

MTA ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI BIZOTTSÁGA
SzIE ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK
(2013. jan. 28-31)

VIROLÓGIA, IMMUNOLÓGIA, BAKTERIOLÓGIA

2012. évi 39. füzet

ELŐSZÓ

Kedves Kolleganők és Kollegák!

Budapest, 2013. január

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és a SzIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskolája 2013. január 28-31. között tartja a legújabb kutatási eredményeink bemutatására szolgáló, immár 39. „akadémiai beszámoló” ülésorozatot.

Az előző évek gyakorlatának megfelelően a beszámolókon PhD hallgatók szereplését külön is elvárjuk, s reméljük, hogy ez is egy jó alkalma lesz a különböző tudományos-szakmai műhelyeket és korosztályokat képviselő, egymás munkája iránt érdeklődő kolleganők/kollegák találkozásának.

Az egyes szekciók üléseinek helyét és idejét a mellékelt beosztásban tüntettük fel.

Az előadások és azt követő megvitatás időtartama legfeljebb: 10 + 5 perc.

Kérjük, hogy a megadott maximális időtartamot senki ne lépje túl! Előző évek gyakorlatának megfelelően, aki azonos témán belül jelentett be 2 vagy több előadást, a 10 + 5 percnél többre az se számítson! Ne az előadások számára, hanem azok szakma-tudományos értékére helyezük a súlyt!

Az előadások összefoglalóit – szekciófüzetekbe csoportosítva – elektronikus úton adjuk közre.

A beszámoló füzetek anyaga az MTA –ATK-ÁoTi honlapján (www.vmri.hu/ MTA – Állatorvos-tudományi Bizottság) megtalálható. Kérjük, hogy az összefoglalók anyagát minden esetben - megvitatásra alkalmas formában – előadni szíveskedjenek.

Ami a vitát illeti, a résztvevőket, különösen pedig a bizottsági tagokat és az üléselnököket kérjük arra, hogy kérdéseikkel, hozzáfűzött megjegyzéseikkel, javaslataikkal, szíveskedjenek az előadottak részletesebb megismerését, értékelését és a beszámoló csoportok további munkáját segíteni. Sokan úgy véljük, hogy a tudományos előrehaladás és a fiatalok tudományos fórumokhoz való szoktatása szempontjából a vita (mégpedig a megfelelő kritikai elemeket sem nélkülöző vita) épp olyan fontos, mint maga az előadás.

Ezért a hasznos és előrevivő vitához szükséges „műhely légkör” kialakítását és fenntartását valamennyi résztvevőtől, de különösen a bizottsági tagoktól és az elnököktől ez úton is tisztelettel és nyomatékosan kérjük.

Az egyes szekciók titkárait arra is kérjük, hogy a szekcióülésről február végéig készítsenek és juttassanak el az Állatorvos-tudományi Bizottság elnökéhez (bnagy@vmri.hu) egy-egy rövid, közérthető formában megírt, a szekció elnökkel (elnökökkel) egyeztetett tájékoztatót (Magy. Áo. Lapja-ban való közlés céljából), mely szükség esetén tartalmazza nem csak az előadások, hanem a vita legfontosabb megállapításait is. Kérjük mindazokat a szerzőket, akik a közléssel valamilyen oknál fogva nem értenek egyet, hogy jelezzék azt bizottságunk titkára felé: Tuboly.Tamas@aotk.szie.hu.

Kérjük az intézetek vezetőit, hogy az elektronikus úton megküldött anyagból továbbítsanak, ill. kellő példányszámban másoltassanak munkatársaik és érdeklődő nyugdíjasaik számára is. Kérjük, továbbá, hogy munkatársaikat segítsék és hívják az üléseken való aktív és sikeres részvételre.

Előre is köszönjük a szekció elnökök, a titkárok, a bizottsági tagok és valamennyi előadó munkáját, s külön is köszönjük az állatorvos-tudományi bizottság titkárnak az összefoglaló füzetek előállításában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és a SzIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskolája nevében,
Sikeres, Boldog Új esztendőt kívánva,

Dr. Nagy Béla,
elnök
MTA Áo-tud. Bizottsága

Dr. Rusvai Miklós, egyetemi tanár
elnök
SzIE Áo-tud Dokt. Isk. Tanácsa

MTA Állatorvos-tudományi Bizottság és SzIE-ÁoTK DI, akadémiai beszámolóinak beosztása és szekcióbizottságai
(2013. január 28-31)

A szekció megnevezése	A szekcióülés ideje	A szekcióülés Helye	Társelnökök	Titkár	Bizottsági tagok
Élettan Biokémia Kórélettan Morfológia	I. 28 hétfő 8.30-tól	Élettan tanterem	Dr. Bartha Tibor Dr. Frenyó V. László Dr. Sótonyi Péter	Dr. Zsarnovszky Attila	Dr. Halasy Katalin Dr. Kovács Melinda Dr. Kutas Ferenc Dr. Vajdovich Péter Dr. Veresegyházi Tamás
Élelmiszerhigiénia Állategészségügyi Igazgatás	I. 28 hétfő, 11.00 -tól	Továbbképzés tanterem	Dr. Laczay Péter Dr. Sas Barnabás Dr. Ózsvári László	Dr. Székely Körmöczy Péter	Dr. Józwiak Ákos Dr. Kovács Sándor Dr. Lombai György Dr. Szita Géza
Állathigiénia Állattenyésztés Genetika Takarmányozástan	I. 28. hétfő 13.00-tól	Élettan tanterem	Dr. Brydl Endre Dr. Kovács Melinda Dr Szabó József	Dr. Bersényi András	Dr. Fekete Sándor Dr. Jakab László Dr. Rafai Pál Dr. Zöldág László
Viroológia Immunológia	I. 29. kedd, 8.30-tól	Élettan tanterem	Dr. Benkő Mária Dr. Harrach Balázs Dr. Tuboly Tamás	Dr. Pálfi Vilmos	Dr. Bakonyi Tamás Dr. Dán Ádám, Dr. Hornyák Ákos, Dr. Péntes Zoltán Dr. Rusvai Miklós, Dr. Soós Tibor
Bakteriológia	13.00-tól		Dr. Bernáth Sándor Dr. Fodor László Dr. Varga János	Dr. Jánosi Szilárd	Dr. Hajtós István Dr. Magyar Tibor Dr. Makrai László Dr. Nagy Béla Dr. Tenk Miklós, Dr. Tóth István,
Parazitológia Állattan Halkórtan	I. 30. szerda 8.30-tól	Élettan tanterem	Dr. Kassai Tibor Dr. Hornung Erzsébet Dr. Molnár Kálmán	Dr. Baska Ferenc	Dr. Békési László Dr. Csaba György Dr. Farkas Róbert Dr. Varga István
Klinikumok Gyógyszertan Toxikológia	I. 31. csütörtök 8.30-tól	Belgyógyászat tanterem	Dr. Gálfi Péter Dr. Szenci Ottó Dr. Vörös Károly	Dr. Jerzsele Ákos Dr. Hetey Csaba	Dr. Bajcsy Árpád Csaba Dr. Sályi Gábor Dr. Vajdovich Péter Dr. Zöldág László

TARTALOMJEGYZÉK

VIROLÓGIA - (2013. 01. 29 délelőtt)

1. GALAMBOK ADENOVÍRUSOS FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA

Ballmann Mónika, Thuma Ákos, Berta Krisztián, Kecskeméti Sándor, Harrach Balázs

2. MADARAK ORTHOREOVÍRUSAINAK GENETIKAI DIVERZITÁSA

Dandár Eszter

3. REASSZORTÁNS FÁCÁN ROTAVÍRUSOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

Papp Hajnalka, Bányai Krisztián

4. KULLANCS ENCEFALITISZ VÍRUS FERTŐZÉS SZÖVETTANI VIZSGÁLATA VADON ÉLŐ RÁGCSÁLÓ FAJOKBAN ÉS LABOREGÉRBEN

Egyed László, Zöldi Viktor, Szeredi Levente

5. IRIDOVÍRUS IZOLÁLÁSA TÖRPEHARCSÁBÓL MAGYARORSZÁGON

Juhász Tamás, Woynárovichné Láng Mária, Csaba György, Dán Ádám

6. SERTÉS CIRCOVÍRUS DETEKTÁLÁSA SZARVASMARHA VÉRSAVÓKBAN

Lőrincz Márta, Cságola Attila, Tuboly Tamás

7. UBORKAMOZAIK VÍRUSBAN EXPRESSZÁLT SERTÉS CIRCOVÍRUS VAKCINA IMMUNOGENITÁSA SERTÉSBEN

Tombác Kata, Gellért Ákos, Salánki Katalin, Balázs Ervin, Tuboly Tamás

8. KLASSZIKUS SERTÉSPESTIS ELLENI VAKCINAJELÖLT VÍRUSTÖRZS HATÉKONYSÁGI VIZSGÁLATA ANYAI ELLENANYAGOKKAL (MDA) RENDELKEZŐ 6-7 HETES MALACOKBAN

