

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi  
járványtani helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek  
genetikai tulajdonságainak vizsgálata**

**PhD értekezés**

Készítette:

**Dr. Balka Gyula**

**2009**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Prof. Dr. Rusvai Miklós témavezető  
egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi  
Állatorvostani Tanszék

.....  
Prof. Dr. Vetési Ferenc  
nyugalmazott egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi  
Állatorvostani Tanszék

.....  
Dr. Abonyi Tamás  
PhD, technical manager  
Pfizer Animal Health

Készült 8 példányban. Ez a ...sz. példány.

.....  
Dr. Balka Gyula

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke .....	5
1. Összefoglalás.....	7
2. Bevezetés, célkitűzések.....	9
3. Irodalmi áttekintés.....	14
3.1. A betegség története.....	14
3.2. A vírus tulajdonságai .....	15
3.2.1. A vírus eredete.....	15
3.2.2. Taxonómia.....	16
3.2.3. A vírusgenom jellemzői .....	16
3.2.4. Kvázispecies jelleg .....	18
3.2.5. Genetikai változékonyság.....	19
3.2.6. A PRRSV sejttropizmusa, szaporodásának jellemzői.....	20
3.3. A PRRS járványtana .....	21
3.3.1. A vírus terjedése .....	21
3.3.2. Kórfejlődés .....	23
3.3.3. Tünetek, kórbonctan.....	24
3.4. A PRRSV elleni immunitás .....	25
3.4.1. A humorális immunválasz.....	25
3.4.2. A celluláris immunválasz .....	26
3.5. Diagnosztika.....	27
3.5.1. Indirekt víruskimutatás, szerológia.....	27
3.5.2. Direkt víruskimutatás .....	28
3.6. A betegség elleni védekezés.....	33
4. Anyag és módszer .....	35
4.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata. 35	
4.1.1. A PRRS magyarországi elterjedtségének meghatározása .....	35
4.1.2. Mintagyűjtés.....	35
4.1.3. ELISA .....	36
4.1.4. A minták feldolgozása, RNS kivonás.....	37
4.1.5. Primerek.....	37
4.1.6. RT-PCR .....	39
4.1.7. A PCR reakció eredményének láthatóvá tétele (vizualizáció) .....	40
4.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból.....	41
4.2.1. Primer és próba tervezés.....	41
4.2.2. A vizsgálatokhoz felhasznált PRRSV törzsek .....	45
4.2.3. A vírusok szaporítása, a vírusszaporodás ellenőrzése.....	45
4.2.4. A PriProET RT-PCR paraméterek beállítása.....	46
4.2.5. A rendszer specificitásának és érzékenységének meghatározása .....	48
4.2.6. Klinikai minták.....	49
5. Eredmények.....	50
5.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata. 50	
5.1.1. A PRRS magyarországi elterjedtségének meghatározása .....	50
5.1.2. Primereink tesztelése.....	50
5.1.3. Diagnosztikai PCR vizsgálataink eredménye .....	51
5.1.4. ORF5 nukleotidszekvencia vizsgálatok (magyarországi vad PRRSV szekvenciák).....	53
5.1.5. Vakcina eredetű szekvenciák.....	54
5.1.6. Szerbiából származó minták szekvenciavizsgálata .....	55

5.1.7. A magyarországi, szerbiai, illetve fontosabb külföldi szekvenciák összehasonlítható genetikai vizsgálata .....	55
5.1.8. Törzsfa-építés .....	56
5.1.9. Származtatott aminosav vizsgálatok .....	58
5.1.10. Vakcina eredetű szekvenciák aminosav vizsgálata .....	61
5.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból .....	63
5.2.1. A rendszer specificitásának és érzékenységének meghatározása .....	63
5.2.3. Olvadáspont meghatározás .....	66
5.2.4. Klinikai minták .....	66
6. Megvitatás .....	68
6.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata .....	68
6.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból .....	73
7. Új tudományos eredmények .....	76
8. Felhasznált irodalom .....	78
9. A témában megjelent tudományos publikációk .....	91
10. Köszönetnyilvánítás .....	93

## Rövidítések jegyzéke

<b>ATP</b>	adenosine-triphosphate	adenozin-trifoszfát
<b>cDNS</b>	complementary DNS	DNS másolat RNS-ről
<b>C<sub>t</sub></b>	cycle treshold	ciklus küszöbérték
<b>CTP</b>	citidine-triphosphate	citidin-trifoszfát
<b>DNA</b>	deoxy-ribonucleic-acid	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
<b>dNTP</b>	deoxy-ribonucleotide-triphosphate	dezoxiribonukleinsav
<b>EAV</b>	equine arteritis virus	ló vírusos arteritiszének vírusa
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunadszorpciós vizsgálat
<b>EU</b>	European Union	Európai Unió
<b>FRET</b>	fluorescence resonance energy transfer vagy Förster resonance energy transfer	fluoreszcens rezonancia energiaátvitel vagy Förster rezonancia energiaátvitel
<b>GP</b>	glycoprotein	glikoprotein
<b>GTP</b>	guanidin-triphosphate	guanidin-trifoszfát
<b>HRPO</b>	horse radish peroxydase	torma-peroxidáz
<b>IL</b>		interleukin
<b>INF</b>		interferon
<b>IPMA</b>	immuno-peroxydase-monolayer-assay	immunperoxidáz festéssel történő ellenanyag kimutatás egyrétegű sejttenyészetben
<b>LDV</b>	lactate dehydrogenase elevating virus	egér laktát dehidrogenáz szintjét emelő vírus
<b>MEM</b>	minimum essential medium	minimálisan szükséges tápoldat
<b>NCR</b>	non coding region	nem kódoló génszakasz
<b>NK</b>	natural killer cell	természetes ölősejt
<b>NO</b>	nitric oxide	nitrogén monoxid
<b>NSP</b>	non structural protein	nem szerkezeti fehérje
<b>OD</b>	optical density	fényelnyelő képesség

<b>OIE</b>	Office International des Epizooties	Nemzetközi Járványügyi Hivatal
<b>ORF</b>	open reading frame	nyitott leolvasási keret
<b>PAM</b>	porcine alveolar macrophages	sertés alveoláris makrofágok
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
<b>PBST</b>	phosphate buffered saline Tween-20	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat és Tween-20
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
<b>PriProET</b>	primer-probe energy transfer	primer-próba energiaátvitel
<b>RNA</b>	ribonucleic-acid	ribonukleinsav
<b>RPM</b>	rotation per minute	fordulatszám
<b>RT-PCR</b>	reverse transcription-polymerase chain reaction	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
<b>SAMS</b>	sow abortion and mortality syndrome	kocák vetéléssel és elhullással járó kórképe
<b>SFHV</b>	simian haemorrhagic fever virus	majmok vérzéssel járó lázat okozó vírus
<b>sgmRNS</b>	subgenomic messenger RNA	szubgenomiális hírvivő RNS
<b>SP</b>	structural protein	szerkezeti fehérje
<b>T<sub>m</sub></b>	melting temperature	olvadáspont hőmérséklet
<b>TBE</b>	tris-borate-ethylenediamine-tetraacetic acid	trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát
<b>TCID<sub>50</sub></b>	tissue culture infective dose 50%	50% sejtkárosodást előidéző vírudózis
<b>TNF</b>	tumour necrosis factor	tumor nekrozis faktor
<b>UTP</b>	uridine-triphosphate	uridin-trifoszfát
<b>U</b>	unit	egység
<b>VN</b>	virus neutralisation	vírusneutralizáció

## 1. a. Összefoglalás

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) hazai elterjedtségéről a saját eredményeinket és más hazai diagnosztikai intézetek (MgSZH-ÁDI, SZIE-ÁOTK, Üllői Nagyállatklinika, Kórbonctani Osztály) adatait figyelembe véve megállapítottuk, hogy az ország 1182 nyilvántartott nagylétszámú sertéstartó telepének körülbelül 10%-a tekinthető fertőzöttnek.

A vírusgenom konzervatív szakaszára, az ORF7-re tervezett reverz transzkripciós polimeráz láncreakción (RT-PCR) alapuló diagnosztikai rendszert dolgoztunk ki annak érdekében, hogy valamennyi lehetséges PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) változatot képesek legyünk kimutatni. A mintagyűjtés során fő szempontunk az volt, hogy olyan telepeket teszteljünk, melyek korábbi szerológiai vizsgálatokban már igazoltan PRRS pozitívak voltak, vagy a betegségre jellemző tünetek (vetelés, koraellés, gyenge almok születése, illetve légzőszervi tünetek a fiatal állatokban) jelentkeztek az állományban. Ezt követően az első lépésben pozitívnak bizonyult, 25 különböző sertéstartó telepről származó 45 mintán második lépésként a filogenetikai vizsgálatokhoz legalkalmasabb, variábilis génszakasz, az ORF5 RT-PCR segítségével történő amplifikációját, majd az amplikon kétirányú, direkt szekvenciameghatározását 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 az európai genotípusba, azon belül pedig az 1-es szubtípusba tartozik. Találtunk azonban három olyan szekvenciát, melyek az amerikai genotípusba tartoztak. 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.

Kilenc esetben mutattunk ki vakcinavírust nem vakcinázott állatokból. Ezek nagymértékben hasonlítottak az adott telepen használt élővírusos vakcinákhoz. Összehasonlítva a Magyarországon törzskönyvezett két vakcinavírust illetve a hozzá nagymértékben hasonlító variánsok származtatott GP5 aminosav-sorrendjét azt tapasztaltuk, hogy az egyik vakcina esetében az összes rá hasonlító variáns következetesen ugyanazokban az aminosav-pozíciókban változott meg, minden esetben az első ektodoménon, ráadásul mindegyik elveszített egy glikozilációs helyet, így erre

az alegységre az eredeti vakcinavírusról, és a vadvírusok túlnyomó többségétől elérően csak két cukormolekula kötődhet. Ebben az esetben mindegyik variánst vetélt magzataból, illetve a betegség tünetei közt elhullott fiatal állatból mutattuk ki. A másik vakcina esetében a variánsok random módon változtak meg ezen a területen, ezeket minden esetben egészséges (bár nem vakcinázott) állatokból mutattuk ki.

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

Munkánk második lépéseként primer-probe energy transfer elven működő, valós idejű RT-PCR eljárást fejlesztettünk ki a PRRSV RNS kópiaszám meghatározása céljából. A rendszer érzékenységét ismert RNS kópiaszámú minták 10-es alapú hígításain vizsgáltuk a Lelystad vírus, egy európai 3-as szubtypusba tartozó belorusz törzs (Soz-8), illetve egy amerikai vakcinavírus (Ingelvac MLV®) esetében, és megállapítottuk, hogy mindegyikből körülbelül 10 RNS kópiát képes kimutatni. Egy  $TCID_{50}$  volt a kimutathatóság határa a szövettenyészetben elszaporított Lelystad vírus és a P129-es (2-es típusú) vírustörzs esetében. Ismert szekvenciájú ampikonok olvadáspont-vizsgálatával megállapítottuk, hogy próba-célterület mismatchek esetén olvadáspont csökkenés lép fel, de a rendszer szignifikáns érzékenység- és hatékonyság-változás nélkül képes működni akár öt mismatch esetén is. A módszer tehát alkalmasnak bizonyult egymástól rendkívül nagy genetikai távolságra levő vírustörzsek kimutatására, mennyiségi meghatározására, és a jövőben hatékony, nagy érzékenységű eljárás lehet a PRRSV molekuláris diagnosztikájában.



## 1. b. Summary

To assess the prevalence of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) among the Hungarian pig herds the data of two diagnostic institutes (CAO-VDI, SZIE-AOTK, Large Animal Clinic) was combined with our results, and it was found that approximately 10% of the 1182 presently registered large scale pig herds can be considered as PRRSV infected.

A gel-based RT-PCR method has been developed for the detection of every possible PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) strain by the amplification of the conserved part of the genome, the ORF7. During the sample collection our goal was to target herds that had been proven to be PRRS positive by serological analysis in other institutes, or showed symptoms resembling to PRRS such as reproductive disorders, high mortality rates among the suckling piglets, or respiratory disorders affecting young animals. Sera samples were collected from sows and piglets showing symptoms of PRRS, and lung, peribronchial lymphnode and tonsil samples were collected from deceased animals and aborted foetuses. After this step, on the 45 positive samples (obtained from 25 different herds) the RT-PCR amplification of the variable part of the genome (ORF5), that is proven to be suitable for phylogenetic analyses was performed, followed by direct sequencing of the amplicons from both directions. These sequences were then compared to each other and the most important sequences downloaded from the GenBank, and it was found that large majority of the Hungarian strains belong to the European subtype 1. Three sequences were clustered in the American genotype. Two of them were originated from the same herd, and shared 90-91% nucleotide identity with the Canadian “Quebec” reference strain, whereas the other one was related to an attenuated live vaccine virus strain that is widely used in Europe, but not authorised in Hungary.

We identified nine vaccine like strains, that were obtained from vaccinated herds, but from non-vaccinated animals, and showed high nucleotide identity to the sequence of the vaccine used in the herd. Analysing the nucleic acid and the deduced amino acid identity values of the vaccine related strains compared to live vaccine virus strains it is remarkable that in case of the derivatives of one of the commercially available vaccine, all amino acid changes were found in the putative ectodomain, consistently at the same amino acid positions. Analysing the putative N-linked glycosylation sites of the first ectodomain of the live vaccine virus strains and their derivatives, it was found that almost all the vaccine-like variants lost the N-46 glycosylation site (compared to the vaccine strain). All these sequences were recovered

from aborted fetuses, or carcasses having severe respiratory problems prior to death. In an other herd where the other vaccine was used the AA changes of the vaccine like strains were found in random distribution, all these like sequences were obtained from clinically healthy animals, and such losses were not observed within the herd.

The ORF5 analysis of the 8 Serbian PRRSV sequences revealed, that they belong to the European genotype, subtype 1, and show high similarity to each other and to sequences found in Denmark.

As the second step of our research a one-step real time RT-PCR method has been developed for the simultaneous detection of both genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The assay is based on primer-probe energy transfer, and the most important advantage of this is the relative tolerance towards mutations in the target-probe region. The primers and the probe were designed using an alignment of 235 Type 1 (including all subtypes) and Type 2 PRRSV strains. According to the alignment, multiple degenerations were included in the forward and reverse primers to enable the detection of all PRRSV strains deposited in the GenBank. Specificity was tested using 37 different PRRSV strains and eight other swine pathogen viruses. The detection limit was approximately 10 copies of RNA prepared from the Lelystad virus, a European Subtype 3 virus (Belarus strain Soz-8), and an American vaccine virus (Ingelvac MLV®). One TCID<sub>50</sub> was the detection limit in the case of the cell cultured Lelystad virus and the P129 isolate, respectively. The melting point analysis revealed melting point decrease, but no significant sensitivity and signal loss in the presence of numerous (up to five) target-probe mismatches, indicating the capability of tolerating even more mutations. The method was suitable for the detection and quantitation of phylogenetically divergent strains and can serve as a robust, high throughput tool in the molecular diagnostics of the PRRSV.

## 2. Bevezetés, célkitűzések

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) széles körben elterjedt vírusos megbetegedés, melyet a PRRS vírusa (PRRSV, porcine arterivirus) által okozott fertőzés idéz elő. Nevét onnan kapta, hogy kocákban reprodukciós 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 kórképet először a 1980-as évek végén figyelték meg és írták le az Egyesült Államokban (Keffaber, 1989), míg az első európai előfordulásáról Északnyugat-Németországban számoltak be 1990-ben (Lindhaus and Lindhaus, 1991). Ezt követően a megbetegedés végigsöpört egész Európán (Medveczky, 1996), majd Ázsiában is gyorsan elterjedt (Stadejek et al., 2008). Magyarországon 1995 óta van tudomásunk a jelenlétéről Hornyák és munkatársainak szerológiai vizsgálati eredményei alapján (Hornyák et al., 1996). Hazánkban először 1999-ben sikerült izolálni a vírust, annak európai genotípusba tartozó változatát (Medveczky et al., 2001). A PRRS, az Állategészségügyi Szabályzat alapján 2002-ig bejelentési kötelezettség alá tartozott, addig nem terjedt el széles körben. Ezt követően azonban egy utólag megkérdőjelezhető döntés alapján kikerült a jelentendő betegségek listájáról, így a 2002-től 2006-ig tartó időszakban a fertőzöttség megállapítása nem vont maga után kötelező érvényű hatósági intézkedéseket, ezért könnyebben terjedhetett hazánkban. Ebben az időszakban a betegség terjedésében fontos szerepet játszottak a Magyarország 2004-es uniós csatlakozását követően a nagymértékben fertőzött nyugati országokból minimális állategészségügyi ellenőrzés mellett beérkező sertésállományok, így az öt évvel ezelőtti 2%-os aránnyal szemben jelenleg nagylétszámú sertésállományaink kb. 10%-a tekinthető fertőzöttnek. Ez az arány még mindig jóval kedvezőbb a tőlünk nyugatabbra levő országokétól; Ausztriában pl. 60%-os a PRRS prevalenciája (Dr. Friedrich Schmoll, Veterinärmedizinische Universität, Bécs, személyes közlés). Noha a 2005. évi CLXXVI. törvény értelmében 2006. január 1-étől ismét bejelentési kötelezettség alá tartozik Magyarországon, végrehajtási rendelet hiányában sem a betegség, a fertőzöttség megállapításának szabályai, sem az azt követő intézkedések, esetleges korlátozások nem tisztázottak.

A PRRSV a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának *Arterivirus* nemzetségébe tartozik (Cavanagh, 1997), genomja kb. 15100 nukleotid hosszúságú,

pozitív irányítottságú RNS molekula, amely 9 nyitott leolvasási keretből áll. A vírusnak két, genetikailag és antigénszerkezetileg 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 (Nelsen et al., 1999). Korábban úgy tartották, hogy az európai törzsek közelebbi rokonságban állnak egymással, mint az amerikaiak (Suarez et al., 1996; Drew et al., 1997), de nemrégiben kelet-európai, illetve oroszországi törzsek vizsgálatával négy, egymástól genetikailag élesen elkülönülő szubtypust határoztak meg az európai genotípuson belül (Stadejek et al., 2002; 2006; 2008).

Európában elsőként Dániában írták le amerikai genotípusú törzsek jelenlétét, olyan állományokban, ahol amerikai genotípusú attenuált törzssel történő vakcinázást követően heveny vetéléses tünetek jelentek meg a kocaállományokban a vakcina virulens vírussá történő revertálódása miatt (Bøtner et al., 1997; Madsen et al., 1998; Nielsen et al., 2001). Amerikai genotípusú törzsek jelenlétét írták le a szomszédos Szlovákiában, illetve Ausztriában is (Psikal et al., 1999; Indik et al., 2005).

Mindezidáig az Aujeszky betegség mentesítése során alkalmazott, kiterjedt, összehangolt szűrővizsgálat PRRS esetében nem történt meg. Korlátozott számú vizsgálataink, illetve több PRRS diagnosztikai munkát is végző intézmény adatai alapján megállapítható, hogy a fertőzöttség elterjedtségének aránya sokkal jobbnak mondható a tőlünk nyugatabbra helyezkedő országokénál, melyeknél az akár a 100%-ot is megközelíti. Hazánk viszonylag kedvező járványtani helyzetének, valamint a törvényi szabályozásnak, és a remélhetőleg hamarosan megszülető végrehajtási rendelet által előírt intézkedéseknek köszönhetően talán van még esély nagyüzemi állományaink nagy részének megvédésére, valamint a mentesítésre. Ehhez elengedhetetlen a magyarországi vírustörzsek megismerése, a törzsek rokonsági viszonyainak feltérképezése.

A PRRS diagnosztikájában a vírus, annak fehérjéinek, vagy genetikai állományának 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 meg az állatok konkrét védettségét, 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 (Hanada et al., 2005), molekuláris diagnosztikája emiatt rendkívül nagy kihívást jelent. Ezért elengedhetetlen gyors, specifikus és megfelelően

érzékeny diagnosztikai eljárások kifejlesztése, melyek alkalmasak mindkét genotípus, illetve a különböző európai szubtypusokba tartozó PRRSV törzsek kimutatására.

Munkánk első lépéseként fertőzött telepeken az adott telepen jelenlévő PRRS vírus nukleinsavát tűztük ki célul. Ehhez egy olyan RT-PCR eljárást kívántunk kifejleszteni, mely képes valamennyi lehetséges törzs kimutatására. Ezt követően pedig az így összegyűjtött mintákon a vírusgenom leginkább variábilis génszakaszának, az ORF5-nek a nukleotidrendjét kívántuk meghatározni egy újabb primerpárt (primerpárokat) alkalmazó RT-PCR rendszerrel. Az így kapott szekvencia-adatokat aztán egymással, valamint a nemzetközi adatbázisban (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) fellelhető fontosabb szekvenciákkal összehasonlítva azok rokonsági (filogenetikai) viszonyait akartuk feltérképezni. Meg akartuk vizsgálni továbbá a magyar törzsek eredetét, valamint az ország különböző pontjairól származó vírusok összehasonlításával megállapítani azok járványtani viszonyait. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a szomszédos országokhoz (Ausztria, Szlovákia) hasonlóan jelen vannak-e amerikai genotípusú szekvenciák hazánkban, illetve, ha igen vakcinavírus eredetűek-e, vagy vadvírusokhoz hasonlítanak-e inkább. Emellett, lehetőség szerint olyan, hazánkkal szomszédos országból is célul tűztük ki PRRSV minták begyűjtését, és jellemzését, melyek esetében nincs publikált szekvencia a nemzetközi adatbázisban azért, hogy azokat a magyar (főleg az adott határ közeléből gyűjtött), illetve nemzetközi törzsekkel összehasonlítva filogenetikai viszonyait elsőként leírjuk.

Egy olyan, rendkívül gyorsan változó vírus esetében, mint a PRRSV, elengedhetetlen a diagnosztikai, legfőképpen a molekuláris diagnosztikai módszerek folyamatos fejlesztése annak érdekében, hogy az adott eljárás képes legyen az adott időszakban létező valamennyi, sőt a folyamatos genetikai sodródás következtében folyamatosan kialakuló újabb változatok kimutatására. Mindemellett egyre inkább előtérbe kerülnek az olyan PCR technikák, melyek, a gél alapú módszerek igen/nem eredményein felül alkalmasak a minták nukleinsav-kópiaszám meghatározására is. Munkánk harmadik szakaszaként tehát a begyűjtött törzsek, és szekvenciák birtokában célul tűztük ki egy olyan modern, gyors, megbízható, specifikus, valós idejű vírusnukleinsav kimutatási módszer kidolgozását, mely lehetővé teszi valamennyi jelenlegi, illetve a későbbiekben kialakuló PRRSV törzs kimutatását, valamint a klinikai mintákban található PRRSV mennyiségi meghatározását.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A betegség története

A jelenleg a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) néven ismert kórkép az 1980-as évek második fele óta szerepel az állatorvosi szakirodalomban. Először 1987-ben az Amerikai Egyesült Államokban észlelték (Keffaber, 1989), de Kanadában retrospektív vizsgálatokkal találtak 1979-ből származó szeropozitív savókat is (Carman et al., 1995). Az akkor még ismeretlen oktanú megbetegedést különféle nevekkkel illették: először „Mystery Swine Disease”, majd a jellegzetes kórtani-klinikai elváltozásoknak megfelelően a „Blue-Eared Disease” nevet kapta, de számon tartották „Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS)”, „Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS)”, és „X disease” néven is (Collins et al., 1992). Európában elsőként Németországban észlelték a kórképet 1990-ben (Lindhaus and Lindhaus, 1991), majd a fertőzés rövid idő alatt elterjedt a kontinensen. A kórokozót elsőként Hollandiában, 1991-ben sikerült azonosítani: sertés eredetű alveolaris makrofág-tenyészetben izolálták a későbbiekben referens vírusként számontartott törzset, a Lelystad-vírust (Wenswoort et al., 1991). Ezt követte 1992-ben a VR-2332 jelű vírus, a referens amerikai típusú törzs izolálása az USA-ban (Collins et al., 1992). A két referens izolátum genetikai és antigénszerkezeti tulajdonságaiban, valamint virulenciájuk mértékében jelentős különbségeket mutattak ki, ezek alapján amerikai és európai genotípust különböztetnek meg (Meng et al., 1995). A 90-es évek második felében a két kontinensre jellemző vírusok kölcsönösen átjutottak a sertésállományokba, vagyis megjelentek mind az amerikai típusú vírusok Európában, mind pedig az európai vírusok az USA-ban (Madsen et al., 1998; Ropp et al., 2004). Ázsiában már a 80-as évek végén megjelent a vírus, leginkább annak 2-es genotípusú törzsei (Cha et al., 2006; Stadejek et al., 2006), Thaiföldön és Oroszországban azonban nagyrészt a vírus európai változatai vannak jelen (Thanawongnuwech et al., 2004; Stadejek et al., 2008). Kínában (leginkább annak keleti tartományaiban) 2006 nyarán egy magas lázzal, illetve addig nem látott súlyos tünetekkel járó betegség jelent meg, mely a hízóállományokban is rendkívül nagyarányú elhullást okozott. Az állatok szerveiből PRRSV törzseket izoláltak, melyekkel kísérleti körülmények között, SPF állatokban is ki tudták váltani a súlyos kórképet (Li et al., 2007; Tong et al., 2007).

A kórokozó, s így a betegség is világszerte gyorsan elterjedt, bár Ausztrália, Új-Zéland, Svájc, Finnország, Norvégia, valamint Argentína, Brazília és Kuba egyelőre

PRRS mentesek. Magyarországon elsőként 1996-ban számoltak be szeropozitív állományokról egy akadémiai beszámoló keretében (Hornyák és munkatársai, 1996), majd 1999-ben a SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékén működő virológiai munkacsoportnak sikerült izolálnia az első PRRSV törzset (ABV 32), melyről az ORF6 és ORF7 nukleinsav-analízisével megállapították, hogy az európai genotípusba tartozik, és szoros rokonságot mutat spanyol törzsekkel (Medveczky et al., 2001).

