

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

A baromfipestis vírus molekuláris járványtana

Doktori értekezés

Készítette:

Dr. Herczeg József

Budapest

2002

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető:

Dr. Rudas Péter, DSc
egyetemi tanár

Témavezető:

Dr. Lomniczi Béla, DSc
tudományos főmunkatárs
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet

Dr. Rudas Péter

Dr. Herczeg József

TARTALOMJEGYZÉK	
RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS	5
2. CÉLKITŰZÉSEK	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. A baromfipestis: a betegség és kártétele.....	8
3.2. A baromfipestis járványok története	9
3.2.1. A világyárványok előtti korszak	9
3.2.2. Az első világyárvány: 1926- kb.1960	10
3.2.3. A második világyárvány kb. 1960-?	12
3.2.4. A harmadik világyárvány: a galambok paramyxovírus-1 betegsége	13
3.2.5. ND az 1980-as és 1990-es években, Európában.....	13
3.3. Az ND epidemiológiája általában	14
3.3.1. Endémiás területek, vírusrezervoárok	14
3.3.2. A vírus terjedése	15
3.3.3. Epidémiás formák: fertőzési hullámok, járványvonulatok.....	15
3.4. A Newcastle-betegség vírusa (NDV)	17
3.4.1. Taxonómiai besorolás.....	17
3.4.2. A baromfipestis vírus felépítése és a fehérjék funkciói	17
3.4.3. Az NDV pathogenitásának molekuláris alapjai.....	18
3.5. Epidemiológiai vizsgálatok.....	20
3.5.1. A monoklonális ellenanyag (Mke) vizsgálatokra alapozott járványtani kutatás.....	20
3.5.2. Genetikai módszereken alapuló diagnosztikai és epidemiológiai vizsgálatok.....	20
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	23
4.1. Vírusok	23
4.2. Vírus-RNS kivonása	23
4.3. Reverz transzkripció.....	23
4.4. Polimeráz láncreakció	24
4.5. A PCR termékek hasítása restrikciós enzimekkel és elektroforézis	24
4.6. Restrikciós enzim-analízis és fizikai térképezés	25
4.7. A PCR termékek szekvenálása.....	26
4.8. Szekvencia-adatok analízise	26
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS.....	28
5.1. Az OIE adatai alapján rekonstruálható baromfipestis járványok	28
5.2. Járványfelderítés módszertani kérdései.....	33
5.2.1. Etiológiailag egységes járványok kritériumai és vizsgálatok eszközei	33
5.2.2. RE-vágáshely-analízis alkalmazásának haszna és korlátai.....	34
5.2.3. Járványtani nyomozáshoz optimális génszakasz	35
5.3. Az NDV-genotípusok, topotípusok és járványtípusok	38
5.3.1. NDV genotípusok.....	38
5.3.2. Mikor topotípus a genotípus?	40
5.3.3. Járványtípusok: epidémia és endémia megjelenítése a dendrogrammon	40
5.4. Shared derived karakterek alkalmazása	41
5.5. ND-járványok etiológiai jellemzése, történetük rekonstruálása	43
5.5.1. Egyes országok ND-járványai: Olaszország	43
5.5.2. Egyes országok ND-járványai: Bulgária.....	53
5.5.3. Egyes országok ND-járványai: a dél-afrikai régió.....	62
5.6. A világyárványok összetettsége	66
5.6.1. Az ND járványok földrajzi megoszlása a baromfipestis globálissá válása idején	66
5.6.2. Baromfipestis járványok az 1970-es évek elején.....	67
5.6.3. Baromfipestis járványok összetettsége az 1990-es évektől napjainkig.....	69
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	70
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	73
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	74

RÖVIDÍTÉSEK

APMV	avian paramyxovírus
bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
FP	Fowl plague
HAG	hemagglutináció
HN	hemagglutinin-neuraminidáz
ICPI	intracerebrális patogenitási index
IVPI	intravénás patogenitási index
Mke	monoklonális ellenanyag
ND	Newcastle disease
NDV	Newcastle disease virus
NP	nukleoprotein
nt	nukleotida
OIE	Office International des Epizooties
PCR	polimeráz láncreakció
PPMV-1	galamb paramyxovírus-1
RE	restrikciós enzim
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz-transzkripció

1. BEVEZETÉS

A baromfipestis (nemzetközi nevén *Newcastle disease*, *ND*; hivatalos magyar neve: *Newcastle*-betegség) a madarak és a házi baromfifélék rendkívül ragályos betegsége, amelyet a tizenöt legnagyobb terjedőképességű fertőző állatbetegség közé (A-kategóriába) sorolt a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (*Office International des Epizooties*, *OIE*, Párizs).

A fogékony állatok a fertőzést követően emésztő-, légzőszervi és idegrendszeri tünetek kíséretében pusztulnak el. A csirketartási körülmények (zsúfoltság, telepek sűrűsége), az állatszállítások, a védekezés ellenére is hozzájárulnak a fertőzés terjedéséhez, járványok kialakulásához.

Doyle angol kutató egy 1926-os *Newcastle upon Tyne*-környékén kitört angliai járvány során különítette el a betegséget (ND) és vírusát (*Newcastle disease virus*, NDV) a századforduló idején elterjedt és nagyon hasonló kórképben jelentkező *fowl plague* (FP)-től és kórokozójától. Későbbi kutatások nyomán vált ismertté, hogy az NDV a paramyxovírusok családjába tartozik, míg az FP-t (régii magyar nevén klasszikus baromfipestist, újabban madárinfluenza) az orthomyxovírusok családjába sorolt avian influenzavírusok (AIV) idézik elő.

A *Doyle* által leírt és rövidesen felszámolt angliai esettel egyidőben súlyos ND-járványokat írtak le a mai Indonézia területén, a Távól-Keleten és rövidesen Indiában is. Mivel az irodalomban még egy-két évtized múlva is ismertettek ND-eseteket FP néven, nehéz egyértelműen világos képet alkotni az európai helyzetről. Annyi bizonyos, hogy az 1940-es évek elejétől számítják a betegség európai térhódítását. Szerencsére ebből az időből már maradtak fenn vírustörzsek is, amelyek vizsgálata nagyban segítette a járványok történéseinek megismerését.

Az irodalom három világjárványt (*pandémiát*) írt le. Az első az 1920-as évek közepétől az 1960-as évek közepéig tartott, amely periódusban a baromfipestis Távól-Keletről kiindulva egymás után hódította meg az egyes kontinenseket. A második pandémia az 1960-as évek elején indult, ismét a Távól-Keletről, és Dél-Ázsián, illetve Közel-Keleten át az 1970-es évek elején érte el Nyugat-Európát. Ennek egy oldalága Kaliforniában pusztított 1971-72-ben; erről viszont már abban az időben megállapították, hogy vírusát nagy valószínűséggel Dél-Amerikából származó díszmadár szállítmányokkal hurcolták be. Csak a teljesség kedvéért említem meg, hogy az 1980-as évek eleje óta a versenygalambokban önállóan terjedő NDV-(PPMV-1)-okozta járványkitöréseket foglalták össze harmadik pandémia néven.

Az utóbbi évtizedekben a különböző területeken eltérő jellegű ND-járványok fordulnak elő. A harmadik világ nagyobb részén a háztáji csirkeállományokban az NDV-fertőzések állandósultak,

endémiássá váltak. Ma ezek tekinthetők az NDV rezervoárjainak a természetben, mert innen hurcolják be a kórokozót nemcsak a helyben működő nagyüzemi állományokba, de távoli kontinensek ND-mentes területeire is (pl. Európa egyes országaiba), ahol aztán súlyos *epizootiás* jellegű, azaz gyors terjedésű járványhullámok alakulnak ki. Ezek felszámolása igen jelentős költséggel jár. Az ND elleni küzdelem nehézségét jelzi, hogy mindez annak ellenére történik, hogy már ötven éve vakcinázással védekeznek ellene. Az elmúlt években a hagyományosan magas állategészségügyi színvonalú országokban (Angliában, Dániában és Skandináv országokban) tört ki váratlanul és ismételten a baromfipestis, sőt 1998-ban Ausztrália elvesztette mentességét.

Munkám fő célja az volt, hogy az elmúlt évtizedek számos globálisnak tűnő és helyi járványaiból származó NDV-törzsek genetikai elemzésével rekonstruáljam egyes területek és időszakok baromfipestis járványainak történetét és összefüggéseit.

Ezt a célkitűzést olyan módszertani fejlemények tették lehetővé, mint a PCR-technika, a szekvenálás és a szekvenciák filogenetikai analízise, amelyek az elmúlt évtizedekben a legtöbb laboratóriumban elérhetőkké váltak. Az említett vírusazonosításra alkalmas molekuláris biológiai módszerekkel is folytatott és járványtani kapcsolatok megismerésével foglalkozó megközelítést gyakran molekuláris epidemiológia néven említik az irodalomban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A munkám alapvető célja az volt, hogy rekonstruáljam mindazon ND-járványok történetét, amelyekből vírustörzsek állnak rendelkezésünkre. Ennek során többek közt azt kívántam megállapítani, hogy mit tekintünk egy járványvonulatnak, vagyis olyan kitörések sorozatának, amelyeket egyetlen (az alapozó) vírustörzs behurcolása indít el és ezek leszármazottai tartanak fenn. Tehát, vizsgálni kívántuk az etiológiai alapon összetartozó epidemiológiai egységek eredetét, időbeli és térbeli kiterjedését, korabeli járványvonulatok kapcsolatát.

A fenti célok megvalósítása érdekében az alábbi résztémákkal foglalkoztam:

1) A járványtörténeteket bemutató egyes közlemények (*Hanson 1974, Lancaster és Alexander 1975*) számos félrevezető információja miatt, a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (*OIE*) eredeti adatai alapján feldolgoztam az ND esetek évi előfordulásait 1960 óta, az alábbi érdeklődési körünkbe tartozó területeken:

- a) a közel-keleti országok egy részében;
- b) egyes nyugat- és kelet-európai országokban;

Természetesen a fenti adatok alapján csak hipotetikus járványvonulatokat lehetett felismerni, amelyek valóságtartalmát, ha erre mód volt, az ezeket reprezentáló vírustörzsek genetikai vizsgálatával értékeltem.

2) Számos módszertani kérdés közül, melyeket járványfelderítésben való alkalmazhatóságuk céljából vizsgáltam, az alábbiakat mutatom be részletesen:

- a) a *restrikciós endonukleáz (RE)*-vágáshelyek eloszlásának azonosító és differenciáló értéke;
- b) a szekvencia-meghatározás azonosító értékének vizsgálata;
- c) a *distance*-értékek és aminosav pozíciók, valamint RE-vágáshelyek (utóbbiak mint *shared derived* karakterek) alkalmazása az NDV törzsek filogenetikai analízisében.

3) ND-járványok etiológiai jellemzése és történetük rekonstruálása:

- a) olaszországi ND járványok története;
- b) bulgáriai ND járványok története;
- c) dél-afrikai ND járványok története;
- d) világjárványok összetettsége.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A baromfipestis: a betegség és kártétele

A házimadarakon kívül - természetes vagy mesterséges fertőzéssel - változatos klinikai tünetek mellett, mintegy 236 madárfaj fertőződhet az NDV-vel. A betegség fenntartásáért a házityúk a felelős, ami a háziszárnyasok közül a legfogékonyabb faj. Izoláltak már baromfipestis vírust hullóktól, emlősökön át az emberig sok más fajból is (*Kaleta és Baldauf 1988*).

Az NDV csirkepathogenitása számos tényező függvénye: vírustörzs, fertőzés módja és intenzitása, a csirke életkora és szerológiai állapota, környezeti körülmények (*Alexander 1997*). A betegség csirkében mutatkozó változatos formáit a klinikai tünetek alapján, *Beard és Hanson* foglalta össze (*McFerran és McCracken 1988*). Az egyes kórformák az első leírójukról kapták nevüket:

- Doyle forma: A csirke minden életkorában akut lefolyású, zöld hasmenéssel és idegrendszeri tünetekkel járó halálos kimenetelű fertőzés, amit gyakran kísérnek vérzések a tápcsatorna nyálkahártyájában. Perakut lefolyású esetben, általános klinikai tünetek közepette gyorsan pusztulnak el az állatok. A kórforma másik neve: *viscerotrop velogen* pathotípusú ND (VVND) (*McFerran és McCracken 1988*). Teljesen fogékony állományokban a mortalitás elérheti 100%-ot is (*Alexander és mtsai 1997*).
- Beach forma: Légzőszervi és idegrendszeri tünetekkel kísért, akut lefolyású, gyakran letális fertőzés. A morbiditás közel 100%-os, míg a mortalitás alacsonyabb, mint a VVND esetén, életkortól függően 50-90% (*Alexander 1997*). Az előző kórformától való elkülönítésre, a *neurotrop velogen* pathotípusú ND (NVND) nevet kapta.
- Beaudette forma: Az ND kevésbé pathogen típusa, amiben csak a fiatal állatok pusztulnak el. *Mesogen* (közepes pathogenitású) NDV törzsek idézik elő. Fertőzési kísérletek során a kifejlett madarakban tojástermelés csökkenést és ritkán idegrendszeri tüneteket figyeltek meg. A fertőzés - a 3 hétnél fiatalabb állatok kivételével - ritkán fatális kimenetelű (*Alexander 1997*).
- Hitchner forma: *Lentogen* pathotípusú (alacsony pathogenitású) törzsek okozta enyhe, vagy *inapparens* légzőszervi fertőzés. Természetes fertőzés során a kifejlett madarakban ritkán jelentkeznek klinikai tünetek. Néhány napos korban, a fogékony csirkékben nagy lehet a légzőszervrendszeri tünetekkel kísért mortalitás, pl. LaSota vírussal való aerosolos vakcinázás esetén. Növendék állományokban a vírus immunszuppresszív hatásának lehet jelentősége, mivel másodlagos fertőzés révén előfordulhat *colisepticaemia*, vagy légzsákgyulladás is (*Alexander 1997*).
- Asymptomaticus-enteralis forma (*McFerran és McCracken 1988*): A kórformáról elnevezett *asymptomaticus* vírustörzsek okozta enyhe bélrendszeri fertőzés.

Klinikai megfigyeléseken túl, kísérleti állatoltásokkal (pathogenitási tesztek) is jellemezték az egyes kórformákat előidéző NDV törzseket. Ezek alátámasztják a vírusok fenti *pathotípusok* szerinti besorolását és diagnosztikai eszközként is szolgálnak (*Hanson és Brandley (1955), Hanson 1975*).

Ezekre az ismeretekre alapozva, a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (*OIE*) korábbi meghatározása szerint: A *Newcastle disease* a madarak olyan fertőző betegsége, amit *avian paramyxovirus 1*-es szerotípusba tartozó, a virulencia következő kritériumainak megfelelő vírusok idéznek elő: a vírus intracerebrális pathogenitási indexe (*ICPI*) napos csirkén 0,7 vagy ennél nagyobb érték (*Alexander 1988b*). A meghatározás legújabb, molekuláris virológiai alapokon nyugvó részére a 3.4.3. alfejezetben (a 18. oldalon) térek ki. A velogen ND törzsek fertőzőképessége függ a szervezetbe való bejutás helyétől és a vírus dózisától. Kísérletek szerint aerosollal, vagy intratrachealis úton 100 ELD₅₀ (50%-os *embrió lethális* dózis), intranasalisan 4000-5000 ELD₅₀, begybe injektálva 20000 ELD₅₀ vírussal lehet megfertőzni 3-6 hetes csirkéket (*McFerran és McCracken 1988*).

Más madárfajokban a klinikai tünetek különbözhetnek a csirkében leírt tünetektől (*McFerran és McCracken 1988, Kaleta és Baldauf 1988*), ezek ismertetése azonban túlmutatna a dolgozat keretein.

3.2. A baromfipestis járványok története

3.2.1. A világjárványok előtti korszak

A baromfipestis (ND) előfordulásáról már a *Doyle (1927)* előtti időkből is vannak adatok. Magyarországon, *Petényi Salamon* ornitológus az 1820-as években megfigyelt baromfibetegség kapcsán ND-nek megfelelő klinikai tünetekről számolt be (*Lomniczi 1998*). 1912-ben *Halász Ferenc* állatorvosi értekezésében leírt kórkép szintén megfelel a ma *Newcastle disease* néven ismert betegségnek (*Lomniczi 1998*). *Jacotot (1950)* szerint, 1909 és 1915 között az ND-t az FP atipikus formájának tekintették, és így számoltak be róla a világ számos régiójában (*Lancaster 1966*). *Ochi és Hashimoto* leírásában, 1924-ben baromfipestis (ND) volt Koreában (*Alexander 1988a*). A betegség - változatos klinikai formái miatt - több mint egy tucat elnevezést kapott az irodalomban, ami az utólagos azonosításban gondot okozhat (*Alexander 1997*).

Az ND az első leírások szerint (*Kraneveld 1926, Doyle 1927, Pickard 1928*) az 1920-as években Dél-Kelet-Ázsiában gyorsan terjedő, és Angliában is előforduló járványos betegségként jelent meg a csirkeállományokban, 98-100 %-os elhullást előidézőve (*Lancaster 1976*).

Kraneveld írta le a betegség feltűnését 1926-ban, Indonéziában Jáva szigetén. Röviddel ez után jelent meg Angliában, *Newcastle-upon-Tyne*-ben, amiről *Doyle (1927)* számolt be. A két

járvány közötti kapcsolatot Dél-Kelet-Ázsiából Newcastle kikötőjén át Angliába történt csirkeszállítással, ill. a hajókon való csirketartással hozták összefüggésbe (*Alexander 1988a*). Angliában Newcastle mellett két további helyen volt járványkitörés (Somerset és Staffordshire), míg Dél-Kelet-Ázsiában, 6 hónap alatt óriási területet hódított meg a betegség (*Lancaster 1966*).

Pickard (1928) a *pseudo-fowl pest* elnevezést használta a mai Djakarta környékén megfigyelt betegség leírására, ami 1927 végére az egész dél-kelet-ázsiai szigetvilágban elterjedt, és 95-100%-os mortalitással óriási veszteségeket okozott (*Lancaster 1966*).

Indiában, 1927 közepén *Edwards* ismerte fel először a betegséget Ranikhet városában. 1928 tavaszán már elérte Punjabot és Bombayt, és több millió baromfit pusztított el (*Lancaster 1976*).

Papagáj elhullásról is vannak beszámolók Indonéziából (*Pickard 1928*) és a Fülöp-szigetekről (*Farinas 1930*) (*Lancaster 1976*). Az ND papagáj-pathogenitására vonatkozóan *Erickson és mtsai* (1977) végeztek átfogó kísérleteket.

Angol (*Alexander 1988a*) és amerikai (*Hanson 1974, Lancaster és Alexander 1975*) szerzők úgy vélekedtek, hogy az ND több hullámban terjedt szét a világon, amelyeket világjárványoknak neveztek. Az alábbiakban az ő munkájuk alapján ismertetem az ND-pandémiákat.

3.2.2. Az első világjárvány: 1926-tól kb. 1960-ig (1. ábra)

Kelet-, Dél-Kelet-Ázsiában a betegség az 1920-as évek végére már széles körben elterjedt: Korea, India, Ceylon, Fülöp-szigetek 1926, Indonéz szigetvilág 1928, Ausztrália 1930, Japán 1933 (*Lancaster 1966*). Az 1932-es egyetlen járványkitörésből származik az *Australia-Victoria* nevű referencia vírus, ami a legkorábbi ismert ND izolátum. A betegség gyors felszámolását követően Ausztrália 1933-tól 1966-ig mentes volt az ND-től (*Westbury 2001*).

A kelet-afrikai partvidék országaiban, az 1940-es évekből származó adatok (*Lancaster 1966*); és a Szaharától délre eső területek 1967-es felmérése (*Lancaster és Alexander 1975*) alapján a falusi csirke állományokban endémiás volt a baromfipestis.

A Dél-Afrikai Köztársaságban 1961, 1967 és 1968-ban, a korábbiaknál kiterjedtebb ND járványokról számoltak be, de a 1961- és 67-es járványokat sikeresen felszámolták (*Lancaster és Alexander 1975*).

Az európai ND helyzet kapcsán, *Lancaster* 1966-os monográfiájában *Eckert* (1957), a *Newcastle disease* és a klasszikus baromfipestis (*fowl plague*) előfordulását összemósó ábráját közölte (*Lancaster 1966*), megnehezítve, hogy reális képet alkothassunk az ND akkori elterjedéséről. FAO-WHO-OIE adatokra hivatkozva Ausztriában, Magyarországon, Jugoszláviában és Romániában - az 1960-as években - alacsony esetszámmal sporadikus

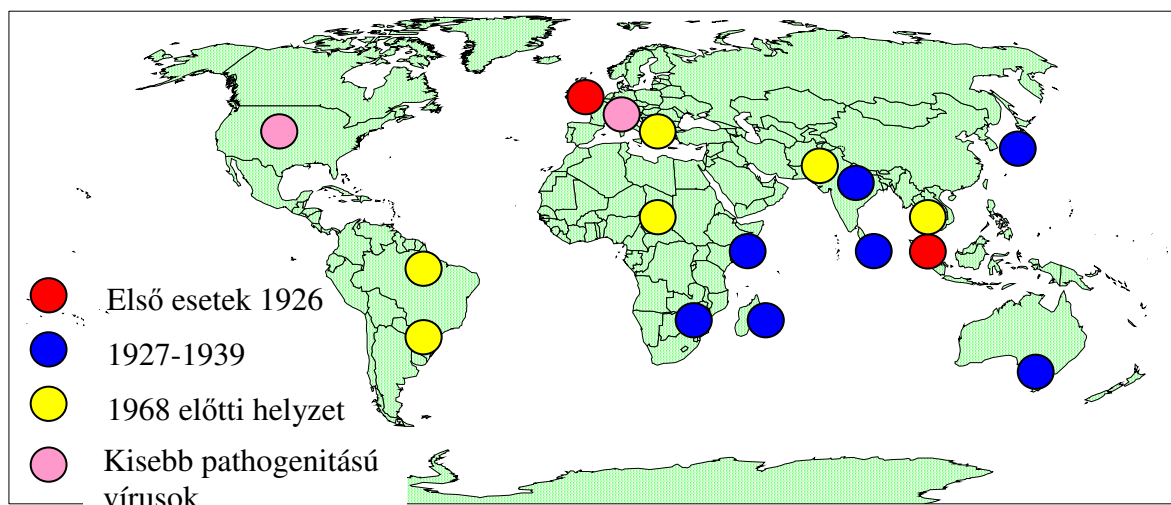
előfordulásának írta le az ND-t (*Lancaster 1966*). Az általunk gyűjtött *OIE* adatok számos ponton azonban ezzel ellentmondóak. Az említett országok 1962-ben 581, 428, 1074 és 273 új járványesetet jelentettek a párizsi székhelyű Nemzetközi Állategészségügyi Hivatalnak. Franciaországról és NSZK-ról, *Lancaster* adatközlés hiányára utaló kitételt tett, holott a két ország 227, ill. 2209 új járványkitörést jelentett (*Bulletin de l' OIE, 1962*).

Az *olaszországi* ND járványok azért különösen érdekesek, mert innen származik az európai ND izolátumok egyik legkorábbi, ma is ismert és vizsgálható reprezentánsa, az *Italien/45*-jelű vírus. Ezt olaszországi eredetű csirke szervekből izolálták az USA-ban, 1945-ben (*Brandly 1946*). Hollandiában, Dániában és Luxemburgban az 1960-as évek elején jelent meg az ND (*Lancaster 1966*).

Az Egyesült Államokban (Kalifornia), az 1940-es évek előtt jelent meg egy akkor *pneumoencephalitis*nek elnevezett baromfibelegség (*Lancaster 1976*). Szerológiai vizsgálatokkal megállapították (*Beach 1944*), hogy a betegség a Newcastle disease enyhébb megjelenési formája. Az Egyesült Államokban és Kanadában a baromfipestis ezen típusa (*neurotrop* forma), és más enyhébb légzőszervrendszeri változatok is elterjedtek (*Lancaster 1976*). *Shope* (1964) szerint, ez a vírus (NVNDV) a nem szokványos gazdában (nem a csirkében) történt sorozatos passzázatok révén, virulenciájában legyengített kórokozóként juthatott át a baromfira (*Lancaster 1976*).

1961-62-ben egyre több ország kezdett ND mentesítési programba. Az 50-es években a figyelem középpontjába kerültek az USA-ban izolált alacsony patogenitású törzsek. Ezek felhasználásával készített vakcinák szisztematikus vakcinázási programok bevezetését tették lehetővé az USA-ban, Kanadában és Európában (*Lancaster 1966*).

1. ábra: A baromfipestis elterjedtsége az I. világhárvány nyomán (*Lancaster és Alexander 1975*)



3.2.3. A második világhajrvány kb. 1960-?

Közél-Keletet - *Hanson* leírása szerint - dél-ázsiai forrásból nyugati irányban terjedő *viscerotrop* baromfipestis járvány érte el az 1960-as évek elején (*Hanson 1974*). Az Iránban 1966-ban, Irakban, Libanonban és Izraelben 1968-ban leírt járvány- kitöréseket követően ez a járvány terjedt át 1969/1970-ben Görögországra és Európa más országaira is (*Hanson 1974*). *Hanson* úgy gondolta, hogy az 1970-es évek ND-járványai dél-kelet-ázsiai forrásból eredhettek, ismeretlen módon, talán kedvtelésből tartott madarak importjával, és számos egymástól független fertőzési gócot kialakítva terjedtek keletről nyugati irányban (*Hanson 1974, 1978*).

Lancaster és *Alexander* (1975) szerint is a Közép-Keletről a Balkánon át érhetette a járványbetörés Európát, ami aztán nyugatra terjedve, 1970-re Angliát is elérte (lásd a 2. ábrát a 29. oldalon). Izraelből Görögországba valóban behurcolták az ND-t, de *Lancaster* és *Alexander* nem szolgáltat bizonyítékot a fertőzésnek az 1960-as évek végén, a Balkánról egészen Angliáig való terjedésére vonatkozóan (*Lancaster és Alexander 1975*).

1971-73-ban, az USA-ban zajló járványkitörések és ND fertőzött egzotikus madarak, (papagájok) dél- és közép-amerikai, dél-kelet-ázsiai importja közötti járványtani összefüggésre derült fény (*Walker és mtsai 1973*) [lásd a 2. ábrát a 29. oldalon]. Dél-Amerikában, a helyi baromfiállományokról papagáj tenyészetekre terjedő ND járványokról is születtek feljegyzések (*Francis 1973*). *Cavrini és Cabassi* már korábban is megfigyelték (1960), hogy Columbiából légi úton Európába érkező papagájokról baromfipestis terjedhet át más madárfajokra (*Lancaster 1966*). NSZK-ban és Hollandiában, Dél-Kelet Ázsiából és Dél-Amerikából származó papagájok karantén állomásán figyeltek meg ismétlődő baromfipestis kitöréseket (*Lancaster és Alexander 1975*). Monoklonális ellenanyaggal (*Mke*) végzett vizsgálatok vetették fel először, hogy az 1970-ben Angliában és 1971-ben az USA-ban kitört járványokat dél-amerikai származású papagájokkal hurcolhatták be (*Russell és Alexander 1983*). Ezt a feltevést utóbb a vírustörzsek genetikai vizsgálatával igazoltuk (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*).

Az 1970-es években, az Európában zajló súlyos ND járványok hatására kifejlesztett, új élővírusos és inaktivált ND vakcinák alkalmazásával és szigorú járványvédelmi intézkedésekkel megfékeztek a baromfipestist (*Muelmans 1988*). Hollandiában és Németországban kötelezővé tették az ND vakcinázást. Írországban és Dániában megtiltották a vakcinás védekezést, a betegség A kategóriás (nem megtúrt) jellegére hivatkozva, a beteg és betegség gyanús állatok/állományok kiirtására helyezve a hangsúlyt (*Alexander 1995*).

3.2.4. A harmadik világjárvány: a galambok paramyxovírus-I betegsége

Járványtani megfigyelés alapján 1935-óta ismert, hogy a PMV-1 megfertőzheti a házigalambokat és a *Columbidae* család más tagjait is (*Lancaster 1966*). Később bebizonyosodott, hogy a galambok fogékony gazdái lehetnek a *viscerotrop velogen* ND vírusnak (*Sharman és Walker 1973*), és tünetmentes állatok üríthetik is a vírust (*Stewart 1971*). Olaszországból Belgiumba importált versenygalambok megbetegedése kapcsán, 1981-ből származik az első publikáció a versenygalambok között járványosan terjedő, az ND *neurotrop* formájának klinikai tüneteire emlékeztető betegségről (*Vindevogel és mtsai 1982*). 1982 első felében a betegség olaszországi, később belgiumi és németországi előfordulásáról számoltak be (*Alexander és mtsai 1984b*). A galambjárványból izolált ND törzsek a csirkére nézve mérsékelt virulenciájúnak bizonyultak. A betegség gyorsan szétterjedt Európában és ezen kívüli területeken (*Wilson 1986*).

Egy-két kivételtől eltekintve a betegség csak galambok között fordult elő (*Alexander és mtsai 1984a*), így ennek részletes ismertetése meghaladja a dolgozat kereteit.

3.2.5. Az ND az 1980-as és 1990-es években, Európában

Az 1980-as években a járványhelyzet kedvező képet mutatott Nyugat-Európában, mert csak sporadikusan fordult elő a baromfipestis (*Alexander és mtsai 1997*). 1986-tól 1990-ig 85 járványkitörést regisztráltak ezekben az országokban. Ebből 75 Olaszországban, további szórványos kitörések Írországban, Portugáliában és Görögországban voltak (*Alexander 1995*). A vakcinázási programnak köszönhetően nem volt ND Németországban (*Werner és mtsai 1999*), az 1986-ban és 1989-ben regisztrált 1-1 esetet leszámítva (*Alexander 1995*).

1991-től azonban, az ND járványkitörések száma jelentősen emelkedett és korábban ND mentes országok is (pl. Svédország) jelentették a betegség megjelenését. A hollandiai és belgiumi járványkitörések 40%-a, a németországi és franciaországi ND esetek többsége kis tenyészetekben, vagy kedvtelésből tartott madarakban fordult elő (*Alexander 1995*). Mke vizsgálatok szerint az 1990-es évek európai járványtörzsei a korábbi, Európában izolált vírusoktól antigénszerkezetükben eltérőek voltak, ezért új monoklonális csoportba (jele: NE) sorolták ezeket (*Alexander és mtsai 1997*).

