

Viroológia és immunológia

A szekcióba 6 előadást jelentettek be. A társelnökök BAKONYI TAMÁS és HARRACH BALÁZS voltak.

Az első előadást DÉNES LILLA tartotta BIKSI IMRE, BÁLINT ÁDÁM, RÁCZ BENCE, ALBERT MIHÁLY és BALKÁ GYULA társszerzőkkel „Atipikus sertés-pestivírus kimutatása és genetikai jellemzése Magyarországon” címmel. Ez a vírus (atypical porcine pestivirus, APPV) egy nemrégiben, újgenerációs szekvencia-meghatározás módszerével azonosított, a *Pestivirus* nemzetséghez tartozó kórokozó, amelyet egyértelműen összefüggésbe hoztak a malacok A-II-es típusú reszketőkórával (Congenital Tremor, CT). A vírust azonosították már az USA-ban, Európában, Ázsiában és Dél-Amerikában is. A kutatás célja a hazánkban eddig ismeretlen sertésvírus elterjedtségének feltérképezése, filogenetikai elemzések segítségével az itthoni és külföldi törzsek összehasonlítása, és a fertőzött állományokban az egyes korcsoportok érintettségének és fertőzőképességének felderítése volt, továbbá egy RNS-alapú *in situ* hibridizációs technika (RNAscope-eljárás) adaptálása a vírus szöveti elváltozásokban való kimutatására. A diagnosztikai RT-PCR-vizsgálatokat a reszketőkór tüneteit mutató, újszülött malacok agyvelőmintáin végezték, és pozitív minták esetében a vírus NS2 és NS3 régióját is meghatározták. Az így kapott szekvenciákat összehasonlították egymással és a génbankban talált szekvenciákkal. RNAscope-módszer segítségével, valamint transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal megkísérelték a vírus szövetekben, sejtekben való eloszlásának kimutatását is. A vírust hat hazai telepről származó, 24 mintában mutatták ki, nyolc esetben végeztek részleges szekvencia-meghatározást az NS2 és NS3 génszakaszon. A szekvenciák filogenetikai elemzése alapján azok három jól elkülönülő csoportba illeszkedtek. RNAscope-módszerrel a vírust kimutatták reszketőkóros malacok kis- és nagyagyvelő-mintáiban is. Az eddigi filogenetikai elemzések alapján elmondható, hogy a magyarországi vírustörzsek különálló leszármazási vonalakba tartoznak, jelentős hasonlóságot mutatnak osztrák és spanyolországi törzsekkel, így feltételezhető, hogy a vírus több forrásból került az országba. Az előadást követő vita során tisztázódott, hogy a mintákból nem került sor a vírus izolálására, valamint, hogy más kórokozó is felmerülhet-e a reszketőkór kóroktanában. Fontos szempont, hogy minden vizsgált, reszketőkóros malac mintájából ki tudták mutatni az APPV-t, egészségesekből (tünetmentes állatokból) viszont nem, ezért erős korreláció feltételezhető a vírus jelenléte és a betegség megjelenése között. Szerológiai módszerekkel viszont

az utóbbiakban is igazolható a fertőződés. Remélhetőleg az APPV-fertőzöttség miatt kialakuló szeropozitivitás nem okoz keresztreakciót a klasszikus sertéspestis vírus elleni ellenanyagok jelenlétére irányuló próbákban.

