

**GENETIKAI MÓDSZEREK A VAKCINA-
ELLENŐRZÉSBEN**

Doktori értekezés

Készítette:

Farsang Attila

Témavezető:

Dr. Soós Tibor

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Budapest

2003.

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Soós Tibor, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Állatgyógyászati Oltóanyag-, Gyógyszer- és Takarmányellenőrző Intézet

Dr. Lomniczi Béla, az állatorvos-tudomány doktora

MTA Állatorvos-tudományi Kutató Intézet

Dr. Tuboly Sándor, ny. egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány doktora

SZIE, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Készült 8 példányban. Ez a 1. sz. példány.

.....

Farsang Attila

TARTALOMJEGYZÉK

GENETIKAI MÓDSZEREK A VAKCINA-ELLENŐRZÉSSEN¹

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. ÖSSZEFOGLALÁS	8
2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK	10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
3.1. A PCR alapjai.....	12
3.2. A PCR főbb típusai	15
3.3. A PCR termék kimutatása, további felhasználása	17
3.4. A PCR mint rutinmódszer	19
3.5. Vakcina ellenőrzés szerepe, jelentősége	21
3.6. Vizsgált problémák hátterének, illetve vírusok jellemzőinek rövid áttekintése	27
3.6.1. Az NDV vakcinák vizsgálata.....	27
3.6.2. Az NDV morfológiája, genomszerkezete	30
3.6.2.1. Az NDV főbb proteinjeinek rövid jellemzése	31
3.6.3. Csirkék fertőző bronchitis vírusa.....	33
3.6.3.1. Coronavírusok struktúrája.....	35
3.6.3.2. A fertőző bronchitis szerkezeti fehérjéinek rövid jellemzése.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
3.6.3.3. A Coronavírusok rekombinációja.....	37
3.6.4. Myxoma vírus: atípusos myxomatosis	39
3.6.4.1. A myxoma vírus rövid jellemzése	41
4. SAJÁT VIZSGÁLATOK.....	42
4.1. LENTOGÉN BAROMFIPESTIS VAKCINA: HOMOLÓG KONTAMINÁCIÓ	42
4.1.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
4.1.2. EREDMÉNYEK	46
4.1.3. MEGBESZÉLÉS	51
4.2. CSIRKÉK FERTŐZŐ BRONCHITIS VÍRUSA (IBV): ADVERZ VAKCINAHATÁS.....	53
4.2.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	53

4.2.2.	EREDMÉNYEK.....	57
4.2.3.	MEGBESZÉLÉS	58
4.3.	AMYXOMATÓZUS MYXOMATÓZIS: KLINIKO-VIROLÓGIAI VIZSGÁLATOK.....	64
4.3.1.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	64
4.3.2.	EREDMÉNYEK.....	69
4.3.3.	MEGBESZÉLÉS	72
5.	LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK.....	74
6.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76
7.	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	77
8.	SUMMARY	78
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMV:	avian myeloblastosis virus, madár myeloblastosis vírus
ÁOGYTI:	Állatgyógyászati Oltóanyag- Gyógyszer és Takarmányellenőrző Intézet
CAV:	chicken anaemia virus, csirke anaemia vírus
cDNS:	complementary DNS
CEL:	chicken embryo lung, csirke embrionális tüdő szövettenyészet
CFR:	Code of Federal Regulations
cp:	citopatogén
DEPC:	dietil-pirokarbonát
DNS:	dezoxiribonukleinsav
dNTP:	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
F:	fenil-alanin
G:	glicin
GATT:	General Agreement on Trade and Tariffs
GMP:	Good Manufacture Practice, szabályos gyártási eljárás
HAG:	haemagglutináció gátlás
HCV:	human coronavirus, emberi coronavírus
HNEG:	haemorrhagic nephritis and enteritis in geese, libák vérzésemese- és bélgyulladás kórképe
IB:	infectious bronchitis, a csirkék fertőző bronchitis betegsége
IBDV:	infectious bursitis disease vírus, a csirkék gumboró betegségének vírusa
IBV:	infectious bronchitis virus, csirkék fertőző bronchitisének vírusa
ICPI:	intracerebral pathogenicity index, intracerebrális patogenitási index

IVPI:	intravenous pathogenicity index, intravénás patogenitási index
GHPV:	goose haemorrhagic polyomavirus, libák vérömléses polyomavírusa
Kb:	kilobázis
L:	a primer hibridizáló szakaszainak hossza bázispárban kifejezve
M:	matrix, a baromfipestis vírusának mátrix génje
MDT:	mean death time, az átlagos idő órában kifejezve, ami alatt a minimális letális dózis megöli az embrionált tojást
MHV:	mouse hepatitis virus, egér hepatitisvírus
MMLV:	Moloney egér leukaemia vírus
MSV:	Master Seed Virus, anyatenyészet
MV:	myxoma vírus
N:	nucleocapsid, a csirkék fertőző bronchitis vírusának nukleokapszid génje
NDV:	Newcastle disease virus, baromfipestis vírus
nm:	nanométer
OIE:	Office International des Epizooties, Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal
ORF:	open reading frame, nyitott leolvasási keret
PBS:	phosphate saline buffer, Na-foszfát puffer
PCR:	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PhEur:	Pharmacopoeia Europea, Európai Gyógyszerkönyv
Q:	glutamin
QA:	Quality Assurance, komplex minőségbiztosítási rendszer
QC:	Quality Control, minőségellenőrzés
R:	arginin
RE:	restrikciós enzim
RFLP:	restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmentum eloszlás analízis

RNS:	ribonukleinsav
RT:	reverse transcription, reverz transzkripció
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction, reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
sM:	small membrán protein, kis membrán protein
S1:	spike 1, a csirkék fertőző bronchitis vírusának külső „spike” génje
TCID ₅₀ :	tissue culture infective dose 50%, a szövettenyészetek 50%-ában CPE-t elidéző vírushatóerő
TGEV:	transmissible gastroenteritis virus, sertések transmissibilis gastroenteritis vírusa
T _m :	a primer kapcsolódási hőmérséklete
T _{th} :	Thermus thermophilus eubaktérium
UV:	ultraviola fény
VICH:	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products
WSV:	working seed virus, munkatenyészet
Z:	monovalens kationok mennyisége
%form:	az oldat formamid tartalma százalékban kifejezve
%GC:	a guanin és a citozin százalékos mennyisége

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatgyógyászati vakcinák ártalmatlanságának, tisztaságának és idegen ágens mentességének biztosítása kiemelkedő fontosságú feladat. Az oltóanyag engedélyezési eljárása során a gyártó által előállított terméket az engedélyező állami hatóság aprólékos vizsgálatoknak veti alá, amelyek célja a termék ártalmatlanságának, tisztaságának, hatékonyságának és hatásértékének megállapítása. Az oltóanyagoknak, mint biológiai hatással bíró produktumnak különlegesen szigorú feltételrendszernek kell megfelelnie, amely garantálja, hogy felhasználása során az elvárt hatást fejtsse ki.

Munkám során azokat a hatósági vakcinaellenőrzésben felmerülő speciális kérdéseket, problémákat próbáltam megoldani a molekuláris biológia módszereivel, amelyeket a hagyományos vizsgálati módszerekkel egyáltalán nem lehet megoldani, vagy csak állatkísérletekkel, valamint idő- és munkaigényes eljárások alkalmazásával. E célból élő vírus tartalmú vakcinákat vizsgáltam, illetve ezen vakcinák felhasználása során felmerülő problémák – pl. *revertálódás, hatásemaradás, szennyezettség* – megoldására tettem kísérletet a molekuláris biológia eszközeivel.

Elsőként RT-PCR és RFLP segítségével 12, az ÁOGYTI-ba engedélyezésre beküldött NDV vakcinával végeztem kísérleteket. Az RT-PCR közvetlenül az ampullából tisztított RNS-ből történt, a vakcinavírus előzetes, tojásban történő elszaporítása nélkül. Az M gént amplifikáltuk, majd *HinfI* és *MboI* RE-vel emésztettük. A kapott RFLP szerint az egyik gyártó LaSota tartalmú vakcinája egy másik vakcinatörzsszel, B-1-gyel volt szennyezett. Egy másik gyártó esetében a törzskönyvi dokumentáció szerinti VG/GA törzs helyett V4 Queensland törzset találtunk az ampullában. A B-1 szennyezettség gyári eredetének bizonyítására plakk tisztítást végeztünk, amellyel sikerült a LaSota és B-1 komponenseket szétválasztani.

Munkám második felében svédországi IBV járványesetekből származó mintákat

vizsgáltunk. E célból egy diagnosztikai és egy filogenetikai RT-PCR rendszert dolgoztunk ki az N és az S1 génekre. A PCR termékek nukleotidszekvenciáját meghatároztuk és filogenetikai analízisnek vetettük alá. E szerint kétféle vírustörzs került be Svédországba, D274 szerotípusú és Massachusetts szerotípusba tartozó. Tekintve, hogy Svédország 1997 előtt az IBV szempontjából ún. „nem vakcinázó” ország volt, különösen érdekes, hogy az 1997 utáni mintákból származó Massachusetts szerotípusú vírusok az S1 génen 100%-os homológiát mutattak a Ma5 vakcinatörzssel. Ezzel szemben az 1997 előtti mintákból származó vírusok, ugyanezzel a vakcinatörzssel a vizsgált génen csak 86-94%-ban egyeztek meg. Mindebből valószínűsíthető, hogy a járványesetek egy részéért vakcinavírusok voltak felelősek. A D274 vírus eredetét nem sikerült tisztázni.

Munkám harmadik fejezetében az atípusos myxomatózis első közép-európai megjelenéséről, illetve a kór virológiai vizsgálatáról számolok be. Shope fibróma vírus tartalmú oltóanyaggal vakcinázott telepen 2001. februárjában aspecifikus myxomatózis kórforma ütötte fel a fejét. A természetes elhullásból származó szemhéj, tüdő, tejmirigy és végbél minták PCR és elektronmikroszkópos vizsgálatával sikerült a myxoma vírust kimutatni, amelyet BP04/2001 jelzéssel láttunk el. A BP04/2001 jelzésű izolátummal elvégzett klinikai és virológiai vizsgálatok igazolták, hogy a magyarországi megbetegedések hátterében az eddig csak Franciaországban és Belgiumban előfordult atípusos myxomatosis kórokozója áll.

2. BEVEZETÉS, CÉLKITÚZÉSEK

A szigorú előírások és vizsgálatok ellenére az irodalomban számos eset leírását találhatjuk meg, amelyek vakcinák által okozott megbetegedésről, hatáselmaradásról, sőt sajnos nem egy esetben elhullásról, illetve halálesetről számolnak be (Chan et al., 2001; Maldonado, 2002).

Melyek az oltóanyag minőségével kapcsolatos legfőbb problémák? Az állategészségügy területén a vakcina tisztaságának, illetve szennyezettségének kérdése komoly állategészségügyi, illetve gazdasági vonzattal rendelkezhet. Jørgensen és mtsai számoltak be (2000) lentogén NDV-vel szennyezett IBV, illetve CAV vakcinákról, amelyek Dániában kerültek forgalomba. Az NDV szennyezettség azért érintette Dániát különösen érzékenyen, mert az NDV szempontjából Dánia ún. „nem vakcinázó” ország, a kórokozótól mentes. A vírus gyorsan szétterjed a fogékony állományban, ha olyan országba kerül be, ahol a populációt nem védték vakcinákkal az adott kórokozó ellen. Az NDV-vel szennyezett IBV, illetve CAV vakcinák felhasználásával az ország NDV-mentessége került veszélybe. Az NDV-vel, mint A-listás betegséggel szemben a védekezés alapelve, hogy a kórokozót nem tűrik meg az adott országban. Szigorú szabályok írják elő a behurcolás megakadályozását célzó intézkedések sorát. A behurcolt kórokozó esetében a primer góc felderítése után a fertőzött, illetve gyanús állományok elpusztításával, fertőtlenítéssel és zárlatokkal kell a szétterjedést megakadályozni.

A vakcina használata felveti a vakcinavírus és a vadvírus megkülönböztetésének problémáját, pl. a diagnosztika területén. Ehhez a vírusok pontos törzsszintű megkülönböztetése szükséges. A vakcinavírus törzsazonosítása jelentős az oltóanyag előállításánál az MSV és WSV ellenőrzésekor, illetve a végtermék esetében az ampulla vírus tartalmának vizsgálatakor is.

Az oltóanyag tisztasága mellett további kérdésként merül fel a vakcina ártalmatlansága. A vakcinavírus genetikai jellemzése elősegíti a vakcina által okozott ún.

adverz hatás felderítését, esetleges megelőzését. A közegészségügy területéről számos tanulmány látott napvilágot, amelyek a sárgaláz elleni oltóanyag által előidézett megbetegedésekről számoltak be. Ezeknek a háttérben a vakcinavírus virulenciájának revertálódása, illetve egyedi érzékenység állhat.

A doktori értekezésemben az volt célom, hogy molekuláris módszereken alapuló eljárásokat dolgozzak ki, amelyek a hatósági vakcina-ellenőrzésben i.) gyors, hatékony és egyértelmű törzsazonosítást tesznek lehetővé; ii.) sokoldalúan alkalmazhatóak a vakcinavírus törzsazonosságának megállapítására, a vakcinavírus-vadvírus elkülönítésére; iii.) elősegítik a vakcina adverz hatás esetében az oltóanyag szerepének tisztázását; iv.) lehetővé teszik a vakcinavírus genetikai jellemzésével a nem kívánatos hatás okainak felderítését.

A fentebb vázolt cél elérése érdekében az alábbi fő problémakörök esetében alkalmaztam molekuláris módszereket:

- Lentogén törzsből készített baromfipestis elleni vakcinák vizsgálata RT-PCR és RFLP módszerével, hogy i.) genetikai alapon azonosítsuk a vakcinavírusokat; ii.) kiszűrjük az oltóanyag más NDV törzssel (homológ kontamináció) való szennyezettségét; iii.) megállapítsuk az oltóanyag IBV és IBDV vírusoktól való mentességét (4.1. vizsgálati fejezet).
- A Svédországban észlelt fertőző IBV járványesetek háttérben álló vírus genetikai jellemzése, illetve filogenetikai analízise. A cél az volt, hogy a járványesetek vizsgálatára egy gyors diagnosztikai, illetve egy filogenetikai analízisre alkalmas RT-PCR rendszert fejlesszünk ki, amelyekkel gyorsan meghatározhatjuk, hogy milyen törzsek okoznak járványt. Igazolni kívántuk továbbá a gyanút, hogy a járványesetek háttérben vakcinavírus áll (4.2. vizsgálati fejezet).

- Myxomatosis ellen oltott házi nyúlállományban megjelent aspecifikus klinikai képet okozó myxoma vírus klinikai és virológiai jellemzése (4.3. vizsgálati fejezet).

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A PCR alapjai

A PCR felfedezésével minden eddiginél hatékonyabb eszköz került a kezünkbe a DNS *in vitro* módon történő kimutatására. Az *in vitro* kimutatás alaplépéseit Kleppe és mtsai már 1971-ben, kb. egy évtizeddel a PCR felfedezése előtt, meghatározták. A PCR-t 1983-ban Kary Mullis fedezte fel (Mullis et al., 1986). Az első gyakorlati alkalmazásáról Saiki és mtsai (1985) számoltak be. A PCR több tudományág mellett, beleértve a genetikát, evolúcióbiológiát, diagnosztikai és igazságügyi orvostudományt, az 1980-as évek vége felé az állatorvostudományt is meghódította (Belák és mtsai, 1989; Nunberg és mtsai, 1989).

A módszer lényege, hogy *in vitro* körülmények között összeállított reakcióelegyben a DNS szintézisért felelős enzim a DNS minta egy szakaszát specifikusan megsokszorozza (amplifikálja). A reakcióelegy az enzimen és a DNS mintán (templát DNS) kívül a DNS szintézishez szükséges összetevőket, illetve az optimális enzimműködéséhez szükséges ionokat, vegyületeket tartalmazza. A szintetizálásra kerülő régió elejét és végét két oligonukleotid primer jelöli ki, amelyek specifikusan, nukleotid-nukleotid kölcsönhatás alapján hibridizálnak a templát DNS szállal. A pH beállításához legáltalánosabban tízszeresen koncentrált PCR puffert alkalmaznak. A tízszeresen koncentrált PCR puffer a következőkből áll (Saiki, 1989): 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ és 100 mM Tris-HCl, pH 9,0. A Mg²⁺, illetve

KCl koncentrációjának értéke nagyban befolyásolja a reakció specificitását az enzimre gyakorolt közvetlen hatásukon keresztül (Saiki, 1989). A DNS szintézisének a dNTP-k szolgálnak „építőkövekként”, a víz biztosítja a megfelelő reakcióközeget.

A templát denaturációjából, primerek kapcsolódásából (annealálás) és a primerek extenziójából álló ismétlődő ciklusok végül az adott DNS fragmentum *exponenciális* felszaporodásához vezetnek. Mindehhez szükséges, hogy pontos ismereteink legyenek az adott gén/génszakasz szekvenciájáról.

A módszer specificitása a primereken alapul. Ezeknek az oligonukleotidáknak a megtervezéséhez ma már jó minőségű számítógépes szoftverek állnak rendelkezésre (pl. Oligo 3.0, 4.0, 5.0; az Embnet hálózat GCG programcsomagjának Prime programja). A tervezéskor figyelembe kell venni, hogy a primerek szekvenciája nem adhat lehetőséget arra, hogy a primer 5' és 3' végén történő önkapcsolódás révén ún. primer-dimer alakuljon ki. További fontos kritérium, hogy a primerek nem képezhetnek önmagukkal hurkot, olvadáspontjaik nem térhetnek el jelentősen egymásétól, illetve a templát olvadáspontjától. Amennyiben degenerált bázisok vannak a primerben, azokat célszerű a primer közepére, illetve 5' végére tervezni, mivel a primer működése szempontjából a 3' végi, kb. 3-4 bázis játszik kulcsszerepet. Ha az 5' vég kapcsolódása nem abszolút (full match), az a primer specificitását jóval kevésbé befolyásolja, mint ha a 3' végen találhatóak eltérések, ún. mismatch-ek.

A sikeres reakció számos komponens együttes jelenlétét kívánja meg, ami miatt a PCR-t *többváltozós, komplex rendszernek* kell tekintenünk, amelynek működése máig sem minden részletében ismert. Az optimális működés, amely a maximális specificitást, illetve érzékenységet biztosítja, függ a felhasznált polimeráz enzim minőségétől, mennyiségétől, az ionkörnyezettől – különös tekintettel a Mg^{2+} ionok jelenlétére –, a primer kapcsolódási hőmérsékletétől, az amplifikálandó templát szekvenciájától, továbbá az alkalmazott primerek szekvenciájától. Mindazokat a paramétereket, amelyeket csak lehet, optimalizálnunk kell. A

templát szekvenciája adott, a primerek szekvenciáját, bár a tervezés során van ráhatásunk, gyakorlatilag állandónak kell tekintenünk. A két legfontosabb paraméter a Mg^{2+} ionok mennyisége, illetve a megfelelő primer kapcsolódási hőmérséklet. A Mg^{2+} jelenléte az enzim megbízható működéséhez szükséges. Nagy mennyiségű Mg^{2+} gyengébb affinitású templát-enzim kölcsönhatást tesz lehetővé, míg alacsonyabb Mg^{2+} koncentráció az erősebb affinitású kapcsolat felé tolja el a reakciót, ún. stringens reakció történik. A szükséges Mg^{2+} mennyiség a templát szekvenciájától függ, vizsgálati rendszerenként az optimális Mg^{2+} mennyiség más és más. Leggyakrabban a 1,5-2,5 mM érték bizonyul megfelelőnek.

A primer kapcsolódási hőmérséklet a primer szekvenciájától függ, és matematikai módon többé-kevésbé jó közelítéssel kiszámolható a következő képlet segítségével:

Meinkoth-Wahl egyenlet (1984)

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log Z) + 0,41 (\text{GC}\%) - 0,61 (\% \text{form}) - 500/L$$

Ahol az Z a monovalens kationok molaritását, a %GC a guanin és citozin nukleotidok százalékos arányát a DNS-ben, a %form a formamid százalékos arányát az oldatban, L pedig a hibridizáló szakaszok bázispárokban megadott hosszát jelöli.

A képlet egyszerűbb, a gyakorlatban jobban használható formáját Suggs és mtsai (1981) adták meg:

$$T_m = 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}).$$

Minél magasabb egy primer T_m értéke az adott DNS-re vonatkoztatva, annál specifikusabb eredményt lehet vele elérni.

A primer kapcsolódási hőmérséklete és a Mg^{2+} ionok koncentrációja mellett, kisebb mértékben, a primerek és a templát koncentrációja, valamint a felhasznált Taq polimeráz

enzim mennyisége is befolyásolja a reakció kimenetelét.

A mai primer tervező programok megadják a számított T_m értéket, amelynek alkalmazása jó eséllyel sikerre vezet.

A PCR reakció átlagosan 30-35 ciklusból áll. Ennyi szükséges, hogy a detektálni kívánt szakasz kellő mennyiségben sokszorozódjék fel. Az ennél nagyobb ciklusszámok célszerűtlenek, mivel 40 ciklus felett már olyan nagy mennyiségben képződnek aspecifikus termékek, hogy az már az eredmények értékelését zavarja.

A kapott PCR termék detektálására többféle módszer terjedt el. A leggyakoribb az *agarózgél elektroforézis*, amikor 1-2 % töménységű agaróz gélen elektromos térben futtatjuk a PCR terméket, majd interkaláló festékkel (etídium-bromid, SYBR Green) festjük, és a detektáláshoz UV fényel világítjuk meg.

Mind több tudományos közlemény jelenik meg a PCR és az ELISA együttes alkalmazásáról, amelyek a PCR termék ELISA-val történő detektálásáról számolnak be. A két módszer együttes alkalmazásának alapja, hogy legalább az egyik primert biotinnal megjelöljük, ehhez kapcsolódik egy streptavidin-tormaperoxidáz konjugátum, amelyhez az enzim ligandumát (tri-merkaptó-benzidín, TMB) adva, kékszínű termék keletkezik. Ezt a színes vegyületet ELISA leolvasóval – adott hullámhossz mellett – kvantitatív módon detektálhatjuk. A kapott abszorbancia értékek további matematikai, statisztikai analízis számára jól kezelhető, numerikus paraméterek. Az ELISA elterjedt, jól standardizált labormódszer, így a PCR-rel történő együttes felhasználása ígéretes.

3.2. A PCR főbb típusai

A fentebb leírt standard PCR-nek az alkalmazása során, több jelentős módosítása született. A **nested** és **seminested** PCR-ben két primerpárt alkalmaznak két egymást követő

amplifikációnál. Az első PCR-ben az A és B primerek segítségével megsokszorozzák a templát DNS-t, majd ennek a PCR-nek a termékét templátként használják fel a második PCR-hez. A második PCR során az amplifikálni kívánt szakasz kijelölésére két lehetőség kínálkozik: i.) nested PCR-ről beszélünk, ha C és D primereket alkalmaznak, amelyek az első reakció primerei (A, B) által közrefogott szakaszon belül helyezkednek el; ii.) seminested rendszerről beszélünk, ha a C primer mellé az első reakció A vagy B primerét választják párnak.

