

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

**A szarvasmarha vírusos hasmenését okozó vírus és az  
által okozott egyes kórképek vizsgálata**

**PhD értekezés**

**dr. Kővágó Csaba**

**2016**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Prof. Dr. Rusvai Miklós témavezető  
egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány doktora  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Patológiai Tanszék

.....  
Dr. Egyed László  
tudományos munkatárs, Ph.D  
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi  
Intézet

.....  
Dr. Bakonyi Tamás  
egyetemi tanár, Ph.D.  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez az .....sz példány.

.....  
dr. Kővágó Csaba

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Összefoglalás.....	6
2. Summary .....	8
3. Bevezetés, célkitűzések .....	10
4. Irodalmi áttekintés.....	13
4.1. A betegség története, előfordulása .....	13
4.2. A kórokozó.....	14
4.2.1. Rendszertani besorolás .....	14
4.2.2. Morfológia, genomszerkezet.....	14
4.2.3. Biotípus változatok.....	15
4.3. Klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások.....	16
4.4. Diagnosztikai lehetőségek.....	19
4.5. Védekezés a fertőzés ellen .....	21
4.5.1. Vakcinázás .....	21
4.5.2. Mentésítés.....	23
5. Anyag és módszer .....	25
5.1. Szerológiai vizsgálat alá vont állományok, mintavétel.....	25
5.2. Szerológiai vizsgálat .....	26
5.3. A genetikai rekombinációs vizsgálatokban használt genomszekvenciák .....	26
5.4. A BNP vizsgálata során gyűjtött vizsgálati anyag .....	27
5.5. Boncolás, kórszövetteni vizsgálat .....	27
5.6. PCR vizsgálatok .....	27
5.7. Filogenetikai vizsgálat és szekvencia illesztés.....	28
5.8. BVDV törzsek között bekövetkezett rekombinációk vizsgálata.....	28
5.9. Rekombinációra érzékeny, „hot spot” területek keresése .....	29
6. Eredmények.....	30
6.1. Szerológiai felmérés .....	30
6.2. BNP esetek vizsgálata .....	33
6.2.1. Klinikai tünetek .....	33
6.2.2. Kórbonctan, kórszövetten.....	33
6.2.3. PCR vizsgálatok .....	36
6.2.4. Bakteriológiai vizsgálatok.....	36

6.3.	A rekombinációs vizsgálatok eredményei.....	37
7.	Megbeszélés .....	44
7.1.	Szerológiai felmérés eredményeinek megbeszélése .....	44
7.2.	BNP esetek vizsgálati eredményeinek megbeszélése .....	48
7.3.	Rekombinációs vizsgálatok eredményeinek megbeszélése .....	52
8.	Új tudományos eredmények.....	58
9.	Irodalomjegyzék.....	59
10.	Saját közlemények.....	66
10.1.	A dolgozat témájában, referált lapokban megjelent közlemények .....	66
10.2.	A dolgozat témájában tartott előadások .....	66
10.3.	Nem a dolgozat témájában, referált lapokban megjelent közlemények.....	67
11.	Köszönetnyilvánítás .....	68
12.	Melléklet.....	69

## Rövidítések jegyzéke

<b>Ab-ELISA</b>	antibody-binding ELISA	ellenanyag-kimutató ELISA
<b>BNP</b>	bovine neonatal pancytopenia	a borjak újszülöttkori pancytopeniája
<b>BVDV</b>	bovine viral diarrhoea virus	a szarvasmarhák vírusos hasmenését okozó vírus
<b>cDNS</b>	complementary DNS	DNS másolat RNS-ről
<b>CPE</b>	cytopathogenic effect	sejtkárosító hatás
<b>DNA</b>	deoxy-ribonucleic-acid	deoxiribonukleinsav
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immun-adszorpciós vizsgálat
<b>MD</b>	mucosal disease	nyálkahártya betegség
<b>MDBK</b>	Madin-Darby Bovine Kidney	Madin-Darby borjúvese sejtvonala
<b>ORF</b>	open reading frame	nyitott leolvasási keret
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
<b>PI</b>	persistently infected	perzisztensen fertőzött
<b>RDP</b>	recombination detection program	rekombinációt kimutató program
<b>RT-PCR</b>	reverse transcription-polymerase chain reaction	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
<b>UTR</b>	untranslated region	le nem fordított nukleinsav rész
<b>VN</b>	virus neutralisation	vírusneutralizáció

# 1. Összefoglalás

A szarvasmarha vírusos hasmenése (BVD) változatos formában megjelenő betegség, mely súlyos gazdasági veszteségeket okoz az állományokban. A BVD-t okozó vírus a *Flaviviridae* család *Pestivirus* genusába tartozik, egyszálú RNS genommal rendelkezik, amely egy nyílt leolvasási keretet kódol. A vírusnak cytopathogén (cp) és nem-cytopathogén (ncp) biotípusa ismert és a tünetmentes fertőzéstől kezdve, a hasmenésen és a vetélésen át változato kórformák kialakítására képes, iedértve a perzisztens fertőzést és a fatális kimenetelű nyálkahártya betegséget (MD).

Munkánk egyik célja az volt, hogy meghatározzuk a BVDV fertőzöttség prevalenciáját hazánkban, felhasználva egy, az ország nagy területére kiterjedő mintavételi kampány eredményeit. Mivel az utóbbi harminc évben nem történt ilyen felmérés, eredményeink alapul szolgálhatnak további felmérésekhez, melyek a későbbiekben elindítandó BVDV mentesítés megtervezéséhez és ivitelezéséhez nélkülözhetlen.

A vizsgálatokat ELISA módszer alkalmazásával hajtottuk végre, melyhez 1200 vérmintát használtunk fel 54 hazai szarvasmarha állományból. Ezekből a mintákból 521 bizonyult pozitívnak (43,4%), 40 adott kérdéses eredményt (3,3%) és 639 volt negatív (53,3%). A kizárólag negatívnak bizonyult mintákat beküldő gazdaságok közül néhány esetben a szeronegatív eredmény bizonyíthatja a BVDV mentességét az adott állománynak, mivel több éve tejelő tehenekből vettek véreket, így ezek fertőzésmentessége jelzi azt, hogy nincs jelen a telepen a BVDV. Emellett azok között a gazdaságok között, melyek szeropozitívnak mutatkoztak volt néhány, mely igen alacsony prevalenciát mutatott (<5%), sokszor csak egy minta adott pozitív vagy kétes eredményt. Eredményeink alapján, a hazai szarvasmarha állományok egy jelentős része (körülbelül egyharmada) tekinthető BVDV mentesnek, mely lényegesen kedvezőbb adat a korábban becsülnél. Azok a becslések korábbi, kisebb területen és kisebb mintaszámmal elvégzett felméréseken alapultak. Így egy a közeljövőben eseleg indítandó országos mentesítési kampány kedvezőbb helyzetből indulhat és az IBR mentesítés mellett párhuzamosan is folytatható.

A borjak újszülött kori pancytopeniája egy olyan, korábban ismeretlen, de a BVDV-fertőzéssel összefüggésben jelentkező kórkép, amelynek kialakulására született feltételezéseket, elméleteket összefoglaltam, és saját vizsgálatok alapján ismertettem a legjellemzőbb tüneteket és kóros elváltozásokat, mivel a kórkép 2008 telén és 2009 tavaszán előfordult Magyarországon is, és nagyjából egy éven át több elhullással is járt. A jelenleg

elfogadott elmélet szerint immunpatológiai alapon kialakuló kórkép hazai eseteiből egyszer sem sikerült semmilyen kórokozót sem kimutatnunk. Eredményeink, továbbá a megfigyelt tünetek és a kialakult kórbonctani és kórszövettani elváltozások sem tértek el a nemzetközi szakirodalomban leírt esetekétől. Így saját vizsgálataink is megerősítették a kórkép BVD-elleni vakcinázással összefüggésbe hozható immunpatológiai kóroktanát.

A rekombináció az egyik alapvető módja annak, hogy a vírusok rövid idő alatt akár jelentős mértékben megváltoztassák genetikai állományuk egy részét. Annak érdekében, hogy a BVDV törzsek között lehetséges rekombinánsokat mutassunk ki, a GenBank-ból származó teljes BVDV-1 és BVDV-2 szekvenciákat vizsgáltunk, melyek. A kiválasztott szekvenciákat egymáshoz illesztettük és az illesztést bioinformatikai elemzésnek vetettük alá. Eredményeink azt mutatják, hogy a rekombináció nem ritka a BVDV esetén. A rekombinációk létrejöttét elősegítheti a vírusnak az a tulajdonsága, hogy képes perzisztens fertőzés kialakítására, mivel ebben az esetben a fertőzött egyed nem termel specifikus ellenanyagokat a vírussal szemben. Ekkor egy antigénjeiben rokon, de genetikailag eltérő BVDV törzs szimultán fertőzheti az egyedet, megteremtve a rekombináció lehetőségét. A vizsgált 62 BVDV-1 törzs között 5 rekombináns találtunk, míg az 50 BVDV-2 törzsből csak egy bizonyult rekombinánsnak. Ezeknek a törzseknek az esetében a rekombináció bekövetkeztét alacsony ( $1.26 \times 10^{-4}$  és  $1.58 \times 10^{-310}$  közötti) p-értékek igazolják, és legtöbb esetben a vélhető "szülői" törzsekhez közelszekvenciák is azonosíthatóak voltak. Az újonnan talált rekombináns törzseken kívül sikerült korábban azonosított rekombinációkat megerősíteni vagy módosítani az általunk használt RDP 4.46 BETA program segítségével.

## 2. Summary

Bovine viral diarrhoea is a viral disease appearing in various forms and causing high economic losses in the cattle stocks. The BVD virus belongs to the *Flaviviridae* family, *Pestivirus* genus, with ssRNA genome, which has one open reading frame. The virus has cytopathogen and non-cytopathogen biotypes and causes various forms of diseases in cattle from unapparent infection, through diarrhoea and abortion to persistent infection and fatal mucosal disease.

One aim of the study described in the present work was to determine the prevalence of the BVDV in Hungary by a monitoring survey carried out on samples collected in cattle keeping units throughout the country. Since no such survey has been carried out in Hungary during the last thirty years, our study may serve as a basis for later monitoring examinations aimed to follow the progress of an expected BVDV eradication campaign.

The examinations were carried out using ELISA on 1200 blood samples sent from 54 cattle stocks. From a total of 1200 samples 521 proved to be positive (43.4%), 40 gave doubtful result (3.3%), while 639 was negative (53.3%). Among the stocks there were some, where the samples were collected from cows serving already through several lactation periods, therefore the seronegativity indicates the BVDV free status of the given stock. Moreover among the positive herds we found a few, where the seropositivity rate was rather low ( $x < 5\%$ ). According to the results of the investigation, a rather high portion (about one third) of the cattle keeping units of Hungary can be regarded as BVDV free, which ratio is much better than it has been anticipated, based upon surveys carried out on lower number of samples and in smaller regions of the country. Hence the chances of an eradication campaign launched in the near future, or carried out parallel with the IBR eradication are better than expected.

Bovine neonatal pancytopenia is a previously unknown syndrome of calves, which was connected to BVDV infection, but its aetiology has not been explained up to the last times. In this work the theories circulating previously to explain the development of the disease are summarized. The most characteristic clinical symptoms and pathological lesions are introduced based on our own observations, since the syndrome appeared on the winter of 2008. and spring of 2009. also in Hungary, and caused several fatalities. No pathogens could be demonstrated from the local cases of the disease, and the pathological lesions and clinical symptoms did not alter from the ones described in the international literature. Thus our own



examinations also support the immunological background of the disease and can be correlated with use of a certain kind of vaccine used in cattle stocks to reduce losses caused by BVD. Recombination is a basic mechanism through which are able viruses to change their genetic structure quickly and profoundly. To identify possible recombination events of BVDV, complete genome sequences of BVDV-1 and BVDV-2 strains deposited in the GenBank were submitted to bioinformatic analysis using recombination detecting softwares. The results indicate that recombination events are not rare in the case of BVDV, which frequently causes immunotolerance and consequently, persistent infection in calves. The lack of specific immunity provides an ideal possibility for multiple infections by antigenically related, but genetically different BVDV strains and hence recombinations may occur. Among the 62 BVDV-1 genomes five recombinants and their possible parent strains, while among the 50 BVDV-2 genomes one recombinant and its parent strains were identified, which were supported by extremely strong probability values (p values vary between  $1.26 \times 10^{-4}$  and  $1.58 \times 10^{-310}$ ). Besides the freshly identified recombinants, recombination events described previously were confirmed, but in some of these, former information was completed with new data, or different parent(s) were suggested by the program (RDP 4.46 BETA) used in this study.

### 3. Bevezetés, célkitűzések

A szarvasmarhák vírusos hasmenését okozó vírus (bovine viral diarrhoea virus; BVDV) Európa számos országában vezető állategészségügyi probléma a szarvasmarha-állományokban. A vírus által okozott fertőzés változatos kórformákat idézhet elő, a szubklinikai fertőzöttségtől és szerológiai áthangolódástól kezdve, a súlyos hasmenéses kórképen és reprodukciós zavarokon keresztül, egészen az esetek jelentős részében fatális kimenetelű nyálkahártya betegségig (mucosal disease; MD). Az említett kórfolyamatok részben közvetlen veszteségeket okoznak a hasmenés és az elhullások révén, de emellett az okozott szaporodásbiológiai zavarok lényegesen csökkentik az állomány reprodukív kapacitását, a fertőzéssel járó immunszuppresszió pedig növeli a más (pl. fakultatív) kórokozók iránti fogékonyságot.

A betegség bélgyulladásal járó formáját először 1946-ban az Amerikai Egyesült Államokban írták le, majd később, 1953-ban egy ettől némileg eltérő tünetegyüttest figyeltek meg, mely szintén a szarvasmarhákban jelent meg, de súlyos nyálkahártya-kifekélyesedéssel, és az érintett egyedek elhullásával járt. A kórképet a tünetek alapján nyálkahártya betegségnek nevezték el. A további vizsgálatok 1961-re kiderítették, hogy a két kórkép azonos kórokozóra vezethető vissza, melyet borjak vírusos hasmenését okozó vírusnak (BVDV) neveztek el. A kórkép hazánkban az első leírás után nem sokkal megjelent, de a kórokozót csak az 1960-as évek elején sikerült izolálni.

A kórokozó BVDV a *Flaviviridae* család *Pestivirus* genusába tartozik, és mára már világszerte elterjedt. A BVDV törzsek jelenleg két külön vírusfajba (BVDV-1 és BVDV-2) tartoznak, melyek a hasonló nevű (szero)típusokat foglalják magukba. Ezek közül az utóbbi hosszabb ideig csak az amerikai kontinensen volt megtalálható, az elmúlt 10-15 évben azonban számos új területen, így Európában is kimutatták a jelenlétét. Hazánkban pillanatnyilag a BVDV-1 a meghatározó, BVDV-2-est még nem sikerült kimutatni.

A törzsek képesek transzplacentárisan megfertőzni a magzatot. Ha ez a fertőzés az immunkompetencia kialakulása előtt történik, akkor immuntolerancia alakulhat ki, és ezáltal a vírussal fertőzötten születő, és azt élethosszig hordozó, ún. perzisztensen fertőzött (persistently infected; PI) borjak jelennek meg az állományban. A perzisztens fertőzés kialakulása azért rendkívül veszélyes, mert a gazda ebben az esetben szeronegatív marad, így azonosítása a hagyományos szerológiai módszerekkel nem lehetséges, de egész élete során nagy mennyiségben üríti a fertőzőképes virionokat. Ezért a PI állattal vagy váladékaival

érintkezve a csoport többi tagja is fertőződhet, aminek a következménye a szerokonverzió a korábban egészséges egyedeknél, és a már említett reprodukciós problémák a vemhes állatokban. A tartós vírushordozás másik következménye, hogy amennyiben a PI állatokban levő vírus genetikailag megváltozik (mutáció vagy rekombináció révén) akkor ezekben az egyedekben kialakulhat a nyálkahártya betegség. Vizsgálataink során mi is számos esetben találkoztunk (nem egyszer halmozottan jelentkező) nyálkahártya betegséggel.

Tekintve, hogy hazánkban 2014-ig nem jelent meg a BVDV fertőzöttség felméréséről az ország teljes területére kiterjedő vizsgálatok eredményeit összefoglaló közlemény, ezért a lehető legtöbb, nagy létszámú, magyarországi szarvasmarha telep bevonásával új szerológiai vizsgálatosorozatot terveztünk. Vizsgálati módszernek a vírus ellen termelődő ellenanyagok vérsavóból történő kimutatását választottuk, mivel az ellenanyagok hosszan perzisztálnak a vérben, így megbízhatóbb adatokat kaphatunk a kórokozó prevalenciájával kapcsolatban, mint a direkt víruskimutató módszerek segítségével. Vizsgálatunk célja a járványtani adatgyűjtésen kívül az volt, hogy segítsük az egyes gazdaságokban önkéntesen megindított BVDV mentesítést. A fertőzöttség lehetőleg minél alaposabb felmérésének hiányában ugyanis nem lehet eredményesen megtervezni a mentesítés stratégiáját, hiszen a választható módszerek közül a fertőzöttség arányának ismerete alapján lehet kiválasztani a leghatékonyabb eljárást. Mivel Magyarországon is esedékes lenne az országos, központilag támogatott BVDV elleni mentesítés elindítása, így a vírus prevalenciájának ismerete segíti a későbbi döntéshozatalt. Szerettük volna megtudni, hogy vannak-e olyan állományok a vizsgálatba bevontak között, amelyekben a vírus nincs jelen, mert az ezekből származó állatok lehetnek a forrásai a jövőben a kiselejtezendő tenyésanyag pótlásának a súlyosan fertőzött állományokban. A súlyosan fertőzött állományokban valószínűsíthető a PI egyedek jelenléte, melyek elősegítik a kórokozó folyamatos fennmaradását az állatokban.

Ugyancsak vizsgálni kívántuk egy új, a különböző statisztikai-analitikai módszereket ötvöző rekombináció-azonosító eljárást használva az új genotípusok megjelenését eredményező genetikai rekombinációk gyakoriságát és esetleges következményeit a BVDV evolúciójában. Ezt azért tartottuk lényegesnek, mert hazánkban is több évtizeden keresztül, kiterjedten használtak olyan élővírusos vakcinát, amely esetleg perzisztens fertőzést okozhatott, amennyiben vemhes állatok oltására használták. Továbbá, az ilyen oltóanyagot alkalmazó állományokban fennmaradva, új BVDV variánsok kialakulását indukálhatta szimultán fertőzések és következményes rekombinációk révén. Jelen kutatásunkban arra kerestük a választ, hogy a BVDV milyen, részben egyéb BVDV törzsekből, részben esetleg más

pestivirusokból származó rekombinációkat hordozhat, és egyáltalán, mennyire tekinthető gyakorinak a rekombináció a BVDV evolúciójában.

Vizsgálataink egyik további célja volt egy elsődlegesen a BVDV-fertőzött, és az ellen a vemhes tehenek vakcinázásával védekező állományokban előforduló kórkép, a borjak újszülöttkori pancytopeniája (bovine neonatal pancytopenia, BNP) néven ismert betegség hazai előfordulásának és a BVD-vel való esetleges kapcsolatának vizsgálata, mivel a kórkép magyarországi előfordulása idején ez az összefüggés még nem volt tisztázott.

## 4. Irodalmi áttekintés

### 4.1. A betegség története, előfordulása

A vírus által okozott hasmenéses kórkép (bovine viral diarrhoea, BVD) első leírására 1946-ban az Amerikai Egyesült Államokban került sor (Olafson et al. 1946). Később, 1953-ban egy ettől jelentősen eltérő tünetegyüttest figyeltek meg, mely szintén a szarvasmarhákon jelent meg, de súlyos nyálkahártya-kifekélyesedéssel és a betegek nagyarányú elhullásával járt. A kórképet a tünetek alapján nyálkahártya betegségnek (mucosal disease, MD) nevezték el (Ramsey és Chivers 1953). A további vizsgálatok 1961-re kiderítették, hogy a két kórkép azonos kórokozóra vezethető vissza, melyet borjak vírusos hasmenését okozó vírusnak (bovine viral diarrhoea virus, BVDV) nevezték el (Coggins et al. 1961). A vírus mára már világszerte, így hazánkban is elterjedt. A vírusnak eredetileg a szarvasmarha a gazdafaja, de egyéb tülkösszarvúakból (juhból, kecskéből, jakból) és eltérő fajokból (sertésből) is izolálták (Deng et al. 2014).

A genetikai és ezzel együtt antigenitásbeli különbségek alapján a BVDV törzseket jelenleg két vírusfajba sorolják (BVDV-1; BVDV-2), melyek közül a kettes jelű vírusfaj hosszabb ideig csak az amerikai kontinensen volt kimutatható, de az elmúlt 10-15 évben számos új területen, így Európában is megjelent. Hazánkban pillanatnyilag csak a BVDV-1 fordul elő, a BVDV-2-est eddig még nem nutatták ki.

A BVDV okozta kórképet az első leírás után nem sokkal hazánkban is felismerték, de a kórokozót csak az 1960-as évek elején sikerült izolálni (Manninger et al. 1963). Magyarországi elterjedtségét illetően sokáig csak becslések álltak rendelkezésre, mert hazánkban 2014-ig nem jelent meg a BVDV fertőzöttséget felmérő, az ország teljes területére kiterjedő vizsgálatokról készült közlemény. Az egy-egy kisebb régióra kiterjedő szerológiai vizsgálatokra alapozott feltételezések közel 100%-osnak tartották a magyarországi nagylétszámú szarvasmarha-állományok fertőzöttségét (Kudron 1999; Varga et al. 1999).

