

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

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

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Hornyák Ákos

2005

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

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

Prof. Dr. Varga János
egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány doktora, a Magyar Tudományos Akadémia tagja, egyetemi
tanár, az állatorvos-tudomány doktora, a Magyar Tudományos Akadémia tagja
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

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

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

.....
dr. Hornyák Ákos

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke	5
1.A. Összefoglalás.....	5
1.B. Summary	9
2. Bevezetés, célkitűzések.....	11
Munkánk célkitűzéseit a következő témakörökben ismertetem.	13
3. Irodalmi áttekintés.....	15
3.1. A lovak fertőző arteritise.....	15
3.1.1. Történet	15
3.1.2. Tünetek.....	15
3.1.3. Kórfejlődés.....	16
3.1.4. A betegség járványtani jellegzetességei.....	16
3.1.5. Védekezés, megelőzés	18
3.2. Az EAV jellemzői.....	18
3.2.1. Az EAV morfológiája	18
3.2.2. A vírus genomszerveződése.....	21
3.3. Az EAV genetikai tulajdonságai.....	23
3.3.1. Az egyes EAV gének genetikai vizsgálata	23
4. Saját vizsgálatok	27
4.1 Szerológiai vizsgálatok a magyarországi lóállományokban	27
4.1.1. Anyag és módszer	27
Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:.....	27
Alkalmazott szerológiai próba	27
4.1.2. Eredmények	28
4.1.3. Megbeszélés	28
4.2 A hazai lóarteritis vírusok izolálása.....	32
4.2.1. Anyag és módszer	32
Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása: ondóminták	32
Szervminták	33
Leukociták.....	33
Orrváladék minta.....	33
Vizelet minta.....	33
Sejttenyészetek.....	34
Vírusizolálás.....	34
4.2.2. Eredmények	35
4.2.3. Megvitatás	38
4.3 A referens Bucyrus törzssel reagáló monoklonális ellenanyagok előállítása.....	43
4.3.1. Anyag és módszer	43
Koncentrált és tisztított EAV szuszpenzió előállítása.....	43
Monoklonális ellenanyagok előállítása.....	43
A hibridoma felülűszók ellenőrzése indirekt ELISA módszerrel	44
A monoklonális ellenanyagok izotípusának meghatározása.....	45
Egyrétegű sejttenyészet vizsgálata peroxidázzal jelzett ellenanyagok segítségével (IPMA)	45
Vírusneutralizációs teszt (VNT)	45
SDS-PAGE és immunblot.....	45
4.3.2. Eredmények	46
4.3.3. Megvitatás	47
4.4 A polimeráz láncreakcióval történő nukleinsav kimutatás	50
4.4.1. Anyag és módszer	50
Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:.....	50

Az RNS izolálása	50
Az RNS átírása DNS másolattá (copy DNS: cDNS)	51
Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR)	51
Megjelenítés (vizualizáció)	53
A PCR termékek (amplikonok) azonosítása: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP).....	53
Érzékenység	53
4.4.2. Eredmények	53
Az EAV RNS izolálása, az alkalmazott két módszer összehasonlítása.....	53
Az EAV RNS átírása és a PCR.....	55
RFLP	55
Érzékenység	55
4.4.3. Megvitatás	56
4.5 A hazai vírustörzsek direkt víruskimutatásának módszerei, ezek összehasonlítása	62
4.5.1. Anyag és módszer	62
Minták	62
Diagnosztikai módszerek	62
Peroxidáz-enzimhez kötött vizsgálat (peroxydase linked assay, PLA)	62
Statisztikai módszerek.....	63
4.5.2. Eredmények	65
4.5.3. Megvitatás	67
4.6. A hazai lóarteritis vírustörzsek genetikai vizsgálati módszerének a kidolgozása	70
4.6.1. Anyag és módszer	70
Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:.....	70
Hazai EAV törzsek filogenetikai vizsgálata, a megfelelő genomszakasz meghatározása.....	70
Az ORF5 régióra tervezett PCR.....	71
A PCR amplikonok azonosítása: RFLP	73
Szekvencia-meghatározás:	73
Számítógépes összehasonlító vizsgálat:.....	73
Statisztikai módszerek.....	74
4.6.2. Eredmények	74
A termékek kimutatása és azonosítása.....	74
Szekvenciameghatározás	74
Keresztkontamináció.....	75
Statisztika	76
4.6.3. Megvitatás	76
4.7 A hazai és külföldi vírustörzsek összehasonlító genetikai vizsgálata.....	79
4.7.1. Anyag és módszer	79
Minták	79
Számítógépes összehasonlító vizsgálat:.....	79
4.7.2. Eredmények	80
Nukleinsav vizsgálatok	80
Az egymást követően vett ondóminták EAV genetikai összehasonlító vizsgálata.....	85
Fehérje vizsgálatok	86
Törzsfá rekonstrukció	89
4.7.3. Megvitatás	91
5. Legfontosabb eredmények	96
Köszönetnyilvánítás	98
Irodalomjegyzék.....	99
Saját közlemények jegyzéke	110

Rövidítések jegyzéke

cDNS	copy DNS	DNS másolat RNS-ről
CPE	cytopathic effect	sejtkárosító hatás
DEPC	diethyl-pyrocabonate	dietil-pirokarbonát
DNA	dezoxy-ribonucleic-acid	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxy-ribonucleotide-triphosphate	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
Ea		ellenanyag
EAV	equine arteritis virus	lóarteritis vírus
EHV-1	equine herpes virus - 1	ló egyes típusú herpesz vírusa
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunadszorpciós vizsgálat
ER	endoplasmatic reticulum	endoplazmatikus hálózat
EU	European Union	Európai Unió
EVA	equine viral arteritis	lovak vírusos arteritisze
FCS	fetal calf serum	magzati eredetű borjú savó
HAT	hypoxanthine aminopterin thymidine medium	hipoxantin aminopterin timidin szelektív tápfolyadék
HRPO	horse radish peroxydase	torma-peroxidáz
IPMA	immuno-peroxydase-monolayer-assay	immunperoxidáz festéssel történő ellenanyag kimutatás egyrétegű sejttenyészetben
McAb	monoclonal antibody	monoklonális ellenanyag
MEM	minimal essential medium	minimálisan szükséges tápoldat
NendoU	nidoviral uridylyate-specific endoribonuclease	nidovirális uridilát specifikus endoribonukleáz (NendoU) enzim
OÁI		Országos Állategészségügyi Intézet
OIE	Office International des Epizooties	Nemzetközi Járványügyi Hivatal
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	phosphate buffer saline	fiziológiás foszfátpuffer
PBST	phosphate buffer saline Tween-20	fiziológiás foszfátpuffer és Tween-20
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció

PLA	peroxydase linked assay	peroxidáz festéssel történő vírusantigén kimutatás egyrétegű sejttenyészetben
RFLP	restriction fragment length polymorfism	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RK-13	rabbit kidney-13	nyúl vese sejtvonal
RdRP	ribonucleic-acid-dependent-ribonucleic-acid-polymerase	RNS dependens RNS polimeráz
RNA	ribonucleic-acid	ribonukleinsav
RPM	revolution per minute	fordulatszám
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium	Roswell Park Memorial Intézetben előállított tápfolyadék
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SDS PAGE	polyacrylamid gel-electrophoresis	poliakrilamid gélelektroforézis
sgRNS	subgenomic messenger RNS	szubgenomiális hírvivő RNS
SzIE ÁOTK		Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
TCID₅₀	tissue culture infective dose 50%	50% sejtkárosodást előidéző vírus dózis
TRS	transcription-regulating sequences	transzkripciót szabályozó szekvencia
V. I.		vírus izolálás
VNT	virus neutralization test	vírussemlegesítő próba

1.A. Összefoglalás

A vírusos lóarteritis magyarországi előfordulására irányuló vizsgálatok első szakaszában szerológiai módszerek segítségével sikerült a hazánkban található lóállományok nagy részének EVA fertőzöttségét leíró adatbázist felállítani. A különböző években gyűjtött vérminták vizsgálata alapján egyrészt megállapítható, hogy a fertőzés terjed Magyarországon, másrészt azonosítani lehetett a potenciálisan vírusürítő méneket. Ezen állatokból gyűjtött ondómintákat használtam a direkt víruskimutatási próbák (vírusizolálás és RT-PCR) során. A nukleinsav kimutatási eljárást nem csak a diagnosztikában, hanem a vírus genetikai összehasonlító vizsgálataiban is felhasználtam. Elsőként izoláltam a vírust Magyarországon, és a későbbiekben bebizonyítottam, hogy az eddigi nemzetközi publikációknak megfelelően, alkalmas mintakezelési technikával, megfelelően orientált mintavételezés mellett, viszonylag rövid idő alatt is nagyszámú vírus izolálható, és így ez a módszer önmagában is alkalmas a mének vírusürítő státuszának elbírálására. Megállapítottam, hogy a szeropozitív mének között hazánkban alacsonyabb (kb. 10%) a vírusürítő állatok aránya, mint a nemzetközi szakirodalomban szereplő értékek (kb. 30%).

Nagyszámú mintán, rendszeresen alkalmaztam az általam kifejlesztett RT-PCR eljárást, és rutindiagnosztikai felhasználhatóságát összehasonlítottam a vírusizolálással. Az eredmények alapján megállapítható, hogy nem friss minták és magzatok esetében az izolálás megbízhatósága elmarad a nukleinsav-kimutatására alapozott eljárásétól. Fontos diagnosztikai megállapítása munkámnak a lovakban előforduló, vírus okozta vetélések arányának tisztázása. Bebizonyosodott, hogy a lovak herpeszvírusos vetélése, azonos időtartam alatt 8-szor gyakrabban fordult elő hazánkban, mint az EVA által okozott abortusz.

Ugyancsak diagnosztikai célból a vírus nukleokapszid fehérje ellen termelt monoklonális ea-t (McAb) állítottunk elő, mely nagy hígításban is felismerte az EAV N fehérjét, és lehetőséget nyújtott a hazai vírusizolátumaink egy részének összehasonlító fehérjevizsgálatára is. A Mab az immunperoxidáz reakcióval (PLA) megfestett, valamennyi hazai genocsoportból kiválasztott, magyarországi EAV törzsekkel (41-ből 18) fertőzött sejtenyészetek mindegyikével és a referens Bucyrus törzssel is pozitív reakciót adott, tehát a Mab konzervatív epitopot ismer fel az N fehérje felszínén, ezért az eddigi törzsekkel általánosan reagáló McAb-ot állítottunk elő. A teszt alkalmazása során lettünk figyelmesek arra, a 2000-ben még mások által nem alátámasztott megfigyelésre, hogy az EA vírussal fertőzött sejtek magjai viszonylag nagy mennyiségben tartalmaznak N fehérjét.

Az izolált EAV törzsek szekvencia meghatározása, és későbbi összehasonlító vizsgálataiban céljából szükségesnek mutatkozott egy másik, ezúttal a hipervariábilis régióra a GP₅ fehérjét kódoló ORF 5 genomszakaszra tervezett RT-PCR létrehozása. Ez a régió nyújtott alapot más szerzők

vírusgenetikai vizsgálatához is, így az évek során a génbankban számos, erről a területről nyert szekvencia vált hozzáférhetővé. Az egylépéses RT-PCR módszer alkalmazásával csökkentettem a keresztkontamináció lehetőségét és tovább javítottam a reakció specifikusságát.

A járványtani nyomozás céljait szolgáló genetikai összehasonlító vizsgálataim során 20 hazai EAV törzs részleges nukleotid sorrendjét határoztam meg és filogenetikai analízis segítségével feltártam azok rokonsági viszonyait és lehetséges eredetét. Megállapítottam, hogy a 2000 előtt Magyarországon izolált EAV törzsek többsége egy korábban le nem írt, önálló alcsoportot képez (II.D), amelynek képviselőit 2000 után a világszerte előforduló, ismert genocsoportokhoz tartozó, különböző eredetű törzsek váltottak fel hazánkban.

Vizsgálati eredményeim értékelésével felhívtam a szakemberek figyelmét a külföldről hazánkba hozott lovak (főleg a perzisztensen vírusürítő mének) és az EAV-fertőzött mélyfagyasztott ondóminták jelentőségére az EVA terjesztésében.

1.B. Summary

In the first period of the investigations aimed to determine the occurrence of equine viral arteritis (EVA) a database containing the infection rate of the majority of the great studs of Hungary was established. The investigation of the serum samples collected in different years proved that the infection is spreading, and also they helped to identify the potential virus carrier stallions. The semen samples collected from these animals were used in the direct virus detecting tests: virus isolation and polymerase chain reaction following reverse transcription (RT-PCR). The tests based on the amplification of the nucleic acid were used not only in the diagnostic work but also in genetic investigations.

Within the framework of my PhD studies I have isolated the equine arteritis virus (EAV) for the first time in Hungary. Later I proved that applying a suitable preparatory technique and a well oriented sample collecting method several strains can be isolated within a relatively short period of time, as it is published in the relevant scientific papers, so this method is suitable to detect the virus shedder stallions. I have demonstrated that the seropositivity rate in Hungary is lower (about 10%) than the values published elsewhere (about 30%).

I have developed an RT-PCR method and used it on a large number of samples, and compared its applicability in the routine diagnostics to virus isolation. The results have shown that in the case of not fresh and foetal samples the isolation is less reliable than the method based on the demonstration of the nucleic acid. These methods helped to determine the ratio of the different viral agents in the background of abortions, which was also an important part of my work. I have proved that the herpesviral abortion is about eight times more frequent in our country than the abortions caused by EVA.

The production of monoclonal antibodies (McAbs) against the nucleocapsid (N) protein served also diagnostic purposes. The produced two McAbs recognised the N protein in high dilutions and helped the comparative studies of the protein structure of some of our virus strains. In a peroxidase linked assay (PLA) carried out on virus infected tissue cultures the McAbs recognised all Hungarian strains (18 from 41 isolate) belonging to different genetic subgroups and also with the referent Bucyrus strain, so it was concluded that the McAbs recognise a conservative epitop on the surface of the N protein, hence they react universally with the strains isolated so far. During the application of the test we detected that the nuclei of the EAV infected cells contain a relatively large amount of N protein, which phenomenon was not described at the time of these investigations (in 2000).

The planned genetic comparisons, sequencing and the alignment of the sequences motivated the development of an other RT-PCR method amplifying a hypervariable genomic region (ORF5) coding the GP₅ protein. The previous genetic studies were also based on this part of the genome;

therefore several sequences were deposited in the international database (GeneBank). The developed one step RT-PCR helped to decrease the risk of cross contamination and enhanced the specificity of the test further.

The partial nucleic acid sequences of 20 Hungarian EAV strains were determined in the genetic investigations serving the purposes of epizootiological investigations, and the phylogenic analysis revealed their similarities and possible origin. I have demonstrated, that the strains isolated in Hungary before 2000 form a new, previously not described subgroup (II.D), and that the representatives of this subgroup were replaced by virus strains of different origin and belonging to previously known strains distributed worldwide.

By the conclusions of the results of my studies I helped to call the attention of the experts working on the field of veterinary administration to the role played by the horses (most of all the persistently infected stallions) and by the EAV contaminated deep frozen semen samples imported to Hungary from other countries in the spreading of EVA.

2. Bevezetés, célkitűzések

A vírusos lóarteritis (equine viral arteritis, EVA) lovakban és egyéb lófélékben előforduló betegség, amelyet a lóarteritis vírus (equine arteriitis virus, EAV) által előidézett fertőzés okoz. Nevét a vírus által kiváltott kisartéria-gyulladásról kapta; az ennek következtében fellépő kórkép tünetei igen változatosak az enyhétől a súlyos, olykor elhulláshoz vagy veteléshez vezető esetekig. Legjellemzőbb az ödéma kialakulása, elsősorban a fejen és a ventrális testtájakon (lábvégek, has alja, hereborék), illetve vemhes kancákban a placenta arterioláinak károsodása miatt a vetelés. Ugyanakkor igen gyakori a tünetmentes fertőzés is (Glaser és mtsai, 1997).

A vírusfertőzés által előidézett betegséget először az Egyesült Államokban írták le (Doll és mtsai, 1956, 1957), de azóta számos országban kimutatták a vírus előfordulását, többek között Magyarországon is (Rusvai és mtsai, 1995). A kórokozó rendszertanilag az *Arteriviridae* család *Arterivirus* nemzetségéhez tartozó burkos, pozitív irányultságú, egyszálú RNS vírus (den Boon és mtsai, 1991). A törzsek szerológiailag egységesek, de nukleinsav-vizsgálatok igazolták, hogy genomjuk egyes változékony régiókon nagymértékben különbözhet, valószínűleg ez az oka annak, hogy virulenciájukban erősen eltérnek egymástól (Chirnside és mtsai, 1994, Sugita és mtsai, 1994, de Vries és mtsai, 1997, Hedges és mtsai, 1999).

A vírus terjedésében két fertőzési forma játszik szerepet, az egyik az aerogén-orális, a másik a venereális fertőzés (Timoney és mtsai, 1986). Az aerogén-orális forma 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 hangsúlyos, 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 (Timoney és mtsai, 1986). 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 fertőzöken átesett mének kb. egyharmada válik tartós vírushordozóvá (Little és mtsai, 1992).

A fertőző arteritis vírusa a vetelés által okozott károk következtében Európában a jelentősebb lópathogén kórokozók közé tartozik. Tekintve, hogy a nagy gazdasági károkkal járó vagy

közegészségügyi veszélyforrásként szereplő lóbetegségektől (pl. takonykór, fertőző kevésvérűség) a földrész már mentes, vagy a mentesítés előrehaladott stádiumban van. Ez utóbbiak, 2004. májusáig az ún. „A” listás állatbetegségek a nemzetközi állategészségügyi-járványügyi hivatal (Office International des Epizootologie, OIE) adatai szerint földrészünkön már csak elvétve fordulnak elő. A fertőző arteritist az OIE korábban a „B”-listás betegségek között sorolta fel, mely listán azok a betegségek szerepelnek, amelyek gazdasági kártétele jelentős ugyan, és a nemzetközi forgalomban a fertőzésre gyanús állatok szállításának fokozott ellenőrzése szükséges, de ezek a fertőző betegségek bejelentési kötelezettség alá nem esnek (Varga és mtsai, 1999). Az egyes európai országokban (pl. Nagy-Britanniában) ugyanakkor már bevezettek, vagy várhatóan bevezetnek korlátozó intézkedéseket az arteritis vírussal fertőzött vagy fertőzésre gyanús lovak esetében, és az Európai Unió államai a közeli jövőben lóállományaik EVA mentesítését is célul tűzhetik ki. Ebben az esetben, a már most is jelentős gazdasági haszonnal járó lóexport fenntartása érdekében nem kerülhető el a magyar lóállomány mentesítése sem.

Saját eddig végzett vizsgálataink részben bizonyították azt, hogy a vírusfertőzés Magyarországon is viszonylag elterjedt. A vizsgált állományokban az állomány nagyságától és a lovak korától függő mértékben eltérő szeropozitivitást tapasztaltunk: minél nagyobb az adott állomány és minél idősebb egy adott egyed, annál nagyobb a valószínűsége, hogy vérében ellenanyagokat lehet kimutatni. A szeropozitivitás százalékos aránya tehát az állományt alkotó lovak számával és életkorával párhuzamosan növekszik (Rusvai és mtsai, 1996).

A vírus ellen képződött ellenanyagok viszonylag hosszú ideig (hónapokig) és viszonylag könnyen kimutathatók a vérből, e célra legtöbb esetben az ún. vírusneutralizációs próbát (vírusközömbösítési próba: VNT) alkalmazzák. Ezzel szemben magának a vírusnak a kimutatása nem könnyű. A heveny megbetegedést kísérő enyhe légzőszervi tünetek alatt a vírus ürül ugyan a testváladékokkal (orrváladék, könny, nyál, vizelet) és a perifériás vér lymphoid sejtjeiben is megtalálható, de mivel súlyos klinikai tünetekkel ez a fertőzési forma nem jár, vizsgálati minta nem érkezik a diagnosztikai intézetekbe. A vemhes kancák esetleges vetélése során is nagy tömegben ürül a vírus (a vetélt magzat, magzatvíz, magzatburkok tartalmazhatnak vírusrészecskéket), de mivel hazánkban a vírusarteritis eddig nem okozott a más országokban leírtakhoz hasonló tömeges vagy sporadikusan de rendszeresen jelentkező vetélést (valószínűleg kevésbé virulens törzsek vannak jelen a hazai lóállományokban), ilyen vetélésből származó mintákból sem sikerült korábban a vírust kimutatni. A krónikusan fertőzött mének ondójukkal folyamatosan, hosszú időn át ürítik ugyan a vírust, de az ondófolyadék szövetkárosító hatása miatt a hagyományos víruskimutatási eljárások közül a szövettényezetekben történő vírusizolálás csak korlátozott mértékben, illetve csak speciális technikák alkalmazásával lehetséges (ultrahangozás, félfolyékony tápfolyadék alkalmazása), amire a rutin diagnosztikai eljárások esetében nincs lehetőség. A vírusizolálás

felsorolt nehézségeire (Huntington, 1990) vezethető vissza, hogy a lóarteritis vírusát eddig Magyarországon nem sikerült izolálni.

Viszonylag könnyebben megoldható a vírus kimutatása a vizsgálati mintákból a polimeráz láncreakción alapuló diagnosztikai eljárások (PCR technika) segítségével. Ilyen PCR vizsgálatokkal elsőként mutattuk ki Magyarországon a vírusspecifikus nukleinsavat fertőzött mének ondómintáiból (Rusvai és mtsai, 1996). Ennek az eljárásnak az a hátránya, hogy noha a vírus jelenlétét bizonyítja, magát a kórokozót izolálni és további összehasonlító vizsgálatokban felhasználni nem lehet, morfológiai jellemzőinek, fehérjeösszetételének, antigénszerkezetének tanulmányozására nincs mód.

Munkánk célkitűzéseit a következő témakörökben ismertetem.

1. Mivel a betegség jelentősége a magyarországi lóállományban szinte teljesen tisztázatlan volt, első lépésben a fertőző lóarteritis hazai előfordulási arányának, az egyes légzőszervi és vetéléses kórképek előidézésében játszott **oktani szerepének** felmérését terveztük.
2. A fertőzés ugyanis eddigi vizsgálataink eredményei szerint, ha szubklinikai formában is, de több magyarországi lóállományban előfordul, ezért terveztük a **fertőzöttségi arány pontosabb felmérését**. Ezen belül fokozott figyelmet kívántunk fordítottunk a vírus fenntartásában (és terjesztésében) elsődleges szerepet játszó szeropozitív (és ezért potenciálisan krónikus vírushordozó és -ürítő) mének felderítésére, azonosítására.
3. A felmérő vizsgálatokkal részben újabb adatokat szeretnénk volna nyerni a vírusarteritis magyarországi szerológiai előfordulásáról (szeroprevalenciájáról), valamint meghatározni azon állományokat és egyedeket, amelyeket tüzetesebben, a direkt víruskimutatás módszereivel kellett továbbvizsgálunk, hogy **izolált hazai vírustörzsekhez juthassunk**, melyek majd a további vírusgenetikai munkánk alapját képezik.

A szerológiai vizsgálatok mellett a hazai lóállományokban előforduló vírustörzsek izolálására kívántunk koncentrálni. Erre részben a fertőzés heveny szakaszában, részben vetélés esetén a magzatból, magzatvízből, magzatburkokból, légzőszervi kórforma esetén orrváladékból, a perifériás vérből elkülönített lymphocytákból szándékoztunk vírust izolálni. A különböző minták előzetes vizsgálatát (screenelését) már az általunk kidolgozott polimeráz láncreakción alapuló vírus-nukleinsav kimutató eljárással terveztük megvalósítani.

4. A PCR vizsgálatokban pozitívnak talált mintákból megint vírusizolálással szándékoztunk kimutatni a vírust, amelyre azért fordítottunk fokozott figyelmet, mert egyrészt maga az izolálás ténye is újdonság volt hazai vonatkozásban, másrészt pedig, az ily módon begyűjtött vírustörzsek felhasználásával a későbbiekben **összehasonlító vírusgenetikai kutatásokat** végeztünk más országokban izolált törzsek vizsgálatba vonásával.

A célkitűzések során felmerült feladatok a következők voltak:

- a. Szerológiai vizsgálatok: komplementfüggő vírusneutralizációs próba végrehajtása nagy számú vérmintával.
 - b. Vírusizolálás: a vírusra érzékeny szövettenyészetek szaporítása, fenntartása, passzálása, a vírusizolálás során az adszorpciós és kokultivációs technikák alkalmazása, illetve ezek kiegészítése a karboximetil-cellulóz fedési módszerrel.
 - c. Valamennyi lóartertist okozó vírusra reagáló, egy vagy több monoklonális ellenanyag létrehozása, mely rutinszerűen alkalmazható mind a szerológiai, mind a direkt víruskimutatási és mind az immunhisztokémiai diagnosztika területén.
 - d. Polimeráz-lánreakción alapuló vírusnukleinsav kimutatási eljárás, primerszakaszok tervezése, reverz transzkripció, optimális ciklusparaméterek kiválasztása (ciklusszám, hőmérséklet, stb.).
5. Szekvencia-meghatározás és -elemzés: az elemzéshez szükséges mennyiségű DNS másolat előállítása, tisztítása, a kapott nukleotidsorrend számítógépes szoftverek segítségével történő összehasonlítása a nemzetközi számítógépes adatbázisban tárolt szekvenciákkal.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A lovak fertőző arteritise

3.1.1. Történet

A lovak fertőző arteritisét (equine viral arteritis, EVA) a lóarteritis vírus (equine arteritis virus, EAV) okozza. A betegséget a XIX. század végétől németnyelvű publikációkban még mint Rotlaufseuche, Pferdestaupe, akute Septikämie, az angol irodalomban pedig Equine Influenza, pink eye néven írták le, utalva ezzel a kórokozó által kiváltott jellemző klinikai tünetekre (kötőhártyagyulladás, láz, légzőszervi tünetek). A múlt század első felében sokan vizsgálták a lovak vírus okozta vetéléseit és számos szerző ugyanannak a kórokozónak tulajdonította a herpeszvírusok és az EAV által előidézett abortuszt (Hutyra és Marek, 1938, Manninger és Csontos, 1941, Jones és Maurer, 1943, Maurer és Jones, 1943). A vírus izolálása és elnevezése egyértelműen Doll nevéhez fűződik (Doll és mtsai, 1956, Doll és mtsai, 1957), aki 1953-ban az USA Ohio államában található Bucyrus település melletti farmon, klinikai tüneteket mutató állatállományból, vetélt csikómagzatok tüdő dörzsölékével 2 vemhes kancát oltott intravénásan, és egyidejűleg azok magzatait is fertőzte. Az egyik kanca az 5., a másik a 11. napon elvetélt, és a magzatokban a betegségre jellemző makro- és mikroszkópos elváltozások voltak megfigyelhetők. A vírus sejttenyészetben történt izolálásáról egyik cikk sem tesz említést, jelezve azt a későbbi kutatást végző generációk számára is felmerülő diagnosztikai nehézséget, hogy a kórokozó a sejttenyészetbe csak hosszabb idő után adaptálódik.

3.1.2. Tünetek

A fertőződés az aerogén-orális, vagy venereális (Timoney és mtsai, 1986) úton történhet. Az aerogén-orális fertőződéstől számított 2-14. napon jelentkeznek a klinikai tünetek, melyek 2-9 napig tartanak. A venereális fertőződést 6-8 napos inkubációs idő jellemzi (Timoney és mtsai, 1987).

A betegség legjellemzőbb tünetei: 5-9 napig tartó, remittáló jellegű, aluszékonyságot eredményező láz, mely akár a 41°C-t is elérheti. Gyakori az orrfolyás, a sárgásan elszíneződött kötőhártya hurutja, a szemhéjgyulladás és alkalmanként chemosis (pink eye), fénykerülés, kötőhártya-homály. Ritkábban légzőszervi tünetek is jelentkeznek: köhögés, néha tüdőödéma, súlyosabb esetben tüdővizenyő, baktériumos felülfertőzés tünetei (Vaala és mtsai, 1992, Timoney és McCollum, 1993). További típusos tünet az ödéma képződés a szemüreg környékén, a végtagokon és méneknél a hereborékon, ritkábban a has és mellkas alján. Esetenként folyadékfelhalmozódás figyelhető meg a testüregekben, nem ritka a kólikát követő hasmenés (Timoney és McCollum, 1993, Wilkins és mtsai, 1995). Legnagyobb jelentőségű tünet a vetélés, mely a 3-10. vemhességi hónapban fordul elő az immunitással nem rendelkező kancákban. Az EVA fertőzött vetélt magzat legtöbbször nem mutat típusos makroszkópos tüneteket, mikroszkóposan a köldökvénák, a tüdő, szív és a mellékvesék kis ereinek gyulladása figyelhető meg. Gyakran

életképtelen csikó születik, mely néhány napos korban légzőszervi tünetek mellett broncho-intersticiális tüdő-, vagy tüdő-bélgyulladásban elhullik (Doll és mtsai, 1956, Timoney és McCollum, 1993, Del Piero 2000, Varga és mtsai, 2000, Szeredi és mtsai, 2002).

3.1.3. Kórfejlődés

Az elsődleges vírusreplikáció az alveoláris makrofágokban zajlik le, majd a vírus 2 napon belül megtelepszik a peribronchiális nyirokcsomókban, és újabb 2 nap múlva kialakul a virémia, mely alatt a vírus további szervekbe eljutva azokban szaporodni kezd. Ezek a további vírusreplikációs helyek a véredényrendszer endotelsejtjei, néhány esetben izomsejtek és egyes szervek (tüdő hörgőcskék, vese, máj, bélboholy-kripták) epitelsejtjei. A panarteritis kialakulása során mindenekelőtt a kis erek artériái és arteriolái érintettek, az itt elszaporodó EAV a lamina elastica interna tönkretételével necrosist idéz elő az erek mediájában, melynek következménye az erek permeabilitási zavarát követő ödémaképződés és végül necrosis (McCollum és mtsai, 1971, MacLachlan és mtsai, 1996).

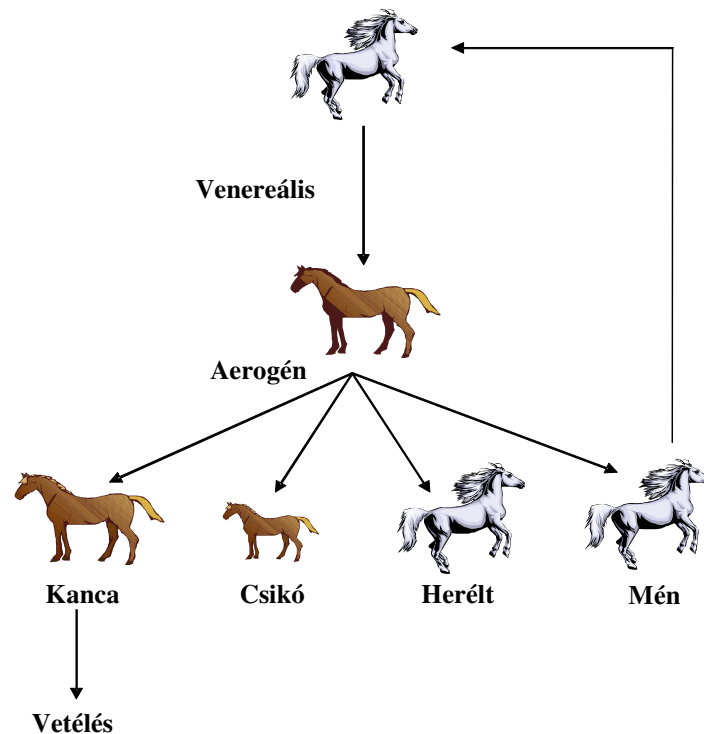
A vírus által okozott vetelés patomechanizmusában sok kérdés tisztázatlan. A 80-as években általánosan elterjedt tudományos nézet szerint a károsodott placenta csökkenő progeszteron szintje és az egyidejűleg helyileg kiürülő prostaglandinok együttesen váltják ki a placenta leválását és ezzel a következményes vetélést (Coignoul és Cheville, 1984). Későbbi tanulmányokban a kutatók feltételezték, hogy a vetelés kiváltásában a placenta kis ereinek károsodása, és ezáltal a magzat placentán át történő, elégtelen tápanyagellátása játsza a döntő szerepet (Timoney és McCollum, 1993). A legújabb publikáció már arról számol be, hogy az esetek nagyobb részében a magzatba be sem jut a vírus, melyet bizonyít, hogy a magzati szervekből többször sem vírusantigént, sem vírus nukleinsav replikációt nem tudtak kimutatni a kanca EAV fertőződését és abortuszát követően (Del Piero, 2000).

3.1.4. A betegség járványtani jellegzetességei

A különböző lófajták EAV iránti fogékonyságáról, a szeropozitivitás mértékéről beszédes számok olvashatók egy USDA (United States Department of Agriculture) publikációból (USDA 2000). Standardbred (amerikai ügető): 23,9%, Thoroughbred (telivér): 4,5%, Warmblood (melegvérű): 3,6%, Quarter horse (amerikai ranch-ló): 0,6% .

A vírusürítés kérdésének ismerete különleges helyet foglal el a betegség elleni küzdelem stratégiájában. A mének kivételével valamennyi EAV fertőzött állatból maximálisan 57 napig mutattak ki vírust, de az egy évnél fiatalabb méncsikók akár 120 napig is vírusürítők maradhatnak (MacLachlan és mtsai, 1996). A mének nemi érésével együtt a tesztoszteron szintjük is megemelkedik, és mivel a vírushordozás és az ennek következtében kialakuló vírusürítés tesztoszteron dependens folyamat (Little és mtsai, 1992), ez magyarázza azt a tényt, hogy a felnőtt

kor elérésével a vírusürítés időtartama is megnyúlik; amerikai szerzők a szeropozitív mének 30%-át vírusürítőnek tartják (Timoney és mtsai, 1986).



1. ábra: Az EAV fertőzési módjai (Glaser és mtsai, 1997)

Az EAV a fertőzött mének járulékos nemi mirigyeiben bújik meg (bulbouretrális mirigy, ondóhólyag, ondóvezetékek), és a fedezetéskor az ondóplazmába került, levált mirigyhámsejtek átvitele az immunitással nem rendelkező kanca nemi traktusába, okozza az új gazdaszervezet fertőződését. Az így megeredt fertőzés azután már aerogén-orális úton terjed tovább az érintett lóállományban és az előrehaladottan vemhes és fogékony kancák aerogén-orális fertőződése váltja ki az állatok vetélését. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a venereális úton fertőződött kancának csak fertőzőkövetítő szerepe van, ő maga nem vetél el. A mének a vírusürítés tartama szerint három csoportba sorolhatók (1. ábra):

1. rövid ideig vírusürítők (short term carriers), ahol a vírushordozás és ürítés mindössze néhány hétig tart,
2. közepes hosszúságú időtartamig (3-9 hónap) elhúzódó vírusürítés,
3. tartós vírusürítés, mely 10 hónaptól egy életen át tarthat.

Ez utóbbi két csoportot általában egyformán tartós vírusürítő állapotnak (long term carrier) nevezi a szakirodalom (Timoney és mtsai, 1987). Ezek az utóbbi mének tartják fenn egy adott állományban a vírushordozottságot. A vírusnak a járulékos nemi mirigyekben történő mutációjával, megváltozik az adott EAV neutralizációs tulajdonságaiért felelős GP₅ gén doménje, ezáltal új fenotípusos

vírusvariánsok jönnek létre, melyeknek genetikai „fitnessse” lényegesen jobb a mutációt el nem szenvedett víruspopulációjánál (Hedges és mtsai, 1999).

A fertőzés után az állatok 2-3 hét múlva ellenanyagválaszt mutatnak, és legtöbbször több éven keresztül szeropozitívak maradnak. Ennek a ténynek tulajdonítható az a több szerzőtől származó megállapítás, hogy az EAV szeropozitivitás és a lovak életkora között pozitív korreláció figyelhető meg. A kolosztrális immunitás 2-6 hónapos korig tart, és védi a csikót a vírushordozástól (McCullum, 1986).

3.1.5. Védekezés, megelőzés

AZ EAV okozta klinikai tüneteket oktatni kezeléssel megszüntetni nem lehet. A fertőzött állatok elkülönítése, pihentetése csökkenti a betegség kártételét az érintett állatnál.

A vetélés megelőzésére előállított oltóanyagok használatát csak néhány országban (USA, Svédország, Írország, Nagy-Britannia) engedélyezik. Az élővírust tartalmazó MLV-Arvac vakcinát mindenekelőtt mének vírusürítésének profilaktikus módon való megakadályozására ajánlja a gyártó, de a vadvírus okozta fertőzés bekövetkezése után az érintett állatok korlátozott vírusürítése megfigyelhető. Az 5-8 napon belül képződött ellenanyagok 2 évig perzisztálnak a vakcinázott állatokban (Timoney és mtsai, 1987). A formalinnal inaktivált vírust tartalmazó vakcinát (Artervac) 3-szor kell beadni: az első vakcinázást követő 4. héten és azt követően 2 hónap múlva. Bár a magas ellenanyagszint következtében a klinikai tünetek nem alakulnak ki egy vadvírus okozta fertőzés után, valamint vírusürítésről és vetelésről sem számoltak be a szerzők, ez a vakcina sem nyújt tökéletes védelmet (Fukunaga és mtsai, 1990, Fukunaga és mtsai, 1997).

Az EU-ban a megelőzés fő célja a vírusürítő állatok (long term carriers) felderítése és a tenyésztésből történő kizárása.

Hazánkban az inaktivált vakcina használata kizárólag a tenyésztésben részt vevő méneknél engedélyezett, ott viszont kötelező a vakcinázást megelőző szerológiai vizsgálattal egybekötött. Ezzel a rendelkezéssel a már vírushordozó mének vírusürítési időtartamát próbálják a rendeletet alkotó szakemberek lerövidíteni, illetve a fiatal, még szeronegatív méneket a vakcinázással védeni a későbbi EAV fertőzéstől és a következményes vírusürítő státusz kialakulásától.

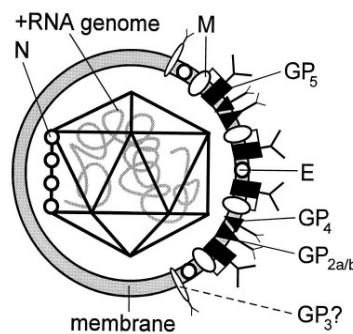
3.2. Az EAV jellemzői

3.2.1. Az EAV morfológiája

Az EAV a *Nidovirales* renden belül az *Arteriviridae* családba tartozik. A rend másik két családjá közül a *Coronaviridae* (Coronavírus és Torovírus nemzetség) a magasabb rendű emlősállatok betegségeit okozza, míg a *Roniviridae* családba tartozó vírusok a gerinctelenek egyik csoportját, a rákokat betegítik meg (Weiss és Horzinek, 1987, den Boon és mtsai, 1991, Cavanagh, 1997, de Vries és mtsai, 1997, Snijder és mtsai, 2003). Ez a taxonómiai besorolás újabb keletű, és az említett víruscsaládok genomszerveződésének a hasonlóságára épül, szemben a régebbi

osztályozással, mely az EAV-t morfológiai és fiziko-kémiai tulajdonságai alapján a *Togaviridae* családnak sorolta (Horzinek és mtsai, 1971, Porterfield és mtsai, 1978). Az *Arteriviridae* családnak az EAV-n kívül a sertések reproductív és légzőszervi tünetegyütteséért felelős vírus (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), az egerek laktát-dehidrogenáz enzimszintjét emelő vírusa (lactate-dehidrogenase elevating virus, LDV) és a majmok vérzéses lázának vírusa (simian haemorrhagic fever virus, SHFV) tartozik (Plagemann és Moennig, 1992).