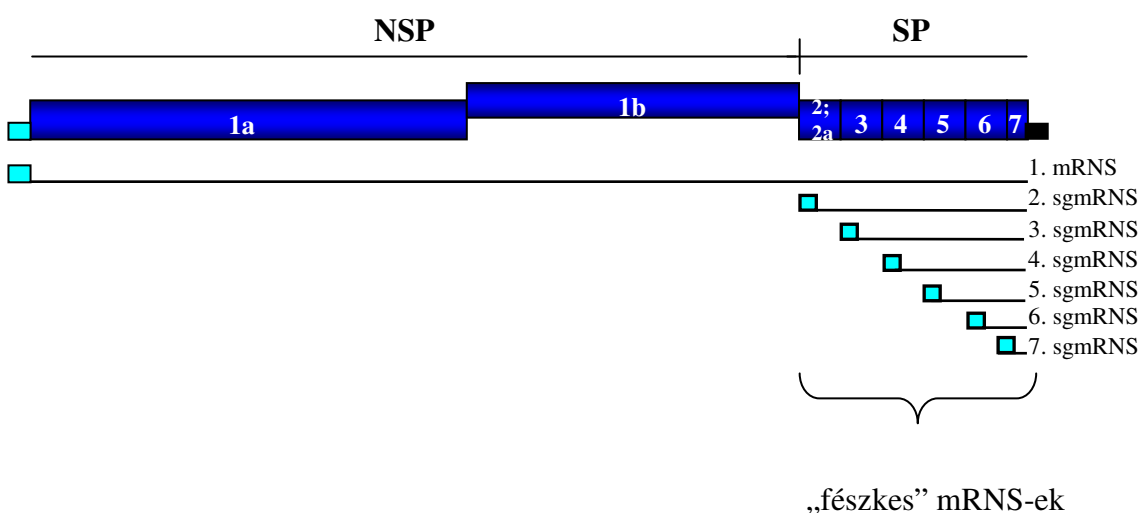
## **3.2. A vírus tulajdonságai**

### *3.2.1. A vírus eredete*

A PRRS vírus (PRRSV) eredetére vonatkozóan több feltételezés is napvilágot látott. A vírus eredetéről szóló, összehasonlító filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján felállított egyik hipotézis szerint a PRRSV az egér laktát dehidrogenáz szintjét megemelő vírustól (Lactate Dehydrogenase-elevating Virus, LDV) alakult ki, valahol Németország keleti részén a 19. században (Plagemann, 2003). Elsőként vélhetőleg vaddisznók fertőződtek az egerektől, majd az új gazdában kezdetben feltehetően lassan replikálódó vírustörzsek közül kialakultak a sertéseket is megbetegíteni képes vírusvariánsok, és a fertőzés elterjedt a vaddisznó-populáción belül. 1912-ben 14, feltételezhetően PRRSV-fertőzött vaddisznót fogtak be ezen a vidéken, és ezeket exportálták az Egyesült Államokba, Észak Karolinába. Ott szabadon engedték őket, és ezzel megindult a vírus evolúciója az amerikai kontinensen is. Más megfigyelések arra utalnak, hogy a PRRSV nem túl régen (az 1980-as évek folyamán) került a sertésbe és adaptálódása ehhez a fajhoz még nem fejeződött be (Hanada et al., 2005), bár újabb, a vírus evolúciójának ütemét vizsgáló számítások az előző hipotézissel összhangban jóval korábbra (1880 tájékára) teszik a két PRRSV típus szétválását a feltételezhető közös ősből (Forsberg, 2005). Az LDV-PRRSV átalakulásban tehát közvetítő szerepet játszhatott a vaddisznó is. Ugyanakkor a vaddisznók PRRSV-fertőzöttségéről kevés adat áll rendelkezésünkre. Ezek leginkább kis arányú szeropozitivitásról (Oslage et al., 1994; Albina et al., 2000), RT-PCR segítségével történő víruskimutatásról (Reiner et al., 2008) számolnak be, míg izolálni a PRRSV-t csupán egy esetben sikerült, egy autó által elgázolt fiatal vadmalac tüdejéből Olaszországban (Bonaliuri et al., 2006).

### 3.2.2. Taxonómia

A PRRSV taxonómiailag a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának *Arterivirus* nemzetségébe tartozik (Cavanagh 1997), virionja burkos, 50-70nm átmérőjű. Legközelebbi rokonai a ló vírusos arteritisének vírusa (Equine Arteritis Virus, EAV), az egér laktát-dehidrogenáz szintjét emelő vírus (LDV) és a majmok vérzéses lázát okozó vírus (Simian Haemorrhagic Fever Virus, SHFV). A *Nidovirales* rend tagjait genomszerveződésük és a vírus replikációs stratégiája alapján sorolták egy taxonómiai egységbe. A latin *nidus* (fészek) elnevezés a vírus replikációja során a szubgenomiális RNS-ek szerveződésének jellegzetes „fészkes” tulajdonságára utal (1. ábra) (Meulenberg, 1993, 2000).



1. ábra.

1. ábra. Az ábrán a PRRSV genomszerveződése, valamint a 3' koterminális, azaz közös 3' végű, fészkes elrendeződésű sgmRNS-ek láthatók, melyek mindegyikének elején a kék négyzet a közös leader szekvenciát jelöli (1a-7: ORF-ek, NSP: nem stukturális, SP: strukturális proteinek). A genom 3' végén látható fekete négyzet a le nem fordított szakaszt jelöli (Meulenberg, 2000).

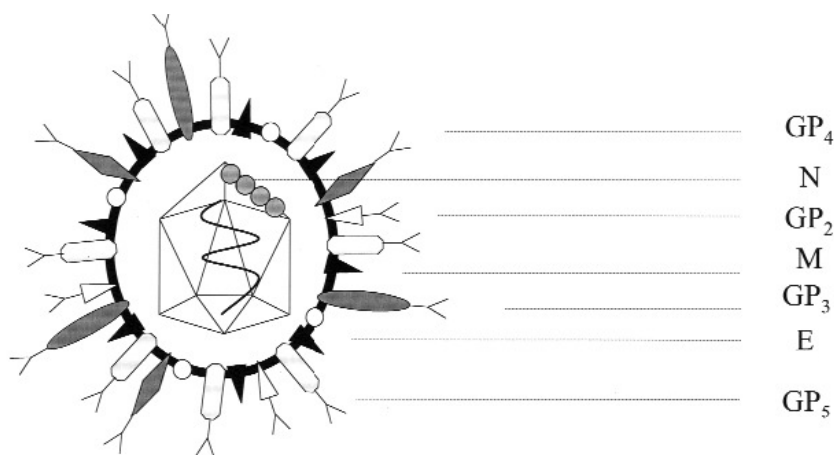
### 3.2.3. A vírusgenom jellemzői

A PRRSV genomja kb. 15100 nukleotid hosszúságú, pozitív irányítottágú RNS molekula, amely a mRNS-hez hasonlóan rendelkezik 5' cap és 3' polyA struktúrákkal. A vírus RNS kilenc ún. nyitott leolvasási keretet kódol (open reading frame, ORF), melyek egy-egy polipeptid kódolásáért felelős genomszakaszok. Ezek a következők: ORF1a/b, ORF2a/b és ORF3-7. Az ORF1 egymaga a vírusgenom több mint



kétharmadát teszi ki (kb. 12000 nukleotid) és a vírus replikációjához szükséges fehérjéket kódolja (Snijder and Meulenberg, 1998) (1.ábra).

Az ORF1a egyetlen polyprotein formájában termelődik, majd proteolitikus folyamatok eredményeként több helyen vágódik és nyolc nem strukturális fehérje keletkezik belőle (non structural protein, NSP1-8). Az ORF1b által kódolt fehérje (mely leolvasási keret eltolódással [frame shift], íródik át) vágásával pedig a további enzimtermészetű, nem strukturális fehérjék (NSP9-12) keletkeznek, amelyek replikáz, RNS-dependens RNS-polimeráz, nukleozid-trifoszfátáz, valamint RNS-helikáz aktivitással rendelkeznek. A vírus három fő strukturális fehérjéje (SP) a GP5 burokfehérje (glikoprotein 5, 24-25 kDa méretű, az ORF5 kódolja), az M (membrán protein, 19 kDa méretű, az ORF6 kódolja), valamint az N fehérje (nukleokapszid protein, 15 kDa, az ORF7 kódolja) (2. ábra). Az ORF2-4 gének kódolják a kisebb mennyiségben termelődő strukturális fehérjéket. Ezen fehérjék transzlációja a már említett „fészkesen” átíródó szubgenomiális RNS molekulákról valósul meg; mindegyik ilyen RNS molekula 5' végén ugyanaz az ún. leader szekvencia található meg (1. ábra), amely nem íródik át aminosavvá és fontos szerepet játszik az mRNS riboszómához való kapcsolódásában (Cavanagh, 1997; Meulenberg, 2000; Wu et al., 2001). A *Nidovirales* rend tagjai közül ezt a mechanizmust követik az *Arteriviridae* és a *Coronaviridae* család tagjai, míg a *Roniviridae* család és a *Torovirus* nemzetség esetében nem figyeltek meg közös leader szekvenciákat (van den Born et al., 2005).



2. ábra. A PRRSV virionjának szerkezete, és legfontosabb szerkezeti fehérjéi.

(Meulenberg, 2000)

N nukleokapszid fehérje	15kDa (ORF7)
M membrán fehérje	18kDa (ORF6)
GP <sub>5</sub> burokfehérje	25kDa (ORF5)
GP <sub>4</sub> burokfehérje	31-35kDa (ORF4)
GP <sub>3</sub> burokfehérje	45-50kDa (ORF3)
GP <sub>2</sub> burokfehérje	29-30kDa (ORF2)
E burokfehérje	10kDa (ORF2 <sub>a</sub> )

#### 3.2.4. Kvázispecies jelleg

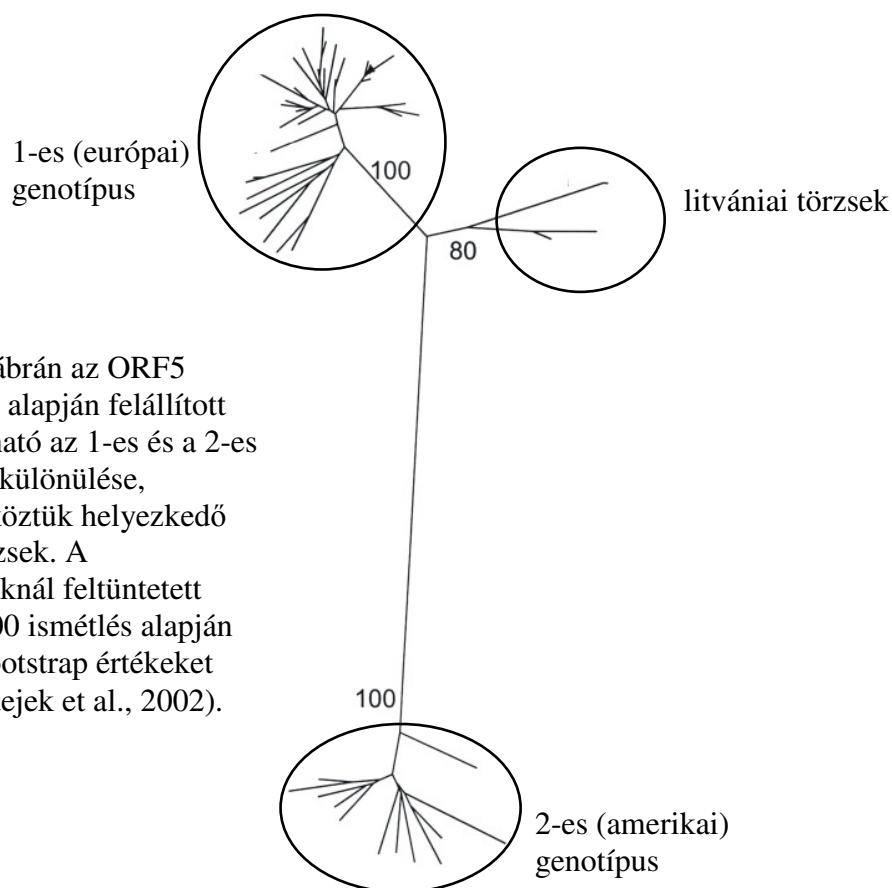
A PRRSV a ma ismert egyik legváltozékonyabb RNS vírus (Hanada et al., 2005). Az RNS vírusok, RNS-dependens RNS-polimerázára jellemző, hogy az RNS szál másolása során gyakran téveszt, vagyis nem a bázispárosodásnak megfelelő nukleotidot építi be a szintetizálódó új szálba, és mivel nincs javító mechanizmusa (proof-reading), mely ezeket a hibákat korrigálná, mutációk keletkeznek a másolt vírusgenomhoz (templát) viszonyítva (Domingo, 2000). Mivel ezek viszonylag nagy számban és mai ismereteink szerint véletlenszerűen képződnek, továbbá egy-egy vírusrészlet (fertőzés) során sok millió templátról készül másolat egyidejűleg, belátható, hogy egy vírustörzset mutáns változatok tömege alkot, melyet a szakirodalom ún. kvázispeciesnek nevez (Holland et al., 1992). Nemcsak a különféle vírusfajok, de az egyes fajokon belül az eltérő funkciót hordozó fehérjéket kódoló vírusgének is eltérő mértékű hajlamot mutatnak a mutációkra, általában a strukturális fehérjéket kódolók gyakrabban, míg a nem strukturális fehérjéket kódoló gének kevésbé szenvednek ilyen jellegű genetikai változást (Kiss et al., 1999; 2000). Adott vírustörzsből a legnagyobb mennyiségben jelenlévő variáns nukleotid-sorrendjét ún. „master-szekvenciának”, míg a szélső értékek és a master-szekvencia közé eső variánsokat a mutáns spektrumnak nevezik. Ugyanakkor a nemzetközi genetikai adatbázisban (GenBank, Bethesda, U.S.A., [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) elhelyezésre kerülő adat (mely RNS vírusok esetében is egyetlen nukleotid sor) a konszenzus szekvencia, amely bármelyik variáns lehet a mutáns spektrum két végpontja között, noha statisztikailag nagyobb a masterszekvencia-közeli változatok „konszenzus szekvenciává” válásának esélye, mert azok nagyobb számban vannak jelen a kvázispeciesben.

A kvázispecies nagyfokú rugalmasságot biztosít a vírus számára, általa könnyebben alkalmazkodik a környezeti feltételekhez, beleértve természetesen a megfertőzött gazda szervezetét és immunválaszának hatását is, vagy ezáltal könnyebben változhat meg egy adott vírus tropizmusa. Állatorvosi, orvosi szempontból az a jelentősége, hogy genetikai háttérrel biztosít antigén- és virulenciaváltozatok kialakulásához, diagnosztikai problémákat és védekezési nehézségeket okozhat, mind a vakcinázás, mind pedig a vírusellenes gyógyszeres kezelés tekintetében. A kvázispecies változékonyosságának ugyanakkor értelemszerűen korlátai vannak: bizonyos mértéken túllépő változások már veszélyeztetik a vírus életképességét, sőt a vírus kvázispecies össze is omlhat: ezt nevezik az „error katasztrófa” jelenségének (Crotty et al., 2001).

### 3.2.5. Genetikai változékonyság

A PRRS vírusnak két, genetikailag és antigénszerkezetileg is jól elkülöníthető variánsát különböztetik meg: az európai (1-es) és az amerikai (2-es) típust, melyek csak mintegy 60-65% homológiát mutatnak a teljes genomszekvenciákat tekintve (Nelsen et al. 1999). A PRRSV genomjának egyik legnagyobb genetikai variabilitását mutató szakasza az ORF5, mely a GP5-ös glikoproteint kódolja (Suarez et al., 1996; Andreyev et al., 1997). Ez a glikoprotein a virion membránjában található és diszulfid kötés segítségével egy heterodimer komplexet alkot az M proteinnel (amit az ORF6 kódol) (Snijder et al., 2003). A GP5 az N-terminális szakaszán neutralizációs epitópot tartalmaz, és a protektív vírusellenes immunitás egyik célpontja, mivel az ellene képződött ellenanyagok megvédik az állatokat a virémiától és a jellegzetes PRRSV okozta elváltozásoktól (Pirzadeh and Dea, 1997; 1998; Snijder and Meulenberg, 1998; Wissink et al., 2003; Balasuriya and MacLachlan, 2004). Ezekon a rendkívül változékonny, hipervariábilis szakaszokon gyakori a mutáció, ami a gazdaszervezet immunrendszere által kifejtett erős szelekciós nyomás miatt legtöbbször aminosav változást is eredményez. Ezek alapján viszonylag rövid idő alatt kialakulnak az adott országra, régióra, sőt akár állattartó telepre jellemző variánsok (lásd később), így azok az esetleges vírusterjedés során is azonosíthatóak lesznek, és magyarázatot adhatnak a vírus eredetére.

Az ezredforduló tájékán az addig elvégzett, korlátozott számú szekvenciavizsgálatok eredményi alapján úgy tartották, hogy az 1-es genotípusú, európai törzsek filogenetikailag szorosabb rokonságot mutatnak egymással, mint az amerikai törzsek (Suarez et al., 1996; Drew et al., 1997). Ez a nézet azonban hamar megdőlt, miután a korábbi szekvenciáktól nagymértékben eltérő PRRSV törzseket találtak Litvániában (Stadejek et al., 2002), melyek a filogenetikai törzsfákon az amerikai és az európai törzsek között helyezkednek el (3. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy ezek a törzsek mutatják a legközelebbi rokonságot a két genotípus közös ősének számító törzsekkel. További kelet-európai, leginkább Belorusszia, és Oroszország területéről származó törzsek vizsgálata nyomán nyilvánvalóvá vált, hogy az 1-es típusú törzseket négy monofiletikus, egymástól élesen elkülönülő szubtípusba lehet sorolni. A nyugat-, illetve közép-európai törzsek egyöntetűen az 1-es szubtípusba tartoznak, a többi szubtípust pedig litván, belorusz, illetve orosz törzsek alkotják (Stadejek et al. 2006, 2008).



3. ábra. Az ábrán az ORF5 szekvenciák alapján felállított törzsfán látható az 1-es és a 2-es genotípus elkülönülése, valamint a köztük helyezkedő litvániai törzsek. A csomópontoknál feltüntetett számok a 100 ismétlés alapján számított bootstrap értékeket jelölik (Stadejek et al., 2002).

### 3.2.6. A PRRSV sejtropizmus, szaporodásának jellemzői

A PRRSV szaporodásának elsődleges célsejtjei a monocita/makrofág vonal sejtjei, ezek közül is elsősorban a sertés alveoláris makrofágok. A vírus megfertőzi a lép, a mandulák, a nyirokcsomók, a máj, a Peyer-plakkok és a tímusz makrofágjait, valamint II-es típusú pneumocitákban is kimutatták már, ugyanakkor a peritoneális makrofágok, a vér monocitái és a csontvelői őssejtek ellenállóak a PRRSV fertőzéssel szemben (Halbur et al., 1996; Sur et al., 1996; Delputte et al., 2004). Néhány nem makrofág típusú sejtet is képes megfertőzni, mint pl. a sertés here csírasejtjeit (spermatidák és spermaticiták) (Sur et al., 1997). A vírus receptor-mediált endocitózissal jut a megfertőzött sejtbe, melyhez jelenlegi ismereteink szerint leglább kétféle receptormolekula, a heparán-szulfát glükózaminoglikán és a szialoadhezin közvetítését veszi igénybe (Vanderheijen et al., 2003; Delputte et al., 2004; 2005). Az előbbihez a vírus a matrix és a GP5 fehérjéjén keresztül kapcsolódik (Delputte et al., 2007). A szialoadhezin a makrofágok specifikus receptora, s azok közül is csak a lép, nyirokcsomók, csontvelő, máj, vastagbél és a tüdő szöveti makrofágjain található meg, s bár kimutatták, hogy szerepet játszik bizonyos sejt-sejt interakciókban (granulocitákkal, monocitákkal, természetes ölüssejtekkel, de akár daganatsejtekkel is), pontos biológiai funkciója még nem ismert. A vér perifériás mononukleáris sejtjei valamint a peritoneális makrofágok felületén nem található szialoadhezin, s ezeket a sejteket kísérletes

körülmények között sem tudták PRRSV-vel fertőzni. Ha azonban mesterségesen kifejezték a szialoadhezint a felületükön, ezek a sejtek is fogékonyá váltak a PRRSV fertőzésre. A szialoadhezin mint vírusreceptor szerepe meglehetősen speciálisnak tűnik a PRRSV esetében, az ember vírusos megbetegedései kapcsán például eddig nem találkoztak vele. Ugyanakkor az LDV-vel kapcsolatos megfigyelések arra utalnak, hogy ez a vírus is alkalmazza a szialoadhezint a sejtbe jutáshoz, ami tovább erősíti azt a hipotézist, hogy a PRRSV az LDV-ből származik (Vanderheijen et al., 2003).

A receptor-komplex fontos része a vimentin, mely a sejtbe jutott virionoknak a citoskeleton filamentumaihoz való hozzákapcsolódását segíti elő, így egyéb fehérjemolekulák mellett (citokeratin 8, citokeratin 18, actin, II-es típusú bázikus keratin) szerepet játszik a virionok sejtben belüli transzportjában (Kim et al., 2006).

*In vitro* körülmények között a legtöbb PRRSV törzs szaporítására a vírus elsődleges célsejtjeiből sertés alveolaris makrofágjaiban (porcine alveolar macrophages, PAM) álló sejtenyészet a legalkalmasabb, melyen a vírust elsőként izolálták. Egyes európai törzsek, az amerikai genotípusú törzsek nagy része, továbbá az attenuált vakcinavírus törzsek sikeresen szaporíthatóak ezen kívül afrikai zöldmajom vese eredetű permanens sejtvonalakon (pl.: MARC-145, MA-104, CL-2621) is (Kim et al., 1993).

### **3.3. A PRRS járványtana**

#### *3.3.1. A vírus terjedése*

A PRRSV sertésről sertésre átvihető direkt módon, azaz közvetlen érintkezés útján, illetve indirekt úton, ragályfogó eszközök segítségével is. A szeronegatív állományok az esetek döntő többségében vírusürítő állatok bevitelét, illetve fertőzött sperma használatát követően fertőződnek a kórokozóval. A vírust kimutatták fertőzött állatok különböző váladékában (vér, orrváladék, nyál, ondó, bélsár, tej, kolosztrum). A leggyakoribb horizontális fertőzési út az oronazális, illetve az ondóval történő vírusátvitel. Fiatal állatok, mivel esetükben a virémia időtartama is jóval hosszabb (lásd később), akár 6-8 hétig is képesek átadni a vírust a velük együtt tartott, hasonló korú társaiknak, ami esetükben leginkább az orrváladék, illetve a köhögés során képződő aeroszol segítségével történik (Wills et al., 1997b; 2002). A köhögéskor, tüsszögéskor a légutakból aeroszol formájában ürülő vírus fertőzőképességének változását, illetve az aeroszol PRRSV eredetű RNS tartalmának felezési idejét különböző hőmérsékleten illetve relatív páratartalmi értékeken vizsgálva megállapították, hogy az alacsony hőmérséklet, illetve az alacsonyabb relatív páratartalom kedvez a vírus túlélésének, de ezek közül a hőmérsékleti értéknek nagyobb a jelentősége (Hermann et al., 2007). A

levegő útján történő fertőzés-fertőződés hatótávolságáról, annak valószínűségéről eltérő adatok állnak rendelkezésre. Kísérletes körülmények között a levegő útján bekövetkező fertőzés általában rövid, egy-két méteres távolságban következik be, ezzel szemben telepi körülmények között, részletes szekvenciavizsgálatokkal alátámasztva kb. 600m-es távolságra történő fertőződést is igazoltak már egy sertéstelep különböző termelési egységei között (Sandri et al., 2006). Egy nagy számú állaton elvégzett kísérlet azt bizonyította, hogy elegendőnek bizonyult a negatív állatok fertőződéséhez, ha a hozzájuk bejutó levegő csupán 1%-a származott a fertőzött állatok légtéréből (Kristensen et al., 2004).

Nagyon fontos fertőzési mód a spermával történő vírusátvitel. Kísérletes fertőzést követően spermából vírusizolálással 43 (Swenson et al., 1994), polimeráz láncreakcióval 92 napig tudtak PRRSV-t kimutatni (Christopher-Hennings et al. 1995). A PRRSV (és az egyéb arterivírusos) fertőzések fontos tulajdonsága a perzisztens fertőzöttség kialakításának képessége, amely a betegség járványtani sajátosságainak szempontjából nagy jelentőségű. Perzisztens fertőzés során a vírus majdnem teljesen eltűnik a szeropozitív állatok vérpályájából, és csupán a limfoid szervekben, leginkább a mandulákban mutatható ki. Noha a perzisztens fertőzés kialakulásának módja nem ismert, annyi bizonyos, hogy bármely korban fertőződött állat esetében kialakulhat, és akár a fertőzést követő 157. napon is izolálható fertőzőképes vírus az állatokból (Wills et al., 1997a). A vemhesség 85-90. napján intrauterinálisan fertőzött sertésmagzatok vérében 210 nappal a születésüket követően is kimutattak vírus RNS-t, és ezekkel a malacokkal 98 napos koruktól együtt tartott szentinel állatok rövid időn belül áthangolódtak a PRRSV-vel szemben (Benfield et al., 1997).

Indirekt fertőzési forrásként szerepelhetnek kontaminált csizmák, ruhadarabok, injekciós tűk, illetve különböző járművek, de ezek fertőzősközvetítő szerepe a megfelelő járványvédelmi, illetve higiéniai követelmények betartásával (ruhacsere, csizma- és járműfertőtlenítés stb.) jelentősen csökkenthető. Mechanikai vektorai lehetnek azonban a PRRSV-nek szúnyogok (*Aedes vexans*) illetve a házi légy is (*Musca domestica*) (Otake et al., 2002; 2003). Mivel ezek nem biológiai vektorok, tehát bennük a vírus nem szaporodik, fertőzősközvetítő képességük a felvett vírus mennyiségétől, illetve a külső környezeti hőmérséklettől függ. Leírtak fertőzött állatokkal kapcsolatba került legyek közvetítésével 2,4 km-es távolságra történt vírusátvitelt is (Schurrer et al., 2004).

A fogékony állatok fertőződése bekövetkezhet a szájüregen/orrüregen át, hámsérüléseken keresztül, termékenyítéskor vagy jatrogén úton. A sikeres fertőzéshez

szükséges vírusrészlet tekintetében azonban jelentős különbségek adódnak a fertőzés bemeneti kapujától illetve az állatok korától függően. Minél fiatalabb az állat a vírussal való találkozás pillanatában, annál kisebb vírusrészlet elegendő a fertőzés megkezdéséhez. Fiatal állatok esetében akár 20 fertőzőképes virion elegendő az intranazális vagy intramuszkuláris fertőzéshez (Yoon et al., 1999), míg venereális fertőzéshez jóval nagyobb vírusrészlet szükséges (Benfield et al., 2000).

### 3.3.2. Kórfejlődés

A vírus a fertőzést követően a bemeneti kapu környékén található perifériás makrofágokban szaporodik, majd 12 órán belül virémia következik be, melynek során eljut a nyirokszervekbe, illetve a tüdőbe. A megfelelő sejtekbe (főként makrofágokba) bejutó és multiplifikáló vírus azok károsodását okozza. Apoptózisra (programozott sejthalál, aktív, irányított folyamat) illetve nekrozisra (általában passzívan végbemenő jelenség) jellemző folyamatokat egyaránt leírtak (Kim et al., 2002; Miller and Fox, 2004; Lee and Kleiboeker, 2007). Fontos megemlíteni az úgynevezett bystander hatást, ami azt jelenti, hogy nem csak a vírussal fertőzött sejtekben mennek végbe az apoptotikus folyamatok, hanem a környezetükben megtalálható (bystander) sejtekben is. Ezen sejtek a vírussal fertőzött makrofágok által termelt és az extracelluláris térbe jutó, apoptosist indukáló mediátorok (TNF- $\alpha$ , NO, reaktív oxigénradikálok stb.) parakrin hatása következtében pusztulnak el (Choi and Chae, 2002).