A vírusfertőzés közvetlen és közvetett kártétele egyaránt jelentős, sőt, indirekt kártétele (a fejlődésben való lemaradás, a rosszabb takarmányértékesítés, a reprodukciós zavarok, az immunszuppresszió miatti másodlagos fertőzések stb. miatt) nagyobb veszteséget jelenthet, mint az állatok gyógykezelésével, illetve az egyes egyedek elhullásával összefüggő kiadások. Európa számos országa mentesítési kampányokat indított, néhány ország pedig a

szarvasmarha-állományok mentesítését sikerrel be is fejezte (Ózsvári et al. 2001; Szabára és Ózsvári 2013)

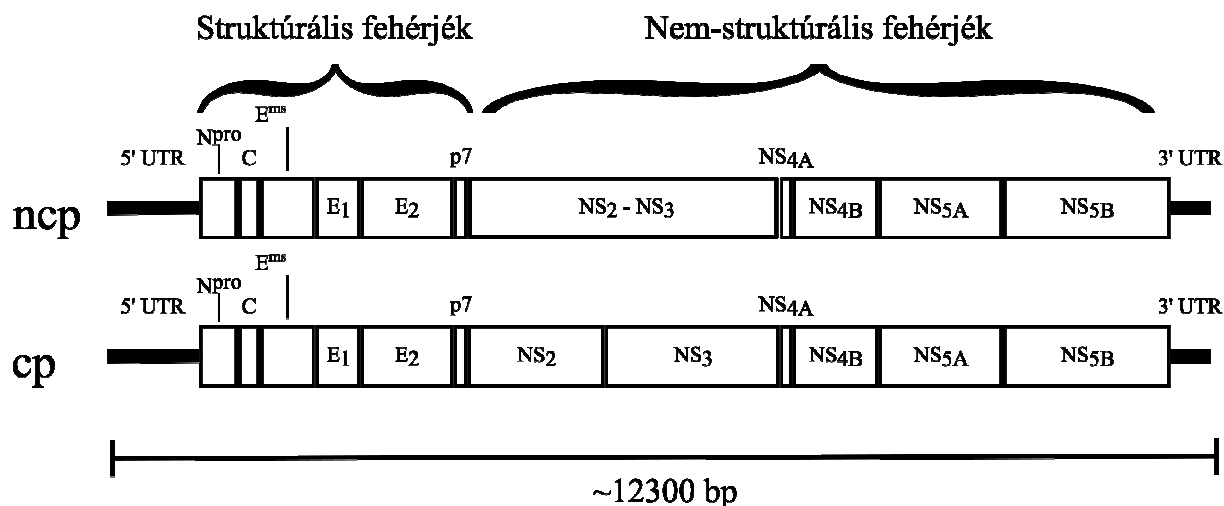
## **4.2. A kórokozó**

### **4.2.1. Rendszertani besorolás**

A BVDV vírus a Baltimore féle besorolás szerint a pozitív irányítottágú, szimplaszálú, RNS genommal rendelkező (+ssRNS) vírusok közé tartozik. A *Flaviviridae* család tagja, azon belül a *Pestivirus* genusba sorolják, amelybe jelenleg négy vírusfaj tartozik, ezek a következők: a BVDV két faja (BVDV-1; BVDV-2), a klasszikus sertéspestis vírusa (*Classical swine fever virus*; CSFV) és a juhok border betegségének vírusa (*Border disease virus*, BDV). A törzsek 5'UTR végszakaszának (untranslated region, le nem fordított génterület) genetikai vizsgálata alapján kiderült, hogy a BVDV további genotípusokba sorolható, melyeket a latin ABC betűivel jelölnek: 1-es genotípus esetén BVDV-1a-o, míg 2-es genotípus esetén BVDV-2a-d (Becher et al. 2003; Sato et al. 2016).

### **4.2.2. Morfológia, genomszerkezet**

A virion 40-60 nm átmérőjű ikozaéder alakú kapsziddal rendelkezik, amelyet lipidburok (envelop) vesz körül. A genom általában ~12200 bázis hosszúságú, mindkét végén UTR régiókkal. A kódoló szekvencia egyetlen nyitott leolvasási keretet (open reading frame; ORF) tartalmaz, amely egyetlen virális polipeptidet kódol. A keletkező fehérje részben autoproteáz aktivitása, részben pedig gazdasejt eredetű proteázok segítségével darabolódik fel a funkcionális fehérjékre. A vírus funkcionális fehérjéi a következők: N<sup>pro</sup>; C; E<sup>ms</sup>, E1; E2; p7; NS2; NS3; NS4a; NS4b; NS5a és NS5b (Collett et al. 1988). Ezek közül immunológiailag igen fontosak az envelop fehérjéit kódoló E1 és E2 szakaszok, mivel ezek azok a fehérjék, amelyek ellen a gazdaszervezetben protektív hatású ellenanyagok termelődnek (Rumenapf et al. 1993). Kórtani szempontból a nem-strukturális fehérjék közül az NS2 és NS3 lényeges, mivel a vizsgálatok szerint ezeknek a fehérjéknek a működése, illetve a két fehérjének az egymástól történő genombeli elválasztódása (1. ábra) alapvetően befolyásolja az adott vírustörzs *in vitro* és *in vivo* tulajdonságait (Becher és Tautz 2011). A két gén elválasztódása esetén *in vitro* sejtenyészetekben sejtkárosító hatás (cytopathic effect, CPE) alakul ki, a fertőzött állatokban pedig a vírus fokozott patogenitásúvá válik (l. később).



1. ábra: A BVDV nem citopatogén (ncp) és citopatogén (cp) változatának genetikai különbségét bemutató sematikus rajz Ammari et al. (2012) nyomán.

Az E<sup>ms</sup> felületi glükoprotein, amely a vírus immunszuppresszív tulajdonságáért felel (Bruschke et al. 1997). Az UTR régiók közül az 5' végen található a vizsgálatok alapján nagyon konzervatív terület belső riboszóma-kötő helyet (internal ribosoma entry site, IRES) tartalmaz (Poole et al. 1995), így a transzláció megkezdéséért felelős, míg a 3' végen található UTR fontos szerepet játszik mind a transzlációban, mind a nukleinsav replikációjában (Yu et al. 1999).

#### 4.2.3. Biotípus változatok

A BVDV törzsek, akár az 1-es akár a 2-es genotípusba tartoznak, szövettényeszetekben történő *in vitro* szaporodásuk során megfigyelhető sejtkárosító tulajdonságuk alapján kétféle biotípusba sorolhatók: a citopatogén (cp) illetve a nem citopatogén (ncp) csoportba. A törzsek nemcsak a sejttényeszeten való szaporításuk közben megfigyelhető sejtelváltozások (lekerekedés, rögsödés, sejtlízis), hanem a gazdaállatban kifejtett kórokozó-képességük alapján is elkülönülnek, ugyanis a BVDV esetében a sejtkárosító hatás (citopatogenitás) és a kórokozó-képesség (patogenitás) háttérében azonos genetikai jellegzetesség áll (Houe 1995). A sejtkárosító képesség kialakulását egy genetikai mutáció eredményének tekintik, amely az NS2-NS3 régió között egy enzimatiság vágáshely kialakulását idézi elő. Ezáltal a két fehérje egymástól független működésre válik képessé (1. ábra). Ennek eredményeképpen a sejttényeszeten a fertőzött sejtek lekerekednek, elvesztik tapadásukat a felülethez és végül elpusztulnak. Ezzel szemben, amennyiben az NS2-NS3 fehérjepár nem válik szét, úgy a

multiplikáció során semmilyen, a fertőzésre utaló jelet nem lehet tapasztalni mikroszkópos vizsgálattal a sejtenyészeten (Lackner et al. 2004).

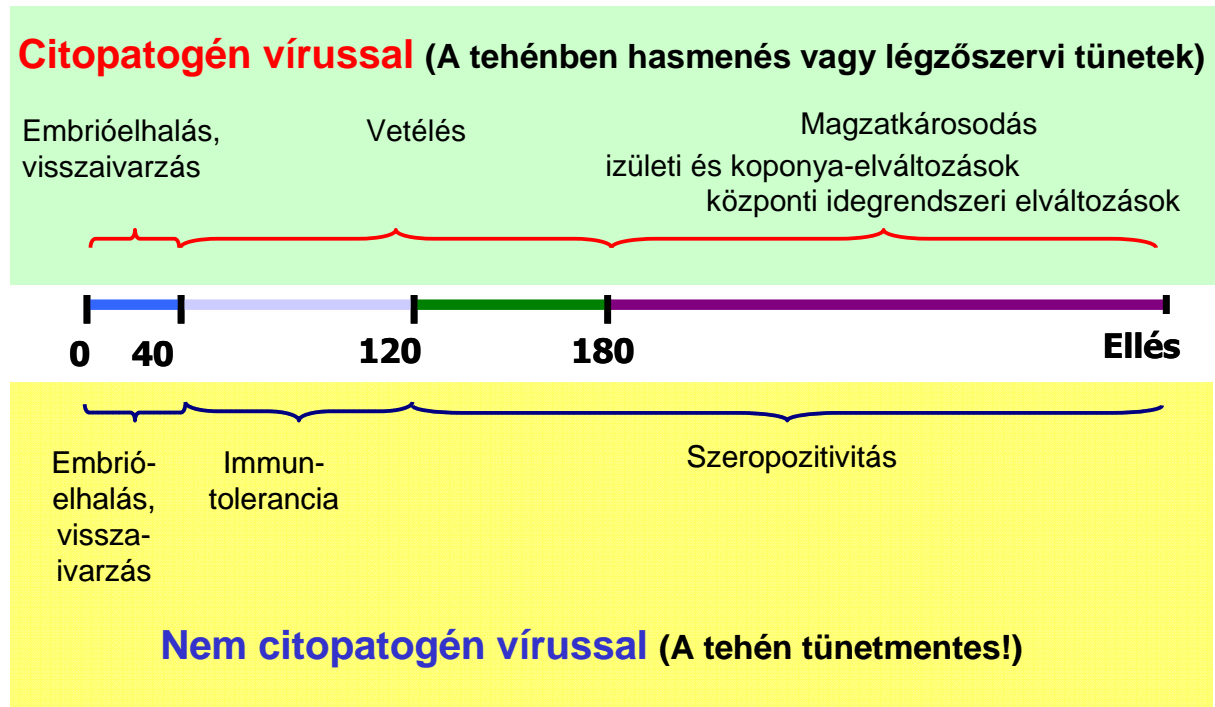
Klinikai szempontból a tapasztalatok szerint a cp biotípusú törzsek általában tünetekben megnyilvánuló kórképet idéznek elő, míg az ncp törzsek virulenciája csökkent. Feltételezések szerint előbb a cp törzs volt jelen, de ez a tulajdonság a vírus túlélése szempontjából hátrányos volt, mert a gazda elhullásához vezetett, ezzel korlátozta a vírus terjedését is. Valószínű, hogy mutáció során később egyes törzsek elvesztették a cp tulajdonságukat, így lényegesen megnőtt az esélyük a fennmaradásra és a fertőzés eredményes továbbvitelére (Goens 2002). A vizsgálatok alapján az a feltételezés honosodott meg, hogy az ncp törzs visszazerezheti cp képességét, mégpedig valamilyen genetikai változás, mutáció vagy, gyakrabban genetikai rekombináció által (Tautz et al. 1998; Bálint et al. 2005). Más feltételezés szerint a vírusfertőzés egyes fázisai alatt ugyanaz az ncp-nek tartott törzs szabályozottan citopatogén, mivel a fertőzés kezdetén, amíg még nincs elegendő mennyiségű virion, kedvező, ha a fertőzött sejt pusztulása révén a környezetébe nagy mennyiségű aktív virion jut, ezzel biztosítva a környező sejtek fertőződését. A fertőzés előrehaladtával a vírus kikapcsolja ezt a funkcióját, ezáltal beáll egy viszonylagos egyensúly a gazdaszervezet egészségi állapota és a fertőzést okozó vírus szaporodása között. A cp törzs működése ettől annyiban tér el, hogy a genetikai változás miatt nem képes kontrolálni a cp képességét, ezáltal a fertőzés minden fázisában elpusztítja a fertőzött sejteket, és életkortól függő formában megjelenő, akár súlyos tünetekhez vagy a gazdaszervezet pusztulásához is vezető kórképet (magzatelhalás, magzatkárosodás, enteritis, nyálkahártya betegség) idézhet elő (Becher és Tautz 2011).

### **4.3. Klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások**

A BVDV fertőzés az esetek nagy többségében tünetmentesen zajlik, de rendszeresen előfordul klinikai tünetekkel járó kórkép, sőt esetenként elhullást előidéző forma is. A betegség jellegében és súlyosságában elsődleges szerepe van a fertőző törzs korábban említett *in vitro* sejtkárosító (cp) tulajdonságának. A cpBVDV fertőzés az egészséges, nem vemhes szarvasmarhában hasmenéssel járó kórképet idézhet elő, míg az ncpBVDV törzs gyakran tünetmentes fertőzést, szerológiai áthangolódást és legfeljebb enyhe immunszuppressziót okoz.



Vemhes tehén fertőzésekor a klinikai képet és a gynecopathologiai következményeket nem csak a vírus biotípusa, hanem a fertőzés időpontja is befolyásolja (Abutarbush 2010; Kahn 2010). A fertőzés lehetséges következményeit a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A BVDV citopatogén (cp) és nem citopatogén (ncp) változatával való fertőzés következménye az anyai és a magzati szervezetben a vemhesség különböző fázisaiban

A 2. ábrán látható, hogy a magzat fokozottan érzékeny a virulensebb cpBVDV törzssel való fertőzésre. A kezdeti szakaszban embrióelhalás, embriófelszívódás és visszaivarzás jelentkezik, a későbbiekben pedig gyakran alakul ki vetélés, illetve a vemhesség utolsó harmadában magzatkárosodás. Ez utóbbi esetben csontrendszeri elváltozások (ankylosis, végtagdeformitás, koponyatorzulás), illetve a csontrendszer kialakulását követő időszakban történt *in utero* fertőzés esetén a központi idegrendszer fejlődési zavarai (hydrocephalia, cerebellaris hypoplasia) jelentkezhetnek.

A kevésbé virulens ncpBVDV törzsek csak a vemhesség legkorábbi szakaszában végzetesek az utódszervezetre. Ekkor ugyancsak embrióelhalást, embriófelszívódást okoznak, a tehén pedig visszaivarzik. Amennyiben a vemhesség kb. 40. napja után, de még az immunkompetens szervek (csontvelő, thymus, lép stb.) kialakulása előtt fertőződik a magzat, akkor az immunitásban, a saját-idegen antigének elkülönítésében kulcsszerepet játszó magzati sejtek funkcionális kialakulása alatt jelenlevő vírusantigént is sajátjaként fogadja el a

szervezet, az immunsejtek a vírus jelenlétét a továbbiakban tolerálják. Az önfelismerés szakaszában (kb. a vemhesség 40-120 napja között) *in utero* fertőződött, és ezért a BVDV iránt immuntoleránsan született borjakban a vírus folyamatosan jelen marad, így alakulnak ki a PI egyedek. A kórformák közül a vírus fennmaradása és evolúciója szempontjából legnagyobb jelentőségű a perzisztens fertőzés, mivel ebben az esetben a vírus hosszú időn át képes ürülni a PI állatból, a kialakult immuntolerancia miatt az ilyen egyed vakcinázása hatástalan. A PI állat közvetítésével a vírus horizontálisan és vertikálisan egyaránt képes terjedni (Kelling és Topliff 2013).

Amennyiben a perzisztensen fertőzött, immuntoleráns állat szervezetében a vírus mutálódik vagy rekombinálódik és a korábban említett genetikai változás következtében a vírus ncpBVDV biotípusából cpBVDV biotípusává alakul át, akkor a védekezőképesség teljes hiánya miatt az állatban súlyos klinikai tünetekkel járó, legtöbbször végzetes kimenetelű MD alakul ki. Ez akkor is előfordulhat, ha a PI állat felülfertőződik cpBVDV törzsszel (Meyers és Thiel 1996).

A MD során a nyálkahártya hámrétegében ballonizáló elfajulás, hámsejtelhalás és -leválás figyelhető meg. Kezdetben a száj- és garatüregben, majd a nyálkahártya-elváltozás kiterjed az emésztőcső teljes hosszára. Klinikailag hasmenés, esetleg vércsíkos hasmenés figyelhető meg. A nyálkahártya betegség tüneteiben beteg állatok többnyire elhullanak. Ez a kórforma azonban ritka, és általában a borjakat vagy növendék szarvasmarhákat érinti. A kórbonctani vizsgálat során a jelentősen megnagyobbodott nyirokcsomókban heveny reaktív gyulladás észlelhető. A peritoneum és a vese tokja alatt multiplex pontszerű vérzéseket, továbbá a vékonybélben a Peyer-plakkokra lokalizálódó diphteroid gyulladást, súlyos fokú heveny mesenterialis nyirokcsomó-gyulladást, a vastagbélben kiterjedt heveny vérzéses-elhalásos gyulladást, a májban pedig reaktív hepatitiszt lehet megfigyelni (Tautz et al. 1998).

A kórszövettani vizsgálat során a nyirokcsomókban és a Peyer-plakkokban kifejezett lymphoid depletio, továbbá a nyirokképletek feletti bélszövetben az eredeti hisztológiai szerkezet teljes destrukcióját, fibronectin (diphteroid) gyulladás jeleit, továbbá a submucosa réteg kitágult vérereiben haemostasisra, illetve microthrombosisra (disseminált intravasculáris coagulopathia, DIC) és nyirokérthrombosisra utaló elváltozásokat lehet látni. A vastagbélben a mucosa kiterjedt necrosis, a propria és a submucosa gyulladással vizonyóje, gyulladással-sejtes beszűrődése, vérereinek tágulata, haemostasis és DIC, továbbá erythrocytodiapedesis jelei tapasztalhatók (Tautz et al. 1998).

Amennyiben a nem vírusos hordozó, immunkompetens szarvasmarha a megszületése után (legtöbbször borjú- vagy növendékkorban) találkozik először cpBVDV törzsszel, akkor a

betegség nevében is megjelenő kórforma, azaz hasmenés jelentkezik. A 7-9 napos lappangási idő után jelentkező, lázzal, nyálkás vagy esetenként vércsíkos hasmenéssel járó kórkép kísérő tüneteként centrális szaruhártya-homály is kialakulhat. A nagy virulenciájú törzsek vérzéssel járó elváltozást is képesek előidézni. Klinikai tünetként véres hasmenés, nyálkahártya-vérzések, orrvérzés jelentkezhet, illetve kórboncoláskor a savóshártyák alatt petechialis vérzések is láthatók. Következésképpen anaemia és thrombocytopaenia alakulhat ki. A betegségnek ez a formája általában letális kimenetelű (Tautz et al. 1998).

A BVDV által kiváltott immunszuppresszió alapja az, hogy a vírus gátolja az antigénprezentáló sejtek működését. Emellett az N<sup>pro</sup> és E<sup>ms</sup> fehérjék gátolják az apoptózist, az utóbbi fehérje ribonukleáz aktivitása révén pedig szelektív sejthalált idéz elő a lymphocytákban, ezáltal csökkenti az immunrendszer aktivitását (Bruschke et al. 1997; Peterhans és Schweizer 2013). A BVDV immunszuppresszív hatása miatt a fertőzés hajlamosít egyéb kórokozókvaló társfertőzésekre. Gyakran előfordul ilyen eset a szarvasmarhák fertőző rhinotracheitisét okozó herpeszvírussal (*Infectious bovine rhinotracheitis*; IBR, *Bovine herpesvirus 1*, BHV-1), parainfluenza 3 (PI-3) vírussal, illetve különböző fakultatív patogén baktériumokkal (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* stb.). Légzőszervi kórokozókvaló szövődött BVDV fertőzés esetén elsősorban a légzőszervi tünetek dominálnak, de leírtak olyan BVDV törzset is, mely önmagában is képes alsó légúti tünetek kialakítására (Baule et al. 1997).

#### **4.4. Diagnosztikai lehetőségek**

A szarvasmarha-állományokban a borjakban jelentkező hasmenéses kórképek esetén feltételezhető a BVDV által okozott fertőzés, de el kell különíteni az egyéb vírusok (pl. rota-, corona-, adenovírusok stb.) illetve bakteriális kórokozók (pl. *Escherichia coli*) által okozott betegségektől. Mint minden más fertőző betegség esetében, a BVDV-fertőzés azonosítása során is a vírus direkt vagy indirekt kimutatása jelenti a biztos diagnózist.

A vírus direkt kimutatására, azaz a vírusnak, vagy valamelyik összetevőjének (fehérjéjének vagy nukleinsavának) kimutatására több módszer alkalmas. A különböző biológiai mintákból a fertőzőképes vírus borjúhere- vagy orrkagylóhám eredetű primer sejttenyészetben, esetleg Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) sejtvonalon izolálható. Az izolálást megnehezíti, hogy egyrészt az ncp vírus kimutatásához egyéb módszerrel (pl. immunfluoreszcens vagy immunperoxidáz festéssel) kell láthatóvá tenni a fertőzött sejteket, másrészt mind a primer

sejttenyészet, mind pedig a sejtvonal esetében előfordulhat, hogy eleve fertőzöttek ncpBVD-vel (Dubovi 2013).

A kórokozó fehérjéi kimutathatók a beteg egyedek szöveteiből és testváladékaiból direkt antigén-kimutató eljárásokkal, Ag-ELISA, illetve immunfluoreszcens (IF) vagy immunperoxidáz festés (peroxidase-linked assay, PLA) alkalmazásával. Mindegyik módszer használható cp- és ncpBVDV törzsek kimutatására egyaránt. Az ELISA módszer további előnye, hogy részben automatizálható, így tömegvizsgálatok végzésére alkalmasabb (Brinkhof et al. 1996; Roehrig 2003).

A jelenleg egyik leggyakrabban alkalmazott, megbízható és gyors direkt víruskimutató módszer a reverz transzkripciót követő polimeráz-láncreakció (RT-PCR). Az eljárás érzékeny és specifikus, továbbá a vírusnukleinsav kimutatásán kívül a reakció során keletkezett amplicon nukleotid-sorrendjének meghatározása (szekvenálása) révén a vírustörzs filogenetikai besorolásához, rokonsági viszonyainak meghatározásához is információt adhat (Lanyon et al. 2014).

Az *indirekt víruskimutató eljárások* a kórokozó ellen a gazdaszervezetben termelődött specifikus ellenanyagok kimutatását célozzák. Ezek az eljárások hasznosak lehetnek egy nagyobb állatcsoport fertőzöttségének felderítésében, mivel az ellenanyagok lényegesen hosszabb ideig perzisztálnak a vérben, mint a vírus, illetve a vírussal fertőzött lymphocyták. A módszerek hátránya, hogy a friss fertőzést követő néhány napig még negatív eredményt adnak, és az immuntoleráns, vírushordozó és -ürítő PI állatokat sem képesek kimutatni (Dubovi 2013).

A BVD-diagnosztikában a legszélesebb körben használt indirekt víruskimutató eljárás az ellenanyag-kimutató ELISA (Ab-ELISA). Mintául általában vérsavót vagy tejmintát használnak, amelyből az eljárás segítségével egyszerűen, steril környezetet és munkavégzést nem igénylő módon kimutatható az ellenanyag. A módszer használata kombinálható marker vakcinával történő mentesítési eljárással. Ebben az esetben az ún. diszkriminatív ELISA alkalmazásával kideríthető, hogy az esetleges szeropozitivitás vakcinázás következménye-e, vagy vad vírus fertőzés hatására jött létre (Durham és Hassard 1990; Cho et al. 1991).

A vírusneutralizációs (VN) próba kifejezetten a kórokozó ellen termelődött neutralizáló ellenanyagok kimutatására és mennyiségének meghatározására szolgál, ezért továbbra is nélkülözhetetlen pl. a vakcinázás hatékonyságának felmérését célzó vizsgálatok során (Dubovi 2013).

## **4.5. Védekezés a fertőzés ellen**

A BVDV fertőzés okozta gazdasági károk elleni védekezésnek alapvetően két módja van, a vakcinázás és a mentesítés, valamint a kettő együttes alkalmazása.

### **4.5.1. Vakcinázás**

Egy állomány endémiás fertőzése esetén a vakcinázás csökkenti a vírus kártételét, de nem szünteti meg a vírus jelenlétét az adott populációban. Azokban az esetekben, amikor egy állományban vagy egy földrajzi területen a vírus prevalenciája nem túl nagy, a vakcinázás helyett a mentesítésre célszerű törekedni (Ridpath 2010).

Az immunizálást a borjak 4-6 hónapos korában kell elkezdeni. Tenyészállatok esetén a teheneket vagy üszöket a termékenyítés előtt 4-5 héttel emlékeztető oltásban célszerű részesíteni. Így egyrészt védjük a magzatot a magzatkárosodástól és az immuntolerancia kialakulásától, másrészt megfelelő maternális immunitással látjuk el a majdani születő borjakat. A vakcinázás után érdemes szerológiai vizsgálatnak alávetni az állományt, mivel azok az állatok, melyek az immunizálás hatására nem hangolódnak át, perzisztens fertőzésre gyanúsak. A későbbiekben érdemes ezeket direkt víruskimutató eljárással is megvizsgálni (Ridpath 2013).

