

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Kar

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Nagyállatklinika

**Az Equid herpesvirus 5 kórtani szerepének vizsgálata lovak
multinoduláris tüdőfibrózisában, valamint kimutatása, egészséges
és légzőszervi tüneteket mutató lovakból**

Készítette: Mikó Péter

Témavezetők:

Dr. Korbacska-Kutasi Orsolya

egyetemi adjunktus

SZIE-ÁOTK

Nagyállatklinika

Dr. Bakonyi Tamás

egyetemi docens

SZIE-ÁOTK

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest 2013

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1 Kóroktan.....	7
3.2 Járványtan	7
3.3 Az EHV-5 fertőzés klinikai tünetei.....	8
3.4 Az Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis	9
3.5 Az EMPF kórformái.....	10
4. Anyag és módszer	12
4.1 Vizsgált állományok.....	12
4.2 Bronchoalveolar lavage és orrtampon minta.....	12
4.3 Leukocita szeparálás perifériás vérmintából.....	13
4.4 Nukleinsav kivonás	13
4.5 Polimeráz láncreakció	13
4.6 Statisztikai módszerek.....	15
5. Eredmények.....	16
6. Megbeszélés	20
7. Összefoglalás.....	22
8. Summary	23
9. Irodalomjegyzék.....	24
10. Köszönetnyilvánítás	29

1. Rövidítések jegyzéke

BALF	bronchoalveolar lavage fluid
bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EHV-5	equid herpesvirus 5
EMPF	equine multinodular pulmonary fibrosis (lovak multinoduláris tüdőfibrózisa)
g	gramm
gB	glykoprotein B
IL-10	interleukin 10
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis (idiopátiás tüdőfibrózis)
m	átlag
MHC II.	major histocompatibility complex II.
MHV-68	murid herpesvirus 68
ml	milliliter
nm	nanométer
NS	nasal swab (orrtampon)
PBL	peripheral blood leukocyte
PBS	phosphate- buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz lánreakció)
μM	mikromol
RAO	recurrent airway obstruction

sd	szórás
TAE	Trisz-acetát–EDTA
TGF- β	transforming growth factor β
UV	ultra viola
V	volt
μ l	mikroliter

2. Bevezetés

A *Herpesviridae* családba, azon belül is az *Alfa-* és *Gammaherpesvirinae* alcsaládba számos, állategészségügyileg jelentős kórokozó tartozik. A *Gammaherpesvirinae* alcsalád, *Percavirus* nemzetségben lévő Equid herpesvirus 5 (Davidson et al., 2009), egyike a lóféléket természetes körülmények között fertőzni képes 11 herpesvírusnak (Fortier et al., 2010). Munkám során ezzel, a napjainkban egyre jobban a tudományos érdeklődés előterébe kerülő herpesvirussal foglalkoztam. A molekuláris biológiai módszerek fejlődésének köszönhetően, mára már pontosan ismerjük az EHV-5 genetikai állományát (Agius et al., 1992), azonban pontos kóroki szerepe továbbra is tisztázatlan; feltételezhetően szerepe van lovak multinoduláris tüdőfibrózisának kialakításában (Williams et al., 2007).

A lovak EHV-5 –tel való fertőzöttsége a világ számos országában bizonyított, azonban a magyarországi ló állományokban való előfordulásáról nincsenek naprakész adataink. Céljaink között szerepel ennek az úrnek a betöltése, valamint tudásunk bővítése kórtani hatásaival kapcsolatban.

A kutatás során egészséges, valamint légzőszervi tüneteket mutató lovak vizsgálatára került sort. Ezekből az állatokból vér, orrtampon, továbbá bronchoalveolar lavege fluid (BALF) minták vizsgálata történt. Ezzel célunk, hogy kiderítsük, milyen típusú mintából lehet a legnagyobb valószínűséggel kimutatni a fertőzést. Célunk azt is megvizsgálni, hogy van-e összefüggés a BALF pozitívítás, és manifesztálódott légzőszervi betegségek között.

A mintákból kinyert DNS-t, EHV-5 specifikus primerekkel, PCR segítségével vizsgáltuk.

3. Irodalmi áttekintés

Az Equid herpesvirus 5 (EHV-5) első izolálására, két Angliából származó, Ausztáliában karanténban lévő ló, orrüregéből vett mintákból került sor 1970-ben (Turner et al., 1970). Ezt követően 1974-ben, légzőszervi tüneteket mutató kancák vérének buffy coat rétegéből került kimutatásra (Wilks and Studdert, 1974), azonban mind két fent említett esetben, mint az Equid herpesvirus 2 egy változata. 1987-ben egy kutatás során, melynek célja, a genetikai homogenitás meghatározása volt, 51 ideiglenesen EHV-2 –nek besorolt vírus izolátum között, a minták restriktációs endonukleázzal, valamint Southern blot hybridizációval történő vizsgálatát követően, felismertek 4, az EHV-2-től nagymértékben elkülönülő törzset (Browning and Studdert, 1987b). Ezen elkülönülő törzsek genomjának további vizsgálata után, bizonyosságot nyert, hogy egy új Gamma- herpesvirus került felfedezésre (Agius and Studdert, 1992).

1997-ban a Zürichi egyetem végzett kutatás során, Svájcban is bizonyítani tudták a vírus jelenlétét (Franchini et al., 1997). 1999-ben Új-Zélandon egy átfogó kutatás keretében 114 lóból (csikó valamint felnőtt ló) származó orrtampon, valamint perifériás leukocita lizátum (PBL) beoltott sejt tenyészeteket, EHV-5 specifikus PCR vizsgálata során 38 minta pozitívnak bizonyult, azonban nem volt kimutatható kórtani összefüggés (Dunowska et al., 1999). Egy nemzetközi összefogás keretében létrejött felmérés során az Angliában vizsgált állomány 24%-a, míg a Magyarországon vizsgált Shagya- arab csikók 15%-a bizonyult EHV-5 fertőzöttnek (Nordengrahn et al., 2002). 2006-ban egy 8 éves Appalosa fajtájú ló vérének mononukleáris sejteket tartalmazó izolátumából, továbbá 47 egészséges, Kaliforniában tréningező versenyló nasopharingeális tamponmintáiból (64% pozitív) került kimutatásra a vírus Amerikában (Bell et al., 2006b). Egy 2008-ban lezajlott monitorozás során bebizonyosodott, hogy a földrajzilag igen nagymértékben izolált, és a lovak importját 1882-től törvényekkel szigorúan szabályzó izlandi populációkban is széles körben elterjedt az EHV-5 (Torfanson et al., 2008). Krónikus légzőszervi tüneteket, valamint teljesítménycsökkenést mutató lovak BALF mintáinak PCR vizsgálata során, számos esetben (16/387) Franciaországban is kimutatásra került a vírus (Fortier et al., 2009). A közelmúltban a bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem, ausztriai lipicai méneseiben kivitelezett, nagyszabású szemészeti szűrővizsgálatába a vizsgált populációk 51,1%-a volt EHV-5-tel fertőzött (Rushton et al., 2013).

Huszonnégy ló, kórbonctani vizsgálataira, valamint PCR eredményeire alapozva, 2007-ben, az EHV-5-öt a lovak multinoduláris tüdőfibrózisát (EMPF) feltételezhetően kialakító

kórokozóként nevezték meg (Williams et al., 2007).. Légzési nehézségeket, légzőszervi tüneteket, valamint általános lázas tüneteket mutató lovakból származó tüdő bioptátumokból, és BALF mintákból, specifikus PCR vizsgálatokkal kimutatásra került a vírus. A radiológiai és ultrahangos vizsgálatok eredményeire, valamint a minták EHV-5 pozitivitására alapozva, minden esetben, multinoduláris tüdőfibrózis (EMPF) lett a diagnózis (Wong et al., 2008). A kórkép pontos leírását követően az EMPF sorra felismerésre került szerte a világon (Hart et al., 2008; Wong et al., 2008; Kubiski et al., 2009; Poth et al., 2009; Niedermaier et al., 2010; Schwarz et al., 2012a, Schwarz et al., 2013). Összefüggésbe hozták még a vírust lymphoid daganatok (Schwarz et al., 2012a), keratitis (Richter et al., 2009), valamint erythema multiforme (Herder et al., 2012) kialakításával.