Lévai Réka, Barna Tímea, Farsang Attila, Fábíán Katalin, Sandra Blome, Sandra Juanola, IlseVaengel, Frank Koenen, Kulcsár Gábor

9. POLYOMAVÍRUS OKOZTA JÁRVÁNY HAZAI LÚDÁLLOMÁNYOKBAN 2012-BEN, ÉS A BETEGSÉG MEGÁLLAPÍTÁSA KACSAKBAN

Gyuris Éva, Kléh Zsófia, Dán Ádám, Bálint Ádám, Thuma Ákos

10. CSIRKE- ÉS PULYKAÁLLOMÁNYOKBAN ENTERÁLIS FERTŐZÉST OKOZÓ VÍRUSOK ELTERJEDTSÉGÉNEK ÉS KÓROKTANI SZEREPÉNEK TOVÁBBI VIZSGÁLATA

Mándoki Míra, Szántó Barbara, Gál János, Benyeda Zsófia, Rusvai Miklós

11. A LÓ FERTŐZŐ KEVÉSVÉRŰSÉGE HAZAI HELYZETE ÉS A SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Stollár Katalin, Dénes Béla, Bakonyi Tamás

12. ÚJ TÍPUSSÚ SERTÉS PARVOVÍRUS FERTŐZÉSEK KIMUTATÁSA KÖZÉP-KELET EURÓPÁBAN

Csárgola Attila, Lőrincz Márta, Cadar Dániel, Tuboly Tamás

13. EGY GÉNUSZ SPECIFIKUS ALTERNATÍV ORF VIZSGÁLATA LIBA PARVOVÍRUSBAN

Mészáros István, Veres Zsuzsa, Hornyák Ákos, Zádori Zoltán

14. A CpG METILÁCIÓ HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A SERTÉS PARVOVÍRUS GENOMJÁBAN

Tóth Renáta, Bálint Ádám, Rauch Tibor, Stefancsik Rajmund, Szénási Enikő, Zádori Zoltán

15. VIZISZÁRNYAS VÍRUSOK FERTŐZŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA PÉZSMARÉCE EREDETŰ SEJTVONALAKON

Mészáros István, Veres Zsuzsa, Bálint Ádám, Dán Ádám, Zádori Zoltán

16. ALTERNATÍV ORF-EK VIZSGÁLATA A PRRSV ORF6 ÉS ORF7 RÉGIÓJÁBAN

Olasz Ferenc, Hornyák Ákos, Zádori Zoltán

17. KÉT MAGYARORSZÁGI PATOGÉN PRRSV TÖRZS SZEKVENCIÁJÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Horváth Péter, Dán Ádám, Bányai Krisztián, Kecskeméti Sándor, Zádori Zoltán, Hornyák Ákos, Bálint Ádám

BAKTERIOLÓGIA – (2013. 01. 28 délután)

18. „SALMONELLA PATHOGENITÁSI SZIGET” (SPI-1) GÉNEK (*hilA*, *sipB*, *sptP*) SZEREPE A *S. HADAR* PATHOGENEZISÉBEN

Szmolka Ama, Imre Ariel és Nagy Béla

19. SZARVASMARHA EREDETŰ *ESCHERICHIA COLI* O157:H43 SZEROTÍPUSÚ ATÍPUSOS TÖRZS DRAFT GENOM SZEKVENCIÁJA

Sváb Domonkos, Horváth Balázs, Maróti Gergely, Tóth István

20. GÜMÖKÓRRA GYANÚT KELTŐ KÓRBONCTANI ELVÁLTOZÁSOK VADDISZNÓ-POPULÁCIÓN BELÜLI ELŐFORDULÁSI ARÁNYÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ KOCKÁZATI TÉNYEZŐK ELEMZÉSE

Csivincsik Ágnes, Nagy Gábor, Svéda Gergely, Rónai Zsuzsanna, Jánosi Szilárd

21. **BRUCELLA OVIS** OMP31 GÉNJÉNEK INAKTIVÁLÓDÁSA AZ IS711 SZAKASZ TERMÉSZETES BEÉKELŐDÉSE KÖVETKEZTÉBEN

Gyuranecz Miklós, Kreizinger Zsuzsa, Horváth Gábor, Rónai Zsuzsanna, Dán Ádám, Nagy Beáta, Szeredi Levente, Makrai László, Jánosi Szilárd, Hajtós István, Magyar Tibor, Mangesh Bhide, Erdélyi Károly, Dénes Béla

22. *BRUCELLA SPP.* OKOZTA FERTŐZÖTTség BORSOD-ABAÚJ-ZEMPLÉN
MEGYEI VADDISZNÓ ÁLLOMÁNYOKBAN

Hajtós István, Kecskeméti Sándor, Zsigáné Lami Erzsébet, Jánosi Szilárd, Dénes Béla

23. MAGYARORSZÁGI *FRANCISELLA TULARENSIS SUBSP. HOLARCTICA* TÖRZSEK
ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

*Kreizinger Zsuzsa, Makrai László, Helyes Georgina, Magyar Tibor, Erdélyi Károly,
Gyuranecz Miklós*

24. LIBÁBÓL IZOLÁLT ELTÉRŐ PATHOGENITÁSÚ *PASTEURELLA MULTOCIDA*
TÖRZSEK SZIALIDÁZ GÉNJÉNEK (*nanB*) ALLÉLTÍPUSAI

Varga Zsuzsanna, Volokhov Dmitriy és Thuma Ákos

25. SERTÉSEKBŐL IZOLÁLT *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* TÖRZSEK
SZEROTIPIZÁLÁSA ÉS ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Sárközi Rita, Makrai László, Tóth Alexandra és Fodor László

26. KÜLÖNBÖZŐ GAZDAFAJOKBÓL SZÁRMAZÓ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*
TÖRZSEK VIRULENCIA FAKTORAINAK VIZSGÁLATA

Khayer Bernadett, Magyar Tibor, Wehmann Enikő

27. BÚZA ÉS KUKORICA ALAPÚ TÁPOK HATÁSA *CAMPYLOBACTER JEJUNI*
KOLONIZÁCIÓJÁRA BROJLERCSIRKÉBEN

Molnár Andor, Claudia Hess, Pál László, Husvéth Ferenc, Michael Hess és Dubleczy Károly

GALAMBOK ADENOVÍRUSOS FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA

Ballmann Mónika¹, Thuma Ákos², Berta Krisztián³, Kecskeméti Sándor⁴, Harrach Balázs¹

Galambokból a hetvenes évek közepén mutattak ki először adenovírusokat (AdV) fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal. Eddig kétféle betegséget írtak le galambokban AdV-os fertőzések kapcsán, azonban egyik esetében sem határozták meg pontosan a háttérben álló kórokozót. Az I-es és II-es típusú adenovirozis elkülönítése tehát pusztán az okozott tünetek alapján történik jelenleg is. Az I-es, vagy más néven „klasszikus” típus, főleg a fiatal galambokat érinti, szezonális előfordulás jellemzi (fiatal galambok versenye, nyár eleje), hasmenést, hányást, testtömeg csökkenést okoz. A II-es típus nem köthető korcsoporthoz, az év bármely szakában előfordul, súlyos, elhalásos májgyulladást idéz elő és heveny lefolyású. A galamb-AdV-ok izolálását primer csirke máj- és vesesejteken kísérelték meg, és mindössze egyetlen esetben sikerült a már ismert tyúk-AdV-szerotípusoktól eltérő vírust elszaporítani. Ez a törzs a galamb-adenovírus 1 elnevezést kapta (pigeonadenovirus 1; PiAdV-1) (Hess et al., 1998). Szekvencia adatot csak ebből az egy galamb-AdV-ből közöltek eddig.

Laboratóriumunk 2007-ben mutatott ki először PCR módszerrel AdV-t galambokból. Ezt követően 5 éven át 58 állományból 165 egyed PCR-es vizsgálatát végeztük el AdV-ok kimutatása céljából. A vírusok izolálását csirke-embrió májsejteken kíséreltük meg. A leggyakoribbnak tűnő aviAdV típus teljes genom szekvenálását is megkezdtük „primer walking” módszerrel. A múlt évben az AdV monitoring mellett circo- és herpeszvírus szűrést is indítottunk, valamint szövettani vizsgálatokat is végeztünk.

Vizsgálatunk során két új típusnak látszó aviAdV-t azonosítottunk. A ritkább típust egy alkalommal mutattuk ki, a gyakoribbat ezzel szemben 39 esetben. Ugyanakkor PiAdV-1-et csak egyszer találtunk. SiAdV-ből szintén két típust azonosítottunk, melyek közül az egyik egy alkalommal fordult elő, míg a másikat 15 alkalommal mutattuk ki. További 30 egyedet találtunk AdV-pozitívnak, ám ezekben az esetekben a pontos típus meghatározását még nem végeztük el. A vizsgált 165 egyedből összesen 87 (52,7%) volt AdV-pozitív. A leggyakoribb galamb-aviAdV genomjából eddig egy 28 ezer bázispár hosszúságú genomszakasz nukleotid sorrendjét határoztuk meg. Az új galamb-AdV-ok izolálási kísérlete sikertelen volt. A 131 circovírusra vizsgált egyedből 113-at (86,2%) találtunk pozitívnak, melyek közül 70 AdV-ra is pozitívnak bizonyult. A vizsgált 59 db mintából herpeszvírust mindössze 4 esetben mutattunk ki, ezekből 2 AdV-ra is pozitív volt. A szövettani vizsgálatok során nem találtunk egyértelműen AdV által okozott szövettani elváltozást. A szövettani vizsgálatok eredményeképpen az elhullásokat valószínűleg főleg takarmányozási problémák, bakteriális és más vírusfertőzések okozhatták.