A vakcinázásra inaktivált vírust, vagy élő, attenuált kórokozót tartalmazó oltóanyagok egyaránt rendelkezésre állnak.

#### **4.5.1.1. Élővírusos oltóanyagok**

Az élő, alacsony virulenciájú vírust tartalmazó vakcinák előállításához korábban Oregon C24V törzset alkalmaztak. Ezt a vakcinát Magyarországon fejlesztették ki Védévac (Phylaxia) néven (Simonyi és Bíró 1967). A használati utasítás szerint a vakcinával az állatok bármely életkorban oltathatók voltak és a Védévacot vemhes tehenekben is kiterjedten alkalmazták. Sőt, a magzati kor késői szakaszában a magzat aktív immunizálására is ajánlották, mivel magzatkárosító hatást nem tapasztaltak (Bognár 1973). A hagyományos élővírusos BVDV vakcinák alkalmazásával kapcsolatban azonban az 1990-es évek végén biztonsági aggályok merültek fel, ezért azok forgalmazási engedélyét a legtöbb országban - így hazánkban is - visszavonták (van Oirschot et al. 1999).

A klasszikus („hagyományos”, gyengített virulenciájú kórokozót tartalmazó) élővírusos vakcinák használatának visszaszorulása után, újabban a génmódosítással előállított vírust

tartalmazó, rekombináns vakcinák alkalmazása van terjedőben. Ilyen konstrukciók kialakításánál lehetőség van ún. markervakcinák létrehozására, amikor is az oltóanyaghoz készült diszkriminatív szerológiai vizsgálattal nemcsak az deríthető ki, hogy immunizálódott-e a kezelt állat a vírus ellen, hanem az is, hogy az áthangolódás vad vírus okozta fertőzés vagy a vakcinázás eredményeként jött-e létre. Az ilyen oltóanyagok nagyban könnyíthetik a vírus elleni mentesítés folyamatát. Jelenleg hazánkban is rendelkezésre áll olyan élő, genetikailag módosított kiméra-vírust tartalmazó oltóanyag (Bovela, Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co. KG), amely mind a BVDV-1, mind a BVDV-2 neutralizációját kiváltó ellenanyagok termeléséért felelős fehérjéit kódoló géneket tartalmazza, így mindkét vírushatár ellen védelmet biztosít. Elvileg ez a vakcina is szolgálhat markervakcinaként (Makoschey et al. 2004).

A vakcinázás a vitathatatlan előnyök mellett kockázatokkal is jár. Az egyik ilyen kockázat az élővírusos vakcinák használata esetén a genetikai rekombináció lehetősége. A vírusok körében a mutáció mellett a rekombináció a legfontosabb módja a genetikai állomány megváltozásának. A rekombináció során a "szülőgenomokból" kiméra keletkezik, mely bizonyos részein az egyik, más részein a másik szülő genetikai anyagával mutat nagyfokú hasonlóságot. A keletkezett rekombináns nem feltétlenül életképes, így csak azokról a rekombinációs eseményekről szerezhetünk tudomást, amelyek a vírus életképességét nem rontották és ezáltal a rekombináns genommal rendelkező új törzs fennmaradt. Az RNS genommal rendelkező vírusok között a vizsgálatok szerint gyakori a rekombináció. A BVDV esetében ennek az evolúciós lehetőségnek a figyelembe vétele különösen fontos, mivel egyes vélemények szerint a citopatogén biotípusú törzs a genetikailag majdnem azonos ncp törzsből jön létre rekombináció révén. Bizonyos kutatások azt mutatják, hogy ebben az esetben a gazdaséjtből származó genetikai részlet, pl. ubiquitin gén épül be a BVDV genom NS2 és NS3 fehérjéit kódoló területeik közé, lehetővé téve a fehérjék egymástól független működését (Becher és Tautz 2011).

#### **4.5.1.2. Inaktivált oltóanyagok**

Az inaktivált kórokozót tartalmazó oltóanyag kiindulási vírusa általában a C86-os törzs (Patel és Williams 1998). Az inaktivált vakcinákban levő vírus nem szaporodóképes, így használata elvileg kockázatmentes: mutációra, rekombinációra nincs lehetőség. Az ilyen vakcinákat általában több alkalommal kell alkalmazni a megfelelő immunitás elérése érdekében. Ugyancsak az immunogén hatás fokozása céljából mindig tartalmaznak adjuválószereket is, melyek az antigénprezentációt fokozzák, depóhatást váltanak ki. Ez mégis hordozhat

magában bizonyos kockázatot, mert a modern, nagy hatékonyságú adjuvánssok esetleg felerősíthetik az olyan mikromennyiségben előforduló, „reziduális” antigének immunogenitását is, amelyek nem kívánatos reakciókat válthatnak ki az oltott állatok szervezetében. Az elmúlt évtizedben erre jó példa volt a BNP kórkép jelentkezése. Ezt a kórképet néhány éven keresztül (2007-2011 között) Európa szerte, több országban észlelték fiatal borjakban (Friedrich et al. 2009). Az első németországi előfordulásokról megjelent beszámolót követően egyre több közlemény jelent meg, melyek szerint előfordult Belgiumban (Pardon et al. 2010), Franciaországban és az Egyesült Királyságban is (Penny et al. 2009). A kórképet több néven említették, ezek közül a szélesebb körben ismertek: a borjak vérzéses betegsége (bleeding calf syndrome), ismeretlen oktanú vérzéses diathézis (idiopathic haemorrhagic diathesis, „blood sweating disease”), neonatal haemorrhagic diathesis (NHD) (Pardon et al. 2010), a legáltalánosabban elfogadottá vált elnevezés, a szarvasmarha újszülöttkori pancytopeniája, vagy BNP (Bell 2011). A kórkép az esetek túlnyomó többségében egészségesen, megfelelő fejlettségi állapotban, a fajra jellemző vemhességi idő után született, jó kondícióban levő borjakon jelentkezett. A betegség általában az igen jó menedzsmenttel rendelkező, átlagon felüli állat-egészségügyi ellátásban részesülő állományokban, jó tartási feltételeket biztosító, és BVDV ellen vakcinás védelmet folytató gazdaságokban okozta a legnagyobb károkat. Az utóbbi miatt a kezdetektől felvetődött és folyamatosan vizsgálat tárgyát képezte a kórkép esetleges kötődése a borjak vírusos hasmenését okozó vírus okozta fertőzéshez. Ennek az a magyarázata, hogy a vérzéses diathesis halmozott előfordulása igen gyakran társult az erősen virulens BVDV-1 vagy a BVDV-2 által okozott fertőzésekhez (Corapi et al. 1989). Ugyanakkor a BVDV kimutatására irányuló vizsgálatok sorra sikerteleneknek bizonyultak a BNP esetekből. Mint később kiderült, a kórkép nagy valószínűséggel immunpatológiai alapon fejlődhetett ki egy nagy hatékonyságú adjuvánst és inaktivált BVDV-t tartalmazó vakcina hatására (Sauter-Louis et al. 2012), amelynek piacról való visszavonása óta nem figyeltek meg újabb esetet.

#### **4.5.2. Mentésítés**

A BVD elleni védekezés legeredményesebb, mindamellert rövid távon legköltségesebb módja a mentésítés. A vírus kártétele miatt az Európai Unió fontolgatja egy általános mentésítési program meghirdetését, de több tagország már önkéntes módon elkezdte a folyamatot. A fertőzés megszüntetése több stratégia mentén lehetséges. A leggyorsabb, de legköltségesebb megoldás a fertőzött állományok azonnali lecserélése mentes állományokra. Ez a stratégia

természetesen feltételezi, hogy rendelkezésre áll elegendő mennyiségű és minőségű negatív állat az állománycseréhez.

A másik lehetőség a hagyományos szelekciós mentesítés, mely esetben az állományokat folyamatosan vizsgálják szerológiailag, a szeropozitív egyedeket eltávolítják mindaddig, míg többszöri ismételt vizsgálat után sem találnak új pozitív egyedeket (ezt segíti, hogy a BVDV terjedőképessége viszonylag csekély, a vírus nem nagy járványozó képességű). Ebben a stratégiában alapvetően fontos a PI állatok kiszűrése. Abban az esetben ugyanis, ha egy állományban folyamatosan új és új szeropozitív állatokat derítenek fel anélkül, hogy más állománnyal találkoztak vagy új, vásárolt állatokat hoztak volna be, akkor felmerül a PI egyed(ek) jelenlétének gyanúja. Ekkor szükségessé válik a szeronegatív állatok vizsgálata direkt víruskimutató eljárásokkal. A szelekciós mentesítés alatt nem lehet vakcinázást alkalmazni, kivéve a markervakcinákat, amelyek viszont jelentős segítséget nyújtanak, mivel csökkentik a gazdasági veszteségeket és közben megtudható, hogy a szeropozitív állat a vakcinázás hatására hangolódott-e át vagy vad vírus fertőzés miatt. Ilyen módon a PI állatok jelenlétének felismerése is hatékonyabb lehet (Lindberg és Alenius 1999).

A mentesítés fent vázolt stratégiai közül az állományok fertőzöttségének a mértéke alapján lehet választani. Amennyiben egy ország vagy régió szarvasmarha-állományának csak kis hányada fertőzött, úgy érdemes lehet az állománycserét választani. Ha a vírus prevalenciája magas, akkor az állománycsere a költségvonzata miatt általában nem megvalósítható, így a szelekciós mentesítést érdemes választani. A valóságban a két lehetőséget általában együtt alkalmazzák, a mentesítés korai szakaszában a szelekciós elvet használják, a későbbi, alacsony prevalenciájú időszakban pedig a néhány fennmaradt, erősebben fertőzött állomány lecserélésével gyorsítják meg a folyamatot (Presi et al. 2011).

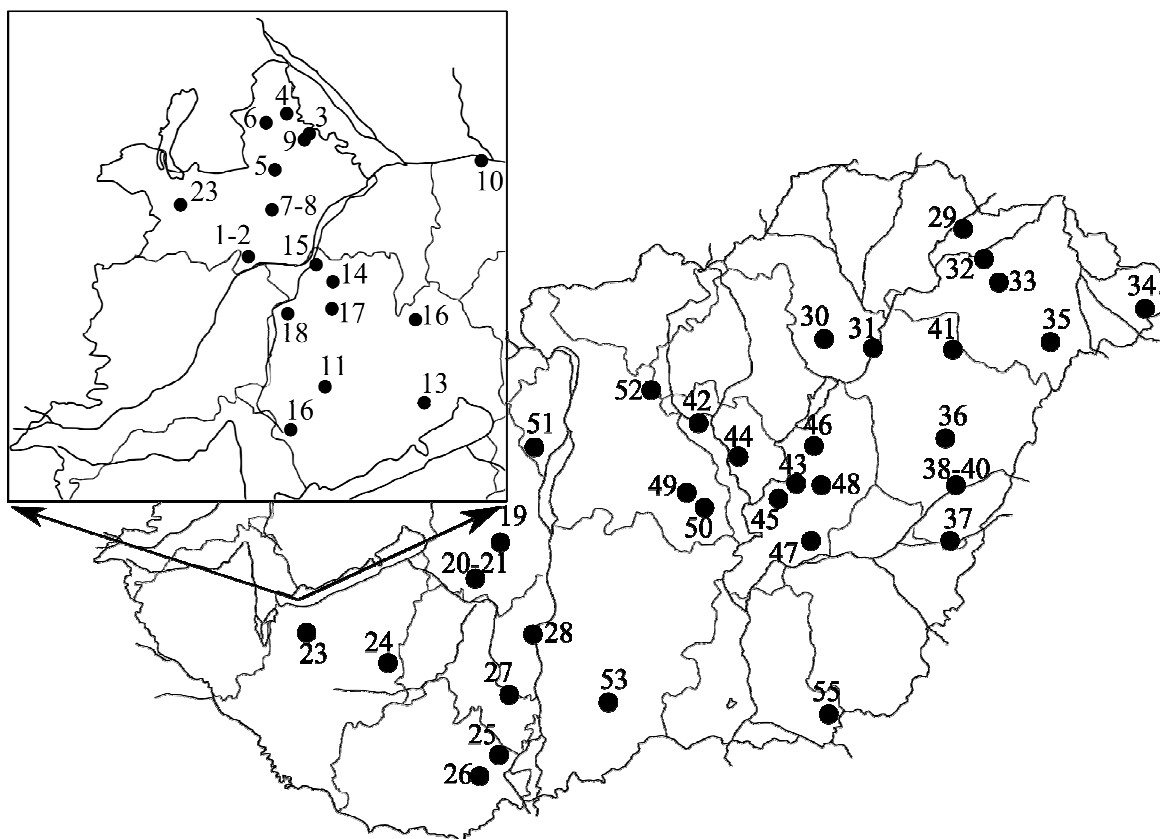
A mentesség elérése után nagyon fontos ennek a státusznak a megőrzése. Mind a mentesítés alatt, mind pedig utána alapvető fontosságú az állatok beszerzésére vonatkozó állat-egészségügyi és járványmegelőzési szabályok maradéktalan betartása, kizárólag mentes állományokból történő állatbeszerzés és a karantén szabályok alkalmazása. Gazdasági szempontból a mentesség számos előnnyel is jár. Egyrészt, a BVDV okozta tetemes gazdasági veszteség megszűnik, másrészt a mentes állatok magasabb áron értékesíthetők, emellett az önkéntes mentesítési kampányokat folytató országok rendszerint a mentesítés megkezdésétől kezdődően csak BVDV-mentes országokból engedélyezik szarvasmarhák behozatalát, vagyis a mentesség piaci előnyt is jelent (Ózsvári et al. 2001; Szabára és Ózsvári 2013).



## 5. Anyag és módszer

### 5.1. Szerológiai vizsgálat alá vont állományok, mintavétel

A vizsgálatokhoz 54 szarvasmarha állományból gyűjtött mintákat használtunk, amelyek származási helyei többé-kevésbé lefedték az ország egész területét (3. ábra). A mintagyűjtés során törekedtünk arra, hogy minden korcsoportból, hasznosítási irányból és ivarból sikerüljön mintát venni. Néhány állomány esetében az állatokat több, egymástól eltérő földrajzi helyen tartották. A vizsgált minták mind olyan gazdaságokból származtak, ahol nem vakcináztak BVDV ellen. (A telepek felsorolását és a minták részletes adatait a Melléklet tartalmazza.) A mintavételi helyeket és a mintaszámot a vizsgálatokat szervező és finanszírozó vakcinaforgalmazó cég határozta meg.



3. ábra: A mintavétel helyszínéül szolgáló gazdaságok földrajzi helyeződése.

A véralvadásban nem gátolt vérmintákat a *vena jugularis*-ból vettük a szakma szabályainak megfelelően. Teljes megalvadás után a vérszérumot 1000 g-n, 3 perces centrifugálással elkülönítettük és a vizsgálat elvégzéséig  $-20^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tároltuk.

## 5.2. Szerológiai vizsgálat

A szérumokban jelenlévő BVDV elleni ellenanyagokat IDEXX Herdchek BVDV Antibody Test Kit ELISA rendszerrel vizsgáltuk (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) a gyártó előírásainak megfelelően.

## 5.3. A genetikai rekombinációs vizsgálatokban használt genomszekvenciák

Vizsgálatainkhoz az amerikai GenBank (NCBI) adatbázisból származó BVDV-1 és BVDV-2 teljes genom-, vagy teljes ORF-szekvenciákat használtunk fel. Ezek az alábbi akcessziós számokon voltak elérhetőek:

### **BVDV-1:**

AB078950, AB078951, AB078952, AF041040, AF091605, AF220247, AF268278, AF526381, AJ133738, AJ133739, AJ585412, DQ088995, EF101530, HQ174292, HQ174293, HQ174294, HQ174295, HQ174296, JN380080, JN380083, JN380088, JN380089, JN400273, JN644055, JN704144, JQ418633, JQ418634, JQ799141, JX297512, JX297513, JX297514, JX297515, JX297516, JX297517, JX297518, JX297519, JX297520, JX297521, JX419397, JX419398, KC695810, KC695814, KC757383, KC853440, KC853441, KC963967, KF501393, KF772785, KF835697, KF835698, KF835699, KF896608, KJ541471, KJ620017, KJ689448, LC089876, M31182, M96687, M96751, U63479, U86599, U86600

### **BVDV-2:**

AB567658, AB894423, AB894424, AF002227, AF145967, AY149215, AY149216, FJ527854, GQ888686, HG426479, HG426480, HG426481, HG426482, HG426483, HG426484, HG426485, HG426486, HG426487, HG426488, HG426489, HG426490, HG426491, HG426492, HG426493, HG426494, HG426495, HQ174297, HQ174298, HQ174299, HQ174300, HQ174301, HQ174302, HQ174303, HQ258810, JF714967, JN380081, JN380082, JN380084, JN380085, JN380086, JN380087, JN380090, JQ418635, KC963968, KF835700, KF835701, KF835702, KJ000672, LC006970, U18059

#### **5.4. A BNP vizsgálata során gyűjtött vizsgálati anyag**

Vizsgálatainkat a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékére vizsgálat céljából 2010-2011-ben beküldött elhullott borjakból, ezek szerveiből, továbbá a klinikai tüneteket mutató borjakból származó mintákon (szérum, alvadásgátolt perifériás vérből nyert fehérvérsejtek) végeztük. Az általunk vizsgált összes eset olyan gazdaságból származott, ahol a borjak jó kolosztrumellátására, tartási körülményeire és állat-egészségügyi felügyeletére fokozott figyelmet fordítottak, és a teheneket technológiának megfelelően adott esetben kétszer vagy háromszor BVD ellen vakcinázták.

#### **5.5. Boncolás, kórszövettani vizsgálat**

Az elhullott borjakban jelentkező elváltozások makroszkópos vizsgálata és képi rögzítése után a különböző szervekből mintákat vettünk kórszövettani és kiegészítő patológiai vizsgálatok céljára. A kórszövettani vizsgálatokra vett mintákat a rutinvizsgálat során megszokott eljárás szerint 4%-os pufferolt formaldehid-oldatban fixáltuk, majd a mintákból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, és ezekből a rutineljárásnak megfelelően hematoxin-eozin festést végeztünk.

A rutin bakteriológiai vizsgálatokat véresagar lemezeken, aerob körülmények között végeztük. A virológiai és molekuláris virológiai vizsgálatokat a makroszkópos vizsgálatok során vett, de formalinnal nem fixált minták homogenizátumaiból végeztük, a mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

#### **5.6. PCR vizsgálatok**

Az RT-PCR-re alapozott, a BNP oktanának felderítését célzó vizsgálatok során a következő kórokozók esetleges jelenlétét próbáltuk kimutatni, illetve kizárni: BVD-vírus, circovírusok és herpeszvírusok. A circovirus PCR során a Cságola és mtsai által leírt módszert és oligonukleotid primereket használtunk (Cságola et al. 2006). A herpeszvírusok kimutatására a HANSON és mtsai által leírt módszert és a valamennyi herpeszvírus egy reakcióban való kimutatására alkalmas, „általános nagy DNS-vírus” primereket használtuk (Hanson et al. 2006).

A BVDV esetleges jelenlétének kimutatására, illetve kizárására a OneStep RT-PCR Kit-et használtunk (QIAGEN, Valencia, CA USA). A PCR-keverék végső mennyisége csövenként

25 µl volt. A vizsgálathoz használt saját tervezésű primerek nukleotid-sorrendjét az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A vizsgálatban alkalmazott BVDV specifikus primerek jellemzői

Primer neve	Szekvencia 5'-3' irányban	Tapadási hely (Osloss)	Termék mérete (bp)	Tapadási (annealing) hőmérséklet
BVD84f	CGAAGGCCGAAAAGAGGCTA	84–104	566	55 °C
BVD649r	AATAACGGCCCCGGTTTCAG	649–629		

A DNS megsokszorozásakor 95 °C-on 2 perces denaturáció és 55°C-on 50 másodperces kapcsolódási lépést követően 72°C-on 1 percig tartó láncszintézist alkalmaztunk 40 cikluson keresztül, végül a folyamatot egy 10 perces végső láncépítési fázis zárta 72°C -on.

A keletkezett terméket etídium-bromidot tartalmazó 1%-os agarózgélben elektroforetizáltuk, majd UV átvilágítással tettük láthatóvá. Az elektroforézis során GeneRuler 100 bp (Fermentas, Vilnius, Litvánia) markert alkalmaztunk a termék méretének meghatározására.

## 5.7. Filogenetikai vizsgálat és szekvencia illesztés

A kiválasztott genomokat ClustalW módszer szerint illesztettük egymáshoz a Mega 6.06 programcsomag segítségével (Tamura et al. 2013). Az illesztés alapján maximum likelihood fát készítettünk az említett programmal. Meghatároztuk az elágazások bootstrap értékeit, ehhez 1000 mintavételt alkalmaztunk. Az ábrán a bootstrap értékeket az elágazásoknál a szekvenciák GenBank azonosítószámait pedig az ágak végén tüntettük fel (11. ábra).

## 5.8. BVDV törzsek között bekövetkezett rekombinációk vizsgálata

A lehetséges rekombinációs események detektálásához a korábban létrehozott genom illesztést az RDP 4.46 Beta program segítségével elemeztük (Martin et al. 2015). A programba beépített vizsgálati módszerek közül a következőket használtuk az elemzés során: RDP (Martin és Rybicki 2000), Geneconv (Padidam et al. 1999), Bootscan (Martin et al. 2005), MaxChi (Smith 1992), Chimera (Posada 2002), SiScan (Gibbs et al. 2000), 3Seq (Boni et al. 2007) és LARD (Holmes et al. 1999). Az eredmény kiértékelésekor azokat a lehetséges

rekombinációkat fogadtuk el, amelyeket a felsorolt vizsgálati módszerek legtöbbje a legerősebb p-értékekkel támogatta.

### **5.9. Rekombinációra érzékeny, „hot spot” területek keresése**

Vizsgálataink során igyekeztünk olyan genetikai területeket azonosítani a BVDV genomon belül, amelyek rekombinációs szempontból „hot-spot”-nak azaz rekombinációra érzékeny területnek mutatkoznak. Ehhez az RDP 4.46 Beta program „Breakpoint p-distribution plot” grafikonját használtuk.

## 6. Eredmények

### 6.1. Szerológiai felmérés

Eredményeink alapján a vizsgált állományokat a 2. táblázatban látható módon csoportosítottuk.