Az 50-70 nm átmérőjű, ikozahedrális szerkezetű, burkos vírus felszínéről hiányoznak ugyan az ebbe a rendbe tartozó, másik 2 víruscsaládra jellemző szírom alakú, 20 nm nagyságú felszíni képletek (peplomerek), de szintén rendelkezik a burok glükoproteinjeiből kiinduló, csésze formájú nyúlványokkal (2. ábra). Ezek 10-15 nm átmérőjűek és a GP₅-M fehérje dimer felszín fölötti részét képezik (Horzinek és mtsai, 1971, de Vries és mtsai, 1995, Faaberg és Plagemann, 1995, Mardassi és mtsai, 1996).



2. ábra: Az EA vírus szerkezete és főbb szerkezeti fehérjei (Snijder és Meulenberg, 2001)

N nukleokapszid fehérje	14	kDa
M membrán fehérje	16	kDa
GP ₅ nagy burok fehérje	30-42	kDa
GP ₄ burokfehérje	28	kDa
GP ₃ burokfehérje	16-42	kDa
GP _{2b} kis burok fehérje	25-30	kDa
E burok fehérje	8	kDa

A szerkezeti fehérjék közül 6 burokfehérjét különítettek el, ebből a membrán fehérje (M protein) és az envelop fehérje (E protein) kivételével a többi összes glükozilálódik a vírusfehérje érési folyamata során. Az M protein egy 3 ívű transzmembrán fehérje, amelynek másik jellegzetessége az, hogy a GP₅ fehérjével, diszulfid hidak révén, heterodimereket képezve kerül be az EA vírusba, monomer formában csak a fertőzött sejtben található. Ez a heterodimerizáció létfontosságú az EAV fertőzőképessége és így a gazdaszervezetben való multiplikációja szempontjából (Snijder és mtsai, 2003). Szemben a GP₅ fehérje gyors heterodimerizációs kinetikájával, az M fehérje lassan kerül be a GP₅/M komplexbe, mennyiségének legnagyobb része az endoplazmatikus hálózatban (ER) akkumulálódik. A GP₅ fehérjével ekvimoláris mennyiségben

jelenlévő M fehérje feltételezeten a heterodimerizáció révén tartja ellenőrzése alatt a vírusérés folyamatát. (de Vries és mtsai, 1995.a). A másik két nagy mennyiségben képződő és a vírusba beépülő burokfehérje a GP₅, korábban G_L (glycoprotein large), mely a virionban lényegesen nagyobb arányban képviselt és a jóval ritkább GP_{2b}, (régebben glycoprotein short G_S), melyeknek a neve nem a méretükre, hanem a vírusban képviselt arányukra vonatkozik. Ezek még távoli rokonságban sincsenek a corona- és torovírusok hasonló fehérjéivel. A két glükozilált fehérje (glükoprotein) mérete nagyjából megegyezik (GP₅ 30-42 kDa, GP_{2b} 25-30 kDa, a glükoziláltsági fokuknak megfelelően), szerepük azonban eltérő (de Vries és mtsai, 1995.b). A GP₅ fehérje felszíni képletei ellen termelt ellenanyagok felelősek a vírus neutralizációjáért, ezért ez a burokfehérje rendkívül fontos szerepet tölt be az EAV fennmaradásában és új, mutálódott víruspopulációk kialakulásában. A GP_{2b} fehérjének esszenciális jelentősége van az infektív utóvírus generáció létrejöttében, (Snijder és mtsai, 1999), és kísérletekkel igazolták, hogy csak önmagukkal dimert képezve épülnek be a virionba, mégpedig, termelődésükhöz képest rendkívül korlátozott számban. Egyes szerzők feltételezik, hogy ezek a fehérjék kivételezett pozíciót, az ikozaéderek csúcsait foglalják el, és ezzel a vírus ikozahedrális struktúrájának kialakításában jutnak döntő szerephez (de Vries és mtsai, 1995).

Az újabb kutatások további három, korábban kisebb jelentőségűnek tartott burokfehérjéről számolnak be, melyek közül az E transzmembrán fehérje az M fehérjéhez hasonlóan rendkívül stabil, jobbra hidrofób jellegű, és a legkisebb molekulatömegű, mindössze 6,5-10,5 kDa. Mint általában a hasonlóan kicsiny méretű hidrofób RNS vírusfehérjék, ez a fehérje is képes áthatolni a kettős lipid rétegen, és különböző folyamatokat indít el a sejtmembránban, mint a pórusképzés, esetlegesen ioncsatorna létrehozása, a virion lefűződése a bimbózás végén (Carrasco, 1994). Behatóbb tanulmányozásakor egyértelművé vált, hogy bár a coronavirusokban is megtalálható ez a fehérje, és ott esetenként együtt evolválódik a másik transzmembrán fehérjével (M protein), az EAV többi szerkezeti fehérjéinek jelentős eltérése következtében a kutatók mégsem tulajdonítanak azonos funkciót nekik (Snijder és mtsai, 1999).

A GP₃ és GP₄ fehérjék funkciójáról a korábbi kutatások alapján csak annyit sikerült megállapítani, hogy mindkettő jelenléte esszenciális a vírus életciklusában (Molenkamp és mtsai, 2000). Biokémiaailag mindkettő erősen glükozilált formában épül be a vírusba, de míg az *in vitro* transzlációs kísérletek tanúsága szerint a GP₃ fehérjéből 16-42 kDa molekulatömegig terjedő fehérjeváltozatok képződnek és ebből csak a 37 és 42 kDa nagyságúak épülnek be a virionba, addig a GP₄ fehérje teljesen glükozilált változata (28 kDa) kerül be az EAV-ba (Wieringa és mtsai, 2002). Legújabbban viszont a 6 burokfehérjét fontosságuk alapján két részre osztják: az M/GP₅ (korábban G_L) heterodimer komplexet nélkülözhetetlennek, míg a kis burokfehérjék két komplexekbe tömörült csoportjait (GP_{2b}-GP₄, GP_{2b}-GP₃-GP₄) (GP_{2b} korábban G_S) melyeknek az EAV-be épülését az E

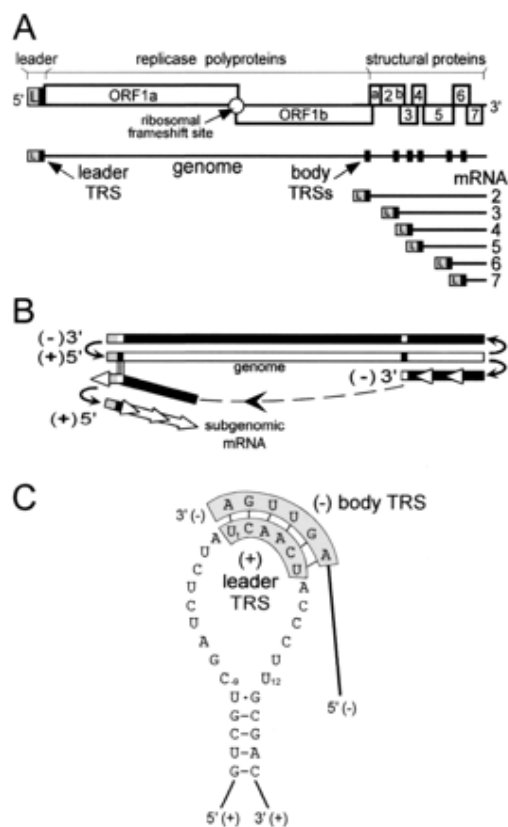
fehérje határozza meg, ellentétben a korábban publikált eredményekkel, nélkülözhetőnek tartják a virion létrejötte szempontjából (Wieringa és mtsai, 2004).

A nukleokapszid szerkezeti felépítése is jelentősen eltér a rend másik 2 képviselőjétől. Míg a koronavírussok RNS-e a magban lazán kígyózó jellegű, a torovírussoké pedig tömör, tubuláris szerkezetű, addig az artrivírussoké többé-kevésbé szabályos ikozahedrális szerkezetet mutat, 25-35 nm átmérővel. Jelentősen kisebb a nukleokapszid fehérje (N protein) mérete is a másik két család vírusaihoz hasonlítva 14 kDa. Ez a fehérje foszforilálódik az érés folyamán. Erősen konzervatív, így a diagnosztikai tesztek főleg e fehérje génjének kimutatásán alapulnak.

3.2.2. A vírus genomszerveződése

Az EAV genomját gyakran használják a *Nidovirales* rend genomszerveződésének a bemutatására. Mint a rend legrövidebb nukleinsavú képviselője, kedvelt modellvírus is a kutatók körében, habár sokak véleménye szerint a hasonló replikációs stratégia (den Boon és mtsai, 1996) és genomszerveződés (van Berlo és mtsai, 1982, van Berlo és mtsai, 1986) ellenére is jelentősen különbözik a rend másik két családjának vírusaitól. A vírus nukleinsava egyszálú, pozitív irányítottágú, policisztronos, az 5' végen sapkával (cap structure), a 3' végen poliadenilált farokkal rendelkező RNS, a referens Bucyrus vírus 12704 nukleotidot tartalmaz és ezen belül 7 leolvasási keretet, mely a genom $\frac{3}{4}$ részét elfoglaló polimeráz génből és a maradék szakaszon osztozó 7 szerkezeti fehérjét kódoló génből áll. Ez az RNS genom méretében ugyan csak a fele a corona- és a torovírussokénak, de a szerkezetét tekintve hasonlít azokhoz egyrészt, mert a genom $\frac{2}{3}$ -át ezeknél is a 2 prekursor poliproteint kódoló gén teszi ki. Másrészt az egymást részlegesen fedő ORF 1a (Bucyrus: 5183 nt hosszúságú és 1727 aminosavat kódol) és ORF 1b (Bucyrus: 4346 nt hosszúságú és 1448 aminosavat kódol) szakasz közötti pszeudocsomó segítségével (Bucyrus: 5399.-5405. nt), 1 nt-ot visszalépve értelmezhető a downstream (1b) leolvasási keret: riboszomális frameshift (Brierley, 1995). Különbözik viszont az EAV genom szerkezete a másik két említett víruscsaládtól abban, hogy nem figyelhetők meg nem kódoló régiók a 3' vég felőli, szerkezeti fehérjéket kódoló ORF-ek között, ami azt jelzi, hogy az *Arteriviridae* család vírusai lényegesen kisebb komplexitásúak és racionálisabb genomszerveződésű a *Nidovirales* rend nagyobb vírusainál.

Az 5' végtől kezdődő ORF 1a és 1b a vírus 2 nem szerkezeti multidomén prekursor fehérjét kódolja, köztük a 3 proteolitikus tulajdonságú fehérjével. Újabban a kutatók ennek a komplex poliproteinnak a replikáz-transzkriptáz elnevezést adták. Az ORF 1b régió kódolt RdRP enzim, elindítja és ellenőrzése alatt tartja a vírusreplikációs folyamatokat (Thiel és mtsai, 2001), és az ehhez szükséges teljes hosszúságú vírus RNS mellett 6, fészekszerű elhelyezkedést mutató, közös 3' végű, szubgenomiális RNS (sgRNS) készletet is létrehoz, melyek a 7 szerkezeti fehérjét kódolják. Innen ered a rend elnevezése (*nidus* latinul fészket jelent) és ez a replikációs ciklus mindhárom ebbe a rendbe tartozó víruscsaládra jellemző (3A. ábra).



3. ábra: Az EAV genomszerveződése (Pasternak és mtsai, 2003)

A: Az EAV genom sematikus képe a 7 leolvasási kerettel (ORF), a transzkripciót szabályozó szekvenciákkal (TRS) és a szubgenomikus mRNS-ekkel (sg-mRNS). **B:** A Sawicki és Sawicki (1995) által javasolt szakaszos negatív szál képződés képe. A vezetősálhoz kapcsolódó sg-mRNS törzsek szakaszos képződése. A pozitív szál fehér színnel a negatív szál fekete színnel jelölt. **C:** Az EAV vezetősál TRS régiójának feltételezett hajtúszerkezetet mutató képe. A vezetősál magjának első aminosava U1-gyel jelölt, a lehetséges bázispárosodás képe: a pozitív irányultságú vezetősál és a negatív irányultságú sgRNS törzse között.

Kutatásokkal bizonyították, hogy a sgRNS-ek mindegyike egy közös vezető szekvenciával rendelkezik (leader sequence: 1-211 nt), mely az EAV RNS 5' végéről származik, és egy szakaszos transzkripció folyamatban kapcsolódik hozzá az sgRNS-ekhez (3B. ábra). Általános jelenség ezeknél a víruscsaládoknál, hogy a szerkezeti fehérjéket kódoló gének mindkét szomszédos génnel néhány nukleotidtól több száz nukleotid hosszúságig terjedő mértékben, a gének két széli részén, átfedik egymást. Ennek a rendkívül gazdaságos genetikai információtárolási és genomszerveződési módnak köszönhetően az sgRNS transzkripció szabályozó szekvenciája (TRS) mindig megelőzi a gént, és ezért az 5' vég felőli oldalon helyeződve a vezető szekvenciával egyesülve válik a translációra alkalmassá (Savicki és Savicki, 1995, de Vries és mtsai, 1997, Snijder és mtsai, 1998, van Marle és mtsai, 1999) (3C. ábra).

A legújabb kutatások szerint a *Nidovirales* rendbe tartozó vírusok másik fő genetikai ismertetőjegye egy RNS-t feldaraboló enzim, mely a replikáz-transzkriptáz nem szerkezeti fehérje komplex enzimműködésének tagja, endonukleáz aktivitással. Ez rendkívül szokatlan az RNS vírusok körében, eddig csak a *Pestivirus* genus tagjainál írtak le hasonló RNáz funkciójú enzimet (Hausmann és mtsai, 2004). Ez az uridilát specifikus endoribonukleáz (NendoU) enzim a *Nidovirales* rend valamennyi tagjára jellemző, funkciója a dsRNS-ek vágása, ezért kulcsjelentőségű a szakaszos negatív szálú sgRNS-ek létrejöttében (Ivanov és mtsai, 2004).

Az ORF 2 régió az egyetlen leolvasási keret mely bizonyítottan bicisztronos működésű, nemcsak az SHF vírus (Godeny és mtsai, 1998), hanem az EAV esetében is (Snijder és mtsai, 1999). Két fehérjét kódol, az ORF 2a (Bucyrus: 9751-9954 nt) a 67 aminosav hosszúságú, hidrofób E (envelope) fehérjét és az ORF 2b (Bucyrus: 9824-10507 nt) a korábban G_S (glycoprotein small), ma GP_{2b} elnevezésű, 227 aminosav hosszúságú membránfehérjét.

A további szerkezeti fehérjék: az ORF 3 (Bucyrus: 10306-10797 nt) a 163 aminosavból álló GP₃ fehérjét, az ORF 4 (Bucyrus: 10700-11158 nt) a 152 aminosavból álló GP₄ fehérjét, az ORF 5 (Bucyrus: 11146-11913 nt) a 255 aminosavból álló GP₅ fehérjét (korábban G_L), az ORF 6 (Bucyrus: 11901-12389 nt) a 162 aminosavat tartalmazó membrán (M) fehérjét kódolja. A vírusgenom végén található ORF 7 régió (Bucyrus: 12313-12645 nt) kódolja a nukleokapszid (N) fehérjét, mely 110 aminosavból áll, és az egyedüli nem burokként erősen konzervatív, valamint az egyetlen foszforilált virionfehérje (Hyllseth, 1973., de Vries és mtsai, 1992, Snijders és mtsai, 1999, Wieringa és mtsai, 2004).

3.3. Az EAV genetikai tulajdonságai

3.3.1. Az egyes EAV gének genetikai vizsgálata

Az EAV genetikai vizsgálatának előzményei a 80-as évekre vezethetők vissza, amikor egyrészt a különböző országokban izolált vírusminták elegendő mennyiségben álltak a kutatók rendelkezésére ahhoz, hogy azok az azonos szerotípus ellenére, az egyre nyilvánvalóbbá váló molekuláris szinten észlelhető különbségek alapján csoportosíthatók legyenek, másrészt a molekuláris biológia forradalma nyomán publikált újabb módszerek is elterjedtek a vizsgáló szakemberek körében. Ezek a módszerek, köztük a nukleotid szintű vizsgálatok megalapozását jelentő PCR (Saiki és mtsai, 1985, Mullis és mtsai, 1986) és az erre épülő szekvenálás, új inspirációt jelentett más szakterület művelőinek is, akik a genetika területén kialakult robbanásszerűen felgyorsult információs adattömegekben saját tudományos területeik fejlesztésére is lehetőséget láttak. Ilyen tudományos terület volt a számítástechnika és az erre alapozott matematika, filogenetika, genetika, biokémia (nukleinsav és fehérje analitika), mikrobiológia, a rá épült diagnosztika, és számos olyan kutatási terület is, mely ezen tudományok új eredményeit másodlagos módon kamatoztathatta. A virológia kiemelkedően fontos területévé vált a matematikai

képességekkel és számítógép ismerettel rendelkező evolúció kutatók számára, akik a vírusok, különösen az RNS vírusok, rendkívüli mutációs rátáját és gyors replikációs ciklusát, valamint az ezek következtében viszonylag gyorsan felismerhető összefüggéseket felhasználva, matematikai képletek megalkotásával tették lehetővé az egyes vírusok rokonsági fokának megállapítását.

Elméletileg valamennyi gén alkalmas a rajta bekövetkezett nukleotid változások (szubsztitúciók) más homológ génekkel történő összehasonlítására és az ebből levont következtetések, számítások után filogenetikai vizsgálatra. Az eredményt tekintve azonban egyáltalán nem mindegy a szubsztitúciók gyakorisága, a ritkább szubsztitúciók egy adott rövidebb időn belül kevés információt jelentenek, így csak hosszabb időintervallum után lehetséges belőlük filogenetikai következtetéseket levonni. Ez a helyzet a DNS vírusoknál, ahol a kis mutációs ráta következtében nagyon nehéz 10-20 évre visszatekintő filogenetikai törzsfát létrehozni egy adott vírus esetében. A DNS vírusokkal készített törzsfák elsősorban különböző genusok közötti származástani kapcsolatokat ábrázolnak. Az RNS vírusok magas mutációs rátája következtében viszont, az egyes vírus-szerotípusokon belül is végezhetők filogenetikai vizsgálatok. A számításokat végző szakembereknek azonban tisztában kell lenniük az adott vírus különböző géneinek szubsztitúciós gyakoriságával, és a vizsgálatra szánt gén funkciójával.

Az EAV genetikai vizsgálatát Murphy (1992) RNS kétdimenziós oligonukleotid ujjlenyomat technikával végezte észak-amerikai lovakból, és több más kontinens (Európa, Afrika, Óceánia) különböző országainak lovaiból izolált vírusokkal. Az oligonukleotid képeket egymással összehasonlítva 60%-97% közötti hasonlóságot talált, de az ujjlenyomat képek hasonlósága bizonyos esetekben nagyobb volt távolabbi országok vírusai között, mint például az észak-amerikai kontinensen belül, jelezve azt, hogy már ezzel a módszerrel is alcsoportok (cluster) létezésére lehetett következtetni. Ő még a vizsgálatok finomítására a nukleinsav hibridizációs módszer alkalmazását találta megfelelő eljárásnak, de a genetikai vizsgálatok terén a PCR módszerrel történő génamplifikáció általánossá, rutinszerűvé válásával, az ilyen irányú kutatások nemcsak új irányt vettek, de erőteljesen fel is gyorsultak.

Az EAV első PCR-re alapozott genetikai vizsgálatát Chirnside és Sugita (Chirnside és mtsai, 1994, Sugita és mtsai, 1994) egymástól függetlenül végezték. Az előbbi 2 egymás melletti génnel (M és N), az utóbbi csak az M génnel, mégis míg Chirnside 10 vírus izolátumból csak 3 vírus változatra következtetett publikációjában (amerikai, osztrák, svájci), addig Sugita az M gén hasonló irányú vizsgálatával 4 különböző alcsoportot tudott elkülöníteni (2 amerikai és két európai). Figyelemre méltó még Chirnside azon megállapítása is, mely a kapott eredmények interpretációjaként feltételezi, hogy az egyes EAV törzsek egymással rekombinálódhatnak.

Időrendi sorrendben a következő gén, a GP₅ fehérjét kódoló ORF 5 régió vizsgálatának kezdete volt (1995), melyet Balasuriya monoklonális ellenanyag vizsgálatokkal egybekötve végzett el.

Megállapította, hogy a GP₅ fehérje felszíni képletei ellen termelt ellenanyagok felelősek a vírus neutralizációjáért, (Balasuriya és mtsai, 1995.a), továbbá azt, hogy 3 hipervariábilis szakaszt tartalmaz, melyek szekvenciái különösen alkalmasak más vírustörzsek hasonló szekvenciáival történt összehasonlítás után filogenetikai vizsgálatok végzésére (Balasuriya és mtsai, 1995.b). Hasonló következtetésre jutottak más kutatók is, akik szintén ezt a gént találták a legalkalmasabbnak az EAV genetikai összehasonlító vizsgálatára (St-Lauren és mtsai, 1997, Belák és mtsai, 1999, Stadejek és mtsai, 1999, Hedges és mtsai, 1999, Larsen és mtsai, 2001). Míg St-Laurent csak 2, Balasuriya pedig 4 genocsoportba tudta sorolni a világ különböző pontjairól származó vírus izolátumokat, addig a legátfogóbb jellegű összehasonlító munkából világossá vált, hogy a két nagy genocsoport (észak-amerikai és európai) további alcsoportokra oszlik, így 5 egymástól jól elkülöníthető genocsoportot képez az EAV törzsek döntő többsége (Stadejek és mtsai, 1999). A további közlemények elsősorban erre a genetikai felosztásra alapozzák saját adataik közzétételét (Hedges és mtsai, 1999, Larsen és mtsai, 2001), illetve a perzisztens hordozás során felbukkanó és a járványkitörésekből származó új vírusváltozatok mutációs rátáját összehasonlítva megállapították, hogy az előbbi jelentősen gyorsabb, és így az új járványkitörések kialakulásáért a méneken megbújó vírusok oktatni szerepe a molekuláris biológia módszereivel is igazolttá vált (Hedges és mtsai, 1999, Balasuriya és mtsai, 1999).

A G_{2b} gént, melyet korábban G_S génnek nevezték, az M génhez hasonlóan, egyazon évben ugyancsak két különböző kutatócsoport vetette alá származástani vizsgálatoknak. A nukleotid szubsztitúciókat figyelembe véve Lepage 8 vírust vizsgálva 3 elkülönülő genocsoportot talált, míg Hedges hasonló módon 19 vírust vizsgálva ugyanezt az összehasonlítást megállapította, hogy a G_{2b} gén szemben a GP₅ génnel konzervatívabb, de a filogenetikai vizsgálatokra való alkalmasságát igazolja az a tény, hogy hasonló genocsoportokat tár fel ennek a génnek a vizsgálata is, mint amelyeket a GP₅ gént alapozva más szerzők leírtak (Lepage és mtsai, 1996, Hedges és mtsai, 1996).

A vírus ORF 3 és ORF 4 régiójának vizsgálata már azelőtt elkezdődött, hogy a kutatók pontosan megismerték volna a két kis gén funkcióját. Archambault még nem szerkezeti fehérjéknek tartva azokat, megállapította, hogy míg az ORF3 gént alapozott összehasonlításokkal 3 különálló genocsoportot (bécsi, észak-amerikai, ARVAC) lehet elkülöníteni, addig az ORF 4 gén konzervatív jellege folytán valamennyi vizsgált vírus törzs filogenetikailag szoros rokonságot mutatott egymással (Archambault, 1997, Archambault, 1998). Hedges ebből a tényből kiindulva, már csak az ORF 3 régió bekövetkező szubsztitúciókat vizsgálta és összehasonlítva ennek a génnek a mutációs gyakoriságát az ORF 5 génnel, megállapította, hogy bár az ORF 3 gén nagyobb mutációs rátát mutat a perzisztens vírusürítő mének ondómintáiból izolált vírusok esetében, mégis a filogenetikai vizsgálatok számára az ORF 5 régió előnyösebb. Ennek oka az, hogy szemben az

előbbi régióon tapasztalható gyakori nukleotid visszamutálódásokkal, az ORF 5 régióon a kimutatott mutációk száma az idő arányában nő, és így a genetikai diverzitás megállapítására és vizsgálatára ez a gén alkalmasabb (Hedges és mtsai, 1999).

A szubgenomikus virális RNS-ek vezető (leader) szálát Kheyar vizsgálta, és publikációiban beszámolt a vezető szálak elsődleges és másodlagos szerkezetéről, valamint ez utóbbinál 3 illetve 4 konzervatív szekvencián alapuló hurokról (A, B, C, D loop). A D hurok jelenléte illetve hiánya alapján az általa vizsgált 10 vírus izolátumot 2 genocsoportba tudta besorolni (Kheyar és mtsai, 1998.a, Kheyar és mtsai, 1998.b).

A nem szerkezeti fehérjéket meghatározó génszakasz, az ORF 1a és 1 ab filogenetikai összehasonlító vizsgálatáról, a vezető szálát leszámítva, csak Stadejek ír a G_L génre alapozott tanulmányában. Ebben kifejti, hogy a replikáz gén régiójára alapozott törzsfa nagyjából megegyezik a G_L génre alapozottal, így a két gén nem evolválódhatott elkülönülten, megcáfolva ezzel Chirnside (1994) azon állítását, mely az EAV rekombinálódás lehetőségét felveti.

4. Saját vizsgálatok

4.1 Szerológiai vizsgálatok a magyarországi lóállományokban

4.1.1. Anyag és módszer

Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:

A fertőzésen átesett lovak azonosítását célzó szerológiai felmérő vizsgálatokat négy csoportba sorolható állatokból gyűjtöttük össze. 1. klinikailag beteg, EVA gyanús lovakból, 2. klinikailag tünetmentes lovakból, 3. klinikailag tünetmentes, fedezettésre igénybe vett ménékből, 4. vetélt kancákból. Összesen 987 vérmintát vizsgáltunk meg 2001. és 2002. években. A minták legnagyobb részét a klinikai tüneteket nem mutató állatok tették ki: 316 vérminta, ezt a fedezettetésben használt ménék vérmintái: 266, majd a klinikailag beteg lovak vérmintái: 250, végül a vetélt kancákból beküldött vérsavók: 155 minta követték.

A vérminták a hazai lovak állategészségügyi ellátásában részt vevő, kis- és nagyüzemeket ellátó állatorvos kollégáktól kerültek be a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar (Szie ÁOTK) Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének Virologiai Laboratóriumába, ahol termosztátban, 20-30 percig, 37°C-on történő melegítés után egy éjszakán át hűtőszekrényben tároltuk. Másnap 300 × g erővel 10 percig centrifugáltuk, a savót elkülönítettük, majd fiziológiás foszfátpufferben (PBS) kétszeresére hígítottuk azt annak magas mucintartalma miatt. Ezt követően 30 percre 56°C-os vízfürdőbe helyeztük a hígított savómintáinkat, majd a vizsgálatok elvégzéséig -20°C-on tároltuk azokat.

Alkalmazott szerológiai próba

A szerológiai módszerek közül a nemzetközi standardnak megfelelően a komplementdependens vírusneutralizációs próbával végzett ellenanyag-kimutatást tartottuk legalkalmasabbnak pontossága és specificitása miatt. Ennek pontos leírása az OIE Manual of Standards-ben (2000) található. A próbát Rabbit Kidney-13 (RK-13) sejtvonalon végeztük, a referens Bucyrus vírustörzssel.

A VN próba rövid leírása:

1. 12,5 µl tápfolyadék (DMEM) bemérése a sejtenyésztő műanyag lemez második sorától a lemez aljáig.
2. 12,5 µl mennyiségben a savók párhuzamos bemérése 1/2 hígítástól, kettes alapú hígítással 96 lyukas műanyag sejtenyésztő lemezre (Greiner, Frickenhausen, Németország).
3. 100-300 egység (tissue culture infective dose 50%: TCID₅₀) referens Bucyrus vírus (Professzor Nowotny Bécs) elkészítése 10 %-nyi mennyiségű tengerimalac savó komplementtel, 25-25 µl rámerése a savókra.
4. A vírus visszatitrlása és a referens pozitív savó visszatitrlása

5. Az 50 µl savó-víruskeverék összekeverése, inkubálása 37°C-on 60 percig.
6. 3-5 napos RK-13 sejtszuszpenzió 100-100 µl rámerése a lemez valamennyi vájatarára.
7. Inkubáció 37°C-on, 72 órán át, 5% széndioxid tartalmú, túltelített páratartalmú termosztátban.
8. Bírálás.

A VN próba értékelése:

1. Az alkalmazott vírus titere 100-300 TCID₅₀ között, a referens pozitív savó titere az előzetes savótiter értékének 0,3 log-án belül kell legyen, ellenkező esetben a próbát ismételni kell.
2. Pozitívnak tekintettük a savót azon hígításától, mely a rámerett 100 TCID₅₀ vírus sejtkárosító hatását (cytopathic effect: CPE), legalább 75%-ban gátolja.

4.1.2. Eredmények

A komplementdependens vírusneutralizációs próbával kapott eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A különböző csoportokban vizsgált állatok szerológiai eredményei

állatcsoportok	vizsgált mintaszám (db)	EAV pozitív	EAV negatív	pozitív minták százaléka (%)
tünetmentesek	316	171	145	54,11
mének	266	112	154	42,11
tüneteket mutatók	250	121	129	48,4
vetélt kancák	155	83	72	53,55
összesen	987	487	500	49,34

A 987 minta közül 266 savó származott méntől, ezekből 112 alkalommal találtunk arteritis vírus ellen képződött ellenanyagokat (42,11%).

A méneken kívül 155 vetélt kancának a savóját vizsgáltuk meg és ezekből 83 esetben mutattunk ki arteritis vírus ellenanyagokat (53,55%), míg a klinikai tüneteket nem mutató 316 lótol származó vizsgálati minta feldolgozása során 171 bizonyult pozitívnak (54,11%), 145 pedig negatívnak. Az EVA klinikai tüneteit mutató állatok szerológiai vizsgálata a 250-ből 121 esetben zárt pozitív eredménnyel, (48,4%). Így az országosan vizsgált lóállomány 49,83%-a bizonyult pozitívnak.

4.1.3. Megbeszélés

Vizsgálatainkat a vírusneutralizációs próbával végeztük, amely egyike a legérzékenyebb indirekt vírus-kimutatási módszereknek.

A lovak arteritis vírusának hazai elterjedtségét vizsgáló felméréssel nemcsak a vírust ürítő mének felderítését, hanem az országban esetlegesen előforduló EVA járványok szerológiai

módszerrel történő megállapítását is szorgalmaztuk. Ez utóbbi vizsgálat két tényre is fényt derített, egyrészt a klinikai tünetekben megnyilvánuló EVA megbetegedés olyan ritka országunkban, hogy egyetlen szerológiailag bizonyítható járványkitörést sem sikerült igazolnunk, valamennyi EVA-ra utaló klinikai tünet más megbetegedéssel volt kapcsolatban, az itt talált szeropozitív lovak aránya ezért néhány százalékkal még az országos átlagnál is alacsonyabb.

Másrészt elvégeztük a mének és esetlegesen egyes lóállományok vakcinázását megelőző utolsó olyan, nagyszámú lovon végzett szerológiai státuszvizsgálatot, mely a későbbiekben viszonyítási pontként szolgálhat a jövőben esetlegesen sorra kerülő vizsgálatoknál, a ma már engedélyezett vakcinázás szélesebb körű hazai elterjedtsége után az alapvetően megváltozott szeropozitivitási arányok kiértékelésekor.

A vizsgálatokból levonható következtetések szerint a Magyarországon 2001 februárjától 2002 júliusáig terjedő időszakban a lóállomány fertőzöttsége 49% körül mozgott, amely figyelembe véve a '90-es évek statisztikai adatait (Rusvai és mtsai, 1996), emelkedő tendenciát mutat úgy, hogy közben súlyos járványkitörések nem észlelhetők az országban. Ez további két következtetést von maga után: 1. hazánkra jellemző azon EAV törzsek elterjedése, melyek csak szubklinikai tünetekben manifesztálódnak, 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).

Az egyes állatcsoportok kismértékben eltérő vírusszerológiai eredményei megerősítik azt a nézetünket, mely szerint a fertőzés terjedésében az életkornak jelentős szerepe van, így bármely általunk vizsgált csoportnál, ha kellően nagy számú egyed vizsgálunk, körülbelül ugyanolyan százalékban tudunk az egyes mintacsoportokból EAV ellenanyagokat kimutatni. A mének átlagtól 10%-kal negatív irányban eltérő szeropozitivitási aránya nagyrészt az újonnan tenyésztésbe vett mének nagyobb arányával magyarázható.

A vizsgálati eredmények érdekessége egyes megyék kisebb szeropozitivitási aránya, mely nem elsősorban csak az alacsony mintaszámmal, hanem az adott megyék lóállomány sűrűségével magyarázható (2. táblázat).

A dolgozatban ismertetett szerológiai vizsgálatokkal (melyek egy nagyobb vizsgálat sorozat részét képezik) az volt a célunk, hogy egy járványtani alaphelyzetet rögzítsünk. Jelenleg ugyanis Magyarországon csak olyan lovak vérében lehetnek ellenanyagok, amelyek a vírussal természetes módon fertőződtek és a fertőzést vagy tünetmentesen átvésztették, vagy hosszabb rövidebb betegség (vetélés, ödémaképződés, légzőszervi tünetek) után abból felgyógyultak. Ez a járványtanilag tiszta helyzet a vakcina esetlegesen szélesebb körben történő alkalmazásával meg fog változni, hiszen a jelenleg rendelkezésre álló módszerekkel nem lehet különbséget tenni a vakcinázás következtében

kialakuló immunitás és az átvészeléses immunitás között, vagyis a vakcinázás hatásági engedélyezését követően a szeropozitivitás nem csak átvészelésre (természetes szerzett immunitás), hanem vakcinázásra (mesterséges szerzett immunitás) is utalhat. Ennek elsősorban a mének esetében van jelentősége, ugyanis vírushordozó állapot csak és kizárólag a fertőződés következtében alakulhat ki, vakcinázás következtében nem. A továbbiakban tehát a mének esetében fokozott jelentősége lesz az úgynevezett direkt vírus-kimutatási módszereknek, amikor nem a vírusellenes ellenanyagokat, hanem magát a vírust, vagy annak valamelyik alkotórészét mutatják ki a vizsgálati mintákból. Eddig a szerológiai vizsgálat pozitivitása indikátorként működött, jelezte, hogy az állat korábban fertőzött volt, így a vírushordozás lehetősége fennállt. Ez az indikátor-szerep attól a pillanattól kezdve megszűnik, melytől az engedélyezett, inaktívált vakcinával történő immunizálás elkezdődik. Hazánkban, a mai gyakorlatban csak a mének immunizálása engedélyezett, előzetes szerológiai státuszvizsgálatot követően és a szeropozitív mén és méncsikó esetében el kell végezni tenyésztésbe vétel előtt a viszonylag drága, munkaerő- és időigényes direkt víruskimutatási vizsgálatot (vírusizolálást, vagy polimeráz láncreakción alapuló nukleinsav-kimutatást). Eddig a direkt kimutatást csak akkor kellett elvégezni, ha az olcsó és megbízható szerológiai teszt pozitív eredményt adott.

2. táblázat: A vizsgált állatok szerológiai eredményei megyénkénti összesítésben

Megyék	vizsgált minták (db)	EAV pozitív	EAV negatív	pozitív minták (%)
BARANYA	114	62	52	54,39
BÉKÉS	108	64	44	59,26
CSONGRÁD	101	60	41	59,41
FEJÉR	22	6	16	27,27
GYŐR-M.-S.	5	1	4	20
HEVES	29	16	13	55,17
KOMÁROM	23	11	12	47,83
PEST	31	6	25	19,35
SOMOGY	116	60	56	51,72
VESZPRÉM	94	12	82	12,77
ZALA	344	189	155	54,94
	987	487	500	49,34

A másik következménye a valamennyi állatra kiterjedő vakcinázás hatósági engedélyezésének az, hogy a szeropozitív lovak aránya a magyarországi lóállományon belül sokkal magasabb lesz. Ez mind a ménállományra, mind a kancaállományra vonatkozik. Vizsgálatainkat azért is végeztük, hogy a későbbi változásokat, azok arányát pontosan meg lehessen majd állapítani.

4.2 A hazai lóarteritis vírusok izolálása

4.2.1. Anyag és módszer

Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása: ondóminták

A vírusközömbösítési próbával megvizsgált 266 ménből 112 pozitívnak bizonyult. Valamennyi szeropozitív állat ondómintáját 2001. és 2002. években kétszer, direkt vírus nukleinsav kimutatással: PCR módszerrel is megvizsgáltuk. A korábbi évekből (1994-2000) származó, 15 szeropozitív mén ondómintát, melyet az akkor elvégzett előzetes vizsgálatok óta -80°C -on tároltunk, valamint 33 szerológiailag nem vizsgált mén ondómintáját is PCR vizsgálatnak vetettük alá.

A vírus izolálását az első 100 minta esetében, valamint a továbbiakban minden PCR módszerrel EAV nukleinsav pozitívnak diagnosztizált minta esetében elvégeztük. Az egyszer már vírust ürítő állatok esetében újra megvizsgáltuk mind a korábban gyűjtött mintát (ha volt ilyen), mind a következő években legalább még egyszer ellenőriztük az ondómintájukat vírusizolálással és PCR módszerrel.

A mintagyűjtést a tenyészmének állategészségügyi feladatait ellátó állatorvosok segítségével, azok közreműködésével az Office International des Epizooties, Manual of Standards 2000 (OIE Manual 2000) irányelvei alapján végeztük, röviden a következő módon. A mén preputium nyílását meleg, szappanos vízzel lemostuk, majd a méntől 37°C -os műhüvelybe teljes ondómintát vettünk, melyből az ondó alapos, mechanikus keverése után, 1-2 percen belül, steril, $+4^{\circ}\text{C}$ -on, hűtőtáskában előhűtött fecskendőbe, 5-10 ml-nyi mennyiséget szívtunk fel. Az így kapott mintát az esetek döntő többségében nyolc órán belül, néhány alkalommal azonban 24-48 órával a mintagyűjtés után kezdtük feldolgozni.

