

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Az elmúlt 30 évben Magyarországon izolált EHV-1
vírustörzsek genetikai tulajdonságainak vizsgálata**

PhD értekezés

Dr. Malik Péter

2012

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Pálfi Vilmos
az állatorvos-tudomány kandidátusa

Dr. Bálint Ádám
PhD
NÉBIH ÁDI Baromfi és Sertés Virologiai Laboratórium

Dr. Dán Ádám
PhD
NÉBIH ÁDI Molekuláris Biológiai Laboratórium

Készült 8 példányban. Ez a ...sz. példány.

.....

Dr. Malik Péter

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. ÖSSZEFOGLALÁS.....	7
2. BEVEZETÉS	11
3. A VIZSGÁLATAIM CÉLJAI	13
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	14
4.1. A lovak herpesvírusainak besorolása és általános jellemzése	14
4.2. Az EHV-1 által okozott megbetegedések	16
4.2.1. Kórfejlődés.....	16
4.2.2. A vírus által okozott kórképek	17
4.2.3. Az EHV-1 diagnosztikája.....	20
4.2.4. A betegség elleni védekezés.....	23
4.3. Az EHV-1 genom felépítése	24
4.3.1. A genom általános tulajdonságai	24
4.3.2. Az ORF30 jellemzői és jelentősége.....	25
4.3.3. Az ORF68 jellemzői és jelentősége.....	27
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	30
5.1. A vizsgálatokban felhasznált izolátumok jellemzése	30
5.2. A vírus kimutatására használt módszerek leírása.....	32
5.2.1. Az EHV-1 vírustörzsek izolálása	32
5.2.2. Az izolátumok genetikai elemzéséhez felhasznált módszerek leírása	33
6. EREDMÉNYEK	38
6.1. A hazai izolátumok ORF30 szakaszának elemzéséhez kifejlesztett real-time PCR módszer leírása és az ehhez kapcsolódó eredmények	38
6.1.1. A primerek tervezése és az amplikon.....	38
6.1.2. A vizsgált EHV-1 izolátumok ORF30 régiójának elemzése.....	40
6.2. A magyarországi EHV-1 izolátumok ORF68 régióján végzett vizsgálatok.....	42
6.2.1. Az ORF68 polimorf szakaszának vizsgálatához használt primerek	42
6.2.2. A saját izolátumokban előforduló nukleotidcserék és a csoportok kialakítása	43

6.2.3. A csoportok földrajzi előfordulásával kapcsolatos eredmények	48
6.2.4. Az EHV-1 törzsek ORF30 és ORF68 szakaszain előforduló szubsztitúciók összefüggéseinek elemzése	51
7. MEGVITATÁS.....	53
7.1. Az EHV-1 törzsek csoportosítására kifejlesztett módszerek előnyei és hátrányai .	53
7.2. Az ORF30 elemzése és a vizsgálataink során kapott eredmények alapján levonható következtetések	54
7.2.1. Az EHV-1 genom ORF30 szakaszának a törzsek neuropatogén tulajdonságaiban játszott szerepe.....	54
7.2.2. Az általunk kifejlesztett real-time PCR módszerrel kapott eredmények és az ebből levonható következtetések.....	55
7.3. Az ORF68 csoportok kialakítása és az eredményekből levonható következtetések	57
7.3.1. Genetikai különbségek a különböző herpesvírusok törzsei között	57
7.3.2. A csoportok kialakítása a részben polimorf szakaszon előforduló SNP-k alapján....	58
7.3.3. Szabályszerűségek a különböző csoportokba tartozó törzsek földrajzi és időbeli elterjedésében	61
8. ÚJ EREDMÉNYEK.....	66
9. IRODALOMJEGYZÉK	68
10. A TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	77
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	78

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A		adenin
C		citozin
CPE	cytopathic effect	sejtkárosító hatás
D		aszparagin
DMSO	dimethyl sulphoxide	dimetil-szulfoxid
dNTP	deoxy-ribonucleotide-triphosphate	dezoxi-ribonukleotid trifoszfát
DNS		dezoxiribonukleinsav
ED	equine dermis	ló eredetű sejtvonal
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
EHV	equine herpesvirus	ló herpesvírus
EMPF	equine multinodular pulmonary fibrosis	lovakban előforduló multinoduláris tüdőfibrosis
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster rezonancia energiaátvitel
G		guanin
HCMV		humán citomegalovírus
HSV-1		herpes simplex vírus-1
MEM	minimum essential medium	
MGSZH		Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
N		aszparaginsav
OIE	World Organisation for Animal Health	Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PriProET	primer-probe energy transfer	primer-próba energiaátvitel
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrom virus	sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómájának vírusa
RFLP	restriction fragment length polymorphism	restrikciós fragment hossz polimorfizmus
RK13		nyúl vese eredetű sejtvonal
RNA	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RSZKFV		ragadós száj- és körömfájás vírusa
SNP	single nucleotide polymorphism	egyedi nukleotid polimorfizmus
SVDV	swine vesicular disease virus	sertések hólyagos betegsége

T		timin
TK		timidin-kináz enzim
UL	unique long region	egyedi hosszú szakasz
US	unique short region	egyedi rövid szakasz
VZV		Varicella zoster vírus

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink célja 35, 1977 és 2008 között, vetélt lómagzatokból származó ló herpesvírus-1 (EHV-1) izolátum, továbbá két referencia törzs (ARMY-183, RacH) genetikai vizsgálata volt. Elsősorban a patogenitást meghatározó markereket kerestünk, illetve olyan szakaszok vizsgálatát szerettük volna elvégezni, amelyek alapján az izolátumok eredetét és genetikai alapú rokonságát meghatározhatjuk. Az összehasonlításhoz a genom két régiójának szekvenciáit elemeztük (az ORF68 és az ORF30 szakaszt), ugyanis irodalmi adatok alapján ez a két nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF) bizonyult a legalkalmasabbnak a kitűzött céljaink megvalósítására. Az ORF30 régió 2254-es nukleotid pozíciójában előforduló pontmutáció meghatározhatja azt, hogy az adott EHV-1 törzs mekkora eséllyel képes idegrendszeri tüneteket kiváltani a gazdaállatban egy fertőzés során. Az ORF68 szekvenciája nem befolyásolja ugyan nagymértékben a vírustörzsek patogenitását, azonban egy kb. 600 bázispár hosszúságú polimorf szakasz vizsgálatával, az ott előforduló pontmutációk alapján az izolátumokat különböző csoportokba lehetett rendezni. A kialakított csoportok tagjainak földrajzi előfordulásában már előzőleg is találtak szabályszerűségeket, a mi vizsgálati eredményeink ezeket meg tudták erősíteni.

A szekvencia különbségek meghatározására mindkét régió esetében saját módszereket használtunk. Az ORF30-ban előforduló SNP (single nucleotide polymorphism, egyedi nukleotid polimorfizmus) kimutatására egy olyan speciális eljárást alkalmaztunk, amit eddig főleg hólyagos betegségeket okozó vírusok (például ragadós száj- és körömfájásának vírusa (RSZKFV), sertések hólyagos betegségének vírusa (SVDV), illetve a sertések reprodukciós és légzőszervi tünetegyüttesének vírusa (PRRSV) különböző genotípusainak meghatározására használtak. Az általunk kifejlesztett módszer is az ezeknél felhasznált primer-probe energy transfer (PriProET) elvén alapul, ami gyors és biztos módszernek bizonyult a neuropatogén és nem neuropatogén genotípusba tartozó EHV-1 törzsek elkülönítésére. A módszer segítségével a Magyarországról származó 35 izolátum közül öt (14%) olyat találtunk, ami a 2254-es nukleotid pozícióban guanin (G) bázist kódolt, vagyis egy kialakuló fertőzés során nagy valószínűséggel idegrendszeri tüneteket képes kiváltani. A RacH vakcinatörzs egyedi szekvenciát kódol a vizsgált ORF30 szakaszon. Ez a különbség a vizsgálataink eredményeiben úgy jelentkezett, hogy a RacH törzshöz tartozó olvadáspont görbe a neuropatogén és nem neuropatogén típusba tartozó törzsektől eltérő pozícióban, a két genotípushoz tartozó görbék között jelent meg.

Az ORF68 szakasz polimorf régiójának genetikai elemzéséhez saját primereket terveztünk, ugyanis az eredeti cikkben szereplő primerekkel nem kaptunk megbízható eredményeket. A DNS templátok amplifikációja után a polimeráz láncreakció termékét minden izolátum esetén

kétszer szekvenáltuk, majd az esetlegesen előforduló pontmutációk alapján csoportosítottuk a Magyarországon izolált, illetve a referencia törzseinket.

Egy előző tanulmányban megvizsgált 108 EHV-1 törzs ORF68 szekvenciáinak eltérései alapján összesen hat csoportot alakítottak ki. Ebbe a hat csoportba a 35 magyar izolátum közül 23-at tudtunk besorolni, ami a törzsek 66%-át jelentette. A többi törzs ORF68-as régiójának polimorf szakaszán olyan pontmutációk fordultak elő, amelyeket eddig még nem írtak le, ezekből a törzsekből négy újabb csoportot alakítottunk ki. Az angol kutatók eredményeitől eltérően, a legtöbb magyar izolátum abba a csoport került (2-es csoport), amelyik az eredeti tanulmány szerint főleg észak-amerikai törzseket tartalmazott. Ezzel ellentétben a 3-as csoportba, melyhez az eredeti vizsgálat szerint az európai törzsek nagy része tartozott, a magyarországi törzseknek csak kevesebb, mint ötödét (17%) tudtuk besorolni. A csoportok nagy részének elterjedése időben és térben is elkülönült a többi csoportétól, ezzel igazoltuk azt a feltevést, hogy az eltérő pontmutációkat tartalmazó törzsek előfordulása bizonyos szabályszerűségeket mutat. Az általunk kidolgozott módszer tehát megkönnyítheti egy adott régióban előforduló EHV-1 vírusok nyomon követését, továbbá ezzel együtt segítséget nyújthat a járványtani nyomozás során. Ahhoz azonban, hogy minél részletesebb és pontosabb adatok álljanak rendelkezésre, a hazánkban előforduló további EHV-1 törzsek genetikai elemzésére van szükség.

SUMMARY

The present studies was aimed at grouping of 35 Hungarian equine herpesvirus-1 (EHV-1) isolates by the single nucleotide polymorphisms (SNP) of two open reading frames (ORFs) in the virus genome, ORF68 and ORF30, respectively. In a former study, two EHV-1 strains (Ab4, V592) were compared, and the results showed that these two regions are suitable for the distinction of EHV-1 strains. The substitution in the 2254 nucleotide position of ORF30 region can influence the neuropathogenic potential of the virus strain. In contrast, while the SNPs in ORF68 cannot be connected to pathogenicity, these substitutions allow classification of EHV-1 strains in different groups. The occurrence of members of distinct groups in different outbreaks can facilitate epidemiological investigations, because the geographical distribution of a particular group is very often specific. All the Hungarian EHV-1 isolates were originated from aborted horse fetuses isolated between 1977 and 2008. Two laboratory EHV-1 strains (ARMY 183, Rach) were also included in the genetical examinations of EHV-1 strains beside the Hungarian isolates. For the characterisation of both specific genetic regions we used newly developed methods.

A former comparison of neuropathogenic and non-neuropathogenic EHV-1 strains revealed that a single amino acid coding nucleotide substitution (A/G2254) in the ORF30 region is associated with the altered functions of the viral DNA polymerase, and consequently the neuropathogenicity of EHV-1 virus strains. For the detection of this substitution we developed a new real-time PCR assay, based on primer-probe energy transfer (PriProET). Our results verified the presence of neuropathogenic EHV-1 strains in Hungary, five of 35 isolates (14%) were the members of the G2254 (neuropathogenic) genotype group. The results of melting temperature analysis showed exact correlation with the sequence variations of the targeted region of ORF30, and the two genotypes (A/G2254) could be easily identified by the different peaks of melting temperatures. The Rach strain has a unique sequence in the targeted region, therefore this strain cannot be assigned to any of the two groups set up previously, and its melting temperature analysis curve was found between the curves of the two genotypes. The only isolate (04_04), which could be connected to neurological symptoms in the infected horses, also encoded G at the 2254 nucleotide position.

After sequencing the particularly polymorphic region of ORF68, the Hungarian EHV-1 isolates could be classified into seven groups. Only 23 of the 35 (66%) isolates belonged to the formerly described groups, while the SNPs of 12 isolates diverged, and four new groups could be set up. In previous studies groups 2 and 5 contained mostly North American strains, while in group 3 predominantly European isolates were found. In contrast, the 40% of Hungarian isolates (14/35) belonged to group 2 but group 3 included only four EHV-1 strains (11.4%). The variation of ORF68 in some certain groups can be associated with the geographical distribution of strains, but the analysis of these genetic markers primarily

provide information about the circulation of EHV-1 strains in a designated area, which can help the epidemiological investigation after an EHV-1 outbreak.

2. BEVEZETÉS

A ló tartás módja és célja sokban különbözik a többi gazdasági haszonállat tartásától, ugyanis ezeket az állatokat elsősorban sportolásra, illetve manapság már egyre csökkenő arányban fizikai munkavégzésre használják. A hústermelés céljára tartott állatok száma Magyarországon elenyésző. A lovak herpeszvírusainak kártétele nemcsak a széles körben elterjedt, légzőszervi tünetekkel vagy vetéléssel járó kórformák esetén jelentős, hanem a tenyészállatokban, illetve versenylovakban megjelenő idegrendszeri tünetek is komoly következményekkel járhatnak.

A lófélékben eddig izolált kilenc herpeszvírus közül az egész világon előforduló, esetenként jelentős gazdasági kárt okozó, viscerotrop alfa-herpeszvírusoknak van a legnagyobb jelentősége, ezek közül is elsősorban a lovak 1-es és 4-es típusú herpeszvírusának (EHV-1 és EHV-4). A két szerotípus által előidézett légzőszervi tünetek nagyon hasonlóak, a vetélése és idegrendszeri tünetekkel járó kórformából izolált törzsek nagy többsége viszont az 1-es típusba tartozik.

Az állatok mozgatása, illetve a gyakori, közvetlen kontaktus idegen állatokkal, ami bizonyos lovaknál elengedhetetlen (pl. versenylovak), nagyban növeli a fertőzés kockázatát. A herpeszvírusokra jellemző latencia lovakban is megjelenhet, a klinikai tüneteket nem mutató, vírushordozó állatok alkotják a fertőzés rezervoárját az adott lóállományon belül. A latensen fertőzött állatok vírusürítővé válhatnak, és egyrészt folyamatosan fenntartják a fertőzést az állományon belül, másrészt a vírust az állományba bekerülő, fogékony állatoknak is át tudják adni, ami tömegesen megjelenő légzőszervi tüneteket és vetéléseket is okozhat.

Az EHV-1 vetéléssel járó kórformája Magyarországon is régóta ismert (Manninger és Csontos, 1941; Sályi, 1941; Kapp, 1973; Glávits és mtsai, 1984), gazdasági jelentősége a vakcinázások ellenére még napjainkban sem csökkent (Rusvai és mtsai, 1996; Szeredi és mtsai, 2003; Szeredi, 2004; Hornyák és mtsai, 2006; Szeredi és mtsai, 2008). Az idegrendszeri tünetekkel járó kórforma előfordulásáról nincsenek adataink, egy olyan eset kórelőzményében, ami később az intézeti vizsgálat során EHV-1 fertőzésnek bizonyult, a vetélése kórforma mellett az egyik állatban ataxia, inkontinencia, illetve a hátsó testfél gyengesége is szerepelt.

A hazánkban előforduló EHV-1 törzsek genetikai változatosságáról és a különböző patogenitású törzsek hazai elterjedéséről eddig nem álltak rendelkezésre szakirodalmi adatok. Elsődleges célom az volt, hogy az 1977 és 2008 közötti 30 éves időszak alatt izolált, vetélt lómagzatokból származó 35 EHV-1 törzset valamilyen genetikai eltérés, vagy patogenitásbeli különbség alapján csoportosítsam. Egy angol kutatók által elvégzett vizsgálatban, amelyben két EHV-1 törzs teljes genomját hasonlították össze, két olyan

szakasz is szerepelt, amelyek elemzésével új információkat kaphatunk a magyarországi EHV-1 törzsek genetikai változatosságáról és földrajzi elterjedésükről.

A külföldi és hazai szakirodalom alapján jól látható, hogy a lovak herpesvírusainak jelentőségét (elsősorban az EHV-1-ét) nem szabad alábecsülni akkor sem, ha egy állományban vakcinázás folyik. Egy-egy értékes csikó elvesztése, esetleg az idegrendszeri tünetek megjelenése egy versenyző- vagy tenyészállatban, amelyek így a felhasználásuk céljára alkalmatlanná válnak, mind-mind érzékenyen érinthetnek egy lovakkal foglalkozó vállalkozást. A betegség elleni sikeres védekezés érdekében tisztában kell lenni a vírus járványtanával, és a herpesvírusokra jellemző speciális tulajdonságokkal, a latencia fogalmával. Vizsgálataim eredményei a vírustörzsek genetikai tulajdonságainak meghatározása alapján elősegítik az EHV-1 fertőzések járványtanának pontosabb megértését, valamint a különböző csoportokba tartozó törzsek mozgásának meghatározásával a fertőzések eredetének tisztázását.

3. A VIZSGÁLATAIM CÉLJAI

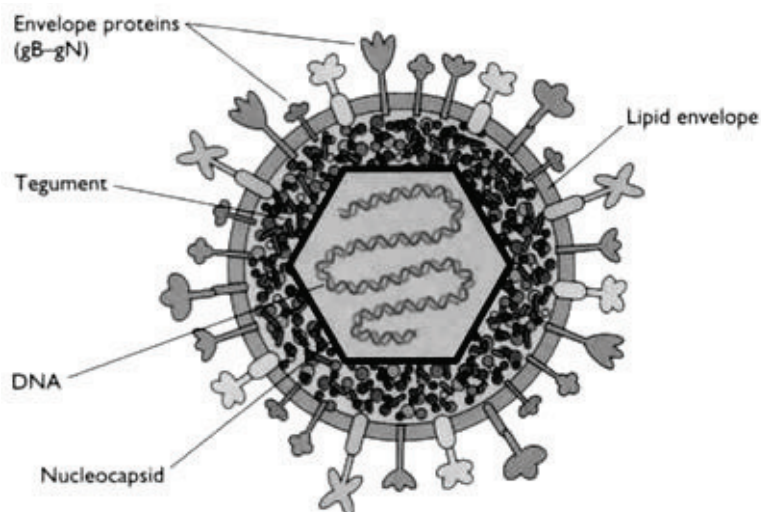
A Magyarországon izolált, kancák vetélt magzataiból származó EHV-1 törzsek molekuláris vizsgálataival arról szerettünk volna információt szerezni, hogy az előzőleg leírt, az ORF30-as és ORF68-as szakaszokon előforduló genetikai markerek milyen arányban fordulnak elő a hazai izolátumokban. A céljaink eléréséhez a következő kérdéseket kívántam megvizsgálni:

1. Az EHV-1 genom ORF30-as régiójában előforduló pontmutáció alapján meghatározott kétféle genotípus („neuropatogén” és „nem neuropatogén” típus) milyen arányban fordul elő a magyarországi izolátumok között?
2. Az a törzs, amely a kórelőzményi adatok alapján képes volt súlyos idegrendszeri tünetek kiváltására, vajon tartalmazza-e azt a genetikai markert, ami alapján a neuropatogén genotípusba lehet besorolni?
3. Lehetséges-e olyan új diagnosztikai eljárás kifejlesztése, amellyel ezeket a genotípusokat az eddigi módszereknél gyorsabban és egyszerűbben el tudjuk különíteni?
4. Az ORF68 szakaszon előforduló egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) alapján előzőleg meghatározott csoportok milyen arányban fordulnak elő a hazai izolátumok között? Találunk-e olyan SNP-eket, amelyeket eddig még nem írtak le? Ha igen, tudunk-e új csoportokat kialakítani az eddig nem ismert pontmutációkat tartalmazó törzsek besorolásával?
5. Megfigyelhető-e bármilyen szabályszerűség a különböző ORF68-as csoportokba tartozó hazai törzsek származási helyeinek földrajzi előfordulásában?
6. Milyen gyakorlati jelentősége van az általunk megvizsgált két genetikai marker meghatározásának?
7. A vizsgálatokba bevont RacH vakcinatörzs esetében találunk-e olyan genetikai eltérést a vizsgált szakaszokon, amely megkülönbözteti a fertőzésekből izolált törzsektől?

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A lovak herpesvírusainak besorolása és általános jellemzése

A herpesvírusok a DNS vírusok közé tartoznak, genomjuk nagyméretű (~ 150000 bp), lineáris, dupla szálú DNS. A *Herpesvirales* rend, *Herpesviridae* családjába sorolt vírusok virionjának felépítése nagyon hasonló. A kb. 150-200 nm átmérőjű virion belsejében, „core” állománya tartalmazza a vírus genomját, ezt borítja be az ikozahedrális szerkezetű, 162 kapszomerből álló kapszid. A legkülső réteg a vírus burka, ehhez kapcsolódnak azok a glikoproteinek, amelyek nagy szerepet játszanak a kórokozó sejtről-sejtre történő terjedésében, illetve a megbetegített szervezet vírus elleni védekezésében. A burok felületén kb. 8 nm hosszúságú „tüskék” láthatóak az elektronmikroszkópos felvételeken. A külső burok és a kapszid között helyezkedik el az amorf tegumentum állomány. Ez főleg a virális enzimeket tartalmazza, amelyek a vírus sejten belüli szaporodásához szükségesek, az itt található fehérjéket a vírus genomja kódolja (1. ábra).



1. ábra. A *Herpesviridae* családba tartozó vírusok általános felépítése

A *Herpesviridae* családon belül három alcsaládot különböztethetünk meg, az ide tartozó vírusok eltérő szaporodási tulajdonságai alapján. Az *Alphaherpesvirinae* alcsaládra jellemző a rövid szaporodási ciklus és a gyors terjedőképesség, a sejtenyészet fertőzött sejtjeiben cytolysist (elsősorban syncytiumok képződését) képesek kiváltani. Tagjaira jellemző még a latens fertőzés kialakításának képessége is, ennek nagy szerepe van az állományon belüli vírushordozás folyamatos fenntartásában. Az alfa-herpesvírusok főleg idegsejtben (ganglionokban) bújnak meg, míg a *Gammaherpesvirinae* tagjai ettől eltérően elsősorban a nyirokszervekben alakítanak ki latenciát.

Az *Alphaherpesvirinae*-be sorolt ló herpesvírusok két alcsoportba oszthatók az adott vírusok viscerotrop vagy dermatotrop tulajdonságai alapján. A gazdasági és klinikai szempontokból legfontosabb két típuson, az EHV-1 és EHV-4-en kívül a szamarak 3-as típusú herpesvírusa (EHV-8), illetve egy az EHV-1-hez nagyon hasonló, először Thomson-gazellából (GHV-1), majd zebrából izolált vírus tartozik (EHV-9) a viscerotrop alcsoportba. A hosszú évtizedeken át a lovak rhinopneumonitise vírusként ismert EHV-1 vírustól a szövetspektrum, az egérpatogenitás és végül a genomok restrikciós enzimekkel végzett összehasonlító vizsgálatainak eredményei alapján 1981-ben különítették el az EHV-4 szerotípust (Studdert és mtsai, 1981; Studdert és mtsai, 1984). A dermatotrop alcsoportba az EHV-3-at, illetve a számár 1-es típusú herpesvírusát sorolták (EHV-6). Az összes ló eredetű alfa-herpesvírus a *Varicellovirus* genusba tartozik.

Az EHV-3 okozza a lovak ivarszervi hólyagos kiütését, ami elsősorban közvetlen érintkezéssel, illetve szexuális úton terjed. A fertőzést rövid inkubációs periódus (2-3 nap) után a külső nemi szerveken (hímvesszőn és a preputiumon, illetve a vaginán és a perineumon) apró pustulák megjelenése követi. Az elváltozások két héten belül gyógyulnak, az elváltozás mértékétől függően a csődörök libidója csökkenhet. Az EHV-3 fertőzés során megjelenhet a latencia, a klinikailag tünetmentes, de vírusürítő állatok hosszú ideig fenn tudják tartani a megbetegedést (Seki és mtsai, 2004).

