

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

**A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi járványtani  
helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek genetikai  
tulajdonságainak vizsgálata**

**PhD értekezés tézisei**

Készítette:

**Dr. Balka Gyula**

**2009**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Prof. Dr. Rusvai Miklós témavezető  
egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani  
Tanszék

.....  
Prof. Dr. Vetési Ferenc  
nyugalmazott egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány kandidátusa  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani  
Tanszék

.....  
Dr. Abonyi Tamás  
PhD, technical manager  
Pfizer Animal Health

## Bevezetés, célkitűzések

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) széles körben elterjedt vírusos megbetegedés, melyet a PRRS vírusa (PRRSV, porcine arterivirus) által okozott fertőzés idéz elő. Nevét onnan kapta, hogy kocákban reprodukciós zavarokat, fiatal állatokban pedig légzőszervi tüneteket idéz elő. Az újszülött, a szopós korú illetve a választott malacokban a megbetegedés önmagában, valamint az általa okozott immunszuppresszió következtében kialakuló másodlagos fertőzések hatására az állat elhullásához vezethet.

A PRRSV a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának *Arterivirus* nemzetségébe tartozik, genomja 15100-15400 nukleotid hosszúságú, pozitív irányítottágú RNS molekula, amely 9 nyitott leolvasási keretből áll. A vírusnak két, genetikailag és antigénszerkezeti is jól elkülöníthető változatát különböztetik meg: az európai (1-es) és az amerikai (2-es) típust, melyek csak mintegy 60-65% azonosságot mutatnak a teljes genom nukleotidsorrendjét tekintve. Korábban úgy tartották, hogy az európai törzsek közelebbi rokonságban állnak egymással, mint az amerikaiak, de nemrégiben kelet-európai, illetve oroszországi törzsek vizsgálatával négy, egymástól genetikailag élesen elkülönülő szubtypust határoztak meg az európai genotípuson belül.

Magyarországon 1995 óta van tudomásunk a jelenlétéről Hornyák Ákos és munkatársainak szerológiai vizsgálati eredményei alapján. Hazánkban először 1999-ben sikerült izolálni a vírust, annak európai genotípusba tartozó változatát.

A PRRS diagnosztikájában a vírus, annak fehérjéinek, vagy genetikai állományának kimutatásán alapuló ún. direkt, illetve az általa indukált ellenanyagválasz kimutatásán alapuló ún. indirekt módszereket, szerológiai próbákat használnak. Ez utóbbiak állomány szintű profilvizsgálatokra alkalmasak, de nem mutatják meg az állatok konkrét védettségét, perzisztensen fertőzött állatok esetében negatív eredményt adhatnak, továbbá (mivel az esetek kb. 1%-ában téves pozitív eredményt adnak), csak magas arányú pozitivitás esetén értékelhető az eredményük. A PRRSV a ma ismert egyik legváltozékonyabb vírus, molekuláris diagnosztikája emiatt rendkívül nagy kihívást jelent. Ezért elengedhetetlen gyors, specifikus és megfelelően érzékeny diagnosztikai eljárások kifejlesztése, melyek alkalmasak mindkét genotípus, illetve a különböző európai szubtypusokba tartozó PRRSV törzsek kimutatására.

Munkánk első lépéseként fertőzött telepeken az adott telepen jelenlévő PRRS vírus kimutatását tűztük ki célul. Ehhez egy olyan RT-PCR eljárást kívántunk kifejleszteni, mely a vírusgenom konzervatív szakaszának amplifikációja révén képes valamennyi lehetséges törzs

