

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

***A Riemerella anatipestifer* hazai előfordulása, a törzsek
jellemzése klasszikus és molekuláris módszerekkel**

PhD értekezés tézisei

dr. Gyuris Éva

2019

Témavezető:

.....

Dr. Magyar Tibor

MTA ÁTK Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés

A *Riemerella anatipestifer* széles körben elterjedt kórokozó, minden országban előfordul, ahol intenzív körülmények között tartanak vízibaromfit, így hazánkban is gyakori. A *R. anatipestifer* széles gazdaspektrummal rendelkezik. Elsősorban nyolchetesnél fiatalabb kacsákban és libákban idéz elő anatipestifer betegséget, de súlyos veszteségeket okozhat pulykaállományokban is. A betegséget leírták már csirkében, fácánban, fogolyban, gyöngytyúokban, fürjben és vadon élő vízimadarokban, sirályban, hattyúban és különböző récefajokban is. A betegség megjelenéséhez hajlamosító tényezőkre van szükség, ez lehet a fiatal életkor, a nem megfelelő higiénia, tartási, takarmányozási hibák, mycotoxicosis vagy társfertőzések. Heveny esetben a beteg madarak elesettek, könnyezés, orrfolyás, tüszögés, híg zöldes hasmenés, valamint idegrendszeri tünetek, fejremegés, mozgászavar figyelhető meg. Idült esetben sántaságot, fejlődésbeli visszamaradást láthatunk. A legszembetűnőbb kórbonctani elváltozás a savós-fibrines szívburok-, légzsák- és hashártyagyulladás, lépduzzanat és hurutos bélgyulladás. Esetenként hurutos tüdőgyulladás, savós-fibrines petevezető-gyulladás és savós-fibrines ízületgyulladás is kialakulhat.

Bár a magyar fogyasztói szokásokra kevésbé jellemző a kacsá- és a libahús fogyasztása, több milliós kacsá- és libaállományunk jó felvevőpiacra talál Nyugat-Európában, ezzel jelentős bevételt hozva országunknak. A vízibaromfi sokoldalúan hasznosítható, a hús, tömés esetén a máj és a toll is értékesíthető. Az anatipestifer betegség nagy gazdasági jelentőségű, megjelenésekor 10-75% mortalitással számolhatunk, további gazdasági kárt jelent a csökkent testtömeg-gyarapodás, a gyógykezelés, vakcinázás költsége és a vágóhídi kobzások.

A dolgozat célja egyrészt az anatipestifer betegséggel kapcsolatos klinikai, kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok eredményeinek összefoglalása természetes körülmények között megbetegedett vízibaromfiban és pulykában. Másrészt az anatipestifer betegség előfordulási gyakoriságát kívántuk felderíteni a hazai liba-, kacsá- és pulykaállományokban.

Vizsgálataink célja továbbá a hazai baromfiállományokból *R. anatipestifer* törzsek izolálása és egy törzsgyűjtemény létrehozása volt. Munkánk során az igen elterjedt *R. anatipestifer* faj eltérő földrajzi területekről és különböző gazdafajokból izolált törzseit jellemeztük és csoportosítottuk különböző fenó- és genotipizáló módszerekkel. Először meghatároztuk az izolált kórokozók fenotípusos tulajdonságait, megvizsgáltuk, hogy a talált különbségek összefüggnek-e az izolálás helyével, idejével vagy a gazdafaji eredettel. Majd molekuláris tipizáló módszerekkel jellemeztük törzseinket, a molekuláris technikák segítségével elemeztük a törzseink genetikai állományának változatosságát és a módszer

felbontóképességét. Megvizsgáltuk, hogy a törzsek genotípusos tulajdonságai eltérnek-e időben, térben vagy különböző gazdafajokban.

A *R. anatipestifer* intenzíven kutatott kórokozó, de kevés a nagy mintaszámú törzsgyűjteményt többféle feno- és genotipizáló módszerrel vizsgáló átfogó tanulmány. Eredményeink a kórokozó és a betegség jobb megismeréséhez járulnak hozzá, ami a tudományos ismeretek bővítésén túl előfeltétele a jelentős gazdasági veszteségeket okozó megbetegedés elleni korszerűbb és hatékonyabb diagnosztikai és védekezési eljárások kidolgozásának is.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

A vizsgálati mintákat a hazai liba-, kacsá- és pulykaállományokból a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának (NÉBIH-ÁDI) elsősorban a budapesti, valamint kisebb mértékben a debreceni és a kaposvári laboratóriumaiba 2010-2014 években diagnosztikai vizsgálatra küldött növendék madarak képezték. Növendék korcsoportban egy eset kivizsgálásához rendszerint 4-10 madár került beküldésre.