Kawasaki és mtsai (1990) dolgozták ki a PCR-t RNS vírusok detektálására, amely RT-PCR néven vált ismertté. Mivel az RNS közvetlenül nem használható a PCR-ben templátként, az RNS molekulát RT enzimmel cDNS-sé írják át. Az RT enzimet madár myeloblastosis vírusból (AMV), vagy Moloney egér leukaemia vírusból (MMLV) izolálták. A *Thermus thermophilus* nevű eubaktériumból előállított rekombináns DNS polimeráz (Tth) rendelkezik RT aktivitással is, amely lehetővé teszi az RT és a PCR reakciók egy csőben, megszakítás nélkül történő elvégzését. A Tth számos előnyt nyújthat, mivel az RT reakció és a PCR ugyanabban a csőben, megszakítás, illetve külső beavatkozás nélkül zajlik, ami jelentősen csökkenti a szennyező anyagok bekerülésének, pipettázási hibáknak, és ezáltal az álpozitív eredményeknek az esélyét. További előny, hogy a Tth enzim magasabb hőfokon (65-70°C) végzi az RT reakciót, mint az AMV-RT és a MMLV-RT enzimek, így a kiterjedt másodlagos szerkezettel rendelkező RNS szakaszokról nagyobb határfokkal készülnek cDNS-ek. Mivel a magasabb hőfok miatt a „hagyományos” random hexamer, mint primer nem használható, az RT-t specifikus primerrel kell végezni, ami a cDNS specificitását még inkább elősegíti. A primereket természetesen úgy kell megtervezni, hogy a T_m-jük magasabb legyen 70°C-nál.

Az eddig említett rendszerekben csak egy primerpár volt (ún. **simplex PCR**), amellyel egyféle vírust lehet kimutatni. A gyakorlatban a helyzet gyakran ennél bonyolultabb, mivel pl. a diagnosztika területén az egyes tünetek multifaktoriális okokra vezethetők vissza, azaz gyakran több fertőző ágens együttes jelenléte áll a háttérben. Az egyes vírusok külön-külön

történő kizárási vizsgálata rengeteg munkát és komoly anyagi ráfordítást igényel. A probléma megoldása lehet, ha egy reakcióelegyben több primerpár van, amelyek akár több gén/kórokozó/stb. egyidejű kimutatását is lehetővé teszik. Az ún. **multiplex, illetve megaplex PCR** ezt az elvet követi. A fentebb leírt optimalizálási problémák természetesen fokozottan jelentkeznek a multiplex rendszernél, és minél több primert akarunk egy reakcióban egyidejűleg működtetni, az optimum annál szűkebb. Célszerű az amplifikálendő szakaszokat közel ugyanolyan méretűnek választani, mivel az enzimatis DNS szintézis sztochasztikus folyamat, amelyben a rövidebb szakaszok gyorsabban szaporodnak, míg a hosszabbak lassabban, amely szélsőséges esetben valamely templát teljes kiszorulásához is vezethet. További probléma, hogy ezeknél a rendszereknél sem képezhetnek a primerek egymással stabil párt, és önmagukkal sem záródhatnak hurokba. Ezeknek a kritériumoknak az egy csőben lévő primerszám növekedésével egyre nehezebb megfelelni, amely határt szab a multiplex rendszerek fejlesztésének.

3.3.A PCR termék kimutatása, további felhasználása

Gyakran nem csak arra keresünk választ, hogy valamely gén/kórokozó/stb. jelen van-e egy mintában, vagy sem, hanem a PCR termék alapján olyan további információkat szeretnénk nyerni, mint például a vizsgált kórokozó azonosítása, fenotipikus tulajdonságainak genetikai háttere, rokonsága más kórokozókkal, törzsekkel. A fenti kérdésekre az RFLP, illetve a DNS direkt szekvenálása és a szekvencia elemzése adhat választ.

Az RFLP lényege, hogy bizonyos enzimek (endonukleázok) képesek a DNS-t hasítani. A hasíthatóság meghatározott felismerő helyekhez kötődik, amelyek jelenléte szükséges ahhoz, hogy az enzim kapcsolódni tudjon és hasítsa a DNS-t. A hasítási helyeknek az elhelyezkedése viszont attól függ, hogy a PCR termék milyen élőlényből, nemzetségből,

fajból, alfajból származik. Ezt a tulajdonságot több tudományág is felhasználta. Az igazságügyi orvostudomány számára ez azt jelentette, hogy a PCR segítségével képessé váltak az egyedek kevés mintából történő, specifikus elkülönítésére, pl. bűnügyek feltárása, apasági ügyek tisztázása. A virológia számára vírusok, sőt vírustörzsek gyors és hatékony elkülönítését tette lehetővé, amely a molekuláris járványtan tudományának felvirágzásához vezetett.

További eszköz a PCR termék minőségi paramétereinek a meghatározásához a szekvenálás, amely sok tekintetben háttérbe is szorította a restrikciós enzim analízist, bár a teljesség kedvéért meg kell említenünk, hogy léteznek olyan problémák (pl. különböző vírusokat tartalmazó oldatok keveredésének kiszűrése, elkülönítése), amelyeknél az RFLP a célravezetőbb.

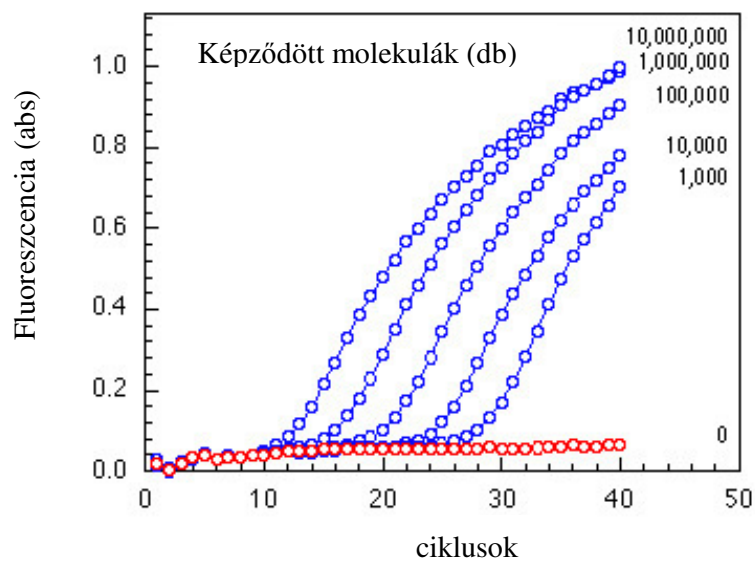
A multiplex rendszereknél a PCR termék „hagyományos” gélelektroforézis alapú detektálása mellett több módszert kísérleteztek ki, amelyek a PCR termék *in situ* („real-time”), kvantitatív nyomonkövetését teszi lehetővé:

- **Fluoreszcensen jelzett primerek** felhasználásával, a gép ciklusról ciklusra nyomon követi a keletkező specifikus termék mennyiségét.
- **Hibridizációs próbák** esetében a próbák fluoreszcens jelölést hordoznak, de jel csak akkor képződik, ha a templáton egymás közelébe specifikusan, nukleotid-nukleotid kölcsönhatás alapján bekötnek.
- **Hidrolizáló próbákkal**, amelyek szintén fluoreszcens jelzést hordoznak, de inaktív formában, jel csak akkor képződik, ha a templáttal való specifikus kapcsolódás után a Taq 5'→3' endonukleáz aktivitása segítségével elhidrolizálja a próbát és így szabad fluoreszcens festék molekula képződik.
- **Molekuláris szendviccsel (molecular beacon)**, amely olyan hajtű alakú oligonukleotid, amely az egyik végén fluoreszcens jelzést hordoz, a másikon pedig egy ún. kioltó

molekulát. Mivel hajtúalakban visszahajlik, ezért a kioltó molekula megakadályozza, hogy a festékmolekula jelet bocsásson ki, erre csak akkor kerülhet sor, ha a molekuláris szendvics a templáttal hibridizál és „kinyílik”.

A fentebb felsorolt real-time módszerek mindegyike a PCR termékek *in situ* nyomonkövetését teszik lehetővé (1. ábra), habár érzékenységük eltér.

1. ábra: Az PCR termékek képződésének *in situ* követése fluoresszcens festékek révén. Az ábrán öt PCR termék képződését követhetjük nyomon. Jól látható, hogy az egyes leendő PCR termékek nem egyformán viselkednek a láncreakció során, mind más és más ciklusszámtól kezdődően kezd exponenciálisan szaporodni. A jelenség háttérében a primerek érzékenysége, illetve a PCR termékek eltérő hosszúsága lehet.



3.4.A PCR mint rutinmódszer

A fentiekben röviden összefoglaltam a PCR technikai háttérét, fajtáit, és utaltam előnyeire, amely lehetővé tette, hogy az elmúlt évtizedben meghódítsa az orvos-, illetve állatorvos-

tudomány számos ágát.

Szólnunk kell azonban a módszer hátrányairól is. A PCR legnagyobb problémája éppen a nagy mértékű érzékenységében gyökerezik, amely miatt álpozitív eredmények születhetnek. A minta kezelése során, a reakcióelegy összemérésekor, szennyeződésként bekerült néhány kópiányi idegen DNS molekula jobb kinetikával sokszorozódhat, mint a céltemplát, és azt akár teljesen ki is szoríthatja. Az álpozitív eredmények megtéveszthetik a kutatót, továbbá a várt PCR termékkel együtt megjelenve, nehézzé, vagy lehetetlenné teszik az eredmény helyes kiértékelését.

Komoly problémát jelentenek az álnegatív eredmények is, amelyek olyan technikai hibákból eredhetnek, mint az enzim aktivitásának elvesztése, a nem megfelelően optimalizált rendszer, RT-PCR esetén az RNS bontó enzimek, az RNázok jelenléte. Mindezek miatt kezdetben sok kétely övezte a módszert, lehet-e belőle valaha is rutinmódszer, vagy megmarad a kutatólaborok eszközének. Az elmúlt évtizedben több állategészségügyi diagnosztikai intézetben (pl. az uppsalai Nemzeti Állategészségügyi Intézet) sikeresen alkalmazták rutinszerűen. Sok adat gyűlt össze a PCR-en alapuló vizsgálatok megbízhatóságáról és megismételhetőségéről (Belák és Ballagi-Pordány, 1993; Belák és Thoren, 2001). A fentebb említett Nemzeti Állategészségügyi Intézet tapasztalatai szerint az álpozitív eredményeket megfelelő laboreszközök, illetve laboratóriumi gyakorlat alkalmazásával szinte teljesen ki lehet küszöbölni, míg az álnegativitás a *belső kontrollok*, *mimikék* alkalmazásával előzhető meg (Ballagi-Pordány és Belák, 1996). A PCR, megfelelő feltételek mellett rutinmódszerként alkalmazva több előnyt nyújt, mint amennyi hátránya van. A PCR és a ráépülő molekuláris biológiai módszerek sokkal érzékenyebbek, specifikusabbak, kevésbé munka- és időigényesek, mint a hagyományos módszerek, pl. immunfestés, ELISA, illetve elektronmikroszkópia. Külön említést érdemelnek a PCR állatvédelmi vonatkozásai, a PCR alkalmazása ugyanis jelentősen csökkentheti az állatkísérletek iránti szükségletet, illetve a felhasznált állatok mennyiségét.

A 2000-es OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines-ban is megjelenik a PCR, mint „hivatalos” módszer a diagnosztikában, és külön fejezet (I.3-as) foglalkozik a PCR automatizálásával, validálásával. Ezek szerint valid a rendszer, ha teljesülnek az alábbi fázisok:

1. Fázis: Megvalósíthatósági tanulmányok.
2. Fázis: Módszerfejlesztés, valamint specificitás, analitikai érzékenység, megismételhetőség tesztelése.
3. Fázis: A módszer kivitelezési jellemzőinek meghatározása különös tekintettel a precizitásra és a pontosságra.
4. Fázis: A módszer kivitelezés validitásának monitorozása.
5. Fázis: A validitási kritériumok fenntartása, illetve továbbberősítése.

Ahhoz, hogy a PCR laborok közötti standardizációt és harmonizációt megvalósíthassuk körvizsgálatokat szükséges végezni. Ilyen jellegű vizsgálatok már történtek klasszikus sertéspestis, illetve ragadós száj és körömfájás (N.J. Knowles and R. Samuel, OIE/FAO Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease, Molecular Epidemiology Group, Inst. For Animal Health, Pirbright Laboratory, UK) esetében.

3.5. Vakcina ellenőrzés szerepe, jelentősége

Az oltóanyagok felfedezése és kidolgozása mind az orvos-, mind az állatorvos-tudomány területén az utóbbi 200 év legjelentősebb teljesítményeként tekinthető, amellyel a fertőző betegségekkel szembeni küzdelemben olyan hatékony eszköz került a kezünkbe, amely például lehetővé tette, hogy a 18. század rettegett betegségét, az emberi himlőt, a vakcinázás eredményeképpen 1979-re sikerült felszámolni.

Az állategészségügy területén kedvező eredményeket sikerült elérni a ragadós száj- és körömfájás, a klasszikus sertéspestis és a baromfipestis pusztításainak visszaszorításában. A vakcinák tömeges felhasználásával párhuzamosan egyre növekedett a vakcinák jó minősége iránti igény. Az utóbbi évtizedekben az állatgyógyászati vakcinák engedélyezésére és ellenőrzésére vonatkozó szabályok megváltoztak. Egy új korszak kezd körvonalazódni, amely az engedélyezés feltételeinek, a gyártási folyamatnak, és a végtermék minőségének szigorúbb ellenőrzését hozza magával. Ennek megfelelően az oltóanyag előállítása az alapanyagoktól a végtermékig rendkívül szigorúan szabályozott biológiai folyamat. Matematikai elemzések mutattak rá, hogy egyetlen kielégítő ellenőrzési rendszer sem alapulhat csak a végtermék ellenőrzésén. A végtermékből vett minták eredményei alapján nem ítéhető meg a gyártási tétel egészének minősége, illetve a gyártási tétel egészét megfelelő konfidenciaszinten reprezentáló minták száma olyan magas lenne, amely szakmailag is, és gazdaságilag is értelmetlenné tenné az eljárást. A probléma megoldása a komplex Minőségbiztosítási Rendszer (QA), azaz azon megtervezett és szervezett munkák összessége, amelyek végigkísérik az egész termelési folyamatot és amelyek betartásával megvalósítható, hogy a készítmények minősége megfeleljen a felhasználás céljainak. Ez magába foglalja egyrészt a GMP-t, vagyis azokat az intézkedéseket, amelyek betartásával elérhető, hogy a terméket mindenkor olyan követelmények szerint gyártsák és ellenőrizzék, amelyek biztosítják, hogy ezek a termékek a forgalombahozatali engedély követelményeinek eleget tegyenek és megfeleljenek arra a célra, amire szánták. A QA további elemként tartalmazza a Minőségellenőrzést (QC), amely a mintavétellel, a minőségi előíratok készítésével, a vizsgálatok elvégzésével, ezen kívül a szervezés, dokumentálás és felszabadítás ügyével foglalkozik, biztosítja továbbá, hogy csak megfelelő minőségű anyagokat használjanak fel. Ennek eredménye a hatékonyabb és biztonságosabb oltóanyag. A fenti irányzat egyik hátránya a vakcina fejlesztés és gyártás megnövekedett költsége.

Az oltóanyagok minőségének ellenőrzése nem csak a termék piaci értéke miatt

jelentős, hanem az *állatállományra, állati eredetű élelmiszerekre, a környezetre gyakorolt hatása, valamint az oltóanyagtermelés biológiai jellege* miatt is fontos. Az oltóanyagoknak az OIE ajánlásai szerint négy fő szempontot kell teljesíteniük: a **tisztaság** (purity), az **ártalmatlanság** (safety), a **hatékonyság** (efficacy) és a **hatásérték** (potency) kritériumait. A termék *tisztasága* azt jelenti, hogy az előállítás során a különböző gyártási fázisokat, illetve a végterméket meg kell vizsgálni kontamináció jelenlétére. A vakcina *ártalmatlan*, ha a végtermék nem okoz adverz reakciókat, illetve megbetegedést, esetleges mellékhatásai pedig egy elfogadhatósági szinten belül vannak. A *hatékonyság* vizsgálatoknál a vakcinának célállaton történő fertőzéssel szemben is bizonyítania kell az alkalmasságát. A *hatásérték* pedig az az érték, amelynek elérése esetén a deklarált hatékonyság biztosítható. Ez például élő vakcinák esetében az ampullában található élő vírus, vagy antigén meghatározását jelenti.

Az oltóanyagok minőségének biztosítása érdekében a gyártó és az állami hatóság végez ellenőrzést. A gyártó a fentebb említett minőségbiztosítási rendszer működtetésével, a kritikus gyártási lépések meghatározásával, illetve folyamatos ellenőrzésével öröködi a termék minősége felett. Az előállítás lépéseit, műveleteit a dokumentálják. Az állami hatóság a törzskönyvi dokumentáció, illetve a törzskönyvi minta (vakcina) vizsgálatát végzi.

A továbbiakban az állami hatóság ellenőrzési eljárását tekintem át. A hatósági beavatkozásnak háromféle módját különböztetjük meg:

1. A gyártási és ellenőrzési követelmények megállapítása.
2. A törzskönyvezési eljárás szigorítása.
3. A termék ellenőrzése.

A követelményrendszer országonként nagyfokú eltéréseket mutat. A szabad kereskedelmet korlátozó, illetve nehezítő szabályok leküzdésével több nemzetközi szervezet foglalkozik. Az Office International des Epizooties (OIE) és az International Cooperation on Harmonisation

of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products (VICH) az állatgyógyászati készítmények követelményrendszerének harmonizálását végzi, a General Agreement on Trade and Tariffs (GATT) keretében növény- és állatvédelmi egyezmények születtek. A helyzetet bonyolítja, hogy nincsenek kötelező érvényű vizsgálati protokollok. A különböző nemzetközileg elfogadott és alkalmazott ajánlások párhuzamosan léteznek egymás mellett. Az Európai Gyógyszerkönyv (Pharmacopoeia Europea, PhEur), az OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, valamint az USA Code of Federal Regulations (CFR) rendszere szabályozza az oltóanyagok vizsgálatára, valamint betegség meghatározására, a kórokozók diagnosztizálására vonatkozó szabályokat. A követelmények harmonizálását a fentebb említett VICH bizottság végzi, jelenleg azonban a nemzetközi szervezeteknek nincs joguk felülbírálni a nemzeti hatóságok módszereit, döntéseit.

A hatóság által végzett vakcina ellenőrzésben, a jelenlegi magyar vizsgálati rendszer egyrészt vizsgálja a törzskönyvi mintát, ami alapján a forgalomba hozatali engedélyezés történik; másrészt a már engedélyezett termékek esetében is végez vizsgálatokat, amelyek évente minimum egy műszaki számra, vagy maximum az éves termelés összes műszaki számainak 30%-ára terjed ki. Egyes kiemelt betegségek elleni oltóanyagok esetén (baromfipestis, veszettség) minden gyártási tétel vizsgálata kötelező.

A törzskönyv alapján a következő vizsgálatcsoportok történnek rutinszerűen:

- tisztaság vizsgálat,
- fiziko-kémiai vizsgálat,
- ártalmatlanság vizsgálat,
- hatékonyság (efficacy) vizsgálat,
- hatásérték (potency) vizsgálat,
- idegen vírus kizárás,
- kiegészítő vizsgálatok (csak gyanú esetén).

A **tisztaság** vizsgálat során az oltóanyag más vírusoktól, baktériumoktól, gombáktól, illetve mycoplazmáktól való mentességét vizsgálják. A **fiziko-kémiai** vizsgálat az oltóanyagok pH-jára, sűrűségére, viszkozitására, térfogatára, *stb.*, valamint a liofilizált oltóanyag ún. maradéknedvesség tartalmára terjed ki. Az utóbbi célja a liofilizátum minőségét, eltarthatóságát befolyásoló nedvességtartalom százalékos értékének meghatározása, illetve, hogy az ampulla megfelelő lezártóságát ellenőrizze. A magas maradéknedvesség tartalom kedvezőtlenül befolyásolja a vakcina eltarthatóságát. A maradéknedvesség tartalom növekedése pedig arra utal, hogy az ampulla „ereszt”, ami ugyancsak kritikus az oltóanyag életidejét tekintve. Az **ártalmatlansági** vizsgálat során inaktivált vakcina esetén 2, élő vakcina esetén 10 adagot oltanak a használati útmutatóban javasolt módon, az ugyancsak a használati útmutatóban meghatározott legfiatalabb korú állatba. A **hatékonyság** vizsgálat során a vakcina *immunogén* alkalmasságát igazoljuk, többnyire (ha csak lehetséges) ráfertőzés révén. A **hatásérték** vizsgálat történhet „direkt” módon, amikor az oltóanyag antigéntartalmát határozzuk meg, illetve „indirekt” módon, amikor állatba oltás után az immunrendszer válaszát mérjük. Az előbbi esetben a hatásérték meghatározása történhet szövettényészetten, sejtvonalon, vagy élő állaton (egér, csirke embrió, napos csirke), illetve közvetlen –antigén-ELISA-val, kvantitatív PCR-rel, HA-val történő – mérés útján; az utóbbi esetben az ellenanyagválaszt mérjük ELISA-val, HAG-gal.

Nagyon fontos, hogy nem rutinszerűen további kiegészítő vizsgálatok történhetnek, ha bármilyen gyanú merül fel az adott termékkel szemben. Amennyiben a fenti vizsgálatok során a termék minőségi paraméterei nem bizonyulnak elégségesnek a termék forgalomba kerülését nem engedélyezik.

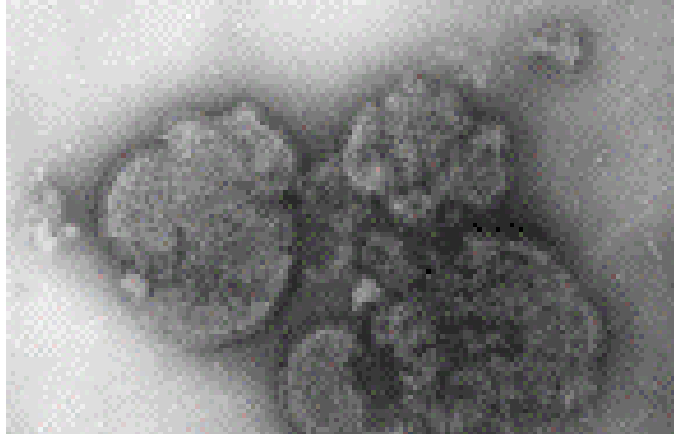
A termék engedélyezése utáni ellenőrzések alkalmával már “csak” a törzskönyvi vizsgálat során megállapított értékek gyártó által történő folyamatos szintentartását tesztelik.

