

AZ ÁLLATGYÓGYÁSZATI OLTÓANYAGOK ELLENŐRZÉSÉT
SZOLGÁLÓ KUTATÁSOK, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A

LÚD POLYOMAVÍRUS OKOZTA BETEGSÉGÉRE

ÉS A

COLOSTRUM LYMPHOCYTÁK ABSZORBCIÓJÁRA ÚJSZÜLÖTT
MALACOKBAN

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

BERNÁTH SÁNDOR

az állatorvos-tudományok kandidátusa

BUDAPEST, 2008.

4. A liba vérömléses vese- és bélgyulladás (polyomavírus)

betegség vizsgálata

Liba vérömléses vese-bélgyulladás betegség	— <i>Irodalom</i>	44. oldal
Liba vérömléses vese- és bélgyulladás betegség kórfejlődése.		
A liba polyomavírussal fertőzött libaembriók vizsgálata		
— <i>Anyag és módszer</i>		53. oldal
— <i>Eredmények</i>		58. oldal
— <i>Megbeszélés</i>		70. oldal

5. Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója malacokban

Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója	— <i>Irodalom</i>	76. oldal
Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója malacokban		
— <i>Anyag és módszer</i>		78. oldal
— <i>Eredmények</i>		81. oldal
— <i>Megbeszélés</i>		84. oldal

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS HASZNOSÍTÁSUK LEHETŐSÉGEI	91. oldal
--	-----------

ÖSSZEFOGLALÁS	93. oldal
---------------	-----------

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	99. oldal
---------------------	-----------

AZ ÉRTEKEZÉSBEN HIVATKOZOTT IRODALOM	101. oldal
--------------------------------------	------------

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK HELYÉNEK FELSOROLÁSA	118. oldal
--	------------

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ÉS SZAKNYELVI ÍRÁSMÓD

CAM	= chorioallantois-membrán
Clp	= caseinolytic proteases (kazeinolitikus proteázok)
cpm	= counts per minute
DNS	= deoxiribonukleinsav
EID ₅₀	= embryo infective dose ₅₀ (embriók 50 %-át fertőző dózis)
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
EM	= elektronmikroszkóp
FcRn	= neonatalis Fc receptor
GCV	= goose circovirus (liba circovírus)
GHPV	= goose hemorrhagic polyomavirus (liba hemorrhagiás polyomavirus)
GPV	= goose parvovirus (liba parvovírus)
HE	= hemalaun eozin
IF	= interferon
Ig	= immunglobulin
IL	= interleukin
Inl A	= internalin A
Inl B	= internalin B
ip.	= intraperitonealis
kDa	= kilodalton
LD ₅₀	= lethal dose ₅₀ (50 %-ban elhullást okozó dózis)
LPI-1	= listeria pathogenicity island 1 (listeria pathogenitási sziget 1)
LLO	= listeriolysin O (listeriolizin O)
MPA	= Membrane filter method for enumeration of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> angol kifejezés rövidítése
mtsai	= munkatársai
OIE	= Office International des Epizooties (Organisation Mundial de la Sante Animale; World Organization for Animal Health; Állategészségügyi Világszervezet)
PB	= phosphate-buffer (foszfát pufferoldat)
PCR	= polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PC- PLC	= phosphatidylcholine-specific phospholipase C (foszfatidilkolin-specifikus foszfolipáz C)

PI- PLC	= phosphatidylinositol-specific phospholypase C (foszfatidilinozitol–specifikus foszfolipáz C)
PrfA	= Positive regulatory factor A (pozitív szabályozó faktor A)
SDS-PAGE	= sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectro-phoresis (nátrium dodecylszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
sc.	= subcutan
σ^B	= alternatív szigma faktor
TNF	= tumor nekrozis faktor
TSA	= triptikáz-soy agar

A tézisekben a baktériumfajok első említése után a nemzetség neve rövidítve van kiírva, a címek kivételével:

<i>E.</i>	= <i>Erysipelothrix</i>
<i>L.</i>	= <i>Listeria</i>
<i>M.</i>	= <i>Mycoplasma</i>
<i>Ps.</i>	= <i>Pseudomonas</i>

A szakszavak és kifejezések írásmódja az Orvosi szótár (Brencsán 2006) előírásainak felel meg.

ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az Állatgyógyászati Oltóanyag-ellenőrző Intézetben, majd jogutódjában, az Állatgyógyászati Oltóanyag- Gyógyszer- és Takarmány-ellenőrző Intézetben lehetőségem volt feladatainkkal összefüggő vizsgálatok végzésére. Értekezésemben ezek közül öt tárgykör eredményeit foglalom össze a kandidátusi értekezésem védése (1978) utáni időszakból, melyek a következőkben összegezhetők.

Az 1980-as években már elfogadottá vált a szakirodalomban, hogy a *Listeria monocytogenes* fő virulenciafaktora a hemolizin, de nem volt adat arra vonatkozóan, hogy a listeria törzsek által termelt hemolizin mennyisége arányos-e a törzsek virulenciájával. Ezért vizsgáltuk a *L. monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin (listeriolizin O, LLO) mennyisége, és egérkísérletben mért virulenciájuk közötti összefüggést (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989; Bernáth és Pitron 1989).

A nátrium dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) készített proteinképek értékelésénél hagyományosan leggyakrabban valamely frakció létét, vagy hiányát veszik figyelembe, mennyiségi viszonyait, a frakciók nagyságát pedig vizuálisan határozzák meg. Az elmúlt évtizedekben több kórokozó baktériumfaj esetében kimutatták, hogy valamely fontos tulajdonság meghatározott molekulatömegű proteinfrakcióhoz kapcsolódik, mely SDS-PAGE eljárással elválasztható. Ilyen esetben fontos, hogy a frakció nagyságáról is információt kapjunk. SDS-PAGE proteinképek értékelésére alkalmaztunk egy számítógépes programot (Quantiscan for Windows, Biosoft, Cambridge, UK), mely információt ad a frakciók nagyságára vonatkozóan is, és vizsgáltuk az eljárással kapott eredmények reprodukálhatóságát (Bernáth és Morovján 1998).

A *Pseudomonas aeruginosa* gyors kimutatása vízből és a baktériummal szennyezett felületekről fontos feladat, mivel kontamináció esetén fertőzés forrásai lehetnek. A baktérium izolálására korábban kidolgoztak egy szelektív, szintetikus táptalajt (Szita és Bíró 1990; Szita és mtsai 1995). Ismert az is, hogy az impedimetriát alkalmazzák baktériumok gyors kimutatására (Martins és Selby 1980; Colquhoun és mtsai 1995; Flint és Brooks 2001). Vizsgálatokat végeztünk, hogy az impedimetriás

eljárás az említett szelektív táptalaj felhasználásával alkalmas-e *Ps. aeruginosa* kimutatására vízmintákból (Szita és mtsai 2007).

Napos korú libapipék Derzsy betegség elleni szérumos kezelése után nagyarányú elhullást észleltek Magyarországon 1969-ben, melyet a szérumok nem kívánt hatásának kivizsgálásakor a tünetek, a kórbonctani és kórszövetteni elváltozások, a libák fertőzésével nyert adatok, de elsősorban a kórokozóval fertőzött naposlibák hiperimmun szérumokkal végzett védelmi kísérleteinek eredménye alapján egy új, addig ismeretlen betegségnek tekintettünk (Bernáth és Szalai 1970, 1971; Szalai és Bernáth 1971). A beteg libákon észlelt tüneteket és a kórbonctani elváltozásokat Domán (1970), valamint Süveges és Szécsényi (1970), a fertőző anyaggal végzett kísérleti libafertőzések eredményeit Süveges és Szécsényi (1970) is ismertette. A kórokozó azonosítása 1969-1971-ben nem történt meg.

Franciaországban észlelt esetek kapcsán Guerin és mtsai (1999; 2000) azonosították a betegség kórokozóját, és *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV) névvel jelölték. Ezt követően vizsgálatokat végeztünk a GHPV kimutatására a betegség első észlelése idejéből származó fertőző anyagból (Bernáth és mtsai 2001). Munkánk során új adatokat kaptunk a betegség kórfejlődésére vonatkozóan is (Bernáth és mtsai 2002; Dobos-Kovács és mtsai 2005).

Szakirodalmi adatokból ismert, és saját vizsgálataink is igazolták, hogy a liba polyomavírus nem szaporítható szövettenyészetben, így ilyen módon nem volt titrálható. Ezért célul tűztük ki eljárás kidolgozását a vírus titrálására libaembriókon. Leírtuk a vírussal fertőzött libaembriók jellegzetes kórbonctani elváltozásait. Vizsgáltuk továbbá, hogy a liba polyomavírussal fertőzött embriókból kiképző kislábak terjeszthetik-e a libák vérömléses vese- bélgyulladásos betegségét (Bernáth és mtsai 2006).

Egy kutatócsoport tagjaként vizsgáltam, hogy újszülött malacok bél-lumenéből a colostrumban lévő lymphocyták abszorbeálódnak-e, vagyis átjutnak-e az újszülött szervezetébe (Tuboly és mtsai 1988). A vizsgálatok elvégzését az indokolta, hogy az említett fontos tárgykörben szakirodalmi adat nem volt fellelhető.

Az állatgyógyászati készítmények forgalombahozatalának engedélyezési eljárása és minőségük ellenőrzése azt a célt szolgálja, hogy csak egyenletesen jó minőségű, ártalmatlan és hatékony készítmények kerüljenek forgalomba (Bernáth és mtsai 1992; Soós 2000; Bernáth 2006). Az állatgyógyászati készítmények fogalmkörébe egyaránt beletartoznak az oltóanyagok és a gyógyszerkészítmények is. Az elmúlt években feladatom volt az állatgyógyászati gyógyszerkészítmények törzskönyvezés előtti értékelése, és a forgalombahozatali engedély meghosszabbításához kapcsolódó véleményezés. Ebben a témakörben írt közleményeim egy része értelemszerűen a biológiai készítményekre vonatkozóan is figyelembe vehető megállapításokat tartalmaz (Bernáth 1995; Bernáth és mtsai 1996a, 2001b; Bernáth és Némethné-Konda 2006). Ezeket a cikkeket az értekezésben nem tárgyalom, de indokolt esetben hivatkozom rájuk.

Nem tárgyalom az értekezésben azokat a mikrobiológia vagy immunológia tárgykörébe tartozó közleményeket sem, amelyek az 1978-ban írt kandidátusi értekezésemhez kapcsolódnak (Bernáth és mtsai 1987, 1987a, 1989, és 2004), vagy ha a vizsgálatok eredményei elsősorban az élelmiszerhigiéniában hasznosíthatók (Bernáth és mtsai 2000; Szita és mtsai 2003, és közlés alatt; Kiss és mtsai 2006, 2006a, 2007).

IRODALOM ÉS SAJÁT VIZSGÁLATOK

1. A *LISTERIA MONOCYTOGENES* TÖRZSEK ÁLTAL TERMELT HEMOLIZIN MENNYISÉGE ÉS A VIRULENCIÁJUK KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS VIZSGÁLATA

***A Listeria monocytogenes* törzsek virulenciája - Irodalom**

Irodalmi adatok szerint a *L. monocytogenes* virulenciájáért, vagyis támadóképességének fokáért (Varga és mtsai 1999), felelősnek tartott tényezők a hemolizin, a lipolitikus hatású anyagok, továbbá a sejt falban található monocytosist okozó és toxikus lipoid anyagok (Ralovich 1984; Varga 1998).

Az elmúlt években számos kutató foglalkozott a *L. monocytogenes* virulenciatényezőinek vizsgálatával. Megállapították, hogy a virulenciafaktorokat meghatározó gének a kromoszóma két különböző helyén található (Vázquez-Boland és mtsai 2001, Hajtós 2003). Hat virulenciafaktor génje (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* és *plcB*) a *hly* géncsoporton, vagy más néven PrfA függő virulencia géncsoporton található, melyet újabban LIPI-1-nek neveznek a „*Listeria pathogenicity island 1*” elnevezés alapján. A géncsoport által kódolt virulenciatényezők meghatározó fontosságúak a *L. monocytogenes* intracelluláris szaporodásában, és a gazdasejtek közötti terjedésében (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

A *L. monocytogenes* nem fagocita sejtekbe jutásához szükséges internalin A és internalin B proteineket kódoló *inlA* és *inlB* gén egy virulenciaszigetet alkot. A két gént Gaillard és mtsai (1991) és Dramsi és mtsai (1995) írták le. Kifejeződésüket az alternatív szigma faktor (σ^B) szabályozza (Kim és mtsai 2004, 2005; Kazmierczak és mtsai 2006). Tengerimalacokon végzett kísérlet alapján Garner és mtsai (2006) megállapították, hogy a σ^B -nak az *inlA* kifejeződésének szabályozásával meghatározó szerepe van a gastrointestinalis fertőzésben.

Az említett két géncsoport által kódolt virulenciafaktorok funkciója röviden a következőkben összegezhető. A *L. monocytogenes* kórokozóképessége arra

vezethető vissza, hogy a gazdasejteket fagocitózisra tudja készíteni, ezt követően szaporodik a gazdasejtekben, és közvetlenül át tud jutni más sejtekbe is. A baktérium a folyamat során a sejtekben marad, ezért védett a gazdaszervezet számos védekezőrendszere ellen, ideértve az ellenanyagokat és a komplementet (Doyle 2001).

Szájon keresztül történő fertőződéskor a vékonybélben a Peyer-plakkok környékén enterocyták és a macrophag sejtek veszik fel a *L. monocytogenes* baktériumokat, és a macrophagokban jutnak el a vérrel és a lymphával a májba vagy a lépbe. A fertőzés korai szakaszában a májban, és a lépben a neutrophilok és macrophagok száma megnő. Ezek a sejtek, továbbá a CD8⁺ T sejtek (Jiang és mtsai 1997) rátapadnak a listeriákat tartalmazó májsejtekre, és feloldják azokat. Amennyiben a T-sejtes immunitás nem nyújt megfelelő védelmet, akkor a listeriák a hepatocytákban és a macrophagokban szaporodnak. Az utóbbiakban a vérárammal eljutnak különböző szervekbe, így az agyba és a méhbe (Doyle 2001; Vázquez-Boland és mtsai 2001).

A *L. monocytogenes* gazdasejtekbe jutása fontos a szisztémás fertőzés kialakulása szempontjából, mind az eredendően fagocita képességű macrophagokba, mind a nem fagocitáló sejtekbe, mint amilyenek az epithelialis sejtek és a májsejtek (Gaillard és mtsai 1987). A *L. monocytogenes* fagocita sejtek által történő bekebelezésében a C3bi és C1q komplement-receptoroknak van szerepe (Alvarez-Dominguez 1993; Vázquez-Boland és mtsai 2001).

A nem fagocita sejteket a listeriák készítetik fagocitózisra. Azonosították a *L. monocytogenes* felületi proteinjeit, melyek a baktérium nem fagocita gazdasejtekbe jutásához szükségesek. Ezek az internalinok, p60 protein, kazeinolitikus proteázok (Clp) és az ActA protein (Nair 2000, Doyle 2001; Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Internalin A (InlA)

Az InlA volt a *L. monocytogenes* első olyan felületi proteinje, melyről megállapították, hogy a baktérium nem fagocita sejtekbe jutásához szükséges. Az InlA egy 80 kDa nagyságú protein, segíti a bejutást a Caco-2 enterocyta típusú

epithelialis sejtvonalba (Gaillard és mtsai 1991; Vázquez-Boland és mtsai 2001). Az InlA receptora emlős sejteken az E-cadherin, mely úgynevezett transzmembrán sejtadhéziós protein. Fiziológiai funkciója a saját sejtek közötti kapcsolatokban van (Mengaud és mtsai 1996; Cossart és mtsai 2003).

Internalin B (InlB)

A *L. monocytogenes* májsejtekbe jutásában van szerepe, és valószínűleg néhány epithelialis vagy fibroblast-típusú sejtvonal (Vero, HEp-2, Hela, CHO) sejtjeibe jutáshoz is szükséges (Braun és mtsai 1998, 2000; Doyle 2001; Bierne és Cossart 2002). Az InlB egy 65 kDa molekulatömegű protein (Lingau és mtsai 1995). Receptora a Met hepatocita növekedésifaktor receptor, és kapcsolatba lép a gC1qR receptorral és a peptidoglikánokkal is (Cossart és mtsai 2003; Pizarro-Cerda és Cossart 2005)

p60 (iap) protein

A p60 proteint (invasion associated protein) az *iap* gén kódolja. Az *iap* gén működése független a PrfA-tól. A p60 protein a táptalaj felülűszójában és a baktérium sejtfalához kapcsolódva is megtalálható. Az *iap* gén az R teleptípusú törzsekből hiányzik. Ezek a törzsek a virulens törzseknek megfelelő mennyiségű LLO-t termelnek, de virulenciájukat elvesztették. A virulencia hiánya abból adódik, hogy a baktériumok nem tudnak bejutni a gazdasejtbe. Amennyiben a p60 proteint külső forrásból hozzáadjuk az R típusú tenyészethez, akkor a baktériumok láncszerű elrendeződése megszűnik, és helyreáll a virulencia (Vázquez-Boland és mtsai 2001). A p60 protein irodalmi adatok szerint fontos antigén a *L. monocytogenes* elleni immunitás szempontjából is (Harty és Pamer 1995).

Kazeinolitikus proteázok és ATP-áz

A kazeinolitikus proteázok (Clp) mintegy 100 kDa molekulatömegű proteolitikus enzimek, általános stressz proteinek (Doyle 2001).

A ClpC ATP-áz és ClpE *L. monocytogenes* virulenciafaktorok szerepe röviden a következőkben összegezhető. A ClpC ATP-áz segíti a macrophagokban a vacuola membránjának elroncsolását, és ez által a *L. monocytogenes* túlélését a

gazdasejtben. Szerepe van ezen kívül a baktérium sejtekhez történő adhéziójában, és sejtekbe jutásában. Hiánya esetén csökken az InlA, InlB és ActA termelődése, és ezért fontos virulenciafaktor (Nair 2000). A ClpE, mint stresszfaktor szükséges ahhoz, hogy a *L. monocytogenes* a 42 °C-os környezeti hőmérsékletet tartósan túlélje. A baktériumsejt osztódásában van szerepe. A *L. monocytogenes ClpC-ClpE* kettős mutáns egészen vizsgálva apathogen (Nair és mtsai 1999).

A nem fagocita sejtekbe jutást segítő ActA proteint kódoló gén a LIPI-1-en helyeződik, kifejeződését a prfA protein szabályozza, így szerepéről ennél a géncsoportnál esik szó.

A LIPI-1-en lévő *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* és *plcB* géneken kódolt virulenciátényezők szerepe a következő.

PrfA

A *L. monocytogenes prfA* génje kódolja a PrfA (positive regulatory factor A) proteint mely szabályozza a LIPI-1-ben található gének kifejeződését (Herler és mtsai 2001). A PrfA negatív mutáns *L. monocytogenes* virulenciája jelentősen csökken, mintegy ezerszeresen. Kazmierczak és mtsai (2006) a *prfA* gén aktivitását a *plcA* gén kifejeződésének mérésével határozták meg intracellulárisan helyeződő, és gazdasejten kívüli *L. monocytogenes* vizsgálatával. Megállapították, hogy a *prfA* gén aktivitása gazdasejtben mintegy 95-ször nagyobb, mint a sejten kívül.

Foszfatidilinozitol–specifikus foszfolipáz C (PI-PLC)

A *L. monocytogenes* két különböző foszfolipáz C-t szintetizál, úgymint a foszfátidilinozitol–specifikus foszfolipáz C-t (PI-PLC), és a foszfátidilkolin–specifikus foszfolipáz C-t (PC- PLC). Ezek közül a PI-PLC-t a *plcA-prfA* operonon lévő *plcA* gén kódolja. Humán sejtvonalakon végzett vizsgálatban megállapították, hogy a PI-PLC a baktérium elsődleges vacuolából való kiszabadulását segíti (Cossart és mtsai 2003). Az elsődleges vacuola (fagoszoma) akkor alakul ki a *L. monocytogenes* körül gazdasejt sejtmenbránjából, amikor a sejt fagocitálja a baktériumot.

Hemolizin, listeriolizin O (LLO)

A LLO-t kódoló *hly* gén a LIPI-1 központi helyén van. Az említett virulenciatényezők közül a legtöbb kutatás kétségtelenül a hemolizin megismerésére irányult, mely 58 kDa molekulatömegű protein, a tiolaktiválta citolizinek csoportjába tartozik (Low és mtsai 1992; Dubail 2000; Hajtós 2003.). Vizsgálatok igazolták, hogy a kísérleti állatok vénájába adagolva nem csak a vörösvérsejteket károsítja. Nyulakon végzett vizsgálatban kimutatták, hogy károsodnak a vérlemezkék és a fehérvérsejtek is (Siddique és mtsai 1969).

A hemolizin szerepét tisztázó vizsgálatok közül ki kell emelni Gaillard és mtsai (1986) kutatásait, akik a *L. monocytogenes* hemolizin termeléséért felelős *hly* gén transposon mutációjával nem hemolizáló törzset állítottak elő. A törzs elvesztette virulenciáját, nem tudott szaporodni a fertőzött egerekben. A transposon spontán elvesztésével a virulencia helyreállt. A kísérlet eredménye igazolta, hogy a hemolizin termelése meghatározó jelentőségű a virulencia kifejeződése szempontjából. „A *Listeria monocytogenes* virulenciája” témakörrel Párizsban, 1987-ben tartott 3. Mikrobiológiai Fórumon Gaillard és mtsai (1986) eredményeire alapozva fogalmazták meg azt a véleményt, hogy két megfigyelés a hemolizin termelés és a virulencia közti összefüggésre utal:

1. Valamennyi vizsgált, nem hemolizáló *L. monocytogenes* törzs nem pathogen, és minden pathogen *L. monocytogenes* törzs hemolízist okoz véres agaron.
2. Nem hemolizáló mutáns, melyet virulens törzs transposon mutációjával kaptak nem tudott szaporodni a gazdaszervezet reticuloendothelialis sejtjeiben. Az ilyen baktériumok közül azok, amelyek elvesztették az idegen génszakaszt hemolizint termeltek, és a virulencia helyreállt.

Az első ponttal kapcsolatban meg kell említeni: Berencsi és mtsai (1983) is közölték, hogy valamennyi *L. monocytogenes* törzs termelt hemolizint, melyet kóresetekből izoláltak.

A fentiekből Vincente és mtsai (1987) arra következtettek, hogy vagy a hemolizin játszik közvetlenül szerepet a virulencia mechanizmusában, vagy a listeria genomba bevitt génszakasz, mely megakadályozza a hemolizin termelést, gátol más virulencia faktorokat is.

Cossart és mtsai (1989) kutatási eredményei a hemolizin közvetlen szerepére utaltak, mert egyértelműen igazolták a hemolizint kódoló gén jelentőségét a *L. monocytogenes* törzsek virulenciájában. A hemolizin termelést kódoló gén transposon mutációjával nem hemolizáló avirulens törzset állítottak elő, majd másik hemolizint kódoló gént plazmiddal a baktériumba juttatva a virulencia helyreállt. Hasonló eredményről számoltak be Mengaud és mtsai (1989). A hemolizinnek az eddigi vizsgálatok alapján a baktériummal telt sejtvacuolák feloldásában van szerepe (Portnoy és mtsai 1992), de hasonló aktivitása van a foszfolipáz C-nek is (Cossart és mtsai 2003).

A *L. monocytogenes* baktériumot a gazdasejtek fagocitálják, és ekkor alakul ki a sejtmembránból a vacuola a baktérium körül. A baktérium nem hemolizáló mutánsai az eredendően nem fagocita sejtekben egy ideig még élnek a vacuolában, de nem tudnak osztódni, és más sejteket megfertőzni. A „hivatásos” fagocita sejtek csaknem azonnal megkezdik a vacuolákban lévő listeriák elpusztítását, és a baktériumok túlélése attól függ, hogy ki tudnak-e szabadulni a vacuolából. A vacuolamembrán feloldásához a LLO szükséges. Megállapították, hogy a vacuolában gyorsan savas pH (\approx pH 6) alakul ki, mely a LLO maximális aktivitásához szükséges, és folyamat a vacuola membránjának repedéséhez vezet. Ekkor a pH megemelkedik és a LLO inaktiválódik, és így nem tudja károsítani a gazdasejt membránját. A LLO inaktiválásában szerepük van a sejt citoplazmájában és a citosolban lévő enzimeknek is (Doyle 2001; Dramsi és Cossart 2002). A *L. monocytogenes* a gazdasejtben a citosolba kerül, és ott szaporodik.

Metalloproteáz

A két foszfolipáz közül a PI-PLC aktív formában szintetizálódik a baktériumsejtben, míg a PC-PLC inaktív, és aktiválásához a baktérium cink-függő

metalloproteáz enzimje, és a gazdasejt cisztein-proteáz enzimje szükséges. A metalloproteáz enzimet a *mpl* gén kódolja (Coffey és mtsai 2000; Doyle 2001).

ActA protein

A *L. monocytogenes* gazdasejten belüli helyváltoztatásában van szerepe. A baktérium más gazdasejtek irányába történő mozgását az ActA sejtfelületi protein indítja el. Az ActA hatására az aktin molekulákból aktinszálak alakulnak ki. A baktériumok az aktinszálak mentén a sejtmembránig jutnak, és rajta úgynevezett listeria-gubókat képeznek. Ezek előbb a szomszédos sejtekbe beöblösödnek, majd az eredeti sejttől elválva oda átjutnak. Így lehetővé válik a *L. monocytogenes* sejtek közötti közvetlen terjedése úgy, hogy a baktérium nincs kitéve az ellenanyagok hatásának. A baktériumok a szomszédos sejtbe kettős sejtmembránból kialakult, úgynevezett másodlagos vacuolában jutnak át. Kísérletileg is igazolt, hogy a LLO a másodlagos vacuolák feloldásához is szükséges (Doyle 2001).

Az ActA protein a gazdasejt-citosolban több mint 200-szoros mennyiségben termelődik a levestenyészethez viszonyítva (Shetron-Rama 2002). Az ActA proteint az *actA* gén kódolja, melynek elvesztése esetén a *L. monocytogenes* mintegy 60-70-szer kisebb mértékben tudja megfertőzni az epithelsejteket mint az eredeti törzs (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Foszfatidilkolin–specifikus foszfolipáz C (PC-PLC)

A PC-PLC-t a *plcB* gén kódolja és a *L. monocytogenes* sejtek közötti terjedésében van szerepe (Doyle 2001). Megállapították, hogy a LLO-val együttesen a baktérium másodlagos vacuolákból való kiszabadulásánál fejt ki hatását (Cossart és mtsai 2003).

Kutatási eredmények igazolták, hogy a PC-PLC bizonyos esetekben helyettesítheti a LLO-t. Gründling és mtsai (2003) közölték, hogy az általuk vizsgált valamennyi egér sejtvonalon a LLO feltétlenül szükséges volt az elsődleges vacuolák feloldásához. A Henle 407, HEP-2 és HeLa humán epithel–sejtvonalakban viszont a *L. monocytogenes* LLO hiányában is ki tud szabadulni az elsődleges vacuolákból a PC-PLC hatására. LLO-t nem termelő *L. monocytogenes* törzs vizsgálatával kimutatták, hogy PC-PLC termelése megemelkedett a gazdasejtben a

levestenyészethez viszonyítva. Gründling és mtsai (2003) is megerősítették, hogy az enzim humán sejtvonalakon végzett vizsgálat szerint a másodlagos vacuolák feloldásához is szükséges, mely lehetővé teszi a baktérium sejtről sejtre történő terjedését.

Kataláz és szuperoxid dizmutáz

A baktérium elsődlegesen az anyagcsere során keletkező szabad hidroxilgyökök megkötésére termeli ezeket az enzimeket, de ugyanilyen funkciójuk lehet a fertőzés során a gazdaszervezet oxigénhez kötött mikrobiocid aktivitásának semlegesítésében is (Cepeda és mtsai 2006). Csak kis szerepük lehet a *L. monocytogenes* virulenciájában. A kataláztermelés elvesztésének nem volt mérető hatása a virulencia mértékére. A szuperoxid dizmutáz aktivitás elvesztése kicsit csökkentette a baktérium szaporodóképességét egércsontvelőből nyert macrophagokban, és az egerek szerveiben. Az eredmény kettős mutáns baktériumok esetén kifejezettebb volt (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

AgrA protein

Autret és mtsai (2003) kimutatták, hogy az AgrA protein a *L. monocytogenes* által kiválasztott számos protein termelődését befolyásolja, ideértve a LLO-t is. Az *agrA* génszakasz elvesztése esetén egerek iv. oltásával meghatározva mintegy tízszer magasabb baktériumszám az LD₅₀ érték. A viszonylag nem nagy változás arra utal, hogy nincs fontos szerepe a fertőzési ciklusban.

Megállapították, hogy a *L. monocytogenes* virulenciatényezőinek termelődését a környezeti hatások is befolyásolják.

Hőmérséklet

A *L. monocytogenes* 4-25 °C-on történő tenyésztése csökkenti a LLO termelődését, de az eredeti állapot 2 óra alatt helyreáll 37 °C-on. Az adhézión proteinek termelődése megnő 42 °C-on, de ez nem növeli a virulenciát, mert viszonylag kevés ilyen molekulára van szükség baktériumsejtek megtapadásához, és a gazdasejtbe jutáshoz (Doyle 2001).

Vasionok hatása a LLO termelésére

Cowart és Foster (1981) vizsgálatai szerint a táptalaj vasion tartalma fordított arányban van a *L. monocytogenes* által termelt LLO mennyiségével. A vizsgált táptalajok 1-12 $\mu\text{M Fe}^{3+}$ iont tartalmaztak vasitrát formájában.

Ralovich és mtsai (1977) szerint a virulens törzsek jellemzői a következők: béta hemolízis juh- vagy lóvért tartalmazó agaron, lipáz aktivitás, egér pathogenitás intraperitonealis fertőzés után, továbbá patogenitás csirkeembrióra, és keratokonjunktivitist okozó hatás.

Ralovich (1984) közölte, hogy virulens *L. monocytogenes* törzseknél az $\text{LD}_{50} \leq 10^6 - 10^7$ baktérium egér intraperitonealis fertőzésével meghatározva. Az avirulens törzseknél ugyanez az érték mintegy $1,5 \times 10^9$ baktérium. A vizsgálatkor a megfigyelési idő a fertőzés után 7 nap. A csirkeembriók intravénás fertőzésekor a virulens törzseknél, négy napos megfigyelési idővel az $\text{LD}_{50} \leq 6 \times 10^2$ baktérium, szikzsákba oltással meghatározva pedig $\text{LD}_{50} \leq 6 \times 10^4$ baktérium. Az avirulensnek tekintett törzsekkel végzett intravénás fertőzéskor az $\text{LD}_{50} \geq 3 \times 10^6$ baktérium. Keratokonjunktivitist a virulens törzsek esetében több mint 10^6 baktérium okoz (pozitív Anton-féle teszt), míg az avirulens törzseknek nincs ilyen hatásuk.

A *L. monocytogenes* elleni hatékony immunitáshoz antigénstimulusra reagáló T sejtek szükségesek, mivel a mikroorganizmus a megfertőzött szervezetben intracellulárisan helyeződik (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004, Schneider 2004). Az immunitás kialakulása során a citokinek, úgymint az interleukinok (IL), interferonok (IF) és tumor nekrozis faktor (TNF) aktiválják az immunrendszert. Számos citokin segíti a *L. monocytogenes* elleni védekezést. Ezek közé tartozik az IL-1, IL-2, IL-12, INF- γ és TNF- α . A T sejttes immunitás, ha jól funkcionál, felismeri és eliminálja azokat a *L. monocytogenes* sejteket, melyek elkerülik a neutrophil és macrophag sejteket. A CD8^+ T sejtek vesznek részt az elsődleges *L. monocytogenes* fertőzés leküzdésében, és immunmemória kialakulásával jelentős védelmet nyújtanak a másodlagos fertőzésekkel szemben (Seaman és mtsai 2000). Ugyanezen sejtek felismerik a listeriákkal fertőzött sejteket, és lizálják a fertőzött májsejteket (Jiang és mtsai 1997).

Számos közlemény foglalkozik *L. monocytogenes* vakcinák előállításával és vizsgálatával. A vakcinatörzseket több esetben az említett virulencia-gének kiiktatásával állították elő.

Osebold és mtsai (1959) a formalinnal inaktivált és alumínium-hidroxidhoz adszorbeált kísérleti és kereskedelmi *L. monocytogenes* vakcinával juhokat nem tudtak megvédeni a virulens baktériumtenyésztéssel i.v. végzett fertőzéssel szemben. Miller és Czuprynski (2002) eredményei szerint egerek rekonvaleszcens szérummal történő kezelése, vagy formalinnal előlt *L. monocytogenes* orális adagolása nem védte meg az egereket a gastrointestinalis fertőzéssel szemben. Hazánkban elsősorban közegészségügyi megfontolásból csak inaktivált oltóanyag volt forgalomban az 1990-es évek közepéig, mely a juh-listeriosis agyvelőgyulladásos kórformájának megelőzésében szerény eredményeket hozott (Hajtós 2003). A vakcina hatékonysági vizsgálatának kidolgozására végzett vizsgálatok is sikertelenek voltak (Kulcsár 2005). Közlemény jelent meg arról is, hogy a LLO-t nem termelő törzsek nem váltanak ki hatékony immunitást a listeriosis ellen. Az immunitás élő, LLO termelő *L. monocytogenes* törzsekkel váltható ki, és CD8⁺ T sejtekkel vihető át más állatba (Bouwer és mtsai 1999).

Potel és Schulze-Lammers (1985) egy *L. monocytogenes* vakcina előállítását és ellenőrzését ismertették, mely 1968-ban került kereskedelmi forgalomba Németországban. A vakcina 1/2a és 4b szerotípusú *L. monocytogenes* R telepformájú törzsekből szerotipusonként legalább 10^8 élő baktériumot tartalmazott. Előállítása során a tenyésztést 22 °C-on végezték, hogy a flagelláris antigéneket is tartalmazza a vakcina. A vakcina hatékonysági vizsgálata egéren történt, a K védőindex meghatározásával. Az egereket 0,5 ml vakcina s.c. oltásával immunizálták. Az immunizált és kontrol egerek fertőzését tíz nap múlva végezték a vakcinatörzsekkel egyező szerotípusú *L. monocytogenes* virulens törzsek tenyészetekének tízes léptékű hígításaival. A Kärber szerint számított védőindexnek legalább 100-nak kell lenni. A szerzők megállapítják, hogy a vakcinázott egerek vérsavóinak ellenanyag-titeréből nem lehet következtetni a vakcina hatékonyságára.