A NÉBIH-ÁDI említett laboratóriumaiba összesen 1418 növendék lúd, 411 növendék kacsá és 1292 növendék pulyka eset érkezett kórbonctani vizsgálatra.

A vizsgálati időszakban (2010-2014) 141 lúd, 31 kacsá és 7 pulyka esetben diagnosztizáltunk anatipestifer betegséget. Az anatipestifer betegséggel diagnosztizált esetek Magyarország hét megyéjéből származtak; Bács-Kiskun megye, Békés megye, Csongrád megye, Jász-Nagykun-Szolnok megye, Pest megye, Hajdú-Bihar megye és Somogy megye. Az anatipestifer betegség diagnózist csak abban az esetben állapítottuk meg, amikor a madaraktól izoláltuk a *R. anatipestifer* kórokozót.

Járványtani adatok

A megbetegedett állományokra vonatkozó járványtani adatokat (az állomány nagysága, életkora, hasznosítási irány, klinikai tünetek, a betegség lefolyása) részben a vizsgálati megrendelőben leírt adatokból nyertük, részben a beküldő állatorvosokkal történt telefonos beszélgetés során.

Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok

A diagnosztikai vizsgálatra beküldött ludakat, kacsákat és pulykákat az intézeti rutin diagnosztikában szokásos módon vizsgáltuk meg. Testtömegméréssel meghatároztuk a madarak fejlettségét a korukhoz és a hasznosítási irányhoz képest. Majd a madaraktól kórmelegállapítás céljából boncoltuk és kiegészítő kórszövettani, bakteriológiai, esetleg virológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz mintákat vettünk.

A részletes kórbonctani vizsgálat során kórszövettani vizsgálatokhoz szervmintákat gyűjtöttünk. Mintákat általában az agyvelőből és a májból, esetenként a szívből, Fabricius-féle bursából, tüdőből, lépéből, veséből és a koponyacsontból vettünk. A szövetmintákat 10%-os pufferolt formaldehid oldatban fixáltuk, paraffinba ágyazás után 4 µm vastag metszeteket készítettünk, végül megfestettük hematoxilin-eozinnal.

Bakteriológiai vizsgálatok

Bakteriológiai vizsgálatot a kórbonctani vizsgálat során vagy a bakteriológiai vizsgálathoz kivett szerv mintákból közvetlenül a kórbonctani vizsgálat után végeztünk. Különböző szerveket, elsősorban a májat, szívburkot, agykamrát, tüdőt, petevezetőt, ízületet, esetenként a légcsövet, kötőhártyát, koponyacsontot, légzsákot vagy a hashártyát mintáztuk meg. *R. anatipestifer* izolálásához 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar lemezeket használtunk. A táptalajokat 37°C-on, 5% széndioxid jelenlétében 24 órán át inkubáltuk. Az *R. anatipestifer* gyanús telep morfológiát mutató telepeket szintén 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajra szélesztettük, majd az előbb leírt módon inkubáltuk. A kapott színtenyészetekkel végeztük el a vizsgálatainkat.

A felhasznált baktériumtörzsek

A fentebb leírt esetekből, az anatipestifer betegségben elhullott madaraktól izolált *R. anatipestifer* törzsek mellett korábban izolált baktériumtörzseket is bevontunk vizsgálatainkba. Összesen 165 lúd, 29 kacsa és 3 pulykaeredetű *R. anatipestifer* törzset használtunk fel. A baktériumokat telep morfológiai vizsgálatok és fajspecifikus PCR-ek segítségével azonosítottuk.

A törzsek fenotípusának meghatározása

Biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A *R. anatipestifer* izolátumok fenotípusos jellemzéséhez biokémiai próbákat végeztünk. A katalázpróbát 3%-os hidrogén-peroxid segítségével végeztük, amit a pezsgés megléte vagy hiánya alapján bíráltunk el. Az izolátumok citokrómoxidáz-C enzim aktivitását pozitív esetben színreakciót adó Bactident Oxydase tesztsík segítségével vizsgáltuk. A baktériumokat indol-, nitrát-, urea-, glükóz-, laktóz- és szacharózpróbákban hagyományos levestáptalajok segítségével vizsgáltuk. A levestáptalajokat 2 napig inkubáltuk 37°C-on.

A növekedés körülményeinek vizsgálata

Az *R. anatipestifer* törzsek ideális tenyésztési körülményeit 37°C-on, 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajon vizsgáltuk aerob körülmények között és megemelt, 5% széndioxid koncentráció mellett. A táptalajokat 24 óráig inkubáltuk.