Arra nézve, hogy az adott vakcina milyen törzset tartalmaz, csak és kizárólag azt a törzset tartalmazza-e, vagy annak egy homológ vagy heterológ kontaminált változatát, a

jelenlegi vizsgálati módszerek nem mindig adnak választ. A vakcinának azonban, mind piaci termékként, mind biológiailag aktív arculatát tekintve, kiemelkedően magas minőségi követelményeknek kell megfelelnie, aminek alapvető része, hogy a hatóság képes legyen ellenőrizni az ampulla aktív komponensét. A gyártó által az oltóanyaghoz felhasznált törzs azonosságát, kontaminációtól való mentességéről a hatóság csak indirekt módon, a gyártás szigorú minőségbiztosító rendszerének hibátlan működését feltételezve nyerhet adatokat a törzskönyvi dokumentációk átvizsgálásával.

Számos adat utal azonban arra, hogy a *biztonsági rendszabályok, szabványok ellenére* is az MSV más vírussal kontaminálódhat, vagy törzscsere történhet (Jørgensen *et al.*, 2000; Carroll-Pankhurst *et al.*, 2001; Giangaspero *et al.*, 2001). Éppen ezért az olyan módszerek rutinszerű alkalmazása mind a törzskönyvi, mind az engedélyezés utáni vizsgálatok alkalmával, amelyek képesek gyorsan és egyértelműen törzsszintű megkülönböztetésre, nagy jelentőséggel bírnak a hatósági ellenőrzésben.

3.6. Vizsgált problémák hátterének, illetve vírusok jellemzőinek rövid áttekintése



3.6.1. Az NDV vakcinák vizsgálata

A baromfipestis a baromfifélék egyik legsúlyosabb megbetegedése, amely általában járványként jelenik meg, légző- és emésztőszervi, idegrendszeri és vérfertőzős tünetektől kísérvé. A nemzetközi irodalomban Newcastle betegség névvel jelölik, mivel Doyle, angol kutató 1927-ben egy Newcastle-upon-Tyne környékén kitört eset leírásakor jellemezte a kórt és a kórokozót. Az NDV-nek különböző virulenciájú törzsei léteznek párhuzamosan a természetben, ezeket pathotípusoknak nevezik (Beard és Hanson, 1984). Az apathogen törzsek tünetmentes fertőzést idéznek elő, az alacsony virulenciájú, ún. *lentogén* törzsek enyhe légzőszervi tüneteket okoznak.

A közepes virulenciájú, ún. *mezogén* törzsek fiatal csirkékben enyhe elhullás mellett légzőszervi tüneteket, míg tyúkokban a tojástermelődés csökkenését okozzák (Hanson, 1980).

A virulens, vagy *velogén* törzsek kétféle kórformát idézhetnek elő: a pneumoencephalitist, amikor az idegrendszeri tünetekhez légzőszervek is kapcsolódnak, és a

bélgyulladásal, vérzésekkel, illetve gyors elhullással járó ún. viscerotróp kórformát.

A betegség megfékezésére már az 1940-es években megindult a vakcinafejlesztés Európában és az Egyesült Államokban. A kezdeti próbálkozások főleg inaktivált vakcina előállítására irányultak. Az első inaktivált vakcináról Hofstad és mtsai 1953-ban számolnak be. Piercy és mtsai (1964) adszorbeáltak először NDV-vel fertőzött allantois folyadékot alumínium hidroxiddal. Ezt a vakcinát az 1960-as években széles körben alkalmazták. Nedelciu és Dinculescu (1965) vizsgálták az olaj-adjuvált inaktivált vakcinákat, amelyet sikerrel alkalmaztak az 1970-71-es járványkor az Egyesült Királyságban és más európai országokban. Az ebből származó tapasztalatok megerősítették az inaktivált vakcinák értékét. Egyrészt a szerológiai adatok igazolták az inaktivált vakcina által keltett magas ellenanyagszintet, másrészt klinikai adatok támasztották alá, hogy a vakcinázott madarak mentesek voltak mind a kórtól, mind a tojás termelődési zavaroktól.

Az élő, attenuált vakcinákat illetően a virulencia csökkenéséről először Iyer és Dobson számolt be 1940-ben. Egy angliai izolátum (Herts 33) csirkeembrión való passzálásával gyenge virulenciájú törzset szelektáltak, ami H-vakcina (a Hertfordshire névből) jelzéssel került felhasználásra. A H-vakcinát a világ számos országában, többek között hazánkban is sikerrel alkalmazták járványok elfojtására és preventív immunizálásra. Ugyancsak Iyer nevéhez fűződik a Mukteswar nevű törzs szelektálása. A kor vakcinái attenuáltságuk ellenére jelentős maradékvirulenciával rendelkeztek, ami miatt 4 hetes kor alatt átmeneti bénulást is okozhattak, ezen kívül a csirkéket egyenként kellett oltani, ami alkalmazásukat nagyon megdrágította. Komarov és Goldsmid (1946) naposkacsa agyavelejébe oltva addig passzált egy palesztinai baromfipestis esetből izolált vírustörzset, amíg a vírus megbetegítőképességének nagy részét elveszítette. Az USA-ban izolált Roakin törzsből is készítettek vakcinát. A fentebb említett törzsek mindegyike mezogén patotípusú NDV.

Az igazi áttörést az alacsony virulenciájú, lentogén törzs megjelenése hozta. A B-1 és LaSota törzsek felfedezésével a vakcinázás már napos, illetve néhány hetes korban is

lehetségessé vált. Ivóvízbe keverve vagy aeroszolként tömeges vakcinázásra is alkalmasak, így első felhasználásuk óta napjainkig valószínűleg ebből a két vakcinavírusból készült termékből fogyott a legtöbb a világon.

Az NDV több genomrégiójának szekvenciaelemzése rávilágított, hogy kimutatható különbségek léteznek a vakcinatörzsek között az F és az M génjeikben. Az elmúlt időszakban több, különböző munkacsoport számolt be egymástól függetlenül ND vakcinatörzsek megkülönböztetésére alkalmas genetikai módszerek kifejlesztéséről (Wehmann *et al.*, 1997; Nanthakumar *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).

A PCR alkalmazása a vakcina ellenőrzésben törzsszintű megkülönböztetést tesz lehetővé (Davidson *et al.*, 2002; Lee és Jackwod, 2001; Wang és Khan, 2000; Seal *et al.*, 1995; Stäuber *et al.*, 1995). A hagyományos módszerekkel a vakcinavírus több biológiai jellemzőjét (pl. patogenitás) meg lehet határozni, azonban a törzskönyvi dokumentációban megadott és az ampullában konkrétan megtalálható vírus azonosságára, illetve különbözőségére nézve semmiféle ismeretet nem nyújtanak. Az egyedi vakcinavírusokról a hosszú évek során a gyakorlati felhasználás, illetve a különböző vizsgálatok révén rengeteg információ halmozódott fel. A LaSota, illetve B-1 törzsek meghatározott ICPI, IVPI indexszel, valamint MDT értékkel jellemezhető lentogén törzsek. Nem ismerünk olyan LaSotára jellemző nukleotidszekvenciájú törzset, amely mezogén vagy velogén lenne. Emiatt, ha egy adott oltóanyag vakcinavírusát a genetikai vizsgálat LaSotaként határozza meg, akkor biztosak lehetünk benne, hogy a LaSotára jellemző ICPI, IVPI indexszel és MDT értékkel bíró, lentogén törzssel van dolgunk, amely e tulajdonságainak megfelelően fog viselkedni a felhasználás során, ha egyéb zavaró körülmény, pl. idegen ágens jelenlétével nem kell számolnunk.

Vizsgálataink során különböző gyártók 12 baromfipestis elleni, élő, attenuált vakcináját vizsgáltuk (1. táblázat).

1. táblázat: Az RT-PCR-rel és restrikciós enzim analízissel vizsgált vakcinatörzsek
 A táblázat a vizsgált vakcinákat mutatja, az RNS extrakciója *közvetlenül az ampullából* történt.

A gyártó kódja (Az elvárt törzs)	Gyártási tétel (lejárati idő)	A talált törzs
N (LaSota)	^a 1 (03.2002)	LaSota
M (VGGA)	2 (11.1998)	V4 Queensland
T (B1)	3 (01.1998)	B-1
T (B1)	4 (01.1999)	B-1
T (LaSota)	5 (01.1998)	LaSota + B-1
T (LaSota)	6 (01.1999)	LaSota + B-1
T (LaSota, IBV)	7 (10.1998)	LaSota + B-1
N (Clone 30)	8 (03.2002)	LaSota
P (LaSota)	9 (06.2002)	LaSota
F (Ulster 2C)	10 (04.2001)	Ulster 2C
A (LaSota)	11 (04.2000)	LaSota
I (LaSota)	12 (05.1997)	LaSota

^akódjaink

3.6.2. Az NDV morfológiája, genomszerkezete

Az NDV a *Mononegavirales* rend *Paramyxoviridae* családjának *Avulavirus* genusába tartozik (Murphy *et al.*, 1995). Az NDV-t másképpen paramyxovírus-1-nek is nevezik, megkülönböztetésül a többi kilenc avian paramyxo szerotípustól.

A viriont lipid bilayer határolja, a burkon belül helikális felépítésű nukleokapszid található. Az NDV genomja folyamatos, egyszálú, negatív irányultságú RNS molekula, amely

15186 nukleotidából áll. A genom 6 gént tartalmaz a következő sorrendben: 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', ahol az NP a nukleoprotein, a P a foszfoprotein, az M a mátrix fehérje, az F a fúziós fehérje, HN a haemagglutinin-neuramidáz enzim és az L a polimeráz.

3.6.2.1. Az NDV főbb proteinjeinek rövid jellemzése

Haemagglutinin-neuramidáz

Az NDV-nél egyetlen polipeptidnek, a HN-nek van haemagglutinin és neuramidáz aktivitása (Scheid és Choppin, 1973). A vírus a HN segítségével adszorbeálódik a sejtfelszíni receptorhoz, illetve a neuramidáz aktivitása szünteti meg a kapcsolatot. Az NDV HN-fehérjéje számos állatfaj vörösvérsejtjéhez képes kapcsolódni és agglutinálni azokat, habár a vörösvérsejtek nem célsejtjei a vírusnak. Számos laboratóriumi teszt alapszik haemagglutináción, az antitestek detektálásában pedig különösen elterjedt szerológiai próba a haemagglutinációgátlás (Allan és Gough, 1974).

A HN-fehérje az F-fehérjével kialakított kapcsolata révén szerepet játszik a fúzió elősegítésében is (Hu *et al.*, 1992; Lamb, 1993). Egyes törzseknél a HN-fehérjét kódoló génben a STOP-kodon pozíciója különbözhet, így a transzlációs termék hossza is változhat (616 aminosav: D26/76, Queensland V4, Ulster 2C; 577 aminosav: B-1, LaSota, Beaudette C, Texas GB; 571 aminosav: Australia Victoria, Herts 33, Italien/45; Sakaguchi *et al.*, 1989). Sakaguchi és mtsai (1989) összefüggést találtak a virulencia és a HN-méret között.

Az F fehérje szerepe a vírus életciklusában

Az F-fehérje 553 aminosav hosszú, keletkezésekor egy ún. F₀ prekursor protein szintetizálódik, és ezt hasítják a gazdasejt proteázai egy F₁ és F₂ fehérjére. A fertőzés során a vírus lipoproteinburka az F-fehérje révén fuzionál a célsejt sejtmembránjával (Lamb, 1993).

Az F-fehérjék felelősek a szövettényészetben megfigyelhető syncytiumképződésért, mivel az F-fehérjék a szomszédos sejtek membránjainak keresztkapcsolásával a fertőzött és nem fertőzött sejtek fúzióját eredményezik. Ez a folyamat elősegíti a vírus humorális ellenanyagoktól védett módon, sejtől-sejtbe történő terjedését.

Az F₀ prekursor protein hasítási helyének vizsgálatával sikerült összefüggést találni a hasítási hely előtt lévő aminosavak bázikussága és a virulencia között (Toyoda *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1993; Seal *et al.*, 1995). A hasítási hely 6 aminosavból áll, a virulens NDV-törzseknél bázikus aminosavakat tartalmaz és ezek felelősek a proteázzal szembeni érzékenységért. A lentogén törzseknél két bázikus aminosav található, a velogén törzseknél négy. A fentiek alapján alakult ki az a nézet, hogy a patogénitász fő meghatározója az F₀ hasítási hely. Peeters és mtsai (1999) bebizonyították, hogy ha az avirulens vírus hasítási helyét (¹¹¹G-G-R-Q-R↓L¹¹⁷) a virulens törzsekre jellemző (¹¹¹G-R-R-Q-R-R↓F¹¹⁷)-re alakítják át, akkor az avirulens vírus virulenssé válik.

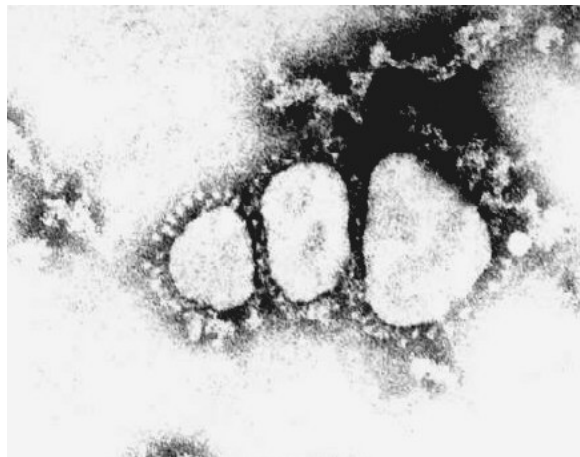
A fentiek alapján az OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines 2.1.15 fejezete a baromfipestist úgy határozta meg, mint „olyan madár paramyxovírus 1-es szerotípusba tartozó vírus által okozott fertőzés, amelynek virulenciáját vagy a ≤0,7 ICPI index jellemzi, vagy az F₂ protein C-terminusának 113-116. pozíciójában legalább három arginin vagy lizin aminosav helyezkedik el, illetve az F₁ protein N-terminusának 117-es pozíciójában fenil-alanin van.”

Az M-fehérje szerepe a vírus életciklusában

Az NDV M-fehérjéje 364 aminosavból áll. A virionok összeszerelésében, sejtől való kijutásukban, valamint valószínűleg a replikáció szabályozásában játszik szerepet. Az M-fehérje a sejtmembrán azon részeihez kötődik, ahová már beépültek a vírus transzmembrán proteinjei (HN és F). Az M-fehérje C-terminális részén lévő pozitív aminosavakkal

kapcsolódik a nukleokapszidhoz (McGinnes és Morisson, 1986; King és Seal, 1998; Seal *et al.*, 1998), valamint a hidrofób részei révén a sejtvázzal és a plazmamembránnal is kapcsolatot létesít.

3.6.3. Csirkék fertőző bronchitis vírusa



Az IBV a házi tyúk (*Gallus gallus*) világszerte elterjedt kórokozója. A vírus a légzőszervi és urogenitális traktusban replikálódik, ami a légzőszervi tünetek mellett a tojánhéj minőségének romlását és a tojás mennyiségének csökkenését vonja maga után (King *et al.*, 1991). Amióta Schalk és Hawn 1931-ben leírta az USA-ban a kórt, több, virulenciájukban jelentősen eltérő törzs jelent meg (Fabricant, 1998). Napjainkban több mint 20 különböző szerotípus ismeretes.

A fertőző bronchitis elleni küzdelem fontos eszközei az élő, attenuált vakcinák. A Massachusetts szerotípusból készített vakcinák megfelelő védeltséget biztosítanak a homológ törzsek ellen. Az ilyen típusú vakcinák világszerte elterjedtek (Sharma, 1999). Az élő vakcinák hátránya azonban, hogy a szabad természetben terjedhetnek (Meulemans *et al.*, 2001), ami komoly járványügyi problémát jelent, mivel az élő Massachusetts vakcinatörzsek és a vad Massachusetts-típusú törzsek elkülönítése körülményes. További probléma, hogy a

Massachusetts-típusú vakcinák által keltett immunválasz más szerotípusokkal szemben nem elégséges (Cavanagh *et al.*, 1997). Mivel új szerotípusok az IBV genomjának változásai – deléciók, inszerciók, pontmutációk és némely esetben rekombináció – révén folyamatosan keletkeznek (Jia *et al.*, 1995; King, 1988; Lee és Jackwood, 2001; Wang *et al.*, 1994), az újonnan feltűnő variánsok gyors és megbízható azonosítása rendkívül fontos (King, 1988; Kwon *et al.*, 1993; Lee és Jackwood, 2001) az IBV elleni küzdelemben.

Figyelembe véve ezeket a veszélyforrásokat, fontos, hogy tanulmányozzuk a vakcinák szabadban való terjedését és a megbetegedésekben való szerepüket. Megfelelő gyakorlati módszerek szükségesek a vadvírusok és a szabadban terjedő vakcinavírusok megkülönböztetésére. A terjedő és tüneteket okozó vakcinavírus tanulmányozására, vizsgálatainkhoz Svédországot választottuk helyszínül, ahol a természetes IB előfordulás alacsony, és a vakcinahasználat csak eseti és jól dokumentált formában történik. Svédországban az utolsó természetes IB eset (jelen tanulmány tárgyát nem számítva) az 1970-es években történt. IBV ellen az országban 1997-ig nem volt vakcinázás.

A vizsgálatok alapját képező IB járványeset első kitörését 1994 februárjában jelezték egy tojóállományban. Ezt 1995-ben tojók és húshibridek közötti megbetegedés követte. Mivel az állományban a klinikai tünetek mind erőteljesebbé váltak, 1997 tavaszán az állategészségügyi hatóságok élő, attenuált vakcinával történő immunizálásra adtak engedélyt. A vakcinázási gyakorlat bevezetése után számos állományban számoltak be tojástermelődési problémákról, és nem lehetett kizárni, hogy ezt a terjedő vakcinavírus okozta, ami összetett járványügyi helyzetet eredményezett. Mindezek a problémák kiemelték a szükségességét i.) egy IBV észlelésre és azonosításra alkalmas érzékeny és specifikus módszer kifejlesztésének; ii.) a vad vírusok közötti genetikai rokonság felderítésének, különös tekintettel a vakcinavírus esetleges szerepére.

A fentebb említett problémák két homlokegyenest különböző megközelítést igényelnek, ezért két RT-PCR-t fejlesztettünk ki: egy diagnosztikai jellegűt és egy

filogenetikai jellegűt. A diagnosztikai PCR alapjául az N gén legkonzervatívabb szakaszát választottuk, hogy minden lehetséges IBV variánst megfelelő érzékenységgel detektálhasson. A filogenetikai rokonsági viszonyok megállapítására pedig az IBV genom hipervariábilis szakaszán, az S1-en alapuló PCR-t terveztünk. A PCR termékek nukleotidszekvenciáját meghatároztuk és összehasonlító analízist végeztünk a kórokozók filogenetikai rokonsági viszonyainak felderítésére.

3.6.3.1. Coronavírusok struktúrája

A coronavírusokat először a negatív kontraszt festésű elektronmikroszkópos kép alapján csoportosították (Almeida *et al.*, 1968). Az IBV a *Coronaviridae* család tagja, a genomját egy 27,6 kb méretű, egyszálú, pozitív irányultságú RNS alkotja. A virion átmérője kb. 80-100 nm, három fő struktúrális proteint tartalmaz: az S glikoproteint, az M proteint és az N proteint.

A coronavírus sematikus rajza a 2. ábrán látható. A helikális ribonukleoproteint lipid burok veszi körül. A vírus az életciklusához szükséges polimeráz proteint maga szintetizálja, ami azonban nem épül be a virionba, de a replikációban kiemelkedő szerepe van.

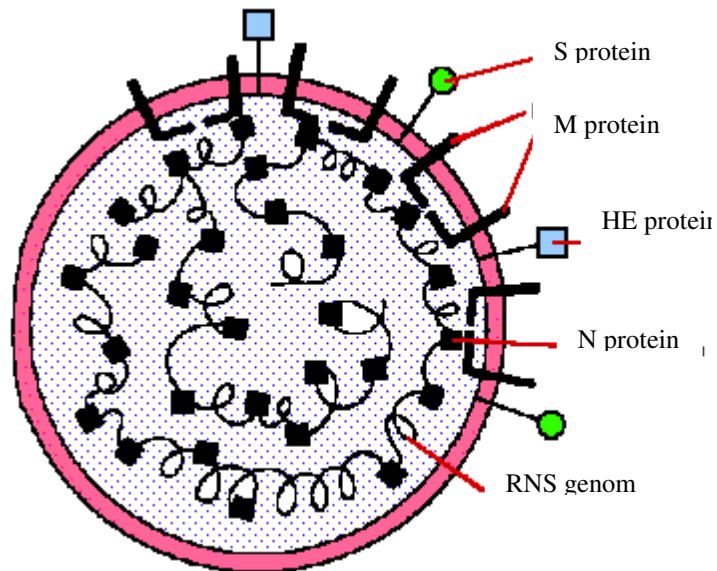
3.6.3.2. A fertőző bronchitis szerkezeti fehérjéinek rövid jellemzése

Nukleokapszid protein (N)

A többi burkos RNS vírushoz hasonlóan (pl. paramyxovírusok, illetve rhabdovírusok) a coronavírusok is helikális szimmetriájú nukleokapsziddal rendelkeznek, az N proteinjük is hasonló méretű, 50 kDa. A protein foszforilált, de nem glikolizált. A nukleotid szekvenciát több IBV törzsnél is meghatározták, és hat törzs esetében (Ark99, Gray, KB8523, H52, M41) a hasonlóság 94,4% és 98,8% közé esik (Collisson *et al.*, 1990). Minden IBV a 165-195.

szakaszon szerin-gazdag régiót tartalmaz, amely valószínűleg egy foszforilációs hely (Armstrong *et al.*, 1983). Az N protein az RNS genommal asszociálódik szorosan (Williams *et al.*, 1992; Zwaagstra *et al.*, 1992), és valószínűleg a transzkripcióban és a translációban játszik szerepet.

2. ábra: Az IBV szerkezete és fehérjéi



Membrán protein (M)

A membrán protein 23 kDa molekulásúlyú, erősen glikolizált molekula. A glikolizáció az IBV esetében az aszparagin N terminálisán keresztül kapcsolódik. A szekvenciáját tekintve, az M protein 3 hidrofób régiót tartalmaz, ami arra vall, hogy keresztülnyúlik a membránon (Boursnell *et al.*, 1989).

Spike protein (S)

Az S protein molekulásúlya a glikolizáltságtól függően 150-160 kDa. Az IBV spike proteinje ún. poszt-transzlációs hasítás útján jön létre, amely eredményeképpen egy S1 és egy S2 protein képződik. (Cavanagh, 1983a, b). Az S1 megfelel az eredeti protein N-terminális részének, míg az S2 a C-terminálisnak. Az S1 sokkal kifejezettebb variabilitást mutat, mint az S2, és több kutató is úgy gondolja, hogy a szerotípusok kialakításáért döntően az S1 felelős. Az S glikoprotein gömbalakú részletét az S1 képezi, míg a membránba horgonyzásban alapvetően az S2 vesz részt.