Az I-es és II-es típusú adenovirozis háttérben álló vírus típusok kapcsolata továbbra sem tisztázott. Feltételezéseink szerint a leggyakrabban kimutatott aviadenovírus legfeljebb másodlagos kórokozóként van jelen a galambállományokban. A legnagyobb problémát valószínűleg a háttérben szinte mindig jelen lévő circovírusok okozzák. Immunszuppresszív hatásuk a másodlagos kórokozók által okozott megbetegedések esélyét növelik.

Köszönetnyilvánítás: OTKA K72484

MADARAK ORTHOREOVÍRUSAINAK GENETIKAI DIVERZITÁSA

Dandár Eszter¹

Annak ellenére, hogy a madarak orthoreovírusai közé sok gazdaságilag jelentős kórokozó is tartozik a GenBank adatbázisában jelenleg mindössze 5 madár izolátum (3 csirke, 1 kacska és 1 liba) teljes genomszekvenciája található meg. Ezért a madár orthoreovírusok genetikai sokféleségének és genomszerveződésének jobb megismerése érdekében PhD munkám során válogatott (jelen esetben csirkéből, pulykából és dolmányos varjúból származó) törzsek genomjának meghatározását és molekuláris vizsgálatát végeztem el.

Idegrendszeri megbetegedésben elhullott csirke agyából izolált reovírus törzs genomját hagyományos, "primer-walking" módszerrel határoztuk meg. Az így nyert génszekvenciák filogenetikai vizsgálata más, csirkéből izolált törzsek megfelelő génjeivel tárt fel rokonsági kapcsolatokat. Ugyanakkor több gén esetében (λA , λB , μNS , σC , p10, p17) új leszármazási ágakat is azonosítottunk, és bizonyos esetekben (pl. λB , σA gén) a génbanki törzsekkel összehasonlítva a nukleinsav azonossági érték mindössze 70-80% volt.

Egy szintén idegrendszeri tüneteket mutató dolmányos varjúból izolált orthoreovírus törzs genomszekvenciáját félvezető alapú, újgenerációs szekvenáló berendezés segítségével kaptuk meg. A szekvencia azonossági értékek meghatározása és a filogenetikai törzsfák elkészítése során egyértelművé vált, hogy a vizsgált törzs nagyban különbözik minden, a GenBank-ban jelenleg fellelhető orthoreovírusról, beleértve a madarak és az emlősök orthoreovírus törzseit is. Valójában a λA gén szekvenciájának vizsgálata utalt csak egyértelműen arra, hogy ez a dolmányos varjú törzs a madarak reovirusaival rokonságban áll. Minden más gén esetében a nukleotid és aminosav hasonlósági értékek a génbanki referencia törzsekkel 29 és 83 % közötti tartományba estek.

Három, házi pulykából izolált orthoreovírus törzs genomját a fenti két módszer kombinációjával határoztuk meg. Ez a munka hiánypótló szerepet is betölt, hiszen jelenleg a GenBank adatbázisában nem lelhető fel teljes pulyka reovírusgenomszekvencia, és részleges adatok is mindössze az S-osztályba sorolt szegmensekre vannak. A σA , σB , σC , p10, p17 és σNS génekre talált génbanki törzsek azonos génjeiből nyert információival való összehasonlításakor kitűnt, hogy az általunk vizsgált pulyka orthoreovírus törzsek génjei egymással és a referencia törzsekkel 85-97%-os nt szekvencia azonosságot mutatnak. Összességében a pulyka reovírusok génjeinek molekuláris elemzése önálló genetikai klasztereket sejtetett.

E néhány vírustörzs molekuláris vizsgálata a madarak orthoreovírusainak nagy genetikai változatosságát mutatja, ami a legtöbb esetben az izolált törzsek gazdafaj eredetére is utal.

REASSZORTÁNS FÁCÁN ROTAVÍRUSOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

Papp Hajnalka¹, Bányai Krisztián¹

A rotavírusok az egyik leggyakoribb okozói a heveny lefolyású gasztroenteritisznek emberekben és több állatfajban egyaránt. A vírust kimutatták már számos emlősből (szarvasmarha, sertés, ló, kiskérődzők stb.) és madarakból (pulyka, csirke, fácán), melyek állományaikban érezhető gazdasági károkat okozhatnak a súlyvesztés, fejlődésbeli elmaradás és az elhullások miatt.

A rotavírusok burok nélküli virionnal és duplaszálú RNS genommal rendelkeznek. Genomjuk szegmentált, a 11 szegmens egy kivétellel monocisztronos. Az eddig megismert 7 vírusszere (*Rotavirus A – G*) közül emlősökben és madarakban egyaránt a *Rotavirus A* a legfontosabb. Vírusszereken belül hagyományosan szerotípusokat különítenek fel a virion két felszíni antigénjének (VP4 és VP7) szerológiai tulajdonságai alapján. Mára azonban a szerotípizálást felváltotta a nukleinsav szekvencia alapú genotípus meghatározás, melyet az utóbbi években kiterjesztettek mind a 11 génszegmensre, ahol az egyes génekhez rendelt genotípust egy-egy betű és szám kombinációjával adják meg. 2012 végéig csupán két madár rotavírus teljes genomszekvenciája volt elérhető a GenBank-ban, egy galamb és egy csirke eredetű törzsé. Idén két újabb madár (egy pulyka és egy fácán) rotavírus törzs teljes genomját közölték.

Doktori képzés keretein belül végzett kutatásaim során madár és emlős rotavírus törzsek genomszekvenciájának meghatározását és filogenetikai szempontú bioinformatikai elemzését végzem. Az elmúlt években hazai együttműködésben több, rotavírus fertőzéssel diagnosztizált fácán bélsármintájához jutottunk hozzá és vizsgáltuk a kimutatott törzsek molekuláris jellemzőit. Előadásomban két mélyebb elemzésre kiválasztott fácán rotavírus törzs szekvencia és filogenetikai elemzését ismertetem. A két törzs genomjának fehérjéjé kódoló szakaszait hagyományos módszerekkel határoztuk meg, a szekvencia elemzéshez ingyenesen letölthető vagy online elérhető programokat használtunk. A legfontosabb eredmények a következők:

- A Magyarországon azonosított fácán törzsek több génjükben is eltértek a referencia törzsnek is felfogható németországi fácán rotavírus törzstől, beleértve a VP4 és/vagy VP7, valamint az NSP2 gén genotípusát. Meglepetésünkre ezekben a génekben a törzseink csirke illetve pulyka és galamb törzsekkel mutattak genotípus azonosságot.
- A filogenetikai vizsgálatok ugyanakkor azt mutatták, hogy azokban az esetekben, amikor a referencia fácán, galamb és pulyka rotavírus törzsek genotípusai megegyeztek a hazai fácán törzsek megfelelő génjének genotípusával (pl. VP1-3, VP6, NSP3-5), akkor a hazai fácán törzsek szorosabb rokonságot mutattak a németországi fácán törzssel, mint a többi gazdafaj referencia törzseivel.

A rotavírusok szegmentált genomjukból adódóan reasszortációra képesek, amely elviekben érintheti a genom bármely szegmensét. A vizsgált hazai fácán rotavírusok genomjának mozaik jellege azt sugallja, hogy a különböző fajok rotavírus törzsei közötti reasszortációnak fontos szerepe van a fácánok rotavírus törzseinek kialakulásában.

KULLANCS ENCEFALITISZ VÍRUS FERTŐZÉS SZÖVETTANI VIZSGÁLATA VADON ÉLŐ RÁGCSÁLÓ FAJOKBAN ÉS LABOREGÉRBEN

Egyed László¹ Zöldi Viktor² Szeredi Levente³

Bevezetés: A kullancsencefalitisz vírus (KEV) nagymértékben eltérő klinikai megjelenésű fertőzéseket okoz emberben. Ugyanez a helyzet a kistrágszáló fajokban, ahol a vadon élő rágcsálófajokban a fertőződés inapparens, laboregekben viszont halálos. Eddig az irodalomban alapkutatói célra nem alkalmazott immunhisztokémiai módszerrel követtük a vírusfertőzés előrehaladását 3 vadon élő rágcsáló fajban és laboregérben.

Cél: A vadon élő rágcsálófajok rezisztenciájának jobb megértése, a vírus szerkezeten belül történő terjedésének vizsgálata, az emberi KEV fertőzés lefolyásának jobb megértése érdekében.