Nagy-Britanniában 1997 első négy hónapjában nagyüzemi broiler állományokban jelent meg az ND, egymástól jelentős földrajzi távolságban lévő góciókban. Klasszikus járványtani nyomozás, Mke vizsgálatok és az izolátumok F és HN génje részleges szekvenálása alapján úgy gondolták, hogy az Észak-Európából abban az évben szokatlan módon vándorló vízimadarak és

Dániából importált fácánok közvetíthették a vírust pontosan meg nem határozott hely(ek)ről (Alexander és mtsai 1998, Alexander és mtsai 1999).

Olaszországban, 1999-2000-ben lezajlott súlyos madárinfluenza járványt követően jelent meg a baromfipestis az állományok újratelepítésével kapcsolatos járványügyi szigor lazulása és a vakcinázások hatékonyságának csökkenése miatt (Capua és mtsai 2000).

3.3. Az ND epidemiológiája általában

A baromfipestis az egyik legelterjedtebb fertőző baromfibe betegség a Földön. A betegség elterjedtségéből azonban nem következtethetünk közvetlenül a víruséra, ugyanis a klinikailag megnyilvánuló betegségnél a kórokozó jóval elterjedtebb. Ennek több oka van: 1) a vakcinázás miatti védettség és a klinikai tünetek elmaradása elfedheti a velogen vírus jelenlétét, 2) alacsony pathogenitású törzsek jelenlétéről nagyon sok ország nem számol be, 3) élővírusos vakcinákkal az ember maga is terjeszti a lentogen vírust (Spradbrow 1988).

Dolgozatom témája miatt csak a megbetegedést okozó vírustörzsek elterjedtségére vonatkozó irodalmi ismeretekre térek ki.

Járványtani szempontból, a betegség alapvetően két formában fordul elő. Endémiás területeken folyamatosan jelen van, míg az egyébként ND-mentes országokban behurcolások révén időszakosan, gyorsan terjedő *epizoociák* formájában fordul elő a betegség.

3.3.1. Endémiás területek, vírusrezervoárok

Szerológiai és vírusizolálási felmérések szerint, velogen NDV törzsek endémiás fertőzés formájában vannak jelen afrikai és ázsiai falvak részben, vagy teljesen szabadon tartott csirkeállományaiban (Spradbrow 1990). Évente szabályos időközönként (szezonalitással) egy, vagy két alkalommal epidémia formájában is megjelenik itt a betegség. A rendszerességet a klimatikus viszonyok (hőség) által kiváltott stresszhatással hozzák összefüggésbe (Awan és mtsai 1994). A falusi csirkeállományok endémiája a velogen vírus jelenlétén kívül számos egyéb tényezőtől is függ: az állatok fogékonysága - azaz koruk és immunstátuszuk szerinti megoszlás - más betegségek előfordulása az állományban, és szezonális környezeti hatások (Awan és mtsai 1994).

A falusi baromfitartás körülményei között több lehetséges NDV rezervoár jöhet szóba:

3.3.1.1. A falusi csirkeállományok rezervoár szerepe

Egy falu csirkeállományának fogékony egyedekkel való folyamatos utánpótlásával az állomány nem minden egyede lesz egyidőben fertőzött és vírusürítő. Ez a fertőzés állományszintű huzamos fenntartását idézi elő (*Awan és mtsai 1994*). Heterogén állomány-immunitás esetén egyes állatok velogen vírussal való enyhe fertőződését követően ezek 5 hétig is üríthetik a vad vírust (*Lancater 1966*).

3.3.1.2. Vizibaromfi fajok (főleg a kacsá) rezervoár szerepe

A hosszantartó vírusürítés miatt *Bush* már 1954-ben felhívta a figyelmet a *kacsa* rezervoár szerepére (*Higgins és Shortridge 1988*). *Shortridge* 1978-ban Hong-Kongban végzett járványtani felmérései során, klinikailag egészséges kacsák 3 %-ából izolált velogen NDV-t (*Shortridge 1978*). A vírus tartós fennmaradásához hozzájárul a csirke és kacsá együtt tartása, és a víz mint közvetítő közeg jelenléte. A vakcinázást követő szerológiai válasz a kacsában nagyon alacsony - gyakran nem is mérhető. A kacsá faji ellenállóképessége nagy a baromfipestissel szemben, ezért nem fordítanak kellő figyelmet ND elleni vakcinás védelmükre (*Higgins és Shortridge 1988*).

3.3.2. A vírus terjedése

Az ND terjedésének/terjesztésének sok módja ismert. Mindig az adott járványtani helyzet függvénye, hogy ezek közül melyik dominál (*Alexander és mtsai 1997*). A díszmadarak járványközvetítő szerepére térek ki, mert számos irodalmi utalás tévesen hivatkozik ezek rezervoár jellegére. Az összes többi vektorra is akad bőven irodalmi példa, de terjedelmi okokból, ezeket nem részletezem.

Fogságban tartott egzotikus madarak között gyakori az ND az alacsony higiéné miatt, de ez a gyűjtőállomásokon tartott csirkéktől való fertőződésre vezethető vissza (*Francis 1973*). Nincs bizonyíték arra, hogy a természetben a papagájok vagy más fajú egzotikus madarak fenntartanak az ND-t, azaz valódi rezervoárként szerepelnének a betegség járványtanában (*Kaleta és Baldauf 1988*).

A vándormadarak nem tekinthetők az ND természetes rezervoárjának (*Kaleta és Baldauf 1988*).

3.3.3. Epidémiás formák: fertőzési hullámok, járványvonulatok

Az epidémiák két megjelenési formáját különíthetjük el: a mikro-(a) és makrojárványokat (b).

a) Mikrojárvány során, fertőzéses kapcsolat révén egy járványmenethez tartozó, térben és időben körülhatárolt esetek sorozatáról beszélünk, amit egyetlen behurcolásból származó alapító törzs és

leszármazottai idéznek elő (*Lomniczi 1999*). Molekuláris járványtani vizsgálatokkal, az alkalmazott technikára jellemző markertől függően, különböző mélységig lehet feltárni, vagy kizárni az egyes helyi kitörések közös járványmenetbe (egy epidemiológiai egységbe) való tartozását.

Monoklonális ellenanyagok specifikus felismerési és kötési képességét markerként felhasználva megállapították, hogy pl. az 1997-es angliai izolátumok biztosan különböznek az angliai PPMV-1 és az 1984-es és 1996-os angliai csirkejárvány törzsektől. A vizsgált izolátumok *Mke*-vel detektálva azonos antigenitásúnak bizonyultak az 1997-es észak-írországi, az 1996-os és az 1997-es skandináviai és egy 1996-os svájci izolátummal (*Alexander és mtsai 1998*). Bár a különböző *Mke* kötési képesség antigenitásbeli (és persze genetikai) eltérést jelez az izolátumok között, az azonos *Mke* kötési tulajdonság nem feltétlenül jelent közeli genetikai rokonságot (*Alexander és mtsai 1998*).

Nukleinsav szekvenálással és filogenetikai analízissel mód nyílt a genetikailag azonos, vagy közeli rokon törzsek révén, a közvetlen járványtani kapcsolatok kiderítésére, ill. kizárására. Az 1997-es angliai ND törzsek 4 genetikai (al)csoportot képeztek. Fény derült arra, hogy legalább 2 független behurcolásból származó primer kitöréssel indult a járvány Dél- és Kelet-Angliában, majd Észak-Írországból Skóciába hurcolt járványtörzs idézett elő újabb független járványkitörést. A dél-angliai járványkitörések eredetét tekintve, a klasszikus epidemiológiai vizsgálat során felvetett járványtani kapcsolat megerősítést nyert: dániai fácán import és abban az évben megfigyelt szokatlan vadmadár-vándorlás (*Alexander és mtsai 1999*).

b) Makroepidemiológiai vizsgálatok során nagyobb időbeni és/vagy térbeni (földrajzi) különbséget, vagy nagy kiterjedést mutató összetett járványok kapcsolatát vizsgáljuk (*Lomniczi 1999*).

Makroepidemiológiai vizsgálat derített fényt az 1970-es évektől Európában zajló nagy kiterjedésű járvány kettős eredetére. Az első erre utaló molekuláris epidemiológiai tanulmányok *Mke* vizsgálatokkal történtek (*Russell és Alexander 1983*). Ezek a vizsgálatok eltérő *Mke* kötési csoportba sorolták az 1960-as évek közepén izolált közel-keleti törzseket (C1), az 1970-es évek elején az USA-ban és Angliában (A) kitört járványok reprezentánsait. Restrikciós endonukleáz (RE) vágáshely-analízissel (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*), majd részleges génszekvenálással végzett genotipizálás (*Lomniczi és mtsai 1998*) megerősítette és további részletekkel pontosította a fentieket (lásd EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS fejezet).

3.4. A Newcastle-betegség vírusa (NDV)

3.4.1. Taxonómiai besorolás

A *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* víruscsaládok, valamint a *Torovirus* nemzetség tagjai genomstruktúrájuk, transzkripció és nukleinsav-replikációs mechanizmusuk alapján a *Mononegavirales* vírus rendbe tartoznak. A *Paramyxoviridae* családba két alcsalád, a *Pneumovirinae* és a *Paramyxovirinae* tartozik. Az előbbinek egy, a *Pneumovirus*, az utóbbinak három genusa ismeretes, a *Paramyxovirus*, a *Morbillivirus* és a *Rubulavirus*. A *Rubulavirus* genusba az ember mumps, az ember és majom parainfluenza, a sertés rubula-, és a madarak paramyxovírusai tartoznak. A madarak paramyxovírusai 9 szerotípusba sorolhatók (*Avian paramyxovirus 1-9*). A Newcastle-betegség vírusa (*Newcastle disease virus, NDV*) az *Avian paramyxovirus 1* szerotípus egyedüli reprezentánsa (*Murphy és mtsai 1995*).

3.4.2. Az NDV felépítése és a fehérjék funkciói

Az ND virionokat nagyméretű, pleomorf, a tömegük 20-25 %-át kitevő burok veszi körül. A burkot kettős lipidréteg és 8-12 nm hosszúságú glycoprotein, *haemagglutinin-neuraminidáz* (HN) és *fúziós* (F) fehérjékből álló nyúlványok alkotják. Ezek a burok belső felületét borító *matrix* (M) fehérjéhez is kapcsolódnak. A virionok átmérője 150-400 nm között változhat. A *Mononegavirales* rendbe tartozó vírusok genomja nem szegmentált, egyetlen polinukleotida szálból álló (szimplaszálú), negatív polaritású RNS molekula. Az NDV genom 6 gént kódol, a következő sorrend szerint: 3' NP-P-M-F-HN-L 5' (*Rima és mtsai 1995*).

NDV genomja 15168 nukleotidából (nt.) áll, ami kb. 1000 nm hosszú, 17-18 nm átmérőjű, helikális szerkezetű nukleoprotein formájában van a virionban. A nukleoprotein további kétféle molekulából álló, *phosphoprotein* (P) és *large-protein* (L), strukturális egység. Ezzel szoros funkcionális kapcsolatban van az *RNS-dependens-RNS-polimeráz enzim* (*Rima és mtsai 1995*). A virion érzékeny hőre, a napsugárzás UV spektrumára, zsírolószerekre, nem ionos *detergenszerekre*, formaldehidre és oxidálószerekre.

➤ Az NDV fehérjéinek szerepe

A *haemagglutinin-neuraminidáz* (HN) fehérje teszi lehetővé, hogy az adszorpció során a vírusburok és a sejtmembrán közel kerüljenek egymáshoz (*Nagai 1993*). A vírus replikációt követően a HN neuraminsavat bontó hatása révén hagyhatják el a bimbózó utódpartikulák a sejt felületét. A fehérje hemagglutinációs aktivitása révén csapódnak össze a vörösvérsejtek. Ennek a tulajdonságnak diagnosztikai jelentősége is van (hemagglutinációs és gátlási próba, HA és HAG) (*Rott és Klenk 1988, Samson 1988*).

A vírusburok másik glycoprotein nyúlványa, a *fúziós (F)* fehérje. A fehérje inaktív F0 prekursor formájában képződik, és poszt-transzlációs hasítása, valamint F1, F2 diszulfid híddal összekapcsolt fehérjékké érése fontos mind a sejtfúziós, mind pedig a haemolitikus aktivitásához (Rott és Klenk 1988). Az érett F1+F2 fehérje irányítja a sejtmembrán és a vírusburok fúzióját, ezzel egy lépésben megvalósítja a penetrációt és a vírus nukleokapszid kicsomagolását (Glickman és mtsai 1988).

A vírusburok belső felületén lévő *mátrix (M)* fehérje fontos szerepet játszik a partikula összeépülésekor, a vírus RNS-polimeráz aktivitás szabályozásában, a celluláris aktinnal való interakcióban és a protein-kináz aktivitásban. Három további vírusfehérje, *nukleokapszid- (N)*, *nukleokapszid-associate- (NP)* és a *nagy (L)* fehérje *helikális nukleokapszid* struktúrát alkot (RNS dependens RNS polimeráz). Ezek szoros funkcionális összefüggésben vannak az RNS genommal. A transzkripció feltétele, hogy az RNS komplexet alkossanak ezekkel a fehérjékkel (Samson 1988).

3.4.3. Az NDV patogenitásának molekuláris alapjai

A gazdaszervezetben a vírusfertőzés kialakítása és szöveti, szervi progressiója a burokfehérjék érési hasítását végző celluláris proteáz enzimeknek a szervezet különböző sejttypusaiban való eloszlásától és a vírus glükoproteinek proteáz érzékenységétől függ. A tripszin minden ND törzs F0 fehérjéjét képes *in vitro* is hasítani. (Nagai és mtsai 1976, Nagai 1993).

Virulens és *avirulens* ND vírus törzsek különböznek a fehérjék érési folyamatában. Az alacsony infektivitású partikulák hasítatlan (F0 és HN0) burokfehérjéket tartalmaznak. Az *avirulens* vírusok szaporodása a felső légúti és/vagy intestinális traktus egyes sejttypusaira korlátozódik, mivel ezeknél a törzseknél a burokfehérjék érési hasítását csak az itt található tripszin-szerű enzimek végezhetik el. Így a fertőzés lokalizált marad, az állat nem betegszik meg, vagy csak enyhe tüneteket mutat (Rott és Klenk 1988). *Virulens* ND törzsek F fehérjéjének érési hasítását sokféle szövetben és szervben megtalálható többféle *proteáz* végzi, így a fertőzés szisztémássá válhat, és az gyakran fatális kimenetelű (Rott és Klenk 1988).

Toyoda és mtsai megállapították, hogy az F0 fehérje vágáshelye a 112-116. aminosav közti régióban van (Toyoda és mtsai 1987). A fúziós fehérje vágási régiója a *virulens* törzseknél $^{112}\text{R/K-R-Q-K/R-R}^{116}$ aminosav sorrendet mutat az F2 fehérjerész C-terminusán. Az F1 fehérjerész N terminusán, a 117. aminosav F (fenilalanin). Ezzel szemben, az *alacsony virulenciájú* vírusoknál a $^{112}\text{G/E-K-R-Q-G/E-R}^{116}$ az aminosav sorrend és a 117. pozícióban leucin található (Collins és mtsai 1993) (1. táblázat).

1. táblázat: F0 vágási hely aminosav szekvenciái virulens és alacsony virulenciájú ND törzseknél
(Glickman és mtsai 1988, Aldous és Alexander 2001)

Vírusterms	Virulencia a csirkében	Vágási hely aminosavai 111-119	Referencia
Herts 33	Magas	-G-R-R-Q-R-R*F-I-G-	Toyoda és mtsai 1989
Essex 70	Magas	-G-R-R-Q-K-R*F-V-G-	Collins és mtsai 1993
135/93	Magas	-V-R-R-K-K-R*F-I-G-	Oberdörfer és Werner 1998
617/83	Magas	-G-G-R-Q-K-R*F-V-G-	Collins és mtsai 1993
34/90	Magas	-G-K-R-Q-K-R*F-V-G-	Collins és mtsai 1993
Beaudette C	Közepes	-G-R-R-Q-G-R*F-I-G-	Collins és mtsai 1993
LaSota	Alacsony	-G-G-R-Q-G-R*L-I-G-	Collins és mtsai 1993
D26	Alacsony	-G-G-K-Q-G-R*L-I-G-	Toyoda és mtsai 1989
MC110	Alacsony	-G-E-R-Q-E-R*L-I-G-	Collins és mtsai 1993
1154/98	Alacsony	-G-R-R-Q-G-R*L-I-G-	Alexander és mtsai 2001

* A vágási hely. Bázikus aminosavak vastag betűkkel jelölve. Minden virulens törzs fenilalanint tartalmaz a 117-es ams. pozícióban, az F1 N-terminusánál.

A Nemzetközi Járványügyi Hivatal a virulencia kritériumai tekintetében kiegészítette (a B ponttal) az ND meghatározását: a) lásd a 3.1. alfejezetben (a 7. oldalon), b) a virulens ND vírus F2 fehérjéje C terminusánál több bázikus aminosav van, azaz a 113. és a 116. aminosav között legalább 3 arginin, vagy lizin van. Az F1 fehérje N terminusánál - ami a fehérje 117. aminosava - pedig fenilalanin van jelen (1. táblázat). Amennyiben az itt leírt jellegzetes aminosav pozíciók és sorrend nem található meg, akkor van szükség a virulencia meghatározásához az izolátum *in vivo* pathogenitási teszttel (IVPI-vel, ICPI-vel) való jellemzésére (Aldous és Alexander 2001).

Érdekes, hogy a HN fehérje mérete 571, 577 és 616 aminosav hosszúságú lehet attól függően, hogy a HN gén translációs stop kodonja hol helyezkedik el (Sakaguchi és mtsai 1989). Egyes ND vírusoknál (Ulster 2C- és D26) a legnagyobb HN fehérje (616 ams.) translációt követő hasítással nyeri el a fertőzőképes partikulák létrejöttéhez szükséges aktív formáját (Garten és mtsai 1980). Más törzseknél (Hitchner B1, Beaudette C, AUS Victoria/32, Italien/45) - amelyek a másik két fehérje valamelyikét termelik (HN551, és HN571) - hasítás nem történik meg, hiszen a fehérje biológiailag aktív állapotban termelődik (Sakaguchi és mtsai 1989).

3.5. Epidemiológiai vizsgálatok

3.5.1. A monoklonális ellenanyag (Mke) vizsgálatokra alapozott járványtani kutatás

Monoklonális ellenanyagok felhasználásával a Weybridgeben működő NDV referencia laboratóriumba érkezett vírustörzseket vizsgálva számos járványtanilag is érdekes összefüggésre bukkantak (*Russell és Alexander 1983, Alexander és mtsai 1987, Alexander és mtsai 1997*) (2. táblázat).

2. táblázat: NDV csoportosítás a Mke kötődési képesség alapján (*Russell 1988*)

Mke Csoport	Virulencia a csirkében	Eredet	Példa
A	V	Papagáj közvetítette VVNDV törzsek 1970-től	Essex 70
B	V	Más VVNDV törzsek	Herts 33
C1	V	Papagáj eredetű és közel-keleti izolátumok	983/81
C2	L	Kacsa eredetű izolátumok	1092/81
D	V	Neurotrop velogen törzsek (USA)	GB Texas
E	L	Vakcina	Hitchner B1
F	L	Kacsa eredetű izolátumok	
G	L	Kacsa eredetű izolátumok és V4	Ulster 2C
H	L	Kacsa eredetű izolátumok	MC 110
P	M	Galamb PMV-1	561-83

Megállapították, hogy a kialakított csoportok részben földrajzi, részben izolálás tekintetében állatfaj szerinti elkülönülést mutatnak. A Mke-kal folytatott vizsgálatokkal elért eredményekből kiemelkedik az 1980-as évek elején galamb-PMV-1-nek nevezett vírustörzsek gyors megkülönböztetése a csirkéket fertőző NDV törzsektől (*Alexander és mtsai 1984 a és b*). Az eltérő Mke kötési profil egyértelműen jelzi a törzsek antigenitásbeli különbözőségét, de az azonos Mke profil nem jelent szükségszerűen genetikai azonosságot (*Alexander és mtsai 1999, Aldous és Alexander 2001*).

➤ Törzsazonosítás Mke-val

Erdei Judit és mtsai (1987) olyan LaSota specifikus Mke-t állítottak elő - ami ELISA tesztben - több mint 300 lentogen, mesogen és velogen törzs közül is képes volt azonosítani ezt a vakcina törzset. Ennek gyakorlati jelentősége a 3-5 hetes korban légzőszervi tüneteket mutató, néhány %-

os elhullással járó esetek etiológiájának tisztázásában mutatkozott meg. *Muelemans* és *mtsai* is beszámoltak LaSota specifikus Mke előállításáról (*Muelemans és mtsai 1987*).

3.5.2. Genetikai módszereken alapuló diagnosztikai és epidemiológiai vizsgálatok

➤ *Oligonukleotida próbák*

Az F génen a fehérje vágáshelyével komplementer, izotóppal jelzett oligonukleotida próbák segítségével, virulens és nem virulens NDV törzseket különítettek el (*Jarecki és King 1993*). *Oberdörfer* és *mtsai* pathotípus szerint csoportosították az 1990-es évek ND törzseit -pathotípus specifikus oligonukleotida próbák felhasználásával. Megállapították, hogy a módszer korlátai - a genomvariabilitás miatt - az általuk használt RT-PCR-ben, az univerzális primerek tapadási hiányosságaira vezethetők vissza (*Oberdörfer és Werner 1998*).

➤ *RT-PCR és restrikciós endonukleáz analízis*

A baromfipestis vírus egy genomrészletének RT-PCR technikával történő amplifikálásáról 1991-ben számoltak be először (*Jestin és Jestin 1991*). Később, pathotípus specifikus primerekkel virulens és nem virulens törzseket tudtak elkülönítettek egymástól (*Kant és mtsai 1997*). Kutatócsoportunk az NDV F gén közel 75%-ának RT-PCR-el való amplifikálását követően, a génrészlet fizikai térképezését végezte el több mint 200 törzsön (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*). Erre a módszerre is alapozva genotípusokba soroltuk az NDV törzseket (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*). M génen végzett fizikai géntérképezéssel mód nyílt valamennyi ismert vakcinatörzs egyedi azonosítására, köztük a LaSota és B1 vakcina vírusok egymástól való megkülönböztetésére (*Wehmann és mtsai 1997*).

➤ *Járványtani céllal (is) végzett nukleinsav szekvenálásra alapozott vizsgálatok*

HN gén translációs STOP kodonjának génbeli elhelyezkedése alapján a vizsgált törzseket három csoportba (A, B és C) sorolták (*Sakaguchi és mtsai 1989*). Az elkülönülést a báziseltérések összehasonlításán alapuló dendrogramm is alátámasztotta. Azonos származási vonalhoz (pl. C csoport) tartozó, az 1980-as évekből származó törzsekben a közel 50 évvel korábban talált vírusokhoz képest a nukleotida mutációk jelentős felhalmozódását tapasztalták (pl. Herts/33 és IBA/85), ami arra utalt, hogy a törzsek pontmutációkkal való divergálása összefügg az eltelt idővel. Kiderült, hogy a HN gén vizsgálatával kialakított csoportok elterjedése földrajzi meghatározottságot mutat. A B csoportú vírusok csak Észak-Amerikában fordultak elő, az A és C csoportok reprezentánsai viszont Európában, Ausztráliában és Japánban is megtalálhatók (*Sakaguchi és mtsai 1989*).

Collins és *mtsai* galambokból izolált PPMV-1 törzsek eredetét kutatva - filogenetikai analízissel - I-IV származási vonalakba (*lineage*) csoportosították az NDV törzseket (*Collins és mtsai 1996*). Ezek közül az I-III csoport azonos az általunk jelölt I-III. genotípussal, míg a IV. lineage, további kiegészítésekkel, megfelel az általunk leírt VI-os genotípusnak (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*).

Kanadában és az USA-ban kormoránokból izolált NDV törzsek F gén szignálszekvenciáját meghatározva és a származtatott aminosav sorrend elemzésével arra a következtetésre jutottak, hogy az 1975-ben és az 1990-es években izolált NDV törzsek jelentős szekvencia különbséget mutatnak (11 aminosav eltérés a vizsgált 28-ból). A szerzők szerint ez több módon is kialakulhatott: különböző eredetű NDV törzsekkel fertőződtek a kormoránok, vagy a vírus folyamatos cirkulációja során pontmutációk felhalmozódása történt az évek során (*Heckert és mtsai 1996*). 1990-es évek elején Észak-Dakota államban pulykából izolált NDV törzsek szekvenciája igen hasonló vagy azonos volt az ugyanitt és Minnesotában kormoránból származó vírustörzsekkel, ami alapján a vadmadarak járványközvetítő szerepére hívták fel a figyelmet (*Seal és mtsai 1995*).

Az USA dél-keleti részén és Puerto Rico-ban izolált NDV törzsek F génjének szekvenálását követően megállapították, hogy azok mindegyike a *lentogen* vírusokra jellemző származtatott aminosav sorrendet mutat a vágáshely régióban ($^{110}\text{GGGRQGR}^{\downarrow}\text{LIGA}^{120}$). Filogenetikai analízis során a B1 és a LaSota vakcina vírussal közeli rokonnak bizonyultak az izolátumok, de egyik esetben sem találtak 100%-os nukleinsav egyezést (*Marin és mtsai 1996*).

King és Seal filogenetikai vizsgálattal (az M gén egy szakaszának szekvenálásával) az USA észak-keleti részén, egyes élőmadár piacokon izolált NDV törzsek eredetét kutatta. Megállapításuk szerint, az NDV izolátumok többsége (6 mintából 4) nagyon hasonló volt a B-1 és a LaSota referencia törzsekhez (0,012 nt kicserélődés/nt. pozíció). Két további izolátum, a V4-jelű *lentogen* törzs és egy galamb eredetű csirke izolátum volt (*King és Seal 1997*).

Kanadai és magyarországi *lentogen* izolátumok eredetét kutatva, RE vágáshely analízissel megállapítottuk, hogy azok mindegyike - az adott régióban használt - Magyarországon a LaSota, Kanadában a B-1-vakcina vírusok reisolátumainak felelnek meg (*Wehmann és mtsai 1999*).

További filogenetikai analízisen alapuló járványtani vizsgálatok eredményei (*Alexander és mtsai 1999, Yang és mtsai 1999, Ke és mtsai 2001, Cattoli és mtsai 2001*) szoros kapcsolatban állnak az általunk végzett vizsgálatok eredményeivel, így azokat az EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS rovatban ismertetem.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vírusok

Az elmúlt 40 évben, Olaszországban izolált ND törzsekből álló gyűjteményt együttműködő partnereink (*S. Pascucci, P. Massi, I. Capua, M. Luini, L. Selli*) bocsátották rendelkezésre (6. táblázat).

A Bulgáriából származó vírustörzseket *Dumanova L.* és *Hadjiev G.* izolálta az 1959-től 1996-ig terjedő időszakban lezajlott ND járványkitörésekből (8. táblázat).

Dél-Afrikai Köztársaságban és Mozambikban izolált törzseket, *Bragg R.R. és Trvassos Dias* küldte vizsgálatra (9. táblázat).

A fentiekén kívül vírustörzsek álltak rendelkezésre *Lomniczi Béla* NDV törzsgyűjteményéből is. A vizsgált törzsek eredetére, biológiai és szerológiai tulajdonságaira vonatkozó adatokat az EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS fejezetben táblázatokban foglaltam össze.

Az NDV törzsek szaporítása 9-11 napos embrionált tyúktojás *allantois* zsákjába való oltással és az embrió elpusztulásának függvényében az *allantois* folyadék leszívásával való learatással történt (*Lomniczi és mtsai 1973*). A vírustartalmú *allantois* folyadékot felhasználásig -70°C -on tároltuk.

Az izolátumokat az F gén 1349 nt.-nyi szakaszán (334-1682. nt. között) végzett RE (*HinFI, BstOI* és *RsaI*) vágáshely-analízissel (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*), majd a gén egyik variábilis régiójának (47-435. nt. között) szekvencia analízisével (*Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*) vizsgáltuk. Ezt megelőzően az alábbi lépéseket végeztük el.

4.2. Vírus-RNS kivonása

A vírus-RNS-t 500 μl *allantois* folyadékból, *Proteinase K* (*Sigma*, St.Louis, USA) enzimmel 55°C -on, 1 óras inkubálást követően fenol-kloroformos osszerázás után, Na-acetáttal, abszolút alkohol jelenlétében, 12 órai inkubálással -20°C -on csaptuk ki. A centrifugálást (20 perc 10000/perc fordulattal), majd a kétszeri 70%-os ethanolos mosást követően, a pelletet 25 μl kétszer desztillált *DEPC* (*Diethyl-pyrocarbonate*) kezelt vízben vettük fel, és -20°C tároltuk a felhasználásig (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*).

4.3. Reverz transzkripció

A cDNS szintézist 25 μl reakció térfogatban hajtottuk végre a következő reagensekkel: 8 μl *DEPC* kezelt víz, 5 μl 5x *first-strand-buffer* (*Gibco*, Bethesda, Maryland, USA), 0,02 U *random hexamer* (*Pharmacia*, Uppsala, Svédország), 1 μl *Moloney Murine Leukemia* vírus reverz

transzkriptáz (*Gibco*) és 5µl RNS minta. A reakcióelegyet 37 °C-on 90 percig inkubáltuk, majd az enzimet 98 °C-on 5 percig tartó hőkezeléssel inaktiváltuk (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*).

4.4. Polimeráz láncreakció

Az F gén különböző hosszúságú szakaszainak amplifikálására az 1aa-4aa; a K1-K2; az MV1-B2 és az 5-4b jelű primer-párok (3. táblázat) 18 NDV törzs F génje a génbanki szekvencia adatainak összehasonlításával - a *GCG* programcsomag *Pileup* és az *OLIGO* 5.0 számítógép programok segítségével - lettek kiválasztva.

Az F gén restriktív endonukleáz vágáshely-analíziséhez 1349 nt hosszú PCR terméket szintetizáltunk 1aa-4aa primer-párossal. Az F gén variábilis régiójának szekvenálására alkalmas *nested-PCR* termék előállítására a K1-K2 és az MV1-B2 primer-párosokat, a konzervatív génrégió hasonló célú amplifikálására pedig az 1aa-4aa és az 5-4b primer-párosokat (3. táblázat) használtuk. A reakciót 100µl térfogatban a következő ingrediensekkel végeztük: 10µl 10x PCR puffer (100mM Tris-HCL, pH 9,0, 500mM KCL és 1 mg/ml BSA), 10µl MgCl₂, 1µl a dATP, dGTP, dTTP és dCTP mindegyikéből (10mM, *Pharmacia*), 30pmol a primerekből, 2U Taq polimeráz (*Perkin-Elmer Cetus*, Norwalk, CT, USA), 5µl cDNS, ddH₂O-val végtérfogatra kiegészítve és 1 csepp ásványi olajjal lefedve (*Sigma*). *Nested-PCR* termék előállításakor a 2. PCR reakcióba mintaként az elsőből származó termék került 50x ddH₂O hígítással. A szintézist *Genetic Thermal Cycling System*, GTC-2 vagy *Perkin-Elmer* PCR készülékben végeztük. A PCR programok leírását publikációink tartalmazzák (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*, *Lomniczi és mtsai 1998*).

