

Zárójelentés

az

Arterivírusok vizsgálata, különös tekintettel a hazai izolátumok genetikai tulajdonságaira

című, K 62853 azonosító számú OTKA témáról

A *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjába tartozó *Arterivirus* genus tagjai burkos vírusok, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkeznek. Két jelentős kórokozó tartozik a nemzetségbe, sertések szaporodásbiológiai zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó tünetegyüttese (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) és a ló fertőző arteritise (Equine viral arteritis, EVA). Mindkét kórokozó vírus gyakorlatilag világszerte előfordul, jelenlétüket több európai országban igazolták. Magyarországon mindkét vírust munkacsoportunknak sikerült először kimutatnia illetve izolálnia. Az OTKA támogatással végzett munka célja a két vírus elterjedtségének, a hazai járványhelyzetnek és a Magyarországon előforduló vírustörzsek genetikai és antigenitásbeli tulajdonságainak tisztázása volt.

A sertések szaporodásbiológiai zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó tünetegyüttesének vírusával kapcsolatos vizsgálatok

A PRRS széles körben elterjedt vírusos megbetegedés, melyet a PRRS vírusa (PRRSV, porcine arterivirus) által okozott fertőzés idéz elő. Nevét onnan kapta, hogy kocákban reprodukációs zavarokat, fiatal állatokban pedig légzőszervi tüneteket idéz elő. Az újszülött, a szopós korú illetve a választott malacokban a megbetegedés önmagában, valamint az általa okozott immunszuppresszió következtében kialakuló másodlagos fertőzések hatására az állat elhullásához vezethet.

A PRRSV genomja 15100-15400 nukleotid hosszúságú, pozitív irányítottágú RNS molekula, amely 9 nyitott leolvasási keretből áll. A vírusnak két, genetikailag és antigénszerkezetiileg is jól elkülöníthető változatát különböztetik meg: az európai (1-es) és az amerikai (2-es) típust, melyek csak mintegy 60-65% azonosságot mutatnak a teljes genom nukleotidsorrendjét tekintve. Korábban úgy tartották, hogy az európai törzsek közelebbi rokonságban állnak egymással, mint az amerikaiak, de nemrégiben kelet-európai, illetve

oroszlországi törzsek vizsgálataival négy, egymástól genetikailag élesen elkülönülő szubtypust határoztak meg az európai genotípuson belül.

A PRRS diagnosztikájában a vírus, annak fehérjéi, vagy genetikai állománya kimutatásán alapuló ún. direkt, illetve az általa indukált ellenanyagválasz kimutatásán alapuló ún. indirekt módszereket, szerológiai próbákat használnak. Ez utóbbiak állományszintű profilvizsgálatokra alkalmasak, de nem mutatják az állatok védettséget, perzisztensen fertőzött állatok esetében negatív eredményt adhatnak, továbbá (mivel az esetek kb. 1%-ában téves pozitív eredményt adnak), csak magas arányú pozitivitás esetén értékelhető az eredményük. A PRRSV a ma ismert egyik legváltozékonyabb vírus, molekuláris diagnosztikája emiatt rendkívül nagy kihívást jelent. Ezért elengedhetetlen egy olyan, gyors, specifikus és megfelelően érzékeny diagnosztikai eljárások kifejlesztése, melyek alkalmasak mindkét genotípus, illetve a különböző európai szubtypusokba tartozó PRRSV törzsek kimutatására.