Norvégiában 1984-ben került kereskedelmi forgalomba egy *L. monocytogenes* baktériumokat tartalmazó vakcina, mely juh adagonként 1/2a és 4b típusú

törzsekből egyenként 10^9 baktériumot tartalmazott. Az adjuvánsként szaponint tartalmazó liofilizált vakcinát visszaoldás után 2 ml-es adagban sc. oltották. A vakcina alkalmazásának első két éves időszaka alapján kérdőíves felméréssel megállapították, hogy a listeriosis előfordulása mintegy 4 %-ról 1,5 %-ra csökkent a vakcinázás hatására. A kezelt állományok 85 %-ában nem figyeltek meg a vakcinázáshoz köthető nem kívánt hatást. Az állományok 10 %-ában pár állatnál étvágycsökkenést észleltek, míg 5 %-ában néhány állatnál átmeneti étvágytalanságot, vagy a vakcinázáshoz köthető megbetegedést diagnosztizáltak. Elhullást nem jelentettek (Gudding és mtsai 1989).

Meg kell említeni, hogy a *L. monocytogenes*-t vírus- és daganatantigének vakcinavektoraként eredményesen alkalmazták állatokon végzett vizsgálatokban, ugyanis alkalmas idegen antigének celluláris immunrendszerbe juttatására. Peng és mtsai (2004) két *L. monocytogenes*-alapú kísérleti vakcinát termeltek, melyek a humán papillomavirus-16 E7 oncoprotein ellen hatékony immunválaszt tudtak kiváltani egereken.

Zhao és mtsai (2005) a *L. monocytogenes dal dat* génjeinek deletiojával olyan baktériumot állítottak elő, mely nem tud D-alanint szintetizálni. Az aminosavat a gerincesek sem szintetizálják. A törzset vakcinavektorként alkalmazva a vakcinához adott d-alanin biztosította egérkísérletben a *L. monocytogenes* ideiglenes túlélését, ameddig az immunitás kialakult. A vakcinatörzs továbbfejlesztését jelentette a *L. monocytogenes dal dat/pRRR* törzs előállítása, amikor is a pRRR suicid plazmid hordozza a *dal* gént, és így a baktérium rövid ideig szintetizálni tudja a D-alanint. A *L. monocytogenes dal dat/pRRR* törzssel oltott egerekben a baktérium 2-3 napig életben marad, hatására LLO-specifikus effektor $CD8^+$ T-sejtek jelennek meg szervezetükben, és az egerek kivédik a *L. monocytogenes* virulens törzssel végzett fertőzést.

Angelakopoulos és mtsai (2002) a vakcinavektor *L. monocytogenes* törzsetek gén-deletioval állították elő. Az *actA/plc* gének deletiojával előállított törzs ártalmatlansági vizsgálatát önkéntes személyeken is elvégezték. A vizsgálat során 10^6 - 10^9 baktérium perorális adagolása után nem észleltek lázas hőemelkedést, vagy hasmenést, és a vérből végzett bakteriológiai vizsgálat negatív eredményt adott. A

vakcinatörzs ürítése négy napon belül megszűnt, egy személy kivételével. Azoknál, akik a legmagasabb dózist kapták *L. monocytogenes* elleni humorális és celluláris immunválaszt mutattak ki.

Az előbbieken említett irodalmi adatok tehát már az 1980-as évek végére egyértelműen igazolták, hogy a *L. monocytogenes* hemolizinnak fontos szerepe van a baktérium által okozott betegség kialakulásában, és ezért a hemolizint a *L. monocytogenes* fő virulencia faktorának tekintették. Nem volt adat arra vonatkozóan, hogy a törzsek által termelt hemolizin mennyisége és a virulencia mértéke között van-e összefüggés. Intézetünkben számos kutatást végeztünk az állatkísérleteket kiváltó alternatív vizsgáló módszerek alkalmazása céljából (Bernáth és mtsai 1979, 1981; Soós 1983; Soós és Bernáth 1985), és felhasználásával (Szent-Iványi és mtsai 1981). Meg kell jegyezni, hogy az alternatív vizsgáló eljárások kidolgozását a szakirodalom jelenleg is igen fontosnak tekinti (Anon 2005). Az említett okok miatt vizsgáltuk, hogy van-e számszerű összefüggés a különböző *L. monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyisége, és az egér intraperitonealis fertőzésével meghatározott virulenciájuk között (Bernáth és Pitron 1989).

Annak ellenére, hogy Magyarországon csak inaktivált *L. monocytogenes* vakcina volt forgalmazását engedélyezték, külföldi gyártók esetenként érdeklődtek Intézetünkben élő törzset tartalmazó vakcina forgalombahozatalának engedélyeztetése ügyében is. Egy ilyen törzs hemolizintermelését és virulenciáját is megvizsgáltuk (Bernáth és Pitron 1989).

A *Listeria monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin mennyisége és a virulenciájuk közötti összefüggés vizsgálata — Anyag és módszer

Baktériumtörzsek és tenyésztésük.

Az első vizsgálatban 12 *L. monocytogenes* törzssel végeztük a kísérletet. Egy külföldi eredetű vakcinatörzs volt (R18), a többi törzset pedig emberből, egészséges juhok bélsarából, hüvelyéből, valamint listeriosisban elhullott juhokból izolálták. A

vizsgálatot körülbelül egy év elteltével a 12 törzs közül 9-el megismételtük (**1. táblázat** 1., 2., 3., 6., 7., 8., 9., 11., és 12. sorszámú törzsei).

A törzsek hemolizáló képességét egy egérpasszázs után 5% juhvért tartalmazó agarlemezen ellenőriztük, majd triptikáz-soy agaron (TSA) tenyésztettük Cole-féle edényben. A baktériumtelepeket 24 órás tenyésztés után edényenként 5 ml fiziológiás konyhasóoldattal lemostuk. Az így kapott baktérium-szuszpenzióknak meghatároztuk az élőcsíraszámát, és ugyanebből a baktérium-szuszpenzióból végeztük el a hemolizin mennyiségének mérését, valamint az LD₅₀ meghatározását egereken. Az élőcsíraszám meghatározása TSA lemezen történt.

Virulencia meghatározása

A baktérium-szuszpenziók húslevesben készített 10-es alapú hígítási sorából hígításonként öt-öt 18-20 g tömegű, CFLP-törzsből származó egérnek 0,5-0,5 ml-t fecskendeztünk i p.-an. A megfigyelési idő egy hét volt. Az LD₅₀ értéket Reed Muench módszerével számítottuk ki (Horváth 1974).

Juhvörösvérsejtek radioizotópos jelölése

A juhvörösvérsejteket háromszor mostuk fiziológiás konyhasóoldatban. Száz ml 2 %-os vörösvérsejt szuszpenzió centrifugált üledékéhez 12 MBq ⁵¹Cr tartalmú Na₂CrO₄-t adtunk (MTA Izotóp Intézete, Budapest; fajlagos aktivitása 1046 GBq/g). A vörösvérsejt-szuszpenziót 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk, 10 percenkénti felrázással. A radioaktivitás 57 %-a kötődött a sejtekhez. Háromszori mosás után a vörösvérsejt szuszpenziót 2 %-ra hígítottuk fiziológiás konyhasóoldattal. A radioaktivitás 98,9 %-a sejthez kötött volt. A minták radioaktivitását NZ 31 típusú Autogamma Spectrometerrel (Gamma Művek, Budapest) mértük.

Hemolízis meghatározása

A baktérium-szuszpenziók hármas léptékű hígításaiból 500 µl-t azonos mennyiségű jelölt vörösvérsejt szuszpenzióval inkubáltuk egy órán keresztül 37 °C-on. Centrifugálás után a felülúszó radioaktivitását mértük.

Az előbbiekkal azonos módon bemért mintákból meghatároztuk a teljes hemolízissel felszabadítható radioaktivitást úgy, hogy a vörösvérsejteket háromszori

fagyasztással, és a mintákkal azonos mennyiségű desztillált vizes kezelésével egy óra időtartamig roncsoltuk. A spontán izotopfelszabadulást úgy határoztuk meg, hogy az izotóppal jelölt vörösvérsejt szuszpenziót egy órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd centrifugálás után a felülúszó radioaktivitását mértük. Minden mintából 3-3 párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

A hemolízis mértékét az alábbi módon számítottuk ki.

Hemolízis-

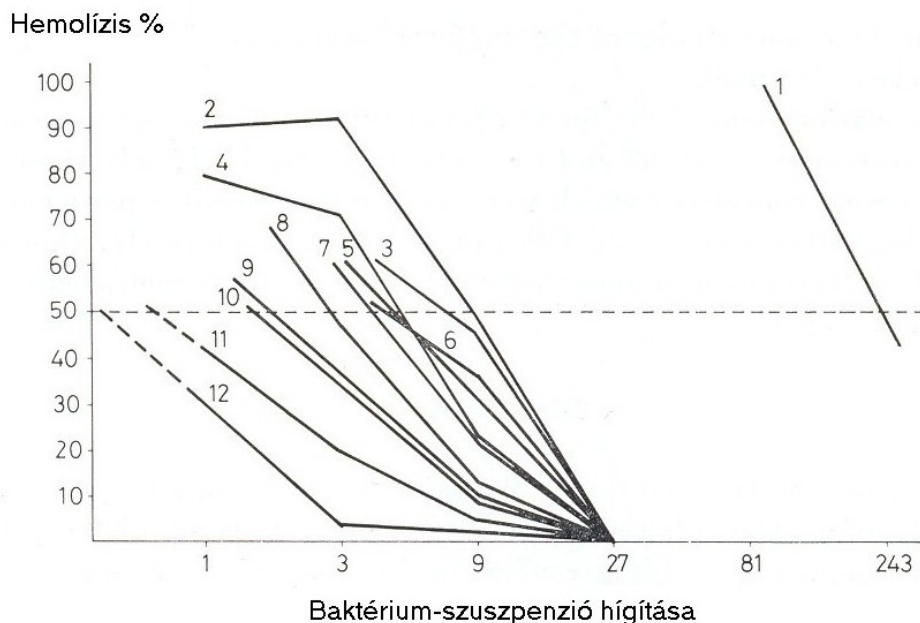
sel felsza- minta felülúszó radioaktivitása, cpm — spontán felszabaduló radioakt., cpm
baduló = $\frac{\text{-----}}{\text{-----}} \times 100$
radioak- maximális felszabadítható radioakt., cpm — spontán felszabaduló radioakt., cpm
tívítás %

Ezt követően kiszámítottuk a listeria törzsek 50 %-os hemolízist okozó hígításainak értékei és egér LD₅₀ értékei közötti korrelációs koefficiens, és a t értéket (Horváth 1974).

A *Listeria monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin mennyisége, és a virulenciájuk közötti összefüggés vizsgálata — *Eredmények*

A kísérletekben a *L. monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyisége és egér intraperitonealis fertőzésével mért virulencia közötti összefüggést vizsgáltuk (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989). Az első kísérletben 12 listeria törzs, majd egy év múlva egy második kísérletben ezek közül kilenc által termelt hemolizin mennyiségét, és egéren mért virulenciáját hasonlítottuk össze. Mindkét esetben valamennyi törzs kétféle vizsgálata, és az élőcsíraszám meghatározása egyidejűleg, párhuzamosan történt, az azonos körülmények biztosítása érdekében. A törzsek alap-baktériumszuszenzióinak élőcsíraszámában észlelt kismértékű elérés a hemolízis és egérvirulencia összefüggésének vizsgálatát nem befolyásolta. A két összehasonlított érték meghatározása ugyanis minden törzs esetében egy baktérium-szuszenzióból történt. A számításoknál azt vettük figyelembe, hogy az adott törzsből készült baktérium-szuszenzió hány-szoros hígítása okoz a vizsgálati rendszerben 50 %-os hemolízist, illetve mennyi egér LD₅₀-t tartalmaz 0,5 ml-ben.

A 12 *L. monocytogenes* törzs hemolizáló hatásának vizsgálati eredménye az **1. ábrán** látható. Megállapítható, hogy a vizsgált törzsek közül 2 kevés, 9 közepes mennyiségű, 1 nagy mennyiségű hemolizint termelt.



1. ábra 12 *Listeria monocytogenes* törzs hemolizintermelő képessége. A horizontális szaggatott vonal jelzi a törzsek 50 %-os hemolizintermelő képességét.

A 12 *L. monocytogenes* törzs vizsgálatának adatait, vagyis a felhasznált hígítatlan baktérium-szuszpenziók élőcsíraszámát, továbbá ezek 50 % hemolizist okozó hígítását és egér LD₅₀ értékét 0,5 ml baktérium-szuszpenzióban az **1. táblázat** tartalmazza.

Az eredményekből megállapítható, hogy esetenként nagy mennyiségű hemolizint termelő törzshöz alacsony egér LD₅₀ érték tartozik. Példaként említhető az R-18 jelzésű *L. monocytogenes* külföldi eredetű vakcinatörzs (**1. táblázat** 2. sorszám), mely avirulensnek minősül ($3,6 \times 10^9$ baktérium $10^{1,7}$ egér LD₅₀), és a vizsgált 12 törzs közül csak egynek volt magasabb a hemolizin termelése. Máskor kevés hemolizint termelő törzs 0,5 ml baktérium-szuszpenziója viszonylag magas egér LD₅₀-et tartalmazott. Ilyen például a 11. törzs.

A 12 törzs hemolizis és egérvirulencia vizsgálatokban kapott eredményéből kiszámítható volt a két jellemző közötti korrelációs együttható, ami $r = 0,408$ értéknek felelt meg. Ha az első kísérletből csak azt a kilenc törzset vesszük

figyelembe, melyek egy év múlva újra vizsgálatra kerültek, akkor az $r = 0,448$ értékű volt. Egy év elteltével ismételten vizsgált 9 törzsnél a hemolizintermelés és egérvirulencia közötti összefüggést $r = 0,163$ korrelációs együttható jellemezte.

1. táblázat A *Listeria monocytogenes* törzsek hemolizin termelő képessége és az egér LD₅₀ értékek

A törzs			Baktériumszuszpenzió élőcsíraszám 0,5 ml-ben	Baktériumszuszpenzió 50% hemolizist okozó hígítása#	Egér LD ₅₀ /0,5 ml #
sorszám	jelzése	szerotípusa			
1	Juh nyirokcsomó	1/2	$3,8 \times 10^9$	1 : 237,6	$10^{4,0}$
2	R-18	1/2	$3,6 \times 10^9$	1 : 8,8	$10^{1,7}$
3	Bp-20 ⁺	4	$3,6 \times 10^9$	1 : 8,0	$10^{3,5}$
4	Karancs	1/2	$4,3 \times 10^9$	1 : 5,4	$10^{2,84}$
5	Sur ⁺	1/2	$7,0 \times 10^9$	1 : 5,2	$10^{2,85}$
6	Sárszentágota ⁺	1/2	2×10^{10}	1 : 4,8	$10^{2,5}$
7	22 Oe juh bélsár	1/2	$2,4 \times 10^9$	1 : 3,8	$10^{4,0}$
8	AU	1/2	$3,3 \times 10^9$	1 : 2,97	$10^{1,1}$
9	Pásztó ⁺	1/2	$2,7 \times 10^9$	1 : 1,79	$10^{2,5}$
10	Bodajk ⁺	1/2	$2,9 \times 10^9$	1 : 1,73	$10^{3,17}$
11	22 Oe juh hüvely	1/2	$3,8 \times 10^9$	1 : —1,73 ⁺⁺	$10^{3,37}$
12	OU juh nyirokcsomó	1/2	$2,2 \times 10^9$	1 : —2,47 ⁺⁺	$10^{1,0}$

⁺ Juhagyvelőből izolált törzsek. ⁺⁺ Számított érték. # Az értékek a vizsgált baktériumtörzsek tenyészetének hígítatlan alapsuszpenziójára vonatkoznak.

Korrelációs együttható: $r = 0,408$ $t = 1,42$

A *Listeria monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin mennyisége, és a virulenciájuk közötti összefüggés vizsgálata - Megbeszélés.

Az eredmények alapján elsőként állapítottuk meg, hogy nem mutatható ki összefüggés, a *L. monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyisége és az egéren intraperitonealis fertőzéssel mért virulencia között. Megállapítható tehát, hogy egy *L. monocytogenes* törzs által termelt hemolizin mennyiségéből nem lehet következtetni a virulencia mértékére (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989).

A törzsek által termelt hemolizin mennyisége és a virulencia közötti összefüggést értékelve a miénkhez hasonló eredményről számoltak be Kathariou és mtsai is (1988). *L. monocytogenes* törzseket 4 °C-on tartósan tárolva, vagy 56 °C-on egy éjszakán át inkubálva úgynevezett hiperhemolizáló törzseket állítottak elő. Az eredeti és a hiperhemolizáló mutáns virulenciáját egér intravénás fertőzéssel vizsgálták. A kétféle baktériumokat a kísérleti állatok lépéből ugyanolyan számban tudták visszaizolálni. Megállapították, hogy nincs közvetlen összefüggés a *L. monocytogenes* által in vitro termelt hemolizin és a virulencia között, mert a hemolizintermelés változása nem befolyásolja a virulenciát. Meg kell említeni, hogy Kathariou és mtsai közleménye ugyan 1988-ban megjelent, de szerkesztőségbe küldésének időpontja 1987. július 8., a mi dolgozatunknál ez az időpont 1987. március 17. (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989).

Később számos munka megerősítette eredményünket. Waseem és mtsai (1995) közölték, hogy nyúlön intravénás fertőzéssel végzett 6 passzázs során a vizsgált *L. monocytogenes* törzs morfológiai, biokémiai és szerológiai jellemzői nem változtak. Ezzel szemben a 6. passzázs után izolált törzsnek alacsonyabb volt az in vitro mért hemolitikus aktivitása és magasabb a nyúlön mért virulenciája, mint a kísérlet kezdetén. Az eredményből arra következtettek, hogy a listeriolizin (hemolizin) in vitro termelésének szintje nem párhuzamos a nyúlön mért virulenciával, és közleményünkre hivatkozva megállapították, hogy hasonló eredményről számoltunk be korábban mi is (Bernáth és Pitron- Szemerédi 1989).

Talbouret és mtsai (1991) és Roche és mtsai (2001) is megerősítették, hogy nincs összefüggés a *L. monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin mennyisége és virulenciájuk között. Meg kell említeni, hogy az utóbbi szerzők a *L. monocytogenes* plakk vizsgálatát HT-29 humán adenocarcinoma sejtvonalon alkalmasnak tartják a virulencia mérésére.

Vizsgálatokkal igazolták, hogy egyes virulenciatényezők elvesztése jelentősen csökkentette a *L. monocytogenes* virulenciáját, és néhány tényező esetében ennek mértékét számszerűen is meghatározták.

A *L. monocytogenes* *prfA* génje kódolja a PrfA (positive regulatory factor A) proteint, mely a LIPI-1-ben található gének kifejeződését szabályozza (Herler és mtsai 2001). A PrfA negatív mutáns *L. monocytogenes* virulenciája az eredeti törzshöz viszonyítva mintegy ezerszeresen csökken (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Az ActA sejtfelületi proteinnek a *L. monocytogenes* gazdasejten belüli helyváltoztatásában van szerepe. Az ActA hatására az aktin molekulákból aktinszálak alakulnak ki, és a baktérium más gazdasejtek irányába történő mozgását indítja el. Az ActA proteint kódoló *actA* gén elvesztése esetén a *L. monocytogenes* mintegy hatvanszor-hetvenszer kisebb mértékben tudja megfertőzni az epithelsejteket, mint az eredeti törzs (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Az AgrA protein a *L. monocytogenes* által kiválasztott számos protein, így a LLO termelődését is befolyásolja. Az *agrA* génszakasz elvesztése esetén egerek intravénás oltásával meghatározva mintegy tízszer nagyobb baktériumszám az LD₅₀ érték, mint a gén deletioja előtt (Autret és mtsai 2003).

A *L. monocytogenes* *iap* génjének elvesztése R teleptípus kialakulását eredményezi, mert a baktérium nem termel p60 antigént. Ezek a törzsek az eredeti, virulens törzseknek megfelelő mennyiségű LLO-t termelnek, de virulenciájukat elvesztették, mert a baktérium nem tud bejutni a gazdasejtbe (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

A felsorolt adatok egyértelmű magyarázatát adják annak, hogy miért nem lehet egy virulenciatényező mennyiségéből következtetni a törzsek virulenciájának mértékére.

Hangsúlyozva a hemolizin igen fontos szerepét, az említett tényezők összességükben határozzák meg a törzsek virulenciáját.

2. ELJÁRÁS SDS-PAGE PROTEINKÉPEK SZÁMÍTÓGÉPES ÉRTÉKELÉSÉRE

Eljárások SDS-PAGE proteinképek értékelésére — *Irodalom*

Az SDS-PAGE módszert gyakran alkalmazzák különböző baktériumtörzsek proteinösszetételének vizsgálatára. Az immunogenitás szempontjából fontos proteinantigének meghatározására a baktériumsejt felületén lévő proteineket vizsgálták, és kimutatásuk immunoblot eljárással történt (Lachmann és Deicher 1986; Groschup és mtsai 1991; Varga 1991; Timoney és Groschup 1993). A baktériumfajok vagy törzsek proteinösszetételének összehasonlításakor a teljes baktériumsejtből készült fehérjekivonatot vizsgálták. A frakciók kimutatása ilyenkor festéssel (Tamura és mtsai 1993; Bernáth és mtsai 1998, 2001a; Dicker és mtsai 2000), vagy a proteinek radioizotópos belső jelölése esetén autoradiográfiával történt (Sántha és mtsai 1988; Bernáth és mtsai 1997).

Az SDS-PAGE eredményeinek értékelésére, a baktériumtörzsek proteinösszetételének összehasonlítására többféle módszert alkalmaznak. Leggyakrabban az elektroforézissel nyert proteinképben lévő azonos molekulatömegű proteinfraakciókat, vagy hiányukat értékelik vizuális összehasonlítással (Berber 2004). A baktériumtörzsek SDS-PAGE proteinképe esetenként negyvennél több frakciót mutat, ezért értékelésük bonyolult feladat (Clink és Pennington 1987). Az értékeléskor a frakciók startponttól mért távolsága mintegy 1 mm pontossággal mérhető meg, de nehezíti a pontos mérést, hogy gyakran eltérő szélességű frakciókat kell összehasonlítani. Esetenként csak a nagyobb frakciókat veszik figyelembe a proteinképek összehasonlításakor (Tamura és mtsai 1993), amelyek kiválasztása szubjektív. A vizsgált törzsek proteinképének denzitometriás ábrázolása segíti a feladat elvégzését. A vizuális vagy denzitometriás összehasonlítás számszerű értékeléssel is történhet. Ilyenkor a két összehasonlított törzsben található egyező és különböző molekulatömegű proteinfraakciók számából határozzák meg a hasonlóság százalékos arányát (Clink és Pennington 1987). A számszerű eredmény segíti az értékelést, de az eljárás hiányossága, hogy nem ad

információt frakciók méretéről. A harmadik eljárást, a proteinkép denzitometriás mérési eredményeinek számítógépes összehasonlítását is régóta alkalmazták (Kersters és De Ley 1975; Jackman 1982). Ilyenkor a proteinképeken a startponttól azonos távolságokban mért denzitometriás értékeket hasonlítják össze. Az összehasonlítandó proteinképekben lévő homológ frakciók mérésénél néhány tized milliméteres eltérést nem lehet kiküszöbölni (Kersters és De Ley 1975). Egy viszonylag kis eltérés a mintegy 100 denzitometriás mérési helyen előnytelenül befolyásolhatja az eredményeket. A módszerrel az eredmények reprodukálhatóságának vizsgálatakor 82-97 % (Kersters és De Ley 1975), illetve 82 % hasonlóságot találtak (Jackman 1982).

Az SDS-PAGE vizsgálat eredményét számos tényező befolyásolja, mely nehezíti a vizsgálat körülményeinek reprodukálását. Ennek oka, hogy az elektroforezissel elválasztott komponensek makromolekulák, és az elválasztás körülményeiben bekövetkező kis eltérések is befolyásolják azok alakját, felületi polaritás- és töltésviszonyait, vagyis azokat a tulajdonságokat, amelyeken az elválasztás alapul. A proteinképek intenzitása a festéstől és festékkivonástól függ. A festék-kimosási eljárás nehezen standardizálható (Békés és mtsai 1988). Az említett okok miatt célszerű az egyidejűleg készített proteinképek összehasonlítása.

A festésre használt színezékek a fehérjék aminosav oldalláncjaihoz kötődnek. A fehérjesávok színintenzitás különbségei adódhatnak az eltérő aminosav-összetételből, de az eltérő fehérjemennyiségből is (Békés és mtsai 1988). Az említett hibalehetőséggel azonos baktériumfajhoz tartozó törzsek vizsgálatánál nem kell számolni.

Az elektroforézises proteinképek értékelésére az úgynevezett relatív mobilitás-adatok bevezetését ajánlják. Ez azon alapul, hogy megfelelő molekulatömegű standardok keverékét, vagy egy referencia mintát kiválasztanak, melyet standardként kezelnek, és mindig együtt futtatják a vizsgálandó mintákkal. A referencia sávok aktuális mobilitási adataiból, meghatározható a vizsgálandó minták sávjainak relatív mobilitása, és az eredmények megfelelő értékelésével lehetséges az egymástól kissé eltérő kísérleti körülmények (különböző gél-koncentráció,

puffer, készülék), illetve más laboratóriumokban kapott eredmények összehasonlítása. Természetesen a kiértékelés egzaktásával szemben támasztott igény nagymértékben függ az alkalmazási céltól (Békés és mtsai 1988).

A vizsgálat körülményeinek nehéz reprodukálhatósága miatt munkánk során mindig csak egyidejűleg előkészített mintákból, azonos elektroforézisben kapott elektroforegramokat hasonlítottunk össze. A mintákkal egyidejűleg magas molekulatömegű és alacsony molekulatömegű standardokat is elektroforetizáltunk (Bernáth és Morovján 1998). Először *Mycoplasma gallisepticum* törzsek proteinösszetételét vizsgálatuk SDS-PAGE-el intézetünkben, az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézet szakembereivel együttműködve (Sántha és mtsai 1988). Az 1980-as években több új mycoplasma fajt írtak le. A törzsek fajokba sorolása elsősorban szerológiai és biokémiai tulajdonságaikon alapult, részletesebb jellemzésüket pedig proteinjeik elektroforézis vizsgálata, DNS restrikciós analízise, és a nukleinsav hibridizáció tette lehetővé. Megállapították, hogy az *Ureaplasma urealyticum* törzsek polipeptid és DNS restrikciós kép alapján két csoportba sorolhatók (Razin és Yogev 1986).

Az említett kutatási eredmények alapján indokoltnak látszott, hogy elemezzük különböző *M. gallisepticum* törzsek SDS-PAGE proteinképét és DNS hasítási képét. Hat *M. gallisepticum* törzs proteinösszetételét vizsgáltuk proteinjeik L [³⁵S] metioninnal való belső jelölése és SDS-PAG elektroforézise után autoradiográfiával. A vizsgált törzseknek a fajra jellemző egyforma proteinképe volt, mely a törzsekre jellemző kis különbségeket mutatott. A vizsgált törzsek proteinképeinek a különbségei kevésbé voltak kifejezettek, mint ugyanazon törzsek DNS restrikciós vizsgálatával megállapított genetikai különbségek, de háromszor ismételt vizsgálatban is kimutathatók voltak (Sántha és mtsai 1988). Eredményünket, vagyis az *M. gallisepticum* törzsek SDS-PAG elektroforézissel kapott proteinképeinek eltéréseit később több közlemény megerősítette (Milošević-Berlič és mtsai 2000; Noormohammadi és mtsai 2002). Az utóbbi szerzők a *M. gallisepticum* ts-11 és S6 törzseivel végzett indirekt ELISA vizsgálatok alapján megállapították, hogy az eltérő antigénprofil miatt a szerodiagnosztikai vizsgálat érzékenységének a növelése érdekében célszerű azonos törzsből származó antigént használni.

Az elmúlt évtizedekben több kórokozó baktériumfaj vizsgálata során megállapították, hogy valamely molekulatömegű protein a kóroktan, vagy az immunogenitás szempontból meghatározó. Régóta vannak ilyen adatok egyes baktérium exotoxinokra vonatkozóan. A *Clostridium perfringens* ϵ prototoxin 37,6 kD, az ϵ toxin 31,6 kDa (Sakurai és Nagahama 1985), a β toxin pedig mintegy 30 kD molekulatömegű (Varga 1998).

Számos kutató vizsgálta az *E. rhusiopathiae* protektív antigénjeit. Megállapították, hogy a fő immunogén antigén 64-67 kD tömegű (Timony és Groshup 1993; Kitajima és mtsai 2000). Sato és mtsai (1999) szerint a 64-67 kD tömegű proteinből 0,58 μ g, a 43 kD-osból pedig 0,63 μ g egerek immunizálásakor az 50 %-os védőadag. A 43 kD-os protein a fő immunogén antigén degradációs terméke. Yamazaki és mtsai (1999) igazolták, hogy 100 μ g 64-67 kDa tömegű protein kétszeri adagolásával immunizálhatók voltak a sertések. Kitajima és mtsai (2000) immunoblot eljárással megállapították, hogy az *E. rhusiopathiae* 2a típusú törzsek között a 67 kD tömegű protektív antigén termelése szempontjából lényeges különbségek vannak. A nagyobb mennyiségű ilyen antigént tartalmazó törzsekből készített vakcinák jobban immunizálták az egereket, mint amelyek kevesebbet tartalmaztak.

A vakcinák gyártása során is alkalmazzák az SDS-PAGE módszert, egyrészt az antigéntermelés ellenőrzésére, másrészt azt vizsgálják, hogy az inaktiválás nem roncsolja-e el a protektív antigéneket. Ilyen hasznosításról számoltak be Chapek és mtsai (2004) a *M. bovis* vakcina gyártásánál, amikor a Vsp C, Vsp A és Vsp O antigének épségét vizsgálták vakcina előállításánál.

Az SDS-PAGE proteinképek értékelésére korábban alkalmazott eljárások nem szolgáltatottak adatot a frakciókban lévő protein mennyiségére vonatkozóan. Ezért vizsgálatokat végeztünk egy olyan számítógépes vizsgáló módszer alkalmazásával (Quantiscan for Windows, Biosoft, Cambridge, UK), mely az egyes frakciók nagyságára vonatkozóan is ad információt (Bernáth és Morovján 1998).

Eljárás SDS-PAGE proteinképek számítógépes értékelésére — *Anyag és módszer*

Baktériumtörzs és tenyésztése

A vizsgálatokat *E. rhusiopathiae* 1a szubtipusú törzssel végeztük, melynek jelzése ATCC 35426 (A-360). A törzs tenyésztéstől kezdett négy párhuzamos vizsgálatát végeztük el, egyidejű minta-előkészítéssel, SDS-PAGE-el és értékeléssel. A következő szemiszintetikus folyékony táptalajt használtuk: 9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 g Pepton Bacto D, 5 g élesztőkivonat, 0,5 g L-arginin, 0,5 g Tween 80, 1000 ml desztillált víz. A pH-t nNaOH -al 7,8-8,0-ra állítottuk. Az autoklávozás áramló gőzben 30 percig történt (Feist 1976). A törzset 24 órás agartenyészetéről oltottuk a folyékony táptalajba, és 37 °C-on 24 óráig inkubáltuk. A tenyészetek bakteriológiai tisztaságát agar táptalajon ellenőriztük.

A vizsgálati anyag előkészítése elektroforézishez

A baktériumtenyészetet centrifugáltuk 3000 g-vel 30 percig, a baktériumokat háromszor mostuk foszfát pufferben. Ezután az üledéket reszuszpendáltuk azonos mennyiségű foszfát-pufferben. A mintegy 500 μl mennyiségű baktériumszuszpenziót jéggel hűtöttük, feltárását 50 W teljesítményű ultrahangkezeléssel végeztük 30 másodpercig, Laborsonic L (B. Braun Diessel Biotech, Melsungen, BRD) készülékkel. A minták centrifugálása után meghatároztuk a felülúszók proteintartalmát Folin fenol reagenssel (Lowry és mtsai 1951). Az elektroforetizált minták mennyisége 50 μl volt, mely három mintában 25 μg proteint, egyben pedig mintegy 50 μg proteint tartalmazott.

SDS-PAGE elektroforézis

A függőleges SDS-PAGE elektroforézist BIO-RAD proteán II. készülékkel végeztük. A startgél 4%-os, az elválasztó gél 10%-os volt. A vizsgálandó mintákkal együtt mindig futtattunk magas- és alacsony molekulatömegű standardokat is. A proteinfrakciók kimutatása Coomassie Brilliant Blue festéssel történt.

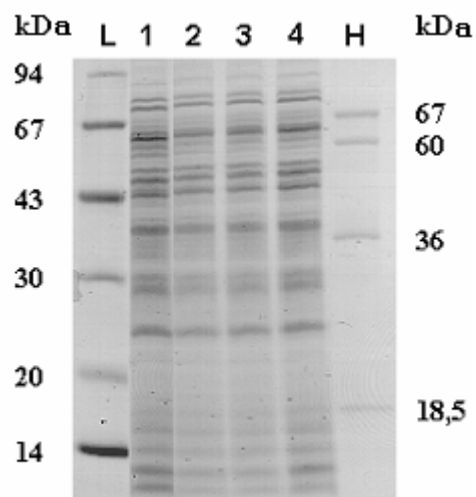
Az eredmények értékelése

A baktériumtörzsek és a standardok gél-elektroforetogramját szárítás nélkül, scanner-el digitalizáltuk, és a digitalizált képet Quantiscan for Windows (Biosoft,

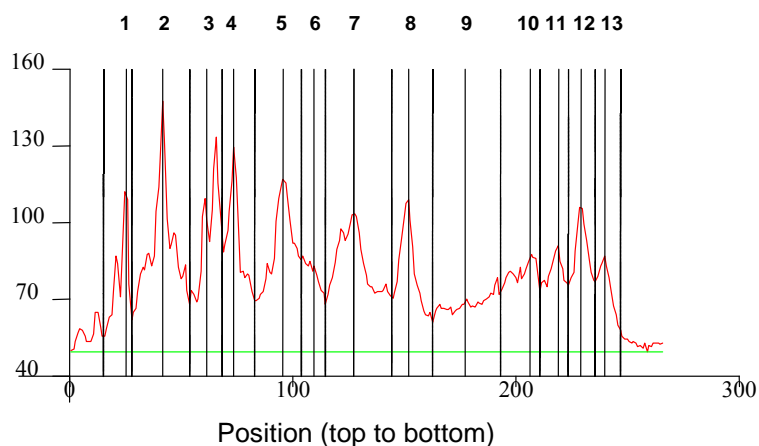
Cambridge, U.K.) program segítségével értékeltük. A proteinképek tengelyének vonalában megkaptuk a proteinkép denzogramját. A denzogramon a proteinfraekciók csúcsokként jelentek meg. A denzogramot a csúcsoknak megfelelően 13 részre osztottuk. Számítógépes program segítségével, integrálással meghatároztuk az egyes szakaszokra eső csúcsok alatti területet, melyeknek összege a görbe alatti teljes terület. Az adatokból kiszámítható, hogy az egyes szakaszok területe mennyi százalékát képviselik a teljes területnek. Vizsgálatunkban mindegyik elektroforetogramot 13 érték jellemzett, melyekből két proteinkép hasonlósága a Pearson-féle korrelációs együttható (Johnson és Wichern 1982) kiszámításával határozható meg. Az eredményeket 1000-el szoroztuk a törtszámok kiküszöbölése érdekében. Ilyen módon 1000 a teljes azonosságnak felelt meg, míg teljesen eltérő adatok esetén az érték 0.