kimutatására. Ezt követően pedig az így összegyűjtött mintákon a vírusgenom leginkább variábilis génszakaszának, az ORF5-nek a nulkeotisorrendjét kívántuk meghatározni egy újabb primerpárt (primerpárokat) alkalmazó RT-PCR rendszerrel. Az így kapott szekvencia- adatokat aztán egymással, valamint a nemzetközi adatbázisban (GenBank, Bethesda, USA, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) fellelhető fontosabb szekvenciákkal összehasonlítva azok rokonsági (filogenetikai) viszonyait akartuk feltérképezni. Meg akartuk vizsgálni továbbá a magyar törzsek eredetét, valamint az ország különböző pontjairól származó vírusok összehasonlításával megállapítani azok járványtani viszonyait. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a szomszédos országokhoz (Ausztria, Szlovákia) hasonlóan jelen vannak-e amerikai genotípusú szekvenciák hazánkban, illetve, ha igen vakcinavírus eredetűek-e, vagy vadvírusokhoz hasonlítanak-e inkább. Emellett, lehetőség szerint olyan, hazánkkal szomszédos országból is célul tűztük ki PRRSV minták begyűjtését, és jellemzését, melyek esetében nincs publikált szekvencia a nemzetközi adatbázisban azért, hogy azokat a magyar (főleg az adott határ közeléből gyűjtött), illetve nemzetközi törzsekkel összehasonlítva filogenetikai viszonyaikat elsőként leírjuk.

Egy olyan, rendkívül gyorsan változó vírus esetében, mint a PRRSV, elengedhetetlen a diagnosztikai, legfőképpen a molekuláris diagnosztikai módszerek folyamatos fejlesztése annak érdekében, hogy az adott eljárás képes legyen az adott időszakban létező valamennyi, sőt a folyamatos genetikai sodródás következtében folyamatosan kialakuló újabb változatok kimutatására. Mindemellett egyre inkább előtérbe kerülnek az olyan PCR technikák, melyek, a gél alapú módszerek igen/nem eredményein felül alkalmasak a minták nukleinsav- kópiaszám meghatározására is. Munkánk harmadik szakaszaként tehát a begyűjtött törzsek, és szekvenciák birtokában célul tűztük ki egy olyan modern, gyors, megbízható, specifikus, valós idejű vírusnukleinsav kimutatási módszer kidolgozását, mely lehetővé teszi valamennyi jelenlegi, illetve a későbbiekben kialakuló PRRSV törzs kimutatását, valamint a klinikai mintákban található PRRSV mennyiségi meghatározását.

## Anyag és módszer

Munkánk első részeként célzott mintagyűjtést végeztünk magyarországi nagylétszámú sertéstelepeken. Olyan telepeket választottunk, melyek korábban elvégzett szerológiai vizsgálatok alapján már bizonyítottan PRRS pozitívak voltak, illetve ahol a betegségre jellemző szaporodásbiológiai zavarok, megemelkedett szopóskori mortalitás, vagy fiatal állatokat érintő légzőszervi tünetek léptek fel. Vérsavó mintákat gyűjtöttünk a betegség tüneteit mutató kocákból, malacokból, továbbá tüdő, hörgőkörüli nyirokcsomó, illetve tonsilla mintákat az elhullott állatokból és a vetélt magzatokból. Emellett, ahol lehetőségünk volt, megvizsgáltuk az adott sertéstartó telepen tartott tenyészkacák ondómintáit is. Sor került továbbá a Vajdaságból származó, légzőszervi tüneteket mutató sertésállományokból gyűjtött vérsavóminták vizsgálatára is.

Génbanki szekvenciaadatok alapján primereket terveztünk diagnosztikai és filogenetikai vizsgálatok céljából. A diagnosztikai vizsgálatokhoz kialakított primerek a vírusgenom leginkább konzervatív szakaszára az ORF7-re illetve a 3'NCR-re tapadnak, és a reakció során az európai törzsek esetében 393, az amerikai törzsek esetében pedig 428 nukleotid hosszúságú terméket amplifikálnak. Filogenetikai vizsgálatokhoz 2-2 genotípus-specifikus primerpárt terveztünk a variábilis ORF5 génszakasz felerősítésére. Az így kapott terméken direkt nukleinsav-szekvencia meghatározást hajtottunk végre. A szekvenciákat egymáshoz, illetve a legfontosabb génbanki (Genbank, Bethesda, USA) szekvenciákhoz illesztettük, azokon filogenetikai vizsgálatokat végeztünk, meghatároztuk származtatott aminosavsorrendjüket, illetve potenciális glikozilációs helyeiket.