3.1. Kóroktan

Az equid herpesvirus-5 lineáris, duplaszálú, megközelítőleg 179 kilobázis nagyságú genommal rendelkező DNS vírus (Agius et al., 1992). A genomot magába foglaló, körülbelül 130nm átmérőjű ikozaherdrális szimmetriájú kapszidot, glikozilált fehérjéket tartalmazó lipid burok (200nm) veszi körül (McGeoch et al., 2006). Ezen fehérjék egyike a glycoprotein B (gB), mely rendkívül fontos szerepet játszik a vírus gazdasajtbe való bejutásában, annak sejtek közötti tovaterjedésben, továbbá a gB képi a vírus ellen kialakuló immunválasz fő célpontját. A herpesvirusok körében a gB-t kódoló gén egy szakasza nagymértékben konzervált, a mutációk kialakulásának gyakorisága rendkívül kicsi (Neubauer et al., 1997; Pereira., 1994), ezért a vírus kimutatására a gB-t kódoló konzervatív régióra irányuló molekuláris vizsgálatokkal a vírustörzsek specifikusan kimutathatóak.

3.2. Járványtan

A látens fertőzések kialakításának képessége sarokköve a herpesvirusok patogenezisének és járványtanának. Látens fertőzés során a vírus genomja jelen van, azonban annak expressziója limitál, továbbá ez idő alatt nem képződnek fertőzőképes virionok (Banks et al., 1992). Az EHV-5 képes az interleukin-10-et (IL-10) kódoló homológ gén expresszálására (Studdest., 1996; Holloway et al., 2000). A virális interleukin-10 fehérje gátolja a major histocompatibility complex II. (MHC II) expresszióját, ezáltal a gazdaszervezetben immunszuppressziót alakít ki (de Wall Malefyt et al., 1991). A gammaherpesvirusok jellemzője, hogy szaporodásuk fő színterei a lymphoid szövetek, B és T lymphocyták. Az EHV-5 nagyfokú affinitása az alveoláris makrofágok iránt, valamint intracelluláris zárványok képzésére mutatott hajlam szokatlan tulajdonságok a gammaherpesvirusok körében.(Williams

et al., 2007; Stoolman et al., 2011). Az vírus erős tropizmussal bír a légző szervrendszer felé (Wang et al., 2003), azonban a konjunktiváról származó mintákban is megtalálható. Terjedésében légzőszervi váladékokban való periodikus megjelenése és ürülése játszik fontos szerepet (Dunowska et al., 2002a; Wang et al., 2007). Járványtani szempontból a vírust tünetmentesen hordozó lovak rendkívül fontos pozíciót foglalnak el, mivel feltűnés nélkül képesek azt terjeszteni. Különböző korcsoportok vizsgálatakor életkor függő prevalencia figyelhető meg. A fiatalabb korcsoportok nagyobb százalékban ürítik a vírust, mint az idősebb korosztály (Marenzoni et al., 2010; Rushton et al., 2013) A korosztályok közti eltérő eredmények összefüggésben lehetnek a vírusfertőzés különböző stádiumaival. Az idősebb lovakban fennálló látens fertőzés a fertőzőképes virionok számának csökkenését eredményezi, ezzel szemben a fiatalabb egyedekben fennálló akut vírusfertőzés, a fertőzőképes vírusok nagyszámú ürülését eredményezi. A csikók feltehetően születés után, a vírust ürítő kancáktól fertőződnek (Fu et al., 1986). Az élethosszon át tartó fertőzés miatt a vírus időről időre kimutathatóvá válik a látens fertőzés reaktivációja, vagy az állat más törzzsel való felülfertőződése miatt (Hartley et al., 2013).

3.3. Az EHV-5 fertőzés klinikai tünetei

A vírus hatására számos különböző klinikai tünet, és kórforma alakul ki. Enyhe esetekben az egyszerű felső légúti gyulladástól kiindulóan, lázas állapot, konjunktivitisz, és nyirokcsomó duzzanat kialakulása figyelhető meg (Dunowska et al., 2002a; Hart et al., 2008, Richter et al., 2009). Súlyosabb esetekben (EMPF) letargia, intermittáló lázas állapot, tachypnoe és nehézlégzés, felerősödött légzési zörejek, tachycardia, anorexia, következményes rossz kondíció a legjellemzőbb tünet. Haematológiai és biokémiai vizsgálatok során leukocytózis, neutrophylia, nem egy esetben leukaemia (Schwarz et al., 2012a) valamint hyperfibrinogenémia tapasztalható. Légúti váladékok vizsgálata során gyakran mutatható ki potenciális patogének nélküli neutrofilejtes gyulladás. A légutak endoszkópos vizsgálata során a pharyngeális lymphoid képletek megnagyobbodása-hyperaemiája, petechiák a nyálkahártyákon, valamint nyálkás váladék figyelhető meg a trachea és a hörgők lumenében. A mellkas radiológiai vizsgálatakor miliáris vagy noduláris, diffúz intersticiális rajzolat látható. A perifériásan elhelyezkedő elváltozások ultrahangos vizsgálatok segítségével is leképezhetőek (Wong et al., 2008; Niedermaier et al., 2010).

3.4. Az Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis

Az EMPF egy krónikus és olykor progresszív légzőszervi betegség, mely jellegzetes makroszkópos valamint kórszövettani megjelenése, és az EHV-5-höz fűződő kapcsolata révén, elkülönül az egyéb oktanú intersticiális pulmonáris betegségektől (Dunkel 2012).

Lovakban a pulmonáris fibrózis patomechanizmusa kevésbé ismert. Emberek idiopatikus tüdőfibrózisának (IPF) patogenezise napjainkban intenzíven kutatott területnek számít. Az IPF kialakításában valószínűleg szerepe van az Epstein-Barr (EBV) vírusnak, mely szintén a gammaherpesvirusok közé tartozik (Doran et al., 2005). Mind az EMPF, és az IPF patogenezisének hátterében feltételezhetően vírus indukált gyulladási folyamatok állnak, melyek végső soron fibrózist eredményeznek. A II. típusú pneumocyták, és a makrofágok ismételt károsodása során, intersticiális fibrózist indukáló Transforming Growth Factor- β (TGF- β) szabadul fel. Murid herpesvirus-68-al (MHV-68) fertőzött egerek esetében bizonyítottan növekedett TGF- β termelés, valamint az IPF-el való kapcsolat volt tapasztalható a vizsgálatok során (Mora et al., 2005). MHV-68-al látenszen fertőzött alveoláris epithel sejtek megnövekedett TGF- β termelést mutatnak *in vitro*, mely a CCL2 chemokin fokozott termelését, és ezen keresztül kollagén szintézist támogatja a fibrocytákban (McMillan et al., 2008; Vanella et al., 2010). A gyulladási sejtek által termelt citokinek, fibroblast növekedési faktorok, és az irányítatlan reparáció progresszív fibrózist eredményeznek (Vanella et al., 2008).

Lovak alsó légúti gyulladásainak prevalenciáját (Robinson et al., 2006), beleértve az ismétlődő és súlyos gyulladási epizódokat produkáló recurrent airway obstructiót (RAO) is, összehasonlítva az EMPF előfordulási gyakoriságával, valószínű, hogy a gyulladás önmagában nem képes szignifikáns fibrózis kialakítására. A humán IPF-es betegeket vizsgálati eredményeit nézve valószínű, hogy önmagában a vírus nem elég a betegség kialakításához. Feltételezhetően szükséges valamilyen genetikai vagy szerzett hajlamosító tényező, mely fogékonyabbá teszi a beteget a vírusfertőzéssel szemben, valamint növeli a betegség kialakulásának valószínűségét (Tang et al., 2003). Feltehetően így van ez az EMPF esetében is, hiszen az EHV-5 viszonylag széles körben elterjedt, azonban az EMPF-es esetek száma jóval kisebb. *Post mortem* esetekben a diagnózis a kórbonctani elváltozásokra, valamint az EHV-5 nukleinsavának PCR-rel való kimutatására alapszik. Klinikai esetekben a tünetek, és a képződiagnosztikai eljárások mellett, a BALF virológiai vizsgálata szolgál támpontul (Wong et al., 2008). Az eddig leírt EMPF-es esetekben túlnyomó részt tüneti kezelést alkalmaztak (kortikoszteroidok, nem szteroid gyulladáscsökkentők, antibiotikumok).

Néhány esetben antivirális szerek alkalmazásával sikerült javulást elérni, azonban az nem tisztázott, hogy ez az alkalmazott gyógyszereknek, vagy csupán a véletlennek köszönhető (Schwarz et al., 2012b). A leírt esetek közül eddig mindössze 2 állat esetében tapasztaltak hosszú távú túlélést, azonban nem csak túlélés, de az állat állapotának javulása, és teljes felépülés is előfordul (Wong et al., 2008; Schwarz et al., 2012b).