Az S glikoprotein a vírus fertőzőképességének kialakításában kulcsszerepet játszik. Az S protein kapcsolódik a sejt felszíni receptorfehérjékhez, valamint szerepet játszik a sejtmembrán és a vírusemembrán fúziójában. Az IBV esetében, az S protein felelős a hemagglutinációért. A vírusfertőzés során képződött anti-S ellenanyagok meggátolják a membránfúziót, és neutralizáló sajátsággal bírnak. Az IBV molekuláris azonosítása főleg az S génen alapuló módszerekkel történik (Handberg *et al.*, 1999; Kingsham *et al.*, 2000; Li és Yang, 2001; Lin *et al.*, 1991).

Kis membrán protein (sM)

Az sM-protein molekulásúlya 12,5 kDa, a proteint az ORF3c gén kódolja. Valószínűleg egy struktúrelem, amely az S és M proteinekkal együtt játszhat szerepet a vírus összeépülésben és a virion sejten belüli szétesésében.

3.6.3.3. A Coronavírusok rekombinációja

A rekombináció a DNS, illetve RNS szál átkereszteződése révén létrejövő géncsere. A

rekombináció jelenségét a diagnosztikában és a vakcinavírusok hatósági célú azonosítása során figyelembe kell venni, mint a kimutathatóságot, illetve azonosíthatóságot befolyásoló jelenséget. A rekombináció jelenségét röviden az IBV példáján tekintjük át.

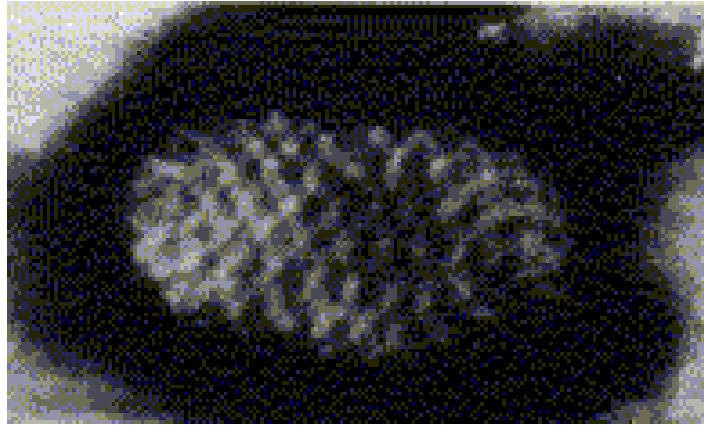
Az IBV génjei között az S gén, azon belül is az S1 szakasz, mutatja a legnagyobb mértékű hajlamot rekombinációra. Az N és M gének konzervatívak, rekombinációs hajlamuk viszonylag alacsony mértékű. A legtöbb filogenetikai PCR az IBV S1 génjén alapszik, amely a legnagyobb variabilitást mutatja, így rokonsági vizsgálatokra a legalkalmasabb. A rekombináció több állati és növényi vírus jellegzetes tulajdonsága. Az IBV esetében mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletek bizonyítják a rekombináció létét. *In vivo* rekombinációra közvetett bizonyítékot szolgáltatott, hogy az S és M gének szekvenálásakor olyan konzervatív doméneket találtak, amelyek több IBV izolátumon belül is homológiát mutatott (Cavanagh és Davis, 1988; Kusters *et al.*, 1989; Cavanagh *et al.*, 1990). Ennek valószínűleg az az oka, hogy rekombináció történt és ez eredményezi, hogy különböző vírusok bizonyos genomrégiói nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Wang és mtsai (1994) számoltak be egy PP14-es jelzésű, Massachusetts törzssel oltott állatból izolált törzsről, amelynek S1 génjének 5' fele Massachusetts jellegű volt (96% hasonlóság), az azt követő 402 bázis az Ark99 (Arkansas szerotípus) jelzésű törzssel mutatott 94% hasonlóságot. A 3' hipervariábilis régió (HVR), ami a Massachusetts szerotípusnál teljesen hiányzik, 99%-ban szintén az Ark99 törzsre hasonlított. A 3' HVR utáni 33 bp, amely egy ún. átkeresztződési hely (cross-over site) az SE17 jelzésű törzssel mutatott 95% egyezést.

Hasonló jelenséget észlelt Jia és mtsai (1995) a CU-T2-es törzsnél, amely eredetileg Arkansas típusú, ám S1 génjébe a H52 vakcinatörzs (Massachusetts szerotípus) fragment található. Mivel a törzs azonosítását, osztályozását tévútra viheti egy-egy rekombináció útján beékelődött génszakasz, a jelenséggel mindenképpen számolni kell, amikor filogenetikai, illetve törzsklasszifikációs munkát végez a kutató.

A vakcina adverz hatások vizsgálatánál szintén kellő körültekintéssel kell eljárni,

mivel a mezei és a vakcinatörzsek között kicserélődhetnek génszakaszok (Jia *et al.* 1995), amely egyrészt a vakcina egyértelmű azonosítását megnehezítheti, másrészt szerepet játszhat a vakcinavírus virulencianövekedésében is.

3.6.4. Myxoma vírus: atípusos myxomatosis



A myxoma vírus felelős a házi, illetve üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) populáció súlyos megbetegedésének, a myxomatózisnak a kialakulásáért. A kórokozónak két fő földrajzi típusa van: a dél-amerikai típus, amelynek természetes gazdája a *Sylvilagus brasiliensis* és a kaliforniai típus, amelynek természetes gazdafaja a *Sylvilagus brachmani*. A természetes gazdafajokban a vírus csak jóindulatú bőrfibrómákat okoz (Kerr és Best, 1998), míg az házi nyúl-fajokban mindkét földrajzi típus súlyos, fatális kimenetelű megbetegedést okoz.

A betegséget először Uruguayban írták le 1898-ban, majd a kórokozót 1927-ben sorolták a *Poxviridae* családba (Fenner, 1994). A dél-amerikai típusú myxoma vírus 1950-ben mesterséges emberi beavatkozás révén került kapcsolatba a Ausztráliában vadon élő nyúlpopulációval, mivel a myxoma vírus révén akarták a nyulak túlszaporodását meggátolni. Hasonló céllal Franciaországban is alkalmazták az MV-t, ahonnan kiindulva a kórokozó egész Európában gyorsan szétterjedt és enzootikussá vált (Arthus és Louzis, 1988). A betegséget hazánkban először 1959-ben figyelték meg (Vetési, 1990).

A betegségnek megjelenését tekintve két fő formája van: az ún. *myxomatózis* forma (másnéven tipikus), amelyen belül megkülönböztetünk klasszikus (Széky és Benedek, 1969) és noduláris altípust (Benedek, 1968), valamint az *amyxomatózisos* (másnéven atípusos vagy krónikus légzőszervi) forma (Marlier *et al.*, 2000). A klasszikus forma legjellemzőbb vonásai a fej- és arctájék duzzadtságával együttjáró mukoid jellegű bőrtumorok, amelyeket myxoma névvel jelölünk, utalva ezzel a göbök vágási felszínének mukoid jellegére (Benedek, 1968). További vonás az immunrendszer súlyos zavara, amely a másodlagos Gram-negatív bakteriális fertőzések eluralkodásához vezet. A klasszikus forma terjedésében a vérszívó rovarok pl. szúnyogok, játszanak szerepet (Benedek, 1968). Az átvitel passzív módon történik, a myxoma vírus nem szaporodik a vektorban, hanem a rovar szájszervéhez tapad (Fenner és Ratcliffe, 1965). A klasszikus forma halálozási aránya a vírus törzstől függően 20 és 100% között van.

Ezzel ellentétben az atípusos formára alig vagy egyáltalán nem jellemzőek a bőrelváltozások. A legfőbb klinikai tünetet a légzőszervi elváltozások jelentik. Valószínű, hogy az atípusos myxomatózis nem vérszívó rovarok útján terjed (Boucher és Nouaille, 2002). A myxomatózisnak ez a fajtáját eddig Franciorszámban (Brun *et al.*, 1981; Joubert *et al.*, 1982), valamint Belgiumban (Marlier és Vindevogel, 1996) figyelték meg. Az atípusos forma eredete jelenleg nem ismert, lehetséges magyarázatul az alábbi három hipotézis szolgál:

- i.) Kaliforniai típusú törzsek behurcolása Európába, mivel a kaliforniai törzs kísérleti körülmények között az európai nyúlban nagyon hasonló tüneteket okoz.
- ii.) A közel 50 éve Európában folyamatosan jelenlévő dél-amerikai típus mutációja (Arthus és Louzis, 1988).
- iii.) Az SG33 jelzésű vakcinatörzs bevezetése és az atípusos forma megjelenése közel egybe esik, ezért Brun és mtsai (1981) az SG33 vakcinatörzs és a vad, dél-amerikai törzsek rekombinációját tekintik valószínű okként.

Jelen tanulmányban az atípusos myxomatózis első közép-európai megfigyeléséről számolunk be. A kór szokatlanul lassú progressziót mutatott és Shope-fibróma vírus tartalmú vakcinával oltott állományban jelent meg téli időszakban, amikor a vérszívó rovarok jelenléte nem jellemző.

Vizsgálatokat végeztünk, i.) a betegség természetének és lefolyásának tanulmányozása; ii.) a vírus izolálása iii.) genetikai jellemzése céljából.

3.6.4.1. A myxoma vírus rövid jellemzése

A myxoma vírus a *Poxviridae* család, *Leporipoxvirus* genusába tartozik. A virion 200-400 nm hosszú, téglateszerű. A vírusrészecskék rendkívül bonyolult felépítésűek, számos proteint tartalmaznak, amelyeknek pontos szerkezete nem ismert. A virion felépítését tekintve megkülönböztetünk sejten kívüli, két membránnal rendelkező formát (ún. extracelluláris burkos virion) és a sejten belüli, egymembrános formát (intracelluláris érett virion). A külső felszín főleg lipidekből és proteinekből áll, és a nukleoproteinekből álló vírusmagot veszi körül.

A vírusrészecskén belül kb. 10 enzim található, amelyek a vírus örökítőanyag metabolizmusában, replikációjában vesznek részt. A genom 163 kb méretű, duplaszálú DNS, amelynek végein hajtűalakú ún. tandem repeat szekvenciák helyezkednek el. A genom közel 200 gént tartalmaz, a replikáció a fertőzött sejt citoplazmájában történik (Moss, 1996).

4. SAJÁT VIZSGÁLATOK

4.1. LENTOGEN BAROMFIPESTIS VAKCINA: HOMOLÓG KONTAMINÁCIÓ

4.1.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vírusok

Vizsgálataimhoz 12, különböző cég által előállított és az ÁOGYTI-ba engedélyeztetési eljárás céljából beküldött vakcinát használtam. Valamennyi vakcina élő, attenuált NDV-t tartalmazott. A törzskönyvi dokumentáció szerint LaSota, B-1, VG/GA, illetve Ulster 2C törzseket tartalmaztak.

Virális RNS kinyerése

Az RNS extrakció közvetlenül az ampullából – tojásban való elszaporítás nélkül – történt. A liofilizált oltóanyagot 2 ml DEPC-es ddH₂O-ban oldottuk fel, amelyből 500 µl mennyiségű folyadékból extraháltuk az RNS-t Proteináz K emésztést (Sigma-Aldrich, MO, USA) követő fenol-kloroformos kezelés útján. A csapadékot 25 µl kétszer desztillált (dd) DEPC kezelt vízben vettük fel, és felhasználásig mínusz 70°C-on tároltuk.

Reverz transzkripció

A cDNS szintézis 25 µl végtérfogatban történt, amely 8 µl DEPC-es vizet, 5 µl 1x first-strand puffert (Gibco, Bethesda, Maryland, USA), 0,02 U random hexamert (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1-1 µl dNTP-t (10 mM), 1 µl RNAGuard-t (Pharmacia, Uppsala, Sweden) és 1 µl

Moloney murine leukémia vírus reverz transzkriptázt (Gibco BRL, Bethesda, MD, US), valamint 5 µl mintát tartalmazott. A reakcióelegyet 37°C-on 90 percig inkubáltuk, majd az enzim inaktivációja 5 perc 98°C-os melegítéssel történt.

Plakk tisztítás

A vakcinavírusokat csirke embriótüdő (CEL) szövettenyészetben szaporítottuk el (Lomniczi, 1974). A legmagasabb hígításból származó plakkokat embrionált tojásba oltottuk. Minden ampullából 3-3 plakkot izoláltunk és a második plakktisztítás után ismét embrionált tyúktojásba oltottuk. Végül PCR-t és RFLP-t végeztünk.

PCR

A reakció 100 µl végtérfogatban történt, amely 10 µl 10x PCR puffert (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl és 1 mg/ml BSA), 10 µl MgCl₂-ot, 1-1 µl dNTP-t (10 mM, Pharmacia, Uppsala, Sweden), 30-30 pmol primert, 2 U Taq polimerázt (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 5 µl cDNA-t tartalmazott. A reakcióelegyet ddH₂O-val 100 µl-re egészítettük ki és a párolgás megakadályozása céljából 1 csepp ásványi olajat adtunk hozzá (Sigma-Aldrich, MO, USA). Az amplifikációt GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) készülékkel végeztük 35 cikluson át. A termoprofil az M gén RT-PCR esetében a következő volt: 94°C 45 sec, 57°C 1 perc, 72°C 2 perc és végül 72°C 7 perc zárta a reakciót. Az F gén RT-PCR termoprofilja a következő lépésekből állt: 5 ciklus 94°C 45 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 perc, majd 30 ciklus 94°C 45 sec, 48°C 1 perc, 72°C 3 perc. A záró extenzió 72°C 7 perc volt. Az IBV RT-PCR termoprofilját a következő lépések képezték: 5 cikluson át 94°C 45 sec, 58°C 30 sec, 72°C 2 perc, majd 30 ciklus 94°C 45 sec, 54°C 1 perc és 72°C 3 perc. A reakciót 10 perc 72°C extenzió zárta.

A nested IBDV RT-PCR 100 µl végtérfogatban történt. Az első PCR 4 µl MgCl₂ (25

mM) 50-50 pmol primert, 1-1 µl dNTP-t, 2,5 U Taq polimerázt és 1x PCR puffert (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl) tartalmazott. A második PCR-ben a reakcióelegy összetétele primerek, illetve a Mg (3 µl) kivételével a fentiekkel megegyezett. A nested IBDV RT-PCR termoprofilja a következő volt: 95°C 1 perc, 60°C 1 perc 30 cikluson át, majd 60°C 7 perc zárólépés (első PCR); 94°C 1 perc, 52°C 1 perc, 72°C 2 perc 25 cikluson át (második PCR). A felhasznált primereket a 2. táblázat tartalmazza.

Restriktív emésztés és elektroforézis

A PCR után a teljes reakcióelegyet (olaj nélkül) 1,5 ml térfogatú Eppendorf csőbe átpipettáztuk és 1 ml n-butanollal kevertük össze. A felülúszót 5 perc 15000 g-n való centrifugálás után leöntöttük és a csapadékot kiszárítottuk, majd 15 µl DEPC-es ddH₂O-ban felvettük. Miután két részre osztottuk, a megfelelő restriktív enzimpufferből 2 µl-t, valamint 8-12 U *Hinf*I, illetve *Mbo*I restriktív enzimet (Promega, Madison, WI, USA) adtunk hozzá. A PCR termékek emésztése egész éjszakán át 37°C-on történt. Ezt követően a reakcióelegyet glicerol tartalmú futtató pufferrel kevertük össze és 2%-os agaróz (Sigma-Aldrich, MO, USA) géltre vittük. Markerként 100 bp DNS létrát használtunk (Sigma-Aldrich, MO, USA). A futtatás 10V/cm mellett kb. 2 óráig tartott, ezt követően a gélt 1,5 mg/ml koncentrációjú EtBr oldatban 10 percig festettük, majd UV megvilágítás mellett leolvastuk.

2. Táblázat: A primerek szekvenciája, elhelyezkedése és pontos genompozíciója

NDV M gén

M1	TCT AGG ACA ATT GGG CTG TAC TTT GAT T	3299-3326 ^a
M2	AGA GAC GCA GCT TAT TTC TTA AAA GGA TTG	4366-4395 ^a

NDV F gén

1a	TGA CTC TAT CCG TAG GAT ACA AGA GTC TG	4381-4359 ^a
4a	GAT CTA GGG TAT TAT TCC CAA GCC A	6155-6179 ^a

^aA B-1 törzs alapján, génbanki referenciaszám: AF309418

IBV S2 gén

BS2U	TTR CCK CCY ATY ATA ACR GCA GAA ATG	2281-2308
BS2L	ATT AGG WGC RTT YTG BGG TAT GG	2840-2863 ^b

^bA pozíciókat a D274 törzs alapján adtuk meg (génbanki referenciaszám: X15832). A primerek a génbankban elérhető valamennyi IBV S2 gén alignmentje alapján készült.

IBDV VP2 gén

P1 ^a	TCA CCG TCC TCA GCT TAC	587-604
P2 ^a	TCA GGA TTT GGG ATC AGC	1212-1229
P2.3 ^b	CCC AGA GTC TAC ACC ATA	701-713
RP5.3 ^b	TCC TGT TGC CAC TCT TTC	1109-1121

^aref: Hung-jen et al., 1994.

^bref: Zhifeng et al., 1993.

Restriktációs enzimhasítóhelyek fizikai térképe

Wehmann és mtsai (1997) elkészítették a LaSota és a B-1 törzsek esetében az M génről készült PCR termék restriktációs emésztéssel nyert fragmentumainak fizikai térképét (4. ábra).

A fizikai térkép a GCG programcsomag Map és Mapsort programjaival készült.

4.1.2. EREDMÉNYEK

Vizsgálataink során 12 az ÁOGYTI-ba engedélyezés céljából beküldött NDV vakcinával végeztünk kísérleteket, hogy az ampullában lévő vakcinavírust azonosítsuk. Az RNS extrakciót közvetlenül az ampullából végeztük előzetes tojásban való elszaporítás nélkül. A liofilizátumot 2 ml ddH₂O-ban oldottuk fel. Mivel néhány esetben azt tapasztaltuk, hogy az ampullában található egyéb adalékanyagok gátolják az RT-PCR-t, ezért 2-4-szeres hígítást alkalmaztunk, hogy kiküszöböljük a gátló hatást. Két eset kivételével, a vizsgálatok a törzskönyvi dokumentáció által megadott vírustörzs jelenlétét erősítették meg. Az 3A. és 3B. ábra a vizsgált vakcinák restriktációs fragmentum eloszlását mutatja be *Hinf*I, illetve *Mbo*I emésztés után. A 1-es, 5-ös, 6-os sávokon a LaSota törzsre specifikusan jellemző hasítási mintázatot láthatjuk, a 3-ason pedig a B-1 törzsre, a 7-esen az Ulster 2C törzsre jellemző fragment eloszlás jelenik meg.

A 2-es jelzéssel vizsgált vakcina a dokumentáció szerint VG/GA törzset (Glisson és Kleven, 1993) tartalmazott, amelynek M génjének (GenBank referenciaszám: U25838) analízise szerint a B-1-gyel megegyező fragmentum eloszlást vártunk, ám a gélen a V4 Queensland törzsre jellemző fragment eloszlás jelent meg. A V4 Queensland törzs esetében az irodalomban fellelhető fragmentum eloszlással összevetve, a vakcinatörzs további sajátosága jelenik meg: a 130 bp méretű fragmentum egy 105 bp méretűre illetve egy 25 bp méretűre esett szét.

Összehasonlítva az 1-es, illetve 3-as sávon látható fragmentum eloszlással, a 4-es

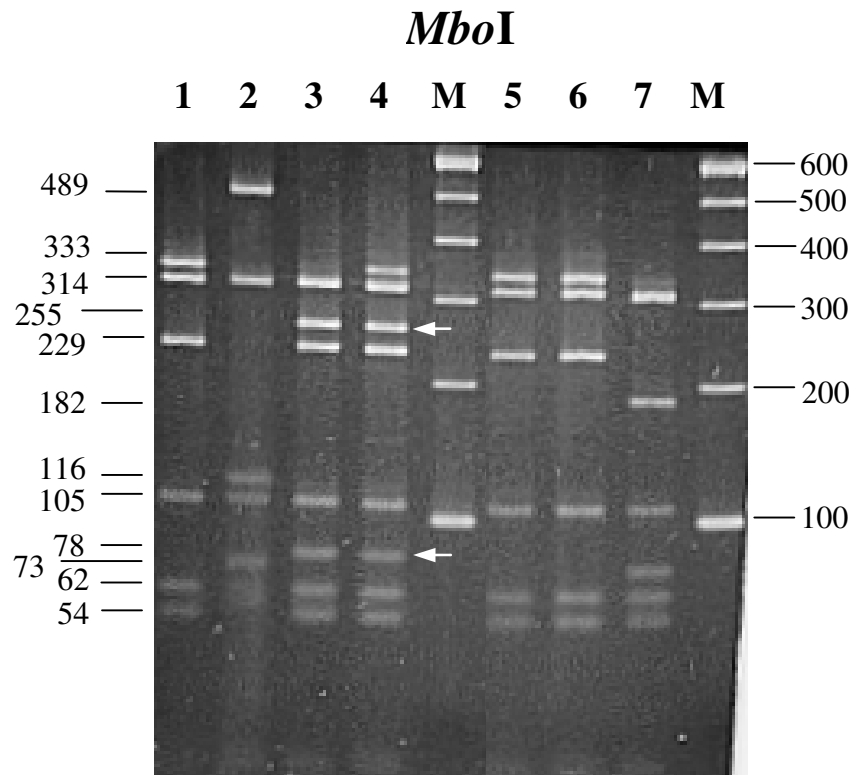
sávon olyan számfeletti fragmentumokat is látunk, amelyek a B-1 törzsrre jellemzőek (a képen nyíl jelöli). Ez a vakcina a gyártó törzskönyve szerint csak LaSota törzset tartalmaz, ám a gélen a B-1-re jellemző 255 bp és 78 bp *MboI*, illetve 409 bp *HinfI* fragment is megjelenik. A LaSota specifikus 298 és 111 bp méretű fragmentumok együtt futnak a gélen a B-1 törzs 297 bp, illetve 105 bp méretű fragmentumaival, ezért külön csíkok formájában nem válnak szét. A 4. ábra mutatja be a LaSota, illetve B-1 törzsek kérdéses génszakaszának fizikai térképét.

A 3-as és 4-es sávon látható vizsgálati minták ugyanannak a cégnek (T) a monovalens vakcinái. További vizsgálatokat végeztünk annak kiderítésére, hogy a fentebb említett eredmény a gyártási technológia következménye-e, vagy a PCR egyszerű technikai hibájáról van szó. A következő lépésben megismételtük a vizsgálatot a „T” cég B-1 és LaSota vakcináival, illetve ezek egy évvel korábbi gyártási tétéleivel. Vizsgálat alá vontuk továbbá a kérdéses cég LaSota tartalmú bivalens ND/IB vakcináját is.