4.5. A PCR termékek hasítása restriktív enzimekkel és elektroforézis

A PCR termékek - mintánkénti teljes mennyiségét - 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe átmérve, 1ml n-butanollal, keverőgéppel (*Vortex*) 15 másodpercig kevertük. 12500g/2 perc centrifugálás után a felülúszó eltávolítását követően a pelletet kiszárítottuk. Ezt követően ismét feloldottuk a pelletet 15µl ddH₂O-ban, majd 3 azonos térfogatba szétmérve 2 µl megfelelő restriktív enzim pufferrel és 8-12 U *Hinf*I, vagy *Bst*OI, vagy *Rsa*I enzimmel (*Promega*, Madison, WI, USA) kevertük össze. A PCR termék emésztése, 37 °C-on egy éjszakán át zajlott. A képződött fragmentumokat glycerol tartalmú futtató pufferrel való összekeverést követően, *MetaPhor* és *DNA grade* agaróz 2:1 arányú keverékéből készített, 2,5%-os gélben szeparáltuk, 0,5x-es TBE pufferben, 185 V-os feszültséggel, 2 órán át. 100 bázispáronként növekvő fragmenteket tartalmazó markert (*Gibco*) használtunk a fragmentméretek közelítőleges megállapításához. A

fragmentek festését 10 percig, 1,5 mg/ml *EthidiumBromid*dal végeztük és UV átvilágítással *Polaroid* filmre fotóztuk.

3. táblázat: PCR primerek és az amplifikált régiók (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*)

Primerek jelölése	Szekvencia	Amplifikált régió
1aa	5'-TGA-5TC-WAT-YCG-5AR-GA5- ACA-AGR-KTC-TG-3'	F gén 334.nt és 1682. nt. közötti 1349 nt.-nyi szakasza
4aa	5'-ATC-TGR-YC5-AGT-GTR-TTA- TTC-CCA-AGC-CA-3'	
5	5'-CAT-TCC-CTA-TGT-CCC-CTG-GTA- TTT-A-3'	F gén 1124.nt. és 1490. nt. közötti 357 nt.- nyi szakasza
4b	5'-GTC-TTT-TGT-TGT-GCC-TTT-TGC-TT-3'	
K1	5'-GGG-RAA-GAR-AGT-GAC-WTT- TGA-CA-3'	M gén 778. nt. és F gén 545. nt. közötti 1008 nt.-nyi szakasza
K2	5'-TKG-GAT-AAW-CCR-YYR-GTG-ACC- TC-3'	
MV1	5'-CCY-RAA-TCA-YYR-YGR-YRC-YRG- ATA-A-3'	M gén 1163. nt. és F gén 492. nt. közötti 557 nt.- nyi szakasza
B2	5'-KCR-GCR-TTY-TGK-KTG-GCT-KGT- AT-3'	

4.6. Restriktions enzim analízis és fizikai térképezés

Minden megvizsgált vírustörzs fizikai térképét megszerkesztettük. Ehhez az enzim vágáshelyek pozícióit a gélről leolvasható fragment hosszak és a vírustörzsek *GenEMBL* adatbankból elérhető szekvenciáiból *GCG program*-csomaggal szerkesztett fizikai térképeket szerkesztettünk. Az olyan új vágáshelyeket, amelyek a génbanki törzsek alapján nem voltak azonosíthatók, részleges génszekvenálással magunk határoztuk meg. Ilyen vágáshely felderítő szekvenálásra példákat az EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS fejezetben, a RE vágáshely-analízis alkalmazása és korlátai című alfejezetben mutatok be. Az 4. táblázat a vágáshely felderítésre használt primer-párok lokalizációját és szekvenciáit tartalmazza.

5. táblázat: RE vágáshelyek felderítésére részleges gén szekvenálással használt primer-párok

Primer-pár	Felderített vágáshelyek	Primer	Amplifikált régió	Szekvenciája
F20-f4	VIII. gt. <i>Hinf</i> I 736	f20	F gén 401. nt. és 889. nt. közötti szakasz	5'-GGY-GCY-RTY-ATY-GGY-RGT-RTR-GCT-CT-3'
	IV. gt. <i>Hinf</i> I 745 IV. és V. gt. <i>Rsa</i> I 540	f4		5'-YTG-AGT-MTG-TGA-GTC-RTA-YAR-DAT-AGG-3'
f5-f6	IV. gt. <i>Hinf</i> I 1198	f5	F gén 800. nt. és 1235. nt. közötti szakasz	5'-AAG-YTA-GGT-GTR-GGR-AAY-ARY-CAA-C-3'
	IV. gt. <i>Rsa</i> I 1055 és 1087	f6		5'-TYA-TYT-TRC-ART-TDG-CRA-YRA-CTG-A-3'
5-4b	V. gt. <i>Hinf</i> I 1515	5	F gén 1124. nt. és 1490. nt. közötti szakasz	5'-CAT-TCC-CTA-TGT-CCC-CTG-GTA-TTT-A-3'
	IV. gt. <i>Bst</i> OI 1260	4b		5'-GTC-TTT-TGT-TGT-GCC-TTT-TGC-TT-3'
	IV. gt. <i>Hinf</i> I 1350			
Fh3-fh4	V. gt. <i>Hinf</i> I 1652	fh3	F gén 1476 nt. és HN gén 93 nt. közötti szakasz	5'-CYY-TGR-AYA-ART-TRG-MRG-ARA-GCA-3'
		fh4		5'-ATG-ABY-GAM-KHC-YGY-TRY-YGG-TGA-3'

4.7. A PCR-termékek szekvenálása

A *nested-PCR* termékeket - mindkét szálon - a PCR primerek felhasználásával szekvenáltattuk, a belgiumi *EUROGENTEC* Bel. S.A.-val, ABI 377-alapú fluoreszcens cycle szekvenálási technológiával. Az EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS fejezet 6., 8., 9. táblázataiban foglaltam össze az *EMBL/GenBank*ba elhelyezett vírustörzsek nukleinsav szekvenciáinak génbanki kódjait.

4.8. A szekvencia-adatok analízise

A szekvenciák összehasonlítását (*alignment*) a *Lasergene* programcsomag *MegAlign* programjával végeztük, ami erre a *Clustal algorithmust* használja. Az izolátumok közötti filogenetikai viszonyt a *TREECON for Windows (version 1.1)* segítségével értékeltük (*Van de*

Peer és De Wachter 1997). Ez a program a távolság matrixot a *Kimura* két-paraméteres korrekciós faktor alapján számolja. A *TREECON* program a dendrogrammot a *neighbour-joining* algoritmussal generálja, ami a legközelebbi szekvencia párok kiválasztásával, a legrövidebb fa kialakítására törekszik. Program kompatibilitási probléma miatt a *MegAlign* *.meg kiterjesztésű *output file-t* *GCGPileup Files* formátumban kellett elmenteni azért, hogy az a *Seqpup* konvertáló programmal átalakítható legyen a *TREECON* számára értelmezhető *input file-lá*.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

5.1. Az OIE adatai alapján rekonstruálható baromfipestis járványok

A bevezetésben már utaltam rá, hogy néhány ország járványügyi adatainak részleges elemzése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (OIE) által nyilvántartott adatok alapján rekonstruálható ND-járványok képe némileg eltért attól, amit a járványok történetét ismertető összefoglaló közlemények mutatnak be (*Lancaster 1966, Hanson 1974, Lancaster és Alexander 1975, Alexander 1988a*). Mivel munkám során ND-járványok történetét kívántam megismerni a hiányosan és esetlegesen rendelkezésre álló vírustörzsek genetikai azonosításával, alapvető fontosságú volt, hogy előbb a valóságnak megfelelően (amennyire ez lehetséges) bemutassam azokat a járványokat, amelyek az Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (OIE) adataiból rekonstruálhatók. A Párizsban székelő hivatal a tagországok egyéb feladatai mellett azért hozták létre, hogy a legveszedelmesebb fertőző állatbetegségek előfordulásának adatait összegyűjtse és minél gyorsabban tájékoztasson ezek előfordulásáról. Az adatokat a tagországok illetékes szerveinek önkéntes bejelentése képezi, amelyeket kétheti jelentéseiben tett nyilvánossá a *Bulletin d'OIE* című kiadványban. A kétheti jelentések ND-re vonatkozó adatait dolgoztam fel országonként 1960-tól, és diagrammokon ábrázoltam azon országok és területek ND-kitöréseinek számát, ahonnan vírustörzsek is rendelkezésre álltak genetikai azonosítás céljára.

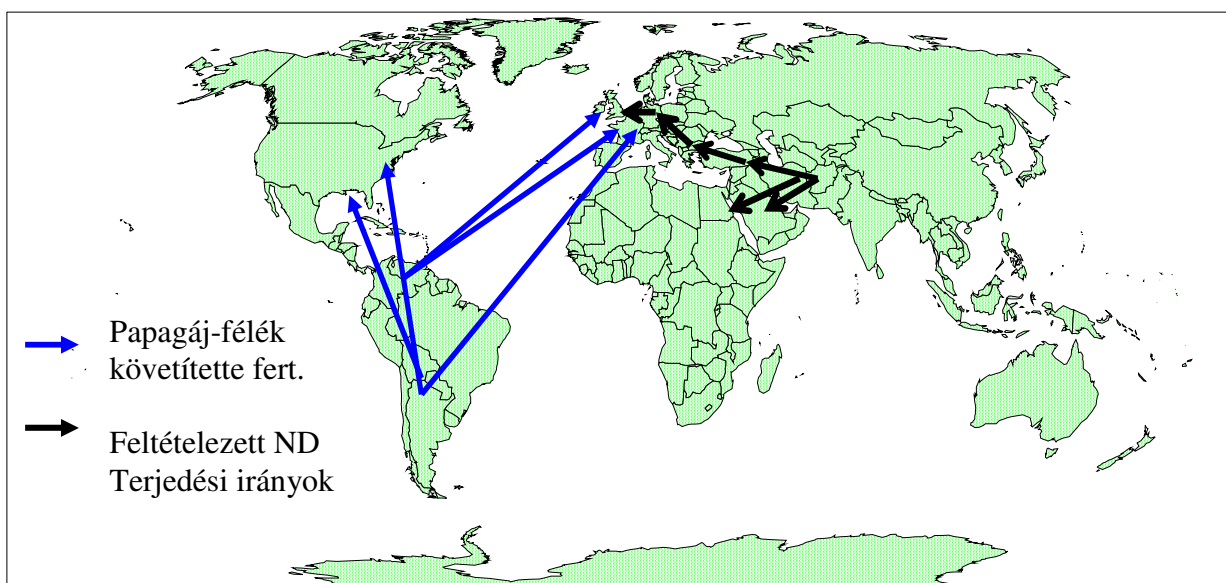
Az adatok értékelésekor tudomásul kellett venni, hogy ezek az önkéntes bejelentés minden hátrányát magukban hordozzák, vagyis a tényleges eseteknél valószínűleg kevesebbet jelentettek az egyes országok. (pl. Románia évente csak néhány esetet közölt, ami azért furcsa, mert ilyen kis kiterjedésű baromfipestis járvány valószínűleg nem létezik.) De találkozunk olyan országokkal is, amelyek időnként szüneteltették a bejelentést (pl. Magyarország, egy 1992-es eset bejelentésétől eltekintve, 1972 óta nem jelentett egyetlen esetet sem). Mindezekkel együtt, az OIE adatok a legrosszabb esetben is a baromfipestis minimális előfordulását tükrözik. Tekintettel arra, hogy A-kategóriás kórokozóval van dolgunk, azaz egyetlen járványkitörés is elegendő az ország mentes státuszának elvesztéséhez, az OIE adatok viszonylag megfelelően tájékoztatnak az egyes országok, vagy területek járványhelyzetéről (3. és 4. ábrák).

➤ ND-járványok a Közel-Keleten, 1960-1980 között

Az 1970-es években született leírásokban központi szerep jut az 1960-as évek végi közel-keleti ND kitöréseknek (*Lancaster és Alexander 1975*). Egyrészt, mert ezeket egy olyan járványvonulat részeként kezelték, amely az évtized elején indult volna a Távols-Keletről (Indonéziából), az évtized második felében jutott volna a Közép-Keletre, majd onnan Európán át

érkezett volna Angliába, 1970-ben (2. ábra). Ha a baromfipestist kizárólag szomszédos területeket meghódítva terjedő fertőző betegséggént képzeljük el és figyelmen kívül hagyjuk a már akkor is hozzáférhető adatokat, akkor is csak jelentős Nyugat-Európa-centrikus szemlélettel sikerülhet megrajzolni a 2. ábrán látható - fekete nyilakkal jelzett - terjedési sémát.

2. ábra: A baromfipestis járvány terjedése a II. világhárvány idején (*Lancaster és Alexander 1975*)

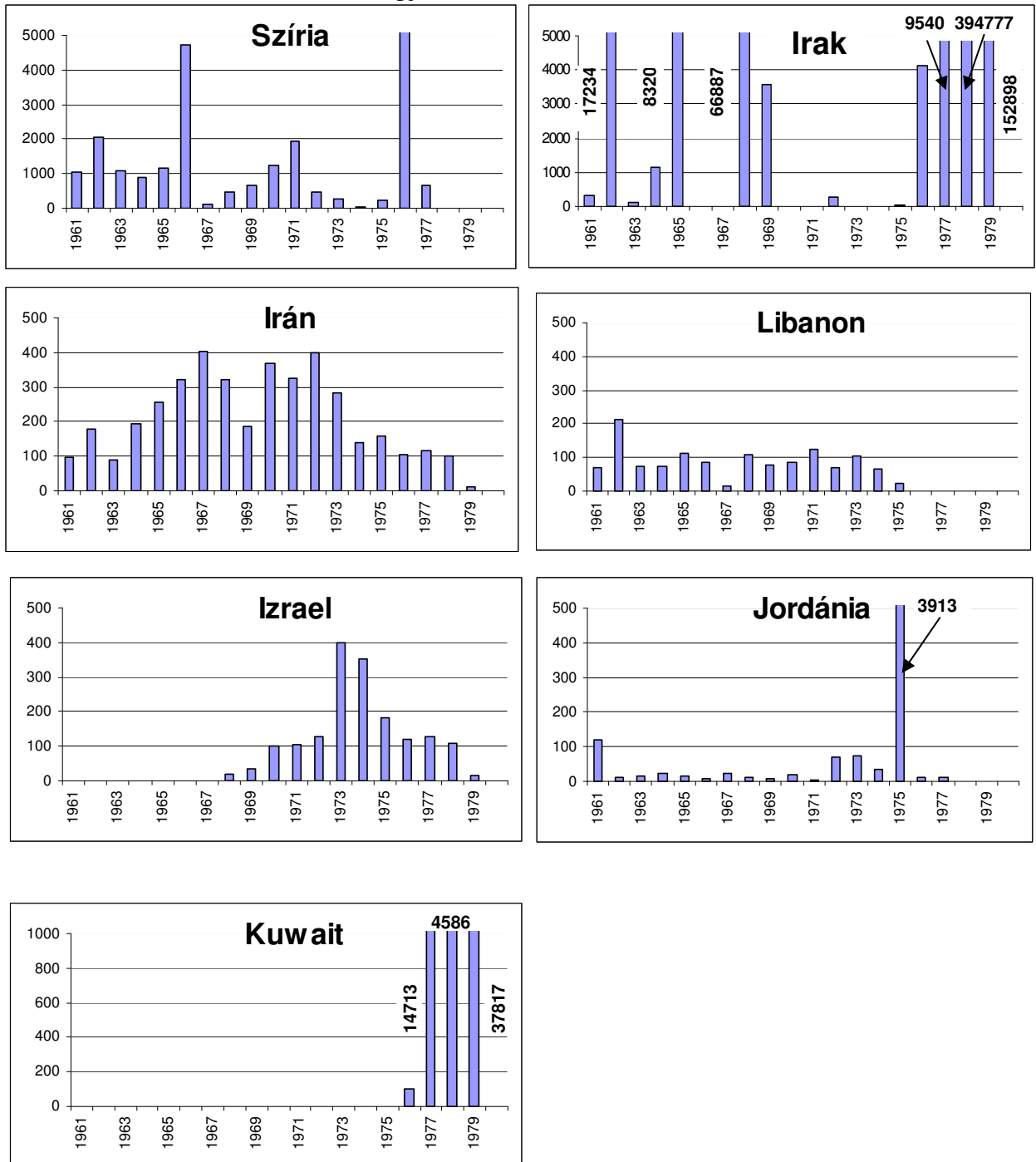


Ezzel szemben még az *OIE* hiányosnak tekinthető adatai alapján is a valóság az, hogy az 1960-as években, a Közel-Keleten folyamatosan igen súlyos ND járványok dúltak (3. ábra). Ha csak az iraki (IQ) adatokat vizsgáljuk, három járványcsúcs tűnik szembe, de az időbeli tagolódás inkább a bejelentések megszakításának tulajdonítható (pl. 1966-67-ben). Folyamatosan jelentettek baromfipestist Indiából (IN), Iránból (IR), Szíriából (SY), Libanonból (LB), Jordániából (JO) és Törökországból (TR). Csak Izrael (IL) kezdett 1968-ban jelenteni. Egyedül Iraknál észlelhető járványcsúcs 1968- és 1969-ben, de csak a megelőző és rákövetkező évek jelentéshiányának háttérében. Megállapítható tehát, hogy csupán az esetszámok eloszlását figyelembe véve semmi jele annak, hogy az 1960-as évek második felében az előző években már előfordultnál is súlyosabb járvány érte volna el a térséget. Ha valamikor, akkor inkább a 70-es évek közepén látunk csúcsokat (5 országban is, 3. ábra), ebből az időből viszont egyáltalán nem maradtak fenn vírustörzsek további analízisre.

Ezzel szemben 1968-70-ből négy országból (KW, LB, IL és IQ) maradt fenn vírus és feltételezhetően ennek tulajdonítható, hogy ez a periódus aránytalanul nagyobb hangsúlyt kapott

az irodalomban, azt a látszatot keltve, hogy az ND-járvány ekkor ért a térségbe. A legnagyobb torzítás, mégis a már idézett összefoglaló munkák szerzőinek (*Lancaster és Alexander 1975*) tulajdonítható, akik még a bejelentések számát is figyelmen kívül hagyták.

3. ábra: Baromfipestis járványkitörések évenkénti megoszlása egyes közel-keleti országokban 1961 és 1980 között (OIE adatok alapján)

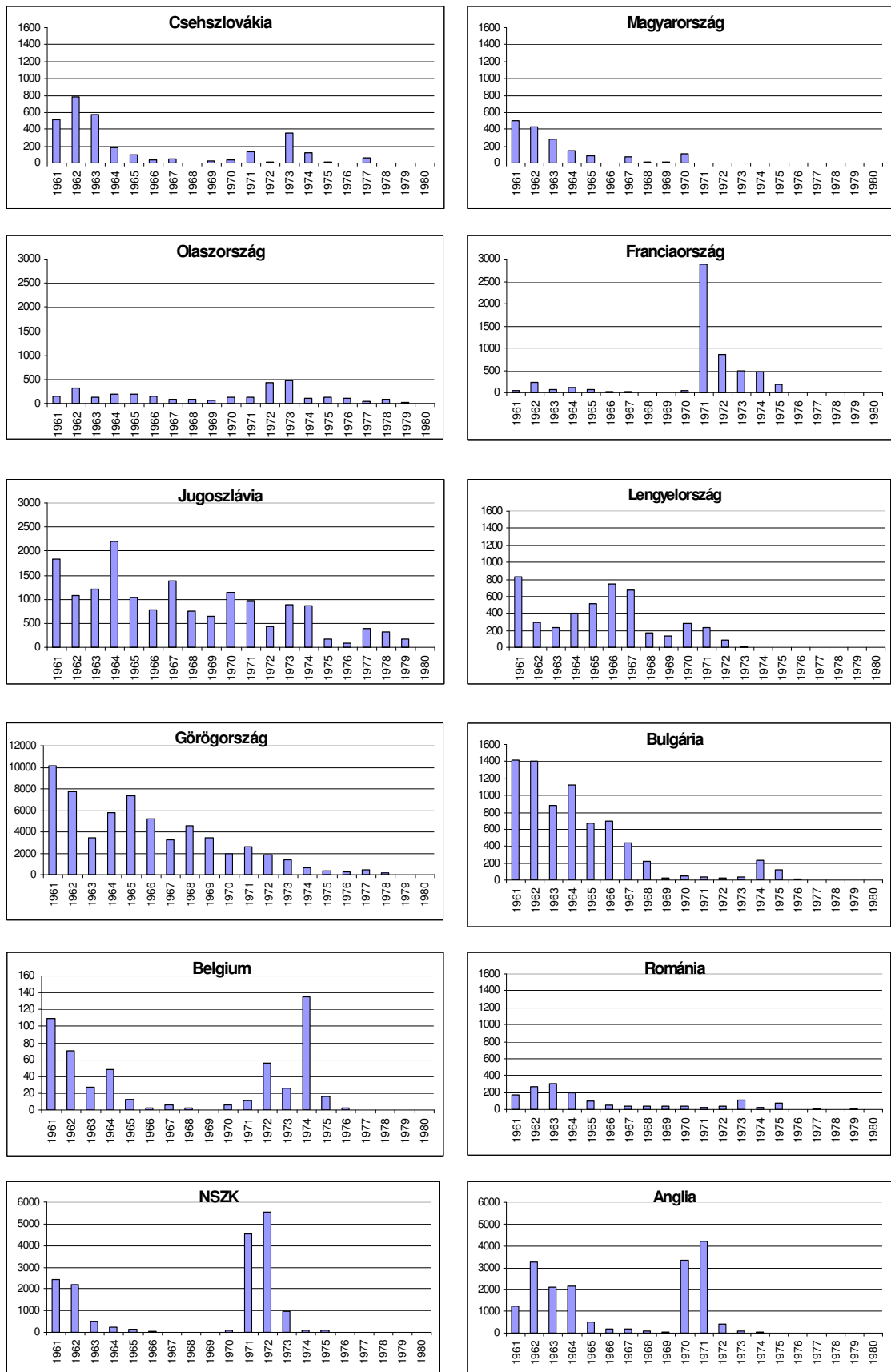


➤ *ND járványok egyes európai országokban az 1960-as évektől*

A fenti ellentmondások miatt, előbb kizárólag az *OIE* statisztikák alapján dolgoztuk fel az 1970-72-es nagy európai ND járvány eseteit országonkénti lebontásban. Említettem, hogy ezt azért tartottam fontosnak, mert az irodalom szerinti II. pandémia részeként ez a járvány a Közel-Keletről terjedt volna Európába, észak-nyugati irányba (2. ábra). Bár ebből az időből már több ország járványkitöréseiből maradtak fenn vírustörzsek, részleteiben csak az olaszországi (IT) és bulgáriai (BG) történetét vizsgáltam, mert csak ezekből állt rendelkezésre a 60-as évektől napjainkig terjedő időszakot képviselő törzsgyűjtemény. Az európai járványok történetének jobb megértéséhez feldolgoztuk a jelentős baromfitartó országok adatait (4. ábra). Megemlítem, hogy az angliai (GB) és németországi (DE) *OIE* adatokat ettől független forrásból is megerősítettük, így ezek egymással szinte egyező dinamikája valószínűleg a többi országra is jellemző lehet (kivéve a gyors felszámolást), függetlenül attól, hogy melyik ország hány esetet jelentett be. Pl. az 1960-as évek olaszországi esetszámai erősen alábecsültek, ténylegesen évi több ezer kitörést regisztráltak az országban (*S. Pascucci* személyes közlése).

A 4. ábra diagrammjain látható, hogy az 1960-as évek első felében pusztító méretű járványok fordultak elő Európa szerte, amelyeket valószínűleg a vakcinázásoknak köszönhetően is az évtized végére, főleg Nyugat-Európában, sikerült leszorítani néhány tucat esetre. Az 1970-et megelőző egy-két évben azonban talán csak Hollandia és Svájc vált teljesen mentessé az ND-től. Az Európa szerte tapasztalt alacsony ND incidencia volt az a háttér, ahonnan az 1970-es járványhullám indult. Különösen az angliai, német-, és franciaországi megbetegedések okoztak óriási károkat, legalábbis ezekről vannak erre utaló adatok (4. ábra). A többi nyugat-európai országban viszonylag mérsékeltébbek voltak a veszteségek, vagy csak kevesebb esetet jelentettek. Ez Olaszország esetében bizonyára így volt, de feltűnőek Belgium alacsony esetszámai is (kb. 200/1974). Ettől az időtől kezdve a kelet-európai országok némelyikének jelentési szokásaiban változás állt be. Pl. Bulgária és Románia néhány tucatra csökkentette a bejelentett esetek számát, ami egyfelől nyilvánvalóan valószínűtlen egy rendkívül kontagiózus fertőző betegség esetében. Másfelől, ennyi eset felszámolásához különösebb erőfeszítésre sem lett volna szükség. Magyarország és Lengyelország viszont egyértelműen beszüntette az ND bejelentését. Már a járványcsúcsok időbeli megoszlásából - 1970-71: Anglia, 1971-1972: NSZK és Franciaország, 1972-1973: Olaszország, 1973: Csehszlovákia és Magyarország (egyéb forrásból), 1974-1975: Bulgária – is hipotetikusán Nyugat-Európa → Dél- és Közép-Európa járványterjedési irányra következtethetünk (4. ábra).

4. ábra: Baromfipestis járványkitörések évenkénti megoszlása egyes európai országokban 1961 és 1980 között (OIE adatok alapján)



Az 1980-as évekből hiányos adatokkal rendelkezünk, mivel a *Bulletin d'OIE* nem, vagy csak hiányosan hozzáférhető az országban ebből az évtizedből. Az ND valódi történetének feltárása szempontjából egyedülálló értéket képviselnek azok a négy évtizedet átfogó törzsgyűjtemények, amelyeket az olasz és a bolgár kollégák bocsátottak rendelkezésünkre és segítségével többé-kevésbé sikerült feltárni az Európán végigvonuló ND járványok kóroktanát és egyes esetekben ezek eredetét és összefüggéseiket is.

5.2. Járványfelderítés módszertani kérdései

5.2.1. Etiológiailag egységes járványok kritériumai és vizsgálatuk eszközei

A járványtani nyomozás egyik alapkérdése, hogy az egymástól térben és időben elkülönülő járványkitörések vajon kapcsolatban állnak-e egymással, azaz etiológiailag egységesek, vagy sem. Egy szűkebb földrajzi régióban közel egy időben lezajlott járványesetek kapcsán azok közös eredetének kérdése merül fel és bár ez logikailag valószínű, gyakran nem ez a helyzet. Járványvonulaton etiológiailag egységes ND-kitörések olyan sorozatát értjük, amely egyetlen behurcolás nyomán indult el és amelyet az alapozó vírustörzs leszármazottai tartanak fenn, azaz az izolátumok *monofiletikus* csoportot alkotnak.

Ez az egyes járványkitörésekből származó izolátumok azonosságának, ill. a talált különbözőségek értékelésével dönthető el. Ehhez egyedül a nukleinsav-szekvencia biztosít döntő adatokat. Az izolátumok szekvencia-eltéréseinek értékeléséhez ismernünk kell, hogy a járványmentek során keletkező vírustörzsek mekkora evolúciós ütemmel rendelkeznek és hogy mekkora az a genetikai diverzitás, amelyen belül még közös (*monofiletikus*) leszármazásról beszélhetünk.

A szekvencia-adatok azonosító képességét illusztrálja, hogy egy adott vírustörzs (izolátum) szekvenciája még akkor is egyedinek tekinthető, ha a különbség egy másik törzstől csak egyetlen nukleotida eltérésre is szorítkozik (*Lomniczi 1999*).

Kétféle módszerrel jutottunk szekvencia adatokhoz:

- Restriktív enzim vágáshely-analízissel (a) és
- Nukleinsav-szekvencia meghatározással (b).

a) Restriktív vágáshely analízis

Három enzimmel az F gén 1349 nt.-nyi szakaszán (334 nt. -1682 nt.) végzett RE vágáshely analízis során törzsenként összesen kb. 25 vágáshelyet lehetett azonosítani, ami maximálisan is kb. 100 nukleotida megismerését jelenti. Ez a módszer a járványtörzsek többségének csoportosítását, genotipizálását lehetővé tette ugyan (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Jörgensen*

és *mtsai 1998*), de a járványtani nyomozáshoz nélkülözhetetlen egyedi azonosításukat csak nukleinsav-szekvencia analízissel lehetett megoldani (*Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*). Találkoztunk olyan izolátumokkal is (pl. Olaszországból), amelyek RE-vágáshely analízisét követően is bizonytalan maradt genotípus szerinti csoportosíthatóságuk; ezeknél egyértelmű eredményre csak szekvenálást követően jutottunk (*Herczeg 2001 és mtsai*) [lásd később].

b) Nukleinsav szekvencia-analízis

Legtöbbször az F gén variábilisabbnak tekintett részén, a 47-435 nt. közötti régióon végeztünk szekvencia-analízist (*Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001, Czeglédi és mtsai kéziratban*).

Etiológiailag egységes járványvonulatba tartozó ND törzsek genetikai diverzitásának mértékét témacsoportunk korábbi vizsgálatai tisztázták. Magyarországi és jugoszláviai V-ös genotípusú sorozatizolátumok szekvenciáinak összehasonlítása azt bizonyította, hogy egy évtizedes járványfutam alatt is csak kb. 1 % nukleotida-szekvencia divergencia alakul ki. Tehát ennél nagyobb (3-6%) divergencia már több évtizedes evolúcióra utalhat, ezért az ekkora távolságban lévő törzsek azonos járványvonulathoz való tartozásának a valószínűsége minimális (*Wehmann 2000*). Ezen adatok felhasználásával, az általam végzett mikroepidemiológiai vizsgálatokból kiderült, hogy a több évtizeden át folyamatosan fennálló, vagy újra megjelenő (klasszikus járványtani vizsgálatok alapján homogénnek gondolt) olaszországi, bulgáriai és dél-afrikai ND járványok egyike sem volt egységes etiológiájú. Egyes időszakokban, Olaszországban és Bulgáriában akár három-négy különböző eredetű genotípus is jelen volt (5.5. fejezet és 7. táblázat).