A *Betaherpesvirinae* alcsalád tagjainak viszonylag hosszú a szaporodási ciklusa és lassabb a terjedési sebessége, mint az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozó vírusoknak. A lovak herpesvírusai közül egy sem tartozik ide, így ennek a csoportnak témánk szempontjából nincs jelentősége.

Három EHV típus tartozik a *Gammaherpesvirinae* alcsaládba, az EHV-2, az EHV-5 és a szamarak 2-es típusú herpesvírusa (EHV-7). Az EHV-2 és az EHV-5 a *Percavirus* nemzetség tagjai, míg az az EHV-7 besorolatlan tagja a *Gammaherpesvirinae* alcsaládnak. Az alcsalád tagjaira jellemző, hogy lymphoid szövetben szaporodnak, és a lymphoid szövetben alakítják ki a latenciát. Szűk a gazdaspektrumuk, és egyes vírusok képesek rá, hogy T-, vagy B-lymphocytákban daganatos transzformációt indítsanak be. Hám- és kötőszöveti sejt eredetű szövettenyészetben szaporíthatóak, a cytopathogén hatásuk cytolysisként jelenik meg (Miller és mtsai, 1990; Collinson és mtsai, 1994; Kershaw és mtsai, 2001; Cutler, 2004;).

Az EHV-2 egy világszerte előforduló gamma-herpesvírus, Magyarországon is izolálták légzőszervi tüneteket mutató csikók orrváladékából (Pálfi és mtsai, 1978; Nordengrahn és mtsai, 2002). A fertőzéssel eddig összefüggésbe hozott klinikai tünetek változatosak lehetnek, felső légúti tünetek mellett leírtak már nyirokcsomó gyulladást, immunszuppressziót és keratoconjunctivitist is. Szerológiai vizsgálatok igazolták, hogy a lovak körülbelül 80-90%-ában megtalálhatók az EHV-2 elleni ellenanyagok (Murray és mtsai,

1996). Fiatal csikókban lázzal és légzőszervi tünetekkel járó megbetegedést okozhat, amit egy másodlagos bakteriális felülfertőződés (pl. *Rhodococcus equi*) tovább súlyosbíthat. Hazai vizsgálatok szerint a kancákban termelt EHV-2 elleni hiperimmunsavóval végzett passzív immunizálás jól használható a betegség megelőzésére (Belák és mtsai, 1980). Az EHV-5-öt szerológiai vizsgálatokkal nagyon nehéz elkülöníteni az EHV-2-től, a nagyon hasonló antigénszerkezet miatt. Magát a vírust csak néhány országban sikerült eddig izolálni (Svájc, Németország, Ausztrália, Új-Zéland) (Telford és mtsai, 1993). Magyarországon 13-23 hetes csikók perifériás limfocitáiból, PCR módszerrel sikerült a vírust kimutatni (Nordengrahn és mtsai, 2002).

A vírust elsősorban fiatal csikók felső légúti megbetegedéseivel sikerült összefüggésbe hozni, azonban egyre több jel mutat arra, hogy a lovakban előforduló, a tüdőben csomóképződéssel és intersticiális fibrózissal járó kórkép (equine multinodular pulmonary fibrosis, röviden EMPF) kiváltó oka is nagy valószínűséggel az EHV-5 (Williams és mtsai, 2007).

4.2. Az EHV-1 által okozott megbetegedések

4.2.1. *Kórfejlődés*

Az EHV-1 elsődleges célpontjai a lovak és a lófélék, azonban kimutatták már a vírust egyéb fajokban, például alpakában és lámában (Rebhun és mtsai, 1988), illetve szarvasmarhában is (Crandell és mtsai, 1988). A vírusfertőzés klinikai lefolyását sok tényező befolyásolhatja, elsősorban az állatok kora, immunállapota, az őket ért stresszhatások, illetve az, hogy az állat először találkozik-e az EHV-1-gyel. A kórokozó elsősorban a primer szaporodási helyéről, a felső légutakból ürülő váladékkal, a vetélés során a környezetbe kerülő magzatvízzel, placentával, ragályfogó tárgyakkal, és a lovak közötti közvetlen érintkezés útján terjed. Azok a lovak, amelyek életükben először találkoztak a vírussal, sokkal nagyobb mennyiségben ürítik, mint a fertőzésen egyszer már átesett állatok, illetve azok, amelyekben a latens vírusfertőzés reaktiválódott (Sutton és mtsai, 1998). Az első alkalommal fertőződött állatokban a vírusürítő szakasz is hosszabb, elérheti a fertőzés utáni 15. napot is (Gibson és mtsai, 1992). A fertőzött állományba születő csikók nagy része már az ellés körüli időszakban átesik az első EHV-1 vagy EHV-4 fertőzésen. A fertőzés forrása általában az ellő kanca, ugyanis az ellés idején reaktiválódó, majd ezután ürülő vírus könnyen átkerül a fogékony újszülött csikókra. Ez azonban általában nem jár látványos klinikai tünetek megjelenésével, így a kórokozó észrevétlenül cirkulálhat az állományban. A szerológiaiilag áthangolódott fiatal csikók aránya ezekben az állományokban akár 35-60% is lehet (Gilkerson és mtsai, 1998).

A felső légutakba bekerült EHV-1 a nyálkahártya epithelium sejtjeibe jutva szaporodni kezd, ami a sejtek pusztulását, lízisét okozza (*lítikus fázis*). A szétesett sejtekből kiszabadult virionok leukocyták közvetítésével jutnak el a nyirokcsomókba, illetve esetenként az endometriumba és központi idegrendszerbe (Kydd és mtsai, 1994). Az EHV-4 fertőzés alatt az esetek döntő többségében nem alakul ki a sejthez kötött viraemia. Vandekerckhove és mtsai (2011) vizsgálataiban három EHV-4 törzs közül csak egy volt képes fertőzni a mononukleáris leukocytákat, ami magyarázatot adhat arra, hogy az EHV-4 törzsek miért okoznak ritkán viraemiát és emiatt vetélést.

A fertőzött epithel sejtekből az EHV-1 vírus eljuthat a trigeminális ganglion idegsejtjeibe is, itt a vírus latens fázisba kerül. A megbetegedés első két hetében a fertőzött lymphocyták nagy részében a lítikus folyamatok dominálnak. Ilyenkor a vírus örökítőanyaga átírásra kerül, a virális fúziós glikoproteinek a sejt felszínére kerülnek, és az immunrendszer a megváltozott lymphocytákat felismeri és elpusztítja. Érdekesség, hogy a folyamat során komplett, fertőző virionok nem keletkeznek („abortív fertőzés”), képződésüket a lymphocyták felszínén található virális glikoproteinek és érzékeny epithel sejtek fúziója indítja be (Scott és mtsai, 1983; Gibson és mtsai, 1992)

Később a virális DNS átírása megszűnik, az EHV-1 latens állapotba kerül a T-lymphocytá populáció CD8+ sejtjeiben. Ilyenkor a virális örökítőanyag átírása szünetel, nem keletkeznek virális antigének, így a fertőzés az immunrendszer számára láthatatlan marad. Különböző stresszhelyzetek, hormonális változások, immunrendszert gyengítő tényezők hatására a latens fázisban nyugvó vírus reaktiválódhat. A folyamat lépései még nem teljesen ismertek, de a T-lymphocytákban és a trigeminális ganglion sejtjeiben újra végbemennek a lítikus fázis lépései, a felső légutak epithel sejtjeiben pedig újra fertőzőképes virionok képződnek. A reaktiválódott folyamat vezethet újra klinikai tünetek megjelenéséhez (pl. vetélés), illetve a lovak klinikai tünetek megjelenése nélkül is üríthetik a kórokozót (Slater és mtsai, 1997). A reaktiválódás után újra egy nyugalmi, latens fázis következik, azonban az előbb említett tényezők bármikor újra beindíthatják a betegség kiújulását, így a latensen fertőzött állatok képezik az EHV-1 rezervoárját egy állományon belül. A vírus reaktiválódását kortikoszteroidok adásával mesterségesen is ki lehetett váltani (Edington és mtsai, 1985).

4.2.2. A vírus által okozott kórképek

4.2.2.1. A vetéléssel járó kórforma

Az EHV-1-nek a kancák vetéléseiben játszott hazai szerepéről az elmúlt években számos hazai közlemény jelent meg. Szeredi és mtsai egy átfogó vizsgálatban, amelyben 93 vetélt magzatot és 8 ellés után elpusztult csikót vizsgáltak, vírusizolálással a minták 12,9%-ban, immunhisztokémiai vizsgálattal a minták 14,9%-ában mutatták ki a vírust (Szeredi és mtsai.,

2003). Hasonló eredményt hozott egy Hornyák és mtsai (2006) által végzett kutatás, amelyben ez az arány 10,5%-os volt, illetve Szeredi és mtsai 1998 és 2000 között elvégzett felmérő vizsgálatában a vetélt magzatok 16%-ában sikerült kimutatni az EHV-1 vírust (Szeredi és mtsai, 2008).

A vetélés patogenezisének legfontosabb lépése, amikor a vírus viraemia során a leukocyták közvetítésével eljut a vemhes méhbe, és ott a microcotyledonok bázisának nyálkahártyájában az arteriolák endotheljét támadja meg (Edington és mtsai, 1991). A vérerekben vasculitis, majd thrombusképződés indul meg, a következetesen kialakuló nyálkahártya-károsodás és szöveti infarctusok a magzatburok leválásához és vetéléshez vezetnek. Ha ez a folyamat gyors és nagy területet érint, akkor a vetélés még azelőtt bekövetkezik, hogy a vírus a magzatba kerül (Smith és mtsai, 1992). Ha a nyálkahártya károsodása nem ennyire kiterjedt, a vetélés csak később következik be, az EHV-1 pedig eljut a placentába és a magzatba is.

A fertőzés lefolyása nagyban függ attól, hogy a kanca a vemhesség melyik szakaszában találkozik a vírussal. A vetélés általában a vemhesség utolsó 4 hónapjában következik be, a fertőződést, vagy a vírus reaktiválódását követően hónapok múlva. A vetélt magzatok ép lábhólyaggal, nem önmérsztetten jönnek világra. Amennyiben a kanca a vemhesség végén fertőződik, akkor a beteg vagy egészségesnek látszó, normál időben megszületett csikó a méhen belül kialakult tüdőgyulladás következtében bágyadt, nem szopik, és a vírusos vagy a baktériumos társfertőzések következtében néhány napon belül elpusztul. Ebben az esetben a vírusos tüdőgyulladásra jellemző kép kórjelző értékű lehet. Ha a thrombusképződés csak kisméretű, és az endometrium sérülése nem jár vetéléssel, a kanca rendes időre, egészséges csikót is ellhet.

A vetélés előtt ritkán láthatók klinikai tünetek, ez gyakran minden előzetes tünet nélkül következik be. A kancák szaporodóképességét általában nem befolyásolja a vetélés, minden probléma nélkül termékenyíthetők és a következő szezonban egészséges csikó is születhet (Szeredi, 2004).

4.2.2.2. Az idegrendszeri tünetekkel járó kórforma

A kialakuló kórképek közül nemcsak a vetélés, hanem az idegrendszeri zavarokkal járó kórforma is érzékeny veszteségeket okozhat egy lóállományban. Az enyhébb esetek általában néhány hét alatt nyomtalanul gyógyulnak, súlyosabb esetekben a mozgászavar, illetve a végtagok gyengesége, vagy bénulása állandósulhat, ami miatt az állatok munkavégzésre alkalmatlanná válnak, illetve el is pusztulhatnak, vagy el kell altatni őket.

A herpesvírusok nagy részével ellentétben az EHV-1 nem az idegsejteket károsítja, hanem a központi idegrendszer arterioláinak endotheljét támadja meg (Wilson, 1997; Stierstorfer és

mtsai, 2002), aminek vasculitis, thrombosis, majd thrombo-ischaemiás necrosis lesz a következménye. Korábban úgy gondolták, hogy az idegrendszeri forma csak vemhes vagy szoptató kancákban fordulhat elő (Jackson és mtsai, 1971), azonban a későbbi járványok során kiderült, hogy a tünetek kialakulását nem befolyásolja az állatok vemhessége, neme, és kora sem (Allen és mtsai, 1986).

A megbetegedett állatokon megfigyelhető tünetek változatosak lehetnek, az idegrendszer szöveti károsodásának helye és súlyossága nagyban befolyásolja a kórforma klinikumát. A lovakon elsősorban ataxiát, paresist és inkontinenciát lehet megfigyelni. Jellemző a hátsó lábak gyengesége, rogyadozása, a hátulsó lábak kitámasztása, ataxia, esetenként kutyaszerű ülés (Allen és mtsai, 2004; Pusterla és mtsai, 2009). Súlyosabb esetekben ez átterjedhet az első lábakra is, így az állatok nem tudnak felkelni. A fertőzés okozhatja még a húgyhólyag működési zavarát, ezzel összefüggésben inkontinenciát, illetve farok- és végbélbénulást is (Greenwood és mtsai, 1980). Jellemző, hogy a klinikai tünetek végső stádiuma 48 órán belül kialakul.

Kórjelző lehet a klinikai tünetek megjelenése után levett cerebrospinális folyadék emelkedett fehérjeszintje, illetve a vírus kimutatható az idegrendszeri tüneteket mutató, lázas állatokból levett orrtamponokból, vagy alvadásban gátolt vérmintákból. Van Maanen és mtsai (2001) egy lovasiskolában lezajlott EHV-1 járvány tapasztalatai alapján, azt a következtetést vonták le, hogy a klinikai tünetek megjelenésekor levett vérekből elvégzett szerológiai vizsgálat diagnosztikai értékű lehet. A 41 lóból 20 mutatott enyhébb vagy súlyosabb idegrendszeri tüneteket, emellett 28 állat szerológiai vizsgálata során tapasztaltak specifikus titeremelkedést. 12 ló esetében már a savópár először levett mintáiban is magas volt az EHV-1 ellen termelt ellenanyagok szintje, ami friss fertőzésre utalt. Ezért a vetéléses kórformával ellentétben, ebben az esetben a szerológiai vizsgálat szolgálhat diagnosztikai értékű információval.

A betegség megelőzését a perzisztensen fertőzött állatok nehezítik meg, ugyanis az állományban cirkuláló vírus az idegrendszeri zavarok megjelenése előtt nem, vagy csak kevés állatnál okoz klinikailag manifesztálódó tüneteket, és ezek is főleg láz és enyhe légzőszervi elváltozások, amelyek nem feltétlenül utalnak az EHV-1 fertőzésre. A megelőzést nehezíti továbbá az is, hogy a betegség elleni védekezésre használt vakcinák a fertőződést és a vírus idegrendszerbe való eljutását nem akadályozzák meg, csak a már fertőzött állatok vírusürítését mérséklik. Így a már fertőzött állatokban a vakcinázás nem tudja megakadályozni az esetlegesen kialakuló idegrendszeri tüneteket (Pusterla és mtsai, 2009; Thein, 2009). A megbetegedés kimenetelét az állatok gyógykezelése csak kismértékben tudja befolyásolni. Az enyhébb tüneteknél a pihentetés és az állatok elkülönítése jótékony hatású lehet, azonban a súlyos mozgászavaroknál a betegség kimenetele kevés kivételtől eltekintve fatális (Edington és mtsai, 1986).

4.2.2.3. A légzőszervi kórforma

Az EHV-1 fertőzés után kialakuló kórképek közül a légzőszervek megbetegedése a leggyakoribb, viszont általában ez a forma jár a legenyhébb tünetekkel. A lappangási idő általában rövid, 3-5 nap, de az EHV-1 törzsek patogenitása, és a lovak immunállapota ezt befolyásolhatja, így akár 10 napra is nőhet (Ostlund, 1993). A fertőzés elsősorban a felső légutakat érinti, ezek hurutos gyulladása (rhinopharyngitis, tracheobronchitis), hőemelkedés, bágyadtság és étvágytalanság a legjellemzőbb tünetek. Ehhez társul a könnyezés, savós orrfolyás, köhögés, illetve a nyirokcsomók duzzanata (tipikusan az állkapcsi és a garat mögötti nyirokcsomók megnagyobbodása). A klinikai tünetek idősebb állatokban, illetve újbóli fertőzés esetén jóval enyhébbek, mint a primeren fertőzött csikókban, sőt gyakran a vírus reaktiválódása után, a vírust ürítő állatban sem jelentkeznek.

Amennyiben az EHV-1 fertőzéshez kedvezőtlen tartási, időjárási körülmények, vagy egyéb immunrendszert gyengítő tényezők kapcsolódnak, a betegség súlyosbodhat és a gyulladás az alsóbb légutakra is kiterjedhet. Ez főleg a fiatal csikókra jelent veszélyt, ezekben az állatokban tüdőgyulladás alakulhat ki, amit másodlagos bakteriális fertőzések súlyosbíthatnak (pl. *Rhodococcus equi*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*), illetve a légzési nehézségek szopási zavart okoznak, ami a csikók legyengüléséhez vezet. Az EHV-4 okozta légzőszervi tüneteket nem lehet elkülöníteni az EHV-1 fertőzés után kialakuló elváltozásoktól, így a tünetek megjelenésekor mindig elsődleges fontosságú a kórokozó kimutatása.

4.2.3. Az EHV-1 diagnosztikája

4.2.3.1. A vírus izolálása

Az EHV-1 vírus izolálását a kórképeknek megfelelően orr-garat váladék mintákból, vetélt magzat szerveiből (lép, máj és tüdő, nyirokcsomók), magzatburokból, elhullott ló esetében lép, máj, tüdő és agy-, gerincvelő mintákból, továbbá EDTA-t tartalmazó alvadásban gátolt vérmintákból szeparált fehérvérsejtekből kísérelhetjük meg. A légzőszervi tünetek megjelenésekor legkönnyebben az orrnyálkahártyáról, tamponnal levett mintákból tudjuk izolálni a vírust. A mintavétel ideje ezekben az esetekben is nagyon fontos tényező, a legalkalmasabb időpont a fertőzés korai, lázzal járó szakasza.

A jellemző klinikai tünetek vagy a kórbonctani elváltozások megjelenése után levett mintákból a vírus kimutatására számos módszer használható. Az utóbbi évtizedekben új módszerek is megjelentek, ezek érzékenysége és gyorsasága megkönnyítette a vírus által okozott megbetegedések diagnosztikáját. Idegrendszeri tünetek jelentkezésekor élő állatokból a vírus kimutatása nem annyira egyszerű, de a frissen fertőződött lovakból a

fehérvérsejtek szeparálása, illetve az ebből végzett vírusizolálás (ko-kultiváció) vagy polimeráz láncrekció (PCR) eredményre vezethet (Welch és mtsai, 1992, Allen, 2007).

Sokáig az EHV-1 és EHV-4 azonosításának legfőbb módszere a beküldött minták különböző egyrétegű sejtenyészetekre (pl. ED, RK13 sejtvonal) oltása volt. Ha a mintákban jelen volt a kórokozó, a sejtenyészetekken 2-4 napon belül láthatóvá válik a vírusokra jellemző sejtkárosító hatás (cytopathic effect, CPE), a plakkszerűen formálódó, majd a sejtenyészetben gyorsan elterjedő syncytiumok megjelenése. A két típus között alapvető különbséget jelent, hogy míg az 1-es típus képes szaporodni a nem ló eredetű sejtekben is (pl. az RK13 nyúlvese szöveten), addig az EHV-4 csak lóból származó szövetenyészetekken (pl. ED szövet) képes növekedni. Ezt a tulajdonságot fel tudjuk használni a két kórokozó differenciál diagnózisában. A módszer ma is része a rutindiagnosztikának, viszont a negatív diagnózist csak a második passzázs után lehet kimondani, ezért a vizsgálat viszonylag hosszú ideig tart.

4.2.3.2. Szerológiai vizsgálatok

A betegségre jellemző klinikai tünetek felkelthetik az EHV-1 fertőzés gyanúját, a biztos kórjelzés azonban a vírus, illetve a fertőzést követően megjelenő ellenanyagok kimutatásával lehetséges. A fertőződésre adott immunválasz lehet humorális (a szisztémásan termelődött IgM, IgG és a lokálisan a nyálkahártyákon megjelenő IgA típusú ellenanyagok), illetve celluláris típusú.

A vírus ellen termelődött ellenanyagok ELISA-val és/vagy vírusneutralizációs próbával mutathatók ki. Az akut fertőzés kimutatására savópárok vizsgálata a legalkalmasabb, ebben az esetben a tünetek jelentkezésekor, majd 2-3 hét múlva vett vérmintából kell elvégezni a szerológiai vizsgálatot. A legalább 4-szeres titeremelkedés tekinthető kórjelzőnek. A kancák vetélése, és a vírus reaktiválódása után megjelenő klinikai tünetek észlelésekor a savópárok vizsgálata nem kórjelző értékű, hiszen a primer vírusfertőzésre adott immunválasz már hónapokkal a tünetek megjelenése előtt lezajlott. Ezért ezekben az esetekben a savópárok titervizsgálata során már nem tapasztalunk specifikus titeremelkedést.

A szerológiai vizsgálat során problémát okozhat a ló herpesvírus 1-es és 4-es típusának szerológiai keresztreakciója. A két vírus ellen termelődött ellenanyagok elkülönítésére alkalmas lehet a párhuzamosan végzett vírusneutralizáció, ugyanis az adott vírussal történt akut fertőzés során termelődött ellenanyagok titere általában jóval magasabb, mint a keresztreaktáló vírussal szembeni ellenanyagoké. Ez azokban a laboratóriumokban jelenthet gondot, ahol nem rendelkeznek ló eredetű szövetenyészettel (pl. equine dermis, ED), vagy nem áll rendelkezésre vírusneutralizációra alkalmas EHV-4 vírustörzs. Ennél egyszerűbb

megoldást jelenthetnek azok az ELISA tesztek, amelyek kifejezetten a két típus ellen termelődött ellenanyagok elkülönítésére szolgálnak.

4.2.3.3. A kórszövettan szerepe a vírus diagnosztikájában

Az EHV-1 kimutatására jól használhatók a kórszöveti módszerek. Az EHV-1 okozta vetélés esetén jellegzetesnek tartják a vetélt magzatok májában makroszkóposan is látható szürkés-fehér, miliáris elhalásos góccokat, amelyek szomszédságában a többé-kevésbé ép májsejtekben sejtmagzárványok találhatóak (Sályi, 1941). A kórszöveti elváltozások vizsgálata során megállapították, hogy a 6 hónaposnál idősebb magzatok esetében általában már a mesenchymalis szövetek produktív jellegű elváltozása található meg (Glávits és mtsai, 1984). Kapp (1973) vizsgálatai szerint a 6 hónaposnál fiatalabb, vetélt magzatok májában ezzel szemben az exsudatív elváltozások, a parenchyma sejtek károsodása és a sejtmagzárványok megjelenése a jellemző. A vírussal fertőzött állatok légutainak epitheliumában, illetve a májban jelenhetnek meg a vírusra jellemző eosinophilen festődő sejtmagzárványok.

Jóval pontosabb diagnózist kaphatunk, ha a kórszövettan kiegészül immunhisztokémiai vizsgálattal is. Ebben az esetben nemcsak a jellemző szöveti elváltozások láthatók, amelyek csak közvetett módon utalnak a vírus jelenlétére, hanem a kórokozó közvetlenül is kimutatható (Szeredi és mtsai, 2003a; Szeredi és mtsai, 2003b). Gyors eredményt adhat a vírus direkt immunfluoreszcenciával történő kimutatása is. Ebben az esetben az elhullott állatokból beküldött szervekből (máj, tüdő, lép) kriosztáttal készül fagyasztott metszet, ami acetonos fixálás és konjugálás után vizsgálható. A módszer egyetlen hátránya, hogy a konjugátum keresztreakál az EHV-4 vírus antigénjével is, így ha azonosítani szeretnénk a tüneteket kiváltó herpesvírust, további vizsgálatokat kell végezni (Gunn, 1992).