A mintakezelés általános szabálya az volt, hogy a megérkezéskor azonnal vagy csak egyszeri fagyasztás után dolgoztuk fel a mintáinkat. Megérkezéskor a $+4^{\circ}\text{C}$ -os mintát újabb keverés, átlagosítás után két részre osztottuk, az egyik részt 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe pipettáztuk, majd $1000 \times g$ 5 percig 4°C -on történő centrifugálást követően elkezdjük a nukleinsav tisztítást. Az első 100 mintánál, a jégfürdőbe helyezett ondómintát, rövid ideig: 3×15 másodpercig, 15 kHz ultrahanggal kezeltük, majd az így nyert mintából 1 órán belül elvégeztük a vírusizolálást. A PCR módszerrel kimutatott EAV nukleinsav pozitív mintáknál az 1,5 ml-es mikrocentrifuga cső 1,5 ml tartalmát kétszeresére hígítottuk PBS-sel és ezt kezeltük ultrahanggal, majd itt is 1 órán belül elvégeztük a vírusizolálást.

A vírusizolálás során pozitívnak bizonyult ondóminták közül az első tíz minta esetében meghatároztuk a vírus infektív titerét is, a mintákat 10-es alapú hígítási sor készítése után párhuzamosan 5-5 sejtenyésztetre oltottuk, az értékelést Reed-Muench módszere szerint végeztük (1938).

Szervminták

1998-2004-ig 157 vetélt magzat és 39 újszülött csikó szervmintáit vizsgáltuk azok vírustartalmára nézve. 1998 és 2001 között a magzati szervmintákat és magzatburkokat -20°C -on tároltuk. A későbbiek során ezen mintákat -80°C -on, tartottuk a felhasználásig.

2001-től a beérkezett szervmintákat: lép, máj, tüdő, 31 esetben magzatburok, azonnal feldolgoztuk, steril ollóval és csipesz segítségével apróra vágtuk, majd eldörzsöltük a szervenként mintegy 1 grammnyi mintát. Ezt 1 : 10 arányban $5 \times$ antibiotikus (Sigma) PBS-ben tovább homogenizáltuk, majd felhasználásig -80°C -on, 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekben tároltuk.

A vírusizolálás során pozitívnak bizonyult szervmintáknál a korábban ismertetett módon ugyancsak meghatároztuk a vírus infektív titerét.

Leukociták

Az EVA gyanús, klinikai tüneteket (láz, ödémaképződés, néhány nappal, héttel korábban előfordult vetelés) mutató állatokból megkíséreltük a vírus kimutatását a leukocitákból: 2,8 % trinátrium-citrát tartalmú steril desztillált víz három ml-nyi mennyiségéhez 5-10 ml teljes vért vettünk az érintett állatból, majd többszöri óvatos keverés után a mintát hűtőládában, $+4^{\circ}\text{C}$ -on a laboratóriumba szállítottuk. A mintákat minden esetben azonnal feldolgoztuk: $+20^{\circ}\text{C}$ -on 30 percig, $400 \times \text{g}$ centrifugális gyorsulással centrifugáltuk, majd a képződött fehérvérsejt réteget (buffy coat) Pasteur üvegpipettával elválasztottuk a vörösvérsejt rétegtől és egy új, steril csőbe pipettáztuk. Itt steril desztillált víz segítségével 40 másodperc hosszan ozmotikus sokknak vetettük alá a vörös vérsejteket, majd normalizáltuk az ozmotikus nyomást, és a fehérvérsejteket 10 percig $200 \times \text{g}$ centrifugális gyorsulással, $+4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. Az üledékben lévő fehérvérsejtet 1 ml steril PBS-ben vettük fel, majd felhasználásig -80°C -on tároltuk. 2001 és 2004 között 61 leukocita mintát vizsgáltunk vírusizolálással és PCR alapú vírus nukleinsav kimutatással. 2001 és 2004 között 25 leukocitát vizsgáltunk vírusizolálással és PCR alapú vírus nukleinsav kimutatással.

Orrváladék minta

A leukocitákkal egyidejűleg, a légzőszervi tüneteket (orrfolyás, köhögés, tüszögés) is mutató lovakból orrváladék mintákat is gyűjtöttünk, $+4^{\circ}\text{C}$ -on szállítottuk, majd a laboratóriumban vortex segítségével a vattatamponról a sejteket a szállítófolyadék-ként szolgáló $5 \times$ antibiotikus PBS-be ráztuk. Az így nyert vizsgálati anyagot a felhasználásig -80°C -on tároltuk. 2001 és 2004 között 25 orrváladék mintát vizsgáltunk vírusizolálással és PCR alapú vírus nukleinsav kimutatással.

Vizelet minta

A további 4 vizeletmintát az eddig leírt módon szállítottuk, 10 percig $200 \times \text{g}$ centrifugális gyorsulással, $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő centrifugálás után a felülúszót elöntöttük, és a fennmaradó 1,5 ml

üledéktartalmú vizeletet felhasználásig -80°C -on tároltuk, vizsgálatuk vírusizolálással és PCR alapú vírus nukleinsav kimutatással történt.

Sejtenyészetek

Vizsgálataink kezdetén összesen hét különböző sejtvonalat próbáltunk ki a vírus izolálása céljából: BHK-21 (hőrcsög vese), ED (ló bőr), EEL (embrionális ló tüdő), MDBK (szarvasmarha vese), PK-15 (sertés vese), RK-13 (nyúl vese), VERO (zöldmájom vese), valamint két túlélő szekunder és terciér sejtenyészetet is bevontunk kísérleteinkbe: borjú here és ló vese hámsejteket. Az előzetesen, a sejtfogékonyság eldöntésére szolgáló kísérleteink eredményeinek figyelembevételével, mintáink döntő részét két sejtvonalon izoláltuk: BHK-21 és RK-13 sejteken. A sejtenyészeteket 24 lyukú, steril műanyag sejtenyésztő lemezekben (Greiner, Frickenhausen, Németország) szaporítottuk. A szaporító tápfolyadék 5%, a fenntartó tápfolyadék 2% újszülött kolosztrummentes borjúsavót (Mezőhegyes) tartalmazott.

Vírusizolálás

2000-ig minden mintát hagyományos módon, csövekben tenyésztett RK-13 sejtvonalból készült, egyrétegű sejtenyészetre, adszorpciós technikával, vagy sejtszuspenzióba oltottunk. 2000 februárjától az előbb említett hagyományos vírusizolálási technika mellett, majd e helyett, műanyag, tenyésztő lemezekben elszaporított, 24 órás, egyrétegű sejtenyészetekre oltottuk a vizsgálati mintáinkat. Ettől kezdve az EAV izolálását az OIE Manual 2000 ajánlása alapján végeztük, mely Timoney (1986) és Ostlund (1997) módszerét írja le, kiegészítve egy, csak nagy általánosságban és csak az ondomintákra megadott, ultrahanggal történő mintakezelési eljárással (OIE 2000).

Mintáink közül az ondominták kivételével, minden esetben megkíséreltük a vírusizolálást. Valamennyi alkalommal a mintákat $5000 \times g$ gyorsulással, 10 percig, 4°C -on centrifugáltuk, majd 1 : 10 és 1 : 100 (-1 és -2 lg) hígításokban oltottuk a sejtenyészetekre, melyeket előzetesen újszülött kolosztrummentes borjúsavót (fetal calf serum: FCS) nem tartalmazó tápoldattal (Eagle minimal essential medium: EMEM Sigma) mostunk. Az inkubációt itt is 1 óráig, 37°C -on, 5% széndioxid tartalmú, túltelített páratartalmú termosztátban végeztük, majd az inokulum pipettával történő eltávolítása után az összes beoltott sejtenyészetet félig folyékony, 0,75% végkoncentrációjú, 3000 centipoise (cps) viszkozitású, karboxi-metil-cellulóz (Sigma) tartalmú, tápfolyadékkal fedtük.

Az első 100 ondominta esetében 3×15 másodpercig, jégfürdőben 15 kHz frekvenciájú ultrahanggal kezeltük a vizsgálati anyagokat, melyeket két ultrahangozás között 2 percig jégfürdőben visszahűtöttünk. Ezzel párhuzamosan ultrahanggal nem kezelt ondomintákkal is elvégeztük a vírusizolálást. Ezt követően centrifugálás után ($5000 \times g$ 10 perc) \lg_{10} alapú hígítási sort készítettünk és a -1, -2, -3 hígításokkal az előbb említett módon fertőztük sejtenyészeteket.

2001-től RK-13 sejtvonala helyett BHK-21 sejtvonalaat használtunk. A további ondominták esetében csak a PCR módszerrel EAV pozitív minták vírusizolálását végeztük el.

Az izolált vírusok fiziko-kémiai tulajdonságait a nemzetközi gyakorlatban alkalmazott próbákkal határoztuk meg (Mayr és mtsai, 1974). Röviden: nukleinsav tartalmuk azonosítására a dezoxiribonukleinsav (DNS) gátlási próbát alkalmaztuk, a fenntartó tápfolyadékhoz 5-fluor-dezoxiuridint (FUDR, Fluka) adva 100 µg/ml végkoncentrációban, míg azt, hogy az izolátum burkos vagy nem burkos virionokat tartalmaz-e kloroformkezeléssel (Sigma) döntöttük el. 20% mennyiségű kloroformot adtunk a vírusszuszpenziókhöz, 1 óráig + 4°C-on tároltuk és többször összeráztuk a keveréket, majd 3000 × g centrifugálás után a felülúszóból 50-50 µl-nyi mennyiséget fogékony sejttenyésztetre oltottuk. Amennyiben az izolátum burkos, RNS vírusnak bizonyult, szerológiai azonosítása vírusneutralizációs próbával (neutralizációs index számítás) történt. Pozitív savóként magyarországi, magzati korban áthangolódott kolosztrumot még nem kapott, újszülött csikó savóját használtuk.

4.2.2. Eredmények

Összesen 583 mintából 41 EAV izolátumot tudtunk elszaporítani vagy BHK-21 vagy RK-13 sejttenyészteten. A 349 esetben párhuzamosan elvégzett PCR vírusnukleinsav kimutatással 46 EAV pozitív mintát találtunk. A különböző direkt víruskimutatási eljárásokkal 47 mintát értékeltünk pozitívnak. A fennmaradó 6 mintából kettő, vetélt magzatok szervmintáiból származott, melyeket 2 illetve 4 év hosszan -20°C-on tároltunk a vírusizolálás megkísérlését megelőzően. A további négy ondominta közül egy nem tartalmazott elegendő mennyiséget a vírusizoláláshoz (200 µl), egyet 9, egyet pedig 2 évig -80°C-on tároltunk, egy PCR pozitív mintából pedig ismételen sem sikerült vírust izolálni.

Az azonnal feldolgozott minták (213 db) közül két mén ondivizsgálatánál mutatkozott eltérés a vírusizolálás és a PCR eredménye között (99,06% korreláció): egy alkalommal, az előbbivel sikerült vírust izolálnunk, amit a megismételt PCR vizsgálattal sem tudtunk az eredeti mintánál igazolni, de a sejttenyészteten elszaporodott vírus nukleinsav PCR-rel már kimutatható volt. Az egy hónap múlva ismételen, ugyanattól az állattól beküldött ondomintából már mindkét módszerrel kimutatható volt a vírus, illetve annak nukleinsava. A másik esetről a PCR módszer mutatkozott érzékenyebbnek, a megismételt mintavételt követően már a vírusizolálás is sikeres volt az ugyancsak eredményes nukleinsav kimutatás mellett (PCR).

2001-től 2004-ig 112 szeropozitív mén ondomintájából 40 esetben arteritis vírust, míg egy alkalommal EHV-1 vírust izoláltunk a félfolyékony tápfolyadék alkalmazásával. EAV esetében a 2. naptól először általában a sejttenyésztetek széli részén, 1-2, csupán 5-15 lekerekedett sejtből álló plakk volt megfigyelhető, melyek idővel, az elváltozott sejtek számának növekedésével nagyobb kiterjedésűek lettek, a 4. nap után egymásba értek, de döntő többségük nem okozott 100% CPE-t a

6. napon sem. A különböző izolátumok plakkformáló képessége egymástól eltért, egyes minták gyengén szaporodó, mások valamivel kifejezettebb CPE-t eredményező és gyorsabb sejtkárosodást előidéző vírusokat tartalmaztak. A későbbiek során genetikailag csoportosított vírusizolátumok és azok sejtkárosító hatása között összefüggést nem találtunk.

Az első 18 EAV izolátum esetében elvégeztük az ultrahanggal kezelt és nem kezelt minták izolálási eredményességére vonatkozó összehasonlító vizsgálatokat is. Félfolyékony tápfolyadékkal fedett sejttenyészeten az ultrahanggal nem kezelt PCR pozitív ondóminták közül vírusizolálással mindössze 2 bizonyult pozitívnak (11.11%), míg az ultrahanggal kezelt PCR pozitív minták közül mind a 18 (100%).

Az ugyanezen mintáknál hagyományos (nem félfolyékony tápfolyadékot alkalmazó) izolálási technikával történt vírusizolálás eredménye teljes mértékben negatív volt, sem a BHK-21, sem az RK-13 sejteken nem tudtunk jól kivehető, határozott plakkokat mutató CPE-t észlelni. Hat esetben csupán a sejttenyészetek gyorsabb öregedése, egyes sejterületek felritkulása volt megfigyelhető a 2.-tól 6. napig, jelezve a sejttenyészetekben esetleg végbemenő vírusreplikációt.

A retrospektív módon vizsgált, 1994 és 2001 között szeropozitív ménekből gyűjtött és azóta -80°C-on tárolt, 15 ondóminta vírusizolálással történő vizsgálatokor csupán két esetben sikerült a vírust izolálnunk. Azokban az esetekben, amikor a minta beérkezését követően három napon belül, az OIE által ajánlott módszer szerint elkezdtük a vírusizolálást, az első leoltás után 5 nap múlva a sejteket lefagyasztottuk, és 2 évvel később, az első vakpasszázzsal folytattuk a munkát.

Az egyszer már vírusürítőnek bizonyult mének egymást követő években történt ondóvizsgálata során 3 ménnél tapasztaltuk a vírusürítés abbamaradását, ezen állatok közül további két esetben a vírusürítést követő második évben sem tudtunk ondóikból EA vírust izolálni, a harmadik méntől további mintát nem kaptunk. Ez az összes, legalább két évig ellenőrizhető mén 33,33%-a volt.

A 2001-2004 közötti időben 154 vetélt lómagzat szerveit vírusizolálással vizsgálva egyetlen EA vírust sem mutattunk ki, ezzel szemben viszont ugyanezen mintákból 20 esetben izoláltunk ló herpeszvírust (equine herpesvirus 1, EHV-1).

A retrospektív módon 4 évre visszamenőleg (1998-2001-ig) 42 arteritis megbetegedésre gyanús kanca elvetélt magzatának és magzatburkának, valamint újszülött korban elhullott csikóknak mélyhűtőben tárolt mintáit is vizsgáltuk, és 2 esetben sikerült arteritis vírust izolálni a félfolyékony tápfolyadék alkalmazásával. Az egyik esetben egy újszülött csikó generalizált kórformát mutatva életének 4. napján pusztult el (Szeredi és mtsai, 2003). A másik izolátum tömeges vetelési hullámot kiváltó EVA járványból származott (Hornják és mtsai, 2001). A magzattól és újszülött csikótól izolált vírus CPE hatása erőteljesebbnek mutatkozott az ondómintákból izolált vírusokénál, gyorsabb plakkképződést és mindkét esetben 100%-os sejtkárosító hatást okozott.

Az első tíz pozitív ondóminta, valamint a lómagzat és a csikó szerveinek titrálással meghatározott vírustartalmát a 3. és 4. táblázat tartalmazza. Az újszülött, négynapos korban elhullott csikó tüdejében a vírustiter $10^{3,4}$ TCID₅₀/ml, lépében $10^{2,2}$ TCID₅₀/ml, májában $10^{1,8}$ TCID₅₀/ml volt, míg a vetélt magzat esetén a tüdőben $10^{1,6}$ TCID₅₀/ml, a lépben $10^{1,4}$ TCID₅₀/ml vírust mutattunk ki.

3. táblázat: Az izolált EA vírusok földrajzi megoszlása, a vírus titere és az izolálás dátuma (A : ondóminta, M : magzat, Ú : újszülött csikó

törzs	Vírusizolálás dátuma	vírustiter (lg ₁₀ /ml)	Megye
A1	2001	3,8	Békés
A8	2001	2,4	Fejér
A13	2001	1,6	Somogy
A16	2001	4,0	Budapest
A19	2001	4,0	Budapest
A49	2001	1,6	Bács-Kiskun
A50	2001	3,2	Bács-Kiskun
A58	2001	3,4	Veszprém
A72	2001	3,8	Baranya
A81	2001	3,8	Fejér
A82	2001		Győr-Sopron
A95	2001		Pest
A111	2001		Fejér
A142	2001		Baranya
A143	2001		Zala
A147	2001		Heves
A170	1997		Békés
A172	2002		Komárom-Esztergom
A189	2002		Heves
A197	2002		Fejér
A204	1994		Heves
A215	2000		Zala
A216	2000		Fejér
A239	2002		Budapest
A243	2002		Bács-Kiskun
A269	2003		Zala
A294	2003		Wiener-Neustadt
M19	2000	1,6	Pest
M20	2000		Heves
M72	1998		Zala
Ú73	2000	3,4	Bács-Kiskun

4. táblázat: Az EAV pozitív szervek vírustitere, 10-es alapú logaritmusban, 1 ml-re vonatkoztatva

minta jelzése	szervek			
	tüdő	lég	vese	máj
M19	1,6	1,4	-	-
Ú73	3,4	2,2	1,8	-

A fenti minták mellett megvizsgált, -80°C-on tárolt 25 orrváladék-, 61 fehérvérsejt- és 4 vizelet mintából vírust nem tudtunk izolálni. Ugyanezen mintáknál korábban a beérkezéstől számított 24-72 órán belül hagyományos módon kísérve meg a vírusizolálást ugyancsak valamennyi esetben negatív eredményt kaptunk mind az orrváladék- mind a fehérvérsejt- mind a vizeletminták esetében.

A kapott mén ondómintákból származó izolátumok ellenőrzése során az említett egyetlen EHV-1 izolátum kivételével valamennyi CPE pozitív minta EAV törzsnek bizonyult.

A Magyarországon izolált EA vírusok földrajzi megoszlását és az izolálás dátumát a 3. táblázatban, a mintaforrásokat és azok mennyiségeit az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat: Az izolált vírusok mintaforrásai

	Összes	EAV pozitív	százalék (%)
mének	280	27	9,64
vetélt magzatok	177	3	1,69
újszülött csikó	19	1	5,26
leukocita	61	-	-
orrváladék	25	-	-
vizelet	4	-	-

4.2.3. Megvitatás

A lóarteritis vírus (EAV) Magyarországi jelenlétének észlelése óta (1974 OÁI évkönyv) rendszeresen és célzottan próbáltuk izolálni a hazai állományokban előforduló törzseket, de kísérleteink több éven át nem vezettek eredményre. A '80-as évek közepétől egyre nagyobb számban végzett szerológiai- és a '90-es évek közepétől mind gyakrabban alkalmazott PCR módszerrel történő vírusnukleinsav kimutatás azonban nyilvánvalóvá tette, hogy a fertőzöttség

hazánkban meglehetősen gyakori. A fertőzés terjedését és a vírus állományon belüli fennmaradásának okát illetően két egymást „kiegészítő” fertőzési mód játszik szerepet. Az állományban endémiásan jelenlévő, aktív fertőzés elsősorban aerogén úton, az orr-garatüregeben elszaporodó és onnan ürülő vírus révén terjed, a venereális fertőződés ez esetben csak másodlagos jelentőségű. Az aerogén fertőzés terjesztésében bármely korú és ivarú (rövid időtartamú vírushordozó) ló szerepet játszhat (Nowotny és Bürki, 1992). Ezzel szemben a járványmentes időszakban a vírus állományon belüli fennmaradásában a tartósan vírushordozó és vírusürítő „long term carrier” mének játszanak döntő szerepet (Timoney és mtsai, 1986, 1987).

Az elmúlt években egyre sürgetőbb formában merült fel az igény mind a lótartók mind pedig a ló-egészségügyért felelős szakemberek körében az EAV elleni hatékony védekezésre és a diagnosztika fejlesztésére. Ennek megfelelően már évekkkel korábban nagy jelentőséget tulajdonítottunk a hazai arteritis megbetegedéseknek, azokból minél hamarabb szeretnénk volna vírust izolálni. A védekezés legfontosabb kérdése a fertőzési lánc megszakítása melynek első és alapvető lépése a tartósan vírusürítő mének felderítése. A szeropozitív mének vírusürítésének ellenőrzését ondóvizsgálattal végezzük. Az ondóminták EAV tartalmának meghatározására két módszert alkalmaznak, az egyik a vírusizolálás, a másik a PCR.

A vizsgálati anyag vírustartalmának kimutatására az arany szabvány (az un. „golden standard”) módszer a vírusizolálás. Ez pozitív esetben 5-10 napot, negatív esetben 10 napot vesz igénybe az általunk alkalmazott félfolyékony tápfolyadék módszerrel. A félfolyékony tápfolyadék megakadályozza a vírussal fertőzött sejtek kiválását a sejtgyepről, és ezáltal elősegíti az EAV sejtől sejtre terjedését és ezzel a helyileg kialakuló sejtkárosító hatások (plakkok) láthatóvá válását. Az izolálást (vagyis a kórokozó *in vitro* elszaporítását és azonosítását) jelentősen felgyorsíthatja monoklonális ellenanyagok alkalmazása peroxidáz enzimhez kapcsolt vírusfehérje kimutatás (peroxydase linked assay = PLA = peroxidáz festéssel történő vírusantigén kimutatás egyrétegű sejttenyészetben) módszerrel (Little és mtsai, 1994), mellyel a vírusantigén a fixált sejttenyészetből már 24 órával a beoltás után immunhisztokémiaileg kimutatható

Az EAV vírusizolálási nehézségei közül öt tényező érdemel említést.

1. A minta az ondóvételt követően csak néhány óráig alkalmas fertőzőképes vírusok kimutatására.

2. Az ondóminta hialuronsav tartalma miatt rendkívül toxikus a sejttenyészetekre: 10^{-1} hígításban a minták 66%-a, 10^{-2} hígításban a minták 8%-a károsítja aspecifikus módon a beoltott sejteket.

3. A kereskedelmi forgalomban kapható RK (rabbit kidney) sejtvonalak szinte mindegyike fertőzött a borjak vírusos hasmenésének (bovin viral diarrhoea = BVD) vírusával. Ez az izolátumok genetikai tisztaságának romlása mellett a sejtvonalak fenntartásában is nehézséget okoz.

4. A sejtvonalak egy része ausztrál és amerikai szerzők szerint nem fogékony a vírusra (Huntington 1990), vagyis a CPE az adszorpció és penetráció elmaradása miatt nem észlelhető a beoltott sejtenyészeteknél.

5. A vírustörzsek szerotípusa ugyan egységes, de virulenciájuk jelentősen eltérhet egymástól, így a CPE nem minden vírusizolátum esetén elég markáns ahhoz, hogy észrevehető legyen. Ezért a szakemberek újabban vírusizolálásra az ún. plak módszer javasolják (félfolyékony tápfolyadékkal), mely a hagyományos eljárásoknál bonyolultabb. Csak ezzel a módszerrel sikerült nekünk az elmúlt esztendőben 41 esetben vírust izolálni.

A fenti nehézségek miatt a víruskimutatás másik, alig 15 éves múltra visszatekintő, de jelenleg rutinszerűen alkalmazott módszere a PCR széles körben és robbanásszerűen terjedt el. Ennek a módszernek az alkalmazását a következő fejezetben írjuk le. Míg a PCR módszer önmagában alkalmatlan a vizsgált mén vírusürítő státuszának meghatározására (Belák és mtsai, 1994), addig a vírusizolálás mindig infektív, azaz élő, replikációra alkalmas víruspartikulákat mutat ki, és így a vizsgált állatnál a vírusürítés ténye sikeres izolálás esetén bizonyítottan tekinthető.

További előny, hogy a mintában esetlegesen jelenlévő egyéb vírus(ok) szintén vagy közvetlenül, a sejtkárosító hatásuk révén, vagy közvetett módon, immunhisztokémiai, immunfluoreszcens, módszerrel kimutathatók az inokulált sejtenyészetekből.

A vírusizolálás lévén az egyik legérzékenyebb módszer, érzékenységekben szinte mindig felülmúlja az egyéb, direkt víruskimutatáson alapuló eljárásokat (PCR, nukleinsav- hibridizáció, antigénkimutató ELISA, IF, AGID, HA teszt), ezért a szakemberek a direkt módszerek „golden standard”-jaként is szokták említeni. Szemben a PCR módszerrel, a vírusizolálás esetén ismeretlen fogalom a túlzott érzékenység következtében jelentkező fals pozitívitás is.

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 sejtenyészetek 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 és az EAV kiszabadításában az ondóminták vírustartalmának vizsgálatakor. Amennyiben az optimális időintervallumot és frekvenciát alkalmazzuk, úgy a hámsejtek károsodását nem, vagy csak minimális mértékben követi 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 különböző gazdaállatból származó sejtvonalak eltérő módon fogékonyak az EA vírusra. Saját tapasztalataink szerint elsősorban két tényező játszik igen jelentős szerepet a EAV sejtenyészetben való replikációjánál: a vesesejtek sűrűbb denzitásúak, tömörebb állományuk következtében a sejtről

sejtre történő vírus terjedés jobban érvényre jut, mint a ritkább heresejteken. Részben ezzel magyarázható, hogy a szekunder és terciér borjú here sejtekben rendkívül lassan, esetenként csak 10 nap után alakult ki CPE. A másik tényező a sejtek növekedési erélye, mely bizonyos típusú sejteknél gyorsabb: ED, EEL, PK-15, másoknál mérsékeltebb: BHK-21, RK-13. A mérsékelt növekedési erély fontos a bíráló számára, mert az inokulációt követő első 24 órában, a vírus által elpusztított sejtek helyén gyakran új sejtpopuláció szaporodik el az intakt, ép sejtekből, mely elfedheti a vírus által okozott kártételt. Ennek oka az, hogy az EAV sejtről sejtre terjedése eddig még nem tisztázott ok miatt hosszabb időt vesz igénybe, mint a vírussal fertőzött sejtek kiválása a sejtgyepből. Az általunk használt sejtvonalak közül különösen az ED sejtek ezért teljesen alkalmatlanok voltak az EAV izolálására. A BHK-21 és az RK-13 sejtek nem hajlamosak a már elpusztult és levált hámsejtek helyére beszorodni, így már a 2., 3. napon jól látható volt a sejtlekerekedés az érintett területeken. Az RK-13 sejtvonalak perzisztens BVD fertőzöttségét egyes szerzők (Edwards és mtsai, 1998) előnyként tüntetik fel az EAV elszaporodásának folyamatában. Itt valószínűleg az egy vírussal való fertőzöttség még nem indukál lítikus kölcsönhatást, de a második, az EA vírus egyidejű jelenléte a sejtben már citolízishez, és így látható CP hatáshoz vezet. Az itt leírtak figyelembevételével alakítottuk ki álláspontunkat, hogy a tömegmunkát jelentő, nagyszámú ondómintából történő vírusizolálást csak két, a fent leírt sejtvonalon végezzük el.

Az EA vírus izolálhatóságát az alkalmazott, speciális mintakezelés, és sejtenyészet mellett igen jelentősen befolyásolja a minta tárolási hőmérséklete, illetve a tárolás során a vírust érő egyéb káros hatások. Mintáink jelentős részéből nem sikerült vírust izolálni, bár szerológiailag, illetve nukleinsav kimutatással bizonyítható volt a vírus jelenléte az adott mintákban. Összefoglalva tapasztalatainkat leírhatjuk, hogy a minták -20°C -on tárolása már rövid időn belül az EA vírus degradációjához vezetett (2 év), és ezért infektív partikulákat izolálni még abban az esetben sem tudtunk, amikor PCR módszerrel a vírus nukleinsav meghatározott szakasza még megsokszorozható volt. Az ondóminták esetében még feltűnőbb volt a fagyasztás káros hatása, még -80°C -on, 2 évig tárolt mintánál is csak 50%-ban voltunk eredményesek, a 9 éves mélyfagyasztást egyik PCR pozitív mintánk sem élte túl. Összegezve elmondható, hogy a rendszerint nagy mennyiségben EAV-t tartalmazó ondómintáknál is 50% ra csökkenti a vírusizolálás esélyét 2 év mélyfagyasztás, a -20°C -os tárolás esetén pedig a vírus túlélése csak hónapokban mérhető, de 2 évnél mindenképpen kevesebb.

Összehasonlítva a vírusizolálást a PCR módszerével, vizsgálatainknál megállapítható volt, hogy a frissen feldolgozott minták esetében a két módszer érzékenysége közel azonos volt, egyetlen mintánál tűnt érzékenyebbnek az előbbi, egy másiknál viszont sikertelen volt az izolálási kísérlet szemben a pozitív PCR eredménnyel. Mindkét módszer találati aránya 41/42, a retrospektív vizsgálatok vonatkozásában viszont a PCR módszere a megbízhatóbb (1/5). Ennek magyarázata

abban rejlik, hogy a PCR módszerrel szemben a vírus izolálásához mindig infekzív virionokra van szükség, az inaktivált vírus már nem tudja elkezdni replikációs ciklusát a sejtben.

A mének egy része már a következő tenyésztési szezonban megszüntette EA vírusürítését, igaz többségük éveig 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 EA vírust.

A vetélt lómagzatok szerveinek vírustartalma rendkívül alacsony, ezt a vírusizolálás mellett más vizsgálatokkal is igazoltuk (ld. a következő fejezeteket), lényegesen több vírust tartalmaznak viszont az újszülött korban, EVA következtében elhullott állatok egyes szervei (Szeredi és mtsai, 2003).

Az EAV pozitív magzatok szerveinek vírustartalom meghatározása a kevés adat ellenére is egyértelművé teszi, hogy magzati és újszülött korban egyaránt a tüdő a vírus elsősorú célszerve. Ezt követi a lép, majd a vese, de itt már a kimutathatóság határán van a vírus mennyisége, a máj pedig mindkét állatnál negatív volt. PCR módszerrel valamivel jobb eredményeket kaptunk (ld. PCR fejezet), de az ondóminták titeréhez viszonyítva a szervekből kimutatott titerek nagyon alacsonyak, jelezve azt, hogy a vírus különösen a vetélt csikók esetében, igen kis mennyiségben van jelen az állatban, mivel a vetélés mechanizmusában a döntő szerepet a méh simaizomzat arterioláinak elfajulása, és az ezt követő magzati tápanyagellátási zavar játsza, és nem a vírusnak a magzatban okozott kártétele.

Az egyéb mintákból történő vírusizolálás sikertelensége nem elsősorban a módszer hibájának, vagy az egyéb testváladékok alacsonyabb EA vírustartalmának tulajdoníthatóak, hanem azzal a ténnyel magyarázhatók elsősorban, hogy hazánkban úgy tűnik az EVA jelentőségének a megítélése periodicitást mutat. Míg az 1998-2000-ig terjedő időszakban néhány lópartó telepen több ízben is észleltük a vírus jelenlétét mind szerológiai, mind a direkt víruskimutatás módszereivel, addig 2000 után csak ondómintákban sikerült a kórokozót megtalálni.

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

Összefoglalva: hazánkban az elmúlt időszakban, megfelelő eljárásokat alkalmazva, 41 EA vírust sikerült izolálnunk, és így megteremtettük a lehetőségét annak, hogy molekuláris biológiai módszerekkel ezeket a törzseket genetikai vizsgálatoknak vessük alá.

4.3 A referens Bucyrus törzzsel reagáló monoklonális ellenanyagok előállítása

4.3.1. Anyag és módszer

Koncentrált és tisztított EAV szuszpenzió előállítása

A referens Bucyrus vírustörzset (Doll és mtsai, 1957) melyet Prof. F. Bürki (Veterinärmedizinische Universität Wien) bocsátott a rendelkezésünkre egyrétegű, forgatott RK-13 sejtenyészeten szaporítottuk el, úgy hogy 0.01 TCID₅₀ vírus/sejt multiplikációs index (multiplicity of infection, moi) aránnyal fertőztük a sejteket, és amikor a CP hatás elérte, illetve meghaladta a 90%-ot akkor arattuk a vírust, melyet a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A vírusszuszenziót két részre osztottuk és egyik feléből jégfürdőben tartott Freon 113 és 2,5 % Sephadex G200 (Sigma Aldrich Co., St Luis, MO, USA) oldatokkal Balasuriya (1993) módszere szerint kivontuk a vírust. A vizes fázist 11% (wt/wt) céziumklorid (CsCl) párnára rétegeztük és 120 000 × g gyorsulással, 4°C-on, 4 órán át centrifugáltuk. A vírus pelletet 150 mM NaCl, 5 mM EDTA és 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (NET) pufferben vettük fel, és 3 × 20 másodpercig jégfürdőben, 15 kHz frekvenciával ultrahangoztuk, a köztes időben 2-2 percig visszahűtöttük, majd 11-33%-os, folyamatos CsCl gradiens közegben 104 000 × g erővel, 17 órán keresztül (egy éjszakán át), 4°C-on ultracentrifugáltuk. A tisztított vírust NET pufferben reszuszendáltuk, és az infektív titerét RK-13 sejtvonalon, Reed-Muench módszere alapján meghatároztuk. Ezzel a vírusszuszenzióval Balb/c egereket immunizáltuk.

A kiinduláskor kettéosztott vírusrészt másikkal alacsony fordulatszámon sejtmentesítettük, majd 0,22 µm pórusnagyságú szűrővel szűrtük és 30%-os, (wt/wt) cukorpárnán, 80 000 × g erővel, 5 órán keresztül, 4°C-on ultracentrifugáltuk. A vírus pelletet NET pufferben reszuszendáltuk, és PBS-sel szemben, a PBS-t háromszor cserélve, 48 órán át dializáltuk, hogy a cukortól megszabaduljunk. A tisztított vírus infektív titerét RK-13 sejtvonalon, Reed-Muench módszere alapján meghatároztuk és -70°C-on tároltuk

Monoklonális ellenanyagok előállítása

Az immunizáláshoz öt 8 hetes, nőstény Balb/c AnN Crl BR egeret (Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA) használtunk. A CsCl gradiens tisztított Bucyrus vírust fiziológiás sóoldatban, 1 : 2 arányban hígítottuk és 250 µl komplett Freund adjuvánszal (Sigma Aldrich Co., USA) emulgeáltuk. Az egereket a hasüregükbe (i. p.) oltottuk 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl és 250 µl emulzióval, és az ivóvizükbe Aldasyl[®] (Europharma, Budapest, Magyarország) immunstimulánst (Szigeti és mtsai, 1998) adagoltunk.

Az első immunizálást követően 4 és 9 héttel, a vírusszuszenziót inkomplett Freund adjuvánszal (Sigma Aldrich Co., USA) emulgeálva, az egereket i. p. ismételtén ugyanazokkal a dózissal oltottuk. Az első immunizálás 13., és a második immunizálás 11. napján vérmintákat vettünk és a vérsavók ellenanyag titerét immunperoxidase monolayer assay (IPMA) módszerrel

(Markussen és mtsai, 1992) és VN teszttel meghatároztuk. Az utolsó immunizálás után, a legjobb ellenanyag választ mutató egeret intravénásan oltottuk fiziológias sóoldattal 1 : 2 arányban hígított vírusantigénnel. Három nappal később az egeret elaltattuk és a lépét steril körülmények között eltávolítottuk. A lépből kivont lymphocyták fúzióját Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejtekkel (Starick és mtsai, 2001) (American Type Culture Collection, Manassas, VA USA), savó mentes RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) tápfolyadékban oldott 50% polyethylene glycol-1500 (mindkettő a Sigma Aldrich Co., USA) jelenlétében történt. A kapott hibrid sejteket HAT [hipoxantin (136 µg/ml), aminopterin (0,19 µg/ml), timidin (3,88 µg/ml)] tápoldat (Sigma Aldrich Co., USA) segítségével szelektáltuk. Két héttel a fúzió után, a sejt felülűszókat 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 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Németország) ellenanyagokat állítottunk elő .

A hibridoma felülűszók ellenőrzése indirekt ELISA módszerrel

ELISA tesztünkben a CsCl gradiens ultracentrifugálással tisztított Bucyrus vírust használtuk antigénként. Az antigén munkahígítását annak karbonát pufferben (pH 9,6) és PBS-ben (pH 7,2) történt titrálásával határoztuk meg. Az antigént karbonát pufferben (pH 9,6) hígítottuk, majd 100 µl mennyiségeket mértünk az ELISA lemezek (Analyzer Ltd., Budapest, Magyarország) minden lyukába. A + 4°C-on, egy éjszakán át tartó inkubáció után, a lemezeket háromszor mostuk 0.05% Tween-20 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tartalmú fiziológias foszfátpufferrel (PBST), majd az 1 : 2 arányban PBST-vel hígított sejt felülűszó 100 µl mennyiségét bemértük a lemez lyukaiba. A lemezeket 37°C-on, 90 percig inkubáltuk, majd PBST-vel 5-ször mostuk. Ezt követően 100 µl, nyúlban termelt anti-egér IgG (Jackson Immuno Research Labs Inc., West Grove, Pennsylvania, USA) konjugátum PBST-vel 1 : 2000-szeres hígítását mértük be a lemezvájulatokba. A 37°C-on, 90 percig tartó inkubáció után, a lemezeket ismét 5-ször mostuk PBST-vel, majd az enzimaktivitást 100 µl/lyuk tetramethylene benzidint (TMB; Diavet Kft., Budapest, Magyarország) tartalmazó szubsztrátoldat hozzáadásával tettük láthatóvá. A szobahőmérsékleten, 15 percig tartó inkubáció után a reakciót vájatonként 50 µl 4N H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le. Az értékeléshez Multiscan Ms reader leolvasó készüléket (Labsystems Oy, Helsinki, Finnország) alkalmaztunk, az optical density (OD) értékeket 450 nm hullámhosszon mértük. Minden lemez tartalmazott negatív kontrollt (10% FCS tartalmú RPMI). A kiértékelés során, a negatív kontrollnál legalább 1,5-szer nagyobb OD értéket mutató hibridsejt felülűszó mintákat pozitívnak tekintettük. A pozitív felülűszókat vetettük alá további vizsgálatoknak, melyeket az IPMA és a VN próbákkal végeztük.