A hemolízis vizsgálata

A *R. anatipestifer* törzsek hemolitikus tulajdonságait 37°C-on, 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajon vizsgáltuk a legtöbb törzs számára ideális 5% széndioxid koncentráció mellett. A táptalajokat 24 óráig termosztátban inkubáltuk.

A szerotípus meghatározása

Az izolátumok szerotípusának meghatározását agargél-precipitációs teszttel (AGP) végeztük. A leggyakoribb, 1-es, 2-es, 4-es, 7-es és 10-es szerotípusú törzsek ellen 16 hetes specifikus kórokozótól mentes kakasokban termeltünk szerotípus-specifikus savót. A vizsgált *R. anatipestifer* törzseket 24 órán keresztül 37°C-on, 5% széndioxid koncentráció mellett, 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajon inkubáltuk, majd PBS-ben 3 McFarland töménységű szuszpenziót készítettünk, majd hőstabil antigéneket állítottunk elő. A tárgylemezeket nedves környezetben 37°C-on inkubáltuk és 48 óra elteltével bíraltuk el.

Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata

Az antibiotikum-érzékenységet Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk, a vizsgálathoz 196 *R. anatipestifer* izolátumot választottunk ki. A friss színtenyészetből néhány telepet 5 ml fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk, a sűrűségét denzitométer segítségével 0,5 McFarland-re állítottuk be, majd 5% juhvért tartalmazó Müller-Hinton táptalajra szélesztettük. Törzseink érzékenységét 13 antibiotikumra vizsgáltuk. A vizsgálatokat a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013, 2015) dokumentumokban ajánlott határértékek alapján a NÉBIH-ÁDI Bakteriológiai Laboratórium (Budapest) által kidolgozott határértékek szerint bíraltuk el.

A törzsek genotípusának meghatározására irányuló vizsgálatok

Plazmid-izolálás

A vizsgálathoz QIAGEN Plasmid Mini Kit-et használtuk a gyártó útmutatásának megfelelően. A plazmidok detektálásához a termékeket 0,5%-os TopVision agaróz gélben 1xTAE pufferben, megfelelő méretű molekulasúly-markerek mellett ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. A gél zsebeibe mintánként 15 µl eluált terméket és 5 µl 6xDNA Loading Dye-t mértünk. A termékek detektálása és dokumentálása UV fényben történt Kodak Gel Logic 212 Imaging System segítségével.

Polimeráz láncreakciók

A *R. anatipestifer* fajazonosító PCR-ekhez és az ERIC-PCR vizsgálathoz szükséges primereket a szakirodalomban közöltek alapján választottuk ki. A DNS templátot frissen inkubált színtenyészetből forralással állítottuk elő, a reakciókat ESCO Swift Mini készülékben hajtottuk végre. A fajspecifikus PCR termékeit 1,5%-os SeaKem agaróz gélben 1xTBE pufferben, ellenőriztük 9 V/cm elektromos térerősségű gélelektroforézissel. A ERIC-PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélben 1 x AccuGENE TAE pufferben ellenőriztük 4 óráig 120 V feszültség mellett. A termékek detektálása és dokumentálása Kodak Gel Logic 212 Imaging System segítségével UV fényben történt.

Az ERIC-PCR vizsgálatok eredményeinek elemzése

A különböző ERIC-PCR reakciók során keletkezett termékek megléte (1) vagy hiánya (0) alapján bináris mátrixot készítettünk PyElph programmal. Dice koefficienszt használtunk a törzsek genetikai rokonságának megállapításához és UPGMA módszerrel készítettünk dendrogramot. A törzsfa topológiáját 100 ismétléses bootstrap analízissel vizsgáltuk.

Eredmények

Járványtani adatok

Anatipestifer betegséget 2010 és 2014 között a beküldött növendék lúdesetek 9,9%-ában, a növendék kacsaesetek 7,5 %-ában diagnosztizáltuk. Pulykákban meglehetősen ritka volt, csak az esetek 0,5%-ában fordult elő. Az anatipestifer betegséget 5 napos-17 hetes korú ludakban diagnosztizáltuk. Kacsákban a betegség 3-6,5 hetes kor között fordult elő, míg pulykákban 12-19 hetes korban diagnosztizáltuk.

A leggyakoribb klinikai tünetek a bágyadtság, zöldes hasmenés, ataxia, elfekvés rendellenes nyak- és fejtartás, fej remegés, oldalt vagy háton fekvés és kapálózás voltak. Esetenként légzőszervi tüneteket, orrfolyást vagy kötőhártya-gyulladást is megfigyeltünk.

Ludakban az esetek 19%-ában circovírus okozta megbetegedés, 5%-ában Derzsy-betegség volt az elsődleges diagnózis. Kacsákban szintén diagnosztizáltunk társfertőzéseket. Az esetek 46%-ában circovírus okozta megbetegedés, 13%-ában mycotoxicosis, 8%-ában mycoplasmosis volt az elsődleges diagnózis.

