

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

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

**Malik Péter**

PhD értekezés tézisei

2012

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

**Témavezető:**

**Dr. Pálfi Vilmos**  
az állatorvos-tudomány kandidátusa

**Témabizottsági tagok:**

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

**Dr. Dán Ádám**  
PhD  
NÉBIH ÁDI Molekuláris Biológiai Laboratórium

## 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). Az ezek által okozott rhinopneumonitis, illetve a fertőzött kancák vetéléssel járó kórképe hazánkban is régóta ismert, gazdasági jelentősége a vakcinázások ellenére még napjainkban sem csökkent. 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 az EHV-1 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.

A lovak 1-es típusú herpeszvírusának a kancák vetéléseiben játszott hazai szerepéről számos közlemény jelent meg. 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 izolátumot valamilyen genetikai eltérés, vagy patogenitásbeli különbség alapján csoportosítsam. Irodalmi adatok szerint két olyan szakasz is jelen van az EHV-1 genomjában (ORF30 és ORF68), 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.

## A VIZSGÁLATAIM CÉLJAI

A hazai, kancák vetélt magzataiból származó EHV-1 izolátumok molekuláris vizsgálataival arról szeretnénk volna információt szerezni, hogy az előzőleg leírt, az ORF30-as és ORF68-as szakaszokon előforduló genetikai markerek milyen formában fordulnak elő az izolátumainkban. A célkitűzések eléréséhez a következő kérdéseket kívántam megvizsgálni:

1. Az EHV-1 genom ORF30-as régiójának 2254-es pozíciójában előforduló A/G pontmutáció alapján meghatározott kétféle genotípus („neuropatogén”/G2254 és „nem neuropatogén”/A2254 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?

## **ANYAG ÉS MÓDSZER**

### A felhasznált EHV-1 izolátumok és laboratóriumi törzsek

Vizsgálataimban összesen 35, az 1977 és 2008 közötti időszakban intézeti diagnosztikai vizsgálatra beküldött vetélt lómagzatokból származó EHV-1 izolátumokat használtam fel. Az izolátumok elnevezését a beküldés évszámából és az izolálás adott éven belüli sorszámából alakítottuk ki. A kórelőzmény minden esetben vetélés volt, egy izolátummal kapcsolatban (04\_04) írtak le idegrendszeri tüneteket is. A hazai izolátumok mellett két laboratóriumi törzset is felhasználtam a genetikai vizsgálataimban, az egyik az ARMY 183, a másik a vakcinákban használt RaCH törzs.

### Módszerek

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.

#### 1. Vírusizolálás

A lecentrifugált szervminták, illetve a liofilizát törzsek felülúszójával RK-13 sejtenyészeteket oltottam. A jellegzetes citopatogén hatás (a sejtek lekerekedése, syncytiumok kialakulása) általában a beoltás után 2-3 nappal már megjelenik, ha a szövetenyészetben nem láttam elváltozást még a hetedik napon sem, akkor a felülúszót újra beoltottam (vakpasszázs).

#### 2. Az izolátumok azonosítása multiplex PCR módszerrel (Carvalho és mtsai, 2000)

A legalább 90-95%-os citopatogén hatást mutató szövetenyészetek többszöri (háromszori) lefagyasztása és felolvasztása után a felülúszót lecentrifugáltam, 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.

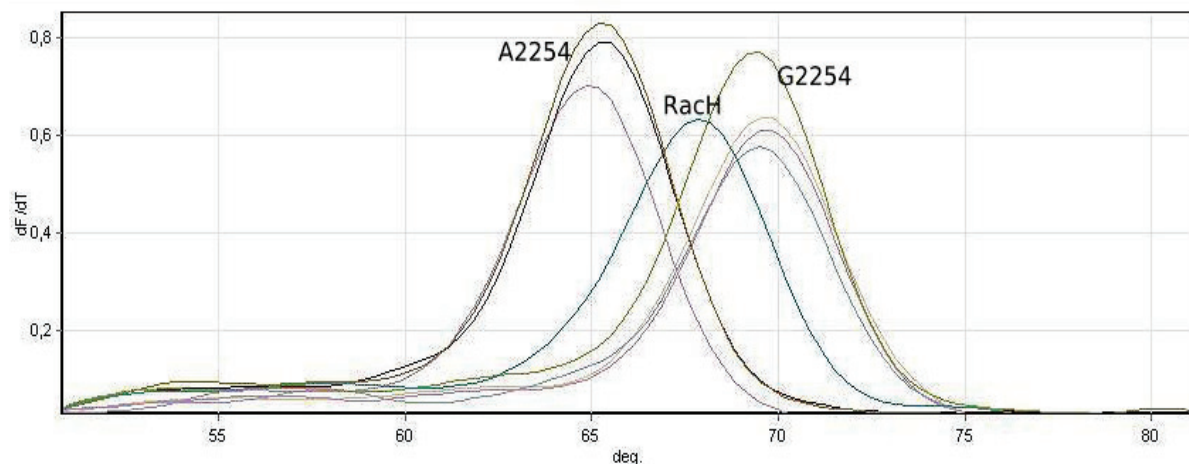
Az ORF30-ban előforduló nukleotidcsere kimutatására szolgáló új PriProET módszer és az ORF68 polimorf régiójának analíziséhez használt saját fejlesztésű PCR leírása az **EREDMÉNYEK** fejezetben található.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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.