A monoklonális ellenanyagok izotípusának meghatározása

A McAb izotípusát az Ouchterlony féle immundiffúziós teszttel, a Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents kit (Sigma Aldrich Co.) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

Egyrétegű sejtenyészet vizsgálata peroxidázzal jelzett ellenanyagok segítségével (PLA)

100 TCID₅₀/200 µl Bucyrus vírussal fertőzött és nem fertőzött RK-13 sejteket, 96 lyukú mikrolemezen (Greiner; Frickenhausen, Németország), 37°C-on, 1 napig inkubáltunk, majd desztillált vízzel 2 : 1 arányban hígított PBS-sel öblítettük a lemezeket. Ezt követően, 3 óráig tartó hőfixálás (80°C) után, a fixált sejteket PBST-vel öblítettük. A sejtklonok felülúszóiból tizes alapú hígítási sort (10-10⁴) készítettünk (hígítóként 4% FCS tartalmú PBST-t használtunk) és ebből párhuzamosan 2 × 50 µl mennyiségeket bemértünk a lemez vírussal fertőzött és nem fertőzött lyukaiba. Az inkubációs idő 37°C-on 1 óráig tartott. A lemezek mosása után, a sejtekhez vájatonként 50 µl mennyiségben, torna-peroxidázzal (horse radish peroxydase: HRPO) jelzett, nyúlban termelt anti-egér IgG konjugátumot (Sigma Aldrich Co., USA) adtunk, majd a lemezeket 37°C-on 1 óráig inkubáltuk. Újabb PBST-vel történő lemezmosás után 50 µl szubsztrát oldatot (5 pH-jú, 200 µg 9-amino-3-etilkarbazol/ml és 0.03 % H₂O₂-t tartalmazó, 200 mM nátrium-acetát puffer) mértünk be a lyukakba. A reakciót 5 perc után úgy állítottuk le, hogy a szubsztrátot kicseréltük 300 µl desztillált vízre. A próbát pozitívnak értékeltük, ha az EAV fertőzött sejtek citoplazmája barnás-vörösre színeződött ellentétben a vírus negatív kontroll sejtekkel, melyek elszíneződést nem mutattak. A vírus negatív kontroll sejtek elszíneződése nem EAV specifikus McAb jelenlétére utalt.

Vírusneutralizációs teszt (VNT)

A VN tesztet az OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines 2000 (OIE) szerint végeztük (részletes leírás a **4.1** fejezetben).

SDS-PAGE és immunblot

A cukorpárnán tisztított Bucyrus vírusszuspenziót 4 percig 100°C-on hőkezeltük nátrium-lauril-szulfátot tartalmazó mintapufferben, majd 15% akrilamid tartalmú, szakaszos, SDS-poliakrilamid gélre mértük. Az elektroforézist Pharmacia Biotech Hofer készülékben, szobahőmérsékleten végeztük, 35 mA áramerősséggel, 150 percig, majd a fehérjét a nitrocellulóz membránra vittük át (fehérje transzfer: egy éjszakán át, 9 V, 47mA) vízhűtéses blotoló készülék segítségével, (Towbin és mtsai, 1979). A membrán fehérjekötő kapacitását 4% sovány tejpor tartalmú PBST-ben, szobahőmérsékleten, 2 óráig tartó áztatással blokkoltuk. A membránt ezután 5 mm szélességű csíkokra vágtuk, és a 2 IPMA pozitív hibridoma klón PBST-vel 1 : 10 arányban hígított felülúszóját tartalmazó csövekbe helyeztük, majd rázógépen, szobahőn egy éjszakán át inkubáltuk. A következő napon PBST oldatával 3-szor mostuk a membráncsíkokat, majd HRPO-val jelzett, kecskében termelt, anti-nyúl IgG konjugátum (Jackson Immuno Research Labs Inc., USA) 1

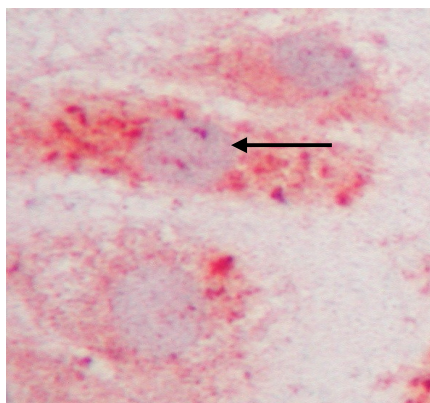
: 1000 arányban hígított oldatával rázógépen 2 óráig inkubáltuk. Újabb 3-szori mosás után, a membráncsíkokhoz 4-kloro-1-naftolt és 0,03 % H₂O₂-t tartalmazó szubsztrát oldatot adtunk, majd szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. A reakciót 5 perc elteltével állítottuk le a szubsztrát desztillált vízre cserélésével.

4.3.2. *Eredmények*

A CsCl grádiens ultracentrifugálás során két, egymástól nehezen elkülöníthető, fehér színű, opaleszkáló víruscsíkot kaptunk, a feljebb helyezkedő csík vastagsága az alsóhoz viszonyítva, annak 10-20%-a volt. A frakcionálás során a két szorosan egymás mellett helyezkedő víruscsíkot egymástól elkülöníteni nem tudtuk, a közös frakció vírustitere 10^{6,6}/ml volt.

A cukorpárnán tisztított vírusszuszpenzióból nyert 2 kb. azonos vastagságú, fehér színű, opaleszkáló víruscsíkot, melyeket egymástól nem különítettünk el, a közös frakció infektív titere 10^{9,8}/ml volt.

Az 576 hibridoma klónból, az elsődlegesen tesztelésre használt indirekt ELISA módszerrel 48 (8,33%), a negatív kontrollnál legalább 1,5-szeresen magasabb OD értékű felülúszót termelő klónt különítettünk el. Ez a 48 ELISA pozitív klón vírusközömbösítési próbával negatívnak bizonyult, ugyanakkor az IPMA vizsgálattal a 48 klón közül 34, mind a beoltott, mind a be nem oltott sejttényészeteken pozitív reakciót mutatott, a maradék 12 klón felülúszója sem a beoltott, sem a be nem oltott sejttényészeteken nem eredményezett színreakciót, vagyis ezek negatívnak bizonyultak az IPMA teszttel. A 48 ELISA pozitív felülúszó közül, végül is 2 (1H1 és 4G6) tartalmazott a Bucyrus vírusra specifikus EAV monoklonális ellenanyagokat.



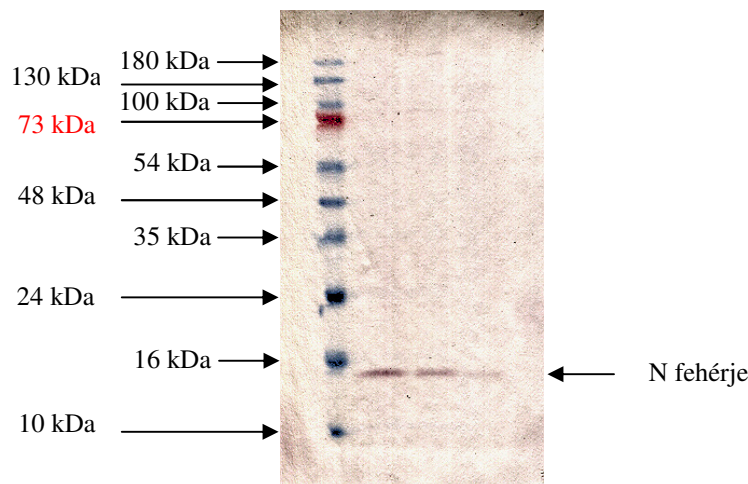
4. ábra: Az 1H1 jelzésű McAb által megfestett sejtek intenzív citoplazma- és halvány magelszíneződést mutatnak. A fekete nyíl jelzi az N fehérje specifikus elszíneződést a sejtmagban.

Az IPMA esetében, a sejteknek a 2 különböző McAb által kiváltott festődési reakciója eltért mind a színintenzitás, mind a színreakció kialakulásának gyorsasága tekintetében. Az 1H1 jelzésű

McAb által megfestett sejtek a szubsztrát alkalmazását követően viszonylag rövid időszakon belül rendkívül intenzív citoplazma- és halvány magelszíneződést mutattak (4. ábra). A 4G6 jelzésű McAb által megfestett sejtek diszkrét, rögös mag körüli festődést mutattak, és viszonylagosan hosszú időt (5-10 perc) igényelt festődésük.

A McAb-ok által kiváltott sejtfestődési tulajdonságok nem változtak meg még a McAb-ok 10-es alapú, különböző hígításainak alkalmazásakor sem. Az 1H1 jelzésű McAb IPMA titere 10^4 , a 4G6 jelzésűé pedig 10^2 volt.

Az immunperoxidáz festésnek megfelelően, a blotolást követően, mindkét McAb felismerte a 14 kDa nagyságú, EAV nukleokapszid (N protein) fehérjét (5. ábra).



5. ábra: Az 1H1 jelzésű McAb immunblot képe a 14 kDa nagyságú, EAV nukleokapszid fehérjével (N protein). 1. sáv: molekula tömeg marker (Fermentas) 2.-5. sáv: 30, 20, 10, 5 μ l tisztított EAV.

A vizsgált 2 McAb szubtipizálása során bebizonyosodott, hogy mindkettő kappa izotípusú könnyű láncsal és IgG1 típusú nehéz láncsal rendelkezik.

4.3.3. Megvitatás

Itt leírt munkánkban figyelmünket a McAb-ok használatára irányítottuk, melyeket az EVA diagnosztikájának javítása céljából állítottunk elő, nevezetesen a McAb-ok PLA-ban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Amíg a közönséges, poliklonális immunsavók előállításának tétellei („sarszai”) folyamatosan változhatnak, addig a McAb olyan diagnosztikai eszköz, mely könnyen standardizálható. Habár a világ igen sok pontján izolált, különböző EAV törzsek ugyanahhoz a szerotípushoz tartoznak, biológiailag, antigéntulajdonságaik és mindenek előtt szekvenciáik tekintetében számos alkalommal írtak le különbségeket (Balasuriya és mtsai, 1997). Mivel bizonyos törzsek esetében a sejtkárosító hatás kevésbé kifejezett, különösen a sejttenyésztéshez nem jól adaptálódott törzseknél, egy specifikus, jól standardizálható reagens nagyon hasznos eszköze lehet a vírusmultiplikáció és a vírusantigén sejten belüli felhalmozódásának kimutatására, ha például egy

McAb-ot, mely felismeri az összes ismert EAV szubtypust, primer ellenanyagként lehetne alkalmazni a vírusizolálást követő antigénkimutatásnál. Egy, az EVA diagnosztikában általánosan használható reagens létrehozásakor az immunizáláshoz erősen konzervatív fehérjét kell választani. A különböző genomrégiók nukleotid sorrendjének összehasonlítása rávilágított arra a tényre, hogy a különböző vírusizolátumok N protein génjei 93-97% homológiát mutatnak egymással, és ez ideálissá teszi az N struktúrfehérjét, annak diagnosztikai alkalmazására (Chirnside és mtsai, 1987). Munkánkban megkíséreltük növelni annak valószínűségét, hogy a létrejövő McAb-jaink a konzervatívabb magfehérjékkel reagáljanak, mint a burokfehérjékkel. 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. Az ily módon koncentrált és tisztított vírus infektív titere ezért alacsony. A cukorpárnán tisztított és koncentrált vírus más szerepének megfelelően, a várható 60:40% arányú megoszlást mutatta az inkomplett virionok javára, és magas titere révén kiválóan alkalmas volt az immunblot módszerrel történő McAb azonosításra.

A teszt rendszerünkben az IPMA vizsgálatot a sejttenyészet összetevőivel reagáló ellenanyagokat termelő klónok azonosítására használtuk. A vírustisztítás ugyanis, bármennyire alaposan végzik is, tartalmazhat, és igen kis mennyiségben tartalmaz is olyan, a sejttenyészetből származó kontamináló anyagokat (FCS, sejtes elemek, stb), melyekkel érzékenyítve az ELISA lemezt, az a vírusra nem jellemző (aszpecifikus), fehérjékkel is reakcióba léphet, megnövelve minden ilyen esetről a kapott ELISA OD értéket. Ennek a viszonylagosan egyszerű módszernek, az ELISA vizsgálat utáni alkalmazása lehetővé tette számunkra a nem vírusspecifikus ellenanyagokat termelő klónok kizárását a további munkánkból egy egyedülálló szelekciós lépéssel. Az IPMA vizsgálat által nyújtott szelekció segítséget jelent, az alacsony kópiaszámú vírusfehérje epitopok ellen termelődött McAb-ok, és az ELISA rendszerben gyengén működő (alacsony ELISA titerű) McAb-ok kimutatásában is, melyek számunkra elvesznének (éppen az alacsony OD érték miatt) abban az esetben, ha ezeket csak ELISA-val vizsgálnánk.

Mivel az egyik McAb még 1 : 10 000 hígításban is képes volt a Bucyrus vírussal fertőzött RK-13 sejtek kimutatására, és ez az ellenanyag az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek tanúsága szerint hatékony reagensként működik (Szeredi és mtsai, 2003), az PLA hatékony és gyors módszere lehet a rutinszerűen beküldött mintákban (vetélt csikómagzatok szervmintái és perszisztensen fertőzött mének ondómintáival inokulált, víruizolálásra használt sejttenyészetek) jelenlévő, különböző EAV törzsek kimutatásának és a vírus azonosításának. A vírusizolálást, amely az ún. „arany standard” (golden standard) módszer a virológiában, nem lehet teljes mértékben más módszerekkel helyettesíteni, még ha azok gyorsabbak is (PCR, capture ELISA, nukleinsav-

hibridizáció). Az új vírusváltozatok kimutatása, azok gyűjtése molekuláris és biológiai tulajdonságaik vizsgálata céljából, elengedhetetlenül szükségessé teszik a vírusizolálás módszerének alkalmazását mind a jelenben mind a jövőben. A McAb-ra alapozott, és az oltott sejtenyészeteken alkalmazott PLA vizsgálat a vírusizolálással elkezdett EAV antigén kimutatást teszi könnyebbé és eredményesebbé, egyúttal az izolátum azonosítását is jelenti, még az igen gyenge CP hatást okozó törzsek esetében is.

A két általunk létrehozott McAb IPMA titerei között jelentős titerkülönbséget állapítottunk meg, amely valószínűleg indoka lehet a két különböző McAb-bal festett EAV fertőzött sejtek eltérő festődési képének.

Az EAV ellen irányuló McAb amellet, hogy diagnosztikai reagensként használható, a még máig sem teljesen megismert intracelluláris, virális N protein szintézis lépéseinek tisztázásában is segíthet. Az EAV fertőzött sejtek eltérő intracelluláris festődése alátámasztja azt a korábbi megfigyelést (Tijms és mtsai, 2002), mely szerint az EAV N proteinje, a vírus replikációs ciklusának jelentős részében jelen van a magban.

4.4 A polimeráz láncreakcióval történő nukleinsav kimutatás

4.4.1. Anyag és módszer

Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:

A PCR vizsgálatok elvégzése előtti mintavétel, minták kezelése és tárolása a 4.2 fejezetben került ismertetésre. A mintákat szükség esetén összevártuk, -70°C -on tároltuk, majd a felhasználás előtt rövid ideig tartó, sejt- és baktériummentesítő centrifugálás után ($5000 \times g$, 3 perc) a centrifugált minta felülúszójából vettük ki a szükséges folyadék mennyiséget a vírus RNS izolálása céljából.

Az RNS izolálása

Az RNS izolálást perzisztensen fertőzött mének ondómintáiból, vetélt lómagzatok homogenizált szervmintáiból (lép, máj, tüdő, magzatburok), orrváladék-, leukocita- és vizeletmintákból kíséreltük meg. Munkánk kezdetén a megfelelőbb eljárás kiválasztása érdekében párhuzamosan két különböző módszerrel tisztítottuk az első 100 mintát.

1. Chomczynski továbbfejlesztett módszere szerint (1987), annak Tri reagens (Sigma) kezeléssel kiegészített változatával. A módszerünk rövid leírása a következő:

A centrifugált minta felülúszójából $140 \mu\text{l}$ -t $900 \mu\text{l}$ Tri reagenssel Vortex segítségével alaposan összekevertünk, szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk, majd $200 \mu\text{l}$ kloroformmal (Sigma) alaposan összekevertük a disszociált nukleoproteineket. Szobahőmérsékleten újabb 5 percig inkubáltuk az elegyet, centrifugáltuk 15 percig $+4^{\circ}\text{C}$ -on, $12\,000 \times g$ -vel.

A kapott vizes fázist új $1,5 \text{ ml}$ -es mikrocentrifuga csőbe tettük, majd $500 \mu\text{l}$ izopropanollal (Sigma) $1 \mu\text{l}$ glükogén jelenlétében, alapos keverés után 10 percig, szobahőmérsékleten inkubálva, kicsaptuk a minta összes RNS tartalmát.

A precipitált RNS-t centrifugáltuk (10 perc, $+4^{\circ}\text{C}$, $12\,000 \times g$), mostuk (75% alkoholtartalmú, dietil pirokarbonát = DEPC (Sigma) kezelt $2 \times$ desztillált vízzel), szárítottuk (levegőn, 5-10 percig), végül feloldottuk $60 \mu\text{l}$ DEPC kezelt $2 \times$ desztillált vízben.

2. QIAamp® Viral RNA Mini Kit felhasználásával (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország), a gyártó utasítása szerint (Nakazato és Edmonds, 1972). A módszer során a vizsgálati minták felülúszóját hordozó RNS-t (carrier RNA) és kaotropikus sóoldatot tartalmazó lizispufferrel tárjuk fel, majd etanos kicsepést követően szilikagél membránra adszorbeáljuk. Két centrifugálással ($6000 \times g$ 1 percig és $20\,000 \times g$ 3 percig szobahőmérsékleten) etanol tartalmú mosófolyadékokkal tisztítjuk a membránhoz kötött RNS-t, majd 0,04% Na-azid tartalmú eluáló pufferrel és centrifugálással ($6000 \times g$ 1 percig, szobahőmérsékleten) eluáljuk a minta RNS tartalmát.

A két különböző módszerrel izolált vírus RNS-ek közül 5-5 EAV pozitív RNS mintát megvizsgáltunk egyrészt a tisztítást követően közvetlenül, másrészt ugyanezen mintákat 3 hónapos,

-80°C-on történt tárolás után. Az adott minta PCR termékének jelenlétét, illetve a kapott terméket jelző csík erősségét (az RNS mennyiségét) vizsgáltuk úgy, hogy a tisztított RNS tízes alapú hígítási sorának elkészítése után a sorozat tagjaiból RT-PCR-rel nukleinsav erősítést végeztünk. Az RNS átíráshoz használt primer mindkét módszernél azonos volt: az egylépéses RT-PCR-nél alkalmazott reverz primert használtuk (ld. később).

Az RNS átírása DNS másolattá (copy DNS: cDNS)

Kezdetben a tisztított vírus RNS-t egy különálló lépésben írtuk át cDNS-sé (reverz transzkripció): az izolált vírus RNS-ről EAV specifikus primer segítségével szintetizáltunk cDNS szálakat. Az eljárás során 11 µl tisztított vírus RNS-hez 10 pmol, a 3' leolvasatlan régióra (12681-12704 nukleotid) tervezett primert (5'-GGTTCCTGGGTGGCTAATAACTAC-3') (6. ábra) kevertünk.

Az átíráshoz RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kitet (MBI Fermentas; Vilniusz, Litvánia) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. (Inkubáció után (5 perc, 70 °C) 40 egység (unit = U) ribonukleáz gátlót (inhibitort) és 40 nmol dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) keveréket adtunk a mintákhoz, majd 5 percig 37 °C-on tartottuk. Ezt követően 200 U RevertAid™ Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase-t (MBI Fermentas; Vilniusz, Litvánia) adtunk a reakcióelegyhez és 60 percig 42 °C-on inkubáltuk, végül 10 perces 70 °C-os kezeléssel zártuk le a reakciót.

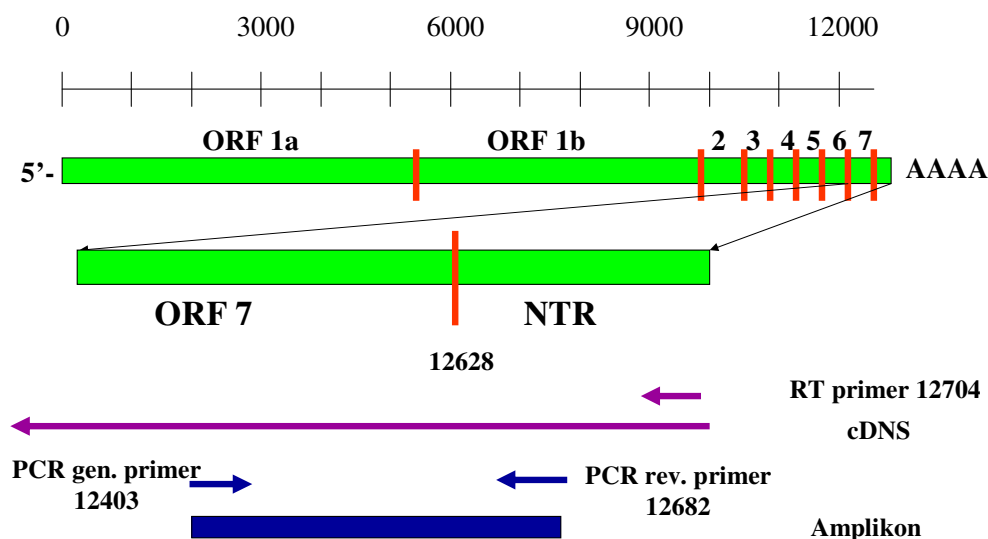
A későbbiek során kipróbáltuk a Qiagen OneStep RT-PCR kit-et (Qiagen, Németország) úgy, hogy a tisztított EAV RNS-t közvetlenül a PCR-t megelőzően, egy lépésben történő reakció keretén belül írtuk át cDNS-sé. Ezt a folyamatot a gyártó leírásának megfelelően 50°C-on 30 percig végeztük, amit 95°C-on 15 percig tartó inaktiválás követett, melynek során az átírást végző enzimeket (Omniscript, Sensiscript) inaktiváltuk, miközben a polimeráz láncreakcióhoz szükséges *Thermus aquaticus* polimeráz enzimét (Taq) aktiváltuk. Itt a vírus RNS átírásához használt primer minden esetben megegyezett a PCR során használt, vírus RNS reverz irányultságú primerével.

Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A korábban használt kétlépéses RT-PCR esetében a polimeráz láncreakció során alkalmazott genomikus (forward) primer (5'-GTTTGGTCAGATGCGGGTCCGC-3') az EAV genom 12402-12423 nukleotidjaihoz kapcsolódott a 7. nyílt leolvasási kereten (open reading frame 7: ORF 7); a reverz primer (5'-CTTCAACATGACGCCACACAGGAG-3') pedig a 12658-12681 nukleotidokhoz (3' leolvasatlan régió) (6. táblázat és 6. ábra).

6. táblázat: Az EAV genomra tervezett diagnosztikai PCR primereinek lokalizációja

Lokalizáció	irányultság	Szekvencia (5'-3')	Pozíció	Amplikon
ORF 7	genomikus	GTT TGG TCA GAT GCG GGT CCG C	12402-12423	280bp
NTR	reverz	CTT CAA CAT GAC GCC ACA CAG GAG	12658-12681	



6. ábra: Az EAV genomra tervezett diagnosztikai RT-PCR primereinek lokalizációja

A reakcióelegy 50 μ l, 1,5 mM $MgCl_2$ koncentrációjú pufferben 10 pmol dNTP keveréket, 50-50 pmol primert, 2 μ l cDNS-t és 1,5 U Taq DNA polymerase-t (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) tartalmazott. A polimeráz láncreakciót MJ Research MiniCycler-rel (MJ Research, Inc. Watertown, Massachusetts, USA) végeztük. Kezdeti 94 °C-os 3 percig tartó denaturáció után 40 ciklusban ismételtük el a következő lépéseket: 94 °C-on 1 perc (denaturáció), 50 °C-on 1 perc (primer kapcsolódás), 72 °C-on 1 perc (láncszintézis). Legvégül a reakcióelegyet 72 °C-on további 2 percig inkubáltuk a láncszintézisek teljes befejezése céljából.

Az egy lépéses PCR esetében az RNS átírást ugyanabban a reakciócsőben a nukleinsav erősítés, a tulajdonképpeni polimeráz láncreakció követte: 8 cikluson keresztül 94°C-on 40 másodpercig tartó denaturáció, mely alatt a DNS szálak szétváltak egymástól, majd a vírus-specifikus primerek kötődése a cél DNS szálakhoz (primer annealing), 58°C-on 50 másodpercig, minden ciklusnál egy 1°C hőmérsékleteséssel (touchdown PCR), és végül az új DNS szálak láncszintézise (extension), 72°C-on 1 percig. Ezután folyamatosan további 32 cikluson keresztül, ugyanezekkel a paraméterekkel végeztük a PCR-t, de a primerkötődés hőmérsékletét 50°C-on folytattuk. A reakciót 72°C-on 10 percig tartó végső láncszintézissel fejeztük be.

Mindkét PCR esetben a vizsgálati minták mellett pozitív kontrollként, a Bucyrus referens EAV törzs tisztított RNS-ről átírt cDNS-t, illetve RNS-t, negatív kontrollként vírus cDNS-t illetve RNS-t nem tartalmazó reakcióelegyet alkalmaztunk.

Megjelenítés (vizualizáció)

A reakcióelegy 10 µl-ét Trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát (TBE) pufferben oldott, 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 1%-os agarózgélben (SeaKem® FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) elektroforetizáltuk 6-8 V/cm feszültség mellett 1 órán át. A gélt ezt követő 302 nm-es ultraibolya fény (UV) átvilágítással (AITM-26 transzluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk és Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System leképező készüléken, Kodak Digital Science 1D program segítségével az adatokat számítógépes információ formájában tároltuk.

A PCR termékek (amplikonok) azonosítása: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP)

A kapott PCR termékek azonosítását a restrikciós enzimmel vágott DNS szakaszok vizsgálatával (RFLP) végeztük el. A gélelektroforézist követően részben *Hinf*I restrikciós endonukleázzal, részben *Pst*I enzimmel (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) emésztettük meg a kapott termékeket. A reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta *Hinf*I restrikciós endonukleázzal történt emésztéskor: 2 µl PCR termék, 2 µl R⁺ puffer 10 × 15,5 µl desztillált víz, 0,5 µl *Hinf*I (5 egység). A *Pst*I enzim használatakor ugyanezeket az összetevőket mértük a reakcióelegybe, kivéve a puffert, mely ebben az esetben 10 × cc O⁺ puffer volt. A PCR termék emésztése 37°C-on, 1 órán át, vízfürdőben történt. Az így keletkezett DNS fragmentumok vizualizációját a PCR termékek vizualizációjával azonos módon végeztük.

A primerek valamint a restrikciós enzimvágási helyek tervezéséhez két számítógépes primertervező programot használtunk: Primer Designer Version 2.0 és 4.1, Sci Ed Central for Windows 95 (Scientific and Educational Software). Csak a mindkét tervező program által elfogadott primerpárokkal végeztük a kiválasztott génszakaszok PCR amplifikációt.

Érzékenység

A két PCR vizsgálat érzékenységét a következő módon teszteltük: a referens Bucyrus törzsből 10-es alapú hígítási sort készítettünk a nem hígított vírustól 10⁻⁶ hígításig, majd az egyes hígításokból TRI reagenssel kivontuk a vírus RNS-t és az így nyert RNS mintákat külön-külön a két PCR módszerrel amplifikáltuk. A kiindulási vírustiter Reed-Muench szerint 10^{6,8}/ml volt.

4.4.2. Eredmények

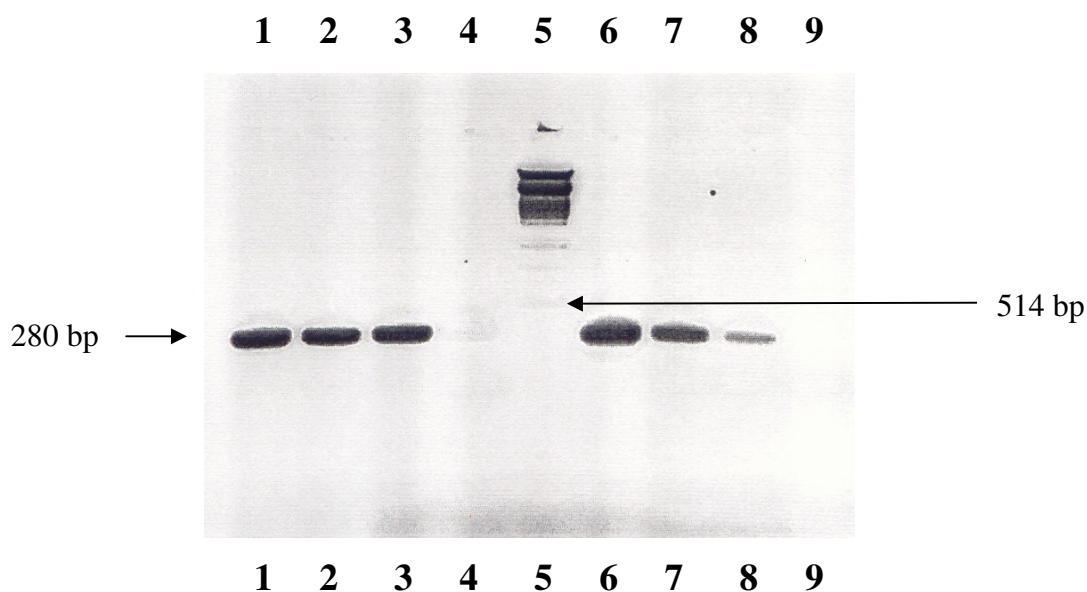
Az EAV RNS izolálása, az alkalmazott két módszer összehasonlítása

Az 583 mintából 46 esetben (7,89%) sikerült az EAV RNS-t izolálni és ezekből a tisztított RNS mintákból RT-PCR segítségével EAV specifikus terméket kapni. Ezen termékek specifikusságát

RFLP-vel és az adott mintából végzett vírusizolálással ellenőriztük. A két különböző módszerrel izolált vírus RNS-ek közül, 5 EAV pozitív RNS minta vizsgálati eredményét a 7. táblázatban és a 7. ábrán mutatjuk be.

7. táblázat: Az általunk alkalmazott 2 RNS tisztítási módszer vizsgálata: a kapott EAV RNS-ek 10-es alapú logaritmusban megadott titerei az alkalmazott módszerek és a tárolási idő függvényében.

Minta	RNS titer lg-ban			
	TRI reagens		QIAamp oszlop	
	Friss	3 hónapos	friss	3 hónapos
A1	3	1	3	2
A8	2	0,1	2	1
A16	3	1	3	2
A19	3	1	3	2
A50	2	0,5	2	1



7. ábra: Az A1 és az A8 jelzésű ondóminták különböző módszerrel izolált RNS titrálásának diagnosztikai RT-PCR utáni gélképe. 1. csík: A1(lg-1)/TRI, 2. csík: A1(lg-1)/Q, 3. csík: A1(lg-2)/TRI, 4. csík: A1(lg-2)/Q, 5. csík: lambda fág/*PstI* molekulatömeg marker, 6. csík: A8(lg-1)/TRI, 7. csík: A8(lg-1)/Q, 8. csík: A1(lg-2)/TRI, 9. csík: A1(lg-2)/Q. Rövidítések: TRI: TRI reagenssel tisztított vírus RNS, Q: QIAamp kit-tel tisztított vírus RNS, lg-1: az RNS 1 : 10-es hígítása, lg-2: az RNS 1 : 100-as hígítása. Az ábra jobb oldalán a nyíl a molekulatömeg markernek, a 280 bázispár hosszúságú PCR termékekhez (bal oldali nyíl mutatja a PCR termékeket), helyeződő legközelebbi nukleinsav fragmentjének csíkjára mutat.

Az EAV RNS átírása és a PCR

Az EAV specifikus primerpár alkalmazásával az RT-PCR reakcióban a primertervezéskor előre kiszámított nagyságú (280 bp) fragmentumok keletkeztek, majdnem mind a 46 esetben erős, tiszta csíkokat eredményezve a gélelektroforézis során. A 3 kivétel a 3 EAV pozitív vetélt magzat volt, amelyek PCR termékeinél csak halvány, vékony csíkok voltak megfigyelhetők, jelezve a szervminták alacsony vírus-RNS tartalmát. Ezekből a szervmintákból a PCR-t követő RFLP vizsgálat során már nem tudtunk hasított amplikon fragmenteket kimutatni, mindazonáltal ezek az amplikonok is alkalmasnak bizonyultak a szekvenálásra. A két különböző RT-PCR módszer (egylépéses ↔ kétlépéses) közül az előbbi vastagabb és kontrasztosabb csíkokat eredményezett az utóbbival összehasonlítva. Vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az egylépéses PCR alkalmasabb módszer, az RNS átírást követő cDNS amplifikálásra, mint a hagyományos PCR.

Összehasonlítva a primerkötődéshez szükséges hőmérsékleteket és programokat, a touchdown módszer jobb eredményeket adott, a termékek több DNS-t tartalmaztak, mint amit a hagyományos PCR alkalmazásakor kaptunk.

RFLP

A két restrikciós endonukleáz enzim közül a *Pst*I 160 és 120 bp fragmentekre emésztette a 280 bp hosszúságú PCR terméket, a *Hin*fI 171 és 109 bp fragmentumokat hozott létre. A kapott DNS fragmentumok hossza mindkét vizsgálat során megegyezett az elméletileg számított értékekkel. A 47 EAV pozitív mintából egyetlen egy sem mutatott polimorfizmusra utaló eltérést a *Pst*I enzimes vágás során, a *Hin*fI emésztést csak 5 minta esetében végeztük el.

A vizsgálati időszakunk alatt (2001-2004 között) a vírusközömbösítési próbával pozitívnak bizonyult 112 mén ondómintáját kétszer (2001 és 2002 években), valamint 33 szerológiailag nem vizsgált mén ondómintáját is megvizsgáltuk PCR módszerrel. A korábbi évekből (1994-2000) származó, 15 szeropozitív mén ondómintát, melyet az akkor elvégzett előzetes vizsgálatok óta -80°C-on tároltunk, szintén PCR vizsgálatnak vetettük alá. Ez utóbbi PCR vizsgálat 5 pozitív mintát mutatott ki, míg az arteritis diagnosztikai PCR-rel összesen 280 mén 296 ondómintájából 27 ménből (9,64%), 37 esetben, 177 lómagzat és 19 újszülött csikó vizsgálata során 3 magzattól (1,69%) és 1 négy napos csikóból (5,26%) mutattunk ki arteritis vírusra jellemző nukleinsav szekvenciát. A 16 különböző lóállományból, 17 alkalommal gyűjtött orrváladék-, fehérvérsejt- és vizeletminta PCR módszerrel vizsgálva mind negatívnak bizonyult, jelezve, hogy ezekben az állományokban a vizsgálati időpontban nem volt vírusürítő állat.

Érzékenység

A két PCR vizsgálati módszer érzékenysége a következőképpen alakult: a kétlépéses módszerrel $10^{-4.8}$ /ml hígítású vírustartalmú csőből tudtuk kimutatni az EAV RNS-t, míg az egylépéses PCR-nél a $10^{-5.8}$ /ml hígítás is pozitív volt.

4.4.3. *Megvitatás*

A viszonylag kis méretű PCR termékeink vizualizációjához használt kisebb töménységű 1%-os agarózgél (1,7-2% helyett) nem okozott gondot számunkra az elektroforézist követő elbíráláskor, a csíkok jól látszottak, fényképeik megfelelően élesek voltak. A PCR módszerrel vizsgált mintákból nagyobb arányban sikerült az EAV nukleinsavát kimutatnunk, mint a vírusizolálás módszerével. Általánosságban a vírusizolálás sikertelenségének számos oka lehet: a sejtenyészet vírussal szembeni fogékonysága (Huntington és mtsai, 1990), az alkalmazott vírusizolálási technika adekvát volta (Timoney és mtsai, 1986, Oestlund és mtsai, 1997), az inkubációs időszak paraméterei: hőmérséklet, CO₂ tartalom, páratartalom, alkalmazott tápfolyadék minősége, összetétele, mennyisége, a minta abszolút vírustartalma, a minta infektív vírustartalma, és a minta tárolási körülményei a feldolgozásig. Az itt megemlített hátráltató tényezők közül az első hármat legjobb tudásunk szerint kiküszöböltük, még a fennmaradó hármat nem tudtuk megváltoztatni, így az általunk végzett vírusizolálás kisebb találati aránya a minták abszolút és relatív alacsony vírustartalmának és a tárolási körülményeknek tulajdonítható.

A vírusizolálás nehézségei miatt a közvetlen (direkt) víruskimutatás másik, igen rövid múlttal rendelkező, de széles körben és robbanásszerűen elterjedt, és jelenleg már számos diagnosztikai intézetben is rutinszerűen alkalmazott módszere a PCR. Használatával a nem fertőzőképes, inaktiválódott vírus is kimutatható, különösebb szakmai felkészültség nélkül is alkalmazható, nem igényel komplex víruslaboratóriumot és 2-3 nappal, esetenként több héttel korábban ad eredményt, mint a vírusizolálás. A diagnosztikai munka mellett a szakemberek kezében hatékony a járványtani nyomozás és a filogenetikai törzsfák készítése terén, vagyis elméleti következtetések levonására is alkalmas. Noha viszonylag gyors (egy-két nap alatt eredményt ad), költségvonzata, különösen az RNS vírusok esetében (RT-PCR), nem teszi lehetővé a naponkénti (azonnali) vizsgálat elvégzését, így bevett gyakorlat, a minták "összevárása". Másik hátránya az a tény, mely szerint nem állapítható meg a PCR pozitivitás esetén, hogy fertőzőképes, vagy inaktív vírust mutattunk-e ki (Belák és mtsai, 1994, McCollum és Timoney, 1999). Ezért a PCR módszer önmagában nem alkalmas a vizsgált mien vírusürítő státuszának meghatározására.

További hátránya, hogy a negatív eredmény nem zárja ki más vírus jelenlétét a mintában, vagyis bármely más vírus, hasonló klinikai tüneteket okozva, felderítetlen marad az adott vizsgálati anyagban mindaddig, míg egy újabb PCR-rel ki nem zárjuk a másik, esetleg harmadik stb. lehetséges vírus jelenlétét. 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. Mindkét módszerhez azonban megfelelő molekuláris biológiai ismeretekre és számítógépes programokra van szükség, és az

említett két módszer költségvonzata együttesen már lényegesen meghaladja az egyszerű vírusizolálását, pedig még mindig csak néhány szóba jöhető vírus jelenlétéről nyújt tájékoztatást.

Minden, a diagnosztikában alkalmazott módszer esetén lényeges kérdés, különösen negatív eredmény esetén a módszer érzékenysége, melyet többször ellenőrizni kell. Ez egyszerű PCR esetén, legfőleg 10¹-10² plakk formáló egység/μl (plaque forming unit = PFU/ μl), kettős vagy ún. „nested” PCR esetén 10^{0.01}-10^{0.1} PFU/μl (Belák és mtsai, 1994). Igaz ez az érték a PFU fogalmával azért nem fejezhető ki korrekt módon, mert a nem fertőzőképes vírusnukleinsav is kimutatható vele. Az irodalomban található adatok alapján ezért nevezik a vírusizolálást a víruskimutatás arany standardjának, mely friss minta vizsgálata esetén megközelíti a nested PCR módszer érzékenységét.