Módszer: Két kísérletet végeztünk:

Az elsőben 3 vadon élő rágcsálófajt, és laboregeret fertőztünk intramuszkulárisan 100 p.f.u. vírussal. A vadon élő rágcsálókat az 1-5, 7, 9, 11, 14, 21 és 28 napokon, a laboregereket naponta (1-11) CO₂-al altattuk el, majd parenchymás szerveiket, beleket, gyomrot, az agyat fixálva, monoklonális ellenanyaggal immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk.

A második kísérletben csak egy vadon élő fajt és laboregeret fertőztünk szájon át, 10⁵ p.f.u. vírussal. Minden egyéb körülmény a fenti kísérlettel azonos volt.

Eredmény: A laboregek mindkét kísérletben elpusztultak a 9-11. napon diffúz encefalitiszben, a vadon élő egerek mindkét kísérletben klinikailag egészségesek maradtak. Hematoxilín-eozin festés csak az agyban mutatott ki elváltozásokat, lympho-histiocytás érgyulladás, idegsejt nekrozis és gliosarjadzás volt általánosan tapasztalható. Az immunhisztokémiai módszer laboregérben a központi idegrendszerben a fertőzés előrehaladtával diffúzvá váló eloszlásban mutatott ki pozitív sejteket a központi idegrendszer teljes területén (nagy- és kisagy, szaglóhagyma, agytörzs). Im. fertőzés esetén csak az agy, perorális fertőzéskor az emésztőrendszer idegi elemei is festődtek.

Vadon élő egérfajokban im. fertőzés esetén minden szövet negatív volt. Szájon át történő fertőzéskor nagy mennyiségű oltóvírust használva két egyedben szubklinikai encefalitisz alakult ki, a laboregekhez hasonló, de enyhe szövettani elváltozásokkal.

Következtetés: Először sikerült kimutatni KEV-t vadonélő rágcsáló központi idegrendszeréből, akkor is, ha a fertőzés mesterségesen nagy mennyiségű oltóvírussal történt. A fertőzés gyógyuló, szubklinikai volt.

Laboregérben a perifériákon csak idegrendszerhez tartozó sejtek fertőződtek. Ez és (néhány egyedben) a fertőzési módtól függően az agy különböző területeinek eltérő intenzitású fertőzöttsége felveti az intraneuronális centripetális terjedés lehetőségét, és azt, hogy a beoltási helytől függően a vírus különböző helyeken éri el a központi idegrendszert.

Köszönetnyilvánítás: Köszönjük Mészáros Ágnesnek a szövettani feldolgozás során végzett pontos megbízható munkáját. A vizsgálatokat az OTKA K81258 támogatásával végeztük.

IRIDOVÍRUS IZOLÁLÁSA TÖRPEHARCSÁBÓL MAGYARORSZÁGON

Juhász Tamás¹, Woynárovichné Láng Mária¹, Csaba György¹, Dán Ádám¹

2008 májusában nagyarányú törpeharcsa *Ameiurus nebulosus* elhullást tapasztaltak egy dél-magyarországi négy ha nagyságú mesterséges tóban Szeged mellett. A megbetegedett törpeharcsák „gyertyázó” testtartással a víz felszín közelében voltak, majd néhány órán belül elpusztultak. Jellemző volt a gyors lefolyás. Három hét alatt több mázsa hal tetemet halásztak le. A tóban élő egyéb halfajok nem betegedtek meg. Gazdasági kár sem keletkezett, bár a sport-horgászati célra létesített tavon éppen egy nemzetközi bajnokság zajlott, amit azonban fennakadás nélkül le tudtak bonyolítani. Az Intézetünkbe beküldött moribund törpeharcsa minták kórbonctani, kórszövettani, bakteriológiai, virológiai és molekuláris biológiai vizsgálatait végeztük el. A lép, máj, vese és az agyvelő homogenizátumával beoltott ponty hámsejt daganat (Epithelioma Papulosum Cyprini, EPC) és naphal ivadék (Bluegill fry, Bf-2) sejtvonalakon 20 °C-on inkubálva 48- 72 óra múlva vírusra jellemző sejtkárosító hatást, a sejtek lekerekedését, valamint jellegzetes bazofil citoplazma zárványokat találtunk. Az eredeti homogenizátumokból és a fertőzött szövettenyészet felülúszójából származó vírus nukleinsav 580 bázispár nagyságú MCP (major capsid protein) génjét Hyatt és munkatársai 2000-ben leírt módszere szerint amplifikáltuk. A kapott PCR termék szekvencia meghatározása után megállapítottuk, hogy az általunk izolált vírus MCP gén szekvenciája a Génbank adatai alapján megegyezik az European Catfish Virus = ECV azonos nukleotid sorrend részletével. Az ECV az Iridoviridae családon belül a Ranavírus nemzetséghez tartozik. A ranavírusok jelenleg a változó testhőmérsékletű gerincesek legjelentősebb kórokozó vírusai, melyek Afrika kivételével az egész világon elterjedtek, Európában is több járványt írtak már le. Járványtanuk azonban még nem teljesen tisztázott. A vírus szerencsére csak a törpeharcsákra patogén, viszont a vírus közeli rokonságban van a bejelentési kötelezettség alá tartozó halbetegséget okozó Epizootic Haematopoietic Necrosis vírussal, amely Európában egzotikusnak számít, és a törpeharcsán kívül más, értékes tógazdasági halfajokat, pl. a pisztrángot, a csukát és a harcsát is megbetegíti. A két vírus által okozott betegség tünetei nagyon hasonlóak, ezért a betegség diagnózisához elengedhetetlen a laboratóriumi vizsgálat. Az ECV és az EHNV csak a vírusok MCP génjének nukleotid szekvencia analízisével különböztethető meg egymástól.

Mivel az ECV magyar elnevezése még nem történt meg, javasoljuk a törpeharcsa iridovírus vagy a törpeharcsa ranavírus elnevezést. Az előző évtizedben Magyarországon több esetben tapasztalták törpeharcsák hirtelen tömeges elhullását, melynek okát herpesz vírusnak tulajdonították. Az ECV kóroktani szerepét Magyarországon első alkalommal sikerült bizonyítanunk.

SERTÉS CIRCOVÍRUS DETEKTÁLÁSA SZARVASMARHA VÉRSAVÓKBAN

Lőrincz Márta¹, Cságola Attila¹, Tuboly Tamás¹

Bevezetés: A *Circovirus* genus tagjai kisméretű, körkörös, szimplaszálú DNS genommal rendelkező vírusok. Világszerte elterjedtek, főként madarakban és sertésekben mutatták ki őket, bár a legújabb eredmények alapján halakban és kutyában is jelen vannak. A sertések vírusát (PCV2) kimutatták egerekben és szarvasmarhákban is. A szarvasmarhák esetében tünetekkel is összefüggésbe hozták a fertőzést, ugyanakkor szerológiai tesztekkel ellenanyagválaszt nem sikerült detektálni és kísérletes fertőzéssel sem sikerült az állatokat megfertőzni.

Későbbi vizsgálatok a PCV2b típust fiatal borjak esetében patogénnek találták. Esetenként bőrvérzést és emésztőszervi vérzéseket találtak, amelyek mellett szövettannal csontvelő sejtek és lymphocyták depletióját is kimutatták, valamint vérvizsgálattal aplasticus pancytopeniát állapítottak meg. A betegség a vérzéses szindróma nevet kapta, és a háttérvizsgálatok alapján semmilyen baktériumot, vírust, toxint nem találtak a PCV2b mellett, utóbbi jelenlétét viszont immunhisztokémiával is megerősítették.

Anyag és Módszer: 3 növendék szarvasmarha vérsavója érkezett vizsgálat céljára. Az állatok egy PCV2b-vel fertőzött sertéstelepen élnek. Az állatoknál nyálkás-véres hasmenés volt megfigyelhető. A beérkezett vérsavókat PCR módszerrel vizsgáltuk circovírus kimutatása céljából és elvégeztük a kimutatott vírus teljes genom szekvenálását. PCV2 specifikus ellenanyagokat indirekt immun-fluoreszcenciás módszerrel vizsgáltunk. A szarvasmarha vírusos hasmenését a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság zárta ki.

Eredmények: Mindhárom szarvasmarha és a telepről érkezett sertések mintái is pozitívnak bizonyultak PCV2b vírusra. A teljes genom PCR is sikeres volt a kettős szarvasmarha savó esetében. A szarvasmarha vérében kétféle vírus volt jelen, a szekvencia alapján egy helyen két különböző nukleotid fordult elő. A két nukleotid közül az egyik minden esetben az volt, amelyik a sertésben lévő vírusban is megtalálható. A változások aminosav változást is okoznak, a Rep fehérjén 1, a Cap fehérjén pedig 4 aminosav is eltért a sertésekben talált PCV2-höz képest. A vérsavók szerológiai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom szarvasmarha hordozott PCV2b-re specifikus ellenanyagokat.