4.2.3.4. Egyéb módszerek

A polimeráz láncreakció (PCR) a kórokozók nukleinsavának kimutatására szolgál. A rutindiagnosztikában használt PCR módszerek esetében egy olyan génrégiót sokszoroznak meg, ami kevés változatosságot mutat, így a különböző törzseket, amelyek genomja bizonyos szakaszokon eltérő lehet, ugyanolyan eséllyel mutatja ki. Ilyen konzervatívnak tekinthető régiókat találtak a timidin-kináz génen, és a különböző glikoproteineket kódoló géneken (pl. glikoprotein G, C, H) (Carvalho és mtsai, 2000, Diallo és mtsai, 2006, Hornyák és mtsai, 2006). A real-time PCR eljárások annyiban különböznek a hagyományos PCR módszerektől, hogy vagy egy speciális festék épül be a keletkező specifikus DNS termék két szála közé (pl. SYBR Green), vagy egy fluoreszcens festékkel jelölt probe (pl. TaqMan

probe) kapcsolódik az egyre nagyobb mennyiségben keletkező specifikus termékekre. Az adott hullámhosszon gerjeszhető festékmolekulák által kibocsátott fluoreszcencia detektálható, és az eredmények analízisével következtethetünk arra, hogy az eredeti mintánkban milyen mennyiségben volt jelen a virális DNS. A módszer nagy előnye a hagyományos PCR eljárásokhoz képest, hogy a folyamat a real-time PCR géphez kapcsolt számítógép képernyőjén nyomon követhető, az eredmény elbírálásához nincs szükség gélelektroforézisre. A másik nagy előnye, hogy ha az eljárás során pozitív kontrollként ismert mennyiségű vírus nukleinsavat használunk, akkor ehhez viszonyítva arra is tudunk következtetni, hogy az eredeti minta az adott nukleinsavból mennyit tartalmazott. Tehát a real-time PCR nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív vizsgálatra is alkalmas lehet.

A vírusfertőzés modellezésére, patogenitási vizsgálatokra, illetve vakcinák hatékonyságának kipróbálására alkalmazható modellállat a laboratóriumi egér. Az intranazálisan oltott egerekben megjelenő klinikai tünetek nagyon hasonlóak a lóban megjelenő tünetekhez (légzőszervi tünetek, vetélés), az egerek testsúlycsökkenésének mértéke összefüggést mutat a vizsgált EHV-1 törzsek patogenitásával (patogenitási index). A módszer azonban bonyolult, drága és túl hosszú lefolyású ahhoz, hogy rutindiagnosztikára használható legyen, ezért ma már ritkán használják (Pálfi és mtsai, 1995; van Woensel és mtsai, 1995; Walker és mtsai, 1999).

4.2.4. A betegség elleni védekezés

A lóállományok EHV-1 fertőzéstől való mentesítése a vírusok széles körű elterjedése, a latencia, valamint az állatok nagy értéke miatt nem jöhet szóba. A védekezés során a megbetegedések megelőzése a leghatékonyabb eszköz, aminek a két, azonos fontosságú eleme a megfelelő tartástechnológia és a vakcinázás.

Az EHV-1 okozta felső légúti megbetegedések elleni védekezés közvetlenül az ellés után, a kolosztrum kiszopásával kezdődik. A kolosztrális ellenanyagok felezési ideje 26 nap, a csikó a fertőzéssel szemben teljesen fogékonyá általában 5-6 hónapos korában válik ezért a vakcinázásukat úgy kell megtervezni, hogy a legmagasabb szintű immunitás a választási stressz idejére alakuljon ki. Ezt követően az oltásokat általában 6 havonta kell megismételni. A kancákat általában bivalens, elölt ágenst tartalmazó vakcinával oltják. Amennyiben az utolsó emlékeztető oltás és a vemhesség alatti első oltás között várhatóan több mint 6 hónap telne el, ajánlatos lehet a vemhesítés előtt közvetlenül egyszer vakcinázni, majd az 5. és a 7, esetleg a 9. hónapban is. A vakcinák adta védettség a nagy mennyiségű vírussal való fertőződést ugyan nem tudja megakadályozni, de egyes esetekben meg tudja gátolni a klinikai tünetek kialakulását, és csökkentheti a vetélések számát. A vakcinázott állatok, ha fertőződnek, lényegesen rövidebb ideig és kevesebb vírust ürítenek, mint a nem vakcinázott

társaik. A vakcinázás tehát növeli az állomány szintű védekezést és csökkenti a vírus terjedését, viszont amint később látni fogjuk az idegrendszeri tünetek kialakulása ellen nem védi meg a már fertőzött állatokat (Bürki és mtsai, 1990).

Magyarországon az 1980-as évektől már használtak élő vírust tartalmazó vakcinákat a betegség elleni védekezésben, ezek az általunk is megvizsgált RacH vakcinatörzset tartalmazták. A felhasznált vakcinák egy része laboratóriumok által előállított, „telepspecifikus” vakcina volt, illetve a 80-as évek végétől kereskedelmi forgalomba került a Hoechst cég Prevaccinol elnevezésű oltóanyaga, ami hazánkban 1997-ig volt forgalomban. Ezután a vírus elleni védekezésre elsősorban inaktivált vakcinákat használtak, kereskedelmi forgalomban a Pneumabort K, a Resequin, majd a Duvaxin volt hozzáférhető. Európában manapság egyetlen élő vírusos vakcina van forgalomban (Rhinomune), a gyártó azonban ebben az esetben nem adta meg, hogy milyen típusú törzset használ a vakcina előállításához. Élő vírust tartalmazó vakcinákban különböző EHV-1 mutánsokat is felhasználnak (pl. TK mutáns: Slater és mtsai, 1993; gl mutáns: Tjuszimura, 2006), azonban ezek hazai alkalmazásáról nincsenek adatok.

A védekezés másik hatékony eszköze a megfelelő tartástechnológia alkalmazása. Ennek során törekedni kell a minél kisebb, állandó létszámú csoportok kialakítására, életkor, hasznosítás és ivar szerint. Az állatmozgásokat szabályozni kell, lehetőség szerint karantén rendszert kell alkalmazni. Fontos, hogy a kanca csoportokat legkésőbb a vemhesség korai szakaszában kialakítsák, új állatot leállításukig ne vigyenek be.

A fertőzés behurcolása szempontjából a legnagyobb veszélyt mindig idegen állatok bevitele jelenti. Ezeket az állatokat az állományba való beállítás előtt legalább 21 napig elkülönítve kell tartani, megfigyelni és az azonos immunológiai állapot kialakításához esetleg vakcinázni kell. Az állományba visszatérő lovak esetén is javasolt a 21 napos elkülönítés és megfigyelés. A fentiek mellett csökkenteni kell az állatokat ért stresszhatásokat, úgymint a zsúfoltság, a parazitás fertőzések, a hosszú szállítás, és a csoportok keverése.

4.3. Az EHV-1 genom felépítése

4.3.1. A genom általános tulajdonságai

Az utóbbi évtizedekben, a mikrobiológiában használt diagnosztikai módszerek legdinamikusabban fejlődő ága a molekuláris diagnosztika volt. A polimeráz láncreakció (PCR), majd a már kvantitatív eredményeket is produkáló valós idejű (real-time) PCR módszerek használatával a kórokozók nukleinsavának kimutatása egyre gyorsabbá és egyszerűbbé vált. Az EHV-1 teljes genomjának szekvenálása (Telford és mtsai, 1992) után lehetőség nyílt arra, hogy a kutatók megismerjék a vírus géneinek működését, ezeknek a vírus szaporodásában betöltött szerepét.

Az EHV-1 örökítőanyaga egy lineáris, megközelítőleg 150000 bázispárból álló dupla szálú DNS molekula, ami azonban a virionból kiszabadulva, a fertőzött sejt magjában cirkuláris formába alakul át. A genom egy egyedi hosszú egységre („unique long” U_L ~113000 bázispár), illetve egy egyedi rövid egységre („unique short” U_S ~11800 bázispár) osztható. A két szakasz között helyezkedik el a belső ismétlődő szekvenciákat tartalmazó szakasz („internal repeat” I_R ~12700 bázispár), az egyedi rövid egységet pedig egy hosszabb, terminális ismétlődő szakasz zárja le („terminal repeat” T_R ~ 12700 bázispár).

A vírus DNS-én belül 76 egyedi ORF-et lehet elkülöníteni. Bár a genom felépítése nagyon hasonló az eddig megszekvenált alfa-herpesvírusokéhoz, azonban öt olyan ORF régió is megtalálható, amelyek csak a ló alfa-herpesvírusaiban vannak jelen (1, 2, 67, 71, 75), azonban ezeknek a vírusfertőzés patogenezisében játszott szerepe még ismeretlen (Huang és mtsai, 2002). Az EHV-4 a genetikai összehasonlítás alapján közeli rokona az EHV-1-nek. A genomok elemzése azt mutatta, hogy a homológ géneken belül az EHV-1 és az EHV-4 szekvenciák hasonlósága 55-84% közötti, míg ezeken a szakaszokon az aminosavak sorrendjében ugyanez az arány 55-96% között van (Telford és mtsai, 1998).

4.3.2. Az ORF30 jellemzői és jelentősége

Az Ab4 (neuropatogén), illetve a V592 (nem neuropatogén) elnevezésű két EHV-1 törzs teljes nukleotid szekvenciájának összehasonlítása alapján a két vírusgenom 0,1%-ban különbözött egymástól, a különbségek 43 esetben jártak aminosav változással is. A 76 ORF közül 31-ben találtak olyan eltérést, ami az aminosav sorrendet érintette. Ezek közül kettőt találtak alkalmasnak arra, hogy az itt megjelenő eltérések alapján, az izolált EHV-1 törzseket csoportosítsák. Az egyik az ORF68, amely homológ a herpes simplex vírus 1-es típusának (HSV-1) $Us2$ génjével (Breden és mtsai, 1992; Colle és mtsai, 1995, Meindl és mtsai, 1999), a másik az ORF30, ami a vírus DNS-polimerázának katalitikus alegységét kódolja (Nugent és mtsai, 2006; Goodman és mtsai, 2007). Az ORF30 a genom egyedi hosszú régióján (U_L) belül helyezkedik el, egy 1220 aminosav hosszúságú polipeptidet kódol. A teljes szekvenciák összehasonlítása, illetve az ismert neuropatogén és nem neuropatogén törzsek szekvenciájának elemzése után szignifikáns összefüggést ($p < 0,0001$) találtak az ORF30 2254-es nukleotid pozíciójában előforduló bázis, illetve a vírustörzs által okozott idegrendszeri tünetek előfordulása között. A 2254-es pozícióban szereplő A (adenin) bázis a nem neuropatogén törzsek 95%-ában fordult elő, míg a neuropatogén törzsek 86%-ában ebben a pozícióban G (guanin) található. Nem lehet kizárni, hogy a genom más részein előforduló egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP-k) is befolyásolják ezt a tulajdonságot, de az adott allél előfordulása szoros összefüggést mutat azzal, hogy egy vírustörzs képes-e a fertőzött állatokban idegrendszeri tüneteket kiváltani (Nugent és mtsai, 2006). Az itt kódolt, a

752-es pozícióban található aminosav szinte minden herpesvírus DNS-polimerázában aszparagin (D), ebben az esetben ez a neuropatogén törzsekben fordul elő. A nem neuropatogén törzsekben, az ebben a pozícióban kódolt aszparaginsav (N) nem fordul elő más herpesvírusban. Érdekes adat, hogy a RacH vakcinatörzsben (Mayr és mtsai, 1968) a 752-es aminosav pozícióban ugyan a neuropatogén törzsekre jellemző aszparagin található, de az ezt követő aminosav eltér a többi EHV-1 típustól (tirozin→szerin). Ez a változás azt eredményezte, hogy a törzs idegrendszeri tüneteket sem okoz, ezért EHV-1 elleni attenuált vakcinák komponenseként használták (Bass, 1978; Minke és mtsai, 2004).

Arra, hogy a DNS-polimeráz kódoló génben létrejött pontmutáció hogyan tudja befolyásolni a vírus patogenitását, több elmélet is született (Goodman és mtsai, 2007). A többi neuropatogénitást okozó alfa-herpesvírustól eltérően az EHV-1 a fertőzés alatt nem az idegsejteket támadja meg, hanem a központi idegrendszer vascularis endothel sejtjeit, ami ischémiahoz és thrombosishoz vezet. Az eltérő DNS-polimeráz működés megzavarhatja a kórokozó replikációját az elsődleges szaporodási helyén (a légutak nyálkahártyájában), csökkentheti a bejutását és szaporodását a vírust szállító leukocytákban, illetve lassíthatja a vírus átjutását a keringő leukocytákból az endothel sejtekbe.

A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a patogenitásbeli különbség elsődleges oka az lehet, hogy a nem neuropatogén alléllal rendelkező törzsek által okozott fertőzésekben alacsonyabb szintű viraemia tapasztalható (Goodman és mtsai, 2007). Ezt azzal magyarázták, hogy bizonyos sejtekben a vírusszaporodás mértéke különböző lehet a két genotípus esetén. *In vitro* körülmények között az eltérő genotípusú törzsek eltérő hatékonysággal tudták a különböző típusú leukocytákat megfertőzni. A D752 törzsek elsődleges célpontjai a CD8+ T-lymphocyták voltak, ami azért fontos, mert ezek a leukocyták a vírus legfőbb hordozói a szervezetben belül, illetve ez a fehérvérsejt típus felelős a vírusfertőzésre adott gyulladásos reakció kiváltásáért, ami a kialakuló klinikai tünetek elsődleges oka.

Van de Walle és mtsai (2009) kísérletében egy nem neuropatogén genotípusba tartozó EHV-1 törzs genomjában, a 2254-es pozícióban található adenin bázist tartalmazó nukleotidot egy guanin bázist tartalmazó nukleotidra cserélték. Az eredmény az volt, hogy a mindössze egy bázisban különböző két törzs eltérő módon viselkedett mind az *in vitro*, mind az *in vivo* vizsgálatokban. A neuropatogénné alakított mutáns törzs által okozott fertőzés esetén a viraemia hosszabb ideig tartott, és a perifériás vérből izolált limfocitákban jóval nagyobb mennyiségben voltak jelen a termelődött virionok. Az állatkísérletek során az eredeti, nem neuropatogén törzssel fertőzött állatokban nem jelentkeztek idegrendszeri tünetek, míg a mutáns törzssel fertőzött állatokban enyhébb-súlyosabb formában, de megfigyelhetők voltak. Különbséget találtak még a vírusfertőzésre adott immunválasz mértékében is, ugyanis a neuropatogén genotípusba tartozó törzssel fertőzött állatokban a vírus ellen termelődött

ellenanyagok titere magasabb volt, mint az eredeti törzs esetén, ami egy masszívabb vírusfertőzésre utal. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy az eltérő patogenitású törzsek esetében az orrváladékkal ürülő vírusok mennyiségében nem volt meghatározó a különbség. A csupán egy nukleotidban eltérő törzsek eltérő neuropatogenitására pontos magyarázat még nem született, azonban a vérben, a lymphocytákkal keringő fertőzőképes virionok magasabb száma, és az elhúzódó viraemia a neuropatogén genotípus esetén megnöveli annak az esélyét, hogy a vírus eljut a központi idegrendszerbe, és ott az endothel sejteket megtámadva, neurológiai tüneteket képes okozni. Az viszont, hogy a lovak EHV-1 okozta megbetegedéseit, különböző esélyekkel ugyan, de mindkét genotípus ki tudja váltani, azt jelzi, hogy az N₇₅₂ (nem neuropatogén) törzsekben előforduló szubsztitúció csökkenti ugyan a vírusürítő szakasz hosszát, illetve a viraemia szintjét, viszont a vírus állományon belüli terjedését nem befolyásolja. Ezen kívül a kétféle törzs által okozott egyéb klinikai tünetek lefolyásában (vetélés, légzőszervi tünetek) a genetikai eltérés nem okoz különbséget. Sőt, néhány esetben bizonyítottan a D₇₅₂-es csoportba tartozó vírustörzs is képes volt idegrendszeri tüneteket kiváltani (Heerkeens, 2009).

A genetikai különbség kimutatására többféle módszer is rendelkezésre áll, leggyakrabban az allél elkülönítő TaqMan próbát használó real-time polimeráz láncreakciót, az adott szakasz szekvenálását, illetve a restrikciós fragment hossz polimorfizmus analízist (RFLP) alkalmazzák a két genotípus elkülönítésére (Allen és mtsai, 1983; Pálfi és Christensen, 1995; Nugent és mtsai, 2006). A módszerek közül a real-time PCR-en alapuló módszerek a leggyorsabbak és legjobban alkalmazhatók, erre épült az általunk kifejlesztett, primer-probe energia transzfert használó rendszer is (Malik és mtsai, 2010).

4.3.3. Az ORF68 jellemzői és jelentősége

Az EHV-1 ORF68-as szakasza a vírus genomjának U_S régióján található, 1256 nukleotid alkotja (Telford és mtsai, 1992). A gén homológ a herpes simplex vírus 1-es típusának U_{S2} régiójával, az ennek megfelelő szakasz az alfa-herpesvírusok nagy részében megtalálható (Breedon és mtsai, 1992). Az U_{S2} proteint szövettenyésztésre oltás után a fertőzött sejtek membránfrakciójából tudták kimutatni, míg egy másik vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a fehérje a fertőzés előtt az összeépült virion burkában helyezkedik el.

Az ORF68 működésének vizsgálatára egy U_{S2} negatív EHV-1 mutánst állítottak elő, ennek a viselkedését, az általa kiváltott fertőzés patogenezisét vizsgálták *in vivo*, és *in vitro* körülmények között. A mutáns törzset RK13 sejtenyésztésre oltották, és figyelték a vírus növekedését, a titerét, illetve a sejtről sejtre terjedés sebességét. Az eredmények elemzése során kiderült, hogy az U_{S2} hiánya nem befolyásolja a szöveten szaporodó vírus titerét,

viszont az ezt nem termelő mutáns kisebb plakkokat tudott formálni az RK13 szöveten, illetve csökkent a szövet sejtjeibe való bejutás sebessége is.

A törzsek *in vivo* vizsgálatához a vírusokat BALB/c egerekbe oltották. Az U_S2 negatív mutáns törzs ugyanúgy meg tudta betegíteni a kísérleti állatokat, viszont a fertőzés lefolyása enyhébb volt. A másik különbség ott jelentkezett, hogy a viraemia kialakult ugyan a mutáns törzssel történt fertőzés után is, viszont a perifériás vérből kimutatható vírusszám kb. 50-szer nagyobb volt az U_S2 pozitív törzsek esetében. Elmondhatjuk tehát, hogy az adott protein nem szükséges ahhoz, hogy egy EHV-1 vírus fertőzőképes legyen, de a fertőzés lefolyását befolyásolhatja az U_S2 hiánya (Meindl és mtsai, 1999).

Két EHV-1 törzs teljes genomjának szekvenálása és összehasonlítása során (Nugent és mtsai, 2006), az ORF68 kb. 600 bázispár hosszú, részben polimorf génszakasza alkalmasnak bizonyult arra, hogy az itt előforduló nukleotid cserék (SNP) alapján az izolátumokat csoportokba rendezzék. A vizsgált régióban előforduló legfontosabb különbség egy a V592-ben előforduló deléció a gén 125540-es pozíciójában. Ennek következtében a kialakult szekvencia eltolódás (frameshift) miatt az ORF68-as szakaszból a két törzs esetén különböző hosszúságú fehérjelánc szintetizálódik (Meindl és mtsai, 1999). Érdekes tény, hogy a kutatás során megvizsgált további 104, klinikai tüneteket mutató állatból származó izolátum nagy többségében jelen volt a szekvencia eltolódás, ezek mind rövidebb proteint kódoltak az adott szakaszon. Mivel a vírusok kórokozóképességében nincs különbség aszerint, hogy a fehérje hosszabb, vagy rövidebb formáját kódolják, ezért valószínűleg a protein működéséért felelős gének a frameshift előtti szakaszon találhatóak.

A csoportok kialakítása a polimorf szakaszon előforduló nukleotid cserék alapján történt (Nugent és mtsai, 2006), konszenzusnak az Ab4 törzs szekvenciáját tekintették. Ez alapján a törzseket hat csoportba sikerült besorolni, azonban két izolátum szekvenciái annyira eltértek a többitől, hogy nem sikerült őket egyikben sem elhelyezni. Az 1-es csoport annyiban különbözik az összes többitől, hogy az ebbe tartozó törzsek genomja az ORF68-as régió 732-es nukleotid pozíciója (nt) utáni szakaszán hat, nyolc vagy kilenc G bázist kódol. A többi csoportba sorolt izolátumok mindegyike ezen a szakaszon hét G bázist tartalmaz.

Az ORF68-as szakaszon előforduló szubsztitúciók nincsenek ugyan összefüggésben az adott törzs patogenitásával, azonban a különböző csoportokba tartozó izolátumok eltérő arányban fordulnak elő a különböző földrészekeken. A 2-es csoport tagjainak nagy része, illetve az 5-ös csoportba tartozó összes izolátum Észak-Amerikából származik, míg a 3-as és 4-es csoportokban nagyrészt (36/42 86%) európai törzsek találhatóak. A csoportokban általában egyenletes a neuropatogén és nem neuropatogén törzsek eloszlása, az egyetlen kivétel az 5-ös csoport, ahol a törzsek 76%-a a neuropatogén genotípusba tartozik. Az ORF68-as régió polimorf szakaszának vizsgálata tehát elsősorban nem a patogenitási vizsgálatok szempontjából lehet érdekes, inkább a vetéléssel, vagy idegrendszeri tünetekkel

járó járványok epidemiológiai nyomozása során adhat értékes információkat, illetve az izolált törzsek filogenetikai vizsgálatánál lehet szerepe.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. A vizsgálatokban felhasznált izolátumok jellemzése

Vizsgálataimban az 1977 és 2008 közötti időszakban a diagnosztikai célból intézeti vizsgálatra küldött vetélt magzatokból származó EHV-1 izolátumokat használtam fel. A 2004 előtti minták az Állategészségügyi Intézet (később MGSZH ÁDI) Virologia Osztályán EHV-1-ként azonosított, majd liofilizált vírusok voltak. Később, a genetikai elemző vizsgálatok elkezdése után az Intézetbe beküldött, majd izolálással és molekuláris módszerekkel EHV-1-ként azonosított izolátumok kerültek be a vizsgálandó minták közé. Vizsgálataim nem tartalmazták az összes, az adott időszakban EHV-1-ként azonosított vírust.

A 2004 előtti izolátumok közül csak azokat vizsgáltam meg, amelyek liofilizált formában rendelkezésre álltak, míg a későbbi izolátumok kiválasztásakor az elsődleges szempont az volt, hogy a vizsgálatokhoz megfelelő mennyiségű és minőségű eredeti minta álljon rendelkezésre az azonosításhoz. A CPE-t mutató mintákat PCR-rel is megvizsgáltam, és a molekuláris összehasonlító vizsgálatot csak azokból végeztem el, amelyek polimeráz láncreakcióval is EHV-1-nek bizonyultak. Az izolátumok elnevezését a beküldés évszámából és az izolálás adott éven belüli sorszámából alakítottam ki. Az izolálás helyét és idejét tartalmazó táblázatból jól látható, hogy a beküldés ideje általában a téli vagy tavaszi időszakra esik, ez a lovak tenyésztési technológiájának sajátjaiból következik (1. táblázat).

A kórelőzmény minden esetben vetélés volt, egy izolátummal kapcsolatban (04_04) írtak le idegrendszeri tüneteket is. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a többi esetben nem fordulhattak elő ilyen tünetek, azonban a kórelőzmény csak a vetélés leírására terjedt ki. A táblázat adataiból kitűnik, hogy a minták az ország különböző régióiból származtak, nagy részben állami gazdaságokból, illetve nagyobb ménesekből. Voltak azonos ménesekből származó izolátumok, ezek közül egyesek azonos járványkitörésből, míg néhány izolátum azonos helyről, de egy későbbi járványból származott. A hazai izolátumok mellett két laboratóriumi törzset is felhasználtam a genetikai vizsgálataimban, az egyik az ARMY 183-as volt (Doll és mtsai, 1954), a másik pedig a vakcinákban használt RacH törzs (Mayr és mtsai, 1968). Ezek Dániából származtak, a törzsek liofilizált formában álltak rendelkezésre a genetikai vizsgálat előtt (eredetük: Statens Veterinære Serumlaboratorium, Dánia, 2000 Frederiksberg, Bülowsvej 19.)