5.2.2. RE-vágáshely-analízis alkalmazásának haszna és korlátai

A vizsgálatok kezdetén kizárólag vágáshely-eloszlással, problémamentesen sikerült hat (I-VI) genotípust felállítani (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*), melyek elkülönítését később a szekvencia-analízis igazolta (*Lomniczi és mtsai 1998*).

Ahogy további divergenciát mutató újabb törzsek kerültek vizsgálatra egyre több kétértelműséggel találkoztunk, két okból is: a) a vágáshely változások (újabb megjelenése, vagy meglévő eltűnése) alapján nem lehetett eldönteni hogy ezek elég jelentősek-e ahhoz, hogy új genotípust alapozzunk rájuk; b) „progresszív” változás helyett megjelentek un. régi genotípusok jellegzetesnek tartott vágáshelyei is.

Ezekre hozok fel néhány példát az alábbiakban.

Egyes régi olaszországi törzsekről nem lehetett egyértelműen megállapítani hogy melyik genotípusba tartoznak, mert ezekben is előfordult az I- és III-as genotípus egyes törzseire jellemző a *HinfI* 1198 vágáshely és egy másik, újonnan megjelent vágáshely (*HinfI* 745) aminek a csoportosításban betöltött szerepét nem ismertük. A vírusok szekvenálást követő filogenetikai analízise azonban egyértelművé tette ezeknek a törzseknek a IV-es genotípusba tartozását (10. ábra).

A VIII-as genotípus korai izolátumai (ZA-5/68, ZA-10/74) a *HinfI* 736-os, *BstOI* 953-as és *RsaI* 1087 vágáshelyek hiányával jelzik különállásukat a csoporton belüli újabkori izolátumoktól (20. ábra). Ezek egyazon genotípusba tartozása filogenetikai analízis elvégzése előtt kérdéses volt.

A RE vágáshely-analízis önálló alkalmazásának korlátait jelezték a törzsdiverzitásból adódóan megjelenő, korábban nem ismert vágáshelyek. Ezek pontos pozícióját részleges szekvenálással, törzsdifferenciáló jelentőségüket pedig a szekvenáláson alapuló genotipizálással lehetett eldönteni. Az új vágáshelyek felderítéséhez szükséges szekvenáló primereket az 4. táblázat mutatja be.

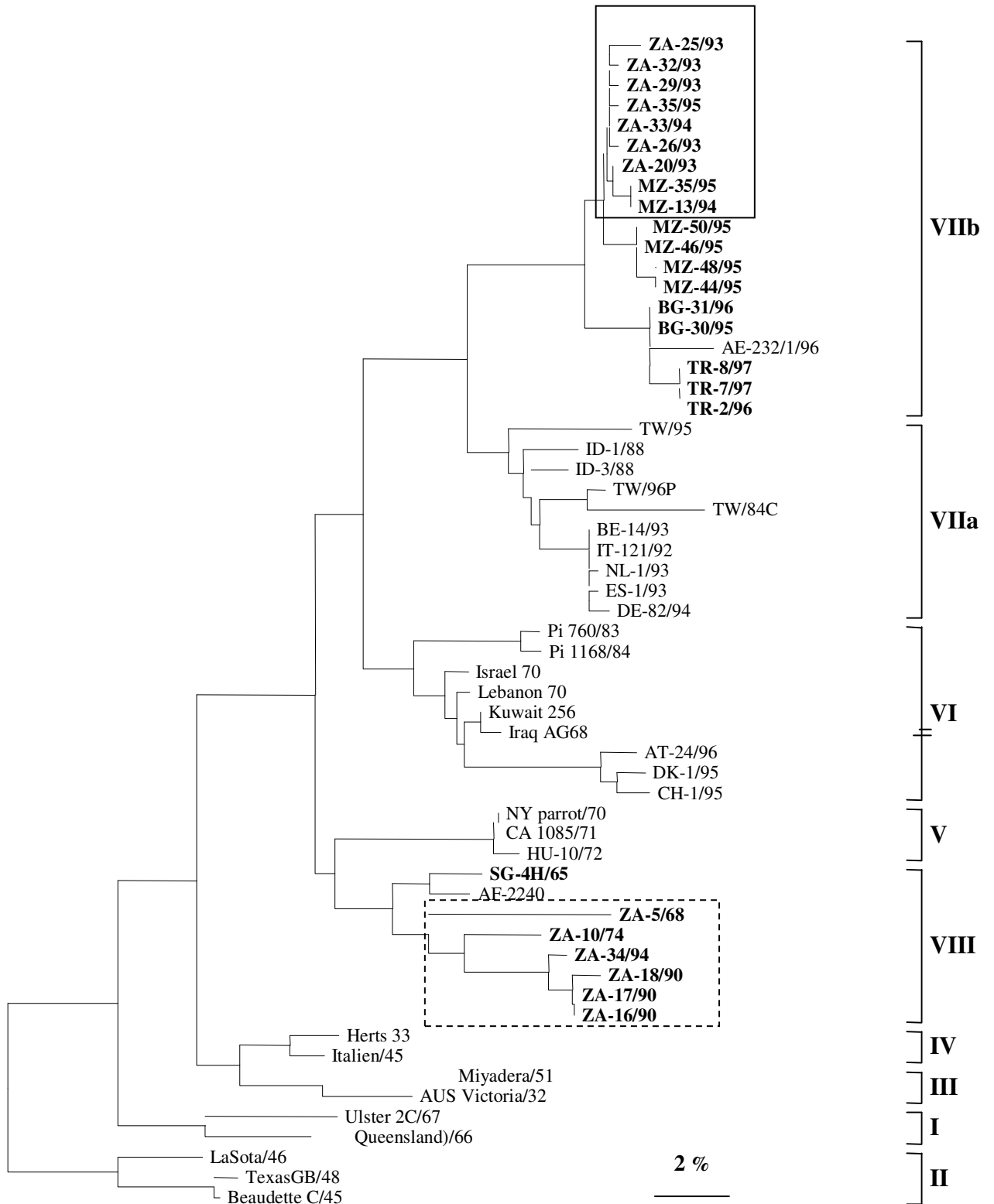
Az egyes országok vírustörzseinek jellemzésekor erre még kitérek.

5.2.3. A járványtani nyomozáshoz optimális génszakasz

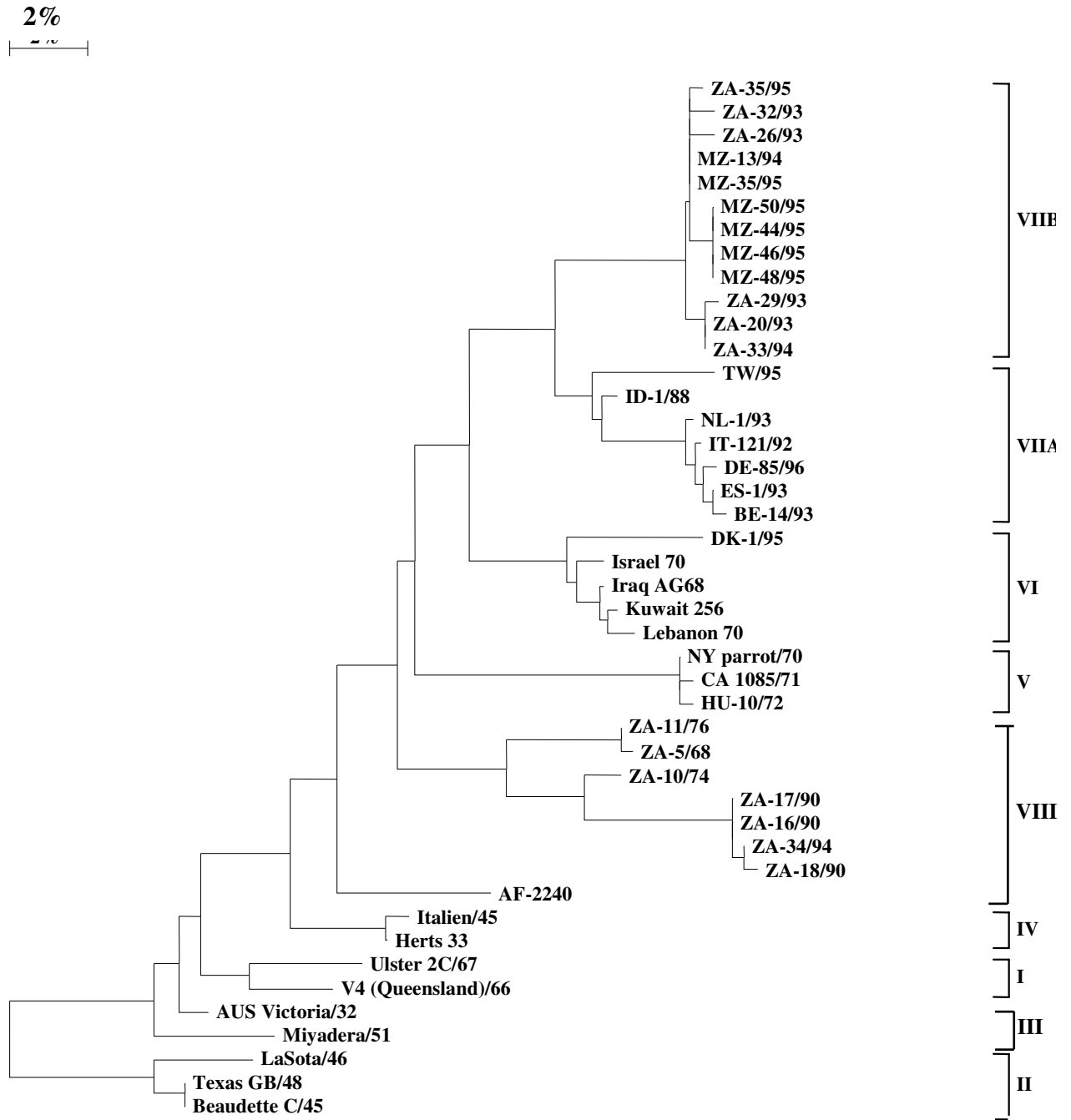
A járványtörzsek filogenetikai analíziséhez alkalmas, vagy optimális génrégió megtalálására és az adott génszakasz törzsdiverzitás szempontjából reprezentatív jellegének igazolására a dél-afrikai izolátumok segítségével az F-gén két szakaszán is végeztünk szekvenálást. A dél-afrikai törzsgyűjtemény filogenetikai analízisét az F gén variábilisnak (47. nt.- 435. nt.) és konzervatív (1140. nt.-1503.nt.) génrégióján, valamint a két szakasz kombinálásával létrejött 736 nt. hosszúságú szakaszon egyaránt elvégeztük. A két régió szekvenciáiból konstruált dendrogramokat a 5. és 6. ábrák mutatják be. Az 5. ábrán a variábilis, a 6. ábrán a konzervatív génrégió törzsfája 6-6 mozambiki és 13-13 dél-afrikai izolátumot tartalmaz. E törzsek szekvenciáinak egyesítésével kapott kombinált törzsfa a 21. ábrán látható. A variábilis, konzervatív és kombinált szekvenciák vizsgálatakor azt látjuk, hogy a három törzsfa topológiája nagyon hasonlít egymásra. Tehát az F gén mind variábilis, mind konzervatív régiója kb. 360 nukleotidnyi szakaszának filogenetikai analízise közel azonos eredményre vezet.

Mégis a variábilisabb génrégió vizsgálata mellett döntöttünk, mert az F gén ezen része kódolja a virulencia kialakításában fontos szerepet játszó proteolitikus hasítási helyet (*cleavage site*-ot).

5. ábra: I-VIII-as NDV genotípusok filogenetikai viszonya az F gén variábilis régiójának vizsgálatával



6. ábra: I-VIII-as NDV genotípusok filogenetikai viszonya az F gén konzervatív régiójának vizsgálatával



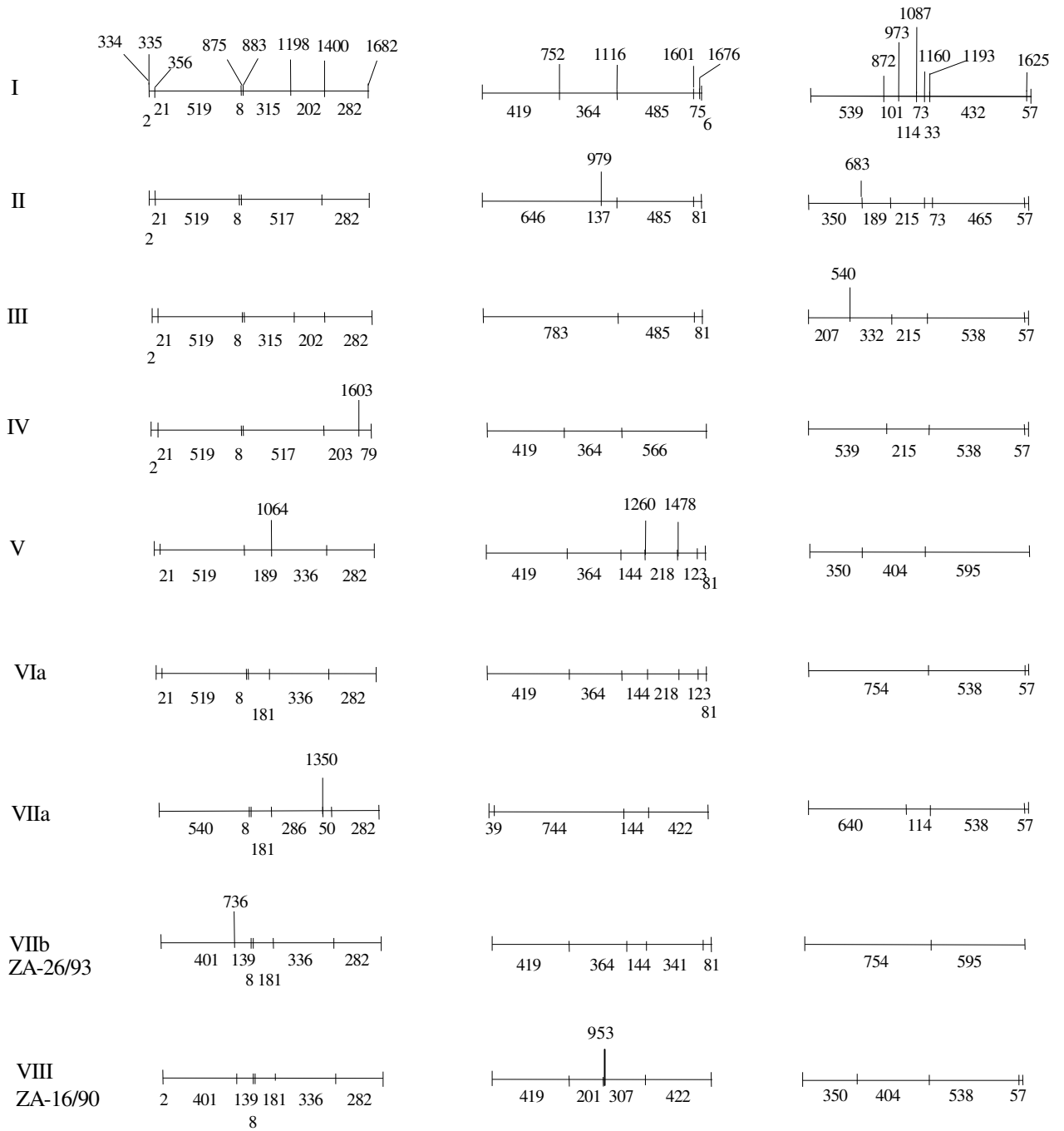
5.3. Az NDV-genotípusok, topotípusok és járványtípusok

5.3.1. Az NDV-genotípusok

Munkánk kezdetén, több mint 200 NDV törzs RE vágáshely-analízisén alapuló F gén fizikai térképezésével, csoportspecifikus vágáshelyek és vágáshely-kombinációk alapján összesen hat (I-VI) genotípusba soroltuk az 1930-as évektől az 1980-as évek közepéig terjedő időszakból származó reprezentatív izolátumokat (8. ábra, 7. táblázat) (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*). Filogenetikai analízissel is megerősítettük a felállított genotípusok különállását. Az 1990-es évek európai ND járványai kapcsán egy újabb csoportot, a VII-est (5. ábra, 7. táblázat) írtuk le (*Lomniczi és mtsai 1998*). Megjegyzendő, hogy *Toyoda és mtsai (1989)* által kialakított NDV csoportosítás (A, B, C) megfelel az általunk jelölt I-IV-es csoportoknak, azzal az eltéréssel, hogy az általuk C-nek jelzett leszármazási vonal valójában két, a III-as és a IV-es genotípust foglalja magába (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*). Mint látni fogjuk, az általunk genotípusnak tekintett víruscsoport olyan törzsek együttesét tartalmazza, amelyek genetikai távolsága kb. 6-8%-on belül van és földrajzi és/vagy időbeli, ennek megfelelően epidemiológiai meghatározottságot mutatnak (lásd: 5.3.2.-t is).

A dél-afrikai törzsgyűjtemény vizsgálatakor derült ki, hogy indokolt a VII-es genotípus tovább osztása VIIa és VIIb csoportra valamint leírtunk egy újabb genotípust a VIII-ast (*Herczeg és mtsai 1999*) (5. és 8. ábra, 7. táblázat). Olaszországi (*Herczeg és mtsai 2001*) és bulgáriai (*Czeglédi és mtsai kéziratban*), továbbá más földrajzi régiókból származó törzsek (pl. *Jörgensen és mtsai 1998*) és törzsgyűjtemények vizsgálatával újabb genotípusokat nem találtunk (8. ábra).

8. ábra: NDV genotípusok RE vágáshely-analízissel végzett F géntérképezés alapján



5.3.2. Mikor topotípus a genotípus?

Az első világjárvány korai szakából, főleg az 1960-as évek előtti időből csak kevés törzs maradt fenn, de ezek vizsgálata is meglepő eredményre vezetett. Az derült ki, hogy három kontinensen, három különböző genotípusba tartozó vírusok uralkodtak. Az erős földrajzi elkülönülés miatt a csoportokat akár topotípusoknak is tekinthetjük (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*).

A II-es genotípus eredetileg valószínűleg csak Észak-Amerikában fordult elő, ahol három *pathotípusa* (lentogen, mesogen, velogen) alakult ki.

A III-as genotípus az 1930-as évektől (AUS Victoria 1932 és Miyadera 1951) valószínűleg csak a Távol-Keleten (*Yang és mtsai 1999, Ke és mtsai 2001*) volt jelen.

A IV-es genotípusú vírusokat eddig csak Európában találtunk az 1940-es évektől. A fentiekből következik, hogy az *NDV topotípus* fogalmán hosszabb időintervallumban (pl. 1930-1960) egy meghatározott földrajzi régióban (pl. kontinensen) elterjedt, valószínűleg ott őshonos genotípust értünk.

Az irodalomban használt I. pandémia kifejezés helyett az ND globális elterjedését lenne helyesebb használni, mivel abban az időben nem azonos vírustörzs (genotípus) terjedt szét a különböző kontinenseken. Az I. pandémia tehát etiológiailag nem volt egységes. Az egyes földrészeknek sajátos, jól karakterizálható (RE-, és szekvencia-analízis) NDV topotípusaik voltak. Ezek egymástól független ND-kitörések láncolatát tartották fenn az egyes földrészek.

5.3.3. Járványtípusok: epidémia és endémia megjelenítése a dendrogrammon

A csak pontmutációk halmozódásával evolváló RNS vírusok esetén, a vírus evolúciós ütemének ismeretében (NDV-nél ez kb. 1%/10 év, *Wehmann 2000*), a szekvencia adatok filogenetikai feldolgozáskor kirajzolódó dendrogrammok fastruktúrájából is következtethetünk a vírusok járványtani kapcsolatára.

A *dendrogrammon* a hosszú függőleges ágon elágazás nélkül, vagy csak igen rövid (néhány tized % nt. divergenciának megfelelő) horizontális karon elhelyezkedő törzsek csoportja gyorsan terjedő epidémiát jelez. Ilyenek, pl. a Dél-Afrikai Köztársaságban és Mozambikban az 1990-es évek közepéről származó VIIb genotípusú törzsek az (5. ábra *dendrogramján* bekeretezéssel jelölve *Herczeg és mtsai 1999*). Amennyiben egy csomópontból több hosszú horizontális ágon kapcsolódnak a törzsek, akkor az adott régióban endémiás szituációból származó vírusokkal állunk szemben. Példa erre a Dél-Afrikai Köztársaságból származó VIII-as genotípusú törzsek csoportja (6. ábrán, szaggatott vonallal bekeretezve, *Herczeg és mtsai 1999*),

vagy az olaszországi törzsgyűjtemény IV-es genotípusú törzsei (a 11. ábrán szaggatott vonallal bekeretezve *Herczeg és mtsai 2001*).

5.4. *Shared derived* karakterek alkalmazása (Lomniczi 1999, Herczeg és mtsai 1999)

Az egyes genotípusok megjelenésének sorrendjét az egymást követő járványokból származó izolátumok un. *shared derived* (örökléssel szerzett) karaktereinek segítségével állapítottuk meg (5. táblázat). Itt valójában az újabb és újabb járványok során egy bizonyos időben mutáció miatt felbukkanó, majd öröklődő aminosav pozíciók összevetéséről van szó. Minél recensebb törzsről van szó, annál valószínűbb, hogy egyre több változást fog felhalmozni a legkorábbi izolátumhoz képest. Az összehasonlításhoz szükséges régi konszenzus szekvenciát az 1960-as évek előtti járványokból származó NDV törzseket magukba foglaló I-IV-es genotípusok aminosav szekvenciáiból állítottuk elő. Ezt követően kiválasztottuk azokat a pozíciókat, ahol az 1960-as évek utáni járványokból származó törzsek az I-IV-es csoportok és alcsoportokhoz képest eltérő aminosavakat tartalmaztak és ezek azután megmaradtak az újabb genotípusok mindegyikében, vagy zömében. Mivel csak az öröklött aminosavakat tekinthetjük *shared derived* karakternek, a genetikai kód degeneráltsága miatt minden esetben ellenőriztük, hogy ezek valóban homológok-e, azaz kémiaiailag identikus *kodonok*nak felelnek-e meg. Az I-IV-es genotípusok és az 1960-as éveket követően megjelent járványok izolátumaiban 27 kémiaiailag eltérő aminosav-pozíciót találunk, amelyek egy vagy több újabb genotípusban megőrződtek. Pl. a 4. pozíció lizinje (R→K) az V. genotípusban jelent meg először és azóta öröklődik. Ezek közül azonban 17 kémiaiailag azonos aminosavat eltérő tripletek kódolnak (szinonim aminosav szubsztitúciók). Bár ezen aminosavak ilyen alapon való azonossága homopláziásnak tekinthető, ami félrevezető a filogenetikai analízis szempontjából mégis mindenütt, ahol ezek több csoporton át is így maradtak meg, *shared derived* karakterként értékelhetők. Vagyis ahhoz, hogy a VI-VIII. csoportok közelebbi rokonságban vannak egymással, mint ugyanezek az I-IV-es csoportokkal, a 17 pozíciónak a mutációja is hozzájárul, jóllehet mind a régi, mind az újabb csoportokban fenotípusosan azonos jegyet (Leu-t) találunk. Pl. a 65. aminosav az I, III, IV és V-ös csoportokban Leu^{TTA} (rövidítése L), de a II-es csoportban ez Leu^{CTC} (jele: l), míg a VI-tól VIII-as csoportokban Leu^{TTG} (jele: l) [5. táblázat]. Megjegyzendő, hogy számos pozícióban (5, 23, 24, 33 és 51) a VIII-as genotípus azonosságot mutat az 1960-as évek előtti járványokat reprezentáló I-IV-es genotípusokkal. Ez összhangban van a VIII-as genotípusnak az I-IV-es csoportokhoz közeli leágazásával a dendrogrammon.

Az 1960-as évek utáni járványtörzsek többségében az F vágáshely aminosav szekvenciája ¹¹²RRQKR/F¹¹⁷. Ez alól a VIII-as csoportú vírustörzs (ZA-16/90, ZA-17/90, ZA-18/90) a kivétel,

mivel ezeknél az izolátumoknál $^{112}\text{RRRKR}/\text{F}^{117}$ szekvenciát találtunk (5. táblázat). Másrészt, a bulgáriai és törökországi izolátumoknál, ez $\text{K}^{115} \rightarrow \text{R}$ cserével revertált egy a korábbi genotípusoknál (III és IV) talált $^{112}\text{RRQRR}/\text{F}^{117}$ vágáshellyé.

5. táblázat: A különböző genetikai csoportok *shared derived* aminosav karakterei a variábilis régióban

CSOP.	4	5	16	17	19	22	23	24	28	33	51	65	81	86	91	93	98	104	107	↓					121	124 _a	
	R	S	T	I	V	A	L	S	P	D	N	L	L	R	L	T	S	E	T	R	R	Q	K	R	F	I	G ^b
I (<i>Le</i>) ^c	- ^d	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	K	-	G	-	L	-	-
II (<i>Le</i>) ^c	-	-	t	-	-	V	-	-	-	-	-	I ^e	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	G	-	L	-	-
(<i>Me/Ve</i>) ^c	-	P	t	V	-	V	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	I	-	-	G	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	S
IV	-	-	I	-	I	T	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	S
V	K	P	I	T	I	I	-	s	L	d	n	-	-	r	l	-	s	G	-	-	-	-	-	-	-	-	S
VI	K	P	I	T	I	I	l	s	L	d	n	I ^e	l	r	l	-	s	G	S	-	-	-	-	-	-	-	S
VII a	K/-	P/-	I	t	I	I	l/S	s	L	d	n	l	l	r	-	t	s	G	s	-	-	-	-	-	-	-	V S
b	K	P	I	t	v	i	l	s	S	-	n	l	l	r	l	t	-	G	s	-	-	-	R/-	r/-	-	-	V S
VIII korai	K	-	i	T	I	I	-	-	L	-	-	l	l	r	l	t	s	G	St	r	-	-	-	-	-	-	V S
napjaink	K	-	V	T	I	I	-	-	L	-	-	l	l	r	l	t	-	G	-	r	-	R/-	-	-	-	-	L/- S(I)

^a Az F0 fehérje származtatott aminosav szekvenciája (egy 1-125 közé eső pozícióknál)

^b Konszenzus szekvencia, amin belül az F0 vágáshely környéki szakasz szekvenciája $^{112}\text{RRQKR}/\text{F}^{117}$ többségi szekvenciát képvisel.

^c Le: lentogen, Me: Mesogen, Ve: velogen

^d A konszenzussal azonos pozíciók jelölése: -

^e A konszenzussal vagy annak szubsztituensével kémiaiilag identikus, de genetikailag eltérő aminosavakat kis betűvel ill. aláhúzott kis betűvel jelöltük.

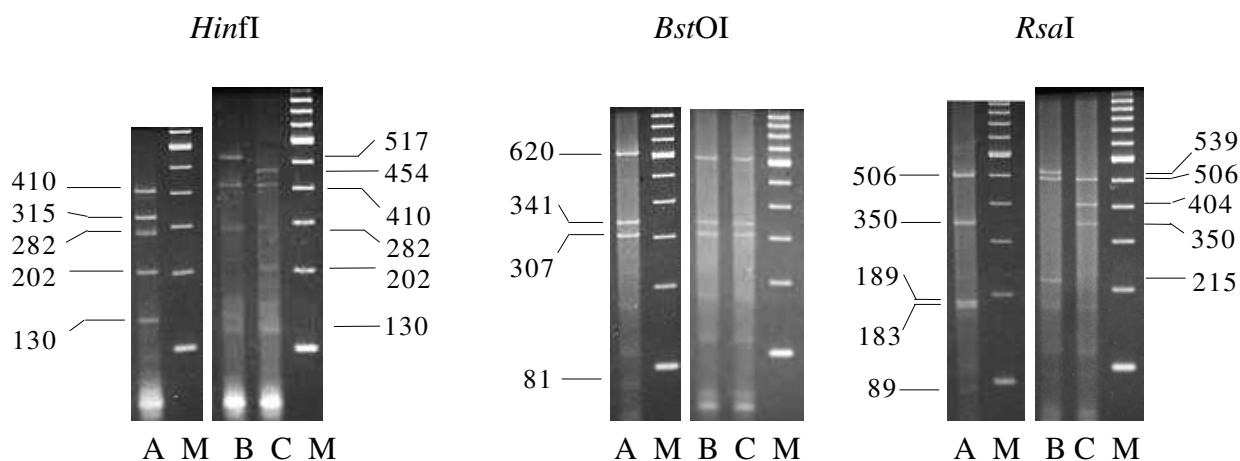
5.5. ND-járványok etiológiai jellemzése, történetük rekonstruálása

5.5.1. Egyes országok ND-járványai: Olaszország

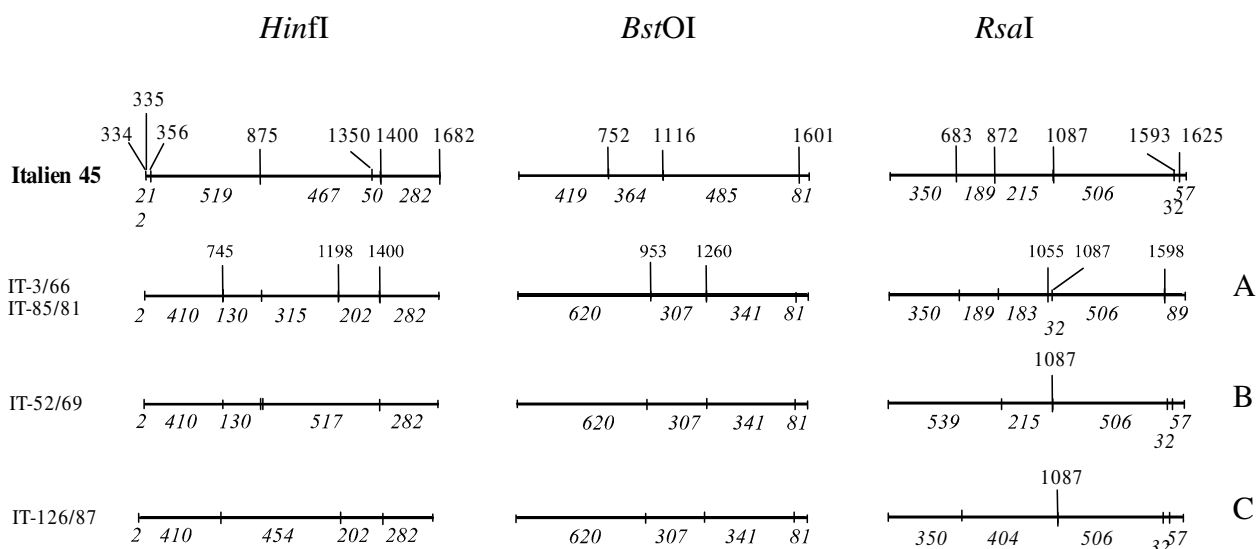
Az 1960-tól rendelkezésre álló OIE adatok szerint 1962-ben Olaszországban 316 új ND kitörés okozott járványcúcsot, majd a bejelentett esetszám 200, vagy ez alatti érték volt az 1970-es évek elejéig (4. ábra).