Következtetések: Két olyan publikáció jelent meg, amely szerint PCV2 (Kappe és mtsai., 2010), illetve ahhoz nagyon hasonló (Nayar és mtsai., 1999) vírus megtalálható a szarvasmarhákban. Ezekhez csatlakoznak a mi vizsgálati eredményeink is, miszerint PCV2-t azonosítottunk borjak vérsavóiban. Az állatok PCV2-vel fertőzött sertéstelepen élnek. A szekvencia analízis alapján állítható, hogy a szarvasmarhákban kimutatott vírus is PCV2b, és ennek a vírusnak a genomja pont mutációkban tér el a sertésekből kimutatott PCV2b-től. A vizsgálatok alapján a kontamináció kizárható és feltehető, hogy a PCV2 szarvasmarhákban is képes szaporodni.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokhoz szükséges mintákat Horváth Emőke segítségével gyűjtöttük, anyagi támogatást pedig a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj biztosított.

UBORKAMOZAIK VÍRUSBAN EXPRESSZÁLT SERTÉS CIRCOVÍRUS VAKCINA IMMUNOGENITÁSA SERTÉSBEN

Tombác Kata¹, Gellért Ákos², Salánki Katalin³, Balázs Ervin², Tuboly Tamás¹

Bevezetés: A rekombináns uborkamozaik vírus (cucumber mosaic virus, CMV) a kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2, PCV2) kapszidjának egyik, 10 aminosav hosszúságú, számítógépes modellezés alapján kiválasztott epitópját expresszálja. A rekombináns CMV antigén korábbi kísérletekben erekbe oltva immunogénnek bizonyult.

Cél: Munkánk célja az volt, hogy a létrehozott nanopartikulum vakcinaként történő alkalmazhatóságát a célállatfajban, házi sertésben vizsgáljuk.

Módszer: A vakcinajelölt tesztelésére két állatkísérletet végeztünk. Az első kísérletben 13 malacot három csoportra osztottunk. Az első csoportot (n=5) az adjuvált, rekombináns CMV-vel izomba oltottuk. A második csoport malacait (n=5) kereskedelmi forgalomban kapható, inaktivált vakcinával immunizáltuk. A harmadik csoport tagjait (n=3) PBS-sel oltottuk. Az oltásokat 10 nap múlva megismételtük. A második oltás után 10 nappal az összes állatot élő PCV2 törzssel fertőztük hasüregbe oltva és szájon át, az állatoktól hetente vérmintát vettünk. A malacokat a kísérlet 60. napján kiirtottuk és szervmintákat gyűjtöttünk. A szérummintákból a PCV2 specifikus ellenanyagszinteket indirekt IF módszerrel vizsgáltuk, a szervmintákban a vírusszaporodást polimeráz láncreakció segítségével mutattuk ki. A második kísérletben 10 malacot használtunk, két csoportra osztva őket. Az első csoport malacait (n=5) négy hetes koruktól kezdve négy héten át, hetente, egyedenként 50 mg rekombináns CMV-vel kevert takarmánnyal etettük. A második csoport (n=5) állatait nem kezeltük. A malacoktól hetente vérmintákat vettünk, amelyekben indirekt IF módszerrel kerestük a PCV2 specifikus ellenanyagokat.

Eredmény: Az első kísérlet kezdetekor egyik állatból sem volt PCV2 specifikus ellenanyag kimutatható. Az első csoportban a második, a második csoportban az első vakcinázást követően tudtunk először ellenanyagot kimutatni. A harmadik csoport állatai csak a kísérleti fertőzést követően váltak szeropozitívvá. Polimeráz láncreakcióval az első csoportban 2 malac 3 szervéből tudtunk vírusszaporodást detektálni. A második csoportban nem volt kimutatható vírusszaporodás. A harmadik csoport összes állatában jelen volt detektálható PCV2 szaporodás. A második kísérlet kezdetekor vett vérmintákban nem volt kimutatható PCV2 specifikus ellenanyag. Az első csoport öt állata közül kettőben a kísérlet második hetére, a további háromban pedig a harmadik hétre indult meg az ellenanyag termelés. A másik csoport állatai a kísérlet végéig szeronegatívak maradtak.

Következtetés: A rekombináns CMV parenterálisan adva képes olyan mértékű PCV2 specifikus ellenanyag termelést kiváltani, hogy az csökkenti a malacokban a vírus szaporodását, és hasonló nagyságú ellenanyagválasz kiváltására szájon át adva is alkalmas.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat az OTKA-NKTH CNK 78675 finanszírozásával végeztük.

KLASSZIKUS SERTÉSPESTIS ELLENI VAKCINAJELÖLT VÍRUSTÖRZS HATÉKONYSÁGI VIZSGÁLATA ANYAI ELLENANYAGOKKAL (MDA) RENDELKEZŐ 6-7 HETES MALACOKBAN

Lévai Réka¹, Barna Tímea¹, Farsang Attila¹, Fábrián Katalin¹, Sandra Blome², Sandra Juanola³, Ilse Vaengel⁴, Frank Koenen⁴, Kulcsár Gábor¹

A klasszikus sertéspestis (CSF) a házi sertés (*Sus scrofa domestica*) és a vaddisznó (*Sus scrofa*) nagy gazdasági kártétellel járó, vírus által okozott betegsége. A vaddisznó, mint a vírus rezervoárja, központi szerepet játszik a betegség járványtanában, veszélyeztetve ezzel az adott területen tartott házi sertés állományokat.

A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (korábban: Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal) Állatgyógyászati Termékek Igazgatóságának (NÉBIH ÁTI) Oltóanyag Osztálya több európai intézettel együtt 2004 óta vesz részt abban a tudományos projektben, melynek célja vaddisznók immunizálására alkalmas, szájon át adható marker vakcina kifejlesztése a CSF ellen. Igazgatóságunk a projektben előállított CP7_E2alf vakcinajelölt törzs hatékonyságát, az Európai Gyógyszerkönyvi előírások (04/2008:50207 és 07/2008:0065) alapján beállított állatkísérletben vizsgálta.

A bemutatott kísérletben 40 darab 6-7 hetes, anyai ellenanyagokkal (MDA) rendelkező malacot állítottunk be. Három csoportot alakítottunk ki: egy oltatlan kontroll és két, peroralisan (po), illetve intramuscularisan (im) vakcinázott csoportot. A vakcinázást követő 14. napon nagy virulenciájú „Koslov” CSF vírustörzsszel fertőztük az állatokat. A kísérletet a fertőzést követő harmadik héten zártuk le. A malacok általános állapotát és testhőmérsékletét egy klinikai pontrendszer segítségével minden nap értékeltük, a moribund állatokat az állatvédelmi szempontok figyelembe vételével extermináltuk. A mintavételezési napokon a szerológiai vizsgálatokhoz natív vért, a vírusizoláláshoz és a PCR vizsgálatokhoz alvadásban gátolt vért vettünk az állatokból. Az elhullott és exterminált állatokat kórboncoltuk, azokból immunhisztokémiai vizsgálatokhoz szervmintákat gyűjtöttünk.

A kontroll állatok nagy része (7/10), illetve a po vakcinázott állatok közel fele (7/15) a CSF tipikus klinikai tüneteit mutatva a kísérlet lezárása előtt elpusztult. Az im vakcinázott állatok a kísérlet lezárásáig egészségesek maradtak. A szerológiai vizsgálatok alapján az elhullott állatok nem hangolódtak át megfelelően. Ezekben a malacokban a fertőzést követő negyedik naptól virémiát tapasztaltunk. A PCR minták vizsgálata folyamatban van.

A kísérlet valid volt, miután a kontroll állatok több, mint 50%-a mutatta a CSF súlyos, tipikus tüneteit, illetve a 70%-ukon észleltük a betegség tipikus jeleit a kísérlet lezárása előtt. Mivel ebben a kísérletben a malacok vakcinázott kocáktól születtek, így részleges védettséggel kell számolnunk. Az im adott vakcina az anyai ellenanyagok jelenlétében is védett, ám po alkalmazás mellett nem biztosított megfelelő védelmet.

A munka pályázati és pénzügyi háttérét a CSFV_goDIVA nevű (azonosító: KBBE-227003) FP7 projekt biztosítja.

POLYOMAVÍRUS OKOZTA JÁRVÁNY HAZAI LÚDÁLLOMÁNYOKBAN 2012-BEN, ÉS A BETEGSÉG MEGÁLLAPÍTÁSA KACSAKBANGyuris Éva¹, Kléh Zsófia², Dán Ádám¹, Bálint Ádám¹, Thuma Ákos¹

A polyomavírus okozta megbetegedést (vérzékes bél- és vesegyulladást, HNEG) libában először 1969-ben figyelték meg Magyarországon. Az ezredfordulót követően a betegség külföldön és hazánkban egyaránt a libák legfontosabb vírusos megbetegedései közé tartozik. Kacsában való előfordulásáról azonban csak nagyon kevés adat van, és a vírus kacsapatogenitása nem bizonyított egyértelműen.

A járványhullámok intézeti adatok alapján 4-5 évenként követték egymást, így a 2003-as évet követően 2008-ban, majd 2012-ben ismét kiemelkedően sok volt a betegségben elhullott libák száma. Az előző évekhez hasonlóan tavaly is elsősorban a szürke tollú, hízott máj előállítására szánt libák – gyakran a tömés alatt, illetve végén – betegedtek meg, ami komoly gazdasági kárt okozott, tekintettel az exportunk mértékére is (a világ hízott máj exportjának jelentős részét Magyarország adja).