1. táblázat. A vizsgálatunkban felhasznált, 1977. és 2008. között izolált EHV-1 törzsek izolálásának pontos időpontja és származási helye

A TÖRZS SORSZÁMA	A TÖRZS ELNEVEZÉSE	AZ ISZOLÁLÁS IDŐPONTJA	SZÁRMAZÁSI HELY
1	77_01	1977. 01. 28.	Mélykút
2	78_01	1978. 02. 10.	Dióspuszta
3	78_02	1978. 02. 12.	Dióspuszta
4	78_03	1978. 02. 20.	Dióspuszta
5	82_01	1982. 03. 19.	Bábolna
6	82_02	1982. 03. 20.	Apaj
7	82_03	1982. 03. 23.	Kerteskő
8	83_01	1983. 03. 01.	Zsámbék
9	88_01	1988. 03. 15.	Törökszentmiklós
10	88_02	1988. 12. 21.	Dabas
11	90_01	1990. 01. 02.	Dabas
12	90_02	1990. 09. 14.	Apaj
13	91_01	1991. 01. 11.	Sarlóspuszta
14	92_01	1992. 12. 21.	Kecskemét
15	97_01	1997. 02. 18.	Üllő
16	97_02	1997. 02. 27.	Vác
17	97_03	1997. 12. 18.	Mezőhegyes
18	98_01	1998. 01. 07.	Mezőhegyes
19	98_02	1998. 03. 03.	Aba
20	98_03	1998. 03. 10.	Alcsútdoboz
21	98_04	1998. 03. 12.	Kunszentmiklós
22	98_05	1998. 03. 17.	Kunszentmiklós
23	01_01	2001. 03. 13.	Karmacs
24	03_01	2003. 02. 25.	Tata
25	03_02	2003. 05. 08.	Lajosmizse
26	04_01	2004. 03. 03.	Tök
27	04_02	2004. 03. 17.	Pákozd
28	04_03	2004. 04. 14.	Bábolna
29	04_04	2004. 04. 19.	Bakonyág
30	05_01	2005. 09. 15.	Sárbogárd
31	06_01	2006. 01. 04.	Mezőhegyes
32	06_02	2006. 02. 21.	Lajosmizse
33	07_01	2007. 01. 29.	Tápiószentmárton
34	07_02	2007. 02. 02.	Tápiószentmárton
35	08_01	2008. 03. 06.	Kisbér

5.2. A vírus kimutatására használt módszerek leírása

5.2.1. Az EHV-1 vírustörzsek izolálása

(forrás: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6. Edition)

5.2.1.1. Mintavétel a fertőzött állatokból

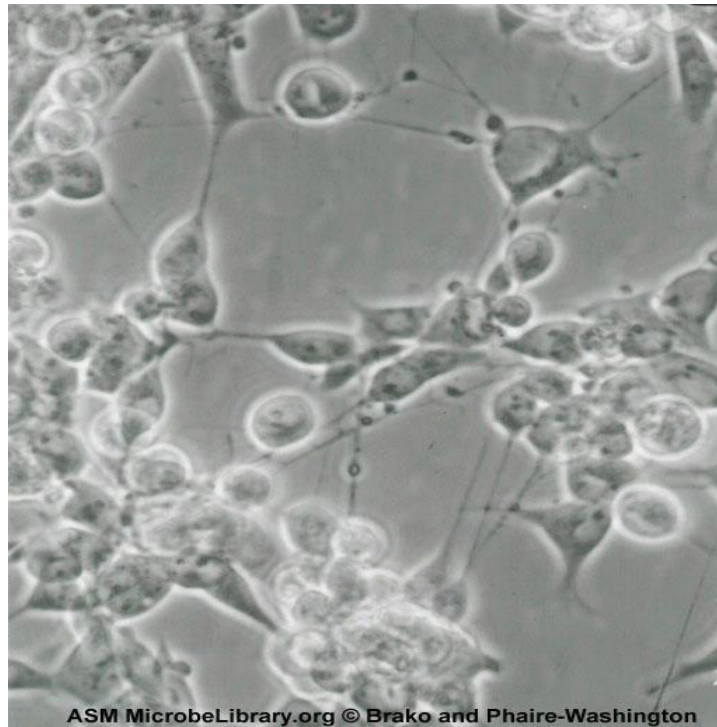
A vírus izolálásának sikerét nagyban befolyásolja a mintavétel ideje. A vetéléses kórforma esetén fontos, hogy minél frissebb szervmintákból végezzük el a vírusok izolálását. A vírus kimutatására a következő szervek a legalkalmasabbak: tüdő, máj, lép, nyirokcsomók, esetleg ha rendelkezésre áll, akkor a magzatburokból is érdemes mintát venni. A kivágott szervdarabokat 4°C-on, illetve ha hosszabb ideig nem kerül vizsgálatra az anyag, akkor -80°C-on kell tárolni a vírusizolálás kezdetéig.

5.2.1.2. A minták előkészítése

A vetélt magzatokból származó szervmintákból kb. 1 cm³-es darabokat vágtam ki, majd ezt kvarchomokkal eldörzsölve 1:10 arányban hígítottam antibiotikus PBS oldattal. A keletkezett homogenizátumot 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytam, majd mikrocentrifuga csőben 1200 g-vel centrifugáltam 10 percig, és a felülúszót oltottam be a szövettenyésztetre. A beoltott mennyiség attól függ, hogy szövettenyésztő csőbe (100 µl), vagy palackra (10 ml-es palackra kb. 1ml-t) kerül a minta. A liofilizált törzseket steril desztillált vízben oldottam fel, majd 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezután mikrocentrifuga csőbe mértem át, és a szervmintákkal azonos módon lecentrifugáltam.

5.2.1.3. A minták szövettenyésztetre oltása

A lecentrifugált szervminták, illetve a liofilizát törzsek felülúszójával RK13 sejttenyészeteket oltottam. A legalább 80%-os benőttségű tenyészetek felülúszó folyadékát leöntöttem, majd a minták bemérése után azokat másfél-két óráig 37°C-on adszorbeáltam. Ezután a sejteket kétszer, MEM oldattal lemostam. A sejtekre fenntartó folyadékot mértem (MEM oldatot 2% borjúsavóval), majd a szövettenyésztetet szén-dioxidos termosztátban inkubáltam 37°C-on. A jellegzetes cytopathogen hatás (a sejtek lekerekedése, syncytiumok kialakulása) általában a beoltás után 2-3 nappal már megjelenik, ha a szövettenyészteten nem láttam elváltozást még a hetedik napon sem, akkor a felülúszót újra beoltottam (vakpasszázs). Az EHV-1-gyel fertőzött szövettenyésztet képét a 2. ábra mutatja be.



2.ábra. Az EHV-1-re jellemző citopatogén hatás szövettényészetén. Jól látható a sejtek lekerekedése és a syncytiumok megjelenése (forrás: www.microbelibrary.org)

5.2.2. Az izolátumok genetikai elemzéséhez felhasznált módszerek leírása

5.2.2.1. A virális DNS kivonása

A legalább 90-95%-os cythopatoген hatást mutató szövettényészetek többszöri (háromszori) lefagyasztása és felolvasztása után a felülúszót 20 percig 5000 g-vel centrifugáltam, majd az így nyert szuszpenzióból mintát vettem. A genetikai elemző vizsgálat előtt minden felülúszóból elvégeztem a Carvalho és mtsai (2000) által kifejlesztett multiplex PCR vizsgálatot, hogy megbizonyosodjam arról, hogy az izolált vírustörzs biztosan EHV-1. A PCR vizsgálatához a szövettényészet lefagyasztott majd lecentrifugált felülúszójának 140 µl-ét használtam fel, ebből a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontam ki a vírus DNS-ét, a gyártó által megadott protokoll szerint. A kivont DNS-t a PCR vizsgálatok kezdetéig –80°C-on tároltuk.

5.2.2.2. Az EHV-1 és az EHV-4 elkülönítésére használt multiplex-PCR módszer leírása

A két típus elkülönítésére használt PCR módszert Carvalho és mtsai fejlesztették ki (Carvalho és mtsai, 2000). Ez egy multiplex PCR eljárás, aminek a lényege az, hogy a két típus timidin-kináz (TK) génjének megfelelő régiójára tervezett primerek segítségével,

felszaporított termék hosszúsága alapján el lehet különíteni az EHV-1-et az EHV-4-től. A reakcióban felhasznált primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. A Carvalho és mtsai által kifejlesztett multiplex PCR-hez használt primerek szekvenciái

Primerek neve	Primerek szekvenciája
TkF4 (EHV-1 forward primer)	5'-ATGGCACTGGCTCCGCTGCCGC-3'
TkF3 (EHV-1 forward primer)	5'-CCTTGTTTCCTTTGGCGACGCAC-3'
TkR2 (EHV-1 ált. reverse primer)	5'-CTGGCGAGAACGCTACCC-3'
TkF5 (EHV-4 forward primer)	5'-TTGGGCCGTGGCCGAAAAC-3'
TkR6 (EHV-4 reverse primer)	5'-CTAGCCAAAACCTTGCCT-3'

A PCR után keletkezett specifikus termékek hossza a következőképpen alakul: TkF4/TkR2: 268 bp, TkF3/TkR2: 226 bp, TkF5/TkR6: 333 bp. A reakciókeverék összetételét a 3. táblázat tartalmazza. A reakció végrehajtásához a QIAGEN cég (Hilden, Németország) TopTaq DNA Polymerase Kit-jét használtam. Az összemért elegy 23 µl-éhez 2 µl vizsgálandó DNS-t adtam.

3. táblázat. Az EHV-1 és EHV-4 elkülönítéséhez használt reakcióelegy összetétele (TopTaq DNA Polymerase Kit, QIAGEN)

10 x TopTaq PCR puffer	2,5 µl
dNTP mix (10 mM mindegyikből)	1 µl
Primer mix (minden primerből 1-1 µl, mindegyik primer koncentrációja 10 µM)	5 µl
TopTaq DNS polimeráz	0,25 µl
Víz	14,25 µl
A vizsgálandó DNS	2 µl

A PCR programját a multiplex PCR használatához optimalizálták, lépései a következők: Egy 5 perces 95°C-os ciklust egy 5 cikusból álló szakasz követ, amelynek lépései a következők: 94°C 1 percig, 56°C 1 percig, majd 72°C 1 percig. A következő szakasz 35 cikusból áll, lépései a következők: 92°C 1 percig, 56°C 1 percig, 72°C 1 percig. Ezután egy végső extenzió következik 72°C-on 1 percig.

Az ORF30-ban előforduló nukleotidcsere kimutatására szolgáló új PriProET módszer és az ORF68 polimorf régiójának felszaporításához használt saját fejlesztésű PCR leírása az **EREDMÉNYEK** fejezetben található.

5.2.2.3. A PriProET módszer általános leírása

A vírusok genotípusai közötti különbségeket jelentő pontmutációk kimutatására már számos módszer született. A restrikciós fragmentumhossz polimorfizmuson (restriction fragment length polymorphism, RFLP) kívül egyéb molekuláris módszerek is alkalmazhatók erre a célra. Az egyik eljárás során hagyományos PCR alkalmazásával a vizsgálandó szakaszt (ahol a pontmutációk előfordulnak) felszaporítják és a keletkezett terméket szekvenálják. A módszer hátránya, hogy hosszú ideig tart. Ennél gyorsabb, ha real-time PCR-t alkalmaznak, és a genotípusoknak megfelelő számú és szekvenciájú TaqMan probe-ot használnak, minden egyes probe-ot külön fluoreszcens festékkel jelölve. A módszer hátránya az, hogy nagyon drága, illetve az, hogy minden probe-nak tökéletesen illeszkednie kell a célterülethez, különben a rendszer érzékenysége jelentősen lecsökkenhet (Bustin és mtsai, 2000).

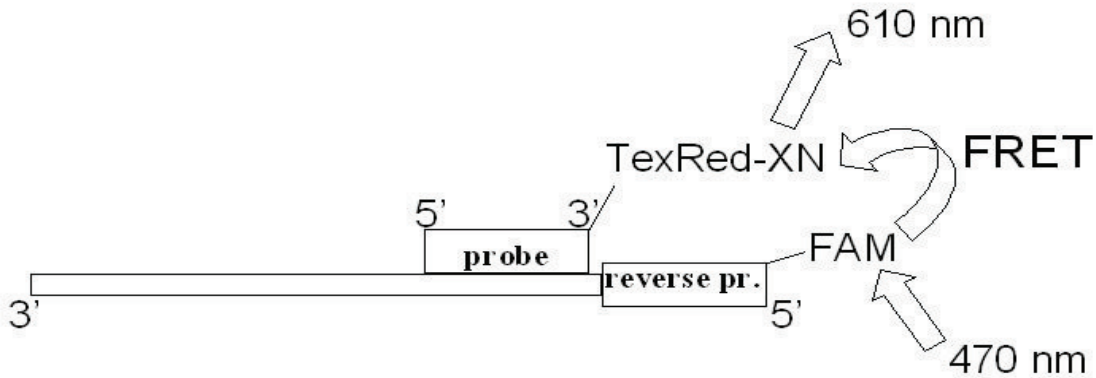
A primer-probe energy transfer (PriProET) módszer alapja a Förster resonance energy transfer (röviden FRET), aminek kidolgozása Theodor Förster nevéhez fűződik. Ennek lényege, hogy egy donor kromofór gerjesztés után képes energiát átadni egy akceptor kromofórnak, ha az egy bizonyos távolságon belül helyezkedik el (ez általában kisebb, mint 10 nm). Az így átadott energia az akceptor molekulának megfelelő hullámhosszú sugárzással távozik, ami detektálható.

A PriProET esetében a donor kromofór az egyik primer-en helyezkedik el, míg az akceptor a probe-hoz kapcsolódik (3. ábra). Fontos, hogy a jelölt primert feleslegben kell adni a reakcióelegyhez (általában 5-10:1 arányban), ugyanis a FRET a jelölt primer donor kromofórja, illetve a primer-hez szintetizálódó DNS termékhez kapcsolódó probe akceptor kromofórja között fog létrejönni. Ha a jelölt primer nagyobb mennyiségben van jelen, akkor a termékből, ami ettől a primertől szintetizálódik, nagyobb mennyiségben keletkezik, következésképpen nagyobb lesz a donor és akceptor molekulák közötti kapcsolatok száma is.

A primerek és probe tervezésekor figyelembe kell venni, hogy a két kromofór közötti távolság lehetőleg ne haladja meg a 40-50 bázist. Lényeges még, hogy a lánc építéséhez olyan polimeráz enzimet kell választani, amelynek hiányzik az 5'-3' irányú exonukleáz aktivitása (pl. Titanium Taq – Clontech), így a láncszintézis során a probe nem hidrolizál, tehát a mennyisége nem csökken a reakció végéig.

A különböző genotípusok elkülönítéséhez a polimeráz láncreakció lezajlása után meg kell határoznunk azt a hőmérsékletet, amelyiken a keletkezett amplikon és a hozzá kapcsolódó probe közötti kötődés megszűnik. Ezt nevezzük az adott genotípushoz tartozó olvadáspontnak, ami attól függ, hogy a keletkezett termék és a probe szekvenciája között van-e különbség, és ha igen, akkor az mekkora. A legfontosabb eltérés a TaqMan rendszer

és a PriProET között az, hogy míg a TaqMan rendszer érzékenysége jelentősen lecsökken, ha a probe és a célterület nem illeszkedik tökéletesen, a PriProET esetén az eltérő szekvencia olvadáspont különbségben jelentkeznek, ami alapján meghatározható a vizsgált izolátum genotípusa.



3. ábra. A primer-probe energy transfer (PriProET) módszer elméleti alapja. A donor kromofór molekulát (ez esetben FAM) 470 nm-es hullámhosszon gerjesztik, ami az energiát átadja az akceptor molekulának (ez esetben Texas Red), ami ezt egy rá jellemző hullámhosszon (610 nm) sugározza ki

5.2.2.4. A PCR termékek megjelenítése (vizualizációja) agaróz gélelektroforézis segítségével

A hagyományos PCR lezajlása után azt, hogy az eredeti mintában volt-e a vizsgálni kívánt kórokozó RNS, vagy DNS genomjából, csak akkor tudjuk megmondani, ha egy adott sűrűségű (ezt a keletkezett termék hossza határozza meg), 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben (SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, USA) futtatjuk meg a PCR reakció végtermékét. A dupla DNS szálhoz kötődő etidium-bromid UV fényvel megvilágítva láthatóvá teszi a reakció során keletkezett DNS-t. Mivel a pozitív esetben keletkező ampikon hossza ismert, ha a végterméket standard méretű DNS darabokkal („DNS-létra”) együtt futtatjuk meg agaróz gélen, a keletkezett végtermék nukleotid hosszúsága meghatározható, így el lehet dönteni, hogy az eredeti minta tartalmazta-e a vizsgált kórokozó genomját, vagy sem.

A mi esetünkben az EHV-1 és EHV-4 elkülönítésére használt PCR termékeinek hossza 226 és 333 bázispár (bp) között volt (2%-os agaróz gél), illetve a saját fejlesztésű, az ORF68 régió polimorf szakaszára tervezett PCR terméke 725 bp (1% agaróz gél) hosszúságot ért el.

A gélelektroforézist 1xTAE-pufferben (tris-acetát-EDTA puffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) végeztük, 100 V feszültségen, 40 percig. A specifikus terméket a gélből kivágtuk, majd a gélből a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) felhasználásával nyertük ki a keletkezett DNS-t.

5.2.2.5. A specifikus DNS termékek nukleotidsorrendjének meghatározása (szekvenálása)

A keletkezett végtermékek szekvenálására a vírustörzsek ORF30 és ORF68 szakaszainak elemzésekor volt szükség. A PCR termékeknél a szekvenáló reakciót az ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-jének (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával végeztük el, a minták futtatása a Biomi Kft. (Gödöllő) ABI PRISM 3130 típusú (Applied Biosystems) szekvenáló automatáján történt, minden törzs esetén két alkalommal.

5.2.2.6. A szekvenciák elemzése és a filogenetikai vizsgálat

A szekvenciák elemzését a BioEdit v7.0.7 (Hall, 1999.) és a DNASTAR 7.1 (Lasergene, WI, USA) programok segítségével végeztem el. A 35 törzs nukleotidsorrendjét egymással, és a BLAST program felhasználásával, a nemzetközi adatbázisban (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) fellelhető EHV-1 törzsek azonos régióival hasonlítottam össze.

A távolság alapú „neighbor-joining” és a karakter alapú „maximum parsimony” módszerrel megalkotott törzsfák elkészítéséhez a Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.4.0. (Tamura és mtsai, 2007) szoftverét használtam fel. A távolság alapú „neighbor-joining” módszer esetén a törzsfák kiszámításához a Kimura-2 paraméteres korrekciós modellt használtam, az eredmények statisztikai megerősítéseként 1000 (bootstrap) ismétléssel. Az EHV-1 törzsek ORF68 régiójának szekvenciái bekerültek a GenBank adatbázisába, a következő azonosítási számokon: HQ654053-HQ654087

6. EREDMÉNYEK

A szövettényészetre oltás után a genetikai analízisre felhasznált 35 hazai izolátum mindegyike specifikus CPE elváltozásokat mutatott. A passzálás során kialakuló spontán mutáció elkerülése miatt a vírustörzseket mindig az eredeti anyagokból izoláltam, a szövettényészetre oltott anyag vagy a beodott liofilizátum (25 minta), vagy a vetélt magzatok szerveinek bedörzsölése után keletkezett szuszpenzió volt (10 minta). A 35 vizsgált izolátum már az első leoltás után specifikus CPE-t produkált a szövettényészeten.

A Carvalho és mtsai által kifejlesztett multiplex PCR vizsgálatban mind a 35 izolátum pozitív eredményt adott, illetve a keletkezett PCR termékek mindegyike az EHV-1-re jellemző hosszúságú volt.

A vizsgálataink eredményeit el kell különítenünk az alapján, hogy az EHV-1 genom melyik régiójának elemzéséhez kapcsolódnak. Ezért a megvizsgált EHV-1 izolátumok ORF30 és ORF68 régióinak analízisét, és ennek eredményeit külön pontokban tárgyalom. Az eredmények között részletezem az általunk tervezett primereket és az elemzésekhez kapcsolódó PCR módszerek leírását is.

6.1. A hazai izolátumok ORF30 szakaszának elemzéséhez kifejlesztett real-time PCR módszer leírása és az ehhez kapcsolódó eredmények

Az EHV-1 vírus ORF30-as régiójában található, a neuropatogenitást meghatározó pontmutáció kimutatására többféle molekuláris módszer is létezik, ezekről már esett szó korábban. Az általunk kifejlesztett eljárás előnye a gyorsasága, egyszerűsége és a specifikussága (Malik és mtsai, 2010).

6.1.1. A primerek tervezése és az amplikon

A módszer kiválasztásakor a PriProET eljárást azért részesítettük előnyben, mert a TaqMan probe-okat használó rendszerekkel ellentétben itt csak egyetlen probe-ra van szükség, és ennek sem kell tökéletesen illeszkednie az amplikonhoz, így többféle genotípus kimutatására is alkalmas lehet. A legfontosabb szempont, amit a primerek és probe tervezésekor figyelembe kell venni, hogy a két kromofór (a mi esetünkben a donor FAM és az akceptor Texas Red) távolsága nem haladhatja meg a 10 nm-t, ami a szekvenciában nagyjából 40-50 nukleotidot jelent. A primerek tervezése során tehát egy olyan szakaszt kellett keresni, ahol a probe sikeresen le tudja fedni a pontmutáció pozícióját, illetve a probe közvetlen közelében

legyen egy olyan szakasz, ahová a donor kromofórral jelölt primer (a mi esetünkben a reverz) kötődni tud.

Az általunk tervezett két primer egy 156 bázis hosszúságú szakaszt fog át, az ORF30 2124-es és a 2279-es pozíciója között. A probe 3' vége és a reverz primer 3' vége között mindössze egy nukleotidnyi a távolság, így a két kromofór közötti távolság is csak 19 nukleotidnyi. A módszer tervezésekor azt szerettük volna elérni, hogy a reakció lezajlása után, az eredmények ismeretében egy más vizsgálattal előtte már EHV-1-re igazoltan pozitív izolátumról meg tudjuk mondani, hogy melyik genotípusba tartozik. A cél tehát nem egy diagnosztikai eljárás megalkotása volt, sokkal inkább egy olyan módszeré, ami a már izolált vírusokat tudja besorolni az A₂₂₅₄ vagy G₂₂₅₄ típusba.

A két típust a PCR lezajlása után végrehajtott olvadáspont analízissel tudjuk elkülöníteni egymástól. A polimeráz láncreakcióhoz használt primerek szekvenciáit a 4. táblázat, a reakcióelegy összetételét és a folyamat hőmérsékleti protokollját az 5. táblázat foglalja össze.