Munkánk második lépéseként egy primer-probe energy transfer elven működő valós idejű RT-PCR eljárást fejlesztettünk ki. Ehhez 235 génbanki szekvencia adatait felhasználva a jelöletlen forward primer helyét az ORF6 terminális szakaszán, míg a Texas Red-del próba illetve a FAM-mal jelölt reverz primer helyét egymás mellett az ORF7 5' vége közelében határoztuk meg. A próba szekvenciáját a Lelystad vírus genomja alapján határoztuk meg, míg a primerek esetében a tervezéskor felhasznált génbanki szekvenciák illesztése alapján többszörös nukleotid-degenerációkat építettünk be.

A rendszer érzékenységének, és a reakció hatékonyságának meghatározásához ismert mennyiségű templát RNS-t tartalmazó oldatokat készítettünk a Lelystad vírusból, az európai 3-as szubtypusba tartozó fehérorosz Soz-8 nevű izolátumból, illetve egy amerikai élővírus vakcinatörzsből (Ingelvac® MLV) a MEGAscript® T7 Kit segítségével. Ehhez az említett

vírusokból kivont RNS felhasználásával gél alapú RT-PCR reakciót hajtottunk végre a kromofór molekulát nem tartalmazó primerekkel, azzal a módosítással, hogy a forward primer 5' egy specifikus T7 promóter szekvenciát illesztettünk. A gélből kitisztított terméket RNS-é írtuk át a gyártó utasításai alapján, nukleinsav tartalmát Nanodrop ND 1000 készülékkel meghatároztuk, majd 10-es alapú hígításokat készítettünk  $10^{11}$ - $10^0$  kópiszámig. A standard görbéket a Lelystad vírus, illetve az amerikai vakcinatörzs hígítási sorozatának eredményi alapján állítottuk fel. A rendszer érzékenységét ezen felül szövettenyészetben elszaporított Lelystad vírus, illetve egy amerikai vadvírustörzs (P129) 10-es alapú hígításai segítségével is meghatároztuk. A reakciók befejeztével minden alkalommal meghatároztuk a termék olvadáspontját.

Rendszerünk specifikusságát a rendelkezésünkre álló PRRSV pozitív minták segítségével, az esetleges keresztreakciókat pedig sertéseket megbetegítő egyéb vírusok (PCV-2, CSFV, SIV, PRCV, ADV, PPV, PCMV) felhasználásával vizsgáltuk.

PRRS mentes, 4 hetes malacokat (5db) fertőztünk intranasalisan PRRSV tartalmú sejttenyészet-felülúszóval annak érdekében, hogy a vírus RNS vérsavóbeli szintjét mérhessük a 7 napon át naponta vett vérsavómintákon. A 8. napon az állatok kíméletes elvéztetését követően megvizsgáltuk tüdő és mandulamintáik PRRSV tartalmát.

## Eredmények

Munkánk során összesen 25 magyarországi telepről származó 45, továbbá 8 vajdasági PRRSV minta ORF5 szekvenciavizsgálatát végeztük el. Az így kapott szekvenciákat azután összehasonlítottuk egymással és a nemzetközi adatbázisban (GenBank) fellelhető fontosabb szekvenciákkal, és megállapítottuk, hogy a hazai PRRSV törzsek túlnyomó többsége (42) az európai genotípusba, azon belül pedig az 1-es szubtípusba tartozik. A magyarországi szekvenciák közül 42 az 1-es típusba tartozik. Ezek a szekvenciák a nyugat európai országok PRRSV törzseihez hasonlóan az 1-es szubtípusba tartoztak. Ezen belül a vizsgált törzsek 4 monofiletikus alcsoportot, valamint 3, az alcsoportoktól elkülönülő szekvenciát alkotnak. A 4 alcsoportból kettőbe Magyarországon törzskönyvezett, élővírusos vakcinához nagymértékben hasonló, a másik kettőbe pedig vadvírusok tartoztak. A legnagyobb alcsoportba az általunk vizsgált 1-es típusú magyar szekvenciák fele (21) tartozik. Ezt az alcsoportot alkotó szekvenciák ezen belül olyan kisebb, monofiletikus csoportokat képeznek melyekbe az adott földrajzi területről származó vírusok tartoztak. Találtunk azonban három olyan szekvenciát, melyek az amerikai genotípusba tartoztak. Ezek közül két, egymással direkt kapcsolatban levő telepről származó vírustörzs vadvírusnak bizonyult, és a kanadai referens vírushoz hasonlított leginkább, egy szekvencia pedig Nyugat-Európában széles körben elterjedt, de Magyarországon nem törzskönyvezett, élővírusos vakcinával mutatott rokonságot. A vajdaságból származó