A következő előadó MÁTÉ LILLA volt, társszerzője pedig jelen összefoglaló szerkesztője, KAJÁN Győző. Az előadás a „Vadmadár eredetű adenovírus törzsek molekuláris tipizálása” címet viselte. A vadmadár eredetű adenovírusok változékonyságának feltérképezése a mai napig kiaknázatlan lehetőségeket rejtő területe a virológiának. Kutatásunk során a magyarországi vadmadár-populáció fertőzöttségének monitorozását tűztük ki célul, ill. később chilei királypingvinekből (*Aptenodytes patagonicus*) származó minták vizsgálatát is elvégezhetjük, ami főként azért érdekes, mert bár pingvinekből mutattak már ki adenovírust, az említett fajból egyelőre még nem rendelkezünk adatokkal. A mintákban az adenovírusok kimutatására kétkörös polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. A kimutatott pingvin-adenovírus esetében a szialidáz-gén meglétét is vizsgáltuk, ill. a fajon belüli tipizálásra a fő kapszidfehérje, a hexon génjének egy részletét is felerősítettük. Vizsgálataink során a 38 mintából mindössze kettő adott pozitív eredményt: egy léprigó (*Turdus viscivorus*) és egy királypingvin. A származtatott részleges DNS-polimeráz aminosav-szekvenciák elemzése szerint a léprigóból kimutatott adenovírus minden eddig leírt fajtól 15% fölötti eltérést mutat, ezért azt feltételezzük, hogy az *Aviadenovirus* nemzetségen belül egy új fajt képviselhet. Az általunk leírt pingvin-adenovírus ugyanazon génszakasz vizsgálata szerint a *Pingvin siadenovirus A* fajba tartozik, de a hexon elemzése alapján, azon belül egy különálló, új típusba sorolhatjuk. Munkahipotézisünk, amely a pingvin-adenovírusok hexonfehérjéinek összehasonlító filogenetikai vizsgálatán alapul, öt monofiletikus klád, azaz öt vírustípus elkülönülését valószínűsíti a fajon belül. Megerősítettük továbbá, hogy a pingvin-siadenovírusok nem rendelkeznek a génusz névadó jellegzetességével, a szialidáz génnel. A vita során a virális szialidáz gén méretéről és szerepéről beszélgettek a hallgatók az előadóval.

A harmadik előadást SZILASI ANNA tartotta „Macska-retrovírusok *in situ* hybridizációs vizsgálata” címmel, társszerzői DÉNES LILLA, BALKA GYULA és TALITA RESENDE voltak. A macskák retrovírusok által okozott fertőzései közül a leukaemia-vírus (feline leukaemia virus, FeLV) és a macska immunhiány vírusa (feline immunodeficiency virus, FIV) okozza világszerte a legnagyobb károkat. Korábban a FeLV-fertőzéshez köthető betegségek okozták a házi macskák körében a legtöbb elhullást, ez mára némileg csökkent. A FIV jelenleg is számos kuta-

tás tárgyát képezi, mint az emberi immunhiány vírusának (human immunodeficiency virus, HIV) modellje, mivel sok vonatkozásban nagyon hasonló tulajdonságokat mutatnak. A kutatás korábbi eredményeire építve a szerzők célja a kórbonctani tanszékre beérkezett, az említett vírusokkal fertőzött macskák szerveinek kórsvetettani vizsgálata volt. A kórelőzmény vagy a kórbonctani vizsgálat során FeLV- és/vagy FIV-fertőzésre gyanús macskákból először diagnosztikai PCR-vizsgálatokat végeztek. Amennyiben a fertőzésről megbizonyosodtak, a paraffinba ágyazott mintákon a már az első előadásban is említett RNS-alapú *in situ* hybridizációs (RNAscope®) vizsgálatokat kíséreltek meg. A módszer a korábbi *in situ* hybridizációs vizsgálatoktól annyiban tér el, hogy annál sokkal érzékenyebb, és kevesebb ún. háttérzajjal működik. Ezt a megnövekedett érzékenységet és specifitást az teszi lehetővé, hogy a célzott RNS-szakaszhoz két, egymástól független próbának kell tudnia kapcsolódnia egymás mellett egy időben, hogy a későbbi amplifikáció létrejöhessen. Ezek a próbák „Z” alakúak, alsó részük 18–25 bázispár (bp) nagyságú, komplementer a célzott RNS-szakasszal, felső részük 14 bp hosszúságú. A dupla kapcsolódásnál 28 bp hosszúságú szakaszt nyerünk, ahova az „L” alakú molekulák tudnak kötődni. Ez utóbbiakhoz később további, immár kromogén enzimmel jelölt próbák kapcsolódnak, így annál erősebb jelet kapunk, minél több „Z” próba kötött be a célzott RNS-szakaszra. Ezeket a jeleket, valamint ezek kiterjedését és erősségét fénymikroszkóppal lehet vizsgálni. Ennek a módszernek az előnye, hogy akár egyetlen keresett RNS-molekulát képes kimutatni az amplifikáció által. A kutatás fő célja, hogy feltérképezzék a FeLV és a FIV által fertőzött sejtek megoszlását, típusát a különböző szöveteken belül, ezzel hozzájárulva a vírusok patomechanizmusának vizsgálatához. A szerzők további célja összehasonlítani a különböző vizsgálati módszereket (ELISA, PCR, *in situ* hybridizáció), azok használhatóságát a klinikai munkában és kutatásban. Az előadást követően az RNAscope-eljárás további felhasználási lehetőségeiről (pl. DNS-vírus, provírus kimutatása, többféle nukleinsav szimultán kimutatása és elkülönítése) folyt eszmecsere. A kutatócsoport együttműködést ajánlott fel az érdeklődők számára a módszer alkalmazására.