4. táblázat. A neuropatogén és nem neuropatogén törzsek elkülönítésére szolgáló PCR módszerhez használt primerek szekvenciái

Primerek neve	Primerek szekvenciája
ORF30f (forward primer)	5'-CTTTCATGTGGACCCCGT-3'
ORF30r (reverz primer)	5'-/56-FAM/-TCACCCACCTCGAACGTC-3'
ORF30probe (jelölt próba)	5'-GGCTTCAACCATCCGTGCGACTACTCT-/3TexRed-XNI/-3'

5. táblázat. A neuropatogén és nem neuropatogén törzsek elkülönítésére szolgáló PCR reakciókeverékének összetétele és a reakció hőmérsékleti protokollja

Reakcióelegy (Master Mix)

10× Titanium Taq polymerase puffer (Clontech, Mountain View, CA, USA),	2,5 µl
10 mM dNTP mix	1,25 µl
Texas Red-del jelölt próba („ ORF30probe ”) 10 µM	1,25 µl
FAM-mal jelölt reverz primer („ ORF30r ”) 10 µM	1 µl
Forward primer („ ORF30f ”) 10 µM	0,1 µl
Titanium Taq polimeráz (Clontech),	2,5 µl
Víz	14,65 µl
DNS templát	2 µl

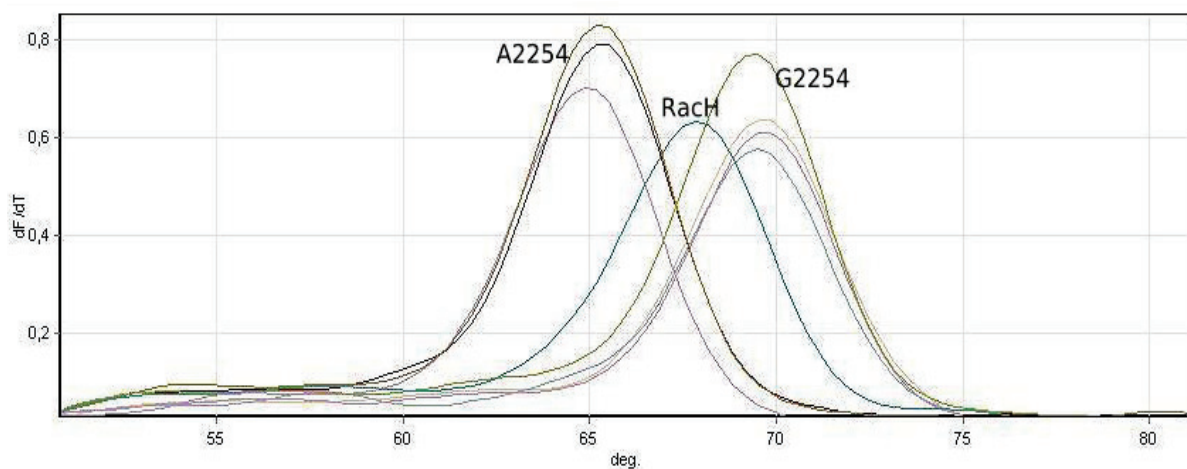
Hőmérsékleti profil

94°C 2 perc	1 ciklus
94°C 10 mp	40 ciklus
52°C 15 mp	
72°C 20 mp	
Olvadáspont elemzés 60-90°C 10 mp 1°C-onként	

A gerjesztési hullámhossz 470 nm volt, a fluoreszcencia mérése 610 nm-en zajlott.

6.1.2. A vizsgált EHV-1 izolátumok ORF30 régiójának elemzése

Az újonnan kifejlesztett PCR módszer segítségével meghatároztuk a 35 magyarországi EHV-1 izolátum, illetve a két laboratóriumi törzs genotípusát is (ARMY 183, RacH). A 2254-es nukleotid pozícióban 5 törzs guanin bázist kódolt (G₂₂₅₄ – „neuropatogén csoport”) (14%), 30 törzs pedig adenint (A₂₂₅₄ – „nem neuropatogén csoport”), ami az összes törzs 86%-a volt. A 3. ábrán egy általunk elvégzett olvadáspont analízis képe látható.



3. ábra. Az ORF30 specifikus régiójára tervezett PCR végtermékeinek elemzésekor kapott olvadáspont analízis képe. A két genotípushoz (A2254/G2254) kapcsolódó olvadáspont görbék között helyezkedik el a RacH vakcinatörzshöz tartozó görbe. Ennek oka a 2259-es nukleotid pozícióban előforduló pontmutáció, amely a vizsgált törzsek közül csak erre jellemző

A probe tervezésekor az Ab4 referencia EHV-1 törzset (GenBank azonosítási szám: DQ180669) vettük alapul. Ez a törzs a vizsgált pozícióban guanint tartalmaz, ezért a G₂₂₅₄ genotípusba tartozó törzsek esetén magasabb volt az olvadáspont, hiszen a probe ebben az

esetben illeszkedett tökéletesen. Az adott nukleotid pozícióban előforduló pontmutáció a görbék szerint kb. 3-4°C különbséget jelent a genotípusok olvadáspontjai között. Az olvadáspont görbe alapján történő besorolást a vizsgált szakasz kétszeri szekvenálásával ellenőriztük, ez minden esetben megegyezett az olvadáspont analízis eredményével. Az egy adott genotípushoz tartozó hőmérsékleti értékek néhány tized fokos tartományon belül mozognak, ez azonban futtatásonként eltérhet.

A laboratóriumi törzsek vizsgálata során megállapítottuk, hogy az ARMY 183 törzs a G₂₂₅₄ genotípusba tartozik, míg a Rach az adott régióban eltér az összes többitől. Az egyéb megvizsgált EHV-1 izolátumoktól eltérően a Rach a 2259-es pozícióban citozint kódol, ezért az olvadáspont görbéje a neuropatogén és a nem neuropatogén genotípusba tartozó izolátumok görbéi között helyezkedik el. A vizsgált izolátumokhoz tartozó olvadáspont hőmérsékletek és a 2254-es pozícióban előforduló bázisok összesítése az 5. táblázatban látható.

5. táblázat. Az általunk megvizsgált izolátumok olvadáspont hőmérsékletei és a 2254-es nukleotid pozícióban található bázis alapján meghatározott genotípus.

EHV-1 törzs	Olvadáspont (°C)	A/G ₂₂₅₄	EHV-1 törzs	Olvadáspont (°C)	A/G ₂₂₅₄
77_01	65,8	A	98_03	66,3	A
78_01	65,9	A	98_04	70,3	G
78_02	65,8	A	98_05	70	G
78_03	66	A	01_01	66	A
82_01	66	A	03_01	66,2	A
82_02	65,9	A	03_02	66,1	A
82_03	66	A	04_01	66	A
83_01	66,2	A	04_02	69,7	G
88_01	65,9	A	04_03	65,9	A
88_02	65,9	A	04_04	69,8	G
90_01	65,8	A	05_01	66	A
90_02	66	A	06_01	66,3	A
91_01	69,7	G	06_02	66	A
92_01	66,2	A	07_01	66,2	A
97_01	66,2	A	07_02	66,2	A
97_02	66	A	08_01	66,2	A
97_03	66	A	ARMY 183	70	G
98_01	66,2	A	Rach	68,3	G

6.2. A magyarországi EHV-1 izolátumok ORF68 régióján végzett vizsgálatok

6.2.1. Az ORF68 polimorf szakaszának vizsgálatához használt primerek

A régió elemzéséhez először a Nugent és mtsai (2006) által leírt primereket használtuk. A cikkben megadott két primer a polimorf szakasz 927 bázispár hosszú szakaszát fogta át (nt 48-974), mely az SNPk előfordulási pozícióit teljesen lefedte. A megadott primerekkel azonban nem sikerült konzekvens eredményeket elérnünk, ezért az adott génszakasz elemzéséhez saját primereket terveztünk.

A primerek tervezésekor az Ab4 törzs ORF68 régiójának szekvenciáját vettük alapul (GenBank azonosító szám: DQ172353). A feladatot nehezítette, hogy a vizsgált régió GC gazdag, ezért első körben két pár primert terveztünk, ami a GC gazdag szakaszok egy részét kihagyta a vizsgálatból (ezeken a területeken az eredeti cikkben nem találtak nukleotid szubsztitúciót). Az általunk tervezett négy primer szekvenciáit és a régió belüli elhelyezkedését a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat. Az ORF68 polimorf szakaszának vizsgálatára tervezett primerek szekvenciái

A primer elnevezése	A primer szekvenciája	Pozíció
ORF68f (forward)	5'-TTGGCATCTGAACCGCTT-3'	118-138
ORF68r (reverz)	5'-GTGGGTGGACGAACTAATG-3'	638-620
ORF68s (forward)	5'-TGGAGAAGACACCGTAGTGG-3'	567-586
ORF68as (reverz)	5'-AGAGTAGGCGTTCCATCCAC-3'	881-862

Az első primerpár (ORF68f-ORF68r) az ORF68 egy 483 bázispár hosszú szakaszát fogta át (nt 138-620), míg a második pár (ORF68s-ORF68as) az 586. és a 862. nukleotid közötti 277 bázispár hosszúságú szakaszt, így a két termék egy 35 nukleotid hosszúságú szakaszon még át is fedte egymást. Az angol kutatók tanulmányában a csoportspecifikus SNP-k a 336-os és 629-es pozícióban, illetve a 710-760-ig terjedő szakaszon fordultak elő. Jól látható, hogy a keletkező két termék ezeket a régiókat lefedi.

A rendszer optimalizálása után lehetővé vált, hogy az ORF68f és az ORF68as közötti szakaszt egy lépésben amplifikáljuk, ebben az esetben egy, a 138-as és a 862-es pozíció között elhelyezkedő, 725 nukleotid hosszúságú szakasz SNP-it tudjuk megvizsgálni. A csoportspecifikus nukleotidcserék előfordulásának vizsgálatához ezt a terméket minden izolátum esetében szekvenáltuk, majd ezeket hasonlítottuk össze. A reakcióelegy összetételét és a hőmérsékleti profilját a 7. táblázat tartalmazza. A termék amplifikációjához a Sigma-Aldrich cég (Saint Louis, USA) RedTaq Polymerase kit-jét használtuk, a gyártó

utasításai szerint. A reakciókeverék 10%-ban tartalmazott dimetil-szulfoxidot (DMSO), ami GC gazdag templát esetén csökkenti a bonyolult másodlagos szerkezet kialakulását, ezzel növelni lehet a PCR reakció hatékonyságát (Chakrabarti és mtsai, 2001).

7. táblázat. Az ORF68 régió vizsgált szakaszának amplifikációjához használt PCR reakciókeverékének összetétele és a reakció hőmérsékleti profilja

Reakcióelegy (Master Mix)

10× RedTaq polymerase puffer	2,5 µl
dNTP mix	0,5 µl
Forward primer („ORF68f”) 10 µM	1 µl
Reverz primer („ORF68as”) 10 µM	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
Dimetil-szulfoxid (DMSO)	2,5 µl
RedTaq polimeráz	1,5 µl
Víz	13 µl
<hr/>	
DNS templát	2 µl

Hőmérsékleti profil

95°C 2 perc	1 ciklus
<hr/>	
95°C 1 perc	40 ciklus
56°C 1 perc	
72°C 2 perc	

6.2.2. A saját izolátumokban előforduló nukleotidcserék és a csoportok kialakítása

A csoportok kialakításához a Nugent és mtsai (2006) által leírt rendszert használtuk. Az angol kutatók a leolvasási keret részben polimorf szakaszain előforduló SNP-k alapján összesen hat csoportot alakítottak ki. Az eredeti hat és az általunk kialakított négy új csoport csoportspecifikus SNP-inek elhelyezkedését a 8. táblázat mutatja be.

Az ORF68 polimorf szakaszán előforduló pontmutációk nagy része hasonló pozíciókban fordul elő. A 3-as, 4-es, 5-ös, és 6-os csoportokba tartozó törzsek megegyeznek abban, hogy a 629-es pozícióban A-t kódolnak, ellentétben az 1-es, a 2-es, és az új csoportba tartozó törzsekkel, amelyekben itt G-t találunk. Hasonlóan változékony pozíció a 710-es (1-4,

6, 8. csoport T₇₁₀; 5, 9, 10. csoport G₇₁₀; 7. csoport C₇₁₀), illetve a 713-as (1-4, 6-8. csoport A₇₁₃; 5, 9, 10. csoport A₇₁₃). Két csoportban találunk eltérést a 719-es pozícióban (3. csoport T₇₁₉, 7. csoport A₇₁₉, összes többi csoport G₇₁₉), illetve két csoport tér el az összes többi csoport szekvenciájától a 755-ös pozícióban is (6. csoport T₇₅₅; 7. csoport A₇₅₅, összes többi csoport C₇₅₅). A magyar izolátumok közül nem találtunk olyat, ami az ORF68 szekvenciája alapján az 1-es, illetve a 6-os csoportba tartozott. Az 5. csoportba a vizsgált törzseink közül csak a két labortörzset (Army 183, RacH) tudtuk besorolni, így ebben a csoportban sem szerepelt magyarországi izolátum.

A 35 megvizsgált EHV-1 törzs közül csak 23 olyat találtunk, amit az ORF68 polimorf szakaszának szekvenciája alapján a Nugent és mtsai (2006) által kialakított hat csoport valamelyikébe be tudtunk sorolni, ez az izolátumok 66%-át jelenti. 12 magyarországi törzsben olyan SNP-eket találtam, amelyek az angol kutatók által megvizsgált izolátumok közül egyikben sem voltak jelen. Érdekes, hogy a 7. csoport specifikus nukleotidcseréinek pozícióiban (nt 710 és 719) már a 3. és 5. csoportban is tapasztaltak eltérést (3. csoport: G₇₁₉ helyett T₇₁₉, 5. csoport: T₇₁₀ helyett G₇₁₀), azonban a 7. csoport tagjai a 710-es pozícióban C-t, a 719-esben A-t kódolnak. Ezzel szemben a 8. csoport tagjainál egy olyan ponton fordul elő a nukleotidcsere (nt 426), ahol az eddig megvizsgált törzsek egyikénél sem tapasztaltak szekvenciaváltozást. Mindkét új csoport öt-öt tagot számlál.

A 9. és 10. csoport annyiban tér el a többitől, hogy mindkettőnek csak egy-egy tagja van. Sajnos az eredeti közleményben hiányoztak azok az alapelvek, amelyek az új csoportok kialakítására vonatkoznak. Egy nukleotid eltérés már új csoportot jelentett a 3-as, a 4-es és a 6-os csoport esetén is, így az alapján, hogy a 83_01 kódszámú törzs a 629-es pozícióban nem az 5. csoport első csoportspecifikus SNP-jét (A₆₂₉) kódolta, külön csoportba került (9. csoport). A két izolátum a törzsfán (lásd később) is külön ágakra került, így ez is indokolhatja a külön csoportokba sorolást.

A 04_04 kódszámú törzs, a 10. csoport egyetlen tagja, három egyedi SNP-t is kódol az 5. és 9. csoportban előforduló G₇₁₀ és A₇₁₃ mellett. Az izolátum nukleotid szubsztitúciói érdekes módon több ponton is egyezést mutattak egy zebrából izolált EHV-1 törzs ORF68 szekvenciájával. A zebra izolátum SNP-i nagyrészt eltérnek a 04_04 kódszámú törzs pontmutációitól, azonban a három, csoportspecifikus eltérés jelen van a zebrából izolált törzsben is (Ghanem és mtsai, 2008).

8. táblázat. A ORF68 régió belüli előforduló csoportspecifikus SNP-k elhelyezkedése. A törzsek összehasonlításának alapja az 1-es csoportba tartozó Ab4 törzs volt, a szekvencia feletti számok a nukleotidok pozíciójára utalnak (a szám az első nukleotidnak megfelelő pozíciót jelenti). A pontok az Ab4 szekvenciájával való azonosságot, a betűk az ettől való eltérést jelzik. Ha egy adott csoportnak csak egy tagja van, a törzs kódja az izolátumok száma utáni zárójelben szerepel.

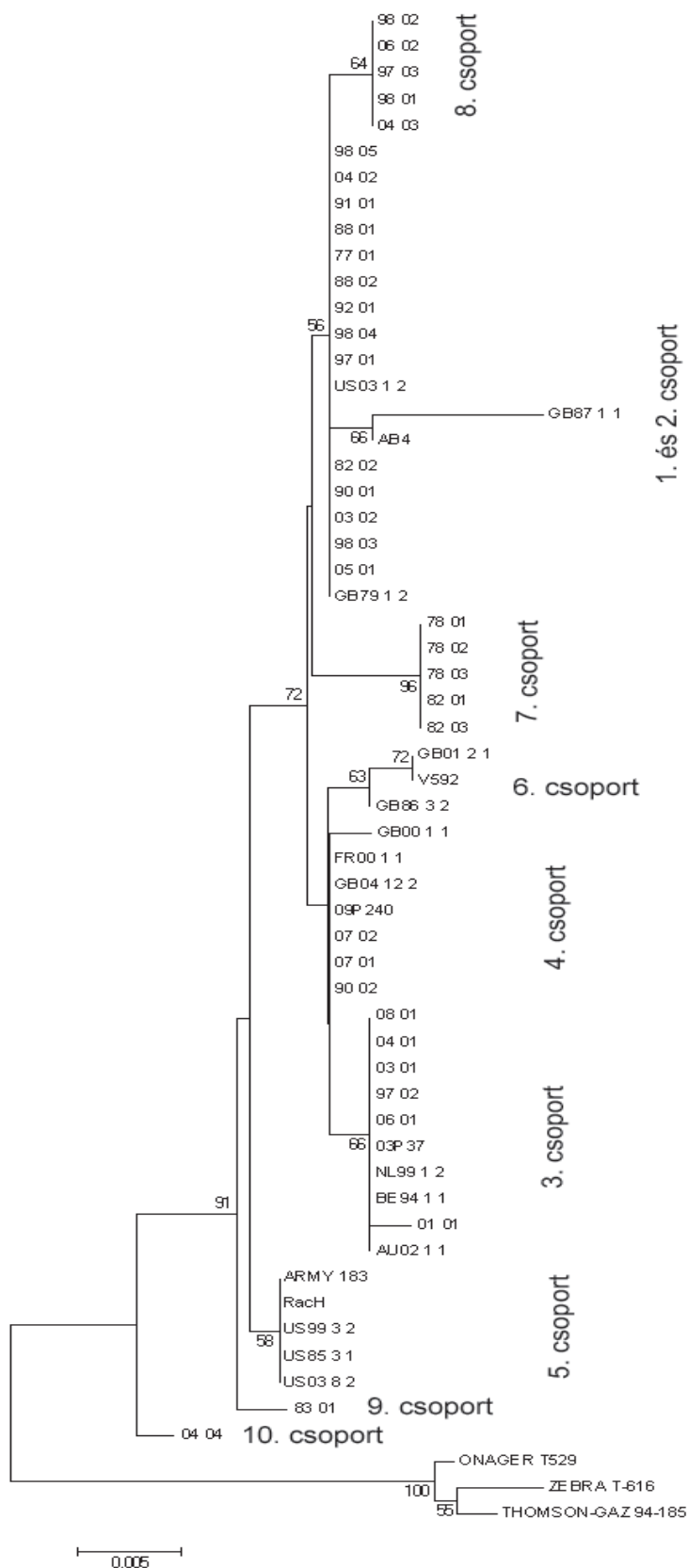
331	421	431	561	621	701	711	731	741	751	Csoport sorszám	Izolátumok száma
CCATCTCAAC	CCCGGTCCTA	AACGAATGCT	GGCGGCTGGA	ATTAGTTGCT	GGCGGCGGCT	GCCGCGGCGG	AGGGGGGGA	TGCGCGCCCC	GAGGCGGCGC	1	0
.....	2	14
.....	3	6
.....	4	3
.....	5	1 (Army-183)
.....	6	1 (Rach)
.....	7	5
.....	8	5
.....	9	1 (83_01)
.....	10	1 (04_04)

A 04_04-es izolátummal kapcsolatban két érdekes információt kell még megemlítenem, amelyek az eredmények szempontjából fontosak lehetnek. Az egyik, hogy ez volt az egyetlen, amelynél a kórtörténetben szerepelt az, hogy egyes állatokban képes volt idegrendszeri tüneteket okozni. Ezt az ORF30 szakasz elemzése később megerősítette, hiszen a 2254-es nukleotid pozícióban G bázist tartalmazott, tehát a neuropatogén genotípusba tartozik. A másik érdekes információ, hogy a járvány helyszínén a vetélt állatokkal egy légtérben egy zebra csődört tartottak, ami azonban semmilyen klinikai tünetet nem mutatott. Az állat sajnálatos módon az adatok elemzése előtt elpusztult, így nem tudtuk igazolni azt, hogy az izolált vírus ebből az állatból származott-e, vagy sem. Az, hogy a 04_04-es törzs genomjának szekvenciája mutat-e máshol is egyezést zebrából származó EHV-1 törzsekkel még további vizsgálatokat igényel, ehhez azonban zebrából izolált vírustörzsekre van szükség, amelyek beszerzése sajnos nem egyszerű.

A törzsfá alapján látszik, hogy vannak csoportok, amelyek közelebbi rokonságban állnak egymással, ilyen például az 1-es, a 2-es és a 7-es, a 3-es, 4-es, és a 6-os, illetve az 5-ös, 9-es és a 10-es. Az ezekben előforduló pontmutációk alapján feltételezhető, hogy a csoportok száma folyamatosan változik, hiszen egy adott csoporton belül előforduló pontmutáció után a megváltozott törzs egy újabb csoport első képviselője is lehet, mint ahogy az a 9-es és 10-es csoport esetén is látható. A csoportosítás elveinek egységes lefektetése nélkül így nagyszámú új csoport is keletkezhet, ami a rendszer használhatóságát veszélyezteti. A törzsek szekvenciáinak összehasonlítása után megrajzolt törzsfá a 4. ábrán látható.

A törzsfán szerepelnek a Magyarországon izolált törzsek, a GenBank adatbázisában fellelhető, lófélékből (ló, zebra, onager) és kérődző állatból (Thomson-gazella) származó EHV-1 vírustörzsek, illetve laboratóriumban használt törzsek (Ab4, V592) is. A fán a csoportok könnyen elkülöníthetők, és jól látható, hogy mely csoportok azok, amelyek közelebbi rokonságban vannak egymással. Kivételt képez az Ab4 törzs, ami a törzsfán az 1-es csoport egyedüli képviselője, viszont a szekvenciája csak a homopolimer szakaszon található G bázisok számában tér el a 2-es csoport tagjaitól, ezért a törzsfán ezekkel a törzsekkel került egy ágra. A másik kivétel a GB87_1_1 törzs, amelyet Nugent és mtsai (2006) nem tudtak csoportba besorolni, ugyanis szekvenciája teljesen eltért a többi törzsetől, viszont a szekvenciája alapján ez is a 2-es csoporttal áll a legközelebbi rokonságban.

Az általunk kialakított új csoportok közül a 8-as áll a legközelebb a viszonyítási alapnak tekintett Ab4-hez, illetve az ezzel szoros rokonságban lévő 2-es csoporthoz. Az 5-ös, illetve a 9-es, és a 10-es messze kerültek a többi csoporttól. Ezekben közös a 710-es pozícióban előforduló G, illetve a 713-asban található A bázis.



4.ábra. A magyarországi izolátumok, a két laboratóriumi törzs (ARMY 183 és RacH), illetve a GenBank-ban fellelhető egyéb, lóból, zebrából, onagerből és Thomson-gazellából származó EHV-1 törzsek ORF68 szekvenciájának összehasonlítása után felállított törzsfa.

6.2.3. A csoportok földrajzi előfordulásával kapcsolatos eredmények

Nugent és mtsai (2006) a kapott eredmények elemzése után azt a következtetést vonták le, hogy az ORF68 régióban előforduló pontmutációk alapján kialakított csoportokba tartozó törzsek származási helyeinek földrajzi elhelyezkedése bizonyos szabályszerűségeket mutat. Az általuk megvizsgált, Európában izolált törzsek nagy része a 3. csoportba került, de a 2-es csoport törzseinek nagy része, illetve az 5-ös csoportba tartozó törzsek kizárólag Észak-Amerikából származott.

Az 5. ábrán a 2, 3, és 4. csoportba tartozó magyarországi törzsek izolálási helyeinek földrajzi eloszlása látható. A vaktérképeken a pontok jelzik az izolálás helyszíneit; ezek mindhárom csoport esetén nagyrészt Magyarország középső részére korlátozódnak, kivételt képez a 2001-ben Karmacsról, illetve a 2006-ban Mezőhegyesről begyűjtött törzs. Érdekes, hogy két mezőhegyesi minta (az egyik 1997-ből, a másik 1998-ból) a 8. csoport specifikus pontmutációit tartalmazza (6. ábra).