A négy évtizedet felölelő olaszországi törzsgyűjtemény általam vizsgált legkorábbi izolátuma 1960-ból származik (6. táblázat). Ebben az évtizedben izolált törzsek egy része RE-analízissel vizsgálva a IV-es genotípus (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996*) csoport-specifikus vágáshelyeit hordozza (lásd: 5.3.1. alfejezet, 8. ábra). Ezek a vírusok azonban néhány RE-vágáshely eltérést is mutatnak a IV-es genotípus legkorábbi ismert reprezentánsaitól, így az Angliában, 1933-ban izolált Herts/33-tól (*Dobson 1939*) és az Itálién/45-től. Utóbbit olaszországi eredetű csirkékből izolálták és azonosították az USA-ban, 1945-ben (*Brandly és mtsai 1946*). A RE-analízissel a IV-es genotípuson belüli variás vágáshelyek megjelenése alapján 3 szubtípusba csoportosítottuk az olaszországi izolátumokat (10. és 11. ábrák). Az izolátumok többségében olyan egyedi és elkülönítő erővel rendelkező vágáshelyek vannak (pl. *HinfI* 745, *BstOI* 953) (10. ábra), amik a környező országok (Bulgária, Magyarország, Németország, Jugoszlávia) korabeli törzseiben nem fordultak elő. Ez arra utal, hogy az olaszországi IV-es genotípusú variáns vírusok monofiletikus eredetűek és térben izolált endémiát tartottak fenn az országban.

10. ábra: Olaszországi IV-es genotípus reprezentánsainak RE hasítási képe és géntérképe



A, B és C a genotípusban talált RE-vágáshely variánsok csoportjait jelzi.
M az elektroforézisnél alkalmazott marker (100 bp. DNS létra) jele.



Ábramagyarázat: Az ábrán az Italian/45 referencia vírus fizikai térképe és IV-es genotípusú variáns törzsek géntérképei láthatók. A *HinfI* 745 és 1198, *BstOI* 953 és 1260 valamint *RsaI* 1055 vágáshelyek megjelenésével és *BstOI* 752, 1116 hiánya miatt térnek el a korai IV-es genotípusú (Italian/45) törzsektől.

A szekvencia-analízis is megerősítette, hogy ezek az izolátumok, bár azonos genotípusba tartoznak, jelentős csoporton belüli diverzitással bírnak (szekvencia divergencia >6%), és 3 szubtypusba sorolhatók (11. ábra). Az izolálási időszak hossza (1945-1987) és a dendrogrammon közös csomópontból elágazó hosszú vízszintes karok több évtizede (minimum 40 év) fennálló endémiára utalnak (11. ábra).

A vírustörzsek *monofiletikus* eredete a járványtan nyelvére fordítva azt jelenti, hogy a területre egyetlen alapozó törzset hurcoltak be a múltban és a 6%-os nukleinsav divergencia a több évtizedes endémiás fertőzési lánc során, helyi evolúciós történések (pontmutációk felhalmozódása) révén alakult ki. Vagyis az itt talált genetikai variánsokat nem külön-külön hurcolták be Olaszországba.

Az 1970-es évek elején, Európa más országaira ekkoriban jellemző, esetenként több ezres járványkitörés helyett Olaszország csak 440-485 járványkitörést jelentett 1972-1973-ban. Az ebből az időből származó első olaszországi izolátum (IT-51B/72) RE-analízissel vizsgálva azonos volt az 1970-es években, Európában megjelent járványhullám első ismert reprezentánsával, az V-ös genotípusba tartozó Essex 70-nel és az USA-ban megjelent (NY parrot/70, US(Ca)-1085/71) törzsekkel (12. ábra).

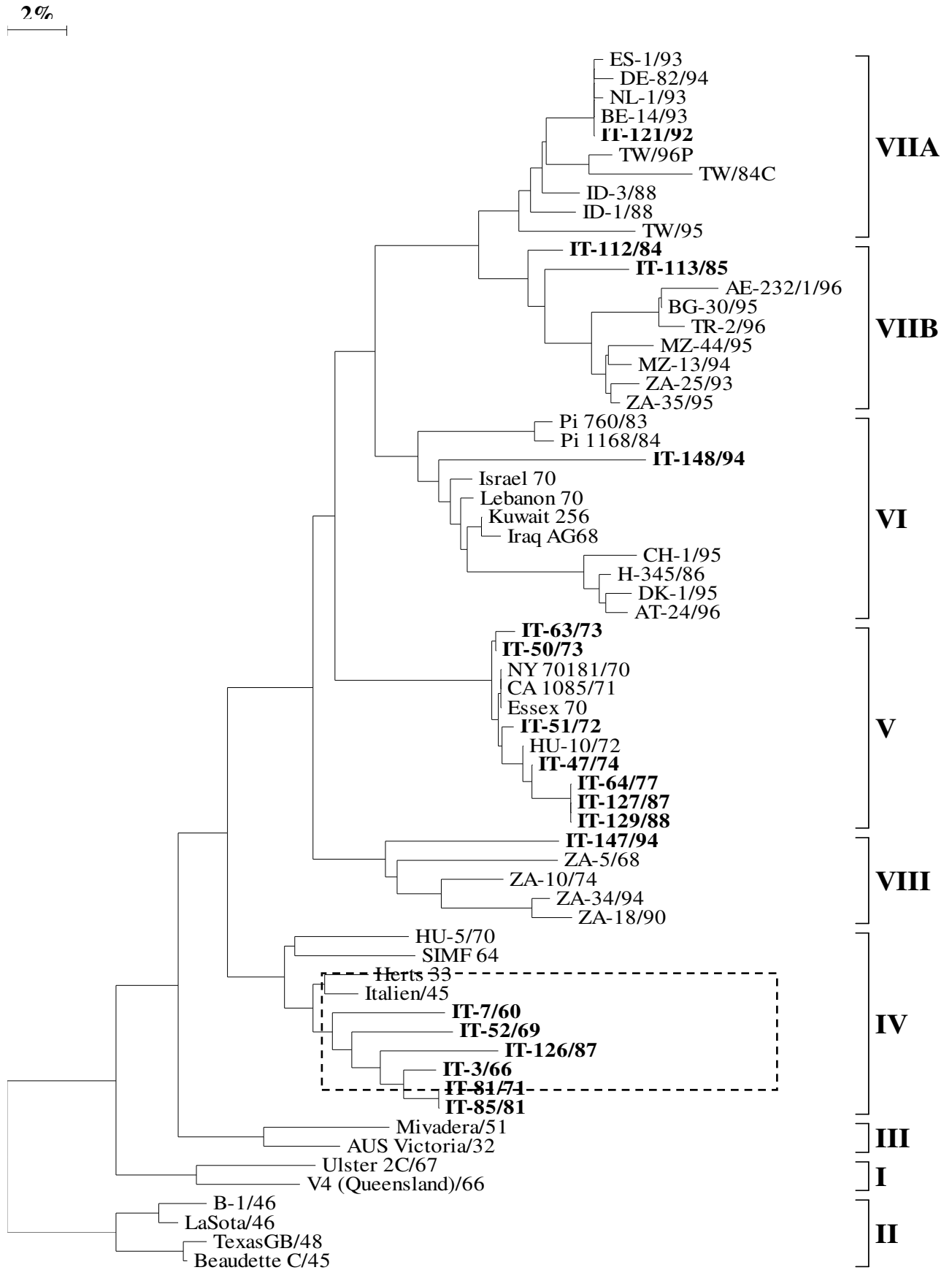
6. táblázat: Olaszországi NDV törzsek származási adatai, genetikai csoportosításuk és génbanki sorszáruk

TÖRZS	IZOLÁLÁS		GENETIKAI CSOPORT		
	Hely	Gazda	RE-analízis	Szekvencia-analízis	
				Génbanki sorszám	
IT-7/60	Perugia	fogoly	IV	IV	AF 218140
IT-3/66	Pavia	fürj	IV	IV	AF 218133
IT-5/68	Pavia	fürj			
IT-48/68	Forli	fürj			
IT-52/69	Forli	fürj	IV	IV	AF 218137
IT-6/70	Pavia	fogoly	IV		
IT-43/71	Forli	csirke	IV		
IT-81/71	Forli	csirke	IV	IV	AF 218141
IT-44/72	Forli	csirke	IV		
IT-51B/72	Forli	pulyka	V	V	AF 218136
IT-109/72	Lombardia	fürj	IV		
IT-50/73	Forli	pulyka	V	V	AF 218135
IT-63/73	Forli	pulyka	V	V	AF 218138
IT-110/73	Verona	csirke			
IT-47/74	Forli	fácán	V	V	AF 218134
IT-62/75	Forli	fürj	IV		
IT-66/76	Forli	fürj			
IT-64/77	Forli	fácán	V	V	AF 218139
IT-65/77	Forli	fürj	V		
IT-85/81	Forli	csirke	IV	IV	AF 218142
IT-67/82	Forli	csirke			
IT-68/83	Forli	fogoly	IV		
IT-112/84	Bergamo	pulyka		VIIb	AF 218127
IT-113/85	Bergamo	csirke		VIIb	AF 218128
IT-126/87	Verona	fürj	IV	IV	AF 218129
IT-127/87	Padova	csirke	V	V	AF 218130
IT-128/88	Padova	csirke	V		
IT-129/88	Treviso	csirke	V	V	AF 218131
IT-130/88	Padova	fácán	V		
IT-131/88	Vincenza	galamb	V		
IT-134/89	Padova	csirke	V		
IT-121/92	Teramo	csirke	VII	VIIa	AF 001127
IT-122/92	Teramo	csirke	VII		
IT-123/92	Teramo	csirke	VII	VIIa	AF 001128
IT-147/94	Róma	pulyka	VI?	VIII	AF 218132
IT-148/94	Palermo	csirke	VI?	VI	AF 221840

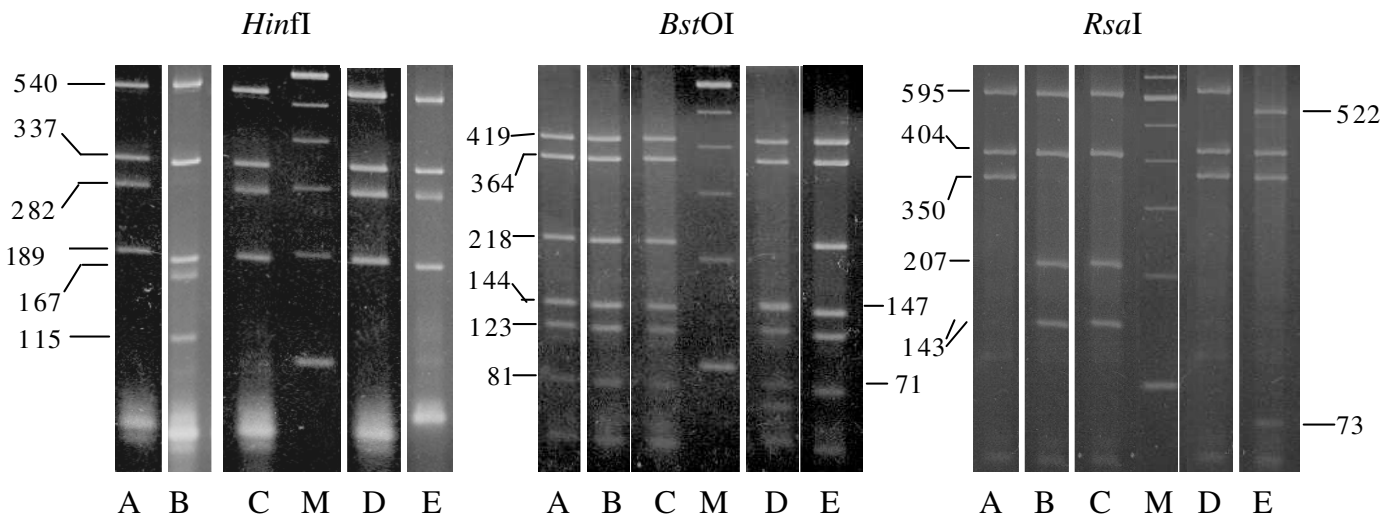
Ezen referenciavírusok és az első olaszországi izolátum (IT-51B/72) között 99,5%-os szekvencia azonosságot állapítottunk meg. A RE-analízis ugyan jelzett diverzitást ebben a csoportban is (IT-50/73, IT-63/73, IT-47/74 között) [12. ábra]. Ezen vírustörzsek közti mutációs távolság alapján (<1%) azonban legfeljebb egy alcsoport (klád) megkülönböztetése indokolt (IT-127/87 és IT-129/88). Ezek az 1987-ben megjelent újabb járványcsúcsból származnak és úgy látszik a *HinfI* 1515-ös vágáshely megjelenése jelentősebb egyéb változásokkal járt együtt. Ezek a vírusok 1,5-2 % divergenciát mutatnak a többi V-ös csoportbeli vírushoz képest, ezért valószínűleg ezek nem itt evolválódtak, hanem ezeket külön hurcolták be később (11. ábra).

Klasszikus epidemiológiai vizsgálatok alapján korábban már összefüggésbe hozták az 1970-es évek elején Észak-Amerikában megjelent ND járványkitöréseket dél-amerikai eredetű díszmadár szállítmányokkal (*Walker és mtsai 1973*). Az Egyesült Államokban izolált NY parrot/70 törzset Paraguayból szállított papagájokból tenyésztették ki, ahol csirkeállományokban is előfordult ND (*Francis és Rivelli 1972*). Az US(Ca)-1085/71-jelű törzs az akkori kaliforniai csirkejárványból származik. E törzsek hasonlóságára monoklonális ellenanyag vizsgálatok utaltak először (*Russell és Alexander 1983*), de csak genetikai analízis bizonyította a nagyon közeli genetikai rokonságot, következésképpen a járványtani kapcsolatot. A mi vizsgálataink igazolták utólag, hogy a papagáj-közvetítette ND és az 1970 augusztusában (Essex 70) Angliában megjelent esetek összefüggenek (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*). A következő évben már súlyos járványok pusztítottak Nyugat- és Közép-Európában is (NSZK több mint 4000, Franciaország és Görögország több mint 2000 eset) [4. ábra]. Úgy tűnik, hogy Belgiumban és Spanyolországban csak 1972-ben, Romániában 1973-ban, Bulgáriában 1974-ben jelentkezett a járványcsúcs (*OIE adatok, 4. ábra*). Több országban, így Jugoszláviában, Lengyelországban - ha hihetünk a bejelentések valóságtartalmának - nem emelkedett a járványkitörések száma. Magyarország 1971-ben az ND incidencia kisfokú emelkedését jelentette, majd beszüntette a további adatközlést. Az angliai és nyugat-európai első járványkitörésekhez képest, Olaszországban az V-ös genotípusú vírusok 1-2 éves késéssel jelentek meg és másfél évtizedes endémiát tartottak fenn (7. táblázat, 11. ábra).

11. ábra: Az olaszországi NDV törzsek 6 genotípushoz tartoznak

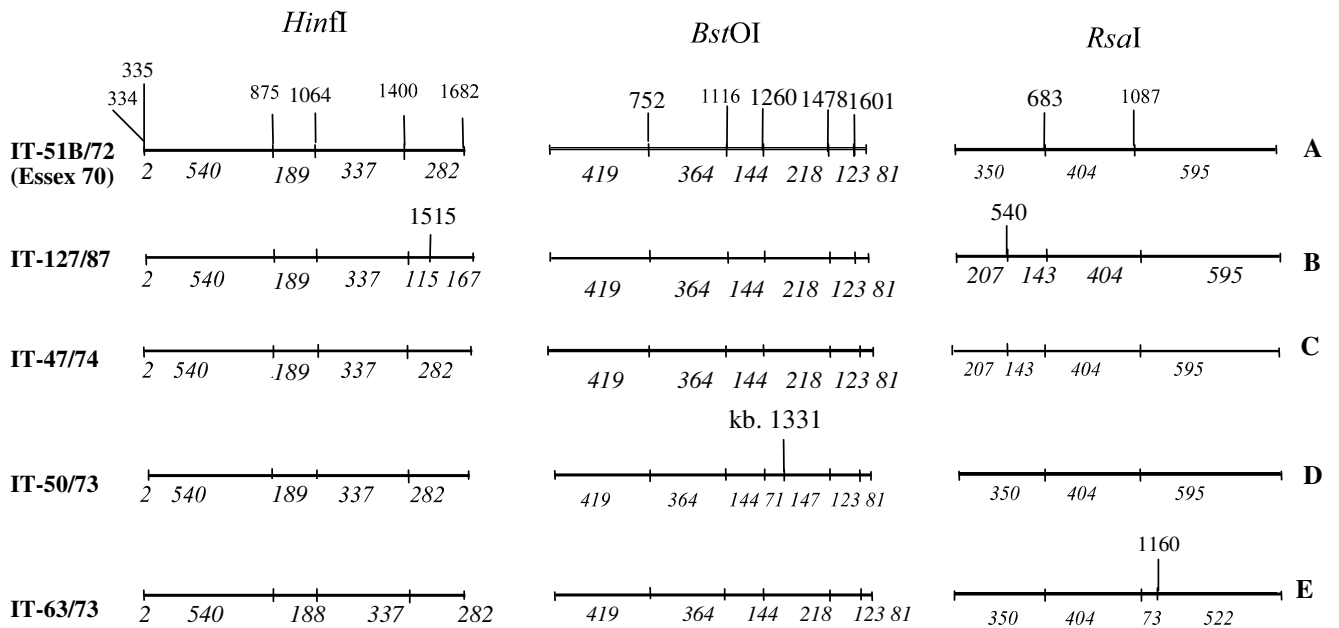


12. ábra: Olaszországi V-ös genotípus reprezentánsainak RE hasítási képe és géntérképe



A, B, C, D és E a genotípusban talált RE-vágáshely variánsok csoportjait jelzi

M az elektroforézisnél alkalmazott marker (100 bp. DNS létra) jele



Ábramagyarázat: Az 1970-es évek elejéről származó olaszországi törzsek jelentős része *Hinfi* 1064, *BstOI* 752, 1116, 1260, 1478 vágáshelyek megjelenésével és *Hinfi* 736, 1198, *BstOI* 953, 1260, *RsaI* 872, 1593 vágáshely eltűnésével különbözik a korábbi európai (IV-es genotípus) járványtörzsektől és az országban is endémiássá vált IV-es genotípusú variáns vírus törzsektől. IT-51B/72 jelű izolátum RE képe azonos a kaliforniai és angliai (NY-parrot/70, Essex/70, CA 1085/71) referens járványtörzsekével. Ezekről, az V-ös genotípus 1970-es évekbeli variánsai újabb vágáshelyek megjelenésével (IT-50/73 *BstOI* 1331, IT-63/73 *RsaI* 1160, IT-47/74 *RsaI* 540) különböznek. Az 1987-es variánsok jellegzetessége a *Hinfi* 1515 megjelenése.

Az 1990-es évek elején és közepén újabb baromfipestis járványhullám volt kibontakozóban Európában (Alexander 1995). Ennek a járványnak olyan, évtizedek óta ND mentes államok is áldozatul estek, mint Svédország, vagy Svájc és Dánia (OIE adatok). Olaszországban *Capua* és munkatársai számoltak be baromfipestis kitörésről (Capua és mtsai 1993). A RE analízis, az 1990-es évek olaszországi járványtörzseinek jelentős diverzitását tárta fel. Az IT-148/94 és további két izolátum (IT-121/92, IT-147/94) fizikai térképe, minden eddig ismert genotípustól eltérő RE hasítási képet mutatott ezért besorolásuk a szekvecia-analízisig bizonytalan maradt (13. ábra). Az IT-148/94 szekvencia analízise tette egyértelművé, hogy ez az izolátum valójában VI-os genotípusba tartozik, de azoktól jelentősen divergált (11. ábra). Az 1990-es években Európa egyes országaiban (Svédország, Svájc és Dánia) előforduló sporadikus ND járványokat ugyancsak VI-os genotípusú vírusok idézték elő (Lomniczi és mtsai 1998, Jörgensen és mtsai 1998). Ezekről a vírusokról azonban jelentős filogenetikai távolságban (9,6-10,2%-os nt. divergencia) van az olaszországi VI-os genotípusú izolátum, csakúgy, mint ennek a genotípusnak az általunk ismert legkorábbi törzseitől (Iraq AG68, Kuwait 256). Később azonban kiderült, hogy az IT-148/94-jelű vírustörzs 3%-os divergenciát mutat egy Szaudi-Arábiában 1995-ben izolált ND törzstől (SA-1/95). Ez alapján felmerült, hogy az olaszországi izolátum közel-keleti törzsekkel áll közeli járványtani kapcsolatban (Szamkó 2000). Az 1990-es években, Olaszországban a VI-os genotípus okozta kitörés(ek) közel-keleti eredetére utal az is, hogy az olasz törzs a szaudi-arábiaival együtt, a legkorábbi VI-os genotípusú arábiai törzsekkel közös csomópontú oldalágon helyezkedik el a *dendrogrammon* (11. ábra).

Az 1990-es évek további izolátumai közül az IT-121/92 vágáshely eloszlási képe jelentősen eltér a VI-os genotípusú variánsoktól (13. ábra). Ezt a szekvencia-analízis is megerősítette, amennyiben az 1990-es évek európai VI-os genotípusú törzseitől jelentős (9,6-10,2%-os nukleinsav divergencia) távolságban van. Hamar kiderült, hogy a többi EU-országban izolált korabeli NDV törzsek (pl. ES-1/93, DE-82/94, NL-1/93) szinte megegyeznek az IT-121/92-jelű törzssel. Ezeket a törzseket a VII. genotípusba soroltuk (Lomniczi és mtsai 1998). Később ezt a csoportot VIIa-nak neveztük el, mert egy újabb (dél-afrikai) csoporttal (VIIb) parafiletikus helyzetben találtuk (Herczeg és mtsai 1999). A VIIa genotípus európai reprezentánsai (Lomniczi és mtsai 1998) a *dendrogrammon* közös csomóponttól rövid horizontális karokkal ágaznak el, mert csak néhány tized százalékos nukleotida divergenciát mutatnak. Ezek az adatok is tükrözik a gyorsan terjedő, több országot (Spanyolország, Olaszország, Németország, Belgium és Hollandia) érintő járványhullámot. Az 1990-es években, Európában megjelent VIIa genotípussal indonéziai izolátumok (ID-1/88) vannak közelebbi rokonságban, ami felvetette az európai

vírusok távol-keleti eredetét (*Lomniczi és mtsai 1998*). Ez utóbbit, taiwani kutatócsoportok újabb adatokkal is alátámasztották (*Yang és mtsai 1999, Ke és mtsai 2001*).

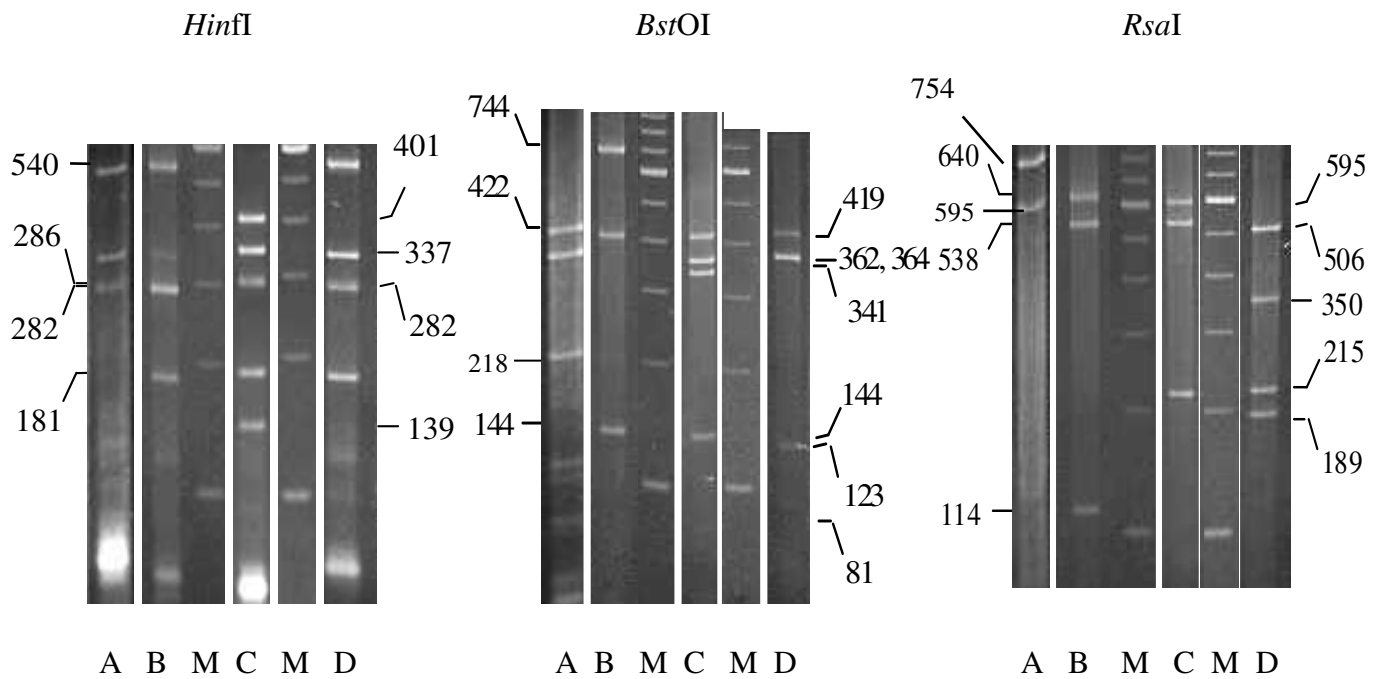
Az 1980-as években, Olaszországban nemcsak a korábbi járványmenetekből származó fertőzések maradtak fenn endémiás formában, hanem újabb, korábban nem ismert RE hasítási képet mutató törzsek (pl.: IT-112/84) is jelen voltak az országban (13. ábra). Ezek a vírusok meglepő módon a VIIb genotípusba tartoztak, de elágazásuk ancesztrális pozícióra utal. Járványtani kapcsolatukra (eredetük vagy ezek felbukkanása máshol) eddig semmi adat nincsen.

Az IT-112/84 és IT-113/85 jelzésű izolátumok 4% fölötti divergenciával térnek el a VIIb másik két alcsoportjától, a dél-afrikai vírustörzseket (pl.: ZA-35/95) (*Herczeg és mtsai 1999*) és egy 2000-es olaszországi izolátumot tartalmazóktól. Így a közvetlen etiológiai kapcsolat kizárható az 1980-as évek közepén és a 2000-ben Olaszországban megjelent járványok között, és az is bebizonyosodott, hogy az olaszországi és a dél-afrikai ND járványok között sem volt közvetlen járványtani kapcsolat (11. ábra).

A 2000. évi VIIb genotípusú olaszországi ND járvány és az 1990-es évek végén, Nyugat Európában megjelent sporadikus ND (VIIb) eredetére utal, hogy ezekkel közeli rokon vírusokat izoláltak a 90-es évek közepén Bulgáriában (BG-30/95) (0,6%-os divergencia), Törökországban (TR-2/96) (0,7% divergencia), és az Egyesült Arab Emírátság területén (AE-232/1/96) (*Alexander és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 1999*). A 2000. évi olaszországi ND járvány vírusai (pl. IT-1/2000) identikusak a Nagy-Britanniában és Észak-Írországban 1997-ben, majd 1997- és 1998-ban Skandináviában megjelent sporadikus esetekből származó törzsekkel (*Alexander és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*). Később ezt olaszországi szerzők is megerősítették (*Cattoli és mtsai 2001*). A skandináviai izolátumokat a dendrogrammon (lásd: *Herczeg és mtsai 2001*) egy finnországi NDV törzs reprezentálja (Fi/Vi/1001/96/1). Ezekből az adatokból, a VIIb genotípus Közél-Kelet → Dél- és Kelet-Európa → Nyugat- és Észak-Európa terjedési irányra következtethetünk.

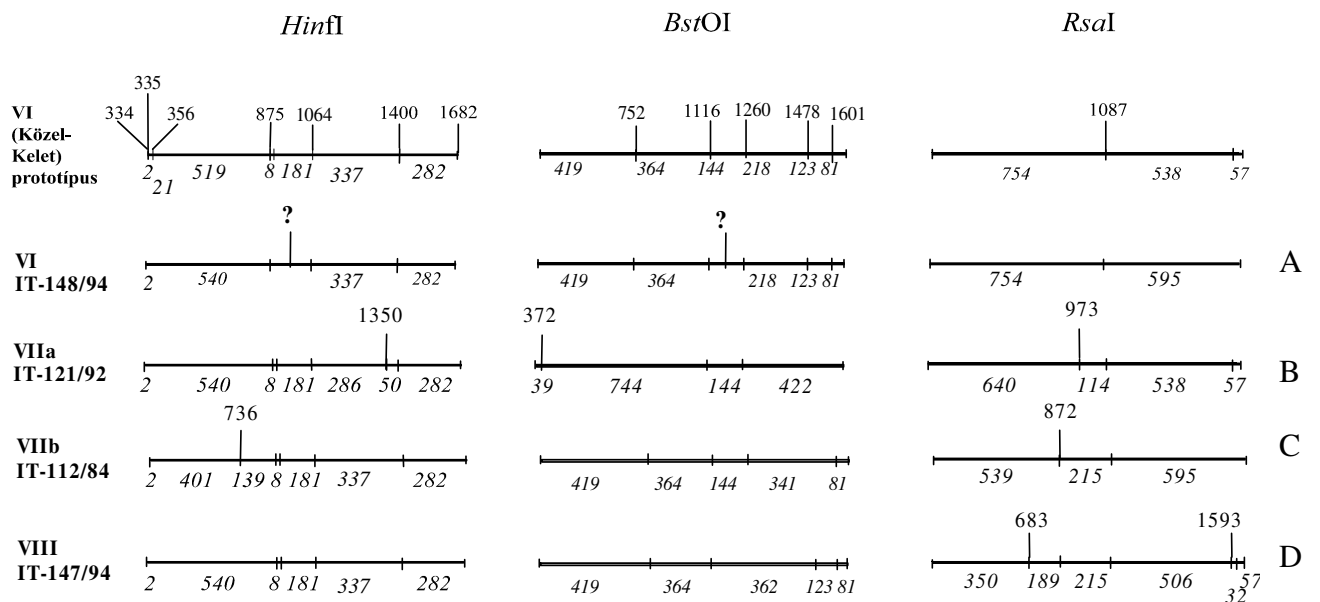
Az 1990-es évek olaszországi járványtörzseinek nagyfokú genetikai diverzitására jellemző, hogy az eddig ismertetett genotípusokon (VI, VIIa és VIIb) kívül, újabb RE vágáshely eloszlási típussal jellemzett törzs (IT-147/94) is előfordult az országban (13. ábra). Ennek, a VIII. genotípusnak a Dél-Afrikában lezajlott baromfipestis járványokban volt jelentősebb szerepe, ezért a részletesebb járványtani vonatkozásokat ott ismertetem.