A fertőzés kimenetelében sok egyéb, már említett tényező mellett szerepe lehet a sertések genetikai tulajdonságainak. A nagy fehér, a pietrain, a lapály, illetve két hibrid sertésfajta alveolaris makrofágjainak *in vitro* PRRSV fertőzésre adott válaszát összehasonlítva megállapították, hogy a lapály fajta PAM-jaiban lassabb volt a vírus replikációja. Ennek magyarázata a fajta PAM sejtjei által a fertőzés korai szakaszában, a többi fajtához képest nagyobb mennyiségben termelt TNF- $\alpha$ , illetve interleukin-8, melyek a vírus szaporodását gátolják (Ait-Ali et al., 2007).

Az adott vírustörzsek eltérő virulenciájának molekuláris háttere egészen a közelmúltig nem volt egyértelmű. Korábban egy revertálódott vakcinaeredetű vírustörzset hasonlítottak össze a vakcinavírussal, illetve a vakcinatörzs kiindulási vad változatával, melynek során az ORF1 génszakaszon találtak „gyanús” nukleotidokat (Nielsen et al., 2001). Nemrégiben a Kínában izolált erősen patogén törzsek összehasonlító genom szekvencia-vizsgálatával az ORF1 által kódolt NSP2-nek megfelelő peptiden találtak egy szakaszt, melyen valamennyi erősen patogén törzs esetében hiányzott egy 30 aminosavból álló szakasz a többi PRRSV törzshöz képest (Li

et al., 2007), kiderült azonban, hogy ennek a deléciónak nincs szerepe a súlyos tünetek, illetve kórtani elváltozások kialakításában (Zhou et al., 2008). Egy napjainkban megjelent tanulmány szerzői úgy vizsgálták az egyes génszakaszok virulenciát meghatározó képességét, hogy egy erősen virulens, illetve egy vakcinavírusból készített fertőző klónból kimérákat készítettek, úgy, hogy a vakcinavírus egyes szakaszait a virulens törzs megfelelő részeivel cseréltek ki. Ezeket a klónokat vemhes kocákba oltva meghatározták azok virulenciáját. Így arra a következtetésre jutottak, hogy az NSP3-8, illetve a GP5 a virulenciát meghatározó legfontosabb területek (Kwon et al., 2008.)

### *3.3.3. Tünetek, kórbonctan*

A fertőzötten született, vagy szopóskorban fertőződött malacoknak általában nehezített légzése van, jellemző a kötőhártya-gyulladás, láz, borzolt szőrzet, étvágytalanság, hasmenés, reszketés, bőrvérzések, szemhéj-ödéma és az akár nagyobb arányú elhullás is. A megszületés utáni hetekben fertőződött növendék malacok között láz, tüdőgyulladás, a növekedésben, fejlődésben való visszamaradás, valamint a másodlagos, elsősorban bakteriális kórokozók következtében megnövekedett elhullás figyelhető meg. Idősebb korban a hízók, kanok és kocák illetve tenyésztésbe nem vett süldők között gyakoribb a szubklinikai fertőzöttség, ami átmeneti lázban és étvágytalanságban nyilvánulhat meg. Leírtak azonban a erős pathogenitású, a kocák közt 50%-os vetélést, és akár 10%-os elhullást eredményező, súlyos, úgynevezett atipikus PRRS-t, vagy más néven SAMS-t (sow abortion and mortality syndrome) okozó járványokat is (Martelli et al 2003). Súlyos megbetegedést, rendkívül magas lázat és nagy arányú, akár 100%-os elhullást ún. high fever syndrome-ot okoznak a már korábban említett, 2006 nyarán Kínában, majd Vietnámban és 2008-ban Bhután területén is megjelent vírustörzsek (Stadejek, személyes közlés). A PRRSV-vel fertőződött illetve élő, attenuált PRRS-vakcinával oltott kanok ondójukkal üríthetik a vírust, amit étvágycsökkenés, enyhe láz, a libido csökkenése kísérhet. Az ejakulátum mennyiségének és a sperma minőségének romlását is leírták, utóbbi a spermiumsejtek csökkent motilitását, morfológiai anomáliákat, akroszóma-rendellenességeket jelent (Prieto and Castro, 2005). A fertőzés kimenetele függ a fertőző vírus patogenitásától, valamint a korábban említettek alapján a fertőzött állat genetikai adottságaitól is. Mind a makroszkópos, mind a kórszövettani elváltozások tekintetében elsősorban a fiatal állatokban találhatunk elváltozásokat, melyek az idősebb egyedekben is felismerhetők, de kevésbé kifejezettek. A tüdők a normálisnál tömöttebb tapintatúak lehetnek, illetve gyakran láthatjuk a másodlagos bakteriális fertőzések következményeinek megfelelő



kórbonctani képet, továbbá az érintett nyirokcsomók jelentősen megnagyobbodhatnak. Kórszövettani elváltozásokat szintén a tüdő és a nyirokcsomók mutatnak elsősorban. A tüdőben intralobuláris intersticiális tüdőgyulladás alakul ki, az alveoláris szeptumok mononukleáris sejtekkel való beszűrődésével, a II-es típusú pneumociták hipertrófiájával és hiperpláziájával, valamint gyulladással és nekrotikus exsudátum esetenkénti felhalmozódásával az alveolusokban. A nyirokcsomókban follikuláris hiperpláziát lehet megfigyelni, illetve kifejezett eozinofil granulociták infiltrációt. Vérérkárosodást, az agy és a szív elváltozásait szintén megfigyelték a magzatokban érgyulladás (leginkább köldökartéria-gyulladás), agyvelőgyulladás és szívizomgyulladás formájában (Rossow, 1998).

### **3.4. A PRRSV elleni immunitás**

#### *3.4.1. A humorális immunválasz*

Indirekt immunfluoreszcenciás eljárással mérhető mennyiségben először az IgM típusú ellenanyagok kezdenek megjelenni az 5-7. naptól, a 14-21. napon elérik maximumukat, majd a 35-42. napra kiürülnek. IgG típusú ellenanyagokat ELISA, illetve IPMA vizsgálatokkal a 10-14. naptól lehet kimutatni, maximumuk a 21-28. napon van, majd néhány hónap alatt kiürülnek. Ennek a gyors és erőteljes ellenanyagválasznak azonban nincs vírusneutralizáló hatása. Ennek egyik oka, hogy a vírus sejthez kapcsolódásáért felelős fehérjéje, a GP5 első vírusfelszíni alegysége kétféle epitópot tartalmaz: az egyik ellen termelt ellenanyagok neutralizálják a vírust („B” epitóp: 37-45. aminosav a GP5-ben), míg a másik ellen termelt nem („A” epitóp: 27-30. aminosav a GP5-ben). Ugyanakkor az A epitóp sokkal hatékonyabb antigén és úgy helyezkedik el a B epitóp előtt, hogy ellene sokkal hamarabb (már néhány nap alatt) termelődnek ellenanyagok, mint a neutralizációért felelős B epitóp ellen (több, mint négy héttel a fertőzés után). Ezt a fehérjerészletet ezért ún. „csali-epitóp”-ként tartják számon, ami egyébként ismert eszköze a vírusok és a baktériumok gazdaszervezet elleni küzdelmének (Ostrowsky et al., 2002; Nowotny et al., 2003; Balasuriya and MacLachan, 2004; Fang et al., 2006; Lopez and Osorio, 2004).

A VN (vírusneutralizáló, a vírus sejtreceptorhoz tapadását megakadályozni képes) ellenanyagok a fertőzést követő 4. hét után jelennek meg és hosszú ideig, akár egy évig is kimutathatók. Látszólag hiányzik a klasszikus szekunder humorális immunválasz a homológ PRRSV ráfertőzésre. Azaz, ha egy malacot kétszer fertőzünk ugyanazzal a vírussal, nem követi kimutatható ellenanyagtiter emelkedés a második fertőzést, ráadásul nincs is kimutatható vírusreplikáció. Ha heterológ ráfertőzést

végzünk, azaz a második PRRS fertőzés (challenge vírus) különbözik az elsőtől (immunizáló vírus), akkor általában ellenanyagtiter emelkedést észlelünk (Lager et al., 1997).

#### 3.4.2. A celluláris immunválasz

Egy adott kórokozóval még nem találkozott állat szervezetében a veleszületett immunválasz jelenti az elsődleges védelmi vonalat. Ilyenkor a bejutás és az elsődleges vírusszaporodás helyén megtalálható endotélsejtek, neutrofil granulociták, természetes ölósejtek (NK, natural killer), illetve makrofágok felületén megtalálható különböző receptorok (Toll-like receptors) felismerik a vírus eredetű dupla-, vagy – jelen esetben – szimplaszálú RNS molekulát, és az így aktivált sejtek aztán intenzív citokintermelésbe kezdenek (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  stb.). Ezek a mediátorok azután mind a fertőzött, mind a nem fertőzött, szomszédos sejtekben gátolják a vírusszaporodást, illetve aktiválják a NK sejteket, melyek elpusztítják a fertőzött sejteket (Saito and Gale, 2007). A PRRSV fertőzés esetén ez az első védelmi vonal által adott citokinreakció kifejezetten gyenge, ami lehetővé teszi a vírus gyors elszaporodását, szóródását, illetve lassítja a későbbi másodlagos immunválasz kialakulását is (Albina et al., 1998; Buddaert et al., 1998). Nehezíti a vírusfertőzött sejtek eliminálódását az a megfigyelés, hogy sem az *in vivo*, sem az *in vitro* körülmények között fertőződött makrofágok felületén nem expresszálódnak vírusfehérjék, ami megakadályozza a fertőzött sejtek ellenanyagok és komplementkötődés segítségével történő elpusztítását (antibody-dependent, complement-mediated cell lysis, ADCML) (Costers et al., 2006). A PRRSV fertőzés emellett megemeli az IL-10 termelődéséért felelős mRNS szintet a vér mononukleáris sejtjeiben, illetve a tüdő makrofágokban (Suradhat and Thanawongnuwech, 2003; Suradhat et al., 2003). Az IL-10 gátolja egyes vírusellenes, proinflammatorikus citokinek (IL-1, TNF- $\alpha$ ) termelődését, továbbá szintén gátló hatással van az antigénprezentáló sejtekre, illetve a CD4<sup>+</sup> T<sub>helper</sub> limfociták képződésére, melynek következtében a sertések a PRRSV fertőzésre általában alacsony kezdeti T limfocitaszint-növekedéssel reagálnak, ami azután egyenletesen emelkedik a fertőzést követő 1-2 évben (Meier et al., 2003).

A későn kialakuló, gyenge immunválasz következtében az állatokban perzisztens fertőzés alakulhat ki (lásd előbb). A garatváladékból illetve a mandulából még akkor is izolálható a PRRSV, amikor a különböző szerológiai vizsgálatokkal mérhető ellenanyagszint már csökkenő fázisban van. Ez a jelenség is arra utal, hogy az elérhető szerológiai tesztekkel mérhető ellenanyagválasz, illetve az egyéb

immunmechanizmusok nem elegendőek ahhoz, hogy a gazda megszabaduljon a vírustól.

### **3.5. Diagnosztika**

A betegséget kizárólag a klinikai tünetek alapján nehéz felismerni; a PRRS diagnózisa a vírus vagy a specifikus ellenanyagok kimutatásán alapul. A fertőzött állatból a vírus kimutatására direkt, az ellenanyagok kimutatására indirekt módszereket használnak.

#### *3.5.1. Indirekt víruskimutatás, szerológia*

A szerológiai vizsgálatok során az állatok vérsavójából a vírusfertőzés hatására, a gazdaszervezet plazmasejtjei által a vírus különböző antigéntermészetű komponensei ellen termelt immunoglobulinokat mutatjuk ki. A módszer előnye, hogy ezek a fehérjék jobban ellenállnak a környezeti hatásoknak, hosszabb ideig stabilak maradnak még nem megfelelő tárolási körülmények között is, mint a fertőzőképes virionok. Az ellenanyagok ezen felül hosszabb ideig perzisztálnak a vérben mint a kórokozó, így nem csak a betegség heveny-félheveny szakaszában mutathatóak ki, hanem akár hónapokkal a fertőzést követően is. A kereskedelmi forgalomban kapható szerológiai vizsgálatokkal továbbá egyszerre nagy számú mintát lehet viszonylag rövid idő alatt megvizsgálni. Az így kapott adatok alapján egy adott állományban a fertőzés lefolyását és a járványmenetet valamint az egyes korcsoportok immunológiai státuszát is tanulmányozni lehet. A kereskedelmi forgalomban kapható indirekt ELISA tesztekkel kimutatható ellenanyagok gyorsan és nagy mennyiségben jelennek meg a fertőzést követően. Antigénként általában rekombináns nukleokapszid fehérjét használnak, melynek előnye, hogy szerkezete hasonló a különböző vírustörzsek esetében, így a tesztek bármely PRRSV törzset képesek kimutatni. Hátránya a módszernek, hogy nem tükrözi a tényleges védettséget, mivel ezeknek az ellenanyagoknak nincs protektív, illetve vírusneutralizáló hatása. Negatív lehet az ELISA tesztek eredménye perzisztensen fertőzött állatok esetében, ugyanis ezekkel a PRRSV-ellenanyagokat a fertőzés után 3-4 hónap múlva már nem lehet kimutatni, pedig a vírus az állatok mandulájából ekkor még kimutatható (Horter et al., 2002). Másik hátránya az ELISA teszteknek, hogy az esetek körülbelül 1%-ában fals pozitív eredményt adnak, mely PRRS negatív állományok periodikus ellenőrző vizsgálataiban okozhat komoly nehézségeket (Toremorrell et al., 2002; Dr. Friedrich Schmoll, Veterinärmedizinische Universität, Bécs, személyes közlés).

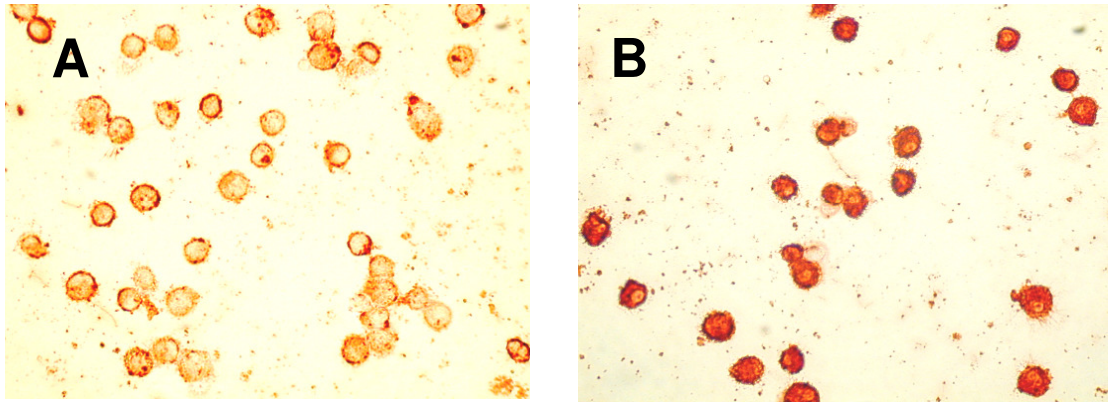
A vírusneutralizációs próbákkal kimutatható ellenanyagok az állatok tényleges védettségéről adnak tájékoztatást, ilyen ellenanyagok azonban csak a fertőzést követő 4. héttől jelennek meg, ezért a módszer heveny fertőzés diagnosztizálására alkalmatlan. A VN próbák sertés alveoláris makrofág sejttenyészeten és egyes, leginkább észak-amerikai, illetve attenuált vakcinatörzsek esetében majomvese eredetű sejtvonalakon (MA-104, MARC-145) is elvégezhetők. Azoknál a törzseknél, melyek nem okoznak citopatogén elváltozásokat a sejttenyészeten immuncitokémiai módszerekkel kell az esetleges vírusszaporodást láthatóvá tenni, mely méginkább munkai igényessé teheti az eljárást. A vírus genetikailag és antigénszerkezetileg nagyon változatos, ezért, ha a próba során az eredeti törzshöz kevésbé hasonló izolátumot használunk, a ténylegesnél alacsonyabb neutralizációs titereket kaphatunk.

A PRRS indirekt diagnosztikájában indirekt immuofluoreszcens próbákat, blokkoló ELISA teszteket, továbbá IPMA eljárás alapján alapuló módszereket is leírtak.

### 3.5.2. Direkt víruskimutatás

#### 3.5.2.1. Vírusizolálás

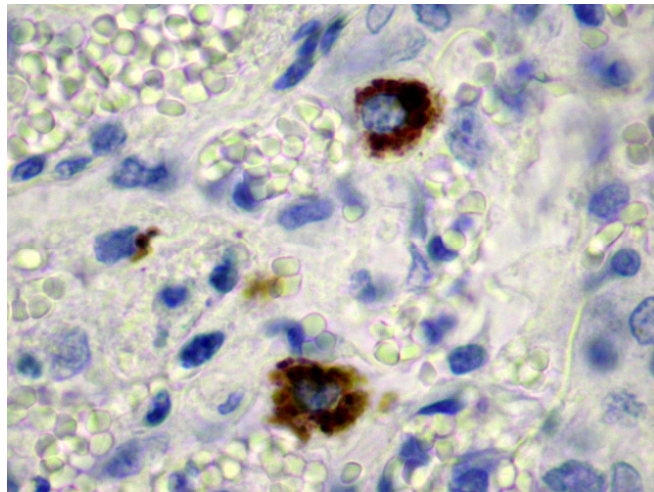
A direkt módszerek közül a vírusizolálás és az RT-PCR a legelterjedtebb. A vírusizolálás a fertőzés heveny szakaszában fiatal állatok (szopóستól hízókorig) esetében a fertőződést követő 4-6 hétig, kanok, kocák vérsavójából 1-2 hétig, továbbá az elhullott állatok tüdejéből, nyirokcsomóiból, tonsillájából vett mintákból lehetséges. A vírus elsősorban a sertések alveoláris makrofágjaiban szaporodik, ezért vírusizolálásra a primer PAM tenyészet bizonyult a legmegfelelőbbnek (Meulenberg, 2000). Hátránya, hogy a PAM sejtek *in vitro* nem szaporodnak, ezért a szükséges mennyiséget 6 hetesnél fiatalabb egészséges malacok tüdejéből kimosással (lavázs) készítik. Amennyiben a vírus szaporodása során nem okoz látható, és nagy biztonsággal elbírálható sejtkárosító hatásokat, peroxidáz alapú immuncitokémiai festéssel lehet a vírusantigéneket láthatóvá tenni (4. ábra) (Balka et al., 2004). A vírust sikerrel adaptálták egyes zöldmajom-vese eredetű sejtvonalakhoz is (CL-2621, MA-104, MARC-145) (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992). Ezeken a sejtvonalakon többnyire az amerikai törzsek szaporodnak. Az egyes PRRS törzsek sejti igénye tehát eltérő, ezért egyetlen sejtkultúra alkalmazása nem mindig elégséges a PRRSV izolálására klinikai mintákból. A módszer további hátránya, hogy a vírus érzékeny a környezeti hatásokra, így nem megfelelő tárolási körülmények között, illetve autolitikus mintákban hamar elveszti fertőzőképességét.



4. ábra. PRRSV negatív (A), illetve pozitív (B) PAM tenyészetben elvégzett immunperoxidáz festés, 100×

#### 3.5.2.2. A vírusantigének kimutatása

A vírus antigénjeinek kimutatására immunhisztokémiai illetve fluoreszcens ellenanyagok használatán alapuló módszereket dolgoztak ki (Benfield et al., 1992; Halbur et al., 1994, Balka and Rusvai, 2006). Ezekkel a vizsgálatokkal formalinnal rögzített, paraffinba ágyazott, vagy fagyasztva metszett szövetmintákban lehet a vírusantigéneket kimutatni (5. ábra).



5. ábra. Immunhisztokémiai jelölés következtében barnásvörös színnel festődő PRRSV antigének a tüdő makrofágjainak citoplazmájában, 200×

#### 3.5.3.3. A vírus genetikai állományának kimutatása

A vírus genetikai állományának kimutatására szolgáló módszerek az *in situ* hibridizáció, illetve a polimeráz láncreakción alapuló különféle technikák. *In situ*

hibridizáció során általában formalinnal fixált szövetmintában mutatják ki a vírust egy, a genetikai állományához kötődni képes, megfelelően jelölt oligonukleotid segítségével, míg a PCR technikák egy adott, általunk kiválasztott génszakasz specifikus sokszorosításán alapulnak. Ez utóbbi módszerek esetében a legnagyobb kihívást a vírus rendkívüli genetikai változékonysága jelenti. Alapvető követelmény, hogy a próbák alkalmasak legyenek mindkét genotípusú vírustörzs kimutatására. Ezért szinte valamennyi PCR módszer a vírusgenom leginkább konzervatívnak mondható szakaszait az ORF6-ot és az ORF7-et célozza meg (6. ábra). A molekuláris diagnosztikai eljárások előnye, hogy autolizált, illetve nem megfelelően tárolt mintákon is sikerrel alkalmazhatók, továbbá nagyfokú érzékenységük folytán kis mennyiségű RNS molekulát is képesek kimutatni, illetve a PCR-termékek (amplikonok) szekvenciájának meghatározásával járványtani nyomozást és filogenetikai vizsgálatokat lehet segítségükkel elvégezni.

A PRRSV molekuláris diagnosztikájára számos nested, illetve non-nested reverz transzkripció PCR módszert leírtak (Fetzer et al., 2006). Arról is beszámoltak, hogy az egyik széles körben használt primerpár, amennyiben nem pontosan a leírt protokoll szerint alkalmazzák, sok esetben aspecifikus, nem PRRSV eredetű szekvenciákat képes felerősíteni, fals pozitív eredményekhez vezetve (Fetzer et al., 2006).

LELYST	14400	ggcga	tacattctgg	cccctgccca	tcacg	tagaaa	gctgcaggtctc
VR2332	14700	-----	.....c.....	t.....	c....	gt.t	
LELYST	14450	cattcaatctcagcgtctg	gtaaccgagc	atacgc	tgtgagaa	agcccgg	
VR2332	14741	..c.g..tg.g..aaa..a.....	ac....	tt.tc..	cc.gcgt.....		
LELYST	14500	actaacatcagtgaa	cggcactctag	taccaggact	tcggagc	ctcgtgc	
VR2332	14791	ctcc..ta.g..c.....	at.g..g..c..	gt.aaaa.....	t		
LELYST	14550	tggggcggcaaacgag	gctgttaaacgagg	agtggt	taacct	cgtaagt	
VR2332	14841	....t....g.aa.....	ag.....	a.....	t....	a...	
LELYST	14600	ggccggtaaaaaccagag	gccagaagaaaa	agaaagta	cagctcc	gatgg	
VR2332	14891	.c.---a..t...a.cg..a..c..c.g....	g..-----	a..a..			
LELYST	14650	ggaatggc	cagccagtcaat	caactg	tgccagt	tgtgggtgcaatgata	
VR2332	14929	..g.....	g.....	a.....	---a....	c	
LELYST	14700	aagtcccagcgc	cagcaacctagggga	---ggacag	gccaaaaa	-----	
VR2332	14976	.tcg.t....aaa.c..gt.c..a..caag....	c..ga..g..	aaataa			
LELYST	14741	---gaaaaagcctgaga	agccacattttccc	ctggctgctgaag	atgaca		
VR2332	15026	gaa.....c..g.....	c.....	t..a..ga.....	tg		
LELYST	14788	tccggcaccacctcacc	cagactgaacgc	tcctctgctt	gcaatcgatc		
VR2332	15076	..a.a..t...t.t....	ct.g...g..gcaat.g..	tc..tcg..a...			
LELYST	14838	cagacggctttcaat	caaggcgcaggaact	gcgtcgcttt	catccagcgg		
VR2332	15126	.....c..c..t.....	t..g...tgca.c..g...gattca..				
LELYST	14888	gaaggtcagttttcag	gttgagttt	atgctgccggtt	gctcatacag	gtc	
VR2332	15176	..g.a.a....	acact..g.....	ggt...tacgca.....	t....		
LELYST	14938	gctgattcgcgtgact	tctacatccgc	-----	cagtcag		
VR2332	15226	.....c.....c..ag.at..c..t.agcat	gatgggctg	g..t..tt			
LELYST	14973	ggtgcaagttaattt	-----	gacagtcaggt	gaatggccgcgat		
VR2332	15276	.ag...tc.c.g.g.t	gaattggaa..at..gt.....	act...			
LELYST	15012	tggcgtgtggcctctg	agt	cacctattcaatt	agggcga	tcacatggggg	
VR2332	15326	..a.a.tgt.....	a.....	c.gtg.....			
LELYST	15062	tcatacttaatcagcag	gaacctatgtg	accgaaatt	aaaaaaaaaaaa		
VR2332	15376	.g.g.t.....-t...ga.....	c.g.....	-----			
LELYST	15112	aaaaaaaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaaaa			
VR2332	15412	-----					

O  
R  
F  
6

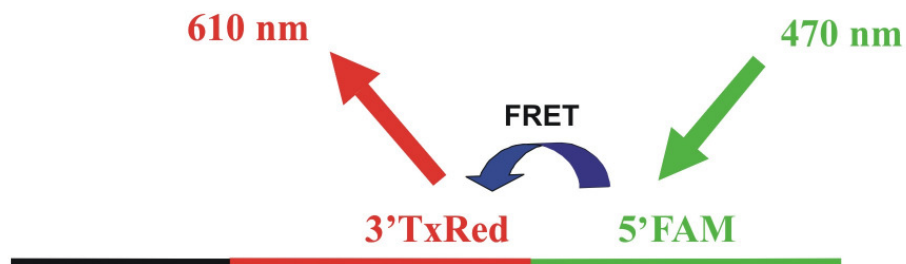
O  
R  
F  
7

6. ábra. Az ábra a leginkább elterjedt diagnosztikai primerek, valamint az általunk kifejlesztett gél alapú RT-PCR-hez használt primereknek az európai (Lelystad virus, akcessziós szám: M96262), illetve az amerikai (VR-2332, akcessziós szám: NC\_001961) referens törzsön való tapadási helyet és irányát mutatja. A piros keret Fetzer et al. (2006), a kék keret Oleksiewicz et al. (1998), míg a zöld háttér az általunk kifejlesztett primereket jelöli. A fekete keret az ORF7-es génszakaszt és a 3' NCR-t mutatja.