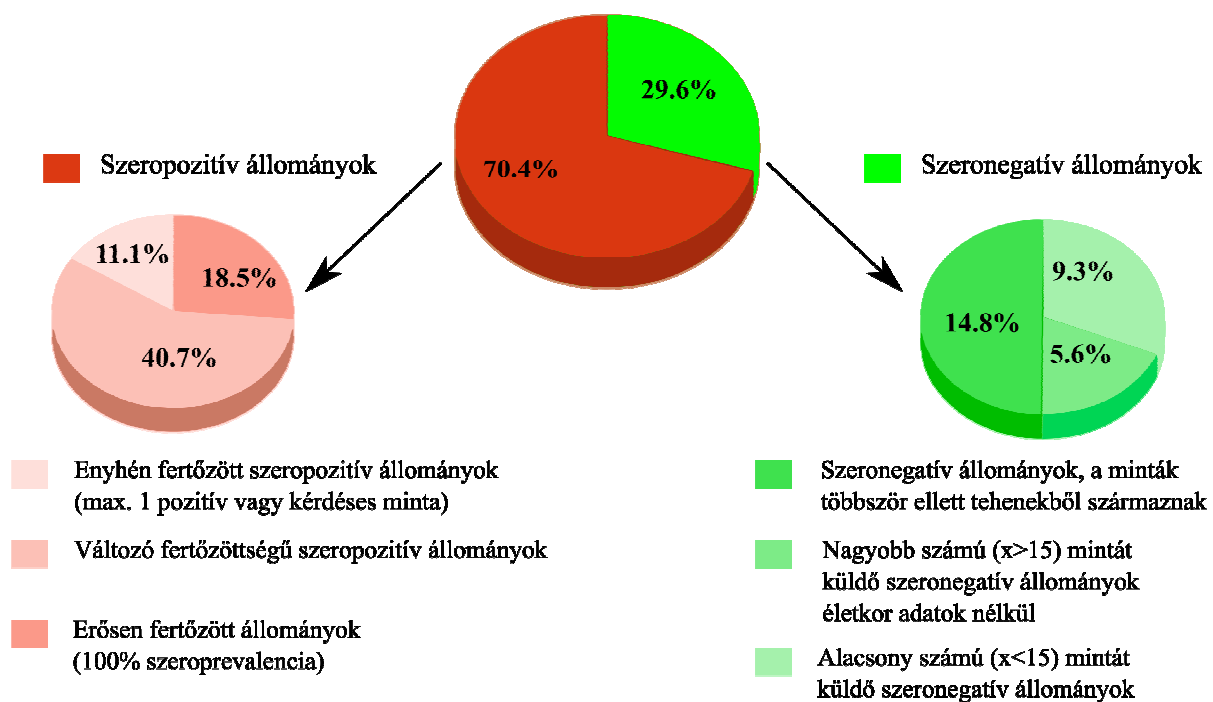
Az. 1. csoportba sorolt állományok 100%-os vagy ahhoz nagyon közeli szeroprevalenciát mutattak, vagyis a vizsgált savók mindegyike pozitívnak bizonyult. A 2. csoportba soroltuk azokat a telepeket, amelyekben ellenanyag változó arányban (10-85%) volt kimutatható, de a vizsgált savók száma és a pozitív savók aránya alapján kétségtelenül jelen volt a vírus. A 3. csoportba sorolt állományok alacsony szeroprevalenciát (<10%) mutattak. Esetenként csak egy-egy minta volt pozitív, illetve az ELISA vizsgálatnál kapott OD érték a módszer hibahatárába esett (kétes eredmény, vagy küszöb-közeli, nagyon alacsony értékű pozitívítás) így érdemes lenne ezeket az állományokat újravizsgálni.

A 4. csoportba sorolt állományokból származó vizsgálati minták már negatív eredményt adtak ugyan, de ezek esetében a teljes vizsgálat szempontjából fontos adatok (pl. életkor) hiányoztak, vagy a mintaszám túl alacsony volt. Ezért statisztikailag nem volt értékelhető az eredmény. Az adatok az adott állomány értékelésére alkalmasak, de feltehetően további következtetések levonása hiba lenne. Az 5. csoportba sorolt állományok BVDV-mentsek. Nagyszámú állatból küldtek mintát, az eredmény statisztikailag értékelhető lett volna, de mivel az állatok koráról nincs információ (azon kívül, hogy 6 hónaposnál idősebbek), így ez sem teljes értékű eredmény. A 6. csoportban BVDV ellenanyag-mentes állományok találhatóak, amelyekben a mintázott állatoknak az életkori adatok alapján lett volna lehetőségük fertőződni a vírussal. Emellett ezekből az állományokból statisztikailag reprezentatív mintamennyiséget sikerült vizsgálni, így valóban nagy valószínűséggel BVDV-mentesnek mondhatók. Az állományokra vetített összesített eredmények megoszlását a 4. ábra mutatja be.

1 2. Táblázat: A vizsgált minták és vizsgált állományok megoszlása a szeropozitivitás arányában

	Minta- szám	Pozitív	Kétes	Állományok száma	Állományok aránya	Minták aránya
1., 100%-os szeropozitivitás (minden vizsgált minta pozitívnak bizonyult)	153	153	0	10	18%	13%
2., Szeropozitív állományok, változó, de viszonylag nagyarányú (10-85%) szeroprevalenciával, a vizsgált minták közül legalább kettő volt pozitív.	620	363	39	22	41%	51%
3., Nagyon kis arányú szeropozitivitást mutató állományok (a vizsgált minták között csak egy adott pozitív vagy kétes eredményt)	104	5	1	6	11%	9%
4., Szeronegatív állományok alacsony mintaszámmal ( $x < 15$ ) vagy életkor adatok nélkül.	58	0	0	5	9%	5%
5., Szeronegatív állományok megfelelő mintaszámmal ( $x > 15$ ) de életkor adatok nélkül	65	0	0	3	6%	5%
6., Szeronegatív állományok, több laktációs perióduson átesett tehenekből származó, megfelelő számú minta ( $x > 15$ )	200	0	0	8	15%	17%
<b>Összesen</b>	<b>1200</b>	<b>521</b>	<b>40</b>	<b>54</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

## Az eredmények megoszlása



4. ábra: A szerológiai felmérés eredményeinek eloszlása állományok szintjén.



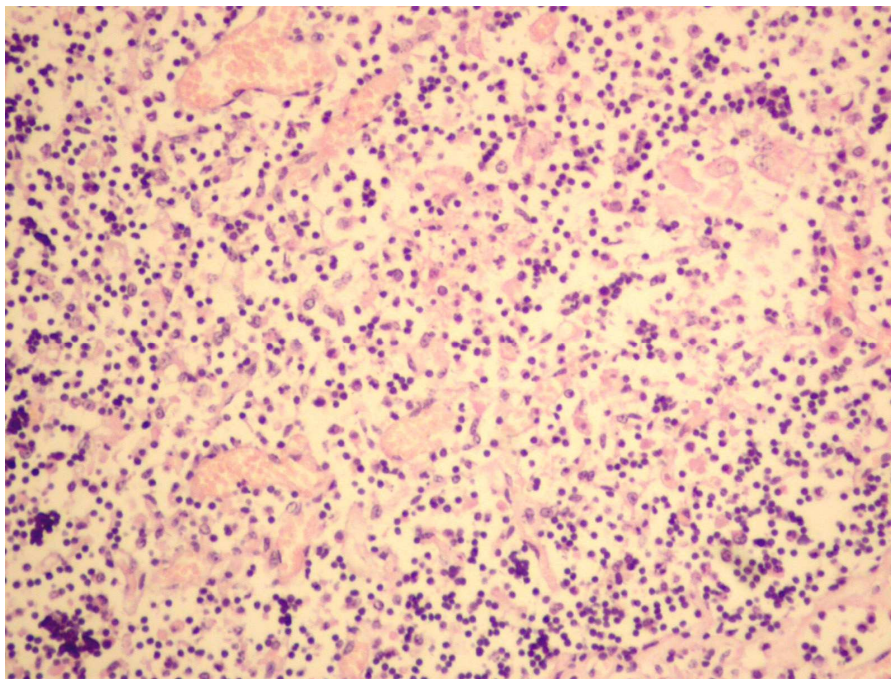
## 6.2. BNP esetek vizsgálata

### 6.2.1. Klinikai tünetek

A tünetek 1–4 hetes borjakon jelentkeztek és a kórképet a kifejezett vérzékenység uralta. A véralvadási zavart jelezte a minden bőrsérülést (injekció beadását, vérszívó rovarok szúrását) követő tartós vérzés mellett a spontán vérzések megjelenése (vérvizelés, orrvérzés, ínyvérzés stb.). A klinikai tünetek jelentkezése után a borjak általában rövid időn belül (2–7 nap) elhullottak. Az elhullások aránya igen nagy volt, a beteg borjak többsége elpusztult.

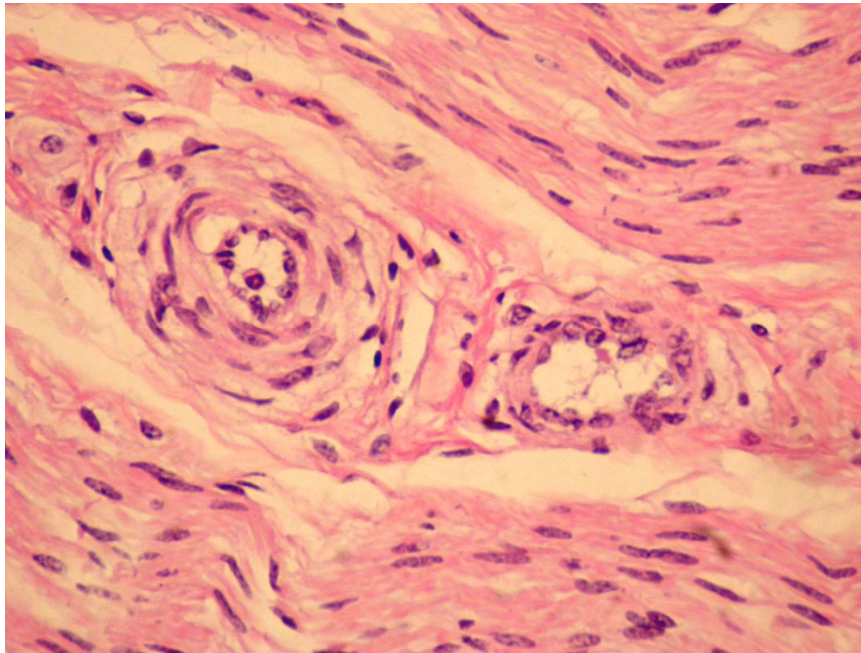
### 6.2.2. Kórbonctan, kórszövettan

A boncolások során kiterjedt vérzéseket lehetett látni testszerte; a bőrben, a bőr alatti kötőszövetben, a nyálkahártyák alatt, az emésztőszervek falában, a zsigerekben. A savós testüregekben vörhenyes exsudátum halmozódott fel.

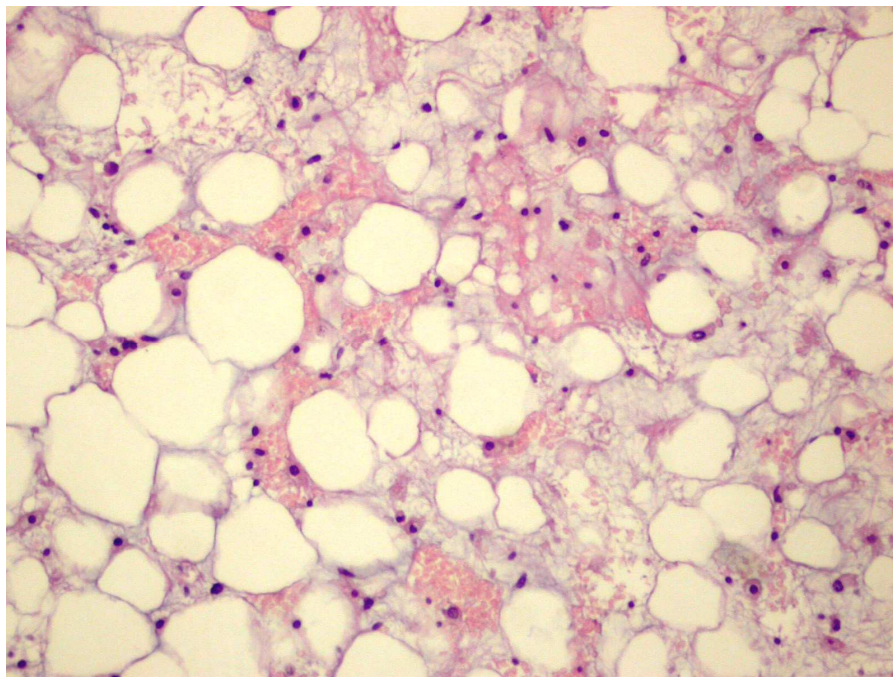


5. ábra. A lép follicularis szerkezetének felbomlása súlyos fokú lymphoid depletio következtében. H–E, 100X

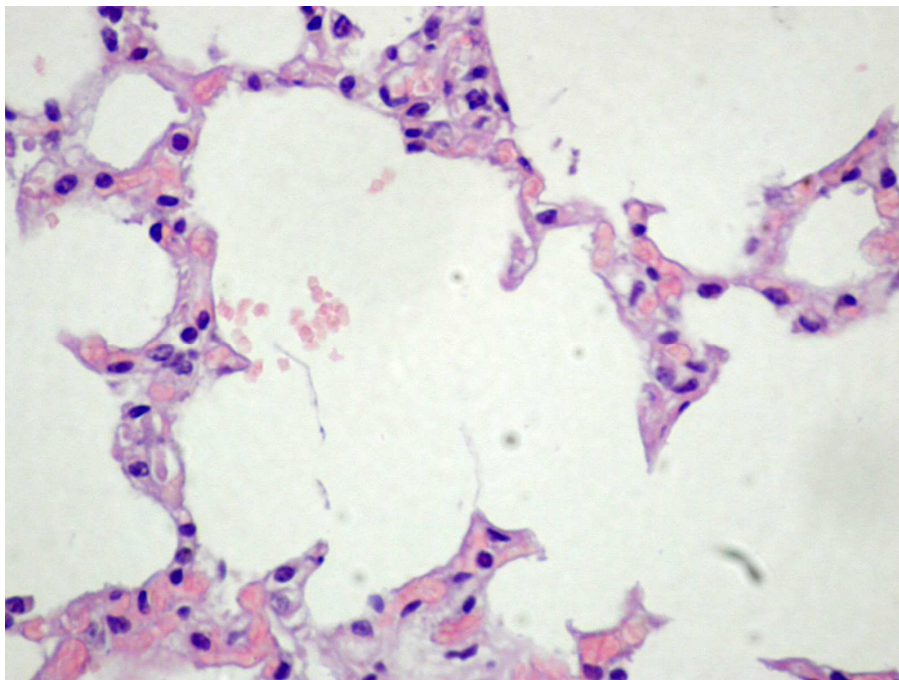
Kórszövetteni vizsgálattal kiterjedt, multifocalis vérzések voltak megfigyelhetők ugyanezekben a területeken. Kifejezett volt a csontvelő aplasiája. A lépben lymphoid depletiót (5. ábra), a recésgyomor falában kiterjedt vérzéseket és érfalkárosodást láttunk (6. ábra).



**6. ábra.** Az oltógyomor falában futó artériákban az endothelsejtek kifejezett duzzanata, a teljes érfal fellazulása és degeneratiója, valamint perivascularis oedema. H-E, 200X

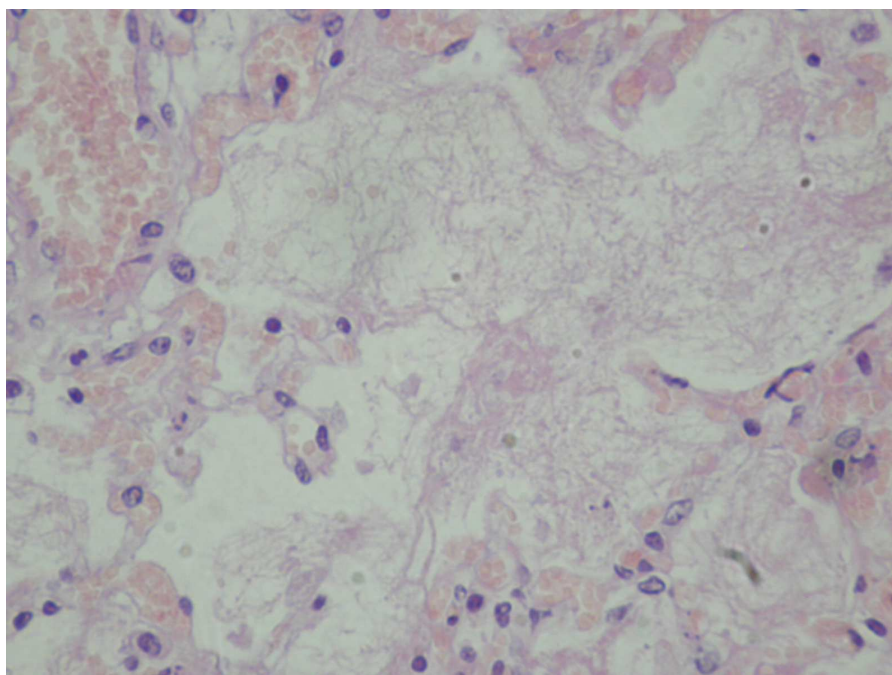


**7. ábra.** A vöröscsontvelőben a myeloid-erythroid sejtek és megakaryoblastok teljes pusztulása. H-E, 100X

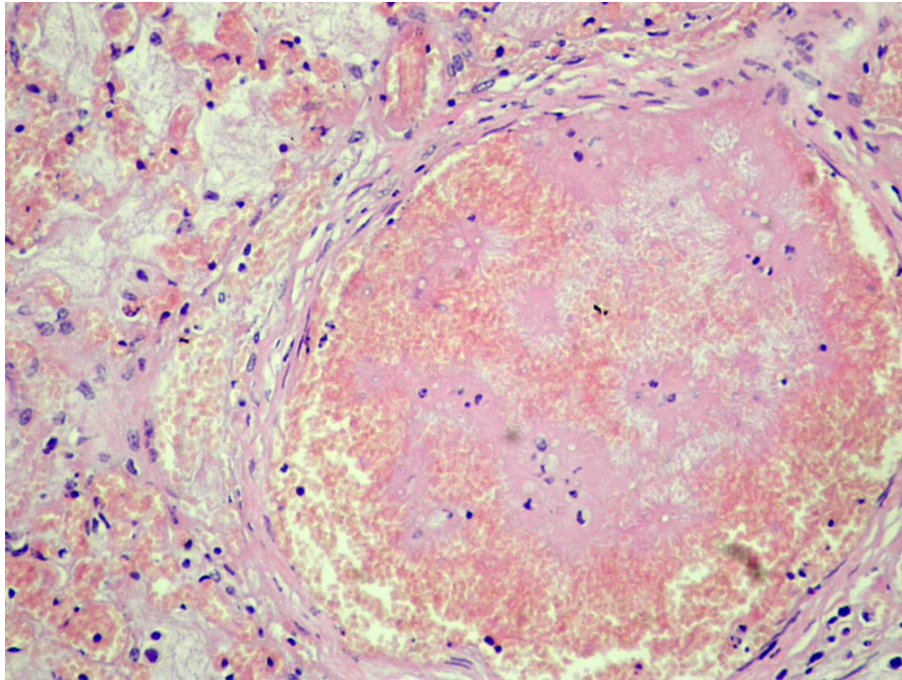


**8. ábra.** Az alveolusokban a vörösvérsejtek intraalveolaris tüdővérzésre utalnak.  
H-E, 200X

A csontvelőben súlyosfokú aplasiát (7. ábra), a tüdőben vérzéseket (8. ábra), az alveolusokban nagy mennyiségű fibrint (9. ábra), illetve disseminált intravasalis coagulatio (DIC, 10. ábra) jeleit figyeltük meg.



**9. ábra.** Nagy mennyiségű fibrin az alveolusok üregében. H-E, 200X



**10. ábra.** *Egy tüdőartéria lumenében nagyméretű, friss keletű thrombus a disszeminált intravascularis coagulatio (DIC) részeként. H–E, 100X*

### **6.2.3. PCR vizsgálatok**

A PCR-en alapuló kimutatási kísérletek valamennyi vizsgált kórokozó (circovirus, herpeszvírus, BVD vírus) esetében minden mintából negatív eredménnyel zárultak.

### **6.2.4. Bakteriológiai vizsgálatok**

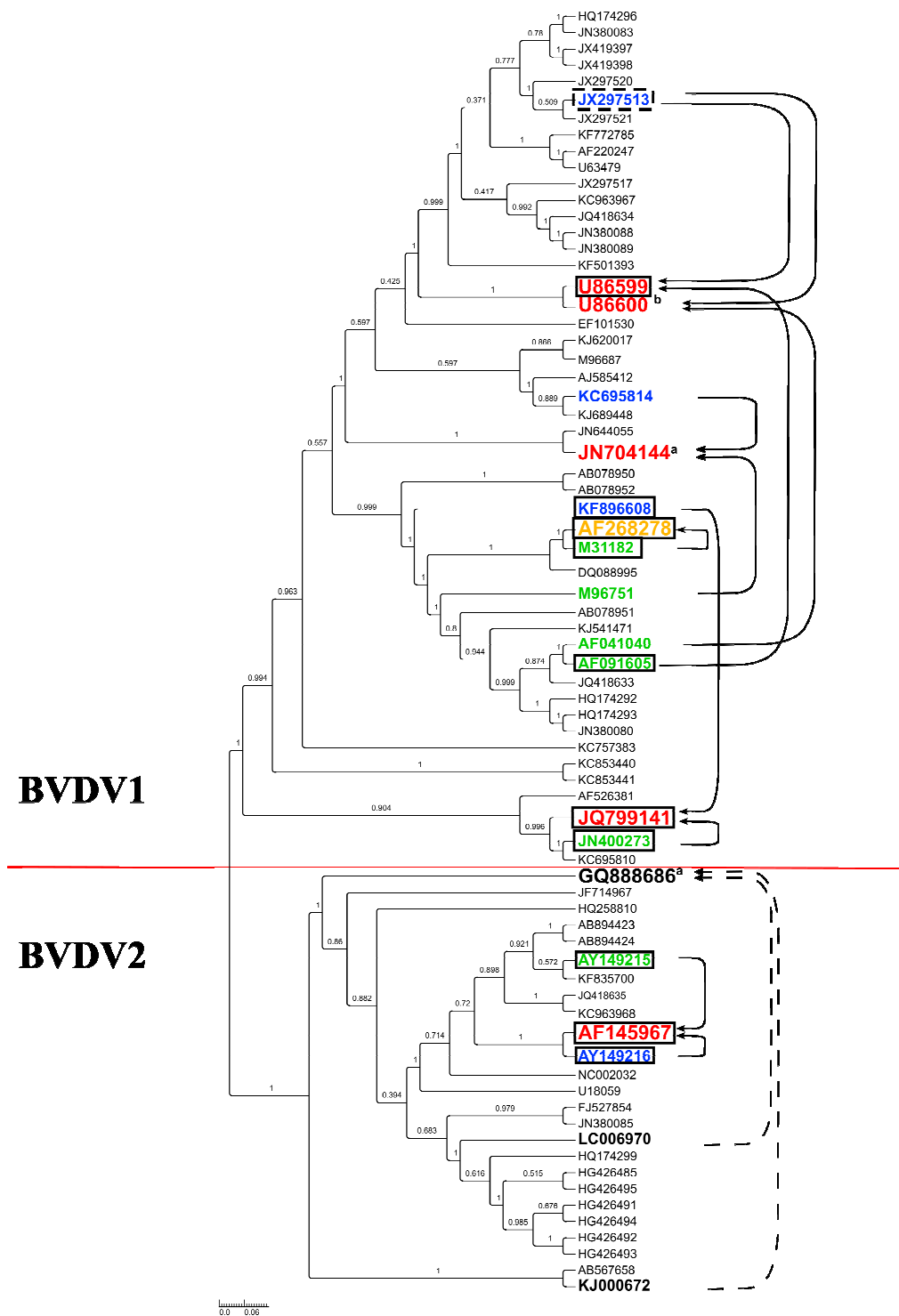
A vizsgált borjak lépéből és csontvelőjéből baktériumokat nem lehetett kitenyészteni.

