



**A vírusos lóarthritis hazai elterjedtségének és a vírus genetikai
állományának vizsgálata**

című
doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Készítette:
Dr. Hornyák Ákos

Budapest
2005

Témavezető:

Dr. Rusvai Miklós, egyetemi tanár,
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Varga János, egyetemi tanár, az MTA levelező tagja,
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Dr. Kulcsár Gábor, osztályvezető
Állatgyógyászati Oltóanyag-, Gyógyszer és Takarmányellenőrző
Intézet

.....
Dr. Hornyák Ákos

Előzmények és célkitűzések

A vírusos lóarteritis a lovakban és egyéb lófélékben előforduló betegség, amelyet a lóarteritis vírus (equine arteriitis virus, EAV) által előidézett fertőzés okoz. Nevét a vírus által kiváltott kisarteria-gyulladásról kapta; az ennek következtében fellépő kórkép tünetei igen változatosak az enyhétől a súlyos, olykor elhulláshoz vagy veteléshez vezető esetekig. A vírus terjedésében két fertőzési forma játszik szerepet, az egyik az aerogén-orális, a másik a venereális fertőzés. Az előbbi esetén a fogékony lovak a fertőzött állatokból származó testváladékoktól cseppfertőzés formájában (aerogén úton), vagy az ilyen váladékokkal szennyezett takarmánytól, ivóvíztől, ragályfogó tárgytól (zabla, jászol, önitató, stb.) fertőződnek (orális forma). Ezt a fertőzési formát bármely korú és ivarú állat esetében megfigyelhetjük. A venereális forma esetén a fertőzés terjesztésében és fenntartásában a mének szerepe fontos, mert ilyenkor az ondóval ürülő vírus okozza a fertőzést (mind hagyományos, mind mesterséges termékenyítés esetén). Ez utóbbi forma azért is jelentős, mert a fertőzött mének hosszú ideig, vagy akár élethossziglan is vírushordozók és ezzel vírusterjesztők maradhatnak. A vírus ebben az esetben az immunrendszer számára hozzáférhetetlenül, a járulékos nemi mirigyekben marad fenn, és ezért nem a spermiumsejtekkel, hanem az ondófolyadékkal ürül a szervezetből. Ez a tartós vírushordozás tesztoszteronfüggő, tehát egyrészt csak az ivarérettség után (kb. egy éves kor fölött) történő fertőződés esetén alakul ki, másrészt ivartalanítás esetén a vírushordozás megszűnik. A nemzetközi szakirodalom adatai szerint a fertőzésen átesett mének kb. egyharmada válik tartós vírushordozóvá.

A vírust először 1953-ban izolálták az Egyesült Államokban, de azóta számos országban sikerült a kórokozót kimutatni. Az EAV genetikai térképezését kezdetben a kutatók az RNS kétdimenziós oligonukleotid ujjlenyomat technikával végezték, de a vírus törzsfa rekonstrukciós vizsgálataihoz hamarosan új módszerre volt szükség, ez az RT-PCR eredményeként keletkező amplikonok direkt szekvenálása és az azt követő szekvencia elemzés volt. Magyarországon a múlt század 30'-as éveiben írtak elsőként a betegségről, majd hosszú idő után a 1995-ben jelent meg újabb közlemény, mely a hazai szeroprevalencia adatait és az azokból levonható következtetéseket tartalmazza. Röviddel később egy magyarországi konferencián hangzott el egy hazai méh ondómintájából a vírus nukleinsav első, magyar szakemberek által történt kimutatásának bejelentése, mely RT-PCR módszerrel történt. Hazánkban 2001-ig az EAV-t nem sikerült sejten belülről izolálni, melynek fő oka a vírus sejten belüli elszaporításának viszonylagosan körülményes technikai módszereiben rejlik.

Saját, tudományos munkám kezdetéig végzett vizsgálataink részben bizonyították azt, hogy a vírusfertőzés Magyarországon is viszonylag elterjedt (35%). A vizsgált állományokban a szeropozitivitás százalékos aránya az állomány nagyságától és a lovak korától függő mértékben arányosan növekszik. Ugyanakkor hazánkban is egyre nagyobb igény mutatkozott az EAV sejttenyészetten történő izolálására, valamint részletes vírusgenetikai vizsgálatok elvégzésére és azok publikálására.

Tudományos munkám megkezdésekor a fent leírt tények ismeretében és azokkal összhangban az alábbi célok megvalósítását tűztük magunk elé.