A vírusgenom kópiaszámának meghatározására SYBR Green (Lurchachaiwong et al., 2008; Martínez et al., 2008), illetve TaqMan rendszereket alkalmazó valós idejű, real-time PCR módszereket dolgoztak ki, melyek alkalmasak mindkét genotípusú PRRSV törzsek kimutatására (Egli et al., 2001; Wasilk et al., 2004; Kleiboecker et al., 2005; Lurchachaiwong et al., 2008). Ezen módszerek közül a SYBR Green alkalmazásán alapuló módszerek egyöntetű hátránya, hogy nem alkalmaznak próbát, így, mivel a kromofór molekula bármely duplaszálú DNS molekulához hozzákötődik, primer dimer, illetve aspecifikus termék képződése esetén is pozitív reakciót adhat. A jelölt próba hidrolízisén alapuló TaqMan® módszerek esetében fontos, hogy a vírusgenomhoz tökéletesen tapadjon a próba, ugyanis a tökéletlen próba-célterület illeszkedés (mismatch) esetén a próba nem hidrolizálódik, hanem eredeti formájában leválik a genomról. Ebben az esetben a quencher molekula a reporter közelében marad, ami jelentősen csökkentheti a rendszer érzékenységét (Bustin, 2000). Mivel a PRRSV az eddig ismert egyik legváltozékonyabb vírus, a célunk az volt, hogy egy olyan real-time módszert fejlesszünk ki, mely próba-célterület mismatch esetén is képes jelvesztés nélkül működni, és lehetőség szerint valamennyi törzs kimutatására, és mennyiségi meghatározására alkalmas.

Erre a célra Primer-Probe Energy Transfer (PriProET)-en alapuló eljárás mutatkozott a legígéretesebbnek. A módszer elméleti hátterét Theodor Förster (1948) dolgozta ki, miszerint egy donor kromofór molekula gerjesztett állapotában energiát képes átadni egy hozzá közel (<10nm távolságban) levő akceptor molekulának (fluorescence resonance energy transfer, vagy Förster resonance energy transfer: FRET). A módszer lényege, hogy az egyik primerhez tapadó kromofór megfelelő hullámhosszú fényel történő besugárzás hatására a közelében tapadó próba kromofórjának átadja energiáját, mely a rá jellemző hullámhosszon fog sugározni (7. ábra). A reakció akkor működik, ha a primer és a próba is képes tapadni a genomon, egymástól az adott távolságon belül, míg oldott állapotban nem kerülnek megfelelő közelségbe, energiaátadás nem történik. A kibocsátott, és általunk mért fény mennyisége arányos a reakcióelegyben eredetileg benne levő PRRSV kópiák mennyiségével. PriProET elven működő diagnosztikai módszereket írtak már le egyéb sertéseket érintő megbetegedések, a ragadós száj és körömfájás, a fertőző hólyagos szájgyulladás (Rasmussen et al., 2003; 2005), a sertések hólyagos betegsége (Hakhverdyan et al., 2006) és a Hepatitis E (Gyarmati et al., 2007) molekuláris diagnosztikájára.





7. ábra. A FRET sematikus ábrázolása: a FAM (6-karboxifluorszein) 470nm-es hullámhosszú fényel történő besugárzás hatására energiát ad át a TexasRed-nek, mely specifikus, 610nm hullámhosszú fényt fog sugározni.

### 3.6. A betegség elleni védekezés

A betegség elleni specifikus védekezéshez számos, kereskedelmi forgalomban kapható vakcina áll rendelkezésre. Sajnos ennél a vírusnál nem működik az általános vakcinakészítési megoldás, melynek során az általunk inaktivált, vagy attenuált a kórokozót tartalmazó oltóanyagot az állatnak beadva az adaptív immunrendszer hatására megfelelő védettség alakul ki, mely megakadályozza a vadvírussal történő fertőződést. Ennek a PRRSV esetében számos oka van. Az egyik ezek közül a vírustörzsek rendkívüli genetikai és antigénszerkezeti változékonysága. Kísérletes körülmények között bizonyították, hogy még a vakcinával azonos genotípusú, de eltérő alcsoportba tartozó vadvírussal történő ráfertőzés esetén is kisebb az attenuált vakcina hatékonysága a vakcina vad változatával történő ráfertőzéshez képest (Labarque et al., 2004). A másik fontos tényező a vírus immunmoduláns hatása. Korábban leírásra került, hogy miként „csapja be” a vírus a humorális immunrendszert („csali-epitóp”), illetve, hogy hogyan gyengíti és késlelteti a hatékony celluláris válasz kialakulását. Mindezek a hatások az élővírusos vakcinák esetében is megfigyelhetőek: a „csali-epitóp” a vírus szerkezeti sajátossága, míg a vakcinázás nyomán kialakuló hiányos celluláris választ kísérletesen bizonyították (Royae et al., 2004). Az élővírusos vakcinák másik hátránya, hogy mind horizontálisan, mind vertikálisan képesek terjedni az állományokban, valamint a nagy számú mutáció miatt gyors a genetikai változás és ezért, továbbá a vadvírustörzsekkel történő esetleges rekombináció folytán virulenciájukat részben, vagy teljesen visszanyerhetik (Bøtner et al., 1997; Nielsen et al., 2001; van Vugt et al., 2001, Balka et al., 2007).

Az inaktivált vakcinák biztonságosnak mondhatók, nem képesek revertálódni, rekombinálódni, ugyanakkor az általuk nyújtott védelem korlátozott, és PRRSV negatív állatokban ismételt alkalmazásuk sem idéz elő VN titeremelkedést, illetve PRRSV specifikus, interferon- $\gamma$  termelő T limfociták sem jelennek meg a vérben. Ennek következtében a ráfertőzést követően nem voltak képesek csökkenteni a vírustiterek sem a vérsavóban, sem a tüdőben a vakcinázatlan állatokhoz képest (Zuckermann et al., 2007). Ugyanakkor fertőzött telepeken eredményesen alkalmazhatóak a kocák PRRSV hatására leromlott szaporodásbiológiai mutatóinak javítására (Papatsiros et al., 2006).

Megfelelően hatékonyságú, pl. az Aujeszky-betegség esetében használt, törzskönyvezett marker vakcina PRRS esetében nem áll rendelkezésünkre, így a mentesítés leginkább a különböző korcsoportok szigorú elkülönítésével, illetve az állomány fokozatos cseréjével kísérhető meg. Kislétszámú állományon sikeresen alkalmazták ezt a módszert a kocák élővírusos vakcinával történő tömegoltásával kombinálva (Voglmayr et al. 2006).

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

#### 4.1.1. A PRRS magyarországi elterjedtségének meghatározása

A fertőzöttség elterjedtségének megállapításához a saját eredményeink mellett két másik, PRRS diagnosztikát végző intézet, a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (MgSZH, ÁDI budapesti, debreceni és kaposvári intézetei) és a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Üllői működő Kórbonctani Osztály adatait használtuk fel. Az MgSZH Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága nyilvántartott 1189 nagylétszámú sertéstartó telep közül kiválasztottuk azokat, melyek esetében az MgSZH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság információs rendszerének (ÁSZIR, Állategészségügyi Szakmai Információs Rendszer) összesített adatai alapján 2005. január 1. és 2008 október 31. között bármilyen (direkt, vagy indirekt) módszerrel PRRSV fertőzöttséget diagnosztizáltak. Ezeket az adatokat azután összehangoltuk az általunk, illetve a SZIE-ÁOTK Nagyállatklinikájának Kórbonctani Osztályán vezetett nyilvántartásokkal.

#### 4.1.2. Mintagyűjtés

Munkánk első részeként célzott mintagyűjtést végeztünk magyarországi nagylétszámú sertéstelepeken. Olyan telepeket választottunk, melyek korábban elvégzett szerológiai vizsgálatok alapján már bizonyítottan PRRS pozitívak voltak, illetve ahol a betegségre jellemző szaporodásbiológiai zavarok, megemelkedett szopóskori mortalitás, vagy fiatal állatokat érintő légzőszervi tünetek léptek fel. Vérsavó mintákat gyűjtöttünk a betegség tüneteit mutató kocákból, malacokból, továbbá tüdő, hörgőkörüli nyirokcsomó, illetve tonsilla mintákat az elhullott állatokból és a vetélt magzatokból. Emellett, ahol lehetőségünk volt, megvizsgáltuk az adott sertéstartó telepen tartott tenyészkatok ondomintáit is.

Munkánk második felében sor került Szerbiából származó, légzőszervi tüneteket mutató sertésállományokból gyűjtött vérsavóminták vizsgálatára is, melyeket dr. Becskei Zsolt a szabadkai Állategészségügyi Intézet Patológiai osztályának munkatársa bocsátott a rendelkezésünkre. Ezek a telepeken (egy kivétellel) PRRS jelenlétének kimutatására irányuló szerológiai vizsgálatok korábban nem történtek, annak ellenére, hogy az állományokban a fiatal állatokban megfigyelt légzőszervi tünetek mellett a betegségre szintén jellemző vetélés, koraellés, szopóskori mortalitás megfigyelhető volt.

#### 4.1.3. ELISA

Amennyiben az adott telepről nagy számú ( $n > 10$ ) savómintát gyűjtöttünk, illetve kaptunk vizsgálatra, első lépésben azok PRRSV-specifikus ellenanyagtartalmát határoztuk meg. Ehhez indirekt ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) módszeren alapuló, kereskedelmi forgalomban kapható tesztet használtunk (HerdCheck PRRS 2XR, IDEXX, Österbybruk, Svédország). A vérmintákat a laboratóriumba kerülésüket követően rövid időre  $37^{\circ}\text{C}$ -os termosztátba tettük a véralvadási folyamatok megfelelő körülményeinek biztosítása céljából, majd néhány órán át tartó  $4^{\circ}\text{C}$ -on hűtőszekrényben történő tárolást követően  $300\times$  g gyorsulással 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a vérsavót pipettával óvatosan eltávolítottuk, és felhasználásig a későbbi esetleges polimeráz láncreakciós vizsgálat miatt az RNS stabilitásának megőrzése céljából  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az ELISA vizsgálatokat a gyártó utasításainak megfelelően az alábbiak szerint végeztük. A savómintákat a kit-ben található, erre a célra kifejlesztett oldattal 1:40 (v/v) arányban hígítottuk, majd az így kapott savó-oldatból 100-100 $\mu\text{l}$ -t mértünk a 96 lyukú lemez megfelelő helyeire. Minden mintát két, egymás melletti lyukba mértünk, melyek közül az egyik aljára rekombináns PRRSV nukleokapszid fehérjét kötöttek, míg a másik lyukban nem gazdasejt eredetű fehérjék voltak (NHC, non-host cell) negatív kontrollként. Fél órán át tartó, szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a lyukakból a savóoldatokat eltávolítottuk, a lemezt a gyártó által biztosított mosófolyadékkal  $3\times$  mostuk, majd 100-100 $\mu\text{l}$ -nyi, tormaperoxidázzal konjugált anti-sertés ellenanyagot mértünk a lyukakba. Ismételt fél óras, szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a szekunder ellenanyagot is eltávolítottuk, majd újabb  $3\times$ -os mosást követően 100-100 $\mu\text{l}$ -nyi tetrametil-benzidin tartalmú szubsztrátoldatot mértünk a lyukakba. 15 percig tartó inkubációt követően 100-100 $\mu\text{l}$ -t mértünk a lyukakba a reakciót leállító folyadékból. Ezután a lemezeket Multiscan Ms reader leolvasó készülékbe helyeztük (Labsystems Oy, Helsinki, Finnország), és a fényelnyelési (optical density, OD) értékeket 610 nm hullámhosszon mértük. Az így kapott értékekből (valamennyi minta esetében) kivontuk az NHC lyukak értékeit, majd ezt a számot elosztva a pozitív kontrollokból hasonlóan számolt értékekkel, megkaptuk a minták S/P (sample/positive) értékeit. Azokat a mintákat, melyeknél ez az érték 0,4 vagy annál nagyobb volt, pozitívként bíráltuk el. Az ELISA eredmények értékelésével kiválasztottuk azokat a mintákat, melyek esetében a legmagasabb S/P értékeket kaptunk, ugyanis irodalmi adatok (Johnson et al., 2004), és saját tapasztalataink is azt mutatják, hogy az általunk használt tesztel mérhető

ellenanyagok kulminálódásakor még nagy mennyiségű vírus RNS található az állatok vérsavójában.

#### 4.1.4. A minták feldolgozása, RNS kivonás

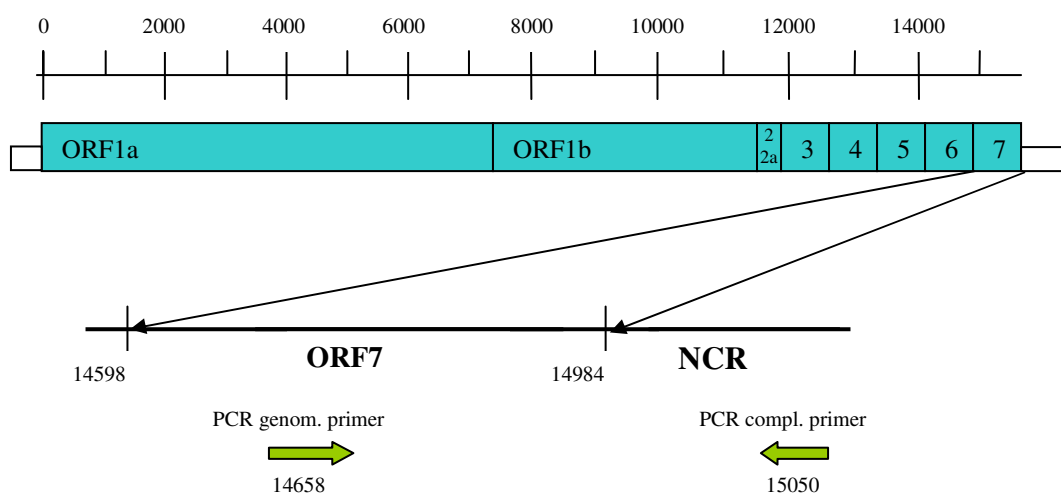
A szövetmintákat (nyirokcsomó, mandula, tüdő) steril PBS pufferoldatban (10%, w/w) homogenizáltuk, majd a sejtes tartalom leüleptése céljából 5000× g gyorsulással 5 percig centrifugáltuk. Az így keletkezett felülúszóból, illetve a savó- és ondómintákból vontuk ki az RNS-t QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével. A módszer során a vizsgálati minták felülúszóját, illetve a savómintákat hordozó RNS-t (carrier RNA) és kaotropikus sóoldatot tartalmazó lízispufferrel tártuk fel, majd alkoholos kicsapást követően szilikagél membránra adszorbeáltuk. Két centrifugálással (6000× g 1 percig és 20000× g 3 percig szobahőmérsékleten) etanol tartalmú mosófolyadékokkal tisztítottuk a membránhoz kötött RNS-t, majd 0,04% Na-azid tartalmú eluáló pufferrel és centrifugálással (6000× g 1 percig, szobahőmérsékleten) leoldottuk a membránról a minta RNS tartalmát. Az így kivont RNS mintákat -80°C-ra fagyasztva tároltuk, a nukleinsav lebomlásának megakadályozása, illetve késleltetése céljából.

#### 4.1.5. Primerek

A minták diagnosztikai és filogenetikai vizsgálatára a primerpárokat Primer Designer 4 for Windows 95, version 4.1 SciEdCentral (Scientific and Educational Software) segítségével terveztünk. Ehhez mindkét genotípusba tartozó teljes, illetve részleges PRRSV szekvenciákat töltöttünk le a génbankból (GenBank, Bethesda, U.S.A, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). A szekvenciákat a szoftver segítségével egymáshoz illesztettük, és az így kapott illesztés részletes vizsgálatával konzervatív területeket kerestünk a különböző genomokon.

A diagnosztikai célokra tervezett primerpárok esetében a tervezéskor a fő szempont az volt, hogy lehetőleg olyan génterületet válasszunk, mely a leginkább konzervatív. Erre a célra az ORF7-en és a genom 3' végén lévő nem kódoló génszakaszon (non coding region, NCR) találtunk megfelelő primertapadási helyeket (8. ábra). A genomikus primer esetében egy nukleotid-degenerációt is beépítettünk, hogy a rendszer képes legyen valamennyi vírustörzs kimutatására. A 1. táblázaton látható, hogy az amplifikáció során kapott termék 35 nukleotiddal hosszabb az amerikai genotípusú törzsek esetében. Annak ellenére, hogy az ORF7 hossza az amerikai törzseknél 369, míg az európai genotípusú, 1-es szubtypusú törzsek esetében 384 nukleotid hosszúságú,

a szekvencia-illesztések alapján a diagnosztikai primerpár tapadási helyei között összesen 35-tel több nukleotid található az amerikai törzsekben.



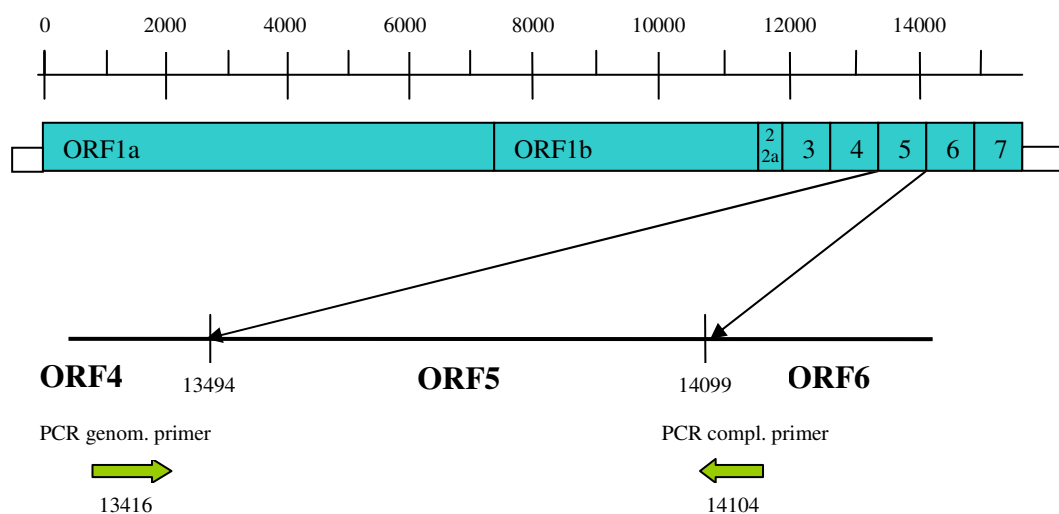
8. ábra: A diagnosztikai primerek helyeződését a Lelystad víruson szemléltető ábra.

1. táblázat: A vizsgálatok során használt diagnosztikai primerek. (\* A primerek pozíciója dőlt betűvel az európai (Lelystad vírus, akcessziós szám: M96262), vastagított betűtípussal az amerikai (VR-2332, akcessziós szám: NC\_001961) referens törzsön való tapadási helyet mutatja. Az ampliconhosszok esetében is ezt a jelölést alkalmaztuk.)

Név	Helyeződés	Írány	Szekvencia: (5'-3')	Pozíció*	Amplicon hossza
PRRS1	ORF7	genom.	CAG CCA GTC AAT CAR CTG TG	<i>14658-14677</i>	393
				<b>14937-14956</b>	
PRRS2	3' NTR	compl.	TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG	<i>15031-15050</i>	428
				<b>15345-15364</b>	

A filogenetikai vizsgálatok során azon génszakasz szekvenciájának meghatározását tűztük ki célul, mely a legnagyobb diverzitást mutatja. A PRRSV esetében ehhez a GP5-ös glikoproteint kódoló ORF5-ös génszakasz a legmegfelelőbb. Ez a virion felszínén megtalálható fehérje (ha késleltetve is) vírusneutralizáló hatású ellenanyagok termelődését indukálja, és a leginkább variábilis része a genomnak. Mivel ez a génszakasz változik a leggyorsabban, rokonsági viszonyok feltárására, illetve járványtani nyomozások során ennek a vizsgálata a leginkább célravezető. Fontos szempont továbbá, hogy a nemzetközi adatbázisban (GenBank) erről a szakasról található a legtöbb információ. Primereinket úgy választottuk ki, hogy az ORF4

terminális szakaszára, illetve az ORF6 kezdeti szakaszára tapadjanak, így az amplikon magába foglalja a teljes ORF5-öt (9.ábra, 2. táblázat). Mivel ezek már sokkal kevésbé konzervatív területek, külön primer párt kellett tervezni mindkét genotípushoz.



9. ábra: A filogenetikai primerek helyeződését a Lelystad víruson szemléltető ábra 2. táblázat. A filogenetikai vizsgálatokhoz használt primerek. (\*A primerek pozíciója dőlt betűvel az európai (Lelystad vírus, akcessziós szám: M96262), vastagított betűtípussal az amerikai (VR-2332, akcessziós szám: NC\_001961) referens törzsön való tapadási helyet mutatja.)

Név	Helyeződés	Írány	Szekvencia: (5'-3')	Pozíció*	Amplikon hossza
PRRS3	ORF4	genom.	GTT GCT SCA TTT CMT GAC AC	<b>13416-13435</b>	<b>689</b>
PRRS4	ORF6	compl.	ATC GTC TAG GCC TCC CAT TG	<b>14085-14104</b>	
PRRS5	ORF4	genom.	ACC ATG AGG TGG GCA ACT GT	<i>13721-13740</i>	<i>699</i>
PRRS6	ORF6	compl.	TGG AGC CGT GCT ATC ATG AC	<i>14400-14419</i>	

#### 4.1.6. RT-PCR

A reverz transzkripciót, illetve az azt követő amplifikációt egy lépésben, 25µl-es reakciókeverékben végeztük QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával, a gyártó utasításainak figyelembevételével. A 25µl reakcióelegy 5µl puffert, 0,4 mM dezoxinukleozid trifoszfátot (dNTP), 10U RNase Inhibitor (Fermentas, Vilnius, Litvánia), 0,8µM PRRSV specifikus primereket, 1µl emzim mixet (Omniscript és Sensiscript reverz transzkriptázt valamint HotStarTaq DNS polimerázt tartalmaz) és 2,5µl RNS templátot tartalmaz. Az RT-PCR program első lépése az 50°C-on 30 percen át tartó reverz transzkripció, majd egy 95°C-on 15 perces denaturáció és a DNS polimeráz aktiválása. Ezt követően 35-ször ismételtük az alábbi lépéseket: 95°C/40s

(denaturáció), 52°C/50s (primer tapadás, annealing), 72°C/60s (láncszintézis, extenzió). A folyamatot 72°C/10min szakasz, a végső láncszintézis zárta le.

#### *4.1.7. A PCR reakció eredményének láthatóvá tétele (vizualizáció)*

Az RT-PCR reakciót követően 7,5µl terméket, 1,5µl 6× Orange DNA Loading Dye-al (Fermentas, Vilnius, Litvánia) összekeverve 0,5µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, TBE pufferben oldott, 1,5%-os agaróz gélben (SeaKem® FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) elektroforetizáltunk. Az alkalmazott feszültség 8V/cm volt 45 percen át. Az agargélt ezt követően 302nm hullámhosszú ultraibolya (UV) fény átvilágítással vizsgáltuk (AITM-26 transzilluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA), majd Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System és a hozzá kapcsolódó Kodak Digital Science 1D program segítségével rögzítettük és tároltuk. A termékek méretét 50bp DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Litvánia) marker segítségével határoztuk meg. A különböző primerpárokat elsőként ismert szekvenciájú PRRSV törzset tartalmazó vakcinákon teszteltük. Ehhez az európai attenuált vírustörzset tartalmazó Porcilis® PRRS (Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Hollandia), illetve az amerikai attenuált törzset tartalmazó Ingelvac MLV® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Németország) használtuk, míg negatív kontrollként RNS mentes reakcióelegy szolgált.

#### *4.1.8. Szekvencia meghatározás, és filogenetikai vizsgálatok*

A diagnosztikai primerekkel kapott termékeket szekvencia-analízisnek vetettük alá az első vizsgált mintákon annak érdekében, hogy kizárjuk az esetleges műtermékek jelenlétét és ellenőrizhessük, hogy az általunk talált szakaszok valóban a keresett vírus genomjának részletei-e. Ezt követően a diagnosztikai primerekkel pozitívnak bizonyult mintákon az ORF5 amplifikációját is elvégeztük filogenetikai vizsgálatok céljából. Az így kapott termékeket (amplikonokat) TBE pufferben oldott, 0,5µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 0,8%-os, alacsony olvadáspotú agarózgélben (Standard Low-m, Agarose Gel, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) elektroforetizáltuk 8V/cm feszültség mellett 2 órán át. Az amplikon helyzetét rövid idejű 302nm-es UV átvilágítással (AITM-26 transzilluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk, majd az amplikont tartalmazó géldarabot kivágtuk a gélből és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) segítségével kivontuk belőle a DNS-t. A termékek két irányú, direkt szekvenálását fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidos szálépítésen alapuló szekvenáló reakció módszerével, ABI PRISM 3100 automata készülékkel, a Magyar



Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutató Központjában, illetve a Kar Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézetének Állattenyésztési és genetikai osztályán végeztettük el. A szekvenáláshoz használt primerek azonosak voltak az általunk az RT-PCR reakcióban használtakkal. Első lépésként az elektroforetogramokat Chromas 2. szoftverrel jelenítettük meg, és a két irányú szekvenálás eredményeként kapott szekvenciaadatokat egymással, illetve a génbanki referens törzs azonos részletével hasonlítottuk össze. Az esetleges eltéréseket, hibás hullámértelmezéseket javítottuk, majd az így kapott szekvenciákat a BLAST (NCBI, Bethesda, USA) program segítségével azonosítottuk. A szekvenciák illesztéséhez az Align Plus 4 for Windows 95, version 4.0. SciEdCentral (Scientific and Educational Software) programot használtuk, majd a filogenetikai törzsfák készítéshez neighbour-joining módszert használtunk Clustal X 1.81 programot, IUB DNS súlyozási mátrixszal, 0,5-ös tranzíciós aránnyal.

A bootstrap mintázást 1000 megismételt törzsfák rekonstrukció adatai alapján szintén a Clustal X 1.81. alkalmazásával kaptuk meg. Ezzel a módszerrel a törzsfák mintázatának a megbízhatóságát ellenőriztük. A filogenetikai törzsfák megjelenítéséhez és szerkesztéséhez a TreeView version 1.6.6 számítógép programot használtuk.

A GP5 fehérje glikozilációs helyeinek feltérképezéséhez a NetNGlyc 1.0 Server szoftvert ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) használtuk.