### 6.3. A rekombinációs vizsgálatok eredményei

Az 11. ábrán látható a BVDV genomok illesztése alapján rekonstruált filogenetikai fa. Mivel a kiválasztott genomok között jelentős számban találtunk közel rokon szekvenciákat, így - elkerülendő a zsúfoltságot - az ábrán azokat a szekvenciákat nem tüntettük fel, melyek valamelyik, a fán már szereplő genommal 98% vagy annál nagyobb hasonlóságot mutattak. A későbbi vizsgálatokkal rekombinánsnak felismert és a lehetséges „szülő” törzseket nyilak jelölik a törzsfán.

Az RDP vizsgálat identitási grafikonjai a 12. ábra A-E pontjai alatt láthatók. A grafikonokon a felismert rekombinációk körülbelüli méretét és genomon való helyeződését mutatjuk, míg a pontos adatok illetve az RDP 4.46 Beta általunk alkalmazott mérési módszereinek a felsorolt rekombinációs eseményeket támogató szignifikancia-értékei (p) az 3. táblázatban láthatók. A rekombinációkban részvevő szekvenciák részletes adatai a 4. táblázatból olvashatók ki.

A teljes BVDV genom hossza általában 13-14 kb között mozog, míg a 12. ábra grafikonjain ábrázolt genomméret ennél valamivel nagyobb (14,2 kb). A különbséget az okozza, hogy az illesztés során eltolódások és „gap”-ek képződnek, melyek a teljes illesztés hosszát megnövelik az azt alkotó egyedi genomokhoz képest. Ebben a vizsgálatban ezt a jelenséget erősítette, hogy mind BVDV-1, mind BVDV-2 törzseket bevontunk a közös illesztésbe. Az együttes vizsgálattal az volt a célunk, hogy lehetőségünk legyen kimutatni a két vírusfaj között esetleg kialakult rekombinációt. Így a grafikonokon egy elméleti genomhosszúsághoz viszonyítva láthatóak a bemutatott rekombinációs események. A rekombináns területek végpontjainak pontos, a rekombináns genomhoz viszonyított helyzetét az 3. táblázatból lehet kiolvasni. A bemutatott rekombinációs események vizsgálati eredményei statisztikailag nagyon erősen alátámasztják a rekombináció létrejöttének valószínűségét.



11. ábra: A 112 BVDV törzs vizsgálata alapján készült szűkített törzsfá. Azok közül a genomok közül, melyek 98%-nál jobban hasonlítanak egymásra csak egyet tüntettünk fel a fán, így 72 teljes genom hasonlósági viszonyai láthatók. Vörös: rekombináns; kék: major parent; zöld: minor parent; narancs: mesterséges kiméra, kontrollként használtuk. Azokat a rekombinációkat, melyeket korábban mások is leírtak nem kereteztük be <sup>a</sup> (Weber et al. 2015) <sup>b</sup>(Jones és Weber 2004).

**3. Táblázat:** A legjobban alátámasztott BVDV rekombinációs események, amelyeket teljes genomok illesztésének analizálásával kaptunk. Néhány eseményt korábban leírtak [<sup>a</sup> (Weber et al. 2015) <sup>b</sup>(Jones és Weber 2004)], de vizsgálatunk új “szülő” szekvenciákat azonosított bizonyos esetekben (részletek a szövegben). A kettős vonal a BVDV-1 és BVDV-2 törzseket választja el egymástól. (<sup>c</sup>A mi vizsgálatunk ezt a rekombinációt nem erősítették meg, de a 11. ábrán és a 3. táblázatban szerepeltetjük, mert kiemelten foglalkoztunk vele a módszer érzékenységének bizonyítása miatt.)

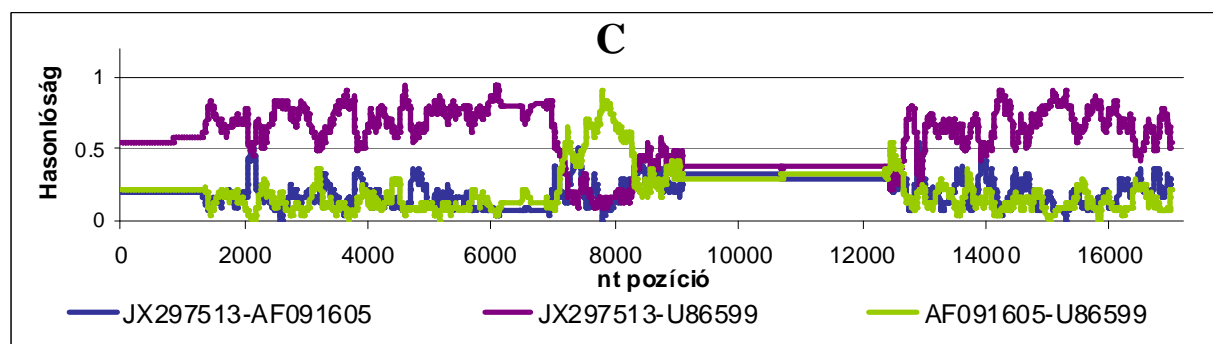
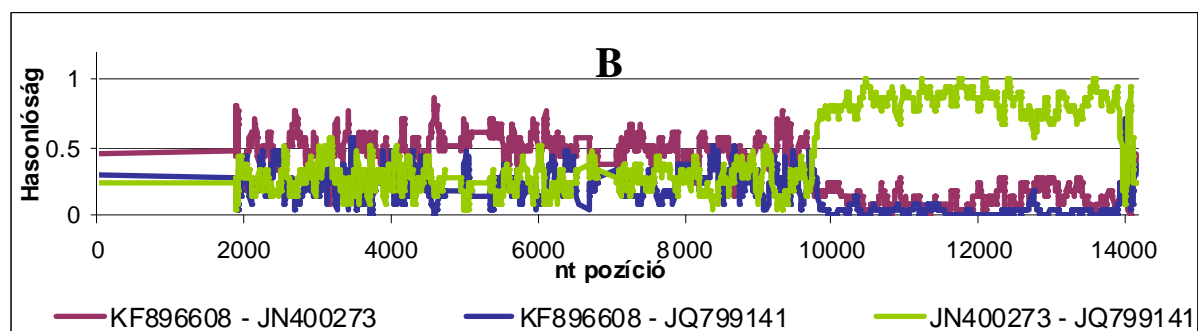
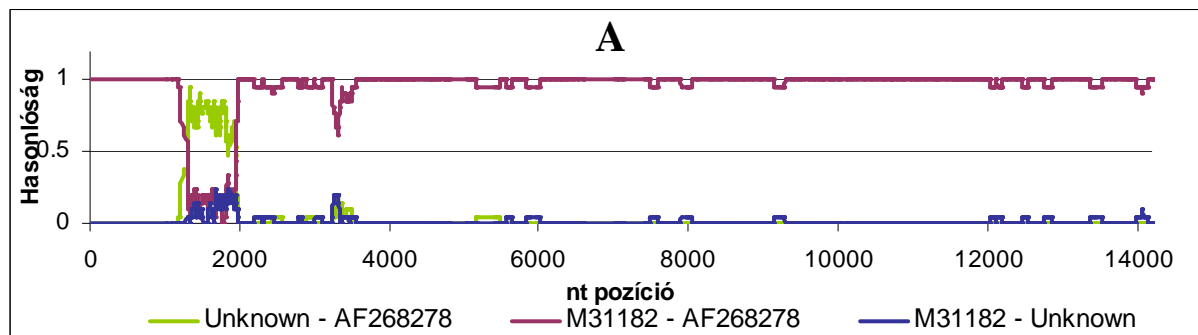
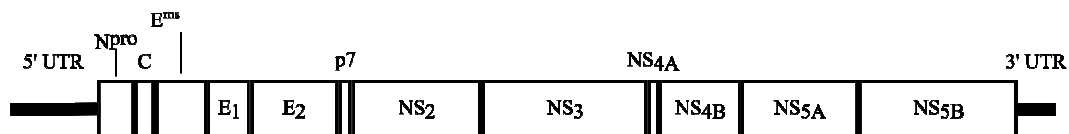
Végpontok (rekombináns)		Rekombináns szevencia	“Szülői” (parent) szekvenciák		A vizsgálati eljárások által számított valószínűségi értékek <sup>*</sup>							
Start	Vég		Minor	Major	RDP	GENE- CONV	Bootscan	Maxchi	Chim-aera	SiSscan	LARD	3Seq
7780	11923	JQ799141	JN400273	KF896608	$1.73 \times 10^{-136}$	$1.02 \times 10^{-145}$	$9.71 \times 10^{-156}$	$1.49 \times 10^{-45}$	$5.62 \times 10^{-35}$	$2.29 \times 10^{-69}$	$1.44 \times 10^{-217}$	$1.12 \times 10^{-80}$
7348	8500	U86599	AF091605	JX297513	$8.57 \times 10^{-27}$	$3.71 \times 10^{-05}$	$8.00 \times 10^{-39}$	$5.97 \times 10^{-13}$	$3.91 \times 10^{-15}$	$2.83 \times 10^{-25}$	$1.29 \times 10^{-09}$	NS
332	1004	AF268278	Unknown	M31182	$2.38 \times 10^{-159}$	$5.98 \times 10^{-113}$	$1.80 \times 10^{-147}$	$4.41 \times 10^{-34}$	$1.14 \times 10^{-29}$	$2.76 \times 10^{-26}$	$7.96 \times 10^{-314}$	$2.61 \times 10^{-165}$
2939	4536	JN704144 <sup>a</sup>	M96751	KC695814	$6.22 \times 10^{-177}$	$4.38 \times 10^{-164}$	$2.23 \times 10^{-87}$	$5.23 \times 10^{-45}$	$7.23 \times 10^{-43}$	$1.72 \times 10^{-68}$	$1.60 \times 10^{-152}$	$1.28 \times 10^{-230}$
8783	12046	JN704144 <sup>a</sup>	M96751	KC695814	$4.90 \times 10^{-147}$	$2.73 \times 10^{-143}$	$1.01 \times 10^{-146}$	$1.59 \times 10^{-58}$	$1.93 \times 10^{-58}$	$3.08 \times 10^{-89}$	$1.24 \times 10^{-221}$	$1.55 \times 10^{-166}$
5976	6575	U86600 <sup>b</sup>	AF041040	JX297513	$5.52 \times 10^{-7}$	$1.35 \times 10^{-05}$	$7.89 \times 10^{-34}$	$1.680 \times 10^{-15}$	$7.99 \times 10^{-15}$	$9.89 \times 10^{-11}$	$2.52 \times 10^{-62}$	NS
11490	11679	AF145967	AY149215	AY149216	$7.74 \times 10^{-19}$	$4.40 \times 10^{-18}$	$3.05 \times 10^{-20}$	$1.74 \times 10^{-05}$	$1.26 \times 10^{-04}$	$4.24 \times 10^{-07}$	$8.36 \times 10^{-19}$	$9.39 \times 10^{-08}$
3586	7357	GQ888686 <sup>a,c</sup>	Unknown	AY149215	$1.31 \times 10^{-14}$	NS	$4.04 \times 10^{-14}$	$8.5 \times 10^{-14}$	$2.77 \times 10^{-14}$	$1.24 \times 10^{-22}$	$6.46 \times 10^{-12}$	$7.57 \times 10^{-08}$

<sup>\*</sup>Szignifikancia szint:  $p < 0.005$ ; NS: nem-szignifikáns

1 **4. Táblázat:** A rekombinánsok, valamint a major és minor parent-ek GenBank-i adatai

Accessziós szám	Rövid leírás (GenBank leírás)	Hossz (nt)	Szerzők
AF268278	Pestivirus type 1, artificial chimera made from NADL strain of BVDV-1 using hepatitis C virus NS3 gene	12734	Lai,V.C.H. and Hong,Z.
M31182	BVDV-1 NADL strain	12573	Colett,M.S., Larson,R., Gold,C., Strick,D., Anderson,D.K. and Purchio,A.F.
JQ799141	Bovine viral diarrhoea virus 1 from yak	12214	Sun,K., Liu,Y.G., Yu,J.F., Wang,W.B., Hu,B.F., Wang,P.P. and Feng,Y.Y.
KF896608	BVDV-1c isolate Bega-like polyprotein gene from cattle	12193	Gao,S., Chang,H. and Yin,H.
JN400273	BVDV-1 isolate SD0803 from swine	12271	Deng,Y., Shan,T.L., Tong,W., Zheng,X.C., Guo,Y.Y., Zheng,H., Cao,S.J., Wen,X.T. and Tong,G.Z.
U86599	Pestivirus type 1 cytopathic genomic RNA, ILLC-Bovine Viral Diarrhoea Virus	15521	Roath,P.D. and Berry,E.S.
AF091605	BVDV-1 strain Oregon C24V	12310	McGoldrick,A., Bensaude,E. and Paton,D.J.
JX297513	BVDV-1 b isolate Aries polyprotein gene	11640	Neill,J.D., Dubovi,E.J. and Ridpath,J.F.
AF145967	BVDV-2 strain 1373 polyprotein gene from cattle	12333	Ridpath,J.F., Neill,J.D., Vilcek,S., Dubovi,E.J. and Carman,S.
AY149216	BVDV-2 strain p24515 polyprotein gene from cattle	12320	Goens,S.D., Wood,R.D., Bennett,C.J. and Rodriguez,L.L.
AY149215	BVDV-2 strain p11Q polyprotein gene from cattle	12271	Goens,S.D., Wood,R.D., Bennett,C.J. and Rodriguez,L.L.
JN704144	BVDV-1 b isolate 3156, complete genome	12302	He,Y.H., Huang,X., Bo,X.W. and Wang,X.H.
M96751	BVDV-1 SD1 polyprotein gene	12308	Deng,R. and Brock,K.V.
KC695814	BVDV-1 isolate Av69 VEDEVAC	12276	Gao,S., Chang,H. and Yin,H.
GQ888686	BVDV-2 isolate JZ05-1	12285	Li,Q., Miao,L., Liu,Y., Li,H. and Zhang,G.
U86600	Pestivirus type 1 noncytopathic genomic RNA	12267	Roath,P.D. and Berry,E.S.
JX297513	BVDV-1b isolate Aries polyprotein gene	11640	Neill,J.D., Dubovi,E.J. and Ridpath,J.F.
AF091605	BVDV-1 strain Oregon C24V	12310	McGoldrick,A., Bensaude,E. and Paton,D.J.





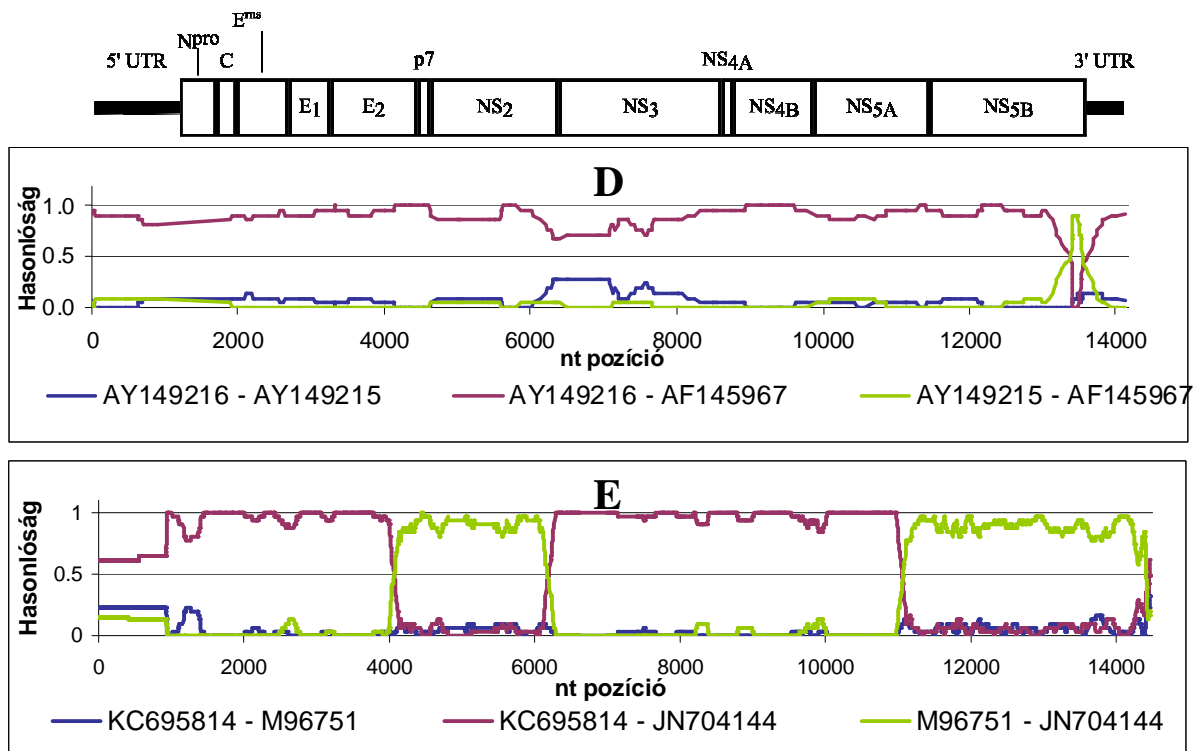
12. ábra: Az rekombináns genomok RDP vizsgálatának grafikonjai

(major parent és a rekombináns hasonlósági százaléka: lila, minor parent és a rekombináns hasonlósági százaléka: zöld, minor és major parent hasonlósági százaléka: kék)

**A: AF268278 genetikailag módosított törzs.** A major parent az NADL törzs (M31182), a minor parent egy hepatitis C törzs. Ezt a mesterséges kimérát kontrollként kezeltük, a rekombinációt felismerő módszer hatékonyságának igazolására.

**B: JQ799141 rekombináns törzs,** melynek major parent-je a KF896608, míg minor parent-je valamely a JN400273-hoz hasonló szekvenciájú törzs..

**C: U86599 rekombináns törzs,** melynek major parentje a JX297513 és a minor parent az AF091605, vagy ahhoz nagyon hasonló, ma még ismeretlen törzs.



12. ábra folytatás

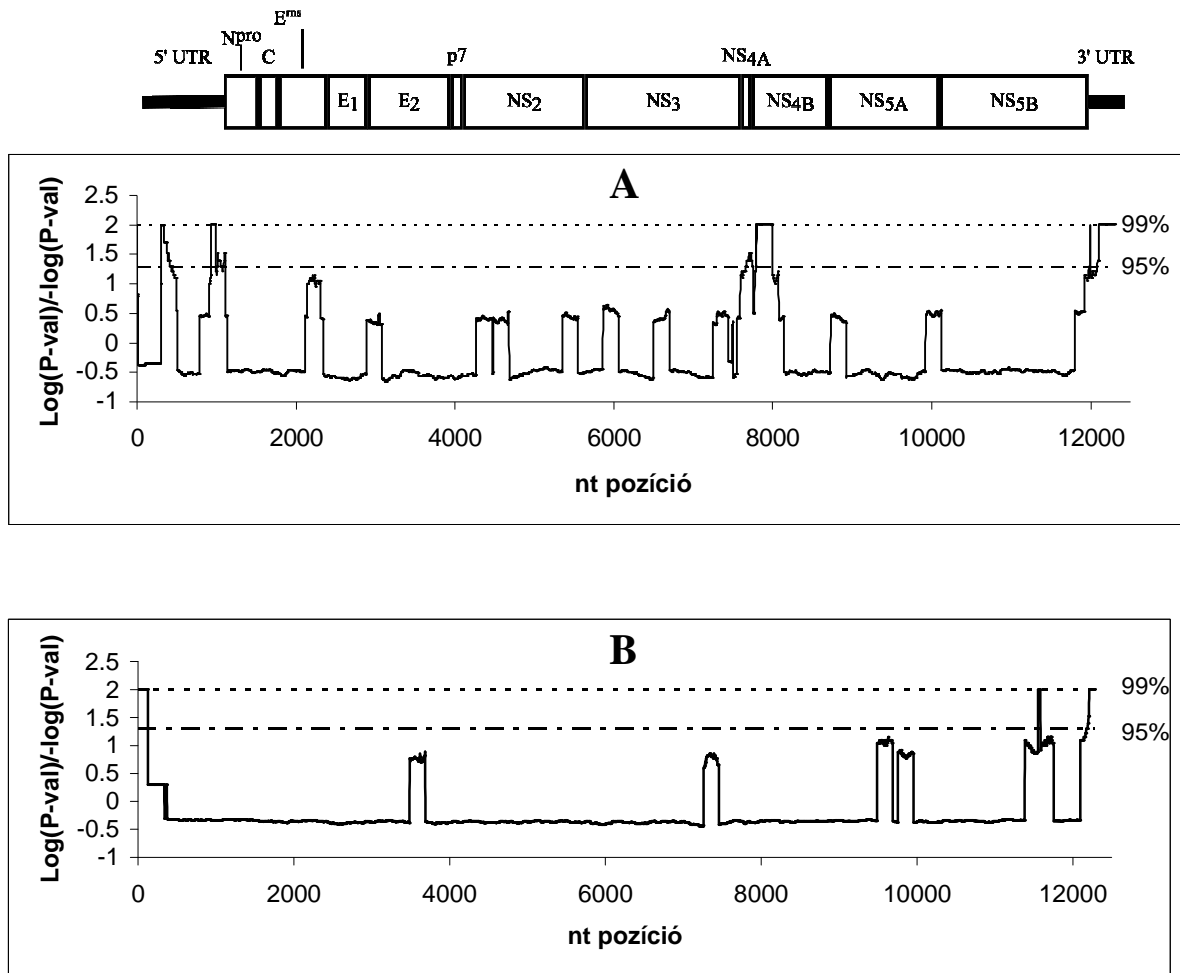
**D: AF145967 rekombináns törzs**, melynek major parent-je az AY149215 jelű törzs, minor parent-je pedig az AY149216-hoz hasonló szekvenciájú törzs.

**E: JN704144 kettős rekombináns törzs**, melynek major parentje a KC695814-es törzs míg a minor parent-je az M96751-hez nukleotid-sorrendjében nagyon hasonló, ma még ismeretlen törzs.

A rekombinációs „hot-spot” kereséshez használt „breakpoint p-distribution plot” analízis négy lehetséges területet azonosított a BVDV-1 genomján, ezek helyeződése az „általános” genomon: A: 0,5 kb; B: 1 kb; C: 7,5; D: 12 kb (13. ábra, A). A fentebb bemutatott rekombinációs események végpontjai elfogadhatóan korrelálnak ezekkel a pontokkal. A csúcsok nem élesek, tehát nem egyes nukleotid pozíciókat jelölnek, hanem inkább szakaszokat.

A rekombinációs végpontok azonosítása akkor a legpontosabb, ha csak a rekombináns és a „szülői” szekvenciákat vetjük össze, de a vizsgálatban 62 különböző BVDV-1 genomot elemeztünk párhuzamosan, így az illesztés eltolódásai és a különböző genomok „hot spot”-jainak némileg eltérő végpontjai széthúzzák a rekombinációra kitüntetett helyeket, így azok nem „forró pontok” („hot spot”), hanem néhány száz bázis hosszúságú szakaszok formájában

jelennek meg az ábrában. Az 50 BVDV-2-es szekvencia vizsgálatok a fent említett „hot-spot”-ok közül kettőt sikerült azonosítani, de a helyeződésük kissé eltér a BVDV-1 esetén tapasztaltaktól, a BVDV-2 genomjában ezek 0,15 kb és 11,7 kb környékén találhatóak (13. ábra, B).



13. ábra: A grafikonokon a BVDV fajok rekombinációs „hot-spot” analízisének eredménye látható. A rekombinációs végpontok pozícióit egy általános BVDV genomhoz viszonyítva ábrázoltuk, az egyszerűsített genom rajza a grafikonok felett látható.