A libákban a betegség 4 hetes kortól jelentkezett és egészen a tömési periódus végéig előfordult. Tekintettel a hosszú (akár több hét) lappangási időre, valamint az érintett állományok elhúzódó szerológiai áthangelődésére, a betegség időbeni lefolyása – néhány naptól több hétig – igen változatos képet mutatott. Az állatok tünetmentesen, vagy rövid bágyadság után, comatosus állapotba kerültek, majd elhullottak. A patomorfológiai elváltozások (a szakirodalmi adatokkal összhangban) elsősorban a vesében mutatkoztak. Kórbonctani vizsgálattal duzzadt haragos vörös- vagy fakó veséket, vesetájéki ödémát, az esetek egy részében pedig zsigeri köszvényt lehetett látni. Szöveti vizsgálattal ezekben a madarakban, a veselebensnyék kéreg- és velőállományának határán vérzésekkel tarkított csatornahám-elhalások voltak megfigyelhetők, amely tapasztalataink szerint a betegségre kórjelző értékű. Az érintett vesékből molekuláris biológiai módszerekkel a vírust ki lehetett mutatni.

2012. szeptemberében egy mulard fajtájú, tömésre szánt, napos korban importált kacsáállományban megemelkedtek az elhullások. A járvány mintegy 23 napig tartott, és az állomány 1,44 %-a hullott el. Az elhullásokat megelőzően – a libákon megfigyeltekhez hasonlóan – rövid ideig (10-30 percig) tartó bágyadságot, elesettséget, majd comatosus állapotot lehetett észlelni. A kórbonctani vizsgálatokkal enyhébb-súlyosabb fokú zsigeri köszvényt, a savóshártyák erőteljes ödémáját, vesetájéki ödémát, valamint duzzadt, haragosvörös veséket lehetett látni. Kórszöveti vizsgálattal a libákéhoz hasonló veseelváltozások voltak megfigyelhetők.

A szerzők megfigyelése összhangban van az izraeli és francia szerzők megfigyeléseivel. Szintén szakirodalmi adatokkal összhangban megállapítható volt, hogy a megbetegedett kacsákból kétféle primerpárral is kimutatott polyomavírus szekvencia szinten azonos volt a libákban is megbetegedést okozó vírustörzssel.

A vírustörzssel kacsákban fertőzési kísérletet tervezünk.

CSIRKE- ÉS PULYKAÁLLOMÁNYOKBAN ENTERÁLIS FERTŐZÉST OKOZÓ VÍRUSOK ELTERJEDTSÉGÉNEK ÉS KÓROKTANI SZEREPÉNEK TOVÁBBI VIZSGÁLATA

Mándoki Míra¹, Szántó Barbara¹, Gál János¹, Benyeda Zsófia¹, Rusvai Miklós¹

A brojlercsirkék satnyaság és törpenövés szindrómája (Runting-Stunting Syndrome, RSS) valamint a pulykák enterális kórképe („poult enteritis complex”) széles körben jelentkező főként enterális tünetekben megmutatkozó komplex kórkép, amely jelentős gazdasági kárt okoz a baromfityesztőknek a növekedésben való visszamaradás és genetikailag elérhető fejlődési erély elmaradása miatt. Az elmúlt évek során sikerült igazolni kiegészítő vizsgálatokkal, hogy a fenti enterális betegség (enteric disease, ED) hátterében egyidejűleg több különböző vírus van jelen. Emelkedett elhullást mutató és főként enterális tünetekben megbetegedett brojlercsirke és -pulyka állományokat vizsgáltunk és a beteg baromfiállományok egyedeinek bélcsatornájából számos vírust, így különböző astro-, corona-, rota-, és reovírusokat mutattunk ki. Munkacsoportunk ezután igazolta több más vírus mellett a parvovírusok jelenlétét is. A betegség hátterében feltételezett vírusok pathogenitása önmagában nem számottevő, és jelenlegi feltételezések szerint általában csak hajlamosító tényezők és koinfekciók mellett alakítják ki a megbetegedést.

Vizsgálatainkkal további magyarországi törzseket gyűjtöttünk, ezáltal sikerült igazolni csirke, valamint pulykaállományokban a fent említett vírusok széleskörű elterjedtségét, a koinfekciók, valamint a következményes vírusos vékonybélgyulladás, továbbá a limfoid képletek sorvadásának jelenlétét. A kórbonctani vizsgálatok mellett egyidejűleg molekuláris biológiai és indirekt immunhisztokémia (IH) felhasználásával is igazoltuk a kórokozók jelenlétét elsősorban a bélhámsejtekben, továbbá néhány belső szervben.

Bár a parvovírusok konkrét vagy kizárólagos oktani szerepét még nem sikerült igazolni a fenti kórképek hátterében, az ED tüneteit mutató állományokban nagyobb számban lehetett kimutatni a parvovírusok jelenlétét. További vizsgálatokat igényel annak megválaszolása, hogy a parvovírusok önállóan kiváltják-e a csirkék és pulykák enterális betegségeit vagy csak beindítanak egy „láncreakciót”, illetve mekkora szerep jut a parvovírusnak az említett kórképek kialakításában.

Köszönetnyilvánítás: Vizsgálataink anyagi hátterét az NKB 15728 pályázat, valamint a TÁMOP-4.2.2.B-10/1 és a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 projekt biztosította.

A LÓ FERTŐZŐ KEVÉSVÉRŰSÉGE HAZAI HELYZETE ÉS A SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Stollár Katalin¹, Dénes Béla¹, Bakonyi Tamás²

A lovak fertőző kevésvérűsége (equine infectious anaemia, EIA), az 50-es éveket követően 2010-től ismét sporadikusan előforduló fertőző betegség a hazai lóállományokban. Az Európai Unió más országaihoz hasonlóan, a betegség bejelentési kötelezettség alá tartozik az állatbetegségek bejelentésének rendjéről szóló 113/2008. (VIII. 30.) FVM rendelet alapján. Az Állategészségügyi Szabályzat előírja, hogy a sportlovakat évente, minden más lovat háromévente rendszeres szerológiai vizsgálat alá kell vonni. A betegségtől való mentesség fenntartása céljából a jogszabály elrendeli a fertőzött állatok leölését és az együtt tartott állatok további vizsgálatát. A lóútlevel kiváltásához szintén kötelező előírás az EIA szerológiai vizsgálat.

A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság laboratóriumában az EIA szerológiai monitoring vizsgálatokat a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (World Organisation for Animal Health, OIE) előírásainak megfelelően agargél immundiffúziós módszerrel (AGID) végezzük. A 2010. évben a megvizsgált 20063 savómintából 8, 2011-ben a vizsgált 17540 mintából 13, 2012. december 15-ig pedig a vizsgált 13364 ló savómintából 5 szeropozitív esetet diagnosztizáltunk az ország különböző megyéiben. A monitoring vizsgálatok során fertőzöttnek talált állatok és a környezetükben tartott többi ló szerológiai vizsgálatát 21 nap múlva ismét elvégeztük AGID és ELISA módszerrel is. Az egyik, 2011-ben szeropozitívnak bizonyult állat társainak vizsgálata során két, AGID próbával negatív, de ELISA teszttel pozitív lovat találtunk. Az ellentmondásos szerológiai eredmények háttérének tisztázására az állatok levágása miatt nem kerülhetett sor.

A szeropozitívnak bizonyult állatok vérmintáit két különböző ELISA teszttel is megvizsgáltuk. Néhány kiválasztott savómintából hígítási sort készítettünk, és párhuzamosan elvégzett vizsgálatokkal hasonlítottuk össze a két ELISA és az AGID módszer érzékenységét. A vizsgálatok eredményei segítséget nyújthatnak a szűrővizsgálatok céljára leginkább alkalmas módszer kiválasztásához.

A betegségtől való mentesség ismételt elérésében fontos szerepe van a lovak egyedi jelölésének és nyilvántartásának, valamint a rendszeres szerológiai monitoring vizsgálatok elvégzésének. A 2010. és 2012. között diagnosztizált 26 szeropozitív állat közül csak 3 esetben figyelték meg a betegség tüneteit, ami alátámasztja a kötelező monitoring vizsgálatok fenntartásának szükségességét. Ennek hiányában a tünetmentes fertőzött lovak felderítése nem lehetséges.

ÚJ TÍPUSSÚ SERTÉS PARVOVÍRUS FERTŐZÉSEK KIMUTATÁSA KÖZÉP-KELET EURÓPÁBAN

Csárgola Attila¹, Lőrincz Márta¹, Cadar Dániel², Tuboly Tamás¹

Bevezetés: Az elmúlt évtized során az általánosan ismert és elterjedt sertés parvovírus 1 (PPV1) mellett számos, korábban ismeretlen sertés parvovírust azonosítottak. A *Parvovirus* genusba tartozó PPV2, PPV3 és PPV4 mára már Ázsiában, Észak-Amerikában és Európában is kimutatásra került, míg a *Bocavirus* genus-ba sorolható sertés bocavírusokat (porcine bocavirus, PBoV1, PBoV2, 6V és 7V, PBoV3, PBoV4, PBoV5, PBo-likeV) Európában és Ázsiában írták le.