## **4.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból**

### *4.2.1. Primer és próba tervezés*

A primerek, illetve a próba tervezéséhez első lépésként 235 teljes, illetve részleges PRRSV szekvenciát töltöttünk le a génbankból (GenBank, Bethesda, USA). A letöltendő szekvenciák kiválasztásakor elsődleges szempont volt, hogy valamennyi fontosabb PRRSV törzs az illesztés részét képezze, beleértve valamennyi európai szubtypust, illetve az amerikai genotípusú törzsek jelentős részét, különös tekintettel a nemrégiben megjelent magas pathogenitású kínai törzsekre. Ezeket első lépésként az Align Plus 4 for Windows 95, version 4.0. SciEdCentral (Scientific and Educational Software) program segítségével egymáshoz illesztettük. A nukleotid illesztést részletesen átvizsgáltuk, melynek során a vírusgenom 3' végénél található ORF6, illetve ORF7 szakaszokat találtuk a leginkább konzervatívnak. A következő lépésben az

illesztést úgy módosítottuk, hogy az csak az ORF6 és ORF7 szakaszokat tartalmazza, így könnyebbé vált azok tanulmányozása. Ennek a kicsivel több, mint 1000 nukleotid hosszúságú illesztésnek a részletes vizsgálatával három olyan szakaszt azonosítottunk, melyek alkalmasnak bizonyultak a PriProET-hez. A forward primer helyét az ORF6 3' végén a reverz primer, illetve a próba helyét pedig a szomszédos ORF7 kezdeti szakaszán határoztuk meg. Ezen belül a próba 3' és a reverz primer 5' tapadási helyei között egy nukleotidnyi távolság van. Erre azért volt szükség, hogy a FRET alapú energiaátadáshoz megfelelő közelségbe kerüljön a donor, és az akceptor kromofór molekula, melyek között jelen esetben a reverz primert alkotó 21 nukleotidon kívül még egy nukleotid, azaz összesen 22 nukleotidnyi távolság van. Az illesztések vizsgálatával az is nyilvánvalóvá vált, hogy a primerek tapadási helyeinek megfelelő nukleotidszakaszok sem teljesen konzervatívak a különböző PRRSV törzsek esetében. Ezért, annak érdekében, hogy primereink minden, a nemzetközi adatbázisban fellelhető szekvenciához képesek legyenek tapadni, mindkettő esetében 4-4 degenerált nukleotidot építettünk be. A próba esetében a rendszer egyik legfontosabb tulajdonsága miatt erre nem volt szükség (képes próba-célterület mismatch esetén is működni) (3. táblázat).

A próbát a világon elsőként izolált PRRSV törzs, a Lelystad vírus génbanki szekvenciájára terveztük, ennek genomja esetében biztosan megvalósul a tökéletes, mismatch nélküli próba illeszkedés. A rendszer működésének, kimutathatósági spektrumának vizsgálatához a Lelystad víruson kívül három, egymástól nagy genetikai távolságra levő törzset választottunk. Ezek génbanki (illetve ellenőrzésképpen általunk is meghatározott) nukleotidszekvenciái alapján az európai 3-as szubtípusú fehéróroszországi, Soz-8 törzs esetében egy, az amerikai P129 törzs esetében négy, az amerikai Ingelvac MLV® vakcinatörzs esetében pedig öt mismatch figyelhető meg a próbának megfelelő területen. Az amplikonok hossza az európai törzsek esetében, a Lelystad víruson számítva 147 nukleotid, az amerikai törzsek esetében az Ingelvac MLV®-n számítva 136 nukleotid hosszúságú.

A fluoreszcens jel intenzitásának növelése céljából az oligonukleotidok tapadási helyén túlnyúló timin (T) nukleotidot (overhang) építettünk be a kromofór molekula tapadási végéhez. A primerek és a próba helyeződését egy 11 európai (litvániai és fehéróroszországi törzseket is beleértve), illetve 11 amerikai genotípusú (köztük magas patogenitású kínai, illetve amerikai genotípusú magyar törzs is) szekvenciából készített illesztésen szemlélteti a 10. ábra.

PriProET rendszerünkhöz donor kromofórnak FAM-ot (6-karboxifluoreszcein) választottunk, a reverz primer 5' végéhez illesztve, akceptor kromofórnak pedig a próba 3' végéhez kapcsolt Texas Red-et használtunk.

3. táblázat. A táblázat a PriProET reakciók során felhasznált oligonukleotidok szekvenciáit mutatja.

Név	Helyeződés	Irány	Szekvencia 5'-3'
Primer 1.	ORF6	Genom.	AGCCTCGTGYTGGGYGGCARRA
Primer 2.	ORF7	Compl.	(FAM)-T-CAGCAWYTGRCACAGYTGAT
Próba	ORF7	Genom.	TCCGATGGGGAATGGCCAGCCAGTC-T-(TxR)
Primer 4.	ORF6	Genom.	<b>TAATACGACTCACTATAGGGA-</b> GCCTCGTGCTGGGCGGCAAA*
Primer 5.	ORF7	Genom.	TCAGCAWYTGRCACAGYTGAT

\* A vastag betűvel jelölt szakasz az 1-es primer 5' végéhez illesztett specifikus nukleotidszakasz, melyet a T7 enzim képes felismerni, és onnan indítja DNS→RNS átírást (T7 promóter).

	LV:14540 VR2332:14832		LV:14642 VR2332:14924		LV:14684 VR2332:14964
	↓ Primer 1	ORF7	↓ ↓	Próba	Primer 2 ↓
AY588319*	agcctcgtgctggcgcaaacgagctgtaaacgaggagtggtaacctcgtaagtatggccggtaaaaaccagagccagaagaaaagaaaagtacagctccgatggggaatggccagccagtc			caatcaactgtgccagttgctg	
AF511526	.....			.....	.....
AY366525	.....	a		a	.....
AJ223078	t	.....	g	ac	t
AY035944	t	.....	g	ac	t
DQ324712	.....	t	g	a	.....
DQ324698	.....	t	g	a	.....
AF438362	.....	g	c	a	a
DQ324720*	.....	g	c	gtc	g
DQ324699	.....	c	gtc	c	ac
DQ324709	.....	t	c	c	g
HU12	.....	a	c	aaa	c
AY150564	t	g	aa	ag	a
DQ988080	t	g	aa	ag	a
AF159149*	t	g	aa	ag	a
AF494042*	t	g	aa	ag	a
PPSKS1A	t	g	aa	ag	a
AY585241	t	g	aa	ag	a
AF331831	t	g	aa	ag	a
AY612613	t	g	aa	ag	a
AF046869	t	g	aa	g	ag
AF299415	t	g	aa	g	ag

10. ábra. Az ábra európai, illetve amerikai genotípusú törzseken szemlélteti a primerek, illetve a próba tapadási helyeit. A csillaggal (\*) és szürke háttérrel jelölt szekvenciákat használtuk fel a rendszer beállításakor. Az üresen hagyott területek esetében nem állnak rendelkezésre szekvenciaadatok.

#### *4.2.2. A vizsgálatokhoz felhasznált PRRSV törzsek*

A PriProET rendszerünk kifejlesztésekor a legfontosabb szempont az volt, hogy az képes legyen valamennyi PRRSV törzs kimutatására. Ennek érdekében mind a detektálási limit, mind a standard görbék felállításakor egymástól filogenetikailag távol álló vírustörzset, illetve azokból készített RNS-t használtunk. A standard görbék felállításához az 1-es típusú (európai), azon belül az 1-es szubtypusba tartozó prototípus vírustörzset, a Lelystad vírust (akcessziós szám: M96262), valamint a 2-es típusú (amerikai) prototípus vírustörzsből készített, azzal genetikailag nagyon közeli rokonságot mutató élővakcina vírustörzset (Ingelvac MLV® PRRS, Boehringer, Ingelheim, Németország, akcessziós szám: AF159149) használtuk. A rendszer érzékenységének meghatározásához, illetve a kimutatható legkisebb RNS kópiaszám meghatározásához ezen kívül felhasználtunk még egy Dr. Tomasz Stadejek által rendelkezésünkre bocsátott 3-as szubtypusba tartozó, Fehéroroszországból származó, Soz-8 nevű vírustörzset (akcessziós szám: DQ324720). A még kimutatható legkisebb infektív titerű vírusrészegység meghatározásához a Lelystad vírust, illetve egy 2-es típusú vírustörzset, a P129-es izolátumot használtuk fel (akcessziós szám: AF494042). Egy általunk izolált, magyar vírustörzssel (HU17, akcessziós szám: DQ3666355) pedig kísérletesen fertőztünk PRRS negatív állatokat annak érdekében, hogy a naponta vett klinikai vérsavómintákon végigkövethessük a vírus RNS kópiaszámának kinetikáját, továbbá hogy a 8. napon leölt állatok egyes szerveinek vírustartalmát a módszerrel meghatározhatjuk.

#### *4.2.3. A vírusok szaporítása, a vírusszaporodás ellenőrzése*

Az izolátumok szaporítását sertés eredetű alveolaris makrofág sejtenyészeten, Wensvoort (1991) módszere szerint végeztük, az alábbiak szerint. Klinikailag egészséges, PRRS mentes állományból származó, 6 hetesnél fiatalabb malacok tüdejét az állatok elvéreztetése után azonnal, steril körülmények között 4× átmostuk antibiotikumokat és antimikotikumot (200000IU penicillin, 200mg streptomycin és 100mg mycostatin) tartalmazó, 200ml ösztérfogatú PBS-ben. Ezt követően a sejsztuszpenziót 10 percig, 4°C-on, 5000× g gyorsulással centrifugáltuk, majd az alveoláris makrofág sejteket (pulmonary alveolar macrophag, PAM) tartalmazó üledéket további két alkalommal mostuk a fent leírt mosófolyadékkal. Az üledékben lévő sejteket 10% kolosztrummentes borjúsavót tartalmazó tápfolyadékba (Eagle minimum essential medium: EMEM, Sigma, St. Louis, USA) vettük fel és a felhasználásig  $2 \times 10^7$  sejt/ml mennyiségben, -80°C-on tároltuk. Minden alkalommal 5ml

$2 \times 10^5$  sejt/ml-re hígított PAM sejtet a tüdőből való kinyerés után azonnal teszteltük egyrészt a PRRS vírus iránti érzékenységre, másrészt a PRRS vírus jelenlétére. A sejtek PRRSV fertőzöttségét a korábbiakban már ismertetett RT-PCR módszerrel zártuk ki. Az érzékenység vizsgálatakor ismert titerű PRRS vírustól 10-es alapú hígítási sort készítettünk, majd ezt 96 lyukú, PAM sejteket tartalmazó sejtenyésző lemezre (Greiner; Frickenhausen, Németország) mértük. Két napos inkubáció után megvizsgáltuk a sejteket sejtkárosító hatások jelenlétére, majd a felülúszó eltávolítása után szobahőmérsékleten 4%-os, PBS-ben oldott paraformaldehiddel 10 percig fixáltuk, és rajtuk peroxidáz festéssel történő vírusantigén kimutatást végeztünk. A fixált sejteket 0,05% Tween 20 tartalmú PBS-sel (PBST)  $7 \times$  mostuk, majd 1:100 hígítású európai és amerikai PRRS vírus ellen termelt immunsavók 1:1 arányú keverékét (Medveczky et al., 2001) pipettáztuk a sejtekre. Az inkubációs idő  $37^\circ\text{C}$ -on 1 óráig tartott. A lemezek mosása után, a sejtekhez vájatonként  $50 \mu\text{l}$  mennyiségben, torma-peroxidázzal (horse radish peroxydase: HRPO) jelzett, nyúlban termelt anti-sertés IgG konjugátumot (DAKO, Dánia) adtunk, majd a lemezeket  $37^\circ\text{C}$ -on 1 óráig inkubáltuk. Újabb PBST-vel történő lemezmosás után  $50 \mu\text{l}$  szubsztrát oldatot (5 pH-jú,  $200 \mu\text{g}$  9-amino-3-etilkarbazol/ml és 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t tartalmazó, 200mM nátrium-acetát puffer) mértünk be a lyukakba. A reakciót 5 perc után úgy állítottuk le, hogy a szubsztrátot kicseréltük  $300 \mu\text{l}$  desztillált vízre. A PAM sejteket megfelelően érzékenynek tekintettük, ha a fertőzött sejtek citoplazmája, a kontrollként alkalmazott PRRS vírus ismert titeréig barnás-vörösre színeződött, ellentétben a sejt kontrollal, mely elszíneződést nem mutatott.

Amennyiben a sejtek fogékonynak bizonyultak a vírus iránt, illetve PRRSV mentesek voltak, további felhasználásig kryoprotektív hatású, 10% DMSO (dimetil-szulfoxid) oldatot a sejtekhez adva,  $2 \times 10^7$  sejt/ml koncentrációban  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk őket.

#### 4.2.4. A PriProET RT-PCR paraméterek beállítása

A reakcióparaméterek (primer-próba koncentráció, forward/reverse primer arány, annealing hőmérséklet, olvadáspont analízis) optimalizálása során a célunk az volt, hogy minél magasabb fluoreszcens jelet, illetve minél alacsonyabb küszöbérték ciklusszámot (treshold cycle,  $C_t$ ) kapjunk. A reakciókat Corbett Research Rotor-Gene Real Time Amplification készülékben (RG-6000, Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) hajtottuk végre. A már ismertetett kritériumok figyelembevételével ugyanazokon a mintákon elvégzett számos próbareakció eredményeként azt

tapasztaltunk, hogy a ún. aszimmetrikus PCR működik a leghatékonyabban. Ez úgy érhető el, hogy a jelölt reverz primerből, a jelöletlen forwardhoz képest négyszeres mennyiséget tartalmaz a reakcióelegy. Ennek során a reverz irányú láncépítés négyszer nagyobb valószínűséggel fog bekövetkezni, mint a forward irányú, így, mivel a jelölt próba közvetlenül a reverz primer mellé tapad (PRRSV RNS jelenlétében) nagyobb számban fog bekövetkezni FRET, illetve fénykibocsátás. Ennek megfelelően a próba mennyiségének titrálós módszerrel történő meghatározásával az optimális próbamennyiség megegyezik a reverz primer mennyiségével.

A reakcióhoz TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit-et (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) használtunk. Ez a rendszer a reverz transzkripció lépéshez nagy tisztaságú SMART™ MMLV (Moloney murine leukaemia virus, egérleukémia vírus) Reverse Transcriptase enzimet, a láncépítéshez pedig olyan *Taq* (*Thermus aquaticus* eredetű) polimeráz enzimet tartalmaz, melynek N-terminálisán rekombináns technikákkal olyan módosításokat hajtottak végre, aminek következtében elvesztette 5'→3' irányú exonukleáz aktivitását. További irányított pontmutációk következtében az enzim nagyobb érzékenységre tett szert, illetve képes az optimálistól eltérő MgCl<sub>2</sub> koncentráció esetén is működni. Az exonukleáz aktivitás kiesése miatt a láncszintézis során az amplikonra tapadt próba a TaqMan rendszerekkel ellentétben nem hidrolizálódik, eredeti helyén marad. Számos próbareakció eredményeként, illetve más kutatók tapasztalatainak figyelembevételével (Mikhail Hakhverdyan, National Veterinary Institute, Uppsala, személyes közlés) a nagyobb fluoreszcens jel elérése érdekében a gyártó utasításaival ellentétben néhány, a PCR reakcióhoz nem elengedhetetlen komponenst kihagytunk a reakcióelegyből (Thermostabilizing Reagent, GC-Melt™, Oligo (dT) Primer), és vízzel helyettesítettünk őket. A reakcióelegy pontos összetétele a 4. táblázatban látható.

4. táblázat. A táblázat a PriProET-hez használt reakcióelegy összetételét mutatja.

10X One step buffer	10µl
50X dNTP mix	1,6µl
50X Titanium Taq RT enzyme mix	1,6µl
Recombinant RNase inhibitor	1,6µl
Forward primer	1µl
Reverse primer	1µl
Próba	1µl
RNS templát	2µl
H <sub>2</sub> O	0,2µl

A reakcióparaméterek a következők voltak: reverz transzkripció: 50°C egy órán át, ezt 5 percig tartó 95°C-os denaturáció, majd 50 cikluson keresztül az alábbi lépések követték: denaturáció 94°C 15s, primer tapadás 55°C 30s, láncszintézis 72°C 20s. A reakciók befejeztével minden alkalommal meghatároztuk a termék olvadáspontját (melting temperature,  $T_m$ ). Ehhez egy kezdeti 95°C-os 1 percig tartó fázis után 50°C-tól 90°C-ig emelkedett a hőmérséklet lépésenként 1°C-al úgy, hogy minden lépés 5s-ig tartott. A fluoreszcens jelet minden ciklus után a primer és a próba tapadása során, illetve a teljes olvadáspont vizsgálat alatt mértük. A megvilágításhoz használt fény hullámhossza 470nm volt, míg a kibocsátott fényt 610nm-en mértük. A hullámhossz értékek az általunk használt fluoreszcens festékekre jellemző értékek voltak: a FAM 470nm-es hullámhosszú fénybesugárzás hatására gerjesztett állapotba kerül, melynek során energiát ad át a közelébe tapadó Texas Red festéknek. Ez utóbbi az energiaátadás hatására 610nm-es hullámhosszú fényt bocsát ki.

#### *4.2.5. A rendszer specificitásának és érzékenységének meghatározása*

A PriProET rendszerünk érzékenységének meghatározásához első lépésként ismert templát RNS kópiaszámú oldatokat kellett készítenünk a már említett Lelystad vírusból, az Ingelvac MLV® vakcinatörzsből, illetve a Soz-8 törzsből. Ehhez bakteriofág eredetű RNS polimeráz enzimet tartalmazó MEGAscript® T7 Kit-et (Ambion, Austin, TX, USA) használtuk fel. Első lépésként konvencionális RT-PCR reakciót végeztünk a három vírustörzsből kivont RNS-ekkel Qiagen One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) felhasználásával a korábban már ismertetett diagnosztikai reakció beállításait felhasználva. A reakció során a PriProET-hez tervezett primereket használtuk fel, azokat annyiban módosítva, hogy a forward primer esetében annak 5' végéhez, a gyártó által megadott specifikus nukleotidszakaszt (T7 promóter) illesztettünk, a reverz primert pedig kromofór molekula nélkül használtuk. A forward primer módosítására azért volt szükség, mert az enzim csak ezt a promóter jellegű nukleotidszakaszt felismerve képes az DNS→RNS átírást 5'→3' irányban megkezdeni. A reakció során kapott amplikont alacsony olvadáspotú agarózgélben (Standard Low-m<sub>r</sub> Agarose Gel, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) elektroforetizáltuk 8V/cm feszültség mellett 2 órán át, majd az amplikont tartalmazó géldarabot kivágtuk a gélből és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) segítségével kivontuk belőle a DNS-t. Az így kapott DNS mintákat a gyártó utasításai alapján adenzin-, guanozin-, citidin-, és uridin-trifoszfátot (ATP, GTP, CTP, UTP) tartalmazó oldattal, az enzim optimális működését biztosító Mg<sup>2+</sup> koncentrációjú pufferrel, illetve a T7 enzimmel



összekevertük, majd 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Mivel termékeink 147, illetve 136 nukleotid hosszúságúak csupán, a hosszabb termékeknél ajánlott 2-4 órás helyett, 16 órán keresztül inkubáltuk a reakcióelegyet, mivel ilyen rövid termékek esetén ugyanakkora mennyiségű RNS átíródásához több iniciációs lépésre van szükség.

A minták RNS koncentrációját ezután Nanodrop ND 1000 készülékkel (Wilmington, USA), UV spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Ezt követően a termékek molekulatömege alapján kiszámítottuk a minták RNS kópia tartalmát, majd a már ismert mennyiséget tartalmazó oldatokból 10-es alapú hígítási sort készítettünk  $10^{12}$ -től  $10^0$  RNA kópiaszám/μl mennyiségig RNáz mentes vízben. Valamennyi reakciót három párhuzamos mintán végeztük el.

A rendszer érzékenységét az általa kimutatott legalacsonyabb infektív titer tekintetében is meghatároztuk a Lelystad vírus, illetve a 2-es genotípusú P129-es vírustörzs felhasználásával. A vírustörzseket a korábban már ismertetett módon elszaporítottuk, és a  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml vírust tartalmazó sejtenyészet felülúszóból szintén 10-es alapú hígításokat készítettünk, melyekből a korábban már szintén ismertetett módon kivontuk az RNS-t QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével. Valamennyi reakciót három párhuzamos mintán végeztük el.

A rendszer specifikusságát a rendelkezésünkre álló magyarországi PRRSV törzsek segítségével határoztuk meg. Korábban már ismertetett módon agargél elektroforézissel győződünk meg az amplikonok megfelelő méretéről. Az esetleges keresztreakciók kizárására az alábbi, sertéseket megbetegítő vírusokat tartalmazó mintákon is elvégeztük a reakciót: 2-es típusú sertés circovírus, sertésinfluenza vírus (H3N2, és H1N1), klasszikus sertéspestis vírus, légzőszervi coronavírus, Aujeszky betegség vírusa, sertés parvovírus, sertés cytomegalovírus.

#### *4.2.6. Klinikai minták*

Ahhoz, hogy a rendszer klinikai mintákon való alkalmazhatóságát vizsgáljuk, 5 db 4 hetes, PRRSV negatív malacot fertőztünk orrlyukanként 2-2ml,  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml vírustartalmú sejtenyészet felülúszóval, mely a HU17-es jelzésű, Nyugat-Magyarországról származó vadvírus izolátumot tartalmazta. Ezt követően vérsavómintákat vettünk a malacoktól 7 napig naponta, majd a 8. napon az állatok kíméletes kiirtását követően azokat kórbonctani és kórszövettani vizsgálatoknak vetettük alá. Ezen kívül az utolsó napon a vérsavóminták mellett tüdő és tonsilla mintákat is vettünk azok PRRSV RNS tartalmának meghatározása céljából. Negatív kontrollként három állatot vírusmentes sejtenyészet-felülúszóval kezeltünk.

## 5. Eredmények

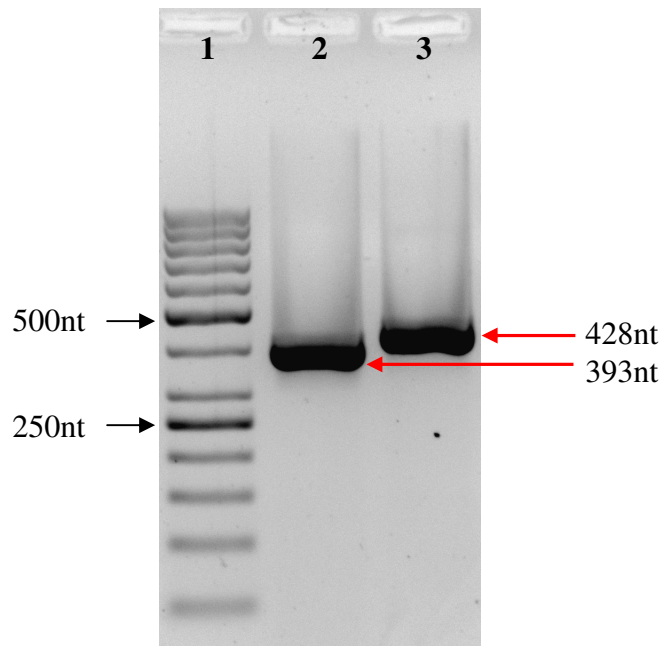
### 5.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

#### 5.1.1. A PRRS magyarországi elterjedtségének meghatározása

A három diagnosztikai intézet adatainak összesítésével azt kaptuk, hogy a hazai telepek kb. 10%-a fertőzött a vírussal. Ez csupán hozzávetőleges adat, mivel nincs rendeletben szabályozott diagnosztikai, illetve bejelentési kötelezettség. A pontos arány csak valamennyi nagylétszámú telepre nézve kötelező, összehangolt, lehetőleg államilag támogatott felmérő vizsgálat eredményei alapján lenne meghatározható.

#### 5.1.2. Primereink tesztelése

A diagnosztikai primerek tervezésekor alapvető cél volt, hogy azok mindkét genotípusba tartozó törzseket képesek legyenek kimutatni. A rendszer mindkét vakcina (Porcilis® PRRS, Ingelvac MLV®) esetében pozitív eredményt adott. A reakció után elvégzett gélelektroforézist követően egyértelműen látható volt a primerpár tervezésekor letöltött szekvenciák hossza közti különbségekből adódó 35 nukleotidnyi különbség (11. ábra). A termékeket kivágtuk a gélből szekvenciameghatározás céljából azért, hogy bizonyítsuk, hogy primerpárunk specifikus, vagyis PRRSV genomhoz tapadt. Az így kapott szekvenciák megegyeztek a vakcinatörzsek génbankban (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) letétbe helyezett szekvenciáinak nukleotidsorrendjével. Ezt követően az ORF5 génszakasz amplifikálásához tervezett 2-2 filogenetikai primerpárt teszteltük a megfelelő vakcinatörzseken. Mindkét primerpár pozitív reakciót adott a megfelelő genotípusú vakcina esetében, és a specifikus reakciót a szekvenciavizsgálat eredményei is megerősítették.



11. ábra. Az ábra egy európai (2), illetve egy amerikai (3) genotípusú vakcinatörzsön, a diagnosztikai primerpárunkkal elvégzett RT-PCR-t követő gélelektroforézis eredményét mutatja. (Az 1. pozícióban a molekulatömeg marker látható.)

#### 5.1.3. Diagnosztikai PCR vizsgálataink eredménye

Munkánk során a diagnosztikai eredmények alapján összesen 53 PRRS vírus ORF5 szekvenciavizsgálatát, illetve filogenetikai viszonyainak feltérképezését végeztük el. Közülük a 45 magyarországi szekvencia 25 különböző nagylétszámú sertéstelepről származik. Az általunk vizsgált minták jelölése, származási helye, a mintavétel időpontja, valamint a GenBank-i akcessziós száma az 5. táblázatban látható. A 6. táblázat a törzsfakészítés során, a nemzetközi adatbázisból letöltött szekvenciákat tartalmazza. A Szerbiából kapott minták vizsgálatával valamennyi vizsgált sertéstelepen igazoltuk a PRRSV jelenlétét. Ezekben az állományokban korábban nem történtek vizsgálatok a vírus direkt, vagy indirekt kimutatására. Összesen 8 különböző szerbiai sertéstelepről származó minta ORF5 szekvenciaanalízisét végeztük el. Valamennyi minta a Vajdaságból, Szerbia északi részéről származik. A magyarországi illetve a szerbiai minták területi eloszlását az országok vaktérképén a 12. ábra mutatja.

5. táblázat. A táblázat a munkánk során megvizsgált magyarországi, illetve szerbiai PRRSV szekvenciák adatait mutatja.

Név	Helység	Eredet	Mintagyűjtés/ feltöltés ideje	GenBank-i akc. szám
HU01	Hajdúszoboszló	vetélt magzat tüdeje	2003.06.20.	DQ3666339
HU02	Hajdúnánás	hízó sertés tüdeje	2003.10.20.	DQ3666340
HU03	Böhönye	választott malac mandulája	2004.10.20.	DQ3666341
HU04	Högyész	választott malac tüdeje	2003.10.13.	DQ3666342
HU05	Hajdúnánás	hízó sertés tüdeje	2004.07.30.	DQ3666343
HU06	Debrecen	hízó sertés tüdeje	2004.12.16.	DQ3666344
HU07	Debrecen	hízó sertés tüdeje	2005.02.15.	DQ3666345
HU08	Kaposvár	vetélt magzat tüdeje	2005.02.03.	DQ3666346
HU09	Hajdúszoboszló	vetélt magzat tüdeje	2005.02.17.	DQ3666347
HU10	Hajdúszoboszló	választott malac tüdeje	2005.02.26.	DQ3666348
HU11	Debrecen	vetélt magzat tüdeje	2005.04.06.	DQ3666349
HU12	Ács	választott malac savója	2005.05.11.	DQ3666350
HU13	Kéleshalom	szopós malac tüdeje	2004.10.25.	DQ3666351
HU14	Kéleshalom	kocásüldő savója	2004.10.25.	DQ3666352
HU15	Ebes	vetelő koca savója	2004.06.14.	DQ3666353
HU16	Kisbér	választott malac tüdeje	2004.26.11.	DQ3666354
HU17	Szil	választott malac savója	2005.03.10.	DQ3666355
HU18	Komárom	választott malac tüdeje	2004.12.02.	DQ3666356
HU19	Kéleshalom	választott malac tüdeje	2004.10.19.	DQ3666357
HU20	Kaposvár	választott malac tüdeje	2005.04.06.	DQ3666358
HU21	Küngös	hízó sertés tüdeje	2006.09.22.	EF406336
HU22	Hajdúszoboszló	vetélt magzat tüdeje	2003.09.11.	EF406337
HU23	Hajdúszoboszló	vetélt magzat tüdeje	2003.09.11.	EF406338
HU24	Hajdúszoboszló	vetélt magzat tüdeje	2003.09.18.	EF406339
HU25	Hajdúnánás	hízó sertés tüdeje	2003.10.20.	EF406340
HU26	Böhönye	vetélt magzat tüdeje	2004.10.15.	EF406341
HU27	Hajdúnánás	választott malac tüdeje	2004.07.30.	EF406342
HU28	Hajdúnánás	hízó sertés tüdeje	2004.09.15.	EF406343
HU29	Hajdúnánás	hízó sertés tüdeje	2004.09.15.	EF406344
HU30	Hajdúnánás	választott malac tüdeje	2004.10.22.	EF406345
HU31	Debrecen	hízó sertés tüdeje	2004.16.12.	EF406346
HU32	Hajdúszoboszló	hízó sertés tüdeje	2004.12.16.	EF406347
HU33	Tetétlen	hízó sertés tüdeje	2005.03.23.	EF406348
HU34	Hajdúszoboszló	hízó sertés tüdeje	2005.03.23.	EF406349
HU35	Hajdúszoboszló	hízó sertés tüdeje	2005.03.23.	EF406350
HU36	Püspökladány	hízó sertés tüdeje	2005.11.14.	EF406351
HU37	Püspökladány	hízó sertés tüdeje	2005.11.14.	EF406352
HU38	Felsőcikola	hízó sertés tüdeje	2008.05.18.	
HU39	Rábapordány	hízó sertés savója	2008.04.22.	
HU40	Nyárad	vetélt magzat tüdeje	2008.08.15.	
HU41	Kistimapuszta	vetélt magzat tüdeje	2008.08.16.	
HU42	Kunszentmárton	hízó sertés tüdeje	2008.02.17.	
HU43	Békés	hízó sertés savója	2008.07.13.	
HU44	Ráckeresztúr	hízó sertés tüdeje	2007.03.01.	
HU45	Baracska	hízó sertés tüdeje	2007.03.29.	
SRB1	Zenta	hízó sertés savója	2007.08.07.	
SRB2	Kispiac	hízó sertés savója	2007.08.15.	
SRB3	Bácstopolya	hízó sertés savója	2007.08.27.	
SRB4	Gyöngyén	hízó sertés savója	2008.04.01.	
SRB5	Zenta	hízó sertés savója	2008.04.02.	
SRB6	Szabadka	hízó sertés savója	2008.04.05.	
SRB7	Bajmok	hízó sertés savója	2008.04.07.	
SRB8	Ada	hízó sertés savója	2008.04.08.	



12. ábra. Az ábra az általunk vizsgált magyarországi és vajdasági PRRSV szekvenciák származási helyeit mutatja.

#### 5.1.4. ORF5 nukleotidszekvencia vizsgálatok (magyarországi vad PRRSV szekvenciák)

A megvizsgált 45 magyarországi PRRSV szekvencia közül 42 az európai genotípusba tartozott. Ezek a törzsek átlagosan  $92,24 \pm 2,64\%$ -os azonosságot mutattak a vizsgált génszakaszon a Lelystad referencia törzssel. Volt olyan szekvencia (HU13), mely 98,37%-ban, illetve olyan is, mely csupán 85,18%-ban egyezett a referenciatörzssel.

Munkánk során 3 olyan szekvenciát találtunk (HU12, HU21 és HU44), melyek az amerikai genotípusba tartoztak. Ezek a törzsek 86,80%, 85,87%, illetve 94,67%-os

hasonlóságot mutattak a VR-2332 jelzésű amerikai referens izolátum génbanki (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) szekvenciájának megfelelő szakaszával. A HU12-es 90,97%, a HU21-es törzs pedig 90,28%-os hasonlóságot mutatott egy 1994-ben, Kanadában vírustörzssel (akcessziós szám: L40848). A két szekvencia mintagyűjtési helye, ahogy a térképen látható, távol helyezkedik el egymástól, de a két állattartó telep direkt kapcsolatban van egymással: a HU21-es minta származási helyén a HU12-es gyűjtési helyéről származó malacokat hizlalnak.

#### *5.1.5. Vakcina eredetű szekvenciák*

Egy alkalommal egy egészséges, 2 hetes szopós malac tüdejéből készítettünk PAM tenyészetet, melynek felhasználása előtt a már ismertetett módon RT-PCR vizsgálattal ellenőriztük annak PRRSV fertőzöttségét. Mivel a vizsgálat pozitív eredményre vezetett, a talált vírus ORF5 szekvenciáját megvizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy az mindössze egy nukleotid eltérést mutatott a telepen használt élővírusos vakcinatörzs hasonló szakaszának szekvenciájával. Ezzel a vakcinával vemhessége alatt kétszer oltották azt az anyakocát, melytől a malac született. Ugyanezen a telepen, egészséges, még nem vakcinázott kocasüldőkből mutattunk ki két másik olyan szekvenciát is, melyek 98,84%-os egyezést mutattak az említett vakcinavírussal. Ezeket az állatokat egy légtérben tartották korábban már többször vakcinázott kocákkal.

Egy másik PRRS pozitív sertéstelepen több, olyan szekvenciát is találtunk, melyek nagymértékben hasonlítottak a telepen használt élővírusos vakcinához. Ezen a telepen (helytelenül) egymást követően alkalmazták a két, Magyarországon kereskedelmi forgalomban lévő élővírusos vakcinát („A” és „B” vakcina), úgy, hogy először az „A”, utána a „B”, majd ismét az „A” vakcinát alkalmazták. A mintagyűjtések időpontja a harmadik fázisba esett, amikor 3-4 hónapja már az „A” vakcinát használták újra. Valamennyi mintát vetélt magzatok tüdejéből, illetve légzőszervi tünetek között elhullott szopós malacokból gyűjtöttük. A malacok nem voltak vakcinázva egyik vakcinával sem, az anyakocákat pedig kétszer vakcinázták az „A” jelű vakcinával. A szekvenciák azonban a „B” vakcinával mutattak 98,84-99,77%-os azonosságot (Kiss et al., 2006).

Egy harmadik telepen légzőszervi tüneteket mutató malacokból olyan szekvenciát mutattunk ki, melyek 95,14%-os nukleotid-egyezést mutatott egy Magyarországon nem törzskönyvezett, amerikai genotípusú attenuált vakcinatörzs hasonló szakaszának szekvenciájával.

#### *5.1.6. Szerbiából származó minták szekvenciavizsgálata*

Munkánk során lehetőségünk nyílt vajdasági sertéstartó telepekről származó savóminták vizsgálatára. Nyolc különböző sertéstelepről jutottunk hozzá mintákhoz, és annak ellenére, hogy korábban csupán egy telepen végeztek PRRSV jelenlétének kimutatására irányuló vizsgálatokat, valamennyi esetben megtaláltuk a vírust. Ezeknek a vírusoknak az ORF5 szekvenciavizsgálatával megállapítottuk, hogy valamennyi az európai genotípusba tartozik, és átlagosan  $85,84 \pm 0,34\%$ -os nukleotidegyezést mutatnak a Lelystad vírus hasonló szakaszával.

#### *5.1.7. A magyarországi, szerbiai, illetve fontosabb külföldi szekvenciák összehasonlítható genetikai vizsgálata*

Az összehasonlító genetikai, illetve filogenetikai vizsgálatok során az általunk meghatározott valamennyi (45 magyarországi, 8 vajdasági) szekvenciát felhasználtuk. Ezen kívül a nemzetközi adatbázisból (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) letöltöttünk 35 szekvenciát az alapján, hogy azok lefedjék az összes európai szubtypust, fontosabb amerikai alcsoportot, illetve a legtöbb, komoly sertéstartó hagyománnyal rendelkező országot (6. táblázat).

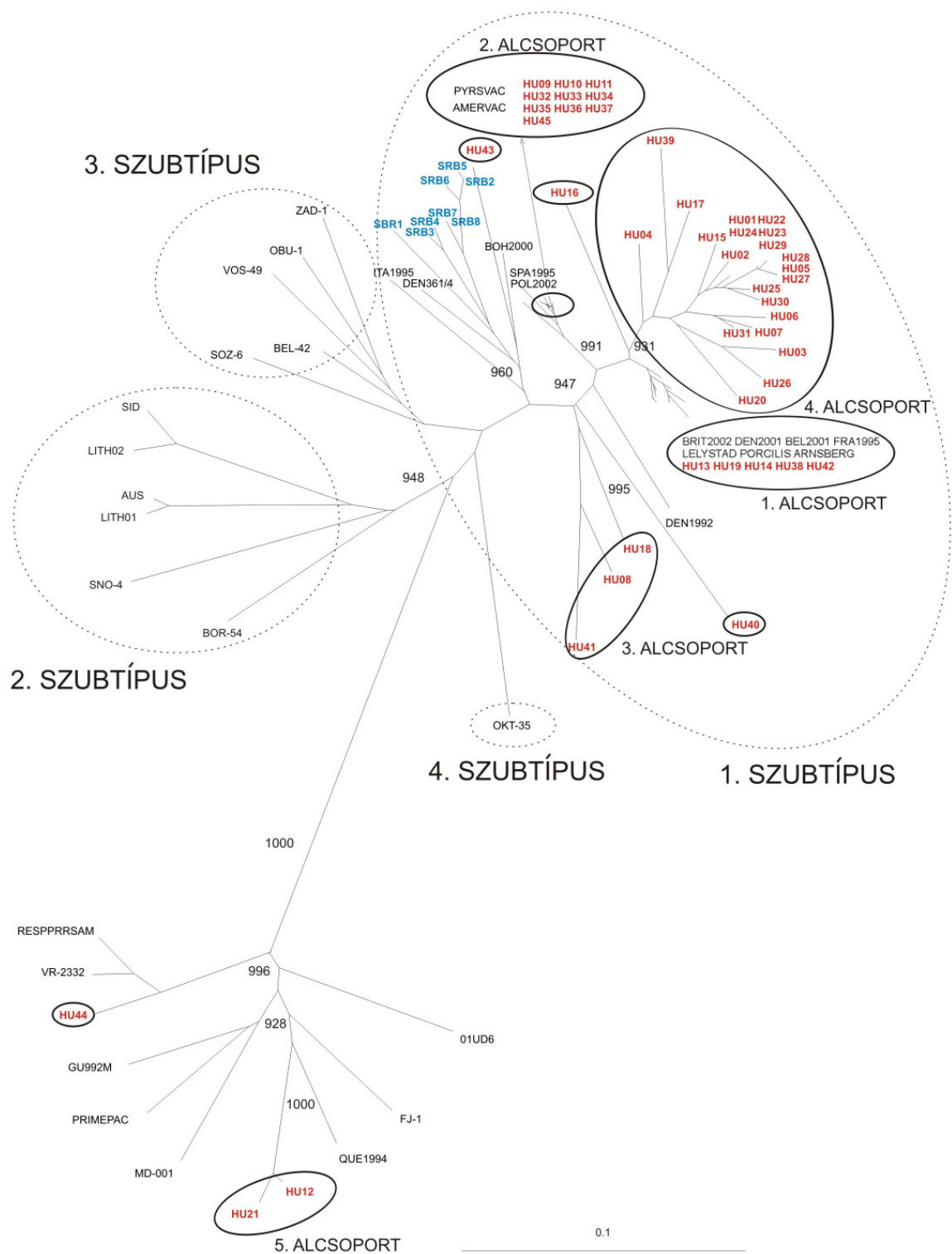
6. táblázat. A táblázat a törzsfakészítéshez a saját adatainkon kívül felhasznált, génbanki szekvenciák legfontosabb adatait tartalmazza.

AMERVAC	Spanyolország	2006	DQ324668
BEL2001	Belgium	2001	AY035901
BOH2000	Csehország	2000	AF253537
BRIT2002	Anglia	2002	AF378799
DEN361/4	Dánia	2001	AY035915
DEN1992	Dánia	1998	AJ223078
DEN2001	Dánia	2001	AY035939
FRA1995	Franciaország	1996	U40697
ARNSBERG	Németország	2002	AF378797
ITA1995	Olaszország	1996	U40696
LELYSTAD	Hollandia	1993	M96262
LITH01	Litvánia	2002	AF378800
LITH02	Litvánia	2002	AF378801
POL2002	Lengyelország	2002	AF378804
PORCILIS	Hollandia	2002	AF378819
PRIMEPAC	USA	1998	AF066384
PYRSVAC	Spanyolország	2002	AF378820
QUE1994	Kanada	1995	L40898
RESPPRRS	USA	1998	AF066183
SPA1996	Spanyolország	1996	U40690
VR-2332	USA	1995	U87392
BEL-42	Fehéroroszország	2006	DQ324669
BOR-54	Fehéroroszország	2006	DQ324672
OBU-1	Fehéroroszország	2006	DQ324676
OKT-35	Fehéroroszország	2006	DQ324677
SNO-4	Fehéroroszország	2006	DQ324683
SOZ-6	Fehéroroszország	2006	DQ324686
VOS-49	Fehéroroszország	2006	DQ324690
ZAD-1	Fehéroroszország	2006	DQ324694
AUS	Litvánia	2006	DQ324667
SID	Litvánia	2006	DQ324682
FJ-1	Kína	2004	AY881994
GU992M	Japán	2005	AB175721
MD-001	Taiwan	1998	AF121131
01UD6	Thaiföld	2004	AY297113

#### 5.1.8. Törzsfakészítés

A törzsfakészítéshez összesen 84 különböző szekvencia adatait használtuk fel. A Clustal X 1.81 programmal készített, majd a TreeView version 1.6.6 programmal láthatóvá tett törzsfakészítés a 13. ábrán látható.





13. ábra. Az ábrán az ORF5 szekvenciaadatok alapján készített törzsfa látható. Piros színnel a magyarországi, kékkel a szerbiai, míg feketével a nemzetközi adatbázisból letöltött szekvenciák rövidített jelölései láthatók. Szaggatott vonalakkal a különböző európai szubtypusokat, míg folytonos vonallal a magyarországi alcsoportokat, illetve különálló szekvenciákat jelöltük. A csomópontoknál látható számok az 1000 ismétlés alapján számított bootstrap értékeket jelölik.

A törzsfán megfigyelhető az európai (1-es) és az amerikai (2-es) genotípusba tartozó, valamint az európai genotípuson belül a különböző szubtípusú szekvenciák éles elkülönülése. A magyarországi szekvenciák közül 42 az 1-es típusba tartozik. Ezek a szekvenciák a nyugat európai országok PRRSV törzseihez hasonlóan az 1-es szubtípusba tartoznak. 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 tartoznak. A legnagyobb alcsoportba (4. alcsoport) az általunk vizsgált 1-es típusú magyar szekvenciák fele (21) tartozik. Ezt az alcsoportot alkotó szekvenciák ezen belül olyan kisebb, monofiletikus csoportokat képeznek melyekbe az adott földrajzi területről származó vírusok tartoznak. A 3. alcsoportot 3 olyan szekvencia alkotja, melyek noha mind a Dunántúlról származnak, egymástól viszonylag távol helyezkedő sertéstelepekről gyűjtöttük őket.

Három magyarországi szekvencia a 2-es típusú törzsekkel került egy csoportba. Ezen belül a HU12-es és HU21-es törzs vadvírus jellegű, míg a HU44-es jelű egy Európa számos országában használatos, de Magyarországon nem törzskönyvezett élővírusos vakcinatörzshöz hasonló.

#### *5.1.9. Származtatott aminosav vizsgálatok*

A származtatott aminosavszekvenciák összehasonlító vizsgálatával megállapítható, hogy a leginkább variábilis területek a GP5-ös fehérje 33-61, illetve 89-109 aminosavszakaszain figyelhetők meg. Ez a két terület egybeesik a fehérje felületi alegységeivel (1. és 2. ektodomén). A vírusszekvenciák nagy többsége (5 vakcinavírus eredetű, illetve 2 vadvírus eredetű kivételével) a Lelystad vírussal ellentétben egy 3. glikozilációs helyet is tartalmazott a 37. pozíciójű aszparaginnak megfelelően. A HU8-as törzs a 46. aminosav pozíciót érintő Asn→Asp mutáció következtében elvesztette az aszparaginhoz kötött glikozilációs helyet, míg a HU41-es vírus az 55. és az 56. aminosavat érintő változás következtében elvesztette az 53. pozícióban lévő aszparaginhoz kötött glikozilációs helyet, annak ellenére, hogy az 53. aminosav nem változott meg. (A vakcina eredetű szekvenciákat részletesen ismertetjük a következő fejezetben.) A 13. ábra az európai típusú magyar PRRS vírusok GP5 fehérjéinek származtatott aminosavszekvenciáit mutatja egymáshoz, illetve referenciaként a Lelystad vírushoz illetve a fehérje első felületi alegységétől kezdődően (az első 32 aminosav által alkotott ún. signal peptid a fehérje érési folyamatai során leválik arról).





Az egymással szoros genetikai rokonságban álló európai genotípusba tartozó szerbiai törzsek aminosavszekvenciái is nagymértékben hasonlítanak egymáshoz. A Lelystad vírushoz képest esetükben is megjelent a 37. pozícióban levő aszparaginhoz kötődő glikozilációs hely (15. ábra).

#### *5.1.10. Vakcina eredetű szekvenciák aminosav vizsgálata*

A korábban már ismertetett vakcinákhoz nagymértékben hasonlító szekvenciák esetén a származtatott aminosavszekvenciákat összehasonlítottuk az adott telepen használt élővírusos vakcinatörzsek hasonló szakaszának aminosav-sorrendjével. Abban az esetben, amikor egy telepen felváltva mindkét, Magyarországon törzskönyvezett vakcinát használták („A” és „B” vakcina), az időszak végén kimutattott, B vakcinára hasonlító vakcina variáns vírusok és a vakcina GP5 fehérjéjének elsődleges szerkezetét összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy valamennyi variáns esetében ugyanazokban a pozíciókban történtek aminosavváltozások a vakcinavírushoz képest. Ezek a változások valamennyi esetben a fehérje első vírurfelszíni alegységén voltak megtalálhatóak, ráadásul a 46 pozícióban bekövetkezett Asp→Lys változás következtében a legtöbb variáns esetében elveszett az ehhez a pozícióhoz kapcsolódó glikozilációs hely. A 37. pozícióban bekövetkezett változás ráadásul a neutralizációs ellenanyagok termelődését indukáló B epitóp első aminosavát érinti (16. ábra). (Valamennyi variánst nem vakcinázott állatból mutattuk ki.)

Egy másik sertéstartó telep esetében, ahol az A jelű vakcinát használták, szintén a vakcinához nagymértékben hasonlító variánsokat mutattunk ki nem vakcinázott állatokban. Ebben az esetben azonban az aminosav-változások nem mutattak egyezést az egyes variánsok esetében, sőt azok elszórtan mutatkoztak az első, a második felületi alegységen illetve azokon kívül (16. ábra).

A vakcina eredetű törzsek esetében megvizsgáltuk, hogy az eredeti vakcinavírus nukleotidszekvenciájához képest bekövetkezett változások milyen arányban eredményeztek aminosav-változást, illetve mennyi maradt néma, szinonim mutáció (7. táblázat).

A 7. táblázat adatait összegezve megállapítható, hogy az aminosav-változást eredményező nukleotidmutációk száma (egy kivétellel) valamennyi esetben magasabb volt a szinonim mutációknál. A B jelű vakcina esetében egy kivétellel az arányuk legalább 4-szeres volt, két variánsnál pedig nem figyelhetőek meg szinonim mutációk. Az A jelű vakcina esetében egy kivétellel szintén magasabb a nem szinonim nukleotid

mutációk száma. A nem szinonim mutációk ilyen magas aránya a szinonimokhoz képest erős szelekciós nyomást jelez ezen a génszakaszon.

7. táblázat. A táblázat a vakcina eredetű szekvenciák esetében mutatja a vizsgált génszakaszon megfigyelt nukleotid, illetve származtatott aminosavváltozások számát. \*: a megfigyelt nem szinonim ( $\Delta N$ ), illetve szinonim ( $\Delta S$ ) mutációk aránya.

Név	Nukleotid-változás	Aminosav-változás	$\Delta N/\Delta S^*$
<b>VAR 1 (B)</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4/1</b>
<b>VAR 2 (B)</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4/1</b>
<b>VAR 3 (B)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4/0</b>
<b>VAR 4 (B)</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4/1</b>
<b>VAR 5 (B)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6/0</b>
<b>VAR 6 (B)</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3/2</b>
<b>VAR 7 (A)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1/0</b>
<b>VAR 8 (A)</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2/3</b>
<b>VAR 9 (A)</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3/2</b>

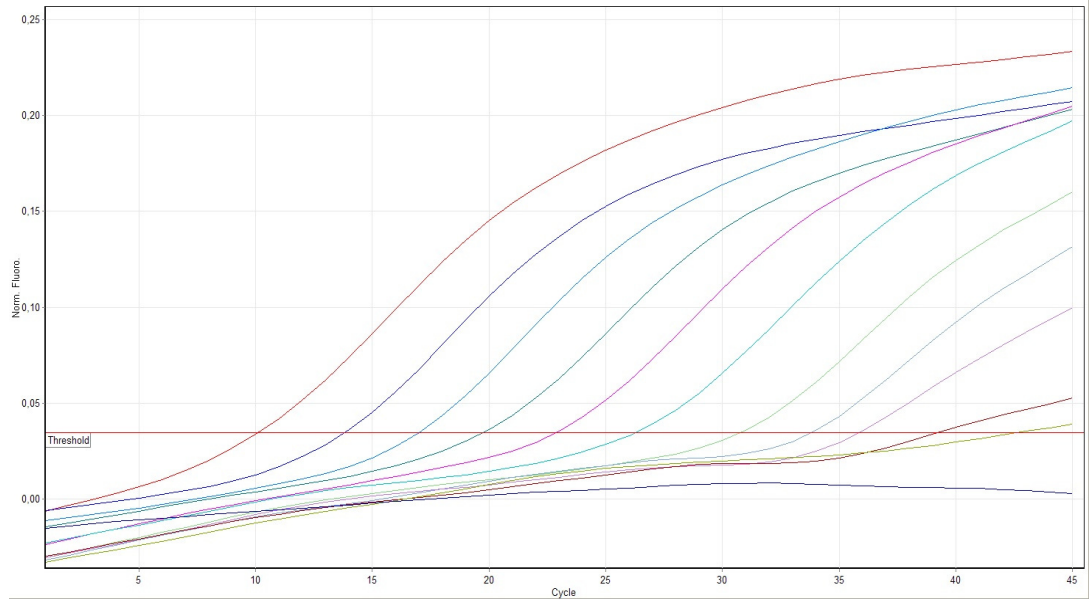
## **5.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból**

### *5.2.1. A rendszer specificitásának és érzékenységének meghatározása*

A rendszer érzékenységének meghatározásához ismert mennyiségű RNS kópiát tartalmazó oldatokat készítettünk a Lelystad, a Soz-8, illetve az Ingelvac MLV® törzsek felhasználásával. Ezek vizsgálatával a rendszer által még kimutatható legkisebb mennyiség kb. 10 kópia mindhárom vírustörzs esetében (17. ábra). A standard görbéket a Lelystad, illetve az amerikai referens vírushoz közel álló vakcinatörzs esetében is meghatároztuk (18. ábra). Az ismert infektív titerű Lelystad, és P129 vírustörzset tartalmazó oldatok hígításával a legkisebb kimutatható mennyiség mindkét esetben  $1\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  volt, ami – az európai, valamint az amerikai vírustörzsekhez készített standard görbe értékei alapján – 61, illetve 42 RNS kópiának felelt meg.