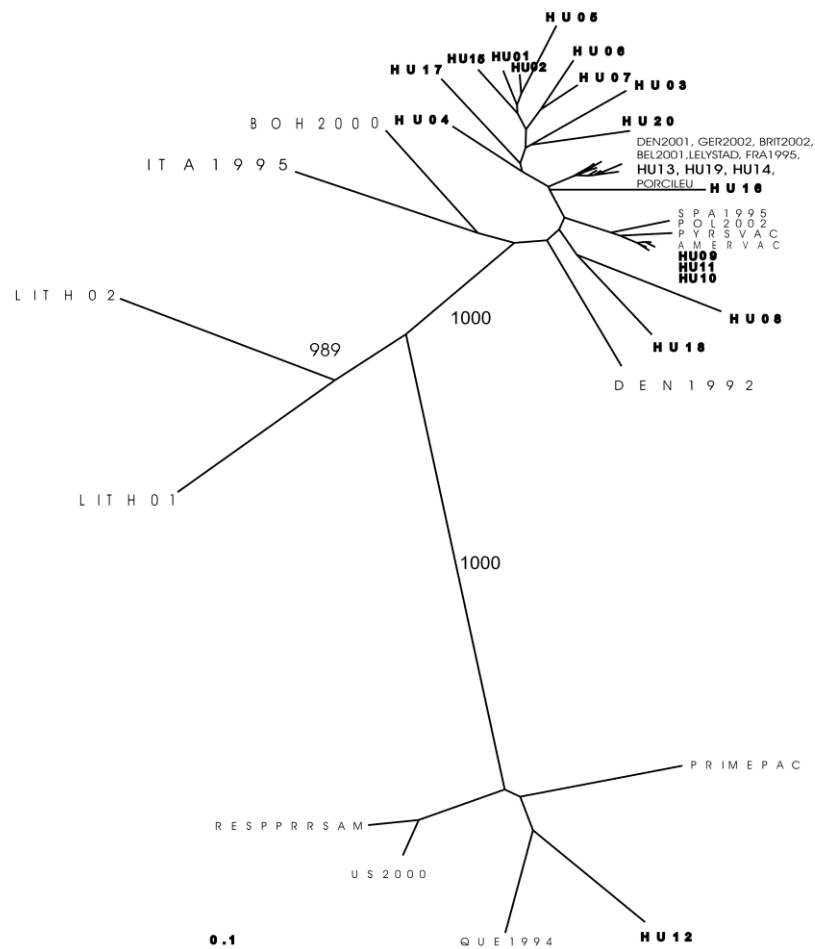
Munkánk első szakaszának célja az volt, hogy magyarországi, PRRSV-vel fertőzött sertéstelepekről történő mintagyűjtést követően megállapításokat tegyünk a PRRS hazai elterjedtségére vonatkozólag. Három diagnosztikai intézet adatait összegezve azt tapasztaltuk, hogy bár a fertőzött nagylétszámú sertéstelepek aránya (kb. 10%) emelkedett az utóbbi időben, nálunk még mindig kedvezőbb a helyzet, mint a nagy sertéstartó hagyományokkal rendelkező nyugat-európai (Dánia, Hollandia), illetve szomszédos (Ausztria) országokban, ahol ez az arány jóval meghaladhatja az 50%-ot.

Vizsgálataink során 5 év alatt összesen 30 magyarországi telepről származó 50, továbbá 8 vajdasági PRRSV minta ORF5 szekvencia vizsgálatát végeztük el. Az így kapott szekvenciákat azután összehasonlítottuk egymással és a nemzetközi adatbázisban (GenBank) fellelhető fontosabb szekvenciákkal, és megállapítottuk, hogy a hazai PRRSV törzsek túlnyomó többsége (42) az európai genotípusba, azon belül pedig az 1-es szubtypusba tartozik. A magyarországi szekvenciák közül 42 az 1-es típusba tartozik. Ezek a szekvenciák a nyugat-európai országok PRRSV törzseihez hasonlóan az 1-es szubtypusba tartoztak. Ezen belül a vizsgált törzsek 4 monofiletikus alcsoportot, valamint 3, az alcsoportoktól elkülönülő szekvenciát alkotnak. A 4 alcsoportból kettőbe Magyarországon törzskönyvezett, élővírusos vakcinához nagymértékben hasonló, a másik kettőbe pedig vadvírusok tartoztak. A legnagyobb alcsoportba az általunk vizsgált 1-es típusú magyar szekvenciák fele (21) tartozik. Az ezt az alcsoportot alkotó szekvenciák ezen belül olyan kisebb, monofiletikus csoportokat képeznek melyekbe az adott földrajzi területről származó vírusok tartoztak. Az aminosavszekvenciák illesztése és a potenciális glikozilációs helyek szoftveres vizsgálatával a

nukleotidszekvenciákból származtatott GP5 felületi alegységén megtalálható, 37. aminosav esetében egy Asp→Asn változás következtében szinte valamennyi törzs esetében megjelent egy új glikozilációs hely a Lelystad vírushoz képest, így a magyar törzsek nagy része ezen a szakaszon 3 oligoszaharid alegységet tartalmaz. Hasonló jelenséget figyeltek meg más európai törzsek esetében is.