Ezután VALKÓ ANNA tartott előadást „A transzmisszibilis gastroenteritis szerológiai felmérése Magyarországon” címmel, társszerzői TUBOLY TAMÁS, DÁN ÁDÁM, URSU KRISZTINA, BÁLINT ÁDÁM valamint CSÁGOLA ATTILA voltak. A sertésstartásban az egyik leggyakrabban jelentkező és jelentős gazdasági veszteséget okozó hasmenés hátterében a régóta felfedezett transzmisszibilis gastroenteritis vírusa (TGEV) is állhat. Ugyanakkor, az általa okozott klinikai megbetegedés

Európa-szerte szórványossá vált, amely a légzőszervi coronavirus (PRCV) megjelenésével hozható összefüggésbe. Utóbbi általában tünetmentes fertőzést okoz, de a kialakuló keresztreakció miatt a TGEV ellen is védettséget indukál. A szerzők előzetes vizsgálatainak során tizenhárom sertéstelepről származó összesen 296 bélsárminta mindegyike negatívnak bizonyult TGEV-re, amely alapján a kórkép kialakulását megakadályozni képes, nagymértékű szerológiai áthangoltságot feltételeztek. Ezen hipotézis igazolására országos szintű felmérést végeztek. A sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) elleni mentesítésre küldött szérummintákból összegyűjtötték 93 telep, főként kocákból származó, 908 mintáját, valamint kiválasztottak egy korábbi vizsgálatból származó 174 mintát, melyek egy Heves megyei telepről származtak és több korosztályt (2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60, 90, 120, 150 napos sertések és kocák) is lefedtek. A 2013-ban Magyarországon izolált TGEV újbóli elszaporítása és a vírustiter meghatározása után a vírust sertésherejeteiken indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatra alkalmas szövettenyésztő lemezekre fixálták, amelyeken minden szérummintát kvalitatív módon teszteltek. A Heves megyei telep pozitív savómintáit titrálással is vizsgálták. A 93 telep szérummintái közül összesen 140 minta bizonyult pozitívnak. Ezek 41 telepről származtak és csak egyetlen esetben fordult elő, hogy az egy telephez tartozó összes minta pozitív eredményt adott. A Heves megyei telep 174 mintája közül 31 volt pozitív, korosztály szerint a következő megoszlásban: 11 db 2 napos, 2 db 7 napos, 5 db 14 napos, 2 db 21 napos, 2 db 35 napos, 1 db 60 napos, 8 db 90 napos. A minták titere jellemzően kicsi volt egy 1 : 4-től 1 : 128-ig terjedő skálán. Ezen eredmények alapján a szerzők azt a következtetést vonták le, hogy eredeti feltevésük nem helytálló, mert a minták csak kis arányú szerológiai áthangoltságot mutatnak, ami nem magyarázza a transzmissziós gastroenteritis klinikai előfordulásának hiányát. A pozitív reakciók sem feltétlenül a TGEV ellen termelt ellenanyagok megjelenésével hozhatók összefüggésbe, a keresztreakáló PRCV szerepének tisztázásához további vizsgálatok szükségesek. Az előadást követő vitában felmerült, hogy a TGEV ragályozó képessége nagy, ezért meglepő a átlagosan csupán 10% körüli szeropozitivitás egy fertőzött állományban. Az előadó válaszában rávilágított, hogy a kutatás során az IgG-választ vizsgálták, de talán az IgA-válasz vizsgálata pontosabb eredményt adott volna. A vitában az is elhangzott, hogy az alkalmazott indirekt immunfluoreszcens eljárás helyett inkább vírusneutralizációs próbával kellett volna vizsgálni a mintákat, mivel az érzékenyebb módszer, amely nagyobb mértékű szeropozitivitást eredményezhetett volna.