Eljárás SDS-PAGE proteinképek számítógépes értékelésére - *Eredmények*

Az *E. rhusiopathiae* 1a szubtipusú ATCC 35426 (A-360) törzs négy párhuzamos vizsgálatát végeztük el. Az SDS-PAGE elektroforézissel és Coomassie Brilliant Blue festéssel kapott proteinképeket (**2. ábra**) scanner-el digitalizáltuk. A Quantiscan for Windows (Biosoft, Cambridge, U.K.) program segítségével a proteinképek tengelyének vonalában megkaptuk a proteinkép denzogramját. A denzogramot a csúcsoknak megfelelően osztottuk fel (**3. ábra**). Az egyes szakaszokra eső csúcsok alatti terület (Peak1-13) összege a görbe alatti teljes terület (Peak 14) (**3. ábra**). A teljes proteinképet a 7827,57 szám jellemzi, a 64-67 kDa-os csúcsot pedig az 1065,29 szám. Az adatokból kiszámítható az egyes szakaszok területe mennyi százalékát képviselik a teljes területnek. Az *E. rhusiopathiae* ATCC 35426 (A 360) törzsből nyert mintában például a 64-67 kDa molekulatömegű protein 13,6 arányszámot adott. Vizsgálatunkban mindegyik elektroforetogramot 13 érték jellemzett, melyekből két proteinkép hasonlósága a Pearson-féle korrelációs együttható (Johnson és Wichern 1982) kiszámításával határozható meg. A proteinképek hasonlóságának értékelését valamennyi lehetséges párosításban elvégeztük. Egy proteinkép másik három képhez viszonyított hasonlóságának mértéke a **2. táblázat**ban látható.



2. ábra *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 35426 (A360) törzs SDS-PAGE protein elektroforetogramjai. Jelzések: 1-4: négy teljes párhuzamos vizsgálat eredménye. H: = magas molekulatömegű standardok. L = alacsony molekulatömegű standardok.



Peak	Position	Units	Net Area
Peak 1	25.16	25.00	347.48
Peak 2	41.94	41.00	1065.29
Peak 3	65.81	65.00	676.05
Peak 4	73.55	73.00	636.76
Peak 5	95.48	95.00	835.81
Peak 6	109.68	109.00	347.57
Peak 7	127.10	127.00	1032.10
Peak 8	151.61	151.00	576.33
Peak 9	177.42	177.00	563.90
Peak 10	206.45	206.00	558.38
Peak 11	218.71	218.00	405.95
Peak 12	229.03	229.00	478.29
Peak 13	239.61	239.00	303.67
Peak 14	127.10	127.00	7827.57

3. ábra *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 35426 törzs SDS-PAGE protein képének denzogramja. A proteinkép a csúcsoknak megfelelően van felosztva: 1-13. A vékony vertikális vonalak jelzik az értékelési szakaszok határait.

Az *E. rhusiopathiae* ATCC 35426 (A 360) törzsnek a tenyésztéstől kezdett négy párhuzamos vizsgálatok a Pearson-féle korrelációs együttható (Johnson és Wichern 1982) kiszámításával az eredmények $988 \pm 0,55$ egyezést mutattak. Jelentős mértékben az sem befolyásolta az eredményeket, hogy az 1. sorszámú minta mintegy kétszeres proteinnennyiséget tartalmazott. Ennek a proteinképnek a hasonlósága a másik három proteinképhez viszonyítva 985 ± 6 volt (**2. táblázat**).

2. táblázat *E. rhusiopathiae* ATCC 35426 jelű törzs négy egyidejű párhuzamos vizsgálatával nyert proteinképek összehasonlítása Pearson korrelációval.

A proteinképek sorszáma a 3. ábra szerint	A denzitometriás görbe alatti teljes területet reprezentáló szám	A proteinképek hasonlósága a másik három proteinképhez viszonyítva
1	15 448	985 ± 6
2	6 351	992 ± 4
3	6 562	987 ± 7
4	7 828	991 ± 4

Eljárás SDS-PAGE proteinképek számítógépes értékelésére – *Megbeszélés*

Baktériumtörzsek SDS-PAGE proteinképeinek értékelésére egy számítógépes programot (Quantiscan for Windows, Biosoft, Cambridge, UK) alkalmaztunk (Bernáth és Morovján 1998). A program funkciójában hasonló a denzitometrikhez, és alkalmas PAGE, agaroz gél és vékonyréteg-kromatográfiás képek értékelésére. A program elfogad értékelésre képeket közvetlenül is megfelelő scannerről, és csaknem valamennyi nem tömörített TIF vagy BMP file értékelhető vele.

Munkánk során vizsgáltuk, hogy az eljárás mennyire alkalmas baktériumok SDS-PAGE proteinképeinek értékelésére, ennek kapcsán ellenőriztük a módszer pontosságát. Az *E. rhusiopathiae* ATCC 35426 (A 360) törzsnek a tenyésztéstől kezdett négy párhuzamos vizsgálatok a Pearson-féle korrelációs együttható

(Johnson és Wichern 1982) $988 \pm 0,55$ volt, tehát az eredmények jó egyezést mutattak (Bernáth és Morovján 1998).

Az SDS-PAGE-t gyakran használják egy fajhoz tartozó baktériumtörzsek proteinképének vizsgálatára és összehasonlítására. A Quantiscan for Windows (Biosoft, Cambridge, UK) számítógépes program a proteinképet denzogramként ábrázolja, melyen a proteinfraciók csúcsokként jelennek meg. A denzogramokon a proteincsúcsoknak megfelelő számú értékelési szakasz jelölhető ki. A számítógépes program által meghatározott a teljes görbe alatti és az egyes szakaszokra jutó területekből kiszámítható, hogy az egyes értékelési szakaszok területe hány százalékát képviseli a teljes görbe alatti területnek. Ezekből az arányszámokból a Pearson-féle korrelációs együtthető (Johnson és Wichern 1982) kiszámításával meghatározható két minta proteinképének hasonlósága. Másrészt az arányszám információt jelent valamely frakció nagyságáról, például egy baktériumfajhoz tartozó törzsek egyidejű vizsgálata, és összehasonlítása esetén.

A vizsgálatkor az értékelési szakaszhatárok igen pontosan beállíthatók. Természetesen minden vizsgálatba beiktattuk alacsony és magas molekulatömegű standardokat is. Amennyiben a proteinképek hossza nem azonos egy vizsgálatban, akkor az értékelési szakaszhatárok kijelölésénél lineáris korrekciót kell alkalmazni.

A baktériumtörzsek proteinjének SDS-PAGE elektroforézis vizsgálatánál az eredmények reprodukálhatóságát befolyásoló tényezők között említik a tenyésztés feltételeit, az extraktumok centrifugálásának idejét, sebességét és az elektroforézis során lehetséges eltéréseket (Kersters és De Ley 1975). Az SDS-PAGE vizsgálat eredményét befolyásolja minden olyan változás, mely hatással van a vizsgált makromolekulák alakjára, felületi polaritás- és töltésviszonyaira (Békés és mtsai 1988). Valamennyi tényező standardizálása különböző időpontokban végzett vizsgálatoknál rendkívül nehéz. Az elvégzett kísérletek igazolták viszont, hogy egy baktériumtörzs SDS-PAGE vizsgálati eredménye jól reprodukálható egyidejű tenyésztés, minta-előkészítés, elektroforézis és megfelelő értékelő eljárás alkalmazásakor (Bernáth és Morovján 1998).

Meg kell jegyezni, hogy az általunk vizsgált eljárás fluorográfiával előállított autoradiográfiás képek értékelésére nem alkalmazható. Lágym β sugárzókkal végzett autoradiográfiás vizsgálatoknál a módszer érzékenységének növelése érdekében a

PAG-t szerves scintillátorral kell kezelni. Ezt az autoradiográfiás módszert fluorográfiának nevezik, melyben a direkt sugárhatás helyett fényhatás exponálja a röntgenfilmet. A fluorográfia ³⁵S izotóp használatakor mintegy 15-ször érzékenyebb, mint a direkt autoradiográfia. A direkt ionizáló sugárzással ellentétben a fluorográfiánál a röntgenfilm nem tükrözi pontosan a sugárzás mennyiségét. A jelenség különösen hosszabb ideig történő exponálásnál jelentkezik, és a röntgenfilm fiziko-kémiai tulajdonságaiból adódik (Laskey 1993).

3. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* KIMUTATÁSA VÍZMINTÁKBÓL IMPEDIMET-RIÁVAL

A víz *Pseudomonas aeruginosa* fertőzöttségének jelentősége. Az impedimetriás módszer alkalmazása baktériumok kimutatására — Irodalom

A *Ps. aeruginosa* a természetben széles körben elterjedt, kimutatták állatok bélsarából, takarmányokból, vízből és élelmiszerekből. A baktériumnak kóroktani szerepe van mastitises esetek kialakulásában embernél és állatoknál egyaránt. Vérfertőzést okozó *Ps. aeruginosa* törzseket izoláltak rákos, HIV fertőzött, vagy rosszindulatú hematológiai elváltozásos betegekből, továbbá kórházak szülészeti és intenzív sebészeti osztályán ápolt paciensekből. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a vérfertőzést okozó törzsek 14 %-a széleskörű gyógyszer-rezisztenciát mutatott (Tacconelli és mtsai 2002). A korszerű gyógykezelés ellenére a *Ps. aeruginosa* okozta vérfertőzések 18-27 %-a végzetes kimenetelű (Kuikka és Valtonen 1998). Az említett közlemények a *Ps. aeruginosa* fertőzések növekvő számára utalnak.

A *Ps. aeruginosa*-t tartalmazó víz (Zietz és mtsai 2006), és a baktériummal szennyezett felületek fertőzés forrásai lehetnek az élelmiszeriparban (Deza és mtsai 2005). Tejelő tehének *Ps. aeruginosa* tőgygyulladását gyakran a fertőzött tőgymosóvíz okozza (Erskine és mtsai 1987; Las Heras és mtsai 1999, 2002). A baktérium kimutatása különösen fontos vesedialízis állomásokon, és víz-ioncserélő rendszerekben. Az ioncserélt víz használata engedélyezett a nem steril gyógyszerkészítmények előállításánál (pl. orális-, bőr-, orr-/fül-, vagy rectalis-/vaginalis-adagolású termékek). Az European Pharmacopoeia (2005) előírásai szerint az említett termékek nem tartalmazhatnak *Ps. aeruginosa*-t. A kozmetikai készítményeknek ugyancsak menteseknek kell lenniök *Pseudomonas* baktériumoktól, mivel jelenlétük egészségügyi kockázatot jelent (Campana és mtsai

2006). Az idézett irodalom igazolja a *Ps. aeruginosa* vízből való kimutatásának fontosságát.

A direkt impedimetriát alkalmazták coliform baktériumok (Martins és Selby 1980), *Escherichia coli* (Colquhoun és mtsai 1995), *Bacillus stearothermophilus* (Flint és Brooks 2001) kimutatására. A vizsgálómódszer elve röviden a következőkben összegezhető. A mikroorganizmusok metabolizmusa során a folyékony táptalaj kémiai összetétele megváltozik a benne lévő tápanyagok átalakításával, amikor belőlük ionos jellegű végtermékek képződnek. Ennek megfelelően változik a váltóáram vezetésével szembeni ellenállás (impedance = váltóáramú ellenállás). Az impedimetriás vizsgálat tehát a váltóáramú ellenállás változásának mérésén alapul, melyet a készülék reciprok értéként, a vezetőképesség változásaként jelez. A mérés során a vezetőképesség növekedésének kimutatásához szükséges idő fordítva aránylik a mintában a vizsgálat kezdetekor meglévő mikroorganizmusok számához viszonyítva (Cady és mtsai 1978). A szakirodalomban közölt kimutatási idők 2,6 óra és 11,4 óra között változtak (Cady és mtsai 1978; Silverman és Munoz 1979).

Szita és Bíró (1990) korábban kifejlesztettek egy szelektív táptalajt a Z-levest a *Ps. aeruginosa* tenyésztésére, amely azon az elven alapul, hogy a baktérium jól szaporodik olyan közegben, mely ammoniát és acetátot tartalmaz nitrogén és szénforrásként. Az acetamid a legegyszerűbb vegyület, mely ammoniát és acetátot tartalmaz savamid kötésben, a *Ps. aeruginosa* képes bontani, és az így keletkezett komponenseket hasznosítani tudja. A Z-leves alkalmazásával a *Ps. aeruginosa*-t jó szelektivitással mutatták ki vegyes mikroflórát tartalmazó nyers tejmintákból (Szita és mtsai 1998).

Vizsgálatunk célja olyan új eljárás, kifejlesztése volt, mely lehetővé teszi a *Ps. aeruginosa* kimutatását vízmintákból az impedimetriás módszer és az említett szintetikus szelektív táptalaj alkalmazásával.

***Pseudomonas aeruginosa* kimutatása vízmintákból impedimetriával — Anyag és módszer**

Táptalaj

Szita és mtsai (1998) által a *Ps. aeruginosa* izolálására kifejlesztett szintetikus szelektív táptalaj (Z-leves) összetétele 1000 ml-ként a következő: 5 g acetamid, 3 g kálium-hidrogénfoszfát, 3 g kálium-dihidrogénfoszfát, 1 g kálium-tetracionát és 0,05 g

magnézium-szulfát heptahidrát; pH 7,2. A táptalajt autoklávozással sterilizáltuk 120 °C-on 20 percig. A kétszeres erősség Z-leves készítésekor az összetevők megduplázott mennyiségét adtuk 1000 ml desztillált vízhez. Az MPA (Membrane filter method for enumeration of *Ps. aeruginosa*) agar összetétele a következő: 7 g kálium-hidrogénfoszfát, 3 g kálium-dihidrogénfoszfát, 1 g ammónium-szulfát, 0,1 g magnézium-szulfát heptahidrát; 0,1 g élesztőkivonat; 1,5 g palmitinsav, 10 ml Triton X-100 és 15 g agar; pH 7,2. A táptalaj sterilizálása autoklávozással történt 120 °C-on 20 percig (Szita és mtsai 2007).

Baktériumtörzsek

A Z-leves szelektivitását különböző baktériumtörzsek szintenyészeteinek leoltásával vizsgáltuk (3. és 4. táblázat).

3. táblázat. A Z-leves szelektivitásának ellenőrzésére használt *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumtörzsek

Baktériumfaj	Törzsek jelzése
<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC 10145, NCIB 9494, ATCC 11229, ATCC 15442, ATCC 27853, ATCC 9027, NCTC 10332
<i>Ps. caryophilli</i>	ATCC 25418
<i>Ps. cepacia</i>	ATCC 25416
<i>Ps. putrefaciens</i>	ATCC 8071
<i>Ps. putida</i>	ATCC 12633
<i>Ps. testosterone</i>	ATCC 11996
<i>Ps. maltophilia</i>	ATCC 13637
<i>Ps. diminuta</i>	ATCC 11568
<i>Ps. marginata</i>	ATCC 10248
<i>Ps. delafieldii</i>	ATCC 17505
<i>Ps. solanacearum</i>	NCPPB 325
<i>Ps. facilis</i>	ATCC 11228
<i>Ps. saccharophila</i>	ATCC 15946
<i>Ps. ruhlandii</i>	ATCC 15749
<i>Ps. vesicularis</i>	ATCC 11426
<i>Ps. aceris</i>	ATCC 10853
<i>Ps. palleronii</i>	ATCC 17724
<i>Ps. lemoignei</i>	ATCC 17989

4. táblázat. A Z-leves szelektivitásának ellenőrzésére használt, nem *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumtörzsek

Baktériumfaj	Törzsek jelzése
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Bacillus lentus</i>	ATCC 10840
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP Y.E. 160
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Aeromonas punctata</i>	ATCC 15468
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14029
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 9001
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775

Minták

A kísérlet során *Ps. aeruginosa* szintenyészetének, és különböző vízmintáknak az impedimetriás vizsgálatát végeztük el.

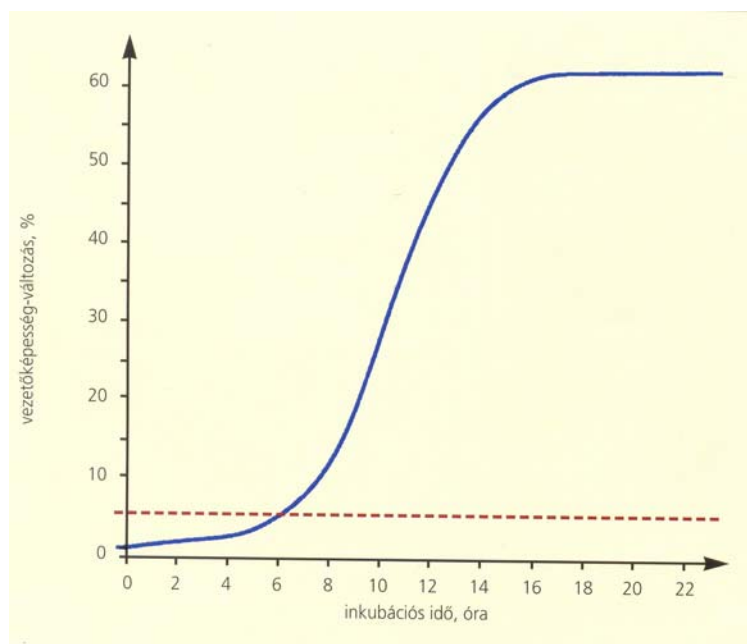
Megvizsgáltuk, hogy a mintákban lévő *Ps. aeruginosa* mennyisége milyen mértékben befolyásolja az impedimetriás vizsgálat eredményét. A *Ps. aeruginosa* ATCC 1014 törzs Z-levesben készített 24 órás tenyészetéből 10-es léptékű hígítási sort készítettünk ugyanabban a táptalajban, és a hígításokat megvizsgáltuk impedimetriás módszerrel.

Összesen 440 csapvíz-, 160 kútvíz-, 250 uszodavíz-minta, és 186 dialízis-állomásról származó vízmintát vizsgáltunk. A minták Magyarország különböző területeiről származtak, és a mintavétel olyan 1000 ml-es üvegekbe történt, melyek a vízminták klórmentesítése céljából 0,5 g nátrium-tioszulfátot tartalmaztak.

Impedimetriás módszer

A vizsgálatokhoz a BacTrac 4100 típusú (SyLab) impedimetriás mérési rendszert alkalmaztuk, mely lehetővé teszi 240 minta egyidejű vizsgálatát azáltal, hogy méri a táptalaj váltóáramú ellenállásának változását, és mértékét a vezetőképesség változásaként adja meg.

A vízminták 100 ml-ét vizsgáltuk *Pseudomonas aeruginosa* jelenlétére, vagy hiányára. A mintákat steril filteren szűrtük (Millipore, lyukméret 0.45 μm , átmérő 47 mm), és a filtereket behelyeztük a BacTrac készülék mérőcelláiba., melyek 10 ml Z –levest tartalmaztak. Az inkubáció időtartama 24 óra volt 37 °C hőmérsékleten. Az impedancia automatikus mérése egy órával a levesek beoltása után (felmelegítés) kezdődött, és 10 perces időközökkel történt. A mikroorganizmus szaporodása egy idő után kimutatható impedancia változást okozott, mely meghaladta az 5 %-ot (Cady és mtsai 1978), a küszöbértéket (**4. ábra**). A BacTrac készülékkel kapott eredményt negatívnak értékeltük, ha az impedimetriás görbe nem keresztezte a küszöbérték vonalát.



4. ábra. *Pseudomonas aeruginosa*-t tartalmazó vízminta vizsgálatakor kapott impedimetriás görbe. A baktérium acetamid metabolizmusa eredményeként a táptalaj elektromos vezetőképességének változása a vízszintes szaggatott vonallal jelzett 5% küszöbértéket 7 óránál rövidebb idő alatt meghaladta.

Összehasonlító vizsgálatok a Pseudomonas aeruginosa kimutatására

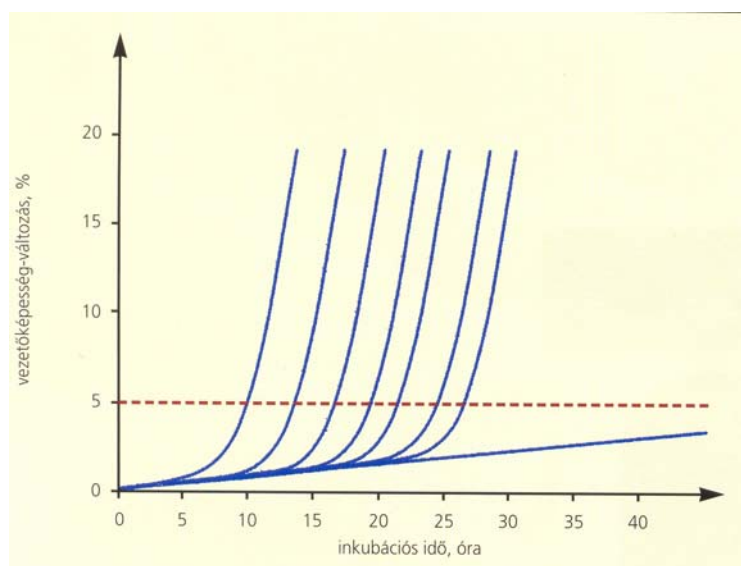
Az impedimetriás vizsgálatokkal egyidejűleg a vízminták *Ps. aeruginosa* fertőzöttségét minden esetben megvizsgáltuk más eljárással is. A 440 csapvíz, 160 kútvíz és 250 uszodavíz-minták mindegyikéből 100 ml mennyiséget szűrtünk 0.45 µm-es Millipore membránszűrőn; azután a filtereket 10 ml Z-levesbe helyeztük. Ugyanezekből a vízmintákból szűrés nélkül 100 ml mennyiséget bevittünk 100 ml dupla erősségű Z-levesbe. Ezután a beoltott leveseket inkubáltuk 37 °C-on 48 óráig, mely után a *Ps. aeruginosa* jelenlétét opaleszcencia és a táptalaj zöld elszíneződése jelezte. A folyékony táptalajból kioltások történtek MPA agarra, és a kifejlődött telepeket biokémiai módszerekkel azonosítottuk. A 186 dialízis-vízmintát szintén szűrtük 0,45 µm-es Millipore membránszűrőn és a szűrőket MPA agarra helyeztük. A telepeket, melyek ebben az esetben egyetlen mintából nőttek ki, biokémiai próbákban azonosítottuk. A *Ps. aeruginosa* azonosításába beletartozott a pozitív oxidáz próba, az indol termelés hiánya, a pozitív ureáz próba, a glukóz oxidatív metabolizmusa, és a nitrát teljes redukciója nitrogénné (Szita és Bíró 1990; Szita és mtsai 1995). A nem *Ps. aeruginosa*, de esetlegesen acetamid-metabolizáló, fluoreszcenciát nem mutató törzsek kiszűrése érdekében a fluoreszcein termelést ultraibolya megvilágítással vizsgáltuk (hullámhossz maximum 365 nm).

***Pseudomonas aeruginosa* kimutatása vízmintákból impedimetriával —**

Eredmények

Az első kísérletben *Ps. aeruginosa* Z-levesben készített tenyészetéből 10-szeres hígítási sort készítettünk, melyekből 1-1 ml mennyiséget a BacTrac készülék 9 ml Z-levest tartalmazó mérőcelláiba helyeztünk. A **5. ábra** mutatja a jellegzetes impedimretriás görbéket. Látható, hogy a küszöbérték eléréséhez szükséges idő fordítva aránylik a vizsgált minta baktérium-koncentrációjához. A vízminták alacsony fertőzöttségéhez hosszabb kimutatási idő társult, a nagyobb fertőzöttséghez pedig rövidebb. A vizsgálatban a kimutatási idő 7 óra és 26 óra között volt (**4. és 5. ábra**).

A laboratóriumi törzsek vizsgálata során csak a hét *Ps. aeruginosa* törzs szaporodott a táptalajban és fluoreszkált UV fény alatt. A további 19 *Pseudomonas* törzs, mely 17 fajhoz tartozott, és a 18 másik baktériumfaj, melyek az **3. és 4. táblázatban** vannak felsorolva, nem fejlődtek a táptalajban.



5. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* tenyészet tízes léptékű hígítási sorával kapott impedimetriás görbék. Balról jobbra: hígítatlan tenyészet, és a tenyészet 10^{-1} to 10^{-6} hígításainak eredményei. A horizontális szaggatott vonal a küszöbértéket képviseli a táptalaj 5 %-os vezetőképesség változásánál. A negatív kontrol minta eredménye a küszöbérték alatt helyeződik.

A 850 különböző vízminta vizsgálata *Ps. aeruginosa* fertőzöttségre vonatkozóan a következő eredményt adta. A 440 csapvíz-minta közül 32 volt pozitív mindkét módszerrel (Z-levesben történő hagyományos tenyésztés vagy impedimetria).

Kilencvennégy minta volt pozitív mindkét módszerrel a 160 kútvízminta közül. A vizsgált 250 uszodavíz-minta közül 188 volt kontaminált *Ps. aeruginosa*-val. Ugyanúgy mint az előbb említett esetekben, a pozitív minták az alkalmazott módszerektől függetlenül azonosak voltak (Z-leves vagy impedimetria).

Összesen 186 dialízis vízmintát vizsgálunk impedimetriával és MPA táptalajon, melyek közül egyetlen pozitív minta volt, mégpedig az impedimetriás vizsgáló módszerrel.

Mindegyik vizsgálatban negatív és ismerten pozitív minta is vizsgálatra került. Amikor a minták szaporodóképes *Ps. aeruginosa*-t tartalmaztak, akkor az impedimetriás görbe még azelőtt keresztezte a küszöbérték vonalát, mielőtt a táptalaj opaleszcens lett. Az ilyen táptalajokból izolált törzsek fluoreszcenit

termeltek (fluoreszkáltak UV fényben), és a biokémiai vizsgálatok minden esetben megerősítették, hogy az izolátum *Ps. aeruginosa*.

A vizsgálatok során nem észleltünk tévesen pozitív eredményt még a különböző mikrobaikkal erősen szennyezett uszodavíz mintákban sem, mivel minden izolált baktérium *Ps. aeruginosa*-nak bizonyult. A vízminták vizsgálati eredményeit a **5. táblázat** tartalmazza.

5. táblázat. Vízminták *Pseudomonas aeruginosa* fertőzöttségének kimutatására végzett vizsgálatok eredménye

Víz minta	Mintaszám	Pozitív minták száma		
		Impedimetria	Z-leves	MPA agar
Csapvíz	440	32	32	nv
Kútvíz	160	92	92	nv
Uzodavíz	250	188	188	nv
Dialízis víz	186	1	nv	0

nv = nem vizsgált.

***Pseudomonas aeruginosa* kimutatása vízmintákból impedimetriával— Megbeszélés**

Munkánkban azt tanulmányoztuk, hogy Szita és mtsai (1998) által kifejlesztett szelektív táptalaj alkalmazható-e impedimetriás vizsgálatban *Ps. aeruginosa* kimutatására vízmintákból (Szita és mtsai 2007). Csapvíz-, kútvíz- és uszodavíz-mintákat vizsgáltuk meg egyrészt impedimetriás eljárással, másrészt Z levesben vagy MPA agaron történt tenyésztéssel, és a *Ps. aeruginosa*-t ugyanazokból a mintákból mutattuk ki a két eljárással. A dialízis-vízmintáknál volt egy kivétel, amikor egy mintából csak az impedimetriás vizsgálat adott pozitív eredményt. Ilyen módon az eredmények megerősítették, hogy az új módszer alkalmas a *Ps. aeruginosa* fertőzöttség kimutatására vízmintákból. Az eljárás előnye, hogy

alkalmas nagyszámú minta egyidejű vizsgálatára. Az általunk alkalmazott BacTrac 4100 típusú (SyLab) impedimetriás műszerrel 240 minta egyidejű vizsgálata volt lehetséges. Az alkalmazott szintetikus táptalaj nem tartalmazott gátló anyagokat, melyek a táptalaj érzékenységét csökkentették volna. A táptalaj egyszerű, jól meghatározott kémiai összetevőket tartalmaz és alacsony költséggel előállítható.

Az eljárás *Ps. aeruginosa* mintabeli mennyiségétől függően 7-26 órán belül pozitív eredményt ad. Ez azt jelenti, hogy az impedimetriás eljárás vízminták magas *Ps. aeruginosa* fertőzöttsége esetén sokkal rövidebb idő alatt kimutatható, mint a hagyományos módszerekkel

Ellenőriztük az alkalmazott táptalaj szelektivitását. A *Ps. aeruginosa* mellett ezért bevontunk a vizsgálatba a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozó 17 másik fajt, és 18 további baktériumfajt. A vizsgálatok igazolták az impedimetriás vizsgálathoz használt táptalaj szelektivitását, mivel a *Ps. aeruginosa*-n kívül egyetlen más baktériumfaj sem szaporodott benne. A Z-leves jó szelektivitását megerősítette azon eredmény is, mely szerint nem észleltünk téves pozitív eredményt még a bakteriológiailag erősen szennyezett uszodavíz-minták vizsgálatakor sem.

Az 1036 vízminta vizsgálata igazolta, hogy az impedimetriás módszer a Z-leves használatával megfelelő a *Ps. aeruginosa* automatizált kimutatására (Szita és mtsai 2007).

A Z-leves szabadalmazott Magyarországon: C 12N 1/20, 1987. Együttműködés alakult ki a Sy-Lab Geräte GmbH-val (Neupurkendorf, Ausztria) az impedimetriás vizsgáló eljárás kereskedelmi hasznosítására, melynek keretében több országban folyamatban vannak a bevezető vizsgálatok.

1. A LIBA VÉRÖMLÉSES VESE- ÉS BÉLGYULLADÁSA BETEGSÉG VIZSGÁLATA.

A liba vérömléses vese- bélgyulladásása betegség — Irodalom

Libainfluenza (továbbiakban Derzsy-betegség) reconvalescens szérummal napos korban oltott libaállományokban nagyszámú elhullást észleltek 1969 nyarán Magyarországon. Az oltóanyag nem kívánt hatásának kivizsgálása során az érintett gazdaságokban felhasznált két különböző gyártási számú szérum 2 ml-es adagjával egynapos korú libákat oltottunk. A szérumos oltás 73% illetve 33% arányú elhullást okozott a kezelés utáni 13. és 29. napok közötti időszakban (Bernáth és Szalai 1970).

A libahullák szervdörzsölékének baktériummentes szűrletével sc. fertőzött valamennyi 1-2 napos korú liba 5-9 nap alatt elhullott a betegségben. Ugyanezzel a szűrlettel 2 hetes korban fertőzött libáknak csak mintegy 50 %-a hullott el 8-10 nappal a fertőzés után, míg a 24-30 napos libák erős sc. fertőzés után sem mutattak semmilyen kóros tünetet a 30 napos megfigyelési idő alatt (Bernáth és Szalai 1970). Schettler (1976) 4 hetesnél idősebb libák fertőzésekor 21-90 nap, vagy annál is hosszabb inkubációs időt figyelt meg. A betegség kialakulásában szerepet tulajdonítanak a stresszhatásoknak is. Megfigyelték ugyanis, hogy a polyomavírus okozta sporadikus elhullások átmenetileg jelentősen megemelkedtek az állományt ért stresszhatásokra (Palya és mtsai 2004).

A kislibák elhullását igen rövid, 1-3 órás betegség előzte meg. Az állatok heveny esetekben híg véres bélsarat ürítettek, ültek, nehezítetten lélegeztek, majd közvetlenül az elhullás előtt komatózus állapotba kerültek. A heveny lefolyású esetekben a legjellemzőbb kórbonctani elváltozások a következők voltak: a bőr alatti kötőszövetben oedema és vérzések, ugyancsak vérzések a savóshártyák alatt és a máj burka alatt, a testüregben szalmasárga savó, a vékonybél-nyálkahártya gyulladása, mely a hátrább eső bélszakaszokon és a vakbélben sokszor vérömléses volt (Bernáth és Szalai 1970; Domán 1970; Süveges és Szécsényi 1970). A vesék bővítését és duzzanatát, a legfiatalabb korban elhullott állatoknál esetenként a

bursa Fabricii vérzéses gyulladását is megfigyelték (Bernáth és Szalai 1970). A hosszabb lappangási idő után elhullott állatokban zsigeri köszvényt is leírtak (Domán 1970; Süveges és Szécsényi 1970). Ilyenkor a kórbonctani elváltozások enyhébbek voltak, de bélhurut, a bőr alatti kötőszövet ödémája és a testüregben kevés szalmasárga savó ilyenkor is megfigyelhető volt (Bernáth és Szalai 1970).

Rövidesen közlemény jelent meg a jellemző kórszövettani elváltozásokról is. A legjellemzőbb kórszövettani elváltozások vesecsatornácskák hámjának elhalása, savós-vérzéses-intersticiális vesegyulladás, és a vérömléses-álhártyás bélgyulladás voltak. Esetenként a bursa Fabricii vérömléses-elhalásos gyulladása is megfigyelhető volt (Szalai és Bernáth 1971).

Kísérletek igazolták, hogy a beteg libák által ürített vírus a velük együtt tartott oltatlan kontroll társaikra is áttérjed. A napos korban fertőzött libák mellé helyezett 15 kontaktkontroll naposliba közül 5 állat 13-24 napos korban hullott el a betegségben (Bernáth és Szalai 1970).

A vizsgálati eredmények arra utaltak, hogy az 1969-ben észlelt nagyarányú elhullásokat nem a Derzsy betegség kórokozója, hanem más vírus okozta. A tünetek, a kórbonctani és kórszövettani elváltozások és fertőzési kísérletek eredménye mellett elsősorban a napos libákon végzett szérumvédési vizsgálataink alapján állapítottuk meg: *„A vizsgált betegség nem azonos az ún. libainfluenzával, ezt azzal is bizonyítottuk, hogy a libainfluenza elleni különféle hiperimmun és rekonvaleszcens szérumok a kórokozóval szimultán oltva felemelt adagban sem biztosítottak semmiféle védelmet. A lappangási idő nem hosszabbodott meg, a kórbonctani elváltozások sem voltak enyhébbek, mint a csak szervdörzsöléssel oltott kontrollcsoport állataiban”*. A kórokozó ellen hiperimmun szérumot állítottunk elő (Bernáth és Szalai 1970). A szérum *„2 ml-es adagban 100%-ban, 1 ml-es adagban 86,7 %-ban kivédte az igen erős szimultán fertőzést”* (Szalai és Bernáth 1971).

Ezt követően jeles szerzők *„A víziszárnyasok fertőző betegségei elleni védekezés immunológiai kérdései”* című cikkben az úgynevezett libainfluenzáról közölték, hogy *„Elméletileg számolni kell ugyanis új vírusvariánsok felbukkanásával, amelyek ellen a jelenleg termelt szérum nem véd. Ismereteink nagyon korlátozott*

voltára és az említett veszély lehetőségére figyelmeztet egyebek mellett az 1969 évi 2. termelési számú *reconvalescens* szérummal bekövetkezett oltási baleset” (Derzsy és Szedő 1973). Az idézet úgy értelmezhető: a szerzők lehetségesnek tartották, hogy az 1969-ben megfigyelt tömeges megbetegedéseket az úgynevezett libainfluenza egy vírusvariánsa okozta. A szakirodalomban 1980-ban, és azt követően megjelent közlemények szerzői már elfogadták álláspontunkat, hogy az 1969 évi tömeges libaelhullások oka a libák vérömléses vese- bélgyulladás megbetegedése volt, és megfogalmazták azt is, hogy a betegséget elsőként különítettük el az addig ismert libabetegségektől (Schettler 1980; Kisary 1993; Guerin és mtsai 2000).