Találtunk három olyan szekvenciát, melyek az amerikai genotípusba tartoztak, noha hazai telepekről származó mintákból mutattuk ki ezeket. Ezek közül két, egymással direkt kapcsolatban levő telepről származó vírustörzs vadvírusnak bizonyult, és a kanadai referens vírushoz hasonlított leginkább, egy szekvencia pedig Nyugat-Európában széles körben elterjedt, de Magyarországon nem törzskönyvezett, élővírusos vakcinával mutatott rokonságot.

A vajdaságból származó minták vizsgálatával megállapítottuk, hogy azok az európai genotípusba, és az 1-es szubtípusba tartoznak, és szoros rokonságot mutatnak egymással, illetve Dániában izolált törzsekkel.



1. ábra: Hús általunk kimutatott magyarországi (vastagon szedett kódok) és hús génbanki PRRSV ORF 5 szekvencia felhasználásával filogenetikai fa

Külön csoportokat képeztek a vakcina eredetű törzsek. Mindkét Magyarországon törzskönyvezett élővírusos vakcina esetében találtunk a vakcinára nagymértékben hasonló szekvenciákat nem vakcinázott, de vakcinázott állatokkal egy légtérben tartott sertésekben, összesen kilenc esetben. Ezek nagymértékben hasonlítottak az adott telepen használt élővírusos vakcinákhoz. Összehasonlítva a Magyarországon törzskönyvezett két vakcinavírust illetve a hozzá nagymértékben hasonló variánsok származtatott GP5 aminosav-sorrendjét azt tapasztaltuk, hogy az egyik vakcina esetében az összes rá hasonló variáns következetesen ugyanazokban az aminosav-pozíciókban változott meg, minden esetben az első ektodoménen, ráadásul mindegyik elveszített egy glikozilációs helyet, így erre az alegségre az eredeti vakcinavírustól, és a vadvírusok túlnyomó többségétől elérően csak két cukormolekula kötődhet. Az aminosavváltozást eredményező, illetve a néma, szinonim nukleotidmutációk számát összehasonlítva megállapítottuk, hogy ezen vakcina eredetű szekvenciák esetében a vizsgált szakaszon kevés kivétellel valamennyi nukleotid változás aminosav változást eredményezett, ami – feltehetőleg a gazdaszervezet immunrendszere által kifejtett – erős szelekciós nyomásra utal. Valamennyi ilyen variánst a betegség tüneteit mutató, majd elpusztult állatokból, vetélt magzatokból, gyenge, illetve légzőszervi tüneteket mutató malacokból mutattuk ki. A másik Magyarországon kapható vakcina esetében ilyen jelenséget nem figyeltünk meg.

Megvizsgáltuk továbbá 8 szerbiai (vajdasági) PRRSV minta ORF5 nukleotidszekvenciáját, és megállapítottuk, hogy azok az európai genotípusba, és az 1-es szubtípusba tartoznak, és szoros rokonságot mutatnak egymással, illetve Dániában izolált törzsekkel.

Munkánk második részének legfőbb célja az volt, hogy kifejlesszünk egy olyan egy lépéses valós idejű, kvantitatív vizsgálatokra alkalmas reverz transzkripció PCR módszert, mely gyors, érzékeny és – ellentétben a próba hidrolízisén alapuló (TaqMan) módszerekkel – képes a próba és a célterület közötti mismatch esetén is megfelelően működni. Ez utóbbi a módszer legfontosabb előnye, mivel a PRRSV az egyik legváltozékonyabb és leggyorsabban fejlődő RNS vírus.

PriProET rendszerünk különböző vírustörzsekből készített, ismert kópiaszámot tartalmazó hígítási sorozatainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy rendszerünk kis mennyiségű templát RNS-t is képes kimutatni. Az Ingelvac MLV® törzs vizsgálatával az is nyilvánvalóvá vált, hogy akár öt próba-célterület mismatch esetén is képes működni anélkül,

hogy érzékenysége, hatékonysága, illetve a standard görbe korrelációs együtthatója (R^2) megváltozott volna a Lelystad vírushoz képest. Az olvadáspont érték $67,0^\circ\text{C}$, mely megegyezik a szintén öt mismatchot hordozó HU12-es törzs esetében kapott értékkel, és még mindig meglehetősen magasnak mondható, ezért feltételezhető, hogy akár további mutációk esetén is képes működni.