A PCR érzékenysége miatt igen jelentős mértékű lehet a fals pozitívítás, különösen a nem gyakorlott, túlterhelt vagy kapkodó vizsgáló esetében és főként a nested PCR alkalmazásakor. Ez utóbbi esetben speciális célszerszámok és anyagok (1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőnyitó eszköz, csőtartó állvány, külön helyiség a DNS kontamináció elkerülése végett, UV vagy germicid lámpa, steril fülke, lamináris box, 1 %-os H lúg, PCR belső kontrol: mimic) nélkül lehetetlen elkerülni a DNS kontamináción alapuló aspecifikus termékek megjelenését a negatív mintákban is (fals pozitívítás). Az itt leírtak ellenére szükséges egy belső kontrol: mimic használata is a fals negatív reakciók kiküszöbölése érdekében (Belák és Ballagi-Pordány, 1993). Ez az oka annak, hogy egyre több laboratórium mond le a nested PCR módszernek, az érzékenység terén nyújtotta előnyeiről, és egyre többen választják, különösen a rutindiagnosztika területein, a ma már kereskedelmi forgalomban is kapható, optimalizált, egylépéses PCR kiteket.

A PCR módszereink érzékenységét vizsgálva azt találtuk, hogy az általunk kifejlesztett kétlépéses PCR kb. 100 TCID₅₀ infekatív virion kimutatására volt alkalmas, míg az egylépéses PCR ennél 10-szer érzékenyebb, 10 TCID₅₀ infekatív vírusrészecske kimutatására volt képes. Mivel az egyes szervminták és ondominták vizsgálatából is ezzel megegyező következtetéseket tudunk levonni (ld. később), ezért vizsgálataink döntő részét már a drágább, de érzékenyebb módszerrel, az egylépéses PCR-rel végeztük.

Az egylépéses és kétlépéses RT-PCR módszer összehasonlítása egyértelműen az előbbi hatékonyabb működését igazolta. Ez nemcsak a kétlépéses RT-PCR fokozottabb DNS kontamináció lehetőségét csökkentette, hanem a reakcióelegyben alkalmazott enzimek révén a keletkezett termékek DNS tartalmát is erőteljesen megnövelte, javítva ezzel az amplifikáció teljesítményét és ezzel a vírus nukleinsav kimutatását. További előnye volt ennek az eljárásnak a munkafolyamat részét képező ún. hot start módszer is, melynek lényege az, hogy az aspecifikus primerkötődés után, a DNS szálak alacsony hőmérsékleten elinduló láncszintézisét azáltal akadályozza meg, hogy a Taq polimeráz enzimet csak közvetlenül a tulajdonképpeni PCR indulásakor aktiválja. Ezáltal a keletkezett termék egyöntetűbb, specifikusabb DNS tartalmú lesz

azáltal, hogy közelítően az összes primer a specifikus kötődési helyekhez tapad és így nem képződnek aspecifikus termékek, melyek elfogyasztják a reakcióelegy egy részét. Külön kell szólni a Qiagen egy lépéses RT-PCR kit Q oldatáról, mely bizonyos esetekben, elsősorban az erőteljesebb szekunder DNS struktúra kialakulását követően, amikor az amplifikáció alapjául szolgáló genomszakaszon a guanin-citozin (GC) arány meghaladta a 60%-ot, segíti a szekunder DNS struktúrájának a megszüntetését és ezzel az RT-PCR reakció sikeres kivitelezését.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a frissen feldolgozott EAV pozitív RNS minták esetében, a gélben látható csíkok a legtöbb esetben egyformán jól kivehetőek voltak, intenzitásuk is megegyezett. A tisztított RNS-ek tízes alapú hígítási sorának vizsgálatakor azonban a TRI reagenssel tisztított minták 2 esetben is 1 hígítási fokkal erősebbnek bizonyultak. Mindkét esetben nagyobb mennyiségű vírus RNS volt jelen az adott mintában.

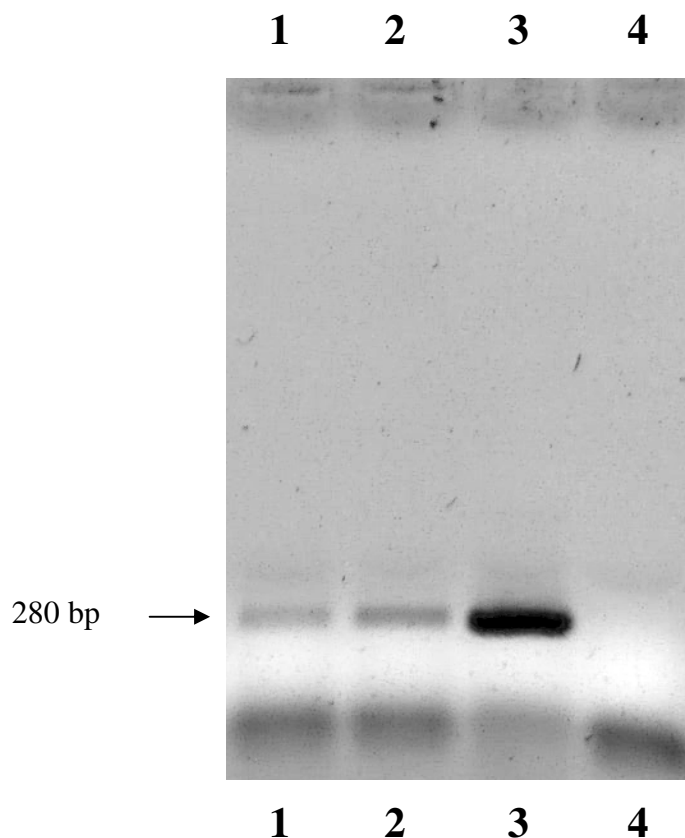
A három hónappal később elvégzett megismételt PCR eredménye ugyanezeknél a mintáknál viszont azt mutatta, hogy az összes EAV RNS tartalmú minta a TRI reagens alkalmazásakor 100-szoros, a QIAamp oszlop alkalmazásakor csak 10-szeres titerveszteséget szenvedett el. Mindezekből a vizsgálatokból az következik, hogy a TRI reagens valamivel több vírus RNS-t izolált, mint a nukleinsav adszorpción alapuló módszer, és az azonnal elvégzett RT-PCR vizsgálatoknál ennek kézzelfogható előnye az, hogy azoknál a mintáknál, ahol a vírus RNS rendkívül kis mennyiségben fordul elő, több esély mutatkozik a vírus nukleinsav kimutatására a TRI reagens alkalmazásával. Más a helyzet viszont a minták tárolásakor, különösen akkor, ha hosszabb idő után dolgozzuk fel a mintagyűjteményünket. Ebben az esetben a QIAamp oszlopkromatográfiás vírus RNS tisztítás és az azt követő több hónapos tárolás után 10-szeres RNS tartalom különbség is mutatkozhat ez utóbbi módszer alkalmazásakor. Mi, az előbb leírtakat figyelembe véve, a legfontosabb mintáinkat TRI reagenssel tisztítottuk, majd a QIAamp kit vírus RNS eluáló pufferébe vettük fel a denaturált RNS-t, és ezzel az oldattal tároltuk azokat -80°C -on.

A vírusizolálás és a PCR vizsgálatok eredményeinek összehasonlításából, mind az érzékenység, mind a megbízhatóság, mind az ismételhetőség (reprodukálhatóság) terén, azt a következtetést vontuk le, hogy a fáradságos 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 nem ondóminta volt a vizsgálat tárgya.

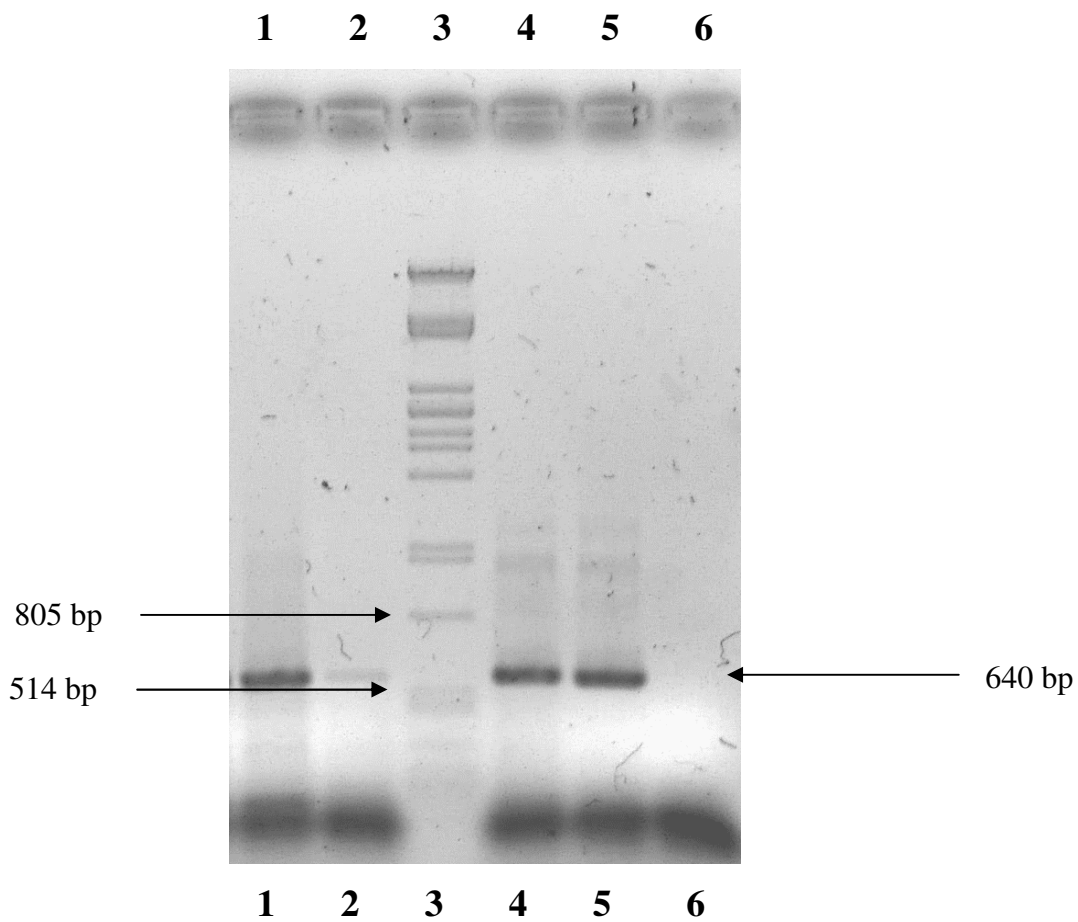
Az RFLP vizsgálataink nemcsak a termék azonosítását szolgálták, hanem segítségükkel azt is megállapítottuk, hogy a vírus NTR régió és ORF 7 régiója közötti vizsgált 280 bázispárnyi genomszakasz nem tartalmazott olyan mutációt mely a *PstI* vágási helyét megváltoztatta volna.

Megvizsgálva és összehasonlítva az ondóminták és a 3 vetélt magzat, valamint az újszülött csikóhulla szerveinek vírustartalmát, jól érzékelhető különbség mutatkozott az egyes csíkok

vastagsága, tehát a termékek DNS tartalma között. A kapott eredményekből itt is azt a következtetést lehetett levonni, amit a vírusizolálás és az izolált vírusok titrálásakor tapasztaltunk, vagyis az ondóminták döntő többsége, elsősorban a frissen vett ondóminták, nagy mennyiségű EAV RNS-t tartalmazott, így az ilyen jellegű vizsgálattal viszonylag egyszerűen és gyorsan lehetséges a víruskimutatás a különböző mentartó telepeken. Ugyanakkor a retrospektív vizsgálatokat tekintve, alapvetően romlik a víruskimutatás esélye: minél tovább tároljuk a mintákat, annál kevesebb a belőlük kinyerhető vírus RNS, ami a keletkezett termékek csíkjának elvékonyodásában nyilvánul meg (8. ábra). Ugyancsak különbség figyelhető meg a vetélt magzatok és az újszülött csikó szerveinek EAV tartalma között a PCR módszer alkalmazásakor is. A 8. ábrán jól érzékelhető a csíkok vastagsága közötti eltérés, jelezve a 3 minta különböző RNS tartalmát. Végül a 9. ábrán figyelhető meg az ugyanabban a PCR vizsgálatban amplifikált mén ondóminták, újszülött csikó és vetélt magzat szervmintáinak EAV nukleinsav-tartalom különbsége.



8. ábra: Az egyes szervminták eltérő RNS tartalma diagnosztikai RT-PCR vizsgálattal: 1. csík: M72 jelzésű vetélt lómagzat lép, 2. csík: M72 jelzésű vetélt lómagzat tüdő, 3. csík: Ú73 jelzésű újszülött csikó tüdő, 4. csík: negatív kontroll



9. ábra: Az egyes szervminták és ondóminták eltérő RNS tartalma a filogenetikai vizsgálatok céljára alkalmazott RT-PCR vizsgálattal. 1. csík: Bucyrus referens EA vírus mint pozitív kontroll 2. csík: M72 jelzésű vetélt lómagzat tüdő, 3. csík:molekula tömeg marker (lambda fág *PstI* enzimmal emésztve), 4. csík: Ú73 jelzésű újszülött csikó tüdő, 5. csík: A215 jelzésű mén ondóminta, 6. csík: negatív kontrol

A fehérvérsejt-, orrváladék- és vizeletminták a PCR vizsgálattal is negatívnak bizonyultak, jelezve, hogy ezek a vizsgálati minták specifikus, EAV nukleinsavat nem, vagy csak a kimutathatóság szintje alatt tartalmaztak. Az adott mintaszám meglehetősen alacsony, de PCR módszerünk érzékenységét figyelembe véve így is megállapítható, hogy a 16 vizsgált állomány egyikében sem volt aktív vírusürítő állat. Ez mutatja, hogy az aerogén-orális fertőződési mód Magyarországon az év jelentős részében igen korlátozott mértékű lehet ($\leq 1 : 16/\text{állomány}$). Érdeemes lenne a továbbiakban azt megvizsgálni, hogy hazánkban, egy adott állományban történt venereális fertőzést követően milyen mértékű lesz az aerogén-orális fertőződés számának emelkedése, és ez hogyan viszonyul az aerogén-orális fertőződés országos átlagához. Amennyiben

ez a szám szignifikánsan magasabb lenne az átlagosnál, úgy nyilvánvalóan még nagyobb jelentőséget nyerne minden venereális úton történő EAV fertőződés.

Összefoglalva a diagnosztikai PCR módszerrel a magyarországi lóállományokból 46 esetben mutattunk ki specifikus EAV nukleinsavat, öttel több esetben, mint a vírusizolálás módszerével. Az EAV diagnosztika szempontjából kiemelkedő jelentőségű, megbízható, valamennyi EAV-változat kimutatására alkalmas gyorsdiagnosztikai PCR-t sikerült létrehozunk, mellyel megteremtettük a hazánkban előforduló EAV törzsek genetikai jellemzésének lehetőségét.

4.5 A hazai vírustörzsek direkt víruskimutatásának módszerei, ezek összehasonlítása

4.5.1. Anyag és módszer

Minták

Az előző fejezetekben említett minták közül valamennyit (61 orrváladék-, 25 leukocita- és 4 vizeletmintát, ezen kívül a 2001-2004 között hozzánk érkezett: 159 lómagzat és újszülött csikó hullák szervmintáit, továbbá az első 100 ondómintát kétszer) az egymást követő évben, három, egymástól részben, vagy teljes egészében különböző módszerrel vizsgáltuk azok EA vírustartalmára. Az így három módszerrel párhuzamosan vizsgált minták száma 349 volt. Ezen minták közös tulajdonsága, hogy az érkezésüktől számított 2, de legkésőbb 10 napon belül elvégeztük a vírusizolálást, vagy a vírusnukleinsav amplifikálását, és ezután az immunhisztokémiai (i. h.) vizsgálat kivételével, az eredményeket azonnal értékeltük és táblázatban archiváltuk. Az EAV pozitív mintákból izolált vírusokat -80°C -on, az EAV nukleinsav pozitív PCR termékeket -20°C -on tároltuk további felhasználásig.

Diagnosztikai módszerek

A **vírusizolálás** módszere a 4.2.1., a diagnosztikai **PCR** módszere a 4.4.1. fejezetben került részletes ismertetésre. Az ott leírtak szerint összesen 349 esetben végeztünk párhuzamos vizsgálatokat vírusizolálás és PCR módszerekkel. A vírusizolálással, majd azt követően, a beoltott sejtek specifikus EAV ellen irányuló McAb-ot felhasználó immunhisztokémiai festésével, valamint a PCR vizsgálattal történő, a minták EAV pozitivitására irányuló, különböző vizsgálatok eredményeinek összehasonlító kiértékelést az első 100 mintánál és a négy pozitív szervminta, valamint az A170 és A172 ondóminta esetében végeztük el. Az egyrétegű sejtenyészetek vizsgálatát peroxidázzal jelzett ellenanyagok segítségével (IPMA, mely mint ellenanyagkimutatási módszer a 4.3.1. fejezetben került ismertetésre) az alábbiak szerint módosítottuk annak érdekében, hogy az EAV antigén kimutatására alkalmassá tegyük ezt a próbát.

Peroxidáz-enzimhez kötött vizsgálat (peroxydase linked assay, PLA)

A vizsgálati minták vírusizolálását a 4.2.1 fejezetben leírtak alapján végeztük el majd a sejteket a tenyésztőlemez aljáról lekapartuk, -80°C -on egyszer lefagyasztottuk, majd a második passzázs alkalmával, a vizsgálati mintákat 96 lyukú mikrolemezen elszaporított RK-13 sejtekre oltottuk és 2 napig 37°C -on inkubáltuk. Ezután desztillált vízzel 2:1 arányban hígított PBS-sel öblítettük a lemezeket, és ezt követően 20 percig tartó, 4% paraformaldehid tartalmú oldattal történő fixálás után, a sejteket PBST-vel öblítettük. Az 1H1 jelű hybridomaklón felülúszójából $1:10^2$ hígítást készítettünk (hígítóként 4% FCS tartalmú PBST-t használtunk), és ebből 50 μl mennyiségeket bemértünk a lemez vírussal fertőzött és nem fertőzött lyukaiba, valamint a vizsgálati anyagok 1. passzázsát tartalmazó vájatokba. A 37°C -on 1 óráig tartó inkubációs idő után a lemezeket mostuk, a sejtekhez vájatonként 50 μl mennyiségben torma-peroxidázzal jelzett, nyúlban termelt anti-egér IgG

konjugátumot (Sigma Aldrich Co., USA) adtunk, majd a lemezeket 37°C-on 1 óráig inkubáltuk. PBST-vel történő újabb mosás után 50 µl szubsztrát oldatot (200 µg 9-amino-3-etilkarbazol/ml és 0.03 % H₂O₂-t tartalmazó, 200mM-os pH 5 nátrium-acetát puffer) mértünk be a lyukakba. A reakciót 5 perc után úgy állítottuk le, hogy a szubsztrátot kicseréltük 300 µl desztillált vízre.

Célunk az volt, hogy megállapítsuk, hogy melyik módszertől milyen, a gyakorlati diagnosztikában alkalmazható, megbízható eredmény várható, melyik módszer érzékenyebb, melyik módszernek nagyobb a specifitása, és az eredmények értékelését követően, hogyan tudjuk az egyes diagnosztikai eljárások kombinálásával még tökéletesebbé tenni az EAV direkt víruskimutatáson alapuló kórjelzését.

Az a 3 módszer, melyekkel pozitív vagy negatív irányú eldöntendő választ vártunk és kaptunk a mintáink EAV tartalmára vonatkozóan, tehát a következő volt:

1. vírusizolálás (Oestlund módszere szerint)
2. vírusizolálást követő immunhisztokémiai eljárással kiegészített szövettani vizsgálat (specifikus McAb segítségével az első vakpasszázst követően)
3. nukleinsav kimutatás diagnosztikai PCR módszerrel.

A keresztkontamináció megelőzése céljából a diagnosztikai PCR-t és a vírusizolálást elkülönített módon, külön sterilfülkékben végeztük. A PCR alkalmazásakor mind a master mix elkészítése, mind a vírus nukleinsav izolálása szűrős mikropipetta-hegyekkel történt. A PCR eredmények megbízhatóságát, a mintákkal egyidejűleg beállított, pozitív és negatív kontrollok nukleinsav amplifikálásával ellenőriztük.

A magzati mintáknál megvizsgáltuk az első 20 negatív mintából a vírusizolálást követő i.h. festődést, valamint valamennyi EAV pozitív magzat (4) szervmintáinak i.h. festődését is.

Statisztikai módszerek

A 3 módszernek a diagnosztikában való alkalmazhatóságát a következő statisztikai vizsgálatokkal kívántuk eldönteni.

1. Az egyes próbák **reprodukálhatóság**ának a vizsgálata: az azonos eredményeken belüli és az ezek közötti egyezések eredményéből kiszámítható **megfigyelt egyezés**, valamint **várt egyezés** értékeit a **kappa statisztika** (Cohen 1960, Fleiss 1971) képletébe helyettesítve azt a viszonyszámot kapjuk meg, amely tájékoztat az adott próba eredményosorának és a legvalószínűbb diagnosztikai eredményosornak az illeszkedéséről.

$$\text{kappa} = \frac{\text{megfigyelt egyezés} - \text{várt egyezés}}{1 - \text{várt egyezés}}$$

2. **Érzékenység** a próba azon jellemzője, amely nem veszi figyelembe a betegség előfordulásának gyakoriságát (prevalencia), és a diagnosztikai próbának azt a képességét jelenti, mely a biztosan beteg állatpopulációból származó mintákból pozitív vizsgálati eredményt képes kihozni. Képlete:

$$\text{érzékenység} = \frac{\text{teszt pozitív minta}}{\text{összes pozitív minta}} \times 100$$

3. **Specifikusság** a próba azon jellemzője, mely szintén nem veszi figyelembe a prevalenciát, és a diagnosztikai próba azon képessége, mely a biztosan nem beteg állatpopulációból a negatív vizsgálati eredményt adja. Képlete:

$$\text{specifikusság} = \frac{\text{teszt negatív minta}}{\text{összes negatív minta}} \times 100$$

4. **Teszt pozitivitás valószínűségi arány:** Ez a számítás még mindig figyelmen kívül hagyja a prevalenciát, és kifejezi annak a két valószínűségnek az arányát, mely a pozitív teszteredmény valószínűsége a vizsgált, biztosan beteg állatok mintáiban és a pozitív teszteredmény valószínűsége a vizsgált és biztosan nem beteg állatok mintáiban, hányados eredménye. Képlete:

$$\text{teszt pozitivitás valószínűségi arány} = \frac{\text{érzékenység}}{1 - \text{specifikusság}}$$

5 **Teszt negativitás valószínűségi arány:** Szintén figyelmen kívül hagyja a prevalenciát (betegség előfordulási gyakoriság egy adott időpontban), és kifejezi annak arányát, mely a negatív teszteredmény valószínűsége a vizsgált, biztosan beteg állatok mintáiban, és a negatív teszteredmény valószínűsége a vizsgált és biztosan nem beteg állatok mintáiban, hányados eredménye. Képlete:

$$\text{teszt negativitás valószínűségi arány} = \frac{1 - \text{érzékenység}}{\text{specifikusság}}$$

A következő három számítás viszont, az előbbiekkal ellentétben, figyelembe veszi a prevalenciát.

6. **Előzetes tesztesély:** A betegség prevalenciájának a függvénye, képlete:

$$\text{előzetes tesztesély} = \frac{\text{prevalencia}}{1 - \text{prevalencia}}$$

7. **Utólagos tesztesély:** A teszt pozitivitási arány és az előzetes tesztesély függvénye, képlete:

$$\text{utólagos tesztesély} = \text{teszt pozitivitási arány} \times \text{előzetes tesztesély}$$

8. **Tesztpozitivitás előrejelző értéke =**

$$\frac{\text{előzetes tesztesély} \times \text{teszt pozitivitás valószínűségi arány}}{1 - \text{előzetes tesztesély} \times \text{teszt pozitivitás valószínűségi arány}} =$$

$$\frac{\text{utólagos tesztesély}}{1 - \text{előzetes tesztesély} \times \text{teszt pozitivitás valószínűségi arány}}$$

valódi pozitivitás

valódi pozitivitás + fals pozitivitás

(Cohen, 1960, Fleiss, 1993)

4.5.2. Eredmények

A vírusizolálás és a diagnosztikai, egy lépéses PCR vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása során kettéválasztottuk a friss minták és az összes minták két diagnosztikai módszerrel kapott eredményei közötti statisztikai számításokat. Az előbbi esetben a következő eredményeket kaptuk:

valódi pozitivitás: 42 valódi negativitás: 171		vírusizolálás	
		pozitív	negatív
PCR	pozitív	40	1
	negatív	1	271

Összeállítottuk ugyanezt a táblázatot az összes minták két diagnosztikai módszerrel kapott eredményeinek behelyettesítésével:

valódi pozitivitás: 47 valódi negativitás: 302		vírusizolálás	
		pozitív	negatív
PCR	pozitív	40	6
	negatív	1	302

$$\text{kappa} = \frac{\text{megfigyelt egyezés} - \text{várt egyezés}}{1 - \text{várt egyezés}}$$

A próba reprodukálhatóságáról tájékoztató kappa statisztikai érték friss minták esetében:

$$k = (0,9936 - 0,7723) / (1 - 0,7723) = 0,2213 / 0,2277 = \underline{\underline{0,9719}}$$

ahol a

$$\text{megfigyelt egyezés} = (40 + 271) / (40 + 1 + 1 + 271) = 311 / 313 = 0,9936$$

$$\text{várt egyezés} = (40 + 1) / 313 \times (40 + 1) / 313 + (271 + 1) / 313 \times (271 + 1) / 313 = 0,7723$$

Ugyanez a kappa statisztikai érték az összes vizsgálatokat (friss minták és retrospektív vizsgálatok mintái) figyelembevéve a következőképpen alakult:

$$k = (0,9799 - 0,7817) / (1 - 0,7817) = 0,1982 / 0,2183 = \underline{\underline{0,9079}}$$

ahol a

$$\text{megfigyelt egyezés} = (40 + 302) / (40 + 6 + 1 + 302) = 342 / 349 = 0,9799$$

$$\text{várt egyezés} = (40 + 1) / 349 \times (40 + 6) / 349 + (302 + 1) / 349 \times (302 + 6) / 349 = 0,7817$$

A vírusizolálás **érzékenységét** (v.i.érz.) összehasonlítva a PCR érzékenységével a következő eredményeket kaptuk a frissen feldolgozott minták esetében:

$$\text{v.i.érz.} = 41 / 42 = 0,9762$$

$$\text{PCR érz.} = 41 / 42 = 0,9762$$

Az összes vizsgálatot figyelembe véve az érzékenység értékei a következőképpen tolódtak el a PCR javára:

$$\text{v.i.érz.} = 41/47 = 0,8723$$

$$\text{PCR érz.} = 46/47 = 0,9787$$

A két módszer **specifitása** közötti különbség a frissen feldolgozott, és az összes feldolgozott minta esetében így alakult:

$$\text{v.i.spec.} = 271/271 = 1$$

$$\text{PCR spec.} = 271/271 = 1$$

$$\text{v.i.spec.össz.} = 302/302 = 1$$

$$\text{PCR spec.össz.} = 302/302 = 1$$

A két teszt megbízhatóságáról készített **teszt pozitivitás valószínűségi arány** (v.i.LR+, PCRLR+) a kétféle mintafeldolgozással nem adott értéket.

$$\text{v.i.LR+} = 0,9762/1 - 1 = \emptyset \quad \text{v.i.LR+össz.} = 0,8723/1 - 1 = \emptyset$$

$$\text{PCRLR+} = 0,9762/1 - 1 = \emptyset \quad \text{PCRLR+össz.} = 0,9787/1 - 1 = \emptyset$$

A két próba **teszt negativitás valószínűségi aránya** (v.i.LR-, PCRLR-) a kétféle mintafeldolgozással:

$$\text{v.i.LR-} = 1 - 0,9762/1 = 0,0238$$

$$\text{PCRLR-} = 1 - 0,9762/1 = 0,0238$$

$$\text{v.i.LR-össz.} = 1 - 0,8723/1 = 0,1277$$

$$\text{PCRLR-össz.} = 1 - 0,9787/1 = 0,0213$$

A vizsgálatok **előzetes tesztelés** (pre-test odds)

$$\text{ondóminták esetében: pre-tes odds} = 42/297 = 0,1414$$

$$\text{magzatok szervmintái esetében: pre-tes odds} = 3/177 = 0,0169$$

$$\text{újszülött csikó szervmintái esetén: pre-tes odds} = 1/19 = 0,0526$$

Az **utólagos tesztelés** vizsgálatának nem volt értelme a 100%-os specificitási értékekből következő LR+ nevező 0 értéke miatt.

A **tesztpozitivitás előrejelző értéke** mindkét vizsgálatnál és mindkét mintafeldolgozás esetén 1-nek bizonyult.

A vírusizolálást követő immunhisztokémia, a specifikus McAb segítségével, az első vakpasszást követően nem mutatott ki több víruspozitív mintát, de a kimutatás gyorsasága 3 esetben megnőtt, mivel az első vakpasszást követő 24 óra elteltével megfestett sejtenyészetek fertőzött sejtjeiben, plakkszerűen jól megfigyelhető volt a sejtek citoplazmájának barnás-vöröses elszíneződése a magárnyék mellett. A vírusra jellemző sejtkárosító hatást fénymikroszkóppal csak a 3-4. napon tudtuk megfigyelni (A8, A49, A95 minták). Amennyiben az érzékenységi statisztikai számításoknál ezt figyelembe vesszük, úgy az i.h. festéssel kombinált vírusizolálás 3 napig

érzékenyebbnek bizonyult az egyszerű, Oestlund féle vírusizolálás módszerénél ($18/19=0,9474 \leftrightarrow 15/19=0,7895$).

Az i.h. specifikusságát magzati mintáknál összehasonlítva a következőket kell figyelembe venni: az első 20 negatív mintából a vírusizolálást követő i.h. is minden esetben negatív eredménnyel zárult. Egy általunk csak PCR módszerrel vizsgált és negatívnak talált magzat szervei, viszont egy másik laboratóriumban végzett vizsgálat szerint i.h. festéssel pozitívnak bizonyultak. A megismételt vizsgálat szerint ugyanezek a minták ismét negatívak voltak vírusizolálással és PCR-rel is. Ez azt jelenti, hogy a McAb-ra alapozott i. h. festés specifikussága vírusizolálást követően 1, a vetélt magzat szerveinek i. h. specifikussága (direkt módszer) viszont mindenképpen 1 alatti.

Külön ki kell emelni, hogy a két észak-amerikai típusú izolátum azonosítása (A170 és A172, ld. filogenetika) semmilyen nehézséget nem okozott az i.h. festési eljárás során.

Összefoglalva az eredményeket, a v. i.-t követő i. h. festés érzékenysége friss minták esetében a v. i.-t az első 3 napban 15%-kal felülmúlja. A 3. nap után a 2 módszer érzékenysége megegyezik, amely 94,74%. A diagnosztikai PCR érzékenysége ugyanezeknél a mintáknál ugyancsak 94,74%, de nagyobb számú minta esetén már 97,62%. Mindhárom módszer 100%-an specifikus.

4.5.3. Megvitatás

A különböző diagnosztikai módszerek eredményeinek a megerősítése, érvényesítése („validálás”), alapvető igény minden vizsgáló szakember részéről. Az egyes diagnosztikai módszerek összehasonlítását régóta különböző statisztikai módszerekkel végzik (Cohen, 1960, Fleiss 1971, 1993), és ezek a különböző statisztikai vizsgálatok jelzik az egyes vizsgálati eredmények érvényességének eltérő paraméterein keresztül az egyes biológiai próbák alkalmazhatóságának lehetőségeit. Általánosságban egy biológiai próbát a kórelőzményi adatok, klinikai megfigyelések, fatális kimenetelű esetekben a patológiai leletek és a teszteredmények utólagos egybevetésével értékelnek, de nem ritka az sem, amikor két vagy több próba eredményét egymáshoz hasonlítják. Munkánk során ez utóbbi módszert választottuk mi is, mert a vizsgálat tárgyát képező minták döntő többségénél, az eredményeink patológiai leletekkel történő alátámasztását nem várhattuk, a vetélt és újszülött csikók esetében pedig, a patológiai elváltozások szegényessége, valamint a jelentős mennyiségben önmérsztett vizsgálati anyagok kórbonctani vizsgálatra való alkalmatlansága folytán, éppen a virológiai és molekuláris biológiai módszerek jelenthetik a patológia számára a megerősítést. Két vagy több módszer egyidejű összehasonlításakor viszont mindig alapvető kérdés: mihez kell viszonyítani, mi az abszolút egyértelmű eredmény? Ilyenkor általában két fő lehetőség kínálkozik: vagy az egyik módszert vesszük alapul, ha egy jól bevált, kipróbált vizsgálati eljárásról van szó, és ehhez viszonyítjuk a többi módszert, vagy az összes módszerrel kapott pozitív eredmény jelenti a felderített összes pozitív esetszámot, és ehhez viszonyítunk. Előbbi esetben a viszonyítási alapul szolgáló bevált módszer érzékenysége, utóbbi

esetben pedig a vizsgált módszerek specifikusságáról szóló adat vesz el, vagyis az a statisztikai mutató, amely a fals pozitívítások lehetséges arányát jelzi. Mi ennek ellenére ez utóbbi viszonyítást választottuk, mert a vírusizolálás az irodalmi adatok alapján a "golden standard", vagyis optimális esetben ennek a módszernek 100% körüli az érzékenysége, másrészt viszont bízunk az i.h. eljárás érzékenységet növelő hatásában. A PCR specifikusságának esetleges problémáit az RFLP termék azonosítása mellett egy másik régió PCR-rel történő felerősítésével és a termék szekvenálásával terveztük kiküszöbölni.

A három módszer összehasonlításakor azonnal kitűnik, hogy az i.h. mint önálló vizsgálati eljárás, nem jöhet számításba, mert a vírusantigén kimutatást mindig megelőzte a mi esetünkben a vírusizolálás, és az i. h. mint vizsgáló módszer nemcsak a v.i.-tól függött, de a két víruskimutatás eredményében sem volt eltérés. Ugyanakkor az is kiderült, hogy a szervek direkt i.h. festése bizonyos esetekben aspecifikus festődést eredményez, ezzel rontva a vizsgálat megbízhatóságát a specifikusság oldaláról nézve.

A két alapmódszer eredményeinek statisztikai módszerekkel való összevetése ugyanakkor tanulságos, nemcsak az egyes statisztikai paraméterek, hanem az ezekből a diagnosztikai alkalmazhatóság terén levonható következtetések tekintetében is.

A kappa statisztikai értékek majdnem 10%-os különbsége a frissen feldolgozott minták javára azt jelzi, hogy a vírusizolálás, eredményességben csak akkor veszi fel a versenyt a PCR módszerrel, ha a rendelkezésünkre álló mintákban még infektív EA virionok találhatóak. Minden egyéb esetben a PCR reprodukálhatósága lényegesen jobb a vírusizolálásénál. A retrospektív vizsgálatok elvégzésekor a vírus izolálása még akkor is esélytelen, ha a mintát -80°-on tárolták. A vírus izolálásának különösen a magzati minták esetében volt alacsony esélye, mert ezeknek egyébként is lényegesen alacsonyabb az infektív titere (ld. 4.2. vírusizolálás fejezet).

A két módszer érzékenysége közötti azonosságot a minták azonnali feldolgozása esetén közel megegyezőnek és rendkívül jónak (97%) találtuk, ami nagyjából megegyezett mind az EAV PCR és v.i. érzékenység nemzetközi adataival (Belák és mtsai, 1994, Gilbert és mtsai, 1997, Balasuriya és mtsai, 1998), mind egyéb vírusok PCR és v.i. érzékenységének összehasonlító adataival (Ballagi-Pordány és mtsai, 1990, 1992, Belák és Ballagi-Pordány, 1993). A retrospektív vizsgálatokat is magába foglaló statisztikai számítások eredményei itt is 10% eltérést mutatnak a PCR javára, ami jelzi, hogy a minta infektív vírustiterének csökkenésével arányosan romlik a v. i. módszer érzékenysége is.

Meggyőző mindkét próba specifikussága is (100%), ami elsősorban a PCR esetében mond ellent az irodalmi adatoknak (Sarkar és mtsai, 1990, Balasuriya és mtsai, 2002, Westcott és mtsai, 2003), a v. i.-nál azonban nem meglepő. A későbbiek során kerül leírásra az általunk kifejlesztett nested PCR módszere (filogenetika), melynél a specifikusság már lényegesen rosszabb, mint a

diagnosztikai PCR esetében. Ez a tény megerősíti azoknak a szakembereknek a véleményét, akik legalábbis a kórjelzés kialakításánál, az egylépéses PCR előnyeit hangsúlyozták, még azon az áron is, hogy esetleg le kell mondani a nested PCR magas érzékenységről, mind a diagnosztikai, mind a filogenetikai vizsgálatok megbízhatóságának a javára. E véleményeket saját vizsgálataink alapján teljesen megalapozottnak tartjuk.

A két vizsgálati módszer teszt pozitivitás valószínűségi arányát, éppen a 100%-os specifikusság miatt nem lehet meghatározni, de a teszt negativitás valószínűségi arány alacsony értéke (2,38%) mutatja, hogy milyen kis valószínűséggel számíthatunk fals negatív eredményre a frissen vizsgált mintáknál. A kirívóan alacsony 12,77%-os találati arány már érzékelteti a v. i. hátrányát a PCR-rel szemben azokban az esetekben, amikor a minta hosszabb ideje nincs feldolgozva.

A három különböző mintacsoport statisztikai vizsgálatával, a prevalenciát is figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy ondóminták esetében annak a valószínűsége, hogy a szeropozitív mén Magyarországon 1998 és 2004 között vírust ürít kb. 14%. Ez a mutató egy kicsit pozitív irányba torzít, a retrospektív vizsgálatok súlyozottsága miatt. Ugyanez az érték 2001 és 2002 között 10% volt, az egyes irodalmi adatokban szereplő (Timoney és mtsai, 1986) 30%-kal szemben. A magzati minták előzetes tesztelési aránya igen alacsony (1,69%), és ez a hazai EAV törzsek alacsonyabb virulenciáját bizonyítja, valamint arra utalhat, hogy az EAV okozta vetélés diagnosztikája, még a szerológiailag bizonyított járványok esetén is, csak rendkívül korlátozott ideig, és mérsékelt eredményességgel valószínűsíthető meg, a magzati szervek már említett alacsony vírustiter értékei miatt. Az újszülött csikók előzetes tesztelési aránya viszont az alacsony mintaszám (1/19) miatt nem vehető össze reálisan a magzati minták tesztelési arányával, de a majdnem négyszeres különbség ez utóbbi javára ígéretessé és indokolttá teszi az újszülöttkori elhullások vizsgálatát, hiszen az EAV okozta vetélés mellett, az újszülött korban okozott elhullások hátterében is jelentős számban állhat EAV fertőzés.

4.6. A hazai lóarthritis vírustörzsek genetikai vizsgálati módszerének a kidolgozása

4.6.1. Anyag és módszer

Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása:

A PCR vizsgálatok elvégzése előtti mintavétel, a minták kezelése és tárolása a 4.2 fejezetben került ismertetésre. A mintákat egy másik, általunk kifejlesztett PCR vizsgálatnak vetettük alá, majd -80°C-on tároltuk azokat.