Az utolsó előtti előadást BARTSIK ÁGNES tartotta „Sertés-parvovírus (PPV1) specifikus ellenanyagszintek változásának vizsgálata indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel” címmel, társszerzői LŐRINCZ MÁRTA, VALKÓ ANNA, ZÁDORI ZOLTÁN és CSÁGOLA ATTILA voltak. A sertés parvovírus 1 (porcine parvovirus 1, PPV1, *Ungulate parvovirus 1* faj) világszerte, így hazánkban is széles körben elterjedt. Eltérő patogenitású törzseit írták le. A fertőzésnek minden életkorban immunszuppresszív hatása van, ezért a társfertőzések súlyosabb formában jelentkeznek. Szeronegatív előhasi kocákban a fertőzés szaporodásbiológiai zavarokat okoz. A vakcinázásoknak köszönhetően úgy tűnt, a kórokozó visszaszorult, kártételének jelentősége csökkent. Németországban azonban egy olyan, erőteljes patogenitású törzs jelenlétét mutatták ki, amely képes áttörni a vakcinás védelmet. Ezt követően Európa-szerte kimutatták házi és vaddisznóállományokból is. A szerzők célja egy szaporodási zavarokkal terhelt hazai, vakcinázott állományban a PPV1-specifikus ellenanyag szintek alakulásának vizsgálata volt, valamint egy esetlegesen a német törzshöz hasonló törzs jelenlétének kimutatása. A követéses vizsgálatuk során összesen 366 szérummintát vizsgáltak meg. A minták 9 véletlenszerűen kiválasztott kocából és malacokból (mindig ugyanazon állatokból) 9 időpontban kerültek begyűjtésre. A vérvételekre a kocák vemhességi idejének felénél, majd az ellés utáni második napon a malacokkal azonos időpontban, ezt követően a malacokból 1, 2, 3, 4 hetes valamint 2, 3, 4, 5 hónapos korban került sor. A PPV1-specifikus ellenanyagszintek alakulását indirekt immunfluoreszcencia (iIF) és vírusneutralizáció (VN) módszerével egy vakcinatörzset ill. egy németországi törzssel azonos, közép-magyarországi sertésállományból származó vírustörzset alkalmazva vizsgálták. A vizsgálatokkal párhuzamosan sikerült hagyományos PCR-módszerrel a telepről származó elhullott malacok nyirokcsomóiból PPV1-vírust kimutatniuk. A szekvencia meghatározása folyamatban van. Az eredményekből kiderül, hogy a vakcinatörzssel szemben a választási korig megfelelően nagyok az ellenanyagszintek, de két hónapos kortól már fennáll a fertőződés lehetősége, ezért célszerű lenne a malacok 6 hetes korban történő vakcinázását megfontolni. Az összes módszerrel az volt kimutatható, hogy az ellenanyagszintek 2–3 hónapos korra érik el mélypontjukat. Ezt követően 4–5 hónapos korban a titerek enyhén emelkedtek, de nem érték el az egy hónapos korban mért értékeket. A közép-magyarországi törzs esetében mind az iIF-, mind pedig a VN-módszerrel mért értékek jóval elmaradtak a vakcinatörzssel végzett vizsgálat eredményeitől. Ezek alapján kijelenthető, hogy a vizsgált savókban jelen lévő ellenanyagok az PPV1 új variánsát sokkal kisebb hatékonysággal képesek neutralizálni, mint a vakcina-

törzset, ami összhangban van korábbi megfigyelésekkel. A vita során feltett kérdésekre adott válaszokból derült ki, hogy a kilenc koca és öt-öt malacuk ellenanyag-szintje között pozitív korrelációt tapasztaltak. Mivel a vakcinatörzs és az új variáns elleni ellenanyag-szintek között mért különbségek nem számottevőek, további kísérletekkel (pl. vírusneutralizációs próba vagy állatfertőzés) egyértelműsíteni lehetne, hogy vajon a mért ellenanyag-szint-különbségek valóban okoznak-e jelentős különbséget a védettségben. Felmerült annak lehetősége is, hogy az új variáns megjelenése a vakcinázás miatt kialakuló immunszelekciónak köszönhető. Ezért lehetséges, hogy a vakcinázási időpont előbbre hozatala tovább fokozza ennek az immunszelekciónak az esélyét. A kialakuló vita végkövetkeztetése az volt, hogy a vírus immunszuppresszív hatása miatt egy korai vakcinázás hatása összességében még így is pozitív lehet.