3.5. Az EMPF kórformái

Az elváltozások legfőképpen a tüdőre és a bronchiális nyirokcsomókra koncentrálnak. Az elváltozások az összetüdő lebenyre kiterjedten tapasztalhatóak. A kórképnek két elkülönülő megjelenési formája figyelhető meg. Mind két formában nagyméretű, tömött tapintatú, sárgásbarna-fehér, fibrotikus csomók tapasztalhatóak makroszkóposan, valamint a tüdő nem kollabál a mellüreg megnyitását követően.

Leggyakoribb a diffúz noduláris forma, mely esetben egyenként legfeljebb 5cm-es átmérőig terjedő, a megmaradt kis mennyiségű ép tüdő parenchimától határozottan elkülönülő, összeolvadó nodulusok alakulnak ki (1. ábra). A kevésbé gyakori a diszkrét gócos forma, melyben nagyméretű (10cm-es átmérőig terjedő), elszórtan előforduló, az ép parenchimától különálló gócok képződnek. Ez utóbbi esetben nagyobb arányban található meg az érintetlen tüdő szövet.

Kórszövettani vizsgálatok során gyulladás és a fibrózis különböző stádiumai tapasztalhatóak. Az uralkodó forma esetén, az ép szövetektől élesen elkülönülő gócok szabályosan rendeződő érett kötőszövetből épültek fel. Az alveoláris architektúra felbomlott, változatos méretű, abnormális „alveolar-like” légterek jönnek létre, melyeket cuboidális epithel bélel.

A ritkább forma esetén az elváltozások határa elmosódott, a gócot éretlen, laza kötőszövetes kötegek alkotják. Ebben az esetben az alveolusok destrukciója figyelhető meg. Az intersticiumot gyulladással sejtek, túlnyomó részben lymphocyták, kisebb részt makrofágok, valamint neutrofil granulocyták, és kis számban multinukleáris óriássejtek infiltrálják. A légutakban neutrofilok, megnagyobbodott, vacuolarizált makrofágok, és számos többmagvú óriássejt halmozódik fel. Egyes intralumináris makrofágokban eozinofil magzárványok találhatóak. Egyes területeken a II. típusú pneumocyták hyperpláziája figyelhető meg (Williams et al., 2007).



1. ábra Az EMPF diszkrét noduláris formájának kórbonctani képe (saját felvétel)

4. Anyag és módszer

4.1. Vizsgált állományok

A kutatás során mintáinkat az ország különböző részeiből gyűjtöttük. Az Üllői Nagyállatklinikáról származó 92 bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (5 esetben vér és orrtampon is) teszi ki a minták jelentős részét. Ezek a minták a klinikára érkező, légzőszervi tüneteket, vagy teljesítménycsökkenést mutató állatok kivizsgálásának részeként kerültek levételre (28 mén, 24 kanca, 40 herélt, m10,5év; sd5,1év). A kinyert mintákat további feldolgozásig -20°C-on tároltuk.

A Szilvásvárad Állami Ménesgazdaság méneséből származó 20 lipicai ló (13 kanca, 7 herélt, m8,3év, sd4,1év) mindegyikéből orrtampon (NS), etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásban gátolt vért, továbbá BALF mintákat vettünk.

A Balaton felvidékről 5 ugrólóból, Keszthelyről 2 ugrólóból, Üllő Dóra majorból 4 ugrólóból a fent leírt három típusú mintát gyűjtöttük (5 mén, 4 kanca, 2 herélt; m8,5év, sd3,5év).

Kecskeméten egy magánistállóból 14 Oldenburgi, valamint 2 Holsteini (6 kanca, 10 herélt, m5,4év; sd1,6év) fajtájú lótól egyenként orrtampon, továbbá EDTA-val alvadásban gátolt vért gyűjtöttünk.

Ahol módunkban állt, a minták begyűjtését megelőzően rögzítettük a ló korát, fajtáját, ivarát, hasznosítását, versenyzési szintjét, továbbá hogy a vizsgálatot megelőzően volt-e bármi nemű légzőszervi betegsége.

4.2. Bronchoalveolar lavage és orrtampon minta

A mintavételeket endoszkóp nélkül „vakon”, nasobronchiális BAL cső használatával, a cső előzetes fertőtlenítésével, majd ezt követően steril kezelésével végeztük. A szondázást megelőzően a lovakat detomidin- butorphanol kombinációval szedáltuk, majd az előzetesen kitisztított orrnyíláson keresztül, az alsó orrjáraton át addig vezettük, míg a tovább haladása ellenállásba nem ütközött. Ezt követően a cső végén lévő mandzsettát 10ml levegővel infundáltuk. A szonda hatására kiváltódott köhögést 2%-os lidokain, valamint steril fiziológiás sóoldatból álló keverékkel csillapítottuk. A mintavételi cső munkacsatornáján keresztül 360ml szobahőmérsékletű steril sóoldatot juttattunk a hörgőkbe, majd steril fecskendőbe rögtön visszaszívtuk, végül a teljes visszanyert mennyiséget összekevertük.

További feldolgozásig -70°C -on tároltuk. Az orrüregből vett tampon mintákat, további feldolgozásig fiziológiás sóoldatban, -70°C -on fagyasztva tároltuk.

4.3. Leukocita szeparálás perifériás vérmintából

Első lépéskén az EDTA-val alvadásban gátolt vérmintákat $1860\times\text{g}$ -n 10 percen keresztül centrifugáltuk. A centrifugálás hatására három jól elkülöníthető frakció jött létre. A vérsavó eltávolítását követően, pipettával leszívtuk a vörösvérsejt frakció fölött kialakult vékony buffy-coat réteget, melyet rögtön milli-Q vízhez pipettáztunk, a keveréket óvatosan átforgattuk, a majd 40 másodperc után, $10\times$ -es töménységű foszfátpufferrel (phosphate-buffered saline, PBS) fiziológiásra állítottuk az ionkoncentrációt. Erre a lépésre azért volt szükség, hogy az ionkoncentráció változását kevésbé tűrő vörösvérsejteket hemolizálni tudjuk. $1860\times\text{g}$ -s újabb 10 perces centrifugálás következett. A felülúszót óvatosan leöntve, a kémcső aljára leülepedett fehérvérsejtekhez PBS-t mértünk. Összerázást követően újabb centrifugálást végeztünk. A felülúszó leöntése, majd a leukociták PBS-ben történő homogenizálását követően a mintákat további feldolgozásig -70°C -on tároltuk.