Hazai EAV törzsek filogenetikai vizsgálata, a megfelelő genomszakasz meghatározása

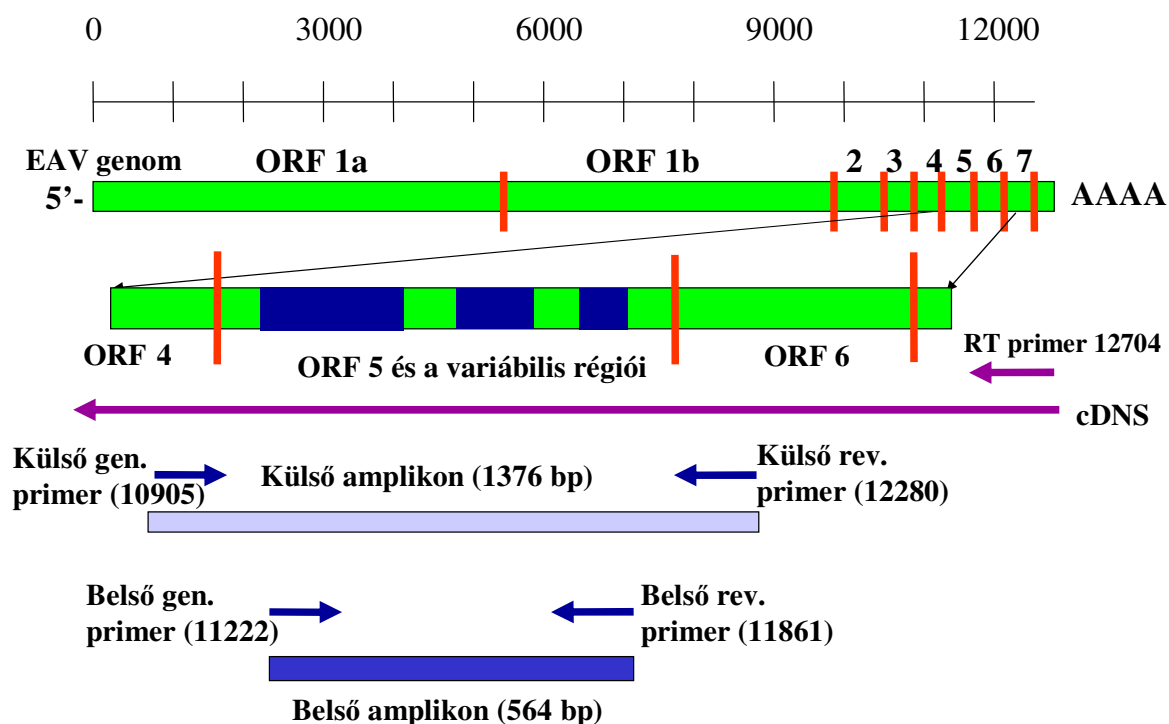
A legrészletesebb kórelőzményi adatokkal rendelkező 16 ondóminta, valamint a 3 vetélt magzattól és 1 újszülött csikóból származó szervmintákban jelenlevő EAV nukleinsavának részleges szekvenálása céljából, a vírus egy másik genomrégióját, PCR módszerrel felerősítettük.

A megfelelő variabilitást mutató, különböző EAV genomrégiók meghatározásához a FASTA (Pasteur Intézet) és a BLAST (Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) számítógépes programokat használtuk, az egyes vírusok illesztését, valamint a konszenzus szekvenciameghatározást a BioEdit 4.7.8. és az Align Plus 4 for Windows 95, version 4.0 (Scientific and Educational Software) programok segítségével végeztük.

A filogenetikai vizsgálatokhoz az EAV ORF5 régió három variábilis részét (Balasuriya és mtsai, 1997) közrefogó, génszakasz amplifikálására terveztünk RT-PCR-t, melyet a diagnosztikai PCR-től való megkülönböztetés céljából a továbbiakban filogenetikai PCR-nek nevezünk. A kevés EAV RNS-t tartalmazó minták sikeres szekvenálása érdekében kidolgoztunk egy nested RT-PCR-t is, melynek külső primerei az ORF 4 és az ORF 6 régiókra tapadva lefedik a teljes ORF 5 vizsgált génszakaszát, és egy 1376 bp hosszúságú terméket adnak, valamint egy belső primerpárt, mely az ORF 5 konzervatív részeire kötődik, körülvéve a három variábilis régiót, egy 640 bp hosszúságú terméket képezve (10. ábra). A tervezett primerpárok pontos leírását a 9. táblázat foglalja össze. Összehasonlító vizsgálatok céljából szintetizáltattuk az ugyanezen célból Stadejek és mtsai (1999) által tervezett primereket is, melyeket a 8. táblázat mutat be.

8. táblázat: Stadejek és mtsai (1999) által az EAV genomra tervezett filogenetikai nested PCR primerek lokalizációja

Genomon belüli pozíció	irányultság	Szekvencia (5'-3')	Nukleotid pozíció	Amplikon hossza (bp)
ORF 5	genomikus	GAC GGA TCG CGG CGT TAT TG	11253-11272	1351
ORF 7	reverz	GGT AGG AAC CCA ACT GAC GGT G	12582-12603	
ORF 5	genomikus	GCC AA/GT TTG CTG CGA TAT GA	11272-11291	565
ORF 5	reverz	TGG GCC TAC CTG GGA CTA AC	11817-11836	



10. ábra: Az EAV genomra tervezett filogenetikai nested RT-PCR primereinek lokalizációja

9. táblázat: Az EAV genomra tervezett filogenetikai nested PCR primereink lokalizációja

Genomon belüli pozíció	irányultság	Szekvencia (5'-3')	Nukleotid pozíció	Amplikon hossza (bp)
ORF 4	genomikus	CCA CTG CGC CGG CTA TAA CT	10905-10924	1376
ORF 6	reverz	TTG CCG CGA ACC ACT ACC TG	12261-12280	
ORF 5	genomikus	AGC GCT TCA CAG ACT TCA CC	11222-11241	640
ORF 5	reverz	CCG TAG GCC ACT GCA TAA TC	11842-11861	

Az ORF5 régióra tervezett PCR

A tervezett nested RT-PCR kétlépéses változatánál az EAV RNS átírás megegyezett a 4.2. fejezetben leírtakkal. Az ezt követő első amplifikáció reakcióelegye 25 µl, 1,5 mM MgCl₂ koncentrációjú pufferben 5% mennyiségű DMSO₄, 10 pmol dNTP, 12,5-12,5 pmol primer, 2,5 µl cDNS és 1,5 U Taq DNA polymerase keverékét (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) tartalmazta. A polimeráz láncreakciót MJ Research MiniCycler-rel (MJ Research, Inc. Watertown, Massachusetts,

USA) végeztük. A kezdeti 94°C-os 3 percig tartó denaturáció után 5 ciklusban ismételtük el a következő lépéseket: 94°C-on 45 másodperc (denaturáció), 57°C-on 1 perc (primer kapcsolódás), 72°C-on 1 perc (láncszintézis), majd további 25 cikluson keresztül a primerkötődés hőmérsékletét 53°C-ra csökkentettük, a többi paraméter változtatása nélkül. Legvégül a reakcióelegyet 72°C-on további 2 percig inkubáltuk a láncszintézisek teljes befejezése céljából. A második amplifikáció reakcióegyének 50 µl-e 1,5 mM MgCl₂ koncentrációjú pufferben 10 pmol dNTP, 25-25 pmol primer, 5 µl cDNS és 1,5 U Taq DNA polymerase keverékét (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) tartalmazta. A kezdeti 94°C-os 3 percig tartó denaturáció után 5 ciklusban ismételtük el a következő lépéseket: 94°C-on 45 másodperc (denaturáció), 58°C-on 1 perc (primer-kapcsolódás), 72°C-on 1 perc (láncszintézis), majd további 35 cikluson keresztül, a többi paraméter változtatása nélkül, 54°C-ra csökkentettük a primerkötődés hőmérsékletét. Legvégül a reakcióelegyet 72°C-on további 2 percig inkubáltuk a láncszintézisek teljes befejezése céljából.

Az egy lépéses PCR esetében, melyet a Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Germany) komponenseivel, a gyártó utasításainak megfelelő módon végeztük, az RNS átírás folyamatát az ORF 6 régióra tapadó, külső, reverz primer végezte, majd 15 percig 95°C-on tartó reverz transzkriptáz enzim inaktiválás és Taq polimeráz aktiválás után, ugyanabban a reakciócsőben a polimeráz láncreakció következett. Ennek során 8 cikluson keresztül a következő reakcióparamétereket állítottuk be 94°C-on 40 másodpercig tartó denaturáció, majd a vírusspecifikus primerek kötődése a DNS szálakhoz (primer annealing), 58°C-on 50 másodpercig, minden ciklusnál egy 1°C hőmérsékleteséssel (touchdown PCR). Végül az új DNS szálak láncszintézise (extension), 72°C-on 1 percig. Ezután folyamatosan további 32 cikluson keresztül, ugyanezekkel a paraméterekkel végeztük a PCR-t, de a primerkötődés hőmérsékletét 50°C-ra állítottuk be. A reakciót 72°C-on 10 percig tartó végső láncszintézissel fejeztük be. Az itt alkalmazott primerek koncentrációja 1 µM volt. A második amplifikációt is ugyanezzel a kittel végeztük, megemelve a primerkoncentrációt 2 µM-ra. Az alkalmazott PCR program megegyezett az első amplifikációban használttal.

Mindkét PCR esetében a vizsgálati minták mellett pozitív kontrollként, a Bucyrus referens EAV törzs tisztított RNS-ét illetve cDNS-ét, negatív kontrollként vírus RNS-t illetve cDNS-t nem tartalmazó reakcióelegyet alkalmaztunk.

A nested PCR mellett megkíséreltük csak egyetlen amplifikálással szekvenáláshoz elegendő mennyiségű DNS-t előállítani, és ebben az esetben csak a két belső primerpárral (Stadejek által és általunk tervezett primerpárokkal) végeztük az ORF 5 régió genomrészének a megsokszorozását.

A termékek megjelenítését a 4.2. fejezetben ismertetett módon végeztük.

A PCR amplikonok azonosítása: RFLP

A kapott PCR termékek azonosítását a restriktív enzimmel vágott DNS szakaszok vizsgálatával végeztük el. A gélelektroforézist követően 2 olyan enzimet találtunk mely az amplikonokat, egymástól jól elkülöníthető módon, két fragmentre hasította. A *Hinf*I, és az *Eco*RI restriktív endonukleáz enzimekkel emésztettük meg a kapott termékeket. Emésztéskor a reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 2 µl PCR termék, 2 µl R⁺ puffer 10 ×, 15,5 µl desztillált víz, 0,5 µl *Hinf*I (5 egység), illetve *Eco*RI (5 egység). A PCR termék emésztése 37°C-on, 1 órán át, vízfürdőben történt. Az így keletkezett DNS fragmentumok szeparációját és vizualizációját a 4.4 fejezetben leírt módon agaróz gélelektroforézissel végeztük.

Szekvencia-meghatározás:

A GP₅ glükoproteint kódoló régióhoz tapadó specifikus primerpárok által felerősített terméket (amplikont) trisz - borát - etilén-diamin-tetraacetát (TBE) pufferben oldott, 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 0,8%-os agarózgélben (Standard Low-m_r Agarose Gel, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) elektromos térben futtattuk (elektroforetizáltuk) 6-8 V/cm feszültség mellett kb. 3 órán át. Az amplikon helyzetét rövid idejű 302 nm-es ultraibolya fény (UV) átvilágítással (AITM-26 transzluminátor, Alpha Innotech Corporation, USA) vizsgáltuk, majd a kb. 500 mg-nyi mennyiségű amplikont tartalmazó géldarabkát kivágtunk a géllemezből és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) segítségével kitisztítottuk az elegyből a DNS-t. A termékek két irányú direkt szekvenálását fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidos szálépítésen alapuló (Sanger és mtsai, 1973) szekvenáló reakció módszerével, ABIPrism 2.1.0 automata szekvenálókészülékkel, a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutató Központjában végeztettük el. A szekvenáláshoz használt primerek azonosak voltak az általunk az RT-PCR reakcióban használtakkal.

Számítógépes összehasonlító vizsgálat:

Az általunk kapott szekvenciákat a referens Bucyrus EAV törzs komplett RNS genomját tartalmazó X53459 génbanki akcessziós számú (den Boon és mtsai, 1991), 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 számítógépes eredményeket a szekvencia-hullámok egyedi ellenőrzésével hitelesítettük. Az ezt követő többszörös szekvenciaillesztéshez a BioEdit 4.7.8 és a Clustal W 5.a szoftver számítógépes programokat alkalmaztuk. A filogenetikai fa létrehozásakor a szekvenciapárok közötti távolságot a DNADIST számítógépes program (Felsenstein 1993, Benkő és Harrach, 1998), Kimura 2 paraméteres modell, 2-es arányú transitio/transversio (Kimura 1980) segítségével határoztuk meg. A DNADIST programmal létrehozott távolsági matrixból (distance matrix) a FITCH programmal készítettünk törzsfát (Fitch és Margoliash, 1967).

Statisztikai módszerek

A statisztikai módszerek közül a filogenetikai PCR próba érzékenysége mellett a próba specifikusságát is vizsgáltuk. A retrospektív vizsgálatokban résztvevő 15 ondómintához, melyekből 6 pozitívnak bizonyult, és ezekből 4 mintát szekvenáltattunk, valamint random módon kiválasztott 7 ondó-, 6 szerv- és 6 leukocita mintát, és a fennmaradó további 16 szekvenáltatott mintát is alávetettük a filogenetikai PCR vizsgálatnak.

4.6.2. Eredmények

A termékek kimutatása és azonosítása

Az egyes PCR módszerekkel kapott ampliconok intenzitása eltérőnek mutatkozott, nagysága 640 bp, a nested PCR külső terméke 1376 bp volt, a számított értékeknek megfelelően. A Stadjek és mtsai által tervezett nested PCR ampliconjainak hossza a cikkben (1999) leírtakkal megegyezett (565 bp).

A termékek azonosítására használt restriktív enzimekkel csak az erősebb csíkot képező ampliconok esetében volt lehetőségünk az emésztés után keletkezett rövidebb fragmentumok elbírálására. Ekkor a *HinfI* enzimes vágás után egy 565 és egy 75 bp molekulatömegű termék, illetve az *EcoRI* enzimes vágás után egy 373 és egy 267 bp molekulatömegű termék keletkezett. A halvány csíkot adó PCR termékek enzimes vágása után nem volt látható fragmentum csík a gélben.

Szekvenciameghatározás

A kapott szekvenciák meghatározásakor, egy esetet kivéve, valamennyi alkalommal az EAV genom GP₅ génjének megfelelő szekvenciákat kaptunk, melyeknél az illesztéses (alignment) vizsgálattal 81-91% hasonlóságot találtunk a referens Bucyrus törzs szekvenciájának a megfelelő genomrészéhez hasonlítva (részletek a 4.7. fejezetben).

Az egyetlen kivételt az M34 minta képezte, melynél a nested RT-PCR-t követően, egy nagyjából 500 bp nagyságú, halvány csík volt megfigyelhető a gélben, mely mellett még legalább két kisebb molekulatömegű amplicon is képződött ugyanabban a reakcióban. A csík halványsága miatt azt direkt szekvenálás után összehasonlítottuk a génbankban található vírus eredetű, majd egyéb élő szervezetből származó nukleotid szekvenciákkal. A kapott eredmény alapján a felerősített génszakaszunk az X79547 génbanki akcesziós számú, 16660 bp nagyságú, *Equus caballus* mitokondriális DNS részét képezte, mely részben a citokrom c oxidáz, részben az e mögött elhelyezkedő 2 ATPáz enzimek kódolásában játszik szerepet. A felerősített génszakasz pontos helyeződését, és a két ellentétes irányú szekvenálás során kapott termékek illesztését a 11. ábrán mutatom be. Az illesztésből kiolvasható, hogy mindkét primer a neki ellentétes irányultsággal kapcsolódott a mitokondriális DNS genom adott szakaszához. A primertervező programokkal ugyancsak megállapítható volt a 2 genomikus és a belső reverz primerek ellentétes irányultsággal történő kapcsolódási lehetősége a mitokondriális genomhoz. A megismételt vizsgálatok során

mindhárom nested PCR, élesebb vagy halványabb csíkkal, de kimutatta az M34 minta mitokondriális DNS szennyezettségét, mindkét általunk használt RNS tisztítási mód (Tri reagens, QIAamp, 4.2. fejezet) alkalmazását követően.

X79547mDNS	7563	agacgctatccctgggcgcctaaatcagacaactctcgtggcctctcgac
Sz34konszenzus	1	-----.....
X79547mDNS	7613	caggactttactacgggtcaatgctcagagatctgcggtatcaaaccacagc
Sz34konszenzus	46
X79547mDNS	7663	tttataccaattgtccttgaactagttccactgaaacacttcgaagaatg
Sz34konszenzus	96g.....
X79547mDNS	7713	atctgcatcaatattataaagtcactaagaagctattatagcattaacct
Sz34konszenzus	146
X79547mDNS	7763	tttaagttaaagattgagggttcaacccccctccctagtgatagccacag
Sz34konszenzus	196
X79547mDNS	7813	ttggatacatcaacatgatttattaatatcgtctcaataatcctaactct
Sz34konszenzus	246t.....
X79547mDNS	7863	atattattgtatttcaactaaaaatctcaaagcactcctaccgacacacc
Sz34konszenzus	296c.....
X79547mDNS	7913	cagaagtaaagacaacccaaaataacaaaacactctgccccttgagaatca
Sz34konszenzus	346
X79547mDNS	7963	aatgaacgaaaatctattcgcctctttcgtaccccaacaataagtaggc
Sz34konszenzus	396a.....
X79547mDNS	8013	ctccctattgtaattctgatcatcatatttccc
Sz34konszenzus	446-----

11. ábra: Az EAV genomra tervezett filogenetikai nested RT-PCR belső primereivel szekvenált Sz34 minta konszenzus szekvenciája illetve a X79547 génbanki akcesziós számú *Equus caballus* mitokondriális DNS genomhoz

Keresztkontamináció

Az A269 EAV RNS pozitív ondóminta filogenetikai RT-PCR vizsgálatát követően 9 nappal az M151 magzati szervmintából mindkét filogenetikai nested RT-PCR módszerrel (Stadejek által és általunk tervezett primerpárokkal és PCR programokkal) halvány csíkot figyeltünk meg az agarózgélben a termék futtatását követően. A direkt szekvenálás nukleotid sorrendjének, az A269 mintából nyert EAV nukleotid sorrendjével történt összehasonlításakor azonosnak bizonyult a két minta. Az M151 minta megismételt nukleinsav tisztítása és ismételt nested RT-PCR vizsgálata negatív eredményű lett, miként a diagnosztikai RT-PCR és a vírusizolálás eredményei is.

Statisztika

A Stadejek és mtsai (1999) által, az ORF 7-től GP₅ gén 5' végéig tervezett nested PCR a 20 pozitív mintából 18-at ismert fel, a 30 negatív mintából 29-et. Így a fals pozitívitás aránya $1/30 = 3,33\%$, a fals negativitási arány pedig $2/20 = 10\%$. Ennek megfelelően az RT-PCR érzékenysége: $18/20 \times 100 = 90\%$, specifikussága pedig $29/30 \times 100 = 96,67\%$. A további RT-PCR-ek hasonló paramétereit a 10. táblázatban mutatom be.

10. táblázat: Az egyes RT PCR-ek érzékenységének és specifikusságának összehasonlítása

RT-PCR típusa	Valódi eredmény	Stadejek és mtsai (1999) nested *	Saját kétlépéses nested	Saját egy lépéses nested	Saját kétlépéses	Saját egy lépéses
Pozitív	22	20	20	21	19	21
Fals pozitív	-	1	1	1	-	-
Negatív	28	27	27	27	28	28
Fals negatív	-	2	2	1	3	1
érzékenység		90,91%	90,91%	95,45%	86,36%	95,45%
specifikusság		96,43%	96,43%	96,43%	100%	100%

* A Stadejek és mtsai által (1999) leírt primerek és PCR programok alkalmazás során nyert eredmények.

4.6.3. Megvitatás

Az egyes PCR módszerekkel kapott termékek az agarózgélben jelentős különbséget mutattak intenzitásukban, bár többségüknél az amplikonok alkalmasak voltak a direkt szekvenálásra. Néhány esetben azonban a kapott DNS mennyisége kevesebb volt a szükségesnél. Ez elsősorban a két, vírusizolálással negatív, vetélt magzati szervmintánál jelentett nehézséget (M20 és M72), valamint minden olyan mintánál, ahol a diagnosztikai PCR és a vírusizolálás negatív eredményei ellenére, a kórelőzményi adatok, a klinikai tünetek és a szerológiai vizsgálati eredmények mégis valószínűsítették az EAV jelenlétét az adott lóállományban (M34, M151). Ezért 2 esetben az előbbi vizsgálati eredmények figyelmen kívül hagyva, megpróbáltuk a gyengén látható terméket direkt szekvenáltatni, és a kapott nukleotid sorrendet értelmezni. A szekvencia meghatározás eredményei derítettek fényt arra a nem kívánatos jelenségre, hogy míg a diagnosztikai RT-PCR és a vírusizolálás 100%-os specifikusságú próbáknak bizonyultak, addig a filogenetikai vizsgálatok céljára kifejlesztett saját, és az irodalomban leírt módszer egyaránt aspecifikus reakciót is adott. Mind a Stadejek és mtsai (1999) által tervezett és használt, mind az általunk alkalmazott két- és egy lépéses filogenetikai RT-PCR vizsgálat működött ugyan a diagnosztikai RT-PCR-rel és

vírusizolálással felderített EAV pozitív esetek többségében, egyes esetekben azonban nem adott kielégítő eredményt. A nested RT-PCR próbák alacsonyabb specifikussága miatt több egymástól némileg különböző amplifikálási módszert próbáltunk ki, először a referencia tesztként alkalmazott Stajderek és mtsai (1999) által tervezett kétlépes nested RT-PCR-t, melynek sem az érzékenységet, sem a specifikusságát nem találtuk kielégítőnek, ezért igyekeztünk, ugyanarra a genomrészre tervezett, saját RT-PCR-vel javítani ezeket a tesztmutatókat. Amint az a 9. táblázatunkból is kitűnik, a saját fejlesztésű, kétlépes RT-PCR, bár az általunk használt primertervező programokkal lényegesen jobb tulajdonságú primertapadási tulajdonságokkal rendelkezett, mégis sem érzékenységben, sem specifikusságban nem bizonyult jobbnak a referens nested RT-PCR-nél. Két lehetséges irányban változtattunk az amplifikálási módszeren: egyik esetben, nem törődve a specifikussággal, az egylépes RT-PCR kit használatával, 90%-ról 95%-ra növeltük a módszerünk érzékenységét, és ez eredményesnek tűnt a két alacsony vírustartalmú minta RNS-ek a megsokszorozásánál (M20 és M72). A másik esetben az érzékenységet hagytuk figyelmen kívül, és a specifikusságra helyeztük a hangsúlyt: ekkor csak a saját tervezésű belső primerpárokat alkalmazva, 100% specifikusságot sikerült elérni, igaz az érzékenység csökkenésével, ami elsősorban a kétlépes RT-PCR-nél volt szembeszökő (85%). Végül a legjobbnak bizonyuló módszernek az egylépes, csak belső primerpárt használó, saját tervezésű RT-PCR bizonyult, mely egyetlen minta kivételével (M72), valamennyi, vele szemben támasztott igényünknek maximálisan megfelelt. A kivételt képező mintát többször, különböző időpontokban, két különálló sterilfűlkében dolgoztuk fel: RNS tisztítás, első RT-PCR, második RT-PCR, majd két eltérő időpontban, egymástól 3 hónapnyi eltéréssel, szekvenáltattuk azokat a kontaminációból eredő falspozitivitás kiküszöbölése céljából. A két szekvencia meghatározás eredménye mindkét mintánál, egyetlen szinonim nukleotid mutációt leszámítva, megegyezett. A további szekvenáltatott mintáknál, a saját tervezésű, egylépes, csak a belső primerpárt használó RT-PCR-rel amplifikáltuk a mintáink ORF5 genomrészét, biztosítva ezzel a magyarországi EAV törzsek genetikai vizsgálatához használt RT-PCR maximális specifikusságát.

A ló mitokondriális eredetű DNS szekvencia felerősítése nested RT-PCR-rel bizonyította számunkra, hogy a nem kellő körültekintéssel alkalmazott ilyen irányú vizsgálatok sokszor félrevezető módon, nagyjából azonos molekulatömegű terméket adnak, melyeknél a termék azonosítás nélküli elfogadása pozitív eredményként, a diagnosztikában alkalmazva rossz kórjelzéshez vezet. A filogenetikai vizsgálatoknál a teljesen más élőlényből származó NS szekvenciával való azonosság rávilágít ugyan a módszer hibáira, de a ráfordított munkaidő és anyagköltség miatt itt is hátrányt jelent a nested PCR módszerének helytelen használata.

A nested RT-PCR-ek alkalmazása során, egy ízben bizonyítottan keresztkontamináció is történt a minták között, melyre a termék tisztítását és direkt szekvenálását követő szekvencia meghatározás

eredménye mutatott rá. Ez a tény újra felhívta a figyelmünket arra, hogy a nested RT-PCR módszer rendkívüli érzékenysége a próba specifikusságának a rovására megy, ezért a filogenetikai vizsgálatok végzésekor legalább annyira meggondolandó a dupla PCR alkalmazása, mint a diagnosztika terén. Számos szerző publikált közleményeket a PCR termékek kontaminációjáról és a kontamináció elleni védekezési stratégiákról, melyen belül 3 fő irányvonal különíthető el: a gamma és U.V. sugárzással történő dekontamináció, melynek hatékonyságát számos szerző vitatja (Deragon és mtsai, 1990, Dwyer és Saksena, 1992), a kémiai szerek és azok kombinációja U.V. sugárzással, valamint speciális eszközök alkalmazása a PCR folyamán (Belák és Ballagi-Pordány, 1993), és a keresztkontamináció jelenségének felderítése uracil DNS glikozilázzal (Longo és mtsai, 1990). A gyakorlatban azonban egyik módszer megvalósítása sem egyszerű, és egyik módszer sem ígér 100%-os biztonságot a kontaminációval szemben. A nested PCR alkalmazása jelenleg azért sem feltétlenül indokolt, mert a kereskedelmi forgalomban újabban kapható RT-PCR kitek annyira tökéletesen optimalizáltak, mind az alkalmazott enzimek, mind a puffer oldat vonatkozásában, hogy érzékenységük felveszi a versenyt a nested RT-PCR-ével, jobb primerekkel még felül is múlhatja azt.

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.

4.7 A hazai és külföldi vírustörzsek összehasonlító genetikai vizsgálata

4.7.1. Anyag és módszer

Minták

A különböző, diagnosztikai vizsgálatra küldött, EAV vírusgenomot tartalmazó minták közül részben a legjobban dokumentált, részben az egymással szoros járványtani és kóroktani összefüggésben lévő mintákat választottuk ki a genetikai összehasonlító vizsgálatokra. Az összesen 47 EAV pozitív mintából így kiválasztott 20-at részletes genetikai összehasonlító vizsgálatnak vetettük alá, egyrészt egymással, másrészt a génbankban található 20, egy-egy adott vírus genocsoportot legjobban jellemző vírustörzssel.

Számítógépes összehasonlító vizsgálat:

A 19 magyarországi és egy ausztriai törzsből nyert szekvenciákat, melyek az EAV ORF5 régió három variábilis részét (Balasuriya és mtsai, 1997) közrefogó, génszakasz nukleotid sorrendjét tartalmazzák egy 640 bp hosszúságú PCR terméken [11222. nt-11861. nt az X53459 génbanki referencia számú (den Boon és mtsai, 1991), a referens Bucyrus EAV törzs komplett RNS genom] belül helyezkedő 518 bp hosszúságú szakaszra (11296. nt-11813. nt) rövidítettünk le. Ezeket a saját EAV szekvenciákat összehasonlítottuk a génbankban található, fontosabb EAV szekvenciákkal, melyhez a FASTA és BLAST (Pasteur Institute), a BLAST (NCBI) a BioEdit 4.7.8 és az Align Plus 4 for Windows 95, version 4.0 (Scientific and Educational Software) számítógépes programokat használtuk.

A számítógépes eredményeket a szekvencia-hullámok egyedi ellenőrzésével hitelesítettük. Az ezt követő többszörös szekvenciaillesztéshez a BioEdit 4.7.8 és a Clustal W 5.a szoftver számítógépes programokat alkalmaztuk. Ezután a kapott nukleotid sorrendből meghatároztuk az adott EAV törzs feltételezhető, részleges GP₅ fehérje aminosav sorrendjét, és az így kapott nem értelmezhető aminosav kodonoknál ismét a szekvencia-hullámok megvizsgálásával és kijavításával tettük egyértelművé a szekvenciáinkat.

A filogenetikai fa létrehozásakor a szekvenciapárok közötti távolságot először a DNADIST számítógépes program (Felsenstein 1993), Kimura 2 paraméteres model, 2-es arányú transitio/transversio (Kimura 1980) segítségével határoztuk meg. A DNADIST programmal létrehozott távolsági matrixból (distance matrix) a FITCH programmal készítettünk törzsfát (Fitch és Margoliash, 1967). Később a teljes szekvencia gyűjtemény összehasonlítását a Clustal W 5.a számítógépes programmal, a IUB DNS súly matrix 0.5 transitio arányt alkalmazva végeztük el.

A Bootstrap mintázást és elemzés (Felsenstein, 1985) eredményeit 1000 megismételt törzsfá rekonstrukció létrehozását követő adathalmaz összevetését végrehajtó számítógépes program: Clustal x version 1.81. msw alkalmazásával kaptuk meg. A kapott törzsfák mintázatának

megbízhatóságát ezzel a számítási módszerrel ellenőriztük. A filogenetikai törzsfák megjelenítéséhez és szerkesztéséhez a TreeView version 1.6.6 számítógép programot használtuk.

A vizsgált 20 amplifikált ORF 5 régiórészlet génbanki referencia számai (National Center for Biotechnology Information, NCBI): AY359193-AY359212.

4.7.2. Eredmények

Nukleinsav vizsgálatok

Egyik általunk vizsgált törzsnél sem tapasztaltunk deléció, inzerciót vagy inverziót tartalmazó mutációs eltérést az adott GP₅ génen, viszont számos pontmutációt állapítottunk meg, melyek egy része nem szinonim mutációt eredményezett, vagyis a nukleotid sorrend megváltozása maga után vonta az aminosav sorrend megváltozását is. Mind a 20 EAV törzs mutatott nukleotid változásokat az EAV GP₅ gén 183.-363., 423.-534. és 606.-666. nt között helyezkedő 1., 2. és 3. variábilis régióján (Balasuriya és mtsai, 1997), melyet a 12. ábrán mutatunk be.

11326 nt–11508 nt (183 nt–363 nt az ORF 5 régió)

```
V1 nt          1  aaaacctggt ggtattgcac attcctggac gaacagatta
                41  tcacgtttgg aaccgattgt gatgacacct acgcgggtccc
                81  agttgctgag gtcctggaac aggcgcatgg accgtacagt
                121 gcgctgtttg atgacatgcc cccttttatt tactatggcc
                161  gtgaattcgg catagttgtg ttg
```

as 61–121 V1 régió

```
V1 as          1  ktcwcyctfld eqiitfgtde ddtvavpvae vlegahgpys
                41  alfddmppfi yygrefgivr l
```

11566nt–11679nt (423nt–534nt az ORF 5 régió)

```
V2 nt          1  gctacgctta ttcttgaaat gtgtgtatct attctgttta
                41  taatctatgg catttacagc ggggcoact tggccatggg
                81  catatctgag gccacgcttg ctatacatc aatt
```

as 141–178 V2 régió

```
V2 as          1  atlilemcvs ilfiygiys gaylamgifa atlaihsi
```

11752nt–11814nt (606nt–666nt az ORF 5 régió)

```
V3 nt          1  tcagctgagg ggaaagtgta ccccgtagac cccggactcc
                41  cggttgccgc cgtgggcaat cgg
```

as 202–222 V3 régió

```
V3 as          1  saegkvypvd pglpvaavgn r
```

12. ábra: Az EAV törzs hipervariábilis régiója Balasuriya és mtsai (1997) után, az X53459 referencia számú genom alapján (DenBoon és mtsai 1991)

Ezek a pontmutációk jellemzőek voltak az EA vírustörzsekből korábban más szerzők által készített filogenetikai törzsfák (Belák és mtsai, 1999, Stadejek és mtsai, 1999, Hedges és mtsai, 1999) genomklasztereinek nukleotid változásaira. A külföldi törzseket Stadejek és mtsai 1.

táblázatából (1999) választottam ki. A 11. táblázatban foglalom össze a genetikai összehasonlító vizsgálatainkban résztvevő magyar és külföldi EAV törzsek legfontosabb adatait. Az összehasonlított EAV törzsek többszörös illesztés vizsgálatát nukleotid szinten a 13. ábra foglalja össze.

11. táblázat: A genetikai összehasonlító vizsgálatban szereplő magyar és külföldi EAV törzsek legfontosabb adatai Stadjek és mtsai (1999) adatainak felhasználásával

rövidítés	törzs	akcessziós szám	ország	mintagyűjtés éve
Buc53	Bucyrus	X53459	USA	1953
Bibuna64	Bibuna	U38609	Svájc	1964
Sweden1	S-2506	AF099842	Svédország	1989
A197	A197	AF359201	Magyarország	2002
Vienna64	Vienna	AF099811	Ausztria	1964
A269	A269	AF359207	Magyarország	2003
Ita90	1192VE4/91	AF099823	Olaszország	1990
Ita92	ITA92	U38598	Olaszország	1992
Ita94	135VE2/95	AF099824	Olaszország	1994
Ita95	470VE1/95	AF099825	Olaszország	1995
PI78	Wroclaw-2	AF099838	Lengyelország	1978
PI88	S-436	AF099839	Lengyelország	1988
USA84	KY84	U38601	USA	1984
USA63	KY63	U38599	USA	1963
A204	A204	AF359202	Magyarország	1994
A213	A213	AF359203	Magyarország	1999
A189	A189	AY359200	Magyarország	2002
A215	A215	AF359204	Magyarország	2000
M72	M72	AF359210	Magyarország	1998
USA89	S-551	AF099847	USA	1989
D95	A755	AF099818	Németország	1995
D96	D526	AF099822	Németország	1996
F86	EAV86P	AF099815	Franciaország	1986
AF118770		AF118770	USA	1996
A16	A16	AY359195	Magyarország	2001
A19	A19	AY359196	Magyarország	2001
A170	A170	AF359198	Magyarország	1997
AF065824		AF065824	USA	1997
M19	M19	AF359208	Magyarország	2000
M20	M20	AF359209	Magyarország	2000
M73	M73	AF359211	Magyarország	2000
A1	A1	AY359193	Magyarország	2001
PI94	5499/94	AF099840	Lengyelország	1994
N90	NEAV-3	AF099837	Norvégia	1990
A13	A13	AY359194	Magyarország	2001
A216	A216	AF359205	Magyarország	2000
A253	A253	AF359206	Magyarország	2003
A147	A147	AY359197	Magyarország	2002
A172	A172	AY359199	Magyarország	2002
A294	A294	AY359212	Ausztria	2003

13. ábra: EAV törzsek többszörös illesztéses vizsgálata nukleotid szinten

Buc53 151 cacactgctttgtacaattgttccgccagtaaaacctgttggtattgcacattcctggacgaacagattatcacgtttg
A172 151t.c.....t.....c.....t.....c.....g.....
A170 151a.....t.....g.....t.....a.....a.....c.....c.....
USA84 151a.....t.....c.....t.....t.....a.....t.....c.....
USA89 151a.....t.....tt.....t.....a.....t.....t.....
Bibuna64 151g.c.....t.....c.....t.....t.....a.....
Sweden89 151c.....t.....c.....t.....c.....c.....t.....t.....t.....c.....
P178 151a.gc.....c.....c.....g.tt.....c.....
Ita90 151a.gc.....c.....gc.....tt.t.....
Ita94 151a.gc.....c.c.....c.....c.....c.t...a.t.c.c.c.....
A13 151 ..t....cc.....c.....t...ctgga...c.....gag...t.a.t.....c.....a.....
N90 151cc.....c.....t...c.gga...c.....g...t.....g.....a.....
D95 151 ..t....cc.....c.....t...cg.ga...c.....tgtg.tt.....g....c.....a.....
Ita95 151 ..t.a.cc.....c.t.....ccc.at.c.....g...t.a.t.....g.c.t.a.c.....
D96 151 ..t....c.....c.....t...gct.t.c.....g...t.....ag.c.....a.....
A189 151a.c.....t.c.c.....cc.c.....c.....t...a.g.....a.....a.....
USA63 151 ..t....cc.a.t.c.c.t...c.....t.c.....c.....g.t.....t.....a.c.....
A294 151a.....c.....c.cc.at.c.....c.....t.....t.....a.....a.....
A204 151 ..t.a.cc.....c.....c.ct...c.....c.....g...a...a.....t.a.....
A213 151 ..t.a.cc.....c.....c.....c.....c.....g...a...a.....t.a.....
A215 151a.....t.....ctcc...c.....g.....g.....a.....
M72 151c.....c.t.....ctcc...c.....g.....c.....a.....
A197 151c.....c.....cc.....tgag...a...t.....c.....c.....
A147 151c.....c.c.....c.....g...t.....g...g.c.....a.....
F86 151 ..t....cc.t...c.....cctc...c.....tgag...t.a.....c...t.a.....
Vienna64 151 ..t.c.cc.....c.c.....t.gct...c.....g...t.....g.....
P188 151 ..t.c.cc.....t.....c.....c.....c.....g...t.....g.....
AF065824 151c.cc.....t.....c.....c.....c.....g...t.....g.....
P194 151c.cc.....c.....c.c.....at.....g...t.....g.....a.....
Ita92 151c.cc.....c.....c.c.....c.....g...t.....g.....a.....
A19 151cc.....c.....t.c.....t.c.....gag...t.....g.c.....a.....
AF118770 151cc.....c.....c.....c.....gtg...t.....c.....a.....
A16 151cc.....c.....t.c.....c.....gag...t.....c.....a.....
A216 151cc.....c.....c.....c.....gtg...t...t...g.c.....a.....
A253 151cc.....c.....cg...t.c.....gtg...t...a...g.c.....a.....
A269 151c.cc...t.....c.....cgcc...c.....tt.....c.t.....
M73 151c.cc...t.....c.....ct.a...c.....g.....a.c.....
M19 151c.cc...t.....c.....ct.a...c.....g.....a.c.....
M20 151c.cc...t.....c.....c.ct.a...c.....g.....a.c.....
A1 151c.cc...t.....c.....c.ct.a...c.....g.....c.a.c.....

