

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

A sertések 2 típusú cirkovírusa és citomegalovírusa okozta megbetegedések komplex vizsgálata hazai állományokban

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Deim Zoltán

Országos Állategészségügyi Intézet

2006

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola elnöke:
Dr. Rudas Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Témavezető:

Dr. Glávits Róbert, kandidátus, osztályvezető
Országos Állategészségügyi Intézet,
Kórszövettani osztály

Témabizottsági tagok:

Dr. Tekes Lajos, kandidátus, főigazgató
Országos Állategészségügyi Intézet

Dr. Biksi Imre Ph.D., diagnosztikai laboratóriumvezető
Szie-ÁOTK, Nagyállatklinika Diagnosztikai laboratórium

.....
Dr. Deim Zoltán

Előzmények és célkitűzések

Az utóbbi években a hazai és külföldi sertésállományokban is több olyan vírusfertőzés [sertések légzőszervi és szaporodási zavarát okozó vírus, (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV), a sertés cirkovírus 2 (Porcine Circovirus type 2, PCV-2)], valamint a sertés citomegalovírus (Porcine cytomegalovirus, PCMV) jelent meg, amelyek különböző szervek megbetegítésével, valamint az állatok védekező-mechanizmusának károsításával jelentős gazdasági veszteséget okoznak. Közülük egyes vírusok megváltoztatják (csökkentik, vagy kóros mértékben fokozzák) a légzőszervek (és az egész szervezet) fertőzések elleni védelmében kulcsszerepet játszó sejtek működését. A különböző szervek súlyos károsodása akár már önmagában is az állat elhullását okozhatja, de még lényegesebb, hogy a szervezet fogékonyra válik különböző, nagyrészt fakultatív patogén ágensek (baktériumok, gombák, protozoonok stb.) kártételével szemben. További közös jellemzője az említett fertőzéseknek, hogy járványtanuk, kórfejlődésük, a kórokozók szervezettel kialakított kölcsönhatása még csak részben, vagy egyáltalán nem tisztázott. Az említett vírusok közül tervezett kutatásaimban elsősorban a PCV-2-vel és a PCMV-vel foglalkoztam.

A PCV-2 okozta fertőzöttség leggyakrabban két eltérő klinikai, és kórtani formában jelentkezik. Az egyik forma a sertések ún. választás utáni cirkovírusos sorvadása (PMWS), amely elsősorban választás után (40-60 napos életkorú) állatokban fordul elő. Heveny esetek lázas hőmérsékletemelkedéssel, légzőszervi tünetekkel, valamint több-kevesebb elhullással járnak. Az elhúzódó forma – innen ered a tünet együttes elnevezése is –, az állomány szétnövését, fejlődésben való visszamaradást, valamint immunszuppressziót, következményes (leggyakrabban baktériumos) fertőzések előfordulását idézi elő. A PCV-2 okozta betegség másik lényeges megjelenési formája a dermatitis-nephropathia szindróma (PDNS), jellegzetes bőr- és veseelváltozásokkal jár. A vírus a lymphocytákban és a macrophagokban szaporodik, ennek megfelelően a lymphoid szervekben enyhébb-súlyosabb lymphocytá depletio, valamint a több szervben lympho-histiocytás beszűrődéssel és macrophag-proliferációval kísért interstitialis gyulladás figyelhető meg. A fertőzöttség kimutatására szerológiai, molekuláris biológiai, virológiai módszerek alkalmazhatók. A lymphocytá populációkban és a macrophagokban a vírus hatására bekövetkező változások, pl. áramlás-citometriai és *in situ* hibridizációs (ISH) módszerekkel detektálhatók.

A PCMV fertőzés egyes sertésállományokban gazdasági kártétellel is járó betegséget, ún. sejtzárványos rhinitist okoz. A betegséget Magyarországon 2002-ben állapították meg először Deim és mtsai (Deim és mtsai., 2003). A PCMV a Betaherpes alcsaládba tartozó citomegalovírus, amely szintén a macrophagokban és a lymphocytákban, valamint az ornyálkahártya mirigyhámsejtjeiben szaporodik. A vírusfertőzés klinikai tünetekben megnyilvánuló formája szopós malacokban jelentkezik, és jelentős arányú elhullást okozhat. Hatására elsősorban a légzőszervekben és a nyirokszervekben jelentkezik lympho-histiocytás gyulladás. A vírusfertőzöttség igazolása szerológiai, molekuláris biológiai, virológiai módszerekkel lehetséges.

A tervezett kutatás során mindenekelőtt adatokat kívántam szerezni az említett vírusfertőzések hazai sertésállományokban tapasztalható elterjedtségéről. Ehhez statisztikailag érvényes véletlenszerű mintavételezést, valamint kórbonctani-kórszövettani, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztem. Kutatásom további célja volt annak vizsgálata, miként befolyásolja a PCV2 és/vagy a PCMV fertőzés a sertések immunrendszerének működését. Az előbbieket mellett a fertőző eredetű betegségek diagnosztizálására az *in situ* hibridizációs (ISH) módszert fejlesztettem ki, és ennek segítségével tanulmányoztam a vírusok támadáspontját és kártételét. Vizsgálataim eredményei megítélésem szerint tudományos adatokat szolgáltathatnak a sertések immunrendszerének vírusfertőzés hatására bekövetkező károsodásáról, illetve az említett kórokozók hazai elterjedtségéről és kártételéről. A munka során szerzett tapasztalatok elősegíthetik a fentiekben említett kórképek diagnosztizálását.

Anyag és módszer

A diagnosztikai célú kórboncolást követően mintákat gyűjtöttem további kiegészítő vizsgálatokhoz.

A kórszövettani feldolgozás során 10 %-os pufferolt formaldehid oldatban történő fixálást alkalmaztam, majd 12-24 óra fixálódást követően a vizsgálandó mintákat paraffin blokkokba ágyaztam be. Ezután 4 µm vékony metszeteket készítettem, és azokat zsírtalanított üveg tárgylemezen hővel fixáltam azokat. A rutin szövettani festések közül a haematoxilín-eosint alkalmaztam.

A vírus DNS jelenlétét és a vírus okozta károsodást *in situ* hibridizációs módszerrel vizsgáltam. A próbát *in vitro* szintetizáltam a vírus ORF-2 régiójából PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) segítségével DIG-UTP jelenlétében. A jelölt próbák kötődését anti-DIG antibody konjugátum segítségével jelöltem és NBT/BCIP-pel (Roche, Basel, Switzerland) tettem láthatóvá. Az így kapott preparátumok jól értékelhetőek voltak, elhanyagolható háttérrel.

A szövetekben jelen lévő vírus antigént immunhisztokémiai módszerrel tanulmányoztam. A deparaffinálást követően a metszeteket 0, 1 %-os protease XIV (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) oldattal 37°C-on 10 percig inkubáltam, ezután 3%-os H₂O₂ oldatban 10 percig, majd 2%-os tejpor oldattal 37°C-on, 10 percig kezeltem. A PCV-2 kimutatását egy a kereskedelmi forgalomban kapható egérben előállított monoklonális ellenanyaggal (36A9) végeztem (Ingenasa, Madrid, Spanyolország). A metszeteket az 1:15000-ben hígított monoklonális ellenanyaggal 37°C-on 20 percig inkubáltam. Az antigén-ellenanyag kapcsolódás kimutatását tormaperoxidázzal jelölt polimer tartalmazó tesztel végeztem el (EnVision™ + anti-mouse HRP, Dako, Glostrup, Dánia). Kromogénként a 3-amino-9-ethylcarbazole oldatot használtam (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), és a kontrasztfestést Mayer-féle hematoxilinnel végeztük. Negatív kontrollként egy szériametszeten a PCV-2 specifikus ellenanyagot foszfátpuffer-oldatra cseréltem. A metszetek vizsgálatakor megfigyeltem és értékeltem a vírusok kártételét, a szöveti reakciókat, valamint az antigén lokalizálódását.

A PCR vizsgálatok során a szervek homogenizálást követően a nukleinsavat a mintákból BIO-RAD AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) segítségével vontam ki. A PCR reakciókat a vírus egy adott régiójára tervezett primerekkel végeztem el, és ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma, St. Lois, MO, USA) enzimet használtam. A PCR reakcióban kapott terméket 0.5 µl/ml ethidium bromide-os 1,5 % agaróz gélben tettem láthatóvá.

Eredmények

Az Országos Állategészségügyi Intézetbe 2003-2005 közötti időszakban 3356 sertés és 785 magzat érkezett kórhatározás céljából. Célrányosan PCV-2 irányba történő PCR vizsgálatokat 1250 sertés szerveiből végeztem el, és 1190 esetben (92,5 %) kaptam pozitív eredményt. A cirkovírusos fertőzöttség PMWS formája a klinikai tünetek és a patomorfológiai elváltozások alapján 789 (63,12 %) sertésnél került megállapításra és ezekben PCR vizsgálatok PCV-2 szempontjából valamennyi esetben pozitív eredményt adtak. A PDNS a két éves időszakban 34 (2,72%) esetben állapítottam meg.

A PMWS heveny és idült formáinak kórbonctani és kórszövetteni jellegzetességei

	PMWS heveny forma	PMWS idült forma
lép: lymphocyta depletio	+	+
nyirokcsomók: lymphocyta depletio elhalások, zárványok	+	+
	-	+
vese: interstitialis gyulladás	-/+	+
máj: interstitialis gyulladás	-/+	+/-
tüdő: interstitialis gyulladás	+	+
syntitialis óriássejt interstitialis vizenyő	-	+
	+	+/-
Mellvízkór és/vagy szívurokvíz kór	+	-/+
agyvelő: perivasculitis	-/+	-/+
senyvesség, fejlődésben való visszamaradás	-	+

Az elváltozást mutató szervek gyakorisága 21 PDNS-ben elhullott sertésben
(elváltozások száma/vizsgált szervek száma; %)

Bőr	Vese	Máj	Tüdő	Agyvelő	Nyirokcsomó, lép
21/21; 100%	21/21; 100%	9/21; 42,9%	15/21; 71,4%	3/21; 14,3%	15/21; 71,4%

Az ISH vizsgálatok során PCV-2 nukleinsavat a vizsgált szervekben nagyrészt intracellulárisan, a sejtek cytoplasmájában lehetett kimutatni. A PCV-2 specifikus nukleinsavat a vesében a Bowman-tok parietális- és viscerális falának epithelsejtjeiben, a tubulushámsejtjeiben valamint a lymphocytákban, a histiocytákban és az óriássejtjeiben (16. kép.) figyeltem meg, a bőrben pedig a vérerek endothelsejtjeiben (17. kép.), valamint a lymphocytákban és a histiocytákban lehetett kimutatni. A két kórképet (PMWS, PDNS) azonos tulajdonságú, de különböző szekvencia sorrendű vírus okozza.

A PCV-2 szaporodási zavart okozhat, ahol a thymus súlyosfokú károsodását figyeltem meg („biológiai thymectomia”), amely alapján felmerül, hogy ez a folyamat szerepet játszhat a PMWS kórfejlődésében.

A sejtzárványos rhinitist elsőként állapítottam meg Magyarországon. A betegséget 2004-2005 években további 15 hazai sertésállományban ismertem fel, és 49 állományból származó malacok közül 35 állomány fertőzöttségét mutattam ki.

Legfontosabb eredmények

1. Kutatómunkám során elsőként gyűjtöttem adatokat a PCV-2 hazai elterjedéséről.
2. Megismertem a PCV-2 okozta kórképek előfordulásának gyakoriságát a hazai sertésállományok egy részében.
3. Megállapítottam, hogy a vaddisznókban a cirkovírus és a betegségre jellemző elváltozások is jelen vannak.
4. Összehasonlító vizsgálatokat végeztem a PMWS akut és elhúzódó formái között.
5. A vírusok (PCV-2, PCMV) kimutatására irányuló *in situ* hibridizációs módszert dolgoztam ki.
6. Munkatársaimmal kifejlesztettük a PCV-2 antigén vizsgálatára alkalmas immunhisztokémiai módszert.
7. A vírusok okozta károsodásokat, valamint a vírusok támadáspontját vizsgáltam ISH és IH módszerekkel, és ezáltal új ismeretekhez jutottam a vizsgált kórképek patogenezisében.
8. A PDNS-re utaló elváltozásokat mutató sertésekben megállapítottam, hogy a vérérkárosodás, thrombotisatio, vérzések, elhalások (bőrben, vesében, stb.) háttérben az érfalak endothelsejtjeiben kimutatott PCV-2 oktani szerepe valószínűsíthető és mivel a PDNS idősebb sertésekben csak sporadikusan fordul elő, ezért a kórkép kialakulásának a háttérben az egyedi érzékenység illetve válaszreakciók állhatnak.
9. A PCV-2 szaporodási zavarát vizsgálata során a thymus súlyosfokú károsodását figyeltem meg („biológiai thymectomia”), amely alapján felmerül, hogy ez a folyamat szerepet játszhat a PMWS kórfejlődésében.
10. A PCV-2 okozta kórképeket (PMWS, PDNS) különböző szekvenciájú vírusok okozzák, bár ez a szekvenciabeli különbség aminosav változással nem járt.
11. A cirkovírus szövetekben történő szaporodása és az általa okozott szöveti elváltozások között szoros összefüggést állapítottam meg.
12. Elsőként állapítottam meg Magyarországon a sejtzárványos orrgyulladást.
13. IH módszerekkel vizsgáltam a PCMV sejt szintű támadáspontját és a vírus okozta károsodásokat.
14. A PCMV fertőzés három megjelenési formáját észleltem (kocák szaporodási zavara, újszülött malacok hirtelen elhullása, szopós malacok klinikai tünetekben megnyilvánuló forma).
15. A PCMV a vizsgált állományokban széles körben elterjedt.