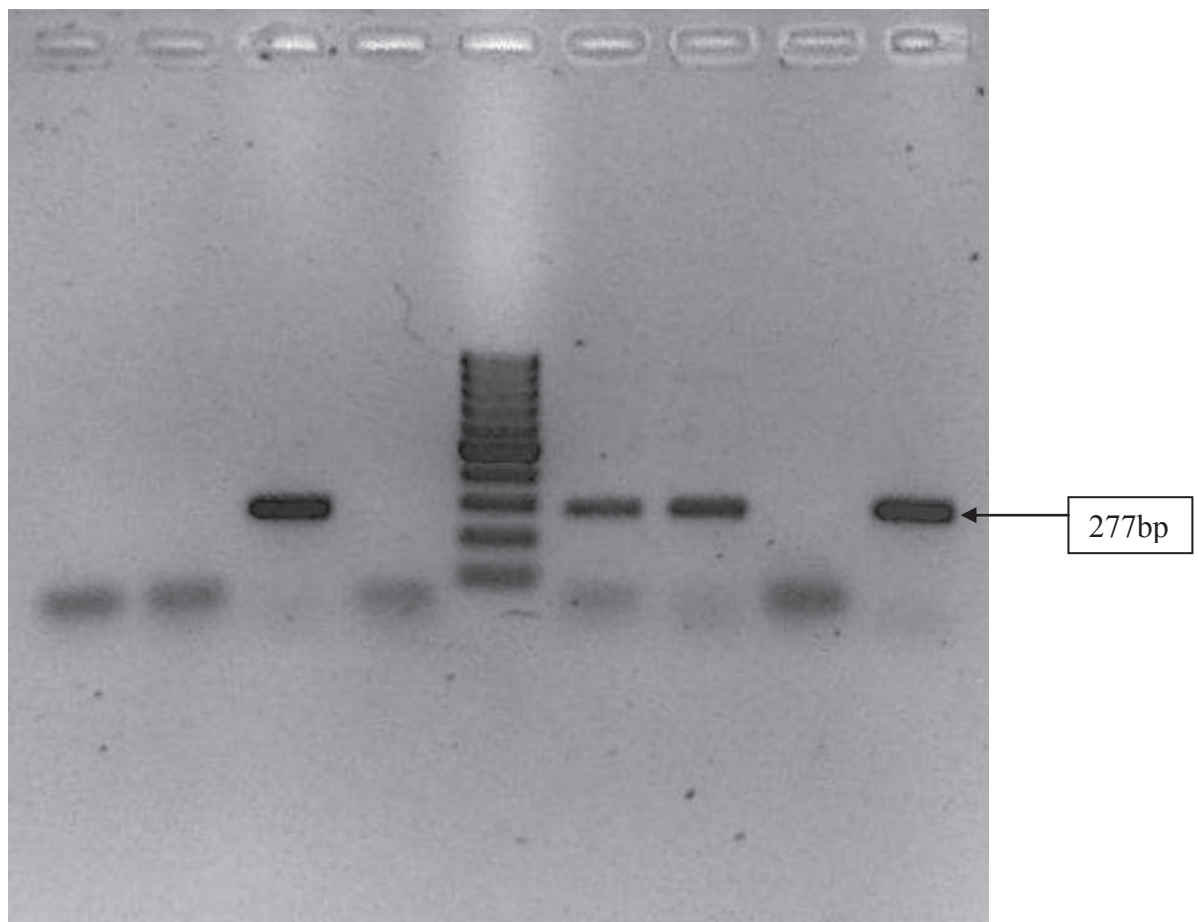
4.4. Nukleinsav kivonás

Az equid herpesvirus-5 nukleinsavát $200\mu\text{l}$ mintából, a QIAamp® DNS Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki a gyártó utasításai szerint.

4.5. Polimeráz láncreakció

A nukleinsav kivonását követően, a PCR kivitelezéséhez QIAGEN® Fast Cycling PCR Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtunk. A reakcióelegy $20\mu\text{l}$ -e tartalmazott $5\mu\text{l}$ RNáz mentes vizet, $10\mu\text{l}$ PCR MasterMix-et melyben megtalálható volt a hőstabil polimeráz, a reakció számára megfelelő körülményeket biztosító puffer, valamint dezoxi-nukleotidok (HotStarTaq plus DNA polimerase, Fast Cycling PCR buffer, dNTP,); $2\mu\text{l}$ CoralLoad Fast Cycling Dye-t (narancs és piros festék);, $1\mu\text{l}$ $40\mu\text{M}$ koncentrációjú primer keveréket (F 5'-GTATCACCGTGGACCAAGAG-3'; R 5'-GGCACATCTGTCAGGTTTCAT-3'); továbbá $2\mu\text{l}$ templát DNS-t. A reakció a vírus genomját alkotó duplaszálú DNS denaturációjával és a HotStarTaq polimeráz aktiválásával kezdődött 95°C hőmérsékleten 5 percre. Ezután következett a 45 ciklusból álló polimeráz láncreakció. Egy ciklus során először 96°C hőmérsékleten 25 másodpercig zajlott a denaturációs lépés. Ezt követően a primerek megtapadását egy 5 másodpercig tartó 67°C hőmérsékleten történő lépés tette lehetővé.

A primerek megfelelő helyekre történő stabilizálódása után a DNS polimeráz 68°C hőmérsékleten 25 másodpercig a templáttal komplementer szálát szintetizált. A 45 ciklus befejeztével, 1 percig tartó 72°C hőmérsékleten zajló, végső láncszintézis következett, annak céljából, hogy minden DNS dupla szálát alkosson. A kész reakcióterméket a készülék 4°C hőmérsékleten tárolta. A DNS amplifikálását az Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler géppel végeztük. A PCR során nyert 277 bp hosszúságú termékeket agarózgél-elektroforézissel vizsgáltuk meg. A gél készítése során 50 ml Trisz-acetát-EDTA (TAE) pufferhez 0,8 g agarózt adtunk, felforraltuk, majd 6 µl Green safe-et adtunk az keverékhez, mely hozzá tud kapcsolódni a DNS-hez és így UV fényben zölden fluoreszkálva lehetővé teszi a keresett termék detektálását. Ezt követően futtatókádba öntöttük a folyékony gélt, majd a megszilárdulása után a kádat feltöltöttük TAE pufferrel. A gél zsebeibe 5-5µl-nyi PCR terméket mértünk. A PCR termékek méretének meghatározásának céljából egy zsebbe molekulatömeg markert (100 bp Ladder, Promega, USA) mértünk és elektroforetizáltunk a mintákkal párhuzamosan. A gélt 40 percen keresztül 10V/cm feszültségen elektroforetizáltuk, majd UV fényben értékeltük, lefotóztuk (2. ábra).



2. ábra Az EHV-5 gB gén konzervált régiójára irányuló primerekkel végzett PCR eredménye. 1,2,4-es oszlop: negatív vizsgálati minták; 5-ös oszlop: molekulatömeg marker; 3,6,7-es oszlop: pozitív vizsgálati minták; 8-as oszlop: negatív kontroll; 9-es oszlop: pozitív kontroll.

4.6. Statisztikai módszerek

A vizsgálatok során nyert adatokat a Microsoft Office Excel 2007 program felhasználásával elemeztük.

5. Eredmények

A Nagyállatklinikára érkező 92 lóból a vizsgálatok során 9 (9,8%) lóból mutattuk ki a vírus DNS jelenlétét. Ezekből 5 esetben, módunkban állt NS, PBL, és BALF minták gyűjtése (1. táblázat). A fennmaradó 87 lóból BALF mintákat vizsgáltunk. Összesítve BALF mintából 7 (7,6%) alkalommal került kimutatásra az EHV-5. A pozitív csoportban 4 mén, 1 kanca, és 4 herélt volt (m7,7év, sd2,8év). Minden esetben tapasztalhatóak voltak krónikus légzőszervi tünetek. Három ló esetében a kórbonctani, kórszövettani leletekre, a hospitalizáció során végzett tüdő biopsziára valamint EHV-5 pozitivitásra alapozva bizonyítottan EMPF, két ló esetében mellkasi ultrahangos vizsgálatokra, BALF minták virológiai vizsgálatára, valamint intracelluláris zárványokra alapozva feltételezhetően EMPF volt a tünetek hátterében.

1. táblázat A Nagyállatklinikára érkezett lovak mintánkénti PCR eredményei

minta/állat kód	7293	7304	7359	7413	7434
BALF	+	+	+	-	-
PBL	-	+	-	-	-
NS	+	+	+	+	+

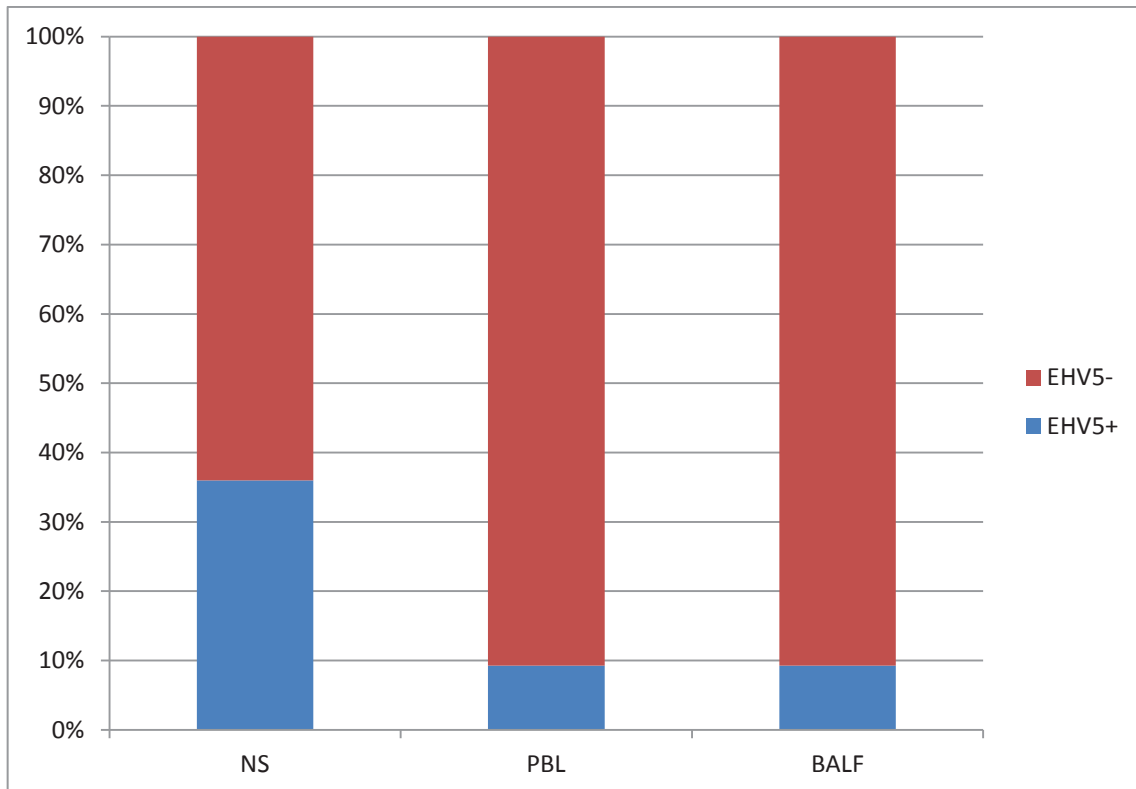
A Szilvásvárad Állami Ménesgazdaság méneséből származó 20 lipicai lóból egyenként NS, PBL, és BALF mintákat gyűjtöttünk. A vizsgált 20 állatból a PCR vizsgálatok eredményei alapján 7 (35%) bizonyult fertőzöttnek (2. táblázat). Az NS minták esetében 7 (35%), a PBL mintákból 2 esetben (10%), a BALF mintákból egyszer sem volt kimutatható a vírus.