Buc53 231 aaccgattgtgatgacacctaaccggtcccagttgctgaggtcctggaacagggccatgacagtgccgtgtttc
A172 231 ...cg...ca.a...cg.t...t...t...t...a.....t.....
A170 231 ...a...a.a...c.t...g...c.t...t.....c.....t.....
USA84 231 ...a...a.a...t.....t.....tt.....t.....
USA89 231 ...a...a.a...c.t...t...t.....r.....t.....
Bibuna64 231 ..t.g...a...t.t.t.....t...t.....g.....t.....a
Sweden89 231 g...g...a.a.t.c.....t...t.....g.....g.....c...t...a...
P178 231ca...t...tt.....t...t.....g.....g.....ca.....
Ita90 231 g...g...ca.a.t...agg...g...t...ta...a.g.....c.g.a...a...
Ita94 231 g.t...ca.a.t.tattt...t...t...ta...a.g.....g.a.t...a...
A13 231 g.ta.c.ca.....gta.....t...t...t...g.a.a...g.a.t.c.t.....
N90 231 g..a.c.ca.....att.....t...t...g.a.a...g.a.t.c.t.t.....
D95 231 g.t...ca.....att.....t.a.t...g.a.a...g.a.t.c.t.t.....
Ita95 231 g.t.g...a.....at.t...g...t...t...g.a.a...g.....
D96 231 g.t.g...ca.a.....tt.....gt...t...t...g.a.c...g.....c.t.....
A189 231gc.c.aa.g.taca.g...t.c...t.a.t...t.a.g.a...g...t...a...
USA63 231 g...g...c.....t...tt.t...ta...g.....c.g...t...t...
A294 231 g.a.g...ca.....t...t.ct.caca.....g.a...c.g.g.a...t...
A204 231 g.....a.ca...c.t...t...t.a.t...a.....c.g.....a...
A213 231 g.....a.ca...c.t.t...t...t.a.t...a.....c.g.....a...
A215 231 g.t.gc.ca.....ac.tt.a...t.ct.g.t...a.....c.t.....a...
M72 231 g.t.gc.ca.....a.tt.a...t.ct.g.t...a.....c.t...a...
A197 231 ..ta.c.ca.a...tt.c...t.c.t...t...g.a...g.....a...
A147 231 g.t.g...ca.a...c.t.a...t...t...tt...a.....g.....a...c...
F86 231 g.t...ca.a...c.t...t...t...tt...g.....g...t...cata.a...
Vienna64 231 g.t.g...ca.....c.tt.a...t...t...tt...g.....g.....a...
P188 231 g.t.gc.ca.....t.a...t.c.t...tt...g...a...g.....a...
AF065824 231 g.t.gc.ca.....t.a...t.c.t...tt...g...a...g.....a...
P194 231 g.t.gc.....t.a...t.c.t...tt...g...a...g.....a...
Ita92 231 g.t.cc...a.c...t.a...t.cac...tt...g...a...g.....a...
A19 231 g.t.gc...a.a...t.t...t.caca...tt...g...t...g.....t...
AF118770 231 g.t.gc...a...t.t...t.caca...tt...g...t...g.....t...
A16 231 g.t.gc...a...c...t...t.caca...tt...g...t...g.....t...
A216 231 g.t.gc...a...t.t...t.caca...tt...g...t...g.....t...
A253 231 g.t.gc.ga...c...c.t.t...g...t.caca...tt...g...t...g.....
A269 231 g.t.g...a...t.t...t...t...g.a.a...g.....a...
M73 231 g.t.g...a...t...ct...t...t...g.a...g.....t...
M19 231 g.t.g...a...t...ct...t...t...g.a...g.....t...
M20 231 g.t.g...a...t...ct...t...t...g.a...g.....t...
A1 231 g.t.g...a...t...ct...t...t...g.a...g.....t...

Buc53 311 atgacatgcccccttttattttactatggccgtgaattcggcatagtttggttg gatgtggtttatgttctatcccgtttta
A172 311g.....a.....t.....t.....t.....t.....t.....t.....
A170 311 g.....c.c.c.t.....c.....t.t.t.a.....t.....t.....
USA84 311c.c.t.....t.....t.a.....t.....c.....
USA89 311c.....t.....t.a.....t.....c.t.....
Bibuna64 311g.....t.....a.....t.....t.....
Sweden89 311c.....a.....tt...aa.....c.....t.....t.....
P178 311 g.....c.....t.....ta.....t.....t.....ac.g
Ita90 311c.....t.....t.....ta.....t.....t.....c..
Ita94 311c.....t.....t.....ta.....t.....t.....ac..
A13 311c.....t.....g.....g.tt...ca.....t.....a.....g
N90 311c.....t.....g.t.t.t.ct...ta.....t.....a.....
D95 311c.c.t.....g.....tt...ta.....t.....a.....
Ita95 311a.....t.....g.t.t.t.a.....t.....a.....
D96 311t.a.....t.....g.....t.t.ta.....t.....a.....
A189 311c.....t.....tt...a.....t.....a.....
USA63 311 .g.....c.t.....tt...a.....g.....
A294 311c.c.t.....a.....tt...a.....t.....a.c.t
A204 311t.....g.t.t.tt...a.....c.....a.c..
A213 311t.....g.t.t.tt...a.....c.....a.c..
A215 311cg.t.t.tt...a.....c.....t.....a.....
M72 311g.t.t.tt...a.....c.....t.....a.....
A197 311a.....t.....t.t.t.a.....t.....t.....g..
A147 311t.....t.t.t.a.....t.....t.....
F86 311c.....t.....c.t.agc.a.....t.....t.....
Vienna64 311g.t.....t.....aa.....t.....t.....
P188 311g.t.....t.....a.....a.....t.....t.....
AF065824 311g.t.....t.....a.....a.....t.....t.....
P194 311g.t.....t.....a.....t.....t.....
Ita92 311g.t.t.t.t.a.....t.....t.....
A19 311c.....t.....g.t.....t.....a.....t.....a.....
AF118770 311c.....t.....g.t.....t.....a.....t.....a.....
A16 311c.....t.....g.t.....t.....a.....t.....a.....
A216 311c.....t.....g.t.t.t.a.....t.....a.....
A253 311c.....t.....g.t.t.t.a.....t.....a.....
A269 311a.t.....tt...a.....t.....t.....
M73 311c.g.t.....tt...a.....t.....t.....
M19 311c.g.t.....tt...a.....t.....t.....
M20 311c.g.t.....tt...a.....t.....t.....
A1 311c.g.t.....tt...a.....t.....t.....

Buc53 391 gttctgtttttcttatcagtactacccatgctaogcttattcttgaaatgtgtgatctattctgtttataatctatgg
A172 391 ..t.a.....t.a.....a.....t.....t.....t.....
A170 391 ..a.....t.....t.....at.....ct.....g.t.....cg.....
USA84 391 ..a.....t.....t.....at.....ct.....t.....g.....
USA89 391 ..a.....t.....t.....at.....ct.....t.....g.....
Bibuna64 391 ..t.....t.....t.....t.....t.....t.....g.....
Sweden89 391 ..t.....tt...t.....t.....t.....c.....
P178 391 ..ct.....g.t.t.g.....a.....g.a.....t.....t.....c.....
Ita90 391 ..t.....g.t.g.t.g.....c.....a.....g.....t.....ct.c.....
Ita94 391 ..t.....g.t.g.t.g.....c.....a.....g.....t.....c.....c.....
A13 391 ..t.a.....g.t.tt...t.....a.....g.t.....t.....
N90 391 ..t.a.....g.t.tt...t.....a.....g.t.....g.t.....
D95 391 ..t.a.....g.t.s.t.....a.g.....g.t.....g.t.....
Ita95 391 ..t.....g.t.t.t.....t.....a.....g.....g.ct...g.t.....
D96 391 ..t.....g.t.t.t.....t.....a.....g.....g.t.c.t.....
A189 391 ..ct.....g.....gt.g.g.....a.a.....a.....g.g.t.....
USA63 391 ..t.....g.....gt.....a.....a.....g.....t.....g.t.....
A294 391 ..t.a.....g.....g.t.....a.....t.a.g.....t.....ct...g.tg.....
A204 391 ..t.....g.g.t.....g.....a.g.a.....g.....t.....t.....
A213 391 ..t.....g.g.t.....g.....a.g.a.....g.....g.....t.....t.....
A215 391 ..t.....tc.g.t.t.....a.....t.g.a.....g.....ct.....cg.....
M72 391 ..t.....c.g.t.....t.....a.....t.g.a.....g.....ct.....cg.....
A197 391 ..gt.a.....g.....gt.g.t.a.....a.g.t.g.....t.....t.g.g.t.....
A147 391 ..t.....c.g.g.t.g.t.....a.....t.....g.....g.....g.gg.....
F86 391 ..ct.....g.....t.g.t.....a.....a.....g.....g.....ct...g.gg.....
Vienna64 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.a.....g.....gg.....t.....g.gg.....
P188 391 ..t.....g.....t.g.t.....t.a.c.....g.....g.....t.....g.tg.t.....
AF065824 391 ..t.....g.g.t.g.t.....t.a.c.....g.....g.....t.....g.tg.t.....
P194 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.gg.....
Ita92 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.tg.....
A19 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.....g.....g.....t.....g.gg.....
AF118770 391 ..t.....g.....t.g.t.....c.a.....g.....g.....t.....g.gg.....
A16 391 ..t.....g.....gt.g.t.....c.a.....g.....g.....t.....g.gg.....
A216 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.....g.....g.....t.....g.gg.....
A253 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.....g.....g.....t.....g.gg.....
A269 391 ..t.a.....g.....tt.g.t.....a.....c.....g.....g.....c.t.....g.gg.....
M73 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.g.t.....
M19 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.g.t.....
M20 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.g.t.....
A1 391 ..t.....g.....t.g.t.....a.c.....g.....g.....t.....g.g.t.....

Buc53 471 catttacagcggggcctacttggccatgggcatatttgcggccacgcttgctatacattcaattgtggtcctccgccaat
 A172 471t.....t.....t.....t.g.....t.....
 A170 471t.....t.....c.t.g.....g.....t.....
 USA84 471t.....t.....c.t.....g.....t.....
 USA89 471t.....t.....g.....c.t.....t.....
 Bibuna64 471 tc...t.t.a...t.a.a.....a...atc.....c.c.....
 Sweden89 471 t.....t.....t.a.....t.....tc.....t.....g.
 P178 471t.a.....tc.a.t.....a...a...tc.t...t.....
 Ita90 471t.a.....t.....a.t.....t.....c.c.....
 Ita94 471 t.....t.a.....a.t.....t.....tc.....t.....
 A13 471t.t.a...t.....t.....a...a...atc.....c.c.....t...g.
 N90 471t.a...t.....t.a.t.....a...a...at.....c.c.....t...g.
 D95 471 .g.....t.a...t.....t.....a...a...atc.....c.....t...g.
 Ita95 471a.t.t.a.....t.....a...a...tc.....c.t.....g.
 D96 471t.t.....a.t.....t.....at.a.tc.....c.c.cc.....gc
 A189 471t.t.a.....t.....tg.g.....at.g.....c.c.....c
 USA63 471t.....a.t.....g.g.....a.....at.g.....tg.c.....
 A294 471t.t.a.....t.....tg.g.....t.g.....tg.c.....
 A204 471t.a.....t.....g.t.....a.....cat.g.....tg.....
 A213 471 ..c...t.a...t...t...g.t.c.a.....cat.g...c.tg.....
 A215 471t.t.a...t...t...tg.g...a.....at.....tg.c.....
 M72 471t.t.a...c...t...tg.g...a.....at.....tg.c.....
 A197 471t.t.a.t.t.a.t...a.t...a.....atc.....c.....t.....
 A147 471 .c...t.t.a...t.a...g...c.....t.g.....g.c.....t...g.
 F86 471 .c...t.t.a.t.tc...tt.a.a...a...t...t...c.....g.
 Vienna64 471 .c...t.t.a.t...a.t.a.a...a...c.t.g.....t.g.
 P188 471 .c...t.a.t.t.a.t...a.t...a...t.g.....g.....
 AF065824 471 .c...t.a.t.t.a.t...a.t...a...t.g.....g.....
 P194 471 .c...t.a.t.tc.a...a...a...c.t.g.....g.....
 Ita92 471 .c...t.a.t.t.a...a...a...a.c.t.g.....g.....
 A19 471 .c...t.a.t.t.a...a...a...c.t.g.....g.....
 AF118770 471 .c...t.a.t.t.a...a...a...c.t.g.....g.....
 A16 471 .c...t.a.t.t.a...a...a...t.g.....g.....
 A216 471 .c...t.a.t.tc.a...a...aa...c.t.g...tg...
 A253 471 .c...t.a.t.tc.a...a...aa...t.g.g...gg...t.....
 A269 471 .c...t.a.t.tc.a...a...c.a...g.g...g.c.....g.
 M73 471 .c...t.a.t.t.a.t...a...a...c.t.g...g.c.....gc
 M19 471 .c...t.a.t.t.a.t...a...a...c.t.g...g.c.....gc
 M20 471 .c...t.a.t.t.a.t...a...a...c.t.g...g.c.....gc
 A1 471 .c...t.a.t.t.a.t...a...a...c.t.g...g.c.....gc

Buc53 551 tactgtggttatgcttggcttggcgataccgctgtacgcttcacgcgtcccttatatcagctgaggggaaagtgtaccoc
 A172 551 .g.....c.g.....c.....c.....t.....t.c.....
 A170 551 .g.....c.g...t.....c.....t.....t.....a...g...t...
 USA84 551 .g.....c.g...t.....c.....c.t.....a.....t...
 USA89 551 .g.....c.g...t.....c.....c.t.....a.....t...
 Bibuna64 551 .g.....c.g...a.....c.t.t.c.....c.....a...
 Sweden89 551 .gt....c.g.....g.t.....c.....c.....a...
 P178 551 .g.a...c.....g.t.....c.....c.....c.....
 Ita90 551 .g.a...c.....g.t.....c.....c.....c.....
 Ita94 551 .g.a...c.....g.t.....c.....c.....c.....
 A13 551 .gt.a...c.g.....t.t.t.....c.....a.....a.t...
 N90 551 .gt.a...c.g.....t.t.t.....c.....a.....t...
 D95 551 .gt....c.g.....t.t.t.....c.....a.....t...
 Ita95 551 .gt....c.g...t...c...t.t.t.c...a.....a.....t...
 D96 551 .gt....c.g...t...c...g.t...c...c...a.....a.....t...
 A189 551 .g.....c.g.tt.a...g.....c.a.c...t...g.....a...t...
 USA63 551 .gt.a...c.g.....a...g.....c.....t.....a.c.....
 A294 551c.g.....c.....g.t.....c.....t.t.....a.cg.....
 A204 551 .g.....c.g.t...a...g.....c.....c.t.t.....
 A213 551 .g.....c.g.t...a...g.....c.....t.t.t.....
 A215 551 .g.....c.....a...g...t.c...c...t...a.....
 M72 551 .g.....c.....a...g...t.c...c...t...a.....
 A197 551 .g.t...c.g...a...a...g...t.c...c...t.cg.....t...
 A147 551 .g.....t.....g.....g.....c.....c.....t...t...
 F86 551 .g.....a...g.t.....c.....c...a.....g.a.t...t...
 Vienna64 551 .g.....g.....g.t.....c.....c...t.t...g.t...a...t...
 P188 551 .g.....c.....g.c...c.....c.....a.t...
 AF065824 551 .g.....g.....c.g.t...c...c.....a.t.c...
 P194 551 .g.....g.....c.g.t...c...c.....a.t...
 Ita92 551 .g.....g.....c.....t.....c.....c.....a.t...
 A19 551 .g.....g.....c.....g.t...c...c.....a.t...
 AF118770 551 .g.....g.....c.....g.t...c...c.....a.t...
 A16 551 .g.....g.....c.....g.t...c...c.....a.t...
 A216 551 .g.....g.....c.....g.t...c...c.....a.t...
 A253 551 .g.....g.....c.....g.t...c...c.....act.....
 A269 551 .g.....g.....g.t.....c.....c.....g.t...
 M73 551 .gt.....t.a...g.t...c...a...c...c...g.t.t...
 M19 551 .gt.....t.a...g.t...c...c...c...g.t.t...
 M20 551 .gt.....t.a...g.t...c...c...c...g.t.t...
 A1 551 .gt.....t.a...g.t...c...c...c...g.t.t...

Buc53	631	gtagacccccggactccccggttgccgcctgggcaatcg
A172	631t.....
A170	631a.....t.....t.....
USA84	631a.....
USA89	631a.....
Bibuna64	631aa.....c.....g...
Sweden89	631	..ta...t...t.....atc.....
P178	631	..t.....t.ca.....
Ita90	631	..t.....t.ca.....
Ita94	631	..t.....t.ca.....
A13	631a.....ttct.....c..
N90	631a.....ttct...ca.t
D95	631a.....ttct.....c..
Ita95	631a.....t.....
D96	631t...a.....t.c.t.....
A189	631	..ga.....a.....t.....c..
USA63	631	..g.....a.....aca.....c..
A294	631a.....ta.t.c.....c..
A204	631	..g.....t.....taca.....c..
A213	631	..g.....t.....taca.....c..
A215	631	..g....t...t...a.....agc.....
M72	631	..g....t...t...a.....a.c.....
A197	631a.....t.c.....c..
A147	631aa.....t.c.....
F86	631t...aa.....tt.ca.....
Vienna64	631aa.....cc.....c..
P188	631aa...t.tt.cc.....
AF065824	631aa...t.tt.cc.....
P194	631aa.....t.cc.....
Ita92	631aa.....cc.....
A19	631aa.....t.ct.....
AF118770	631aa.....t.ct.....
A16	631aa.....t.cc.....
A216	631	..a.....aa.....t.ct.....
A253	631	..a.....aa.....t.ct.....
A269	631ca.....cc.....
M73	631aa.....t.cc.....
M19	631aa.....t.cc.....
M20	631aa.....t.cc.....
A1	631aa.....t.cc.....

Jelmagyarázat: sötétzöld nukleotidok: 183. nt-252. nt-Hedges és mtsai (1999) változékony régiója, sötétzöld és zöld nukleotidok: 183. nt-363. nt-Balasuriya és mtsai (1997) 1. variábilis régiója, sárga nukleotidok: 423. nt-534. nt-Balasuriya és mtsai (1997) 2. variábilis régiója, kék nukleotidok: 606. nt-666. nt-Balasuriya és mtsai (1997) 3. variábilis régiója a GP₅ génen belül az X53459 referenciaszámú Bucyrus (denBoon és mtsai, 1991) EAV genomon. Ugyanitt az aláhúzott tripletek, a könnyebb áttekinthetőség érdekében egy-egy aminosavat jelentenek a megfelelő nyitott leolvasási keretben. A szürke háttérű EAV törzsek szekvenciáit más szerzők publikálták.

Az egymást követően vett ondóminták EAV genetikai összehasonlító vizsgálata

Összesen 4, több éven át EAV-ürítő mént találtunk 10 évre kiterjedő vizsgálataink során, ezek közül 2 méntől származó 2-2 ondóminta részleges GP₅ gén összehasonlítását végeztük el. Az egyik ondó pár 5 éves időintervallumot (1994-1999 A204 és A213 minták), a másik 3 évet fogott át (2000-2003 A216 és A253 minták). A 2 pár ondóminta különböző arányú nukleotid változást mutatott mind a V1, mind az összes V1, V2, V3 GP₅ régión. A V1 szakasz vizsgálati eredményére alapozott genetikai távolság az A204 és az A213 minta között 0,83%/év, volt, míg ugyanez a távolság mindhárom régió (V1, V2 és V3) szakaszára vonatkozóan 0,66%-ra csökkent. Az A216 és az A253 mintáknál ezek az értékek lényegesen nagyobbak voltak: V1: 6,94%/év, V1, V2, V3: 2,73%/év.

Fehérje vizsgálatok

A kapott nukleotid sorrendekből meghatározott, feltételezhető GP₅ fehérje aminosav sorrendeket szintén összehasonlítottuk a referens Bucyrus vírus, valamint a többi általunk vizsgált vírus aminosav sorrendjével. A három változékony régió és a köztes szakaszok aminosav változásait a 14. ábra mutatja be

14. ábra: EAV törzsek nukleotid sorrendjeiből származtatott aminosav szekvenciák többszörös illesztéses vizsgálata

Buc53	51	HTALYNCSAS	KTCWCYCTFLDEQIITFGTDCDDTYAVPVAEVL	EQAHG	PYSALFDDMP	PFIIYGREFGIVL	DVF	MFYPVL
Bibuna64	51K.....G.N...S...SV.....V..N.V.....	F.M.....
Sweden1	51D.L.....G.NN.H...SV.....RV.....	F.M.....
A197	51T.....E.M.....N.NN.S...SV.....T.....	F.M.....
Vienna64	51A.....G.N..HS...SV.....T.....	F.M.....
A269	51A.....G.N...S...SV.....T.....	F.M.....
Ita90	51S.....I.....G.NN.R...SV.....T.....	F.M.....
Ita92	51N.....A.N...S...ST.....T.....	F.M.....
Ita94	51ND.L.....NN.IS...SV.....T.....	F.M.....
Ita95	51PN.....V.....G.N..IS...SV.....T.....	F.M.....
P178	51N.....N.FS...SV.....T.G.....	F.M.....
P188	51G.N...S...SV.....T.....	F.M.....
USA84	51Q.....N.N...V.....V.....	L.....
USA63	51G...S.FSV.....V.G.....	F.M.....
A204	51T.....ME.....NN.H...SV.....T.....	F.M.....
A213	51ME.....NN.HS...SV.....T.....	F.M.....
A189	51H.....E.....G.ENATG...SV.....T.....	F.M.....
A215	51S.....G.N..HS...SV.....T.....A.....	F.M.....
M72	51S.....G.N...S...SV.....T.....	F.M.....
USA89	51L.....D.....N.NN.H...V.....R.V.....	L.....
D95	51RD...V.....N.I...SV.....V.....	F.M.....
D96	51A.....V.....G.NN.S...SV.....V.....	F.M.....
F86	51L.....E.N.L.....NN.H...S.....I.....A.AI.M.....	F.M.....
AF118770	51V.....G.N...S...ST.....V.....	F.M.....
A16	51E.....G.N..H...ST.....V.....	F.M.....
A19	51E.....E.V.....G.NN.S...ST.....V.....	F.M.....
A170	51E.....E.....N.NN.H...V.....V.G.....	L.....
AF065824	51N.....G.N...S...SV.....T.....	F.M.....
M19	51TN.....G.N...S...SV.....V.....V.....	F.M.....
M20	51TN.....G.N...S...SV.....V.....V.....	F.M.....
M73	51TN.....G.N...S...SV.....V.....V.....	F.M.....
A1	51TN.....D.....G.N...S...SV.....V.....V.....	F.M.....
P194	51N.Y.....G...S...SV.....T.....	F.M.....
N90	51QD.....N.N.I...SV.....V.....	F.M.....
A13	51DLD...E.N...N.N.V...SV.....V.....	VF.M.....
A216	51V.....V.....G.N...S...ST.....V.....	F.M.....
A253	51E.....V.E.V.....GWNA.HS...ST.....V.....	F.M.....
A147	51N.....V.....G.NN.HS...SV.....T.....	F.M.....
A172	51N.....D.V.....R.NN.RS...SV.....V.....	F.M.....
A294	51TN.....G.N...S...ST.....V.....	F.M.....

Buc53	131	VLFFLSVLPY	ATLILEMCV	SILFIIYGIY	SGAYLAMGIFAATLAIHS	VVLRQLLWLCLAWRYRCTLHAS	FISAEGKVYP
Bibuna64	131V.....L.....I.....
Sweden1	131V.....
A197	131T.V.I...V.V.....T.I.....S.....V.....
Vienna64	131A...VV.L...I...T.VV.....V.....
A269	131T.VV.L.....T.V.V.....
Ita90	131V.....
Ita92	131VV.L.....T.VV.V.....I.....
Ita94	131V.....
Ita95	131V.V.....T.V.....
P178	131I.....T.V.....
P188	131V.....VV.L.....T.VV.V.....F.....I.....
USA84	131F.L...V.....V.V.....
USA63	131V.....V.T.IV.V.....Q.....
A204	131VI.....V.T.IV.V.....
A213	131VI.....V.T.IV.V.....
A189	131I...V.....V.....I.S.V.....
A215	131VI.....V.....V.T.I.V.....
M72	131VI.....V.....V.T.I.V.....
USA89	131F.L...V.....V.V.....
D95	131I...V...V.V.V.....T.I.....D.....
D96	131V.....V.T.....
F86	131VV.L...L...T.FV.....F.....
AF118770	131VV.L.....T.VV.V.....I.....
A16	131VV.L.....T.VV.V.....I.....
A19	131VV.L.....T.VV.V.....I.....
A170	131F.L.V...V.....VV.V.....I.....
AF065824	131V.....VV.L.....T.VV.V.....I.H.....
M19	131VV.L.....T.VV.V.....
M20	131VV.L.....T.VV.V.....
M73	131VV.L.....T.VV.V.....
A1	131VV.L.....T.VV.V.....
P194	131VV.L.....T.VV.V.....M.....I.....
N90	131V.V.L.....T.I.....
A13	131V.....T.I.....
A216	131VV.L.....T.VV.LV.....I.....
A253	131VV.L.....T.VV.V.....T.....
A147	131T.F...VV.L.....VV.V.....
A172	131V.....V.....I.....
A294	131VV...V.....VV.V.....R.....

Buc53	211	VDPGLPVAAVGN
Bibuna64	211I..A.S
Sweden1	211	.N.....S..
A197	211I..A..
Vienna64	211I..A..
A269	211I..A..
Ita90	211A..
Ita92	211I..A..
Ita94	211A..
Ita95	211I.....
P178	211A..
P188	211I..VA..
USA84	211I.....
USA63	211I..T..
A204	211T..
A213	211T..
A189	211	.N...I.....
A215	211I..S..
M72	211I..I..
USA89	211I.....
D95	211I..S..
D96	211I..AC.
F86	211I..VA..
AF118770	211I..A..
A16	211I..A..
A19	211I..A..
A170	211I.....
AF065824	211I..VA..
M19	211I..A..
M20	211I..A..
M73	211I..A..
A1	211I..A..
P194	211I..A..
N90	211I..S.T
A13	211I..S..
A216	211	.N...I..A..
A253	211	.N...I..A..
A147	211I..A..
A172	211
A294	211I..TA..

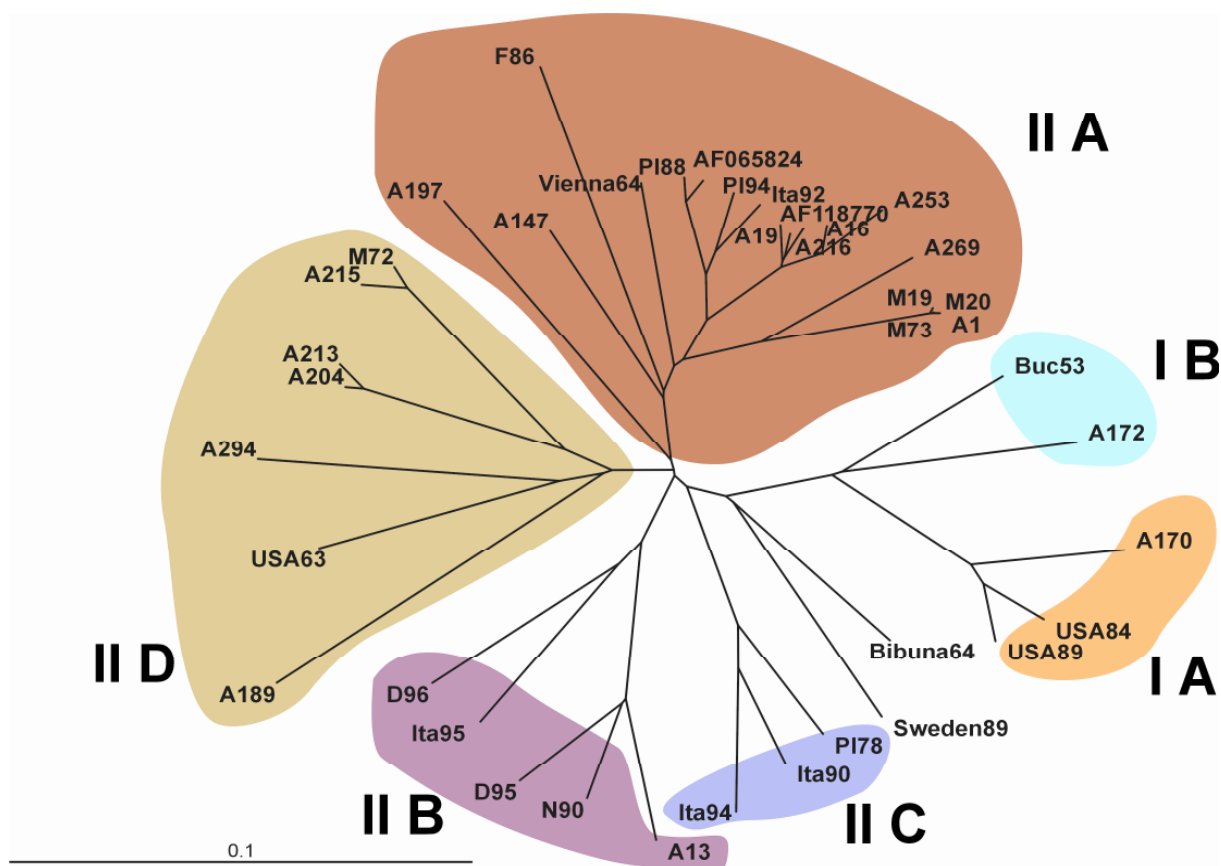
Jelmagyarázat: sötétzöld aminosavak: 61. as-84. as-Hedges és mtsai (1999) változékonny régiója, sötétzöld és zöld aminosavak: 61. as-121. as-Balasuriya és mtsai (1997) 1. variábilis régiója, sárga aminosavak: 141. as-178. as-Balasuriya és mtsai (1997) 2. variábilis régiója, kék aminosavak: 202. as-222. as-Balasuriya és mtsai (1997) 3. variábilis régiója a GP₅ génen belül az X53459 referenciaszámú Bucyrus (denBoon és mtsai, 1991) EAV genomon. A szürke háttérű EAV törzsek szekvenciáit külföldi szerzők publikálták.

Az aminosav sorrend vizsgálata számos aminosav változást tárt fel a GP₅ fehérjén belül. A 19 magyarországi EAV törzs legkifejezettebb aminosav cseréit a GP₅ fehérje 79.-90., 154.-158, 171.-178. és 217.-220. aminosav pozíciói között észleltük.

Balasuriya és mtsainak a GP₅ génen végzett vizsgálatának (1997) eredményeit összehasonlítva a mi eredményeinkkel, a magyarországi törzsek hipervariábilis régiója: V1, V2, V3, nagyjából azonos aminosav változást tartalmaz ugyan, mint a Balasuriya és mtsai által vizsgált EAV törzsek, de ennek ellenére egy eltérés is megállapítható. A magyarországi EAV törzsek V2 és V3 régiója közötti génszakasz lényegesen kisebb mértékben konzervatív, mint a külföldi törzsek ezen a génszakaszon: 19 vizsgált vírustörzsből 8 törzs, 9 aminosav pozícióban változást mutat, míg a külföldiek közül csak két másik közép-európai (lengyel) mutat 1-1 hasonló génszakaszon történt mutációt.

Törzsfá rekonstrukció

Két filogenetikai fát készítettünk a vizsgált magyarországi és génbanki vírustörzsek többszörös nukleotid- és aminosav sorrend illesztését követően (15. és 16. ábra).



15. ábra: A vizsgált EAV törzsek nukleotid sorrendjére készített filogenetikai fa

A vírus GP₅ génjének nagyobbik felén elhelyezkedő hipervariábilis régió szekvencia adatainak vizsgálati eredményére alapozva, az EAV törzsek 5 különálló genetikai alcsoportba oszthatók: észak-amerikai I.A. és I.B., valamint európai II.A., II.B. és II.C. genocsoportokba (Stadejek és mtsai, 1999). Ennek alapján a hazai vírustörzsek az 5 genocsoportból 4-be besorolhatóak (16. ábra).

Az A170 törzs az I.A. genocsoportba került, amelyik főleg kanadai, USA-beli és új-zélandi vírus izolátumokat, de két európai izolátumot is tartalmaz.

Az A172 törzs az I.B. alcsoportba tartozik, amely az elsőként izolált Bucyrus törzset, és más észak-amerikai, valamint néhány európai izolátumot is magába foglal.

A 19 magyarországi izolátumból 11, melyek különböző származási helyűek, a fő európai alcsoportba, a II.A. jelűhöz tartozik, amely Ausztriából, Franciaországból, Németországból, Olaszországból, Lengyelországból és az Egyesült Királyságból származó vírusokat is tartalmaz.

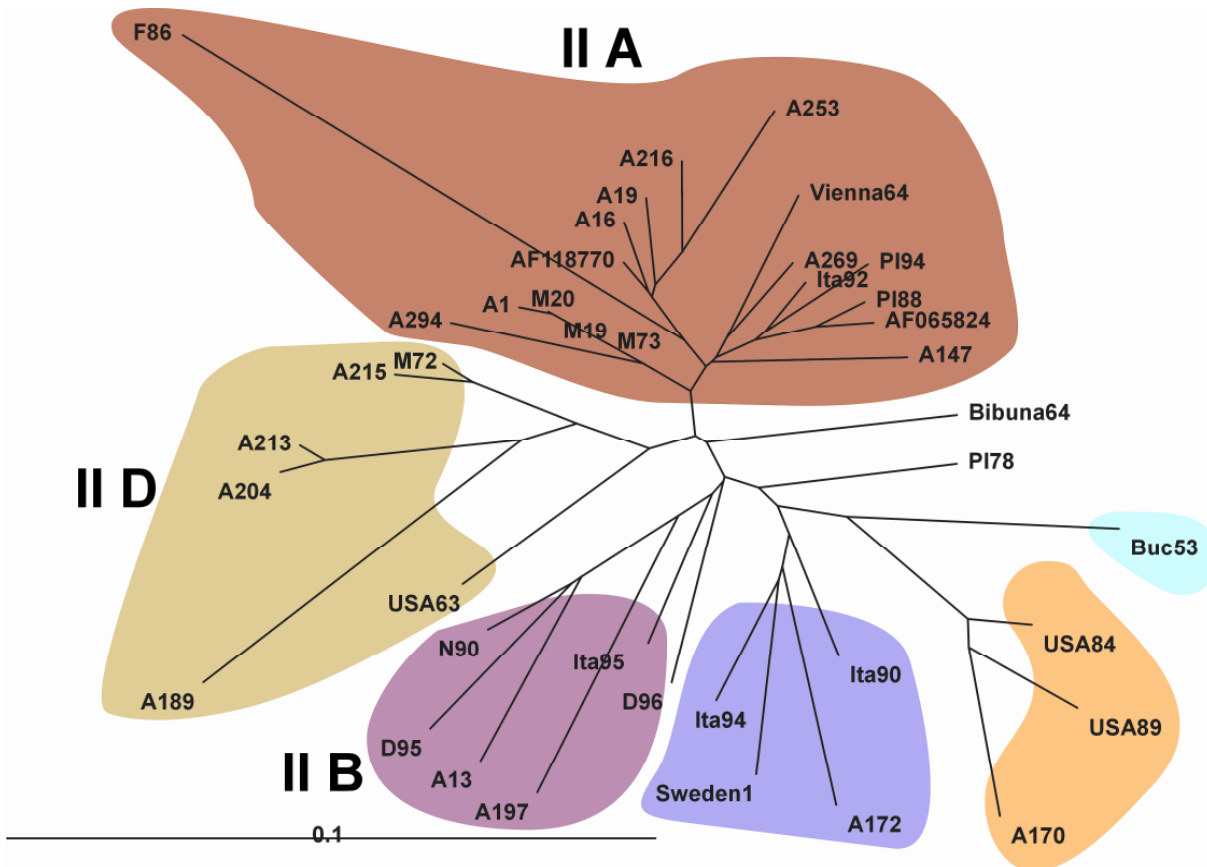
Ezen a hazai vírusok közül 8-at perzisztens vírusürítő mének ondómintáiból (A1, A16, A19, A147, A197, A216, A253 és A269), 2-t vetélt magzati szervekből (M19 és M20), 1-et pedig egy 4 napos újszülött csikó szerveiből (Ú73) (Szeredi és mtsai, 2003) mutattunk ki. Ez azt mutatja, hogy az ondómintákban és a magzati, illetve újszülött szervmintákban jelenlévő vírusok alapvetően genetikailag azonosak. Például az A1 és az M20 EA vírustörzsek 99,61%-ban azonosak, mindössze 2 nukleotid eltérés van közöttük, ami egyetlen aminosav változást jelent. Ezért kijelenthető, hogy a Magyarország egyik területén vetélést okozó vírus kifejezetten hasonlít egy más országrészből származó ondómintával, a két eset között megtaláltuk a járványtani összefüggést (Hornyák és mtsai, 2002.).

Vizsgálatainkkal azt is bebizonyítottuk, hogy különböző genetikai jegyekkel rendelkező EAV törzsek egyidejűleg is jelen lehetnek egy lóállományban, a perzisztens vírusürítő mének ondójában, nevezetesen az A1 (II.A. alcsoport) és az A170 (I.A. alcsoport) mintákat egy állományban gyűjtöttük.

Az A13 minta az európai II.B. alcsoport vírusaival mutat rokonságot, amely csoport Franciaországból, Németországból, Olaszországból és Norvégiából izolált vírusokat tartalmaz.

Öt magyarországi izolátum (A189, A204, A213, A215, M72) és az ausztriai törzs (A294) nem tartozik egyik itt felsorolt alcsoportoz sem, és egy új alcsoportot képez (II.D.), mely a II.A. és a II.B. csoportok között helyezkedik el dendogramunkon (16. ábra). A jellegzetes képviselője ezen alcsoport vírusainak az eredetileg 1963-ban észak-amerikában (Kentucky USA) izolált vírustörzs, mely európai vírusként volt genetikailag jellemezve (Balasuriya 1995). Az előbb felsorolt 12 törzssel szemben, melyek az európai II.A. alcsoportoz tartoznak, és amelyeket 2000-ben, vagy azután izoláltunk, az új, általunk javasolt alcsoport 6 EAV törzse közül 5, 2000 előtt gyűjtött mintákból, közülük egy magzati szervmintából, a 6. pedig éppen 2000-ben gyűjtött ondómintából származik.

A másik, általunk készített filogenetikai törzsfán, melyet az egyes vírusok nukleotid sorrendjéből levezetett aminosav sorrend alapján hoztunk létre, néhány szembetűnő változás figyelhető meg némely vírus pozíciójában, összehasonlítva ugyanezen vírusoknak a nukleotid sorrendre alapozott filogenetikai törzsfán elfoglalt helyzetével.



16. ábra: A vizsgált EAV törzsek nukleotid sorrendjéből levezetett aminosav sorrendre alapozott filogenetikai fa

Az A172 az amerikai I.B. alcsoportból átkerült az európai II.C. csoportba, az A197 jelű vírus az európai II.A. alcsoportból a II.C.-be, az ausztriai A294 vírus a javasolt II.D. alcsoportból a II.A.-ba. Ezek a vírusáthelyeződések egyik alcsoportból a másikba, viszont nem érintik a Kentucky 1963 törzshöz genetikailag közelálló magyarországi vírus izolátumokat, melyek ezen a filogenetikai törzsfán is jól láthatóan elkülönülve egy új alcsoportot képeznek (II.D.).