Pulykában egy esetben diagnosztizáltunk *R. anatipestifer* okozta vérfertőzést, egy esetben szintén szeptikémára utaló elváltozásokat láttunk, míg 5 esetben a kórokozó helyi elváltozásokat okozott *E.coli* vérfertőzés mellett.

Kórbonctani vizsgálatok

Kórbonctani vizsgálatok lúdban és kacsában

Lúdban és kacsában savós-fibrines szívburok-, légzsák- és hashártyagyulladás volt a legszembetűnőbb kórbonctani elváltozás anatipestifer betegség esetén. Savós-fibrines felrakódást láttunk a máj felszínén és a szívburokban. A lép általában megnagyobbodott, az orrüregben és az orrelléküregekben hurutos-gennyes izzadmány halmozódott fel, esetenként hurutos tüdőgyulladást is megfigyeltünk. A vékonybélben rendszerint hurutos bélgyulladást láttunk. Általában a fej bőr alatti kötőszövetének oedemáját és bővérűségét is megfigyeltük. Esetenként savós-fibrines ízületgyulladást láttunk. Néhány esetben savós-fibrines petevezető-gyulladást is megfigyeltünk. Kötőhártya-gyulladást ritkán láttunk. Felnőtt lúdban vagy kacsában anatipestifer betegséget nem diagnosztizáltunk.

Kórbonctani vizsgálatok pulykában

Az esetek 72%-ában, 5 esetben a *R. anatipestifer* csak helyi elváltozásokat okozott pulykában *E.coli* vérfertőzés mellett. A leggyakrabban a koponyacsont gennyes osteomyelitisét és savós-gennyes agyburokgyulladást láttunk. Esetenként az előző elváltozások mellett *R. anatipestifer* okozta savós-gennyes agykamragyulladást és/vagy

savós-gennyes ízületgyulladást is megfigyeltünk. A fent leírt esetekben, habár *E. coli* okozta vérfertőzést tapasztaltunk, a helyi elváltozásokból a *R. anatipestifer*-t mindig szintenyészetben izoláltuk.

Egy esetben a kórokozó vérfertőzést okozott, ekkor savós-fibrines szívburok-, légzsák- és hashártyagyulladást és savós-gennyes ízületgyulladást figyeltünk meg. Egy esetben a bakteriológiai vizsgálat a vérfertőzést nem igazolta, de a *R. anatipestifer*-t izoláltuk a szívburokból, légzsákról, koponyacsontból, agyburokból, agykamrából és az ízületből. Kórbonctani vizsgálattal savós-fibrines szívburok-, légzsák- és hashártyagyulladást, a koponyacsont gennyes osteomyelitisét és savós-gennyes agyburok- és agykamragyulladást, savós-gennyes ízületgyulladást láttunk. Felnőtt pulykában anatipestifer betegséget nem diagnosztizáltunk.

Kórszövettani vizsgálatok

Szövettani vizsgálattal lúdban, kacsában és két pulyka esetben savós-fibrines gyulladást figyeltünk meg a szív epicardiumában, a máj Glisson-tokjában, a légzsákok falában és a tüdőt borító savóshártyában. Savós májgyulladást láttunk, esetenként az alsó légutakban, a tüdő parabronchusaiban savós vagy hurutos izzadmányt figyeltünk meg. Idegrendszeri érintettség esetén savós-fibrines agyburok- és agykamragyulladást láttunk az agyvelőben. Az agy- és gerincvelőt borító lágy burok diffúzan megszélesbedett, savós-fibrines gyulladást, lymphocytás, histiocytás és heterophil granulocytás beszűrődést lehetett megfigyelni. Hasonló sejtes beszűrődés fordult elő az agykamrákban, a gerincvelő canalis centrálisában.

A pulykaesetek nagy részében a koponyacsontban heterophil granulocytás beszűrődéssel járó savós-gennyes osteomyelitiset savós-gennyes agyburokgyulladást vagy esetenként savós-gennyes agykamragyulladást figyeltünk meg.

A baktériumok izolálása és azonosítása

A telepmorfológia megfigyelése és a fajazonosító PCR vizsgálatok után 136 lúd, 24 kacska és 3 pulykaeredetű törzset izoláltunk.

A molekuláris azonosítást az összes vizsgálatba bevont izolátumon elvégeztük. A különböző fajazonosító PCR-ek során egy 546 bp és egy 338 bp hosszúságú DNS szakasz sokszorozódott fel.