2. táblázat A Szilvásvárad Állami Ménesgazdaságban vizsgált lovak adatai

	PCR-	PCR+
Kor	4-16 év (m7,7; sd3,8)	4-15 év (m9,4; sd4,75)
Ivar	Kanca 7 Herélt 6	Kanca 6 Herélt 1
Hasznosítás	Törzskanca 1 Hátas/Fogatló12	Törzskanca 3 Hátas/Fogatló4

A Balaton felvidékről 5 ugrólóból, Keszthelyről 2 ugrólóból, Üllő Dóra majorból 4 ugrólóból gyűjtött NS, PBL, és BALF minták vizsgálata 4 ló fertőzöttségét igazolta (3. táblázat). Négy esetben (36,4%) NS, 1 esetben (9%) PBL, és 1 alkalommal (9%) BALF mintából került kimutatásra a vírus nukleinsava (3. ábra). A BALF pozitív kanca esetében krónikus légzőszervi tünetek voltak megfigyelhetőek, további kivizsgálása folyamatban van.

3. ábra Az EHV5 nukleinsavának kimutatása különböző mintákból



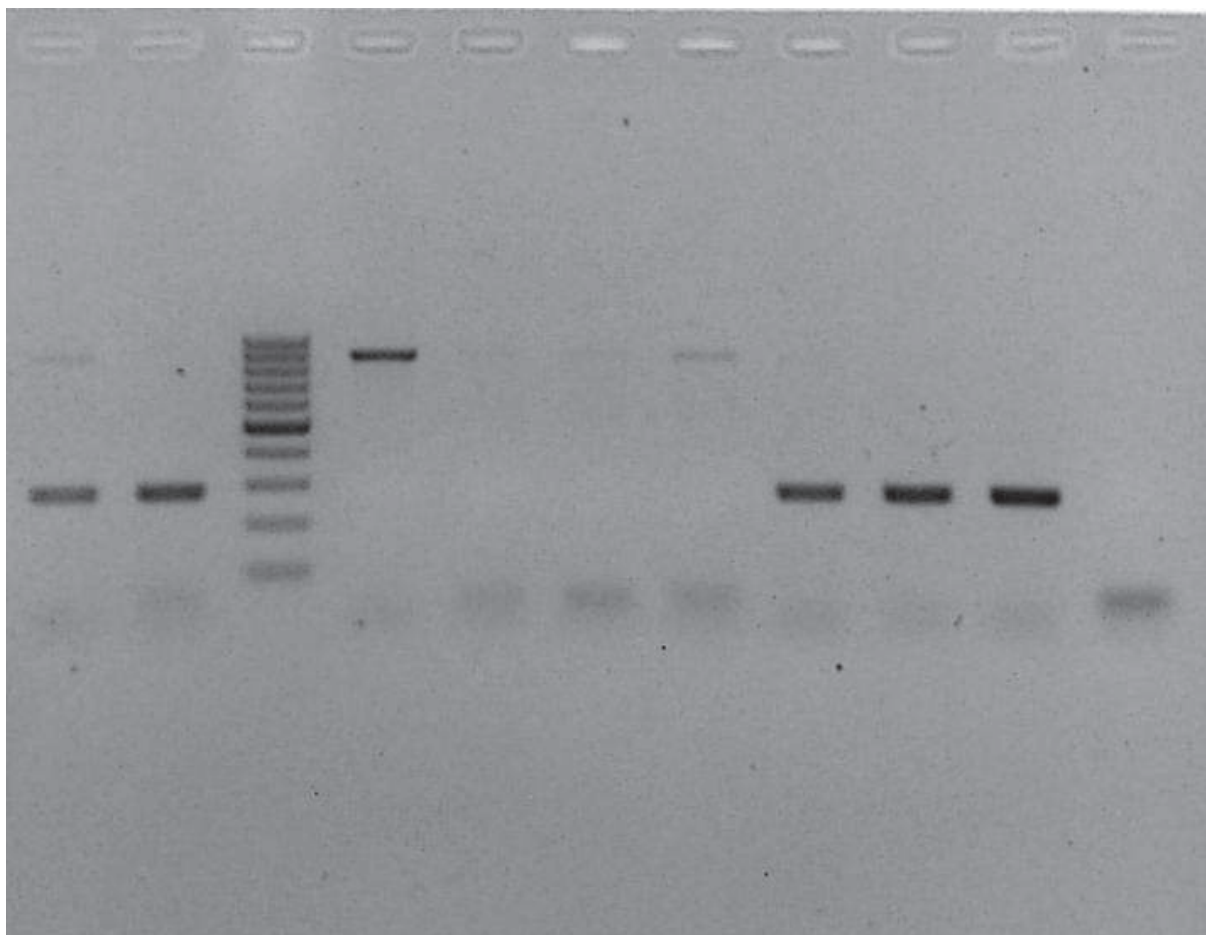
	PCR-	PCR+
Kor	6-15 év (m9,4; sd3,25)	4-12 év (m6,75; sd3,77)
Ivar	Mén 4 Kanca 2 Herélt 1	Mén1 Kanca 2 Herélt 1
Hasznosítás	Ugróló 7	Ugróló 4

3.táblázat Balaton felvidéken vizsgált lovak adatai

A Kecskeméten vizsgált 16 ló közül, 4 (25%) egyedből (m6,25év; sd1,5év) mutattuk ki a vírust (4. táblázat, 4. ábra). NS mintákból 4 (25%), míg PBL mintákból egyszer sem sikerült kimutatni a vírus nukleinsavát.

4. táblázat A Kecskeméten vizsgált lovak adatai

	PCR-	PCR+
Kor	3-9 év (m5,16; sd1,6)	5-8 év (m6,25; sd1,5)
Ivar	Kanca 6 Herélt 6	Herélt 4
Hasznosítás	Ugróló 12	Ugróló 4