Kilenc esetben mutattunk ki vakcinavírust nem vakcinázott állatokból. Ezek nagymértékben hasonlítottak az adott telepen használt élővírusos vakcinákhoz. Összehasonlítva a Magyarországon törzskönyvezett két vakcinavírust illetve a hozzá nagymértékben hasonló variánsok származtatott GP5 aminosav-sorrendjét azt tapasztaltuk, hogy az egyik vakcina esetében az összes rá hasonló variáns következetesen ugyanazokban az aminosav-pozíciókban változott meg, minden esetben az első ektodoménon, ráadásul mindegyik elveszített egy glikozilációs helyet, így erre az alegységre az eredeti vakcinavírustól, és a vadvírusok túlnyomó többségétől elérően csak két cukormolekula kötődhet. Ebben az esetben mindegyik variánst vetélt magzatból, illetve a betegség tünetei közt elhullott fiatal állatból mutattuk ki. A másik vakcina esetében a variánsok random módon változtak meg ezen a területen, több néma nukleotidmutáció következett be, illetve ezeket minden esetben egészséges (bár nem vakcinázott) állatokból mutattuk ki.

Megvizsgáltuk továbbá 8 szerbiai (vajdasági) PRRSV minta ORF5 nukleotidszekvenciáját, és megállapítottuk, hogy azok az európai genotípusba, és az 1-es szubtípusba tartoznak, és szoros rokonságot mutatnak egymással, illetve Dániában izolált törzsekkel.

Munkánk második lépéseként primer-probe energy transfer elven működő, valós idejű RT-PCR eljárást fejlesztettünk ki a PRRSV RNS kópiaszám meghatározása céljából. A rendszer érzékenységét ismert RNS kópiaszámú minták 10-es alapú hígításain vizsgáltuk a Lelystad vírus, egy európai 3-as szubtípusba tartozó belorusz törzs (Soz-8), illetve egy amerikai vakcinavírus (Ingelvac MLV®) esetében, és megállapítottuk, hogy mindegyikből körülbelül 10 RNS kópiát képes kimutatni. Egy TCID<sub>50</sub> volt a kimutathatóság határa a szövettenyészetben elszaporított Lelystad vírus és a P129-es (2-es típusú) vírustörzs esetében. Ismert szekvenciájú amplikonok olvadáspont-vizsgálatával megállapítottuk, hogy próba-célterület mismatchek esetén olvadáspont csökkenés lép fel, de a rendszer szignifikáns érzékenység- és hatékonyság-változás nélkül képes működni akár öt mismatch esetén is.

A kísérletesen fertőzött állatok vérsavóinak naponkénti vizsgálata során a vírus genetikai állománya a fertőzést követő második napon jelent meg az állatok vérsavójában, majd egy nagyon enyhe csökkenést követően a 6. és 7. napon érte el a maximális,  $8-9 \times 10^5$  RNS kópia/ml értéket. A mandulák, illetve a tüdők PriProET vizsgálatával megállapítottuk, hogy míg az előbbi szervek grammonként  $1-2 \times 10^5$ , utóbbiak  $6-9 \times 10^8$  RNS kópiát tartalmaztak.



## Következtetések

Munkánk első szakaszának célja az volt, hogy magyarországi, PRRSV-vel fertőzött sertéstelepekről történő mintagyűjtést követően megállapításokat tegyünk a PRRS hazai elterjedtségére vonatkozólag. Három diagnosztikai intézet adatait összegezve azt tapasztaltuk, hogy bár a fertőzött nagylétszámú sertéstelepek aránya (kb. 10%) emelkedett az utóbbi időben, nálunk még mindig kedvezőbb a helyzet, mint a nagy sertéstartó hagyományokkal rendelkező nyugat-európai (Dánia, Hollandia), illetve szomszédos (Ausztria) országokban, ahol ez az arány jóval meghaladhatja az 50%-ot.