Az egyes reakciók után elvégzett olvadáspont (T_m) vizsgálat minden esetben bizonyította a különböző PRRSV törzsek specifikus amplifikációját. A módszer azt méri, hogy milyen erősen kapcsolódik a próba a célterülethez, milyen magas hőmérsékleti értéken válik le a templátról. Ezt alapvetően az befolyásolja, hogy a próba hány nukleotidja találkozik a célterületen a neki megfelelő párjával. Mivel a próba a PRRSV törzsekre lett tervezve, az olvadáspontvizsgálat gyors, megbízható módszer ahhoz, hogy minden pozitív reakció esetében megbizonyosodjunk az eredmény specifikusságáról. Az olvadáspont értékének csökkenése azt jelenti, hogy a próba és a célterület között nem tökéletes a kapcsolódás, mismatch lépett fel. A kapott T_m értékeket a tökéletes illeszkedést mutató Lelystad vírus esetében kapott hőmérséklet értékekkel ($76,0^\circ\text{C}$), már a szekvenciavizsgálat előtt felismerhetőek a mismatch-ek – mutációk. Pontos számuk azonban a hőmérsékletkülönbségek alapján nem határozható meg, mivel a próba 5' végén található nukleotid eltérések kevésbé tudják befolyásolni a T_m értéket. Noha a pontos mismatch szám nem állapítható meg ennek alapján, a módszer alkalmas a nemzetközi adatbázisban megtalálható amerikai és európai genotípusú törzsek gyors elkülönítésére.

Annak a bizonyítására, hogy rendszerünk különböző vírustartalmú klinikai mintákban is képes meghatározni azok vírustartalmát, egy európai genotípusú, magyar izolátumot tartalmazó sejttenyészet felülúszóval intranazálisan fertőztünk öt választott malacot. A vérsavók, illetve a szervminták vizsgálatával kapott eredmények nagyságrendileg megegyeznek korábban már publikált kísérleti adatokkal, és bizonyították, hogy heveny fertőzés során a vírus elsődleges szaporodási helye a tüdő, ahol feltehetőleg a legnagyobb számban fordulnak elő a vírus szaporodásának elsődleges célsejtjei, és a vírusgenom kópiaszáma $1000\times$ nagyobb mennyiségben van jelen, mint a mandulában, illetve a vérsavóban. Heveny megbetegedés esetén a vírus molekuláris biológiai kimutatására ez a szerv a legalkalmasabb.

Nagyszámú, genetikailag különböző PRRSV szekvenciákkal, illetve kísérleti állatokból nyert klinikai mintákkal elvégzett vizsgálataink adatait összegezve megállapítható, hogy az általunk kifejlesztett PriProET érzékeny, specifikus módszer, mely képes viszonylag

nagy számú próba-célterület mismatch esetén is megbízhatóan kimutatni és mennyiségileg meghatározni az adott minták PRRSV RNS kópiaszámát.

A különböző országokból gyűjtött minták vizsgálata bebizonyította, hogy a PriProET módszer alkalmas volt azok kimutatására. A minták olvadáspontjának meghatározásával, illetve összehasonlító nukleotidszekvencia vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a próba tapadási területének 3' vége közelében fellépő mutációk sokkal nagyobb befolyással vannak a T_m értékekre, mint az 5' vég közelében lévők. A primerek, illetve a próba tervezésekor a nemzetközi adatbázisból letöltött 235 PRRSV szekvencia alapján úgy tűnt, hogy az amerikai törzsek olvadáspont értéke egy, a próba tapadási területének 5' vége közelében lévő deléciónak miatt alacsonyabb lesz az európai törzsekénél. Jelen vizsgálatunk azonban bizonyította, hogy egyes magyarországi vírusok esetében az olvadáspont értékek alacsonyabbak lehetnek. Ez arra hívhatja fel a figyelmet, hogy nem csak a filogenetikai vizsgálatokra leginkább használt ORF5-ös génszakasz, hanem a diagnosztikai vizsgálatok során leggyakrabban célba vett terület az ORF7 nukleotidszekvenciáját is érdemes közzé tenni a nemzetközi adatbázisban, hogy azok megfelelő forrást biztosítsanak a molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztésére.