Célok: Az új parvovírus fertőzések elterjedtségének felmérése Közép-Kelet Európában, és a kapott szekvenciák összehasonlító elemzése.

Módszer: Romániában (5 állomány, 93 minta), Szerbiában (7 állomány, 30 minta), Horvátországban (13 állomány, 85 minta) és Lengyelországban (13 állomány, 185 minta) gyűjtött, összesen 38 különböző sertés állományból származó 393 mintát vizsgálatunk PCR módszerrel, saját tervezésű primerekkel. A kapott PCR termékeket szekvenáltuk. Meghatároztuk a különböző vírusok kapszidjait kódoló génszakaszokat, és az eredményeket elemeztük (BioEdit software, MEGA version 5 software).

Eredmények:	Vizsgált vírusok								
	PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	PBoV1-2	PBoV3	PBoV4	6V7V	PBoV-like
	pozitív minta/pozitív állomány								
Románia	3/1	30/4	21/3	12/3	2/1	1/1	1/1	3/2	30/2
Szerbia	0/0	29/7	25/7	20/6	2/2	13/3	1/1	7/3	5/3
Horvátország	0/0	17/6	54/12	50/11	4/3	49/13	11/6	0/0	4/4
Lengyelország	1/1	80/12	6/5	34/11	*	*	*	*	*

*: nem volt elegendő minta a vizsgálatához.

Következtetés: A vizsgált parvovírusok közül PPV2 és PPV3 a különböző szervmintákból voltak kimutathatók. A PBoV1-2 főleg bélből és bélsárból mutatható ki. A PPV4, PBoV3, PBoV4, 6V7V, és PBo-likeV bélsár- és a különböző szervmintákból egyaránt kimutathatók. A kapszidot kódoló nukleotida szekvenciák alapján a PPV3, a PPV4 és a PBo-likeV vírusok nagyfokú hasonlóságot mutattak, míg a többi vizsgált vírus esetében a divergencia nagyobb fokú. Még nem ismert, hogy ezek a vírusok milyen hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre, ha tünetekben megnyilvánuló megbetegedést nem is okoznak, jelenlétük feltehetően hatással van a termelés gazdaságosságára. Ezért is fontosnak tartjuk a különböző parvovírusok gazdaszervezetre gyakorolt hatásának vizsgálatát, amihez nélkülözhetetlen további, megbízható diagnosztikai módszerek fejlesztése.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, OTKA PD100405 és az NKB 15712 támogatásával készítettük.

A CpG METILÁCIÓ HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A SERTÉS PARVOVÍRUS GENOMJÁBAN

Tóth Renáta¹, Bálint Ádám², Rauch Tibor³, Stefanics Rajmund⁴, Szénási Enikő⁵, Zádori Zoltán¹

A DNS metiláció a legfőbb epigenetikai módosítás az eukarióta genomban, de nemcsak a gazdaszervezetek életfolyamatainak szabályozásában játszik kulcsszerepet, hanem nagyban befolyásolja a DNS vírusok életciklusát is. Ennek kapcsán néhány vírus esetében már bizonyították, hogy a vírus genomja metiláltsági fokának változtatásával, képes replikációjának befolyásolására, valamint a gazda immunrendszerének manipulálására.

A CpG metiláció hatásai a parvovírusok esetében még nem ismertek, ezért elsődleges célunk a *Parvoviridae* családba tartozó sertés parvovírus (PPV) metilációs térképének meghatározása, valamint a metilációs mintázatban létrejövő változások a virális fitnessre és a PPV replikációjára kifejtett hatásának vizsgálata volt *in vitro* módszerekkel.

Első lépésként meghatároztuk és összehasonlítottuk a vírus permisszív, illetve szemi-permisszív sejtvonalon szaporított, virionba pakolódott és replikatív formájának metilációs mintázatát, biszulfid PCR és szekvenálás segítségével. Ezt követően, a genetikai kód degeneráltságát kihasználva, joining PCR alkalmazásával 9-29 új CpGdinukleotid helyet tartalmazó mutáns vírusokat hoztunk létre, amelyek fertőzőképességét transzfekeciót, majd vírustitrálást követően, immunfluoreszcenciával vizsgáltuk. A metilációs mintázat replikációra kifejtett hatásának vizsgálatához olyan transzfekeciós kísérleteket terveztünk szövettenyésztetben, amelyeknek során különbözőképpen metilált vírusok replikációiniciációs képességét vizsgáltuk.

Vizsgálataink alapján, a szövettenyésztetből tisztított vírusnak mind a replikatív formája, mind pedig a virionba pakolódott formája hipometilált a vírus teljes életciklusa alatt, valamint nem figyelhetőek meg különbségek a megnövelt számú CpG helyeket tartalmazó mutáns vírusok és a vad típusú vírus fertőzőképessége között *in vitro*. A transzfekeciós kísérletek során az *in vitro* CpGmetilált vírus genomok közel 30%-kal alacsonyabb fertőzőképességet mutattak a nem-CpGmetilált vírus DNS-ek fertőzőképességéhez viszonyítva.

Eredményeink alapján, a sertés parvovírus genomjának hipometiláltságából, valamint abból a megfigyelésből, amely szerint a CpGdinukleotid szám növelésének nincs szignifikáns hatása a vírus fitnesszére *in vitro*, arra következtethetünk, hogy a CpGdinukleotidok alulreprezentáltsága vagy genetikai sodródás vagy pedig a gazda immunrendszere által hajtott természetes szelekció eredménye. Az *in vitro* metiláció mérsékelten befolyásolhatja a PPV replikációiniciációját, ugyanakkor ez a mesterséges metilációs mintázat a replikáció során nem marad fenn, ami arra utal, hogy a replikálódó PPV genom nem szubsztrátja a gazdasejteknben található metilázoknak.

A kutatást az MB08C NKTH-OTKA 81187 számú pályázatból finanszíroztuk.

EGY GÉNUSZ SPECIFIKUS ALTERNATÍV ORF VIZSGÁLATA LIBA PARVOVÍRUSBAN

Mészáros István¹, Veres Zsuzsa¹, Hornyák Ákos², Zádori Zoltán¹

Bevezetés: Az általános nézet szerint a parvovírusok fehérjéi két fő nyitott leolvasási keretről (open reading frame – ORF) íródnak át. Az évek során azonban több parvovírusban fedeztek fel rövid ORF-eket, melyek egy alternatív leolvasási keretben átfedésben vannak a két fő ORF-fel. Néhány esetben bebizonyosodott, hogy ezek fehérjéket kódolnak. A *Parvovirinae* alcsalád minden nemzetségében kimutathatóak alternatív nemzetség-specifikus ORF-ek, amelyek közül a *Dependovirus* nemzetség tagjaiban található különösen hosszú. A libaparvovírus (GPV) genomban ez a hosszú ORF (long genus-specific ORF – LGORF) a 3016-3619 pozícióiban található. Az LGORF evolúciós konzerváltságára a legegyszerűbb magyarázat, hogy fehérjét kódol.

Cél: Immunológiai módszerekkel bizonyítani, hogy az LGORF régióról fehérje íródik át.

Módszerek: Az LGORF régiót pBADTBX, illetve pET28 expressziós vektorba klónoztuk, hogy 6His fúziós fehérjeként *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL baktériumban expresszáljuk. Kihhasználva a 6His peptid fémion kötő képességét, a fúziós LGORF fehérjét Ni-NTA agaróz oszlopon tisztítottuk és SDS-PAGE segítségével elválasztottuk. A fúziós fehérje csíkját a gélből kivágtuk és PBS oldatban szuszpendáltuk. Az így nyert szuszpenzióval két SPF csirkét immunizáltunk. Az immunizáció sikerét a tisztított LGORF fehérjéket használva western blot segítségével teszteltük.

Az LGORF-ről átíródó protein kimutatását és lokalizációjának meghatározását liba parvovírussal fertőzött szövettenyészetben immunfluoreszcens festéssel végeztük. A fehérje *in vivo* leíródását GPV-vel fertőzött liba savóját használva a tisztított fehérjék western blot-jával próbáltuk bizonyítani.

Eredmények: Mindkét vektorral sikerült expresszálnunk a hipotetikus fehérjével megegyező méretű fehérjét, amelyet a NiNTAagaróz oszlopon tisztítani tudtunk. Az immunizálás után az állatok vérsavóját felhasználva ki tudtuk mutatni az LGORF-ről leíródó fehérjét libaparvovírussal fertőzött sejtek magjaiban. GPV-vel fertőzött liba savójának segítségével western blot kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a fertőzött állatokban ellenanyag található az LGORF kódolta fehérje ellen.