1. Az EVA hazai jelentőségének, valamint a kancák vetélésében kiváltott oktani szerepének felderítése.
2. Szerológiai vizsgálatok végzése két célból: Az EVA fertőzöttség mértékének pontosabb felderítése, valamint a vírusűrtésért elsődlegesen felelős perzisztensen vírushordozó mének felderítése céljából.
3. Vírusizolálással hazai EAV törzseket gyűjteni, részben azok részletes fehérje és nukleinsav vizsgálata céljából, részben pedig a vírusokat archiválni akartuk további kutatások céljából.
4. Terveztük valamennyi EAV törzssel reagáló, egy vagy több monoklonális ellenanyag létrehozását, mely rutinszerűen alkalmazható a szerológiai, a direkt víruskimutatási és az immunhisztokémiai diagnosztika területén.
5. Terveink között szerepelt két különböző céllal alkalmazható polimeráz-lánreakción alapuló vírusnukleinsav kimutatási eljárás, egy diagnosztikai és egy szekvencia összehasonlításra tervezett RT-PCR kidolgozása.
6. A rendelkezésre álló vírusok számítógépes szoftverek segítségével történő genetikai összehasonlítását terveztük más hazai EAV törzsekkel és a nemzetközi számítógépes adatbázisban tárolt szekvenciákkal.

Anyag és módszer

Alkalmazott szerológiai próba

A szerológiai módszerek közül a nemzetközi standardnak megfelelően a komplementdependens vírusneutralizációs próbával végzett ellenanyag-kimutatást (OIE Manual of Standards 2000) Rabbit Kidney-13 (RK-13) sejtvonalon, a referens Bucyrus vírustörzssel végeztük.

Vírusizolálás

297 ondómintát 3×15 másodpercig, jégfürdőben 15 kHz frekvenciájú ultrahanggal kezeltünk, majd Ig_{10} alapú hígítási sort készítettünk és párhuzamosan 1:1000 hígításig, adszorpciós technikával, 24 órás egyrétegű sejttenyészetre oltottuk. 177 vetélt magzat, 19 újszülött csikó szervmintáit (lép, máj, tüdő, esetenként magzatburok), valamint 61 leukocitát, 25 orrviládék- és 4 vizeletmintát ultrahangkezelés nélkül hasonló módon sejttenyészetre oltottunk. Az inkubációs idő után a tenyészeteket 2%, kolosztrummentes újszülött borjúsavót és 0,75% karboxi-metil-cellulózt tartalmazó félfolyékony tápfolyadékkal fedtük. A két leggyakrabban használt sejtvonal a BHK-21 és az RK-13 voltak.

Koncentrált, tisztított EAV szuszpenzió előállítása

A referens Bucyrus vírustörzssel 0.01 TCID₅₀ vírus/sejt moi (multiplicity of infection) aránnyal fertőztük a sejteket. A vírusszuspenziót két részre osztottuk és egyik feléből Freon 113 és 2,5 % Sephadex G200 oldatokkal kivontuk a vírust, majd a vizes fázist 11% (wt/wt) céziumklorid (CsCl) párnára rétegeztük és $120\,000 \times g$ gyorsulással, 4°C-on, 4 órán át centrifugáltuk. A vírus pelletet NET pufferben vettük fel, ultrahangoztuk, majd 11-33%-os, folyamatos CsCl gradiens közegben $104\,000 \times g$ mellett, 17 órán keresztül (egy éjszakán át), 4°C-on ultracentrifugáltuk. A tisztított vírust NET pufferben reszuszpendáltuk, és ezzel a vírusszuspenzióval Balb/c egereket immunizáltunk.

A kiinduláskor kettéosztott vírushozmennyiség másik részét sejtmentesítés után 30%-os, (wt/wt) cukorpárnán, $80\,000 \times g$ erővel, 5 órán keresztül, 4°C-on ultracentrifugáltuk. A vírus pelletet NET pufferben reszuszpendáltuk, és PBS-sel szemben 48 órán át dializáltuk. A tisztított vírus infektív titerét Reed-Muench módszere alapján meghatároztuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Monoklonális ellenanyagok előállítása

A fent leírt módon immunizált Balb/c egerekből vérmintákat vettünk és a vérsavók ellenanyag titerét indirekt ELISA, immunperoxidase monolayer assay (IPMA) módszerrel és VN teszttel (VNT) meghatároztuk. A legjobb ellenanyag választ mutató egér lépből kivont lymphocyták fúzióját Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejtekkel, savó mentes RPMI 1640 tápfolyadékban oldott 50% polyethylene glycol-1500 jelenlétében végeztük. A kapott hibrid sejteket HAT tápoldat segítségével szelektáltuk. A sejtfelülűszoikat indirekt ELISA szerológiai vizsgálattal teszteltük. A további vizsgálatokban használt két klónt (1H1 és 4G6), melyeket az IPMA és a VNT eredménye alapján válogattunk ki, kétszer klónoztuk a véghígítás módszerével. A sejteket

elszaporítottuk, majd ezeket használva Mini Perm bioreaktorban ellenanyagokat állítottunk elő.

SDS-PAGE és immunoblot

A cukorpárnán tisztított Bucyrus vírusszuszpenziót hőkezelés után 15% akrilamid tartalmú, szakaszos, SDS-poliakrilamid géltre mértük. Az elektroforézist Pharmacia Biotech Hoefer készülékben, szobahőmérsékleten végeztük, majd a fehérjét a nitrocellulóz membránra vittük át (Towbin és Mutsaers, 1979). A membrán fehérjekötő kapacitását 4% sovány tejpor tartalmú PBST-vel blokkoltuk. A membránt ezután csíkokra vágtuk, és a 2 IPMA pozitív hibridoma klón hígított felülszóját tartalmazó csövekben egy éjszakán át inkubáltuk. A membráncsíkokat HRPO-val jelzett, kecskében termelt, anti-nyúl IgG konjugátum hígított oldatával rázógépen inkubáltuk, majd 4-kloro-1-naftolt és 0,03 % H₂O₂-t tartalmazó szubsztrát oldatot adtuk hozzá.

A vírus RNS-ek izolálása

Az RNS izolálást perzisztensen fertőzött mének ondómintáiból, vetélt lómagzatok szervmintáiból, orrváladék-, leukocita- és vizeletmintákból kíséreltük meg, két különböző módszerrel.

1. Chomczynski továbbfejlesztett módszere szerint (1987), annak Tri reagens kezeléssel kiegészített változatával.
2. QIAamp® Viral RNA Mini Kit felhasználásával, a gyártó utasítása szerint (Nakazato és Edmonds, 1972).

RNS átírása DNS másolattá (cDNS)

Kezdetben a tisztított vírus RNS-t egy különálló lépésben írtuk át cDNS-sé (reverz transzkripció): az izolált vírus RNS-ről a 3' leolvasatlan régióra tervezett EAV specifikus primer segítségével szintetizáltunk cDNS szálakat. Az átíráshoz RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitet alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint.

Később a Qiagen OneStep RT-PCR kisset alkalmaztunk úgy, hogy a tisztított EAV RNS-t közvetlenül a PCR-t megelőzően, egy lépésben történő reakció keretén belül írtuk át cDNS-sé. Ekkor az RNS átírásához használt primer megegyezett a PCR során használt reverz irányultságú primerrel. Ezt a folyamatot is a gyártó leírásának megfelelően végeztük.

Reverz-transzkripciót követő polimeráz lánreakció (RT-PCR)

A korábban használt kétlépéses RT-PCR esetében a polimeráz lánreakció során alkalmazott genomikus (forward) primer az EAV genom ORF 7, a

reverz primer pedig a 3' NTR régióra tapadt. A polimeráz lánreakciót MJ Research MiniCycler-rel végeztük.

Az egy lépéses PCR esetében az RNS átírást ugyanabban a reakciócsőben a nukleinsav erősítés, a tulajdonképpeni polimeráz lánreakció követte. touchdown PCR módszerrel.

A filogenetikai vizsgálatokhoz az EAV ORF5 régió három variábilis részét közrefogó, génszakasz amplifikálására terveztünk egy nested és egy egy lépéses RT-PCR-t, melyek külső genomikus primere az ORF 4 3' vég felőli, külső reverz primere az ORF 6 5' vég felőli, belső genomikus és belső reverz primerei az ORF 5 régióba tapadtak. Ez utóbbi primerpárt használtuk az egy lépéses RT-PCR-nél is.

A termékek szekvenálása és a szekvenciák elemzése

Az általunk kapott szekvenciákat a referens Bucyrus EAV törzs komplett RNS genomját tartalmazó X53459 génbanki akcessziós számú, valamint az NCBI (National Center for Biotechnology Information) génbankban található, általunk kiválasztott EAV szekvenciákkal hasonlítottuk össze; ehhez a FASTA és a BioEdit 4.7.8 számítógépes programokat használtuk. A többszörös szekvencia-illesztéshez a BioEdit 4.7.8 és a Clustal W 5.a szoftver számítógépes programokat alkalmaztunk. A filogenetikai fa létrehozásakor a szekvenciapárok közötti távolságot a DNADIST számítógépes program, Kimura 2 paraméteres modell, 2-es arányú transition/transversion segítségével határoztuk meg. A DNADIST programmal létrehozott távolsági matrixból (distance matrix) a FITCH programmal készítettünk törzsfát.

Eredmények

A 987 ló vérsavóból 266 származott ménekből, ezek közül 112 tartalmazott arteritis vírus ellen képződött ellenanyagokat (42,11%). A méneken kívül 155 vetélt kancának a savójából 83-ban mutattunk ki EAV ellenanyagokat (53,55%), míg a klinikai tüneteket nem mutató 316 lótlól származó vizsgálati minta feldolgozása során 171 bizonyult pozitívnak (54,11%), 145 pedig negatívnak. Összességében az ország különböző, (elsősorban nagy létszámú) méneseiből származó vizsgált savók 49,83%-a bizonyult pozitívnak.

Víruskimutatás izolálással, azt követő Mab festéssel és RT-PCR-rel

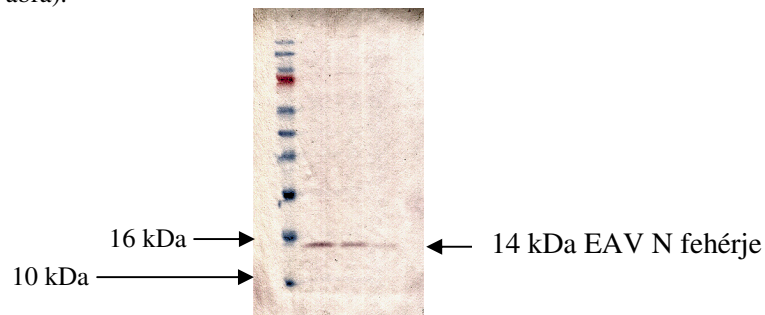
A három direkt víruskimutatási eljárás összesített eredménye szerint 280 mén 27 ondómintájából (9,64%), 177 vetélt lómagzat vizsgálatát követően 3 magzat szervmintáiból (1,69%), valamint 19 újszülött csikó közül 1 állat szerveiből mutattunk ki vírust vagy EAV nukleinsav szekvenciát.

A három módszer egymással szignifikáns korrelációt mutatott friss minták vizsgálata esetén, míg a több hónapig fagyasztva tárolt mintáknál jelentős különbség mutatkozott érzékenység tekintetében az RT-PCR javára.

A módszerek specifikussága a szekvenáláshoz használt RT-PCR-t kivéve 100%-osnak bizonyult.

Monoklonális ellenanyag (McAb) előállítás

Sikerült specifikus, az EAV N fehérje ellen termelt McAb-ot létrehozunk (1. ábra).

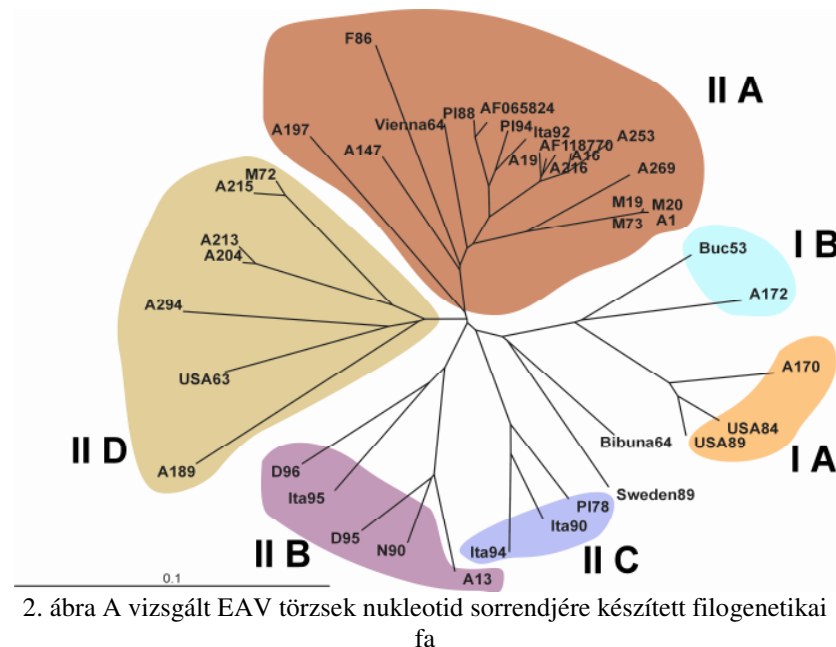


1. ábra EAV N fehérje és jelzett McAb felhasználásával készült immunblot

A McAb nemcsak a sejten történő víruskimutatásban mutatkozott sikeresnek, hanem vetélt lómagzatok szerveinek szövettani vizsgálatánál a direkt vírusantigén kimutatási eljárásban is, továbbá felhasználásával in vitro sejten (PLA módszerrel) kimutattam az EAV fertőzött sejt magjában is a nukleokapszid fehérjét.