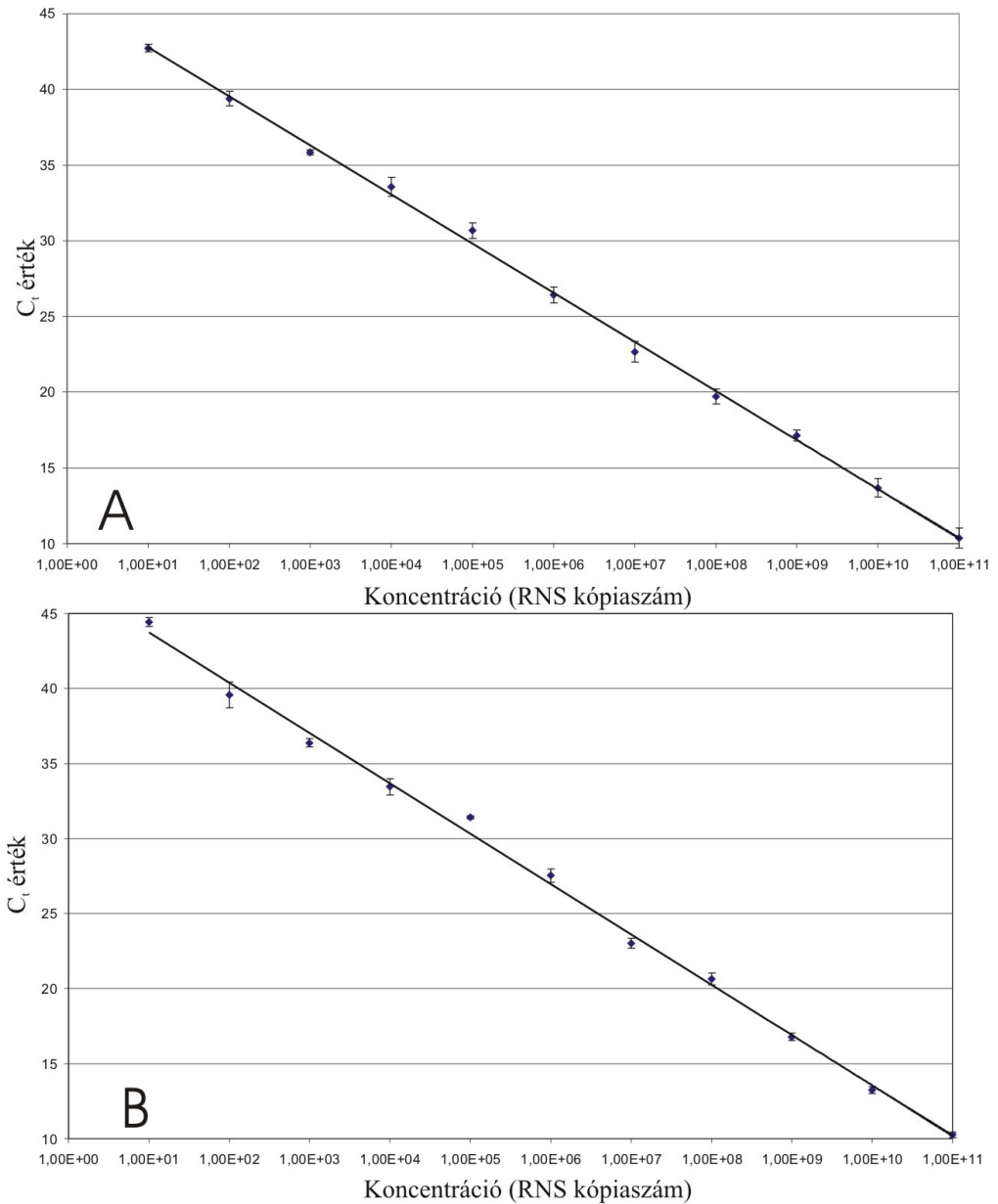
A birtokunkban levő valamennyi, gél-alapú PCR során korábban pozitívnak bizonyult PRRSV mintát a PriProET-rel megvizsgálva valamennyi esetben pozitív eredményt kaptunk. Néhány, 2003-ból származó minta esetében azt amplifikációs görbe negatív volt, a fluoreszcens jel nem érte el a küszöbértéket. Ezekben az esetekben az olvadáspont meghatározásakor kapott PRRSV-specifikus értékek igazolták a vírus RNS jelenlétét. Az egyéb kórokozókat tartalmazó minták vizsgálata valamennyi esetben negatív eredményre vezetett.





17. ábra. Az ábra Lelystad vírusból előállított ismert mennyiségű, 10-es alapú RNS hígításokon elvégzett PriProET eredményét mutatja (jobbról balra haladva:  $10^{11}$ - $10^0$  kópia/minta). Az y tengelyen a fluoreszcencia szintek, az x tengelyen az amplifikációs ciklusszámok láthatók. A vízszintes piros vonal a fluoreszcencia pozitívítási küszöbértéket mutatja.



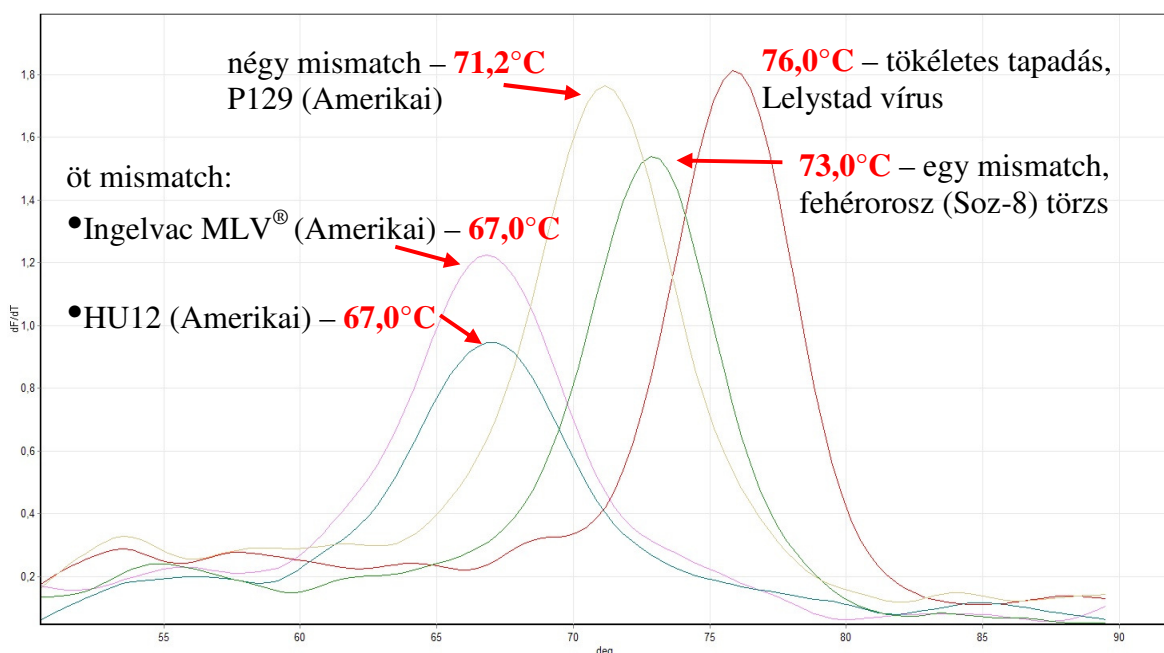


18. ábra. Az ábra a 10-es alapú hígítások eredményei alapján felállított standard görbéket mutatja a Lelystad (A), illetve az Ingelvac MLV® (B) törzs esetében. A görbe a háromszor megismételt reakció eredményeinek átlagos értékei alapján lett felállítva (a standard hibaértékek az egyes pontoknál feltüntetve). Az x tengelyen a kópiaszám, az y tengelyen pedig a C<sub>t</sub> értékek láthatók.

### 5.2.3. Olvadásponthoz meghatározás

A Lelystad vírus esetében, ahol tökéletes a próba-célterület illeszkedés, 76,0°C-os olvadásponthoz hőmérsékletet kaptunk. Ez az a hőmérséklet, amelynél a próba leválik a célterületről, értéke pedig attól függ, hogy milyen erős a kapcsolat a próba és a célterület között. Minél több mismatch van a próba területén, annál kevesebb nukleotid kapcsolódik a párjához, így várhatóan annál kisebb lesz az olvadásponthoz érték ( $T_m$ ).

Azon minták esetében ahol csökkent  $T_m$  értékeket kaptunk, még ismert génbanki (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) szekvenciák esetén is meghatároztuk az amplikonok nukleotidsorrendjét a gél-alapú diagnosztikai primerpárunk segítségével. Így valamennyi, csökkent olvadásponthoz minta esetében mismatch-ek jelenlétét tudtuk igazolni a próbának megfelelő célterületen. A Soz-8 törzs esetében az egy mismatch 73,0°C-os értéket, a P129-es törzsnél a négy mismatch 71,2°C-os, az Ingelvac MLV® törzs, illetve a Magyarországon elsőként izolált amerikai HU12-es vírustörzs esetében az öt mismatch 67,0°C-os értéket eredményezett (19. ábra).

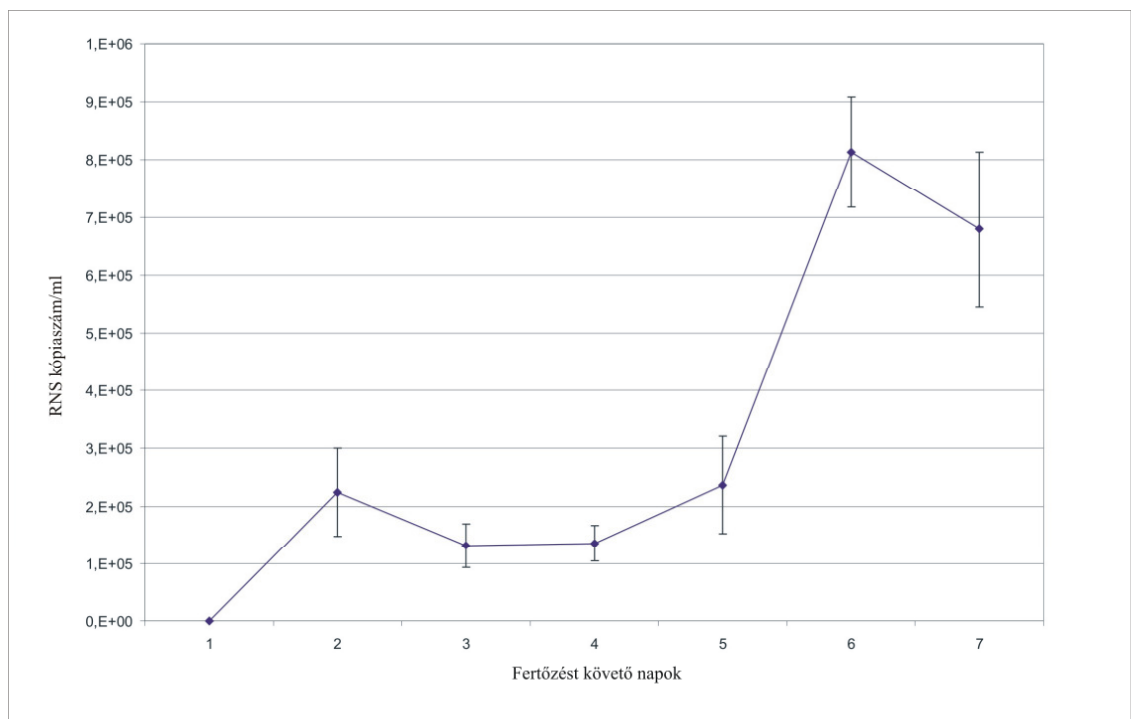


19. ábra. Az ábrán a különböző számú próba-célterület mismatch esetén kapott olvadásponthoz értékek láthatók. Az y tengelyen a fluoreszcencia, az x tengelyen pedig a hőmérsékleti értékek láthatóak.

### 5.2.4. Klinikai minták

A kísérletesen fertőzött állatok vérsavóinak naponkénti vizsgálata során a vírus genetikai állománya a fertőzést követő második napon jelent meg az állatok vérsavójában. Ezután egy nagyon enyhe csökkenést követően a 6. és 7. napon érte el a

maximális,  $8-9 \times 10^5$  RNS kópia/ml értéket (20. ábra). Az állatok elektromos kábítást követő elvéreztetése után elvégzett kórbonctani-kórszövettani vizsgálatokkal intralobuláris intersticiális pneumóniát figyeltünk meg az állatok tüdejében, valamint súlyos follikuláris hiperpláziát, illetve eozinofil granulociták infiltrációt a nyirokszervekben. A mandulák, illetve a tüdők PriProET vizsgálatával megállapítottuk, hogy míg az előbbi szervek grammonként  $1-2 \times 10^5$ , utóbbiak  $6-9 \times 10^8$  RNS kópiát tartalmaztak. Valamennyi PCR reakció után meghatároztuk az amplikonok olvadáspontját, melyek ugyanazt az értéket mutatták ( $T_m$ ,  $76,0^\circ\text{C}$ ), mint a fertőzéshez használt vírus, mely igazolta a reakciók specifikusságát.



20. ábra. Az ábrán a kísérleti állatok savómintáiból kimutatott PRRSV RNS kópiaszámok átlaga (standard deviációval) látható. Az x tengely a fertőzést követő napok számát, az y tengely az RNS kópiaszámot mutatja.

## 6. Megvitatás

### 6.1. Magyarországi és szerbiai PRRSV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

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 (Dr. Friedrich Schmoll, Veterinärmedizinische Universität, Bécs, személyes közlés).

Ezzel egyidőben arra is törekedtünk, hogy minél több magyarországi, illetve, ha lehetséges, szomszédos országbeli PRRSV-t gyűjtsünk, és végezzük el azok ORF5 génszakaszának nukleotidszekvencia-vizsgálatát, megállapítsuk azok filogenetikai viszonyait egymással, illetve a nemzetközi adatbázisban fellelhető fontosabb szekvenciákkal.

Az általunk 5 év alatt gyűjtött minták részletes vizsgálatával megállapítottuk, hogy törzseink nagy része az európai 1-es szubtípusba tartozik. Ezen belül bizonyos szekvenciák monofiletikus csoportokat is alkotnak. A legnagyobb ilyen csoport (4-es alcsoport) a vizsgált európai genotípusú törzseink nagy részét tartalmazza. Az alcsoporton belül külön ágakat képeznek egymáshoz közeli sertéstartó telepekről származó minták. Mivel ezek a telepek olyan távolságra vannak egymástól, hogy esetükben a szél útján, aeroszolos formában való átfertőződés kizárható, nagy valószínűséggel fertőzött tenyészállatok vásárlása, a fertőzött állatoknak fogékony telepek közelében haladó úton történő szállítása, esetleg nem kellőképpen fertőtlenített gépjárművek (pl. takarmányszállító kamion) telepek közötti forgalma, vagy akár kontaminált ruházatú személyzet egyaránt fertőzési forrásnak tekinthető. Megfigyelhetők emellett olyan szekvenciák is, melyek egyedül állnak, viszonylag nagy távolságra más magyarországi PRRSV törzsektől. Ezekben az esetekben (HU16, HU40, HU43) az állományok vagy olyan vírussal fertőződtek, melyről nincsenek adataink, és nem állnak közeli rokonságban más hazai törzsszel, vagy pedig korábban fertőződtek valamelyik alcsoport közös ősével, és a vírus rendkívül gyors genetikai sodródásának következtében eltávolodtak az egyidőben, más telepeken kialakuló törzsektől. 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, így a magyar törzsek nagy része ezen a szakaszon 3 oligoszaharid alegységet tartalmaz. Hasonló jelenséget figyeltek meg más európai törzsek esetében is (Mateu et al., 2003; 2006; Stadejek et al., 2002; Pesch et al., 2005), illetve egy, az amerikai referens vírustörzssel (VR-2332) elvégzett tanulmány során is (Rowland et al., 1999). Ez utóbbi tanulmány kísérletesen fertőzött vemhes kocák magzataiból olyan törzseket mutatott ki, melyek a 34. aminosav pozícióban (ez megfelel az európai törzsek 37. aminosavjának) egy Asp→Asn változás következtében egy harmadik glikozilációs hellyel gazdagodtak. Ezeket a változatokat ráadásul csak minimálisan 1 héttel a magzatok születése után lehetett belőlük kimutatni, mikor bennük már neutralizáló ellenanyagok jelentek meg, és akkor is csak az állatok manduláiban és nyirokcsomóiban. Az Asn<sup>34</sup> mutánsokat hordozó malacok savójának gyengébb volt a neutralizáló hatása az Asn<sup>34</sup> változatokkal szemben, mint az eredeti (Asp<sup>34</sup>) vírust hordozó állatok savójának a kiindulási vírussal szemben. Ezek alapján feltételezhető, hogy ez a változás szelekciós nyomás eredményeként alakul ki, olyan mutánsokat eredményezve, melyek így képesek lesznek limfoid szervekben perzisztens fertőzést kialakítani (Rowland et al., 1999). Feltételezhető tehát, hogy hasonló változás jelentkezett az általunk vizsgált magyar vírustörzsek esetében is, vagy az, hogy eleve ilyen jellegű vírussal fertőződtek. Két vadvírus szekvencia esetében csak két glikozilációs helyet találtunk. A HU08-as vírus esetében a 46. helyen Asn helyett Asp található, amihez nem kapcsolódik oligoszaharid molekula, míg a HU41-es szekvencia, feltehetőleg a 55. és 56. aminosav szerkezete miatt nem képes oligoszaharid megkötésére az 53. pozícióban, noha az itt levő aminosav a potenciális glikozilációs helyeket jelölő Asn maradt. A 46. pozícióban levő glikozilációs hely „kiütése” *in vitro* körülmények között csökkentette a mutáns vírusok infektivitását a vadvírushoz képest. Ennek a magyarázata, hogy a 46. pozícióban levő oligoszaharid feltehetőleg szerepet játszik a GP5, és az M fehérjének a vírus érése során történő heterodimerizációjában, úgy, hogy megakadályozza a közeli 50. pozícióban levő cysteinen kialakuló diszulfid híd túl korai, nem megfelelő kialakulását (Wissink et al., 2004). Egy másik tanulmányban ugyanakkor a glikozilációs helyek elvesztése növelte ezeknek a vírusoknak az *in vitro* érzékenységet a megfelelő vadvírus ellen termelt ellenanyaggal elvégzett neutralizációs tesztekben, továbbá *in vivo* kísérletekben növelte a közeli neutralizációs epitópok immunogenitását, nagyobb mennyiségű ellenanyag termelődését indukálva (Ansari et al., 2006). A hiányzó 46. oligoszaharidnak a vírus érése során betöltött szerepét feltehetőleg átveszi egy a 37. pozícióban megjelenő glikozilációs hely,

ugyanis az valamennyi eddig leírt, illetve általunk talált ilyen szekvencia esetében is megtalálható volt (Stadejek et al., 2002; Mateu et al., 2003; Wissink et al., 2004).

Külön csoportot képeznek a vakcina eredetű törzsek. Mindkét Magyarországon törzskönyvezett élővírusos vakcina esetében találtunk a vakcinára nagymértékben hasonlító szekvenciákat nem vakcinázott, de vakcinázott állatokkal egy légtérben tartott sertésekben. Az egyik esetben (B vakcina) helytelenül alkalmazott vakcinázási protokoll után akkor is B vakcinához hasonló szekvenciákat találtunk vakcinázatlan, újszülött állatokban, amikor a telepen már 3-4 hónapja a másik vakcinát (A vakcina) alkalmazták. Ezen szekvenciák vizsgálata során következetes aminosavváltozásokat figyeltünk meg a vakcinavírushoz képest a 37. a 46. az 59. és a 60. nukleotid pozícióban. A 46. pozíciót érintő változás (Asn→Lys) nyomán megszűnt a vakcina esetében még megfigyelhető glikozilációs hely. A 37. aminosavat érintő Ser→Asn változás nyomán azonban megjelent itt egy glikozilációs hely, ami valószínűleg, a korábban említett módon átvette a 46. cukormolekula szerepét a vírusfehérje érési folyamataiban. A 37. aminosavat érintő változás a neutralizációs ellenanyagok termelődését indukáló B epitóp első aminosavát érinti (Balasuriya and MacLachan 2004; Ostrowski et al., 2002), ami befolyásolhatja az eredeti vakcinavírus ellen termelődött, neutralizáló hatású ellenanyagok tapadását, annál is inkább, mert egy oligoszaharid molekula is megjelenik az epitópon. A 7. táblázat adatait vizsgálva látható, hogy a B vakcinához hasonló variánsok esetében rendkívül alacsony a szinonim mutációk száma, kevés kivétellel tehát valamennyi nukleotidváltozás aminosavváltozást eredményezett a GP5 első vírusfelszíni alegységén. Ez rendkívül erős szelekciós nyomásra utal ezen a területen, amit feltehetően a gazdaszervezet immunrendszere, azon belül is leginkább a neutralizáló ellenanyagok jelentenek. Ez alapján a vírus multiplikációja során, az RNS polimeráz véletlenszerű tévesztése miatt kialakuló nagy számú vírusváltozat (quasispecies) közül azok fognak kiválasztódni, melyek leginkább különböznek az eredeti vakcinavírustól, legkevésbé fognak megfelelni az eredeti vírus ellen termelődött ellenanyagoknak. Jelen esetben ezt alátámaszthatja az a tény is, hogy valamennyi ilyen variánst a betegség tüneteit mutató, majd elpusztult állatokból, vetélt magzatokból, gyenge, illetve légzőszervi tüneteket mutató malacokból mutattuk ki. A vakcinavírus esetleges reverzióját csak az eredeti, a vakcina attenuálása előtti vadvírustörzs szekvenciájának ismeretében lehetne bizonyítani, erről azonban nem állnak rendelkezésre adatok.

A hazánkban használt másik élővírusos vakcina esetében is kimutattunk vakcinázatlan állatokból származó, a vakcinára nagymértékben hasonló szekvenciákat,

ezekben az esetekben azonban a nukleotid, illetve aminosavváltozások elsősorban helyezkedtek el az első, a második felületi alegységen, illetve az azt követő szakaszokon, nem eredményeztek glikozilációs hely változást, ráadásul valamennyi ilyen variánst teljesen egészséges állatokból: egy újszülött malac alveolaris macrophagtenyészetéből, valamint két egészséges kocából mutattuk ki.

Három olyan szekvenciát is találtunk, mely a filogenetikai fán amerikai törzsek közé került. Közülük két vírus (HU12 és HU21), közel 90%-os genetikai rokonságot mutatott a kanadai referens izolátummal. A kórelőzményi, illetve a telep állatforgalmi adatait figyelembe véve sem találtuk kezdetben olyan eseményt, mely a törzsek eredetét megmagyarázná. Vakcina eredetű amerikai szekvenciát is találtunk egy állományban, itt azonban, noha kórelőzményi adat nem állt rendelkezésre, feltételezhető, hogy Nyugat-Európából származó állatok közvetítésével került be a vírus az állományba. Számos „régibb” EU tagállamban írták le vakcina eredetű amerikai törzsek jelenlétét (Madsen et al., 1998; Indik et al., 2005; Pesch et al., 2005).

A Szerbiából származó valamennyi szekvencia az európai 1-es szubtypusba tartozott, azon belül különálló, monofiletikus csoportot alkotott, és (egymáson kívül) leginkább egy Dániában izolált vírustörzsre hasonlítottak (DEN361/4, akc. szám: AY035915). Ez alapján feltételezhető, hogy Szerbiába, legalábbis annak vajdasági sertéstelepeire dániai eredetű vírus került be, és a telepek nagy valószínűséggel egymástól fertőződtek direkt, vagy indirekt vírusátvitel nyomán. Figyelemre méltó, hogy egy Békés megyéből, a szerb határ közeléből (Békés) kimutatott magyarországi szekvencia (HU43) azonos monofiletikus csoportban van ezekkel a törzsekkel, így nem zárható ki az esetleges közös ős, és akár járványtani kapcsolat is lehet a HU43-as és a vajdasági törzsek között.

A filogenetikai vizsgálatok eredményeinek összegzéseként megállapítható, hogy Magyarország többször, több forrásból fertőződött. Találtunk kanadai, dániai, spanyolországi eredetű törzseket egyaránt. (Spanyolországi eredetű törzsekről már korábbi vizsgálatok is beszámoltak hazánkban [Medveczky et al., 2001]). Ilyen rendkívül gyorsan változó vírus esetében azonban gyakran nem állapítható meg teljes biztonsággal a kiindulási vírus eredete, ugyanis egy adott országban a behurcolás után rendkívül gyorsan, már néhány év alatt kialakulhatnak a csak ott jellemző szekvenciák, melyek akkorra már meglehetősen távoli rokonságban állnak az eredeti vírustörzsszel. Ráadásul, ha a fertőződés idejében a kiindulási vírus ORF5 szekvenciáját (vagy ahhoz hasonló) nem helyezték el a nemzetközi adatbázisban, azóta az is hasonló sebességű változáson ment keresztül, és napjainkra gyakran már nincs közöttük olyan mértékű

hasonlóság, mely alapján a közös eredet egyértelműen kijelenthető lenne. A PRRSV-vel közeli rokonságot mutató EAV esetében, szintén az ORF5 vizsgálatával nem figyeltek meg ekkora változékonyságot a vizsgált hazai törzsek tekintetében (Hornýák et al. 2005), és ott egyértelműen megállapítható volt a behurcolt vírusok eredete.

Nem találtunk európai 2-es, illetve 3-as szubtypusú vírusokat, mely nem meglepő, hiszen a hazánkba érkező, továbbtartásra szánt élősertés majdnem kizárólag Nyugat-Európából érkezik, 2-es, illetve 3-as szubtypusú törzseket pedig eddig csak Fehéroroszországban és Oroszországban írtak le (Stadejek et al., 2006; 2008).



## **6.2. Primer-probe energy transfer elven működő kvantitatív RT-PCR eljárás kidolgozása PRRSV kimutatására klinikai mintákból**

Munkánk ezen részének legfőbb célja az volt, hogy kifejlesszünk egy olyan egylépéses 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. TaqMan rendszerek esetén ugyanis, ha mismatch van a próbának megfelelő génterületen, a próba egészben válik le az amplikonról, és mivel a jeladó (reporter) molekula továbbra is az elnyelő (quencher) közelségében marad, így nem történik jelkibocsátás. Mivel a PriProET esetében a polimerizációhoz egy olyan enzimet használunk, mely rekombináns technológiai beavatkozás következtében mutáció következtében elvesztette természetes 5' exonukleáz aktivitását a próba nem hidrolizálódik, nem válik le, eredeti helyén marad, így stabil jelkibocsátást kaphatunk pozitív reakció esetén.

Az irodalmi áttekintésben ismertetett valós idejű TaqMan rendszerek közül némelyek egy primerpárt, illetve két, eltérő kromofórral jelölt genotípus specifikus próbát tartalmaznak (Egli et al., 2001; Wasilk et al., 2004; Lurchachaiwong et al., 2008) míg mások multiplex rendszerben két primer párt, illetve két genotípus specifikus próbát alkalmaznak (Kleiboeker et al., 2005). A PriProET ezzel szemben egy próbát és egy primer-párt alkalmazva képes mindkét genotípust kimutatni, ezzel csökkenti a primerek egymáshoz, aspecifikus templátokhoz, vagy a próbához való tapadásának (dimerizációjának) esélyét. A primerek kromofór molekulát hordozó végére illesztett T overhang hatására magasabb floreszcens jelszintet kaptunk, mint nélküle, így elméletileg kevesebb templát jelenlétében is értékelhető, a küszöbértéket meghaladó jel mérhető, emelve ezzel rendszerünk érzékenységét. Ennek magyarázata az, hogy a T a legkisebb nukleotid, és az általa okozott quencher, azaz energiaelnyelő hatás a legkisebb a nukleotidok között. Emiatt a reverz primeren található T a FAM-ról történő energiaátadás mértékét (a FRET hatást), a próbán levő T pedig a TexasRed által kibocsátott fény mennyiségét növeli.