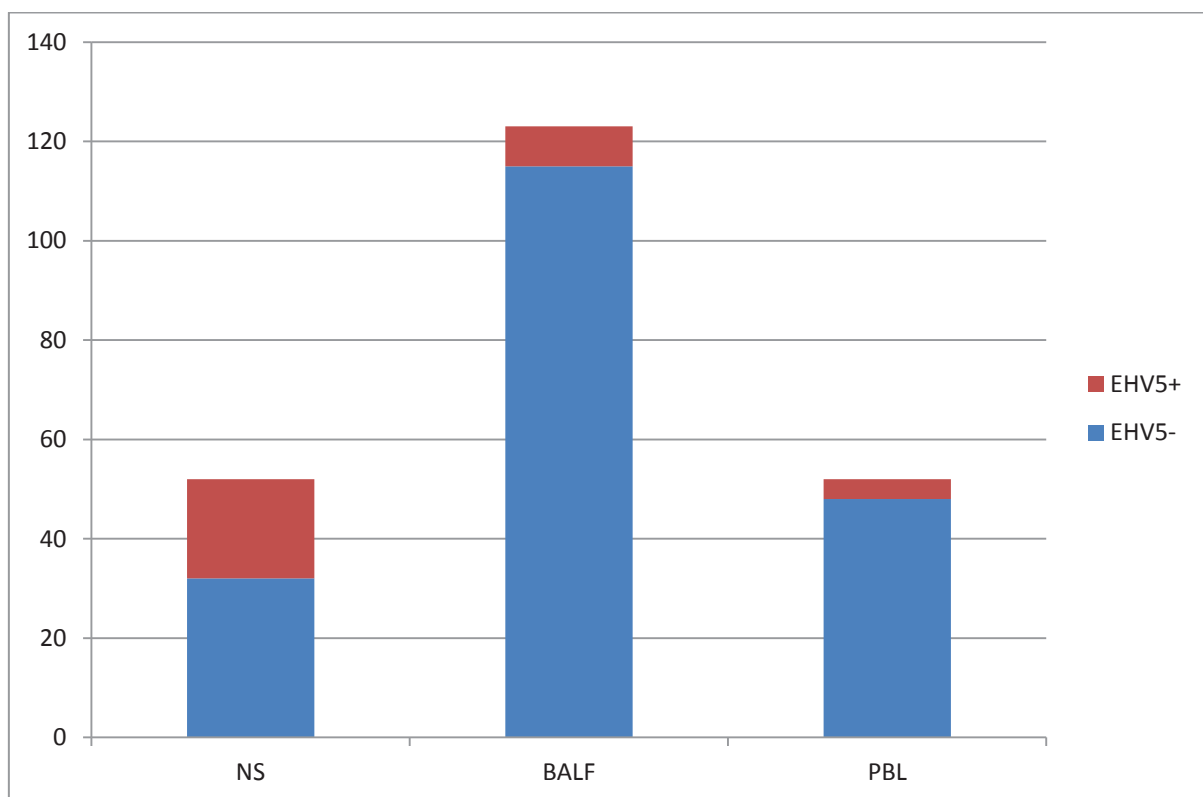


4. ábra A Kecskeméten vizsgált lovak PCR eredményei. 4-7. oszlop: negatív vizsgálati minta; 1,2,8,9-es oszlop: pozitív vizsgálati minta; 3.oszlop: molekulatömeg marker; 10-es oszlop: pozitív kontroll; 11-es oszlop: negatív kontroll

Összesen 87 állattól gyűjtöttünk BALF mintákat; 36 lótol egyenként NS, PBL, és BALF mintákat; 16 egyedből egyenként NS és PBL mintákat. A kutatásban résztvevő 139 állatból 24 (17,3%) esetben került kimutatásra az EHV-5 nukleinsava, legalább a vizsgák minták egyikéből (5. táblázat). Az orrtampon minták esetében 20/52 (38,5%), a PBL minták esetében 4/52 (7,7%), míg a BALF mintáknál 8/123 (6,5%) volt pozitív (5. ábra). A pozitív csoportból 11 (45,8%) mutatott krónikus légzőszervi tüneteket. Az EMPF-el diagnosztizált lovak BALF mintája minden esetben EHV-5 pozitív volt.

5. táblázat A kutatásban résztvevő lovak adatai

	PCR-	PCR+
Kor	3-25 év (m9,7; sd5)	4-15 év (m8,13; sd3,46)
Ivar	Mén 30 Kanca 36 Herélt 49	Mén 5 Kanca 9 Herélt 10



5. ábra A vizsgált minták és a pozitív eredmények egymáshoz viszonyítottan

6. Megbeszélés

Az equid herpesvirus 5, 1970-es leírását követően a világ számos országában intenzíven kutatott vírussá vált. Kimutatásra került mind egészséges, mind pedig légzőszervi betegségekben szenvedő lovakból vett mintákban (Fortier et al. 2010). Több európai országban tanulmányozták kórtani szerepét, valamint ló állományokban való elterjedését. Előfordulási gyakorisága nagyon változékony, 0-tól akár 100%-ig terjedő prevalencia is tapasztalható a populáció földrajzi elhelyezkedéstől, a vizsgált korcsoportoktól, valamint a vizsgált minták típusától függően (Dunkel, 2012). Fialat versenylovakból származó légzőszervi váladékok vizsgálata során 2006-ban az Egyesült Államokban, az EHV-5 64% előfordulási gyakoriságát tapasztalták a vizsgált populációban (Bell et al., 2006). Hazánkban 2002-ben zajlottak az EHV- elterjedtségére irányuló kutatások, melyek során a vizsgált arab telivér csikók 15% bizonyult fertőzöttnek (Nordengrahn et al., 2002).

Céljaink között szerepelt, hogy felmérjük az EHV-5 különböző magyarországi lóállományokban való elterjedtségét. A kecskeméti, valamint szilvásváradai állományok esetében, a mintagyűjtések azonos helyen tartott, megegyező fajtájú és ismert hasznosítású állatokból történtek, így két homogén populációt vizsgálhattunk.

A Kecskeméten vizsgált német vérvonalú állomány 16 egyedéből 4 (25%) egyed bizonyult fertőzöttnek. A magasabb előfordulás kialakításában feltehetően szerepe volt annak, hogy ezek a lovak rendszeresen részt vettek díjugrató versenyeken, ahol nagyobb eséllyel találkozhattak vírushordozó állattal. A szállítás és a verseny stressz eredményeképpen időlegesen kialakuló immunszuppresszió, fogékonyabbá teszi az adott állatot a fertőzéssel szemben. Érdeemes megjegyezni, hogy korábban az Üllői Nagyállatklínikára érkező, EHV-5-tel fertőzött és légzőszervi tüneteket mutató 2 ló is ebből az állományból származott.

A Szilvásváradai Állami Ménesgazdaság ménésének vizsgálata során, a szakirodalomban fellelhető (60% Marenzoni et al., 2010; 51,1% Rushton et al., 2012), lipicai ménésekben végzett felmérésekhez képest alacsonyabb, 35%-os prevalenciát tapasztaltunk.

A kutatás során vizsgált állományokhoz képest, a Nagyállatklínikára érkező beteg lovak között, a vírus előfordulása alacsonynak mondható.

Saját felméréseink során az összes vizsgált ló közül 24 (17,3%) esetben került megerősítésre az EHV-5-tel való fertőzöttség. Eredményeink arra utalnak, hogy az EHV-5 viszonylag széles körben fordul elő a hazai lóállományokban. Az equid herpesvirus 5 nukleinsava jóval többször került kimutatásra az NS mintákból, mint a PBL és BALF mintákból, emiatt úgy véljük, hogy az EHV-5-tel való fertőzöttség megállapítására, az

orrtampon mint a legalkalmasabb, hiszen legnagyobb eséllyel ebből tudjuk kimutatni a vírust, nem invazív, költséghatékony, valamint rendkívül egyszerűen véghezvihető a mintavétel, a bronchoalveolar lavage kivitelezésével szemben.

A lovak pulmonáris fibrózisa, egy progresszív lefolyású, sorvasztó betegség, mely teljesítménycsökkenéshez, és rendszerint az érintett egyed elhullásához vezet. Régóta feltételezik, hogy a pulmonáris fibrózisok kialakításában szerepet játszanak különböző vírusfertőzések. Emberekben az Epstein-Barr vírus az idiopátiás tüdőfibrózissal, míg 2007-óta az equid herpesvirus 5, a lovak multinoduláris tüdőfibrózisával lett összefüggésbe hozva (Williams et al., 2007). A szakirodalomban eddig leírt EMPF-es esetek mindegyikéből kimutatásra került az EHV-5. *In situ* hibridizációs technikával, a virális genom kizárólag az érintett tüdő területekről volt kimutatható (Dunkel, 2012; Williams et al., 2007).

Az általunk vizsgált 5 EMPF-es állat mindegyikéből BALF mintákat vettünk, és azokból minden esetben kimutatásra került az EHV-5 nukleinsava. Az EHV-5 nukleinsavának jelenléte a BALF mintákban szignifikáns összefüggést mutatott az EMPF diagnózisával (Fisher teszt, $P < 0,001$). Ezek alapján úgy véljük, hogy az EMPF diagnózisának felállítása során, az EHV-5 jelenlétének vizsgálata BALF mintákban elengedhetetlen.

Az EMPF kialakításában az EHV-5 fertőzöttségen kívül valószínűleg más tényezők is közrejátszanak, hiszen a vírus igen változatos, és olykor magas prevalenciával fordul elő különböző állományokban. Eredményeink azt a hipotézist támasztják alá, miszerint szükséges valamilyen genetikai, vagy környezeti hajlamosító tényező az EMPF kialakulásához (Tang et al., 2003). A három igazolt EMPF-es állat közül, két egyed nagyon közeli rokonságban állt egymással. Az érintett állatok mindegyike rendszeresen versenyző ugróló volt. Az intenzív használat, az állatok gyakori szállítása, nagyobb érintettséget feltételez.

Hangsúlyozandó hogy ezen eredmények alapján nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket az equid herpesvirus 5-nek a lovak multinoduláris tüdőfibrózisának kialakításában betöltött kórtani szerepével kapcsolatban, hiszen nem rendelkezünk megfelelő számú EMPF-es esettel. A vírus pontos szerepének tisztázása érdekében a jövőben további kutatások szükségeltetnek. Célszerű lenne összehasonlítani az EMPF-es lovakból származó vírusok genetikai anyagát, annak érdekében, hogy felderítsük az esetleges összefüggéseket a különböző vírustörzsek, és az EMPF kialakulása között.

Érdeemes lenne vizsgálni az EHV-5 elterjedtségét orrtampon minták alapján a hazai nagyobb létszámú lóállományokban, hogy még pontosabb képet kaphassunk a vírus magyarországi előfordulásával kapcsolatban.

7. Összefoglalás

Az equid herpesvirus-5 egyike a lóféléket természetes körülmények közt fertőzni képes herpesvirusoknak. Az EHV-5 a Gammaherpesvirinae alcsalád, azon belül is a Percavirus nemzetség tagja. A Herpesviridae családba tartozó vírusok, több, állategészségügyileg jelentős betegségek okozói felnőtt és fiatal lovakban, előfordulásuk gyakori, valamint a világon széles körben elterjedtek. Mindezekkel szemben az EHV-5 előfordulásáról továbbá potenciális kórtani szerepéről hiányosak eddigi ismereteink. Az EHV-5 első izolálására 1970-ben, Ausztráliában, karanténban lévő, légzőszervi tüneteket mutató lovakból került sor. Ezt követően, különösen az elmúlt húsz évben, számos alkalommal kimutatásra került szerte a világon egészséges és klinikai tüneteket mutató lovakból. Az elmúlt évek kutatásaira alapozva, valószínűsíthető, hogy összefüggés van az EHV-5 fertőzés, valamint egy nemrégiben leírt betegség, a lovak multinoduláris tüdőfibrózisának (EMPF) kialakulása között. Kutatásunk célja az volt, hogy felmérjük az EHV-5 előfordulását különböző magyarországi ló- állományokban, valamint hogy kimutassuk a vírust egészséges és légzőszervi tüneteket mutató lovakból származó mintákban. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) mintákat gyűjtöttünk a SzIE ÁOTK Nagyállatklinikájára kivizsgálásra érkező 92 lóból (5 esetben orrtampon és vérmintákat is), továbbá orrtampon, vér és BALF mintákat gyűjtöttünk 20 Lipicai lóból; orrtampon, vér és BALF mintákat 11 sportló fajtájú ugrólóból; továbbá orrtampon és vérmintákat 16 ugrólóból. Az EHV-5 nukleinsavának jelenlétét polimeráz láncreakció (PCR) segítségével, vírus specifikus primerek felhasználásával vizsgáltuk. A kutatásba összesen 139 lovat vontunk be, ezek közül 24-ben (17.3%) kimutatásra került az EHV-5 nukleinsava. A pozitív csoportból 11 (45.8%) mutatott krónikus légzőszervi tüneteket, három esetben a kórszövetteni eredményekre, tüdő biopsziára, valamint post- mortem szövetmintákra alapozva bizonyítottan EMPF, két esetben a mellkasi ultrahang leletekre, EHV-5 pozitivitásra valamint intracelluláris zárványokra alapozva, feltételezhetően szintén EMPF volt a tünetek hátterében. A vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az EHV-5 viszonylag széles körben fordul elő a hazai lóállományokban. Az EMPF kialakulásának hátterében viszont a vírushelyettesítése mellett további faktorok szükségessége is feltételezhető.

8. Summary

Equid herpesvirus 5 (EHV-5) is one of the eleven herpesviruses that have the potential to naturally infect equids. EHV-5 belongs to the Gammaherpesvirinae subfamily as a member of the Percavirus genus. A group of viruses from the Herpesviridae family are well known pathogens causing very severe diseases both in adult and young horses, they occur frequently and have a worldwide distribution, in contrast the occurrence and the potential pathogenic role of EHV-5 is still undefined. EHV-5 was first isolated from horses in quarantine in 1970 Australia, with clinical signs of upper respiratory tract disease. Since then EHV-5 has been detected in healthy and clinically affected horses from all over the world, but more recently in the past twenty years. Based on recent studies there is also increasing evidence that there is a strong association between EHV-5 infection and the development of a newly described disease called equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF). The aim of our study was to estimate the prevalence of EHV-5 in Hungarian horse populations, and to detect the virus in samples from both healthy and clinically affected horses. We have collected 92 bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples (in 5 cases nasal swabs and PBL samples also) from horses referred to the University's Large Animal Clinic, nasal swabs peripheral blood leukocyte (PBL) and BALF samples from a herd of 20 Lippizaners, nasal swabs PBL and BALF samples from 11 mixed breed show jumping horses, nasal swabs and PBL samples from a group of 16 warmblood show jumping horses. We have investigated the presence of EHV-5 nucleic acid in these samples by polymerase chain reaction (PCR) with the use of virus specific primers. Altogether 139 horses were involved in the study, and in 24 (17.3%) horses equid herpesvirus-5 nucleic acid was identified in at least one of the investigated samples. From the positive group 11 (45.8%) horses had chronic respiratory signs, three of them were diagnosed with EMPF based on histologic results of lung biopsy specimens or post-mortem tissue samples. Two other horses suffered of suspected EMPF based on thoracic radiography with nodular interstitial pattern, EHV-5 positivity and intranuclear inclusion bodies. The results of the study indicate that EHV-5 is relatively widespread in Hungary. In the background of EMPF, however, further factors besides EHV-5 infection may play significant role.

9. Irodalomjegyzék

- Agius, C.T., Nagesha, H.S., Studdert, M.J., (1992). Equine herpesvirus 5: comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure. *Virology* 191, 176–186.
- Banks, T.A., Rouse, B.T., (1992). Herpesviruses-immune escape artists? *Clinical Infectious Diseases* 14, 933–941.
- Bell, S.A., Balasuriya, U.B., Nordhausen, R.W. and MacLachlan, N.J. (2006b) Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *J. vet. Diagn. Invest.* 18, 472-475.
- Browning, G.F., Studdert, M.J., (1987b). Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *Journal of General Virology* 68. 1441-1447.
- Caswell, J.L. and Williams, K.J. (2007) Respiratory system. In Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Ed M. G. Maxie. Elsevier Saunders. pp 564-570
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171–177.
- de Wall Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., TeVelde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J.E., (1991). Interleukin10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174, 915–924.
- Dunkel, B. (2012), Pulmonary fibrosis and gammaherpesvirus infection in horses. *Equine Veterinary Education*, 24: 200–205. doi: 10.1111/j.2042-3292.2011.00340.x
- Dunowska, M., Meers, J. and Wilks, C.R. (1999) Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand. *N. Z. vet. J.* 47, 44-46.