A hazai EAV törzsek szekvencia meghatározása

Az ORF 5 génszakaszra tervezett belső primerpárral sikerült a hazai vírusokból egylépéses RT-PCR módszerrel azok teljes hipervariábilis régióinak amplifikálásával megfelelő mennyiségű DNS-hez jutnunk, melyek szekvenálásával új információt szereztünk a Magyarországon jelenlévő arteritis vírusokról. Az így nyert vírus-szekvenciákat AY359193-AY359212 akcessziós számokkal helyeztük el a génbankban. A génbankban található külföldi és a hazai EAV törzsek szekvenciáiból filogenetikai fát készítettünk, mely hasonlóságot mutatott az irodalomban található, az ORF 5 régióra tervezett RT-PCR-t követő szekvencia elemzésekkel (2. ábra).



2. ábra A vizsgált EAV törzsek nukleotid sorrendjére készített filogenetikai fa

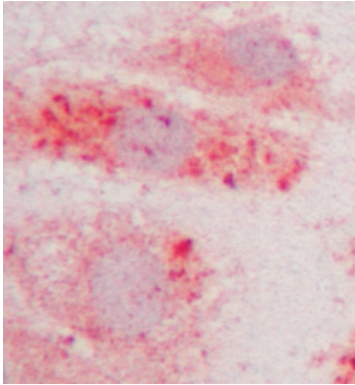
Megvitatás

A vizsgálatokból levonható következtetések szerint a Magyarországon 2001 februárjától 2002 júliusáig terjedő időszakban a korábban már szeropozitívnak bizonyult lóállományok EVA fertőzöttsége 49% körül mozgott, amely figyelembe véve a '90-es évek statisztikai adatait, emelkedő tendenciát mutat úgy, hogy közben súlyos járványkitöréseket nem észleltek az országban. Ez további két következtetést von maga után: 1. hazánkra jellemző azon EAV törzsek elterjedése, melyek csak szubklinikai tüneteket okoznak, ezt bizonyítja az 50% szeropozitivitási arány a vizsgált lovak körében, 2. a szeropozitivitás emelkedése valószínűsíti, hogy a hagyományos terjedési mód mellett (aerogén-orális) kell lennie egy másik terjedési lehetőségnek is, mely a szeropozitivitást az érintett lóállományok körében jelentős mértékben modulálhatja (venereális fertőzés).

A létrehozott N fehérje ellen termelt McAb-ot az EVA diagnosztikájának javítása céljából állítottunk elő, nevezetesen a McAb-ok IPMA-ban és PLA-ban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Munkánkban megkíséreltük növelni annak valószínűségét, hogy a létrejövő McAb-jaink a vírus konzervatív core-proteinjével reagáljanak, semmint a burokkapszidjával. Az immunizálásra használt tisztított vírus mind inkomplett, mind komplett

virionokat tartalmazott ugyan, de az arányuk erőteljesen az inkomplett, burkától megfosztott vírus javára tolódott el, és ez növelte annak valószínűségét, hogy az általunk előállított McAb-ok szinte kizárólag a nukleokapszid ellen irányuljanak.

Tesztrendszerünkben az IPMA vizsgálatot a sejttenyészet összetevőivel reagáló ellenanyagokat termelő klónok azonosítására használtuk, míg a PLA vizsgálatokkal a sejttenyészetben elszaporított EAV N fehérje immunhisztokémiai festése révén a v. i. módszer bírálhatósági idejét kívántuk lerövidíteni (3. ábra).