13. ábra: Olaszországi VI-os genotípus reprezentánsainak RE hasítási képe és géntérképe



A, B, C és D a genotípusban talált RE-vágáshely variánsok csoportjait jelzi.

M az elektroforézisnél alkalmazott marker (100 bp. DNS létra) jele.



7. táblázat: Különböző genotípusok előfordulása az elmúlt évtizedekben

Ország	1960 előtt	1961-70		1971-80		1981-90		1991-2000	
		eleje	vége	eleje	vége	eleje	vége	eleje	vége
Olaszország	<u>IV</u>	<u>IV</u>	<u>IV</u>	IV	IV	IV			
				V	V		V	VIIa, VIa, VIII	VIIb
Bulgária	<u>IV</u>	II	<u>IV</u>	<u>IV</u>	II	<u>IV</u>			
			II	II	II	<u>IV</u>			
				<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	V		
					VIc		VIc	VIc	
Dél-Afrikai Köztársaság				VIa				VIIb	
				VIII				VIII	
Mozambik								VIIb	

Jelölések: aláhúzott betű = epidémia
normál betű = sporadikus előfordulás

A genotípusok feltételezett eredete:

II = Észak Amerika
IV = Európa
V = Dél és Közép Amerika
VI = Afrika
VIIa = Dél-Kelet Ázsia /India
VIIb = Dél-Afrika
VIII = Dél-Afrika

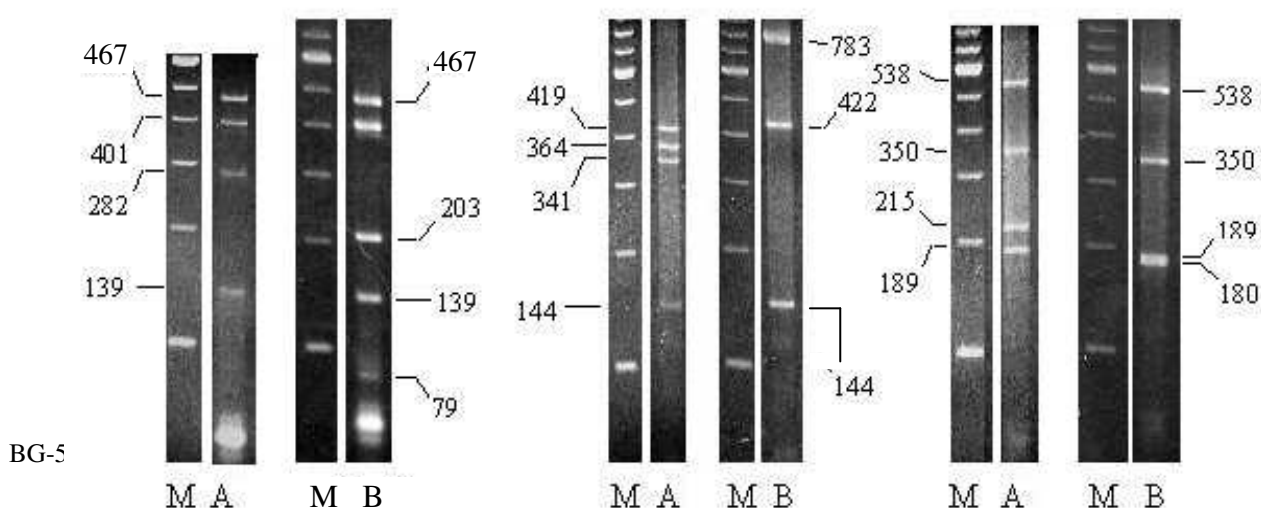
5.5.2. Egyes országok ND-járványai: Bulgária

A Bulgáriából származó törzsgyűjtemény az 1959-1995-ig terjedő időszakban lezajlott ND járványkitörések 35 izolátumát tartalmazta (8. táblázat). Az OIE adatok szerint a baromfipestis Bulgáriában az 1960-as években 1000-1500 járványkitörés/év gyakorisággal fordult elő az évtized közepéig. Az évtized végére évente már csak kb. 100 új kitörést jelentettek az országból (4. ábra).

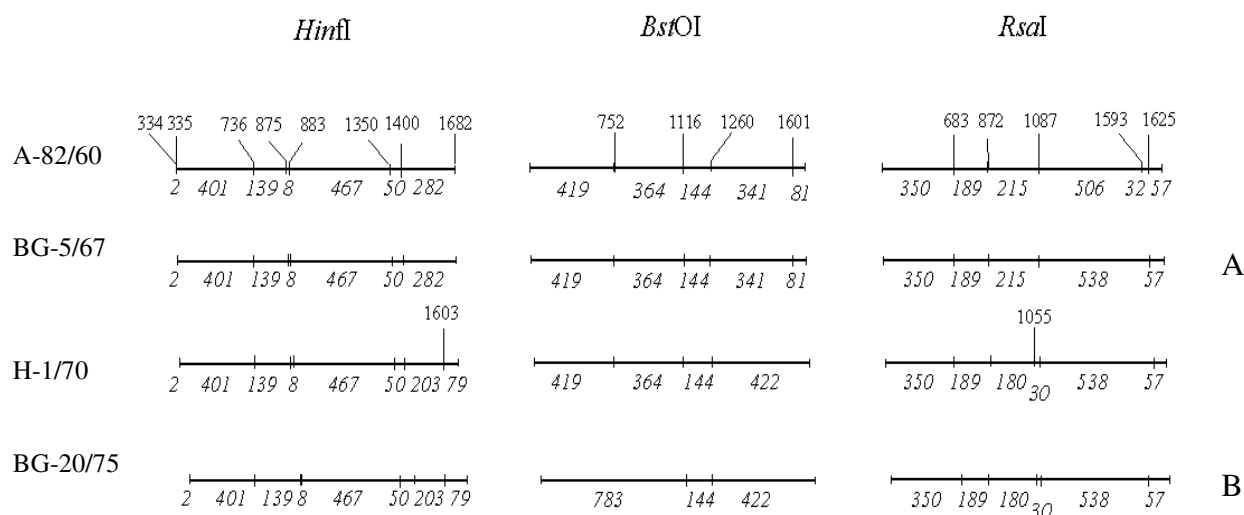
Az 1950-es évek végétől izolált vírusok két olyan genotípusba, a IV.-be és a II.-ba tartoztak, amelyekről előzetes vizsgálataink már jelezték, hogy az I. pandémia idején is előfordultak (Ballagi-Pordány és mtsai 1996) (14. és 15. ábrák).

RE-analízis szerint, a IV-es genotípusnak két variáns alcsoportja volt jelen Bulgáriában. Az izolátumok többsége - a IV-es genotípus egyik referencia vírusától, az Italien/45-től (lásd 10. ábra) eltérő (*Hinf*I 736, *Bst*OI 1260 megjelenése és *Rsa*I 1593 eltűnése miatt) vágáshely eloszlási képet mutatott. Ezt IV_a alcsoportnak (az ábrán A) jelöltük. Egy ausztriai izolátumtól (A/82/60), viszont csak egy vágáshely hiányával (*Rsa*I 1593) különböznek ezek a törzsek (Ballagi-Pordány és mtsai 1996) (14. ábra). A IV_b (az ábrán B) jelű alcsoportba sorolt bulgáriai törzsek további vágáshely variációkat (*Hinf*I 1603, *Rsa*I 1055 megjelenése és *Bst*OI 752, 1601 hiánya) mutatnak (14. ábra). Ezekhez a bulgáriai törzsekhez hasonló vírusokat Magyarországon is izoláltak az 1970-es évek elején (pl. HU-1/1970) (Ballagi-Pordány és mtsai 1996).

14. ábra: IV-es genotípusú bulgáriai törzsek RE hasítási képe és géntérképük



A és B a genotípusban talált RE-vágáshely variánsok csoportjait jelzi.
M az elektroforézisnél alkalmazott marker (100 bp. DNS létra) jele.



A bulgáriai IV-es genotípus mindkét RE-vágáshely alcsoportjából (IVa és IVb) egy-egy izolátum nukleinsav szekvenciáját (BG-5/67 és BG-20/75) hasonlítottam össze. Ez a két törzs 9,1%-os nukleotida eltérést mutat egymástól a vizsgált gén régióban. Tekintettel a kb. 1%/10 év számított evolúciós sebességre (Wehmann 2000), a 9,1%-os nukleotida-divergencia jóval hosszabb helyi evolúciós folyamatot feltételez mint az 1940-es évektől az izolálásig eltelt idő. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a IVa és IVb törzseket egymástól függetlenül hurcolták be 1940 után és ezek máshol divergáltak. Egy alternatív magyarázat az, hogy helyben evolválódtak: de ebben az esetben viszont az NDV már jóval 1940 előtt (ekkor állapították meg Bulgáriában) is jelen kellett, hogy legyen. Filogenetikai analízis szerint a bulgáriai IVa-hoz legközelebbi törzs a volt Szovjetunióból származik (SIMF 64) 4,0%-os genetikai távolsággal, míg a IVb alcsoportot képviselő törzshöz legközelebbi vírus egy magyarországi (HU-5/70) izolátum (4,8%-os divergencia) (16. ábra). Így hosszabb távú járványtani kapcsolat tételhető fel a volt Szovjetunió és Bulgária, (IVa) valamint Magyarország és Bulgária (IVb) között.

Korábbi vizsgálataink alapján úgy gondoltuk, hogy II-es genotípusú vírusok csak az USA-ban fordultak elő az 1960-as évek előtt (Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998). A bulgáriai gyűjteményben azonban több idetartozó vírustörzset is találtunk. A II-es genotípuson belül a BG-izolátumok a *Bst*OI 752 vágáshely megjelenése és *Rsa*I 1625 eltűnése miatt elkülöníthetők az amerikai NDV törzsektől (15. ábra). Régi USA beli vírusok bulgáriai előfordulása tulajdonképpen nem volt meglepő, mert az irodalom több országban is beszámolt un. amerikai típusú (*pneumoencephalitis*) ND esetek előfordulásáról. Pl. Nagy-Britanniában már a negyvenes évek végén (Reid 1961), de Németországban (Köhler 1953), Japánban (Watanabe 1952) és Magyarországon is (Sályi és mtsai 1955, Lomniczi és Derzsy 1964). A bulgáriai és

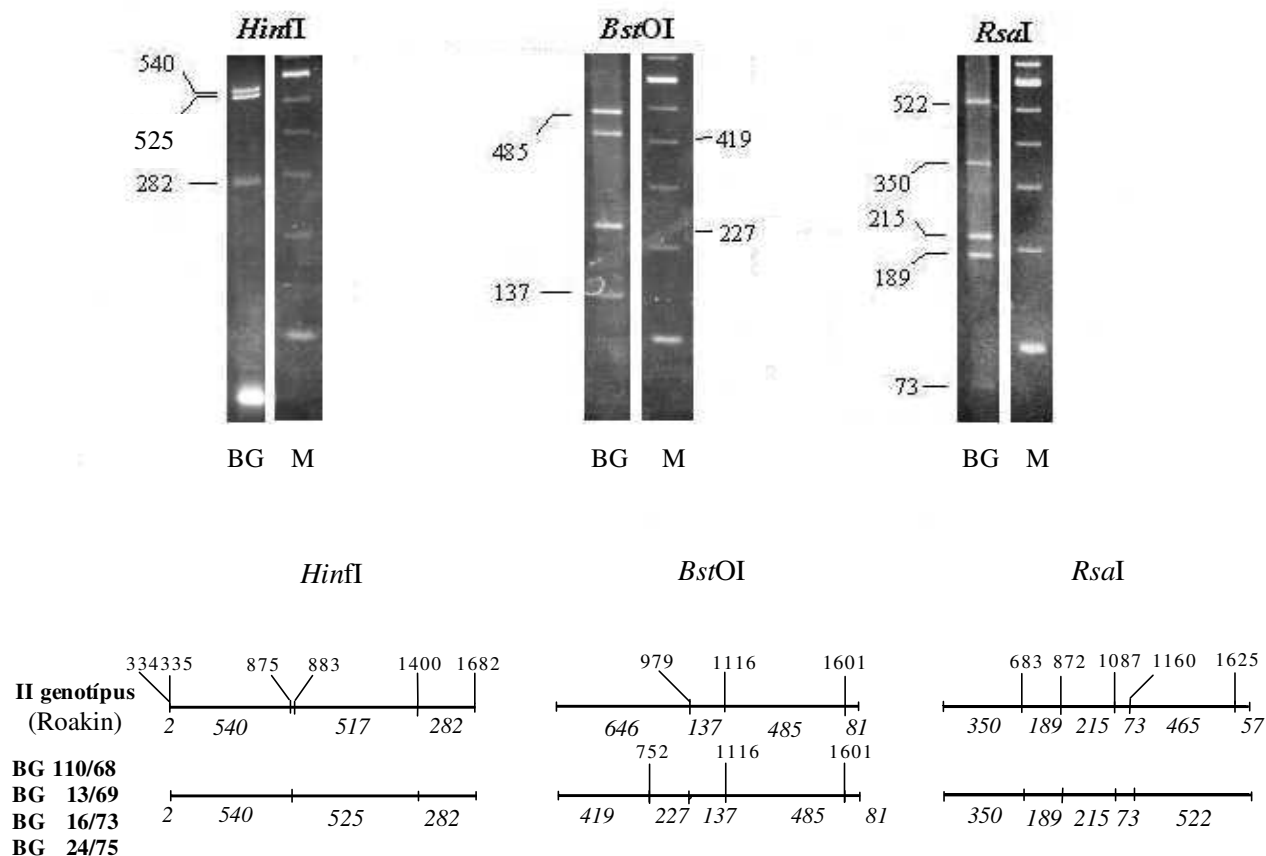
amerikai izolátumok közötti legkisebb genetikai távolság 1,9%, ami a vírustörzsek amerikai eredetére utal.

8. táblázat: Bulgáriai NDV törzsek származási adatai, genetikai csoportosításuk és génbanki sorszámaik

TÖRZS	IZOLÁLÁS Hely	GENETIKAI CSOPORT		
		RE-analízis	Szekvencia-analízis	Génbanki sorszám
BG-1/59	Plovdiv	IV		
BG-5/67	Vratza	IVa	IVa	AF402104
BG-110/68	Kurilo	II	II	
BG-6/68	Dubravite	IVa		
BG-7/68	Karashiaka	IVa		
BG-8/68	Haskovo	IVa		
BG-10/68	Krepost	IVa		
BG-83/68	Kardjali	IVa		
BG-13/69	Svetovrachane	Iib	II	AF402107
BG-85/69	Haskovo	IVa		
BG-11/69	Harmanli	IVa		
BG-15/70	Shiroka Poliana	IVa		
BG-14/70	Stochna Gara	IVb		
BG-16/73	Ivanovo	Iib	II	AF402112
BG-88/73	Boliarovo	Va	V	AF402113
BG-18/74	Nikolovo	IVb		
BG-17/74	Djebel	Vc	V	AF402115
BG-72/74	Sumen	VI		
BG-24/75	Bregovo	Iib	II	AF402119
BG-21/75	Prodopi	IVa		
BG-20/75	Malko Gradishte	IVb	IVa	AF402120
BG-92/77	Haskovo	IVa		
BG-90/77	Iatak	Vb	V	AF402122
BG-25/78	Septemvrijtzi	Ve	V	AF402123
BG-26/79	Jasen	Vd	V	AF402125
BG-95/80	Iskretz	Ve		
BG-101/82	Shishkovtzi	Ve		
BG-99/82	Mokresh	VIb		
BG-102/86	Mizia	Ve		
BG-29/86	Kozloduj	VIa	VI	AF402135
BG-104/88	Furen	Ve	V	AF402136
BG-105/92	Dolno Linevo	VIa	VI	AF402137
BG-48/95	Jasen	VIc		
BG-30/95	Stanevo	VI?	VIIIB	AF136781
BG-31/96	Popina	VI?	VIIIB	AF136782

A bulgáriai törzsek alacsony diverzitásából arra lehet következtetni, hogy a II-es genotípus ezen törzsei egyszeri behurcolással kerülhettek Bulgáriába.

15. ábra: II-es genotípusú bulgáriai törzsek RE hasítási képe és géntérképük



Magyarázat az ábrához: a II-es genotípus csoport-specifikus vágáshelyei (amerikai eredetű referencia vírus: *Roakin*) mellett az általam vizsgált bulgáriai törzsek hordoznak néhány differenciáló vágáshelyet.

Néhány esetben Magyarországon is izoláltak olyan törzseket, amelyeket II. genotípusnak azonosítottunk. Valószínűsíthető, hogy a hazai törzseket Bulgáriából hurcolták be, mert pl. a BG-16/73 és HU-35/79 jelű törzsek között nincs nukleinsav-eltérés a vizsgált génrégióban (*Wehmann 2000*). A vizsgálataink szolgáltatták az első etiológiai bizonyítékokat arra vonatkozóan, hogy II. genotípusú vírusok széleskörű terjedést mutattak az Amerikai Egyesült Államokon kívül is.

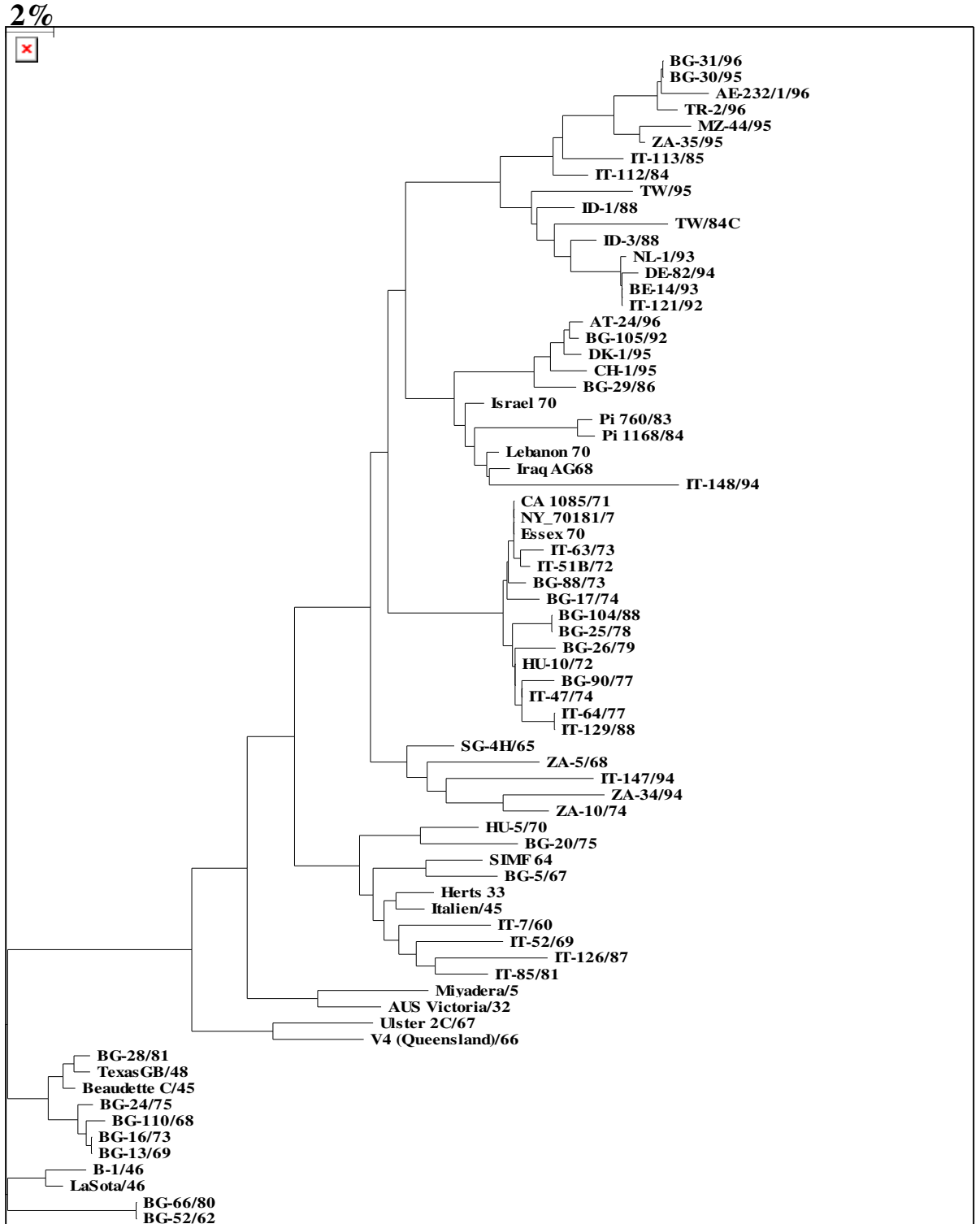
Az ND globálissá válása idején tehát két különböző kontinensen őshonos járványtörzsek leszármazottai, a IV-es és II-es genotípusú vírustörzsek voltak szinte egy időben jelen Bulgáriában (7. táblázat).

Az OIE adatok szerint az 1970-es évek elején egy Nyugat-Európából kiinduló járványhullám némi késéssel, 1974-ben érthette el Bulgáriát (4. ábra). Bár 1971- és 1972-ből nem rendelkezünk bulgáriai izolátummal a késés valószínűsíthető, mert a nyugat-európai országokban a vírus megjelenését általában 1-2 év múlva követte csak a járványcsúcs.

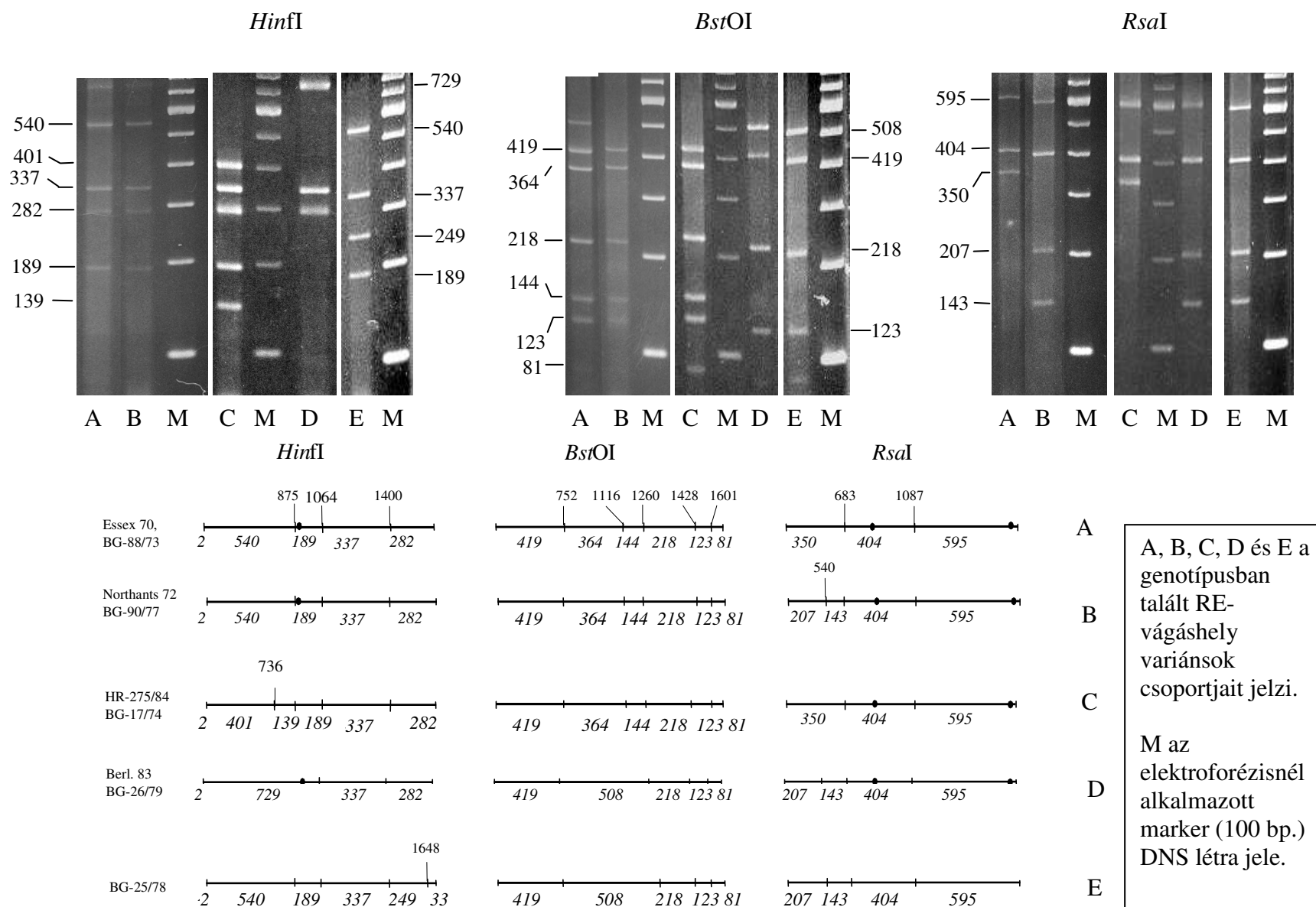
Az első V. genotípusú izolátum, a BG-88/73 jelű törzs RE analízissel azonos, szekvenálási adatok szerint pedig mindössze 0,8%-os távolságot mutat a legkorábbi európai V-ös genotípusú vírustól, az Essex-70-től (16. és 17. ábrák). Ez az olaszországi példához hasonlóan arra utal, hogy a bulgáriai járványvonulat sem közvetlenül az európai primer járványkitörésből, hanem másodlagos esetekből származó vírustörzsek behurcolásából ered. A BG-17/74 jelű vírus *HinfI* 736-os vágáshely megjelenésével különbözik az előző izolátumtól (17. ábra). Ezt a vágáshely eloszlási képet már Jugoszláviában izolált törzsben (HR/275/84) is láttuk, így feltételezhetjük, hogy a régióban elterjedt V-ös genotípus variáns-vírusról van szó (Wehmann 2000). A BG-88/73- és BG-17/74-jelű izolátumok az V-ös genotípuson belül közös oldalágban helyezkednek el a korai európai (angliai és olaszországi) vírus törzsekkel együtt (jelzésük a dendrogramon Va alcsoport) [16. ábra].

A BG-90/77 egy vágáshely megjelenésével (*RsaI* 540) különbözik az 1973-as első bulgáriai izolátumtól (BG-88/73) és az Angliában 1972-ben izolált Northants/72 jelű vírussal mutat azonos RE vágáshely eloszlási képet (17. ábra). A BG-26/79 egy újabb vágáshely variáns: ilyen RE hasítási képű vírusok csak a korábbi NDK-ban fordultak elő (pl. Berl./83) (17. ábra). Utóbbi két bulgáriai izolátum az V-ös genotípus másik oldalágán helyezkedik el és az Vb alcsoportot alkotja. A genotípus leggyakoribb bulgáriai képviselői (pl. BG-25/78) 1978-1988 között fordultak elő az országban. Az összes többi helyi variánstól a *HinfI* 1648 vágáshely megjelenésében és *BstOI* 1116 megszűnésében különböznek. Ezek a variánsok nem fordultak elő sem a környező országokban (Magyarország, Jugoszlávia, Olaszország) sem pedig távolabb [pl. Németország] (Wehmann 2000, Herczeg és mtsai 2001). Ezek a vírusok az Vb alcsoport oldalágán azoktól ~ 2,5% genetikai távolságban helyezkednek el (16. ábra), ezért az Vb1 alcsoport jelzést kapták (Czeplédi kéziratban). Egyébként a bulgáriai V-ös genotípuson belül viszonylag alacsony a genetikai diverzitás (<2,5%), ami a genotípus Bulgáriában való gyors szétterjedésére utal, ahogy ez más országokban is történt. Egyes alcsoportok különböző országokban izolált azonos tagjai az ezen országok közötti járványtani kapcsolatra hívják fel a figyelmet (16. ábra).