Az új csoportokba tartozó törzseknél már nehezebb körülhatárolni az elterjedési területeket, mert ezek a csoportok jóval kevesebb tagot számlálnak. A 7. csoport esetén még behatárolható az a terület, ahol az adott vírustörzsek előfordultak, de a 8. csoportnál ez már nem annyira egyértelmű, a 9-es és 10-es csoport pedig csak egy-egy izolátumból áll, ezért ott nehéz előfordulási területről beszélni.

Az ORF68 szekvenciája alapján történő járványtani vizsgálat akkor vezethet eredményre, ha az állományba bekerült állatok származási helye ismert, illetve nagyban megkönnyíti a helyzetet, ha a származási helyről származó korábbi izolátum a rendelkezésünkre áll. Az azonos évben talált, egy településről, vagy egymással szoros kapcsolatban álló ménesekből (Bábolna-Diópuszta) származó minták nagy valószínűséggel ugyanazt a vírustörzset tartalmazzák, ezért egyezik meg az ORF68 szekvenciájuk. A 7. csoport tagjai elég speciális SNP-eket tartalmaznak, ezért a csoport 4 évvel későbbi újabb felbukkanása, nagyjából ugyanazon a területen, valószínűleg a vírus reaktiválódását jelenti.

A 2. csoport elterjedésével kapcsolatban már nehezebb következtetéseket levonni. Ez a legnagyobb létszámmal rendelkező csoport és szinte a teljes vizsgált időszak alatt (1977 és 2005 között) találtam ide tartozó törzseket. Mivel a csoport tagjai kódolják a legelterjedtebb ORF68 szekvenciát, és nem tartalmaznak speciális SNP-eket, nem lehet teljes bizonyossággal kijelenteni, hogy a vizsgált 30 év alatt ugyanaz a törzs cirkulált az adott területen, de ezt kizárni sem lehet. Ezért a 2-es csoport tagjai esetén van a legnagyobb jelentősége annak, hogy ismerjük az adott állományba behurcolt vírustörzs származási helyét.

2. csoport



77_01 Mélykút	97_01 Üllő (AOTE)
82_02 Apaj	98_03 Alcsútdoboz
88_01 Töröksejtmiklós	98_04 Kunszentmiklós
88_02 Dabas	98_05 Kunszentmiklós
90_01 Dabas	03_02 Lajosmizse
91_01 Sarlóspuszta	04_02 Pákozd
92_01 Kecskemét	05_01 Sárbogárd

3. csoport



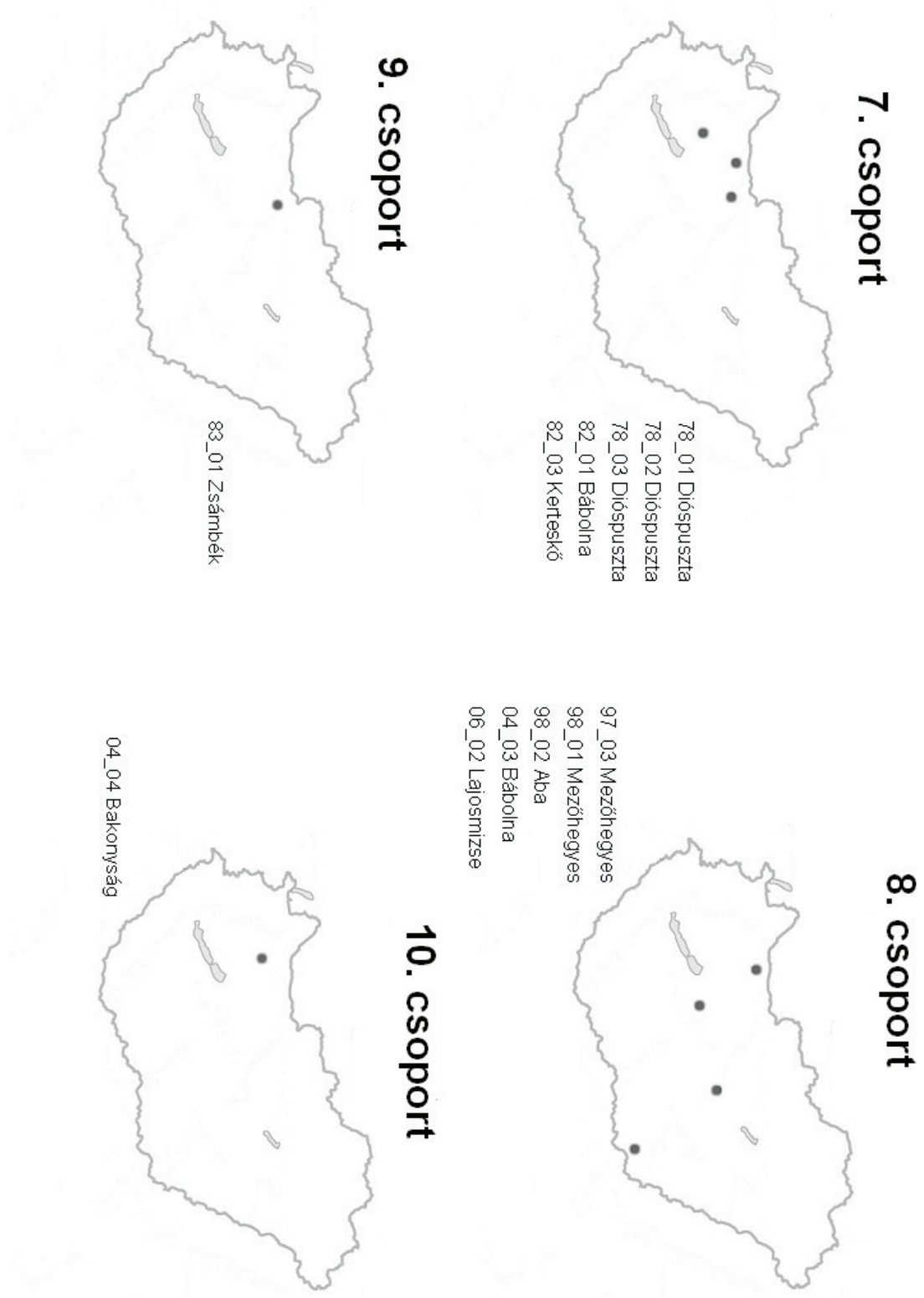
03_01 Tata	97_02 Vác
04_01 Tök	06_01 Mezőhegyes
01_01 Karmacs	08_01 Kisbér

4. csoport



90_02 Apaj
07_01 Tápilószentmárton
07_02 Tápilószentmárton

5. ábra. A Nugent és mtsai (2006) által kialakított csoportokba (1-6.) csak a magyarországi izolátumok 65,7%-át (23 izolátum) sikerült beilleszteni. A törzsek kódja mellett szerepel az izolálás helye. Az egy éven belül izolált, azonos helyről származó törzsek azonos járványból származnak. A pontok Magyarország vaktérképén az izolálás helyszíneit jelzik.



6. ábra. Az általunk kialakított új csoportokba (7-10.) besorolt EHV-1 törzsek izolálásának helyszíneit bemutató ábra. A törzsek kódja után szerepel a származási hely, a vaktérképen pontok jelzik a kódok után szereplő településeket

6.2.4. Az EHV-1 törzsek ORF30 és ORF68 szakaszain előforduló szubsztitúciók összefüggéseinek elemzése

Nugent és mtsai (2006) a két EHV-1 törzs teljes genomjának összehasonlítása és elemzése során arra a következtetésre jutottak, hogy míg az ORF30 2254-es nukleotid pozíciójában előforduló szubsztitúció szignifikáns összefüggést mutat az adott törzs neuropatogén tulajdonságaival, addig az ORF68 régió részben polimorf szakaszán előforduló eltérések nem befolyásolják a törzsek patogenitását. Az ORF68 nukleotidcseréi alapján kialakított csoportokon belül nagyjából egyenletes volt a neuropatogén és nem neuropatogén genotípusba tartozó izolátumok eloszlása, kivéve az 5. csoportot, ahol a csoport 17 tagja közül 13 tartalmazta a neuropatogén típusra jellemző szubsztitúciót (9. táblázat).

9. táblázat. A neuropatogén törzsek aránya a Nugent és mtsai (2006) által vizsgált EHV-1 törzsek csoportjain belül

Csoportok az ORF68 szekvencia alapján	Izolátumok száma	A neuropatogén csoportba (ORF30) tartozó törzsek száma
1. csoport	6	2 (33,3%)
2. csoport	36	15 (41,7%)
3. csoport	34	12 (35,3%)
4. csoport	8	4 (50%)
5. csoport	17	13 (76,5%)
6. csoport	3	0 (0%)

A saját vizsgálataink során összesen öt olyan törzset találtunk, amelyekben előfordult a neuropatogenitásra utaló nukleotidcsere. Ezek eloszlása nem volt egyenletes, négy törzs a 2. csoportba tartozott, míg egy az általunk kialakított 10. csoport tagja volt (10. táblázat). Ezekből az adatokból nehéz általános következtetéseket levonni, hiszen a különböző csoportok eltérő számú törzset tartalmaznak, így nem meglepő, hogy a legtöbb tagot számláló csoport tartalmazta a legtöbb neuropatogén törzset is. Ami viszont furcsa, hogy a 2. és a 10. csoporton kívül egy sem akadt, amely legalább egy ilyen törzset tartalmazott volna.

10. táblázat. A neuropatogén törzsek aránya a Magyarországon izolált EHV-1 törzsek csoportjain belül

Csoportok az ORF68 szekvencia alapján	Izolátumok száma	A neuropatogén csoportba (ORF30) tartozó törzsek száma
1. csoport	0	0 (0%)
2. csoport	14	4 (29%)
3. csoport	6	0 (0%)
4. csoport	3	0 (0%)
5. csoport	0	0 (0%)
6. csoport	0	0 (0%)
7. csoport	5	0 (0%)
8. csoport	5	0 (0%)
9. csoport	1	0 (0%)
10. csoport	1	1 (100%)

A neuropatogén törzsek arányából a rendelkezésre álló izolátumok viszonylag kis száma miatt szintén nehéz általános következtetéseket levonni, azonban további vizsgálatokkal a megvizsgált EHV-1 szekvenciák száma növelhető, így a valóságos adatokat jobban megközelítő számot kaphatunk. A két ORF vizsgálata kiegészítheti az esetleges járványtani nyomozás során felhasznált adatokat, hiszen így nem csak egy, hanem két olyan marker is rendelkezésre áll, amely alapján az állományba behurcolt törzset azonosítani lehet.

7. MEGVITATÁS

A ló 1-es típusú herpesvírusa az egyik legfontosabb és legnagyobb kárt okozó fertőző ágens egy ló tartó számára. Kártétele több irányú, nemcsak légzőszervi és szaporodásbiológia problémákat okoz, hanem esetenként képes arra, hogy idegrendszeri tüneteket váltson ki, ami súlyos esetben az értékes tenyész- és versenylovakat munkavégzésre alkalmatlanná teheti. Az a genetikai eredetű változás, ami meghatározza azt, hogy egy EHV-1 törzs nagyobb eséllyel legyen képes idegrendszeri tüneteket kiváltani, csak az utóbbi évtizedben vált ismertté.

7.1. Az EHV-1 törzsek csoportosítására kifejlesztett módszerek előnyei és hátrányai

Az, hogy a lóállományokban jelen levő vírustörzsek genomjai különböznek egymástól, már több évtizede ismert, viszont az eddig alkalmazott módszerekkel nem sikerült kialakítani egy olyan standard eljárást, ami széles körben elterjedt volna. A leggyakrabban felhasznált módszer a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP), viszont ezzel csak viszonylag kevés számú csoportot sikerült kialakítani (Allen és mtsai, 1983; Crandell és mtsai, 1988; Kirisawa és mtsai, 1993; Pálfi és Christensen, 1995). Allen és munkatársai egy 1983-ban megjelent tanulmányukban ötféle restrikciós enzim segítségével elemezték az akkor még egyféle típusba, de két szubtypusba sorolt EHV-1 és EHV-4 vírustörzsek örökítőanyagát. Megállapították, hogy a többi herpesvírustól eltérően az EHV-1 törzsek genetikai állománya csak kismértékben tér el egymástól. A megvizsgált 272, EHV-1-es szubtypusba sorolt izolátumon belül összesen 16féle típust lehetett elkülöníteni, viszont a megvizsgált törzsek 90%-a az 1P és 1B típushoz tartozott. A módszer tehát a törzsek részletesebb elemzését sajnos nem teszi lehetővé.

Az EHV-1 fertőzés egerekben nagyon hasonló tüneteket okoz, mint lovakban. A törzsek patogenitásbeli különbségeinek meghatározásához a laboratóriumi egér, mint modellállat, ezért viszonylag jól használható (Studdert és mtsai, 1981; Pálfi és Christensen, 1995; van Woensel és mtsai, 1995; Walker és mtsai, 1999). Pálfi és Christensen (1995) újszülött egereket fertőztek eltérő patogenitású EHV-1 törzsekkel, majd a fertőzés után kialakuló klinikai tüneteket és patológiai elváltozásokat vizsgálták. Az alapján, hogy az adott törzssel fertőzött egerek elhullottak-e, illetve, hogy az elhullott, vagy leölt állatok agyából és/vagy belső szerveiből ki lehetett-e mutatni a beoltott vírust, az EHV-1 törzseket négy csoportba sorolták.

Van Woensel és mtsai (1995) egy ettől eltérő módszert alkalmaztak. Ismert patogenitású EHV-1 törzsekkel fertőztek egereket, majd mérték az állatok súlycsökkenését. A fertőzés után naponta mért testsúlyértékekből alapján számolt „safety index” általában korrelált a

törzsek patogén tulajdonságaival. Így szerintük a rendszer alkalmas lehet járványokból izolált, illetve vakcinatörzsekben használt EHV-1 törzsek patogenitásának megállapítására. Sajnos minden egyes ismertetett módszernek megvannak a maga hátrányai, ezért egy standard eljárás kialakítására nehezen alkalmazhatók. Az RFLP-n alapuló módszerek hátránya az, hogy a genomok eltéréseit csak akkor jelzik, ha a mutáció egy olyan pozícióban jelenik meg, ahol valamelyik restriktív enzim vágóhelye van. Kísérleti állatok alkalmazása számos etikai és állatvédelmi problémát vet fel, pusztán az EHV-1 vírustörzsek csoportosítása nem feltétlenül indokolja laboratóriumi egerek fertőzését és megölését. Emellett a módszerrel kapott eredményeket több biológiai faktor is befolyásolhatja (az egerek immunológiai állapota, a vírustörzs beadásának módja, állatok takarmányozása, stb.), ezért nehéz objektív eredményt produkálni.

A leginkább célravezető megoldásnak az tűnik, ha minél több EHV-1 törzs teljes genomja kerülne be a GenBank-ba, és a törzsek örökítőanyagának összehasonlításával a nukleotidok eltérései alapján lehetne a csoportokat kialakítani. Mindezek figyelembevételével munkám során a hazai törzseket genetikai tulajdonságaik alapján kíséreltem meg csoportokba sorolni. Ez egyben lehetőséget nyújtott a már ismert ilyen csoportosítás során kapott eredményekkel való összehasonlításra is. A genetikai adatbázisban, a GenBank-ban, ma is csupán két olyan EHV-1 törzs szerepel, amelynek a teljes szekvenciája ismert, a neuropatogén Ab4 és a nem neuropatogén V592. Ennek oka valószínűleg az, hogy a vírus örökítőanyaga megközelítően 150000 bázispár hosszúságú, egy ekkora genom teljes szekvenálása hatalmas munkával és anyagi ráfordítással jár.

7.2. Az ORF30 elemzése és a vizsgálataink során kapott eredmények alapján levonható következtetések

7.2.1. Az EHV-1 genom ORF30 szakaszának a törzsek neuropatogén tulajdonságaiban játszott szerepe

A két ismert patogenitású EHV-1 törzs összehasonlítása során 51 nukleotid szubsztitúciót (ezek összesen 22 ORF-on belül fordultak elő) és az ORF68 csoportspecifikus SNP-it próbálták összefüggésbe hozni a lovakban kiváltott idegrendszeri tünetekkel, amihez a Fisher exact próbát használták fel. Neuropatogén törzsnek az számított, amelynek a kórelőzményében szerepelt, hogy az általa kiváltott járvány ideje alatt legalább egyszer előfordultak idegrendszeri tünetek. A kapott eredmények alapján egyedül az ORF30, 2254-es nukleotid pozíciójában megjelenő szubsztitúció volt az, ami statisztikailag szignifikáns ($p < 0,01$) összefüggést mutatott a vírustörzs neuropatogén tulajdonságaival (Nugent és mtsai, 2006).

Ezután összesen 131 izolátum ORF30 szekvenciáját analizálták, ezek közül 82 olyan járványkitörésből származott, amelyeknél a kórelőzményben nem szerepelt idegrendszeri tünet, 49 izolátum esetén viszont a járvány során legalább egyszer leírtak neuropatogenitást. 78 (95%) nem neuropatogén izolátum A₂₂₅₄-et kódolt (aminosav: aszparagin (N₇₅₂)), míg a neuropatogén izolátumok közül 42-ben (86%) ebben a pozícióban G (aminosav: aszparaginsav (D₇₅₂)) szerepelt.

Érdekes módon az ORF30 régió nukleotidcserével megváltozó, 752-es aminosava a herpesvírusok DNS polimerázán belül nem túl változékony. Az emlős eredetű herpesvírusokban ebben a pozícióban mindig egy savas oldalláncot tartalmazó aminosav (általában aszparaginsav, kivéve az Aujeszky-vírust, ahol glutaminsav) található (Nugent és mtsai, 2006). Ettől nagyban eltérnek a neuropatogenitást nem mutató törzsek, amelyekben a 752-es pozícióban egy hidrofil oldalláncot tartalmazó aminosavat (aszparagin) találunk. Az eltérő aminosav a proteinláncban, eltérő biológiai tulajdonságokat is okoz. A DNS-polimeráz funkció megváltozása befolyásolja a fertőzés után kialakuló viraemia súlyosságát, illetve a vírusürítés időtartamának hosszát (Goodman és mtsai, 2007; van de Walle és mtsai, 2009). Fontos megjegyezni azt is, hogy az emlős herpesvírusokban előforduló D₇₅₂ a neuropatogén törzsekre jellemző, viszont érdekes módon, a mi eredményeink is azt igazolták, hogy az EHV-1 fertőzésekből izolálható törzsek nagy része a nem neuropatogén genotípusba (N₇₅₂) tartozik. Különböző országokban végzett felmérő vizsgálatok kissé eltérő eredményeket hoztak, azonban abban megegyeztek, hogy az izolált törzseknek csak kisebb része tartozott neuropatogén genotípusba. Japánban ez az arány 2,7%, az USA-ban 10,8%-19,4%, Argentínában 7,4%, Németországban 10,6%, míg Franciaországban az arány elérte a 24%-ot (Tsujimura és mtsai, 2012).

Ennek oka talán az lehet, hogy a nem neuropatogén törzsek csak elvétve járnak olyan klinikai tünetekkel, amelyek elhulláshoz vezetnek, ezért ezek a törzsek nagyobb eséllyel tudnak fennmaradni a gazdaállatokban, mint egy olyan vírus, ami esetenként súlyos, az állatok pusztulásával járó tüneteket okozhat. Ehhez kapcsolódva meg kell említeni, hogy egy amerikai tanulmány érdekes tendenciát fedezett fel a neuropatogén genotípus időbeli előfordulásával kapcsolatban. 426 darab, 1951 és 2006 között izolált EHV-1 törzs ORF30 szekvenciáit elemezték, amihez allél elkülönítő real-time PCR módszert használtak. Az 1960-as években a G₂₂₅₄ törzsek aránya még csak 3,3% volt, ez a 90-es évekre 14,4%-ra nőtt. A 2000-es években (2000-2006) izolált törzsek esetében ez az arány már 19,4% volt (Smith és mtsai., 2010).

7.2.2. Az általunk kifejlesztett real-time PCR módszerrel kapott eredmények és az ebből levonható következtetések

PhD munkám kezdetén, amikor már eldöntöttük, hogy az EHV-1 vírustörzseken belül mely szakaszok lesznek azok, amelyek elemzésével a törzseinket össze fogjuk hasonlítani, ki kellett dolgoznunk az összehasonlítás módszertani alapjait. Először mi is a két genotípushoz külön TaqMan probe-ot használó allél elkülönítő real-time PCR módszert terveztük alkalmazni, azonban több olyan közlemény is megjelent, amelyek arra utaltak, hogy az egy adott génszakaszon belül előforduló SNP-k kimutatására alkalmas lehet a primer-probe energy transfer elvét használó real-time PCR módszer.

A hólyagos betegségek és számos más vírusos betegség (pl. PRRS) kórokozójának genotípusait a módszer segítségével egyszerűbben és gyorsabban el lehetett különíteni, mint az allél diszkrimináló real-time PCR módszer használatával, vagy a hagyományos PCR módszerrel felszaporított DNS-szakasz szekvenálásával. A legelső lépés annak a megállapítása volt, hogy sikerül-e egy olyan szakaszt találni, ami lefedi a 2254-es nukleotid pozíciót, illetve ezzel együtt megfelel-e azoknak a kritériumoknak, amelyek lehetővé teszik a PriProET módszer használatát. Szerencsére az adott szakasz alkalmas volt erre, ezért a primerek és probe megtervezése, illetve a rendszer optimalizálása után a módszer kiválóan használható az EHV-1 neuropatogén és nem neuropatogén genotípusainak elkülönítésére.

Az általunk kifejlesztett PriProET rendszer segítségével kimutattuk, hogy a magyarországi izolátumok között a neuropatogén genotípusba tartozók aránya 14% volt (5/35), ami jól illeszkedik a nemzetközi eredmények közé. Az öt neuropatogén izolátum közül egy 1991-ből, kettő 1998-ból, kettő 2004-ből származott, tehát sem a 70-es, sem a 80-as években izolált minták között nem fordult elő olyan, ami képes lehet idegrendszeri tüneteket okozni. Az eredményeinknél azonban figyelembe kell venni, hogy a mintáink nagy része az 1990-es és 2000-es évekből származott, így nem lehet kizárni, hogy a neuropatogén törzsek mégis előfordultak Magyarországon már az 1990-es évek előtt is.

Az egyetlen olyan izolátum (04_04), amelynél szerepeltek idegrendszeri tünetek a kórelőzményben, a PriProET módszerrel is neuropatogénnek bizonyult. Az állományban, ahonnan származott, először egy félvér kancán jelentek meg az EHV-1 fertőzés tünetei. Az állat keresztgyengeség jeleit mutatta, ezt mechanikai sérülés következményének gondolták. A ló a gyógykezelésre (gyulladáscsökkentés, fájdalomcsillapítás, vitaminok) nem reagált, és a sérülések miatt a harmadik napon leölték. Ezután még öt lovon jelentek meg olyan súlyos idegrendszeri tünetek, hogy az állatokon eutanáziát kellett végrehajtani. Ezek az állatok nem tudtak felkelni, vergődtek, a farizmok és a hátsó lábak is érzéketlenek voltak, az enyhe izomtónus megtartása mellett. Négy-öt olyan ló is akadt, amelyek enyhébb idegrendszeri tüneteket mutattak, ezek azonban nem feküdtek el. A keresztgyengeség mellett előfordult még vizeletcsorgás, és imbolygó járás is. A tünetek nagy része 2-3 hét alatt megszűnt, azonban néhány állatnál még egy év múlva is látható volt, hogy a hátsó lábak mozgása nem tökéletes. Az idegrendszeri tünetek mellett két állatban az EHV-1 fertőzés vetéléses formája

is megjelent, intézeti vizsgálatra ezekből a vetélt magzatokból küldtek mintákat. Az állományban a lovak herpesvírusai ellen nem végeztek vakcinázást a tünetek megjelenése idején. Mivel a vírusaink között nem szerepelt másik olyan izolátum, amelyik biztosan okozott idegrendszeri tüneteket a fertőzés során, ezért nem tudtunk következtetni arra, hogy van-e bármilyen eltérés az A₂₂₅₄-es és a G₂₂₅₄-es genotípusba tartozó vírustörzsek által okozott járvány lefolyása között.