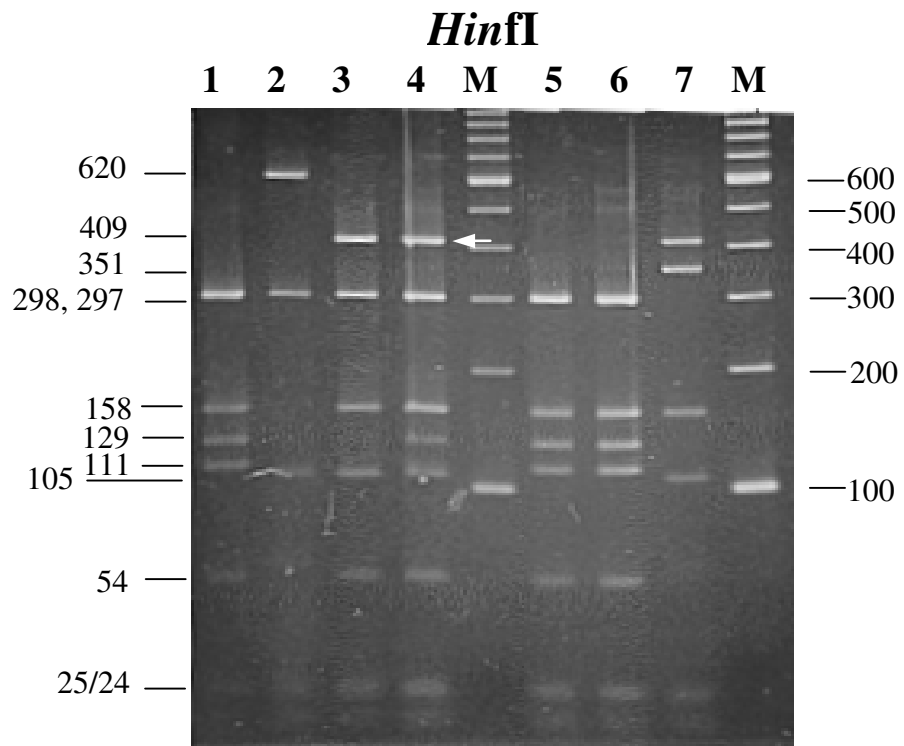
A 5. ábra mutatja be az ismételt vizsgálat, valamint az egy évvel korábbi műszaki számú termékekkel nyert eredményeket. A 1-es és 2-es sávon látható a B-1 tartalmú vakcina 1999-es és 1998-as műszaki számú képviselője. A kép alapján tisztán B-1 tartalmúak, LaSota jellegű extra fragmentumok (129 bp méretű, illetve 297 bp méretű duplacsík) nem jelennek meg. A 3-as és 4-es minták a „T” cég LaSota vakcináinak 1999-es, illetve 1998-as műszaki számú képviselőit mutatja. A fragmentum eloszlásban ismét megjelenik a 409 bp B-1-re jellemző fragmentum, ami szerint a két törzs az ampullában egyidejűleg jelen van. Az 5-ös jelzésű bivalens IB/ND vakcina, amely a törzskönyv szerint LaSota NDV komponenst tartalmaz, szintén B-1 kontaminációt mutat. Annak bizonyítására, hogy a vakcina a gyártás során szennyeződött egy másik NDV törzsszel, plakk tisztítást végeztünk, hogy a két lehetséges komponenst tiszta formában kinyerjük. Mivel a két törzs nem különíthető el plakk morfológia alapján, tíz-tíz plakkot csíptünk ki véletlenszerűen a véghígításokat tartalmazó Petri csészékről. A plakkokat tojásban elszaporítottuk. Az ezt követő restriktív analízis során a vizsgált plakkok vagy LaSota, vagy kevert jellegűnek bizonyultak.

3. ábra: Különböző lentogén NDV tartalmú vakcinák RE képe az M gén *MboI* (3A) és *HinfI* (3B) emésztése után.

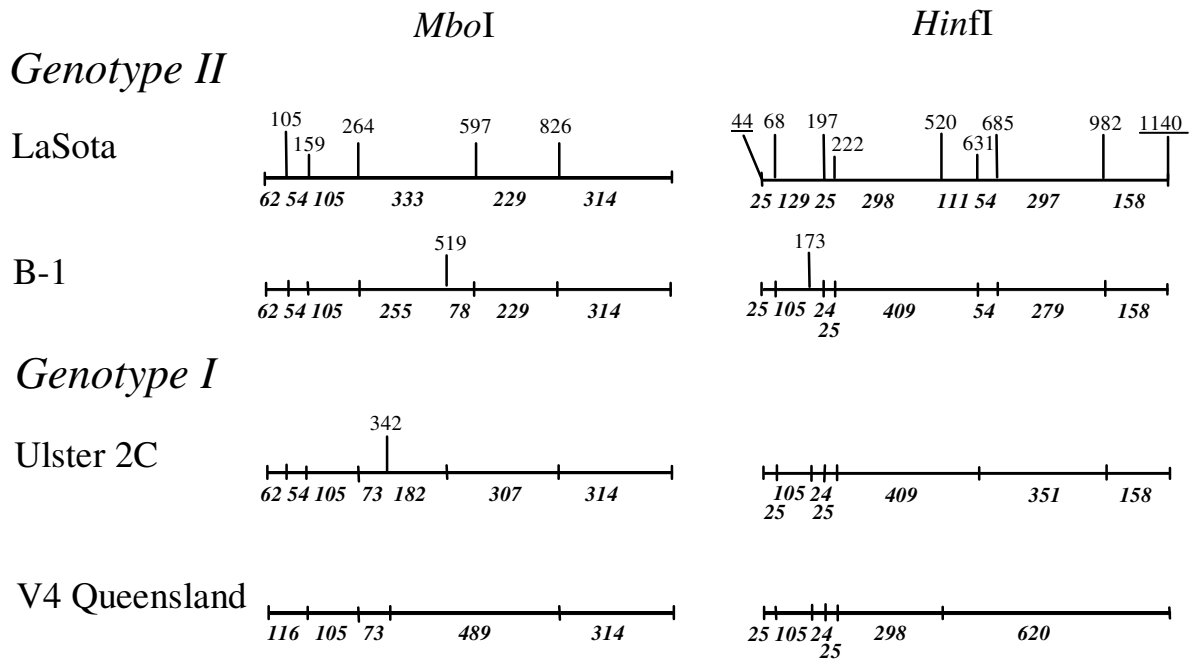
3A.



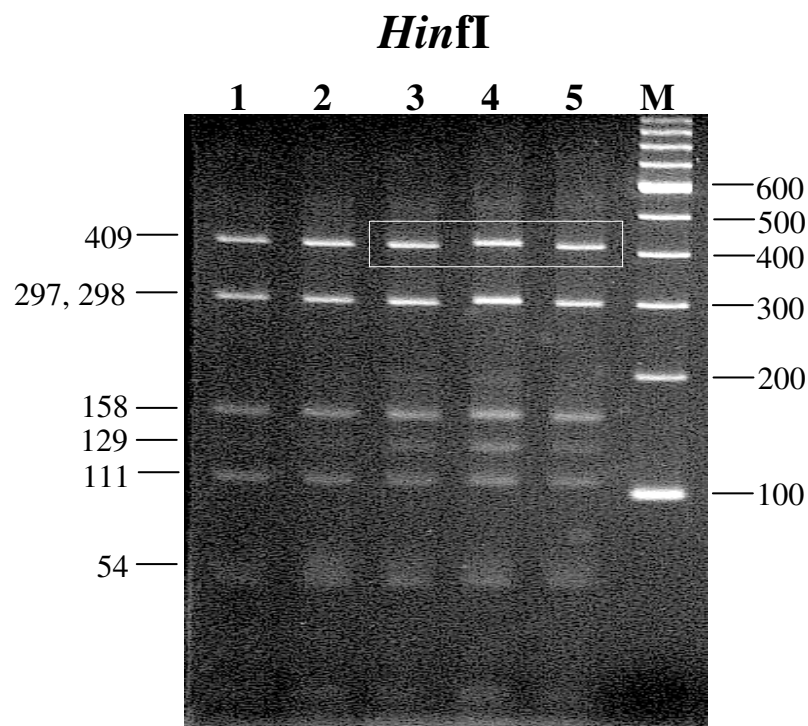
3B.



4. ábra: A vakcinatörzsek M génjének fizikai térképe. A normál számok a fragmentum utolsó nukleotidjának pozícióját jelöli. A félkövérrel szedett számok a fragmentum méretét adják meg bp-ben.



5. ábra: A szennyezett vakcina különböző gyártási tételeinek RE képe az M gén *HinfI* emésztése után.

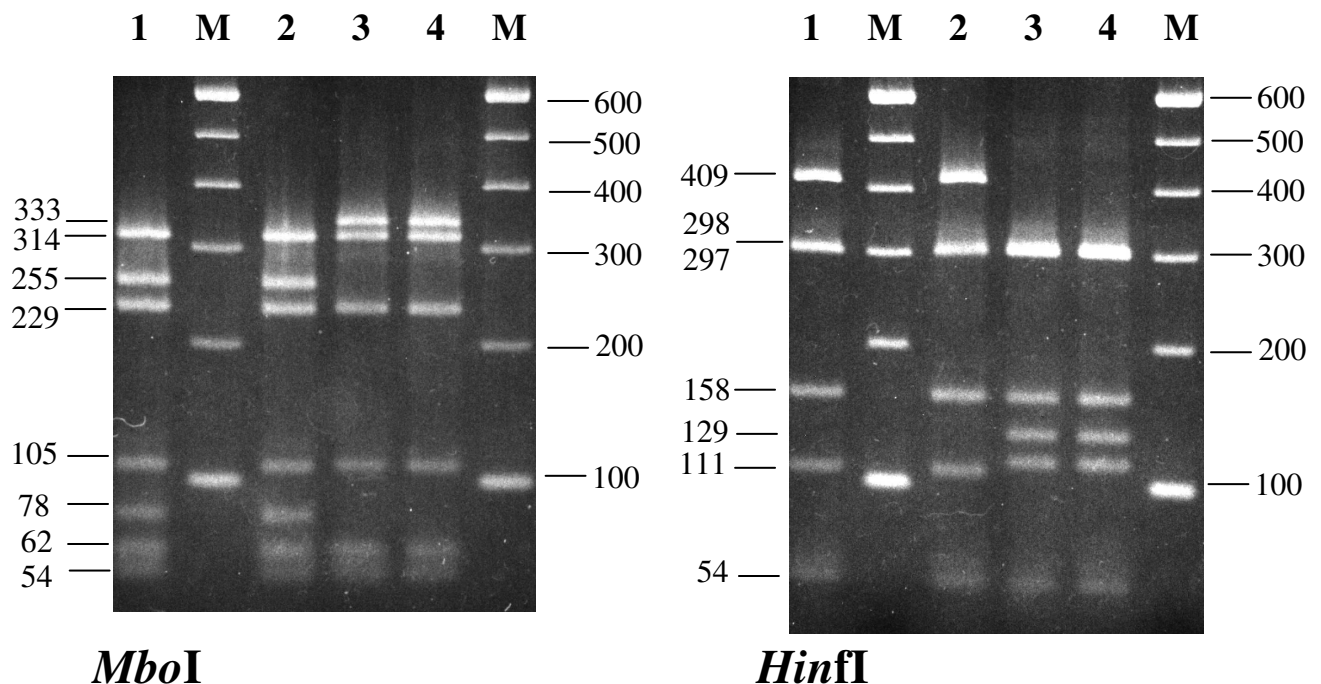


A kisebb LaSota tartalmat mutató plakkokat további tisztításnak vetettük alá és végül tiszta B-1 jellegű fragmentum eloszláshoz jutottunk. A harmadszori plakktisztítás restrikciós analízisének eredményét a 6A, 6B ábra mutatja be. Az egyedi plakkok vagy B-1 (1-es, 2-es sáv), vagy LaSota (3-as, 4-es sáv) mintázatot mutattak.

Az M gén PCR mellett elvégeztük az F gén PCR-t (Ballagi-Pordány *et al.*, 1996), amely a vakcina törzsek lentogenitásának megállapításához nyújt segítséget. A PCR terméket *Bst*OI, *Hinf*I és *Rsa*I restrikciós endonukleázokkal hasítottuk. A vizsgálat minden vakcinatörzs esetén alátámasztotta, hogy az adott restrikciós mintázat csak és kizárólag lentogén törzsekre jellemző.

A leggyakoribb idegen ágens kizárására a baromfipestis vakcinákat mind fertőző bronchitis vírusra, mind fertőző burzitis vírusra is teszteltük. IBV kimutatáshoz az S2 gént amplifikáltuk, IBDV esetében pedig a VP2 gént (2. táblázat). Egyik vírust sem tudtuk kimutatni a vizsgált NDV vakcinákból.

5. ábra: Egyedi plakkok RE képe *Mbo*I és *Hinf*I emésztés után.



5.1.1. MEGBESZÉLÉS

Az ipar, hogy megakadályozza a kontaminációkat, szigorú gyártási szabályokat alkalmaz, pl. különböző vírustörzsek esetében a fizikailag elszeparált munkaterek (Allan *et al.*, 1978). A hatóságnak az engedélyezési eljárás során *vizsgálnia kell*, hogy ezek a szigorú szabályok valóban meghozták-e a kívánt eredményt. E célból megfelelő eszközökkel kell rendelkeznie a különböző NDV törzsek érzékeléséhez és azonosításához. A jelenleg használatos hatósági vakcinaellenőrzési módszerek nem teszik lehetővé a direkt, ampullából történő törzsazonosítást. A jelen tanulmányban vázolt egyszerű genetikai analízis segítségével a napjainkban használt valamennyi élő NDV vakcina törzs egyértelműen, közvetlenül ampullából azonosítható az M gén restrikciós enzim analízisével (Wehmann *et al.*, 1997; Wehmann *et al.*, 1999). A homológ kontamináció semmiféle más eszközzel, beleértve a direkt szekvenálást, a monoklonális antitestet nem deríthető fel. Az RFLP viszont több vírustörzs egyidejű azonosítását is lehetővé teszi.

Az 3. ábrára tekintve észre lehet venni, hogy ha a LaSota és a B-1 *HinfI*, illetve *MboI* emésztésből származó fragmentumait egymásra helyezzük, az így keletkező „kevert” eloszlásban LaSota, illetve B-1 specifikus sávok is megjelennek. Ha a 4-es minta egy B-1 tartalmú törzs lenne, akkor a képen látható legnagyobb, 333 bp méretű fragmentumnak nem lenne szabad megjelennie, mivel az csak és kizárólag a LaSotára jellemző.

Ha azonban a 4-es mintát LaSotának feltételezzük, akkor a 333 bp fragmentum mellett nem lenne szabad megjelenni a 275 bp és a 78 bp méretű fragmentumoknak, mivel ezek viszont csak és kizárólag a B-1-re jellemzőek. Ezek egymást kölcsönösen kizáró fragmentumok, amely abból adódik, hogy a vírus genomjában ugyanazt régiót foglalják el, csak különböző törzseknél különböző méretekben vágódnak ki (4. ábra). A LaSota, illetve a B-1 esetében *MboI* hasítás után a 333 bp (LaSota) és a 275+78 bp (B-1) fragmentumok, míg *HinfI*-gyel történő hasításnál a 409 bp (B-1) és a 298+111 bp (LaSota) fragmentumok

ugyanabból a genomrégióból származnak. Ha egymást kölcsönösen kizáró fragmentumok jelennek meg ugyanazon a sávon, akkor ez csak két vagy több törzs keverékét jelentheti.

Az 4-es vakcina esetében a PCR közvetlenül ampullából történt, és mindkét enzimmel történő hasítás alapján a fragmentum eloszlás a LaSota és a B-1 jelleget keverten mutatta. A gélen megjelenő csík intenzitásából ítélve a két komponens aránya kb. 1:1, ami megfelel az elvárható értéknek, mivel a LaSota és a B-1 közel azonos növekedési kapacitással rendelkezik.

Nem ismert olyan technikai hiba, amely hasonló kevert fragmentumokat eredményezne. A PCR kémiai kontaminációjakor egy vizsgálat során valamennyi minta ugyanazt a mintázatot mutatná. A 4-es minta fragmentum eloszlásait nem lehet másképpen magyarázni, csak törzskeverékkel. Annak demonstrálására, hogy a vakcina mindkét törzset „gyárilag” tartalmazza plakk tisztítást végeztünk és a legmagasabb hígításból származó plakkokat vizsgáltuk. A kevert mintázat szétválaszthatósága további bizonyítékot szolgáltatott arra nézve, hogy a kontamináció a gyártási folyamat alatt következett be. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy az eredményeink szerint a 3-as, 4-es és 5-ös vakcinatörzsek a LaSota mellett B-1 törzset is tartalmaznak. Mivel a kérdéses cég egy évvel korábbról származó, ugyanolyan típusú vakcinája is B-1 törzsszel szennyezett volt, valószínűleg a LaSota MSV szennyeződött.

Felmerül a kérdés, vajon mekkora az érzékenysége a rendszernek? Vizsgálataink szerint elméletileg minden plakkból kinyerhető a szennyező vírus, ha az legalább 5 %-ban van jelen. Mivel a LaSota és a B-1 nagyon hasonló szaporodási dinamikával bír, így ha pl. a LaSota MSV kontaminálódott B-1-gyel a gyártási folyamat valamely korai fázisában, akkor a közel azonos szaporodási kapacitásból adódóan a szennyezettség stabil lesz, azaz a Seed nem fog az egyik törzs túlnövésén alapuló „öntisztulást” mutatni. Az 1-es genotípusú (LaSota és B-1), illetve 2-es genotípusú (Ulster 2C és V4 Queenslad) komponensek vegyülése nem eredményezne stabil „keveréket” a különböző genotípusú vírusok eltérő növekedési rátája

miatt (nem közölt adat).

A genetikai törzsazonosítás lehetőséget nyújt kontamináció, törzscsere eseteinek felderítésére. Az általunk bemutatott módszerrel közvetlenül az ampullából lehet elvégezni a törzsazonosítást, amely lehetőséget kínál a 3A. és 3B. ábra 2-es sávján látható törzscsere felderítésére. A gyártó által deklarált 2-es genotípusba tartozó VG/GA törzs helyett az ampullában az 1-es genotípusú V4 Queensland törzset találtuk. További lehetőségként a genetikai törzsazonosítás sikerrel alkalmazható a kontamináció felderítésében is. Az M génen alapuló RT-PCR kiegészítve a PCR termék restrikciós enzim analízisével olyan korszerű eszközt ad a hatóság kezébe, amellyel gyorsan, hatékonyan, állatkísérletek mellőzésével egyértelmű eredmények nyerhetők, amelyek szilárd, jól dokumentálható alapját képezhetik a vakcinák engedélyezési eljárása során felmerülő kérdések egyértelmű és megnyugtató megválaszolásának. A fentebb leírt vizsgálati eredmények alapján a szennyezettnek bizonyult vakcina forgalombahozatalát az ÁOGYTI javaslata alapján nem engedélyezték.

5.2. CSIRKÉK FERTŐZŐ BRONCHITIS VÍRUSA (IBV):

ADVERZ VAKCINAHATÁS

5.2.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Járványesetek

Svédországban 1997 előtt nem használtak IB elleni vakcinákat. 1994 és 98 között, különböző farmokon összesen 12 esetben (3. táblázat) diagnosztizáltak IBV-t, ELISA teszttel. Az első járványeset 1994-ben történt, amelyben tojóhibridek betegedtek meg, a tünetek tojástermelődési zavarok formájában jelentkeztek. További járványesetekről számoltak be 1995-97 között, amelyek tojó- és húshibrideket egyaránt érintettek. A tünetek csökkent tojástermelődés, rossz tojásmínőség, köhögés, tüszögés voltak. Vírusizolálás nem történt, a 12 esetből származó mintákat közvetlenül PCR-rel vizsgáltuk.

3. Táblázat: A vizsgált vírusok listája

Vírus	Járványeset	Dátum
1096/97	Layer 97-98	1997
1097/97	Layer 97-98	1997
1106/97	Layer 97-98	1997
1120/97	Layer 97-98	1997
50/98	Layer 97-98	1998
422/97	Layer 97-98	1997
423/97	Layer 97-98	1997
397/95	Scania 95	1995
722/95	Holland 95	1995
340/94 ^b	Layer 94	1994
242/95 ^b	Scania 95	1995
748/95	Holland 95	1995
X ^a	Vakcina	

^a Etikai okokból a vakcina nevét nem adjuk meg

^b A filogenetikai PCR-ben ezek a minták nem működtek

RNS izolálás

Az RNS izoláláshoz a fertőzött állatok légcső és vékonybél mintáit használtuk. A mintákat elkülönítetten kezeltük. A szervmintákból 1-1 g-ot homogenizáltunk 8 ml Ca-, és Mg-mentes PBS-ben. A teljes RNS-t 166 µl homogenizált szerv, 245 µl PBS, 83 µl 6x proteináz K puffer (0,01 M Tris, pH 7,8, 0,005 M EDTA és 0,5% SDS) és 5 µl proteináz K (10 mg/ml;

Boehringer Mannheim, Germany) felhasználásával nyertük ki, majd a keveréket 55°C-on 1 órán át inkubáltuk. Az RNS-t TrizolTM (Gibco BRL, Bethesda, MD, US) felhasználásával extraháltuk (Verhofstede *et al.*, 1996). A precipitált RNS-t 15 000 g-n 30 percig centrifugáltuk, a pelletet 400 µl 70%-os etanollal mostuk, kiszárítottuk és 50 µl frissen készített dietil-pirokarbonát-tartalmú (DEPC, Fluka Chemi AG, Buchs, Switzerland) vízben feloldottuk, és felhasználásig -70°C-on tároltuk. (Vilcek *et al.*, 1994).

cDNS szintézis

A cDNS-t 25 µl végtérfogatban állítottuk elő, amely 5 µl RNS-t, 5 µl DEPC-es vizet, 1 µl random hexamert (0,02 U; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) tartalmazott. Az RNS-t 65°C-on 5 percig denaturáltuk, ezt követően jégre helyeztük és 17 µl reakcióoldatot adtunk hozzá, amely 1 µl RNAsine-t (24 U, Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2,5-2,5 µl dNTP-t (2 mM; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 5 µl 1st strand puffert (Gibco BRL, Bethesda, MD, US), és 1 µl MML-RT enzimet (200 U; Gibco BRL, Bethesda, MD, US) tartalmazott. A reakcióelegyet 37°C-on 90 percig inkubáltuk, majd az enzim inaktivációja 5 perc 98°C-os melegítéssel történt.

„Diagnosztikai” PCR

Diagnosztikai céllal két primerpárt terveztünk (N784-N1145, illetve N791-N1129) az IB fertőzés állatokban való kimutatására. A lehető legszélesebb diagnosztikai érzékenység biztosítása érdekében a génbankban elérhető 14 IBV N gén konszenzusszekvenciájának felhasználásával terveztük meg a primereket. A primerek szekvenciája, pontos elhelyezkedése a 4. táblázatban látható. Az amplifikáció 50 µl végtérfogatban történt, amely 0,2-0,2 mM dNTP-t, 10-10 pmol primert (N784-N1145 külső primerek), 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNS polimerázt (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, Co, USA) és 3

μl cDNS-t tartalmazott. A párolgás megakadályozására 2 csepp ásványi olajat (Sigma-Aldrich, MO, USA) adtunk a reakcióoldathoz. A termoprofil a következő volt: 45 sec 94°C, 1 perc 60°C, 2 perc 72°C, amely 35-ször ismétlődött és 7 perc 72°C-os végső extenzió zárt.

Az első kör után, 1 μl első PCR termék, valamint a belső primerek (N791-N1129) felhasználásával, a fentiekkel egyéb reagensek tekintetében azonos reakcióoldatot mértünk össze. A második kör termoprofilja a következő volt: 45 sec 94°C, 1 perc 53°C, 1 perc 72°C. A PCR termékből 5 μl-t 2%-os agaróz gélen futtattunk. Az elektrofozézis után EtBr oldattal festettük a gélt, majd UV fényenél detektáltuk.

„Filogenetika” PCR és szekvencia analízis

A S1 gén első felét választottuk filogenetikai vizsgálataink alapjául, 37 génbanki szekvencia előzetes összehasonlító elemzése alapján, mivel ez a génszakasz rendelkezik a legnagyobb variabilitással. Ennek megfelelően két primert terveztünk erre a szakaszra (CO1, CO2), amelyek 840 bp méretű szakaszt fogtak közre. A filogenetikai PCR termoprofilja a következő volt: 94°C 45 s, 55°C 1 perc és 72 °C 1 perc 35 cikluson át. A PCR termékeket ABI PRISM készülékkel szekvenáltatuk meg (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). A nukleotid, illetve az aminosav szekvenciák alignmentjét a DNASTar programcsomaggal (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) végeztük a Clustal módszer segítségével. Az alignment összeállításakor minden génbanki S1 szekvenciát felhasználtunk.

4. Táblázat. A primerek szekvenciája, elhelyezkedése a génen

A dignosztikai primereket az N gén alapján terveztük

N784	AAT TTT GGT GAT GAC AAG ATG A	763-784 ^a
N1145	CAT TGT TCC TCT CCT CAT CTG	1145-1165

N791	GTG ATG ACA AGA TGA ATG AGG A	770-791
N1129	CAG CTG AGG TCA ATG CTT TAT C	1129-1150

A filogenetikai primereket az S1 gén alapján terveztük

CO1	TGA CTC TTT TGT KTG CAC TAT	20390-20416 ^b
CO2	AAA TTA TAA TAA CCA CTC TGA	21255-21278

^a A számok a primerek pontos pozícióját adják meg, a Beaudette referenciatörzs nukleokapszid génjén (referenciaszám: M95169)

^b A számok a primerek pontos pozícióját adják meg, Beaudette referenciatörzs S1 génjén (referenciaszám: M95169)

A szekvenciák génbanki referenciaszáma (Accession number)

A vizsgálataink során nyert, új szekvenciaadatokat beküldtük a génbankba, ahol AF420320 - AF420330 referenciaszámmal hozzáférhetőek.

5.2.2. EREDMÉNYEK

„Diagnosztikai” PCR

A konzervatív N génre tervezett N784-N1145 és N791-N1129 primer párok segítségével IBV-t mutattunk ki a 12 vizsgált klinikai mintában. A primerek pozitív eredményt adtak a következő referenciatörzsekkel D1466, H120, UK/7/91 és UK/918 (Dr. D. Cavanagh bocsátotta rendelkezésünkre).

„Filogenetikai” PCR és szekvencia-analízis

A Layer 94 elnevezésű járványesetből származó minták kivételével az S1 génen alapuló RT-PCR kimutatta a vírust minden 1994-98 között gyűjtött szervmintában. A PCR termékek

alkalmasak voltak arra, hogy a génbankban fellelhető S1 szekvenciák felhasználásával meghatározzuk a vírusok közötti filogenetikai kapcsolatokat. A 7. ábra mutatja a szekvenciák alapján készült törzsfát.

A filogenetikai fa adatai szerint a 748/95, 397/95, 1097/97, 1120/97, 1096/97, 1106/97, 422/97, 423/97 és 50/98 vírusok (Halland 95, Scania 95 és Layer 97-98, lásd 3. táblázat) a Massachusetts szerotípusba tartoznak. Egy korai izolátum a Halland 95-ből származó 722/95 közeli rokonságot mutat a D274 vírussal, amely a Dutch szerotípus tagja (Fabricant, 1998).

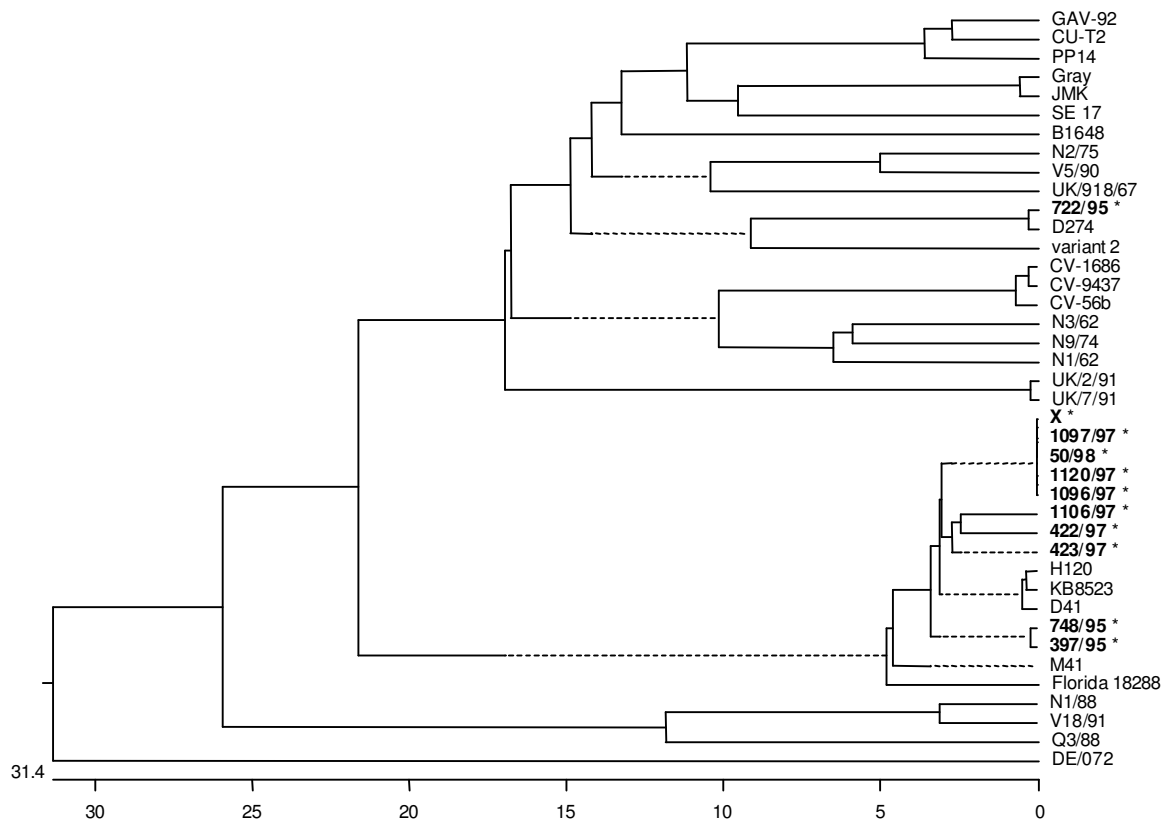
Az 1997-ben izolált vírusok érdekes profilt mutatnak. Négy vírus S1 szekvenciája (1097/97, 1096/97, 1120/97 and 50/98) teljesen megegyezik az országban használt vakcinatörzsszel, amelyet etikai okokból X-nek nevezünk. Három további vírus (1106/97, 422/97 and 423/97) kisebb eltérésekkel ugyan, szintén szoros rokonságot mutat X-szel (7. ábra)

Az S1 génen nyert adatok megerősítése céljából, az N gén szekvenciák alapján is készítettünk törzsfát. A N gén törzsfá megerősítette, hogy a 1096/97, 1097/97, 1120/97 és az 50/98 minták kifejezett hasonlóságot mutatnak a vakcinatörzsszel.

5.2.3. MEGBESZÉLÉS

Az RT-PCR eredménye megerősítette, hogy az N gén kiemelkedően konzervatív természetű. Habár már az első körben minden minta, illetve vírustörzs esetében pozitív eredményt adott az RT-PCR, mindig alkalmaztunk egy második kört és nested rendszerben végeztük az amplifikációt, hogy a lehető legmagasabb érzékenységet és szelektivitást biztosítsuk a vírus detektálásnak. Nagyszámú kísérlet igazolja, hogy a két-lépéses (nested) PCR – összehasonlítva az egy-lépésessel – érzékenyebb (Belák és Ballagi-Pordány, 1991; Ballagi-Pordány *et al.*, 1992). Ez a magasabb érzékenység alapfeltétele a megfelelő

7. ábra: A svéd IBV minták filogenetikai viszonyai a génbanki törzsekkel összevetve (S1 gén)



diagnosztikai rendszernek. A diagnosztikai PCR primereit 14 génbanki törzs nukleokapszid génje alapján terveztük, hogy a lehető legszélesebb reaktivitást érjük el. Ez a módszer megbízható, új eszköz lehet az IBV diagnosztikában. Sokan érvelnek amellett, hogy a PCR érzékenysége álpozitív eredményekhez vezet, így nem alkalmas rutin diagnosztikai módszerként. Megfelelő körültekintéssel és laboreszközökkel a keresztkontaminációk és átviteli szennyezések megakadályozhatóak (Belák és Ballagi-Pordány, 1993). Szükség esetén az álnegatív eredmények ellen belső kontrollokat, ún. mimikeket kell alkalmazni (Ballagi-Pordány *et al.*, 1996a).

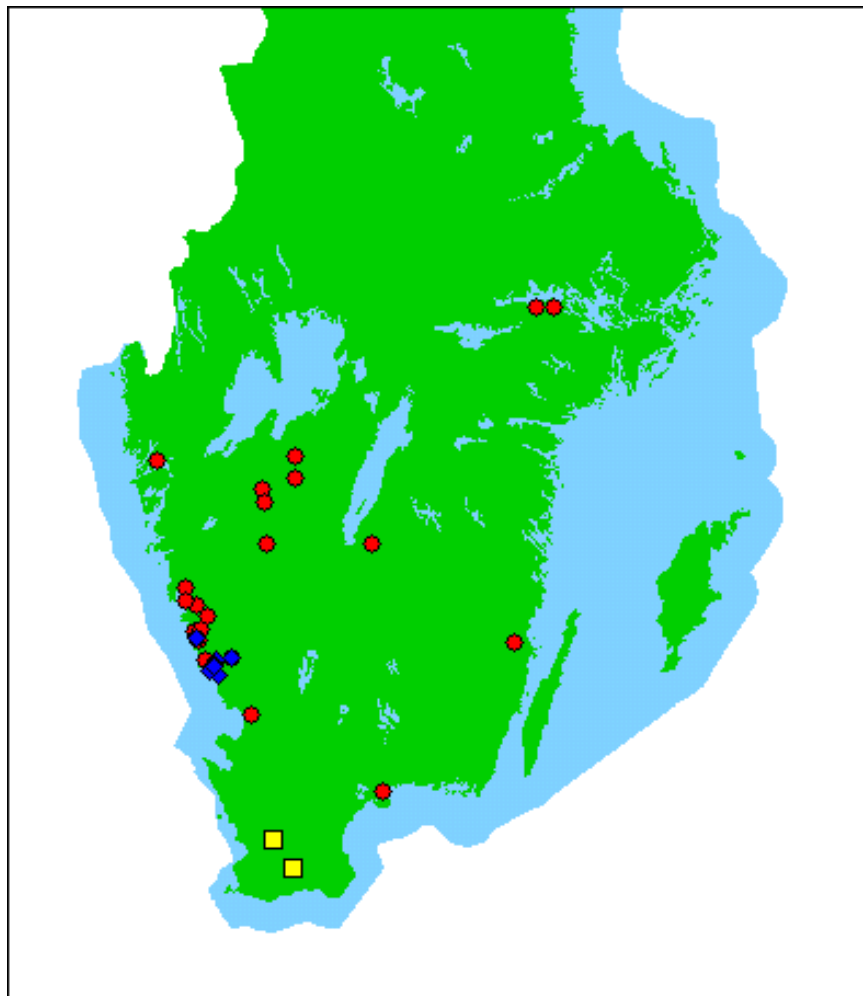
Az S1 gén 5' részét választottuk ki abból a célból, hogy a filogenetikai vizsgálatokhoz megfelelő PCR-t fejlesszünk ki és más szerzők eredményeivel összevethető eredményekre

jussunk. A járványesetekből származó minták filogenetikai viszonyainak felderítésére az S1 génen alapuló RT-PCR megfelelőnek bizonyult (Saif, 1993; Sapats *et al.*, 1996), bár az 242/95 és az 340/94-es minták esetében nem kaptunk PCR terméket. E két minta esetében a filogenetikai RT-PCR nem megfelelő működésének több oka lehetett: i.) túl kis mennyiségű RNS; ii.) olyan eltérések a vírusok S1 génjében, amelyek megakadályozták a primerek kapcsolódását.

A 3. táblázatban felsorolt vírusok mindegyike két külön forrásból (vékonybél és trachea) is rendelkezésre állt. A PCR pozitivitást nem befolyásolta sem a „diagnosztikai”, sem a „filogenetikai” RT-PCR esetében, hogy az RNS mely szervből származott, ezért a továbbiakban a trachea mintákból származó vizsgálatok eredményét részletezem. A vizsgálatok eredménye szerint 1994-98 között Svédországban Massachusetts és Dutch szerotípusba tartozó vírusok okoztak természetes járványeseteket. A legtöbb farmon Massachusetts-szerű törzseket találtak, egy esetben azonban a vírus 99%-ban identikus volt a D274 jelzésű törzssel. Ez azért érdekes, mert a D274-szerű törzset (722/95) egy olyan farmról izolálták, amelyik kb. 5 km-re fekszik egy másiktól, ahonnan két hónappal korábban Massachusetts-szerű törzs került elő (748/95). Ez azt jelenti, hogy viszonylag kis földrajzi területen különböző IBV variánsok cirkuláltak egyidejűleg és egymástól függetlenül (8. ábra). A 722/95 pontos eredete tisztázatlan. Lehet, hogy vad típusú D274, de mivel ezt a törzset vakcinaként is használják nem kizárt, hogy 722/95 egy D274 törzset tartalmazó vakcina származéka, amely más országból került be. A kis genetikai különbség és a további adatok hiánya miatt, ez a kérdés megválaszolatlan maradt. A következő kilenc vírus nagyon érdekes genetikai divergenciát mutatott. A korai (1997 előtti) esetekből származó vírusok a Massachusetts szerotípus törzseivel közeli genetikai mintázatot mutatnak. Teljes homológiát azonban nem találtunk egyetlen ebbe a szerotípusba tartozó vizsgált törzs esetében sem. A Massachusetts szerotípushoz közeli genetikai mintázat ismét felveti a kérdést, hogy vajon Massachusetts szerotípussal vakcinázott csirkéket vásároltak-e külföldről, mivel 1997-ig

Svédországban tilos volt élő, attenuált vakcinát használni? Valószínűnek tűnik, hogy ezek a vírusok nem vakcina eredetűek, hanem természetes IB esetek.

8. ábra: Az IBV járványesetek földrajzi elhelyezkedése Svédországban. A megbetegedések helyszínei 1994-ben (■), 1995-ben (◆) és 1997-ben (●).



Miután 1997-ben a járványügyi helyzet miatt feloldották az élő vakcina használatának tilalmát, valamennyi '97 után izolált vírus kifejezett rokonságot mutat a vakcinatörzssel. Négy vírus S1 szekvenciája teljesen megegyezett a vakcinatörzssel, míg három további vizsgált vírus 86 és 94% közötti hasonlóságot mutatott. Ezeket a vírusokat olyan vakcináztatlan állományokból izolálták, amelyek tojástermelődési zavarokat mutattak. Ez a tünet háromféle okra vezethető vissza:

1. ismét egy természetes esettel állunk szemben, amelynél a kórokozó az S1 génjét tekintve kifejezett hasonlóságot, vagy teljes egyezést mutat a vakcinatörzssel,
2. természetes felülfertőződés történt: vadvírus és Massachusetts szerotípusba tartozó vakcinavírus volt egyidejűleg jelen az állatban, de a rendszer csak a Massachusetts törzset tudta kimutatni,
3. a vakcinavírus terjedt az oltatlan állományban és okozott tojástermelődési zavarokat.

Az S1 igen magas genetikai variabilitása miatt az 1. lehetőség nem valószínű. A 2. lehetőséget vizsgálva az IBV valóban képes az ún. ko-exisztencia jelenségére (Capua *et al.*, 1999), amikor több, gyakran teljesen különböző típusba tartozó törzs van jelen ugyanabban az állatban. Mivel nekünk kutatásaink kezdetén semmiféle előzetes genetikai információnk nem volt a kórokozóról, a filogenetika primereket úgy terveztük, hogy ne csak a Massachusetts szerotípust, hanem az ismert IBV szerotípusok széles skáláját amplifikálhassa, emiatt valószínűtlennek tartjuk, hogy ha több szerotípusba tartozó IBV törzs volt jelen a vizsgált baromfiban, akkor a „nem-Massachusetts” típusok kívül essenek az érzékelési körből. Ezeket az eredményeket mások indirekt módszerrel, antigén ELISA-val is alátámasztották, mivel egy esetben sem tapasztaltak emelkedő pozitív titereket, ami a felülfertőzés tényét jelezte volna.

Ezek alapján a rendelkezésre álló adatok kifejezetten a 3. lehetőséget, a terjedő és tüneteket okozó vakcinavírust támogatják. Az 1097/97, 1096/97, 1120/97, 50/98 és a vakcinatörzs a vizsgált 840 bp-nyi S1 szakaszon teljes egyezést mutat, ami az S1 variabilitását tekintve határozottan bizonyítja az öt vírus azonosságát. Az IBV rekombinatív hajlama (Jia *et al.*, 1995; Kottier *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Lee és Jackwood, 2000) miatt esetleg néhányan megkérdőjelezhetik ezt az egyezést. A rekombináció révén lehetőség van arra, hogy az egyik vírus a másik S1 génjéből nagyméretű szakaszokat „vegyen fel”, ami megzavarhatja a pontos osztályozást, ha a primerek éppen ezt az „idegen” elemet amplifikálják (Jia *et al.*, 1995). Ez szólhatna a négy vírus vakcina eredete ellen. Ha így lenne, akkor valamennyi vírus miatt éppen ugyanazt, a vakcinavírusból származó 840 bp-nyi szakaszt építette be a genomjába? További kérdésként merül fel, hogy mi lehetne ennek a 840 bp-nak a forrása, ha nem a vakcina?

Mivel az S1 variabilitása nagyon magas, ami nem csak rekombinációkban, hanem pontmutációkban, inzerciókban, deléciókban is megnyilvánul, ha 840 bp teljesen megegyezik a mezei vírusok és a vakcinavírus között, akkor a legvalószínűbb magyarázat, hogy azok a mezei vírusok vakcina eredetűek.

További kérdés miképpen tekintsük a többi három vírust (1106/97, 422/97, 423/97), amelyek nem teljesen azonosak az S1 génjükben a vakcinatörzsszel? Valószínűleg ezek is vakcina eredetűek, de a természetes körülmények között pontmutációk akkumulálódhattak az S1 génjükben.

A hibás filogenetikai következtetéseket elkerülése céljából, érdemes több gén alapján is vizsgálni a rokonsági viszonyokat (Zwaagstra *et al.*, 1992), ezért az N gén alapján is végeztünk filogenetikai vizsgálatokat. Az N gén filogenetika egyértelműen alátámasztotta az S1-en nyert adatokat, amelyek a vakcina eredetre utalnak.

A kutatásaink során egy hatékony új megközelítést alkalmaztunk, amely alkalmas i.) az összes lehetséges IBV variáns gyors detektálására, ami a primerek széleskörű reaktivitásán

alapszik; ii.) a variánsok filogenetikai vizsgálatok céljából történő azonosítására. Az S és N gén RT-PCR-ek alkalmasak továbbá más madárfajok koronavírussainak detektálására, mivel a fácán és a pulyka az IBV-hez nagyon hasonló koronavírus gazdája (Breslin *et al.*, 1999a,b; Guy, 2000; Cavanagh, 2001a,b; Cavanagh *et al.*, 2001, 2002). Vizsgálataink bizonyították, hogy az élő vakcinavírus terjedhet a baromfi populációban (tüneteket keltve) és zavaró epizootológiai szituációt teremthet, amit szem előtt kell tartani az IBV-vel szembeni gyakorlati munka során.

5.3. AMYXOMATÓZUS MYXOMATÓZIS: KLINIKO- VIROLÓGIAI VIZSGÁLATOK

5.3.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szervminták

Természetes fertőzésben elpusztult nyúlból származó szemháj, tüdő, végbél és tejmirigy mintákat vizsgáltunk. Egy gramm szövetmintát homogenizáltunk 8 ml PBS-ben. A homogenizátumot penicillinnel, streptomycinnel és gentamycinnel (30-30 IU/ml) kezeltük.

Vírus izolálás és titrálás

Vírus izolálás céljából 2 ml szerv homogenátumot oltottunk RK-13 szövetkultúrára. A szövetet 50 ml-es Greiner szövettenyésztő palackban tartottuk. A homogenátumot 30 perc abszorció után kétszeri MEM Earl (Sigma-Aldrich, MO, USA) médiummal történő mosással eltávolítottuk, majd a szövetet 37°C-on inkubáltuk és a citopatogén elváltozásokat naponta követtük nyomon. Az 5. napon az RK-13 szöveten syncytium képződést figyeltünk meg. A negatív mintákat háromszor passzáltuk, de citopatogén hatást nem sikerült megfigyelni. A

pozitív mintákat mínusz 80°C-on tároltuk. Kísérleti fertőzéshez a szemhéj minta (BP04/2001) harmadik passzázsát használtuk. A vírustitrálást RK-13 szövettenyészetben végeztük. A vírus titere $10^{4,5}$ TCID₅₀ volt. A TCID₅₀ meghatározás RK-13 egyrétegű szövettenyészetben, a Sperman-Kärber egyenlet felhasználásával történt

Állatok

Az állatkísérletekhez összesen 14 új-zélandi fehér nyulat használtunk fel. Valamennyi állat 8 hetes korú és 1,5-2,2 kg súlyú volt. A kísérletek során izolátorban tartottuk őket (Monair Andersen, Hollandia), a hőmérséklet állandó 20°C volt, az állatok táplálékot és vizet *ad libitum* kaptak. Az állatok elhelyezése és valamennyi kísérleti beavatkozás az ÁOGYTI Állatvédelmi és Etikai Bizottságának jóváhagyásával történt az 1998. XXVIII. „Az állatok kíméletéről” szóló törvénynek megfelelően.