16. ábra: A bulgáriai NDV törzsek 5 genotípushoz tartoznak



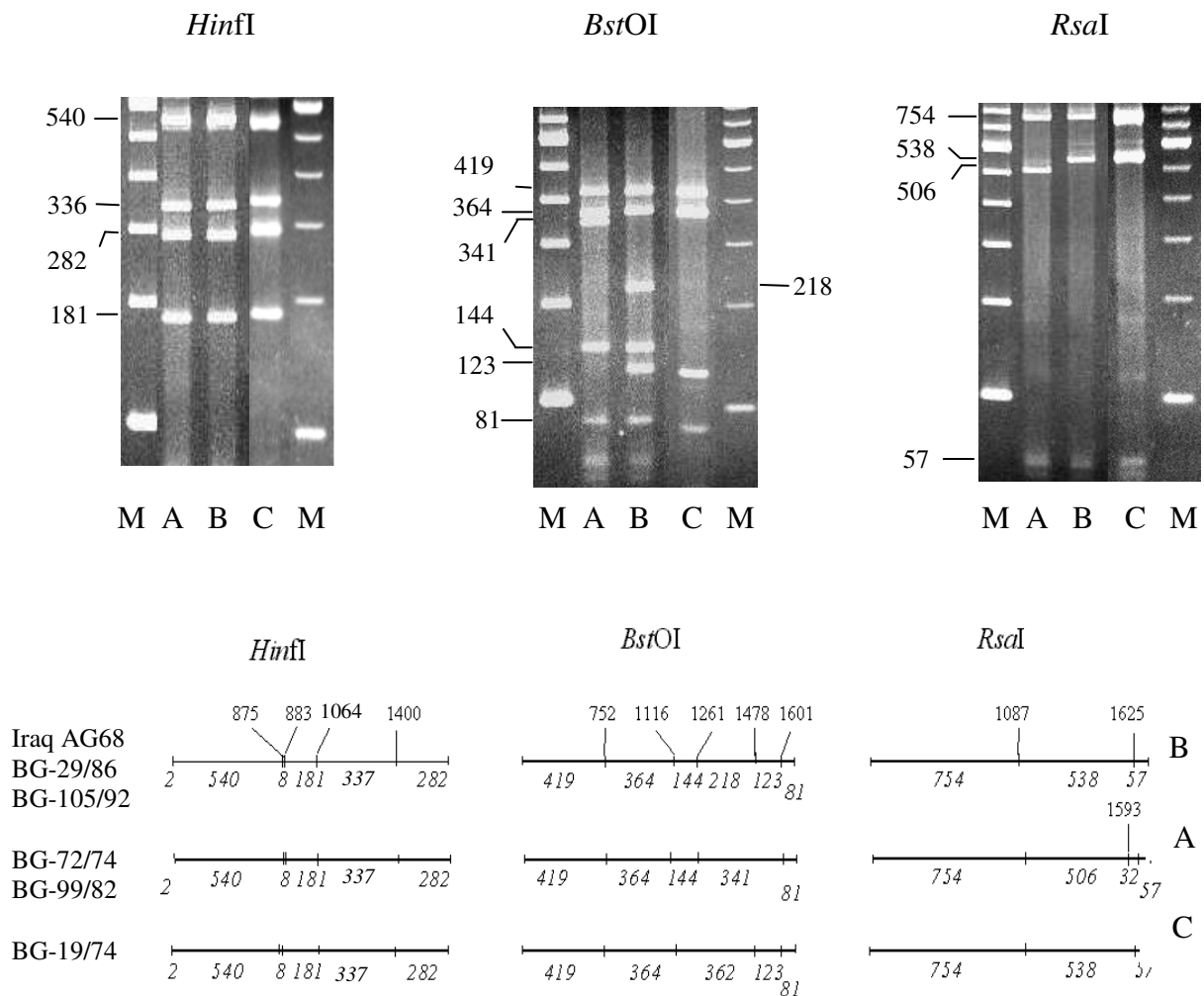
17. ábra: V-ös genotípusú bulgáriai törzsek RE hasítási képe és géntérképük



A II. világhárvány idején felbukkant VI-os genotípusnak csak néhány tagja állt rendelkezésre Bulgáriából, de ezek izolálási dátumai majdnem két évtizedet ölelnek fel (8. táblázat). RE vágáshely analízissel három-féle vágáshely eloszlási képet mutattak ezek a vírusok (18. ábra). A BG-29/86 és BG-105/92 törzsek megegyeznek az 1960-as évek végi közel-keleti járványokból származó izolátumokkal pl. Iraq AG-68, Kuwait 256. Az előzőektől két vágáshely eltéréssel rendelkeztek a BG-72/74- és BG-99/82-jelű izolátumok. A harmadik RE vágáshely variáns a BG-19/74 (18. ábra).

A VI-os genotípusú és azonos RE hasítási képpel rendelkező közel-keleti és magyarországi törzsek filogenetikai analízise mindössze 3-4%-os nukleinsav divergenciát tárt fel ami a megelőző évtizedekben fennállt járványtani kapcsolatra utal (Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998).

18. ábra: VI-os genotípusú bulgáriai törzsek RE hasítási képe és géntérképük



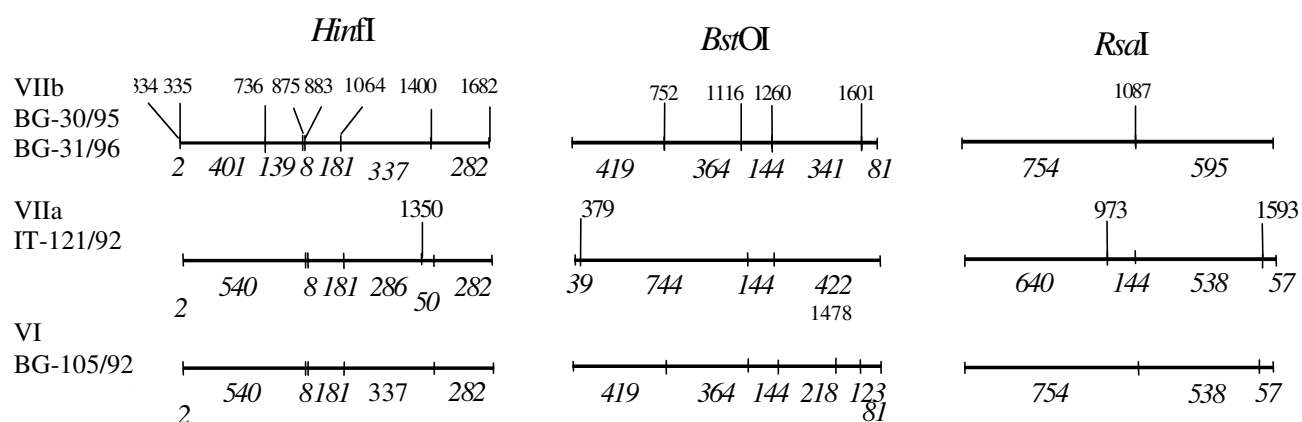
A, B és C a genotípusban talált RE-vágáshely variánsok csoportjait jelzi.

M az elektroforézisnél alkalmazott marker (100 bp. DNS létra) jele.

Korábbi vizsgálataink során az 1960-as évek végéről származó közel-keleti vírusokat a VIa, a galamb eredetű izolátumokat pedig a VIb alcsoportba soroltuk (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*). Most a bulgáriai törzsek filogenetikai analízise során azt láttuk, hogy a BG-29/86 és BG-105/92-jelű jelű izolátumok nem a VIa alcsoportba tartoznak. Mindkét vírustörzs inkább az 1980-as években Magyarországon izolált vírusokkal (pl. HU-386/85) (*Czeglédi kéziratban*), és a Nyugat-Európában, az 1990-es évek második felében megjelent járványtörzsekkel (pl. AT-24/96) áll közelebbi rokonságban (a mutációs távolság 0,8%). A BG-105/92 törzsszel identikus magyarországi izolátumot is találtunk (*Wehmann 2000*). Ezek az adatok közvetlen járványtani kapcsolatot jeleznek az 1990-es évek bulgáriai, magyarországi és nyugat-európai VI-os genotípusú törzsek által okozott járványok között. Ezeket a vírusokat tartalmazó kádot a VIc-ként tartjuk nyilván (*Czeglédi kéziratban*).

Az 1990-es évek közepétől újabb genotípus, a VIIb jelent meg Bulgáriában. Ezek a vírusok (BG-30/95, BG-31/96) a VI-os genotípustól a *HinfI* 736-os vágáshely megjelenésében, valamint az *RsaI* 1625 és *BstOI* 1478 vágáshely eltűnésében különböznek (19. ábra).

19. ábra: A VIIb genotípusú bulgáriai törzsek RE hasítási képe és géntérképei



Ábramagyarázat: Az ábra az 1990-es évek elején Európa egyes országaiban (IT, BE, DE, NL) előforduló VIIa genotípus és a Bulgáriában megjelent VIIb törzsek géntérképei közötti különbségeket mutatja.

A VIIb genotípusú bulgáriai izolátumok a szekvencia-analízis szerint is a közel-keleti (Törökország, Egyesült Arab Emírátságok) VIIb vírusokkal állnak közelebbi rokonságban (0,8-2,7% divergencia). Ugyanakkor a 3,5-5,1%-os genetikai távolság révén kizárható a közvetlen járványtani kapcsolat az azonos időben Dél-Afrikában zajló baromfipestis járvánnyal (16. ábra).

5.5.3. Egyes országok ND-járványai: a dél-afrikai régió

Több mint három évtizedet átfogó dél-afrikai és mozambiki NDV törzsgyűjtemény restriktív vágáshely analízissel végzett vizsgálatakor az izolátumok két fragmentum-eloszlási képet mutattak: A- és B-jelűeket (20. ábra). Az A-jelű csoport vírusait 1968 és 1995 között, a B-jelűét pedig az 1990-es években zajló járványokból gyűjtötték. Már a RE-analízis is máshol még ismeretlen, új genotípusok jelenlétére utalt. Miután a filogenetikai értékelés megállapította, hogy a törzsek zöme (a B-fazonúak) a korábban jellemzett VII. genotípusba tartozik, azonban a nyugat-európai járványkitörésből jelentős genetikai távolságban vannak (>8%), a távol-keleti és európai törzsek kádját VIIa-nak, a dél-afrikaiakat pedig VIIb-nek neveztük el (21. ábra). Dél-Afrikai törzsgyűjtemény filogenetikai analízisét az F gén variábilis (47.-435. nt.) és konzervatív (1140.-1503.nt.) génrégióján (5. és 6. ábrák), valamint a két szakasz kombinálásával létrejött 736 nt. hosszúságú szakaszon egyaránt elvégeztük. (21. ábra).

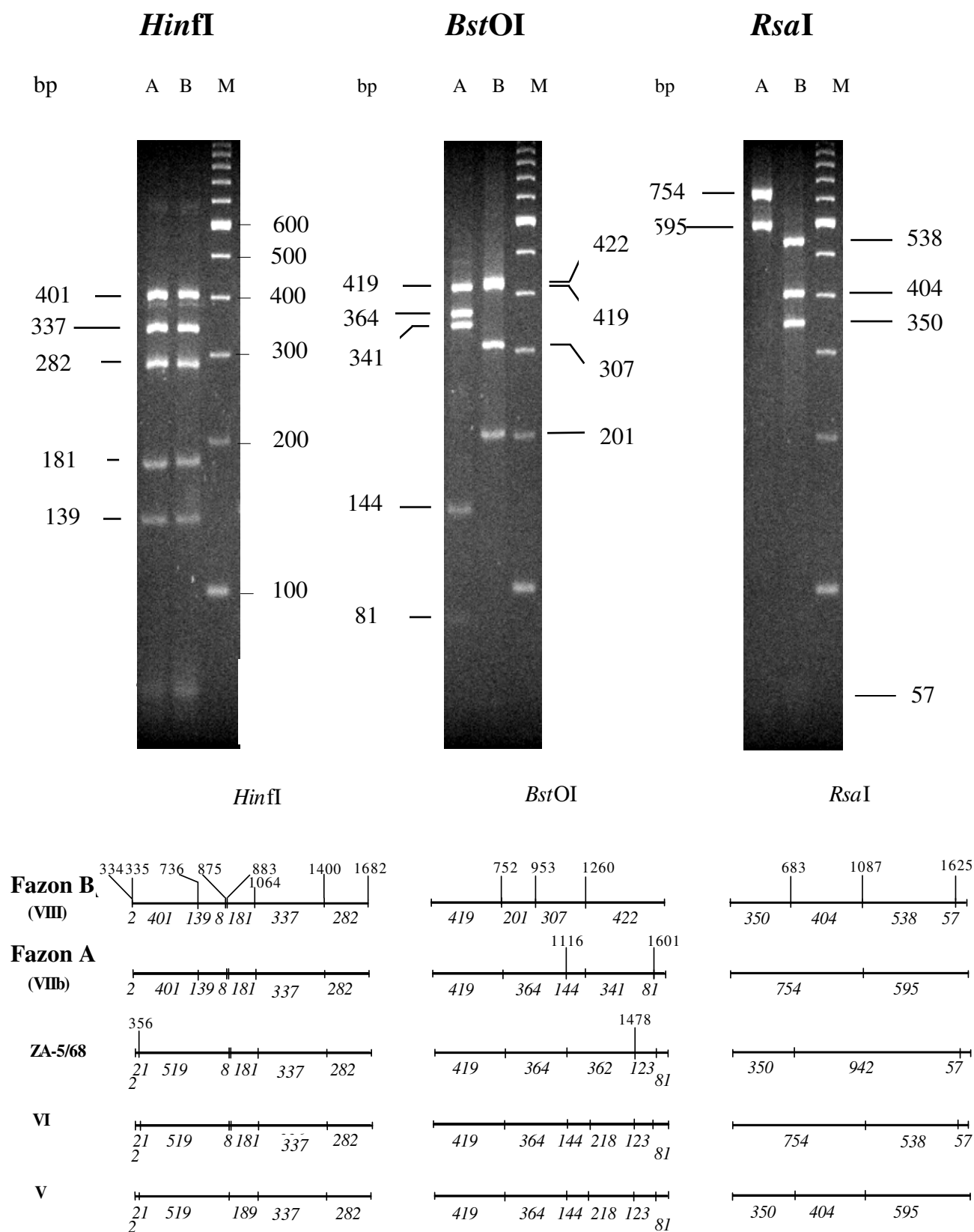
A helyi izolátumok alacsony divergenciája (<2%) összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy ezt a csoportot nem túl régen hurcolták be, ezt követően azonban a járvány epizootiás jelleget mutat. A 21. ábrán látható, hogy a VIIa és VIIb leszármazását tekintve közös eredetű. A földrajzilag is meghatározott két nagy ág 6,4-9,1%-os mutációs távolsága évtizedekkel korábban történt szétválásra utal. Mivel a távol-keleti törzsek divergenciája jóval nagyobb a VIIb törzsekénél (pl. *Yang és mtsai 1999*), igen valószínű, hogy a VII-es törzsek "őshazája" a Távol-Kelet volt és onnan kerültek a törzsek Dél-Afrikába, ahogyan újabban a Közel-Keletre is. Nukleinsav divergencia adatokra és a törzsfá ágszerkezetére támaszkodva azonban kizárható a közvetlen járványtani kapcsolat az 1990-es években zajló VIIa genotípusú nyugat-európai és VIIb genotípusú dél-afrikai járványok között. A VIIb vírusok szóródására utal, hogy Dél-Afrikai mellett a Közel-Keleten [Törökország (TR-2/96), Egyesült Arab Emírátság (AE-232/1/96)] és Európában elsőként Olaszországban (IT-112/84), majd Bulgáriában (BG-30/95) találtunk VIIb genotípusú vírusokat (11. ábra).

Még nagyobb genetikai távolságra kerültek az A-vágáshely fazonú törzsek, ezért ezek a VIII. genotípus jelölést kapták. E törzsek különállását valójában a vágáshelyekkel kimutatható eltérések már nem érzékeltetik, ezért ezek csak szekvencia-vizsgálattal jellemezhetők. A VIII-as genotípusú törzsek között meglehetősen nagy (akár 5% is lehet) a nukleinsav divergencia. Az 1990-es évek izolátumai egy közeli csomópontba tartozva igen közeli rokonságban állnak egymással (0,0-0,8%), míg az 1968-ból és 1970-ből származó törzsek jóval korábbi leágazási pontok révén állnak kapcsolatban mind egymással, mind a jelenkori törzsekkel (mutációs távolságuk 4,8-5,1%).

9.táblázat: . Dél-afrikai és mozambiki NDV törzsek és szekvenciák

NDV törzsek jelölése		Génbanki sorszám	Genetikai csoportosítás	
Saját	Eredeti		Restrikciós Enzim	Szekvenálás
ZA-5/68	163	AF136762	VI variáns ?	VIII
ZA-10/74	LeMay	AF136763	VI variáns?	VIII
ZA-11/74	Bosch		VI variáns ?	
ZA-16/90	746	AF136764	A	VIII
ZA-17/90	770	AF136765	A	VIII
ZA-18/90	778	AF136766	A	VIII
ZA-20/93	C1211	AF136767	B	VIIb
ZA-24/93	C1528		B	
ZA-25/93	C1537	AF136768	B	VIIb
ZA-26/93	C1642	AF136769	B	VIIb
ZA-28/93	C1776		B	
ZA-29/93	C1828	AF136770	B	VIIb
ZA-31/93	C2040		B	
ZA-32/93	C2041	AF136771	B	VIIb
ZA-33/94	R296/1/94	AF136772	B	VIIb
ZA-34/94	R297/1/94	AF136773	A	VIII
ZA-35/95	550	AF136774	B	VIIb
MZ-22/94	124 (02.)		B	
MZ-23/94	221 (03.)		B	
MZ-5/94	276 (05.)		B	
MZ-9/94	393 (07.)		B	
MZ-13/94	603 (08.)	AF136775	B	VIIb
MZ-20/94	987 (09.)		B	
MZ-11/94	862 (10.)		B	
MZ-35/95	524 (06.)	AF136776		VIIb
MZ-44/95	659 (07.)	AF136777		VIIb
MZ-46/95	678 (08.)	AF136778	B	VIIb
MZ-48/95	688 (08.)	AF136779	B	VIIb
MZ-50/95	704 (08.)	AF136780		VIIb

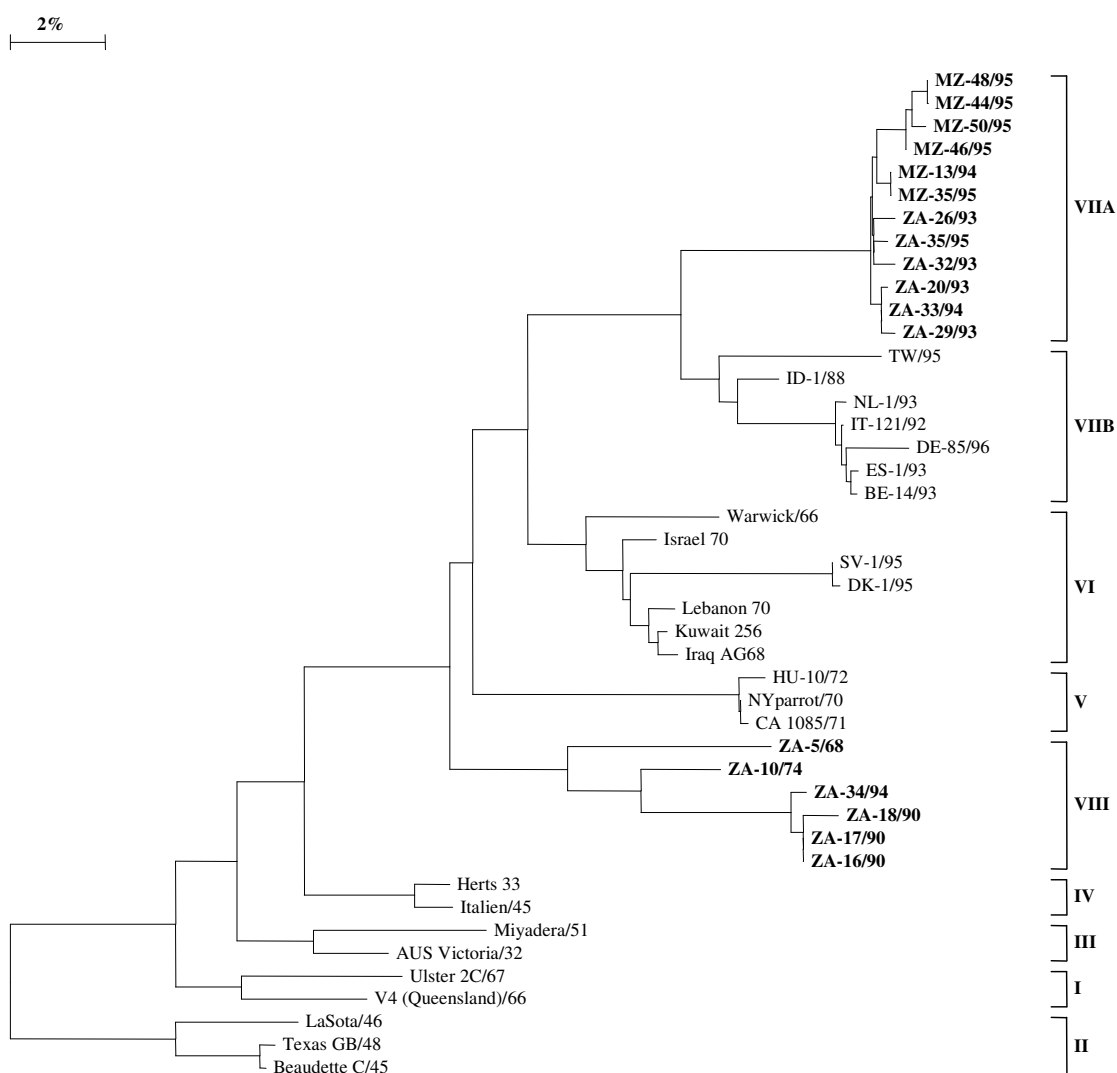
20. ábra: A dél-afrikai A- és B-jelű víruscsoportok RE futtatási képe és géntérképeik más genotípusokkal összehasonlítva.



Ábramagyarázat: Az A- és B-jelű dél-afrikai izolátumok két *Bst*OI és két *Rsa*I vágáshelynél különböznek. Más vágáshely-kombinációban van eltérés az előbbieket és az V. és VI. genotípus között.

Szekvencia-analízissel az F -gén konzervatív és variábilis régióján egyaránt találtam olyan *shared derived* jegyeknek megfelelő aminosav pozíciókat, amik a VIII-as genotípusú dél-afrikai vírusok közös eredetére, valamint több évtizedes helyi evolúciójára utalnak (5. táblázat és 21. ábra). Ezek az adatok alátámasztják azt az elgondolást, hogy ezek tekinthetők Dél-Afrika "őshonos" NDV törzseinek, jóllehet nekünk a több évtizedre visszanyúló endémiás fertőzésből csak néhány képviselőt volt módunk vizsgálni.

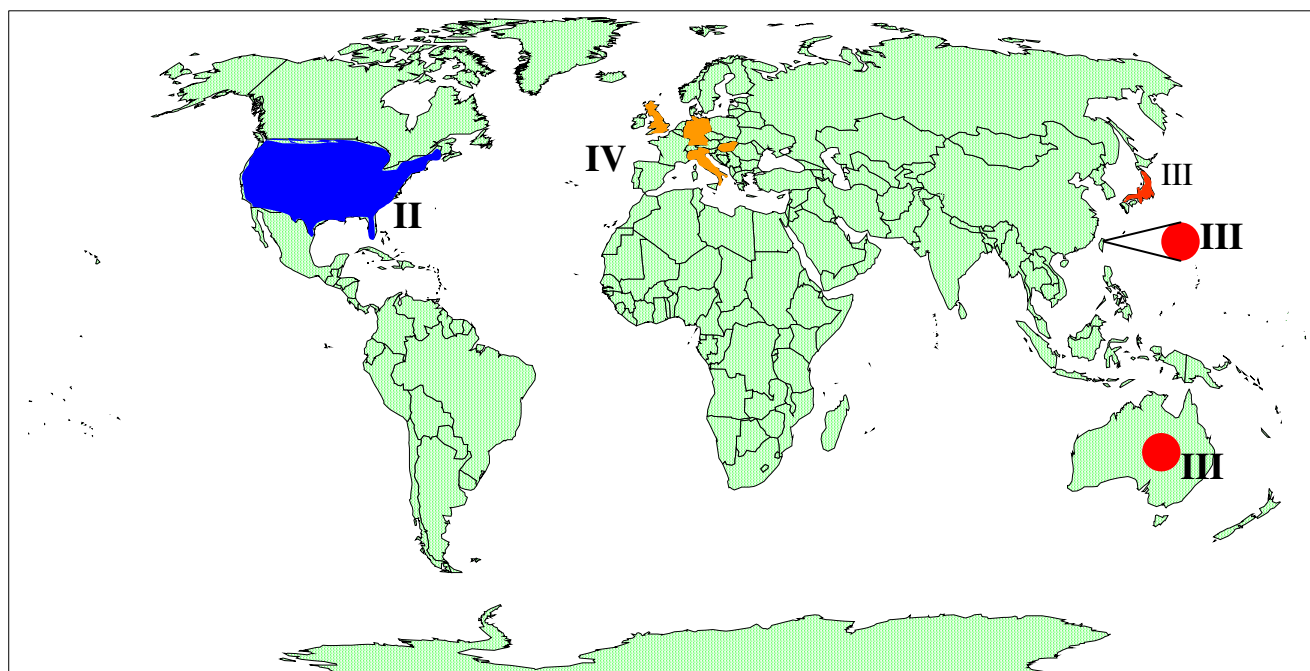
21. ábra: I-VIII-as NDV genotípusok filogenetikai viszonya az F gén variábilis + konzervatív régiói szekvenciáinak kombinálásával vizsgálva



5.6. A vilájjárványok összetettsége

Vizsgálataim során számos járványvonalat vírustörzseit jellemeztem (azonosítottam), amik a világ különböző területeiről és eltérő időszakokból származtak. Mivel a vizsgált vírustörzsek az irodalomban leírt mindkét pandémia járványainak egy részét reprezentálják megpróbáltuk rekonstruálni az elmúlt kb. hat évtized alatt fellépett nagyobb járványok mozgását, fontosabb történéseit. Ezzel kapcsolatban a legfontosabb megállapításunk az volt, hogy mindkét időszakban egymással rokonságban nem lévő és földrajzilag meghatározott helyen előforduló genotípusok (*topotípusok*) okoztak járványokat, valójában pandémiákról (ahol egyetlen vírustípus terjed el) nem is beszélhetünk.

5.6.1. Az ND járványok földrajzi megoszlása a baromfipestis globálissá válása idején (1. kép)



Az I. pandémia idején (kb. 1930-1960) legalább három földrajzilag elhatárolt genotípus (*topotípus*) tartott fenn egymással átviteli kapcsolatban nem levő járványokat. Egységes pandémia képét inkább időbeli egybeesésük kelthette, mert az egységes etiológia kérdése még csak fel sem merülhet. Helyesebb a baromfipestis globálissá válásáról beszélni, aminek a csirketartás iparszerűvé válásán, a nemzetközi forgalom növekedésén, a diagnosztikai módszerek fejlődésén át számos oka lehet.

A baromfipestis globálissá válásának idejéből fennmaradt távol-keleti izolátumok (AUS Victoria/1932 és Miyadera/1951) a III-as genotípusba tartoznak (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*). Az 1920-as évek végétől megjelent járványtani leírások alapján a III-as genotípus jóval nagyobb kiterjedtséget érhetett el Dél-Kelet-Ázsiában, de ebből az időből nem

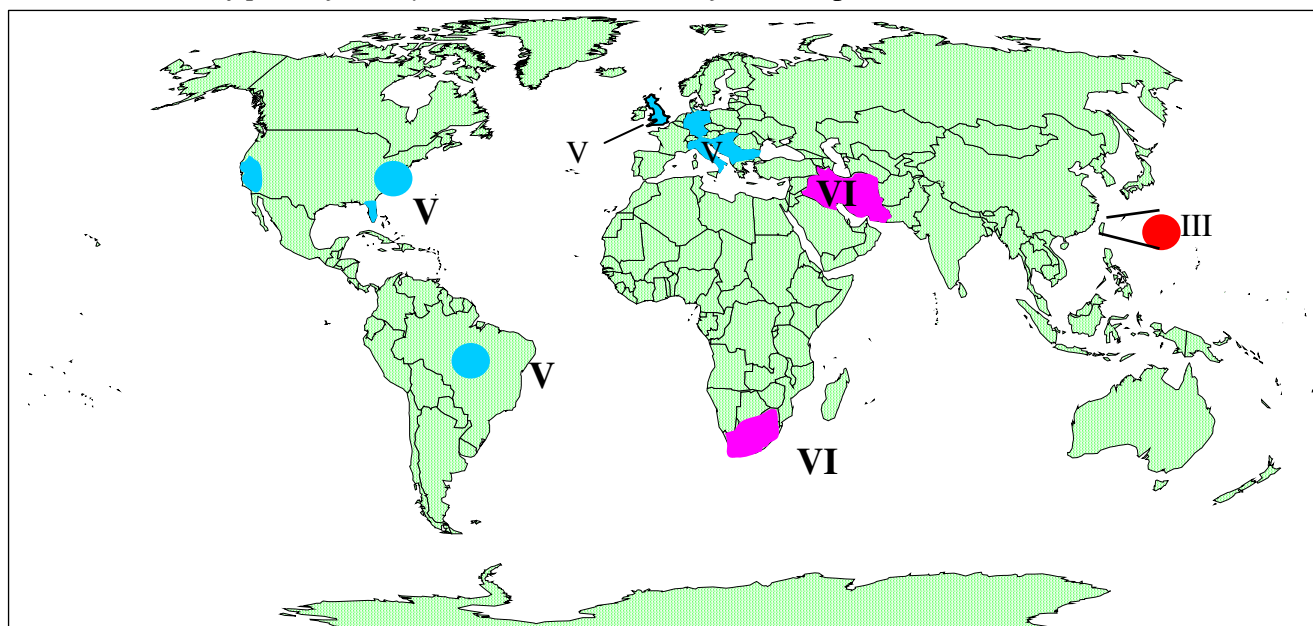
rendelkezőnk további, a retrospektív vizsgálatot lehetővé tevő izolátummal. Mégis a fentiek alapján korai dél-kelet-ázsiai topotípusnak tekinthetjük, mivel más kontinensen, jelen ismereteink szerint, nem fordult elő. Hogy a feltételezés helytálló volt bizonyítja az, hogy a III-as genotípusú NDV törzsek az 1960-as évek végén és az 1990-es évek közepén is felbukkantak Taiwanon (*Yang és mtsai 1999, Ke és mtsai 2001*). Hat évtizedes folyamatos előfordulás a III-as genotípus dél-kelet-ázsiai eredete és őshonossága mellett szól.

Az európai térhódítás korai időszakából is maradtak fenn NDV törzsek:

Angliából a Herts/33 és olaszországi eredetű csirkékből az Italien/45. Ezeket a IV-es genotípusba soroltuk. Ilyen vírusokat még az 1970-es években is lehetett Európában izolálni, más kontinensen azonban ilyen törzseket eddig nem találtunk. Ezért a IV-es genotípust korai európai topotípusnak tekintjük. A IV-es genotípusú törzsek korai európai előfordulása és őshonossága mellett szól az is, hogy Olaszországban és Bulgáriában az 1970-es évek előtt ezek domináltak, az 1960-as évekre már több évtizedes evolúciót feltételező, terület (ország)-specifikus genetikai vonalak alakultak ki. Bár utoljára az 1980-as években fordultak elő, nem biztos, hogy „kihaltak”.

Észak-Amerikában az 1960-as évek előtt a II-es genotípusba sorolt vírusok terjedtek el. A II-es genotípus különlegessége, hogy itt különböző pathotípusok (lentogen, mesogen, velogen) alakultak ki jelentősebb genetikai divergencia nélkül. Észak-Amerikában az ND felszámolásával az észak-amerikai topotípus virulens törzsei bizonyára kihaltak tekinthetők, de nincs kizárva, hogy máshol még fennmaradtak hiszen éppen hazánkban izoláltak még 1984-ben is ilyen törzset (*Erdei és mtsai 1992, Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998*).