A pontozott és pont-vonalazott vonalak a konfidencia szinteket reprezentálják.

A: BVDV-1-es törzsek "breakpoint p-distribution" grafikonja

B: BVDV-2-es törzsek "breakpoint p-distribution" grafikonja

## 7. Megbeszélés

### 7.1. Szerológiai felmérés eredményeinek megbeszélése

A BVDV által okozott fertőzés következtében jelentkező különböző kórformák jelentős gazdasági károkat okoznak; és ezek két csoportra oszthatók. Egyrészt, közvetlen veszteségek amelyek a kisebb tejtermelésből, a csökkent vágóértékből, az elhullásból, illetve a reprodukciós zavarokból származnak. Ezeken felül felmerülnek még egyéb, a gyakoribb állatorvosi kezeléssel és a megnövekedett élők munkai igényből adódó költségek (Ózsvári et al. 2001). A szakirodalom szerint szélsőséges esetben a veszteségek elérhetik akár a 340 Euro/állat mértéket is egy-egy súlyos járványkitörésben. Húsmarha-állományban ennél enyhébb, kb. 54 Euro/állat veszteséggel lehet számolni (Lindberg et al. 2006). A betegséggel endémiásan sújtott országokban, az Egyesült Királyságban, Dániában és Norvégiában a veszteségeket ellésenként 8,5 és 34 Euróra becsülték (Greiser-Wilke et al. 2003; Gulliksen et al. 2009). Ezen felül több országban vagy régióban, például Skóciában a járvány kitörése hasonló mértékű költségek mellett együtt járt a BVDV-mentes státusz elvesztése miatt kieső prémium bevételekkel is. Összefoglalva tehát a betegség jelentős veszteségeket okoz mind a mezőgazdasági termelőknek egyénileg, mind nemzetgazdasági szinten (Greiser-Wilke et al. 2003; Hagglund et al. 2006; Laureyns et al. 2010).

A vázolt gazdasági jelentőség miatt minél hamarabb célszerű volna hazánkban is mentesítési kampányt indítani a betegség felszámolása érdekében, ehhez azonban szükséges a jelen állapot ismerete, ennek érdekében végeztük el szerológiai felmérő vizsgálatunkat. A vakcinás védekezés csak a gazdasági veszteségek csökkentésére alkalmas, nem pedig a betegség leküzdésére. A vakcinás védekezés háttérben a vírus tovább perzisztálhat az állományokban. Emellett a PI állatok nem vakcinázhatók sikeresen, és tovább terjesztik a vírust (Laureyns et al. 2010).

A szerológiai vizsgálatok eredményeképpen BVDV-fertőzöttségi státuszuk alapján 6 csoportba osztottuk a telepeket:

1., Teljesen, vagy majdnem teljesen szeropozitív állományok. Ezek az állományok a leginkább problémásak és ezek profitálnának a legtöbbet a mentesítésből. Azoknak a telepeknek az esetében, ahol a szeropozitív állatok leginkább a többször ellett tehének közül kerülnek ki, feltételezhető, hogy aktív PI állat van az állományban vagy az állomány korábbi generációja volt kitéve PI állatból származó fertőzésnek. A nagyfokú szeropozitivitás oka

lehet továbbá a korábbi generáció attenuált vakcinával való immunizálása, és a Védévac vakcinában levő attenuált törzs fennmaradása a telepen. Erről a korábban hazánkban széles körben használt, élővírust tartalmazó vakcináról kimutatták, hogy képes a placentán átjutva fertőzni a magzatot, mely ennek eredményeképp (Bognár 1973) szeropozitívan születik, amennyiben az anyát a vemhesség 3. trimeszterében vakcinázták. Amennyiben az oltóanyagot a vemhesség első felében alkalmazták a vemhes állatokban, úgy a magzat immuntoleránssá vált a kórokozóra nézve, így a korábbi vizsgálatok szerint sok PI állat született. Szintén magyarázhatja a magas szeropozitivitást az állomány nem dokumentált vakcinázása és az esetleges állatorvos-váltás, amikor is a korábbi állatorvos nem tájékoztatta az alkalmazott immunizálásról az újat. Hozzájárulhatott ehhez továbbá a bikával való fedeztetés illetve fertőzött ondó használata mesterséges termékenyítéshez, bár ez utóbbi gyakorlatilag kizárt, hiszen a legálisan kereskedelmi forgalomba kerülő ondónak minden esetben BVDV-től mentes bikától kell származnia.

2., Ebbe a csoportba azok az állományok kerültek, melyek esetében változatos szeropozitivitási arányokat kaptunk. Ez arra utal, hogy az állományban valószínűleg van PI állat, mely folyamatosan terjeszti a vírust, esetleg fertőzött állatokat hoztak be, illetve arra is utalhat, hogy a tenyészállatok fertőzésnek voltak kitéve a vemhesség különböző stádiumaiban.

3., Ebbe a csoportba soroltuk a minimális szeropozitivitást mutató állományokat. Ez az enyhe fertőzöttség (egy szeropozitív vagy kétes eredményt adó minta egy adott telepről) betudható akár az ELISA módszer hibájának is, hiszen az alkalmazott ELISA kit gyártó által megadott validitása kb. 98%. Ezeknél a telepeknél tanácsos volna a pozitív egyedeket újrazvizsgálni, hogy kiderüljön valódi szerológiai státuszuk.

4., Ebben a csoportban, bár a minták szerológiai vizsgálata negatív eredményt adott, az eredményeket a későbbi kiértékeléskor, a következtetések levonásakor nem vettük figyelembe. Részben a kísérő adatok (életkor, hasznosítási irány) hiányoztak vagy hiányosak voltak, részben a túlzottan alacsony mintaszám statisztikailag nem reprezentálta megfelelően az állományt. Ezeknek az adatoknak a felhasználása hibás eredményekhez, ezáltal hibás következtetések levonásához vezetne.

5., Ebben a csoportban olyan állományok eredményeit találjuk, amelyek szérummintái negatív eredményt adtak és BVDV-mentességük majdnem biztos. Kellően nagy

mintapopulációt vizsgáltunk ugyan, de az állatok életkoráról nem áll rendelkezésre információ, így óvatosan kell következtetni az állomány státuszára. (Nem mindegy ugyanis, hogy a mentes állatok üszök vagy idősebb, többször ellett tehenek, melyeknek nagyobb volt az esélye az esetleges fertőződésre.)

6., Ez a csoport tartalmazza azokat az állományokat, amelyek szeronegativitást mutattak, statisztikailag reprezentatív számú mintát vizsgáltunk és minden szükséges kísérő információt a rendelkezésünkre bocsátottak. Jellemzően idősebb állományokról van szó, amelyek életkoruk miatt jelentős eséllyel fertőződhetek volna korábban a vírussal, de negatív eredményük azt bizonyítja, hogy a közelükben nem volt fertőzési forrás. Ezeket az állományokat valóban BVDV-mentesnek tekinthetjük.

Összefoglalva eredményeinket, az 1200 minta közül 43,4% mutatkozott szeropozitívna az összesítésben (521 állat). Ez az eredmény magasabb, mint a skandináv országok szeroprevalencia értékei, de ott korábban elindult a betegség elleni mentesítési folyamat, így sikeresen csökkenteni tudták a fertőzött állatok számát. Más országok esetében (pl. Ausztria egyes régiói, illetve Dánia) a prevalencia alacsonyabb (Greiser-Wilke et al. 2003).

Amennyiben állományszinten vizsgáljuk a fertőzöttség mértékét, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy a vizsgált állományok 29,6%-a mentesnek bizonyult. Ez az arány cáfolja, a korábbi, szinte teljes átfertőzöttségről szóló feltételezéseket (Varga et al. 1999). Ezek az állományok szolgálhatnak a mentesítés megindítása esetén a fertőzött állományokból eltávolított egyedek pótlásának forrásául. Ezek a gazdaságok magasabb árat érhetnek el állataik értékesítésekor (sőt egyes országokba csak ezek exportálhatnak), mivel ezek az állatok biztosan nem terjesztik a vírust. Ez igaz mind bel-, mind külkereskedelmi értelemben, hiszen a környező országokban megindult mentesítés miatt egyre nagyobb a kereslet a BVDV-mentes állatokra.

A vizsgált állományoknak további 11,1%-a igen alacsony szeropozitivitást mutatott. Ezekben az esetekben az ELISA kiértékelésénél az OD érték vagy éppen elérte a pozitív szintet, vagy kétségesnek mutatta az ominózus 1 mintát 15-20 minta közül. Ezeket az állatokat célszerű lett volna újrvizsgálni, hiszen az eredményt befolyásolhatja számos körülmény, leginkább a mintában a tárolás hibájából kialakult haemolízis, mely könnyen hamis-pozitív OD értéket eredményezhet. A mintavétel azonban nem a mi szervezésünkben zajlott, így az ismételt vizsgálatra nem volt lehetőségünk. A szerológiaiailag negatív állatokat a perzisztensen vagy esetleg frissen fertőződött, de szerológiaiailag még át nem hangolódott egyedek felismerése érdekében a vírus jelenlétére is meg kell vizsgálni. Erre alkalmas a fülszám behelyezésekor

nyert mintának, a vér lymphocytáinak és/vagy a vérsavónak a vizsgálata, a vírusnukleinsav kimutatása céljából RT-PCR-rel, illetve a vírus antigénjeinek a kimutatása érdekében Ag-ELISA-val. A vírushordozó állatokat az állományból el kell távolítani.

Amennyiben egy állományon belül igen magas a szeropozitív állatok száma, úgy nincs lehetőség a szelekciós mentesítésre. A megoldást a teljes állománycsere jelentheti, ami nagy költséggel jár. Köztes módszerként javasolható az, hogy a frissen született borjakat amint lehet, válasszák el az anyjuktól, és elkülönítve, fertőzésmentes környezetben neveljék, miközben minden újszülött borjú krotáliázásnál nyert fülminta-korongját megvizsgálják BVDV jelenlétére, hogy a megszületett PI borjakat azonnal el lehessen távolítani. Így belső forrásból meg lehet oldani a mentesítést, de megemlítendő, hogy az eljárás csak olyan gazdaságban alkalmazható, amely egymástól földrajzilag elkülönülő telepekkel rendelkezik, és így biztonságosan megoldható a mentes állatok elkülönítése a fertőzött állományrésztől.

Vizsgálataink során kaptunk mintát olyan gazdaságoktól, amelyek több teleppel rendelkeznek, egymástól távolabb. Ezekben az esetekben a különböző telepeket külön kezeltük, és a szerológiai státuszuknak megfelelően soroltuk be a fenti csoportokba. Ezeknek a gazdaságoknak alkalmuk nyílik a fent említett eljárással elvégezni a mentesítést, vagy kiválasztani a legkevésbé fertőzött/mentes telepet, és annak esetleges szelekciós mentesítése után onnan feltölteni a többi telepen kiselejtezett állományokat. Így ezekben a gazdaságokban viszonylag költség-hatékonyan elvégezhető a mentesítés. Természetesen ezeknek a gazdaságoknak is alapvető érdekük, hogy a mentesítési folyamat alatt kizárólag igazoltan BVDV-mentes állatokat vásároljanak, és semmi esetre se keveredjenek a mentesnek bizonyult borjak a vírussal fertőzött, vagy erre gyanús állatokkal.

A vizsgálataink alapján mentesnek mutatkozó állományokban lehetőleg meg kell őrizni ezt a státuszt. Ennek érdekében alkalmazni kell minden általános járványmegelőzési eljárást, a gazdálkodás minden műveletében, beleértve a tenyésztést és az állatbeszerzést is. Ezen felül fokozottan ügyelni kell a személyi és a telepre behajtó gépjárművekre vonatkozó higiéniai követelmények betartására.

## 7.2. BNP esetek vizsgálati eredményeinek megbeszélése

A korábban ismeretlen kórkép kialakulásának magyarázatára számos elmélet vetődött fel, de ezek egyike sem bizonyult hosszú távon elfogadhatónak.

A kialakuló kórbonctani-kórszövettani kép alapján kezdetben felvetődött a növényi eredetű vagy mycotoxinok okozta mérgezés, de ennek ellentmondott az, hogy újszülött, abrakot és szénát még nem fogyasztó borjak betegedtek meg, és az anyjukon semmilyen tünet nem jelentkezett, valamint a tartás korábban említett jó színvonala miatt a kórképet észlelő gazdaságokban a technológia és a takarmány is kiváló minőségű volt.

Az egyes circovirusok által kiváltott kórképekhez való hasonlóság miatt felvetődött a circovirusok esetleges kórtani szerepe is. Ezt egy PCR-vizsgálat is alátámasztotta, amelynek során sertés circovirus genomot mutattak ki BNP esetből (Kappe et al. 2010), de ebben az esetben a retrospektív vizsgálattal nem lehetett kizárni az esetleges bonctermi szennyeződés lehetőségét. E vizsgálat kivételével más beszámoló nem erősítette meg a circovirusok esetleges oktani szerepét, sőt cáfolták azt (Willoughby et al. 2010).

Ugyancsak felvetődött a kéknyelvbetegség vírus (BTV) esetleges kórtani szerepe is, melynek közvetett bizonyítékát a vírusfertőzés európai elterjedésének, illetve a BNP-esetek előfordulásának időbeli és földrajzi egybeesésében vélték felfedezni. A BTV kimutatására irányuló valamennyi kísérlet negatív eredménnyel zárult (Pardon et al. 2010).

Újabban a különböző vírusvakcinák előállításánál használt, szarvasmarha eredetű sejtenyészetek sejtjeinek felszínén levő immunhisztokompatibilitási (major histocompatibility complex, MHC) fehérjemolekulák szerepét feltételezik a kórkép kialakulásának hátterében (14. ábra). Eszerint a BVDV-fertőzés okozta gazdasági károk csökkentésére, elsősorban a szaporodásbiológiai zavarok kivédésére vemhes állatokban széles körben használt inaktivált vakcinában (Pregsure, Pfizer Inc.) alkalmazott immunstimuláns adalékanyagok olyan mértékben felerősítik a vakcina alapanyagként szolgáló vírustenyészetben levő, sejteredetű szennyeződésen előforduló allogenetikus MHC molekulákat, hogy azok ellen a vakcinával immunizált tehenekben ellenanyagok képződnek (Bridger et al. 2011; Pardon et al. 2011). A szarvasmarhák részére gyártott különböző vírusvakcinákat ugyanis szarvasmarha-eredetű sejtenyészetekre állítják elő, így azok elkerülhetetlenül tartalmaznak reziduális MHC-antigéneket. Az elölt (inaktivált) vakcinák előállításánál használt modern adjuválószernek némelyike olyan erőteljes mértékben fokozza az immunogén hatást, hogy a vírusfehérjék mellett ez a reziduális MHC-komponens is

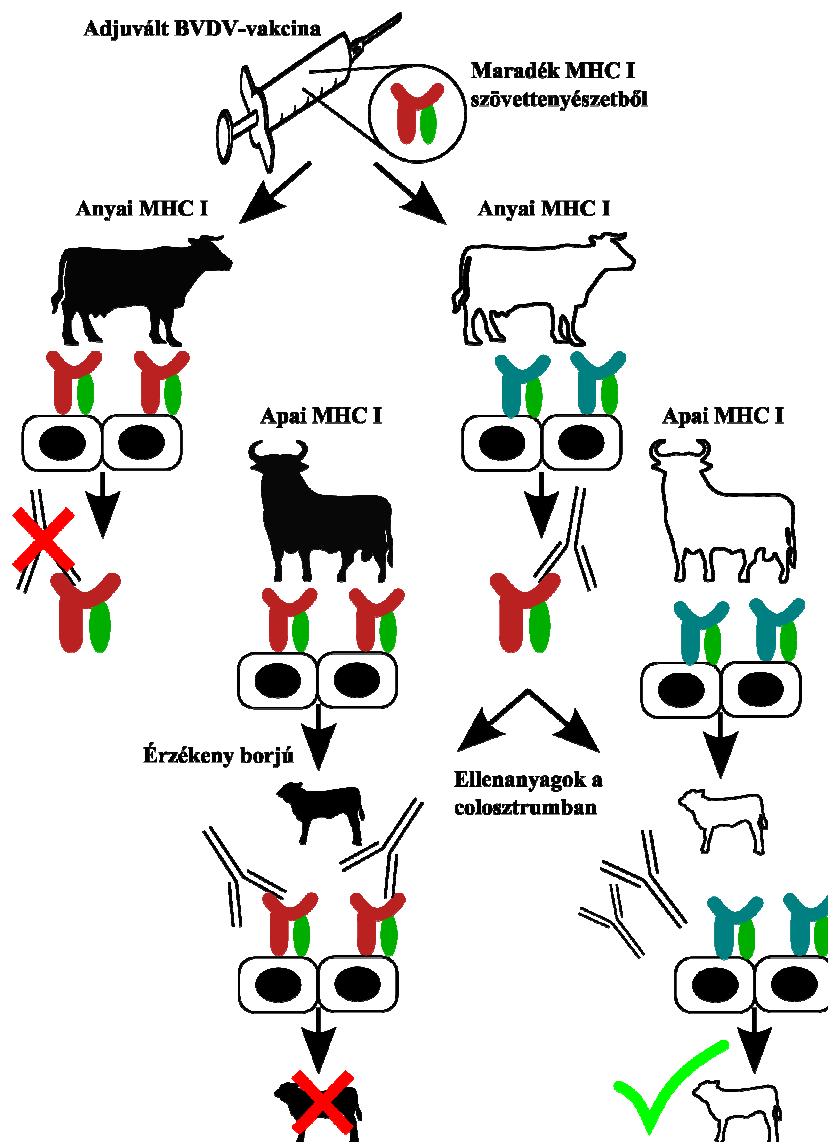


immunválaszt indukál az oltott állatokban. Természetesen csak azok ellen az MHC-molekulák ellen képződik ellenanyag, amelyek nem fordulnak elő a tehénben, hiszen a saját MHC antigénjeire toleráns minden állat. Ezek az ellenanyagok (a többi ellenanyaghoz hasonlóan) a kolosztrummal átjutnak az újszülött borjúba, és amennyiben a borjúnak a bikától örökölt sejtfelszíni MHC antigénjei között vannak olyanok, amelyek ellen képződtek ellenanyagok az anyaállatban a vakcinázás mellékhatásaként, akkor ezekhez kapcsolódva citotoxikus reakciót indítanak meg (Assad et al. 2012). Ez a cytotoxicus reakció elsősorban csontvelő-károsodást és következményes pancytopeniát okoz (Pardon et al. 2010; Bastian et al. 2011; Deutskens et al. 2011). Ez egyben megfelelő magyarázatot adhat arra is, hogy miért csak, sőt miért elsősorban a jó tartási körülmények között élő, rendszeresen vakcinázott tehenektől születő, kolosztrummal bőven ellátott borjakon jelentkezik a kórkép (Friedrich et al. 2011), ahogyan az az általunk vizsgált esetben is történt.

Mivel az állatállományukra legjobban gondot viselő gazdaságok a vemhesség alatt akár kétszer-háromszor is immunizálták a teheneket, azok szinte hiperimmunizálódtak az idegen MHC-allotípus ellen, és az ellenanyagok a kolosztrumban is nagy mennyiségben választódtak ki. Ez nem okoz gondot, ha a borjú apai vonalon nem a vakcinában levő MHC-allotípust örököli. Ha viszont igen, akkor az anyai ellenanyagok citotoxikus hatást fejtenek ki a borjú sejteire, azok közül is elsősorban az MHC-antigénekben igen gazdag csontvelősejtekre.

Mindez magyarázatot ad arra, hogy miért nem jelentkezett egy gazdaságon belül sem valamennyi borjún a kórkép. Hiszen a gazdaságokban a tehenek MHC-allotípusa eltérő, így nem mindegyik immunizálódott a vakcinában levő MHC antigén ellen, volt, amelyik azt sajátjának ismerte el. Ugyancsak különböző lehet egyazon gazdaságban az apai vonal is, hiszen különböző bikákból származó szaporítóanyagot használhatnak termékenyítésre, így a borjak között is eltérő apai MHC-antigénnel rendelkező egyedek lehettek. Csak azok betegedtek meg, ahol a vakcinatermelésre használt sejtvonal és az apai MHC-antigének hasonlóak voltak. Emiatt vélték többen genetikai eredetűnek a betegséget (Ballingall 2011; Ballingall et al. 2011; Kasonta et al. 2012).

A kolosztrum meghatározó szerepét a kórkép kialakításában egyértelműen tisztázták: többször vakcinázott tehenek főcstejével a nem az adott tehenektől született borjakban is sikerült pancytopeniát kiváltani (Friedrich et al. 2009; Bell et al. 2010; Schroter et al. 2011).



14. ábra: A borjak újszülöttkori pancytopeniájának immunpatológiai háttere. A vakcinában levő MHC I. alloantigének csak a nem homológ allotípusú tehenben (fehér színnel jelölve) indukálnak ellenanyagválaszt. Amennyiben ezt a tehenet a vakcinával megegyező MHC I. allotípusú bika (feketével jelölve) spermájával termékenyítik, akkor a borjú (feketével jelölve) is hordozza az apai allotípust, így a kolozstrummal felvett anti-allotípus ellenanyagok hatására kialakul benne a pancytopenia (Deutskens és mtsai ábrájának módosítása, 2011).

Az általunk megfigyelt esetek a BNP legjellegzetesebb tüneteit mutatták. Mivel a vizsgálatok idején egyértelműen elfogadható magyarázat még nem volt a kórkép oktatát illetően, vizsgálatainkat számos más irányba is kiterjesztettük, ezen belül is külön gondot fordítottunk a BVDV esetleges kórtani szerepének kizárására. Ez minden esetben megtörtént, de a vizsgálatra érkezett tetemek egyikéből sem sikerült BVD-vírust kimutatni. Ugyanakkor a

vizsgálat során alkalmazott PCR–alapú tesztek más vírusok jelenlétét sem mutatták ki, és baktériumokat sem sikerült az elváltozott területek szöveteiből kitenyészteni. A BVD–elleni vakcinázás, a betegség által okozott gazdasági károk ismeretében (Ózsvári et al. 2001), továbbra sem mellőzhető a fertőzött telepeken. Tekintettel a betegség gazdasági jelentőségére, a károk csökkentése érdekében továbbra is rendelkezésre áll hatékony, Magyarországon engedélyezett vakcina, de a vemhes tehenek többszöri vakcinázását mindenképpen kerülni kell. A kórkép immunpatológiai háttere felveti annak lehetőségét, az igen hatékony adjuválszerek miatt a borjak újszülöttkori pancytopeniájához hasonló kórképek kialakulására más vakcinák és más fajok esetében is számítani kell.

### 7.3. Rekombinációs vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A vizsgálat során meglepő volt a BVDV genomok rekombinációs gyakorisága, hiszen a 62 BVDV-1 genomból 5, míg a BVDV-2 esetén 50 genomból 1 alkalommal sikerült rekombinációs eseményt kimutatni. Ez a vizsgált BVDV-1 genomok 8%-a, a BVDV-2 genomok 2%-a. Ezeket a rekombinációkat meglehetősen erős ( $1,58 \times 10^{-310}$  és  $1,26 \times 10^{-4}$  közötti) p-értékek támogatják, melyek majdnem kétséget kizáróan bizonyítják a rekombinációk valódiságát. Az általunk talált hat rekombináció közül kettő már korábbi szerzők leírásaiból ismert volt, de a saját vizsgálataink ezekben az esetekben is kiegészítik a korábbi ismereteket. Az elemzés kezdetén úgy döntöttünk, hogy csak teljes genomokat vonunk elemzés alá, mivel a vizsgálati módszerek matematikai algoritmusából következően a rövidebb szakaszok vizsgálata esetén több rekombinációs esemény azonosítható ugyan, de ezzel együtt jelentősen megnő a hamis-pozitív észlelések száma is. Ennek oka, hogy a rövidebb szakaszok egymáshoz hasonló részeinek kialakulásában koevolúciós folyamatok miatt a mutációk is jelentős szerepet játszhattak, melyeket ilyen módon nehéz elkülöníteni a valódi rekombinációktól.