Az értekezés alapját képező szakcikkek és előadások

Szakcikkek

1. **Z. DEIM**, R. GLAVITS, I. BIKSI, L. DENCŐ, AGNES RACZNE M. First report of porcine inclusion body rhinitis in Hungary, Vet. Rec., Közlésre elfogadva
2. SZEREDI L., **DEIM Z.**: A sertések 2-es típusú cirkovírusának (PCV-2) immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása az ún. választás utáni sorvadásban és dermatitis nephropathia szindrómában elhullott sertések szerveiből, MÁL, 2005. 8, 463-470
3. **DEIM Z.**, DENCŐ L., BIKSI I., RÁCZNÉ M. Á., GLÁVITS R.: Adatok a sertések dermatitis-nephropathia szindrómájának kóroktanához és kórfejlődéséhez, MÁL, 2005. 4, 207-212
4. **Z. Deim**, R. Glavits, F. Szalay, K. Ursu, I. Biksi: Porcine bursitis: Cystic adventitial disease of the vena saphena, Vet. Rec., Közlésre elfogadva
5. D. Cadar, A. Cságola, Á. Dán, **Z. Deim**, Marina Spînu, V. Miclăuş, L. Köbölkuti, G. Czirják, T. Tuboly: Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania, Vet. Rec., Közlésre elküldve
6. **Z. Deim**, L. Dencso, R. Glavits, I. Biksi: A role of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets, Vet. Rec., Közlésre elküldve

Előadások

1. **DEIM ZOLTÁN**, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Újabb ismeretek a sertések dermatitis nephropathia szindrómájának kóroktanához és kórfejlődéséhez. Köves-napok, Nyíregyháza, 2005
2. **DEIM ZOLTÁN**, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Adatok a sertések dermatitis nephropathia szindrómájának (pdns) kóroktanához és kórfejlődéséhez. MTA akadémiai beszámolók, Budapest, 2005
3. **DEIM ZOLTÁN**, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. A sertés cirkovírus (pcv-2) oktatási szerepének vizsgálata a kocák egyes szaporodási zavarai és a magzatok károsodásában. MTA akadémiai beszámolók, Budapest, 2005
4. **DEIM ZOLTÁN**, DENCŐ LÁSZLÓ, BIKSI IMRE, RÁCZNÉ M. ÁGNES, GLÁVITS RÓBERT. Újabb ismeretek a sertések PCV-2 okozta betegségről VI. Országos sertés-konferencia, Budapest, 2004
5. **DEIM ZOLTÁN**, GLÁVITS RÓBERT, BIKSI IMRE, DENCŐ LÁSZLÓ, RÁCZNÉ M. ÁGNES. A sejtzárványos rhinitis hazai sertésállományokban. MTA Akadémiai beszámolók, Budapest, 2004
6. **DEIM Z.**, Glávits R, Szalay F, , Ráczné M. Ágnes, Ursu K, Biksi I. Az ún. adventitialis bursitis (csánkfeletti nyálkatömlő gyulladása) kliniko-patológiai jelentősége és oktatási vizsgálata. Köves-napok, Komárnó, Szlovákia, 2004
7. **DEIM ZOLTÁN**, GLÁVITS RÓBERT, BIKSI IMRE, DENCŐ LÁSZLÓ, RÁCZNÉ M. ÁGNES. A sejtzárványos rhinitis első megállapítása hazai sertésállományokban. Köves-napok, Kecskemét, 2003