Következtetés: Liba parvovírusban a nemzetség-specifikus, alternatív ORF fehérjét kódol. Az, hogy a vad típusú vírussal fertőzött állat savójával is sikerült kimutatni, bizonyíték arra, hogy a gén *in vivo* is kifejeződik és immunogén a gazdaállatra nézve. Az immunfluoreszcens festés eredményei alapján a fehérje a fertőzött sejtek sejtmagjában halmozódik fel. A fehérje funkciójának felderítése további vizsgálatokat igényel. A parvovírusok alternatív ORF-jeivel végzett korábbi kutatások alapján feltételezhetően olyan tulajdonságot kódol, mely nem feltétlenül letális a vírusra nézve, de a gazdaállatban csökkenti a virulenciáját.

Köszönetnyilvánítás: Köszönettel tartozunk Bacskó Tibornak és Gáti Ferencnek az állatkísérletekben nyújtott segítségért. A kutatást az MB08C NKTH-OTKA 81187 számú pályázat támogatta.

VIZISZÁRNYAS VÍRUSOK FERTŐZŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA PÉZSMARÉCE EREDETŰ SEJTVONALAKON

Mészáros István¹, Veres Zsuzsa¹, Bálint Ádám², Dán Ádám², Zádori Zoltán¹

Bevezetés: Számos olyan víziszárnyas vírus létezik, melyeket csak elsődleges szöveten vagy embrionált tojásban lehet vizsgálni. 2009-ben publikáltak egy tanulmányt új sejtvonalakról (AGE1.CS, CR és CRpIX), melyeket pézsmaréce (*Cairina moschata*) elsődleges sejtjeiből hoztak létre és a humán adenovírus-5-ből származó gének transzformációjával stabilizálták (E1A és E1B). A sejtvonalak alkalmasnak bizonyultak a humán vakcinia vírus MVA törzsének szaporítására. Ezek alapján feltételeztük, hogy más, madár patogén vírusok is képesek lehetnek replikálódni ezeken a szöveteken.

Cél: Fertőző bronchitis vírus (IBV), kacsacirkevész, kacsacirkevész A vírus, liba parvovírus, liba vérzéscsökkentő polyomavírus és madárinfluenza A vírus replikációjának vizsgálata AGE1.CS, CR, CRpIX sejtekben. A szövetek diagnosztikai alkalmazásának vizsgálata.

Módszer: 24 vájatú sejtenyésztő lemezen 70%-os konfluenciájú sejtkultúrát indítottunk 1 ml tápfolyadékban. A vírushatóanyagokból 3x-os, 10x-es, 30x-os és 100x-os hígításokat készítettünk, majd ezekből 100 µl-rel fertőztük a sejteket. Három nap múlva a sejt felülréséből leszívunk 250 µl-t és átoltottuk egy új sejtenyésztő lemezen lévő sejtekre (5x-ös hígulás). Ezt összesen ötször végeztük el, így az eredeti 100 µl-esvírus hígítások még minimum 34375x-ösre hígultak. Vírus nukleinsav izoláló kittel (High Pure Viral Nucleic Acid Kit – Roche) a gyártó leírásait követve a felülréséből kitisztítottuk a vírus nukleinsavat, majd az irodalomból vett, illetve általunk tervezett primerek segítségével PCR-rel teszteltük, hogy megtalálható-e a felülrésében. Pozitív kontrollként az eredeti vírushatóanyagokból tisztított nukleinsavakat használtuk. A polyomavírus mintákat real-timePCR-rel, a kacsacirkevész és liba parvovírussal fertőzött CRpIX szövetet immunfluoreszcencia festéssel is vizsgáltuk.

Eredmények: PCR-rel a kacsacirkevész, liba parvovírus, liba polyomavírus mintákból mind a három szövetetípuson kimutattuk a vírus DNS-t, a fertőző bronchitis vírus és madárinfluenza vírus fertőzött szövetekből nem tudtuk vírus RNS-t kimutatni, míg a kacsacirkevész esetén a pozitív kontrollként használt vírus mintából sem sikerült. A polyomavírus esetében real-timePCR-rel is bizonyítottuk, hogy a vírus szaporodik a szöveteken. A kacsacirkevész vírussal, illetve a liba parvovírussal fertőzött CRpIX szöveten immunfluoreszcencia festéssel azonosítottuk a fertőzött sejteket.

Következtetés: A liba parvovírus és a liba vérzéscsökkentő polyomavírus esetén több kísérletben is igazoltuk a szövetek permisszivitását, előbbinél az immunfluoreszcencia festés jól alkalmazható diagnosztikai célokra. Úgy tűnik, hogy a kacsacirkevész a szövetek szemi-permisszívok, diagnosztikára közvetlenül nem alkalmazhatóak. A szövetek általában nem bizonyultak fogékonyak az RNS vírusokkal történő fertőzésre, a kacsacirkevész kivételével, ahol az immunfluoreszcencia festéssel végzett vizsgálatok pozitív eredményt hoztak, de a PCR során nem sikerült amplifikálni a vírus nukleinsavát. Az ellentmondás tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az MB08C NKTH-OTKA 81187 számú pályázat támogatta.

ALTERNATÍV ORF-EK VIZSGÁLATA A PRRSV ORF6 ÉS ORF7 RÉGIÓJÁBAN

Olasz Ferenc¹, Hornyák Ákos², Zádori Zoltán¹

Bevezetés: A sertés légzési és reprodukciós szindrómáját (PRRS) okozó, a Nidovirales rendbe és az Arteriviridae családba tartozó vírus gazdaságilag jelentős sertés kórokozó, amely légzési megbetegedéseket, a kocáknál pedig szaporodási zavarokat okoz. A vírus genomja egy megközelítőleg 15 kilobázis hosszúságú pozitív, egyszálú RNS, amelyen nyolc darab, egymással részben átfedő open reading frame (ORF) található: ezek bármelyikének elvesztése a vírus fertőzőképességének megszűnésével jár. Az ORF1a és az ORF1b-ről átíródó mRNS a nem-szerkezeti fehérjét kódolja, míg a többi ORF-ről (ORF 2-7) transzkriptáló szubgenomiális (sg) mRNS-ekről egy-egy szerkezeti fehérje keletkezik. Újabb kutatások megállapították, hogy az ORF2-ről és ORF5-ről keletkező mRNS nem egy, hanem kettő darab fehérjét kódol, és ezek átírását ugyanarról a mRNS-ről a transláció során a leolvasási keret eltolódása teszi lehetővé.

Célkitűzés: Megvizsgálni a többi ismert ORF-ben, hogy található-e bennük evolúciósan konzervált alternatív leolvasási keret, és ha igen, vajon kódol-e fehérjét.

Módszerek: Első lépésként bioinformatikai eszközökkel vizsgáltuk az ORF-eket. Megállapítottuk, hogy az sg mRNS6 (M fehérjét kódolja) és az sg mRNS7 (a nukleokapszid mRNS-e) alternatív leolvasási keretében található egy-egy viszonylag konzervatív ORF, amelyekről az mRNS6 esetén 18-38 aminosav közti míg az mRNS7-ről egy 36-53 aminosav hosszúságú peptid íródhat át.

A peptidek leíródását egy GFP fúziós fehérje rendszert alkalmazva tanulmányoztuk. Az előzőleg meghatározott alternatív ORF-eket PCR-rel amplifikáltuk és pEGFP-N1 plazmidba klónoztuk. Negatív kontrollként a konzervált ORF-et nem tartalmazó leolvasási keretet, pozitív kontrollként a már bizonyítottan fehérjét kódoló ORF-et klónoztuk az eGFP elé, így összesen hat konstrukciót készítettünk (hármat az mRNS6-hoz, hármat az mRNS7-hez). A rekombináns plazmidokat MARC-145 sejtekbe transzfektáltuk és a transzfekció után 24 és 48 óra múlva az eGFP fúziós fehérjét UV mikroszkóppal detektáltuk.

Eredmények: Az ORF7 esetén az N fehérjével fuzionált eGFP intenzív jelet adott, míg a prediktált ORF-et tartalmazó konstrukcióról szintén leíródott az eGFP, de intenzitása elmaradt a pozitív kontrolltól. Érdekes, hogy a negatív kontrollnak szánt harmadik leolvasási kerethez fuzionált eGFP is adott detektálható jelet, de jóval kisebb mértékben, mint az előző kettő. Az ORF6 esetén az M fehérjéhez fuzionált eGFP-ről is rendkívül gyenge átírást tapasztaltunk, míg a másik két leolvasási keretről gyakorlatilag nem volt leíródás.

Következtetés: Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy az sg mRNS7 több leolvasási keretéről is fehérje íródik át. Az sg mRNS6 tanulmányozására nem alkalmas az alkalmazott transzkripció-transzlációs rendszer, amelynek oka a vizsgált szekvencia hatására megjelenő *de novo* splicing vagy transzkripció gátlás lehet.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az MB08C NKTH-OTKA 81187 számú pályázat támogatta.

KÉT MAGYARORSZÁGI PATOGÉN PRRSV TÖRZS SZEKVENCIÁJÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Horváth Péter¹, Dán Ádám², Bányai Krisztián¹, Kecskeméti Sándor², