

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

I. Genetikai módszerek a vakcinaellenőrzésben

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

Farsang Attila

**Budapest
2003**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető:

Dr. Rudas Péter, DSc
Egyetemi tanár

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Soós Tibor, kandidátus
Igazgató
ÁOGYTI

Dr. Lomniczi Béla, az állatorvos-tudomány doktora
Tudományos főmunkatárs
MTA Állatorvos-tudományi Kutató Intézet

Dr. Tuboly Sándor, az állatorvos-tudomány doktora
Ny. egyetemi tanár
SZIE, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és
Mikrobiológiai Tanszék

.....
Dr. Rudas Péter

.....
Farsang Attila

I. A kutatások előzményei és céljai

Az állatgyógyászati vakcinák ártalmatlanságának, tisztaságának és idegen ágens mentességének biztosítása kiemelkedő fontosságú feladat. Az oltóanyag engedélyezési eljárása során a gyártó által előállított terméket az engedélyező állami hatóság aprólékos vizsgálatoknak veti alá, amelyek célja a termék ártalmatlanságának, tisztaságának, hatékonyságának és hatásértékének megállapítása. Az oltóanyagnak, mint biológiai hatással bíró produktumnak különlegesen szigorú feltételrendszernek kell megfelelnie, amely garantálja, hogy felhasználása során az elvárt hatást fejtsse ki.

Arra nézve, hogy az adott vakcina milyen törzset tartalmaz, csak és kizárólag azt a törzset tartalmazza-e, vagy annak egy homológ vagy heterológ kontaminált változatát, a jelenlegi vizsgálati módszerek nem mindig adnak választ. A vakcinával szembeni kiemelt követelmények miatt a hatóságnak szükséges, hogy ellenőrizni tudja az ampulla aktív komponensét is. A gyártó által az oltóanyaghoz felhasznált törzs azonosságát, kontaminációtól való mentességéről a hatóság csak indirekt módon, a gyártás szigorú minőségbiztosító rendszerének hibátlan működését feltételezve nyerhet adatokat a törzskönyvi dokumentációk átvizsgálásával.

Számos adat utal azonban arra, hogy a *biztonsági rendszabályok, szabványok ellenére* is a Master Seed Virus (MSV) más vírussal kontaminálódhat, vagy törzscsere történhet (Jørgensen *et al.*, 2000; Caroll-Pankhurst *et al.*, 2001; Giangaspero *et al.*, 2001). Éppen

ezért az olyan módszerek rutinszerű alkalmazása mind a törzskönyvi, mind az engedélyezés utáni vizsgálatok alkalmával, amelyek képesek gyorsan és egyértelműen törzsszintű megkülönböztetésre, nagy jelentőséggel bírnak a hatósági ellenőrzésben.

A PCR alkalmazása a vakcina ellenőrzésben törzsszintű megkülönböztetést tesz lehetővé (Davidson *et al.*, 2002; Lee & Jackwood, 2001; Wang & Khan, 2000; Seal *et al.*, 1995; Stäuber *et al.*, 1995). A doktori értekezésemben az volt célom, hogy molekuláris módszereken alapuló eljárásokat dolgozzak ki, amelyek a hatósági vakcina-ellenőrzésben i.) gyors, hatékony és egyértelmű törzsazonosítást tesznek lehetővé; ii.) sokoldalúan alkalmazhatóak a vakcinavírus törzsazonosságának megállapítására, a vakcinavírus-vadvírus elkülönítésére; iii.) elősegítik a vakcina adverz hatás esetében az oltóanyag szerepének tisztázását; iv.) lehetővé teszik a vakcinavírus genetikai jellemzésével a nem kívánatos hatás okainak felderítését.

A fentebb vázolt cél elérése érdekében az alábbi fő problémakörök esetében alkalmaztam molekuláris módszereket:

- Lentogén törzsből készített baromfipestis elleni vakcinák vizsgálata RT-PCR és RFLP módszerével, hogy i.) genetikai alapon azonosítsuk a vakcinavírusokat; ii.) kiszűrjük az oltóanyag más NDV törzssel (homológ kontamináció) való szennyezettségét; iii.) megállapítsuk az oltóanyag IBV és IBDV vírusoktól való mentességét.