4.7.3. Megvitatás

A vizsgált magyarországi EA vírusok GP₅ gén szekvencia adatai rávilágítanak arra a tényre, hogy a termékenyítéséhez használt ondó, mely perzisztensen vírusürítő méntől származik, oka lehet a kancák nemi úton történő EAV fertőződésének, nemcsak a mén tartózkodási helyeül szolgáló (A215 és M72), hanem földrajzilag más helyen található lóállományokban is (A1 és M19, M20 és Ú73). Ezeket az ondótól fertőződött a kancákat tekinthetjük a vírus amplifikátorainak, melyek horizontális úton fertőzik késői vemhes istállótársaikat, ezzel vetelési hullámot idéznek elő. Ez az irodalomban publikált járványtani ok-okozati összefüggés (Timoney és mtsai, 1986), a mi

magyarországi viszonyaink között is jól megfigyelhető, és molekuláris biológiai módszerekkel bizonyítható volt (Hornyák és mtsai, 2002). A szekvenálás és a filogenetikai elemzés eredményei azt mutatták, hogy a vetélt magzat szerveiből izolált vírus majdnem azonos volt az állományban termékenyítésre használt mén ondómintájából kimutatott vírussal (A1 és M19).

Úgy találtuk, hogy a 2000 előtt Magyarországon izolált EAV törzsek többsége egy új alcsoportot képez (II.D.), amely genotípusba tartozó egyes törzseket korábban dán és norvég szerzők (Larsen és mtsai, 2001) leírtak, de ezek a szórványos szekvencia-meghatározások nem szolgáltatottak alapot egy új genocsoport képzéséhez. Ezzel szemben a filogenetikai vizsgálatok, melyeket más szerzők (Balasuriya és mtsai, 1997, Belák és mtsai, 1999, Stadejek és mtsai, 1999, Hedges és mtsai, 1999) a GP₅ régió hipervariábilis szakaszára alapozott genetikai módszerrel vizsgáltak, nem tesznek említést ennek az önálló genocsoportnak a létezéséről, melynek a 90-es években Magyarországon elterjedt EAV vírusok tipikus képviselői voltak, de ide sorolható a nemrégiben (2003) Ausztria keleti részén izolált EAV is. Ez a vírus, melyre a földrajzi közelség miatt ugyancsak kiterjesztettük genetikai vizsgálatainkat, genetikailag közeli rokonságban van a 2000 előtt elterjedt magyarországi EAV törzsekkel, és szintén a II.D. alcsoportba tartozik. A magyar és osztrák lótarók között kialakult meglehetősen szoros kapcsolat alapján a kelet-ausztriai és nyugat-magyarországi régió, az EAV járványtani vonatkozásában közös földrajzi területnek tekinthető.

Más oldalról megközelítve a kérdést viszont a hazai EAV törzsek szekvenciáit összehasonlítva a génbankban található, más országbeli vírusokkal, a fenti II.D. csoportú törzsektől eltekintve nagyfokú hasonlóság figyelhető meg a magyarországi és egyes, a világ különböző helyeiről származó EAV törzsek között. A 19 hazai törzs közül 2 az Észak-Amerikában izoláltakkal mutatott rokonságot, de itt is az egyik genetikailag közelebb állt az I.A. alcsoportba (A170), míg a másik (A172) az I.B. alcsoportba tartozott. A kórelőzményi adatok alapján az A170 minta donor ménjét a 90-es évek második felében importáltuk Svédországon keresztül Kanadából, és amint az a retrospektív vizsgálatokból kiderült, már az 1997-ben gyűjtött és azóta mélyfagyasztott ondóminták is tartalmazott EAV RNS-t, vagyis az állat már megérkezésének idején vírushordozó és ürítő volt. A másik mént, az A172 minta donorját, szeronegatív ménként szállították korábban a Cseh Köztársaságba, de 2 év elteltével már szeropozitív volt és EAV nukleinsavat mutattunk ki az ondómintájából. Öt másik, Európából importált mén ondómintáiból kimutatott EAV törzset a II.A. genocsoportba soroltunk (A1 Hollandiából, A16 Németországból, A19 Belgiumból, A197 Romániából, A269 Szlovákiából származó mének).

Mindezek figyelembevételével úgy tűnik, hogy az elmúlt évtized politikai változásait követő nyitottabb lókereskedelem és lóforgalom, egy nyitottabb gazdasági helyzetben, néhány év után vírusváltást eredményezett: a helyi II.D. típusú EAV törzseket új, más genetikai fajtájú, különböző

származási helyű vírusok váltották fel, amelyek 2000 után dominánssá váltak Magyarországon. A domináns hazai vírus genom 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 tenyészanyagok nagyfokú kockázatot jelentenek, a perzisztens vírushordozó mének ondójából felbukkanó, új EAV variánsok importálásában.

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 vetelésben 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% 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 vírust ürítő mén, vagy egy EAV fertőzött mélyfagyasztott ondóminta játszott szerepet.

Ezidáig a magyarországi EAV izolátum gyűjteményünkben mindössze egyetlen genotípus nincs jelen, nevezetesen az európai II.C. alcsoport (Stadejek és mtsai, 1999). Ez egyrészt azt jelenti, hogy Magyarország ez idáig még nem importált olyan fertőzött állatot (mindenekelőtt perzisztens vírusürítő mént), amelyik arról a földrajzi területről származik, ahol a II.C. genotípus jelen van, vagy a szekvenált minták száma volt túl kevés, vagy ezek a II.C. genotípusú EAV törzsek időközben elveszítették járványtani jelentőségüket, mint ahogyan néhány egyéb, korábban Európában jelenlévő vírustörzs esetében ez megtörtént, pl. a svájci, 1964-ben izolált Bibuna törzs, vagy az 1989-ben izolált svédországi EAV esetében.

Az összes magyarországi vírusminta szekvencia meghatározása és elemzése szintén bebizonyította, hogy a vizsgált 3 variábilis régió megtalálható a GP₅ gén egy szakaszán (Balasuriya és mtsai, 1997), és ezek a régiók tűntek számunkra is a genetikai összehasonlító vizsgálatok legalkalmasabb célpontjának. Az irodalomban ugyan említés történik az ORF 3 gén nagyobb

változékonyságáról (Hedges és mtsai, 1999, Balasuriya és mtsai, 1999), de az ORF 3 régiónál nagyfokú a visszamutálódási arány (Hedges és mtsai, 1999), míg az ORF 5 esetében a lassabb mutációs arány ellenére a törzsek diverzitása lineáris. Ennek jelentősége a vírus mutációs arányának (mutációs ráta) vizsgálatokkor érezhető. Eredményeink szintén megerősítik azt a mások által is leírt tényt (Balasuriya és mtsai, 1997, Belák és mtsai, 1999, Stadejek és mtsai, 1999, Hedges és mtsai, 1999), hogy a GP₅ gén alkalmas egyrészt az EAV izolátumok filogenetikai vizsgálatára, másrészt pedig a különböző vírusizolátumok genetikai diverzitásának a felbecsülésére, amely gyors és viszonylag egyszerű módszer az újonnan megjelenő vírusvariánsok azonosítására és hasznos eszköz a vírus terjedési útjának nyomozásához (Stadejek és mtsai, 1999). A GP₅ gén 3 variábilis régiója (61-121 aminosav) közül az első a legváltozékonnyabb rész és annak is az első fele (61-84. aminosav, Hedges és mtsai, 1999), különösen variábilis szakasz. Mind a nukleotid, mind az aminosav változékonyság kisebb ugyan a 2 másik régión, de az itt észlelhető szubsztitúciók ugyancsak meghatározzák az alcsoportokat. A hazai vírusizolátumok, melyek a korábban leírt alcsoportokhoz tartoznak, nem különböznek jelentős mértékben az ugyanabba az alcsoportba tartozó külföldi EAV törzsektől.

A vírusűrítő mének egymást követő ondómintáinak a vizsgálatai jelzik, hogy a gazdaszervezet immunválasza mellett, a vírus belső (genetikai) tulajdonságai szintén szerepet játszanak az új EAV változatok felbukkanásában. Ezek a legfontosabb tulajdonságok a vírus igen nagyfokú mutációs rátája, a genomról másolt kópiák nagy száma és a vírus gyors replikációs ciklusa, melyeknek következtében, még neutrális környezeti feltételek mellett is, viszonylag rövid időszakon belül esély mutatkozik új vírusváltozatok kialakulására. Különösen felgyorsul ez a folyamat abban az esetben, ha a környezet távolról sem neutrális, mint amelyet a tesztoszteron dependens nemi traktus jelent az ott megbúvó EA vírusok számára (Little és mtsai, 1992, Hedges és mtsai, 1999). Az itt, a vírusokat folyamatosan érő szelektív nyomás, melyet a perzisztens vírusűrítő mén járulékos nemi mirigyének sejtes környezete fejt ki rájuk, felerősíti a Red Queen hipotézis jelenséget (Van Valen 1973, Domingo és mtsai, 1996, 1998), vagyis a mutálódott víruspopulációk versenyét egyazon, korlátozott kiterjedésű helyért, melynek során, minél nagyobb fokú a genetikai diverzitás, annál nagyobb a létrejött új, győztes víruspopuláció alkalmazkodó képessége a szelektív nyomáshoz, a túléléshez. Ebben a versengésben nincs végleges győztes, csak állandó dinamikus egyensúly van, az egyes mutáns generációk között, melyben az átmenetileg előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező, fertőzőképes utódokat leginkább létrehozni képes vírusok kiszorítják a veszteseket, a kisebb genetikai „fitness”-ű vírusokat (Steinhauer és mtsai, 1989). Ez a szelekció jellemző az RNS vírusok körében előforduló quasispeciekre (Eigen, 1993).

Habár a GP₅ gén fő részének nukleotid sorrendjéből levezetett aminosav sorrendre alapozott törzsfa rekonstrukció során némileg eltérő alcsoport helyeződéseket tapasztaltunk, a végső következtetés alapvetően megegyezik a nukleotid sorrendre alapozott törzsfa képéből kapott következtetéssel. Az aminosav sorrendre alapozott filogenetikai fa, összehasonlítva a nukleotid sorrendre alapozott törzsfával, a vírusizolálás időpontjainak és az izolálás helyének ismeretében logikusabb, vagyis jobban érthető az, hogy egyes vírusok miért tartoznak egy adott genocsoportba. Ezen, egy adott vírustörzs vírusizolálási időpontja, izolálási helye és az aminosav sorrendre alapozott törzsfán elfoglalt pozíciója közötti összefüggés értendő. A jobb értelmezhetőség lehetséges magyarázata a viszonylagosan nagyobb fenotípusos stabilitás, melyet az aminosav sorrend képvisel, amely szekvencia lassabban változik, mint a nukleotid-sorrend, egy olyan magas mutációs arányú quasispecies vírus esetében, mint az EA vírus.

A hazai vírusizolátumok közül az A172 (a Csehországból hazatért mén vírusa) a II.C. alcsoportba kerül ezen a törzsfán, mely genocsoport még kiegészül a svédországi EAV törzsszel is, amely nukleotid szinten nem tartozott egyik fő genocsoportba sem. Az A294 vírus, melyet 2003-ban Bécsben izoláltak, az új törzsfán a II.A. alcsoportba kerül, közeli rokonságba a 2000-ben, magzatokból izolált újabb magyarországi törzsekkel, sugallva ezzel azt a járványtani kapcsolatot, mely a 2000. évi magyarországi vetélési hullámok és a legújabb ausztriai EAV izolátum között fennáll.

A két törzsfán található pozíció különbségek magyarázhatók a viszonylag rövid aminosav szekvenciákkal (172 aminosav), és a divergencia alacsony szintjét az alacsony „bootstrap” értékek is kifejezik, amelyek figyelmeztetnek bennünket az ilyen módon nyert filogenetikai fa „törékenységre”, vagyis arra, hogy a bevitt adatok kis mennyisége következtében lényegesen alacsonyabb valószínűségi értékekkel számolhatunk.

Másik érdekes megfigyelésünk, hogy a GP₅ fehérjét kódoló gén hipervariábilis régiójának Balasuriya és mtsai által 1997-ben vizsgált és leírt adataival, a hazai EAV törzsek hasonló adatait összegezve kimutatható, hogy a magyarországi törzsek, bizonyos régiókon belül kevesebb aminosav változást mutatnak (14. táblázat). Megfigyelhető viszont a többszörös aminosav illesztések esetében az az eltérés is, mely első ránézésre is nyilvánvalóvá teszi, hogy a második és harmadik variábilis régió közötti, Balasuriya és mtsai (1997) szerint konzervatív részen (2. interváriábilis régió) a vizsgálatainkban részt vevő hazai törzsek csaknem fele, nem szinonim mutációt szenvedett. A vizsgálatainkba bevont nem magyarországi EAV izolátumok közül, 2 ugyancsak közép-európai (lengyelországi) vírus is aminosav változást mutatott e régióban, sejtetve azt, hogy ez a terület, ha nem is változékonny, de minden valószínűség szerint egy szűkebb földrajzi területre jellemző EAV csoport genomrészének tekinthető.

5. Legfontosabb eredmények

1. Szerológiai vizsgálatokkal megállapítottam a hazai EAV prevalenciát, és a fertőzöttség mértékének emelkedő tendenciáját.
2. Elsőként izoláltam Magyarországon EA vírust RK-13 és BHK-21 sejttenyészeteken.
3. Diagnosztikai jellegű RT-PCR módszert dolgoztam ki a nukleokapszid-NTR régió genomszakaszának amplifikálására.
4. Munkatársaimmal EA vírus nukleokapszid fehérje specifikus McAb-ot hoztunk létre.
5. PLA módszerrel kimutattam az EAV fertőzött sejt magjában a nukleokapszid fehérjét.
6. Szekvenálás céljából RT-PCR módszert dolgoztam ki az ORF 5 hipervariábilis régió genomszakaszának amplifikálására.
7. Elsőként végeztem hazai EAV törzsek összehasonlító genetikai vizsgálatát.

A genetikai összehasonlító vizsgalataimmal a következő, állatorvosi szempontok alapján fontos megállapításokat írtam le.

1. A termékenyítéséhez használt ondó, mely perzisztensen vírusürítő méntől származik, az oka a kancák nemi úton történő EAV fertőződésének.
2. Bebizonyítottam, hogy az ily módon fertőződött kancákat tekinthetjük a vírus amplifikátorainak, melyek horizontális úton fertőzik késői vemhes istállótársaikat, és ezzel vetélési hullámot idéznek elő.
3. Úgy találtuk, hogy a 2000 előtt Magyarországon izolált EAV törzsek többsége egy új alcsoportot képez (II.D).
4. A többi izolált, hazai EAV törzsek szekvenciáit összehasonlítva a génbankban található, más országbeli vírusokkal, nagyfokú hasonlóságot figyeltem meg a magyarországi és egyes, a világ különböző helyeiről származó EAV törzsek között. Ennek alapján nyilvánvalóvá tettem, hogy néhány év után a helyi II.D. típusú EAV törzseket új, más genetikai fajtájú, különböző származási helyű vírusok váltották fel, amelyek 2000 után dominánssá váltak Magyarországon.
5. Vizsgálati eredményeim értékelésével felhívtam a szakemberek figyelmét a külföldről hazánkba hozott lovak (főleg a perzisztensen vírusürítő mének) és az EAV-fertőzött mélyfagyasztott ondóminták jelentőségére az EVA terjesztésében.
6. Vizsgálataink arra is rávilágítottak, hogy az újabb hazai vírusizolátumok, melyek az egyes, korábban leírt alcsoportokhoz tartoznak, nem különböznek jelentős mértékben az ugyanabba az alcsoportba tartozó külföldi EAV törzsektől.
7. Megfigyeltem a többszörös aminosav illesztések esetében azt az eltérést, mely első ránézésre is nyilvánvalóvá teszi, hogy a 2. és harmadik variábilis régió közötti, korábban konzervatívnak tartott

részen (2. intervariábilis régió) a vizsgálatainkban részt vevő hazai törzsek csaknem fele, nem szinonim mutációt szenvedett, két másik, közép-európai EAV törzzel együtt. Ez azt jelenti, hogy ez a terület, ha nem is változékony, de minden valószínűség szerint egy szűkebb földrajzi területre jellemző EAV csoport genomrészének tekinthető.

Köszönetnyilvánítás

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

Ugyancsak hálás köszönetet mondok dr. **Bakonyi Tamás** egyetemi adjunktusnak, egykori diákomnak, aki fáradhatatlanul és óriási türelemmel segítette kutatási tevékenységemet, EAV 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, 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 termelés, illetve az 1998 és 2002 közötti időszak vizsgálati anyagainak a gyűjtését és a rendelkezésemre bocsátását.

Köszönöm **Tapasztai 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 tagjai felé, akik a számomra pszichikailag és fizikailag rendkívül megterhelő időszakban mellettem maradtak, gondoskodásukkal tehermentesítettek a mindennapi gondoktól.

Irodalomjegyzék

1. Archambault D, Laganier G, Carman S, St-Laurent G. Comparison of nucleic and amino acid sequences and phylogenetic analysis of open reading frames 3 and 4 of various equine arteritis virus isolates. *Vet Res.* 1997.28:505-516.
2. Archambault D, Laganier G, St-Laurent G. Genetic variation and phylogenetic analysis of open reading frames 3 and 4 of various equine arteritis virus isolates. *Adv Exp Med Biol.* 1998.440:813-819.
3. Állategészségügyi Intézetek Évkönyve 1973-1974.
4. Balasuriya UBR, Rossitto PV, DeMaula CD and MacLachlan N. J. A 29 K envelope glycoprotein of equine arteritis virus expresses neutralization determinants recognized by murine monoclonal antibodies, *J Gen Virol.* 1993.74:2525-2529.
5. Balasuriya UBR, MacLachlan NJ, De Vries AA, Rossitto PV, Rottier PJ. Identification of a neutralization site in the major envelope glycoprotein (GL) of equine arteritis virus. *Virology.* 1995.a.207:518-27.
6. Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology.* 1995.b.214:690-697.
7. Balasuriya UBR, Patton JF, Rossitto PV, Timoney PJ, McCollum WH, and MacLachlan NJ: Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1997.232:114–128.
8. Balasuriya UBR, Evermann JF, Hedges JF, McKeirnan AJ, Mitten JQ, Beyer JC, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ. Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J Am Vet Med Assoc.* 1998.213:1586-1599.
9. Balasuriya UBR, Hedges JF, Nadler SA, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ. Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J Gen Virol.* 1999.80:1949-1958.
10. Balasuriya UBR, Leutenegger CM, Topol JB, McCollum WH, Timoney PJ, MacLachlan NJ. Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *J Virol Methods.* 2002.101:21-28.
11. Balasuriya UBR, Hedges JF, Smalley VL, Navarrette A, McCollum WH, Timoney PJ, Snijder EJ, MacLachlan NJ. Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Gen Virol.* 2004.85:379-390.

12. Ballagi-Pordány A, Klingeborn B, Flensburg J, Belák S. Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 1990.22:373-381.
13. Ballagi-Pordány A, Klintevall K, Merza M, Klingeborn B, Belák S. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1992.39:69-77.
14. Belák S, Ballagi-Pordány A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun.* 1993.17:55-72. Review.
15. Belák S, Ballagi-Pordány A, Timoney PJ, McCollum, Little TV, Hyllseth B. and Klingeborn B. Evaluation of a nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. In: Nakajima H, and Plowright W(eds.), *Proceedings of 7th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Tokyo, 1994. Newmarket, R&W Publications, 1994.33-38.
16. Belák S, Stadejek T, Bjorklund H, Bascunana CR, Ciabatti IM, Scicluna MT, Amaddeo D, McCollum WH, Paton DJ, Autorino GL, Timoney PJ. and Klingeborn B. Genetic diversity among field isolates of equine arteritis virus. *Equine Infectious Diseases VIII, Proceedings of the Eight International Conference*, Dubai 1998. R&W Publications (Newmarket) Ltd., Suffolk, UK, 177-183.
17. Benkő M, Harrach B. A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol.* 1998.143:829-837.
18. Brierley I. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol.* 1995.76:1885-1892. Review.
19. Carrasco L. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett.* 1994.22:151-154. Review.
20. Cavanagh D, Brian DA, Brinton MA, Enjuanes L, Holmes KV, Horzinek MC, Lai MM, Laude H, Plagemann PG, Siddell SG, et al. The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv Exp Med Biol.* 1993.342:255-267.
21. Cavanagh D. Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol.* 1997.142:629-633.
22. Chirnside ED, Cook RF, Lock MW, and Mumford JA: Monoclonal antibodies to equine arteritis virus: In: *Proceedings of 5th International Conference on Equine Infectious Diseases*. Powell DG (Ed.). Lexington, University Press of Kentucky, 1987.262–267.
23. Chirnside ED, Wearing CM, Binns MM, Mumford JA. Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine arteritis virus isolates. *J Gen Virol.* 1994.75:1491-1497.

24. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987.162:156-159.
25. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 1960.20:37-46.
26. Coignoul FL, Cheville NF. Pathology of maternal genital tract, placenta, and fetus in equine viral arteritis. *Vet Pathol.* 1984.21:333-340.
27. Del Piero F. Equine viral arteritis. *Vet Pathol.* 2000.37:287-296. Review.
28. den Boon JA, Snijder EJ, Chirnside ED, de Vries AA, Horzinek MC, Spaan WJ. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J Virol.* 1991.65:2910-2920.
29. den Boon JA, Kleijnen MF, Spaan WJ, Snijder EJ. Equine arteritis virus subgenomic mRNA synthesis: analysis of leader-body junctions and replicative-form RNAs. *J Virol.* 1996.70:4291-4298.
30. de Vries AA, Chirnside ED, Bredenbeek PJ, Gravestien LA, Horzinek MC, Spaan WJ. All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res.* 1990.11:3241-3247.
31. de Vries AA, Chirnside ED, Horzinek MC, Rottier PJ. Structural proteins of equine arteritis virus. *J Virol.* 1992.66:6294-6303.
32. de Vries AA, Raamsman MJ, van Dijk HA, Horzinek MC, Rottier PJ. The small envelope glycoprotein (GS) of equine arteritis virus folds into three distinct monomers and a disulfide-linked dimer. *J Virol.* 1995.a.69:3441-3448.
33. de Vries AA, Post SM, Raamsman MJ, Horzinek MC, Rottier PJ. The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J. Virol.* 1995.b.69:4668-4674.
34. de Vries AA, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. *Semin Virol.* 1997.8:33-47. CrossRef.
35. Deragon JM, Sinnott D, Mitchell G, Potier M, Labuda D. Use of gamma irradiation to eliminate DNA contamination for PCR. *Nucleic Acids Res.* 1990.25:61496155.
36. Doll ER, Bryans JT, Mccollum WH, Crowe EW. Propagation of equine abortion virus in Syrian hamsters. *Cornell Vet.* 1956.46:68-82.
37. Doll ER, John T, Bryans JT, McCollum WH, Crowe ME. Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* 1957.47:3-41.

38. Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, Novella IS, Holland JJ. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* 1996.10:859-864. Review.
39. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarmis C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis.* 1998.4:521-527. Review.
40. Dwyer DE, Saksena N. Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination. *Mol Cell Probes.* 1992.6:87-98.
41. Edwards, S., Castillo-Olivares, J., Cullinane, A., Lable, J., Lenihan, P., Mumford, J.A., Paton, D.J., Pearson, J.E., Sinclair, R., Westcott, D.G.F., Wood, J.L.N., Zientara, S., Nelly, M. International harmonization of laboratory diagnostic tests for equine viral arteritis. In: Wernery, U., Wade, J.F., Mumford, J.A., Kaaden, O.-R. (Eds.), *Equine Infectious Diseases VIII, Proceedings of the Eight International Conference, Dubai 1998.* R&W Publications (Newmarket) Ltd., Suffolk, UK, 359–362.
42. Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am.* 1993.269:42-49. Review.
43. Faaberg KS, Even C, Palmer GA, Plagemann PG. Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J Virol.* 1995.69:613-617.
44. Faaberg KS, Plagemann PG. ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology.* 1997.227:245-251.
45. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985.39:783-791.
46. Felsenstein, J. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.5c manual.* 1993;University of Washington, Seattle, Wash.
47. Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. *Science.* 1967.155:279-284. Review.
48. Fitch WM. Locating gaps in amino acid sequences to optimize the homology between two proteins. *Biochem Genet.* 1969.3:99-108.
49. Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin,* 1971.76:378–382.
50. Fleiss JL. The statistical basis of meta-analysis. *Stat Methods Med Res.* 1993.2:121-145. Review.
51. Fukunaga Y, Wada R, Matsumura T, Sugiura T, Imagawa H. Induction of immune response and protection from equine viral arteritis (EVA) by formalin inactivated-virus vaccine for EVA in horses. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1990.37:135-141.

52. Fukunaga Y, Wada R, Imagawa H, Kanemaru T. Venereal infection of mares by equine arteritis virus and use of killed vaccine against the infection. *J Comp Pathol.* 1997.117:201-208.
53. Gilbert SA, Timoney PJ, McCollum WH, Deregt D. Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1997.35:2181-2193.
54. Glaser AL, Chirnside ED, Horzinek MC, de Vries AA. Equine arteritis virus. *Theriogenology* 1997.47:1275-1297.
55. Godeny EK, de Vries AA, Wang XC, Smith SL, de Groot RJ. Identification of the leader-body junctions for the viral subgenomic mRNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: evidence for gene duplication during arterivirus evolution. *J Virol.* 1998.72:862-867.
56. Hausmann Y, Roman-Sosa G, Thiel HJ, Rumenapf T. Classical swine fever virus glycoprotein E_{ns} is an endoribonuclease with an unusual base specificity. *J Virol.* 2004.78:5507-5512.
57. Hedges JF, Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Genetic variation in open reading frame 2 of field isolates and laboratory strains of equine arteritis virus. *Virus Res.* 1996.42:41-52.
58. Hedges JF, Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Genetic divergence with emergence of novel phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Virol.* 1999.73:3672-3681.
59. Hedges JF, Balasuriya UBR, MacLachlan NJ. The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. *Virology.* 1999.264:92-98.
60. Hornyák Á, Bakonyi T, Pálfi V, Rusvai M. A lovak fertőző arteritisét okozó vírus első hazai izolálása. *Magy. Áo. Lapja* 2001.123:729-734.
61. Hornyák Á, Bakonyi T, Szeredi L, Rusvai M. Négy fertőző arteritisvírus-törzs összehasonlító genetikai vizsgálata. *Magy. Áo. Lapja* 2002.124:459-465.
62. Hornyák Á, Dénes B, Szeredi L, Dencső L, Rusvai M. Diagnostic application of immunoperoxidase monolayer assay using monoclonal antibodies produced against equine arteritis virus 14-kDa nucleocapsid protein. *Hybrid Hybridomics.* 2004.23:368-372.
63. Hornyák Á, Bakonyi T, Tekes G, Szeredi L, Rusvai M. 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.

64. Horzinek M, Maess J, Laufs R. Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1971.33:306-318.
65. Hutyra F, Marek J. Special pathology and therapeutics of diseases of domestic animals. Chicago, Alexander Eger, 1938.
66. Hyllseth B. Structural proteins of equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1973.40:177-188.
67. Huntington PJ, Forman AJ, Ellis PM. The occurrence of equine arteritis virus in Australia. *Aust. Vet. J.* 1990.67:432-435.
68. Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004.101:12694-12699.
69. Jones TC. and Maurer FD. *Amer. Jour. Vet. Res.* 1943.4:15.
70. Kheyar A, St-Laurent G, Diouri M, Archambault D. Nucleotide sequence and genetic analysis of the leader region of Canadian, American and European equine arteritis virus isolates. *Can J Vet Res.* 1998.a.62:224-230.
71. Kheyar A, St-Laurent G, Diouri M, Dufresne J, Archambault D. Sequence determination and genetic analysis of the leader region of various equine arteritis virus isolates. *Adv Exp Med Biol.* 1998.b.440:805-812.
72. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980.16:111-120.
73. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970.227:680-685.
74. Larsen LE, Storgaard T, Holm E. Phylogenetic characterisation of the G(L) sequences of equine arteritis virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of equine viral arteritis in Denmark. *Vet Microbiol.* 2001.80:339-346.
75. Lepage N, St-Laurent G, Carman S, Archambault D. Comparison of nucleic and amino acid sequences and phylogenetic analysis of the Gs protein of various equine arteritis virus isolates. *Virus Genes.* 1996.13:87-91.
76. Little TV, Holyoak GR, McCollum WH, Timoney PJ. Output of equine arteritis virus from persistently infected stallions is testosterone-dependent. In: Plowright W, Rosedale PD, Wade JF (eds), *Proceedings of 6th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Cambridge, 1991. Newmarket, R&W Publications, 1992.225-229.
77. Little TV, Deregt D, McCollum WH, Timoney PJ. Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of

- infection. In: Nakajima H, and Plowright W(eds.), Proceedings of 7th International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo 1994. Newmarket, R&W Publications, 1994.27-31.
78. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990.93:125-128.
 79. Magnusson P, Hyllseth B, Marusyk H. Morphological studies on equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1970.30:105-112.
 80. Manninger R, Csontos J. *Deut. Tierärztl. Wchnschr*. 1941.49:105.
 81. Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*. 1996.221:98-112.
 82. Markussen NH, and Have P: Phocine distemper virus infection in harp seals (*Phoca groenlandica*). *Marine Mam Sci* 1992.8:19–26.
 83. Maurer FD, Jones TC. *Amer. Jour. Vet. Res*. 1943.4:257.
 84. Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B und Wittmann G. *Virologische Arbeitsmethoden* Veb Gustav Fischer Verlag Jena 1974.
 85. MacLachlan NJ, Balasuriya UB, Rossitto PV, Hullinger PA, Patton JF, Wilson WD. Fatal experimental equine arteritis virus infection of a pregnant mare: immunohistochemical staining of viral antigens. *J Vet Diagn Invest*. 1996.8:367-374.
 86. McCollum, W. H, Prickett ME, Bryans JT. Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res. Vet. Sci*. 1971.12:459-464.
 87. McCollum WH. Responses of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E. Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus. *Am J Vet Res*. 1986.47:1931-1944.
 88. McCollum, W. H. & Timoney, P. J. Experimental observation on the virulence of isolates of equine arteritis virus. In *Equine Infectious Diseases VIII*, Edited by U. Wernery, J. F. Wade, J. A. Mumford & O.-R. Kaaden. Newmarket, UK: R & W Publications. 1999. 558–559.
 89. Molenkamp R, van Tol H, Rozier BC, van der Meer Y, Spaan WJ, Snijder EJ. The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription. *J Gen Virol*. 2000.81:2491-2496.
 90. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986.51.Pt.1:263-273.

91. Murphy TW, McCollum WH, Timoney PJ, Klingeborn BW, Hyllseth B, Golnik W, Erasmus B. Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet Microbiol.* 1992.32:101-115.
92. Nakazato H, Edmonds M. The isolation and purification of rapidly labeled polysome-bound ribonucleic acid on polythymidylate cellulose. *J Biol Chem.* 1972.247:3365-3377.
93. Nowotny N, Bürki F. Three cases of virus isolation from horse fetuses diagnosed with equine arteritis virus (EAV) abortion from stud farms with different breeds. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1992.105:181-187.
94. Ostlund EN, Peters JC, Stoker AM, McCollum WH, and Timoney PJ: Enhancement of cell culture growth of two arteriviruses by carboxymethyl cellulose overlay. Presented at the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Louisville, 1997.
95. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HELTH: Manual of standards for Diagnostic Tests and vaccines 2000.Chapter:2.5.10.583-585.
96. Patton JF, Balasuriya UB, Hedges JF, Schweidler TM, Hullinger PJ, MacLachlan NJ. Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected standardbred stallion. *Arch Virol.* 1999.144:817-827.
97. Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* 2001.20:7220-7228.
98. Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ. The stability of the duplex between sense and antisense transcription-regulating sequences is a crucial factor in arterivirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol.* 2003.77:1175-1183.
99. Plagemann PG, Moennig V. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv Virus Res.* 1992.41:99-192. Review.
100. Porterfield JS, Casals J, Chumakov MP, Gaidamovich SY, Hannoun C, Holmes IH, Horzinek MC, Mussgay M, Oker-Blom N, Russell PK, Trent DW. *Togaviridae.* *Intervirology.* 1978.9:129-148.
101. Reed LJ, and Muench HA. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938.27:493-497.
102. Rusvai M, Hornyák Á, Abonyi T, Fehérvári T és Medveczky I. A ló fertőző arteriitisének járványtanával kapcsolatos újabb megfigyelések. *Magy. Áo. Lapja* 1995.50:16-19.
103. Rusvai M, Kucséra L, Pálfi V. A vírusos eredetű lóbetegségek hazai előfordulása, a védekezés főbb szempontjai. *Magy. Áo. Lapja* 1996.51:499-503.

104. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985.230:1350-1354.
105. Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kossel H, Fischer D. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973.70:1209-1213.
106. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*. 1990.18:7465.
107. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*. 1995.380:499-506. Review.
108. Snijder EJ, Wassenaar AL, Spaan WJ. Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *J Virol*. 1994.68:5755-5764.
109. Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*. 1998.79:961-979. Review.
110. Snijder EJ, van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJ, de Vries AA. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol*. 1999.73:6335-6345.
111. Snijder EJ, Meulenberg JJ. Arteriviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Fields virology*, vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.1110–1159.
112. Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJ. Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol*. 2003.77:97-104.
113. Stadejek T, Bjorklund H, Bascunana CR, Ciabatti IM, Scicluna MT, Amaddeo D, McCollum WH, Autorino GL, Timoney PJ, Paton DJ, Klingeborn B, Belák S. Genetic diversity of equine arteritis virus. *J Gen Virol*. 1999.80:691-699.
114. Starick E, Ginter A, and Coppe P: ELISA and Direct Immunofluorescence Test to detect equine arteritis virus (EAV) using monoclonal antibody directed to the EAV-N protein. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001.48:1–8.
115. Steinhauer DA, de la Torre JC, Meier E, Holland JJ. Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus. *J Virol*. 1989.63:2072-2080.
116. St-Laurent G, Lepage N, Carman S, Archambault D. Genetic and amino acid analysis of the GL protein of Canadian, American and European equine arteritis virus isolates. *Can J Vet Res*. 1997.61:72-76.
117. Sugita S, Kondo T, Sekiguchi K, Yamaguchi S, Kamada M, Nerome K and Fukunaga Y. Molecular evolution of the M gene of equine arteritis virus. In: Nakajima H, and Plowright

- W(eds.), Proceedings of 7th International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo 1994. Newmarket, R&W Publications, 1994.39-43.
118. Szeredi L, Hornyák Á, Dénes B, Rusvai M. 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*. 2003.50:270-274.
 119. Szigeti G, Pálfi V, Nagy B, Édes Istvánné, Nagy Gy, Szmollény G, Bagó Gy and Radványi Sz. New type of immuno-stimulant to increase antibody production in response to viral and bacterial vaccines. *Magyar Áo Lapja* 1998.120:719–721.
 120. Thiel V, Herold J, Schelle B, Siddell SG. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol*. 2001.75:6676-6681.
 121. Tijms MA, van der Meer Y, Snijder EJ. Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *J Gen Virol*. 2002.83:795-800.
 122. Tijms MA, Snijder EJ. Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *J Gen Virol*. 2003.84:2317-2322.
 123. Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, Murphy TW. Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res Vet Sci*. 1986.41:279-280.
 124. Timoney PJ, McCollum WH, Murphy TW, Roberts AW, Willard JG, Carswell GD. The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987.35:95-102.
 125. Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW, McDonald MJ. Status of equine viral arteritis in Kentucky, 1985. *J Am Vet Med Assoc*. 1987.191:36-39. Review.
 126. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1993.9:295-309. Review.
 127. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979.76:4350–4354.
 128. Vaala WE, Hamir AN, Dubovi EJ, Timoney PJ, Ruiz B. Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in a neonatal thoroughbred. *Equine Vet J*. 1992.24:155-158.
 129. van Berlo MF, Horzinek MC, van der Zeijst BA. Equine arteritis virus-infected cells contain six polyadenylated virus-specific RNAs. *Virology*. 1982.118:345-352.
 130. van Berlo MF, Rottier PJ, Horzinek MC, van der Zeijst BA. Intracellular equine arteritis virus (EAV)-specific RNAs contain common sequences. *Virology*. 1986.152:492-496.

131. Van Den Born E., Gultyaev A. P., Snijder E. J. Secondary structure and function of the 5'-proximal region of the equine arteritis virus RNA genome. *RNA*. 2004.10:424-437.
132. van Dinten LC, Rensen S, Gorbalenya AE, Snijder EJ. Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. *J Virol*. 1999.73:2027-2037.
133. van Marle G, Dobbe JC, Gultyaev AP, Luytjes W, Spaan WJ, Snijder EJ. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999.96:12056-12061.
134. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1973.1:1-30.
135. Varga J, Tuboly S, Mészáros J. A háziállatok fertőző betegségei. Állatorvosi járványtan II. Mezőgazda Kiadó 1999.27.
136. Weiland E, Bolz S, Weiland F, Herbst W, Raamsman MJ, Rottier PJ, De Vries AA. Monoclonal antibodies directed against conserved epitopes on the nucleocapsid protein and the major envelope glycoprotein of equine arteritis virus. *J Clin Microbiol*. 2000.38:2065-2075.
137. Weiss M, Horzinek MC. The proposed family Toroviridae: agents of enteric infections. Brief review. *Arch Virol*. 1987.92:1-15. Review.
138. Westcott DG, King DP, Drew TW, Nowotny N, Kindermann J, Hannant D, Belak S, Paton DJ. Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet Res*. 2003.34:165-176.
139. Wieringa R, de Vries AA, Raamsman MJ, Rottier PJ. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J Virol*. 2002.76:10829-10840.
140. Wieringa R, de Vries AA, Rottier PJ. Formation of disulfide-linked complexes between the three minor envelope glycoproteins (GP2b, GP3, and GP4) of equine arteritis virus. *J Virol*. 2003.77:6216-6226.
141. Wieringa R, de Vries AA, van der Meulen J, Godeke GJ, Onderwater JJ, van Tol H, Koerten HK, Mommaas AM, Snijder EJ, Rottier PJ. Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *J Virol*. 2004.78:13019-13027.
142. Wilkins PA, Del Piero F, Lopez J, Cline M. Immunohistochemical diagnosis of equine arteritis infection in a foal. *Equine Vet J*. 1995.27:398-405.

Saját közlemények jegyzéke

1. Rusvai Miklós, **Hornyák Ákos**, Abonyi Tamás, Fehérvári Tamás, Medveczky István: A ló fertőző arteritisének járványtanával kapcsolatos újabb megfigyelések. *Magy. Áo. Lapja* 1995. 50. 16-19.
2. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Pálfi Vilmos és Rusvai Miklós: A lovak fertőző arteritisét okozó vírus első hazai izolálása. *Magy. Áo. Lapja* 2001. 123. 729-734.
3. **Hornyák Ákos**, Bakonyi Tamás, Szeredi Levente és Rusvai Miklós: Négy hazai fertőző arteritis vírustörzs összehasonlító genetikai vizsgálata. *Magy. Áo. Lapja* 2002. 124. 459-465.
4. 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.
5. **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.
6. **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.
7. 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.