Magyarország után először Németországban észlelték a betegséget az 1970-es évek közepén. Igen nagy veszteséget okozott olyan esetekben, amikor a libák vágásakor gyűjtött teljes vérrel, vagy *reconvalescens* savóval oltották a napos korú libákat. A savókat esetenként maguk a gazdák állították elő, és felhasználásig fagyaszttva tárolták. Egy ilyen esetben 3000 naposlibát oltottak teljes vérkészítménnyel. Az elhullások 2 hetes korban kezdődtek, és 4 hetes korra valamennyi liba elhullott. Egy másik helyen a termelő által gyűjtött szérummal 900 naposlibát oltottak, és a kezelés után 3 hét alatt valamennyi liba elhullott.

Oltóanyaggyártó cégek által termelt *reconvalescens* savók alkalmazása is megbetegedéseket okozott. Egészségesnek tartott libák vágásakor gyűjtött savóval 1000 libát oltottak, és 4 hetes korra az állatok csaknem 70 %-a elhullott. Másik esetben *reconvalescens* szérumot termeltek, fenollal kezelték. A szérummal oltott 400 liba 70 %-a elhullott a szérumos kezelés után 3 héten belül. Egy oltóanyag-termelő házilibák vágásakor szérumot gyűjtött, mellyel négy egymást követő keltetésből származó 12 000 libát oltottak. Az oltás után 4 hét alatt az állatok több mint 90 %-a elhullott (Schettler 1976). Az elhullások a tünetek jelentkezése után rövid időn belül történtek. A kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok eredménye alapján a szerző megállapítja, hogy hasonló ahhoz a betegséghez, melyről Bernáth és Szalai (1971) beszámolt, és melyet „*hemorrhagic nephritis and enteritis of geese (HNEG)*”- nek neveztek. A szerző az általa ismertetett öt esetet mindegyikét a fertőzött szérummal történt kezelés következményének tartotta (Schettler 1976).

A németországi esetekkel csaknem egyidejűleg Franciaországban is súlyos veszteségeket okozott a betegség. Az elhullások 4-10 hetes korban történtek. Ezekben az esetekben nem vezették vissza szérumos kezelésre a libák fertőződését, így az állatok magasabb kora az elhulláskor a betegség járványos terjedéséből adódhatott (Schettler 1977, 1980).

A közelmúltban Dél-Németországban ismét beszámoltak megbetegedésekről, mely 4 hetes korú libaállományokban két helyen jelentkezett. A két állomány mintegy 300 km-re volt egymástól, de ugyanabból a keltetőből szállították a naposlibákat. Először véres bélsárürítés volt a legjellemzőbb tünet, és az állatok igen rövid időn belül elhullottak. Később zsigeri köszvény volt a leggyakoribb kórbonctani elváltozás. Elhullásokat mintegy 5 hét időtartamig észleltek az állományokban, és a veszteség aránya 43,8 %, illetve 29,2 % volt. Az elhullott állatok szerveiből a liba polyomavírust PCR vizsgálattal is kimutatták (Miksch és mtsai 2002).

A betegség kórokozóját Guerin és mtsai (1999, 2000) azonosították a vírus strukturális jellemzői, és a vírusgenom egy 1175 bázispár nagyságú szakaszának szekvencia-analízise alapján. A kórokozót a polyomavírus nemzetség új fajaként a *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV) névvel jelölték. Guerin és mtsai (1999) közölték, hogy a libák polyomavírus által okozott megbetegedése a franciaországi libaállományokban a legnagyobb veszteséget okozó fertőző betegség.

Magyarországon a 2000 és 2003 közötti időszakban az Országos Állategészségügyi Intézet működési területén 41 lúdállományban állapították meg a polyomavírus okozta megbetegedést. Az érintett állományok 1000-4000 létszámúak voltak. A betegség leggyakrabban 3-6 hetes állományokban fordult elő. Néhány esetben fiatalabb, valamint idősebb állományokban is megállapították a betegséget, legkorábban 4 napos, legkésőbb 17-20 hetes életkorban. Az elhullás mértéke 4% és 67 % között változott. Az elhullások 1-2 hónapon keresztül folyamatosan jelentkeztek, vagy rövid megszakítással két elhullási hullám is kialakult. A kórbonctani elváltozások közül leggyakrabban a bélfal megvastagodását, a nyálkahártya kipirultságát, valamint a vesék duzzanatát és vörösbarna

elszíneződését találták. Ritkábban a bőr alatti kötőszövetben vérzések, oedema, a testüregben és szívburokban szalmasárga savó, elhúzódó esetekben pedig zsigeri köszvény is gyakran előfordult. Kórszövettani vizsgálattal a vesében a húgycsatornácskák zonális elhalását és vérzéseket találtak. A bélnyálkahártyában hámelhalással, mirigyelhalással, vérzésekkel és fibrinkiválással kísért gyulladást, a májban savós gyulladást, egyéb szervekben vérzéseket észleltek (Palya és mtsai 2004, 2005). Intranukleáris magzárványokat ugyanúgy nem találtak, mint ahogyan a korábbi kórszövettani vizsgálataik során Szalai és Bernáth (1971), Schettler (1977), továbbá Guerin és mtsai (2000) sem.

Figyelemre méltó, hogy 2002-ben és 2003-ban a polyomavírus okozta esetek száma növekedett Magyarországon (Ivanics és mtsai 2003; Glávits és mtsai 2005). Kísérletesen fertőzött napos, vagy 10 napos libák vizsgálatával megállapították, hogy a fertőzés időpontja és a szerológiai áthangolódás között 8 hét telt el, ami magyarázza a gyakorlatban észlelt, hosszú ideig elhúzódó elhullásokat (Glátits és mtsai 2005).

A vírus izolálása libaembrio-fibroblaszt, libaembrio-máj és libveseszövettenyészeteken sikertelen volt. A VP1 gén nukleotidsorrendje alapján megállapították, hogy a magyarországi liba polyomavírus izolátumok genetikailag nagyon közel állnak egymáshoz, továbbá a francia és német izolátumokhoz. A Magyarországon 1969-ben súlyos libaelhullásokat okozó törzs megegyezett a francia törzssel, és különbözött a napjainkban hazánkban izolált törzsektől, valamint a német izolátumtól. A jelenleg izolált hazai törzsekben a francia izolátumhoz képest két, három és négy nukleinsavváltozást figyeltek meg. A vizsgált törzsek között aminosavszekvenciában nem volt különbség (Palya és mtsai 2004, 2005).

A *Polyomaviridae* család *Polyomavirus* nemzetségébe tartozó polyomavírusok mintegy 45 nanométer átmérőjű, ikozaéderes szimmetriájú, burok nélküli, körülbelül 5000 bázispár hosszú, duplaszálú cirkuláris DNS genommal rendelkező vírusok. A genom két irányban íródik át, a korai és késői gének kifejeződése

céljából. Egy szabályozó régió tartalmazza a genetikai információt a vírus DNS szaporodásához, és vírus mRNS-ekre történő átírásához. A korai mRNS-ek kódolják a nagy tumor antigént és a kis tumor antigént, melyek multifunkcionális szabályozó proteinek. A késői mRNS-ek kódolják a vírus strukturális proteinjeit, a VP1, VP2 és VP3 proteineket, melyekből a vírus kapszid képződik (Johne és Müller 2003; Pérez-Losada és mtsai 2006). Az avian polyomavírus további strukturális proteinje a VP4 (Johne és Müller 2004).

A polyomavírusok egyetlen fajhoz, vagy közeli fajok csoportjához adaptálódtak (**6. táblázat**). Az emlős fajokban az első fertőzés általában az élet korai szakaszában történik, és tünetmentes. Szakirodalmi adatok szerint csaknem minden humán betegség, melyet a polyomavírusok okoznak, a szervezet immunhiányos állapotához kötődik (Crandall és mtsai 2005). A vírusok aktiválódása a T sejtek elégtelen működéséhez kapcsolódik (Ahsan és Shah 2006). A polyomavírus 1-10 %-ban okoz vesekárosodást veseátültetések után. Elsődleges okozója a BK vírus, melyet 1971-ben mutattak ki először, egy veseátültetett személy vizeletéből. Vesekárosodást okozhat továbbá a JC vírus, mely ugyancsak humán polyomavírus, de valószínűleg az SV40 majom-polyomavírus is lehet kórokozó (Pavlakis és mtsai 2006). Az immunszuppresszív kezelés a fő kockázati tényező a betegség kialakulása szempontjából (Hirsch és mtsai 2006; Vats és mtsai 2006). A BK és JC vírus hemorrhagiás cystitist is okozhat csontvelő-átültetett személyekben. HIV fertőzött egyénekben a JC vírus, de a BK polyomavírus is, progresszív multifokális leukoencephalopathia okozója lehet (Ahsan és mtsai 2006; Pavlakis és mtsai 2006).

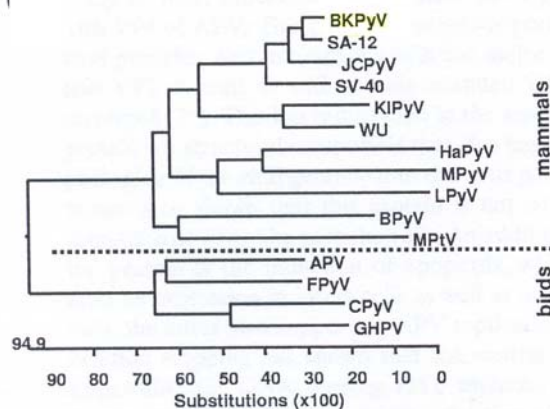
A madár polyomavírusokat először papagájfajokból izolálták (Bernier és mtsai 1981; Bozeman és mtsai 1981), valamennyi esetben heveny lefolyású betegség kapcsán. Típustörzsük a *Budgerigar fledgling disease polyomavirus* (BFPyV). A vírus 2-3 hetes korú törpepapagáj-fiókák hirtelen elhullását okozza, esetenként 100 %-os mortalitással (Müller és Nitschke 1986; Guerin 2000). A betegséget a közelmúltban állapították meg Olaszországban (Bert és mtsai 2005) és Szlovákiában (Literák és mtsai 2006). Pintyfajokból és sólyomféléből is izolálták a vírust (Johne és Müller 1998). A *Budgerigar fledgling disease polyomavirus* név helyett Johne és Müller (1998) az *Avian polyomavirus* elnevezést javasolta.

6. táblázat. A *Polyomaviridae* család *Polyomavirus* nemzetségébe tartozó polyomavírusok R. Johne és H. Müller (2007) közleményének táblázata alapján

Gazdafaj	A vírus neve és első leírásának ideje	Betegség természetes fertőzöttség esetén
Ember	<i>BK polyomavirus</i> (1971)	Nephropathia veseátültetés után
	<i>JC polyomavirus</i> (1971)	AIDS-es betegekben progresszív multifokális leukoencephalopathia
	<i>KI polyomavirus</i> (2007)	Nem ismert; valószínű légzőszervi megbetegedéshez társul.
	<i>WU virus</i> (2007)	Nem ismert; valószínű légzőszervi megbetegedéshez társul.
Majom	<i>Simian virus 40</i> (1960)	Nem ismert
	<i>Simian virus 12</i> (1963)	Nem ismert
	<i>Baboon polyomavirus 2</i> (1989)	Nem ismert
	<i>B-lymphotropic polyomavirus</i> (1979)	Nem ismert
	<i>Chimpanzee polyomavirus</i> (2005)	Nem ismert
Szarvasmarha	<i>Bovine polyomavirus</i> (1977)	Nem ismert
Nyúl	<i>Rabbit kidney vacuolating virus</i> (1966)	Nem ismert
Hörcsög	<i>Hamster polyomavirus</i> (1968)	Bőrtumorok
Patkány	<i>Athymic rat polyomavirus</i> (1984)	Athymusos szőrtelen patkányok nyálmirigygyul-ladása
Egér	<i>Murine polyomavirus</i> (1953)	Nem ismert
	<i>Murine pneumotropic virus</i> (1953)	Szopósegér légzőszervi megbetegedése
Papagáj és más madárfajok	<i>Budgerigar fledgling disease polyomavirus (Avian polyomavirus[*])</i> (1981)	Törpepapagáj-fióka betegség; polyomavirus betegség más madárfajokban
Liba	<i>Goose hemorrhagic polyomavirus</i> (2000)	Libák vérömléses vese- bélgyulladás
Pintyőke	<i>Finch polyomavirus</i> (2006)	Polyomavirus betegség
Varjú	<i>Crow polyomavirus</i> (2006)	Nem ismert

*Az elnevezést Johne és Müller (1998) ajánlotta.

Jelenleg 4 olyan polyomavirus ismert, melyet madárfajokból izoláltak: a BFPyV, a GHPV, a *Finch polyomavirus* (FPyV) és a *Crow polyomavirus* (CPyV) (Johne és Müller 2007) (6. táblázat és 6. ábra).



6. ábra. 15 polyomavírus filogenetikai viszonyai a nagy tumor antigén teljes aminosavszekvenciái alapján (Johne és Müller 2007).

BKPyV = *BK polyomavirus*; **SA-12** = *Simian agent 12 (Simian virus 12)*; **JCPyV** = *JC polyomavirus*; **SV-40** = *Simian virus 40*; **KIPyV** = *KI polyomavirus*; **WU** = *WU virus*; **HaPyV** = *Hamster polyoma-virus*; **MPyV** = *Murine polyomavirus*; **LPyV** = *B-lymphotropic polyomavirus*; **BPyV** = *Bovine polyomavirus*; **MPtV** = *Murine pneumotropic virus*; **APV** = *Budgerigar fledgling disease polyomavirus*, más néven *Avian polyomavirus* (Johne és Müller 1998); **GHPV** = *Goose hemorrhagic polyomavirus*; **FPyV** = *Finch polyomavirus*; **CPyV** = *Crow polyomavirus*.

DNASTAR software csomag, MegAlign modul, Clustal W algoritmus (LASERGENE) (Johne és Müller 2007).

A különböző madárfajokból 2000 előtt izolált polyomavírusok (6. táblázat) fő capsid proteinjét (VP1) kódoló génszakaszok 99 % genetikai hasonlóságot mutattak. A liba megbetegedést okozó GHPV és a törpepapagáj típusörzs VP1-et kódoló génszakasza viszont csak 59 % hasonlóságú. A GHPV így a madár polyomavírustól jól megkülönböztethető, új vírusnak tekinthető (Guerin és mtsai 2000). A GHPV teljes, 5256 bázispár méretű vírusgenomját Johne és Müller (2003) írták le, és javasolták a GHPV és az *Avian polyomavirus Avipolyomavirus* szubgenusba sorolását. Az avian polyomavirus és a GHPV nagy kórokozóképességének okát nem ismerik. Feltételezik, hogy az avian polyomavirusnál ez a tulajdonság a VP4 proteinhez kapcsolódik, mely a sejteket károsítja a vírus kiszabadulása előtt. Hasonló szerepet tulajdonítanak a GHPV-nál a késői mRNS 5' régióján helyeződő ORF-X-nek (open reading frame X), mely 169 aminosavat kódol (Johne és Müller 2003, 2003a).

A libák vérömléses vese- bélgyulladás megbetegedése vizsgálata során megállapítást nyert, hogy a GHPV a vérerek endothelsejtjeinek magvában szaporodik (Bernáth és mtsai 2002; Lacroux és mtsai 2004; Dobos-Kovács és mtsai 2005). Lacroux és mtsai (2004) az endothelsejteken kívül libavese-sejttenyészetben való víruszaporodásról is beszámoltak. Johne és Müller (2003), továbbá Palya és mtsai (2004, 2005) vizsgálatai az állítást nem erősítették meg. A betegség körfejlődésének vizsgálata során mi sem észleltünk víruszaporodást a különböző szervek parenchyma sejtjeiben. Libavese-szövettenyészetben végzett öt passzázs után a szövettenyésztetre vitt vírust PCR módszerrel sem lehetett kimutatni (Bernáth és mtsai 2006).

Guerin és mtsai közölték (1999), hogy a liba polyomavírus által okozott nagy veszteségek csökkentése érdekében vakcina előállítását tervezik. Vakcina előállításának tervéről, vagy kísérleti vakcina előállításáról további szakirodalmi adatok is találhatóak. Johne és Müller (2003) közölte, hogy GHPV specifikus vírusszerű részecskék előállításán dolgoznak, vakcinatermelés céljából. Palya (2006) rekombináns baculovírus felhasználásával GHPV VP1 proteint termelt. A GHPV VP1 proteiből két olajemulziós vakcinát állított elő. Az egyik vakcina a másikkal viszonyítva tízszeres mennyiségű antigént tartalmazott. A napos korban egyszer vakcinázott, vagy 18 nap múlva ismételt immunizált libákat a második vakcinázás után 21 nappal virulens GHPV-al im. oltással fertőzték. A fertőzés után a vakcinázott libacsoportok közül egyben nem volt megbetegedés, háromban 5 %-nyi elhullás volt, ugyanakkor a kontroll csoportban a libák 65 %-a elhullott, a GHPV által okozott jellegzetes tünetek és kórbonctani elváltozások mellett.

Zielonka és mtsai (2006) a GHPV fő strukturális proteinjét, a VP1-et rekombinációval *Sacharomyces cerevisiae* élesztőgomba-sejtekben, illetve *Sf9* rovarsejtek felhasználásával állították elő, diagnosztikai készítmény és vakcina készítése céljából. A rovarsejtekben kifejeződő GHPV-VP1 vírusszerű részecskék formájában termelődött. A 45 nm átmérőjű részecskéket nem lehetett megkülönböztetni a fertőzőképes polyomavírustól, de a termelés hatékonysága alacsony volt a majom polyomavírus SV-40-VP1 kifejeződéséhez viszonyítva.

Élesztősejtekben a GHPV-VP1 kisebb, 20 nm átmérőjű részecskék formájában termelődött, és csak a GHPV-VP2-vel együttesen eredményezett 45 nm átmérőjű vírusszerű részecskéket. Mindkét módon előállított vírusszerű részecskék hemagglutinálták a csirke erythrocytákat. A termékeket antigénként használták diagnosztikai vizsgálatokban. Libák vérömléses vese-bélgyulladás betegségben szenvedő libaállományban ELISA próbával és hemagglutináció-gátlási próbával 87,5 % arányban GHPV-specifikus ellenanyagokat mutattak ki, míg egy egészséges libaállományban valamennyi vizsgálat negatív eredményt adott. Ugyanakkor GHPV-specifikus ellenanyagokat mutattak ki két másik állományban, ahol a betegséget nem észlelték, és ez az eredmény a GHPV széleskörű elterjedtségére utal (Zielonka és mtsai 2006).

Vizsgálati eredmények igazolták a vírus horizontális terjedését (Bernáth és Szalai 1970; Süveges és Szécsényi 1970). Feltételezik, hogy a vírussal fertőződött liba perzisztens módon fertőzött maradhat (Shettler 1976; 1980; Palya és mtsai 2004, 2005), és ennek a vírus vertikális terjedésében lehet szerepe (Lacroux és mtsai 2004). A vírus vertikális terjedésére adat is utalt, ugyanis Palya és mtsai (2005) négy napos korban megfigyeltek polyomavírus által okozott elhullást, míg Bernáth és Szalai (1970) szerint a fertőzési kísérletben a legrövidebb lappangási idő 5 nap volt. Az említetteket figyelembe véve libaembriókon végeztünk fertőzési kísérleteket, és vizsgáltuk, hogy kikelhetnek-e fertőzött kislibák, és lehet-e járványtani szerepük a vírus terjesztésében. Továbbá vizsgáltuk, hogy a libaembriók alkalmasak-e a vírus titrálására (Bernáth és mtsai 2006).

Libák vérömléses vese- és bélgyulladása betegség kórfejlődése. A liba polyomavírussal fertőzött libaembriók vizsgálata — *Anyag és módszer*

1. A betegség első észlelése idejéből származó fertőző anyag vizsgálata

Fertőző anyag

A betegség első észlelésekor végzett fertőzési kísérletek során elhullott libák májából és veséjéből fiziológias konyhasóoldattal 20 %-os szervdörzsöléket, és

belőle baktériummentes szűrltet készítettünk (Bernáth és Szalai 1970), melyet mintegy 30 évig -20 °C-on fagyasztva tároltunk (Szűrltet 69).

Kísérleti állatok és fertőzésük

A fertőző anyag 2 ml-ét négy 1 napos korú libáknak bőr alá oltottuk, és ezután az állatokat 30 napig megfigyeltük. A kísérleti állatokat izolátorokban tartottuk. Az állatok ivóvizet és 15 Kgray gammasugárzással kezelt baromfi indítótápot ad libitum kaptak (Bernáth és mtsai 2001).

PCR és szekvenálás

Diagnosztikai céllal a Guerin és mtsai (2000) által leírt primereket (VP1F: GAG GTT GTT GGA GTG ACC ACA ATG, illetve VP1R: ACA ACC CTG CAA TTC CAA GGG TTC) használtuk a cikkben leírtak szerint. Vizsgálatainkhoz primereket terveztünk a vírus VP1 génjére, amelyekkel egy 598 bázis hosszúságú fragmentumot amplifikáltunk. A reakciókörülmények a következők voltak: 94 °C 15 másodperc, 55 °C 1 perc, 72 °C 1 perc 30 cikluson át, és végül 72 °C 7 perc. Az 50 µl végtérfigatú reakcióelegyet 0,2 mM dNTP, 10 pmol primer (HR2: ACG GCA CTG CTA CCA CCT CC, illetve HF1: GAG CCC CTC AGC CAA AAC CA), 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNS polimeráz (Zenon Biotechnológia Kft, Szeged) alkotta. A PCR terméket 2 %-os agaróz gélben futattuk meg, majd etídium-bromiddal festettük és UV fény alatt detektáltuk (Herolab Molekulare Trenntechnik, Wiesloch). A szekvenálás ABI PRISM (Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca.) készülékkel történt. A törzs azonosítását a BioEdit 4.8.7 programmal (North Carolina University) végeztük (Dobos- Kovács és mtsai 2005).

2. A betegség kórfejlődésének vizsgálata

Fertőző anyag

A betegség első észlelése idején készített fertőzőanyaggal előzetes vizsgálatot végeztünk azért, hogy ellenőrizzük fertőzőképességét, és megfelelő mennyiségű fertőzőanyagot nyerjünk. Az anyaggal öt naposlibát oltottunk sc., melyek a 7. vagy a 8. napon hullottak el. A májakat és veséket antibiotikum-antimikotikum (Sigma-

Aldrich) tatalmú PBS-ben homogenizáltuk. A szuszpenziót 4000 g-vel centrifugáltuk 30 percig 4 °C-on, majd a felülúszót steril filterpapíron szűrtük. Ezt a lépést megismételtük, majd 100 ml felülúszóhoz ugyanennyi kloroformot adtunk. Az oldatot 2 óráig rázattuk, azután centrifugáltuk 8000 g-vel 15 percig 4 °C-on. A felülúszót LC2.29 laminar boxban tartottuk 1 órát, hogy a kloroform nyomait eltávolítsuk. A felülúszóban elektronmikroszkóppal és PCR-el ellenőriztük a GHPV jelenlétét (Bernáth és mtsai 2001).

Kísérleti állatok és a fertőzési kísérlet elrendezése.

A vizsgálatokat 24 egynapos korú libán végeztük. Elhelyezésük HM1500 (Montoir-Andersen) izolátorokban történt, negatív nyomás mellett, az EU előírásainak megfelelően (European Council Directive 86/609/EEC Nov. 24, 1986). Az állatok ivóvizet és 15 Kgray gamma-sugárzással kezelt baromfi indítótápot ad libitum kaptak. Két kontroll libát elvéreztettünk a kísérlet előtt, hogy ellenőrizzük az állatok meghatározott vírusoktól való mentességét EM és PCR vizsgálatokkal. Öt naposliba szerveiből fertőző anyagot termeltünk. A többi öt kisliba kontaktkontroll volt. A fő kísérletben 12 libát fertőztünk 2 ml fertőző anyaggal sc.. Az állatokat naponta megfigyeltük. A fertőzött állatok közül a kísérlet 3., 4., 5., és 6. napján 2-2 állatot extermináltunk. A fertőzés utáni 7. napon egy kisliba elhullott, kettő a betegségre jellemző klinikai tüneteket mutatott, egy pedig egészséges volt. A két beteg és az egy egészséges libát még ugyanazon a napon extermináltuk. A fertőzött állatokkal együtt tartott kontaktkontroll libák közül egy a 21., egy pedig a 33. napon hullott el. A további 3 kontaktkontroll kislibát a kísérlet kezdetétől számított 32. napig megfigyeltük (7. táblázat).

Kórbonctani és kórszövettani vizsgálat

Az elvéreztetett és az elhullott állatok kórbonctani vizsgálatra kerültek, és kórszövettani vizsgálatot is végeztünk. A szervekből (vese, bélcsatorna, máj, lép, tüdő, szívizomzat, vázizomzat, agyvelő, thymus, Fabricius-tömlő) kis darabokat 8 %-os neutralis formaldehidoldatban fixáltunk, majd paraffinba ágyasztuk. A metszeteket hemalaun-eozinnal festettük meg. A metszetek elbírálását NFPK (Carl Zeiss, Jena) kutatómikroszkóppal végeztük. A kórszövettani felvételeket Docuval (Carl Zeiss, Jena) fotomikroszkóppal készítettük (Dobos-Kovács és mtsai 2005).

7. táblázat A naposlibákon végzett fertőzési kísérlet elrendezése

Fertőzés utáni nap	Fertőzött libák száma $\Sigma n = 12$		Kontroll libák száma $\Sigma n = 7$	
	Elvéreztetett	Elhullott	Kísérlet előtti	Kontakt
0	—	—	2	—
3	2	—	—	—
4	2	—	—	—
5	2	—	—	—
6	2	—	—	—
7	3	1	—	—
21	—	—	—	1 ⁺
32	—	—	—	1 ⁺ + 3 ^{**}

⁺ = elhullott

^{**} = megfigyelve a 32. napig

Elektronmikroszkópos vizsgálat

A kísérleti állatok veséjéből, bélcsatornájuk több szakaszából, májából, lépéből, thymusából, Fabricius-tömlőjéből minden esetben, alkalmanként a tüdőből és az agyvelőből is, 1 mm³ nagyságú szervrészlet mintákat vettünk. A mintákat 0,2 M-os foszfát-pufferral (PB) készült 4%-os paraformaldehid és 0,2%-os glutáraldehid oldat pH 7,3-es keverékében +4 °C-on, 3-4 órán át előfixáltuk. Ezután a szervmintákat 0,2 M-os PB-ben 4x5 percig mostuk, majd 0,2 M-os PB-vel készült 1%-os OsO₄ oldatban 2 órán át szobahőmérsékleten utánfixáltuk, majd 0,2 M-os PB-ben újból kimostuk. Ezt követően felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük és Durcupánba ágyasztuk. A Durcupan műgyanta polimerizálása 56 °C-on 48 óra hosszan történt. A blokkokból 40-60 nm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket 2,5 %-os uranylacetáttal és pH 7,3-as Reynold-féle ólomcitát oldattal kontrasztoltuk és JEOL-JEM 100S jelzésű transzmissziós elektronmikroszkóppal bíraltuk el (Dobos-Kovács és mtsai 2005).

3. Embrionált libatojásokon végzett vizsgálatok

Vírus

A vírustartalmú fertőző anyag élővírus-tartalmát libaembriók chorioallantois-membránjára (CAM) oltással, és Spearman-Kärber módszerrel (Allan és Hebert 1968) számítva $10^{4,25}$ EID₅₀/0,2 ml-nek határoztuk meg.

Embrionált libatojások

Az embrionált libatojásokat liba-parvovírusról mentes állományból szereztünk be. Öt libaembrión vizsgáltuk PCR módszerrel, hogy az embriók liba hemorrhagiás polyomavírus (GHPV), liba parvovírus (GPV) és liba circovírus (GCV) fertőzéstől mentesek-e. Az első kísérletben húsz embriót oltottunk a fertőző anyag 0,2 ml-ével. Ezek közül tíz 14 napos embriót CAM-ra, tíz 7 napos embriót szikbe fertőztünk, öt embrió pedig fertőzésmentes kontroll volt.

A második kísérletben 25 embrionált tojásan titráltuk a vírust az OMCL (Official Medicines Control Laboratory) által auditált módszer szerint. A fertőző anyagból tízes alapú hígítási sort készítettünk 10^{-4} hígításig. A hígításokból 0,2 ml-t oltottunk öt-öt 14 napos libaembrió CAM-jára. Öt embriót kontrollként vizsgáltunk. A tojásokat naponta lámpáztuk. Az elhullott libaembriók kórbonctani vizsgálatát, és a szerveikből vett minták kórszövetteni és elektronmikroszkópos vizsgálatát is elvégeztük. A fertőzött tojásokból kikelt kislibákat és egy kontroll-libát HM 1500 izolátorban (Montair-Andersen) helyeztük el (Bernáth és mtsai 2006).

Polimeráz láncreakció

Az említett három vírus kimutatására PCR-vizsgálatokat végeztük a tojás szikanyagából, az embriók veséjéből, bélcsatornájából és a CAM-ból vett mintákon. A fertőzés előtti vizsgálatok célja az volt, hogy ellenőrizzük az embriók mentességét az említett vírusoktól, míg a kísérlet során a PCR az elektronmikroszkópos vizsgálattal párhuzamosan alkalmazva igazolta a vírus jelenlétét. A vírus-DNS izolálására a szokásos fenol-kloroform eljárást alkalmaztuk. A PCR vizsgálatoknál GPV-re Sirivan és mtsai (1998), GHPV-re Guerin és mtsai (2000), míg GCV-re Ball és mtsai (2004) által leírt primereket és feltételeket alkalmaztuk. Az így nyert anyagot 2 %-os agarózgélen történő futtatás után 0,1 % etídiumbromid festést követően, UV fényenél vizsgáltuk.

Kórbonctani vizsgálat

A fertőzést követő 9., 10., 11., 12. napon, amikor a fertőzött embriók közül az első elhullásokat észleltük, az elhullott embriókon kívül egy kontroll embrió is kórbonctani vizsgálatra került (Bernáth és mtsai 2006).

Elektronmikroszkópos vizsgálat

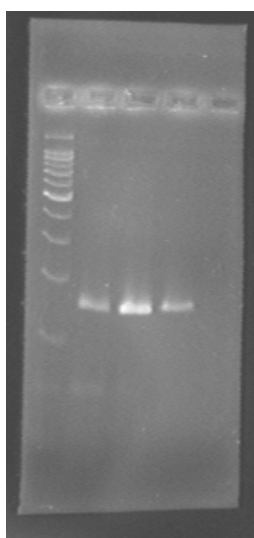
Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat az embriók szerveiből (máj, vese, bél és agyvelő) és a CAM-ból végeztük el.

Liba vérömléses vese- bélgyulladásos betegség kórfejlődése. A polyomavírussal fertőzött libaembriók vizsgálata — *Eredmények*

1. A betegség első észlelése idejéből származó fertőző anyag vizsgálata

A betegségben elhullott libák szervdörzsölékének baktériummentes szűrletével 1 napos korú libákat fertőztünk 1971-ben. A fertőzőanyagot mintegy 30 évig -20 °C -on tároltuk majd ugyanazzal a szűrlettel a fertőzési kísérletet megismételtük. Ezzel a fertőző anyaggal oltott naposlibák mindkét esetben a fertőzés után 11 nap lappangási idő után hullottak el. Az eredmény arra utal, hogy a kórokozó nem károsodott kimutatható mértékben a hosszú tárolási idő alatt. A fertőző anyagból, és ezzel az anyaggal fertőzött és elhullott négy liba szerveiből (bursa Fabricii, máj, lép, vese) elvégzett PCR vizsgálattal liba polyomavírust mutattunk ki (**7. ábra**).

M 1 2 3



7. ábra. A képen a liba polyomavírus okozta betegségben elhullott 1., 2. és a 3. kisliba vese mintájából nyert PCR termék látható.

A parvovírus kimutatására irányuló vizsgálat negatív eredménnyel zárult (Bernáth és mtsai 2001).

2. Libák vérömléses vese-bélgyulladás megbetegedésének kórfejlődése

Két kontroll libát elvéreztettünk a kísérlet előtt, és EM továbbá PCR módszerrel ellenőriztük, hogy az állatok GHPV, GPV és GCV fertőzéstől mentesek-e. Ezek a vizsgálatok negatív eredményt adtak.

Az előkísérletben öt naposlibát fertőztünk, melyek a 7. vagy a 8. napon hullottak el a betegségben.

A fő kísérletben 12 egynapos korú libát fertőztünk 2 ml fertőző anyaggal bőr alá. Öt kisliba kontaktkontroll volt. Az állatokat naponta megfigyeltük. A fertőzött állatok közül a kísérlet 3., 4., 5., és 6. napján 2-2 állatot extermináltunk. A fertőzés utáni 7. napon egy kisliba elhullott, kettő a betegségre jellemző klinikai tüneteket mutatott, egy pedig egészséges volt. A két beteg és az egy egészséges libát még ugyanazon a napon extermináltuk. A fertőzött állatokkal együtt tartott kontaktkontroll libák közül egy a 21., egy pedig a 33. napon hullott el. A további 3 kontaktkontroll kislibát a kísérlet kezdetétől számított 32. napig megfigyeltük (**7. táblázat**).

A beteg kislibákon igen rövid ideig, mindössze 1-3 óráig lehetett betegségre utaló tüneteket látni. Állás közben gyakran egyensúlyukat veszítették, és véres bélsarat ürítettek (**8. ábra**), néha csőrükre támaszkodtak.



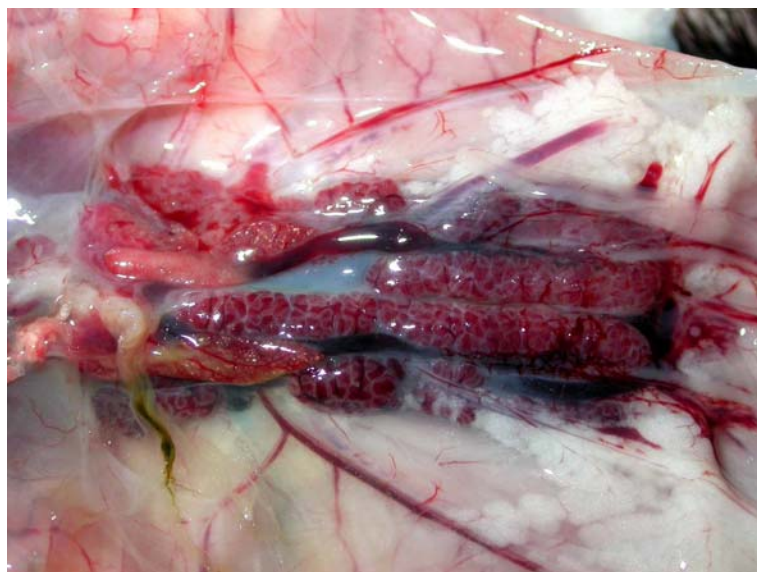
8. ábra Egyensúlyzavart mutató kisliba. Véres bélsárürítés.