- A Svédországban észlelt fertőző IBV járványesetek háttérében álló vírus genetikai jellemzése, illetve filogenetikai analízise. A cél az volt, hogy a járványesetek vizsgálatára egy gyors diagnosztikai, illetve egy filogenetikai analízisre alkalmas RT-PCR rendszert fejlesszünk ki, amelyekkel gyorsan meghatározhatjuk, hogy milyen törzsek okoznak járványt. Igazolni kívántuk továbbá a gyanút, hogy a járványesetek háttérében vakcinavírus áll.
- Myxomatosis ellen oltott házi nyúlállományban megjelent aspecifikus klinikai képet okozó myxoma vírus klinikai és virológiai jellemzése.

II. Vizsgálati módszerek

Minták

A kiindulási anyag az NDV vizsgálatoknál 12 vakcina volt, IBV esetében természetes járványesetkből származó trachea és vékonybél minták, míg a myxoma vizsgálatnál természetes megbetegedésben elhullott állat szemhéj, végbél és tüdőmintái voltak.

RNS izolálás

Az RNS-t Trizol™ (Gibco BRL, Bethesda, MD, US) felhasználásával extraháltuk (Verhofstede *et al.*, 1996). A precipitált RNS-t 15 000 g-n 30 percig centrifugáltuk, a pelletet 400 µl 70%-os etanollal mostuk, kiszáritottuk és 50 µl frissen készített dietil-pirokarbonát-tartalmú

(DEPC, Fluka Chemi AG, Buchs, Switzerland) vízben feloldottuk, és felhasználásig -70°C -on tároltuk. (Vilcek *et al.*, 1994).

cDNS szintézis

A cDNS-t 25 μl végtérfogatban állítottuk elő, amely 5 μl RNS-t, 5 μl DEPC-es vizet, 1 μl random hexamert (0,02 U; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) tartalmazott. Az RNS-t 65°C -on 5 percig denaturáltuk, ezt követően jégre helyeztük és 17 μl reakcióoldatot adtunk hozzá, amely 1 μl RNAsine-t (24 U, Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2,5-2,5 μl dNTP-t (2 mM; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 5 μl 1st strand puffert (Gibco BRL, Bethesda, MD, US), és 1 μl MML-RT enzimet (200 U; Gibco BRL, Bethesda, MD, US) tartalmazott. A reakcióelegyet 37°C -on 90 percig inkubáltuk, majd az enzim inaktivációja 5 perc 98°C -os melegítéssel történt.

PCR és gélelektroforézis

Több különböző PCR rendszert dolgoztunk ki, vagy alkalmaztunk saját vizsgálati problémáinkra. Az IBV-nél diagnosztikai és filogenetikai PCR-t dolgoztunk ki az N és S1 génekre. Az NDV esetében Wehmann és mtsai (1997) által kidolgozott módszert alkalmaztuk. A myxoma vírus vizsgálatára az envelope gén egy szakaszát amplifikáltuk.

A gélelektroforézist 2%-os agaróz gélen végeztük 10 V/cm mellett 20 percen át. A festés 1,5 mg/ml EtBr-ben történt.

Szekvenálás és szekvencia-analízis

A szekvenálás a Genotype GmbH (Németország, Hirschhorn) végezte. A szekvencia adatok számítógépes analízise a DNASTar 5.0 program csomaggal történt.

SDS-PAGE

A BP04/2001-et RK-13-an szöveten elszaporítottuk, majd 30 000 g-n ultracentrifugáltuk 12 órán át. A pelletet felszuszpendáltuk és SDS-PAGE-re vittük.