3. ábra A Mab által megfestett sejtek intenzív citoplazma- és halvány magfestődést mutatnak

A félfolyékony tápfolyadék alkalmazása nélkül a vírus CPE sokkal nehezebben vagy egyáltalán nem észlelhető, mert a károsodott sejtek korán kiválnak az egyrétegű tenyészetből. Megfigyeléseink szerint a különböző eredetű sejttenyészetek eltérő EAV iránti fogékonysága mellett elsősorban ezzel magyarázható a hazai vírusizolálás korábbi sikertelensége az arteritis vírussal kapcsolatban. Az ultrahang alkalmazása rendkívül fontos volt számunkra a járulékos nemi mirigyek hámsejtjeinek feltárásában (vagyis az EAV kiszabadításában) az ondóminták vírustartalmának vizsgálatakor. Amennyiben az optimális időintervallumot és frekvenciát alkalmazzuk, úgy a hámsejtek károsodását nem, vagy csak minimális mértékben kíséri az EAV károsodása. Az ultrahangozás és a félfolyékony tápfolyadék használatával az izolálás lényegesen hatékonyabbá vált, mert az ultrahanggal nem kezelt ondómintákból számottevően kisebb arányban izolálható az EAV. A mének egy részénél már a következő tenyésztési szezonban megszűnt az EAV ürülése, igaz többségük évekig vírusürítő maradt. Ez a tény jelzi annak fontosságát, hogy a jövőben vizsgálni kell a vakcinák hatását a mének vírusürítésére: várható-e, hogy a vakcinázott mén rövidebb ideig marad vírushordozó és ürítő, mint nem vakcinázott társai? Ez

a kérdés különösen akkor válik fontossá, ha tekintetbe vesszük, hogy a vizsgálatainkba vont mének 66,7 %-a több évig is perzisztens vírushordozó maradt, és egyes mének 3, illetve 5 évig is folyamatosan ürítették ondójukkal az EAV-t.

A vetélt lómagzatok szerveinek vírustartalma rendkívül alacsony, ezt a vírusizolálás mellett RT-PCR módszerrel is igazoltuk, lényegesen több vírust tartalmaznak viszont az újszülött korban, EVA következtében elhullott állatok egyes szervei.

Végül meg kell említeni azt a mellékleletként jelentkező eredményt, hogy a 2000 és 2004 közötti időszakban vetélt magzatokból izolált 4 EA vírussal szemben a feldolgozott mintákból 20 alkalommal mutattunk ki EHV-1 vírust, ami azt jelzi, hogy hazánkban a lovak herpeszvírus okozta vetélésének jelenleg egy nagyságrenddel nagyobb jelentősége van, mint az EAV kártételének.

A PCR módszerrel vizsgált mintákból nagyobb arányban sikerült az EAV nukleinsavát kimutatnunk, mint vírusizolálással, hátránya viszont ennek az eljárásnak, hogy a negatív eredmény nem zárja ki más vírus jelenlétét a mintában. Ma már ezt a problémát, elsősorban a genetikailag rokon vírusok kimutatásánál egyre szélesebb körben alkalmazva, a multiplex és a multi-PCR módszerekkel próbálják leküzdeni a diagnosztikában dolgozó szakemberek. A vírusizolálás és a PCR vizsgálatok eredményeinek összehasonlításából, mind az érzékenység, mind a megbízhatóság, mind az ismételhetség (reprodukálhatóság) terén, azt a következtetést vontuk le, hogy a fáradtságos vírusizolálás minden mintánál felesleges abban az esetben, amikor csak az EAV jelenlétére vagyunk kíváncsiak (ondóminták). Így az első 100 minta után már csak akkor végeztünk párhuzamosan vírusizolálást és PCR nukleinsav kimutatást, amikor nemcsak EAV volt a vizsgálat tárgya.

Összefoglalva a hazai EAV törzsek genetikai vizsgálatainak céljából kifejlesztett 2 különböző RT-PCR módszerrel kapcsolatos tapasztalatainkat, leszögezhető, hogy a megbízhatóságot és a specifikusságot abszolút prioritásnak kell tekinteni az érzékenységgel szemben. Munkánk azt is bizonyítja, hogy a jelenlegi RT-PCR kitek megfelelő érzékenységgel rendelkeznek, még egy nehezebben hozzáférhető genom régió amplifikálásához is.

A vírus genetikai vizsgálata alkalmas járványtani nyomozásra. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy az elmúlt másfél évtized politikai változásait követő gazdasági helyzetben a növekvő lókereskedelem és lóforgalom, néhány év után vírusváltást eredményezett: a helyi II.D. típusú EAV törzseket új, más genetikai szubtípusokba tartozó, különböző származási helyű vírusok váltották fel, amelyek 2000 után dominánssá

váltak Magyarországon. A domináns hazai vírusok genotípusának II.D.-ről II.A. alcsoport jellegűre váltása, mely körülbelül 2000-ben következett be, egyértelművé teszi számunkra a külföldről hazánkba hozott lovak (főleg a perzisztensen vírusürítő mének) és az EAV-fertőzött mélyfagyasztott ondóminták jelentőségét az EVA terjesztésében. Ezek az állatok és tenyésztésanyagok nagyfokú kockázatot jelentenek a perzisztens vírushordozó mének ondójából felbukkanó, új EAV variánsok importálásával.