Néhány állaton idegrendszeri tünetek, így nyak és fejcsavargatás, imbolygó járás is megfigyelhető volt. Az állatok az elhullás előtti utolsó fél órában ülve, nehezítetten lélegeztek. Később aluszékonnyá váltak, és rövidesen elhullottak. A beteg állatok egyetlen esetben sem gyógyultak meg.

Kórbonctani vizsgálat

A fertőzés után a 3., 4., 5. és 6. napon exterminált állatokban érdelemleges kórbonctani elváltozás egy esetben sem találtunk.

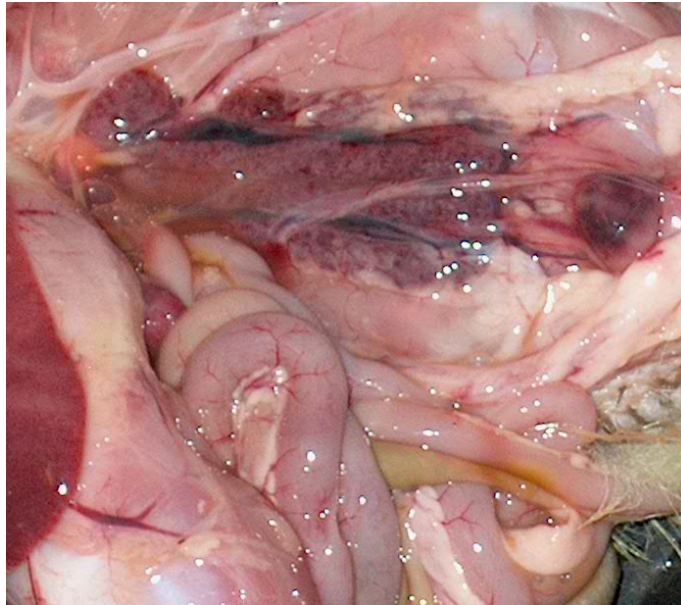
A kísérlet során elhullott és betegen elvéreztetett állatokban észlelt makroszkópos boncletet megegyezett a korábban leírtakkal (Bernáth és Szalai 1970; Süveges és Szécsényi, 1970). Testszerte, de leggyakrabban a nyaktájék bőr alatti kötőszövetében, a combok belső felületén lévő lazarostos kötőszövetben, a Fabricius-tömlő falában és környezetében, a bélfodorban oedemát, a szívburokban és a testüregben savós folyadékot találtunk. Úgyszintén testszerte, de leggyakrabban a hashártya, a szív külső hártája alatt, ritkábban a májburok alatt, az izmok közti kötőszövetben és a fasciák alatt pontszerű vérzések voltak. A vesében rendszeresen, a Fabricius-tömlőben ritkábban, az agyburkokban és az agyvelő állományában elvétve szétfolyó, az agyvelő állományában ezen kívül még roncsoló (apoplexiás) vérzés volt a boncletet (**9. ábra**).



9. ábra.

Duzzadt, bővérű vesék, mellettük a savóshártya alatt vérzések.

A vékonybélben gyakrabban, a vakbélben ritkábban szabad vérzéseket észleltünk, és ilyenkor a vér a bél üregébe került (**10. ábra**). Ezen kívül általában heveny veseelfajulás, ritkábban heveny májdystrophia is jelentkezett. A lép elváltozást nem mutatott. Az említett elváltozások állatonként változó súlyosságban fordultak elő és nem is minden állatban alakult ki mindegyik.

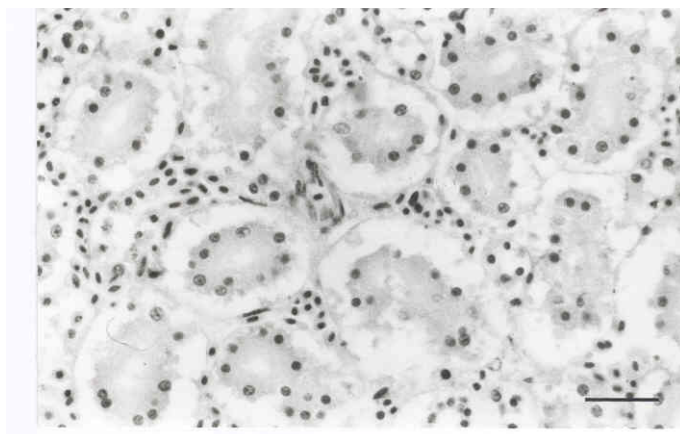


10. ábra Vérömléses bélgyulladás. A savóshártya felől is megfigyelhető a bélszakasz vörös elszíneződése. Vérzések a Bursa Fabricii állományában

A kísérlet kezdete utáni 21. napon elhullott kontaktkontroll libában kiterjedt agyvérzést, a 32. napon elhullottban a bántalomra jellemző típusos boncleletet, testszerte oedemát, vérzéseket és vérzéses bélgyulladást figyeltünk meg.

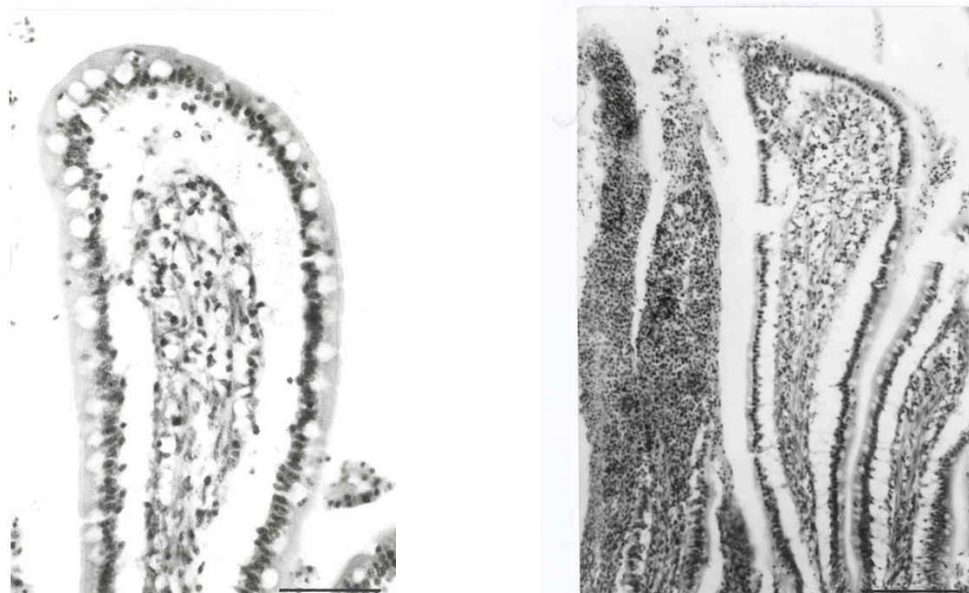
Kórszövettani vizsgálat

Az elhullott vagy betegként leölt állatok veséiben, a tubulusokban, főleg az elsődleges kanyarulatos csatornácskák hámsejtjeiben vacuolás elfajulás, vagy acidophil sejtelhalás és egyidejűleg karyopycnosis fordult elő (**11. ábra**). E mellett az interstitiumban körülírt gócbokban vagy kiterjedt területeken friss kapillaris vérzéseket lehetett megfigyelni.



11. ábra. A vese tubulus-hámsejtek vacuolás elfajulása. HE.-festés. Vonal = 25 μ m.

A vékony- és a vakbélben néhány bélbolyról, vagy szinte mindegyikről az epithelsejtek savókilépés miatt összefüggően leváltak (**12. ábra**). Az epithelsejt rétegtől megfosztott bolyhok kapillárisai szabaddá váltak. Ilyen bélbolyhok kapillárisaiból néha számottevő mennyiségű vér jutott ki, amely a levált epithelsejtekkel együtt a béltartalomhoz keveredett (**13. ábra**).



12. ábra A vékonybélben a bélboly epithelrétege savókilépés miatt levált. HE.-festés. Vonal = 50 μ m.

13. ábra Az epithelréteg nélküli bélbolyhokból kiinduló vérzés látható a kép bal oldalán, mellette a jobbra lévő bélbolyhokban az epithelréteg levált. HE.-festés. Vonal = 100 μ m.

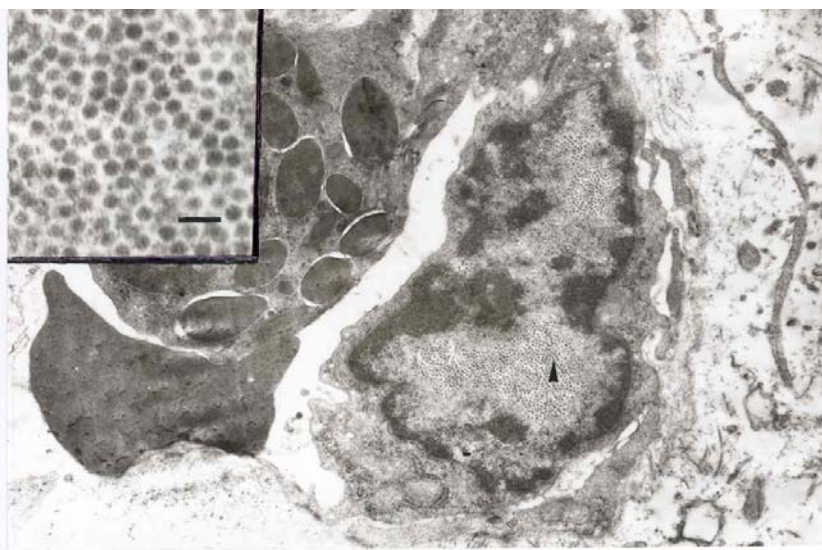
A bélbolyhok atrophíája a heveny esetekben nem volt megfigyelhető és a kehelysejtek aktivitásának jelei sem mutatkoztak. Egy-egy állatnál, kevés helyen a bélbolyhok propriájában heterophil granulocytás beszűrődés fordult elő. A vékonybélben a fenti szövettani elváltozások egyedenként változó mértékben, de a bél minden szakaszában előfordultak.

A májban csupán néhány esetben lehetett a megszélesbedett Disse-terekben savókilépést megfigyelni. Ritkán a sinusoidokból kiinduló vérzést lehetett látni. A tüdőben gyakorta heveny vizenyő mutatkozott, és ugyanilyen tartalom a bronhusokba és légcsőbe is átjutott. A szívizomzatban, vázizomzatban a szövetközi vizenyő mellett némelykor kapilláris vérzések mutatkoztak. A lépben, thymusban érdemleges szerkezetváltozást nem lehetett látni. A Fabricius tömlőben és környezetében szövetközi vizenyő és kapilláris vérzések is előfordultak.

Az agyvelőben alkalmanként perivasculáris vizenyőt, diszkrét kapilláris vagy néha roncsoló vérzéseket figyeltünk meg.

Elektronmikroszkópos vizsgálat

A kísérletesen fertőzött kislibák veséiben a muscularis típusú arteriáktól a glomerulus kapillárisokig az endothelsejtjek sejtmagjában 40-45 nm nagyságú, burok nélküli vírusokat figyeltünk meg (**14. és 15. ábra**).



14. ábra Vese, arteriola. Polyomavirusok az endothelsejt magjában. A vérérben vörösvérsejt és heterophil granulocytá. Az insert a ▲-al jelölt terület nagyítása. Vonal = 100 nm.

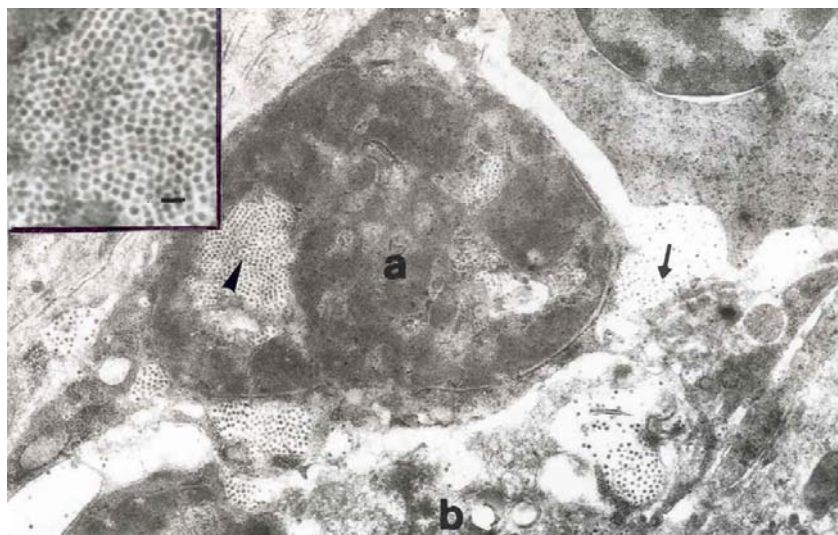


15. ábra Vese, glomerulus kapillaris. Az egyik endothelsejt magjában polyomavírusok, a másik endothelsejt elhalt (magja pycnosisos, citoplazmája szerkezet nélküli). Az insert a ▲-al jelölt terület nagyítása. Vonal = 100 nm.

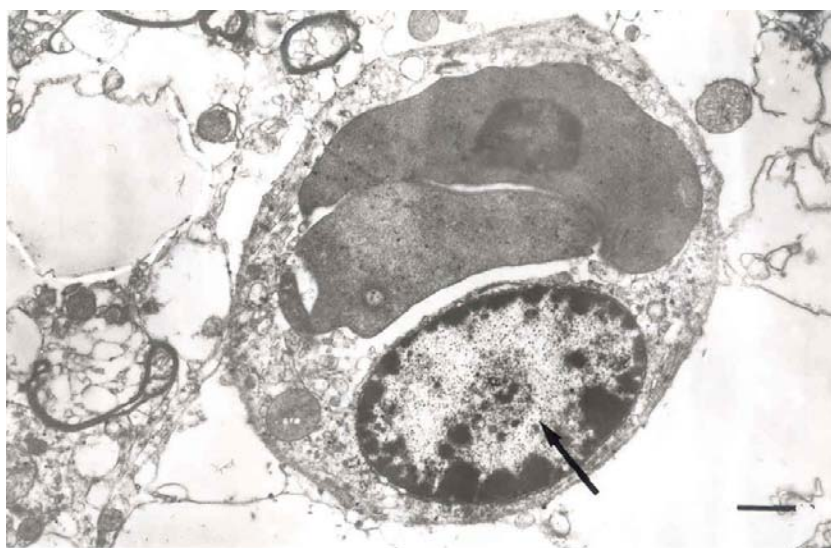
A vírust tartalmazó endothelsejtek vagy még szabályos sejtstruktúrát mutattak, vagy finom szerkezetük felbomlott. Gyakran egyes endothelsejtek elhaltak. Számos elhalt, pycnosisos magvú endothelsejtben vírust nem találtunk. Ezek az elhalt sejtek is rendszerint a vérér alaphártyáján foglaltak helyet. Az érintett vérér alaphártyája vagy szabályos összefüggő zónát képzett, vagy helyenként elmosódott és szerkezete nem volt kivehető, fellazult. A vérér körül általában enyhe oedema mutatkozott. A tubulus-hámsejtekben vírust egy esetben sem figyeltünk meg. A tubulus-hámsejtekben kórszövettani vizsgálattal vízforgalmi zavarokra utaló elváltozásokat, zavaros duzzadást, reveribilis és irreverzibilis jellegű vacuolás-hydropicus elfajulást, vagy collapsust lehetett kimutatni.

A bélcsatornában a bélbolyhok tengelyében futó kapillárisok endothelsejtjeiben, a sejtmagokban vírusok voltak megfigyelhetők (**16. ábra**).

Az enterocytákban vírust egy esetben sem lehetett megfigyelni. A bélbolyhok állományában előforduló vérzések az elhalt endothelsejteket tartalmazó vérerekből diapedezis útján, a nagyobb mértékű szabad vérzések pedig a „lecsupaszodott” bélbolyhok vérereiből rhexis révén indultak ki.



16. ábra Vékonybél. Bélboholy-kapillaris. Az egyik (a) endothelsejt magjában és citoplazmájában polyomavirusok. A másik (b) endothelsejt elhalt, citoplazmája szétesett, benne polyoma-virusok. Az elhalt endothelsejtből kiszabaduló és a vérplazmába került polyomavirusok csoportja (→). Az insert a ▲-al jelölt terület nagyítása. Vonal = 100 nm.



17. ábra Agyvelő. kapillaris. Az endothelsejt magjában (→) polyomavirusok. A kapillaris környezetében oedema. Vonal = 1000 nm.

A májban, a lépben, a thymusban, a Fabricius-tömlőben, a tüdőben és az agyvelőben szintén csak a vérerek (az arteriolák és kapillárisok) endothelsejtjeiben lehetett a fenti vírusokat megfigyelni (17. ábra). A szervek parenchyma-sejtjeiben egy alkalommal sem találtunk vírusokat. Csupán egy esetben, az egyik bélboholyban

figyeltünk meg egyetlen makrophag sejtben vírust úgy, hogy az az elhalt és vírustartalmú endothelsejtet phagocytálta (Dobos-Kovács és mtsai 2005).

3. Vizsgálatok libaembriókon

Korábbi kísérleteinkben az amnion-allantois zsákba fertőzött libaembriók nem hullottak el a megfigyelési idő végéig, ezért ezt a fertőzési módot az értekezésben tárgyalt kísérletben nem alkalmaztuk. A libaembriók fertőzését először CAM-ra és szikzsákba végeztük annak megállapítására, hogy milyen hatása van a vírusnak az embriókra. A szikzsákba oltott 7 napos embrióknál viszonylag hosszú, 14-17 nap volt a lappangási idő, míg a CAM-ra oltott 14 napos embriók 8-10 nap elteltével hullottak el. A bőralatti kötőszövetben és a savóshártyák alatt vérzések, testüregben savós folyadék, és a bőralatti kötőszövet oedemája volt a jellemző tünet mindkét fertőzési módnál.

A fő kísérletben csak a CAM-ra történő fertőzést alkalmaztuk. A $10^{4,25}$ - $10^{2,25}$ EID₅₀/0,2 ml mennyiségű liba-polyomavírussal fertőzött libaembriók a fertőzést követő 9-14. napon pusztultak el. A $10^{1,25}$ - $10^{0,25}$ EID₅₀/0,2 ml fertőző vírus alkalmazása esetén ez az időtartam meghosszabbodott a fertőzés utáni 14-16 napra. A $10^{1,25}$ EID₅₀/0,2 ml, és a $10^{0,25}$ EID₅₀/0,2 ml mennyiségű liba polyomavírussal fertőzött csoportból egy-egy embrió életben maradt, és a kontroll libával egy időben kikelt. A részletes adatokat a **8. táblázat** tartalmazza.

Az elpusztult embriók kórbonctani elváltozásai hasonlóak azokhoz, mint amelyeket a korábbi naposlibákon végzett kísérletek során megfigyeltünk (Dobos-Kovács és mtsai 2005), azonban néhány jelentős különbség észlelhető volt. A nagyobb fertőző adagok alkalmazása esetén ($10^{4,25}$ - $10^{2,25}$ EID₅₀/0,2 ml) az agyvelőben található diffúz, vagy körülírt multiplex vérzések voltak a legjellemzőbb kórbonctani elváltozások. Az agyvelőbeli diffúz vérzések miatt a 15 libaembrió közül 13 esetében az agykoonya mérete megnőtt és boltozatossá vált. A csontok eltávolodtak egymástól (**18. ábra**).

8. táblázat Libaembriók kísérleti fertőzésével kapott kórbonctani elváltozások

Liba polyomavírus fertőző dózis EID ₅₀ /0,2 ml	Elhullás a fertőzés utáni napon	Leggyakoribb kórbonctani elváltozások	
		agyban	egyéb szervekben
10 ^{4,25}	10-12	Diffúz vérzés	Nephrosis
10 ^{3,25}	9-11	Diffúz vérzés	Nephrosis és vesevérzések
10 ^{2,25}	13-14	Diffúz vérzés	Nephrosis és vesevérzések
10 ^{1,25}	14-16 1 kisliba kikelt	—	Vesevérzések
10 ^{0,25}	15-16 1 kisliba kikelt	—	Testszerte oedema
Kontroll	—	—	—

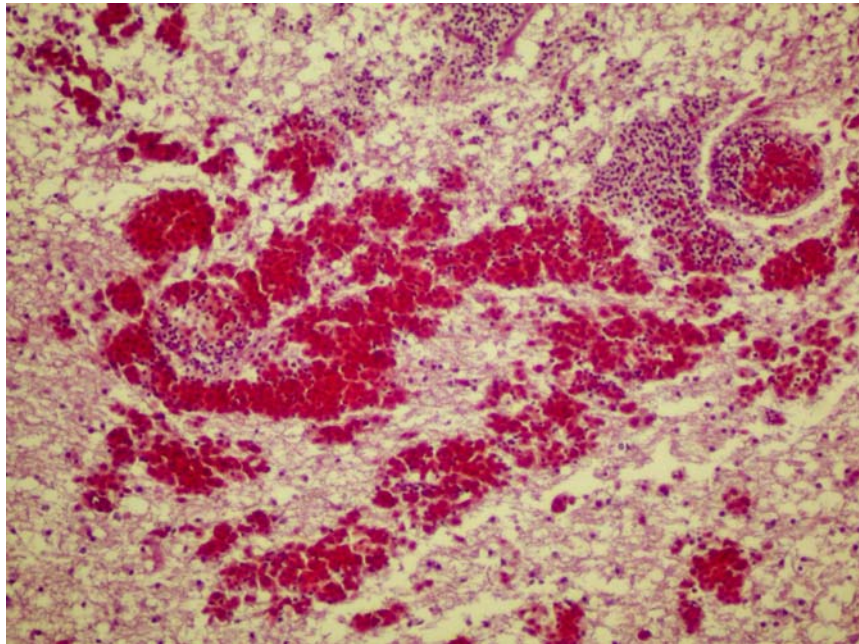


18. ábra Kísérletesen fertőzött öt libaembrió, melyekben kiterjedt agyvelői vérzések alakultak ki (jobb oldalon), és egy negatív kontrol embrió (balról). Négy embrió a liba polyomavírus 10^{4,25} EID₅₀/0,2 ml, míg egy a vírus 10^{3,25} EID₅₀/0,2 ml mennyiségével volt fertőzve.

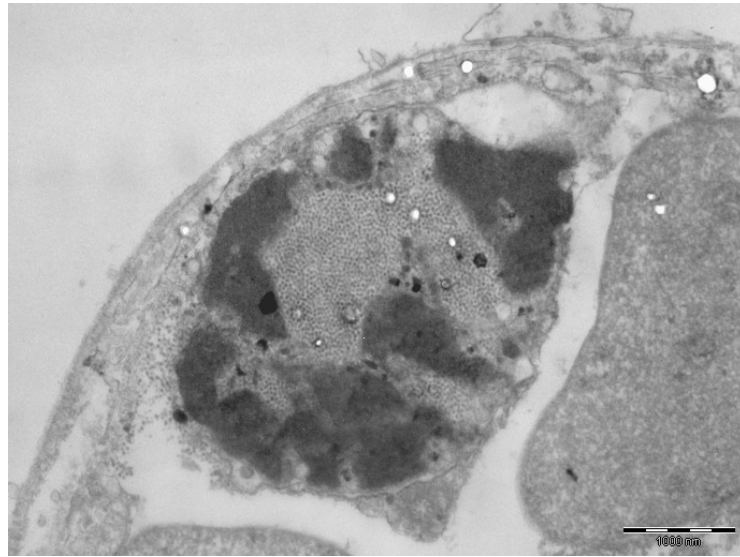
Az agykoponya említett elváltozása nem alakult ki azokon az embriókon, melyeket $10^{1,25}$ - $10^{0,25}$ EID₅₀/0,2 ml vírusráteggyel fertőztünk. Ezekben az esetekben oedema és kiterjedt vérzések voltak a bőr alatti kötőszövetben, és gyakran veseelfajulás is előfordult. Érdekes módon a bélcsatornában nem láttunk kórbonctani elváltozásokat, és a CAM felületén sem voltak vérzések. A kontroll embriók vizsgálata negatív eredményt adott.

Az agyvelőbeli elváltozások fénymikroszkópos vizsgálati eredménye a **19. ábrán** látható.

Az elektronmikroszkópos vizsgálati eredményei összhangban voltak a kórbonctani leletekkel. Burok nélküli, 40-45 nm méretű virionokat figyeltünk meg a bélbolyhok-, a veseglomerulusok-, valamint az agy-kapillárisainak endothel-sejtjeiben, a sejtanyagokban (**20. ábra**).

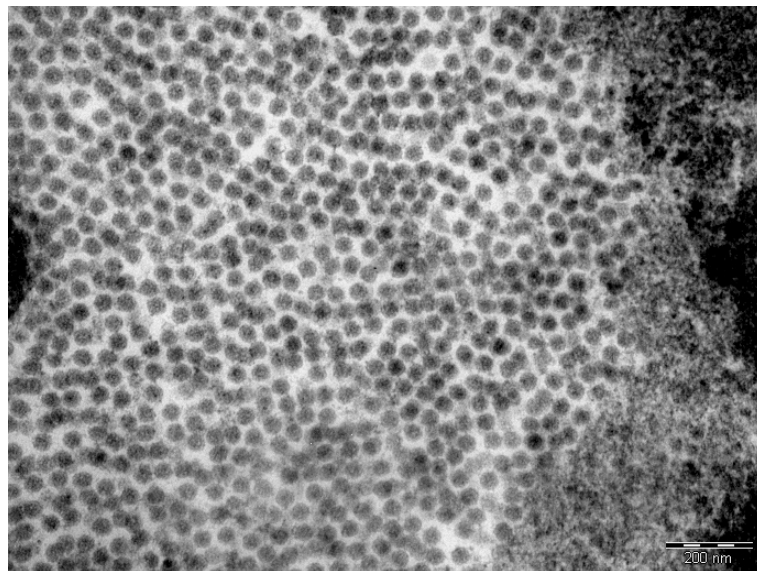


19. ábra Kapilláris vérzések az agyvelőben. Kószöveti kép. HE festés.



20. ábra Agyvelő, elektronmikroszkópos felvétel. Polyomavírusok egy kapilláris endothel sejtjének magjában. Vonal = 1000 nm.

A virionok elszórva, parakristályos formában helyezkedtek el a sejtmagban (**21. ábra**), formailag azonosak voltak a korábbi fertőzési kísérleteinkben megfigyelttel (Dobos-Kovács és mtsai 2005).



21. ábra. Parakristályos elrendeződésű liba polyomavírusok egy intestinalis kapilláris endothel sejtjének magjában. Vonal= 200 nm.

Két fertőzött libaembrió kikelt, de gyengébb fizikai állapotúak voltak, mint az egészséges kontroll liba. A liba polyomavírus fertőzöttség miatt ez a két kisliba 4 napos korban elhullott. A bőr alatti kötőszövet oedemája, és enyhe nephrosis és vérzéses bélgyulladás voltak a kórbonctani elváltozások. A kontaktkontroll kisliba egészséges maradt a 32 napos megfigyelési idő alatt. A fertőzött és kontaktkontroll libákból kloakatamponnal mintát vettünk, és PCR vizsgálatot végeztünk annak vizsgálatára, hogy van-e vírusürítés és lehetséges-e a vírus horizontális terjedése. A fertőzött állatokból vett kloakatampon PCR vizsgálata pozitív, míg a kontroll libáé negatív eredményű volt. A kontaktkontroll liba veséjének liba polyomavírus kimutatására irányuló PCR vizsgálata ugyancsak negatív eredménnyel zárult.

Liba vérömléses vese- bélgyulladása betegség kórfejlődése. A polyomavírussal fertőzött libaembriók vizsgálata — *Megbeszélés*

A közelmúltban a betegség első észlelése idejéből származó fertőző anyagból, és ezzel az anyaggal fertőzött és elhullott négy liba szerveiből (bursa Fabricii, máj, lép, vese) elvégzett PCR vizsgálattal liba polyomavírust mutattunk ki (Bernáth és mtsai 2001). Korábbi vizsgálataink során a tünetek, a kórbonctani-, kórszövettani- és a kórokozót tartalmazó anyaggal végzett fertőzési-vizsgálatok alapján, és elsősorban a fertőzött kislibákon végzett szérumvédelési kísérletek eredményeire alapozva állapítottuk meg, hogy az 1969 évi tömeges libaelhullásokat nem az úgynevezett libainfluenza okozta (Bernáth és Szalai 1970, 1971; Szalai és Bernáth 1971). Újabb vizsgálataink mégis indokoltak voltak, mert az 1969-ben észlelt megbetegedések kóroktanának újabb fontos bizonyítékát jelentette, hogy kimutattuk a liba polyomavírust a korabeli fertőző anyagból (Bernáth és mtsai 2001).

A libák polyomavírus okozta betegségét ismereteink szerint 1969 után hosszú ideig, egészen az 1990-es évek végéig nem észlelték Magyarországon (Ivanics és mtsai 2003). A kórokozó a környezeti hatásoknak jól ellenálló vírus, így felmerül a kérdés, hogy mely tényezők eredményezhették ezt a hosszú időszakot, mely alatt a betegséget nem diagnosztizálták hazánkban. Okát pontosan megállapítani nem lehet, de meg kell említeni a következőket. Az 1969 évi megbetegedések Derzsy-betegség

elleni reconvalescens szérumos oltások után, kizárólag nagyüzemi állományokban jelentkeztek. Az első észleléskor tehát a betegség nem természetes úton, nem járványszerűen terjedt, hanem vírust tartalmazó libainfluenza elleni szérummal történő kezelés után betegedtek meg a kislibák. Valamennyi beteg kisliba elhullott, gyógyulást egyetlen esetben sem észleltek. Ahol a betegség jelentkezett ott egyes helyeken a kislibák mintegy 50 %-a, de legtöbbször 80-90 %-a elpusztult, majd az érintett állományokat felszámolták. Az 1960-as évek végén a Derzsy-betegség súlyos veszteségeket okozott, de voltak fertőzéstől mentes libaállományok is. Ezekből a Derzsy-betegségtől mentes törzsállományokból származó tojásokat használták keltetésre. A felsorolt tényezők feltehetőleg együttesen eredményezték azt, hogy a betegséget hosszú ideig nem észlelték Magyarországon (Bernáth és mtsai 2001).

Meg kell említeni azt is, hogy Schettler (1980), továbbá Palya és mtsai (2004) feltételezték, hogy egyes tünetmentes libák vírushordozók lehetnek. Ezt a véleményt a legújabb vizsgálatok igazolták. Zielonka és mtsai (2006) a liba polyomavírus (GHPV) VP-1 antigén felhasználásával szerológiai módszereket fejlesztettek ki a GHPV specifikus ellenanyagok kimutatására. Az ELISA és hemagglutináció gátlási próbával ismertén liba polyomavírussal fertőzött állományban 85,7 %-os pozitivitást mutattak ki. Egy másik állomány vizsgálata, ahol nem észlelték a betegséget, negatív eredményt adott. Ugyanakkor GHPV specifikus ellenanyagokat mutattak ki két olyan állományban, ahol a betegség tünetei nem jelentkeztek. Ez az eredmény a szubklinikai vagy nem diagnosztizált fertőzések létezésére utal.

A közelmúltban Roy és mtsai (2004) közölték, hogy az avian polyomavírusokat hatékonyan tudták kimutatni formalinnal fixált, paraffinba ágyazott készítményekből PCR módszerrel. Ilyen készítmények nyilván hazai laboratóriumokban is rendelkezésre állnak. Vizsgálatuk, vagy fagyasztva tárolt libaszervek vizsgálata további információt adhatna arról, hogy voltak-e nem diagnosztizált megbetegedések a betegség újabb hazai megállapítása előtti időszakban. Az 1992-1997 közötti időszakban öt különböző libaállományból begyűjtött, és fagyasztva tárolt libaszerveket megvizsgáltuk Intézetünkben PCR

módszerrel, a betegség kórokozójának kimutatása céljából. Valamennyi esetben negatív eredményt kaptunk (Bernáth és mtsai 2002).

Vizsgálatokat végeztünk a betegség kórfejlődésének a tisztázására. A libák polyomavírus okozta megbetegedésének pathogenezisében az a meghatározó tényező, hogy a kórokozó a szervezet különféle nagyságú vérereinek, de leginkább az arteriolák és a kapillárisok endothelsejtjeinek magjában multiplikálódik. A víruszaporodás következtében az endothelsejtek funkciója károsodik. A vírus multiplikációja endothelsejt-elhaláshoz vezet. Emiatt a vérerek, főleg a kapillárisok falának átjárhatósága fokozódik. Erre a kapilláris-permeabilitási zavarra lehet visszavezetni a beteg állatokban testszerte mutatózó oedemát.

Ugyancsak a vérérfal átjárhatósága miatt jöhetnek létre a testszerte megfigyelt diapedezises, kapillaris vérzések is, melyek egyes szervekben, így a vesében, és az agyvelőben némelykor súlyos fokúak is lehetnek. A bélcsatornában a bélbolyhok állományában előforduló diapedezises vérzések mellett súlyos fokú szabad vérzésekkel is találkoztunk, mely rhexises eredetű. A rhexises vérzés kialakulásának előzménye az lehet, hogy a bélbolyh-kapillárisokból kiáramló savó nagyfokú enterocytaleválást okoz, majd a bélbolyhok szabaddá vált vérereinek fala mechanikai hatásokra megnyílik. Ezt a vérérfal előzetes károsodása elősegítheti.

A vesében a tubulushámsejtek regresszív elváltozásai nem vírus okozta primer hatásra jönnek létre, hanem a kapillarisok endothelsejtjeinek károsodása miatt kialakuló vérkeringési zavar következményei lehetnek.

A vírust a morfológiai vizsgálatok során egyik szervben sem találtuk meg az úgynevezett parenchymasejtjeiben.

Heveny esetekben, amikor a naposlibák a fertőzés után 7 nap múlva elhullottak a testszerte előforduló savókilépés és vérzések mellett általában nem lehetett gyulladásos-sejtes beszűrődést észlelni. Egyes állatokban azonban az epithelrétegüktől megfosztott, csupasz bélbolyhok propriájában heterophil granulocytás beszűrődést lehetett megfigyelni, amely reaktív elváltozás lehet (Dobos-Kovács és mtsai 2005). Az elhullásokat mindössze egy-két órás betegség

előzte meg. A betegség heveny lefolyása magyarázatul szolgálhat arra, hogy a gyulladáshoz vezető elváltozások csak a fentebb említett esetekben voltak kimutathatók. Hosszabb lefolyású esetekben viszont több munkacsoport is leírt gyulladáshoz vezető elváltozásokat (Szalai és Bernáth 1971; Lacroux és mtsai 2004).