Állatkísérletek

Két állatkísérletet hajtottunk végre, az elsőben (A) 3 nyulat fertőztünk a BP04/2001 izolátum 40 cm^3 -vel aeroszol formában. A fertőzést követő 3. napon egy kontakt kontroll nyulat helyeztünk a fertőzött állatok közé, hogy a betegség közvetlen terjedését, illetve tüneteit vizsgálhassuk.

A második (B) kísérletben (5. táblázat) nyolc nyulat oltottunk myxomatózis ellen Myxovac vakcinával (Ceva-Phylaxia, Budapest). A Myxovac attenuált myxoma vírust, egy Lausanne törzs származékot (Áldássy törzs) tartalmaz. A vakcinázást követően két hét múlva két csoportot képeztünk 4-4 állattal. A 1. csoport tagjait a BP04/2001 izolátum 0,15 ml-ével szemhéjba oltottuk, míg a 2. csoport tagjait a BP04/2001 izolátum 40 cm^3 mennyiségű aeroszolljával fertőztük. Két állatot használtunk oltatlan kontrollnak (6. táblázat). A fertőzést izolátorban végeztük, hogy fenntartsuk a speciális körülményeket, amelyek kizárják a

myxomatózis szokásos vektorainak jelenlétét. Marshall (1959) kimutatta, hogy a myxomatózis tüneteinek súlyossága függ a hőmérséklettől, ezért az izolátor hőmérsékletét állandó 20°C-on tartottuk.

Az állatokat 6 héten át naponta megfigyeltük. Az elpusztult állatok boncolását elvégeztük. A szervminták (végbél, tejmirigy, szemháj, lép) elektronmikroszkópos vizsgálatoknak, vírusizolálásnak és PCR-nek vetettük alá. A 6. hét végére életben maradt állatokat az ÁOGYTI Állatvédelmi és Etikai Bizottságának jóváhagyásával, a szakma szabályai szerint túllattuk.

5. táblázat: A „B” állatkísérlet kísérleti elrendezése.

CSOPORTOK	FERTŐZÉS		“VÉDŐ HATÁS”
VACCINÁCIÓ IM	IDP	4	3/4
8		AEROGÉN	4
KONTROL	IDP	1	0/1
2		AEROGEN	1

DNS izolálás

A PCR-hez a szemháj mintát használtuk. A szervmintát először 5 perc 5000 x g centrifugáltuk, majd a felülúszóból a DNS kivonást a VioGene DNA/RNA Extraction Kit (Zenon Kft. Szeged, Hungary) felhasználásával végeztük. A DNS-t 30 µl ddH₂O-ben oldottuk fel.

PCR és szekvencia analízis

Az envelope gén 400 bp méretű fragmentumát amplifikáltuk. A felhasznált primereket (For: GCC AAA CGA TAC ATC CAC; Rev: GGG GGA ATC TGA TAA AAA C) a génbankban elérhető Lausanne referenciatörzs alapján (azonosítószám: NC001132) terveztük. A PCR reakció 50 µl végtérfogatban történt, amely a következőket tartalmazta: 5 µl 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl és 1 mg/ml BSA), 3 µl MgCl₂, 0,5-0,5 µl dNTP-ből (10 mM, Pharmacia, Uppsala, Sweden), 20-20 pmol a primerekből, 2 U Taq polymeráz (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 5 µl DNA, az elegyet ddH₂O-val egészítettük ki 50 µl-re. A párolgás megakadályozására egy csepp ásványi olajat használtunk (Sigma-Aldrich, Mo, USA). A PCR reakció GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) gépen történt, a program 35 ciklusból állt, a termoprofil a következő volt: 94°C 15 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 perc és végül 72°C 7 perc extenzió zárta a reakciót.

A PCR termék megjelenítéséhez 2%-os agaróz gélen 8 µl PCR terméket futattunk meg. A gélt EtBr-val festettük és UV fény alatt vizsgáltuk. A PCR termék szekvenciájának meghatározását a Genotype GmbH (Hirshhorn, Németország) végezte. A nukleotid és aminosav szekvencia elemzése a BioEdit 5.0.9 program (Észak-Karolina Egyetem, USA) felhasználásával történt. Az alignment készítéshez a Clustal módszert alkalmaztuk.

Akcessziós szám és szekvencia-adat

A BP04/2001 Env génjének általunk meghatározott nukleotidszekvencia adatait AY136665 akcessziós számmal a génbankba beküldtük.

SDS PAGE

A BP04/2001 jelzésű izolátumot és a Myxovac vakcinavírust, mint kontrollt RK-13-on elszaporítottuk. A szövetfelülúszót 12 órán át 30000 x g mellett ultracentrifugáltuk. A csapadékot 1 ml PBS-ben oldottuk fel, amelyet lízispufferrel kezeltünk. A vírusproteineket 10%-os SDS poliakril-amid gélen megfutattuk. A futtatás 10 V/cm feszültség mellett 2 órán át tartott. Kis és nagy molekulású markert (Sigma-Aldrich, MO, USA) is használtunk. A gélt Blue R-250 festékkel (Sigma-Aldrich, Mo, USA) 1 órán át festettük, majd egész éjjel mostuk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Természetes fertőzésben elpusztult állat szemhéj, végbél, tüdő és tejmirigy mintáját használtuk elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. Minden szervmintából 1 mm³ nagyságú darabot 0,2 M-os PBS-oldattal készült 4%-os paraformaldehidet és 0,2%-os glutáraldehidet tartalmazó, pH 7,2 – 7,4-es oldatban 3 órán át +4°C-on előfixáltuk. Az előfixált anyagot 0,2 M-os PBS-oldatban 4x5 percig mostuk, majd 0,2 M-os PBS-oldattal készült 1%-os OsO₄-oldatban 2 óráig szobahőmérsékleten utófixáltuk. Ezt követően újabb mosás következett 4x5 percig 0,2 M-os PBS-oldatban, majd felszálló etilalkohol sorozatban és végül propilénoxidban víztelenítettük. Ezután a kísérleti anyagot propilénoxid és ACM Durcupan (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) 1:1 arányú keverékében 30 percen át átítattuk és 56°C-on Durcupanba ágyasztuk. A Durcupan 48 órán át polimerizálódott.

Az elkészült blokkból Reichet OM U3-típusú ultramikrotommal 40-60 nm vastag ultravékony metszetet készítettünk. A metszeteket 2,5%-os uranylacetát és Reynolds-féle ólomcitrát oldatban kontrasztoltuk. Az ultravékony metszeteket JEM JEOL 100S transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEM JEOL 100S, JEOL Ltd., Akashima, Japan) vizsgáltuk.

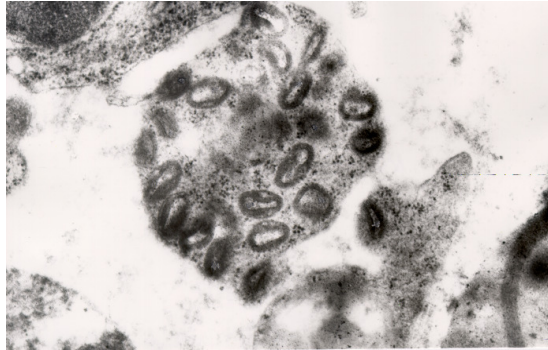
5.3.2. EREDMÉNYEK

A természetes fertőzésből származó állat szemhéjából, tüdejéből és végbeléből sikerült myxoma vírust izolálni. A BP04/2001 jelzéssel ellátott izolátum RK-13 szövettenyészetben syncytiumképződést okozott. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok a fertőzött sejtek citoplazmájában 250 nm átmérőjű poxvírus-szerű vírusrészecskéket mutattak ki (9. ábra). Az állatkísérletekhez a szemhéj mintából izolált vírust használtuk. Az „A” kísérletben a 6-14. napon mind a négy állat kifejezett szemhéjgyulladást és légzőszervi tüneteket mutatott (10. ábra). A myxomatózisra jellemző vöröses árnyalatú bőrelváltozások (nodulusok) nem jelentek meg, de a bőrön nekrotikus foltokat megfigyeltünk. A szemhéj, herezacskó és az anorektális tájék ödémás duzzadtsága volt jellemző.

A vírus a speciális, szúnyogokat, egyéb vérszívókat kizáró izolált körülmények között is terjedt. A kontakt kontrol állat és aeroszollal fertőzött nyúl a kísérlet során elpusztult. A Magyarországon myxomatózis ellen használt vakcina teljes védelmet biztosított az aeroszolos fertőzéssel szemben és 75%-os védettséget tapasztaltunk a szemhéjoltás fertőzéssel szemben. Mindkét vakcinázatlan kontroll állat elpusztult myxomatózisban.

Az izolátum genetikai analízise (génbanki referenciaszám: AY136665) 97%-os hasonlóságot tárt fel a Lausanne referenciatörzssel, amely a dél-amerikai típusba tartozik. Az amplifikált 400 bp méretű szakasz túl kicsi a myxoma vírus genomjához képest, ahhoz, hogy a vírus főbb vonásainak genetikai okait feltárja, ezért, hogy mélyebb bepillantást nyerhessünk a vírus genomjába a tisztított és lizált vírus SDS poliakril-amid gélelektroforézisét is elvégeztük. A BP04/2001 izolátum protein profiljából kitűnt, hogy összehasonlítva a vakcinavírussal egy 200 kDa méretű protein hiányzik (11. ábra).

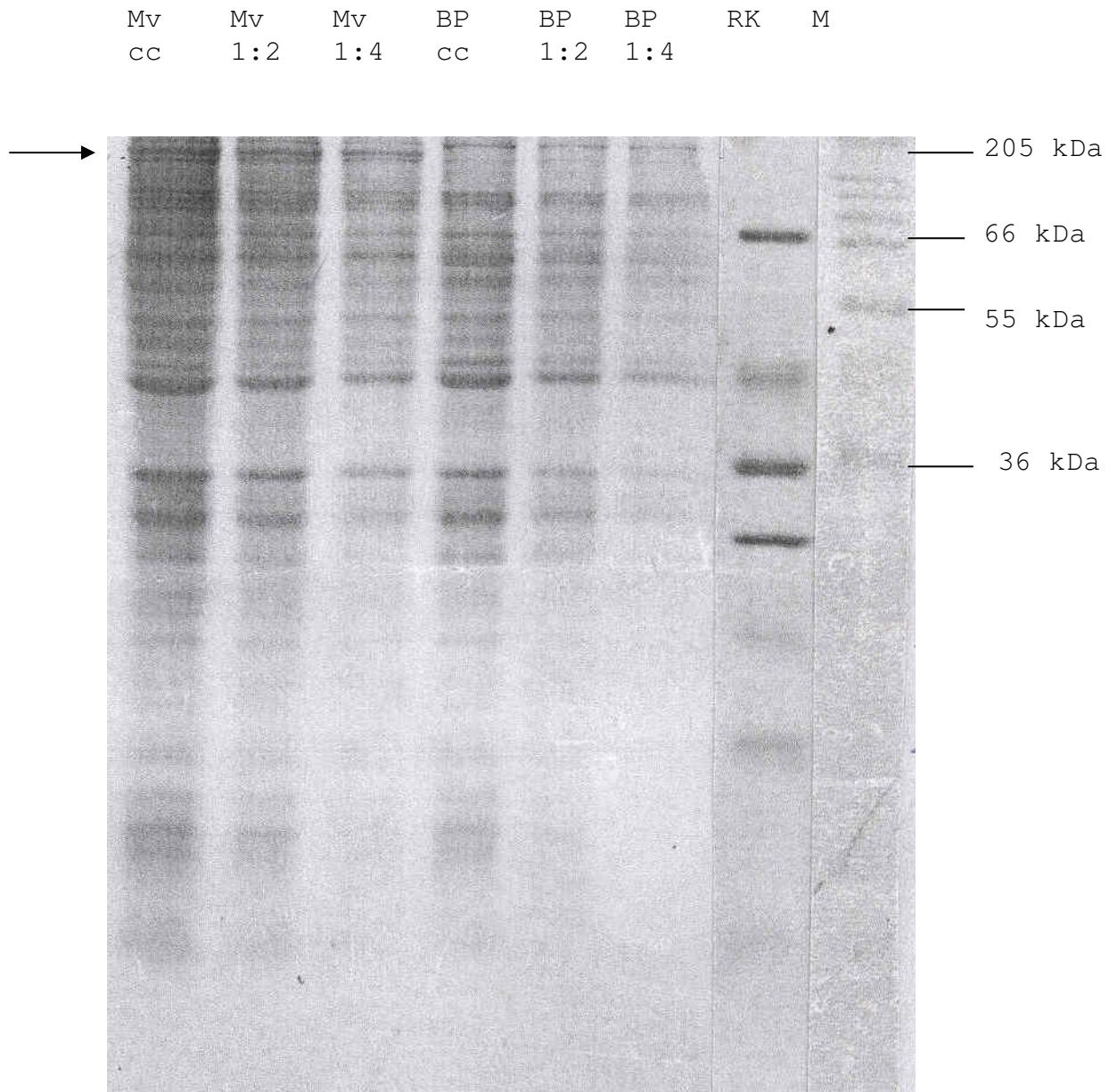
9. ábra: Szemhéj minta ultravékony metszete elektronmikroszkóppal: poxvírus jellegű vírusrészecskék a citoplazmában



10. ábra: A BP04/2001 izolátummal fertőzött állaton súlyos kötőhártyagyulladás jelentkezett.



11. ábra: A BP04/2001 izolátum, illetve a Myxovac vakcinavírus SDS-PAGE képe. A BP04/2001 izolátumból egy kb. 200 kDa méretű fehérje hiányzik (a képen nyíl jelöli). Mv cc: koncentrált Myxovac vakcina; Mv 1:2: Myxovac kétszeres hígítás; Mv 1:4: Myxovac négyszeres hígítás; BP cc: koncentrált Bp04/2001; BP 1:2: BP04/2001 kétszeres hígítás; BP 1:4: BP04/2001 négyszeres hígítás; RK: RK-13 szövetkultúra negatív felülúszó; M: molekulasúly marker.



5.3.3. MEGBESZÉLÉS

A myxomatózis közel 50 éve okoz súlyos problémákat Európában. A betegség arculata ez idő alatt a klasszikus myxomatózis formától, a noduláris myxomatózis formán át, az atípusos amyxomatózis formáig folyamatosan változott, újabb aspektusokkal bővült. Az atípusos myxomatózis megjelenése valószínűleg egy lépés a myxoma vírus evolúciójában. Atípusos eseteket eddig csak Franciaországban, illetve Belgiumban (Brun és mtsai, 1981; Marlier és Vindevogel, 1996), figyeltek meg. Jelen tanulmányban az atípusos myxomatózis első közép-európai megjelenéséről számolunk be. A BP04/2001 izolátum által okozott klinikai tünetek nagyon hasonlítottak a Joubert és mtsai (1982) és Arthus és Louzis (1988) által amyxomatózis myxomatózis néven leírt kórhoz. A betegség kötőhártyagyulladás, heregyulladás és légzőszervi elváltozások formájában jelentkezik. "Myxomák" nem alakulnak ki (6. táblázat). Annak ellenére, hogy az állatkísérletekhez felhasznált állatlétszám alacsony volt, az atípusos myxomatózis halálozási aránya magasabbnak tűnik, mint a klasszikus myxomatózisé.

A myxomatózis általában vérszívó rovarok útján terjed, pl. szúnyog, egyéb vérszívó (Fenner és Ratcliffe, 1965), de nagyüzemi körülmények között, főleg a téli időszakban, más módon is terjedhet. Marlier és mtsai (1999) számoltak be, hogy sikerült amyxomatózis myxomatörzseket izolálniuk orrváladékból. Chapuis és mtsai (1994) a sub-antarktiszi övezetben figyeltek meg myxomatózis rovarok nélküli terjedését. Vizsgálataink során a BP04/2001 izolátum közvetlen, állatról állatra terjedését figyeltük meg.

Az "A" kísérletben a fertőzés aeroszollal izolátorban történt, hogy kizárjuk a vérszívó rovarok jelenlétét. Az állatok, beleértve a kontakt, nem fertőzött kontrollt is, atípusos myxomatózisban megbetegedtek, ami a vírus közvetlen terjedésére utal az állatok között.

6. táblázat: Az atípusos és a klasszikus myxomatózis főbb jellemzőinek összehasonlítása.

	ATÍPUSOS MYXOMATOSIS	KLASSZIKUS
ÁTVITEL	AEROSOL	VEKTOR
LAPPANGÁS /NAP/	6 – 14	4 - 10
KLINIKAI TÜNETEK	CONJUNCTIVITIS, DYSPNOE	„MYXOMÁK”
CP RK-13-ON /NAP/	4-5	5-6
MORTALITÁS	83%*	20-100%**
NUKLEOTID HASONLÓSÁG AZ ENV GÉNEN	0,97	1,0 /LAUSANNE REF. STRAIN/

* saját vizsgálataink szerint,

** Marlier et al., 1999.

Mivel a megbetegedések Shope-fibróma vírus tartalmú vakcinával oltott nyúlállományban történtek, ezért a “B” kísérletben myxoma vírus tartalmú vakcina hatását vizsgáltuk. A vakcina kielégítő védelmet nyújtott az atípusos myxomatózis ellen.

Az atípusos myxomatózis eredete jelenleg még nem egyértelműen tisztázott. Mivel a kaliforniai típus hasonló tüneteket okoz az európai nyúlfajokban, mint az atípusos myxomatózis esetében, ezért PCR vizsgálatot végeztünk, hogy a BP04/2001 izolátum földrajzi típusát meghatározzuk. A vizsgált 400 bp génszakasz szekvencia analízise azt mutatja, hogy a BP04/2001 izolátum a Lausanne referenciatörzsszel mutat 97%-os nukleotid hasonlóságot. Ez rendkívül érdekes, mivel a Lausanne törzs a dél-amerikai típusba tartozik.

Több kísérlet irányult arra, hogy olyan genetikai különbséget találjanak a klasszikus és az atípusos myxomatózis között, amely magyarázná a klinikai megjelenésben lévő

különbségeket. Az erőfeszítések ellenére az eltérő klinikai megjelenés molekuláris okai jelenleg nem világosak. A myxoma vírus nagy genomja miatt az esetleges különbségek feltárása nehézkes. SDS poliakril-amid gélelektroforézist végeztünk azért, hogy betekintést nyerjünk a BP04/2001 izolátum fehérje-, illetve tágabban genetikai szerkezetébe. Összehasonlítva a BP04/2001 izolátum és a vakcinavírus protein profilját, azt tapasztaltuk, hogy a BP04/2001 izolátum esetében egy kb. 200 kDa méretű protein hiányzik. Ennek a proteinnek a génexpressziója sérülhetett részleges vagy teljes deléció által, vagy pedig pontmutáció révén, amely egy belső STOP kodon létrejöttét eredményezte. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy az adott protein hiányzásának pontos okát felderíthessük.

Összegezve, jelen tanulmányban az atípusos myxomatózis közép-európai előfordulásáról számolunk be. A természetes esetből izolált vírus, a BP04/2001 aerogén úton terjedt különleges, zárt körülmények között, amelyek kizárták a myxomatózis terjesztésében szerepet játszó rovarok jelenlétét. Tekintve a közvetlen terjedést és a nagyfokú virulenciát, a nyúltelepeken a téli időszakban történő légzőszervi elváltozásoknak nagyobb figyelmet kell szentelni.

6. LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK

Munkánk során igazoltuk, hogy NDV vakcinák homológ kontaminációja esetén az RT-PCR–RFLP módszerrel a LaSota és B-1 törzsek együttes jelenléte felderíthető és az oltóanyag gyári eredetű szennyezettsége igazolható.

A svédországi IB járványesetek vizsgálatára olyan gyors, hatékony új diagnosztikai RT-PCR-t alakítottunk ki, amely a lehető legszélesebb kört felölelve kínál lehetőséget az állományban előforduló IBV törzsek kimutatására.

Az IBV vakcinatörzs és a vadvírus elkülönítésére kidolgozott „filogenetikai” RT-

PCR rendszerrel képesek voltunk a svédországi IB járványesetek háttérében álló Massachusetts és D274 vírusokat azonosítani. Az S1 gén nukleotidszekvenciájának elemzése a Massachusetts vírusokat további alcsoportokra bontotta annak megfelelően, hogy a természetes IB esetek vagy vakcinavírus eredetűek voltak. A „filogenetikai” RT-PCR nem csak a megbetegedések háttérében álló vakcinavírus kiszűrésében jelentős, hanem, mivel egy adott vakcina szerotípus egy más szerotípussal szemben csak korlátozott védelmet biztosít, a mezei vírusok azonosítása révén a hatékonyabb védelmet nyújtó vakcinatörzs kiválasztását is elősegítheti.

Myxomatózis ellen oltott házi nyúlállományban jelentkező aspecifikus myxomatózis vizsgálata során igazoltuk az – eddig csak Franciországbban és Belgiumban leírt – atípusos myxomatosis közép-európai jelenlétét. A genetikai, elektronmikroszkópos és virológiai vizsgálatok a Lausanne referenciatörzsszel 97%-os hasonlóságot mutató törzset mutattak ki. A protein vizsgálat eredménye szerint ez a vírus a klasszikus kórformát előidézőtől különbözik. Az előbbiből hiányzik egy 200 kDa molekulásúlyú protein. Az atípusos myxomatosis törzs vektorok nélküli, közvetlen úton való terjedését állatkísérletben igazoltuk.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Soós Tibor igazgató úrnak, aki vállalta témám vezetését, lehetővé tette, hogy elmélyüljek a vakcinológiában, valamint szakmailag és emberileg segítette a dolgozatom elkészülését.

Köszönöm Dr. Lomniczi Bélának és Dr. Tuboly Sándornak, hogy témabizottsági tagként segítettek a munkámat. Dr. Lomniczi Bélának külön köszönöm, hogy a laboratóriumában tanulhattam meg a PCR gyakorlati alapjait. Dr. Tuboly Sándornak külön köszönetet mondok szakmai útmutatásaiért.

Köszönettel tartozom Dr. Belák Sándornak, aki minden feltételt megteremtett, hogy a módszertani ismereteimet és szakmai szemléletemet az uppsalai Nemzeti Állategészségügyi Intézetben fejleszthessem tovább.

Dr. Dobos-Kovács Mihályt az elektronmikroszkópos, kórszövettani vizsgálatokért illeti köszönet.

Dr. Kucsera Lászlónak, az ÁOGYTI osztályvezetőjének köszönöm, hogy sok türelemmel vezetett a gyakorlati állatorvostudomány „labirintusában”, valamint köszönöm a dolgozat összeállításakor nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok Dr. Kulcsár Gábornak, Dr. Makranszki Lászlónak, Dr. Fábíán Katalinnak, Dr. Horváth Ernőnek, Dr. Nagy Edithnek, Dr. Kovács Andreának az állatkísérletekben, laborvizsgálatokban nyújtott segítségért, valamint a dolgozat összeállításakor nyújtott jobbító szándékú kritikákért.