Vizsgálataink arra is rávilágítottak, hogy a vetélt magzatok szerveiből származó, és különböző időben gyűjtött vírusminták eltérő genocsoportba tartoznak. Míg az M72 mintát 1998-ban izoláltuk, addig a másik 3 magzattól származó vírust (M19, M20 és Ú73) 2000-ben. Ez arra enged következtetni, hogy az új (II.A.), nem „őshonos” (II.D.) magyarországi törzsek behozatalát követően több alkalommal is előfordult vetélésben is megnyilvánuló EVA járvány. Az 1998-as M72 magzati EAV izolátum és a vele szoros rokonságban álló ondóból kimutatott vírus (A215) már 2000 előtt jelen voltak az országban, vetéléseket okozva. Másrészt viszont, 2000 körül egy új vírustörzset hurcoltak be az országba, melynek leszármazott 3 víruspopulációját (M19, M20 és Ú73) vetélt magzatokból és egy újszülött csikóból kimutattuk. Ez a törzs 2000-től nagyobb „lehetőséghez” jutott, hogy elterjedjen az országban, vagy az ondóminták forgalmazása, vagy a mének fedeztetéshez történő szállítása révén. Annak ellenére, hogy az utóbbi 3 szervminta vírusai között 99,8% szekvencia azonosságot találtunk (csupán 1 nukleotid az eltérés), mégis ezek földrajzilag 3 eltérő helyről származtak (M19: Közép-Magyarország, M20: Észak-Kelet-Magyarország, M73: Dél-Magyarország). Ezek az adatok azt a következtetést valószínűsítik, hogy a 2000-ben történt különböző magyarországi járványkitörések kóroktanában vagy egy perzisztensen vírus ürítő mén, vagy egy EAV fertőzött mélyfagyasztott ondómintát játszott szerepet.

Legfontosabb eredmények és az ezekből levonható következtetések

1. Munkatársaimmal elsőként mutattuk ki Magyarországon PCR-rel az EAV nukleinsavra jellemző szekvenciát perzisztensen vírusürítő mén ondómintájából (1995).
2. Elsőként izoláltam Magyarországon az EAV-t (2001).
3. Nagyszámú mintából megállapítottam a hazai szeropozitív ménekben található perzisztensen vírusürítő egyedek arányát (2001).
4. Munkatársaimmal Magyarországon elsőként állítottunk elő EAV ellen termelt McAb-t, és azt felhasználva immunhisztokémiai módszerrel igazoltuk az EAV N proteinjének a jelenlétét a sejtmagban (2003).
5. Összesen 19 magyarországi és 1 kelet-ausztriai izolátum szekvenciáit elemezve megállapítottuk, hogy az EAV okozta vetélések kiváltásában és a

fertőzés fenntartásában hazánkban is a perzisztensen vírushordozó-ürítő mének játszik a döntő szerepet.

6. Kimutattuk, hogy az irodalomból ismert 5 genotípusból 4 hazánkban is jelen van, leggyakrabban perzisztensen vírusürítő mének ondómintáiban.
7. Az egyes genotípusú hazai arteritis vírusok genetikailag nem különböznek jelentős mértékben az ugyanabba a csoportba tartozó külföldi EAV-tól.
8. A 2000 előtt Magyarországon izolált EAV törzsek többsége egy új, eddig nem ismert alcsoportot képez (II.D).
9. 2000-ben a helyi II.D. típusú EAV törzseket új, más genotípus, vírusok váltották fel, amelyek 2000 után dominánssá váltak.

Az értekezés alapját képező szakcikkek és előadások

Szakcikkek

1. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Pálfi Vilmos és Rusvai Miklós: A lovak fertőző arteritisét okozó vírus első hazai izolálása. Magyar. Áo. Lapja 2001. 123. 729-734.
2. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Szeredi Levente és Rusvai Miklós: Négy hazai fertőző arteritis vírustörzs összehasonlító genetikai vizsgálata. Magyar. Áo. Lapja 2002. 124. 459-465.
3. Szeredi Levente, **Ákos Hornyák**, Béla Dénes, Miklós Rusvai: Equine viral arteritis in a newborn foal: parallel detection of the virus by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2003. 50. (6) 270-274.
4. **Ákos Hornyák**, Béla Dénes, Levente Szeredi, László Dencső, Miklós Rusvai: Diagnostic application of immunoperoxidase assay using monoclonal antibodies produced against Equine Arteritis Virus : A14kD nucleocapsid protein. Hybrid Hybridomics. 2004. 23.(6) 368-372.
5. **Ákos Hornyák**, Tamás Bakonyi, Gergely Tekes, Levente Szeredi, Miklós Rusvai: A novel subgroup among genotypes of Equine Arteritis Virus; Genetic comparison of forty strains. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2005. 52:112-118.
6. Levente Szeredi, **Ákos Hornyák**, Vilmos Pálfi, Tamás Molnár, Róbert Glávits, Béla Dénes: Occurrence of Equine viral arteritis induced abortions detected by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. Vet Microbiol. 2005. May 27.

