

Állatorvostudományi Egyetem
Patológiai Tanszék

A PRRSV kimutatása RNS alapú *in situ* hibridizációval

Készítette: Horváth Gergő

Témavezetők: Dr. Balka Gyula, egyetemi docens
Dénes Lilla, PhD hallgató

Budapest

2018

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	1
2.	Rövidítések jegyzéke	2
3.	Bevezetés	3
4.	Irodalmi áttekintés	4
4.1.	Genetika, morfológia.....	4
4.2.	Járványtan	5
4.3.	Kórfejlődés	6
4.4.	Klinikai tünetek.....	7
4.5.	Gazdasági kár	8
4.6.	Immunológia	8
4.7.	PRRS Nemzeti Mentésítési Terv	9
5.	Célkitűzések.....	11
6.	Anyagok és módszerek.....	12
6.1.	Felhasznált minták és feldolgozásuk.....	12
6.2.	Metszetek deparaffinálása.....	12
6.3.	Feltárás.....	12
6.4.	RNS alapú <i>in situ</i> hibridizáció – RNAscope	13
6.5.	Metszetek szkennelése, szoftveres elemzés.....	16
6.6.	Real-time RT-PCR.....	16
6.7.	Statisztikai elemzés	16
7.	Eredmények	17
8.	Következtetések	25
9.	Összefoglaló	27
10.	Abstract	28
11.	Irodalomjegyzék	29

2. Rövidítések jegyzéke

AID	activation-induced deaminase	OIE	Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal
APOBEC	apolipoprotein B editing catalytic polipeptide	ORF	nyitott olvasási keret
ASF	afrikai sertéspestis	PBS	foszfát-pufferes sóoldat
CAV	kutya adenovírus	PCR	polimeráz láncreakció
CD	cluster of differentiation	PCV	sertés circovírus
CISH	kromogén <i>in situ</i> hibridizáció	PR	Aujeszky-betegség
CSF	klasszikus sertéspestis	PRDC	sertések összetett kóroktanú légzőszervi betegsége
Ct	threshold cycle	PRRS	sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája
FISH	fluoreszcens <i>is situ</i> hibridizáció	PRRSV	sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának vírusa
FFPE	formalinban-fixált, paraffinba ágyazott	PRV	Aujeszky-betegség vírusa
GP	glikoprotein	qPCR	valós idejű polimeráz láncreakció
IgG	immunglobulin-g	RA1	patkány arterivírus-1
IgM	immunglobulin-m	RNS	ribonukleinsav
IFN- α	interferon-alfa	RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
IFN- β	interferon-béta	USD	Amerikai Dollár
IFN- γ	interferon-gamma	USA	Amerikai Egyesült Államok
IHC	immunhisztokémia	TCID50	Szövettenyészetben 50%-os sejtkárosító hatást kifejtő mennyiségű
IL-10	interleukin-10	TGEV	transzmisszibilis gastroenteritis vírusa
IM	intramuscularis	TGF- β	Transforming growth factor beta
IN	intranazalis	TGEV	transzmisszibilis gastroenteritis vírusa
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció	TISH	biotinyl-tyramid alapú <i>in situ</i> hibridizáció
LDV	tejsav dehidrogenáz-szintet emelő vírus		
MPS	macrophag-phagocytá rendszer		
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal		
MLV	attenuált, élő vírus		

3. Bevezetés

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS) világszerte elterjedt betegség házi sertésekben, illetve vaddisznókban (1). A fertőzött állatok korcsoportjától függően igen változatos klinikai tüneteket mutatnak. Kocák esetében a szaporodásbiológiai zavarok a legjellemzőbbek, úgymint a koraellés, késői visszaivarzás, halott, mumifikált magzatok, vagy pedig gyenge életképességű malacok születése. A növendék, illetve a hízó korcsoportokban főként a légzőszervi tünetek (köhögés, nehezített légzés) dominálnak, illetve tüdőgyulladás is kialakulhat (2,3).

A PRRS egyike a modern sertéstartásban előforduló legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró betegségeknek (1). A legfrissebb, rendkívül átfogó kutatás eredményei alapján az USA sertéstartásában évente több, mint 663 millió USD kárt okoz a betegség direkt termelésesökkentő hatása révén. Ezen felül, indirekt módon további 447 millió USD többletköltség kialakulásához vezet a szindróma jelenléte. Ezutóbbi összeg magában foglalja a gyógyszerek árát, a diagnosztika, valamint a járványvédelem terén szükségessé váló kiadásokat (3).

A betegség kórokozója az *Arteriviridae* család *Porartevirus* genusába tartozó PRRS-vírus 1 (PRRSV-1), valamint PRRS-vírus 2 (PRRSV-2) (4–6). Ezen két különálló vírusfajra nagyfokú geno-, és fenotípusos diverzitás jellemző. A PRRSV-1, illetve a PRRSV-2 genomja közt 40%-os az eltérés, továbbá az egyes fajokon belül is meghaladja a 15%-ot a genetikai állomány különbözősége (7–9). A betegséget okozó két vírus – amelyek korábban egyazon vírusfaj két genotípusát alkották – közt jelentős különbségek mutatkoznak ezen felül szerológiai szempontból, valamint a klinikai tünetek és földrajzi előfordulásuk terén is (10).

A kórkép jelentős gazdasági károkozása miatt kulcsfontosságú az állattartó telepek fertőződésének megelőzése, illetve a betegség terjedésének minimalizálása. Emiatt kiemelten fontos a megfelelő diagnosztikai módszerek alkalmazása, amely lehetővé teszi a fertőzött telepek, illetve egyedek felkutatását. Ehhez manapság validált szerológiai, immunhisztokémiai és különböző polimeráz láncreakciós (PCR) módszerek állnak rendelkezésünkre (11). Kutatásunk során egy újszerű, RNS-alapú *in situ* hibridizációs eljárással kísérjük meg kimutatni a kórokozót kísérleti körülmények között fertőzött házi sertések tüdőszöveti mintájából.

4. Irodalmi áttekintés

A világ hústermelésének mintegy 35–40%-a sertéstartásból származik, (12) ennek okán rendkívül fontos a sertésállományok védelme a különböző fertőző betegségektől. Ezen kórformák ugyanis veszélyeztetik úgy az élelmiszerlánc-biztonságot, mint a termelés gazdaságosságát.

A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómája világszerte elterjedt betegség, amelynek kórokozója a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjába, a *Porartevirus* nemzetségbe tartozó PRRS vírus (PRRSV). Szintén ebbe a nemzetségbe tartozik a tejsav dehidrogenáz-szintet emelő vírus (LDV), illetve a patkány arterivírus-1 (RA1) (4,5). A retrospektív szerológiai vizsgálatok, illetve az okozott tünetek alapján a betegség első előfordulása Kanadában 1979-ben, az USA-ban 1985-ben, Nyugat-Európában pedig 1991–1992-ben volt megfigyelhető.

A kórokozót Európában először 1991-ben izolálták Hollandiában, akkor Lelystad-vírus néven, Észak-Amerikában pedig először 1990-ben mutatták ki a betegséget okozó vírust (ATCC VR-2332) (13–15). Ezen két izolátum genetikai különbségei alapján – a korábbi besorolás szerint – elkülöníthető egy európai, 1-es genotípus; illetve egy észak-amerikai, 2-es genotípus. Napjainkban a régebben egyazon faj két genotípusaként azonosított kórokozót a Nemzetközi Vírus Taxonómiai Társaság (ICTV) már két különálló fajként tartja számon (PRRSV-1, PRRSV-2) (4). A betegséget okozó két vírusfaj közt genotípusos, illetve fenotípusos különbségek is megfigyelhetőek, amelyek megnyilvánulnak szerológiai tulajdonságaikban, valamint az általuk okozott tünetekben is, továbbá eltérés mutatkozik a kórokozók közt földrajzi elterjedésükben is (8,10).

4.1. Genetika, morfológia

A betegség kórokozója (PRRSV) egy burkos, ikozaéder alakú burokkal rendelkező vírus, amelynek örökítőanyaga pozitív irányítottságú, lineáris, szimpla szálú RNS. A PRRSV átmérője 50–60 nm, genomja ~15 kb nagyságú, amelyben 10 nyitott leolvasási keret található meg. A virális RNS összesen 8 ismert szerkezeti fehérjét kódol, az ORF2a, ORF2b, ORF3–7, illetve az ORF5a régiókban (16,17). A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómájának kórokozójára nagyfokú genetikai sokféleség és változékonyság jellemző (18).

A PRRS kórokozójának nagy mértékű genetikai változékonyságáért elsősorban a vírus RNS-függő RNS-polimeráza a felelős, mivel a transzkripció során gyakorta nem a megfelelő bázispárt építi be, a hibajavító mechanizmusok pedig hiányoznak. A tévesen behelyettesített nukleotidok aránya a PRRSV esetében a legmagasabb az összes RNS-vírus közt. A változékonyság hátterében állhat továbbá a replikáció kifejezetten nagy frekvenciája és a rekombináció is amely. A jelenség abban az esetben fordul elő, ha egyazon gazdaséjtet (sertés macrophag) egyidőben kettő, vagy több PRRSV-törzs fertőz. A vírus genetikai változékonyságában szerepet játszhatnak a gazdaséjtek citoplazmájában lévő különböző enzimek (activation-induced deaminase-AID, apolipoprotein B editing catalytic polipeptide-APOBEC), amelyek megváltoztatják a képződő vírusrészecskék nukleotidszekvenciáját. Mindezen folyamatok következtében kialakuló változatok stabil jelenléte annak köszönhető, hogy valamilyen relatív fitness előnyhöz jutnak, amelyben nagy szerepe van a gazdaszervezet immunrendszere által kifejtett szelekciós nyomásnak is (18–21). Ez a különösen nagy változékonyság alapvetően befolyásolja a vírus immunbiológiáját, járványtanát, diagnosztikáját, illetve az ellene készült vakcinák hatékonyságát (22).

4.2. Járványtan

A PRRSV terjedésében fontos szerepe van a kórokozó közvetlen átvitelének, fertőzött állatokkal való érintkezés révén. A betegséget okozó vírust kimutatták már fertőzött sertésekből származó vérből, spermából, nyálból, bélsárból, tejből, kolosztrumból, illetve a köhögés és tüsszentés során képződő aeroszorból is. Az aeroszolban lévő vírusok túlélési idejét növeli az alacsony hőmérséklet, illetve az alacsonyabb páratartalom is. Ezen felül azt is kimutatták, hogy az adott PRRSV-törzs patogenitása is hatással van a kórokozó cseppfertőzéssel való terjedésére. A kórokozó spermával való átvitele is jelentős lehet, ugyanis PCR eljárással a fertőzést követően 92. napig kimutatható a virális RNS az ejakulátumból. A PRRSV terjedhet vertikálisan is a vemhesség alatt, a placentán keresztül, ami gyakran a fertőzött magzatok halva születésével, mumifikálódásával jár. A vírus bélsárban való jelenléte miatt előfordulhat a kórokozó különböző ragályfogó tárgyakkal (öltözet, állatorvosi eszközök), járművekkel történő átvitele is, bár ennek esélye precízen elvégzett fertőtlenítéssel jelentősen csökkenthető. Ezen felül indirekt módon, mechanikai vektorként szerepet játszhat a PRRSV terjedésében a gyötrő szúnyog (*Aedes vexans*), illetve a házi légy (*Musca domestica*) is. Az ízeltlábúak fertőzés közvetítő képessége függ a vektor által felvett vírus mennyiségétől, illetve a környezeti hőmérséklettől is (23–26).

4.3. Kórfejlődés

A PRRS vírusa a gazdaszervezet monocyta vonal aktivált sejtjeiben képes szaporodni, elsődleges célsejtje a sertés differenciált alveolaris macrophagja. Ezen felül bizonyított, hogy a vírus dendritikus sejtekben is képes replikációra. A kórokozó adszorpciójában a gazdasejt CD163 receptora tölti be a legfontosabb szerepet, amelyhez a GP2a és a GP4 minor virális szerkezeti fehérjék kötődése biztosítja a stabil kapcsolatot. A kórokozó penetrációja egy standard clathrin mediálta endocytosisal megy végbe. Az így kialakult endosomában a pH-csökkenés, illetve különböző fehérjebontó enzimek hatására megtörténik a dekapszidáció, elkezdődik a transzkripció, illetve a transláció, majd a vírus replikációja, mialatt a fertőzött sejtek egy anti-apoptotikus állapotba kerülnek. A replikáció végeztével bekövetkezik a fertőzött sejtek apoptózisa, majd a vírus, kiszabadulását követően, más macrophagok esetében is programozott sejthalált indukál. A macrophagok nagy arányú apoptózisát a tüdőben, illetve a placentában figyelték meg, a fertőződést követő 2 hétben. Az ezt követő 2 hét során a vérből érkező új monocyták infiltrálják az érintett területeket, az apoptosis következtében azonban a fertőzést követő egy hónapban súlyosan károsodik az első védelmi vonalat jelentő macrophag-phagocita rendszer (MPS). A PRRSV ezen immunrendszer-károsító hatása miatt alakít ki gyakran társfertőzéseket különböző légzőszervi vírusokkal és baktériumokkal, valamint ezért az egyik legfontosabb szereplője a sertések összetett kóroktanú légzőszervi betegség komplexének (porcine respiratory disease complex, PRDC) (27–29).

A PRRSV-vel való fertőződés 3 különálló szakaszra bontható: akut fertőzés, perzisztáló fertőzés, illetve a kórokozó eltűnése a gazdaszervezetből. A heveny fertőzés során a tüdő, valamint a felső légutak macrophagjaiban, dendritikus sejtjeiben zajlik a vírus replikációja, ami viraemia kialakulásához vezet a fertőzést követő 6–12 órán belül, amely akár több hétig is eltarthat. A betegség ezen szakaszában jelentkeznek a kórokozóra jellemző általános (láz, levertség), és légzőszervi tünetek (nehezített légzés, köhögés), illetve a szaporodásbiológiai zavarok is (koraellés, halva születés, sperma minőség romlása). A perzisztáló fertőzés szakasza alatt a vírus replikációja lecsökken, a vírus eltűnik a vérből, valamint a tüdőből, a fertőzött állat nem mutat klinikai tüneteket. A vírus ezen szakaszban csak bizonyos lymphoid szervekben (tonsillák, nyirokcsomók) található meg. A regionális nyirokcsomókban zajló vírusreplikáció miatt ebben a szakaszban lehetőség van a kórokozó oronasalis váladékkal, illetve ondóval való terjedésére. A vírus gazdaszervezetből való eliminációjának időpontja nem teljesen ismert. A vírus replikációját, veleszületett fertőződés

esetén ugyanis kimutatták a fertőzés után 250 nappal is, ami az átlagos sertéstartásban élethosszig tartó fertőződést jelenthet (27–29).

4.4. Klinikai tünetek

A PRRS klinikai tünetei igen sokfélék lehetnek, esetenként a kórokozóval való fertőződés tünetmentes. A kialakult klinikai kép nagyban függ az érintett egyedek korcsoportjától, az adott vírustörzs patogenitásától, illetve az egyidejűleg jelenlévő más kórokozóktól. Kocák esetében a súlyos reprodukciós zavarok a legjellemzőbbek, úgymint a koraellés, a halott, mumifikált magzatok, illetve gyenge életképességű malacok születése, valamint a malacok választását követő késői visszaivarzás. Ezeken kívül kialakulhat még hyperthermia, étvágytalanság, cyanózis a füleken, illetve a tejmirigyeken, valamint agalactia is. Ritkán előfordul, hogy a betegség következtében a fertőzött kocák az ellés után elhullanak. A kórokozóval fertőzött magzatok kisebb testsúllyal, és csökkent vitalitással születnek. Az újszülött malacok esetében előfordulhat szemhéjödéma, nehezített légzés, valamint a hátulsó végtagok bénulása is, ezen felül gyakori az elhullás. A növendék, illetve a hízó korcsoportokban a légzőszervi tünetek kerülnek előtérbe (köhögés, nehezített légzés), tüdőgyulladás gyakorta kialakul. Továbbá jelentős ezen korcsoportokban a növekedési erély csökkenése, a romló takarmányértékesítés, illetve az elhullási arány növekedése. Tenyészkacák esetében előfordulhat letargia, anorexia és láz is, de gyakori a klinikailag tünetmentes állatok spermaminőségének csökkenése. A kórokozó többnyire kimutatható ezen állatok sperma mintáiból (2,3,30). Bizonyos erős patogenitású, atipikus PRRSV-törzsek esetében igen súlyos klinikai tünetek, kifejezetten magas láz (40–42 °C), illetve nagyarányú mortalitás figyelhető meg, minden korcsoportban. Ilyen vírustörzseket leírtak már az USA-ban, Kínában, Dél-Kelet Ázsiában és Kelet-Európában (Fehéroroszország) is. (27,31,32).

A kórokozónak jelentős a szerepe a sertések összetett kóroktanú légzőszervi betegség komplexének (PRDC) kialakulásában, amely kórkép kifejlődésében meghatározó továbbá a sertés circovírusának 2-es típusa, illetve a *Mycoplasma hyopneumoniae* baktérium is. Ezen felül a PRRSV gyakran fordul elő együtt más légzőszervi kórokozókkal, úgymint a sertés-influenzavírus (H1N1, H1N2), az *Actinobacillus plueropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, valamint a *Bordetella bronchiseptica*. Ezen, általában bakteriális társfertőzések hatására bronchopneumonia, valamint gennyes pleuritis és pericarditis alakulhat ki az érintett egyedekben. A másodlagos fertőzések hatására a

légzőszervi tünetek (köhögés, nehezített légzés, szapora légzés) súlyosbodnak, illetve az elhullások gyakorisága, és az okozott gazdasági kár is nő (33–35).

4.5. Gazdasági kár

A PRRS egyike a legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró betegségeknek, amelyek a modern sertéstartásban jelen vannak (26). A témában legfrissebb adatokkal dolgozó, rendkívül alapos kutatás szerint a betegség az USA sertéstartásában évente több, mint 663 millió USD kárt okoz. Ennek oka, hogy a betegség következtében csökken az élve született malacok száma, a malacok és a növendék sertések növekedési erélye; romlik az állatok takarmányértékesítése, valamint, hogy nő a naposkori, illetve választás előtti elhullás aránya. Ezeken felül, indirekt módon évi 447 millió USD kárt okoz a kórkép, amely magába foglalja az állatorvosi teendők (140 millió USD), a járványvédelem (191,8 millió USD), illetve egyéb, a betegség kitörésével kapcsolatos (145,8 millió USD) kiadásokat is. Összességében a betegség által okozott gazdasági kár jelentősebb része a csökkenő árbevétel miatt alakul ki, a növekvő kiadások ennek csak kisebb részét teszi ki (3). Egy másik, Hollandiában végzett kutatás során azt találták, hogy egy sertéstartó telep PRRSV-vel történő fertőződése az első klinikai tünetek észlelését követő 18 hetes periódusban, kocánként átlagosan 126 € kárt okoz. A betegség kitörését követő, 18 hetes periódus után jelentkező költségek igen nagy szórást mutattak attól függően, hogy az adott telep milyen intézkedéseket vezetett be. A legminimálisabb, kocánkénti 3 € többletköltség csupán az állatok monitorozását fedezte, a PRRS teljes mentesítése a telepről kocánként 66 € kiadást jelentett (36).

4.6. Immunológia

A PRRS kórokozójával való fertőződés esetén a vírushoz specifikusan kötődő ellenanyagok megtalálhatóak a véráramban már a fertőzést követően (PI) 7–9 nappal. Ezen ellenanyagok a vírus fő szerkezeti fehérjéihez (N, M, GP5) kötődnek, azonban bizonyított módon nem vesznek részt a kórokozó elleni védelem kialakulásában, nem képesek a vírus célsejtekhez való kötődését megakadályozni (27).

Eleinte IgM típusú ellenanyagok képződnek a kórokozó ellen, amelyek 14–21 nappal a fertőzés után érik el legnagyobb koncentrációjukat és fertőzést követő 40–42 napig maradnak detektálható szinten a vérben. Ezt IgG típusú anti-PRRSV ellenanyagok követik, amelyek maximális titerüket a fertőzés 21–28 napján érik el, és a fertőzés perzisztáló szakaszában végig jelen vannak a véráramban. A vírust neutralizáló ellenanyagok csupán a

fertőzést követően 28 nappal kezdenek megjelenni a szérumban. Ezen immunglobulinok főként a kórokozó GP5 glikoproteinje ellen képződnek, kisebb jelentőséggel bírnak a GP4, illetve M szerkezeti fehérje ellen képződő neutralizáló antitestek. Ezen ellenanyagok szerepe mindmáig nem tisztázott, bizonyos kutatások szerint nem játszanak szerepet a kórokozóval szemben kialakuló védettségben, más eredmények viszont arra utalnak, hogy a neutralizáló ellenanyagok vérben való jelenléte megelőzi a viraemia kialakulását ismételt fertőzés esetén (27,37).

A T-lymphocyták központi szerepet töltenek be a PRRSV elleni immunválaszban, ugyanis részt vesznek az antigénspecifikus immunválasz aktiválásában és szabályozásában, számos citokin termeléséért felelősek, ezen kívül antigén-prezentációs szerepet is betöltenek, valamint szabályozzák az immunválaszt, a gyulladást. A CD8⁺ citotoxikus T-sejtek feltehetően a PRRSV-fertőzött sejtek elpusztításáért felelősek, a heveny fertőzés kontrollálásában betöltött szerepükre azonban nincs bizonyíték. Ezen sejtek is termelik a vírus-specifikus interferon-gamma (IFN- γ) citokint, amelynek jelentős a szerepe a vírus eliminációjában. Bizonyos PRRSV-törzsek hatására a szabályozó T-sejtek által termelt TGF- β , valamint IL-10 szintek megemelkednek. Ezen citokineknek jelentős immunszuppresszív hatásuk van, mivel antagonizálják az immunsejteket aktiváló különböző folyamatokat, hatásukra például csökken a vírus-specifikus interferon-gamma (IFN- γ) szintje is (27,38).

A veleszületett immunitás legfontosabb vírus elleni eleme a kórokozó által fertőzött sejtek interferon termelése (IFN- α , IFN- β), ugyanis ezek a citokinek aktiválnak számos immunológiai folyamatot, serkentik a naív T-sejtek citotoxikus, IFN- γ termelő sejtekké való alakulását, valamint fokozzák az IFN- γ gén expresszióját is. A PRRSV nagy mértékben csökkenti az általa fertőzött macrophagok, illetve dendritikus sejtek IFN- α termelését, jelentősen mérsékelve ezzel az ellene, vagy egyéb, egyidejűleg fennálló vírusfertőzésre adott immunválaszt. A jelenség mechanizmusa részleteiben még nem ismert, bizonyos feltévesek szerint a gazdas sejtek vírus indukálta apoptózisával magyarázható (27,37,38).

4.7. PRRS Nemzeti Mentésítési Terv

A kórkép által okozott gazdasági kiesés mérséklése, majd pedig megszüntetése céljából a Nemzeti Élelmiszerlánc Biztonsági Hivatal (NÉBIH) mentésítési programot dolgozott ki a Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal (OIE) ajánlásait figyelembe véve, amely 2014 óta végrehajtás alatt áll. A szigorú járványvédelmi intézkedéseknek köszönhetően

2017 augusztusára 9 megye (Vas, Zala, Baranya, Fejér, Tolna, Pest, Nógrád, Heves és Borsod-Abaúj-Zemplén megyék), valamint további 11 járás (Hajdú-Bihar, Csongrád, valamint Jász-Nagykun-Szolnok megyékben) rendelkezik a NÉBIH által kiadott mentes minősítéssel (39,40).

5. Célkitűzések

Kutatásunk során kísérleti körülmények közt PRRSV-1-gyel fertőzött sertések tüdőszöveti mintáit vizsgáltuk. Kutatásunk célja (i) a kórokozó kimutatására és szöveti lokalizációjának meghatározására használható újszerű, RNS-alapú *in situ* hibridizációs vizsgáló módszer, az RNAscope-eljárás adaptálása a vírus azonosítására, (ii) a vírus detektálását követően az előállított metszetek szkennelése, hogy egy képelemző szoftverrel megállapítsuk a vírussal fertőzött sejtek arányát, (iii) a képelemzés eredményét összehasonlítsuk a qRT-PCR-vizsgálattal kapott értékekkel, hogy megállapítsuk, alkalmazható-e az RNAscope-eljárás szemi-kvantitatív vírusmeghatározásra is.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Felhasznált minták és feldolgozásuk

Kutatásunkban 20, más vizsgálatok céljából fertőzött, PRRSV-mentes állományból származó sertések mintáit használtuk. Az egyedeket 7 hetes korukban 10^6 TCID₅₀ mennyiségű, virulens PRRSV-1 törzset tartalmazó izolátummal fertőzték. Ezen felül a kutatásban használtunk további 5 sertést (3-as csoport), amelyeket negatív kontrollként használtuk. A vizsgálatban résztvevő összes sertést 9 hetes korban exterminálták, majd a tetemek boncolása során minden egyed bal medialis tüdőlebenyének egy részét 10%-os semleges pufferelt formalinban fixálták és küldték az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékére, míg a minták másik részéből qRT-PCR-módszerrel vizsgálták a vírus jelenlétét.

Kutatásunk során az így kapott vizsgálati anyaggal dolgoztunk tovább. A sertések tüdőszövetéből származó minták fixálása szobahőmérsékleten, 24 órán keresztül 10%-os semleges pufferelt formalinban történt. Ezt követően a vizsgálati anyagot foszfát-pufferes sóoldattal (PBS) mostuk, majd víztelenítő automata segítségével, etanollal dehidratáltuk. A mintákat a tömény (96%) etanolból xilolba helyeztük, paraffinba ágyasztuk, majd a blokkokból rotációs mikrotom segítségével metszeteket készítettünk, amelyeket Superfrost+ tárgylemezekre vittünk fel.

6.2. Metszetek deparaffinálása

A metszeteket termosztátban egy órán át, 60 °C-on inkubáltuk. Ezután elszívófülke alatt 2x5 percig xilolban, 2 × 2 percig 96%-os etanolban mostuk, majd 5 percig száradni hagytuk.

6.3. Feltárás

A hibridizációs termosztátot (HybEZ™ Oven) 40 °C-ra előmelegítettük, a hozzá tartozó hibridizációs kamrába a használat előtt 30 perccel vízzel átitatott párasító lapot helyeztünk és a már felfűtött termosztátba helyeztük. Eközben előkészítettünk 700 ml 1× Target Retrieval oldatot egy főzőpohárban, majd fóliával lefedve forraltuk. A deparaffinált metszetekre 5–8 csepp RNAscope hidrogén-peroxid oldatot cseppentettünk, majd 10 percen

keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt a metszetek kétszeri, desztillált vízzel történő mosása követte.

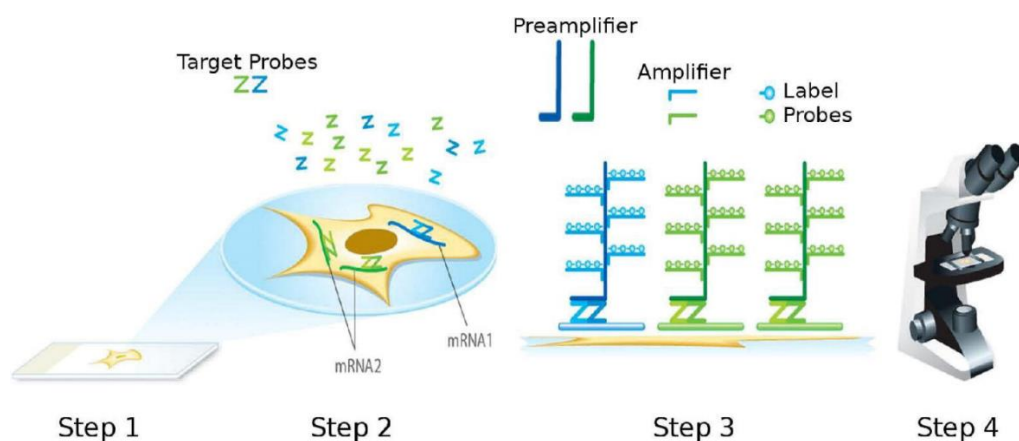
Ezt követően a tárgylemezeket a korábban előkészített, 1× Target Retrieval oldatban forraltuk 15 percen keresztül. A szükséges idő letelte után a metszeteket kétszer desztillált vízzel mostuk, majd 96%-os etanolban történő mosás következett. Az etanolból való eltávolítás után a mintákat szobahőmérsékleten, levegőn száradni hagytuk.

Ezután Immedge™ hidrofób barrier tollal 2–4 alkalommal körberajzoltuk a mintákat, majd legalább 2 percen keresztül, szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A továbbiakban kb. 5 csepp RNAscope® Proteáz Plus oldatot cseppentettünk a metszetekre úgy, hogy a szervmintákat teljesen lefedje. Ezután a mintákat a korábbiakban 40 °C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban (HybEZ™ Oven) inkubáltuk 30 percig, majd desztillált vízzel kétszer mostuk a metszeteket.

6.4. RNS alapú *in situ* hibridizáció – RNAscope

A PRRSV direkt kimutatásában a leginkább elterjedt módszer a reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciós (RT-PCR) eljárás. Ezzel a módszerrel a mintából kivont nukleinsav-oldatból mutatható ki annak specifikus vírusgenom-tartalma, amelynek akár a mennyisége is vizsgálható valós idejű (real-time) PCR-eljárással. Ezt a mindennapi gyakorlatban sokszor használt eljárást magas érzékenység, illetve specificitás jellemez, hátránya azonban, hogy alkalmazása esetén nincs lehetőség a kórokozó szövettani környezetét megvizsgálni, így kóroktani szerepét megítélni is nehéz (41).

Ezzel szemben az RNS-alapú *in situ* hibridizációs eljárások alkalmazása során lehetőség nyílik a detektált örökítő anyag szövetbeli megoszlásának, valamint környezetének vizsgálatára. Az első sikeres *in situ* hibridizációs vizsgálatot 1968-ban végezték el, azonban a korai eljárások esetében a megfelelő szintű érzékenységhez igen alacsony specificitás tartozott. Ezen felül kezdetben az adott RNS-szakaszokat radioaktív izotópokkal jelölték, amely igen körülményessé tette az eljárást annak érdekében, hogy a vizsgálatot végző személyzetet ne érje káros mértékű sugárzás (42,43). A későbbiekben elkezdődött a nem izotopikus, fluoreszcens anyagot használó *in situ* hibridizációs eljárások alkalmazása (FISH). Ebben az esetben a radioaktív anyagok mellőzésével egy biztonságosabb, és gyorsabb vizsgáló módszer került kialakításra, amelynek szenzitivitása, valamint specificitása is meghaladta a korábban használatos eljárásokét (44).



1. ábra: Az RNAscope eljárás működésének sematikus bemutatása

Forrás: Wang et al. (2012) J. Mol. Diag. 14:22.

Az általunk használt RNAscope vizsgáló módszer egy újszerű eljárás, amely lehetőséget nyújt a nukleinsavak sejtszintű kimutatására, eloszlásának pontos megállapítására. A jel-zaj arány javítása érdekében különleges szerkezetű és működésű hibridizációs oligonukleotidok kerültek kialakításra a módszer kidolgozásakor. Ennek értelmében két, egymástól független, „Z” alakú, 18–25 bázis hosszúságú hibridizációs próbát használunk az eljárás során, amelyek egymás mellett kötődnek a templát RNS-szálhoz. Pozitív fluoreszcens/kromogén jel csak abban az esetben alakul ki, ha a két hibridizációs oligonukleotid közvetlenül egymás mellett alakítja ki kötéseit, és így az „L” alakú, többszörösen jelölt próba képes hozzá kötődni. (1. ábra) Ez a struktúra biztosítja az eljárás nagy specificitását, amely az *in situ* hibridizációs eljárás több, mint 40 éves történetében az egyik legnagyobb áttörést jelenti. A vizsgálni kívánt RNS szekvenciához 10–20 pár hibridizációs próba megtervezése szükséges, amelyek közül csupán 3 pár templáthoz való kötődése elegendő ahhoz, hogy a pozitív reakció kialakuljon. Mivel ezen hibridizációs oligonukleotidok a vizsgált RNS-nek csupán 40–50 bázis hosszúságú szakaszaihoz kötődnek, az RNAscope-módszerrel a részlegesen károsodott RNS-szakaszok is kimutathatóak. Ezen tulajdonságok biztosítják az eljárás megfelelő szenzitivitását. Az RNAscope-eljárás előnyei közé tartozik továbbá, hogy formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) metszeteket vizsgálhatunk vele fénymikroszkóp segítségével, illetve, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatoknál gyorsabban kivitelezhető, könnyebben reprodukálható, valamint egyszerűbben validálható (45–47).

Az RNAscope-eljárással történő vizsgálathoz a korábbiakban előkészített FFPE-metszeteket használtuk. Első lépésben a metszetekről leitatattuk a felesleges folyadékot, majd pedig minden mintára cseppentettünk kb. 4 csepp hibridizációs próbát úgy, hogy az egész metszetet ellepje. Ezen oldat tartalmazza az előzetesen megtervezett, PRRS vírus genomjának ORF7 régiójára tervezett, 25–25 bp hosszú, komplementer oligonukleotidokat. Ezt követően a mintákat 2 órán keresztül inkubáltuk a korábbiakban 40 °C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban (HybEZ™ Oven). Az inkubációs idő letelte után a metszeteket az előzőleg elkészített mosó puffer oldatban kétszer, 2 percen keresztül mostuk szobahőmérsékleten.

A felesleges folyadék leitatása után, a következő lépésekben a mintákra amplifikáló reagenseket (Amp-1–6) mértünk. Először az 1-es amplifikáló oldatot (Amp-1) cseppentettük a metszetekre, amelyeket utána 40 °C-on 30 percen át inkubáltunk. Ezt a mosó pufferben történő kétszeri mosás követte, egyenként 2 percig, szobahőmérsékleten. A továbbiakban sorra a 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, illetve 6-os amplifikáló reagenseket (Amp-2–6) alkalmaztuk, köztük az előbbieken leírt módon mostuk a metszeteket. A metszetek inkubációs ideje a 40°C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban (HybEZ™ Oven) 15 perc (Amp-2), 30 perc (Amp-3), illetve 15 perc (Amp-4) volt. A következő lépések során (Amp-5–6) szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket 30, majd 15 percig.

Ezt követően Fast RED-B és Fast RED-A oldatok 1:60 arányú keverékével kezeltük a metszeteket. A RED keverékből kb. 120 µl-t pipettáztunk minden metszetre, majd 10 percen keresztül inkubáltuk a mintákat a hibridizációs kamrában, szobahőmérsékleten. A desztillált vízzel történő mosást követően a metszeteket 2 percre 50%-os hematoxin I oldatba helyeztük. Kétszeri, desztillált vizes mosás után a mintákat 10 másodpercig 0,02%-os ammónia oldatban kékítettük., majd ismét desztillált vízzel mostuk, végül 60°C-on szárítottuk 15–25 percen keresztül. A metszetek teljes száradását követően a tárgylemezeket xilolba merítettük, majd EcoMount médiumot cseppentettünk rá, és fedőlemezzel fedtük. A tárgylemezeket legalább 5 percen keresztül levegőn száradni hagytuk, majd pedig fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A PRRSV jelentlétére a metszetekben látható piros színben látható jelek utaltak.

6.5. Metszetek szkennelése, szoftveres elemzés

Az RNAscope eljárással elkészített metszeteket Panoramic View (3D Histech, Magyarország) szkennelvel digitalizáltuk, majd a képeket QuPath (0.1.2 verzió) szoftverrel elemeztük. A képelemző program segítségével a metszet általunk random kijelölt, egységnyi területein megszámláltuk a pozitív reakciókat tartalmazó sejtek arányát (48).

6.6. Real-time RT-PCR

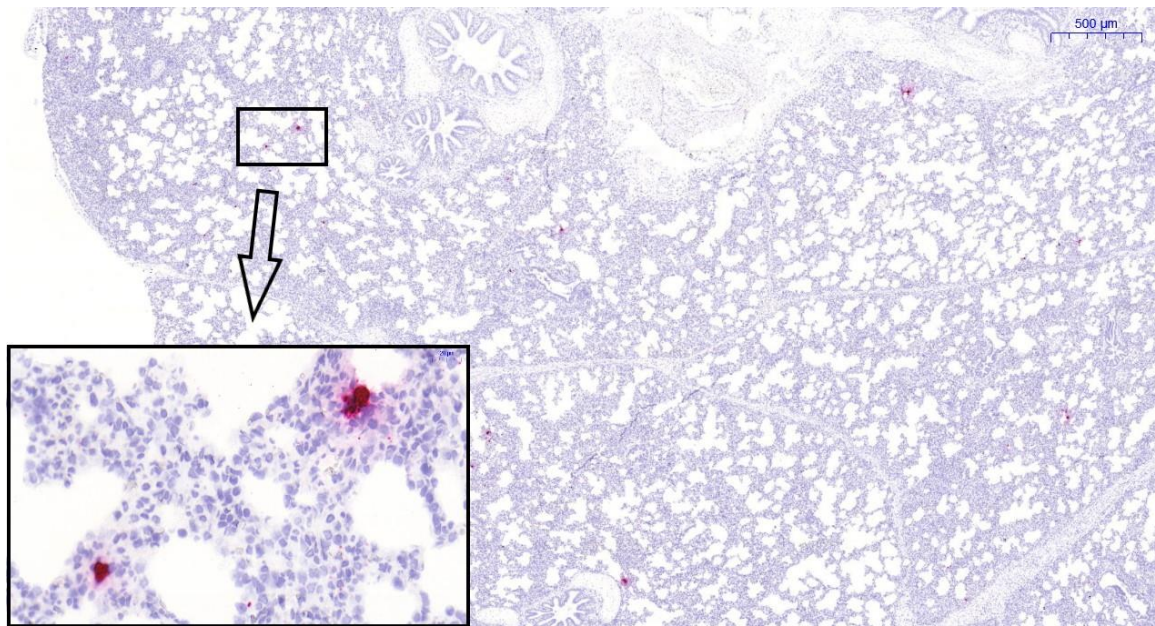
Kutatásunk során az RNAscope-eljárással megvizsgált egyedek tüdőszöveti mintájának qRT-PCR-módszerrel történő elemzése is megtörtént. Az Pécsi Állatorvostudományi Egyetem Pathobiológiai Tanszékének Virologiai csoportja által elvégzett kvantitatív RT-PCR vizsgálattal nyert vírus mennyiségre utaló eredményeket így össze tudtuk vetni a kutatócsoportunk által szoftveresen elemzett, RNAscope-módszerrel nyert pozitív jelek számával.

6.7. Statisztikai elemzés

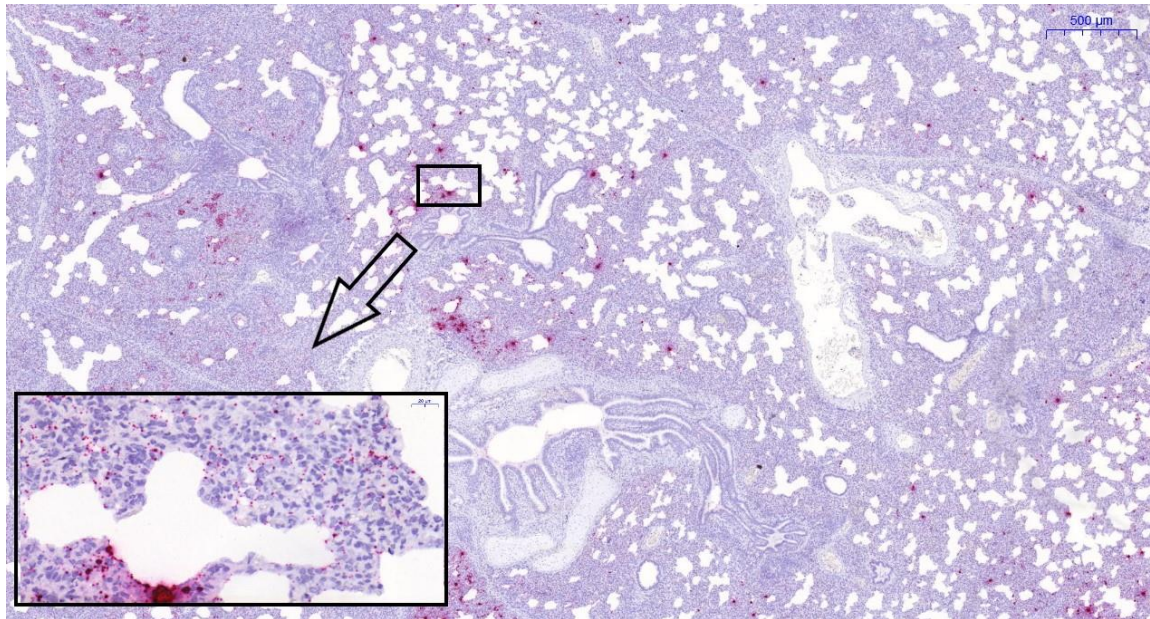
A kutatási eredmények statisztikai elemzése R 3.5.1. szoftverrel történt. Az RNAscope eljárással vizsgált metszetek esetében szoftveresen nyert adatok és a qRT-PCR módszerrel kapott Ct (treshold cycle) értékek 10-es alapú logaritmus közötti összefüggést lineáris regressziós modellel vizsgáltuk.

7. Eredmények

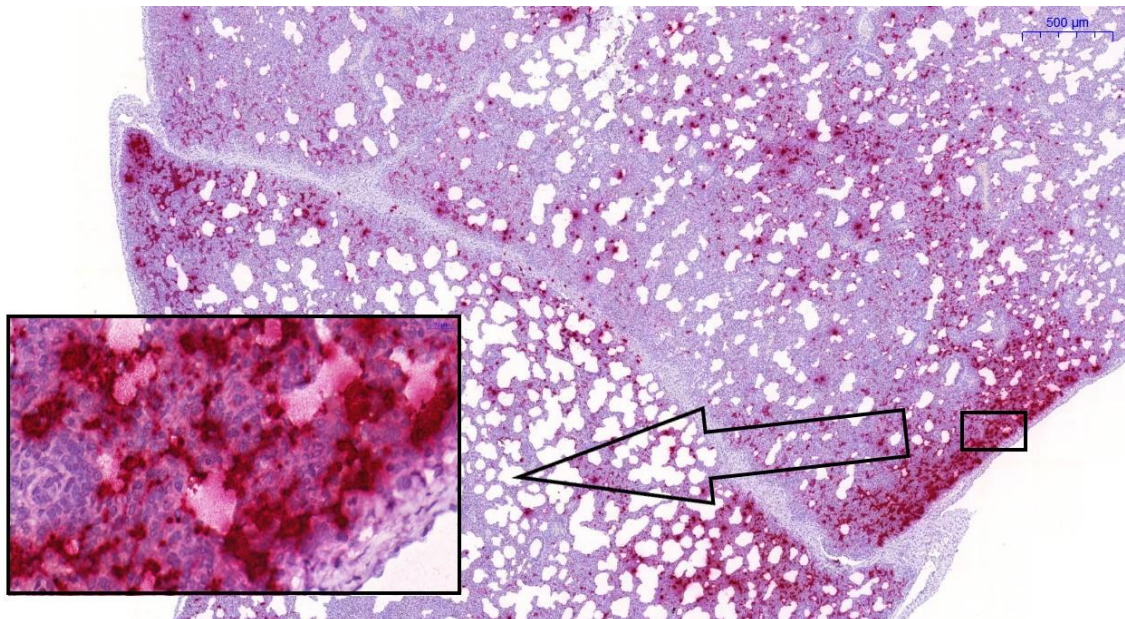
Vizsgálatunk során kutatócsoportunk elsőként azonosította sikeresen a PRRSV-t kísérleti körülmények közt fertőzött állatok tüdőszöveti mintájából, egy újszerű, RNS-alapú *in situ* hibridizációs vizsgáló módszerrel, RNAscope eljárással. A vírus jelenlétét intenzív, piros jellel azonosítottuk a metszeteken, amelyek különböző mértékben voltak megfigyelhetőek. (2.-4. ábra)



2. ábra: Kis számú fertőzött sejtet tartalmazó PRRS-pozitív sertés tüdőszöveti minta RNAscope eljárással vizsgálva (40x, illetve 400x nagyítás, bar = 500μm)

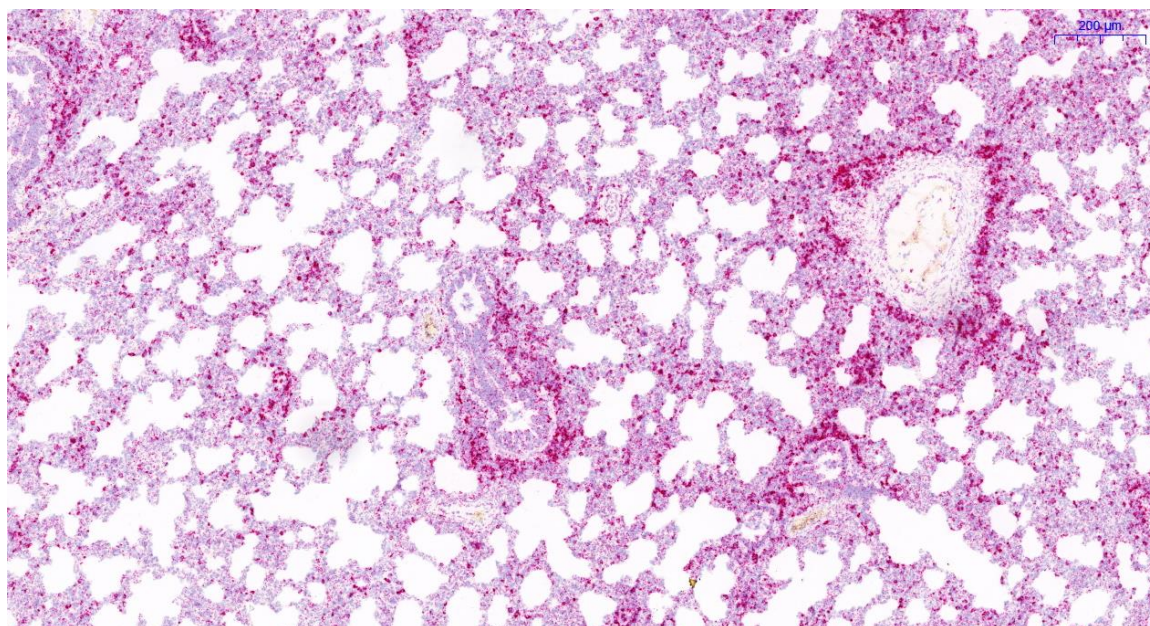


3. ábra: Közepes mennyiségű fertőzött sejtet tartalmazó, PRRS-pozitív sertés tüdőszöveti minta RNAscope eljárással vizsgálva (40x, illetve 400x nagyítás, bar = 500μm)

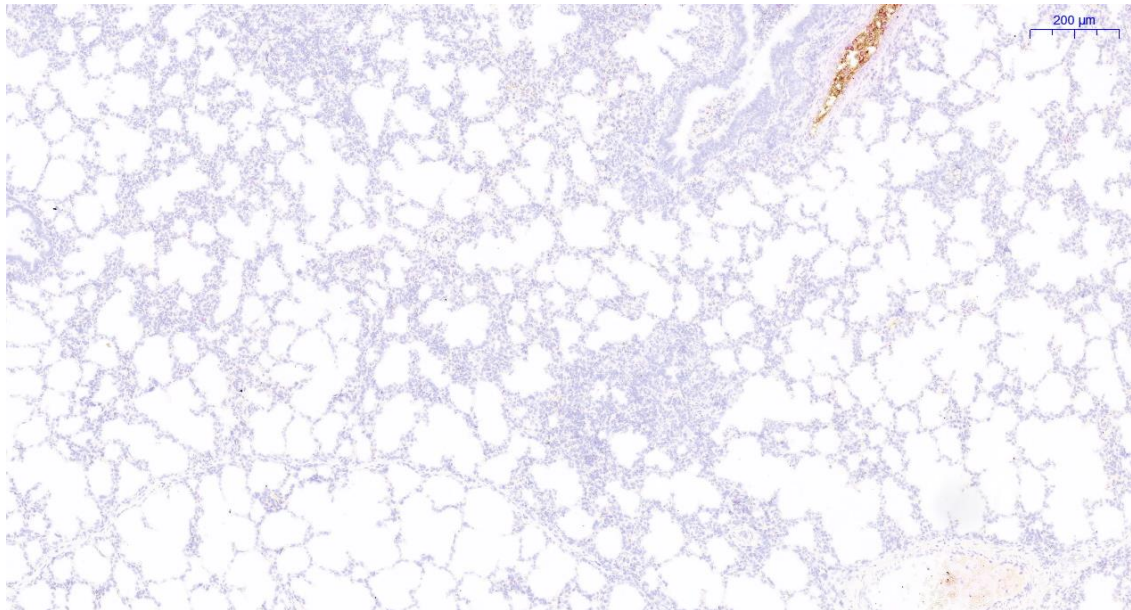


4. ábra: Nagy számú fertőzött sejtet tartalmazó PRRSV-pozitív sertés tüdőszöveti minta RNAscope eljárással vizsgálva (40x, illetve 400x nagyítás, bar = 500μm)

Pozitív kontrollként a sertések minden sejtjében expresszálandó peptidil-prolil izomeráz B (Ss-PPIB) próbát alkalmaztuk (**5. ábra**), míg negatív kontrollként a bakteriális dihidro-pikolinát-reduktáz (DapB) próbát alkalmaztuk (**6. ábra**).



5. ábra: Pozitív kontroll próba vizsgálat eredménye sertés tüdőszöveti mintán. A fajspecifikus, *Sus scrofa* peptidil-prolil izomeráz B (Ss-PPIB) próbát használtuk a vizsgálat során (RNAscope, 100×, bar = 200μm)



6. ábra: A negatív kontroll próba vizsgálat eredménye sertés tüdőszöveti mintán. A csak bakteriális dihidro-pikolinát-reduktáz (DapB) próbát alkalmaztuk. (RNAscope, 100x, bar = 200 μm)

Kutatásunk következő lépésében az elkészített FFPE-metszeteket beszkeneltük, digitális, nagy felbontású képeket előállítva belőlük. Az így digitalizált metszeteket a Qupath képelemző szoftver segítségével vizsgáltuk (48). A minták elemzése során a szövetekben lévő fertőzött sejtek százalékos arányát állapítottuk meg, a kutatócsoportunk által kidolgozott paraméterek alkalmazásával. Az alveolaris macrophagok cytoplasmájában elhelyezkedő vírusok szöveten belüli eloszlása sok esetben nem volt egyenletes, gyakorta az erek körüli, illetve intralobularis septumok kötőszövetében voltak jelen nagyobb koncentrációban. A metszetek reprezentatívnak értékelt egységeiben végzetük el a PRRSV-pozitív sejtek arányának meghatározását. Az így mért értékek 0,16% és 26,7% közt helyezkedtek el (**1. táblázat**).

Egyed azonosító	Fertőzött sejtek aránya (%)
5	1,86
10	9,02
11	5,60
13	3,97
15	4,29
17	1,04
18	3,86
21	0,72
20	1,04
24	5,79
1	4,24
3	2,93
6	1,88
8	8,25
12	2,73
14	0,20
16	26,70
22	0,19
23	0,16
25	0,41
2	0,00
4	0,00
7	0,00
9	0,00
19	0,00

1. táblázat: PRRSV-pozitív sejtek aránya

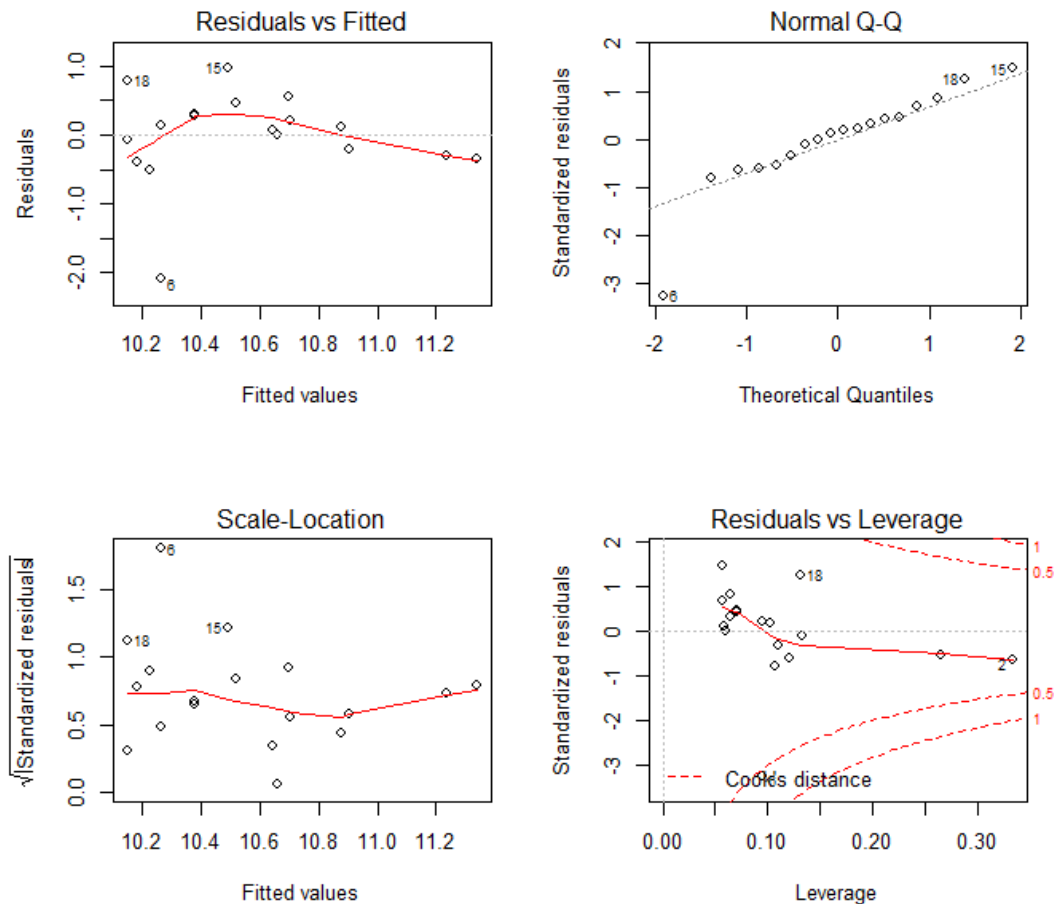
Vizsgálatunk céljai közt szerepelt továbbá, hogy az RNAscope eljárással kimutatott PRRSV-pozitív sejtek arányát összehasonlítsuk a minták RT-qPCR vizsgálatával nyert Ct (treshold cycle) értékekkel. (**2. táblázat**) Mivel a két változó közt nemlineáris kapcsolatot feltételeztünk, a kópiaszám eredményeket transzformáltuk, és azok 10-es alapú

logaritmusával dolgoztunk tovább. Ezt követően a két változó közti kapcsolatot lineáris regresszió analízissel vizsgáltuk. A statisztikai elemzés során a két torzítópontot (16-os, 14-es egyed) elhagyva állítottuk fel modellünket.

Egyed azonosító	Fertőzött sejtek aránya (%)	Ct értékek 10-es alapú logaritmusa
5	1,86	10,65
10	9,02	10,99
11	5,60	11,00
13	3,97	10,66
15	4,29	10,91
17	1,04	8,18
18	3,86	10,73
21	0,72	9,71
20	1,04	10,41
24	5,79	10,70
1	4,24	11,25
3	2,93	10,98
6	1,88	10,68
8	8,25	10,93
12	2,73	11,46
14	0,20	8,79
16	26,70	11,68
22	0,19	10,95
23	0,16	10,09
25	0,41	9,80
2	0,00	0,00
4	0,00	0,00
7	0,00	0,00
9	0,00	0,00
19	0,00	0,00

2. táblázat: mintákban lévő pozitív sejtek aránya, illetve a mintákban mért kópiaszám értékei

A statisztikai elemzés során kapott lineáris korrelációs együttható értéke ($r = 0,2776 < 0,75$) arra utal, hogy a két változó közti kapcsolat nem túl erős, viszont a p -érték alapján 95%-os szignifikanciaszinten vizsgálva, szignifikánsnak ($p = 0,005751$) bizonyult. Ezek alapján nagyobb mintaszám esetén feltehetőleg a két változó közt erősebb kapcsolatot mutató eredményeket kaphattunk volna. Az általunk felállított statisztikai modellt az **8. ábrán** mutatjuk be.



7. ábra: Statisztikai modell ábrázolása. Az reziduum-plot (A, C) a reziduumokat ábrázolja a becült y értékek függvényében, a Q-Q plot (B) alapján a reziduumok eloszlásáról kaphatunk információt, a negyedik ábrán pedig torzítópontok hatásáról (D) nyerhetünk információt.

A 8. ábrán az adatainkra illesztett lineáris regressziós modell diagnosztikai ábráit láthatjuk, amely alapján felmérhetjük, megfelelő-e a modellünk. Az (A) ábrán a pontok szóródása nem teljesen véletlenszerű, a pontok enyhén trombita alakba rendeződnek, a

változók közötti lineáris kapcsolat nem igazolt teljes mértékben, amelyet az alacsony R^2 -érték is alátámaszt. A Q-Q plot (B) ábrán a pontok egy egyenesen helyezkednek el, tehát a reziduumok normális eloszlása normális. A (D) ábrán nincsenek pontok a 0,5-ös sávon kívül, tehát torzítópontok nem voltak hatással a modellünkre.

8. Következtetések

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS) hazánk sertéságazatában is a legfontosabb betegségek közé tartozik. A betegség kórokozóját (PRRSV) rutinszerűen RT-PCR eljárással mutatják ki a laboratóriumok, több információ nyerhető azonban a vírus immunhisztokémiával (IHC), vagy *in situ* hibridizációval való vizsgálatával. Utóbbi két módszer alkalmazása során ugyanis lehetőség nyílik a kialakuló kórszöveti elváltozások megvizsgálására, valamint a kórokozók szövetekben történő eloszlásának megfigyelésére is. Mindezek segíthetnek egyes esetekben a PRRSV kóroktani szerepét megítélni (49). Fontos megjegyezni továbbá, hogy az IHC-val való vizsgálat során több nehézséggel kell számolnunk. Ezen eljárás során ugyanis nagymértékben meghatározza az eredmény pontosságát a használt fixáló anyag koncentrációja, kémhatása, a boncolás, illetve a fixálás közt eltelt idő, a fixálás időtartama, illetve annak időtartama, a kivágott blokkok mérete. A piacon jelenleg elérhető kétféle anti-PRRSV-ellenanyag sajnos nem alkalmas sem rutindiagnosztikai, sem tudományos vizsgálatokra a nagy számú fals negatív eredmény miatt, feltehetőleg a vírusra jellemző kifejezett genetikai és antigénváltozékonyság következtében. Mindezek miatt IHC alkalmazásakor számolni kell a hosszú validálási eljárásokkal, illetve az időnként nem megfelelő mértékű szenzitivitással és a nehéz megismételhetőséggel (47,50).

A PRRSV kimutatására alkalmasak továbbá különféle RNS alapú *in situ* hibridizációs (ISH) eljárások. Ezen vizsgálatok során kezdetben radioizotópos jelölést használtak, amely veszélyforrást jelentett a kutatást végzők számára, és körülményessé is tette az eljárást. Továbbá a korai ISH vizsgálatok specificitása is igen gyenge volt (43). Komoly előrelépést jelentett a nem-izotópusos ISH eljárások kifejlesztése, ezen módszerek ugyanis mellőzik a radioaktív anyagok használatát, helyette fluoreszcens, vagy kromogén anyagok jelölik a hibridizációs oligonukleotidokat. Az eljárások szelektivitása, és specificitása is javult, bár továbbra is előfordultak nem specifikus kötődések, hibridizációk (43,47).

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának kórokozóját korábban sikeresen kimutatták különböző fluoreszcens (FISH), kromogén (CISH), illetve biotinyl-tyramid alapú (TISH) *in situ* hibridizációs eljárással (49,51). Az általunk használt újszerű, innovatív RNAscope eljárással viszont kutatócsoportunk mutatta ki először sikeresen sertések tüdőszöveti mintájából a PRRSV-t. RNAscope módszer segítségével kimagasló érzékenység és specificitás mellett vizsgálható a kórokozó szöveti

eloszlása, valamint a fertőzés következtében kialakult elváltozások is. Ezen pozitív eredmények alapján az eljárás alkalmas a kórokozó kutatási célú, valamint diagnosztikai vizsgálatára is, bár ez utóbbi esetében a jelentős költség még akadályt jelenthet. A módszer segítheti továbbá a PRRSV kóroktani szerepének tisztázását az egyes esetekben, illetve hozzá járulhat a betegség kialakulásának mélyebb megismeréséhez is.

Vizsgálatunk következő részében az RNAscope eljárással sikeresen kimutatott fertőzött sejtek arányát is megállapítottuk a sertések tüdőszövetéből készített metszetekben, azok szoftveres elemzésével. A továbbiakban ezt az értéket összehasonlítottuk a minták qRT-PCR vizsgálatával nyert Ct (threshold cycle) értékekkel. A két változó statisztikai elemzése alapján nem túl erős, de szignifikáns ($p = 0,005751$) kapcsolatot állapítottunk meg a két érték közt. Eredményeink alapján valószínű, hogy nagyobb mintaszám esetén szorosabb összefüggésre utaló adatokat kaptunk volna a két változó esetén. Ez arra utal, hogy a PRRSV-pozitív minták RNAscope-eljárással történő vizsgálata során, a kórokozóval fertőzött sejtek arányából bár nem pontosan, de következtethetünk az egyed tüdőszövetében megtalálható vírusok mennyiségére. Fontos megemlíteni, hogy a boncolás során végzett orientált mintavétel ellenére, bármilyen kórszövetteni metszettel dolgozó eljárás – köztük az RNAscope is – az adott szervnek csupán egy 2 dimenziós szegmensét vizsgálja. Ebből következően a metszetek vizsgálata alapján végzett mennyiségi becslések pontossága is eleve korlátozott, azonban a gyakorlott patológus számára így is segítséget nyújthat. Ezen felül nem elhanyagolható, hogy a PRRSV RNAscope módszerrel való vizsgálata a kórokozó azonosításán túl segítséget nyújt annak kóroktani szerepének meghatározásában is, ami fontosabb tényező lehet, mint a vírusok szöveti koncentrációjának konkrét ismerete.

A PRRSV RNAscope eljárással történő vizsgálatával kapcsolatban még sok tapasztalat szerzése szükséges annak érdekében, hogy a módszer elterjedté váljon úgy a betegség diagnosztizálásában, mint kutatásában is. Kétségtelen azonban, hogy ez az újszerű RNS alapú *in situ* hibridizációs eljárás sok lehetőséget rejt még magában nem csak az állatorvosi patológia területén, hanem akármilyen RNS-sel kapcsolatos kutatás esetén.

9. Összefoglaló

A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómája egyike a legnagyobb gazdasági kárt okozó megbetegedéseknek, amelyek a modern sertéstartást érintik. A kórkép világszerte elterjedt, a nagy sertéstartó államoknak jelentős többletköltséget okozva. A betegség kórokozója a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának *Porarterivirus* nemzetségbe tartozó PRRS-vírus 1 (PRRSV-1), valamint PRRS-vírus 2 (PRRSV-2). A vírust rendkívüli változékonyság jellemzi, amely nagyban befolyásolja a kórokozó elleni védekezés hatékonyságát, a betegség járványtanát, illetve immunbiológiáját.

A PRRSV által okozott klinikai tünetek a különböző korcsoportokban jelentősen eltérnek. Kocák esetében a reprodukciós zavarok a legfontosabbak, úgymint a koraellés, a halvaszületés, valamint a kései visszaivarzás. A kórokozóval fertőzött újszülött malacok vitalitása igen lecsökkent, így az újszülöttkori mortalitás jelentősen megnő, ezen kívül bizonyos légzőszervi tünetek is megjelenhetnek. A növendék, illetve hízó korcsoportokban a súlyos formában megjelenő légzőszervi tünetek (nehezített légzés, köhögés) kerülnek előtérbe, amelynek következtében pneumonia is kialakulhat. A betegség következtében megjelenő tünetek súlyosságát nagyban befolyásolja az adott vírustörzs virulenciája, valamint a fertőzött egyedek immunbiológiai állapota.

Kutatásunk során 20, kísérleti körülmények közt vad típusú, PRRSV-1-gyel fertőzött sertés bal középső tüdőleányéből formalin-fixáltuk és paraffinba ágyasztuk (FFPE), majd ezen blokkokból készített metszeteket vizsgáltuk. A mintákból a sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómájának vírusát egy újszerű, RNS-alapú *in situ* hibridizációs módszerrel, RNAscope eljárással mutattuk ki. A reakcióhoz alkalmazott próbákat a kísérletben alkalmazott vírustörzs szekvenciája alapján készítettük el. A vírus jelenlétét intenzív piros jellel azonosítottuk. A jel intenzitását összevetettük az azonos mintákon elvégzett real-time PCR eredményével, amely pozitív korrelációt mutatott. Negatív kontrollként nem-fertőzött állatok mintáit használtuk és a kromogén jel teljes hiánya bizonyította a módszerünk specificitását. Kutatócsoportunk elsőként azonosította sikeresen a PRRSV-t fertőzött állatokban, *in situ* hibridizációs módszer segítségével. A korábban ilyen célból alkalmazott immunhisztokémiai módszerek alkalmatlanok voltak ezen feladatra, amely a vírus magas genetikai és antigén variabilitásának, továbbá a széles spektrumú antitestek hiányának tudható be.

10. Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most economically important diseases around the world in the swine industry. The syndrome widespread worldwide, causing enormous economic impact on the most important pig producing countries. The causative agent of the disease is PRRS-virus 1 (PRRSV-1), and PRRS-virus 2 (PRRSV-2) classified in the order *Nidovirales*, family *Arteriviridae*, genus *Porarterivirus*. The virus is characterized by the high level of genetic diversity, which affects the epidemiology, the immunology and the control of the disease.

The clinical signs associated with PRRSV infection could be really various depending on the age of the affected animals. In sows, reproductive failure is the most important: late-term abortion, premature farrowing, increase in number of dead-born piglets and irregular returns to estrus. The infected new-born piglets are less viable, weak and the preweaning mortality is increased due to lethargy, weakness and respiratory disorders. In weaners and growers, respiratory symptoms (dyspnoea, coughing, sneezing) are the most relevant, moreover, pneumonia could appear as a part of the porcine respiratory disease complex. The severity of the clinical signs depends mostly on the virulence of the virus strain, the immunological condition of the infected pigs, and the viral/bacterial coinfections.

In our study, we examined the lungs of 20 pigs, which have been inoculated with a wild-type PRRSV-1 strain under experimental conditions. For the visualization of the virus, 4 µm thick slides were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks, prepared from the left medial lobes of each animal. Thereafter a new, RNA-based *in situ* hybridization technology (RNAscope) was applied to detect PRRSV in the samples. The oligos, serving as probes were designed based on the sequence of the strain used in the challenge model. The presence of the virus was shown by intense red signal. The intensity of the signal was then compared to the real-time qPCR results performed on the parallel samples, showing a positive correlation. Non-infected control animals served as negative controls and the total lack of positive staining confirmed the specificity of the assay.

For the first time, our research group implemented an *in situ* hybridization assay for the detection of PRRSV in challenged animals. Previous attempts to use immunohistochemistry for the same purposes were unsuccessful due to the high genetic and antigenic variability of the virus and the lack of broadly reacting antibodies available on the market.