Lacroux és mtsai (2004) szerint a vírus libavese–szövettenyésztésben szaporítható, azonban ezt a megállapítást nem erősítette meg Johné és Müller (2003), Palya és mtsai (2004, 2005), és a mi munkacsoportunk sem. Eredményeink szerint nem alakultak ki citopathogén elváltozások libavese szövettenyésztésben, és öt passzázs után PCR módszerrel sem lehetett vírust kimutatni (Bernáth és mtsai 2006). Ezek az eredmények összhangban vannak Bernáth és mtsai (2002), Lacroux és mtsai (2004), továbbá Dobos-Kovács és mtsai (2005) megfigyeléseivel, melyek szerint a vírus az endothelsejtek magjában szaporodik, az úgynevezett parenchymasejtekben nem. Ez magyarázatot adhat arra, hogy miért voltak sikertelenek a vírus szaporítására irányuló kísérleteink libavese–sejtenyésztésben.

A liba polyomavírussal fertőzött embriókból kikelt két kisliba. Ezek az állatok gyengébb fizikai állapotúak voltak, mint a kontroll kisliba, és a klockájukból vett tamponminta PCR vizsgálatával kimutattuk a liba polyomavírust. A két kisliba négy napos korban elhullott a betegségben, de addig egy izolátorban helyeztük el őket a kontroll kislibával. Ez alatt az idő alatt nem fertőzték meg a kontroll kislibát. Erre az eredményre magyarázatot adhat az idő rövidege, amelyet az állatok együtt töltöttek, valamint a speciális elhelyezés. A kislibák ugyanis rácsozaton voltak, amelyen nem halmozódhatott fel bélsár, és ez csökkentette a liba polyomavírus átjutásának az esélyét a kontroll állatba. Ennek ellenére megállapíthatjuk, hogy a liba polyomavírussal fertőzött libaembriókból két kisliba ki tudott kelni, és ürítette a vírust, mely a GHPV vertikális átvitelének lehetőségére utal, és arra, hogy a vírus átvihető fertőzésmentes libaállományba fertőzötten kikelt libákkal.

A Derzsy betegség elleni szérumban alkalmazása kapcsán 1969-ben észlelt nagyarányú libaelhullások is felhívták a figyelmet arra, hogy az állatgyógyászati készítmények mikroorganizmusokkal való fertőzöttsége igen nagy veszélyt jelent (Bernáth és Szalai 1970; Bernáth és mtsai 2001). Több esetben kimutatták az állatgyógyászati vakcinák fertőzöttségét mycoplasmákkal, BVD vírussal, csirkeanémia vírussal

(Vannier 1996). Az oltóanyag-termelésben felhasználandó biológiai készítmények (szérum, sejttenyészetek, sejtvonalak) esetleges pestivírus fertőzöttségét előzetesen ellenőrizni kell (OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004). A humán szérumkészítményeknél a legnagyobb kockázatot a *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1), hepatitis B vírus (HBV) és hepatitis C vírus (HCV) fertőzöttség jelentette az elmúlt évtizedekben, de komoly előrehaladást értek el a szűrővizsgálatok bevezetésével (Castle 2004; Seitz 2004).

A humán- és állatgyógyászati-készítmények törzskönyvezésének fő célja, hogy csak egyenletesen jó minőségű, ártalmatlan és hatékony készítmények kerüljenek forgalomba (Bernáth 1995; Soós 2000). A törzskönyvezés követelményrendszerének egyre bővülő rendeleti szabályozása elősegíti a fenti célok megvalósítását, de minden részletkérdésre értelemszerűen nem térhet ki (Bernáth 2006; Bernáth és Némethné Konda 2006). Időről időre új típusú készítményeket és új vizsgáló módszereket fejlesztenek ki, és ennek megfelelően a törzskönyvi követelmények is változnak (Bernáth és mtsai 1996).

Elfogadott álláspont, hogy a készítmények alkalmazása bizonyos kockázattal jár, a nulla kockázati szint elérése nem lehetséges. Az elfogadható kockázati szintet nagymértékben befolyásolja a rendelkezésre álló vizsgáló módszerek érzékenysége. Specifikus, érzékeny módszerek csökkenthetik az elfogadható kockázat szintjét. Ezért nélkülözhetetlen az új, korszerű eljárások bevezetése és alkalmazása az állatgyógyászati készítmények minőségének biztosítására és ellenőrzésére. A vakcinák előállítására használt sejtvonalak, vírustörzsek idegen vírus fertőzöttségének kimutatására jelenleg a PCR módszer tekinthető leginkább elfogadhatónak (Bernáth és mtsai 1996; Vannier 1996).

Az OIE megfogalmazta az elveket a „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (2004) című könyv „Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials” fejezetében, melyeket az állatok kezelésére alkalmazandó biológiai készítmények előállításánál és ellenőrzésénél, így a szérumok vonatkozásában is be kell tartani, és alkalmazni kell. A fertőzöttségtől való mentesség alatt meghatározott fertőzőképes organizmusok hiánya értendő, melynek biztosítása csak a felhasznált alapanyagok, feldolgozásuk és tárolásuk

megfelelő ellenőrzésével érhető el, és a termékeket is ellenőrizni kell. A szérumokra vonatkozó szabályok röviden a következők.

- A szérumokat egészséges állatokból kell nyerni, melyek amennyire csak lehetséges mentesek a kezelt állatfajra átvihető kórokozóktól. Mentesek bármely olyan állatfajra átvihető kórokozótól is, mely kapcsolatba kerül a kezelt állatokkal.
- Amennyiben vírust, vagy baktériumot használnak a szérum termeléséhez, akkor azoknak, és a vírusszaporításhoz használt sejttenyészeteknek mentesnek kell lenniük szennyező baktériumoktól, gombáktól, mycoplasmáktól, vírusoktól és más patogénektől, melyek átvihetők a kezelt állatfajra, vagy azzal érintkező állatfajokra.
- A szérum minden gyártási tételét ellenőrizni kell sterilitási vizsgálattal.
- A szérum minden gyártási tételét ellenőrizni kell olyan vizsgáló eljárásokkal, melyek megfelelően bizonyítják, hogy a szérum mentes idegen vírusoktól. Az ilyen vizsgáló eljárásokba beleértendő az olyan sejttenyészeteken végzett vizsgálatok, melyeken azok a vírusok szaporíthatók, melyek iránt a szérummal kezelendő állatfaj is fogékony. Beleértendő továbbá az embrionált tojásokon, és szükség esetén az állatokon végzett vizsgálatok is.

A liba polyomavírusról, és a vírus által okozott betegség kórfejlődéséről az utóbbi években a kutatás sok új megállapítást tett. Ezek tükrében az OIE kézikönyvében megadott ellenőrző módszerek közül az embrionált libatojáson végzett vizsgálat (Bernáth és mtsai 2006) alkalmas lett volna az 1969-ben nagyarányú libaelhullásokat előidéző két reconvalescens szérumból a kórokozó polyomavírus kimutatására, különösen chorioallantois-membránra történő oltás esetén. A célállatokon végzett ártalmatlansági vizsgálatot mindig a használati utasításban megadott legfiatalabb korú állatokon kell elvégezni. A Derzsy betegség elleni szérumot naposkorú libákon alkalmazták. Naposlibákon végzett ártalmatlansági vizsgálat ugyancsak kimutatta volna a polyomavírust. A szövettanyészeteken végzett vizsgálat viszont minden bizonnyal negatív eredményt adott volna a szérumok polyomavírus fertőzöttsége ellenére, mivel liba eredetű

szövettenyészeteken sem volt sikeres a vírus szaporítása (Johne és Müller 2003; Palya és mtsai 2004, 2005; Bernáth és mtsai 2006).

Az European Pharmacopoeia Fifth Edition (2005), Supplement 5.1, 5.2.9. Evaluation of Safety of Each Batch of Veterinary Vaccines and Immunsera fejezetének előírása szerint immunszérumok ártalmatlansági vizsgálatát a használati utasításban ajánlott legfiatalabb korú célállaton kell végezni, az ajánlott adagolási módon. Madaraknál általában 10 kísérleti állaton végzik a vizsgálatot. Az oltott állatok megfigyelési ideje legalább 14 nap. Az elhullott állatok kórbonctani vizsgálatát el kell végezni, mikroszkópos és mikrobiológiai vizsgálat indokolt lehet. Az 1969-ben nagyarányú elhullást okozó szérumok 2 ml-es adagjával sc. naposlibákat oltottunk Intézetünkben. A legrövidebb lappangási idő 13 nap volt (Bernáth és Szalai 1970), tehát ez a vizsgálat is kimutatta a nem kívánt hatást.

Az állatgyógyászati készítmények alkalmazásának veszélyét már mintegy tíz évvel ezelőtt is sokkal kisebbnek tartották, mint az élő állatok, és állati eredetű termékek kereskedelméhez fűződő kockázatot (Vannier 1996). Elmondható az is, hogy az állatgyógyászati készítmények előállítását szabályozó Európai Unió előírások, a tagállamok közötti harmonizáció, a korszerű technikai követelmények, új technológiák, a gyártók által bevezetett minőségbiztosítási elvek és intézkedések hatására a készítmények alkalmazásának kockázata napjainkban már jelentősen kisebb, mint korábban volt (Vannier 1996; Bernáth és mtsai 1996; Bernáth 2006).

5. COLOSTRUM LYMPHOCYTÁK INTESTINALIS ABSZORPCIÓJA MALACOKBAN ÉS BÁRÁNYOKBAN

Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója —Irodalom

A syndesmochorialis placentaszerkezetű állatfajokban (ló, szarvasmarha, juh, kecske, sertés) az újszülött állatok passzív védelmének kialakulásában a colostrummal felvett maternális immunglobulinok igen fontos szerepet töltenek be (Porter és mtsai 1970; Newby és mtsai 1982; Mayer és mtsai 2002).

A colostrumba irányuló IgG szekréciót régóta receptor mediált folyamatnak tekintik (Dixon és mtsai 1961). A folyamatot a neonatalis Fc receptor (FcRn) mediálja

(Kacs Kovics és mtsai 2000). A receptor enyhén savas környezetben megköti az IgG molekulát, míg semleges-enyhén lúgos közegben szétválk az IgG/FcRn komplex (Kiss és mtsai 2004; Mayer és mtsai 2004). Az FcRn receptort szarvasmarhatgyben kizárólag az acinusok és ductusok epithelsejtjeiben mutatták ki. Ez az eredmény arra utal, hogy az FcRn közvetlenül befolyásolja a colostrum illetve a tej IgG tartalmát. Juhok és szarvasmarhák tgyyszövetének immunhisztokémiai vizsgálatával megállapították, hogy a receptor az ellés előtt 10 nappal diffúzan tölti ki a citoplazmát az acinus és ductus sejtekben. Az ellés után 1 nappal, 5 nappal és 14 nappal az FcRn főleg az előbbi sejtek apicalis oldalán jelenik meg, majd az ellés utáni 75. napon ismét diffúz lokalizációját figyelték meg. Az FcRn eloszlásának változása arra utal, hogy fontos szerepet játszik az IgG transzportban a colostrumképzés idején (Mayer és mtsai 2002, 2004).

Az újszülött emésztőcsatornájában a hámsejtek pynocytosis útján veszik fel az Ig-okat. A kérődzőknél valamennyi Ig molekula felszívódik, közöttük az IgA is, de ezt követően az IgA kiválasztódik a bél lumene felé (Tuboly 1998; Mayer és mtsai 2004). A szekretoros IgA polimer immunglobulin receptor közvetítésével kerül a nyálkahártya felszínére. A fiatal kérődző állatoknál a már vérbe jutott IgG1 egy része a vékonybél cryptasejtjeinek aktivitásával kerül ismét a bélbe, és ott hozzájárul az emésztőtraktus specifikus immunvédelméhez (Mayer és mtsai 2004).

Kimutatták továbbá, hogy a különböző emlős állatfajokban a vemhesség végén, az anyai szervezet ún. common mucosal system-jéből lymphoid sejtek, közöttük T és B lymphocyták kumulálódnak a tejmirigyben (Evans és mtsai 1982). Ezek transepithelialisan az alveolusokba jutnak, és a colostrummal az újszülött emésztőcsatornájába kerülnek (Seelig és Beer 1978).

A colostrumban, illetve a tejben található sejtek típusa állatfajonként különböző, változik a laktáció időtartama alatt és az egyed kondíciójától függően. Négyféle sejtípus található az emlő szekrétumában: lymphocyták, macrophagok, neutrophyl és epithelialis sejtek. Közölték, hogy a tgyyszekrécióban lévő lymphocyták többsége a mesenterialis nyirokcsomókból származik (Kumar és mtsai 1989; Le Jan 1996). A sertés colostrumában a lymphocyták aránya 10-25 %, az epithelialis sejtek aránya több mint 20 % (Le Jan 1996). A juh colostrumában lévő sejtek 6-11 %-a

lymphocytá (Lee és Outteridge 1981). A szarvasmarha colostrum kevesebb, mint 68 % lymphocytát, és több mint 23 % macrophagot tartalmaz (Liebler-Tenorio 2002). Vizsgálták tehát, hogy milyen sejtek találhatóak a colostrumban, de kérdéses maradt szerepük az újszülöttek immunstátusának kialakulásában. Feltételezték, hogy az emésztőcsőben van védőhatásuk, vagy mediátor anyagaikkal stimulálhatják az újszülött immunrendszerének működését (Ogra és mtsai 1977).

Schnorr és Pearson (1984) vizsgálatai igazolták, hogy újszülött bárányokban a saját anyai colostrum lymphocyták abszorbeálódnak az emésztőcsatornából. Feltételezték, hogy bárányokban az abszorbeálódott colostrum lymphocyták immuninformációt vihetnek át az újszülöttbe, és szerepük lehet immunrendszerük fejlődésében (Tuboly és mtsai 1995, Tuboly és Bernáth 2002).

Újszülött borjakon is vizsgálták a colostrum lymphoid sejtek abszorpcióját az emésztőcsőből. A jelölt sejteket jejunumban és az ileumban a Peyer-plakkokban mutatták ki, és a vizsgálati eredményből arra következtettek, hogy a sejtek felvételének ezek az elsődleges helyei (Liebler-Tenorio és mtsai 2002).

Egy munkacsoport tagjaként vizsgáltam, hogy a colostrumból és a vérből származó lymphoid sejtek abszorbeálódnak-e az újszülött malacok emésztőcsatornájából, és bejutnak-e a bélfodri nyirokcsomóba (Tuboly és mtsai 1988).

Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója malacokban — *Anyag és módszer*

Kísérleti állatok

Négy magyar hússertés fajtájú koca („A”, „B”, „C”, „D”) 23 újszülött malacain végeztük a kísérletet. A malacokat a megszületés pillanatában anyjuktól elválasztottuk.

Lymphoid sejtek szeparálása

A kocáktól az ellést követően 50-50 ml vérmintát vettünk, majd 5 NE oxitocin i.v. beadása után 100-100 ml colostrummintát gyűjtöttünk. A vérmintákból a lymphoid sejteket Ficoll Paque-al szeparáltuk, majd PBS-ben háromszor mostuk, és a

sejtszámot 2×10^6 /ml-re állítottuk. A colostrumminták centrifugálása után az üledéket PBS-ben reszuszpendáltuk, Ficoll Paque-al szeparáltuk, majd háromszor PBS-ben mostuk. A sejtszámot 3×10^6 -ra állítottuk (Tuboly és mtsai 1988).

A sejtek jelölése

A lymphoid sejtek jelölését Barth és Gillespie (1974) módszerével végeztük. A jelöléshez $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ izotoniás NaCl oldatát használtuk, aktivitása jelöléskor 100 MBq/ml volt, a radioizotópos szennyező ^{99}Mo pedig kevesebb mint 0,01 %. A lymphoid sejtek szuszpenziójához ml-ként 37 MBq $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ -ot adtunk és 37°C -on 15 percig inkubáltuk, időnkénti keveréssel. Ezután a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -t redukáltuk olyan módon, hogy a sejtuszuszpenziókhoz ml-ként 0,04 ml steril $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ oldatot adtunk cseppenként, állandó keverés közben. Az ónklorid oldatot frissen készítettük savas citrát dextróz oldatban (30 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$, 0,15 g NaH_2PO_4 és 2,0 g dextróz egy liter desztillált H_2O -ban, a pH 7,4-re állítása után szűréssel sterilizálva). Az ónklorid oldat hozzáadása után a sejtuszuszpenziókat 37°C -on 15 percig inkubáltuk. Ezután $2 \times 400 \mu\text{l}$ mintát vettünk a sejtekhez kötött radioaktivitás meghatározására. A sejteket háromszor mostuk pufferral a szabad radioaktivitás eltávolítása érdekében. Ismét $2 \times 400 \mu\text{l}$ mintát vettünk a szabad radioaktivitás meghatározására. A jelöléskor a radioaktivitás 1,9-5,1 %-a kötődött a sejtekhez, míg a háromszori mosás után radioaktivitás 93-95 %-a sejthez kötött volt. A radioizotópos méréseket NZ 310 típusú Autogamma Spectrometerrel (Gamma Művek, Budapest) végeztük (Tuboly és mtsai 1988).

A kísérleti állatok kezelése

A jelzett sejteket a születést követő 7-10. órában juttattuk a malacok emésztőcsatornájába. Az „A” és „B” koca malacain laparotomiát végeztünk és a sejteket közvetlenül a duodenumba injektáltuk. A „C” és „D” koca malacainak orrnyelöcső szondán adtuk be a sejtuszuszpenziót. Az egyes kocák malacait úgy osztottuk meg, hogy azok vagy a saját anyai colostrumból vagy vérből származó sejteket, illetve idegen koca colostrum sejtjeit kapták. A „B” és „C” koca malacai közül három 56°C -on inaktivált saját anyai colostrum sejteket kapott. A colostrumsejtekkel kezelt malacok kísérleti elrendezését a **9. táblázat** mutatja be.

9. táblázat Lymphoid sejtek abszorpciójának vizsgálata újszülött malacokban

Kocák jelzése	Malacok jelzése	A malacok kezelésére használt lymphoid sejtek eredete	A colostrum lymphoid sejtek applikálásának módja (5-5 ml)
A	A1 és A2	A koca colostrumából	Laparatomia után gyomorba
	A3 és A4	B koca colostrumából	
	A5 és A6	A koca véreből	
B	B1 és B2	B koca colostrumából	Laparatómia után a duodenumba
	B3 és B4	B koca véreből	
	B5	B koca colostrumából (inaktivált)	
C	C1 és C2	C koca colostrumából	Orr-nyelőcső szondával
	C3 és C4	B koca colostrumából	
	C5 és C6	C koca véreből	
	C7 és C8	C koca colostrumából (inaktivált)	
D	E1, E2, E3, E4,	Idegen kocák colostrumából	Orr-nyelőcső szondával

A kísérletbe vont malacokat a jelzett sejtek bevitele után a 8. órában 16 mg/testtömeg-kg ketaminHCl adagolása után elvégeztettük, és belőlük vér és szervmintákat vettünk a duodenum és jejunum bélszakaszokból, valamint a bélfodri nyirokcsomókból. A malacok vérmintáiból a fehérvérsejteket Ficoll Paque-al szeparáltuk. A mosott sejtek 10^6 /ml-es szuszpenziójából keneteket készítettünk. A szervmintákból kriosztátban készítettünk meszeteket. A meszeteket és a vérkeneteket autoradiográfiásan vizsgáltuk olyan módon, hogy a lemezeket Ilford Nuclear G-emulzióba mártottuk, majd 6 napon át 4 °C-on sötétkamrában exponáltuk. A duodenum és jejunum mintákból szövettani vizsgálatot, és elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk. Az elektronmikroszkópos vizsgálat Philips 201 CS műszerrel történt (Tuboly és mtsai 1988).

Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója malacokban — *Eredmények*

A colostrum lymphoid sejtek intestinalis abszorpciójának vizsgálata az újszülött malacokban a következő eredményre vezetett.

A technetiummal jelölt saját anyai colostrum sejtekkel kezelt újszülött malacok duodenum- és jejunum-epitheliumában a sejtek kimutathatók voltak, kriosztátban készített szövetmetszetek autoradiográfiás vizsgálatával (**22. és 23. ábra**).

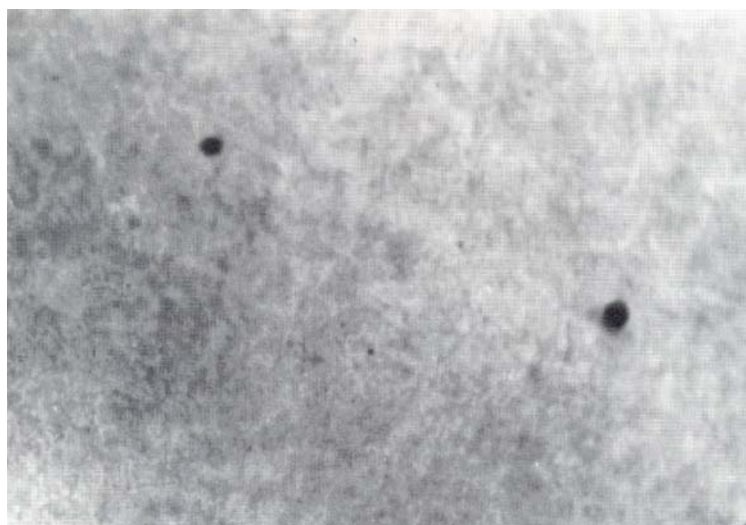
Ugyanezekben a malacokban a colostrum sejtek a ductus lacteális-ból készített kenetekben, valamint a mesenterialis nyirokcsomók corticalis részében (**24. ábra**) is kimutathatók voltak, autoradiográfiával.



22. ábra Technetiummal ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) jelölt colostrum lymphoid sejtek a duodenum epitheliumban. Kriosztát metszet, autoradiográfia, 120 x.



23. ábra Technetiummal ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) jelölt colostrum lymphoid sejt a bélboholy intercelluláris réseiben. Autoradiográfia, HE, 260 x.



24. ábra Technetiummal ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) jelölt colostrum lymphoid sejtek a mesenterialis nyirokcsomó corticalis részében. Kriosztát metszet, autoradiográfia, 260 x.

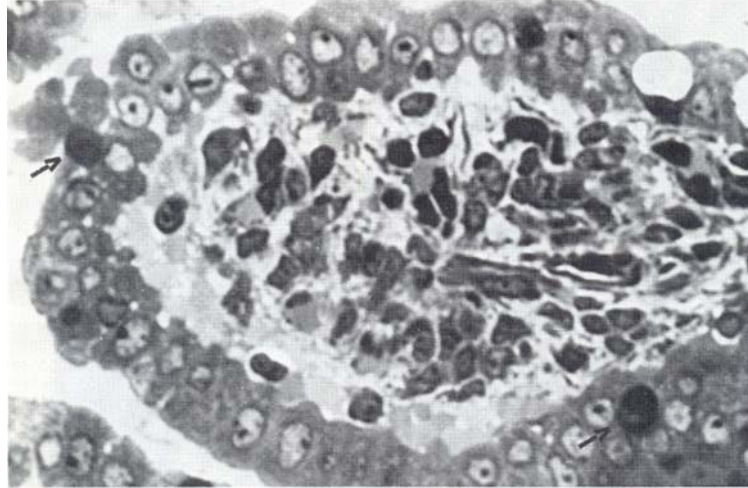
A radioizotóppal jelzett idegen anyai colostrumsejtek a malacokban csak a duodenum és jejunum epitheliumában voltak megtalálhatók, a ductus lactealis nyirokfolyadékában és a nyirokcsomókban azonban nem. A saját anyai vérből származó jelzett lymphocyták abszorpcióját sem a duodenumban, sem a jejunumban nem lehetett megfigyelni.

Azokban a malacokban, amelyeket inaktivált saját anyai colostrumsejtekkel kezeltünk a duodenum, jejunum és mesenterialis nyirokcsomó mintáiban a fiziológiai szöveti kép volt megfigyelhető, a sejtek nem abszorbeálódtak.

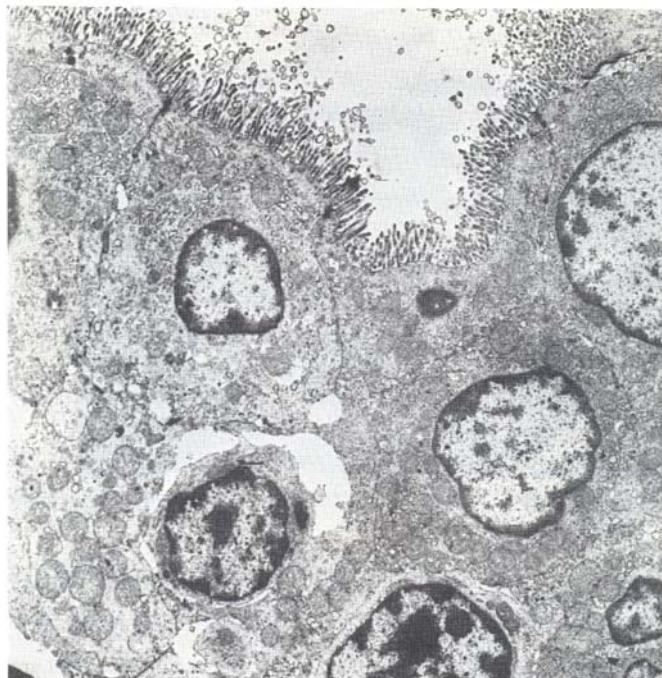
A malacok vérmintáiból szeparált fehérvérsejtek között jelzett sejteket nem találtunk.

A saját anyai colostrumsejtekkel kezelt malacok duodenum és jejunum mintáiból készített metszetekben fénymikroszkópos vizsgálattal a lymphoid sejteket a bél lumenben, gyakran a bélbolyhok csúcsi részeinél, egyesével, csoportokban, vagy a bélbolyh epithel sejtei között lehetett észlelni (**25. ábra**).

Elektronmikroszkópos vizsgálattal főként a jejunum nyálkahártyájának epithel sejtjei között, a kitágult intercellularis résekben lehetett megfigyelni a lymphocytákat (**26. ábra**).



25. ábra Jejunum. Lymphoid sejtek (→) a bélboly epithel-sejtjei között. Félvékony metszet, toluidinkék festés, 400 x.



26. ábra Lymphocyta a jejunum epithel sejtjei közötti részben. EM felvétel, 9600 x.

Az idegen anyai colostrum sejtekkel kezelt malacok belében epithelsejtek között lymphoid sejtek csak elvétve lehetett kimutatni, a ductus lactealis lymphában és a nyirokcsomókban azonban nem. A saját anyai vérből származó colostrumsejteket nem lehetett kimutatni sem a malacok belének epithel sejtjei között, sem a bélfodri nyirokcsomókban.

Colostrum lymphocyták intestinalis abszorpciója malacokban– *Megbeszélés*

A syndesmochorialis placentájú állatok colostrumában a lymphoid sejtek jelenlétét már régebben megfigyelték (Lee és Otteridge 1981; Evans és mtsai 1982). Ennek ellenére a maternális immunitás sajátosságainak tanulmányozása elsősorban a colostrumban foglalt immunglobulinokra korlátozódott, míg a lymphoid sejtek szerepét nem vizsgálták.

A colostrum lymphoid sejtjeinek abszorpcióját az újszülöttek emésztőcsövéből, és a sejtek bejutását a nyirokkeringésbe először patkány (Seelig és Billingham 1981), és juh modell kísérletekben igazolták (Schnorr és Pearson 1984; Schelldrake és Husband 1985).

Vizsgálataink alapján elsőként közöltük (Tuboly és mtsai 1988), hogy újszülött malacokban a saját anyai colostrum lymphocyták a bélfalon keresztül abszorbeálódnak. Vizsgálatunk igazolta, hogy az abszorpció az epithel réteg intercelluláris résein keresztül történik. Megállapítottuk azt is, hogy az anyai colostrumban lévő lymphoid sejtek 8 óra alatt a nyirokutakon át eljutnak a mesenterialis nyirokcsomókba. Feltételeztük, hogy a lymphocyták immuninformációt vihetnek az újszülött malacokba, és szerephez juthatnak az újszülött immunstátusának kialakulásában (Tuboly és mtsai 1988).

A saját anyai lymphocyták abszorpcióját újszülött malacok bél lumenéből vizsgálati eredményeik alapján más szerzők is megerősítették, közleményünkre történő hivatkozással (Williams 1993; Le Jan 1996).

Ugyancsak elsőként közöltük, hogy a saját anyai vérből származó lymphoid sejtek nem abszorbeálódnak az újszülött malacok emésztőcsövéből, mely arra utal, hogy a

folyamatban szelektivitás érvényesül (Tuboly és mtsai 1988). Az abszorpció mechanizmusa hasonló lehet ahhoz, mint amilyen a lymphoid sejtek tejmirigy alveolusaiba való átjutását szabályozza (Seelig és Beer 1978; Manning és Parmely 1980).

Vizsgálati eredményünket, mely szerint az újszülött malacokban az anyai vérből származó lymphoid sejtek nem abszorbeálódnak Williams (1993) kutatásai is igazolták. Williams colostrumot nem kapott malacok vizsgálatával megállapította, hogy a jelölt anyai colostrum fehérvérsejtek szájon történő beadása után 2 óra elteltével kimutathatók voltak a vérben. A maximális számot a vérben 5-7 óra alatt érték el, és 24 óra múlva a májban, tüdőben, nyirokcsomókban, lépben is kimutathatók voltak. Colostrummentes malacok bélcsatornájából kivett szövetrészekben is vizsgálta a jelölt anyai colostrumsejtek abszorpcióját. Megállapította, hogy 24-48 óra elteltével a duodenális és jejunális epithelsejtek között, a lamina propria irányába haladtak a sejtek. Az ileumból származó készítményben nem észlelték a sejtek abszorpcióját. Az anyai vérből származó jelölt leukociták nem abszorbeálódtak a gasztrointestinalis szövetekbe sem in vivo, sem in vitro. Amikor a sejteket a malacok vénájába fecskendezték, akkor ugyanúgy eljutottak szervekbe, mint a colostrumból a bél falon keresztül abszorbeálódo sejtek.

Új megállapítás az is, hogy az idegen koca colostrumából származó lymphoid sejtek csak a duodenum és a jejunum epitheliumában lehetett kimutatni, a bélfordri nyirokerekéből vett lymphá mintákban és a nyirokcsomókban nem (Tuboly és mtsai 1988). Az eredmény ugyancsak arra utal, hogy a sejtek abszorpciójában szelektivitás érvényesül.

Az immunglobulinok felszívódásának tanulmányozása során megállapították, hogy azok endocytosis útján jutnak a bélhámsejtek citoplazmájába (Széky és mtsai 1979). A lymphoid sejtek abszorpciója viszont az epithel réteg intercellularis résein keresztül történik. A colostrum-sejtek abszorpciója aktív folyamat, melyet sertésnél in vivo vizsgálatok bizonyítottak (Tuboly és mtsai 1988), és később in vivo és in vitro vizsgálatok is megerősítettek (Williams 1993). Ugyanis csak a saját anyai colostrum lymphocyták abszorbeálódtak, az anyai vérből származók nem.

A malacok mintegy 500-700 millió élő anyai sejtet vesznek fel naponta (Le Jan 1996). A sertés colostrum 10^7 /ml lymphoid sejtet tartalmaz és ezek 11-26 %-a lymphocytá. (Evans és mtsai 1982). A T lymphocyták aránya 70-90 % (Le Jan 1996). Az említett sejtek a bélnyálkahártyán abszorbeálódnak, és ebből arra lehet következtetni, hogy immunkompetenciájuk és antigén-elkötelezettségük mellett hozzájárulhatnak az újszülött immunrendszerének a fejlődéséhez. Ezeknek a folyamatoknak a minél alaposabb megismerése a sertés vonatkozásában azért is fontos, mert a malacok immunrendszerének működőképessége lassabban alakul ki, mint más állatfajokban. A B lymphocyták száma például csak 30 nap alatt éri el felnőtt állatokra jellemző szintet (Tuboly és mtsai 1988).

A vizsgálatokban a colostrumsejtek jelölése a Technetium-99 radioizotóppal történt. Barth és Gillespie (1974) igazolták ennek a radioizotópos jelölésnek előnyös tulajdonságait. Megállapították, hogy a jelölés nem befolyásolja kimutatható mértékben a jelölt sejtek fehérje és nukleinsav anyagcseréjét, a radioizotóp spontán felszabadulása alacsony, a szabad izotóp nem kötődik újból a sejtekhez. Technetiummal jelölt fehérvérsejteket alkalmaznak például gyulladákos területek azonosítására, és a képfelbontás és a radioaktivitás mérése szempontjából megfelelőbbnek találták, mint a ^{51}Cr , ^{67}Ga vagy az ^{111}In jelölést (Menzies-Gow és mtsai 2003). A fehérvérsejtek technetiumos jelölése a mi vizsgálatunk során is jól alkalmazható volt az autoradiográfiás vizsgálatokban.

A vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a colostrumból lymphocyták átjutnak újszülött borjakban, bárányokban és sertésekben a nyirokkeringésbe és a bélfodri nyirokcsomókba. Többen vizsgálták, hogy a colostrumból az újszülöttek szerveibe jutó sejtek befolyásolják-e az újszülöttek immunállapotát. Williams (1993) fitomitogén proliferatív hatását vizsgálta colostrumot nem szopott, de fluoreszcein-izothiocianáttal jelölt anyai colostrumsejtekkel per os kezelt, és kontroll malacokon. Az anyai colostrumsejtekkel kezelt malacok B sejtjeire szignifikánsan nagyobb hatása volt a fehér zsálya mitogénnek, mint a kontroll malacok B sejtjeire.

Riedel-Caspari (1993) vizsgálatai szerint a colostralis lymphocyták megnövelik a borjak védetségét *E. coli* fertőzésekkel szemben. A szerző borjakat fertőzött a születés után 3 órával egy enteropathogén *E. coli* törzs 10^9 telepformáló egységnyi

tenyészetével. Közvetlenül a fertőzés után, és a két következő napon 10 állatnak sejtmentes colostrumot (COL —) adott, míg a másik 10 állatnak colostrum sejtekkel kiegészítettet (COL +). A COL + borjak a kísérlet első hetében a fertőző *E. coli*-t a bélsárban szignifikánsan kevesebb számban ürítették, és a baktérium kimutathatóságának alsó határértékét hamarabb érték el, mint a COL — borjak.

Liebler-Tenorio (2002) közölte, hogy a colostrális leukocyták kétféle módon gyakorolhatnak hatást az újszülöttek immunrendszerére. Egyrészt a bélsatornában a colostrális leukocyták által termelt oldható tényezőket abszorbeálhatja az epithelium és/vagy a sejtek átjutnak a bélbarrieren, és közvetlen kapcsolatba kerülnek az újszülött immunrendszerével.

Le Jan (1996) szerint a colostrumban lévő sejtek az újszülöttben résztvesznek a lokális immunitás kialakulásában, és modulálják az újszülött bélsatornájának immunstátuszát, abban a kritikus időszakban, amikor kialakul az antigénekre a megfelelő reakció (védelem, tolerancia, allergia).

A colostrumsejtek funkciója a következő (Le Jan 1996):

- A T lymphocyták feltehetőleg immunfunkciókat közvetítenek az újszülöttnak, és citokineket választanak ki. A T8 sejtek lehetővé teszik az immunrendszer kontrollált aktiválását. A B lymphocyták dimer IgA-t választanak ki.
- A colostrumban lévő neutrofil sejtek fagocitáló és mozgáskéességüket tekintve csökkent funkcionális képességűek. Szerepük a tejmirigy védelmében lehet. Megfigyelték, hogy a colostrum-sejtek szeparálásakor, a mosások során ezeknek a sejteknek a többsége elpusztul.
- A colostrumban lévő makrofágok in vitro vizsgálatokban aktívak voltak. Ebből arra következtettek, hogy fagocitózissal és IgA kiválasztással hozzájárulnak az újszülött immunvédelméhez. Alapvető szerepük az újszülöttekben a citokin termelés, és ezen kívül antigén-prezentáló sejtek.
- Az epithelsejtek a tejmirigy alveoláris epitheliumról válnak le, és hozzájárulnak szekretórikus IgA továbbításához az újszülött bélsatornájába.

A koca colostrumában lévő epithelsejtek in vitro tenyészthetők. Ez arra utal, hogy citokin termeléssel és antigén prezentációval kapcsolatba tudnak lépni az újszülött immunrendszerével. Igen nagy jelentőségű lehet az újszülött immunrendszere számára, hogy az anyai sejtek révén hozzájut olyan feldolgozott antigénekhez, melyre önmagában nem lenne képes. Ilyenek lehetnek például azok az antigének, melyekhez IgA kapcsolódott.

A kérődzőkben, nyúlban és sertésben az anyai colostrum-sejtek tehát abszorbeálódnak az újszülöttek bélcsövéből. Kísérleti eredmények bizonyították, hogy a sejtek mintegy 60 óráig biztosan fennmaradnak az újszülöttek szervezetében. Ez az időtartam elegendő arra, hogy a sejtek kifejtessék funkciójukat (Le Jan 1996).

Az ember haemochoriális placentával rendelkezik, így még a méhen belüli életben, a placentán keresztül jutnak IgG osztályba tartozó ellenanyagok a magzatba. Számos vizsgálatot végeztek annak megállapítására, hogy milyen hatással van az anyatejjel történő táplálás az újszülött immunrendszerére (Hanson és mtsai 2002). Korábban elsősorban azt feltételezték, hogy az anyatejjel a gyermek kész védőfaktorokhoz jut, mint amilyen az IgA ellenanyagok, laktoferrin, oligoszacharidok, melyek receptoranalógnak funkcionálnak. Ezek a tényezők számos fertőzés ellen védelmet nyújtanak. Újabban többen megállapították, hogy az anyatejjel történő táplálás stimulusokat közvetít a gyermek immunrendszeréhez, lehetőséget ad a fertőzések elleni nagyobb védelemre, még az anyatejjel történő táplálás befejezése utáni időszakban is.

Silfverdal és mtsai (1997) az anyatejjel történő táplálás hatását vizsgálták az invazív *Haemophilus influenzae* b típus által okozott fertőzésekre. Azok a gyermekek, akik 13 hétnél hosszabb ideig kizárólag anyatejet kaptak szignifikánsan védettebbek voltak a fertőzéssel szemben, mint akiket rövidebb ideig tápláltak ilyen módon. Ez a hatás 12 hónapos korig volt kimutatható. Ugyancsak Silfverdal és mtsai (1999) értékelték az anyatejjel történő táplálás védőhatását *Haemophilus influenzae* okozta meningitis kialakulására a svéd lakosság adatainak értékelésével. Az anyatejjel történő táplálás kedvező hatását 5 és 10 éves korig kimutatták, de 15 éves korban már nem.

Az anyatejjel történő táplálás időszakában, vagy azt követően a vakcinázásokra kialakuló nagyobb immunválaszt ugyancsak olyan adatnak tekintik, mely alátámasztja, hogy az említett táplálás aktívan stimulálhatja a gyermek immunválasztát. Ilyen hatásokról számoltak be tetanusz és diphtheria toxoidok, *Haemophilus influenzae* b típus, és élő, orális adagolású poliovírus vakcinákkal történő immunizálás esetén. BCG vakcina ugyancsak erősebb T sejttes immunválaszt váltott ki az anyatejjel táplált gyermekekben (Pabst és mtsai 1989; Greenberg és mtsai 1994; Hanson 2002).

Más esetben humán adatok elemzésekor nem észleltek a vakcinázáskor kedvező hatást. Ezt elsősorban élő vírusvakcináknál (polio-, influenza-, rotavírus) tapasztalták, és Hanson szerint (1998, 2002) olyan helyeken fordulhat elő, ahol a betegség endémiás, és az anyatejben lévő IgA neutralizálja a vakcinavírust. *Haemophilus influenzae* b és tetanusz vakcina együttes alkalmazásakor is beszámoltak olyan esetről, amikor az anyatejjel történő táplálásnak nem volt kedvező hatása az immunválaszra. A szerző szerint az ilyen esetek összefügghetnek a szoptatási időszak hosszával, és az anya immunstátuszával is (Hanson 1998).

Eredményeinket összefoglalva: vizsgálataink igazolták, hogy a colostrumból a saját anyától származó lymphocyták bejutnak az újszülött malacok nyirokereibe, bélfodri nyirokcsomóiba. Az emésztőcsatornából a sejtek abszorpciója szelektív módon történik. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a lymphocyták immuninformációt vihetnek át az újszülöttbe, és szerepük lehet immunrendszerük fejlődésében (Tuboly és mtsai 1988, 1990; Bernáth és mtsai 1989a).

Donovan és mtsai (2007) kutatási eredményei bizonyították, hogy szarvasmarha vírusos hasmenése (bovine virus diarrhoea, BVD) ellen inaktivált vakcinával immunizált tehének borjaiba a colostrum leukocyták immuninformációt visznek át. A colostrum szopása után 1-2 nap múlva a borjak véréből izolált leukocyták szignifikánsan nagyobb proliferációt mutattak BVD vírus antigénhatásra, mint az első szopás előtt vett vérmintáikból izolált sejtek. A anyai leukocyták a szopás után 24 órán belül hozzájárulnak az újszülött védelméhez a vírusfertőzéssel szemben. Az anyaállat vakcinázásával biztosítható, hogy az újszülött a colostrummal antigénhatásra reagáló anyai leukocytákhoz jusson. Az említettek alapján a szerzők

megállapították: nyilvánvaló, hogy az átvitt ellenanyagok egyszerű mérése nem elegendő az anyából az újszülöttbe átjutó immunitás mértékének teljes felmérésére (Donovan és mtsai 2007). Az állatgyógyászati oltóanyagok ellenőrzése során a készítmények minőségét, ártalmatlanságát és hatékonyságát értékelik. Donovan és mtsai (2007) kutatási eredményeik alapján, az alkalmazott oltóanyag hatékonysága egyik összetevőjének, a celluláris immunválasznak szerepét hangsúlyozzák, és ezért megállapításuk az oltóanyagellenőrzés szempontjából is figyelemre méltó.

A colostrum lymphocyták abszorpciójának vizsgálata során elért kutatási eredményeink iránti érdeklődést jelzi, hogy az International Society for Research on Human Milk and Lactacion 10. kongresszusán, melyet az UNICEF és a WHO támogatásával rendeztek Tucson-ban (Arizona, USA) 2001-ben, a nemzetközi társaság vezetőségének meghívására plenáris előadást tartottunk "Intestinal absorption of colostrum lymphoid cells in newborn animals" címmel (Tuboly és Bernáth 2001).

Az értekezésben tárgyalt vizsgálatok új tudományos eredményeit a következő fejezet összegezi.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS HASZNOSÍTÁSUK LEHETŐSÉGEI

Elsőként igazoltuk, hogy a *Listeria monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin (listeriolizin O, LLO) mennyisége és az egerek intraperitonealis fertőzésével meghatározott virulenciájuk között nem mutatható ki korreláció, ezért a törzsek által termelt LLO mennyiségéből nem lehet következtetni virulenciájukra (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989; Bernáth és Pitron 1989).

Számítógépes program (Quantiscan for Windows, Biosoft, Cambridge, UK) alkalmazása baktériumtörzs SDS-PAGE proteinképek értékelésére. Megállapítottuk, hogy az eljárás jól reprodukálható eredményt ad, és közöltük, hogy az értékeléssel információ kapható valamely frakció nagyságára vonatkozóan is (Bernáth és Morovján 1998).

Új eljárás kidolgozása *Pseudomonas aeruginosa* kimutatására vízmintákból direkt impedimetriás módszer alkalmazásával (Szita és mtsai 2007). Együttműködés alakult ki a Sy-Lab Geräte GmbH-val (Neupurkensdorf, Ausztria) a vizsgáló eljárás gyakorlati alkalmazására és kereskedelmi hasznosítására.

A libák vérömléses vese- bélgyulladás első észlelése idejéből származó vizsgálati anyagban PCR módszerrel kimutattuk a liba polyomavírust (Bernáth és mtsai 2001). Az eredmény újabb egyértelmű bizonyítéka annak a korábbi megállapításunknak, melyet a reconvalescens szérumok nem kívánt hatása kivizsgálása eredményeként tettünk, hogy az 1969. évi tömeges libaelhullásokat egy addig ismeretlen betegség, a libák vérömléses vese- bélgyulladása okozta.

Elsőként állapítottuk meg, hogy a liba polyomavírus az ér endothelsejtek magvában szaporodik, és a betegség vérzéses jellegét, valamint a testszerte kialakuló oedemákat az említett sejtek károsodása és elhalása okozza. A szervek parenchyma sejtjeiben nem találtunk vírusokat. Az eredmények adatot szolgáltattak a betegség kórfejlődésére vonatkozóan, és arra is, hogy a libaszervekből készített szövettényezeteken miért volt sikertelen a vírus szaporítása (Bernáth és mtsai 2002; Dobos-Kovács és mtsai 2005).

A liba polyomavírus libaembriókon történő titrálásának kidolgozása. Az eljárás jelentőségét az adja meg, hogy a liba polyomavírus szövettanyészeten nem volt szaporítható, így ez az első olyan laboratóriumi módszer, mellyel a szaporodóképes vírus mennyisége meghatározható (Bernáth és mtsai 2006).

A liba polyomavirussal fertőzött libaembriók kórbonctani elváltozásainak első leírása, az agykoponya jellegzetes elváltozásának első ismertetése (Bernáth és mtsai 2006).

Elsőként bizonyítottuk, hogy a liba polyomavirussal fertőzött embriókból kikelő kislibák a betegség terjesztői lehetnek (Bernáth és mtsai 2006).

Első közlése annak a vizsgálati eredménynek, hogy újszülött malacokban a saját anyai colostrum lymphocyták a bélcsőből abszorbeálódnak, és eljutnak a mesenterialis nyirokcsomókba. A saját anyai vérből, vagy idegen koca colostrumból származó lymphocytákat nem lehetett kimutatni a ductus lactealis nyirokfolyadékában és a mesenterialis nyirokcsomókban, és ez arra utal, hogy a colostrumban lévő lymphocyták abszorpciója szabályozott mechanizmus eredménye (Tuboly és mtsai 1988).

ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezés öt tárgykörben végzett vizsgálatok eredményeit foglalja össze. Az új kutatási eredmények és hasznosításuk lehetőségei a következőkben összegezhetők.

Az 1980-as években már elfogadottá vált a szakirodalomban, hogy a *L. monocytogenes* fő virulenciafaktora a hemolizin (listeriolizin O, LLO), de nem volt adat arra vonatkozóan, hogy a listeria törzsek által termelt hemolizin mennyisége arányos-e a törzsek virulenciájával. A *L. monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyisége és egér intraperitonealis fertőzésével mért virulencia közötti összefüggés vizsgálatokor kapott eredményekből kiszámítható volt a két jellemző közötti korrelációs együttható, ami $r = 0,408$ értéknek felelt meg, a t érték pedig 1,42 volt. Az ismételt vizsgálat hasonló eredményre vezetett, és ennek alapján elsőként igazoltuk, hogy a *Listeria monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyisége, és az egér intraperitonealis fertőzésével meghatározott virulencia között nincs korreláció. A hemolizáló *L. monocytogenes* törzsek által termelt hemolizin mennyiségéből tehát nem lehet következtetni a virulencia mértékére (Bernáth és Szemerédiné Pitron 1989; Bernáth és Pitron 1989).

Eredményünket később Tabouret és mtsai (1991), Waseem és mtsai (1995), továbbá Roche és mtsai (2001) közleményei is megerősítették, és a *L. monocytogenes* virulenciatényezőinek megismerése is igazolta. A *L. monocytogenes* kórokozó-képessége arra vezethető vissza, hogy a gazdasejteket fagocitózissra tudja készíteni, ezt követően szaporodik a gazdasejtekben, és közvetlenül át tud jutni más sejtekbe is. A törzsek virulenciájában minden olyan virulenciatényezőnek szerepe van, melyek ezt a folyamatot lehetővé teszi (Doyle 2001).

Az elmúlt években azonosították a *L. monocytogenes* számos virulenciatényezőjét. Ismertették a *L. monocytogenes* felületi proteinjeit, melyek a baktérium nem fagocita gazdasejtekbe jutásához szükségesek. Ezek az Internalin A, Internalin B, p60 protein, kazeinolitikus proteázok és az ActA protein (Nair 2000; Doyle 2001; Vázquez-Boland és mtsai 2001). A „*listeria pathogenicity island 1*”-en (LIPI-1), melyet *hly* géncsoportnak, vagy más néven PrfA függő virulencia géncsoportnak is neveznek, hat virulenciafaktor génje (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* és *plcB*) található. A

géncsoport által kódolt virulenciátényezők meghatározó fontosságúak a *L. monocytogenes* intracelluláris szaporodásában, és a gazdasejtek közötti terjedésében (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Vizsgálatok igazolták, hogy egyes virulenciátényezők elvesztése jelentősen csökkentette a *L. monocytogenes* virulenciáját. Egyes esetekben a csökkenés mértékét számszerűen is meghatározták. Ilyen például a *L. monocytogenes prfA* génje, mely a PrfA (positive regulatory factor A) proteint kódolja. A PrfA protein a LIPI-1-ben található gének kifejeződését szabályozza (Herler és mtsai 2001). A PrfA negatív mutáns *L. monocytogenes* virulenciája mintegy ezerszeresen csökken az eredeti törzshöz viszonyítva (Kazmierczak és mtsai 2006).

A *L. monocytogenes iap* génje kódolja a p60 proteint (invasion associated protein). A gén elvesztése R teleptípus kialakulását eredményezi. Ezek a törzsek az eredeti, virulens törzseknek megfelelő mennyiségű LLO-t termelnek, de virulenciájukat elvesztették, mert a baktérium nem tud bejutni a gazdasejtbe (Vázquez-Boland és mtsai 2001).

Megállapítható, hogy az értekezésben hivatkozott és tárgyalt virulenciátényezők összességükben határozzák meg a törzsek virulenciáját. A *L. monocytogenes* törzsek által in vitro termelt hemolizin mennyiségéből ezért nem lehet következtetni a törzsek virulenciájának mértékére.

Az SDS-PAGE proteinképek értékelésénél hagyományosan leggyakrabban valamely frakció létét, vagy hiányát veszik figyelembe, mennyiségi viszonyait, a frakciók nagyságát pedig vizuálisan határozzák meg. Az elmúlt évtizedekben több kórokozó baktériumfaj esetében kimutatták, hogy valamely fontos tulajdonság meghatározott molekulatömegű proteinfrakcióhoz kapcsolódik, mely nátrium dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elválasztható. Ebben az esetben fontos lehet az is, hogy valamely frakció nagyságára vonatkozóan is információt kapjunk. SDS-PAGE proteinképek értékelésére alkalmaztunk egy számítógépes programot (Quantiscan for Windows, Biosoft, Cambridge, UK). Az *E. rhusiopathiae* ATCC 35426 (A 360) törzs SDS-PAGE proteinképeit értékeltük Quantiscan for Windows (Biosoft, Cambridge, U.K.) számítógépes programmal. A

törzs tenyésztéstől kezdett négy párhuzamos vizsgálatkor a Pearson-féle korrelációs együttható kiszámításával az eredmények $988 \pm 0,55$ egyezést mutattak. Jelentős mértékben az sem befolyásolta az eredményeket, ha egy minta mintegy kétszeres proteinnennyiséget tartalmazott. Ennek a proteinképnek a hasonlósága a másik három proteinképhez viszonyítva 985 ± 6 volt. Vizsgálataink alapján közöltük, hogy a program baktérium SDS-PAGE proteinkép értékelésekor pontos, reprodukálható eredményt ad, és az értékelési szakaszok területének meghatározásával információt szolgáltat a frakciók nagyságára vonatkozóan is (Bernáth és Morovján 1998).

Impedimetriás eljárással, acetamid tartalmú szelektív, szintetikus táptalaj (Z-leves) felhasználásával vizsgáltuk, hogy a módszer megfelelő-e a *Ps. aeruginosa* automatizált kimutatására vízmintákból. A szelektív szintetikus táptalajban az egyedüli szén és nitrogénforrás az acetamid. Összesen 1036 csapvíz, kútvíz, uszodavíz és dialízisvíz-mintát vizsgálatunk meg. A vizsgálatok során a hagyományos tenyésztési eljárással összehasonlítva téves negatív, vagy téves pozitív eredmény nem volt. A 440 csapvíz-minta közül 32 volt pozitív mindkét módszerrel. Kilencvennégy minta volt pozitív ugyancsak mindkét módszerrel a 160 kútvízminta közül. A vizsgált 250 uszodavíz-minta közül 188 volt kontaminált *Ps. aeruginosa*-val. További 186 dialízis vízmintát vizsgálunk impedimetriával és MPA táptalajon, melyek közül egyetlen pozitív minta volt, mégpedig az impedimetriás vizsgáló módszerrel.

A vízminták *Ps. aeruginosa* fertőzöttségét a kontamináció mértékétől függően 7-26 óra alatt lehetett kimutatni az impedimetriás eljárással. A vízminták alacsony fertőzöttségéhez hosszabb kimutatási idő társult, a nagyobb fertőzöttséghez pedig rövidebb (Szita és mtsai 2007). Az eredmények alapján megállapítható, hogy az impedimetriás módszer a Z-leves használatával alkalmas a *Ps. aeruginosa* kimutatására vízmintákból. A módszer fő előnye, hogy egyidejűleg 240 minta vizsgálható, az eljárás teljesen automatizált, egyszerű táptalaj szükséges hozzá, és nem munkaigényes.

A laboratóriumi törzsek vizsgálata során csak a hét *Ps. aeruginosa* törzs szaporodott a táptalajban és fluoreszkált UV fény alatt. A további 19 *Pseudomonas* törzs, mely 17 fajhoz

tartozott, és a 18 másik baktériumfaj (például: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) nem fejlődött a táptalajban. A Z-leves jó szelektivitását megerősítette azon eredmény is, mely szerint nem észleltünk téves pozitív eredményt még a bakteriológiailag erősen szennyezett uszodavíz-minták vizsgálatakor sem (Szita és mtsai 2007). Együttműködés alakult ki a Sy-Lab Geräte GmbH-val (Neupurkendorf, Ausztria) a vizsgáló eljárás gyakorlati alkalmazására és kereskedelmi hasznosítására, melynek keretében több országban folyamatban vannak a bevezető vizsgálatok.

A liba vérömléses vese- bélgyulladásos betegség első észlelése idejéből származó fertőző-anyagban polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálattal kimutattuk a liba polyomavírust (Bernáth és mtsai 2001). Az eredmény az 1969-ben észlelt megbetegedések kóroktana vonatkozásában újabb fontos bizonyítékot jelentett.

A liba polyomavírus okozta betegsége kórfejlődésének tanulmányozása céljából naposlibákat fertőztünk. Elsőként közöltük, hogy a kórokozó a szervezet különféle nagyságú vérereinek, de leginkább az arteriolák és a kapillárisok endothelsejtjeinek magjában multiplikálódik (Bernáth és mtsai 2002; Dobos-Kovács és mtsai 2005). Megállapítottuk, hogy a vírusszaporodás az endothelsejtek károsodását, elhalását eredményezi, ezért a vérerek, főleg a kapillárisok falának átjárhatósága fokozódik. A kapilláris-permeabilitási zavarra lehet visszavezetni az elhullott állatokban testszerte mutatózó oedemát.

Ugyancsak a vérérfal átjárhatósága miatt jöhetnek létre a testszerte megfigyelt diapedezises, kapilláris vérzések is, melyek egyes szervekben, így a vesében, és az agyvelőben némelykor súlyosfokúak lehetnek. A bélcsatornában a bélbolyhok állományában előforduló diapedezises vérzések mellett szabad vérzésekkel is találkoztunk, melyek rhexises eredetűek. A rhexises vérzés kialakulásának előzménye az lehet, hogy a bélbolyhok-kapillárisokból kiáramló savó nagyfokú enterocyta-leválást okoz, majd a bélbolyhok szabaddá vált vérereinek fala mechanikai hatásokra megnyílik (Dobos-Kovács és mtsai 2005).

A vesében a tubulushámsejtek regresszív elváltozásai nem vírus okozta primer hatásra jönnek létre, hanem a kapillárisok endothelsejtjeinek károsodása miatt kialakuló vérkeringési zavar következményei lehetnek. A vírust a morfológiai vizsgálatok során egyik szervben sem találtuk meg az úgynevezett parenchyma-sejtekben. Az említett vizsgálati eredményeket a betegség kórfejlődéséről elsőként közöltük (Dobos-Kovács és mtsai 2005). A vizsgálati eredmények magyarázatot adtak arra is, hogy a liba-szervekből készített szövettényezeteken miért volt sikertelen a vírus szaporítása (Bernáth és mtsai 2006).

Elsőkét írtuk le a liba polyomavírussal fertőzött libaembriók kórbonctani elváltozásait. Az elváltozások közül különösen jellemző, hogy $10^{2,25}$ EID₅₀/0,2 ml, vagy annál nagyobb mennyiségű liba-polyomavírussal fertőzött libaembriók agykoponya-csontjai gyakran eltávolodtak egymástól, az agyvelőbeli diffúz vérzések miatt. Az agykoponya ilyenkor boltozatossá vált, mérete megnőtt (Bernáth és mtsai 2006).

A liba polyomavírust nem sikerült szövettényezeteken szaporítani, így ilyen módon nem titrálható. Ezért kidolgoztuk a vírus titrálását libaembriókon, a kórokozó chorionallantois-membránra oltásával. Ez az első laboratóriumi módszer, mellyel a szaporodóképes vírus mennyisége meghatározható (Bernáth és mtsai 2006).

Vizsgáltuk, hogy a liba polyomavírussal fertőzött embriókból kikelő kislibák terjeszthetik-e a liba vérömléses vese- bélgyulladás betegségét. Elsőként bizonyítottuk, hogy kikelhetnek kislibák a liba polyomavírussal fertőzött embriókból. Ezek az állatok négy napos korban hullottak el a betegségben. A kloakájukból vett tamponminta PCR vizsgálatával kimutattuk a liba polyomavírust. Vizsgálati eredményünk arra utal, hogy a polyomavírussal fertőzött embriókból kikelő kislibák a liba vérömléses vese- bélgyulladás betegség terjesztői lehetnek (Bernáth és mtsai 2006).

Vizsgáltuk, hogy újszülött malacok bél-lumenéből a colostrumból izolált lymphocyták abszorbeálódnak-e, vagyis átjutnak-e az újszülött szervezetébe. A kísérletek elvégzését az indokolta, hogy a fontos tárgykörben szakirodalmi közlemény nem volt fellelhető. Elsőként közöltük, hogy újszülött malacokban a

saját anyai colostrum lymphocyták a bélfalon keresztül abszorbeálódnak, és eljutnak a mesenterialis nyirokcsomókba (Tuboly és mtsai 1988).

Vizsgálatunk igazolta, hogy az abszorpció az epithel réteg intercelluláris résein keresztül történik. Megállapítottuk azt is, hogy az anyai colostrumban lévő lymphoid sejtek 8 óra alatt a nyirokérrendszeren át eljutnak a mesenterialis nyirokcsomókba (Tuboly és mtsai 1988). Újszülött malacok bél lumenéből a saját anyai lymphocyták abszorpcióját vizsgálati eredményeik alapján más szerzők is megerősítették, közleményünkre történő hivatkozással (Williams 1993; Le Jan 1996). Williams (1993) vizsgálatai igazolták azt a megállapításunkat is, hogy az anyai vérből izolált lymphocyták nem abszorbeálódnak az újszülött malacok bél-lumenéből.

Ugyancsak elsőként állapítottuk meg, hogy a saját anyai vérből, vagy idegen kocától származó lymphocytákat nem lehetett kimutatni a ductus lactealis nyirokfolyadékában és a mesenterialis nyirokcsomókban, és ez arra utal, hogy a colostrum lymphocyták abszorpciója szelektív módon történik (Tuboly és mtsai 1988).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni először azoknak, akiknek támogatásáért már nincs módom köszönetet mondani. Tisztelettel emlékezem **Dr. Simonyi Erzsébetre**, az állatorvos-tudományok kandidátusára és **Dr. Kucsera Györgyre**, az állatorvos-tudományok doktorára a pályám kezdetén nyújtott útmutatásért, és önzetlen segítségért.

E helyen is köszönetemet fejezem ki **Dr. Mészáros Jánosnak**, az MTA rendes tagjának a szakmai pályafutásom során nyújtott támogatásért, a doktori pályázat és értekezés elkészítéséhez tett javaslataiért, melyek nélkülözhetetlen segítséget jelentettek számomra.

Megköszönöm **Dr. Tuboly Sándornak**, az MTA doktorának a sok évig tartó, eredményes kutatási együttműködés lehetőségét, és azt, hogy az értekezés írása és szerkesztése során adott fontos javaslataival, megfontolt érveivel segítette munkámat.

Hálás vagyok **Dr. Kassai Tibornak**, az MTA doktorának a szakmai útmutatásért, és támogatásért melyet egyetemi hallgató korom óta nyújtott számomra, és megköszönöm biztató szavait értekezésem elkészítéséhez.

Köszönetet mondok **Dr. Soós Tibornak**, az állatorvos-tudományok kandidátusának, intézetünk igazgatójának, aki nem csak az értekezésben tárgyalt vizsgálatok feltételeinek biztosításával, hanem értékes szakmai tanácsaival, és az értekezés írása, összeállítása során adott hasznos javaslataival is nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Dr. Szalai Ferencnek **Dr. Dobos-Kovács Mihálynak**, **Dr. Szita Gézának**, az állatorvos-tudományok kandidátusának, és **Dr. Glávits Róbertnek**, az állatorvos-tudományok kandidátusának megköszönöm a több évig tartó, eredményes szakmai együttműködést.

Hálás vagyok **Dr. Palatka Zoltánné** munkatársamnak a sok éven át végzett lelkiismeretes, pontos munkáért, mellyel kutatómunkámat segítette. **Balla Éva** munkatársam áldozatos segítségét ugyancsak köszönöm.

Megköszönöm az Állatgyógyászati Oltóanyag- Gyógyszer- és Takarmány-ellenőrző Intézetben dolgozó valamennyi munkatársam támogatását, és azt, hogy munkájukkal hozzájárultak kutatásaim végzéséhez.

Hálával tartozom közös közleményeink valamennyi társszerzőjének a kollegiális szakmai együttműködésért.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN HIVATKOZOTT IRODALOM

- Ahsan, N., K. V. Shah (2006): Polyomaviruses and human diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. **577.** 1-18.
- Allan W. H., C. N. Hebert (1968): The precision of virus endpoint determinations. *Arch. Ges. Virusforsch.* **25.** 330-336.
- Alvarez-Dominguez, C., E. Carrasco-Marin, F. Leyva-Cobián (1993): Role of complement C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect. Immun.* **61.** 3664-3672.
- Angelakopoulos, H., K. Loock, D. M. Sisul, E. R. Jensen, J., F. Miller, E. L. Hoffman (2002): Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with deletion of *actA/plcB* in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect. Immun.* **70.** 3592-3601.
- Anon (2005): Call for alternative methods for testing vaccines. *Vet. Rec.* **156.** 394-395.
- Autret, N., C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche, A. Charbit (2003): Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Inf. Immun.* **71.** 4463-4471.
- Ball, N. W., J. A. Smith, J. H. Weston, B. J. Borghmans, V. Palya, R. Glávits, É. Ivanics, Á. Dán, D. Todd (2004): Diagnosis of goose circovirus infection in Hungarian geese samples using polymerase chain reaction and dot blot hybridization tests. *Avian Pathol.* **33.** 51-58.
- Barth, R. F., G. Y. Gillespie, (1974): The use of technetium-99m as a radioisotopic label to assess cell-mediated immunity in vitro. *Cell. Immunol.* **10.** 38-39.
- Berber, I. (2004): Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. *J. Cell Mol. Biol.* **3.** 33-37.
- Berencsi Gy., Durst J., Hajtós I., Kemenes F., Süveges T. (1983): Adatok a listeriosis járványtanához saját vizsgálatok alapján. *Állategészségügyi és takarmányozási közlemények.* Phylaxia, Budapest.
- Bernáth S., Szalai F. (1970): Vizsgálatok libapipék között 1969-ben jelentkezett megbetegedés kóroktanának tisztázására. I. Fertőzési kísérletek. *Magy. Állatorv. Lapja.* **25.** 531-536.
- Bernáth, S., F. Szalai (1971): Aetiologic investigation on the disease of baby goslings, attaching to their nephritis and enteritis. *International Symposium on Feeding and Hygiene of Goose,* 24-30. 10. 1971. Budapest.
- Bernáth S., Kucséra Gy., Soós T. (1979): A vírusközömbösítési próba (S-index) értékelése a ragadós száj- és körömfájás elleni vakcinák hatékonysági vizsgálata során. *Magy. Állatorv. Lapja.* **34.** 29-32.

- Bernáth, S., T. Soós, Gy. Kucsera (1981): A száj- és körömfájás elleni vakcinák immunogenitásának különböző mutatói közötti összefüggések értékelése (orosz nyelven). Az Összövetségi Száj- és Körömfájás Kutatóintézet: „A száj- és körömfájás megelőzése, leküzdése és hatékony vakcinák előállítására” című kiadványban, Vlagyimir, pp. 190-194.
- Bernáth S., Bognár K., Soós T. Halász P. (1987): Szilárd fázisú radioimmunassay (RIA) szarvasmarha fertőző rhinotracheitise (IBR) ellenanyagainak kimutatására. Magy. Állatorv. Lapja. **42.** 669-672.
- Bernáth, S., K. Bognár, T. Soós, M. Halász (1987a): Die quantitative Bestimmung von IBR-Antikörpern mittels Radioimmunassay. Tagungsbericht Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR., Berlin, **256.** 111-116.
- Bernáth S., Szemerédiné Pitron Mária (1989): A *Listeria monocytogenes*-törzsek által termelt hemolizin mennyisége és az egéren mért virulenciája közötti összefüggés vizsgálata. Magy. Állatorv. Lapja. **44.** 353-355.
- Bernáth, S., M. Pitron (1989): Haemolysin producing capacity and mouse-pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol. Hung. **36.** 373-376.
- Bernáth, S., E. Habermann, K. Bognár, T. Soós, M. Halász (1989): Solid-phase radioimmunoassays (RIA) for quantitative determination of microbial antibodies. Scientific Publications, Institute for Control of Veterinary Preparations, Sofia. Vol. II. pp. 23-26.
- Bernáth, S., S. Tuboly, A. Kovács, R. Glávits, I. Medveczky, Z. Megyeri (1989a): Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets and lambs. Scientific Publications, Institute for Control of Veterinary Preparations, Sofia, Vol. II. 56-57.
- Bernáth S., Szászfai Gy., Barcsainé Vas Zs., Puchner M. (1992): Az import állatgyógyászati készítmények törzskönyvezésének néhány aktuális kérdése. Magy. Állatorv. Lapja. **47.** 688-691.
- Bernáth S. (1995): Gyógyszertörzskönyvezés – az állatgyógyászati készítmények törzskönyvi dokumentációjának formai és tartalmi követelményrendszere Magyarországon. Magy. Állatorv. Lapja. **50.** 889-891.
- Bernáth S., M. Halász, E. Horváth, T. Soós (1996): Current aspects of the registration of veterinary biologicals connected to risk assessment. Proceeding of the 8th International Technical Consultation on Veterinary Drug Registration, (O. I. E.), Prague, pp. 131-132.
- Bernáth, S., M. Szászfai, G. Kulcsár, M. Halász (1996a): Suspected adverse drug reactions in the Hungarian veterinary practice between 1982 and 1992. Acta Vet. Hung. **44.** 451-456.
- Bernáth, S., G. Kucsera, I. Kádár, Gy., Horváth, G. Morovján (1997): Comparison of the protein patterns of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by SDS-PAGE and autoradiography. Acta Vet. Hung. **45.** 417-425.

- Bernáth, S., Gy. Morovján (1998): Computerized evaluation procedure for comparing the electrophoretic protein patterns of bacterial strains. Lett. Appl. Microbiol. **27**. 235-238.
- Bernáth, S., Gy. Morovján, V. Sztojkov, G. Szita (1998): Comparison of the protein composition of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of subtype 1a isolated from ducks and pigs. Acta Vet. Hung. **46**. 211-217.
- Bernáth S., Fehérváriné Tóth M., Szabó M., Szászfai M. (2000): Az élelmezés-egészségügyi várakozási idő aktuális kérdései. Magy. Állatorv. Lapja. **122**. 677-681.
- Bernáth S., Horváth E., Kovács A., Nagy E., Dobos-Kovács M., Szalai F., Farsang A. (2001): A libák vérömléses vese- és bélgyulladásának kóroktana és a betegség járványtani jelentősége. Magy. Állatorv. Lapja. **123**. 522-525.
- Bernáth, S., L. Német, K. Tóth, Gy. Morovján (2001a): Computerized comparison of the protein composition of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* strains. J. Vet. Med. B. **48**. 73-79.
- Bernáth S., Bacsfai N., Fehérváriné Tóth M., Szászfai Gy. (2001b): Az állatgyógyászati gyógyszerkészítmények forgalombahozatali engedélyének időszakos felülvizsgálata és meghosszabbítása. Magy. Állatorv. Lapja. **123**. 47-50.
- Bernáth S., Dobos Kovács M., Szalai F., Farsang A., Horváth E., Nagy E., Kovács A. (2002): A libák vérömléses vese bélgyulladása. Baromfiágazat. **3**. 88-92.
- Bernáth, S., K. Fábrián, I. Kádár, G. Szita, T. Barna (2004): Optimum time interval between the first vaccination and the booster of sheep for *Clostridium perfringens* type D. Acta Vet. Brno. **73**. 473-475.
- Bernáth S. (2006): Állatgyógyászati készítmények és az állategészségügyben felhasználandó biocid termékek forgalomba hozatalának hatósági engedélyezési eljárása. (In: Mezőgazdasági ökotoxikológia. Szerk.: Székács András és Darvas Béla) pp. 51-53. IHarmattan Kiadó, Budapest.
- Bernáth S., Némethné Konda L. (2006): Az állatgyógyászati gyógyszerkészítmények forgalomba hozatalának élelmezés-egészségügyi és ökotoxikológiai szempontjai. (In Mezőgazdasági ökotoxikológia. Szerk.: Székács András és Darvas Béla) pp. 307-314. IHarmattan Kiadó, Budapest.
- Bernáth, S., A. Farsang, A. Kovács, E. Nagy, M. Dobos-Kovács (2006): Pathology of *Goose haemorrhagic polyomavirus* (GHP) infection in goose embryos. Avian Pathol. **35**. 49-52.
- Bernier, G., M. Morin, G., Marsolais (1981): A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by papova-like agent. Avian Dis. **25**. 1083-1092.