A két BVDV-faj törzsei világosan elkülönülnek a filogenetikai fán. Korábbi vizsgálatok egyetlen, a két faj között bekövetkezett rekombinációra derítettek fényt (Ridpath és Bolin 1995). A jelen vizsgálatban, amikor az elemzésbe teljes genomszekvenciákat vontunk be, ezt a rekombinációs eseményt nem sikerült megerősítenünk. A fajok közötti rekombinációk alacsony száma alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a vírusfaj-specifikus immuntolerancia elősegíti a koinfekció kialakulását a fajazonos, de genetikailag eltérő vírustörzsekkel a gazdaegyedben. Másrészt, vannak rekombinációk, melyek megváltoztatják az adott törzs hasonlósági viszonyait, így teljes-genom illesztés esetén nem teljesül a több szerző által javasolt és használt szubgenom csoportosítás a BVDV-1 (BVDV1a-BVDV1n) esetében. Az említett csoportosítás alapja a genomok 5' UTR szakaszának filogenetikai összehasonlításán alapul és nem veszi figyelembe a genom többi részét, ami jóval meghaladja az 5' UTR szakasz méretét, és emiatt a nagyobb genomszakasz genetikai bélyegei elnyomhatják, felülírhatják a rövidebb szakasz elemzése alapján kialakuló rokonsági viszonyokat.

Vizsgálatunkban az algoritmusok olyan genomokat választottak ki „szülői” szekvenciaként, melyek az adott illesztésben a legvalószínűbbnek tűntek a rekombinációk létrehozásában. Ez nem jelenti azt, hogy a rekombinációban pont ezek a törzsek vettek részt, mivel meglehetősen

valószínű, hogy a valódi szekvencia donor törzsek nincsenek még megszekvenálva, így nem kerülhettek be a GenBank-ba. Így lehetséges az, hogy a rekombináns szakaszok nem egyeznek meg 100%-osan a program által „szülő”-ként azonosított genomok megfelelő szakaszaival, csak nagyon közeli rokonságuk bizonyítható.

Az általunk használt módszerek robusztusságának igazolására bevontuk a vizsgálandó genomok közé az AF268278-as rekombináns törzset (BVDV-1), mivel a szakirodalom és a GenBank-i adatok áttanulmányozása után kiderült, hogy a törzs egy mesterséges kiméra, melyben a kutatók a BVDV N<sup>pro</sup> génjét egy human hepatitis C vírus eredetű szakasszal cserélték ki. A vizsgálat során csak az egyik „szülő” törzset (major parent) lehetett azonosítani, ez az M31182 (12. ábra A). A minor parent keresése nem hozott eredményt, így a program erre a „szülőre” unknown, azaz ismeretlen eredményt adott, mivel hepatitis C genomok nem képezték részét az elemzésnek. Ez az eredmény igazolta az általunk használt módszerek megbízhatóságát és érzékenységét.

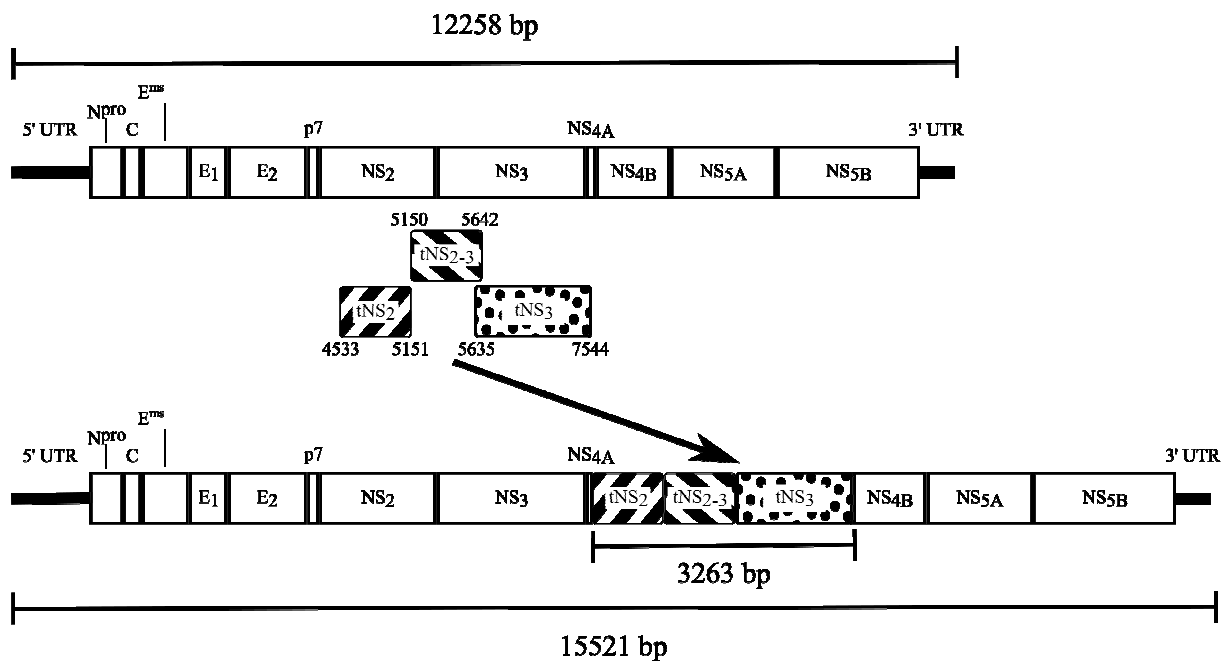
Eredményeink megerősítették Weber és mts-ai 2015-ben leírt, a JN704144 törzsben felderített kettős rekombinációs eseményt melynél a rekombináns törzs két eltérő helyen is átvette a minor parent genomszakaszait. A rekombináns törzs egy kínai esetből származik, a major parent az Av69-es Védévac törzs, amelyet szintén Kínában szekvenáltak, a minor parent pedig szintén egy telepi mintából származó izolátum, az SD1-es törzs. Amellett, hogy ez a rekombinációs esemény példája a feltehetőleg ritka kettős rekombinációnak, rávilágít az élő, attenuált vakcinák használatának kockázataira is. Az élővírusos vakcina csökkenti a vad vírusok okozta gazdasági veszteségeket, de mellette a fertőzés fennmarad és, mint látható, rekombinációra ad lehetőséget vad vírusokkal. A rekombinációs esemény abból a szempontból is egyedi, hogy extrém alacsony p-értékek támogatják minden alkalmazott módszer esetében, az értékek  $p < 7,23 \times 10^{-43}$  és  $1,28 \times 10^{-230}$  között változnak (3. táblázat).

A következő rekombináns, a JQ799141, melyet szintén Kínában izoláltak, ugyanúgy, mint a „szülő” törzseket, a JN400273-ast és a KF986608-at. Érdekessége a jelenségnek, hogy míg a rekombináns törzs gazdafaja a jak volt, az egyik parent-et, a JN400273-t sertésből izolálták. Logikus, hogy ez a törzs szarvasmarha és jak állományokban is perzisztál, máskülönben nem jöhetett volna létre a rekombináció. A tény, hogy ebben a tripletben mindhárom törzs (a két „szülő” és a rekombináns is) három különböző gazdafajból (szarvasmarha, sertés, jak) származik, igen fontos járványtani szempontból. Még nem publikáltak olyan esetet, melynek során különböző gazdafajok eltérő vírusfajba (a juhok border disease vírusa /BDV/, szarvasmarha BVDV és a klasszikus sertéspestis vírusa /CSF/) tartozó törzsei között alakult volna ki rekombináció a *Pestivirus* nemzetségen belül. Ilyet mi sem találtunk, bár

vizsgálataink kezdetén az elemzésnek része volt 12 BDV és 171 CSF törzs is, de ezen eltérő gazdafajok vírusai között nem tudtunk rekombinációs eseményt kimutatni, így ezeknek a szekvenciáknak az adatai nem kerültek bele az „Anyag és módszer” fejezetbe. Mindazonáltal a JQ799141 rekombináns törzs megtalálása megerősíti azt, hogy azonos vírusfajba tartozó törzsek – melyeket különböző gazdafajokból izoláltak – közötti rekombinációra lehetőség van. A keresztfertőzés lehetősége (BVDV-1 sertésben) pedig felvetheti a különböző fajok, különböző fajú vírusainak egymással történő rekombinációjának lehetőségét is.

Az U86599-es törzs más szempontból vált érdekessé. Ennek a genomszekvenciája nagyon hasonlít az U86600-ra, melyben korábban SimPlot analízis segítségével felderítettek lehetséges rekombinációs eseményt (Jones és Weber 2004). Az általunk kapott eredmény szerint a korábban meghatározott JX297513 valóban a major parent, de a minor parent tekintetében új eredményt tudunk bemutatni: az AF041040 helyett a AF091605 az új minor parent az általunk használt fejlettebb programverzió eredményei szerint. Mindazonáltal a vizsgálatok szerint az AF091605 igen közeli rokona a korábbi „szülőiként” azonosított szekvenciának. Emellett az újabb módszerekkel sikerült hosszabb rekombinációs területet felderíteni az U86599-es genomban, mint amelyről a korábbi publikációban beszámoltak az U86600 esetén, és a mi esetünkben a p-értékek is erősebbek. Mivel az U86600 nagyon közeli rokona az U86599-nek (kevesebb, mint 1%-ban tér el tőle), így az eredményt összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az U86599 az eredeti rekombináns törzs, az U86600 pedig ebből származik, az eltérést a kettő között pedig a rekombináns kialakulása óta elszenvedett pontmutációk eredményezték. Fontos megemlíteni azt, hogy ezt a rekombinációs eseményt támogatják a leggyengébb p-értékek a mi eredményeink közül, és az egyik eljárás, a 3Seq nem is igazolta a rekombináció bekövetkeztét. Ezek a körülmények a szekvencia részletesebb vizsgálatát tették szükségessé, és a bemutatott rekombinációs esemény valódiságát fenntartásokkal kellett kezelni. Ez jó példa arra, hogy a kapott számszerű és grafikus adatokat, még ha a kritériumoknak meg is felelnek, mindig célszerű újraértelmezni, amennyiben egyéb körülmények ezt indokolják. A rekombinációban szereplő major parent-et az Amerikai Egyesült Államokban izolálták, a minor parent-et pedig az Egyesült Királyságban. Mivel a kimutatott „szülő” szekvenciák a valódiakkal távolabbi rokonságban állnak, mint a többi bemutatott rekombináció esetén, így a megerősítő p-értékek gyengébbek. További zavaró körülményként jelentkezik a genom szokatlanul nagy mérete (15521 nt). Mint a vizsgálat során kiderült, ennek az oka a genomba az NS2-3 régióba beékelődő 3263 nt hosszú szakasz. Ez a szakasz a vírus bizonyos génjeinek részleges repetíciója (részleges NS2, NS2-3 és NS3 gén), melyek bizonyos átfedéssel épültek be a genom említett területére. A szakasz genetikai

hasonlósági viszonyainak felderítése után kiderült, hogy a beékelődő szakasz legközelebbi „rokona” ugyanannak a törzsnek a megfelelő helyen lévő saját génjeiből összeálló régió (15. ábra). Így kimondható, hogy ennek a beékelődő szakasznak az eredete nem más, mint a törzs saját génjeinek részleges duplikációja és nem egy idegen genomból származó rekombináldó szakasz. Mivel azonban az elemzőprogram algoritmusai nem alkalmasak arra, hogy saját genom eredetű replikatív szakaszokat keressenek, így a beékelődött szakaszt a hozzá legközelebbi rokon szekvencia eredetű rekombinációként azonosították, helytelenül.



15. ábra: Az U86599 törzs génjeinek részleges duplikációja.

Egy másik példa egy korábban leírt eredmény újraértékelésének szükségességére a BVDV-2 törzsek között korábban leírt rekombináns, a GQ888686 esete. Az általunk elvégzett elemzés során, amikor mind a 112 genomot tartalmazó illesztést vizsgáltuk és az elfogadási küszöbértéket  $p < 0,005$ -re ( $5 \cdot 10^{-3}$ ) állítottuk, egyetlen módszer sem jelölte meg ezt a törzset rekombinánsként. Amikor az 11. ábrán látható filogenetikai fa alapjául szolgáló szűkített illesztést alkalmaztuk, és 72 genomot analizáltunk, az RDP módszer ismét nem fogadta el rekombinánsnak a szekvenciát, és a többi módszer is csak viszonylag gyenge p-értékeket adott. A korábban leírt „szülő” szekvenciák mindkét esetben részét képezték az illesztéseknek. Eredményeinket összefoglalva a GQ888686 törzset az új, továbbfejlesztett algoritmussal vizsgálva nem tekintjük rekombinánsnak.

Eredményeink áttekintése során kiderült, hogy a vizsgálat törzsek közül a BVDV-2 fajba tartozók között igen kis számban sikerült rekombinációs eseményt kimutatni, bár a vizsgálatba vont BVDV-2-es törzsek száma csak csekély mértékben volt kevesebb a BVDV-1-es törzsekénél. A BVDV-2-es törzsek jelentős részét Észak-Amerikában (az USA-ban és Kanadában) izolálták, tehát elméletileg ezek egymás mellett léteznek egy (a BVDV-1 elterjedési területéhez képest) szűkebb földrajzi területen, ami pedig alkalmat kínált volna a koinfekcióra és ennek következtében a rekombinációk létrejöttére. A kis számú rekombináns a BVDV-2-es törzsek között jelentheti a faj nagyobb genetikai stabilitását, melyet megerősít, hogy összehasonlítva a BVDV-1-gyel, lényegesen kevesebb szubgenotípus csoportba sorolják a törzseket az 5' UTR szekvenciák alapján. Munkánk során a korábban más szerző által leírt eseten kívül, melynek rekombinációs jellegét a korábban leírtaknak megfelelően elvetettük, csak az AF145967 jelű BVDV 2-es törzset tudtuk rekombinánssként azonosítani. A törzs genomjában más szerző korábban már leírt rekombinációs jelenséget, de az a terület különbözik az általunk azonosított rekombináns szakasztól. Emellett a korábban rekombinációként leírt jelenség mely az NS3 gént érinti, véleményünk szerint egy inzerció eredménye, és az elemzés során ezen a területen a megjelölt rekombináns és minor parent hasonlósági vonal a grafikonon csak kissé közelíti, de nem keresztezi a rekombináns-major parent hasonlósági vonalat. Ezen kívül egyetlen általunk alkalmazott eljárás sem hozott szignifikáns eredményt ennek a leírt rekombinációnak az alátámasztására, így el kell vetnünk ennek az eseménynek a valódiságát. Ellenben a genom 3' vége felé, az NS5b génben egy 195 nt hosszúságú rekombináns területet sikerült azonosítani. Az eredmények szerint ez a terület az AY149215-ös törzsből származik, amely szintén a BVDV-2-es fajba tartozik. A kérdéses rekombináns területet vizsgálva kiderült, hogy BLAST keresést alkalmazva 100%-os egyezést találtunk egy BVDV-1 törzssel, melynek részleges genomja KF896612 jelzéssel szerepel a GenBank-ban. A rekombinációk azonosítására használt módszereink azért nem voltak képesek ezt a jelenséget azonosítani, mert részleges szekvenciák nem képezték részét az elemzésünknek, és a jelek szerint a felhasznált BVDV-1-es genomok közül egy sem volt kellően hasonló a KF896612 szakaszhoz.

Eredményeink igazolják a rekombinációs események relatív gyakori előfordulását a BVDV törzsekben. A genomátrendeződés és a genetikai csuszamlás jelensége régóta ismert a szegmentált genetikai állománnyal rendelkező vírusfajok (influenzavírusok, bluetongue vírus) esetén, de ritkább a nem-szegmentált genomú vírusoknál, mint amilyen a BVDV is. Figyelembe véve a BVDV patomechanizmusában a PI állatok által játszott szerepet, az endémiásan fertőzött területeken a PI állatok elősegíthetik a rekombinációk, ezen belül fajok



közötti rekombinációk létrejöttét. A rekombinációk keresésére szolgáló módszerek alkalmazásakor mindenképpen indokolt a lehetséges eljárások, a különböző algoritmusok párhuzamos használata, mert így, kombinációban a programok egymás erősségeinek kihasználásával és gyengeségeiknek az ellensúlyozásával megbízhatóbb eredményt adnak.

## 8. Új tudományos eredmények

1. Egész országra kiterjedő szerológiai felmérést végeztem a magyarországi BVDV fertőzöttség megállapítása érdekében. Ennek során felismertem, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben, a hazai szarvasmarha állományok jelentős része mentes a BVDV fertőzöttségtől.
2. Elsőként számoltam be a újszülött borjak pancytopeniájaként (bovine neonatal pancytopenia; BNP) leírt betegség hazai előfordulásáról.
3. Rekombinációkat kereső számítógépes program segítségével új, eddig le nem írt rekombináns vírustörzseket derítettem fel, egyes korábban leírt rekombinációs események adatait pontosítottam (minor-major parent genomok, rekombinációs szakasz lokalizációja, az esemény statisztikai valószínűségének adatai különböző módszerekkel meghatározva).
4. A rekombinációs vizsgálat során kimutattam, hogy az élővírusos BVDV vakcina (Védévac) törzs képes rekombinálódni vad BVDV vírusokkal, és rámutattam ennek lehetséges járványtani kockázatára.
5. Sikerült felderítenem egy eddig le nem írt, fajközötti rekombinációs esemény a BVDV-1 és BVDV-2 fajba sorolt vírusok között.

## 9. Irodalomjegyzék

- Abutarbush, S. M.: **Veterinary Medicine — A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats, 10th edition**, *Can Vet J* **51**(5): 541-541. 2010
- Ammari, M., McCarthy, F., Nanduri, B., Pinchuk, G. és Pinchuk, L.: **Understanding the Pathogenesis of Cytopathic and Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Infection Using Proteomics**. In: *Proteomic Applications in Biology*,. Szerk.: D. J. Heazlewood. InTech. 2012
- Assad, A., Amann, B., Friedrich, A. és Deeg, C. A.: **Immunophenotyping and characterization of BNP colostrum revealed pathogenic alloantibodies of IgG1 subclass with specificity to platelets, granulocytes and monocytes of all maturation stages**, *Vet Immunol Immunop* **147**(1-2): 25-34. 2012
- Bálint, Á., Baule, C., Pálfi, V., Dencső, L., Hornyák, Á. és Belák, S.: **A 45-nucleotide insertion in the NS2 gene is responsible for the cytopathogenicity of a bovine viral diarrhoea virus strain**, *Virus Genes* **31**(2): 135-144. 2005
- Ballingall, K. T.: **Genes and the development of bovine neonatal pancytopenia**, *Vet J* **190**(2): 187-188. 2011
- Ballingall, K. T., Nath, M., Holliman, A., Laming, E., Steele, P. és Willoughby, K.: **Lack of evidence for an association between MHC diversity and the development of bovine neonatal pancytopenia in Holstein dairy cattle**, *Vet Immunol Immunop* **141**(1-2): 128-132. 2011
- Bastian, M., Holsteg, M., Hanke-Robinson, H., Duchow, K. és Cussler, K.: **Bovine Neonatal Pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies?**, *Vaccine* **29**(32): 5267-5275. 2011
- Baule, C., van Vuuren, M., Lowings, J. P. és Belák, S.: **Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa**, *Virus Res* **52**(2): 205-220. 1997
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H. és Thiel, H. J.: **Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification**, *Virology* **311**(1): 96-104. 2003
- Becher, P. és Tautz, N.: **RNA recombination in pestiviruses Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease**, *Rna Biol* **8**(2): 216-224. 2011

- Bell, C.: **Bovine Neonatal Pancytopenia or bleeding calf syndrome**, Livestock **16**(1): 24-28. 2011
- Bell, C. R., Scott, P. R., Kerr, M. G. és Willoughby, K.: **Possible preventive strategy for bovine neonatal pancytopenia**, Vet Rec **167**(19): 758-758. 2010
- Bognár, K.: **Foetal active immunization of calves following inoculation of the dam with a bovine viral diarrhoea vaccine (Vedevac)**, Acta Vet Acad Sci Hung **23**(1): 1-11. 1973
- Boni, M. F., Posada, D. és Feldman, M. W.: **An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets**, Genetics **176**(2): 1035-1047. 2007
- Bridger, P. S., Bauerfeind, R., Wenzel, L., Bauer, N., Menge, C., Thiel, H. J., Reinacher, M. és Doll, K.: **Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia**, Vet Immunol Immunop **141**(1-2): 1-10. 2011
- Brinkhof, J., Zimmer, G. és Westenbrink, F.: **Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle**, Vet Microbiol **50**(1-2): 1-6. 1996
- Bruschke, C. J. M., Hulst, M. M., Moormann, R. J. M., vanRijn, P. A. és vanOirschot, J. T.: **Glycoprotein E-rns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species**, J Virol **71**(9): 6692-6696. 1997
- Cho, H. J., Masri, S. A., Deregt, D., Yeo, S. G. és Thomas, E. J. G.: **Sensitivity and Specificity of an Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay for the Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus-Antibody in Cattle**, Can J Vet Res **55**(1): 56-59. 1991
- Coggins, L., Gilléspie, J., Robson, D., Thompson, J., Phillips, W., Wagner, W. és Baker, J.: **Attenuation of virus diarrhea virus (strain Oregon C24V) for vaccine purposes.**, Cornell Vet **51**: 539-545. 1961
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. és Purchio, A. F.: **Molecular-Cloning and Nucleotide-Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhea Virus**, Virology **165**(1): 191-199. 1988
- Corapi, W. V., French, T. W. és Dubovi, E. J.: **Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus**, J Virol **63**(9): 3934-3943. 1989
- Cságotla, A., Kecskeméti, S., Kardos, G., Kiss, I. és Tuboly, T.: **Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars**, Arch Virol **151**(3): 495-507. 2006

- Deng, Y., Shan, T. L., Tong, W., Zheng, X. C., Guo, Y. Y., Zheng, H., Cao, S. J., Wen, X. T. és Tong, G. Z.: **Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus 1 isolate from swine**, Arch Virol **159**(9): 2513-2517. 2014
- Deutskens, F., Lamp, B., Riedel, C. M., Wentz, E., Lochnit, G., Doll, K., Thiel, H. J. és Rumenapf, T.: **Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I)**, Vet Res **42**(1): 97. 2011
- Dubovi, E. J.: **Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus**, Biologicals **41**(1): 8-13. 2013
- Durham, P. J. K. és Hassard, L. E.: **An Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (Elisa) for Antibodies to Bovine Viral Diarrhea Virus**, Vet Microbiol **22**(1): 1-10. 1990
- Friedrich, A., Buttner, M., Rademacher, G., Klee, W., Weber, B. K., Muller, M., Carlin, A., Assad, A., Hafner-Marx, A. és Sauter-Louis, C. M.: **Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves**, Bmc Vet Res **7**: 10. 2011
- Friedrich A., Rademacher, G., Carlin, A., Assad, A., Sauter-Louis, C. és Klee, W.: **A novel problem: increase in the incidence of a bleeding disorder in young calves - clinical and epidemiological findings.**, Proceedings of the European Buiatrics Forum, Marseille, Société Française de Buiatrie. 2009
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. és Gibbs, A. J.: **Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences**, Bioinformatics **16**(7): 573-582. 2000
- Goens, S. D.: **The evolution of bovine viral diarrhea: a review**, Can Vet J **43**(12): 946-954. 2002
- Greiser-Wilke, I., Grummer, B. és Moennig, V.: **Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe**, Biologicals **31**(2): 113-118. 2003
- Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Loken, T., Akerstedt, J. és Osteras, O.: **Respiratory infections in Norwegian dairy calves**, J Dairy Sci **92**(10): 5139-5146. 2009
- Hagglund, S., Svensson, C., Emanuelson, U., Valarcher, J. F. és Alenius, S.: **Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds**, Vet J **172**(2): 320-328. 2006
- Hanson, L. A., Rudis, M. R., Vasquez-Lee, M. és Montgomery, R. D.: **A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene**, Virol J **3**: 28. 2006