5.6.2. Baromfipestis járványok az 1970-es évek elején (2. kép)



Az 1960-as években már súlyos baromfipestis járványok dúltak a Közel-Keleten és Európában is (*OIE* adatok). Az évtized közepétől Angliában (Warwick/66), végétől a Közel-Keleten (pl. Iraq AG68), Dél-Afrikai Köztársaságban (pl. ZA-4/68) és Görögországban (Greece 68) a baromfipestis korábbi járványtól független eredetű, VI-os genotípusú vírusok voltak jelen.

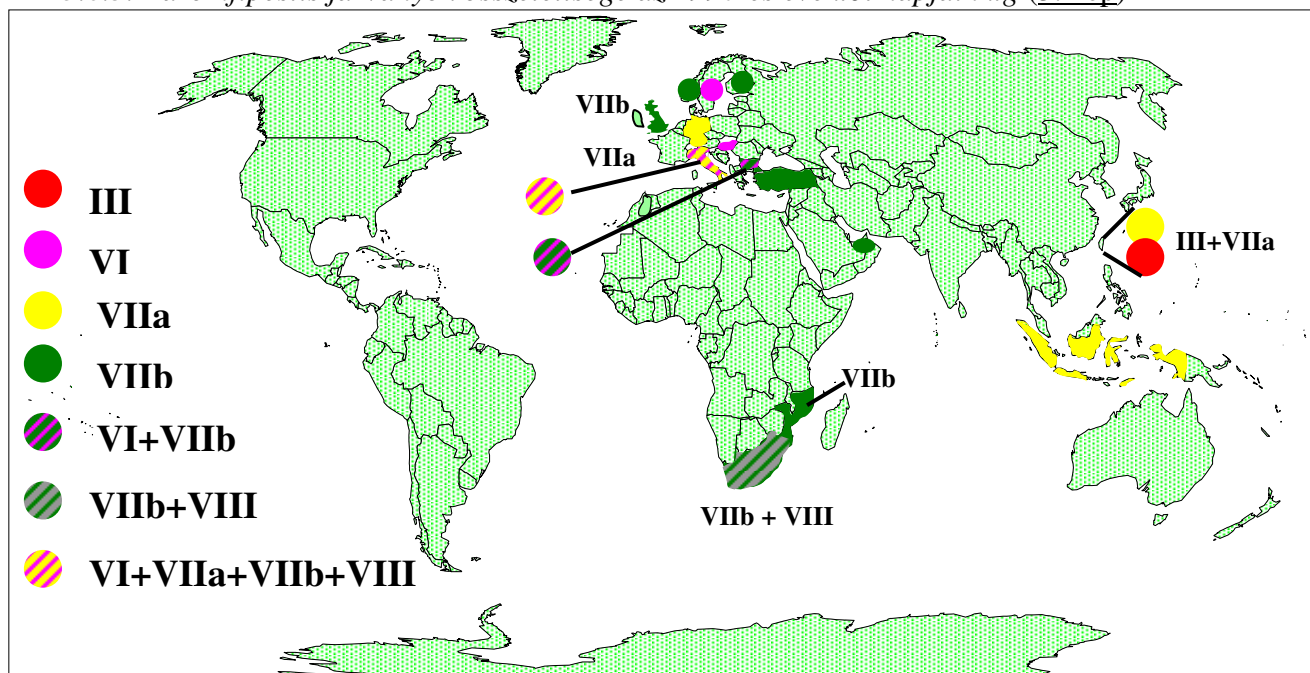
Szudánban az 1970-es évek közepétől biztosan jelen voltak VI-os genotípusú törzsek, de közvetlen járványtani kapcsolatot kizáró genetikai távolságban a VIa reprezentánsaitól (*Szamkó 2000*). Hong Kongban (HK-6/75) és Dél-Kínában (CN-26/76) is biztosan előfordult a VI-os genotípus a 1970-es évek közepén (*Herczeg* nem publikált RE eredmények és *Szamkó 2000*), de az előző vírusoktól a közvetlen járványtani kapcsolatot kizáró genetikai távolságban.

Angliában épphogy sikerült felszámolni az ND-t az 1960-as évek végére, 1970-től újra az ND kitörések növekedését regisztrálták. Ezeket a korábbiaktól járványtanilag független, Dél- és Közép-Amerikából papagájokkal behurcolt V-ös genotípusú törzsek (pl. Essex-70) idézték elő. A kontinentális Európában szintén már 1970-ben észlelték az ND megjelenését, majd nyugatról kelet-, dél-kelet irányba való terjedését (a járványcsúcsok alakulása: 1971 Anglia, 1971-1972 NSZK és Franciaország, 1972-1973 Olaszország, 1973 Csehszlovákia, 1974-1975 Bulgária) [4. ábra].

A díszmadár kereskedelem révén 1971-ben az USA-ba is behurcolták Dél- és Közép-Amerikából a baromfipestist. New Yorkban (NY/parrot/70) karanténban tartott papagájokból izoláltak V-ös genotípusú NDV-t, de csak Kaliforniában okozott járványt csirkék között (US(Ca)-1085/71).

Taiwanon az 1960-as évek végén (TW/69) és az 1990-es években (TW/95-3) jelen voltak III-as genotípusú törzsek (*Yang és mtsai 1999, Ke és mtsai 2001*).

5.6.3. Baromfipestis járványok összetettsége az 1990-es évektől napjainkig (3. kép)



Az 1980-as évektől Európában három különböző genotípusú NDV törzs okozott egymástól etiológiailag független járványkitöréseket. Kelet- és Közép-Európában VI-os genotípusú NDV jelent meg, majd egyes országokban (pl. Bulgária és Magyarország) évtizedes endémia formájában maradt fenn. Ennek a genotípusnak további, egymástól is független alcsoportjai okoztak sporadikus járványkitöréseket Nyugat-Európában és Olaszországban, az 1990-es évek közepén (*Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 2001*).

Az 1990-es évek elején egyes nyugat-európai országokban VIIa genotípusú NDV törzsek okoztak járványkitöréseket. Indonéziai izolátumok vizsgálatával a VIIa genotípus távol-keleti eredetére lehetett következtetni (*Lomniczi és mtsai 1998*).

Norvégiában, Finnországban, Angliában és Észak-Írországban az évtized második felében VIIb genotípusú vírustörzsek fordultak elő (*Alexander és mtsai 1999*). A VIIb genotípus megtalálható volt még Törökországban és az Egyesült Arab Emírátsok területén is, ami ezek közép-keleti eredetére utal (*Herczeg és mtsai 1999*). Egyes országokban egyidejűleg több genotípushoz tartozó törzsek is jelen voltak (pl. Olaszországban 4, Bulgáriában 2). Epidemiológiailag független VIIb genotípusú ND járványok zajlottak szinte egy időben Európában és Dél-Afrikában. Mozambikban csak VIIb, a Dél-Afrikai köztársaságban viszont VIIb és VIII-as genotípusok egyaránt előfordultak (*Herczeg és mtsai 1999*).

Taiwanon a III-as mellett, a VIIa genotípusú törzsek is okoztak járványokat az 1990-es években (*Yang és mtsai 1999*).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Az F gén RE-vágáshely eloszlásának és egyik variábilis régiójának (a 47-435 nukleotida közötti szakasz) szekvenálását követő filogenetikai analízisével az NDV törzseket nyolc (I-VIII-jelű) genotípusba, ezeken belül altípusokba soroltuk és jellemeztük ezek földrajzi, időbeli és epidemiológiai hovatartozását. Közülük öt genotípust (V, VI, VIIa, VIIb, VIII) mi írtunk le, az I.-IV. csoportok meghatározottságát pedig definiáltuk (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Lomniczi és mtsai 1998, Herczeg és mtsai 1999, Herczeg és mtsai 2001*).
2. A RE-vágáshely-analízis (az F gén 75%-a 3 RE-mel vizsgálva) önmagában is alkalmas olyan NDV csoportok felismerésére és differenciálására, amelyek tér- és/vagy időbelileg meghatározottak. Mivel azonban a vágáshely-analízis nem kvantitatív módszer, a csoportokat jellemző vágáshelyek számának különbségei nincsenek korrelációban a mutációs távolsággal. Így fordulhat elő, hogy azonos fizikai térképet mutató vírustörzsek között járványtani szempontból már jelentős (2-4%) nukleotida-szekvencia eltérés is lehet.
3. A szekvencia-adatok alapján álló távolság-analízis egyaránt alkalmas genotípusok, szubtípusok és egyedi vírustörzsek azonosítására, következésképpen makro- és mikrojárványok nyomkövetésére. Az NDV F-gén variábilisabbnak és konzervatívabbnak tartott génrégióinak szekvencia-analízise, külön-külön és kombinálva, nagyon hasonló ágstruktúrájú dendrogrammokat eredményez. A variábilisabb régió szekvencia-adatai legfeljebb 1-2%-kal magasabb genetikai különbséget tárnak fel az izolátumok között.
4. Igazoltuk, hogy az 1990-es évek elejétől jelentkező nyugat-európai ND-járványokat két különböző genotípusba (VI és VII) tartozó NDV törzsek idézték elő és hogy a VII-es (később VIIa) genotípus távol-keleti eredetű (*Lomniczi és mtsai 1998*).
5. Bebizonyítottuk, hogy az időben egybeeső (1990-es évek) dél-afrikai (VIIb) és európai (VIIa) ND-járványok között annak ellenére nem volt járványtani kapcsolat, hogy a VIIb típusú vírusok szintén távol-keleti leszármazásúak. Megállapítottuk, hogy a dél-afrikai járvány sem volt etiológiailag egységes: az epidémiát okozó VIIb törzsek mellett, ezektől járványtanilag független, ott őshonos, endémiás VIII-as genotípusú baromfipestis vírusok is részt vettek a járványkitörésekben (*Herczeg és mtsai 1999*).

6. Egy négy évtizednyi izolálási intervallumot felölelő olaszországi törzsgyűjtemény vizsgálatakor megállapítottuk, hogy időbeli eltéréssel ugyan, de összesen 6 NDV genotípus fordult elő az országban.
- Helyi evolúciót tanúsító IV-es genotípusú törzsek az 1980-as évekig tartottak fenn endémiás fertőzést;
 - erre épült rá a 70-es évek elején a dél-amerikai eredetű V. genotípus gyors terjedésű járványhulláma, melynek leszármazottai még az 1980-as évek végéig perzisztáltak;
 - sporadikus kitörések egzotikus – VI., VIIb. és VIII. genotípusbeli - vírustörzsek független behurcolásairól is tanúskodnak az 1980-90-es években;
 - a VIIa (indonéziai eredetű) és a VIIb közel-keleti ágához tartozó törzsek epizootiás jellegű járványokat okoztak az 1990-es évtized elején, ill. 2000-ben (*Herczeg és mtsai 2001*).
7. Egy ugyancsak négy évtized alatt izolált bulgáriai törzsgyűjtemény genetikai analízise szintén összetett járványhelyzetet tárt fel: az 1970-es évek közepén egyszerre négy, genetikai, tehát epidemiológiai kapcsolatban nem álló vírustörzs tartott fenn a fertőzést az országban, később újabb genotípus is megjelent:
- IV. genotípusú törzsek az 1980-as évekig fordultak elő és több, területspecifikus altípusuk alakult ki;
 - az 1960-70-es években észak-amerikai (II-es genotípusú) törzsek is részt vettek a járványokban;
 - az országot az 1970-es évek elején érte el a Nyugat-Európában már elterjedt V. genotípus;
 - a VI-os genotípus (VIc altípusa amely később Kelet- és Nyugat-Európában is előfordult) több éven volt jelen;
 - végül, a VIIb-nek az 1990-es években a Közel-Keleten terjedő altípusáról állapítottuk meg, hogy már 1984-ben felbukkant Bulgáriában, majd az 1990-es évek második felében járványos esetekből izolálták, végül eljutott nyugat- és észak-európai országokba is (*Czeglédi és mtsai kéziratban*).
8. A két európai ország (Olaszország és Bulgária) ND járványainak retrospektív genetikai vizsgálata jelentősen hozzájárult az I. és II. ND-pandémia valódi történéseinek megértéséhez is (*Herczeg és mtsai 2001, Czeglédi és mtsai kéziratban*):

- a) Bebizonyosodott, hogy az irodalomban egységes etiológiájú, ezért világjárványként leírt I. pandémia (kb. 1930-1960 között) valójában legalább három, egymástól független eredetű, földrajzilag is jól elhatárolódó NDV genotípus térnyerésének időbeli egybeesése révén jött létre. Ezért helyesebb az ND globálissá válásáról és nem pandémiáról beszélni. Ezek a genotípusok eredetüket és elterjedtségüket tekintve erős földrajzi meghatározottsággal rendelkeznek: a II-es genotípus Észak-Amerikában, a III-as Kelet-Ázsiában, a IV-es pedig Európában uralkodott.
- b) A II. pandémia sem volt etiológiailag egységes, az V. és VI. genotípus okozta. Az V-ös csoportbeli, papagáj közvetítette, dél- és közép-amerikai eredetű NDV-törzsek a nyugat-európai primer, vagy alapozó járványkitöréseket (1970) követően terjedtek Kelet- és Dél-Európa felé, és nem a Távol-Keletről a Közel-Keleten át vonulva jutottak el Nyugat-Európába, ahogy az irodalom közölte. Már az 1960-as években is a közel-keleten uralkodó VI-os genotípusú törzseket pedig csak az 1980-as évek elején hurcolták be Európába, annak is főleg csak a keleti részébe (*Ballagi-Pordány és mtsai 1996, Wehmann 2000*).

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom tudományos vezetőmnek, *Lomniczi Bélának*, (MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete, Budapest) több éves kutatói irányításomért, szakmai tanácsaiért, a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért, formai és tartalmi kérdéseket érintő hasznos javaslataiért.

Köszönetemet fejezem ki *Wehmann Enikőnek*, akivel együtt tanultuk a baromfipestis vírus molekuláris genetikai analízisét, majd később közösen dolgoztunk járványtani és filogenetikai kérdések megoldásán; valamint az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete valamennyi dolgozójának a munkámban nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti *dr. Ballagi-Pordány András*t (Uppsala, Svédország), aki a baromfipestis vírus molekuláris genetikai vizsgálatok elindításában és módszertani kérdések megoldásában nyújtott hasznos segítséget.

Köszönettel tartozom valamennyi szerzőtársunknak: *dr. R.R. Bragg*, (Dél-Afrikai Köztársaság); *dr. D. Travassos*, (Mozambik); *dr. G. Hadjiev*, *dr. L. Dumanova* (Bulgária); *dr. O. Werner* (Németország); *dr. P.H. Jorgensen*, *dr. E. Holm* (Dánia); *dr. R.J. Manvell*, *dr. D.J. Alexander* (Anglia); *dr. S. Pascucci*, *dr. P. Massi*, *dr. M. Luini*, *dr. L. Selli*, *dr. I. Capua* (Olaszország), akik vírusizolátumok átadásával járultak hozzá a baromfipestis molekuláris járványtani vizsgálatainkhoz.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- 1) **Aldous, E.W. and Alexander, D.J.** (2001) Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology* 30: 117-128.
- 2) **Alexander, D.J., Parsons, G and Marshall, R.** (1984a) Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces. *Veterinary Record*, 115: 601-602.
- 3) **Alexander, D.J., Russell, P.H., Collins, M.S.** (1984b) Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 Characterisation of isolated viruses *Veterinary Record*, 115: 444-446.
- 4) **Alexander, D.J., Manvell, R.J., Kemp, P.A., Parsons, G., Collins, M.S., Brockman, S., Russell, P.H. and Lister, S.A.** (1987) Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathology*, 16: 553-565.
- 5) **Alexander, D.J.** (1988a) Historical aspects. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 1-11.
- 6) **Alexander, D.J.** (1988b) Methods of spread. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 256-272.
- 7) **Alexander, D.J.** (1995). Newcastle disease in countries of the European Union. *Avian Pathology*, 24, 3-10.
- 8) **Alexander, D.J.** (1997) Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Calnek, B.W. et al., (eds.), Diseases of Poultry, 10th Edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 541-569.
- 9) **Alexander, D.J., Manvell, R.J., Lowings, J.P., Frost, K.M., Collins, M.S., Russell, P.H and Smith, J.E.** (1997) Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 26: 399-418.
- 10) **Alexander, D.J., Morris, H.T., Pollitt, W.J., Sharpe, C.E., Eckfort, R.L., Sainsbury, R.M.Q., Mansley, L.M., Gough, R.E., Parsons, G.** (1998) Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkey in Great Britain during 1997. *Veterinary Record*, 143: 209-212.
- 11) **Alexander, D.J., Banks, J., Collins, M.S., Manvell, R.J., Frost, K.M., Speidel, E.C. and Aldous, E.W.** (1999) Antigenic and genetic characterisation of newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Veterinary Record*, 145: 417-421.

- 12) **Alexander, D.J.** (1995) The Epidemiology and Control of Avian Influenza and Newcastle Disease *Journal Comparative Pathology*, 112: 105-126.
- 13) **Awan, M.,A., Otte, M.,J. and James, A.,D.** (1994) The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. *Avian Pathology*, 23: 405-423.
- 14) **Ballagi-Pordány, A., Wehmann, E., Herczeg, J., Belák, S. & Lomniczi, B.** (1996). Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Archives of Virology*, 141: 243-261.
- 15) **Brandly, C.A., Moses, H.E., Jungherr, E.L., Jones, E.E. & Tyzzer, E.E.** (1946). Newcastle disease and fowl plaque investigations in the war research program. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 58: 369-371.
- 16) **Capua, I., Scacchia, M., Toscani, T. & Caporale, V.** (1993). Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. *Journal of Veterinary Medicine B*, 40, 609-612.
- 17) **Capua, I., Marangon, S., Dalla Pozza, M.** (2000) Newcastle disease in Italy. *Veterinary Record*, pp 768.
- 18) **Cattoli, G., Manvell, R.J., Tisato, E., Banks, J., Capua, I.** (2001) Characterisation of Newcastle disease viruses isolated in Italy in 2000. *Avian Pathology* 30, 465-469.
- 19) **Collins, M.S., Bashiruddin, J.B. and Alexander, D.J.** (1993) Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology*, 128: 363-370,
- 20) **Collins, M.S., Strong, I., Alexander, D.J.** (1996) Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed „pigeon PMV-1 viruses”. *Archives of Virology*, 134: 403-411.
- 21) **Czeglédi, A., Herczeg, J., Hadjiev,G., Doumanova,L., Wehmann, E., Lomniczi, B.** (2001) The occurrence of five major Newcastle disease genotypes (II, IV, V, VI and VIIb) in Bulgaria in the past four decades (kéziratban).
- 22) **Dobson, N.** (1939). Newcastle disease. *Proceeding 7th World Poultry Congress*, Cleveland, Ohio 250-253.
- 23) **Doyle, T.M.** (1927) A hithero unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal of Comparative Pathology*, 40: 144-169.
- 24) **Erdei, J., Erdei, J., Bachir, K., Kaleta, E.F., Shortridge, K.F., Lomniczi, B.** (1987) Newcastle disease vaccine (LaSota) strain specific monoclonal antibody. *Archives Virology*, 96: 265-269.

- 25) **Erdei, J., Lomniczi, B., Benyeda, J.** (1992) Egy Baranya megyei sporadikus baromfipestis-esetből izolált vírustörzs rokonsága jugoszláviai vírustörzsekkel. *MÁL* 47: 359-363.
- 26) **Erickson, G.A., Maré, C.J., Gustafson, G.A., Miller, L.D., Proctor, S.J., Carbrey, E.A.** (1977) Interaction between Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus and Pet Birds of Six Species. I. Clinical and Serological Responses, and Viral Excretion. *Avian Diseases*, 21: 642-654.
- 27) **Francis, D.W. and Etren-Rivelli, F.** (1972) Case report – Newcastle disease in Paraguay. *Avian Diseases*, 16: 336-342.
- 28) **Francis, D.W.** (1973) Newcastle disease and psittacines, 1970-71. *Poultry Digest*, Jan. p. 16-19.
- 29) **Garten, W., Berk, W., Nagai, Y., Rott, R., Klenk, H.H.** (1980) Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: Effects on pathogenicity. *Journal of General Virology*, 50: 135-147.
- 30) **Glickman, R.L., Syddall, R.J., Iorio, R.M., Shhehan, J.P. and Bratt, M.A.** (1988) Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 62: 354-356.
- 31) **Hanson, R.P., Barandy, C.A.** (1955) Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science*, 122: 156-157.
- 32) **Hanson, R.P.** (1964) Newcastle Disease Virus. An Evolving Pathogen. Madison and Milwaukee, WI: University of Wisconsin Press.
- 33) **Hanson, R.P.** (1974) The Reemergence of Newcastle Disease. *Advances in Veterinary Science*, 18: 213-229.
- 34) **Hanson, R.P.** (1975) Newcastle disease virus. In: Hitchner, S.B. et al., (eds.), *Isolation and identification of avian pathogens*, 2nd edition, American Association of Avian Pathology, College Station, Texas, 1975. Pp. 160-173.
- 35) **Hanson, R.P.** (1978) The Newcastle disease. *World Animal Review*, 30-33.
- 36) **Heckert, R.A., Collins, S.M., manvell, R.J., Strong, I., Pearson, J.E., Alexander, D.J.** (1996) Comparison of Newcastle Disease Viruses Isolated from Cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60: 50-54.
- 37) **Herczeg, J., Wehmann, E., Bragg, R.R., Travassos Dias, P.M., Hadijev, G., Werner, O. & Lomniczi, B.** (1999). Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for

- recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Archives of Virology*, 144: 2087-2099.
- 38) **Herczeg, J., Pascucci, S., Massi, P., Luini, M., Selli, L., Capua, I., Lomniczi, B.** (2001) A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathology*, 30: 163-168.
 - 39) **Higgins, D.A. and Shortridge, K.F.** (1988) Newcastle disease in tropical and developing countries. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp.273-301.
 - 40) **Jarecki Black, J.C., King, D.J.** (1993) An oligonucleotide probe that distinguishes isolates of low virulence from the more pathogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 37: 724-730.
 - 41) **Jestin, V. and Jestin, A.** (1991) Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Archives of Virology*, 118: 151-161.
 - 42) **Jorgensen, P.H., Herczeg, J., Lomniczi, B., Manvell, R.J., Holm, E. & Alexander, D.J.** (1998). Isolation and characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease) viruses from a flock of ostriches (*Struthio camelus*) and emus (*Dromaius novahollandiae*) in Europe with inconsistent serology. *Avian Pathology*, 27: 352-358.
 - 43) **Kaleta, E.F., Baldauf, C.** (1988) Newcastle disease in free living and pet birds. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 197-246.
 - 44) **Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D., Balk, F., and Ter Huurne, A.** (1997) Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 26: 837-849.
 - 45) **Ke, G.M., Liu, H.J., Lin, M.Y., Chen, J.H., Tsai, S.S., Chang, P.C.** (2001) Molecular characterisation of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *Journal of Virological Methods*, 97: 1-11.
 - 46) **King, D.J., Seal, B.S.** (1997) Biological and molecular characterisation of Newcastle disease virus isolates from surveillance of live bird markets in the north-eastern United States. *Avian Diseases*, 41: 683-689.
 - 47) **Köhler, H.** (1953) Die Bedeutung der Encephalitis bei der Diagnose der New-Castle-Krankheit der Hühner. *Deut Tierärz Wochensh.* 60: 262-267.
 - 48) **Lancaster, J.F.** (1966) Newcastle disease (A review of some of the literature published between 1928 and 1964) Monograph No. 3 pp. 17, Canada Department of Agriculture.

- 49) **Lancaster, J.E. and Alexander, D.J.:** (1975) Newcastle disease: virus and spread. Monograph No 11, Canada Department of Agriculture, Ottawa.
- 50) **Lomniczi, B., Derzsy, D.** (1964) Szokatlanul enyhe lefolyású baromfipestis járvány. *MÁL* 19: 46-48.
- 51) **Lomniczi, B.,** (1973) Studies on interferon induction and interferon sensitivity of different strains of Newcastle disease. *Journal of General Virology*, 21: 305-313.
- 52) **Lomniczi, B.** (1998) Egy régi vita a baromfipestisről. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 120: 631-638.
- 53) **Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Kaleta, E.F., Werner, O., Muelmans, D., Jorgensen, P.H., Manté, A.P., Gielkens, A.L.J. & Damoser, J.** (1998). Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology*, 143: 49-64.
- 54) **Lomniczi, B.** (1999) Genotípusok analízisének gyakorlati felhasználása: a molekuláris epidemiológiáról általában. *Vírusok evolúciója c. Jegyzet*, ELTE TTK Doktori Iskola,
- 55) **Marin, M.C., Villegas, P., Bennett, J.D., Seal, B.S.** (1996) Virus characterisation and sequence of the fusion protein gene cleavage site of recent Newcastle disease virus field isolates from the southeastern United States and Puerto Rico. *Avian Diseases*, 40: 382-390.
- 56) **McFerran, J.B. and McCracken, R.M.** (1988) Newcastle disease. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 161-183.
- 57) **Muelmans, G., Gonze, M., Carlier, M.C., Petit, P., Burny, A. and Le Long** (1987) Evaluation of the use of monoclonal antibodies to hemagglutination and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus for identification and strain differentiation purposes. *Archives of Virology*, 92: 55-62.
- 58) **Muelmans, G.** (1988) Control by vaccination. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 318-332.
- 59) **Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. & Summers, M.D. eds** (1995). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplement*, 10: 268-274.
- 60) **Nagai, Y., Klenk, H.D., and Rott, R.** (1976) Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 72: 494-508.
- 61) **Nagai, Y.** (1993) Protein dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 1: 81-87.

- 62) **Oberdörfer, A, Werner, O.** (1998) Newcastle disease virus: detection and characterisation by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathology*, 27: 237-243.
- 63) **Reid, J.** (1961) The control of Newcastle disease in Great Britain. *Brit Vet J*, 117: 275-288.
- 64) **Rima, B., Alexander, D.J., Billeter, M.A., Collins, P.L., Kingsbury, D.W., Lipkind, M.A., Nagai, Y., Orvell, C., Pringle, C.R. and ter Muelen, V.** (1995) Paramyxoviridae. In F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo and M.D. Summers (Eds.), *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 268-274) Vienna: Springer—Verlag.
- 65) **Rott, R. and Klenk, H.D.** (1988) Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In: D.J. Alexander (Ed.), *Newcastle disease* (pp. 98-112). Boston: Kluwer Academic Publishers.
- 66) **Russel, P.H. & Alexander, D.J.** (1983). Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, 75: 243-253.
- 67) **Russell, P.H.** (1988) Monoclonal antibodies in research, Diagnosis and epizootiology of Newcastle disease. In: D.J. Alexander (ed.) *Newcastle disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 131-147.
- 68) **Sakaguchi, T., Toyoda, T., Gotoh, B., Inocencio, N.M., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y.** (1989) Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology*, 169: 260-272.
- 69) **Sályi, Gy., Hodosy, J., Hirt, G.** (1955) A megszokottól eltérő jellegű baromfipestis járványok. *MÁL* 10: 154-158.
- 70) **Samson, A.C.R** (1988) Virus structure In: D.J. Alexander (ed.) *Newcastle disease*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp.23-44.
- 71) **Seal, B.S., King, D.J., Bennett, J.D.** (1995) Characterisation of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2624-2630.
- 72) **Sharman, E.C. and Walker, J.W.** (1973) Regulatory aspects of velogenic viscerotropic Newcastle disease *Journal of American Veterinary Medical Association*, 163(9):1089-1093.
- 73) **Shortridge, K.F. and Alexander, D.J.** (1978) *Research in Veterinary Sciences*, 25: 204-206.

- 74) **Spradbrow, P.B.** (1988) Geographical distribution. In. D.J. Alexander (ed.) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 247-256.
- 75) **Spradbrow, P.B.** (1990) Village poultry and preventive veterinary medicine. *Preventive Veterinary Medicine*, 8: 305-307.
- 76) **Stewart, G.H.** (1971) Naturally occurring clinical Newcastle disease in the racing pigeon (*Columba livia*). *Veterinary Record*, August 21, p.225-226.
- 77) **Szankó, T.** (2000) Baromfipestis járványok felderítése vírustörzsek genetikai analízisével. *TDK Dolgozat MTA Állatorvostudományi Kutatóintézet*.
- 78) **Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N.M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., Nagai, Y.** (1987) Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology*, 158: 242-247.
- 79) **Toyoda, T., Sakaguchi, T., Hirota, H., Gotoh, B., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y.** (1989) Newcastle disease evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology*, 169: 273-282.
- 80) **Van de Peer, Y. & De Wachter, R.** (1997). Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Computer Application in the Biosciences*, 13: 227-230.
- 81) **Vindevogel, H., Thiry, E., Pastoret, P.P., and Muelmans, G.** (1982) *Veterinary Record*, 110: 497-499.
- 82) **Walker, J.W., Heron, B.R., and Mixson, M.A.** (1973) Exotic Newcastle disease eradication program in the United States. *Avian Diseases*, 17: 486-503.
- 83) **Watanebe, M., Yamamoto, T., Mifune, R., Inui, S.** (1952) An occurrence of Newcastle disease (pneumoencephalitis type) in Okayama Prefecture in Japan in 1951 (In Japanese). 24th Rep Govt Exp Sta Anim Hyg Tokyo 7-12; (in Vet Bull 1954; 24: 375).
- 84) **Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Lomniczi, B.** (1997) Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine*, 15: 1430-1433.
- 85) **Wehmann, E., Herczeg, J., Tanyi, J., Nagy, É., Lomniczi, B.** (1999) Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type used in the region. *Avian Pathology*, 28: 6-12.
- 86) **Wehmann Enikő** (2000) Baromfipestis vírustörzsek molekuláris genetikai vizsgálata törzsazonosítás céljából és filogenetikai összefüggések felderítésére. *Doktori értekezés*

- 87) **Werner, O., Oberdörfer, A.R., Köller, B., Manvell, R.J., Alexander.D.J.** (1999) Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathology*, 28: 79-88.
- 88) **Westbury, H.** (2001) Newcastle disease virus: an evolving pathogen? *Avian Pathology*, 30: 5-11.
- 89) **Wilson, G.W.C.** (1986) Newcastle disease and paramyxovirus 1 of pigeons in the European Community. *World Poultry Science*, 42: 143-153.
- 90) **Yang, C.Y., Shieh, H.K., Lin, Y. L. & Chang, P.C.** (1999). Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. *Avian Diseases*, 43: 125-130.