- Dunowska, M., Wilks, C.R., Studdert, M.J., Meers, J., (2002a). Equine respiratory viruses in foals in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 50, 140–147.
- Fortier, G., Pronost, S., Mischczak, F., Fortier, C., Leon, A., Richard, E., Van Erck, E., Thiry, E. and Lekeux, P. (2009) Identification of equid herpesvirus- in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Vet. J.* 182, 346-348.
- Fortier, G., van Erck, E., Pronost, S., Lekeux, P. and Thiry, E. (2010) Equine gammaherpesviruses: pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Vet. J.* 186, 148-156.
- Franchini, M., Akens, M., Bracher, V. and von Fellenberg, R (1997) Characterisation of gamma herpesviruses in the horse by PCR. *Virol.* 238, 8-13.
- Fu, Z.F., Robinson, A.J., Horner, G.W., Dickinson, L.G., Grimmett, J.B., Marshall, R.B.,(1986). Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection. *New Zealand Veterinary Journal* 34, 152–155.
- Hart, K.A., Barton, M.H., Williams, K.J., Flaminio, M.J.B. and Howerth, E.W. (2008) Multinodular pulmonary fibrosis, pancytopenia and equine herpesvirus-5 infection in a Thoroughbred gelding. *Equine vet. Educ.* 20, 470-476.
- Hartley, C.A., Dynon, K.J., Mekuria, Z.H., El-Hage, C.M., Holloway, S.A., Gilkerson, J R., (2013) Equine gammaherpesviruses: Perfect parasites? *Veterinary Microbiology*, Available online 19 June 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.031>
- Herder, V., Barsnick, R., Ealliser, U., Teifke,j.-P.,König, P., Czerwinski, G., Hansmann, F., Baumgartner, E., Hewicker-Trautwein, M., (2012). Equid herpesvirus 5-associated dermatitis in a horse-Resembling herpes-associated erythema multiforme *Veterinary Microbiology* 155 (2012) 420-424
- Holloway, S.A., Lindqueter, G.J., Studdert, M.J. Drummer, H.E., (2000). Analysis of equine herpesvirus 2 strain variation using monoclonal antibodies to glycoprotein B. *Archives of Virology* 145, 1699–1713.

- Kubiski, S.V., Rech, R.R., Camus, M.S., Pellegrini-Masini, A., Elfenbein, J.R. and Howerth, E.W. (2009) Pathology in practice. Interstitial pneumonia with fibrosis and intranuclear inclusion bodies. *J. Am. vet. med. Ass.* 235, 381-383.
- Marenzoni, M.L., Coppola, G., Maranesi, M., Passamonti, F., Cappelli, K., Capomaccio, S., Verini Supplizi, A., Thiry, E. and Coletti, M. (2010) Age-dependent prevalence of equid herpesvirus 5 infection. *Vet. Res. Commun.* 34, 703-708.
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J., Davison, A.J., (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research* 117, 90–104. established pulmonary fibrosis in a murine model by gammaherpesvirus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177, 771-780.
- McMillan, T. R., Moore, B. B., Weinberg, J. B., Vanella, K. M., Fields, W. B., Christensen, P. J., Van Dyk, L. F., Toews, G. B. (2008) Exacerbation of
- Mora, A.L., Woods, C.R., Garcia, A., Xu, J., Rojas, M., Speck, S.H., Roman, J., Brigham, K.L., Stecenko, A.A., (2005). Lung infection with gamma-herpesvirus induces progressive pulmonary fibrosis in Th2-biased mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 289, 711–721.
- Neubauer A, Braun B, Brandmuller C, Kaaden OR, Osterrieder N (1997) Analysis of the contribution of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology* 227: 281-294
- Niedermaier, G., Poth, T. and Gehlen, H. (2010) Clinical aspects of multinodular pulmonary fibrosis in two warmblood horses. *Vet. Rec.* 166, 426-430.
- Nordengrahn, A., Merza, M., Ros, C., Lindholm, A., Palf, V., Hannant, D. and Belak, S. (2002) Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. *Vet. Res.* 33, 251-259.
- Pereira L (1994) Function on glycoprotein B homologues of the family Herpesviridae. *Infect Agents Dis* 3: 9-28
- Doran, P., Egan, J., (2005) Herpesviruses: a cofactor in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular*

- Poth, T., Niedermaier, G. and Hermanns, W. (2009) Equine multinodular pulmonary fibrosis in association with an EHV-5 infection in 5 horses. *Wien Tierarztl Mschr. – Vet. med. Aust.* 96, 203-208.
- Richter, N., Ebert, M., Borchers, K., (2009) Prevalence of EHV-2 and EHV-5 DNA in ocular and nasal swabs as well as peripheral blood mononuclear cells. *Pferdeheilkunde*25, 38-44.
- Robinson, N.E., Karmaus, W., Holcombe, S.J., Carr, E.A. and Derksen, F.J. (2006) Airway inflammation in Michigan pleasure horses: prevalence and risk factors. *Equine vet. J.* 38, 293-299.
- Rushton J.O., Kolodziejek J, Tichy A, Nell B, Nowotny N. Detection of equid herpesviruses 2 and 5 in a herd of 266 Lipizzaners in association with ocular findings. *Vet Microbiol.* 2013 May 31;164(1-2):139-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.035. Epub 2013 Feb 4.
- Schwarz, B., Gruber, A., Benetka, V., Rütgen, B., Schwendenwein, I., Leidinger, E. and van den Hoven, R. (2012a) Concurrent T cell leukaemia and equine multinodular pulmonary fibrosis in a Hanoverian Warmblood mare. *Equine vet. Educ.* Epub ahead of print; doi: 10.1111/j.2042-3292.2011.00257.x.
- Schwarz, B., Schwendenwein, I. and van den Hoven, R. (2012b) Successful outcome in a case of equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) treated with valacyclovir. *Equine Vet. Edu.* Article first published online: 18 June 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2012.00425.x.
- Schwarz, B., Klang, A., Bezdekova, B., Sárdi, S., Kutasi, O., Hoven, R., (2013) Equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF): five case reports. *Acta Vet Hung* 2013 Sep;61(3):319-32. doi: 10.1556/AVet.2013.024.
- Stoolman, J.S., Vannella, K.M., Coomes, S.M., Wilke, C.A., Sisson, T.H., Toews, G.B. and Moore, B.B. (2011) Latent infection by gammaherpesvirus stimulates profibrotic mediator release from multiple cell types. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300, L274-L285.

- Studdert, M.J., (1996). Equine herpesvirus 2 and disease. *Equine Veterinary Journal* 28, 426–428.
- Tang, Y.W., Johnson, J.E., Browning, P.J., Cruz-Gervis, R.A., Davis, A., Graham, B.S., Brigham, K.L., Oates, J.A., Jr, Loyd, J.E. and Stecenko, A.A. (2003) Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. clin. Microbiol.* 41, 2633-2640.
- Torfason, E.G., Thorsteinsdottir, L., Torsteinsdottir, S. and Svansson, V. (2008) Study of equid herpesviruses 2 and 5 in Iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Res. vet. Sci.* 85, 605-611.
- Turner, A.J., Studdert, M.J., (1970). Equine herpesviruses. 3. Isolation and epizootiology of slowly cytopathic viruses and the serological incidence of equine rhinopneumonitis. *Australian Veterinary Journal* 46, 581–586.
- Vannella, K.M. and Moore, B.B. (2008) Viruses as co-factors for the initiation or exacerbation of lung fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 1, 2.
- Wang, L., Raidal, S.L., Pizzirani, A., Wilcox, G.E., (2007) Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Veterinary Microbiology* 121, 18–28.
- Wang, L., (2003) An investigation of the association between herpes viruses and respiratory disease in racehorses in Western Australia. Murdoch University PhD Thesis, Perth, Australia.
- Wilks, C.R., Studdert, M.J., (1974). Equine herpesviruses. 5. Epizootiology of slowly cytopathic viruses in foals. *Australian Veterinary Journal* 50, 438–442.
- Williams, K.J., Maes, R., Del Piero, F., Lim, A., Wise, A., Bolin, D.C., Caswell, J., Jackson, C., Robinson, N.E., Derksen, F., Scott, M.A., Uhal, B.D., Li, X., Youssef, S.A. and Bolin, S.R. (2007) Equine multinodular pulmonary fibrosis: a newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease. *Vet. Pathol.* 44, 849-862.
- Wong, D.M., Belgrave, R.L., Williams, K.J., Del Piero, F., Alcott, C.J., Bolin, S.R., Marr, C.M., Nolen-Walston, R., Myers, R.K. and Wilkins, P.A. (2008) Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. *J. Am. vet. med. Ass.* 232, 898-905.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a dolgozat elkészítése során nyújtott segítséget témavezetőimnek, Dr. Korbacska-Kutasi Orsolyának és Dr. Bakonyi Tamásnak.

Nagyon hálás vagyok a labormunka során nyújtott rengeteg segítségért Dr. Forgách Petrának, valamint Bakonyi Győzőnek.

Külön köszönettel tartozok Dallos Andornak, a Szilvásvárad Állami Ménesgazdaság igazgatójának, a vizsgálatok során nyújtott közreműködésért.

Szeretnék köszönetet mondani a folyamatos biztatásért és támogatásért Hevér Dórának. A kutatás részben a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0011 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” c. pályázat támogatásával valósult meg.