Mivel a lovak 1-es típusú herpesvírusa által előidézett kórfolyamat súlyosságát többféle tényező is befolyásolhatja, ezért egy törzs neuropatogén típusba sorolása még nem feltétlenül jelenti azt, hogy az általa okozott járványban ezek a tünetek meg is jelennek. Azonban egy EHV-1 vírussal fertőzött állományban, a betegség lezajlása után izolált vírus vizsgálatával kideríthető, hogy mekkora esélye van annak, hogy a betegség reaktiválódásakor az idegrendszeri tünetek jelentkezzenek, illetve ha még az ORF68 alapján meghatározott csoport is ismert, könnyebb felderíteni az állományba behurcolt vírus származási helyét.

Érdekes kérdés az is, hogy ha egy EHV-1 törzs neuropatogenitását egyetlen nukleotid megváltozása ennyire tudja befolyásolni, akkor egy G₂₂₅₄-es (neuropatogén) genotípusba tartozó törzs megjelenése az állományban elvileg ugyanúgy létrejöhet egy nem neuropatogén törzs spontán pontmutációja után (hiszen amint látható ez a pozíció jelentős változékonyságot mutat), mint egy kívülről érkező fertőzés után. Egy lezajlott fertőzés után az EHV-1 törzsek izolálása és genotipizálása (ORF30 és ORF68 alapján is) ezért nem csak a járványtani nyomozást segítheti elő, de esetleg értékes információkat adhat arról is, hogy az idegrendszeri tünetek megjelenéséért egy, már az állományban jelen lévő törzs mutációja, vagy egy külső forrásból bekerült törzs a felelős.

7.3. Az ORF68 csoportok kialakítása és az eredményekből levonható következtetések

7.3.1. Genetikai különbségek a különböző herpesvírusok törzsei között

A különböző herpesvírusokon belül eltérő a szekvencia különbségek aránya. Például a humán cytomegalovírusok (HCMV) vírustörzsei genetikai alapon nehezen rendezhetők csoportokba, melynek oka a rekombináció relatíve magas aránya (Chou és mtsai, 1991; Zwegyberg és mtsai, 1998). Hasonlóan változékonyak a humán herpes simplex vírus-1 (HSV-1) törzsek, gyakori az intra- és intergénikus rekombináció (Sakaoka és mtsai, 1994, Norberg és mtsai, 2004;). Ezzel ellentétben a Varicella zoster vírus (VZV) genetikailag viszonylag stabil, a törzsek szekvenciáinak változékonysága tizede a HSV-nek és 40-szer kisebb, mint a HCMV izolátumoké (Muir és mtsai, 2002). A VZV törzsek esetén megfigyelhető egy földrajzi/etnikai alapú elkülönülés is, ezek között viszonylag ritka esemény a rekombináció. Az EHV-1 ebből a szempontból leginkább a VZV-re hasonlít, a két teljesen

megszekvenált labor törzs genetikai állománya mindössze 0,1%-ban különbözött, tehát a genom viszonylag stabil, kicsi az esélye a törzsek közötti rekombinációnak. Az EHV-1 abban is hasonlít a VZV-re, hogy az ORF68 eltérései alapján kialakított csoportok előfordulása nem volt egyenletes, a különböző földrajzi régiókban eltérő számban tudták izolálni az egyes csoportok tagjait.

7.3.2. A csoportok kialakítása a részben polimorf szakaszon előforduló SNP-k alapján

A régió kb. 600 bázispár hosszúságú, részben polimorf szakasza bizonyult a leginkább alkalmasnak arra, hogy az angol kutatók egy olyan marker rendszert dolgozzanak ki, amely alapján a törzseket genetikai alapon csoportokba tudták sorolni. A csoportok kialakításához a viszonyítási alapot az Ab4 törzs ORF68 szekvenciája jelentette. Az Ab4 és az ezzel megegyező szekvenciájú, és a G bázisokból álló homológ szakaszon hat, nyolc vagy kilenc G-t kódoló törzsek alkották az 1-es csoportot. A 2-es csoport tagjai ettől annyiban tértek el, hogy ezen a területen mindegyikben hét G bázist találtak, ami a többi genetikai csoportra ugyanúgy érvényes, viszont ezekben speciális, csoportspecifikus pontmutációk is előfordultak (8. táblázat). Itt kell megjegyezni, hogy egy homológ bázisokból álló génszakasz (főleg amit G vagy C bázisok alkotnak) szekvenálása problémás lehet. Az itt előforduló G bázisok számát a szekvenálás eredményeként keletkező kromatogram görbéken az egybefüggő hullám miatt nehéz meghatározni. Az már egy ideje ismert (Meindl és mtsai., 1999), hogy az Ab4 törzsben az ORF68-ról expresszáldott fehérjelánc hosszabb, mint a frameshift-et tartalmazó törzsekben (418 a 303 aminosavval szemben), viszont a többi típus létezésére (6G, 9G törzsek), ezeken a szekvenciákon kívül még nem találtak bizonyítékot.

A csoportok kialakítása során nem tudtunk egy megadott szabályrendszer szerint dolgozni, mivel nincs meghatározva az, hogy milyen kritériumok szükségesek ahhoz, hogy egy adott törzset az előforduló SNP-k alapján mikor kell már egy új csoportba sorolni. Az eredeti hat csoportban, az 1-es és 2-es kivételével mindegyikben, a 629-es pozícióban A bázis szerepel. A 4-es csoportban ezen kívül nem is találunk eltérést az Ab4 szekvenciájához képest, míg a 3-as, 5-ös és a 6-os törzsek ezen felül tartalmaznak még egyéb pontmutációkat is. Ezekben az esetekben a csoportosítás alapja csupán annyi volt, hogy akár egy nukleotid bázis eltérése alapján is, az adott izolátum már egy új csoportba került.

A saját mintáink szekvenálása után a 35 magyarországi izolátumból csak 23 volt, amit a pontmutációik alapján a Nugent és mtsai (2006) által leírt hat genetikai csoport valamelyikébe be tudtunk sorolni. Öt-öt izolátum esetében egyértelmű volt, hogy új csoportokat kell kialakítanunk, hiszen ezek a vírustörzsek olyan SNP-eket tartalmaztak, amelyek nem fordultak elő egyik eddig ismert csoportban sem. Viszont azokban a

nukleotidpozíciókban, ahol a 7-es csoport SNP-i előfordultak (C₇₁₀, A₇₁₉), két másik csoportban is előfordultak pontmutációk (3-as csoport: T₇₁₉; 5-ös, 9-es, 10-es csoport: G₇₁₀). Ezekből a törzsekből alakítottuk ki az új 7-es és 8-as csoportot. A 83_01 kódjelű törzs szekvenciája nagyon hasonlított az 5-ös csoport tagjaira, viszont hiányzott a 629-es pozícióban található pontmutáció, illetve a 436-os nukleotid az összes többi törzssel ellentétben A helyett C bázist tartalmazott. A Nugent és mtsai által alkalmazott rendszer szerint (mivel két bázisban is eltért a hozzá legjobban hasonlító 5-ös csoport tagjaitól) külön csoportba került, ez a törzs alkotta az újonnan létrehozott 9-es csoportot.

A 04_04 kódjelű törzs szekvenálása után teljesen egyedi pontmutációkat találtunk. Az izolátum tartalmazott ugyan az 5-ös csoport tagjaival megegyező pontmutációkat (G₇₁₀, A₇₁₃), viszont három nukleotid pozícióban megjelentek olyan változások, amelyeket eddig még nem figyeltek meg EHV-1 vírustörzsekben. Mindhárom olyan helyen volt, ahol eddig egyik izolátumban sem fordult elő mutáció (A₅₆₁, T₆₂₈, C₇₄₁). A többi csoport tagjaitól teljesen eltérő pontmutációk indokolták azt, hogy az általunk létrehozott 10-es csoport mindössze egy tagból, a 04_04-es kódjelű izolátumból áll. A törzsek genetikai vizsgálata után vettük fel a kapcsolatot a telepet kezelő állatorvossal, aki beszámolt arról, hogy a fertőzés kezdetén elsősorban idegrendszeri tünetek jelentkeztek az állományban (az ORF30 szakasz vizsgálata ezt genetikailag is alátámasztotta), majd megjelentek a vetélések is a vemhes kancák között.

Az állományba a telepet kezelő állatorvos szerint a betegség felbukkanása előtt fél évvel vemhes kancák érkeztek az állományba, amelyek karanténozás nélkül, közvetlenül a kancaistállóba kerültek. Az új állatok állományba kerülése valószínűleg az eddig latenciában nyugvó vírust reaktiválta, és beindította az állomány újboli fertőződését. A kancaistállóban tartottak egy zebramént is, ami négy évvel az idegrendszeri tünetek megjelenése előtt került az állományba, egy cirkuszos család tulajdonából. Ez a járványkitörés alatt nem mutatta a betegség tüneteit. Sajnos az EHV-1 törzsek genetikai elemzése idején az állat már nem élt, ezért további vizsgálatokat nem tudtunk végezni.

A kancákkal együtt tartott zebramén azért vált érdekessé a vizsgálataink során, mert az ORF68 részben polimorf szakaszán előforduló három, eddig nem ismert SNP megtalálható három olyan EHV-1 törzsben is, amelyek egy zebrából, egy Thomson-gazellából, illetve egy onagerből származtak (Ghanem és mtsai, 2008). Érdekes módon a nem ló eredetű három törzs megegyezett abban, hogy rövidebb-hosszabb szakaszokon deléciók vannak az ORF68 régióban, amik viszont teljesen hiányoztak a lovakból izolált törzsekből, így a 04_04 kódjelű törzsből is. Ezen kívül mindhárom, nem ló eredetű törzs tartalmazott több olyan pontmutációt is, amelyek szintén hiányoztak a magyarországi izolátumból. A 04_04-es törzsben megjelenő „zebra-eredetű” SNP-k előfordulására az egyik lehetséges magyarázat az lehet, hogy az állományban perzisztáló ló eredetű EHV-1 törzs néhány helyen rekombinálódott a zebra

eredetű EHV-1 törzssel, és ezért jelentek meg a kizárólag zebra eredetű törzsekre jellemző pontmutációk. Ennek a bizonyítása azonban még további vizsgálatokat igényel.

A csoportok genetikai elemzése után felállított törzsfán jól látható, hogy melyek azok a csoportok, amelyek egymással szorosabb rokonságban állnak. A törzsek összehasonlításának alapja az Ab4 törzs ORF68 régiójának polimorf szakasza, ezért a csoportspecifikus szekvencia eltérések csak viszonylagosak és azt jelentik, hogy egy vizsgált izolátum milyen mértékben és hol tér el a viszonyítási alapnak tekintett törzstől.

Ez elsősorban azért alakult így, mert az Ab4 volt az első olyan törzs, amelynek ismertté vált a teljes genom szekvenciája, így az ezután vizsgált törzsek genomjának felépítését ehhez tudták hasonlítani. Ha megnézzük a felállított törzsfát, azt látjuk, hogy a csoportokat többé-kevésbé három nagyobb egységbe tudjuk rendezni, az egyik egység tartalmazza az 1-es, 2-es, és az ezekkel szoros rokonságban levő 8-as csoportot, ettől egy kicsit távolabb van a törzsfán, de még viszonylag hasonló a 7-es csoport szekvenciája. Egy külön ágat képviselnek a 3-as, 4-es és 6-os csoport tagjai, amelyekben közös elem a 629-es pozícióban előforduló mutáció (A₆₂₉).

Egy önálló ágon találjuk az 5-ös, 9-es és 10-es csoportokat. Érdekes módon az eredeti hat csoport közül az 5-ös volt az egyetlen, mely a törzsfán ennyire messze került a viszonyítási alapnak tekintett Ab4-től, és a hozzá hasonlító csoportoktól (1-es és 2-es). Az ezekre jellemző G₇₁₀ és A₇₁₃ a Magyarországon izolált törzsek közül csak kettőben fordult elő, ami viszont meglepő, hogy az angol kutatók tanulmányában a RacH vakcinatörzsen kívül, csak Észak-Amerikából származó törzsek szerepeltek, így ezek a törzsek nagy valószínűség szerint külföldről behurcolt törzsek lehettek, vagy egyéb úton (vakcinák) kerültek be az országba.

A törzsfá alapján valószínűsíthetjük, hogy a lóállományokban fertőzést okozó törzsek genetikai állománya változatosabb, mint amilyenek először gondolták. Annak oka, hogy az izolátumok ORF68 szekvenciái szerint a csoportok nagyobb egységekbe rendezhetők, az lehet, hogy a régebben kialakult mutációk később újabb mutációkkal egészültek ki, illetve a lóállományokban perzisztens formában jelenlévő kórokozók az állományba bekerült új törzsekkel rekombinálódhattak, így újabb és újabb csoportok alakultak ki. Ezt az is igazolhatja, hogy vannak olyan pontmutációk, amelyek több csoportban is megjelennek, és ezek mellett találjuk meg azokat a csoportspecifikus változásokat, amelyek csak egy-egy csoportra jellemzők.

Ehhez kapcsolódik a csoportok kialakításának problémája, aminek szabályszerűségeit sajnos nem találjuk meg a Nugent és mtsai (2006) által leközölt tanulmányban. Mivel új csoportok kialakításához elegendő egy új SNP megjelenése, ez később ahhoz vezethet, hogy az egyre nagyobb számban megvizsgált izolátumokban újabb és újabb pontmutációkat találunk, ami egy idő után a rendszerezést teljesen lehetetlenné teszi. Véleményem szerint

szerecséesebb volna a több mostani csoportban közös SNP-k alapján nagyobb létszámú csoportokat kialakítani, így talán a később talált újabb mutációk sem tudják a csoportok számát annyira felduzzasztani, hogy a csoport alapú rendszer használhatatlanná váljon.

7.3.3. Szabályszerűségek a különböző csoportokba tartozó törzsek földrajzi és időbeli elterjedésében

Nugent és mtsai a saját izolátumaik ORF68 régióinak elemzésekor arra figyeltek fel, hogy az SNP-k alapján kialakított genetikai csoportok tagjai eltérő valószínűséggel fordultak elő bizonyos földrajzi régiókban. Például az 5-ös csoport tagjai főleg észak-amerikai, míg a 3-as és 4-es csoport tagjai elsősorban európai járványkitörésekből származtak. A rendelkezésre álló izolátumok származási helyét, mint földrészt vették figyelembe, országokon belüli eloszlást nem vizsgálták. Ezek az adatok valószínűleg nem is álltak rendelkezésükre.

A magyarországi izolátumok származási helye települések szerint is ismert volt, ezért a csoportok eloszlását nagyobb felbontásban tudtuk összehasonlítani. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy egy adott törzshöz tartozó származási hely nem feltétlenül jelenti azt, hogy az a törzs Magyarországon kizárólag abban az állományban fordul elő, hiszen amint látni fogjuk, vannak törzsek, amelyek egy adott régióon belül több ménesben is felbukkantak. A másik eltérés, hogy amint azt később megállapítottuk, voltak olyan törzsek is, amelyek nagy valószínűség szerint külföldi eredetűek. Mivel a vizsgálataink során nem tudtuk az 1977 és 2008 közötti időszakban Magyarországon járványt okozó összes EHV-1 törzset analizálni, ezért az eredményeinkből inkább csak tendenciákra tudunk következtetni.

A magyarországi minták elemzése során kapott eredményeink több ponton is eltérnek a Nugent és mtsai (2006) által kapott eredményektől. Az angol kutatók által begyűjtött és megvizsgált izolátumok legnagyobb része a 2-es és 3-as csoport tagja volt (2-es csoport: 36/104 izolátum, 3-as csoport: 34/104 izolátum), ebbe a két csoportba tartozott a vizsgált vírusok 67,3%-a. Az 1-es csoportba tartozó törzsek szekvenciái teljesen megegyeztek a 2-es csoport tagjaival, kivéve azt az egyetlen különbséget, hogy a homológ, G bázisokból álló szakaszon nem hét G bázist kódoltak, hanem hatot, nyolcat vagy kilencet, bár az adott szakasz szekvenálási nehézségeiről már ejtettem szót. A 2-es és 3-as csoport szinte ugyanannyi tagot számlált, viszont egy jelentős különbség mégis akadt közöttük. A 2-es csoport tagjainak kicsit több mint a fele származott az USA-ból (19/36 izolátum), és csak nyolc izolátum volt európai eredetű, míg a 3-as csoport esetén ez az arány fordított volt, a 34 törzsből 29-et Európában izoláltak, és csak négy származott az Egyesült Államokból.

Eredményeink annyiban hasonlítottak ehhez, hogy a Magyarországon izolált vírusok legnagyobb részét szintén a 2-es csoportba tudtuk besorolni (14/35 izolátum). Különbség viszont, hogy az angol kutatók cikkében ez volt az a csoport, ami főleg az USA-ból származó

izolátumokból állt, és csak kevesebb, mint negyede volt európai eredetű. Érdekes módon a főleg európai izolátumokból álló 3-as csoportnak a mi esetünkben csak hat tagja volt (ami kevesebb, mint fele a 2-es csoport tagjainak), de még így is ez volt a második legnagyobb csoport. A megvizsgált izolátumaink közül végül nem akadt olyan, amit az 1-es vagy a 6-os csoportba tudtunk volna sorolni. Az 5-ös csoport ezektől annyiban tért el, hogy az EHV-1 fertőzésből származó izolátumok közül ugyan egy sem tartozott ide, viszont mindkét laboratóriumi törzs (ARMY 183, RacH) olyan csoportspecifikus szekvenciákat tartalmazott a vizsgált szakaszon, ami erre a csoportra jellemző. Érdekes még az is, hogy az általuk szekvenált másik vakcinatörzs (a Rhinoquin vakcina víruskomponense) szintén az 5-ös csoportra jellemző SNP-eket kódolt.

Ehhez kapcsolódik az a feltevésünk, hogy mivel a 9-es és 10-es csoportba tartozó két magyarországi izolátum (83_01, 04_04) szoros rokonságot mutatott az 5-ös csoportba tartozó vírusokkal, ezek esetleg valamilyen vakcinatörzs mutációja, vagy észak-amerikai törzsek behurcolása után jelenhettek meg a magyarországi lóállományokban. A két izolátum ugyan több pontmutációban is különbözött egymástól (az ORF30 szakasz alapján a 83_01 a nem neuropatogén, míg a 04_04 a neuropatogén genotípusba tartozott), illetve az izolálásuk időpontjai között is majdnem 20 év telt el, a 35 izolátum közül csak ez a kettő volt az, amelyik tartalmazott az 5-ös csoportra jellemző specifikus mutációkat (G₇₁₀, A₇₁₉).

Ahogy arról az irodalmi összefoglalóban már volt szó, hazánkban az 1980-as évektől használtak élő vírust tartalmazó vakcinákat az EHV-1 elleni védekezésben. A 90-es évek végéig kapható Prevaccinol vakcinában és a különböző laboratóriumokban előállított „telepspecifikus” vakcinákban is a RacH törzset használták. Érdekes viszont, hogy annak ellenére, hogy Magyarországon is széles körben használtak attenuált, élő vírusos vakcinákat a betegség megelőzésére, a 35 megvizsgált törzsből egyedül ezt a két, vetélésből származó izolátumot (83_01, 04_04) lehetett kapcsolatba hozni a vakcinatörzsekkel. A mieinkhez hasonló eredményeket kapott Pálfi és Christensen (1995) is 25, dániai eredetű EHV-1 izolátum genetikai vizsgálata után. Négy, vetélésekből származó vírusban a restrikciós enzimekkel történő emésztés után olyan genetikai markereket találtak, amelyek a RacH vakcinatörzsre jellemzőek. Ezek szerint az élő, attenuált vírust tartalmazó vakcinákból származó EHV-1 vírustörzsek cirkulálhatnak a lóállományok között, sőt ezek akár vetélésekből is izolálhatók.

Hozzá kell azonban tennünk, hogy a két magyarországi izolátum szekvenciája az ORF68-as szakaszon nem egyezett meg teljesen a RacH szekvenciájával, így nem lehet biztosan kijelenteni azt, hogy vakcinatörzsekről van szó, azonban a két izolátumban előforduló, 5-ös csoportra jellemző két SNP azt valószínűsíti, hogy ezek a törzsek vagy élő vírusos vakcinatörzsekkel, vagy behurcolt, észak-amerikai törzsekkel állnak kapcsolatban.

A legnagyobb, összesen 14 tagot számláló 2-es csoport tagjai szinte az egész 30 éves időszak alatt okoztak járványos vetéléseket. Jellemző rájuk az is, hogy annak ellenére, hogy nagy létszámú csoportról van szó, egy kivételével az ország középső részén, egy kb. 150 km-es átmérőjű körön belül fordultak elő. Mivel ez az egyik olyan csoport, amelybe a legtöbb, járványból származó EHV-1 izolátum tartozik, ezért ezek azok, amelyeket a legnehezebb nyomon követni. Ezt könnyítheti meg az, ha az adott területen cirkuláló, esetleg perzisztensen jelen levő EHV-1 törzsek ORF68 és ORF30 szekvenciái ismertté válnak. Így az állatok mozgatása révén fertőződő állományokba bekerülő vírusok származási helye könnyebben kideríthető.

Az ORF30 elemzése során szinte csak a 2-es csoportban találtunk neuropatogén izolátumokat, ami valószínűleg azzal is összefügg, hogy ez a legnagyobb létszámú csoport. Ez viszont azt is jelzi, hogy nagy valószínűséggel erre nem jellemző az, ami a később szóba kerülő 7-es és 8-as csoportra, miszerint a csoportba tartozó több izolátum különböző időben és más településeken történő megjelenése valószínűleg ugyanannak az egy vírustörzsnek a felbukkanását jelenti. Kivétel ez alól két olyan, egy évből és egy településről származó izolátum (98_04, 98_05), amelyek még abban is megegyeznek, hogy az ORF30 szekvenciáik alapján mindkettő a neuropatogén csoportba tartozik. Ezért a két izolátum valószínűleg ugyanazt a törzset jelenti, amely egy településen belül két lótarató állataiban is vetélést tudott okozni. Ugyanez mondható el a 4-es csoport két tagjáról is, a 07_01 és 07_02-es kódszámú izolátumokról, a két minta valószínűleg ebben az esetben is egy vírustörzset takar. A 4-es csoportba ezen kívül csak egy izolátumot tudtunk besorolni, ez 17 évvel korábbról, 1990-ből származik.

A 7-es csoporttal kapcsolatban meg kell jegyeznünk, hogy ez volt az egyetlen, amelynek a tagjairól tudjuk, hogy valószínűleg külföldi eredetűek (Pálfi Vilmos személyes közlése). A csoportba tartozó izolátumok, amint az a 6. ábrán is látható, egy viszonylag körülírt területen, két évben (1978, 1982) bukkantak fel. Az 1978-as járványban összesen három minta került beküldésre, egy közös helyről, Dióspusztáról. Ez a Bábolnai Állami Gazdasághoz tartozó egyik ménes volt, értékes tenyészállatokat tartottak itt. 1978-ban egy külföldi lószállítmány (Szerbiából szállítottak lovakat Németországba) egynapos pihenője során fertőződhetek a magyar lovak. A vetelési hullámot valószínűleg az állományba bekerülő új törzs váltotta ki, ebből a járványból származtak azok a minták, amelyek végül az akkori az Állategészségügyi Intézetbe kerültek. A ménesben lezajlott vetélések után a járvány megnyugodott, de az állatokban a 7-es csoportot alkotó EHV-1 vírustörzs perzisztens állapotban továbbra is jelen volt. A törzs legközelebb 1982-ben okozott vetélést, szintén a Bábolnai Állami Gazdasághoz tartozó bábolnai ménesben, illetve egy kicsit később, még egyszer ugyanabban az évben Kerteskőn. Ezután ebbe a csoportba tartozó EHV-1 törzset nem sikerült izolálnunk, annak ellenére, hogy egy másik olyan minta is szerepelt a vizsgálataink között, amelyik Bábolnáról

származik. Ezt 2004-ben küldték be intézeti vizsgálatra, viszont ez már a 8-as csoport specifikus SNP-it kódolta.