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. Olyan esetekben, amikor a templát RNS károsodása (hosszú időn át és/vagy nem megfelelő hőmérsékleten történő tárolás, autolízis stb.) miatt a fluoreszcens jel nem éri el a küszöbértéket, nem lehetséges a kópiaszám meghatározása. A  $T_m$  vizsgálat ilyenkor is alkalmas lehet a vírusgenom jelenlétének igazolására akkor, ha az a megfelelő, PRRSV-re jellemző tartományban ad eredményt. Ez a módszer más vírusok esetében is eredményesen használható (Rasmussen et al., 2003). Ez azzal magyarázható, hogy az amplifikációs görbék, illetve az olvadáspont meghatározására a rendszer eltérő mérési módszereket alkalmaz. Az amplifikáció során a kibocsátott, megfelelő hullámhosszú abszolút fény mennyiséget, míg az olvadáspont vizsgálat során a templát DNS és a próba szétválását követő fényintenzitás változást méri a berendezés. Nagyon kis mennyiségű templát RNS jelenléte esetén előfordulhat, hogy az abszolút fény mennyiség nem éri el a küszöbértéket, ami miatt a kópiaszám meghatározás lehetetlenné válik. Ilyenkor az olvadáspontvizsgálat során a megfelelő hőmérsékleten megfigyelt fényintenzitás változás utalhat a templát molekula jelenlétére.

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. (Megjegyezzük, hogy a nemzetközi adatbázisban [GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)] nem találtunk

olyan szekvenciákat, melyek ötnél több mismatch-et tartalmaztak volna a próbának megfelelő területen.) Ez a tulajdonság, a primereknek a nukleotidszekvencia illesztések alapján elvégzett többszörös degenerációja, valamint a PCR kitben megtalálható, genetikailag módosított, rendkívül nagy hatékonyságú enzimek képessé teszik PriProET rendszerünket arra, hogy az eddig publikált szekvenciáknak megfelelő összes PRRSV törzset, valamint további, eddig még nem közölt próba-célterület mutáns vírusokat is kimutasson.

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 (Kleiboeker et al., 2005), 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× nagyobb mennyiségben van jelen, mint a mandulában, illetve a vérsavóban. Heveny megbetegedés esetén a vírus molekuláris biológiai kimutatására ez a szerv a legalkalmasabb. Irodalmi adatok alapján perzisztens fertőződés során a vírus a nyirokszervekben, főként a mandulákban található meg, míg a vérpályából eltűnik (Wills et al., 1997a), endémiásan fertőződött telepeken elhullott malacokból tehát inkább a limfoid szerveket érdemes vizsgálni.

Nagy számú, 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.

## 7. Új tudományos eredmények

- 1) A fertőzés kimutatására, diagnosztikai célból, gél alapú RT-PCR eljárást dolgoztunk ki a PRRSV konzervatív szakaszának (ORF7, 3' NCR) amplifikálására, mely egyaránt alkalmas 1-es és 2-es genotípusú törzsek kimutatására, illetve az eltérő amplikonhosszok alapján a genotípusok előzetes elkülönítésére.
- 2) Szekvenciameghatározás és filogenetikai analízis céljából gél alapú RT-PCR eljárást dolgoztunk ki a PRRSV variábilis szakaszának (ORF5) amplifikálására.
- 3) Elsőként végeztünk nagy számú magyarországi mintán ORF5 szekvenciameghatározást, illetve összehasonlító genetikai vizsgálatokat.
  - a) Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált magyarországi PRRSV szekvenciák nagy többsége (93,33%) az európai genotípusba, azon belül az 1-es szubtípusba tartozik.
  - b) Elsőként számoltunk be Magyarországon amerikai genotípusú PRRSV jelenlétéről. Találtunk vakcina-eredetű, illetve vadvírus jellegű törzseket egyaránt.
  - c) Elsőként írtuk le Európában vadvírus eredetű, amerikai genotípusú PRRSV törzsek ORF5 szekvenciáját.
  - d) Megállapítottuk, hogy a Lelystad vírushoz képest szinte valamennyi magyar törzs esetében egy új glikozilációs hely jelent meg a GP5 fehérje 37. aminosavának megfelelően.
  - e) Az egyik Magyarországon is törzskönyvezett attenuált vakcinavírus esetében erős szelekciós nyomásra utaló változásokat találtunk a GP5 fehérje első felületi alegységén. Ugyanezek a vakcinaeredetű törzsek elvesztették a fehérje 46. aminosavához kötődő glikozilációs helyét. (A másik Magyarországon törzskönyvezett élővírusos vakcina esetében hasonlót nem figyeltünk meg.)
- 4) Elsőként határoztuk meg szerbiai (vajdasági) PRRSV minták ORF5 nukleotidszekvenciáját, és megállapítottuk, hogy azok az európai genotípusba, és az 1-es szubtípusba tartoznak, és szoros rokonságot mutatnak egymással, illetve Dániában izolált törzsekkel.
- 5) Kifejlesztettünk egy primer-probe energy transfer elven működő, valós idejű RT-PCR eljárást a PRRSV kimutatására.
  - a) A rendszer alkalmasnak bizonyult egymástól távoli rokonságban álló törzsek kimutatására, illetve mennyiségi meghatározására.
  - b) Az amplikonok olvadáspont-vizsgálata alkalmas a próba tapadási területén fennálló mismatch-ek felderítésére.

c) Szekvenciavizsgálatokkal, és az ismert szekvenciájú vírusokból készített, meghatározott kópiaszámú, rekombináns RNS-t tartalmazó minták sorozathígításainak vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a rendszer képes akár 5 próba-célterület mismatch esetén is működni anélkül, hogy a reakció hatékonysága, vagy érzékenysége csökkenne.

## 8. Felhasznált irodalom

- Ait-Ali, T., Wilson A.D., Westcott, D.G., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, M.A., Drew, T.W., Bishop, S.C., and Archibald, A.L. 2007. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated porcine alveolar macrophages. *Viral. Immunol.* 20, 105-118.
- Albina, E., Carrat, C., and Charley, B. 1998. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 485-490.
- Albina, E., Mesplede, A., Chenut, G., Le Potier, M.F., Bourbao., G., Le Gal, S., and Leforban Y. 2000. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet. Microbiol.* 77, 43-57.
- Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., and Lager, K.M. 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., and Pattnaik, A.K. 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994-4004.
- Balasureya, U.B. and MacLachan, N.J. 2004. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 107-129.
- Balka, Gy., Hornyák, Á., és Rusvai, M. 2004. A PRRSV diagnosztikájában használatos módszerek összehasonlítása (poszter). Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és 10. Fermentációs kollokvium. Keszthely, 2004. október 7-9.
- Balka Gy., és Rusvai M. 2006. Detection of PRRSV antigenes using a broad spectrum immunohistochemical metod on formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 53, 243-244.
- Balka, Gy., Hornyák, Á., Barna, T., Farsang, A., Kulcsár, G., and Rusvai, M. 2007. Transmission of a modified live virus vaccine from vaccinated to nonvaccinated pigs. Vaccine Congress, 9-11 December 2007, Amsterdam, The Netherlands In: *Proceedings of Vaccine Congress* p. 153.

- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, S.M., Goyal, D., Robinson, W.T., Christianson, R.B., Morrison, D., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diag. Invest.* 4, 127-133.
- Benfield, D. A., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R.R., Nelson, J.K., Chase, C.C.L., Rossow, K.D., and Collins, J.E. 1997. Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. In: *Proceedings of the 28<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Prac.* p. 455-458.
- Benfield, D.A., Nelson, C., Steffen, M., and Rowland, R.R.R. 2000. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. In: *Proceedings of the 31<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Prac.*, p. 405-408.
- Bonaliuri, P., Merialdi, G., Dottori, M., and Barbieri, I. 2006. Presence of PRRSV in wild boar in Italy. *Vet. Rec.* 158, 107–108.
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K. J., Have, P., Madsen, K. G., Madsen, E. S., and Alexandersen S. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497-499.
- Buddaert, W., Van Reeth K., and Pensaert, M. 1998. *In vivo* and *in vitro* interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 40, 461-467.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Carman, S., Sanford, S.E. and Dea, S. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario – 1978 to 1982. *Can. Vet. J.* 36, 776-777.
- Cavanagh, D. 1997. *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.* 142, 629-633.
- Cha, S.H., Choi, E.J., Park, J.H., Yoon, S.R., Sonf J.Y., Kwon, J.H., Song, H.J., and Yoon, K.Y. 2006. Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses. *Vet. Mic.* 117, 248-257.
- Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmermann, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J., and Benfield, D.A. 1995.

- Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 456-464.
- Choi, C., and Chae, C. 2002. Expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res. Vet. Sci.* 72, 45-49
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.E., and Chladek, D.W. 1992. Swine infertility and respiratory syndrome (Mystery swine disease). In: *Proc. Minn. Swine Vet. Conf.* 15-17.
- Costers, S., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis. *J. Gen. Virol.* 87, 2341-2351.
- Crotty, S., Cameron, C.E., and Andino, R. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6895-6900.
- Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., and Nauwynck, H.J. 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 179-188.
- Delputte, P.L., Costers, S., and Nauwynck, H.J. 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.* 86, 1441-1445.
- Delputte, P.L., van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R., and Nauwynck, H.J. 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J. Virol.* 81, 9546-9150.
- Domingo, E. 2000. Viruses at the edge of adaptation. *Virology.* 270, 251-253.
- Drew, T.W., Lowings, J.P., and Yapp, F. 1997. Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Vet. Microbiol.* 55, 209-221.
- Egli, C., Thür, B., Liu, L., and Hofmann, M.A. 2001. Quantitative TaqMan® RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vir. Meth.* 98, 63-75.



- Fang, L., Jiang, Y., Xiao, S., Niu, C., Zhang, H., and Chen, H. 2006. Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vir. Gen.* 32, 5-11.
- Fetzer, C., Pesch, S., and Ohlinger V.F. 2006. High risk of false positive results in a widely used diagnostic test for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 115, 21-31.
- Forsberg, R. 2005. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2131-2134.
- Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszcenz. *Ann. Phys.* 6, 55-75.
- Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belák, S., and Widén, F. 2007. Universal detection of Hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan® and Primer-Probe Energy Transfer. *J. Virol. Meth.* 146, 226-235.
- Hakhverdyan, M., Rasmussen, T.B., Thorén P., Uttenthal, Å., and Belák S. 2006. Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Arch. Virol.* 151, 2365-2376.
- Halbur, P.G., Andrews J.J., Huffman E.L., Paul P.S., Meng X.J., and Niyo Y. 1994. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 254-257.
- Halbur, P.G., Miller, L.D., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., and Rathje, J.A. 1996. Comparison of the antigen distribution of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32, 159-170.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., and Gojobori, T. 2005. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory viruses. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1024-1031.
- Hermann, J.R., Hoff S.J., Muñoz-Zanzi, C., Yoon K.J., Roof, M., Burkhardt A.C., and Zimmermann, J.J. 2007. Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols *Vet. Res.* 38, 81-93.
- Hornyák Á., Pálfi, V. és Karakas M. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon. Akadémiai beszámoló, 10. előadás.

- Hornyák Á., Bakonyi T., Tekes G., Szeredi L., and Rusvai M. 2005. A Novel Subgroup among genotypes of Equine Arteritis Virus: Genetic comparison of 40 strains. *J. Vet. Med. B* 52, 112-118.
- Horter, D.C., Pogranichniy, R.M., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J., and Zimmerman, J.J. 2002. Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 86, 213-228.
- Holland, J. J., De La Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176, 1-20.
- Indik, S., Schmoll, F., Sipos, W., and Klein, D. 2005. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet. Microbiol.* 107, 171-179.
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings J., Johnson, C.R., and Murtaugh, M.P. 2004. Pathogenic and humoral responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 233-247.
- Keffaber, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioner Newsletter*, 1, 1-9.
- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, K.Y., Joo, H.S., and Frey, M.L. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.
- Kim, T.S., Benfield, D.A., and Rowland, R.R. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Vir. Res.* 85, 133-140.
- Kim, J.K., Fahad, A.M., Shanmukhappa, K., and Kapil, S. 2006. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J. Virol.* 80, 689-696.
- Kiss, I., Kecskeméti, S., Tanyi, J., Belák, S., Ros, C., and Klingeborn, B. 1999. Observations on the quasispecies composition of three animal pathogenic RNA viruses. *Acta Vet. Hung.* 47, 471-480.
- Kiss, I., Kecskeméti, S., Tanyi, J., Klingeborn, B., and Belák, S. 2000. Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. *Res. Vet. Sci.* 68, 237-242.
- Kiss, I., Sámi, L., Kecskeméti, S., Hanada, K., 2006. Genetic variation of the prevailing porcine respiratory and reproductive syndrome viruses occurring on a pig farm upon vaccination. *Arch. Virol.* 151, 2269-2276.

- Kleiboeker, S.B., Schommer, S.K., Lee S.M., Watkins, S., Chittick W, and Polson, D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 165-170.
- Kristensen, C.S., Bøtner, A., Takai, H., Nielsen, J.P., and Jorsal, S.E. 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Vet. Microbiol.* 99, 197-202.
- Kwon, B., Ansari, I., Pattnaik., A.K., and Osorio, F.A. 2008. Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones. *Virology* doi: 10.1016/j.virol.2008.07.030.
- Labarque, G., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S., and Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183-4190
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., and Brockmeier, S.L. 1997. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58, 127-133.
- Lee, S.M., and Kleiboeker, S.B. 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365, 419-434.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Kjaing, W., and Jiang, P. 2007. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet. J.* 174, 577-584.
- Lindhaus, W. and Lindhaus, B. 1991. Rätselhafte Schweinkrakenheit. *Prakt. Tierarzt.* 72, 423-425.
- Lopez, O.J. and Osorio, F.A. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 155-163.
- Lurchachaiwong, W., Payungporn, S., Srisatidnarakul, U., Mungkundar, C., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. 2008. Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 55-60.
- Madsen, K.G., Hansen, C.M., Madsen, E.S., Strandbygaard, B., Botner, A., and Sorensen, K.J. 1998. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch. Virol.* 143, 1683-1700.

- Martelli, P., Cordioli, P., Fallacara F., Terreni M., and Cavirani S. Genetic diversity (ORF5) of PRRSV isolates from a herd with SAMS. 2003. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases p. 56-57.
- Martínez, E., Riera, P., Sitjá, M., Fang, Y., Oliveira C., and Maldonado J. 2008. Simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Res. Vet. Sci.* 85, 184-193.
- Mateu, E., Martín, M., and Vidal, D. 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J. Gen. Virol.* 84, 529-534.
- Mateu, E., Díaz, L., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., and Pujols, J. 2006. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res.* 115, 198-206.
- Medveczky, I. 1996. Áttekintés a sertés reprodukciós és légzőszervi szindrómájának (PRRS) újabb ismereteiről. *Magyar Állatorvosok Lapja* 51, 367-371.
- Medveczky, I., Bálint, Á., Makranszky, L., Steverink, P., and Jacobs L. 2001. Sequence analysis of the membrane protein gene and nucleocapsid gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a swine herd in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 49, 237-244.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., and Zuckermann, F.A. 2003. Gradual development of the interferon gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., and Lum, M.A. 1995. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch. Virol.* 140, 745-755.
- Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., de Meier, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kuyver, E.P., Wensvoort, G., and Moormann, R.J. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-72.
- Meulenberg, J.J.M. 2000. PRRSV, the virus. *Vet. Res.* 31, 11-21.
- Miller, L.C., and Fox, J.M. 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102. 131-142.

- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., and Faaberg, K.S. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol.* 73, 271-280.
- Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Bøtner, A., and Storgaard, T. 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 82, 1263-1272.
- Novotny, L.A., and Bakaletz, L.O. 2003. The fourth surface-exposed region of the outer membrane protein P5-homologous adhesin of nontypable *Haemophilus influenzae* is an immunodominant but nonprotective decoying epitope. *J. Immunol.* 171, 1978-1983.
- Oleksiewicz, M.B., Bøtner, A., Madsen, K.G., and Storgaard, T., 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet. Microbiol.* 64, 7-22.
- Oslage, U., Dahle, J., Muller, T., Kramer, M., Beier, D., and Liess, B. 1994. Prevalence of antibodies against the viruses of European swine fever, Aujeszky's disease and "porcine reproductive and respiratory syndrome" in wild boars in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 101, 33-38.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., and Lopez O.J. 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., and Pijoan, C. 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes (*Aedes vexans*) (Meigen). *Can. J. Vet. Res.* 66, 191-195.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Tricando, C., and Pijoan, C. 2003. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 152, 73-76.
- Papatsiros, V.G., Alexopoulos, C., Kritas, S.K., Koptopoulos, G., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., and Kyriakis, S.C. 2006. Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J. Vet. Med. B* 53, 266-272.
- Pesch, S., Meyer, C., and Ohrlinger, V.F. 2005. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 107, 31-48.

- Pirzadeh, B., and Dea, S. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J. Gen. Virol.* 78, 1867-1873.
- Pirzadeh, B., and Dea, S. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 79, 989-999.
- Plagemann, P.G.W. 2003. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg. Inf. Dis.* 9, 903-908.
- Prieto, C., and Castro, J.M. 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63, 1-16.
- Psikal, I., Moutelikova, R., Kosinova, E., Mojzis, M., Smid, B., Nejedla, E., Indik, S. and Rodak, L. 1999. Molecular identification and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in the Czech and Slovak Republics. *Proceedings of the 3rd Int. Symp. of PRRSV and Aujeszky* 1, 175-176.
- Rasmussen, T.B., Uttenthal, Å., de Stricker, K., Belák, S., and Storgaard, T. 2003. Development of a novel quantitative real time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 148, 2005-2021.
- Rasmussen, T.B., Uttenthal, Å., Fernandez J., and Storgaard, T. 2005. Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of Indiana and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 116, 169-176.
- Reiner G., Willems H., Hack I., Fresen C., and Hertrampf, B. 2007. PRRSV, PCV2, Influenza, and other pathogens of the respiratory tract in feral pigs from Germany – prevalences and peculiarities. In: *5th Int. Symp. On Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Krakow, Poland p.183.
- Ropp, S.L., Wees, C.E., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J. E., Benfield, D.A., and Faaberg, K.S. 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J. Virol.* 78, 3684-3703.
- Rossow, K.D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35, 1-20.
- Rowland, R.R.R., Steffen, M., Ackerman, T and Benfield, D.A. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence

- of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259, 262-266.
- Royae, A.R., Husmann, R.J., Dawson, H.D., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., and Lunney, J.K. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 199–216.
- Saito, T., and Gale, M. 2007. Principles of intracellular viral recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 17-23.
- Sandri, G.P., Pesente, P., Sperati-Ruffoni, L., Giovanardi, D., and Piemonti, D. 2006. PRRSV aerosol transmission: a documented case in the real world. In: *Proc. Intl. Pig Vet. Congr.*, I. p. 235.
- Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Mahlum, C., Mondaca, E., Otake, S., Fano, E., Collins, J.E., and Pijoan, C. 2004. Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 65, 1284 - 1292.
- Snijder, E.J., Dobbe, J.C., and Spaan, W.J.M. 2003. Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J. Virol.* 77, 97-104.
- Snijder, E.J., and Meulenber, J.J.M. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 83, 961-979.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Belák, S., Drew, T.W., and Pejsak, Z. 2002. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Eastern Europe: Towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1861-1873.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Potapchuk, D., and Podgórska, K. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835-1841.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Scherbakov, A.V., Timina, A.M., Krabbe, J.S., Chabros, K., and Potapchuk, D. 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153, 1479-1488.
- Suarez, P., Zardoya, R., Martin, M. J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., and Castro, J. M. 1996. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive

- and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Vir. Res.* 42, 159-165.
- Sur, J.H., Cooper, V.L., Galeota, J.A., Hesse, R.A., Doster, A.B., and Osorio, F.A. 1996. *In vivo* detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by *in situ* hybridization at different time post infection. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2280-2286.
- Sur, J.H., Doster, A.B., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmermann, J.J., Osorio, F.A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170-9179.
- Suradhat S., and Thanawongnuwech R. 2003. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.
- Suradhat S., Thanawongnuwech R., and Poovorawan. Y. 2003. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 453-459.
- Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmermann, J.J., Evans L.E., Landgraf J.G., Wills R.W., Sanderson T.P., McGinley, J.M., Brevik, A.J., Ciszewski, D.K., and Frey, M.L. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1943-1948.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit A., and Damrongwatanapokin S. 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet. Microbiol.* 101, 9-21.
- Tong G.Z., Zhou Y.J., Hao X.F., Tian Z.J., An T.Q., and Qiu H.J., 2007 Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [letter]. *Emerg. Infect. Dis.* 13 <http://www.cdc.gov/EID/content/13/9/1434.html>
- Toremorell, M., Polson, D., Henry, S.C., and Morrison, R.B., 2002. Specificity of the PRRSV IDEXX ELISA test in negative farms. *Proc. Intl. Pig. Vet. Congr. I.* p. 209.
- van den Born, E., Posthuma C.C., Gultjaev, A.P., and Snijder, E.J. 2005 Discontinuous subgenomic RNA synthesis in arteriviruses is guided by an RNA hairpin structure located in the genomic leader region. *J. Virol.* 79, 6312-6324.
- van Vugt, J.F.A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., and Bøtner A. 2001. High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome



- virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J. Gen. Virol.* 82, 2615-2620.
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., van Damme, J., van Voensel, P.A., and Nauwynck, H.J. 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207-8215.
- Voglmayr, T., Sipos, W., Schuh, M., Truschner, K., Griessler, A., Mourits, B., Schmoll, F. 2006. PRRSV-Eradikation in einem geschlossenen Herdebuchzuchtbetrieb ohne Unterbrechung der Produktion mit Einsatz einer Lebendvirus (MLV)-Vakzine und Schliessung der Herde. *Tierärztl. Prax.* 34, 241 - 248.
- Wasilk, A, Callahan, J. D., Christopher-Hennings, J., Gay, T.A., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M.E., Toremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., and Nelson, W.M. 2004. Detection of U.S., Lelystad, and European-Like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses and Relative Quantification in Boar Semen and Serum Samples by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4453-4461.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuysen, J. M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., de Veld, P., van't Groenland, G.J.R., van Gennip, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M., and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quart.* 13, 121-128.
- Wills, R.W., Zimmermann, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt K.B., Christopher-Hennings, J., and Nelson, E.A. 1997a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: A persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, 231-240.
- Wills, R.W., Zimmermann, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffmann, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., and Platt K.B. 1997b. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57. 69-81.
- Wills, R.W., Doster, A., and Osorio, F. 2002. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) to age-matched sentinel pigs. *J. Swine Health Prod.* 2002. 10. 161-165.
- Wissink, E.H.J., van Wijk, H.A.R., Kroese, M.V., Weiland, E., Meulenber, J.J.M., Rottier, P.J.M., and van Rijn, P.A. 2003. The major envelope protein, GP<sub>5</sub>, of a

- European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J. Gen. Virol.* 84, 1535-1543.
- Wissink, E.H.J., Kroese, M.V., Maneschijn-Bonsing, J.G., Meulenbergh, J.J.M, van Rijn, P.A., Rijsewijk, F.A.M., and Rottier, P.J.M. 2004. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP<sub>2a</sub> and GP<sub>5</sub> for infectious virus production. *J. Gen. Virol.* 85, 3715-3723.
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R.R., Christopher-Hennings, J., and Nelson, E. 2001. A 10 kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191
- Yoon, K.Y., Zimmermann, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M., and McGinley, M.J. 1999. Effect of challenge route and dose on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet. Res.* 30, 629-638.
- Zhou, L., Zhang, J.L., Zeng, J.W., Guo, X., and Yang H.C. 2008. The 30 amino acids deletion in nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus is not clearly related to its virulence. In: *Proceedings of the 2008 International Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Symposium*, p. 37.
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., and Osorio F. 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123. 69-85.

## 9. A témában megjelent tudományos publikációk

**Balka Gyula**, Rusvai Miklós, Kecskeméti Sándor, Kiss István: PRRS - újabb kihívás előtt a sertéságazat : 1. A vírus sajátosságai : Irodalmi összefoglaló és saját tapasztalatok. Magyar Állatorvosok Lapja, 2006. 128, 524-532.

**Balka Gyula**, Rusvai Miklós, Kecskeméti Sándor, Kiss István: PRRS - újabb kihívás előtt a sertéságazat. 2. A betegség járványtani, kórtani és immunológiai sajátosságai. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 2008. 130, 31-38.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, I. Kiss, S. Kecskeméti, T. Bakonyi, M. Rusvai: Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. Veterinary Microbiology 2008. 127, 128-135.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, Zs. Benyeda, M. Rusvai: Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Virological Methods, közlésre elfogadva.

### A témában tartott előadások, poszterek nemzetközi konferenciákon

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, I. Kiss, S. Kecskeméti, M. Rusvai (poszter): Genetic diversity of vaccine origin a wild type Porcine Reproductive and Respiratory virus strains circulating in Hungarian swine herds. 5<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Reemerging Pig Diseases, 24-27 June 2007, Krakow, Poland. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Reemerging Pig Diseases p.: 179.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, T. Barna, A. Farsang, G. Kulcsár, M. Rusvai (poszter): Transmission of a modified live virus vaccine from vaccinated to nonvaccinated pigs. Vaccine Congress, 9-11 December 2007, Amsterdam, The Netherlands In: Proceedings of Vaccine Congress p. 153.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, M. Rusvai (előadás): Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the

detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. EuroPRRSnet Workshop, 24-25 July 2008, Bruxelles, Belgium

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, M. Rusvai (poszter): Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. 5<sup>th</sup> International PRRS Symposium, PRRSV Reverse Genetics: From the Laboratory to the Field, 2008. December 5-6, Chicago, USA In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International PRRS Symposium p. 50.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastrukturális feltételeinek maradéktalan biztosításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratának lektorálásában nyújtott segítségéért, valamint a Tanszékünkön tapasztalható kollegiális, baráti légkör megteremtéséért szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Rusvai Miklós tanszékvezetőnek.

Köszönettel tartozom Dr. Hornyák Ákosnak, aki az általam használt molekuláris biológiai, szerológiai, és egyéb virológiai kutatási és diagnosztikai módszerek elsajátításában segített, és kivételes elhivatottságával, munkabíráásával nagy mértékben segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Vetési Ferencnek, témabizottságom tagjának, hogy a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékre kerülésemtől kezdve pártolta, és segítette munkámat, és lehetőséget biztosított számomra, hogy eredményeimet hazai tudományos konferenciákon előadhassam.

Köszönöm a volt debreceni Állategészségügyi Intézet munkatársainak, Dr. Kiss Istvánnak, és Dr. Kecskeméti Sándornak, hogy az általuk munkám kezdetéig, a témában elvégzett kutatásaik eredményeit önzetlenül átadták. Köszönöm Dr. Becskei Zsoltnak, a szabadkai Állategészségügyi Intézet munkatársának, aki a szerbiai mintákat a rendelkezésünkre bocsátotta.

Külön köszönöm továbbá kollégáimnak, Dr. Mándoki Mírának, Dr. Jakab Csabának, Dr. Gál Jánosnak, Dr. Demeter Zoltánnak, Dr. Palade Alinának, és Dr. Benyeda Zsófiának, hogy külföldi tanulmányútjaim során, valamint a kutatáshoz szükséges mintagyűjtés céljából végzett kiszállások esetén diagnosztikai és oktatási feladataim alól tehermentesítettek.

Köszönöm családomnak, szeretteimnek és barátaimnak, hogy támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették számomra hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.