Az általunk 5 év alatt gyűjtött minták részletes vizsgálatával megállapítottuk, hogy törzseink nagy része az európai 1-es szubtípusba tartozik. Ezen belül bizonyos szekvenciák monofiletikus csoportokat is alkotnak. A legnagyobb ilyen csoport (4-es alcsoport) a vizsgált európai genotípusú törzseink felét tartalmazza. Az alcsoporton belül külön ágakat képeznek egymáshoz közeli sertéstartó telepekről származó minták. Mivel ezek a telepek olyan távolságra vannak egymástól, hogy esetükben a szél útján, aeroszolos formában való átfertőződés kizárható, nagy valószínűséggel fertőzött tenyészállatok vásárlása, a fertőzött állatoknak fogékony telepek közelében haladó úton történő szállítása, esetleg nem kellőképpen fertőtlenített gépjárművek (pl. takarmányszállító kamion) telepek közötti forgalma, vagy akár kontaminált ruházatú személyzet egyaránt fertőzési forrásnak tekinthető.

Az aminosavszekvenciák illesztése és a potenciális glikozilációs helyek szoftveres vizsgálatával a nukleotidszekvenciákból származtatott GP5 felületi alegységén megtalálható, 37. aminosav esetében egy Asp→Asn változás következtében szinte valamennyi törzs esetében megjelent egy új glikozilációs hely a Lelystad vírushoz képest, így a magyar törzsek nagy része ezen a szakaszon 3 oligoszaharid alegységet tartalmaz. Hasonló jelenséget figyeltek meg más európai törzsek esetében is.

Külön csoportokat képeztek a vakcina eredetű törzsek. Mindkét Magyarországon törzskönyvezett élővírusos vakcina esetében találtunk a vakcinára nagymértékben hasonlító szekvenciákat nem vakcinázott, de vakcinázott állatokkal egy légtérben tartott sertésekben. Az egyik esetben (B vakcina) helytelenül alkalmazott vakcinázási protokoll után akkor is B vakcinához hasonló szekvenciákat találtunk vakcinázatlan, újszülött állatokban, amikor a telepen már 3-4 hónapja a másik vakcinát (A vakcina) alkalmazták. Ezen szekvenciák vizsgálata során következetes aminosavváltozásokat figyeltünk meg a vakcinavírushoz képest a 37. a 46. az 59. és a 60. nukleotid pozícióban. A 46. pozíciót érintő változás (Asn→Lys) nyomán megszűnt a vakcina esetében még megfigyelhető glikozilációs hely. Az

aminosavváltozást eredményező, illetve a néma, szinonim nukleotidmutációk számát összehasonlítva megállapítottuk, hogy ezen vakcina eredetű szekvenciák esetében a vizsgált szakaszon kevés kivétellel valamennyi nukleotid változás aminosav változást eredményezett, ami – feltehetőleg a gazdaszervezet immunrendszere által kifejtett – erős szelekciós nyomásra utal. Valamennyi ilyen variánst a betegség tüneteit mutató, majd elpusztult állatokból, vetélt magzatokból, gyenge, illetve légzőszervi tüneteket mutató malacokból mutattuk ki. A másik Magyarországon kapható vakcina esetében ilyen jelenséget nem figyeltünk meg.

Három olyan szekvenciát is találtunk, mely a filogenetikai fán amerikai törzsek közé került. Közülük kettő közel 90%-os genetikai rokonságot mutatott a kanadai referens izolátummal. A kórelőzményi, illetve a telep állatforgalmi adatait figyelembe véve sem találtuk kezdetben olyan eseményt, mely a törzsek eredetét megmagyarázná. Vakcina eredetű amerikai szekvenciát is találtunk egy állományban, itt azonban, noha kórelőzményi adat nem állt rendelkezésre, feltételezhető, hogy Nyugat-Európából származó állatok közvetítésével került be a vírus az állományba. Számos „rég” EU tagállamban írták le vakcina eredetű amerikai törzsek jelenlétét.

Munkánk második részének legfőbb célja az volt, hogy kifejlesszünk egy olyan egylépeses valós idejű, kvantitatív vizsgálatokra alkalmas reverz transzkripciós PCR módszert, mely gyors, érzékeny és – ellentétben a próba hidrolízisén alapuló (TaqMan) módszerekkel – képes a próba és a célterület közötti mismatch esetén is megfelelően működni. Ez utóbbi a módszer legfontosabb előnye, mivel a PRRSV az egyik legváltozékonyabb és leggyorsabban fejlődő RNS vírus.

PriProET rendszerünk különböző vírustörzsekből készített, ismert kópiaszámot tartalmazó hígítási sorozatainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy rendszerünk kis mennyiségű templát RNS-t is képes kimutatni. Az Ingelvac MLV® törzs vizsgálatával az is nyilvánvalóvá vált, hogy akár öt próba-célterület mismatch esetén is képes működni anélkül, hogy érzékenysége, hatékonysága, illetve a standard görbe korrelációs együtthatója ( $R^2$ ) megváltozott volna a Lelystad vírushoz képest. Az olvadáspont érték  $67,0^\circ\text{C}$ , mely megegyezik a szintén öt mismatchot hordozó HU12-es törzs esetében kapott értékkel, és még mindig meglehetősen magasnak mondható, ezért feltételezhető, hogy akár további mutációk esetén is képes működni.

Az egyes reakciók után elvégzett olvadáspont ( $T_m$ ) vizsgálat minden esetben bizonyította a különböző PRRSV törzsek specifikus amplifikációját. A módszer azt méri, hogy milyen erősen kapcsolódik a próba a célterülethez, milyen magas hőmérsékleti értéken válik le a templátról. Ezt alapvetően az befolyásolja, hogy a próba hány nukleotidja találkozik

a célterületen a neki megfelelő párjával. Mivel a próba a PRRSV törzsekre lett tervezve, az olvadáspontvizsgálat gyors, megbízható módszer ahhoz, hogy minden pozitív reakció esetében megbizonyosodjunk az eredmény specifikusságáról. Az olvadáspont értékének csökkenése azt jelenti, hogy a próba és a célterület között nem tökéletes a kapcsolódás, mismatch lépett fel. A kapott  $T_m$  értékeket a tökéletes illeszkedést mutató Lelystad vírus esetében kapott hőmérséklet értékekkel ( $76,0^{\circ}\text{C}$ ), már a szekvenciavizsgálat előtt felismerhetőek a mismatch-ek – mutációk. Pontos számuk azonban a hőmérsékletkülönbségek alapján nem határozható meg, mivel a próba 5' végén található nukleotid eltérések kevésbé tudják befolyásolni a  $T_m$  értéket. Noha a pontos mismatch szám nem állapítható meg ennek alapján, a módszer alkalmas a nemzetközi adatbázisban megtalálható amerikai és európai genotípusú törzsek gyors elkülönítésére.

Annak a bizonyítására, hogy rendszerünk különböző vírustartalmú klinikai mintákban is képes meghatározni azok vírustartalmát, egy európai genotípusú, magyar izolátumot tartalmazó sejttenyészet felülúszóval intranazálisan fertőztünk öt választott malacot. A vérsavók, illetve a szervminták vizsgálatával kapott eredmények nagyságrendileg megegyeznek korábban már publikált kísérleti adatokkal (Kleiboeker et al., 2005), és bizonyították, hogy heveny fertőzés során a vírus elsődleges szaporodási helye a tüdő, ahol feltehetőleg a legnagyobb számban fordulnak elő a vírus szaporodásának elsődleges célsejtjei, és a vírusgenom kópiaszáma  $1000\times$  nagyobb mennyiségben van jelen, mint a mandulában, illetve a vérsavóban. Heveny megbetegedés esetén a vírus molekuláris biológiai kimutatására ez a szerv a legalkalmasabb.

Nagy számú, genetikailag különböző PRRSV szekvenciákkal, illetve kísérleti állatokból nyert klinikai mintákkal elvégzett vizsgálataink adatait összegezve megállapítható, hogy az általunk kifejlesztett PriProET érzékeny, specifikus módszer, mely képes viszonylag nagy számú próba-célterület mismatch esetén is megbízhatóan kimutatni és mennyiségileg meghatározni az adott minták PRRSV RNS kópiaszámát.

## Új tudományos eredmények

- 1) A fertőzés kimutatására, diagnosztikai célból, gél alapú RT-PCR eljárást dolgoztunk ki a PRRSV konzervatív szakaszának (ORF7, 3' NCR) amplifikálására, mely egyaránt alkalmas 1-es és 2-es genotípusú törzsek kimutatására, illetve az eltérő amplikonhosszok alapján a genotípusok előzetes elkülönítésére.
- 2) Szekvenciameghatározás és filogenetikai analízis céljából gél alapú RT-PCR eljárást dolgoztunk ki a PRRSV variábilis szakaszának (ORF5) amplifikálására.
- 3) Elsőként végeztünk nagy számú magyarországi mintán ORF5 szekvenciameghatározást, illetve összehasonlító genetikai vizsgálatokat.
  - a) Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált magyarországi PRRSV szekvenciák nagy többsége (93,33%) az európai genotípusba, azon belül az 1-es szubtípusba tartozik.
  - b) Elsőként számoltunk be Magyarországon amerikai genotípusú PRRSV jelenlétéről. Találtunk vakcina-eredetű, illetve vadvírus jellegű törzseket egyaránt.
  - c) Elsőként írtuk le Európában vadvírus eredetű, amerikai genotípusú PRRSV törzsek ORF5 szekvenciáját.
  - d) Megállapítottuk, hogy a Lelystad vírushoz képest szinte valamennyi magyar törzs esetében egy új glikozilációs hely jelent meg a GP5 fehérje 37. aminosavának megfelelően.
  - e) Az egyik Magyarországon is törzskönyvezett attenuált vakcinavírus esetében erős szelekciós nyomásra utaló változásokat találtunk a GP5 fehérje első felületi alegységén. Ugyanezek a vakcinaeredetű törzsek elvesztették a fehérje 46. aminosavához kötődő glikozilációs helyét. (A másik Magyarországon törzskönyvezett élővírusos vakcina esetében hasonlót nem figyeltünk meg.)
- 4) Elsőként határoztuk meg szerbiai (vajdasági) PRRSV minták ORF5 nukleotidszekvenciáját, és megállapítottuk, hogy azok az európai genotípusba, és az 1-es szubtípusba tartoznak, és szoros rokonságot mutatnak egymással, illetve Dániában izolált törzsekkel.
- 5) Kifejlesztettünk egy primer-probe energy transfer elven működő, valós idejű RT-PCR eljárást a PRRSV kimutatására.
  - a) A rendszer alkalmasnak bizonyult egymástól távoli rokonságban álló törzsek kimutatására, illetve mennyiségi meghatározására.

- b) Az amplikonok olvadáspont-vizsgálata alkalmas a próba tapadási területén fennálló mismatch-ek felderítésére.
- c) Szekvenciavizsgálatokkal, és az ismert szekvenciájú vírusokból készített, meghatározott kópiaszámú, rekombináns RNS-t tartalmazó minták sorozathígításainak vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a rendszer képes akár 5 próba-célterület mismatch esetén is működni anélkül, hogy a reakció hatékonysága, vagy érzékenysége csökkenne.

## **A témában megjelent tudományos publikációk**

**Balka Gyula**, Rusvai Miklós, Kecskeméti Sándor, Kiss István: PRRS - újabb kihívás előtt a sertéságazat : 1. A vírus sajátosságai : Irodalmi összefoglaló és saját tapasztalatok. Magyar Állatorvosok Lapja, 2006. 128, 524-532.

**Balka Gyula**, Rusvai Miklós, Kecskeméti Sándor, Kiss István: PRRS - újabb kihívás előtt a sertéságazat. 2. A betegség járványtani, kórtani és immunológiai sajátosságai. Irodalmi összefoglaló. Magyar Állatorvosok Lapja, 2008. 130, 31-38.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, I. Kiss, S. Kecskeméti, T. Bakonyi, M. Rusvai: Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. Veterinary Microbiology 2008. 127, 128-135.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, Zs. Benyeda, M. Rusvai: Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Virological Methods, közlésre elfogadva.

## **A témában tartott előadások, poszterek nemzetközi konferenciákon**

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, Á. Bálint, I. Kiss, S. Kecskeméti, M. Rusvai (poszter): Genetic diversity of vaccine origin a wild type Porcine Reproductive and Respiratory virus strains circulating in Hungarian swine herds. 5<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Reemerging Pig Diseases, 24-27 June 2007, Krakow, Poland. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Reemerging Pig Diseases p.: 179.