Végül az utolsó előadást FELFÖLDINÉ LÉVAI RÉKA tartotta „Az elektroporációs eljárás, mint új oltási technika első hazai alkalmazása állatkísérletekben” címmel. Társ szerzői FÁBIÁN KATALIN, HAJDÚ DOROTTYA, PAUL MCKAY, GABRIELLA SCARLATTI és KULCSÁR GÁBOR voltak. A szerzők a „European AIDS Vaccine Initiative” (EAVI2020) elnevezésű tudományos projekt keretében új oltási technikát próbáltak ki házinyulakon. Az EAVI2020 kilenc ország 23 intézetét egyesíti egy összesen 23 millió euró összköltségvetésű projektben, amelynek célja, hogy megoldást találjon az egész világon 35 millió embert érintő HIV-fertőzésre. Az ún. elektroporációs eljárást hatékonyan alkalmazzák már *in vitro* körülmények között sejtek, baktériumok célzott transzfektálására, azaz DNS/RNS nagyon pontos sejtbe juttatására. A csupasz DNS izomba történő injektálása jól működik egerekben, azonban emberekben az így bejuttatott DNS-ről átíródó antigén nem eléggé immunogén. Az 5 éves projekt céljai között szerepel, hogy a NÉBIH ÁTI gödöllői, zárt állatházában olyan modell állatkísérleteket végezzenek el a szerzők házinyulakon, amelyekben a partnerek által előállított speciális HIV immunogének, mint vakcinajelöltek hatékonysága és ártalmatlansága vizsgálható. Az elektroporációs eljárás kipróbálásá-

val az volt tehát a kutatók célja, hogy a DNS célzott izomba juttatásának sikerét növeljék. Az elektroporációs eljárás során a pulzáló elektromos mezőt használták ki: segítségével ideiglenesen pórusokat nyitottak a célsejt membránjában, ugyanakkor a membrán emellett egy időre a félig áteresztő tulajdonságát is elveszíti. Ez a múló és visszafordítható membránkárosodás lehetővé teszi a plazmid-DNS izomsejt általi felvételét. A kísérletbe 48 db új-zélandi fehér nyulat vontak be, az állatok táplálékhoz és vízhez a kísérlet során *ad libitum* jutottak. A kutatók a plazmid-DNS-ek, a klónozott gének alapján nyolc, egyenként hat egyedből álló csoportot alakítottak ki, a nyolcadik csoportot ún. fehérjekontrollként állították be. Az immunizálás alkalmával, majd a 2., 4., 6., 8., 10., 16., 20. és 22 héten az állatok fülvenájából savókészítés céljából alvadásban nem gátolt vért vettek. A 0., a 4. és a 8. héten a nyulakat elaltatták, majd elektroporációs technikával immunizálták azokat. A 20. héten az ún. booster oltást fehérjékkel, im. végezték el. A kísérletet az előzetes laboratóriumi vizsgálatok eredményeinek ismeretében a 28. héten az állatok exterminálásával zárták. A savókat a londoni Imperial College-ben és a milánói San Raffaele Scientific Institute-ban különböző szerológiai módszerekkel vizsgálják (antigén specifikus ELISA, vírusneutralizációs próba, T-sejt/B-sejt ELISpot). A laboratóriumi vizsgálatok még jelenleg is zajlanak, azonban az előzetes eredmények ígéretesek: az elektroporációs eljárás kimutathatóan fokozta az izomsejtek plazmid-DNS felvételét, ugyanis az eredmények valamennyi vektor-szerkezet esetében az IgG-k mennyiségének folyamatos növekedését mutatják. Az előadást követően az oltás technikai részleteire vonatkozóan kapott kérdést az előadó. Elmondta, hogy az oltás előtt a testtájat leborotválták, és azt csak szemrevételezéssel vizsgálták később, de semmilyen kóros elváltozást nem tapasztaltak, az oltás 4 hét utáni ismétlésekor az előző oltás pontos helye nem volt felismerhető. Ezután felmerült az immunizálás során alkalmazott altatás pontos célja. Az előadó válasza szerint ennek főleg állatjóléti célja volt.

dr. Kaján Győző