Elektronmikroszkópia

1 mm³ szervmintát (szemháj) 4%-os paraformaldehidben fixáltunk (3 h at 4°C), majd 0,2% glutaraldehiddel kezeltük. 0,2 M PBS-ben mostuk és 1%-os OsO₄ (PBS-ben feloldva) oldatban utófixáltuk. Felszálló etanol sorozattal víztelenítettük, és Durcupan gyantába (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) ágyasztuk. Ultramikrotómmal (Reichert OM U3) 40-60 nm átmérőjű metszeteket vágunk. A metszeteket JEM JEOL 100S electronmikroszkóppal (JEOL Ltd., Akashima, Japan) néztük át.

III. Eredmények, következtetések

Munkánk során igazoltuk, hogy NDV vakcinák homológ kontaminációja esetén az RT-PCR–RFLP módszerrel a LaSota és B-1 törzsek együttes jelenléte felderíthető és az oltóanyag gyári eredetű szennyezettsége igazolható.

A svédországi IB járványesetek vizsgálatára olyan gyors, hatékony új diagnosztikai RT-PCR-t alakítottunk ki, amely a lehető legszélesebb kört felölelve

kínál lehetőséget az állományban előforduló IBV törzsek kimutatására.

Az IBV vakcinatörzs és a vadvírus elkülönítésére kidolgozott „filogenetikai” RT-PCR rendszerrel képesek voltunk a svédországi IB járványesetek háttérében álló Massachusetts és D274 vírusokat azonosítani. Az S1 gén nukleotidszekvenciájának elemzése a Massachusetts vírusokat további alcsoportokra bontotta annak megfelelően, hogy a természetes IB esetek vagy vakcinavírus eredetűek voltak. A „filogenetikai” RT-PCR nem csak a megbetegedések háttérében álló vakcinavírus kiszűrésében jelentős, hanem, mivel egy adott vakcina szerotípus egy más szerotípussal szemben csak korlátozott védelmet biztosít, a mezei vírusok azonosítása révén a hatékonyabb védelmet nyújtó vakcinatörzs kiválasztását is elősegítheti.

Myxomatózis ellen oltott házi nyúlállományban jelentkező aspecifikus myxomatosis vizsgálata során igazoltuk az – eddig csak Franciországbban és Belgiumban leírt – atípusos myxomatosis közép-európai jelenlétét. A genetikai, elektronmikroszkópos és virológiai vizsgálatok a Lausanne referenciatörzsszel 97%-os hasonlóságot mutató törzset mutattak ki. A protein vizsgálat eredménye szerint ez a vírus a klasszikus kórformát előidézőtől különbözik. Az előbbiből hiányzik egy 200 kDa molekulasúlyú protein. Az atípusos myxomatosis törzs vektorok nélküli, közvetlen úton való terjedését állatkísérletben igazoltuk.

IV. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Farsang, A., Ros, C., Renström, L.H.M., Baule, C., Soós, T. and Belák, S. (2002): Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathology*, 31: 229-236.

Farsang, A., Makranszki, L., Dobos-Kovács, M., Virág, Gy., Fábíán, K., Barna, T., Kulcsár, G., Kucsera, L. and Vetési, F. (2003): Occurrence of atypical myxomatosis in Central-Europe: clinico-virological examinations. *Acta Veterinaria Hungaria*, Közlésre elfogadva.

Farsang, A., Wehmann, E., Soós, T. and Lomniczi, B. (2003): Positive identification of Newcastle Disease Virus Vaccine Strains and Detection of Contamination in Vaccine Batches by Restriction Site Analysis of Matrix Protein Gene. *Journal of Veterinary Medicine B*, Közlésre beküldve.

Konferenciák

Poszter: A. Farsang, E. Wehmann, T. Soós és B. Lomniczi: „Genetic methods in vaccine against Newcastle Disease”; EFIS2000, Kazimierz Dolny, Lengyelország, 2000

Poszter: A. Farsang, F. Vetési, M. Dobos-Kovács, L. Kucsera, L. Makranszki, G. Kulcsár, T. Barna és T. Soós: „Clinico-pathological examination of an aspecific myxomatosis”; XIIth International Congress of Virology, Párizs, Franciaország, 2002