Köszönet illeti Kovács Istvánnét, Csízy Juditot és Rém Évát a labormunkákban nyújtott technikai segítségért.

8. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Farsang, A., Ros, C., Renström, L.H.M., Baule, C., Soós, T. and Belák, S. (2002): Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathology*, 31: 229-236.

Farsang, A., Makranszki, L, Dobos-Kovács, M., Virág, Gy., Fábíán, K., Barna, T., Kulcsár, G., Kucsera, L. and Vetési, F. (2003): Occurrence of atypical myxomatosis in Central-Europe: clinico-virological examintaions. *Acta Veterinaria Hungaria*, Közlésre elfogadva.

Farsang, A., Wehmann, E., Soós, T. and Lomniczi, B. (2003): Positive identification of Newcastle Disease Virus Vaccine Strains and Detection of Contamination in Vaccine Batches by Restriction Site Analysis of Matrix Protein Gene. *Journal of Veterinary Medicine B*, Közlésre elfogadva.

Konferenciák

Poszter: A. Farsang, E. Wehmann, T. Soós és B. Lomniczi: „Genetic methods in vaccine against Newcastle Disease”; EFIS2000, Kazimierz Dolny, Lengyelország, 2000

Poszter: A. Farsang, F. Vetési, M. Dobos-Kovács, L. Kucsera, L. Makranszki, G. Kulcsár, T. Barna és T. Soós: „Clinico-pathological examination of an aspecific myxomatosis”; XIIth International Congress of Virology, Párizs, Franciaország, 2002

9. SUMMARY

Ensuring the efficacy, potency and safety of the veterinary vaccines is a highlighted issue. However, the vaccines are subjected by manufacturers to very scrupulous examinations in order to obtain data about the main parameters mentioned above and to warrantee the appropriate quality and effect of the vaccines, there are several reports about serious adverse effects, reduced protective effect of vaccines.

Used molecular methods I tried to work out the most charatceristic problems of the official vaccine control, which either cannot be solved by traditional virological methods or only by applying time consuming procedures. For this purpose I examined vaccines containing live virus and problems caused by these vaccines.

First, 12 NDV vaccines sent for registration procedure were analysed. The RT-PCR was carried out, using the RNA purified directly from vials without any egg inoculation. The matrix (M) gene of NDV genome was amplified and digested by *HinfI* and *MboI*. According to the RFLP a homologue contamination was revealed, i.e. the LaSota vaccine strains was contaminated with B-1 strain. The two components were separated by plaque purification obtaining unequivocal prove of a contamination which may have happened during the manufacturing procedure. In case of another NDV vaccine, the vial should have contained VG/GA vaccine strain according to the dossier but V4 Queensland strain was found.

In the second chapter, samples from outbreaks in Sweden were examined by RT-PCR. A „diagnostic” and a „phylogenic” RT-PCR were carried out. The amplicons were analysed by MegAlign software. D274 and Massachusetts strains were identified. Considering the fact, that before 1997 Sweden was a „non-vaccinating” country, it is very interesting that the Massachusetts strains after 1997 showed 100% similarity with the vaccine strain Ma5 used in Sweden. In contrary of the samples after 1997, the Massachusetts strains before 1997 showed only 86-94% similarity with the vaccine strain mentioned above. The studies revealed a

strong possibility that the vaccination had lead to the spread of the vaccine virus, causing various disease manifestation and confusing epizootiological situation in the poultry population.

In the third chapter, the first appearance of the atypical myxomatosis in Central.Europe is reported. The virus was isolated from eyelid specimen of a naturally infected rabbit. Genetic analysis of the isolated virus was carried out by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The primers were designed on the basis of the major envelope gene (Env) of the Lausanne reference strain in the GenBank. The viral proteins were examined by SDS-PAGE. The isolated virus (ref. No.: BP04/2001) was able to infect the susceptible animals directly, by contact way. The disease was characterised by respiratory symptoms of the upper tracheal tract, conjunctivitis and high mortality by the 11-14. day. The clinical and genetic examinations revealed that the cause of the disease is the atypical myxomatosis occurred in France and Belgium to date.

10.IRODALOMJEGYZÉK

- ALLAN, W.H. and GOUGH, R.E. (1974): A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. *Veterinary Record*, **95**, 147-149.
- ALLAN, W.H., LANCASTER J.E., and TÓTH B. (1978): Newcastle disease vaccines, their production and use. *FAO Animal Production and Health Series No. 10*, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.
- ALMEIDA, J.D., BERRY, D.M., CUNNINGHAM, C.H., HAMRE, D., HOFSTAD, M.S., MALLUCI, L., MACINTOSH, K. and TYRELL, D.A.J. (1968): Coronaviruses. *Nature*, **220**, 650.
- AMSTRONG, J., SMEEKENS, S. and ROTTIER, P. (1983): Sequence of the nucleocapsid gene from murine coronavirus MHV-A59. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9909_9916.

- ARTHUR, C. P. and LOUZIS, C. (1988): A review of myxomatosis among rabbits in France. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **65**, 937-976.
- BALLAGI-PORDÁNY, A., KLINTEWALL, K., MERZA, M., KLINGEBORN, B. and BELÁK, S. (1992): Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medicine B*, **39**, 69-77.
- BALLAGI-PORDÁNY, A. and BELÁK, S. (1996): The use of mimic as internal standard to avoid false negative results in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes*, **10**, 159-164.
- BALLAGI-PORDÁNY, A., WEHMANN, E., HERCZEG, J., BELÁK, S. and LOMNICZI, B. (1996): Identification and grouping of Newcastle disease strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch. Virol.* **141**, 243-261.
- BEARD, C.W. and HANSON, R.P. (1984): Newcastle disease. In: Hofstad, M.S. et al. (eds), *Diseases of Poultry*, 8th Edition, Iowa State University Press, pp. 452-470.
- BELÁK, S., BALLAGI-PORDÁNY, A., FLENSBURG, J. and VIRTANEN, A. (1989). Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain. *Archives of Virology*, **108**, 279-286.
- BELÁK, S. and BALLAGI-PORDÁNY, A. (1991): Bovine viral diarrhoea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, **3**, 181-190.
- BELÁK, S. and BALLAGI-PORDÁNY, A. (1993): Experiences on the applicability of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Molecular and Cellular Probes*, **7**, 241-248.
- BELÁK, S. and THORÉN, P. (2001): Molecular diagnosis of animal disease: some experiences over the past decade. *Expert Reviews in Molecular Diagnostics*, **1**, 89-98.
- BENEDEK, G. (1968): Data to the clinical features of myxomatosis (in Hungarian, with English abstract). *Magyar Állatorvosok Lapja*, **23**, 329-336.

- BOURSNELL, M.E.G., BINNS, M.M., BROWN, T.D.K. and CAVANAGH, D. (1989): Molecular biology of avian infectious bronchitis virus. Progression in Veterinary Microbiology and immunology, Basel, Karger **5**, 65-82.
- BRESLIN, J.J., SMITH, L.G., FULLER, F.J. and GUY, J.S. (1999a): Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid gene region of turkey coronavirus. Intervirology, **42**, 22-29.
- BRESLIN, J.J., SMITH, L.G., FULLER, F.J. and GUY, J.S. (1999b): Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. Virus Research, **65**, 187-198.
- BRUN, A., SAURAT, P., GILBERT, Y., GODART, A. and BOUQUET, J. F. (1981): Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose. Rev. Med. Vet. **132**, 585-590.
- BOUCHER, S. and NOUAILLE, L. (2002): Les maladies virales, In: Maladies des lapins, Groupe France Agricole, Paris, 110-117.
- CAPUA, I., MINTA, Z., KARPINSKA, E., MAWDITT, K., BRITTON, P., CAVANAGH, D. and GOUGH, R.E. (1999): Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). Avian Pathology, **28**, 587-593.
- CARROLL-PANKHURST, C., ENGELS, E. A., STRICKLER, H. D., GOEDER, J. J., WAGNER, J. and MORTIMER Jr, E. A. (2001): Thirty-five year mortality following receipt of SV40-contaminated polio vaccine during the neonatal period. British Journal of Cancer, **85**: 1295-1297.
- CAVANAGH, D. (1983a): Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopeptides. Journal of General Virology, **64**, 1787-1791.
- CAVANAGH, D. (1983b): Coronavirus IBV: structural characterisation of spike protein. Journal of General Virology, **64**, 2577-2583.
- CAVANAGH, D. (2001a) .Commentary. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. Avian Pathology, **30**, 109-115.

- CAVANAGH, D. (2001b): Technical Review: Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterisation. *Avian Pathology*, **30**, 581-598.
- CAVANAGH, D. and DAVIS, P.J. (1988): Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. *Journal of General Virology*, **69**, 621-629.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P., COOK, J. and LI, D. (1990): Molecular basis of the variation exhibited by avian infectious bronchitis coronavirus (IBV). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **276**, 369-372.
- CAVANAGH, D., ELLIS, M. M. and COOK, J. K. A. (1997): Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathology*, **26**, 63-74.
- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., SHARMA, M., DRURY, S.E., AINSWORTH, H.L., BRITTON, P. and GOUGH, R.E. (2001): Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology*, **30**, 365-378.
- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., WELCHMAN, D. de B., BRITTON, P. and GOUGH, R. E. (2002): Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathology*, **31**, 81-93.
- CHAN, R.C., PENNEY, D.J., LITTLE, D., CARTER, I.W., ROBERTS, J.A. and RAWLINSON, W.D. (2001): Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet*, **358**, 121-122.
- CHAPUIS, J.L., CHANTAL, J. and BIJLENGA, G. (1994): Myxomatosis in the sub-antarctic islands of Kerguelen without vectors, thirty years after its introduction. *C R. Academical Science III*, **317**, 174-82.

- COLLINS, M.S., BASHIRUDDIN, J.B. and ALEXANDER, D.J. (1993): Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology*, **128**, 362-370.
- COLLISSON, E.W., WILLIAMS, A., HAAR, R.V., WANG, L. and SNEED, L.W. (1990): Sequence comparisons of the 3' end of the genomes of five strains of avian infectious bronchitis virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **276**, 373-377.
- DAVIDSON, I., BOHRESTHAIM, L. and WEISMANN, Y. (2002): Molecular identification of the Marek's disease virus vaccine strain CVI988 in vaccinated chickens. *Journal of Veterinary Medicine B*, **49**, 83-87.
- DOYLE, T.M. (1927): A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal of Comparative Pathology and Therapy*, **40**, 144-169.
- FABRICANT, J. (1998): The Early history of Infectious Bronchitis. *Avian Disease*, **42**, 648-650.
- FENNER, F. and RATCLIFFE, F.N. (1965): "Myxomatosis". Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- FENNER, F. (1994): Myxoma virus. In: Osterhaus, A. D. M. E., *Virus infections of Vertebrates*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp. 59-71.
- GIANGASPERO, M., VACIRCA, G., HARASAWA, R., BUTTNER, M., PANUCCIO, R., DE GIULI MORGHEN, C., ZANETTI, A., BELLOLI, A. and VERHULST, A. (2001): Genotypes of Pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **63**: 723-733.
- GLISSON, J. R, and KLEVEN S. H. (1993): Poultry vaccines. In: Peters, A. R. (ed), *Vaccines for veterinary applications*, pp. 165-173. Butterworth-Heinemann, London.
- HANDBERG, K.J., NIELSEN, O.L., PEDERSEN, M.W. and JORGENSEN, P.H. (1999): Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction.

Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathology*, **28**, 327-335.

HANSON, R. P., (1980): Newcastle Disease. In: Hitchner, S. B., C. H. Domermuth, H. G. Purchase, and J. E. Williams (eds), *Isolations and Identifications of Avian pathogens*, 2nd edn, pp. 63-66. American Association of Avian Pathologists, Creative Printing Company, Inc., New York.

HOFSTAD, M.S. (1953): Immunization of chickens against Newcastle disease by formalin-inactivated virus. *American Journal of Veterinary Research*, **14**, 586-94.

HU, X., RAY, R. and COMPANS, R.W. (1992): Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *Journal of Virology*, **43**, 1528-1534.

HUNGA-JEN, L., GIAMBRONE, T. and DORMITORIO, T. (1994): Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Journal of Virological Methods*, **48**, 281-291.

IYER, S.G. and DOBSON, N. (1940): A succesful method of immunization against Newcastle disease of fowls. *Veterinary Record*, **52**, 889-94.

JIA, W., KARACA, K., PARRISH, C.R. and NAQI, S.A. (1995): A novel variant of avian bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archieves of Virology*, **140**, 259-271.

JOUBERT, L., DUCLOS, P. H. and TUAILLON, P. (1982): La myxomatose des garennes dans le Sud-est: la myxomatose amyxomateuse. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **133**, 739-753.

JØRGENSEN P.H., HANDBERG, K. J., AHRENS, P., MANVELL, R. J., FROST, K. M. and ALEXANDE D. J. (2000): Similarity of avian paramyxovirus serotype 1 isolates of low virulence for chickens obtained from contaminated poultry vaccines and from poultry flocks. *Veterinary Records*, **146**: 665-668.

- KAWASAKI, E. S. (1990): Amplification of RNA. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. INNIS, M. A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. and WHITE, T.J. (eds), Academic Press, San Diego, CA, pp. 21-27.
- KERR, P. J. and BEST, S. M. (1998): Myxoma virus in rabbits. *Revue Scientifique et Technique OIE*, **17**, 256-268.
- KING, D.J. (1988): Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. *Avian Disease*, **32**, 362-364.
- KING, D. J. and CAVANAGH, D. (1991): Infectious bronchitis, In CALNEK, B. W., BARNES, H. J., BEARD, C. W., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds), *Diseases of poultry*, 9th edn (pp 471-484). Ames: Iowa State University Press.
- KING, D.J. and SEAL, B. (1998): Biological and molecular characterisation of Newcastle disease virus (NDV) field isolates with comparisons to reference NDV strains. *Avian Diseases*, **42**, 507-516.
- KINGSHAM, B.E., KEELER, C.L. Jr., NIXON, W.A., LANDMANN, B.S. and GELB, J. Jr. (2000): Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Disease*, **44**, 325-335.
- KLEPPE, K., OHTSUKA, E., KLEPPE, R., MOLINEUX, I. and KHORANA, H.G. (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, **56**, 341-361.
- KOMAROV, A. and GOLDSMIT, L. (1946): Preliminary observation on the modification of a strain of Newcastle disease virus by intracerebral passage through ducklings. *Veterinary Journal*, **102**, 212-218.
- KOTTIER, S.A., CAVANAGH, D. and BRITTON, P. (1995): Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, **213**, 569-580.
- KUSTERS, J.G., NIESTER, H.G.M., LENSTRA, J.A., HORZINEK, M.C. and VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1989): Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV.

Virology, **169**, 217-221.

KWON, H.M., JACKWOOD, M.W. and GELB Jr., J. (1993). Differentiation of infectious bronchitis virus serotype using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Disease*, **37**, 194-202.

LAMB, R.A. (1993): Paramyxovirus fusion. A hypothesis for changes. *Virology*, **197**, 1-11.

LEE, C-W. and JACKWOOD, M.W. (2000): Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Archives of Virology*, **145**, 2135-2148.

LEE, C. and JACKWOOD, M.W. (2001): Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. *Virus Research*, **80**, 33-39.

LI, H. and YANG, H. (2001): Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. *Avian Pathology*, **30**, 535-541.

LIN, Z., KATO, A., KUDOU, Y. and UEDA, S. (1991): A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Archives in Virology*, **116**, 19-31.

LOMNICZI, B., (1974): Plaque assay for avirulent (lentogenic) strains of Newcastle disease virus. *Applied Microbiology*, **27**: 1162-1163.

MALDONADO, Y. (2002): Current controversies in vaccination: vaccine safety. *Journal of American Medical Association*, **288**, 3155-3158.

MARLIER, D. and VINDEVOGEL, H. (1996): La myxomatose amyxomateuse: isolement de trois souches en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **140**, 343-346.

MARLIER, D., CASSART, D., BOUCRAUT-BARALON, C., COIGNOUL, F. and VINDEVOGEL, H. (1999): Experimental infection of specific pathogen-free New Zealand white rabbits with five strains of amyxomatous myxoma virus. *Journal of Comparative Pathology*, **121**, 369-384.

MARLIER, D., MAINIL, J., SULON, J., BECKERS, J.F., LINDEN, A. and VINDEVOGEL, H.

- (2000): Study of the virulence of five strains of amyxomatous myxoma virus in crossbred New Zealand White/Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals. *Journal of Comparative Pathology*, **122**, 101-113.
- MARSHALL, I. D. (1959): The influence of ambient temperature on the course of myxomatosis in rabbits. *Journal of Hygiene Cambridge*, **57**, 484-497.
- MCGINNES, L.W. and MORRISON, T.G. (1986): Nucleotide sequence of the gene encoding the Newcastle disease virus fusion protein and comparisons of paramyxovirus fusion protein sequences. *Virus Research*, **5**, 343-356.
- MEINKOTH, J. and WHAL, G. (1984): Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry*, **138**, 267-284.
- MEULEMANS, G., BOSCHMANN, M., DECAESSTECKER, M., VAN DER BERG, T.P., DENIS, P and CAVANAGH, D. (2001): Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathology*, **30**, 411-421.
- MOSS, B. (1996): Poxviridae: The viruses and their replication. In "Fundamental Biology", 3rd ed., Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., SCHARF, S.J., SAIKI, R.K., HORN, G. T. and EHRILICH, H.A. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- MURPHY, F.A., FAQUET, C.M, BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELI, G.P., MAYO, M.A. and SUMMERS, M.D (Eds) (1995): Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses, *Archives of Virology Suppl*, **10**, 268-274.
- NAGAI, Y., HAMAGUCHI, M. and TOYODA, T. (1989): Molecular biology of Newcastle disease virus. *Progressions in Veterinary Microbiology*, **5**, 16-64.

- NANTHAKUMAR, T., KATARIA, R. S., TIWARI, A. K., BUTCHAIHAH, G. and KATARIA, J. M. (2000): Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Veterinary Research Communications*, **24**: 275-286.
- NEDELICIU, D. and DINCULESCU, P. (1965): Influence of oily excipient on the immunogenicity of inactivated Newcastle disease vaccine. *Lucr Inst Cerc Vet Bioprep Pasteur*, **4**: 131-140.
- NUNBERG, J.H., WRIGHT, D.K., COLE, G.E., PETROVSKIS, E. A., POST L.E., COMPTON, T. and GILBERT J.H. (1989): Identification of the thymidin kinase gene of feline herpesvirus: use the degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. *Journal of Virology*, **63**, 3240-3249.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE), (1996): Newcastle Disease. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 3rd edn, 161-169, OIE, Paris.
- PEETERS, B.P.H., DE LEEUW, O.S., KOCH, G. and GILEKENS, A.L.J. (1999): Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant of virulence. *Journal of Virology*, **73**, 5001-5009.
- PIERCY, S.E., MACLEOD, A.H. and BLAXLAND, J.D. (1964): Duration of immunity trials with beta-propiolactone inactivated Newcastle disease virus vaccines. *Veterinary Records*, **76**, 1084-1089.
- SAIF, L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Veterinary Microbiology*, **34**, 285-297.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, H., S. and ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R.K. (1989): The design and optimisation of the PCR. In: EHRLICH, H.A. (ed.) *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York, pp. 7-16.
- SAKAGUCHI, T., TOYODA, T., GOTOH, B., INOCENCIO, N.M., KUMA, K., MIYATA,

- T. and NAGAI, Y. (1989): Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology*, **169**, 260-272.
- SAPATS, S.I., ASHTON F, WRIGHT, P.J. and IGNJATOVIC J. (1996): Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. *Journal of General Virology*, **77**, 413-418.
- SCHALK, A.F. and HAWN, M.C. (1931). An apparently new respiratory disease of chicks. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **78**, 413-422.
- SCHIED, A. and CHOPPIN, p.W. (1973): Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, **11**, 263-295.
- SEAL, B.S., KING, D.J., LOCKE, D.P., SENNE, D.A. and JACKWOOD, M.W. (1998): Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 1141-1145.
- SEAL, B. S., KING, D. J. and BENNETT, J. D. (1995): Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 2624-2630.
- SHARMA, J.M. (1999): Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in Veterinary Medicine*, **41**, 481-494.
- STÄUBER, N. K., BRECHTBÜHL, L. BRUCKNER, M. and HOFMANN, A. (1995): Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine*, **13**:360-364.
- SUGGS, S.V., HIROSE, T., MYAKE, E.H., KAWASHIMA, M.J., JOHNSON, K.I. and WALLACE, R.B. (1981): ICN-UCLA symposium for developmental biology using purified gene. (Brown, D.D. ed.), Academic Press, New York, **23**, 683-693.

- SZÉKY, A. and BENEDEK, G. (1969): Histological investigations of skin lesions in myxomatosis of rabbits. *Magyar Állatorvosok Lapja*, **24**, 73-80.
- TOYODA, T, SKAGUCHI, T, IMAI, K., INOCENCIO, N.M., GOTOH, B., HAMAGUCHI, M. and NAGAI, Y. (1987): Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology*, **158**, 242-247.
- VERHOFSTEDE, C., FRANSEN, K., MARISSSENS, D., VERHELST, R., VAN DER GROEN, G., LAUWERS, S., ZISSIS, G. and PLUM J. (1996): Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *Journal of Virological Methods*, **60**, 155-9.
- VETÉSI, F. (1990): *Házinyúlegészségtan. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, Hungary.*
- VILCEK, S., ELVANDER, M., BALLAGI-PORDÁNY, A. and BELÁK, S. (1994): Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**: 2225-2231.
- WANG, L., JUNKER, D., HOCK, L. EBIARY, E. and COLLISSON, E. W. (1994): Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virus Research*, **34**, 327-338.
- WANG, L., XU, Y. and COLLISSON, E. W. (1997): Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus. *Virus Research*, **49**, 139-145.
- WANG, X and KHAN, M.I. (2000): Molecular characterisation of an infectious bronchitis virus strain isolated from an outbreak of vaccinated layers. *Avian Disease*, **44**, 1000-1006.
- WANG, Z., VREEDE, F. T., MITCHELL, J. O. and VILJOEN, G. J. (2001): Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by triple one-step RT-PCR. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **68**, 131-134.

- WEHMANN, E., HERCZEG, J., BALLAGI-PORDÁNY, A. and LOMNICZI, B. (1997): Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine*, **15**: 1430-1433.
- WEHMANN, E., HERCZEG, J., TANYI, J., NAGY, É. and LOMNICZI, B. (1999): Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type used in the region. *Avian Pathology*, **28**: 6-12.
- Williams, A.K., Wang, L., Sneed, L.W. and Collison, E.W. (1992): Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Research*, **25**, 213-222.
- ZHIFENG, L., KATO, A., OTAKI, Y., NAKAMURA, T., SASMAZ, E. and UEDA, S. (1993): Sequence comparisons of a high virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Diseases*, **37**, 315-323.
- ZWAAGSTRA, K. A., ZEIJST, B. A .M. and KUSTERS, J. G. (1992): Rapid Detection and Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 79-84.