- Holmes, E. C., Worobey, M. és Rambaut, A.: **Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus**, Mol Biol Evol **16**(3): 405-409. 1999
- Houe, H.: **Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus**, Vet Clin N Am-Food A **11**(3): 521-&. 1995
- Jones, L. R. és Weber, E. L.: **Homologous recombination in bovine pestiviruses Phylogenetic and statistic evidence**, Infect Genet Evol **4**(4): 335-343. 2004
- Kahn, C. M., (Szerk). **Merck Veterinary Manual**, Whitehouse Station N. J. Merck & Co. 2010
- Kappe, E. C., Halami, M. Y., Schade, B., Alex, M., Hoffmann, D., Gangl, A., Meyer, K., Dekant, W., Schwarz, B. A., Johne, R., Buitkamp, J., Bottcher, J. és Muller, H.: **Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology**, Berl Munch Tierarztl **123**(1-2): 31-41. 2010
- Kasonta, R., Sauter-Louis, C., Holsteg, M., Duchow, K., Cussler, K. és Bastian, M.: **Effect of the vaccination scheme on PregSure (R) BVD induced alloreactivity and the incidence of Bovine Neonatal Pancytopenia**, Vaccine **30**(47): 6649-6655. 2012
- Kelling, C. L. és Topliff, C. L.: **Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections**, Biologicals **41**(1): 20-25. 2013
- Kudron, E.: **Prevalence of seropositivity against certain viral diseases in cattle in the western transdanubian region of Hungary between 1972-1996**, Magy Áo Lapja **121**(5): 264-266. 1999
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E. és Tautz, N.: **Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus**, J Virol **78**(19): 10765-10775. 2004
- Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P. és Brownlie, J.: **Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis**, Vet J **199**(2): 201-209. 2014
- Laureyns, J., Ribbens, S. és de Kruif, A.: **Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle**, Vet J **184**(1): 21-26. 2010
- Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G. J., Houe, H., Moennig, V., Saatkamp, H. W., Sandvik, T. és Valle, P. S.: **The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future**, Rev Sci Tech Oie **25**(3): 961-979. 2006

- Lindberg, A. L. E. és Alenius, S.: **Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations**, Vet Microbiol **64**(2-3): 197-222. 1999
- Makoschey, B., Becher, P., Janssen, M. G., Orlich, M., Thiel, H. J. és Luttkicken, D.: **Bovine viral diarrhoea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity**, Vaccine **22**(25-26): 3285-3294. 2004
- Manninger, R., Bartha, A., Juhász, M. és Szent-Iványi, T.: **Vizsgálatok a szarvasmarhák hazánkban előforduló, vírus okozta hasmenésének oktanáról**, Magy. Áo. Lapja **18**: 225-227. 1963
- Martin, D. és Rybicki, E.: **RDP: detection of recombination amongst aligned sequences**, Bioinformatics **16**(6): 562-563. 2000
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. és Muhire, B.: **RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes**, Virus Evol **1**(1). 2015
- Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. és Williamson, C.: **A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints**, Aids Res Hum Retrov **21**(1): 98-102. 2005
- Meyers, G. és Thiel, H. J.: **Molecular characterization of pestiviruses**, Adv Virus Res **47**: 53-118. 1996
- Olafson, P., Mac, C. A. és Fox, F. H.: **An apparently new transmissible disease of cattle**, Cornell Vet **36**: 205-213. 1946
- Ózsvári, L., Bíró, O. és Csaba, I. B.: **Quantification of losses caused by bovine viral diarrhoea and mucosal disease**, Magy Áo Lapja **123**(9): 555-560. 2001
- Ózsvári, L., Bíró, O. és Illés B., C.: **A szarvasmarhák vírusos hasmenése és nyálkahártya-betegsége (BVD-MD) okozta veszteségek nagyságának számszerűsítése**, Magy Áo Lapja **123**(9): 550-560. 2001
- Padidam, M., Sawyer, S. és Fauquet, C. M.: **Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination**, Virology **265**(2): 218-225. 1999
- Pardon, B., Steukers, L., Dierick, J., Ducatelle, R., Saey, V., Maes, S., Vercauteren, G., De Clercq, K., Callens, J., De Bleeker, K. és Deprez, P.: **Haemorrhagic Diathesis in Neonatal Calves: An Emerging Syndrome in Europe**, Transbound Emerg Dis **57**(3): 135-146. 2010
- Pardon, B., Stuyven, E., Stuyvaert, S., Hostens, M., Dewulf, J., Goddeeris, B. M., Cox, E. és Deprez, P.: **Sera from dams of calves with bovine neonatal pancytopenia contain**

- alloimmune antibodies directed against calf leukocytes**, Vet Immunol Immunop **141**(3-4): 293-300. 2011
- Patel, J. és Williams, J.: **Study towards the selection of a novel broadly antigenic cytopathic BVD virus (cp BVD) strain for inactivation BVDV vaccine Bovilis BVD**, XX WAB Congress, Sydney, Australia, Australian Association of Cattle Veterinarians. 1998
- Penny, C. D., Bell, C., Morrison, L., Howie, F. és Willoughby, K.: **Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves**, Vet Rec **164**(24): 762. 2009
- Peterhans, E. és Schweizer, M.: **BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response**, Biologicals **41**(1): 39-51. 2013
- Poole, T. L., Wang, C. Y., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A. és Collett, M. S.: **Pestivirus Translation Initiation Occurs by Internal Ribosome Entry**, Virology **206**(1): 750-754. 1995
- Posada, D.: **Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Empirical data**, Mol Biol Evol **19**(5): 708-717. 2002
- Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S. és Heim, D.: **Bovine viral diarrhea (BVD) eradication in Switzerland-Experiences of the first two years**, Prev Vet Med **99**(2-4): 112-121. 2011
- Ramsey, F. K. és Chivers, W. H.: **Mucosal disease of cattle**, N Am Vet **34**: 629-633. 1953
- Ridpath, J. F.: **Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status**, Vet Clin N Am-Food A **26**(1): 105-+. 2010
- Ridpath, J. F.: **Immunology of BVDV vaccines**, Biologicals **41**(1): 14-19. 2013
- Ridpath, J. F. és Bolin, S. R.: **The Genomic Sequence of a Virulent Bovine Viral Diarrhea Virus (Bvdv) from the Type-2 Genotype - Detection of a Large Genomic Insertion in a Noncytopathic Bvdv**, Virology **212**(1): 39-46. 1995
- Roehrig, J. T.: **Antigenic structure of flavivirus proteins**, In: *Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution*. Szerk.: Maramorosch K. Academic Press 141-. 2003
- Rumenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. és Thiel, H. J.: **Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses**, J Virol **67**(6): 3288-3294. 1993
- Sato, A., Tateishi, K., Shinohara, M., Naoi, Y., Shiokawa, M., Aoki, H., Ohmori, K., Mizutani, T., Shirai, J. és Nagai, M.: **Complete Genome Sequencing of Bovine Viral Diarrhea Virus 1, Subgenotypes 1n and 1o**, Genome Announc **4**(1). 2016
- Sauter-Louis, C., Carlin, A., Friedrich, A., Assad, A., Reichmann, F., Rademacher, G., Heuer, C. és Klee, W.: **Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal**



- pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany**, Prev Vet Med **105**(1-2): 49-58. 2012
- Schroter, P., Kuiper, H., Holsteg, M., Puff, C., Haas, L., Baumgartner, W., Ganter, M. és Distl, O.: **[Reproducibility of bovine neonatal pancytopenia (BNP) via the application of colostrum]**, Berl Munch Tierarztl Wochenschr **124**(9-10): 390-400. 2011
- Simonyi, E. és Bíró, J.: **Immunization experiments against hog cholera with the bovine viral diarrhoea virus strain Oregon C24V**, Acta Vet Acad Sci Hung **17**(1): 55-61. 1967
- Smith, J. M.: **Analyzing the Mosaic Structure of Genes**, J Mol Evol **34**(2): 126-129. 1992
- Szabára, Á. és Ózsvári, L.: **The prevalence, economic losses and eradication programs of BVDV in Europe**, Magy Áo Lapja **135**(5): 285-292. 2013
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. és Kumar, S.: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**, Mol Biol Evol **30**(12): 2725-2729. 2013
- Tautz, N., Meyers, G. és Thiel, H. J.: **Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus**, Clin Diagn Virol **10**(2-3): 121-127. 1998
- van Oirschot, J. T., Brusckhe, C. J. és van Rijn, P. A.: **Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea**, Vet Microbiol **64**(2-3): 169-183. 1999
- Varga, J., Tuboly, S. és Mészáros, J.: **A háziállatok fertőző betegségei: állatorvosi járványtan 2**, Budapest, Mezőgazda. 1999
- Weber, M. N., Streck, A. F., Silveira, S., Mosena, A. C. S., da Silva, M. S. és Canal, C. W.: **Homologous recombination in pestiviruses: Identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups**, Infect Genet Evol **30**: 219-224. 2015
- Willoughby, K., Gilray, J., Maley, M., Dastjerdi, A., Steinbach, F., Banks, M., Scholes, S., Howie, F., Holliman, A., Baird, P. és McKillen, J.: **Lack of evidence for circovirus involvement in bovine neonatal pancytopenia**, Vet Rec **166**(14): 436-437. 2010
- Yu, H. Y., Grassmann, C. W. és Behrens, S. E.: **Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: Functional role during RNA replication**, J Virol **73**(5): 3638-3648. 1999

## 10. Saját közlemények

### 10.1. A dolgozat témájában, referált lapokban megjelent közlemények

Kővágó, C., Hornyák, Á., Kékesi, V., Rusvai, M.: Demonstration of homologous recombination events in the evolution of bovine viral diarrhoea virus with in silico investigations, Acta Vet Hung, 2016, Közlésre elfogadva.

Kővágó, C., Balka, G., Mándoki, M., Abonyi, T. and Rusvai, M.: **A borjak újszülöttkori pancytopeniája néven ismert kórkép és annak hazai előfordulása**, Magy. Áo. Lapja **135**(5): 259-266. 2013

Kővágó, C., Forgách, P., Szabára, Á., Mándoki, M., Hornyák, Á., Duignan, C., Gere, E. P. and Rusvai, M.: **Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Hungary - Situation before Launching an Eradication Campaign**, Acta Vet Hung **63**(2): 255-263. 2015

### 10.2. A dolgozat témájában tartott előadások

Kővágó, C., Bálint, Á., Hornyák, Á. and Rusvai, M.: **Genetic analysis of a non-cytopathic bvdv strain isolated in hungary**, Magyar Mikrobiológiai Társaság 14. kongresszusa, Keszthely, Hungary, Akadémiai Kiadó. 2006

Kővágó, C., Tapasztai, Z. and Rusvai, M.: **Changes in the seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Hungary**, Magyar Mikrobiológiai Társaság 15. kongresszusa, Budapest, Hungary. 2007

Mester, A., Rusvai, M., Kővágó, C. and Bajcsy, A. C.: **A BVD vírus előfordulása hazai szarvasmarha állományokban és a vírus lényegesebb szaporodásbiológiai hatásai**, Magyar Buiatrikus Társaság 20. Jubileumi Nemzetközi Kongresszusa, Eger, Magyar Buiatrikusok Társasága. 2010

### **10.3. Nem a dolgozat témájában, referált lapokban megjelent közlemények**

- Andocs, G., Meggyesházi, N., Balogh, L., Spisak, S., Maros, M. E., Balla, P., Kiszner, G., Teleki, I., Kővágó, C. and Krenacs, T.: **Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia**, Cell stress & chaperones **20**(1): 37-46. 2015
- Andocs, G., Meggyesházi, N., Vancsik, T., Krenács, T., Papp, E., Kővágó, Cs., és Szász, O.: **Hyperthermia Induced Immunogenic Cell-Death**, Eur J Cancer **51**: S7-S7. 2015
- Gere, E. P., Gálfi, P., Molnár, Z., Csavojetz, A., Meggyesházi, N., Szauder, I., Újhelyi, G. and Kővágó, C.: **Bélműreg-ellenállás vizsgálata IPEC-J2 modellrendszerben**, Magy. Áo. Lapja **136**(11): 651-659. 2014
- Meggyesházi, N., Andocs, G., Kővágó, C., Balogh, L. and Krenács, T.: **Modulated electrohyperthermia induced immunogenic cell death specific signals in colorectal adenocarcinoma model**, Eur J Cancer **50**: S81-S82. 2014
- Pászt-Gere, E., Barna, R. F., Kővágó, C., Szauder, I., Újhelyi, G., Jakab, C., Meggyesházi, N. and Szekacs, A.: **Changes in the distribution of type II transmembrane serine protease, TMPRSS2 and in paracellular permeability in IPEC-J2 cells exposed to oxidative stress**, Inflammation **38**(2): 775-783. 2015
- Rezek, O., Boldogkői, Z., Tombacz, D., Kővágó, C., Gerendai, I., Palkovits, M. and Toth, I. E.: **Location of parotid preganglionic neurons in the inferior salivatory nucleus and their relation to the superior salivatory nucleus of rat**, Neurosci Lett **440**(3): 265-269. 2008
- Tapaszti, Zs., Forgách, P., Kővágó, C., Bekesi, L., Bakonyi, T. and Rusvai, M.: **First detection and dominance of Nosema ceranae in Hungarian honeybee colonies**, Acta Vet Hung **57**(3): 383-388. 2009
- Tapaszti, Zs., Forgách, P., Kővágó, C., Topolska, G., Nowotny, N., Rusvai, M. and Bakonyi, T.: **Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes**, Vet Microbiol **139**(3-4): 227-234. 2009

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton is szeretném megköszönni a Szent István Egyetem Állatorvosi Doktori Iskolájának, és annak korábbi és jelenlegi vezetőinek, Prof Dr. Huszenicza Gyulának, Prof Dr. Rusvai Miklósnak és Prof. Dr. Vörös Károlynak, hogy lehetővé tették, és munkájukkal elősegítették PhD fokozatom megszerzéséhez szükséges követelmények teljesítését.

Szeretnék megköszönni témabizottságom tagjainak, Prof. Dr. Bakonyi Tamásnak és Dr. Egyed Lászlónak minden segítséget, melyet munkám során tőlük kaptam!

Szeretnék köszönetet mondani továbbá a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Járványtani és Mikrobiológiai továbbá Gyógyszertani és Méregtani Tanszékének tanszékvezetőinek, Prof. Dr. Fodor Lászlónak és Prof Dr. Gálfi Péternek, illetve munkatársainak, dr. Forgách Petrának, dr. Hornyák Ákosnak, Pásztiné dr. Gere Erzsébetnek és mindazoknak, akik bármilyen módon részt vettek munkámban mindazt a szakmai és emberi segítséget, mellyel hozzájárultak kutatásaimhoz.

1 **12. Melléklet**

2  
3

A minta eredete	Helység	Minta beérkezése	Mintaszám	Pozitív	Kérdéses	Módszer	Korcsoport
<b>I. Győr-Moson-Sopron megye</b>							
1. Előre Szövetkezet	Beled	2006.08.22	10	5	0	VN	nincs adat
2. Előre Szövetkezet	Beled	2006.10.26	25	0	0	ELISA	nincs adat
3. Lajta-Hanság Zrt.	Kimle	2006.11.13	10	5	2	ELISA	tehenek
4. Lajta-Hanság Zrt. Tanüzem	Mosonmagyaróvár	2006.11.13	10	10	0	ELISA	nincs adat
5. Lajta-Hanság Zrt.	Hanságliget	2006.11.13	10	10	0	ELISA	nincs adat
6. Lajta-Hanság Zrt.	Mosonszolnok	2006.11.13	11	1	0	ELISA	nincs adat
7. Farádi Mg. Szöv.	Farád	2007.03.02	6	2	2	PCR	nincs adat
8. Farádi Mg. Szöv.	Farád	2007.05.23	15	0	0	PCR	nincs adat
9. Lajta-Hanság Zrt. Károlyháza	Károlyháza	2008.03.03	21	15	1	ELISA	nincs adat
<b>II. Komárom-Esztergom megye</b>							
10. Komáromi MgZrt.	Komárom	2007.07.25	13	13	0	ELISA	nincs adat
<b>IV. Veszprém megye</b>							
11. Vicenter Kft. Devecser Szak. Telep	Devecser	2006.09.19	36	30	0	ELISA	borjak
12. Bakony HO-Li Kft.	Borzavár	2006.10.26	20	2	0	ELISA	tehenek
13. Vám-Tej Kft.	Nemesvámos	2006.11.21	13	1	0	ELISA	nincs adat
14. Bovina Kft.	Takácsi	2007.01.11	17	15	0	VN	nincs adat

A minta eredete	Helység	Minte beérkezése	Mintaszám	Pozitív	Kérdéses	Módszer	Korcsoport
15. Aranykocsi Zrt.	Malomsok	2007.05.17	10	4	6	VN	6-7hónapos vemhes üsző
16. Tóth Tamás	Sümeg	2007.10.29	48	33	1	ELISA	37: tehenek, 9: vemhes üsző
17. Agroprodukt Zrt.	Pápa	2008.05.08	10	7	0	ELISA	nincs adat
18. Agroprodukt Zrt.	Marcalgergelyi	2008.05.10	20	10	3	ELISA	nincs adat
19. <b>V. Fejér megye</b>							
20. Szabó Zsolt e.v.	Nagylók	2006.10.26	209	101	20	ELISA	tehenek; 12: vemhes üsző;
21. Mezőföld Mg. Szöv.	Mezőszilas	2007.12.07	20	1	0	ELISA	tehenek
22. Mezőföld Mg. Szöv.	Mezőszilas	2007.12.07	5	0	0	ELISA	6 hónapos borjak
<b>VI. Zala megye</b>							
23. Hegykő MgZrt.	Hegykő	2007.08.27	70	0	0	ELISA	20: min 1×gave birth; 10: vemhes üsző; 10: 13-14 hónapos; 10: 3 hónapos; 10: 4 hónapos; 10: 7 hónapos

A minta eredete	Helység	Minta beérkezése	Mintaszám	Pozitív	Kérdéses	Módszer	Korcsoport
<b>VII. Somogy megye</b>							
24. Marcali Ma Rt.	Marcali	2006.09.08	13	0	0	VN	nincs adat
25. Bos Frucht Agrár	Kazsok	2006.10.26	20	18	0	ELISA	nincs adat
<b>VIII. Baranya megye</b>							
26. Somberek Zrt.	Somberek	2006.09.26	15	15	0	ELISA	tehenek
27. Szajki Zrt	Szajk	2006.10.26	20	0	0	ELISA	tehenek
<b>IX. Tolna megye</b>							
28. Szekszárd Rt.	Szekszárd	2006.12.12	15	0	0	ELISA	tehenek
29. Milkmen Kft.	Paks	2006.12.18	15	0	0	ELISA	nincs adat
<b>XII. Borsod-Abauj-Zemplén megye</b>							
30. Geo-Milk Kft.	Sárospatak	2006.11.16	20	1	0	ELISA	tehenek
31. Aranykalász Mg. Szöv.	Mezőkeresztes	2006.12.15	20	0	0	ELISA	nincs adat
32. Tiszamenti szövetkezet	Tiszakeszi	2007.01.10	20	0	0	ELISA	tehenek
<b>XIII. Szabolcs-Szatmár-Bereg megye</b>							
33. Ibránytej Kft.	Ibrány	2006.11.07	20	0	1	ELISA	tehenek
34. Farm-Tej Kft.	Kemecse	2006.11.08	20	0	0	ELISA	tehenek
35. Erdőhát Zrt.	Csaholc	2006.12.05	20	20	0	ELISA	tehenek

A minta eredete	Helység	Minta beérkezése	Mintaszám	Pozitív	Kérdéses	Módszer	Korcsoport
36. Bátortrade Kft.	Nyírbátor	2006.12.21	20	20	0	ELISA	nincs adat
<b>XIV. Hajdú-Bihar megye</b>							
37. Hajdúszováti Sz. T. H. Kft.	Hajdúszovát	2006.10.26	20	0	0	ELISA	tehenek
38. Komádi Tehenészet Kft.	Komádi	2006.10.31	20	20	0	ELISA	tehenek
39. Agro-Cow Kft.	Berettyóújfalu, Pozsár farm	2006.11.03	15	12	0	ELISA	3-5 hónapos borjak
40. Agro-Cow Kft.	Berettyóújfalu, Tetőtlen farm	2006.11.03	15	14	0	ELISA	8-20 hónapos borjak
41. Agro-Cow Kft.	Berettyóújfalu, Balogh farm	2006.12.12	20	3	1	ELISA	2-5 napos borjak - első vemhességből; 15: 3-5 hónapos borjak
42. Bocskai Szarvasmarha Teny. Kft.	Hajdúdorog	2008.03.07	12	0	0	ELISA	nincs adat
<b>XV. Jász-Nagykun-Szolnok megye</b>							
43. Agro-Lehel Kft.	Jászberény	2006.09.11	5	5	0	VN	nincs adat
44. Kunhalom Agrária Kft.	Fegyvernek	2006.10.26	20	20	0	ELISA	nincs adat
45. Jász-Föld Zrt.	Jászladány	2006.10.26	20	17	1	ELISA	nincs adat



A minta eredete	Helység	Minta beérkezése	Mintaszám	Pozitív	Kérdéses	Módszer	Korcsoport	
Törökszentmiklósi Mg. Zrt. (2								
46.	telep)	Törökszentmiklós	2006.10.26	40	37	1	ELISA	tehenek
47.	Középtiszai MgZrt.	Kunhegyes	2006.11.13	20	0	0	ELISA	tehenek
48.	Belán-Alcsi Red Kft.	Mezőtúr	2006.12.07	20	0	0	ELISA	nincs adat
49.	Kenderes 2006. Kft	Kenderes	2007.12.07	15	0	0	ELISA	tehenek
XVI. Pest megye								
84-128 napos								
50.	Pirkó Kft	Cegléd	2007.11.26	13	0	0	ELISA	borjak
51.	DPMG Zrt.	Törtel	2008.02.15	20	13	0	ELISA	nincs adat
52.	Agrifutura Kft.	Tárnok	2008.02.15	25	19	0	ELISA	nincs adat
53.	Galgamenti Szövetkezet, Haraszt	Tura	2008.04.11	20	1	0	ELISA	nincs adat
XVII. Bács-Kiskun megye								
54.	Agro-Business. Kft.	Jánoshalma	2006.11.23	13	1	1	ELISA	nincs adat
XVIII. Csongrád megye								
55.	Agrár-Ker Kft.	Csanádpalota	2008.03.03	20	20	0	ELISA	nincs adat