11. Irodalomjegyzék

1. Reiner G, Fresen C, Bronnert S, Willems H. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Vet Microbiol* (2009) **136**:250–258. doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.023
2. Pejsak Z, Stadejek T, Markowska-Daniel I. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm. *Vet Microbiol* (1997) **55**:317–322. doi:10.1016/S0378-1135(96)01326-0
3. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL, Haley C a. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Heal Prod* (2013) **21**:72–84. Available at: <http://www.aasv.org/shap/issues/v21n2/v21n2p72.html>
4. Kuhn JH, Lauck M, Bailey AL, Shchetinin AM, Vishnevskaya T V., Bào Y, Ng TFF, LeBreton M, Schneider BS, Gillis A, et al. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Arch Virol* (2016) **161**:755–768. doi:10.1007/s00705-015-2672-z
5. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol* (2016) **161**:2921–2949. doi:10.1007/s00705-016-2977-6
6. Balka G, Podgórska K, Brar MS, Bálint Á, Cadar D, Celer V, Dénes L, Dirbakova Z, Jedryczko A, Márton L, et al. Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994–2014: origin and evolution of the virus in the region. *Sci Rep* (2018) **8**:7811. doi:10.1038/s41598-018-26036-w
7. Shi M, Lam TT-Y, Hon C-C, Hui RK-H, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC-C. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res* (2010) **154**:7–17. doi:10.1016/j.virusres.2010.08.014
8. Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology* (2015) **479–480**:475–486.

doi:10.1016/j.virol.2015.02.012

9. Han J, Wang Y, Faaberg KS. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* (2006) **122**:175–182. doi:10.1016/j.virusres.2006.06.003
10. Pesch S, Meyer C, Ohlinger VF. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol* (2005) **107**:31–48. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.028
11. Drigo M, Franzo G, Gigli A, Martini M, Mondin A, Gracieux P, Ceglie L. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J Virol Methods* (2014) **202**:79–86. doi:10.1016/j.jviromet.2014.03.006
12. Clark M, Tilman D. Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice. *Environ Res Lett* (2017) **12**:064016. doi:10.1088/1748-9326/aa6cd5
13. Stadejek T. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* (2006) **87**:1835–1841. doi:10.1099/vir.0.81782-0
14. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Q* (1991) **13**:121–130. doi:10.1080/01652176.1991.9694296
15. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, et al. Isolation of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and Experimental Reproduction of the Disease in Gnotobiotic Pigs. *J Vet Diagnostic Investig* (1992) **4**:117–126. doi:10.1177/104063879200400201
16. Rahe M, Murtaugh M. Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses* (2017) **9**:148. doi:10.3390/v9060148
17. Johnson CR, Griggs TF, Gnanandarajah J, Murtaugh MP. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative

- ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol* (2011) **92**:1107–1116.
doi:10.1099/vir.0.030213-0
18. Shi M, Lam TT-Y, Hon C-C, Hui RK-H, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FC-C. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res* (2010) **154**:7–17. doi:10.1016/j.virusres.2010.08.014
 19. Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FCC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* (2010) **154**:18–30. doi:10.1016/j.virusres.2010.08.015
 20. Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, Hirose O, Gojobori T. The Origin and Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Mol Biol Evol* (2005) **22**:1024–1031. doi:10.1093/molbev/msi089
 21. Domingo E, Holland JJ. RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annu Rev Microbiol* (1997) **51**:151–178.
doi:10.1146/annurev.micro.51.1.151
 22. Martin-Valls GE, Kvisgaard LK, Tello M, Darwich L, Cortey M, Burgara-Estrella AJ, Hernandez J, Larsen LE, Mateu E. Analysis of ORF5 and Full-Length Genome Sequences of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates of Genotypes 1 and 2 Retrieved Worldwide Provides Evidence that Recombination Is a Common Phenomenon and May Produce Mosaic Isolates. *J Virol* (2014) **88**:3170–3181. doi:10.1128/JVI.02858-13
 23. Cho JG, Dee SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* (2006) **66**:655–662. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.024
 24. Cho JG, Deen J, Dee SA. Influence of isolate pathogenicity on the aerosol transmission of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* (2007) **71**:23–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193878>
 25. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CCL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Serum and Semen of Adult Boars. *J Vet Diagnostic Investig* (1995) **7**:456–464. doi:10.1177/104063879500700406
 26. Reiner G, Fresen C, Bronnert S, Willems H. Porcine Reproductive and Respiratory

- Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Vet Microbiol* (2009) **136**:250–258. doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.023
27. Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu Rev Anim Biosci* (2016) **4**:129–154. doi:10.1146/annurev-animal-022114-111025
 28. Nauwynck HJ, Van Gorp H, Vanhee M, Karniychuk U, Geldhof M, Cao A, Verbeeck M, Van Breedam W. Micro-Dissecting the Pathogenesis and Immune Response of PRRSV Infection Paves the Way for More Efficient PRRSV Vaccines. *Transbound Emerg Dis* (2012) **59**:50–54. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01292.x
 29. Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur J-H, Osorio FA. Duration of Infection and Proportion of Pigs Persistently Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Clin Microbiol* (2003) **41**:58–62. doi:10.1128/JCM.41.1.58-62.2003
 30. Schulze M, Revilla-Fernández S, Schmoll F, Grossfeld R, Griessler A. Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Vet Scand* (2013) **55**:16. doi:10.1186/1751-0147-55-16
 31. Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, Doorselaere J VAN, Saveleva TA, Nauwynck HJ. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res* (2010) **6**:30. doi:10.1186/1746-6148-6-30
 32. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, et al. Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS One* (2007) **2**:e526. doi:10.1371/journal.pone.0000526
 33. Zeman DH. DIAGNOSTIC NOTES Concurrent respiratory infections in 221 cases of PRRS virus pneumonia: 1992-1994 issues of Swine Health and Production. *Swine Heal Prod* (1996) **4**:143.
 34. Fablet C, Marois-Créhan C, Simon G, Grasland B, Jestin A, Kobisch M, Madec F, Rose N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-

- finish pig herds: A cross-sectional study. *Vet Microbiol* (2012) **157**:152–163.
doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.015
35. Chae C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J* (2016) **212**:1–6. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.030
 36. Nieuwenhuis N, Duinhof TF, van Nes A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec* (2012) **170**:225–225. doi:10.1136/vr.100101
 37. Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Immunol Immunopathol* (2015) **167**:1–14. doi:10.1016/j.vetimm.2015.07.003
 38. Mateu E, Diaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* (2008) **177**:345–351. doi:10.1016/j.tvjl.2007.05.022
 39. A FÖLDMŰVELÉSÜGYI MINISZTERIUM HIVATALOS LAPJA. Available at: <http://gi.kormany.hu/download/6/d8/02000/12.pdf> [Accessed October 11, 2018]
 40. PRRS Nemzeti Mentésítési Terv - Állategészségügy hivatali - Nébih. Available at: <http://portal.nebih.gov.hu/-/prrs-nemzeti-mentesitesi-terv> [Accessed October 12, 2018]
 41. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* (2005) **39**:75–85. doi:10.2144/05391RV01
 42. Gall JG, Pardue ML. FORMATION AND DETECTION OF RNA-DNA HYBRID MOLECULES IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS. *Proc Natl Acad Sci* (1969) **63**:378–383. doi:10.1073/pnas.63.2.378
 43. Ehtisham M, Wani F, Wani I, Kaur P NS. Fundamental principles of in situ hybridization. *Int Res J Cli Med* (2016) **1(4)**:23–29. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/305476277>
 44. Larsson LI, Hougaard DM. Detection of gastrin and its messenger RNA in Zollinger-Ellison tumors by non-radioactive in situ hybridization and immunocytochemistry. *Histochemistry* (1992) **97**:105–110. doi:10.1007/BF00267299

45. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagnostics* (2012) **14**:22–29.
doi:10.1016/j.jmoldx.2011.08.002
46. Wang H, Wang MX-M, Su N, Wang L, Wu X, Bui S, Nielsen A, Vo H-T, Nguyen N, Luo Y, et al. RNAscope for In situ Detection of Transcriptionally Active Human Papillomavirus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Vis Exp* (2014)
doi:10.3791/51426
47. Bingham V, McIlreavey L, Greene C, O’Doherty E, Clarke R, Craig S, Salto-Tellez M, McQuaid S, Lewis C, James J. RNAscope *in situ* hybridization confirms mRNA integrity in formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue samples. *Oncotarget* (2017) **8**:93392–93403. doi:10.18632/oncotarget.21851
48. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* (2017) **7**:16878.
doi:10.1038/s41598-017-17204-5
49. Han K, Seo HW, Oh Y, Kang I, Park C, Kang SH, Kim S-H, Lee B-H, Kwon B, Chae C. Evaluation of monoclonal antibody–based immunohistochemistry for the detection of European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and a comparison with in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reacti. *J Vet Diagnostic Investig* (2012) **24**:719–724.
doi:10.1177/1040638712446507
50. Matos LL de, Trufelli DC, de Matos MGL, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* (2010) **5**:9–20. Available at: <http://www.la-press.com>.<http://www.la-press.com>.
51. Trang NT, Hirai T, Ngan PH, Lan NT, Fuke N, Toyama K, Yamamoto T, Yamaguchi R. Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification. *J Vet Diagnostic Investig* (2015) **27**:326–331.
doi:10.1177/1040638715579260

Köszönetnyilvánítás

Nagyon köszönöm témavezetőimnek, Dr. Balka Gyula egyetemi docens úrnak, és Dénes Lilla PhD hallgatónak a rengeteg segítségért, támogatásért, kitartó munkáért, valamint azért, hogy biztosították számomra azt a szakmai környezetet, amely nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom Schönhardt Kittinek, Pop Renátának, valamint a Patológiai Tanszék minden munkatársának, akik munkám során segítségemre voltak, hozzáférést biztosítottak minden szükséges eszközhöz, és biztosították a kellemes légkört munkám telje ideje alatt.

Köszönet illeti a Bécsi Állatorvostudományi Egyetem Pathobiológiai Tanszékének Virologiai csoportját, hogy munkámhoz rendelkezésemre bocsátották az általuk végzett vizsgálatok eredményeit.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).



4. melléklet Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott DR. BALKA GYULA..... Igazolom, hogy

HORVÁTH GERGŐ..... (a hallgató neve)

A PRRSV KIMUTATÁSA RNS ALAPÚ IN SITU HIBRIDIZÁCIÓVAL

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. M. 19......

BALKA GYULA Balka Gyula

a témavezető neve és aláírása

PATOLÓGIAI.....

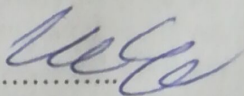
tanszék



NYILATKOZAT

Alulírott HORVÁTH GERGŐ nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe A PRRSV KIMUTATÁSA RNS ALAPÚ
IN SITU HIBRIDIZÁCIÓVAL
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2018.
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. M. 19.

Horváth Gergő 

a hallgató neve és aláírása

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: ... HÖRVÁTH GERGŐ
Elérhetőség (e-mail cím): ... howath.gergo@gmail.com
A feltöltendő mű címe: ... A P.R.R.S.V. KIMUTATÁSA RNS ALAPÚ
... IN SITU HIBRIDIZÁCIÓVAL
A mű megjelenési adatai: ... 2019.
Az átadott fájlok száma: ... 1 DB

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

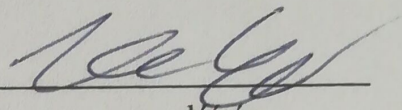


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2019 évM.....hó ...19...nap


aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*