Előadások

1. Rusvai Miklós, **Hornyák Ákos**, Medveczky István, Belák Sándor: A fertőző lóarteritis vírusának direkt kimutatása hazai lóállományban. Akadémiai Beszámoló, 1995. 13.

2. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Pálfi Vilmos, Rusvai Miklós (2001) A lovak fertőző arteritiszét okozó vírus első hazai izolálása, A Magyar Mikrobiológia Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred
2. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Szeredi Levente és Rusvai Miklós: Négy hazai fertőző arteritisz vírustörzs összehasonlító genetikai vizsgálata, 2002. A Magyar Mikrobiológia Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred
3. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Tekes Gergely and Rusvai Miklós: Genetic comparison of selected equine arteritis virus strains isolated in Hungary from different forms of the disease, 2003. Abstracts of the 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary
4. Bakonyi Tamás, Delfs Kira, **Hornyák Ákos**, Tekes Gergely and Rusvai Miklós: Detection of equine herpesvirus 1 in aborted foals by PCR; comparison with virus isolation techniques, 2004. Abstracts of the 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary

Poszter

1. Levente Szeredi, **Ákos Hornyák**, Béla Dénes, Miklós Rusvai, Vilmos Pálfi (2002) Preliminary report on the applicability of an N-protein (14 kD) specific monoclonal antibody (Mab) in the detection of equine arteritis virus (EAV) by an immunohistochemical method, 20th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Grugliasco (Turin)-Italy, 18-21 September 2002

Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám elindításában, valamint az elért eredmények értékelésében, a publikációim bírálatában és kijavításában nyújtott segítségéért, mellyel elérhetővé tette számomra a tudományos fokozat megszerzését, szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **Rusvai Miklós** egyetemi tanárnak.

Ugyancsak hálás köszönetet mondok dr. **Bakonyi Tamás** egyetemi adjunktusnak, egykori diákomnak, aki fáradhatatlanul és óriási türelemmel segítette kutatási tevékenységemet, EAV kutatással kapcsolatos tudományos témáját önzetlenül átengedve nekem, ezzel saját magát átmenetileg hátrányos helyzetbe hozva. Megköszönöm a számítástechnikai ismeretekben nyújtott részletekbe menő segítségét, valamint a publikációim gondos áttanulmányozását és szakszerű észrevételeit, javaslatait.

Köszönettel tartozom az Országos Állategészségügyi Intézet igazgatójának dr. **Tekes Lajos** címzetes egyetemi tanárnak, tudományos

munkám megkezdéséhez nyújtott segítségéért, valamint a hosszú időszak végéig tartó, a munkahelyem által biztosított, anyagi támogatásáért.

Hálás szívvel köszönöm dr. **Dénes Béla** és dr. **Szeredi Levente** intézeti kollégáimnak, az EAV monoklonális ellenanyag előállításában, illetve az 1998 és 2002 közötti időszak vizsgálati anyagainak a gyűjtésében nyújtott segítséget.

Köszönöm **Tapaszi Zsuzsa** zoológusnak, **dr. Forgách Petra** állatorvosnak és **Schamberger Anita** egyetemi hallgatónak áldozatkész munkájukat, mellyel tehermentesítettek rutindiagnosztikai feladataim számos időigényes részletétől.

Ugyancsak köszönetemet fejezem ki dr. **Tekes Gergő** állatorvosnak, az EAV összehasonlító genetikai vizsgálatában nyújtott értékes segítségéért.

Megköszönöm dr. **Kulik Mónika**, dr. **Balogh Attila** és dr. **Magosi Zoltán** állatorvos kollégáknak a fáradhatatlan és rendszeres mintaküldést, mellyel munkámat jelentős mértékben támogatták.

Végül hálás köszönetemet fejezem ki **családom** mindazon tagjainak, akik a számomra pszichikailag és fizikailag rendkívül megterhelő időszakban mellettem maradtak, gondoskodásukkal tehermentesítettek a mindennapi gondoktól.