Érdekes, hogy a 8-as csoportba tartozó törzsek előfordulása térben és időben is sokkal változatosabb, mint a 7-es csoport tagjaié. Amint az a 6. táblázatban látható, a 8-as csoportba tartozó izolátumok egy kb. 10 éves időszakban fordultak csak elő, 1997 és 2006 között. A csoportspecifikus mutációt kódoló törzs először az ország délkeleti részén, a mezőhegyesi ménesben jelent meg, majd valószínűleg ugyanez 1998-ban újra felbukkant, szintén ugyanitt. Ugyanebben az évben megjelent Abán is, majd egészen 2004-ig nem sikerült olyan EHV-1 vírust izolálnunk, amelyben a csoportra jellemző SNP-k megjelentek. Ezután valamilyen módon a vírustörzs (vagy egy vele közeli rokonságban álló törzs) eljutott Bábolnára. A 8-as csoportba tartozó izolátumok utolsó felbukkanása 2006-ban történt, Lajosmizsén. Érdekes, hogy ugyanebben az évben Mezőhegyesről is érkezett egy minta az intézetbe, viszont az izolátum ORF68 régiójának elemzése után kiderült, hogy ez a 3-as csoportba tartozik.

Jól látható, hogy elég nagy időintervallumok vannak a csoportba tartozó izolátumok felbukkanásai között, és a beküldött minták az ország távoli régióiból származtak. Ezzel együtt a 8-as csoportra jellemző pontmutáció nagyon egyedi (G_{426}), ebben a pozícióban csak ebben a csoportban fordult elő az egyedi nukleotid polimorfizmus. Ezért valószínű, hogy a járványokat ugyanaz a törzs okozta, kisebb-nagyobb időbeli és térbeli eltérésekkel. Ezt az is igazolhatja, hogy ugyan csak hat izolátum tartozik ebbe a csoportba, viszont az ORF30 alapján meghatározott genotípusuk is megegyezik.

Ha megnézzük azt, hogy a rendszerváltás előtt és után vannak-e különbségek a csoportok előfordulásában, akkor kiderül, hogy az 1989 előtt izolált törzseket csak a 2-es, 7-es és 9-es csoportokban találunk. Ha figyelembe vesszük azt, hogy a 7-es csoportot alkotó törzsek valószínűleg csak rövid ideig és egy állami gazdaság ménesein belül cirkuláltak, akkor látható, hogy az EHV-1 törzsek genetikai változatossága sokkal kisebb volt a 70-es és 80-as években, mint a későbbiekben. Ennek oka valószínűleg az lehet, hogy a rendszerváltás előtt jóval zártabb körülmények között folyt a lovak tartása és tenyésztése Magyarországon, ezért kisebb volt az esély arra, hogy az országban új, itt még nem cirkuláló vírustörzsek megjelenjenek.

A lótartásra jellemző, hogy az állatok egy része folyamatosan mozgásban van, ezért az általuk hordozott EHV-1 vírustörzseknek sokkal nagyobb az esélye arra, hogy egy másik állatállomány egyedeit megfertőzzék, mint a jellemzően egy adott helyen tartott egyéb gazdasági haszonállatoknak. Ezért egy adott izolátum esetén nem csak a származási helynek van jelentősége, hiszen az izolátumok földrajzi elterjedéséből levonható következtetések elsősorban tendenciákat jelentenek, illetve egy nagyon jellemző csoportspecifikus pontmutáció esetén abban segítenek, hogy a csoportba tartozó törzsek

mozgását nyomon tudjuk követni. Valószínű tehát, hogy az egyes izolátumokhoz tartozó származási helyek nem az adott csoport statikus előfordulási helyét, hanem az előfordulási területen (egy országban, vagy országok között) zajló cirkuláció egyik állomását jelentik.

Meg kell jegyeznünk azt is, hogy a mintáink nagy része elsősorban állami gazdaságokból és nagyobb ménesekből származott, ezért a minta beküldések nem fedték le az egész ország területét. Így nem tudjuk biztosan kijelenteni azt, hogy egy adott csoportba tartozó izolátumok az ország bizonyos területein nem bukkanhatnak fel, viszont érdekes, hogy bizonyos csoportok tagjai csak korlátozott ideig és korlátozott területen fordultak elő, míg voltak olyan csoportok, amelyek szinte az egész 30 éves időszak alatt jelen voltak.

8. ÚJ EREDMÉNYEK

A vizsgálataink előtt feltett kérdésekre az eredményeink elemzése után a következő válaszokat tudtam adni:

1. A 35 magyarországi izolátumból összesen 5 tartalmazta azt az egyedi nukleotid polimorfizmust, ami a neuropatogén genotípusba tartozó törzsekre jellemző, ez a megvizsgált izolátumok 14%-át jelenti.
2. A 04_04 kódjelű izolátum, amelynek kórelőzményében szerepeltek neurológia tünetek az ORF30 szakasz 2254-es nukleotid pozíciójában guanin bázist kódol, így a neuropatogén genotípusba tartozik.
3. Kifejlesztettünk egy primer-probe energiaátvitelen (PriProET) alapuló új, egyszerű, gyors és specifikus módszert, amivel a neuropatogén és nem neuropatogén genotípusba tartozó törzseket el lehet különíteni
4. Kidolgoztunk egy új, saját módszert az EHV-1 genom ORF68-as szakaszán előforduló pontmutációk vizsgálatára. Ennek segítségével meghatároztuk, hogy a magyarországi EHV-1 izolátumok között az előzőleg kialakított csoportok milyen arányban fordulnak elő. A 35 izolátumból 12 eddig le nem írt pontmutációkat tartalmazott, ezekből az eddigi hat mellé négy új csoportot tudtunk kialakítani.
5. Mivel a vizsgálatainkban nem szerepelt az összes, az elmúlt 30 évben Magyarországon izolált EHV-1 törzs, ezért az izolátumok származási helye az adott törzs Magyarországon belüli mozgásának egy-egy állomását jelenti. Az általunk vizsgált genetikai markerek segítségével nem annyira a bizonyos csoportokba tartozó törzsek állandó előfordulási helyéről tudunk információt szerezni, hanem egy adott területen cirkuláló törzsek nyomon követését lehet elvégezni.
6. Az ORF30 és ORF68-as szakaszon előforduló pontmutációk meghatározása és nyilvántartása elsősorban az EHV-1 járványok lezajlása után elvégzett járványtani nyomozást segítheti. Minél több genetikai markert ismerünk egy adott EHV-1 izolátum örökítőanyagában, annál könnyebb lesz az állományban fertőzést okozó törzs azonosítása, és származási helyének meghatározása.

7. A Rach vakcinatörzs nukleotid szekvenciája az ORF30 neuropatogenitást befolyásoló szakaszán eltért az összes többi izolátumtól és laboratóriumi EHV-1 törzstől, amit a módszerünk részeként elvégzett olvadáspont analízis is igazolt, ugyanis az ehhez a törzshöz tartozó görbe a két genotípus olvadáspont görbéi között helyezkedett el.

8. Megállapítottuk, hogy a 04_04-es jelzésű izolátum olyan nukleotid szekvenciákat tartalmaz, amelyek csak zebra, onager, vagy Thomson-gazella eredetű EHV-1 vírusokban fordulnak elő, viszont az ezekre a törzsekre jellemző specifikus eltérések nagy része hiányzik. Annak tisztázása, hogy ebben az esetben a zebra eredetű pontmutációk hogyan lehetnek jelen egy ló eredetű EHV-1 törzs genomjában, további vizsgálatokat igényel.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Allen, G.P., Yeargan, M.R., Turtinen, L.W., Bryans, J.T., McCollum, W.H. 1983. Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 44, 263-271.

Allen, G.P., Bryans, J.T. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2, 78-144.

Allen, G.P., Kydd, J.H., Slater, J.D., Smith, K.C. 2004. Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections In: Coetzer, J.A.W., Tustin R.C. (eds): *Infectious Diseases of Livestock*, 1st ed. Newmarket: Oxford University Press 829-859.

Allen, G.P. 2007. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 69-72.

Bálint, Á., Tenk, M., Deim, Z., Rasmussen, T.B., Uttenthal, Å., Cságola, A., Tuboly, T., Farsang, A., Fossum, C., Timmusk, S., Berg, M., Belák, S. 2009. Development of primer-probe energy transfer real-time PCR for the detection and quantification of porcine circovirus type 2. *Acta. Vet. Hung.* 3, 441-452.

Balka, G., Hornyák, Á., Bálint, Á., Benyeda, Z., Rusvai, M. 2009. 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. *J. Virol. Methods* 158, 441-445.

Bass, E.P. 1978. Immunization with a modified live virus equine rhinopneumonitis vaccine and an aluminum hydroxide absorbed equine influenza vaccine. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 24, 65-74.

Belak, S., Palfi, V., Tuboly, S., Bartha, L. 1980. Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2. *Zentralbl. Vet. Med. B.* 27, 826-830.

Breeden, C.A., Yalamanchili, R.R., Colle, C.F., O'Callaghan, D.J. 1992. Identification and transcriptional mapping of genes encoded at the IR/Us junction of equine herpesvirus type 1. *Virology* 191, 649-660.

- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193
- Bürki F, Rossmanith W, Nowotny N, Pallan C, Möstl K, Lussy H. 1990. Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet. Q.* 12, 80-86.
- Carvalho, R., Passos, L.M.F., Martins, A.S. 2000. Development of a differential multiplex PCR assay for equine herpesvirus 1 and 4 as a diagnostic tool. *J. Vet. Med.* 47, 351-359.
- Chakrabarti, R., Schutt, C.E. 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene* 274, 293-298.
- Chou, S.W., Dennison, K. M. 1991. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J. Infect. Dis.* 163, 1229-1234.
- Colle, C.F., O'Callaghan, D.J. 1995. Transcriptional analyses of the unique short segment of EHV-1 strain Kentucky A. *Virus Genes* 9, 257-268.
- Collinson, P.N., O'Reilly, J.L., Ficorilli, N., Studdert, M.J. 1994. Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gamma herpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 329-331.
- Crandell, R. A., Ichimura, H., Kit, S. (1988): Isolation and comparative restriction endonuclease DNA fingerprinting of equine herpesvirus-1 from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1807-1813.
- Cutler, T.J. 2004. Corneal epithelial disease. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 20, 319-343.
- Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L., Rodwell, B.J., Corney, B.G. 2006. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 131, 92-98.
- Doll, E.R., Wallace, M.E. 1954. Cultivation of equine abortion and equine influenza viruses on the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Cornell Vet.* 44, 453-461.
- Edington, N., Bridges, C.G., Huckle, A., 1985. Experimental reactivation of equine herpesvirus 1 (EHV-1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet. J.* 17, 369-372.

- Edington, N., Bridges, C.G., Patel, J.R. 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch. Virol.* 90, 111-124.
- Edington, N., Smyth, B., Griffiths, L. 1991. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *J. Comp. Pathol.* 104, 379-387.
- Ghanem, Y. M., Fukushi, H., Ibrahim, E.S., Ohya, K., Yamaguchi, T., Kennedy, M. 2008. Molecular phylogeny of equine herpesvirus 1 isolates from onager, zebra and Thomson's gazelle. *Arch. Virol.* 153, 2297-2302.
- Gibson, J.S., Slater, J.D., Awan, A.R., Field, H.J. 1992. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen- free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch. Virol.* 123, 351-366.
- Gilkerson, J.R., Love, D.N., Drummer, H.E., Studdert, M.J., Whalley, J.M. 1998. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in thoroughbred foals before and after weaning. *Aust. Vet. J.* 76, 677-682.
- Glávits, R., Molnár, T., Pálfi, V. 1984. A lovak rhinopneuminitis-vírus okozta vetélésével kapcsolatos megfigyelések. *Magy. Állatorv. Lapja* 39, 361-365.
- Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palù, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N. 2007. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* 11, e160
- Greenwood, R.E.S., Simpson, A.R.B., 1980. Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Vet. J.* 12, 113-117.
- Gunn, H. M. 1992. A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.* 44, 37-40.
- Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belák, S., Widén, F. 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and primer-probe energy transfer. *J. Virol. Methods* 146, 226-235.

- Hakhverdyan, M., Rasmussen, T.B., Thorén, P., Uttenthal, A., and Belák, S. 2006. Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Arch. Virol.* 151, 2365-2376.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Heerkens, T.M.J. 2009. Equine herpesvirus-1, non-neurogenic pathotype, in a 9-year old American Saddlebred with neurological signs. *Can. Vet. J.* 50, 297-300.
- Hornyák, A., Bakonyi, T., Kulik, M., Kecskeméti, S., Rusvai, M. 2006. Application of polymerase chain reaction and virus isolation techniques for the detection of viruses in aborted and newborn foals. *Acta Vet. Hung.* 54, 271-279.
- Huang, J.A., Ficorilli, N., Hartley, C.A., Allen, G.P., Studdert, M.J. 2002. Polymorphism of open reading frame 71 of equine herpesvirus 4 (EHV-4) and EHV-1. *J. Gen. Virol.* 83, 525-531.
- Jackson, T.A., Kendrick, J.W. 1971. Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 158, 1351-1357.
- Kapp, P. 1973. Rhinopneumonitis során elvetélt csikómagzatok májának ultrastrukturális elváltozásai. *Magy. Állatorv. Lapja* 28, 241-247.
- Kershaw, O., von Oppen, T., Glitz, F., Deegen, E., Ludwig, H., Borchers, K. 2001. Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus. Res.* 80, 93-99.
- Kirisawa, R., Ohmori, H., Iwai, H., Kawakami, Y. 1993. The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. *Arch. Virol.* 129, 11-22.
- Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J., Mumford, J.A. 1994. Distribution of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: Implications for cellular immunity. *Equine Vet. J.* 26, 470-473.
- Malik, P., Palfi, V., Balint, A., 2010. Development of a new primer-probe energy transfer method for the differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Virol. Methods.* 169, 425-427.
- Manninger, R., Csontos, J. 1941. Virusabortus des Stuten. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 49, 105-108.

Mayr, A., Pette, J., Petzold, K., Wagener, K. 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. Zentralbl. Vet. Med. B. 15, 406-418.

Meindl, A., Osterrieder, N. 1999. The equine herpesvirus 1 US2 homolog encodes a nonessential membrane-associated virion component. J. Virol. 73, 3430-3437.

Miller, T.R., Gaskin, J.M., Whitley, R.D., Wittcoff, M.L. 1990. Herpetic keratitis in a horse. Equine Vet. J. 17, 15-17.

Minke, J.M., Audonnet, J.-C., Fischer, L., 2004. Equine viral vaccines: the past, present and future. Vet. Res. 35, 425-443.

Muir, W. B., Nichols, R., Breuer, J. 2002. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. J. Virol. 76, 1971-1979.

Murray, M.J., Eichorn, E.S., Dubovi, E.J., Ley, W.B., Cavey, D.M. 1996. Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. Equine Vet. J. 28, 432-436.

Norberg, P., Bergstrom, T., Rekadbar, E., Lindh, M., Liljeqvist, J.-A. 2004. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. J. Virol. 78, 10755-10764.

Nordengrahn, A., Merza, M., Ros, C., Lindholm, A., Palfi V., Hannant, D., Belák S. 2002. Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. Vet. Res. 33, 251-259.

Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N. 2006. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. J. Virol. 80, 4047-4060.

Office International des Epizooties (OIE) Chapter 2.5.9., Equine Rhinopneumonitis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6. Edition, OIE, Paris, France, 2008. (http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_summry.htm)

Ostlund, E.N., 1993. The equine herpesviruses. Veterinary Clinics of North America. Equine Prac. 9, 283-294

Palfi, V., Belak, S., Molnár, T. 1978. Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zentralbl. Vet. Med. B.* 25, 165-167.

Palfi, V., Christensen, L.S. 1995. Analyses of restriction fragment patterns (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) strains circulating in Danish horses. *Vet. Microbiol.* 47, 199-204.

Pignatelli, S., Dal Monte, P., Landini, M.P. 2001. gpUL73 (gN) genomic variants of human cytomegalovirus isolates are clustered into four distinct genotypes. *J. Gen. Virol.* 82, 2777-2784.

Rasmussen, T.B., Uttenthal, A., de Stricker, K., Belák S., Storgaard, T. 2003. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of Foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 148, 2005-2021.

Rasmussen, T.B., Uttenthal, Å., Fernández, J., Storgaard, T. 2005. Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of Indiana and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 356-362.

Rebhun, W.C., Jenkins, D.H., Riis, R.C., Dill, S.G., Dubovi, E.J., Torres, A. 1988. An epizootic of blindness and encephalitis associated with a herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus I in a herd of alpacas and llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 953-956.

Rusvai, M., Kucsera, L., Pálfi, V. 1996. A vírusos eredetű lóbetegségek hazai előfordulása, a védekezés főbb szempontjai. *Magy. Állatorv. Lapja*, 51, 499-503.

Sakaoka, H., Kurita, K., Iida, Y., Takada, S., Umene, K., Kim, Y.T., Ren, C.S., Nahmias, A.J. 1994. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J. Gen. Virol.* 75, 513-527.

Sályi, Gy. 1941. Adatok a kancák járványos elvetelésének kórszövettanához. *Közlemények az összehasonlító élet- és kórtan köréből.* 29, 98-109.

Scott, J.C., Dutta, S.K., Myrup, A.C. 1983. In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1344-1348.

Seki, Y., Seimiya, Y.M., Yaegashi, G., Kumagai, S., Sentsui, H., Nishimori, T., Ishihara, R. 2004. Occurrence of equine coital exanthema in pastured draft horses and isolation of equine herpesvirus 3 from progenital lesions. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1503-1508.

Slater, J.D., Gibson, J.S., Field, H.J. 1993 Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. *J Gen. Virol.* 74, 819-828.

Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M., Field, H.J. 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* 75, 2007-2016.

Smith, K.C., Whitwell, K.E., Binns, M.M., Dolby, C.A., Hannant, D., Mumford, J.A. 1992. Abortion of virologically negative fetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with Equid herpesvirus 1. *Equine Vet. J.* 24, 256-259.

Smith, K.L., Allen, G.P., Branscum, A.J., Cook, R.F., Vickers, M.L., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B.R. 2010. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet. Microbiol.* 141, 5-11.

Stierstorfer, B., Eichhorn, W., Schmahl, W., Brandmüller, C., Kaaden, O.-R., Neubauer, A. 2002. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report. *J. Vet. Med.* 49, 37-41.

Studdert, M.J., Simpson, T., Roizman, B. 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, 214, 562-564.

Studdert, M.J., Fitzpatrick, D.R., Horner, G.W., Westbury, H.A., Gleeson, L.J. 1984. Molecular epidemiology and pathogenesis of some equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates. *Aust. Vet. J.* 61, 345-348.

Sutton, G.A., Viel, L., Carman, P.S., Boag, B.L. 1998. Pathogenesis and clinical signs of equine herpesvirus-1 in experimentally infected ponies in vivo. *Can. J. Vet. Res.* 62, 49-55.

Szeredi, L., Aupperle, H., Szeiger, K. 2003a. Detection of equine herpesvirus-1 in the fetal membranes of aborted equine fetuses by immunohistochemical and in-situ hybridization techniques. *J. Comp. Path.* 129, 147-153.

- Szeredi, L., Pálfi, V., Molnár, T. 2003b. Comparison of methods for the diagnosis of equine herpesvirus type 1 infection. *Acta Vet. Hung.* 51, 153-163.
- Szeredi, L. 2004. Kanca equine herpesvirus 1 (EHV-1) okozta vetélése: kórfejlődés, kórbonctani és kórszövettani elváltozások, valamint az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei. *Magy. Állatorv. Lapja* 126, 259-268.
- Szeredi, L., Tenk, M., Jánosi, S., Pálfi, V., Hotzel, H., Sachse, K., Pospischil, A., Bozsó, M., Glávits, R., Molnár, T. 2008. A survey of equine abortion and perinatal foal losses in Hungary during a three-year period (1998-2000). *Acta Vet. Hung.* 56, 353-367.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Telford, E.A.R., Watson, M.S., McBride, K., Davison, A.J. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189, 304-316.
- Telford, E.A.R., Studdert, M.J., Agius, C.D., Watson, M.S., Aird, H.C., Davison, A.J. 1993. Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. *Virology* 195, 492-499.
- Telford, E.A.R., Watson, M.S., Perry, J., Cullinane, A.A., Davison, A.J. 1998. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.* 79, 1197-1203.
- Thein, P. 2009. Lovak herpesvírus-fertőzései. *Magy. Állatorv. Lapja* 131, 145-147.
- Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kondo, T., Fukushi, H., Matsumura, T. 2006. Pathogenicity and immunogenicity of equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gl or gE gene in murine and hamster models. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 1029-1038.
- Tsujimura, K., Oyama, T., Katayama, Y., Muranaka, M., Bannai, H., Nemoto, M., Yamanaka, T., Kondo, T., Kato, M., Matsumura, T. 2012. Prevalence of equine herpesvirus type 1 strains of neuropathogenic genotype in a major breeding area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1663-1667.
- van Maanen, C., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Damen, E.A., Derksen, A.G. 2001. Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* 33, 191-196.
- Van de Walle, G.R., Goupil, R., Wishon, C., Damiani, A., Perkins, G.A., Osterrieder, N. 2009. A single-nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to

cause lethal neurological disease. *J. Infect. Dis.* 200, 20-25.

van Woensel, P.A., Goovaerts, D., Markx, D., Visser, N. 1995. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. *J. Virol. Methods.* 54, 39-49.

Vandekerckhove, A.P., Glorieux, S., Gryspeerdt, A.C., Steukers, L., Van Doorselaere, J., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J. 2011. Equine alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-4) differ in their efficiency to infect mononuclear cells during early steps of infection in nasal mucosal explants. *Vet. Microbiol.* 152, 21-28.

Walker, C., Love, D.N., Whalley, J.M. 1999. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Vet. Microbiol.* 68, 3-13.

Welch, H.M., Bridges, C.G., Lyon, A.M., Griffiths, L., Edington, N. 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 73, 261-268.

Williams, K.J., Maes, R., Del Piero, F., Lim, A. Wise, A., Bolin, D.C., Caswell, J., Jackson, C., Robinson, N.E., Derksen, F., Scott, M. A., Uhal, B.D., Li, X., Youssef, S.A., Bolin S.R. 2007. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis: A Newly Recognized Herpesvirus-Associated Fibrotic Lung Disease. *Vet. Pathol.* 44, 849-862.

Wilson, W.D., 1997. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 13, 53-72.

Zwegyberg, L., Wirgart, B., Brytting, M., Linde, A., Wahren, B., Grillner, L. 1998. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3662-3669.

10. A TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk:

Malik, P., Pálfi, V., Bálint, A., 2010. Development of a new primer–probe energy transfer method for the differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. J. Virol. Methods. 169, 425-427.

Malik, P., Bálint, Á., Dán, Á., Pálfi, V. 2012. Molecular characterisation of the ORF68 region of equine herpesvirus-1 strains isolated from aborted fetuses in Hungary between 1977 and 2008. Acta Vet. Hung. 60, 175-187.

Malik Péter, Pálfi Vilmos 2012. Az EHV-1 és EHV-4 diagnosztikájának gyakorlati kérdései Magyar Állatorvosok Lapja 134, 67-75.

Konferencia prezentációk:

P. Malik, Á. Bálint, Á. Dán, V. Pálfi (*poszter*): Molecular analysis of equine herpesvirus 1 strains isolated in the last 30 years in Hungary. 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 23–26 August 2009

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőm, dr. Pálfi Vilmos munkáját, akinek szakmai hozzáértése hozzásegített ahhoz, hogy a disszertációm elkészülhessen. Több évtizedes elméleti és gyakorlati tapasztalata nagyban megkönnyítette a kapott adatok kiértékelését és az ezekhez kapcsolódó eredményekből a témám szempontjából releváns következtetések levonását.

Ezen kívül köszönettel tartozom dr. Bálint Ádámnak, aki a munkám során felhasznált molekuláris módszerek elsajátításában és egyéb szakmai kérdésekben nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönet illeti még dr. Dán Ádámot és dr. Hornyák Ákost is a szakmai tanácsaikért.

Köszönöm a családom tagjainak a PhD dolgozatom elkészítése alatt tanúsított türelmükért és támogatásukért.