- Bert, E., L. Tomassone, C. Peccati, M. G. Navarrete, S. C. Sola (2005): Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med. B.* **52.** 64-66.
- Békés F., Kemény Á., Kemény S., Merész P., Demeter L., Varga J. (1988): Gélelektroforézis-kísérletek számítógépes mennyiségi kiértékelése I. Élelmezési Ipar. **42.** 121-129.
- Bierne, H., P. Cossart (2002): InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasion and a growth factor. *J. Cell Sci.* **115.** 3357-3367.
- Bouwer H. G. A., H. Shen, X. Fan, J. F. Miller, R. A. Barry, D. J. Hinrichs (1999): Existing antilisterial immunity does not inhibit the development of a *Listeria monocytogenes*-specific primary cytotoxic T-lymphocyte response. **67.** 253-258.
- Bozemann, L. H., R. B. Davis, D. Gaudry, P. D. Lukert, O. J. Fletcher, M. J. Dysktra (1981): Characterisation of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.* **25.** 972-980.
- Braun, L., H. Ohayon, P. Cossart (1998): The Inl B protein of *L. monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **27.** 1077-1087.
- Braun, L., B. Ghebrehiwet, P. Cossart (2000): gC1q-R/p3, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **19.** 1458-1466.
- Brencsán J. (2006): Orvosi szótár. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest.
- C 12 N 1/20, sz. találmány (1987): Eljárás és szintetikus táptalaj *Pseudomonas aeruginosa*. szelektív kimutatására. Orsz. Találmányi Hiv.
- Cady, P., S. W. Dufour, P. Lawless, B. Nunke, S. J. Kraeger, (1978): Impedimetric screening for bacteriuria. *J. Clin. Microbiol.* **7.** 273-278
- Campana, R., C. Scesa, V. Patrone, E. Vittoria, W. Baffone (2006): Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk efficacy of preservative systems. *Lett. Appl. Microbiol.* **43.** 301–306.
- Castle, P., (2004): Blood/plasma products, biological standardisation programme, microbiological techniques, cell and gene therapy products. Quality on the move: dynamics of the European Pharmacopoeia. Proceedings of the International Conference, Budapest, 4-6 October, 2004. pp. 166-169.
- Cepeda, J. A., M. Millar, E. A. Sheridan, S. Warwick, M. Raftery D. C. Wareham (2006): Listeriosis due to infection a catalase-negative strain of *L. monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **44.** 1917-1918.
- Chapek, M. L., K. K. Brown, B. C. Lin (2004): Autologous biologicals –science/regulations. (Editor: C. Jungbäck, in: Consideration of alternative licensing procedures for vaccines for minor species, minor indications and autogenous/ autologous products. *Dev. Biol. Karger, Basel*, 117. 33-41.

- Clink, J., Pennington, T. H. (1987): Staphylococcal whole-cell polypeptide analysis: evaluation as a taxonomic and typing tool. *J. Med. Microbiol.* **23**. 41-44.
- Coffey, A. B. van den Burg, R. Veltman, T. Abee (2000): Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **88**. 132-141.
- Colquhoun, K.O., Timms, S. and Fricker, C. R. (1995) Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology. *J. Appl. Bacteriol.* **79**., 635–639.
- Cossart, P., M. F. Vincente, J. Mengaud, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, P. Berche (1989): Lysteriolysin O is essential for virulence of *L. monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* **57**. 3629-3636.
- Cossart, P., J. Pizzaro-Cerdá, M. Lecuit (2003): Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* **13**. 23-31.
- Cowart, R.E., B.G. Foster (1981): The role of iron in the production of hemolysin by *L. monocytogenes*. *Current Microbiol.* **6**. 287-290.
- Crandall és mtsai (2005): Phylogenomics and molecular evolution of polyomaviruses.(In: Polyomavirus and Human Diseases. Edited: Nasimul Ahsan). pp.11-13.
- Derzsy D., Szedő M. (1973): A viziszárnyasok fertőző betegségei elleni védekezés immunológiai kérdései. *Magy Állatorv. Lapja.* **28**. 423-430.
- Deza, M. , Araujo, M. and Garrido, M. J. (2005) Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolysed water. *Lett Appl Microbiol* **40**, 341–346.
- Dicker, K. S., O. M. Esendal, M. Akran (2000): Epidemiology of ovine campilobacter infection determined by numerical analysis of electroforetic protein profiles. *J. Vet. Med. B.* **47**. 739-743.
- Dixon, F. J., W. O Weigle, J. J. Vazquez (1961): Metabolism and mammary secretion of serum protein in the cow. *Lab. Invest.* **10**. 216-237.
- Dobos–Kovács, M., E. Horváth, A. Farsang, E. Nagy, A. Kovács, F. Szalai, S. Bernáth (2005): Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese: Pathomorphological investigations and suggested pathogenesis. *Acta Vet. Hung.* **53**. 213-223.
- Domán I. (1970): Fiala libák ismeretlen oktanú (fertőző?) bélgyulladás. *Magy. Állatorv. Lapja.* **25**. 529-531.

- Donovan, D. C., A. J. Reber, J. D. Gabbard, M. Aceves-Avila, K. L. Galland, K. A. Holbert, L. O. Ely, D. J. Hurley (2007): Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. *Amer. J. Vet. Res.* **68**. 778-782.
- Doyle, M. E. (2001): Virulence characteristics of *L. monocytogenes*. *Food Res. Inst (FRI) Briefings*, p. 1-13.
- Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, P. Cossart (1995): Entry of *L. monocytogenes* into hepatocytes requires expression of Inl B, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Mikrobiol.* **16**. 251-261.
- Dramsi, S., P. Cossart (2002): Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell Biol.* **156**. 943-946.
- Dubail, I. P. Berche, A. Charbit (2000): Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and in vivo- inducible promoters, in the pathogen *L. monocytogenes*. *Inf, Immun.* **68**. 242-3250.
- Erskine, R. J., J. G., Unflat, R. J. Eberhart, L. J. Hutchinson, C. R. Hicks, S. B. Spencer, (1987): *Pseudomonas* mastitis: Difficulties in detection and elimination from contaminated wash-water systems. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **191**, 811-815.
- European Pharmacopoeia, Fifth Edition (2005), Council of Europe, Strasbourg.
- Evans, P. A., T. J. Newby, C. R. Stockes, F. J. Bourne, F. J. (1982): Study of cells in the mammary secretions of sow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**. 515-527.
- Feist, H., K. D. Flossmann, W. Erler (1976): Einige Untersuchungen zum Nährstoffbedarf der Rotlaufbakterien. *Arch. Exp. Vet. Med.* **30**. 49-57.
- Flint, S.H. and Brooks, J.D. (2001): Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. *J. Microbiol. Meth.* **44**. 205-208.
- Garner, M. R., B. L. Njaa, M. Wiedermann, K. J. Boor (2006): Sigma B. contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systematic spread in guinea pig infection model. *Infect. Immun.* **74**. 876-886.
- Gaillard, J. L., P. Berche, P. Sansonetti (1986): Transposon mutagenesis as a tool to study the role of haemolysin in the virulence of *L. monocytogenes*. *Infect. Immun.* **52**. 50-55.
- Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, P. Sansonetti (1987): Penetration of *L. monocytogenes* into the host: a crucial step of the infectious process. 3rd Forum in Microbiology. *Ann. Inst. Past. Microbiol.* **138**. 259-264.
- Gaillard, J. L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, P. Cossart (1991): Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent on surface antigens from Gram-positive cocci. **65**. 1127-1141.

- Glávits R., Ivanics É., Palya V., Zolnai A., Nagy E., Zarka P., Mató T., Ursu K. (2005): Növendék ludak parvo-, circo- reo- és polyomavirus okozta megbetegedéseivel kapcsolatos újabb diagnosztikai és kísérleti megfigyelések. *Magy. Állatorv. Lapja*. **127**. 21-28.
- Greenberg, D. P., C. M. Vadheim, S. Partridge, S. J. Chang, C. Y. Chiu, J. I. Ward (1994): Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate vaccine in young infants. *J. Infect. Dis.* **170**. 76-81.
- Groschup, M. H., K. Cussler, R. Weiss and J. F. Timoney (1991): Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Epidemiol. Infect.* **107**. 637-649.
- Gudding, R., L. L. Nesse, H. Gronstol (1989): Immunisation against infections caused by *Listeria monocytogenes* in sheep. *Vet. Rec.* **125**. 111-114.
- Guerin, J. L., J. L. Pingret, J. Gelfi, L. Dubois, P. Sans, A. Vuillaume, C. Boucraut-Baralon, S. Bertagnoli (1999): Isolation of an avian polyomavirus, associated with haemorrhagic nephritis and enteritis of geese. Proceedings of the 1st World Waterfowl conference, Tachung, Taiwan, pp. 266-271.
- Guerin, J-L., J. Gelfi, L. Dubois, A. Vuillaume, C. Boucraut-Baralon, J-L. Pingret (2000): A novel polyomavirus (Goose haemorrhagic polyomavirus) is the agent of haemorrhagic nephritis and enteritis of geese. *J. Virol.* **74**. 4523-4529.
- Gründling, A., M. D. Gonzalez, D. E. Higgins (2003): Requirement of the *L. monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J. Bacteriol.* **185**. 6295-6307.
- Hajtós I. (2003): A kérődzők listeriosisa. *Magy. Állatorv. Lapja*. **125**. 643-660.
- Hanson, L. A (1998): Breastfeeding provides passive and likely longlasting active immunity, *Annals Allergy, Asthma, Immunol.* **81**. 523-533.
- Hanson, L. A., S. A. Silfverdal, M. Korotkova, V. Erling, L. Strömbeck, P. Olcén, M. Ulanova, M. Hahn-Zoric, S. Zaman, R. Ashraf, E. Telemo (2002): Immune system modulation by human milk. (in: Integrating population outcomes, biological mechanisms and research methods in the study of human milk and lactation (Editors: M. K. Davis, C. E. Isaacs, L. A. Hanson, A. L. Wright). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. **503**. 99-106.
- Harty, J. T., E. G. Pamer (1995): CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **154**. 4642- 4650.
- Herler, M., A. Bubert, M. Goetz, Y. Vega, J. A. Vazquez-Boland, W. Goebel (2001): Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J. Bacteriol.* **183**. 5562-5570.
- Hirsch, H. H., C. B. Drachenberg, J. Steiger e. Ramos (2006): Polyomavirus associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv. Exp. Med. Biol.* **577**. 160-173.

- Horváth I. (1974): Kvantitativ mikrobiológiai eljárások. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Ivanics É., Glávits R., Palya V., Nagy E., Zarka P., Dán Á., Mató T. (2003): Növendék ludak vírusos betegségeinek diagnosztikai tapasztalatai és elkülönítő körjelzése. *Magy. Állatorv. Lapja*. **125**. 585-593.
- Jackman, P. J. H. (1982): Classification of *Corynebacterium* species from axillary skin by numerical analysis of electrophoretic protein patterns. *J. Med. Microbiol.* **15**. 485-492.
- Jiang, X., S.H. Gregory, E. J. Wing (1997): Immune CD8⁺ T lymphocytes lyse *L. monocytogenes*-infected hepatocytes by a classical MHC class I-restricted mechanism. *J. Immunol.* **158**. 287-293.
- Johne, R., H. Müller (1998): Avian polyomavirus, in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch. Virol.* **143**. 1501-1512.
- Johne, R., H. Müller (2003): The genome of goose haemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus *Avipolyomavirus*. *Virol.* **308**. 291-302.
- Johne, R., H. Müller (2003a): Genome of a novel emerging polyomavirus of birds - goose haemorrhagic polyomavirus. 2. Biotechnologie –Tag an der Universität Leipzig 21. Mai 2003. Abstracts, pp. 84-85.
- Johne, R., H. Müller (2004): Nuclear localization of avian polyomavirus structural protein VP1 is a prerequisite for the formation of virus-like particles. *J. Virol.* **78**. 930-937.
- Johne, R., H. Müller (2007): Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J. Virol.* **81**. 11554-11559.
- Johnson, R. A., D. W. Wichern (1982): Applied Multivariate Statistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey. p. 49.
- Kacskovics, I., Z. Wu, N. E. Simister, V. L. Frenyó, L. Hammarstrom (2000): Cloning and characterization of the bovine MHC class-I-like Fc receptor. *J. Immunol.* **164**. 1889-1897.
- Kathariou, S., J. Rocourt, H. Hof, W. Goebel (1988): Levels of *L. monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections in mice. *Infect. Immun.* **56**. 534-536.
- Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, K. J. Boor (2006): Contributions of *L. monocytogenes* σ^B to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiol.* **152**. 1827-1838.
- Kerters K., J. De Ley (1975): Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* **87**. 333-342.
- Kim, H., K. J. Boor, H. Marquis (2004): *Listeria monocytogenes* σ^B contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**. 7374-7378.

- Kim, H, H. Marquis, K. J. Boor (2005): σ^B contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by cotrolling expression of *inlA* and *inlB*. Microbiol. **151**. 3215-3222.
- Kisary, J. (1993): Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese. pp. 513-514. (In J. B. McFerran and M. S. McNulty (editors): Virus infectios of birds. Elsevier Editions, London, UK.
- Kiss, R, T., Triczka, G. Szita, S. Bernáth, G. Csikó (2006): *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis. Int. J. Food Microbiol. **112**. 71-74.
- Kiss R, Tirczka T., Szita G., Bernáth S. (2006a): Újabb adatok az élelmiszerek *Listeria monocytogenes* fertőzőittségéről és közegészségügyi jelentőségéről. Élelmiszer-biztonság, **4**.18.
- Kiss, R, Triczka T., Szita G., Bernáth S, Csikó Gy. (2007): *Listeria monocytogenes* élelmiszer-monitoring adatok és humán listeriosis megbetegedések Magyarországon 2004-ben. Magy. Állatorv. Lapja **129**. 498-501.
- Kiss Zs., Mayer B., Juhász V., Doleschall M., Frenyó V., Kacsokovics L. (2004): A szarvasmarha neonatalis Fc-receptorának (bFcrn) tőgybeli expressziója és Ig-kötő képessége. Magy. Állatorv. Lapja **126**. 598-605.
- Kitajima. T., E. Oishi, K. Amimoto, S. Ui, H. Nakamura, K. Oda, S. Katayama, A. Izumida, Y. Shimizu (2000): Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response. J. Vet. Med. Sci. **62**. 1073-1077.
- Kuikka, A., V.V. Valtonen, (1998) Factors associated with improved outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia in a Finnish university hospital. Europ. J. Clin. Microbiol. & Inf. Dis. **17**, 701–708.
- Kulcsár Á. (2005): Szóbeli közlés.
- Kumar, S. N., G. K. Steward, W. M. Steven, L. L. Seelig (1989): Maternal to neonatal transmission of T-cell mediated immunity to *Trichinella spiralis* during lactacion. Immunol. **68**. 87-92.
- Lachmann, P.G. and H. Deicher (1986): Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. Infect. Immun. **52**. 818-822.
- Lacroux, C., O. Andreoletti, B. Payre, J. L. Pingret, A. Dissais, J. L. Guerin (2004): Pathology of spontaneous and experimental infections by goose haemorrhagic polyomavirus. Av. Pathol. **33**. 351-358.
- Las Heras, A., L. Dominguez, I. López, J. F. Fernández-Garayzábal (1999): Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. Vet. Rec. **145**. 111–112.
- Las Heras, A., A. I. Vela, E. Fernandez, A. Casamayor, L. Dominguez, J. F. Fernandez-

- Garayzábal (2002): DNA macrorestriction analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mastitis in dairy sheep. *Vet. Rec.* **151**. 670–672.
- Laskey, R. A. (1993): Radioisotope detection using X-ray film. (in *Radioisotopes in Biology. A Practical Approach*. Edited by R. J. Slater, IRL Press, Oxford 1993). pp. 87-107.
- Lee, C. S., P. M. Outteridge (1981): Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocytes subpopulations. *J. Dairy Res.* **48**. 225-237.
- Le Jan, C. (1996): Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Vet. Res.* **27**. 403-417.
- Liebler-Tenorio, E. M., G. Riedel-Gaspari, J. F. Pohlenz (2002): Uptake of colostrum leucocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **85**. 33-40.
- Lingau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, T. Chakraborty (1995): Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Inf. Immun.* **63**. 3896-3903.
- Literak, I., B. Smid, L. Dubská, L. Bryndza, L. Valicek (2006): An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in Slovakia, including a genome analysis of a novel polyomavirus isolate. *Avian Dis.* **50**. 120-123.
- Low, J. C., R. C. Davies, W. Donachie (1992): Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeria infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.* **30**. 2704-2708
- Lowry, O. H., N. Y. Rosebrough A. L. Farr, R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**. 265-275.
- Manning, L. S., M. J. Parmely (1980): Cellular determinants of mammary cell mediated immunity in the rat. I. The migration of radioisotopically labelled T lymphocytes. *J. Immunol.* **125**. 2508-2514.
- Martins, S. B., M. J. Selby (1980): Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedance procedures. *Appl. Environm. Microbiol.* **39**. 518-524.
- Mayer, B., A. Zolnai., V. L. Frenyó., V. Jancsik, Z. Szentirmay., L. Hammarstöm, I. Kacs Kovics (2002): Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunol.* **107**. 288-296.
- Mayer B., Zolnai A., Frenyó V. L., Jancsik V., Szentirmay Z., L. Hammarstöm, Kacs Kovics I. (2004): A maternalis immunitás átadása kerdzokben. *Magy. Állatorv. Lapja.* **126**. 31-38.

- Mengaud, J., M. F. Vincente, J. Chenevert, C. Geoffroy, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, P. Cossart (1989): A genetic approach to demonstrate the role of listeriolysin O in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol. Hung.* **36**. 177-182.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mége, P. Cossart (1996): E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**. 923-932.
- Menzies-Gow, N. J., R. Weller, I. M. Bowen, K. T. T. Crley, L. Livesey, M. Weaver, C. M. Marr (2003): Use of nuclear scintigraphy with ^{99m}Tc-HMPAO-labelled leucocytes to assess small intestinal malabsorption in 17 horses. **153**. 457-462.
- Miksch, K., E. Grossmann, K. Köhler, R. Johne (2002): Nachweis des Goose Haemorrhagic Polyomavirus (GHPV) in Beständen mit Hämorrhagischer Nephritis und Enteritis der Gänse in Süddeutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **115**. 390-394.
- Miller, D. C., C. J. Czuprynski (2002): Passive immunization with coalescens serum, or oral immunization with formalin killed organisms, does not protect mice against gastrointestinal challenge with *L. monocytogenes*. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* **25**. 69-75.
- Milošević-Berlič, T., D. Benčina, P. Dovč (2000): Sequence polymorphisms within the *pMGA* antigenic variants in *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**. 133-189.
- Müller, H., R. Nitsche (1986): A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med. Microbiol. Immunol.* **175**. 1-13.
- Nair, S. C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer, P. Berche (1999): ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **31**. 185-196.
- Nair, S., E. Milohanic, P. Berche (2000): Clp ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**. 7061-7068.
- Newby, T. Y., C. R. Stockes, F. J. Bourne (1982): Immunological activities of milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**. 67-94.
- Noormohammadi, A. H., G. F. Browning, P. J. Cowling, D. O'Rourke, K. G. Whithear, P. F. Markham (2002): Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous enzyme-linked immunosorbent assay. *Av. Dis.* **46**. 405-411.
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition (2004).
Office International des Epizooties, Paris.
- Ogra, S. S., D. Weintraub P. L. Ogra (1977): Immunologic aspects of human colostrum milk. III. Fate and absorption of cellular and soluble components in the gastrointestinal tract of newborn. *J. Immunol.* **119**. 245-248.

- Osebold, J. W., A. Njoku-Obi, J. M. Abare (1959): Acquired resistance of sheep to *Listeria monocytogenes* and pilot studies on vaccination. *Am. J. Vet. Res.* **20**. 966-972.
- Pabst, h. F., J. Godel, M. Grace, H. Cho, D. W. Spady (1989): Effect on breast-feeding on immune response to BCG vaccination. *Lancet.* **1**. 295-297.
- Palya, V., É. Ivanics, R. Glávits, Á. Dán, T. Mató, P. Zarka (2004): Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese. *Avian Pathol.* **33**. 244-250.
- Palya V., Ivanics É., Glávits R., Dán Á., Mató T., Zarka P. (2005): A libák vérzéses vese bélgyulladásának (polyomavírus-fertőzésének) járványos előfordulása. *Magy. Állatorv. Lapja.* **127**. 91-97.
- Palya, V. (2006): Recombinant subunit vaccine for the immunization of young geese against polyomavirus infection. 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, 25-29 June 2006, Oslo, Norway. Abstracts , p. 133.
- Pavlakakis, M., A. Haririan, D. K. Klassen (2006): BK virus infection after non renal transplantation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **577**. 185-189.
- Peng, X., S. F. Hussain, Y. Paterson (2004): The ability of two *Listeria monocytogenes* vaccines targeting human papillomavirus-16 E7 to induce an antitumor response correlates with myeloid dendritic cell function. *J. Immunol.* **172**. 6030-6038.
- Perez-Losada, M., R. G. Christensen, D. A. McClellan, B. J. Adams, R. P. Viscidi, J. C. Demma, K. A. Crandall (2006): Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. **80**. 5663-5669.
- Pizarro-Cerdá, J., P. Cossart (2005): Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J. Pathol.* **208**. 215-223.
- Porter, P., D. E. Nookes, D. W. Allen (1970): Secretory IgA and antibodies to *E. coli* in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary canal of the young pig. *Immunol.* **18**. 245-257.
- Potel, J, J. Schulze-Lammers (1985): *Listeria monocytogenes*-vaccine: production and control. *Zbl. Bact. Hyg. A.* **259**. 331-340.
- Portnoy, D.A., T. Chakraborty, W. Goebel, P. Cossart (1992): Molecular determinants of *L. monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**. 1263-1267.
- Ralovich B., M. Shahamat, M. Woodbine (1977): Further data on the characters of *Listeria* strains. *Med. Microbiol. Immunol.* **163**. 125-139.
- Ralovich, B. (1984): Listeriosis research. Present situation and perspective. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Razin, S. and D. Yogev (1986): Genetic relatedness among *Ureaplasma urealyticum* serotypes (serovars). *Pediatr. Infect. Dis.* **5**. 300-304.

- Riedel-Caspari, G., (1993): The influence of colostrum leucocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. Vet. Immunol. Immunopathol. **35**. 275-288.
- Roche, S. M., P. Velge, E. Bottreau, C. Durier, N. M. , P. Pardon (2001): Assessment the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. Int. J. Food Microbiol. **138**. 277-279
- Roy, P.A., A.S. Dhillon, L. Lauerman, H. L. Shivaprasad (2004): Detection of avian polyomavirus infection by polymerase chain reaction using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Avian Dis., **48**. 400-404.
- Sakurai, J., M. Nagahama (1985): Tryptophan content of *Clostridium perfringens* Epsilon toxin. Infect. Immun. **47**. 260-263.
- Sato, H., H. Miyazaki, H. Sakatura, T. Suzuki, H. Saito, N. Maeharat (1999): Isolation and purification of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. J. Vet. Med. B. **46**. 73-84.
- Sántha, M., K. Lukács, K. Burg, S. Bernáth, I. Rasko and L. Stipkovits (1988): Intraspecies genotypic heterogeneity among *Mycoplasma gallisepticum* strains. Appl. Environm. Microbiol. **54**. 607-609.
- Scheldrake, R. F., A. J. Husband (1985): Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs, Res. Vet. Sci. **39**. 10-15.
- Schettler, C., H. (1976): Advantage and danger the hemorrhagic nephritis and enteritis of geese (HNEG); Proceedings of the Vth. European Poultry Conference, Malta, p. 503.
- Schettler, C., H. (1977): Détection en France de la néphrite hémorragique et enterite del'oie (NHEO). Rec. Med. vét. **153**. 353-355.
- Schettler, C. H. (1980): Klinik und Pathologie der hämorrhagischen Nephritis und enteritis der Gänse. Tierärztl. Prax. **8**. 313-320.
- Schneider, D. J. (2004): Listeriosis. (In: Infectious diseases of livestock, 3rd edition. Editors: J. A. W. Coetzer, R. C. Tustin) Oxford Univ Press, Oxford. pp. 1904-1907.
- Schnorr, K. L., L. F. Pearson (1984): Intestinal absorption of maternal leucocytes by newborn lambs. J. Reprod. Immunol. **6**. 329-337.
- Seaman, M. S., C. R. Wang, J. Forman (2000): MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. J. Immunol. **165**. 5192-5201.
- Seelig, L. L. Jr., Beer, A. E. (1978): Transepithelial migration of leucocytes in mammary gland of lactating rats. Biol. Reprod. **18**. 736-744.

- Seelig, L. L., R. E. Billingham (1981): Capacity of „transplanted” lymphocytes to transverse the intestinal epithelium of adult rats. *Transplant.* **32.** 308-314.
- Seitz, R. (2004): Current state of blood product safety. Quality on the move: Dynamics of the European Pharmacopeia, Proceedings of the International conference, Budapest, 4-6 October 2004, pp. 91-92.
- Shetron-Rama, L. M., H. Marquis, G. A. Bouwer, N. E. Freitag (2002): Intracellular induction of *Listeria monocytogenes actA* expression. *Inf. Immun.* **70.** 1087-1096.
- Siddique, I. H., L. C. Ying and B.B. Robinson (1969): Hematological and febrile responses of rabbits to listerial hemolysins. *Can. J. Comp. Med.* **33.** 292-296.
- Silfverdal, S. A., L. Bodin, S. Hugosson, O. Garpenholt, B. Werner, E. Esbjörner, B. Lindquist, P. Olcén (1997): Protective effect of breastfeeding on invasive *Haemophilus influenzae* infection: a case-control study in Swedish preschool children. *Int. J. Epidemiol.* **26.** 443-450.
- Silfverdal, S. A., L. Bodin, P. Olcén (1999): Protective effect of breastfeeding in a Swedish population. *Int. J. Epidemiol.* **28.** 152-156.
- Silverman, M.P. Munoz, E. F. (1979) Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **37.**, 521-526
- Sirivan, P., M. Obayashi, M. Nakamura, U. Tntaswasdi, K. Takehara (1998): Detection of goose and Muscovy duck parvovirus using polymerase chain reaction- restriction enzyme fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* **42.** 133-139.
- Soós T. (1983): Három különböző O₁ típusú ragadós száj- és körömfájás vírustörzs immunogén tulajdonságának vizsgálata. I. Szerológiai és állatfertőzési kísérletek. *Magy. Állatorv. Lapja.* **38.** 142-144.
- Soós T., Bernáth S. (1985): Ragadós száj- és körömfájás ellen vakcinázott sertések immunitásának vizsgálata. *Magy. Állatorv. Lapja.* **40.** 142-144.
- Soós T. (2000): Az állatgyógyászati vakvcinák engedélyezésének és ellenőrzésének tapasztalatai, figyelemmel országunk Európai Unióhoz történő csatlakozási törekvéseire. *Magy. Állatorv. Lapja.* **122.** 628-633.
- Süveges T., Szécsényi I. (1970): Kislibák tömeges elhullásának kóroktani vizsgálata. *Magy. Állatorv. Lapja.* **25.** 541-544.
- Szalai F., Bernáth S. (1971): Vizsgálatok libapipék között 1969-ben jelentkezett megbetegedés kóroktanának tisztázására. II. Specifikus védekező eljárás kidolgozása. III. Kórszövettani vizsgálatok. *Magy. Állatorv. Lapja.* **26.** 420-423.

- Szent-Iványi T., Kucsera Gy., Tuboly S., Bognár K., Kiss Zs., Bernáth S. (1981). Egyidejűleg alkalmazott Védévac és ragadós szájj- és körömfájás elleni vakcina immunogén hatása. *Magy. Állatorv. Lapja* **36**. 369-373.
- Széky A., F. Rátz, S. Tuboly, Gy.S. Nagy (1979): Absorbtion of colostral immunoglobulins in suckling piglets. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **26**. 99-110.
- Szita, G., Biró, G. (1990) A synthetic culture medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta. Vet. Hung.* **38**. 187–194.
- Szita G., Biró G., Tóth G., Pintér V., Fábíán A. (1995) A *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása szintetikus táptalaj felhasználásával. *Magy. Állatorv. Lapja* **50**. 287–289.
- Szita, G., Tabajdi, V., Fábíán, A., Bíró, G., Reichart, O. Székely Körmöczy, P. (1998) A novel, selective synthetic acetamide containing culture medium for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from milk. *Int. J. Food Microbiol.* **43**. 123–127.
- Szita, G., E. Smidt, S. Bernáth, G. Faludi, A. Fábíán, V. Tabajdi, R. Kiss (2003): A synthetic culture medium evaluated for detection of coliform bacteria in tomato paprika. *Food Microbiol.* **20**. 483-486.
- Szita, G., M. Gyenes, L. Soós, T. Rétfalvi, L. Békési, G. Csikó, S. Bernáth (2007): Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples using a novel synthetic medium and impedimetric technology. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**. 42-46.
- Szita, G., B. Gyetvai, J. Szita, M. Gyenes, N. Solymos, L. Soós, A. Hajós, S. Bernáth (2008): Synthetic culture media evaluated for detection of coliform bacteria in milk cheese and egg melange. *Acta Vet. Brno.* (Közlésre elfogadva, 2008. 1. szám.)
- Tabouret, M., J. De Rycke, A. Audurier, B. Poutrel (1991): Pathogenecity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. *J. Med. Microbiol.* **34**. 13-18.
- Tacconelli, E., M. Tumbarello, S. Bertagnolio, R. Citton, T. Spanu, G. Fadda, R. Cauda, (2002): Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: analysis of trends in prevalence and epidemiology. *Emerg. Infect. Dis.* **8**. 220–221.
- Tamura, Y., T. Takahashi, K. Zarkasie, M. Nakamura, H. Yoshimura (1993): Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**. 111-114.
- Timoney, J. F., M. M. Groschup (1993): Properties of a protective protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Microbiol.* **37**. 381-387.
- Tuboly, S., S. Bernáth, R. Glávits, I. Medveczky (1988): Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **20**. 75-85.

- Tuboly S., Bernáth S., Glávits R., Medveczky I. (1990): A colostrum lymphoid sejtteinek intestinalis abszorpciója újszülött malacokban. Autoreferátum. Magy. Állatorv. Lapja. **45**. 187-188.
- Tuboly, S., S. Bernáth, R. Glávits, A. Kovács, Z. Megyeri (1995): Intestinal absorption of colostrum lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of immune status. Acta Vet. Hung. **43**. 105-115.
- Tuboly S. (1998): Immunológia. (In: Állatorvosi Járványtan I., Szerk.: Tuboly S.) Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Tuboly S., Bernáth S. (2001): A Humántej- és laktáció-kutatók Nemzetközi Társaságának 10. kongresszusa. Magy. Állatorv. Lapja. **123**. 250-251.
- Tuboly, S., S. Bernáth (2002): Intestinal absorption of colostrum lymphoid cells in newborn animals. (In: Integrating population outcomes, biological mechanisms and research methods in the study of human milk and lactation (Editors: M. K. Davis , C. E. Isaacs, L. A. Hanson, A. L. Wright). Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. **503**. 107-114. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Vannier, P. (1996): Risk assessment for veterinary vaccines. Proceeding of the 8th International Technical Consultation on Veterinary Drug Registration, (O.I.E.), Prague pp. 127-130.
- Varga, J. (1991): Comparison of surface antigens of some *Campylobacter fetus subsp. fetus* strains of ovine origin by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. J. Vet. Med. B. **38**. 497-504.
- Varga J.(1998): *Listeria monocytogenes* (in: Állatorvosi járványtan I. Szerkesztő: Tuboly S. Mezőgazda Kiadó, Budapest). pp. 129-130.
- Varga J., Tuboly S., Mészáros J. (1999): A háziállatok fertőző betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Vats, A., P. S. Randhava, R. Shapiro (2006): Diagnosis and treatment of BK virus –associated transplant nephropathy. Adv. Exp. Med. Biol. **577**. 213-227.
- Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Reviews, **14**. 584-640.
- Vincente, M., J.C. Perez-Diaz, F. Baquero, J. Chenevert. E. Groisman, J. Mengaud, J. Moniz Pereira, J. Rauzier, G. Gicquel-Sanzey, P. Cossart (1987): Genetics of hemolysin in *Listeria monocytogenes* 3rd Forum on Microbiology. Ann. Inst. Past. Microbiol. **138**. 250-251.
- Waseem, M., R. Vahidy, M. A. Khan (1995): Correlation between production of listeriolysin O by variants of *Listeria monocytogenes* and their virulence for rabbits. Zbl. Bakt. **282**. 384-388.

- Williams, P.P. (1993): Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs. *Can. J. Vet. Res.* **57**. 1-8.
- Yamazaki, Y., H. Sato, H. Sakakura, K. Shigeto, K. Nakano, H. Saito, N. Maehara (1999): Protective activity of the purified protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pigs. *J. Vet. Med. B.* **46**. 47-55.
- Zhao, X., Z. Li, B. Gu, F. Frankel (2005): Pathogenicity of a vaccine strain of *L. monocytogenes* that relies on a suicide plasmid to supply an essential gene product. *Inf. Immun.* **73**. 5789-5798.
- Zielonka A., A. Gedvilaite, R. Ulrich, D. Lüschor, K., Sasnauskas, H. Müller, R. Johne (2006): Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests. *Virus Res.* **120**. 128-137.
- Zietz, B.P., H. Dunkelberg, J. Elbert, M. Narbe (2006): Isolation and characterization of *Legionella* spp. and *Pseudomonas* spp. from greenhouse misting systems. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1239–1250.

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK HELYÉNEK FELSOROLÁSA

1. ábra	22. oldal	1. táblázat	23. oldal
2. ábra	32. oldal	2. táblázat	33. oldal
3. ábra	32. oldal	3. táblázat	37. oldal
4. ábra	39. oldal	4. táblázat	38. oldal
5. ábra	41. oldal	5. táblázat	42. oldal
6. ábra	51. oldal	6. táblázat	50. oldal
7. ábra	58. oldal	7. táblázat	56. oldal
8. ábra	59. oldal	8. táblázat	67. oldal
9. ábra	60. oldal	9. táblázat	80. oldal
10. ábra	61. oldal		
11. ábra	62. oldal		
12. ábra	62. oldal		
13. ábra	62. oldal		
14. ábra	63. oldal		
15. ábra	64. oldal		
16. ábra	65. oldal		
17. ábra	65. oldal		
18. ábra	67. oldal		
19. ábra	68. oldal		
20. ábra	69. oldal		
21. ábra	69. oldal		
22. ábra	81. oldal		
23. ábra	81. oldal		
24. ábra	82. oldal		
25. ábra	83. oldal		
26. ábra	83. oldal		