A baktériumok fenotípusos vizsgálatainak eredményei

Biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A *R. anatipestifer* törzsek oxidáz- és kataláztesztben pozitív, míg indol- és nitráttesztben és laktózbontásban negatív eredményt mutattak. Urea-, glükóz- és szacharózbontásban az általában negatív eredményt adó törzsek mellett néhány törzs kétes vagy pozitív eredményt mutatott.

A növekedés körülményeinek vizsgálata

Valamennyi *R. anatipestifer* törzs növekedett 37°C-on, 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajon 5% széndioxid koncentráció mellett. A törzsek 24%-ának növekedését a megemelt széndioxid koncentráció jelentősen elősegítette, aerob körülmények között csak apró, tűszúrásnyi telepeket képeztek.

A hemolízis vizsgálata

A *R. anatipestifer* törzsek 98%-a nem hemolizált, míg 2%-uk 5% juhvérrel kiegészített Columbia agar táptalajon 5% széndioxid koncentráció mellett 24 óráig 37°C-on történő inkubálás után β -hemolizált.

A szerotípus meghatározása

A törzsek 83,1%-a monospecifikus reakciót mutatott. A törzsek 16,9 %-a az 1-es és a 7-es szerotípus-specifikus savóval is egyformán reagált (1,7 szerotípus). Az eddig leírt 21 szerotípus közül a törzsek kétharmada az 1-es szerotípusba tartozott (64,5%). Kisebb számban fordultak elő az 1,7-es (16,9%), 2-es (7,2%), 4-es (3,6%) és 7-es (4,8%) szerotípusba tartozó törzsek. Két törzset 10-es (1,2%), egy-egy törzset pedig 13-as (0,6%), 17-es (0,6%) és 18-as (0,6%) szerotípusúként azonosítottunk. Egyes szerotípusok csak lúd vagy csak kacsaaeredetű törzsekben fordultak elő.

Antibiotikum-érzékenység meghatározása

A legtöbb törzs érzékeny volt florfenikolra (98%), ampicillin/amoxicillinre (95,4%), penicillinre (93,4%), szulfametoxazol-trimetoprimra (90,8%) és spektinomycinre (86,8%). A törzsek nagy arányban rezisztensek voltak flumekvinnel (93,4%), tetraciklinnel (90,8%), eritromicinnel (75,5%) és sztreptomicinnel (70,9%) szemben. Gentamicinnel, doxiciklinnel, szulfonamidokkal és enrofloxaccinnal szemben változatos eredményeket kaptunk.

A rezisztencia mértéke florfenikolra és spektinomycinre 1993-tól, eritromicinre és sztreptomicinre 1997-től, szulfonamidokra 2004-től és doxiciklinre 2009-től időben emelkedő tendenciát mutatott. A rezisztens törzsek aránya az izolálás földrajzi helye szerint az

átlaghoz képest 3-19,5% eltérést mutatott. Kiterjedten vagy extrém rezisztens törzsek (extensively drug-resistant, XDR) aránya időben emelkedő tendenciát mutatott.

A baktériumok genotípusos vizsgálatainak eredményei

Plazmid-izolálás

A megvizsgált törzsek 59,6%-a 2900 bp nagyságú plazmidot tartalmazott, míg a törzsek 17%-a 4800 bp nagyságú plazmidot hordozott. 5500 bp nagyságú plazmidot a törzsek 6,4%-ából izoláltuk; 4,2%-nál pedig 6900 bp nagyságú plazmidot találtunk. A törzsek 12,8 %-a a plazmid-izolálás során negatív eredményt adott. A baktériumtörzsek minden esetben csak egy plazmidot tartalmaztak.

ERIC-PCR

ERIC-PCR módszerrel a *R. anatipestifer* törzsek között tizenhét mintázatot különítettünk el (A-Q). A törzsek nagy része a két egymáshoz hasonló A (60,8%) és B (16,9%) ERIC-PCR típusba tartozott, a C (4,8%), F (6%) és I (1,8%) típusba is több törzset soroltunk, míg a többi típusba csak néhány törzs tartozott. Tizenkettő ERIC-PCR mintázat csak a lúderedetű törzsekre volt jellemző.

A legkorábban izolált törzsek (2000, 2004) egyediek, a legtöbb később nem fordult elő. A lúderedetű törzsek változatosabb mintázatot mutattak, mint a kacsából izolált törzsek. Az ERIC-PCR típusok és a szerotípusok között szoros korrelációt figyeltünk meg. Az 1-es szerotípusú törzsek 94,4%-a az A ERIC-PCR típusba tartozott, a fennmaradó hat törzs öt különböző ERIC-PCR típust (D, G, L, M és O) képviselt. A 7-es szerotípusú törzsek a C ERIC-PCR típusba tartoztak, míg az 1,7-es szerotípusúak a B ERIC-PCR típust képviselték. A 2-es 4-es és 10-es szerotípusú törzseket az ERIC-PCR kettő-négy további csoportra osztotta.

Következtetések

A diagnosztikai vizsgálatra érkezett madarak vizsgálata alapján meghatároztuk az anatipestifer betegség előfordulási gyakoriságát lúdban, kacsában és pulykában. Vízi baromfiban a betegség kifejezetten gyakori, előfordulása vetekszik a Derzsy-betegséggel, circovírus okozta megbetegedéssel, polyomavírus okozta megbetegedéssel, colibacillosissal vagy a baromfikolerával. Esetükben a nagy állategészségügyi jelentőség felhívja a figyelmet a megfelelő gyógykezelésre és a megelőzésre.

Lúdban és kacsában 8 hetes kor alatt - összhangban a korábbi leírásokkal - a betegség heveny vérfertőzéssel járó formáját diagnosztizáltuk, leggyakrabban a savóshártyák savós-fibrines gyulladását figyeltük meg. Adatokat szolgáltatunk arról, hogy idősebb, 9-17 hetes lúdban is előfordulhat az anatipestifer betegség, de ekkor többnyire helyi elváltozást, hurutos tüdőgyulladást találtunk, vérfertőzés többnyire csak komolyabb hajlamosító tényező hatására jelentkezett.

Pulykában az anatipestifer betegség ritka, és általában csak helyi elváltozást, a koponyacsont gennyos osteomyelitisét és savós-gennyos agyburokgyulladást okozott, vérfertőzést csak egy esetben láttunk. Pulykában feltehetőleg csak komolyabb immunszuppresszív tényező hatására jelenik meg az anatipestifer betegség. A nemzetközi szakirodalomban elsőként számoltunk be *R. anatipestifer* fertőzéssel kapcsolatban a koponyacsont gennyos osteomyelitiséről.

Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata és a szerotípus meghatározása közvetlen segítséget nyújt a betegség elleni védekezésben és a megelőzésben. A kórokozó fakultatív patogén, a betegség lúdban az esetek 24 %-ában, kacsában az esetek 67 %-ában másodlagosan jelentkezett, a betegség megelőzésének része az elsődleges megbetegedés gyógykezelése, és - amennyiben lehetséges - a hajlamosító tényezők csökkentése is. Rezisztencia vizsgálataink azt mutatják, hogy a florfenikol, ampicillin/amoxicillin, penicillin és a szulfametoxazol-trimetoprim többnyire eredményesen használható szerek. Az enrofloxacin doxiciklin és a szulfonamidok már kevésbé bizonyultak hatékonynak. A flumekvin, tetraciklin, eritromicin kezelés nagy valószínűséggel nem fog eredményre vezetni. A szerotipizálás során 1-es volt a leggyakoribb, emellett az 1,7-es, 2-es, 7-es és 4-es is előfordult.

A *R. anatipestifer* törzsek között fenotípusos vizsgálatokkal és genotipizáló módszerekkel is találtunk különbségeket. A különböző módszerek segítségével elkülönített csoportok egy kivételtől eltekintve nem függtek össze egymással. A fenotípusos vizsgálatokkal feltárt különbségek összefügghetnek virulencia tényezőkkel és hozzájárulhatnak a kórokozó környezetben való túlélésének, terjedésének jobb megértéséhez. A legtöbb fenotípusos vizsgálat során nem találtunk összefüggést a gazdafaj, az izolálás ideje, földrajzi helye között. Viszont kistekő gazdafaj specificitást megfigyeltünk a ritkábban előforduló szerotípusok esetében. Az antibiotikum-érzékenység vizsgálata során pedig időbeli és térbeli különbségeket is találtunk, melyek feltehetőleg az antibiotikum-

használati gyakorlattal függenek össze. Az antibiotikumok nem megfelelő alkalmazása minden bizonnyal hozzájárul a rezisztencia terjedéséhez.

A törzsek genotipizálása valósabb képet ad a törzsek rokonsági kapcsolatairól, a környezet nem befolyásolhatja az adott tulajdonság megjelenését. A legteljesebb képet a teljes genom szekvenálásával kaphatjuk, de ez a legköltségesebb módszer, ezért a mindennapi gyakorlatban nem elterjedt. A plazmid-izolálás során egy mobilis genetikai elemet vizsgáltunk, nem találtunk összefüggést az izolált plazmid és a gazdafaj, az izolálás ideje, földrajzi helye között. Az ERIC-PCR vizsgálat során a teljes genomot vizsgáltuk, a módszer felbontóképessége alkalmassá tette a genetikai változatosság vizsgálatára, a törzsek csoportosítására. Tizenhét különböző ERIC-mintázatot különítettünk el, melyek közül a korábban izoláltak (2000-2004) legtöbbször egyedinek bizonyult. Több ERIC-típus csak ludakból izolált törzsek között fordult elő, ennek oka lehet a gazdaadaptáció vagy esetleg a kacsák kisebb fogékonysága. A szerotípusokhoz hasonlóan a különböző ERIC-típusok térbeli előfordulásában sem láttunk különbséget. Valószínűleg a leggyakoribb ERIC-típusokat és szerotípusokat képviselő törzsek tartósan jelen vannak az adott régióban, cirkulálnak, és visszatérően járványokat okoznak. Mellettük esetenként térben elszórva egy-egy ritkább típus is felbukkant. Az ERIC-PCR vizsgálat a gyorsasága, egyszerűsége, kis költsége és eszközigénye miatt elterjedt módszer. A reprodukálhatóság ellenőrzése után alkalmas lehet járványtani nyomozásra is.

Vizsgálataink során a törzsek szerotípusa és az ERIC-típusok között szoros korrelációt fedeztünk fel, egy kivétellel az összes ERIC-típus egy szerotípust képviselt. Korábbi vizsgálatok során még nem találtak összefüggést a *R. anatipestifer* törzsek szerotípusa és egy molekuláris tipizáló módszer között sem. Eredményeink alapján az ERIC-PCR alkalmas lehet a *R. anatipestifer* izolátumok szerotípusának meghatározására. Ugyanis a szerotipizálás nem tekinthető elterjedt, rutin módszernek, mert csak néhány specializált laboratórium rendelkezik a szerotípus referencia törzsek ellen termeltetett savóval, ami nem olcsó és a módszer kivitelezése, elbírálása gyakorlatot igényel. A kereskedelmi forgalomban kapható savók esetében pedig nem egyezik a nomenklatúra a szakirodalomban leírt és elfogadott elnevezésekkel. A szerotípus meghatározása a hatékony védekezés szempontjából különösen fontos, mert a különböző szerotípusok között meggyőző keresztvédelmet nem tapasztaltak.

Új tudományos eredmények

1. Elsőként számoltunk be a koponyacsont *R. anatipestifer* okozta gennyes osteomyelitiséről pulykában.
2. Elsőként végeztük el nagyszámú (197 db) magyarországi eredetű, különböző gazdafajokból származó *R. anatipestifer* törzs átfogó fenotípus- és genotípusos összehasonlító vizsgálatát.
3. Elsőként végeztük el a hazai *R. anatipestifer* törzsek átfogó antibiotikum-érzékenységi vizsgálatát 13 hatóanyagra nézve. A rezisztens törzsek aránya időben növekvő tendenciát mutatott.
4. Meghatároztuk a hazánkban előforduló szerotípusokat, felmértük a százalékos arányukat az izolálás helye, ideje és a gazdafaj szerint.
5. A hazai *R. anatipestifer* törzsek ERIC-PCR vizsgálatával 17 különböző ERIC-mintázatot különítettünk el, mely során a lúderedetű törzsek nagyobb változatosságot mutattak (17 típus), mint a kacsából származó törzsek (5 típus).
6. A világon elsőként találtunk összefüggést a *R. anatipestifer* törzsek szerotípusa és egy molekuláris tipizáló módszer, az ERIC-PCR között.

A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Gyuris É., Wehmann E., Magyar T.: **A baromfi *Riemerella anatipestifer* okozta megbetegedése. Irodalmi áttekintés**, Magyar Állatorv. Lapja, 138. 3-14, 2016.

IF: 0,196

Gyuris É., Wehmann E., Czeibert K., Magyar T.: **Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* strains isolated from geese and ducks in Hungary**, Acta Vet. Hung. 65. 153-165, 2017.

IF: 1,042

Gyuris É., Nemes Cs., Magyar T.: **Data on the epidemiology and pathology of anatipestifer disease in Hungary (2010-2014)**, Acta Vet. Hung. 66. 350-364, 2018.

IF: 1,042

Magyar T., Gyuris É., Ujvári B., Metzner, M., Wehmann E.: **Genotyping of *Riemerella anatipestifer* by ERIC-PCR and correlation with serotypes**, Avian Pathol. DOI: 10.1080/03079457.2018.1535693.

IF: 2,054

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó publikációk

Glávits R., Palya V., Ivanics É., Szalay D., Nemes Cs., Gyuris É., Dán Á., Bálint Á., Harrach B.: **Adenovírus okozta légzőszervi betegség (tracheobronchitis) növendék pulykában**, Magyar Állatorv. Lapja, 136. 313-320, 2014.

IF: 0,185

Rónai Zs., Cshivincsik Á., Gyuris É., Rigó D., Dán Á.: ***Mycobacterium avium* subspecies *avium*, „*hominissuis*” és *silvaticum* alfajok jelentősége és magyarországi előfordulása**, Magyar Állatorv. Lapja, 137. 549-556, 2015.

IF: 0,212

Bányai K., Bistyák A. T., Thuma Á., Gyuris É., Ursu K., Marton S., Farkas S. L., Hortobágyi E., Bacsadi Á., Dán Á.: **Neuroinvasive influenza virus A (H5N8) in fattening ducks, Hungary, 2015**, Infect. Genet. Evol. 43. 418-423, 2016.

IF: 2,885

Szabó R., Wehmann E., Makrai L., Nemes Cs., Gyuris É., Thuma Á., Magyar T.:
Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary, Avian Pathol. 46. 506-514, 2017.

IF: 2,054

Kutatási témában tartott előadások

Gyuris É., Nemes Cs., Magyar T.: Anatipestifer betegség: hazai tapasztalatok. Derzsy Napok. Hajdúszoboszló, 2018.06.08.

Gyuris É., Ujvári B., Wehmann E., Nemes Cs., Magyar T.: A *Riemerella anatipestifer* hazai előfordulása, a törzsek jellemzése klasszikus és molekuláris módszerekkel. Fialat Kutatók Napja. Budapest, 2018.11.14.

Egyéb témában tartott előadások

Gyuris É., Glávits R., Palya V., Ivanics É., Szalay D., Nemes Cs., Dán Á., Harrach B.: Adenovírus okozta tracheo-bronchitis pulykákban. Akadémiai Beszámoló. Budapest, 2012.01.17.

Gyuris É., Glávits R., Palya V., Ivanics É., Szalay D., Nemes Cs., Dán Á., Harrach B.: Adenovírus okozta tracheo-bronchitis pulykákban. Derzsy Napok. Siófok, 2012.06.22.

Gyuris É., Kléh Zs., Dán Á., Bálint Á., Thuma Á.: Libákban polyomavírus okozta járvány 2012-ben, a betegséggel kapcsolatos megfigyelések kacsákban. Akadémiai Beszámoló. Budapest, 2013.01.27.

Gyuris É., Thuma Á.: A pulyka fertőző eredetű légzőszervi kórképeinek elkülönítő kórjelzése. MOÁE Baromfi-egészségügyi Társaság - Őszi Szakülés. Budapest, 2013.11.12.

Gyuris É., Szabó R., Magyar T.: *Ornithobacterium rhinotracheale* okozta megbetegedés pulykákban. MOÁE Baromfi-egészségügyi Társaság - Őszi Szakülés. Budapest, 2014.11.04.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Magyar Tibornak, az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézete igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett Légzőszervi bakteriológia témacsoportban foglalkozhassam disszertációm témájával. Köszönöm, hogy teret engedett útkeresésemnek és tudásával, tapasztalatával segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Abonyi Tamásnak, a NÉBIH-ÁDI igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított a kutatás elvégzésére.

Köszönettel tartozom Dr. Glávits Róbertnek, Dr. Ivanics Évának és Dr. Thuma Ákosnak, hogy megismertették velem a baromfidiagnosztikát. Hálával tartozom a szakmai iránymutatásért és hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Dr. Wehmann Enikőnek, hogy megismertette velem a különböző molekuláris biológiai módszereket és segítséget nyújtott a publikációk lektorálásában. Köszönet illeti Dr. Sellyei Boglárkát, Dr. Khayer Bernadettet és Dr. Szabó Rékát, hogy a felmerülő gyakorlati kérdéseimre választ adtak.

Köszönettel tartozom Hegedűs Évának, Schihlgruberné Oryszcsák Katalinnak és Ujvári Barbarának, hogy a molekuláris biológiai módszerek kivitelezésében segítségemre voltak.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Makrai Lászlónak, Dr. Nagy Józsefnek, Dr. Nemes Csabának és Dr. Bistyák Andreának, hogy korábban izolált törzsekkel a törzsgyűjteményt gazdagították.

Köszönöm Markovics Juditnak, Kempa-Tóth Angélának és Képíróné Szabó Ildikónak, hogy a kórbonctani és bakteriológiai mintavételekkor segítségemre voltak.

A szövettani metszetek elkészítéséért Lakosi Szilviának és Ráczné Mészáros Ágnesnek tartozok köszönettel.

Köszönöm a beküldő állatorvos kollégáknak, hogy többek között engem is megtisztelnek bizalmukkal.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és barátaimnak a türelmüket és a támogatásukat.