A ló fertőző arteritisét okozó vírussal kapcsolatos vizsgálatok

A lovak vírusos arteritise (equine viral arteritis = EVA) az egész világon elterjedt betegség, melyet a jelenleg a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának *Arterivirus* nemzetséghez sorolt burkos, pozitív irányultságú, egyszálú ribonukleinsav tartalmú RNS vírus (equine arteritis virus = EAV) okoz. Bár az eddig izolált törzsek szerológiailag egységesek, virulenciájukban a vizsgálatok szerint jelentősen eltérnek egymástól. A vírus érfalkárosító hatása miatt fellépő légzőszervi, ödémaképződéssel járó és szaporodásbiológiai formában jelentkező esetek közül az utóbbi, az esetleg tömegesen előforduló vetélés a legsúlyosabb. Ez a kórforma az, amely az időnként egy-egy állományban nagy gazdasági veszteségeket okozó vetélési hullámok miatt a fertőzés járványtani jelentőségét kiemeli. Ugyanakkor igen gyakori a tünetmentes fertőzés is.

A vírus perorális, légúti és venereális úton terjedhet. E fertőzésmódok közül az utóbbi azért fontos, mert hangsúlyozott szerepe van a vírus állományokon belüli fennmaradásában. Míg ugyanis az előbbi kettő a lóállományokban a rövid időtartamú (ún. „short term”) fertőzéssel kapcsolatos, addig a vírushordozó mének a hosszú időtartamú (ún. „long term”) vírusürítésben és az ezzel járó, nemi úton terjedő fertőzésben játszanak szerepet. Ezek a mének akár élethosszig hordozhatják és ondójukkal üríthetik a vírust, fertőzve így a fogékony

kancákat, amelyekben a vírus elszaporodik, „felpasszálódik” és aerogén-perorális úton terjedő járványt indíthat meg. Ily módon egyetlen fertőzött mén is vetelési hullámot indíthat meg tenyészállományokban. A vírusürítésnek ez a módja kiemelt jelentőséget ad a szeropozitív méneknek, mert az irodalmi adatok szerint az ilyen mének mintegy 30%-a tartós vírusürítő és ezzel az ún. hosszú időtartamú vírushordozó státusszal fenntartja a vírusfertőzöttséget. Ez az állapot tesztoszteronfüggő, vagyis csak ivarérett ménekben alakulhat ki, kancák, heréltek és egy évesnél fiatalabb csikók csak 3-4 hétig hordozhatják a vírust (rövid időtartamú vírushordozók), így annak csak aerogén-perorális terjesztésében játszhatnak szerepet, hosszú távú fenntartásában nem.

Korábban, a magyarországi járványhelyzet felmérésére végzett vizsgálataink folytatásaként vizsgáltuk, hogy az immunizálás 2004-ben történt bevezetésének volt-e hatása a vírus elterjedtségére. A két négyéves vizsgálati periódus (2002-2005: 7647 minta, illetve 2006-2009: 3031 minta) idején végzett szerológiai vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a vírus elterjedtsége, a pozitív minták aránya nem növekedett, illetve kis mértékben csökkent (32,055%-ról 27,98%-ra). Még szembeötlőbb a különbség, ha nem a szeropozitivitási adatokat hasonlítjuk össze, hanem a vírus fenntartásában és venereális úton történő terjesztésében kulcsszerepet játszó fedezőmének ondómintáiból végzett víruskimutatás adatait vetjük össze. Míg az első periódusban vizsgált 343 ondómintából 52 tartalmazott vírust (15,16%), addig a második periódusban vizsgált 138 mintából mindössze 1 volt pozitív (0,72%).

Az EAV a *Nidovirales* rend többi tagjához hasonlóan, jellegzetes transkripció stratégiaja szerint a 3' végen coterminális subgenomikus mRNSeket (sg-mRNAs) képez a proteinszintézis során. Ezeknek a sg-RNS szakaszoknak a jelenléte intenzív vírusréplikációt jelez a fertőzött sejtenyészeten illetve a fertőzött gazdaszervezetben. Az általunk kifejlesztett és a genomikus és subgenomikus nukleinsavszakaszok kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas Taqman real-time PCR felhasználásával azonosítani lehet azokat a vírushordozó egyedeket, amelyekben a fertőzés inaktív stádiumban van, illetve amelyekben akut vírusszintézis zajlik