### A hazai EHV-1 izolátumok ORF30 génszakaszának elemzése

A két genotípus elkülönítéséhez használandó új módszer kiválasztásakor a primer-probe energiaátvitelen alapuló (PriProET) eljárást azért részesítettük előnyben, mert a TaqMan probe-okat használó real-time PCR 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 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. A két genotípushoz és a Rach törzshöz tartozó olvadáspont görbék az 1. ábrán láthatók.



1. ábra. Az A2254 (nem neuropatogén), és a G2254 (neuropatogén) genotípusú izolátumokhoz és a Rach vakcinatörzshöz tartozó olvadáspont görbék

A 35 magyarországi izolátum közül összesen öt olyat találtunk, ami a 2254-es pozícióban G bázist kódolt (neuropatogén genotípus), ez a megvizsgált izolátumok 14%-át jelentette. A 04\_04 jelű izolátum, amelynek kórelőzményében szerepeltek idegrendszeri tünetek, szintén a neuropatogén genotípusba tartozott. A két laboratóriumi törzs is G bázist kódolt a vizsgált pozícióban, azonban a Rach törzs az ORF30 egy másik nukleotid pozíciójában eltért az összes törzstől. A Rach a 2259-es pozícióban citozint kódol, ezért az olvadáspont görbéje a

neuropatogén és a nem neuropatogén genotípusba tartozó izolátumok görbéi között helyezkedett el.

#### A hazai EHV-1 izolátumok ORF68 szakaszának elemzése

Az EHV-1 genom ORF68 régiójának kb. 600 bázispár hosszúságú, részben polimorf szakasza bizonyult a leginkább alkalmasnak arra, hogy angol kutatók egy olyan marker rendszert dolgozzanak ki, amely alapján az EHV-1 törzseket hat csoportba lehetett besorolni az ORF68 szakaszon előforduló egyedi pontmutációk alapján. Az ilyen módon csoportokba rendezett izolátumok földrajzi elterjedésében szignifikáns különbségeket találtak aszerint, hogy melyik csoportba tartoztak.

Az eredeti cikkben szereplő PCR rendszerrel nem kaptunk konzekvens eredményeket, ezért a szakasz vizsgálatára saját PCR rendszert terveztünk, amivel a vizsgálni kívánt szakasz 725 nukleotid hosszúságú szakaszát tudtuk amplifikálni, majd a PCR termékeket minden izolátum esetén kétszer szekvenáltuk.

A 35 magyarországi izolátumból csak 23-at (66%) tudtuk az eredeti hat csoport valamelyikébe sorolni. 12 magyarországi izolátumban olyan egyedi nukleotid polimorfizmusokat találtunk, amelyeket eddig még nem írtak le. Ezekből négy új genetikai csoportot sikerült kialakítani. A különböző izolátumok földrajzi elterjedését csak azoknál a csoportoknál tudtuk vizsgálni, ahol elegendő számú izolátum állt rendelkezésre. A csoportok közül több olyat is találtunk, amelyek elterjedése időben vagy térben korlátozott volt, ezekben az esetekben látható különbség volt az egyes csoportok földrajzi előfordulásában. Azt azonban hozzá kell tennünk, hogy egy izolátum származási helye nem az EHV-1 törzs egyedüli előfordulási helyét jelenti, hanem az adott területen cirkuláló vírustörzs pillanatnyi felbukkanási helyét.

A 04\_04 kódszámú törzs három olyan egyedi SNP-t kódol, ami lóból izolált EHV-1-ben szekvenciáiban még nem szerepelt. Viszont 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. Az eredmény azért érdekes, mert az izolátum származási helyén egy zebracsődört is tartottak a kancák mellett.

A két genetikai marker (ORF30 és ORF68) gyakorlati felhasználása tehát elsősorban a járványtani nyomozást segítheti, egy állományba bejutott vírustörzs eredetét egyszerűbb kideríteni, ha ismerjük az adott területen előforduló EHV-1 törzsek ORF30 és ORF68 jellemző szekvenciáit.



## ÚJ TUDOMÁNYOS 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.

## **AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK**

### Lektorált, impakt faktórral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk:

Malik, P., Pálfi, V., Bálint, Á., 2010. Development of a new primer–probe energy transfer method for the differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. Journal of Virological 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 Veterinaria Hungarica 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

## **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.