**Gy. Balka**, Á. Hornyák, T. Barna, A. Farsang, G. Kulcsár, M. Rusvai (poszter): Transmission of a modified live virus vaccine from vaccinated to nonvaccinated pigs. Vaccine Congress, 9-11 December 2007, Amsterdam, The Netherlands In: Proceedings of Vaccine Congress p. 153.

**Gy. Balka, Á. Hornyák, Á. Bálint, M. Rusvai** (előadás): Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. EuroPRRSnet Workshop, 24-25 July 2008, Bruxelles, Belgium

**Gy. Balka, Á. Hornyák, Á. Bálint, M. Rusvai** (poszter): Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. 5<sup>th</sup> International PRRS Symposium, PRRSV Reverse Genetics: From the Laboratory to the Field, 2008. December 5-6, Chicago, USA In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International PRRS Symposium p. 50.

### **Egyéb közlemények referált lapokban**

T. Németh, N. Solymosi, **Gy. Balka**: Long term results of subtotal colectomy for acquired hypertrophic megacolon in eight dogs. Journal of Small Animal Practice 2008. 49, 618-624.

Jakab Csaba, Kovács Rita Beáta, Szabó Gyula, **Balka Gyula**: Negyedik agykamrai plexus chorioideus papilloma nyolcéves tibeti mastiffban: Klinikopatológiai esetismertetés. Magyar Állatorvosok Lapja, 2004. 126, 743-749.

Pétsch Márta, Jakab Csaba, **Balka Gyula**, Vörös Károly, Manczur Ferenc: Glomerulonephritis következtében kialakult pulmonalis thromboembolia. kutyában: Esetismertetés Magyar Állatorvosok Lapja, 2005. 127, 428-435.

Jakab Csaba, Bánky Áron, Kincses Krisztina, **Balka Gyula**, Demeter Zoltán: Kutyák bördaganatainak előfordulási gyakorisága és hisztopatológiája. Magyar Állatorvosok Lapja, 2006. 128, 140-149.

## Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastruktúrális feltételeinek maradéktalan biztosításában, a kutatás menetének irányításában, a kapott eredmények értékelésében, a publikációim kéziratának lektorálásában nyújtott segítségéért, valamint a Tanszékünkön tapasztalható kollegiális, baráti légkör megteremtéséért szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Rusvai Miklós tanszékvezetőnek.

Köszönettel tartozom Dr. Hornyák Ákosnak, aki az általam használt molekuláris biológiai, szerológiai, és egyéb virológiai kutatási és diagnosztikai módszerek elsajátításában segített, és kivételes elhivatottságával, munkabíráásával nagy mértékben segítette munkámat.

Köszönöm Prof. Vetési Ferencnek, témabizottságom tagjának, hogy a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékre kerülésemtől kezdve pártolta, és segítette munkámat, és lehetőséget biztosított számomra, hogy eredményeimet hazai tudományos konferenciákon előadhassam.

Köszönöm a volt debreceni Állategészségügyi Intézet munkatársainak, Dr. Kiss Istvánnak, és Dr. Kecskeméti Sándornak, hogy az általuk munkám kezdetéig, a témában elvégzett kutatásaik eredményeit önzetlenül átadták. Köszönöm Dr. Becskei Zsoltnak, a szabadkai Állategészségügyi Intézet munkatársának, aki a szerbiai mintákat a rendelkezésünkre bocsátotta.

Külön köszönöm továbbá kollégáimnak, Dr. Mándoki Mírának, Dr. Jakab Csabának, Dr. Gál Jánosnak, Dr. Demeter Zoltánnak, Dr. Palade Alinának, és Dr. Benyeda Zsófiának, hogy külföldi tanulmányútjaim során, valamint a kutatáshoz szükséges mintagyűjtés céljából végzett kiszállások esetén diagnosztikai és oktatási feladataim alól tehermentesítettek.

Köszönöm családomnak, szeretteimnek és barátaimnak, hogy támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették számomra hogy minél több időt és energiát fordíthassak kutatásaimra.