A primereket 35 (genomikus) illetve 170 (subgenomikus) szekvencia illesztésével terveztük, és ismert titerű, RK-13 sejteken elszaporított vírusszuspenzió (Bucyrus törzs), továbbá perzisztensen fertőzött ménekből származó ondóminták felhasználásával teszteltük, negatív kontrollok beállítása mellett. A forward primer szakaszok a 185 (leader region) illetve 12248 (membrane protein encoding gene) nukleotid pozíciónál tapadnak, a reverz primer az 12398 (N gene) pozíciónál. A 6' FAM és BHQ jelölt proba nukleinsav az N gén 12350 nt pozíciójánál tapad. A Taqman valós idejű RT-PCR kivitelezésére Platinum® Taq DNA Polymerase kit-et

(Invitrogen) és Applied Biosystems 7300 thermocycler készüléket használtunk a következő thermoprofil alkalmazásával: 48 °C 15 min., 95 °C 2 min., 95 °C 30 sec., 60 °C 1 min. A két utolsó lépést 45 alkalommal ismételtük.

Mindkét real-time rendszer esetében volt kimutatható fluoreszcencia az EAV-t tartalmazó minták vizsgálatakor, azonban a genomikus rendszer érzékenysége sokkal nagyobb volt. Nem tapasztaltunk aspecifikus pozitív reakciót egyéb, a lovakban vetélést okozó más pathogének, úgymint az EHV-1, EHV-4, *Chlamidophyla psittaci*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Salmonella abortusequi* vizsgálatakor. Az 540/64-es jelzésű vírus $10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, $10^{2.5}$, $10^{2.5}$ infekzív titerű hígításainak vizsgálatakor a szubgenomikus real-time módszer átlagos küszöbértékei (threshold cycle, C_t) sorrendben 28.55, 31.70, 35.70, 41.73, 43.95 voltak, míg ugyanezek a minták a genomikus módszerrel vizsgálva 21.61, 24.87, 28.27, 31.29, 36.08-os C_t értékeket adtak. Az EAV tartalmú ondóminták átlagos C_t értékei 30.77, és 24.26 volt a szubgenomikus illetve a genomikus rendszerrel vizsgálva. A negatív minták esetében nem volt kimutatható fluoreszcens jel. A felülúszóból, illetve a sejtenyészetből kimutatott sg-mRNS-ek C_t értékei minden időpontban megegyeztek egymással a fertőzést követő 16. órától a 48-ig, 43,19-19,72-ig tartó értékeket mutatva.

Az általunk kidolgozott módszer segítségével következtetni lehet az EAV replikációs aktivitására mind *in vitro* sejtenyészetekben, mind a természetes körülmények között fertőződött állatokban. Az sg-mRNA jelenléte ugyanis az intenzív vírusreplikáció jele. A rendszer további optimalizálás után hasznos módszer lehet a vírusdiagnosztikában a fertőzött állatok aktív vírusürítő státuszának megállapítására.

Az elmúlt öt évben vizsgáltuk a két állategészségügyi szempontból fontos arterivírus, a sertések szaporodásbiológiai zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó tünetegyüttesét előidéző vírus (PRRS) és a lovak fertőző arteritisét előidéző vírus (EAV) hazai elterjedtségét és megállapítottuk, hogy mindkét vírus hazai előfordulása elmarad a nyugat-európai országokban megfigyelttől. Mindkét vírus diagnosztikájában kidolgoztuk és széleskörűen alkalmaztuk az RT-PCR alapú diagnosztikai módszert. Az amplifikációs termékek nukleotid-sorrendjének meghatározása után vizsgáltuk a két vírus filogenetikai viszonyait magyarországi és a környező országokból származó pozitív minták felhasználásával, továbbá összehasonlítottuk ezeket a nemzetközi génbankban elhelyezett szekvenciákkal is. A PriProET és Taqman technikára valamint valós idejű RT-PCR eljárásra alapozott módszerekkel a vírusfertőzések *in vitro* és *in vivo* zajló kinetikájáról tudtunk adatokat gyűjteni. Eredményeinket nyolc referált szakfolyóiratban megjelent vagy közlésre elfogadott közleményben és két PhD értekezésben közzétettük illetve foglaltuk össze.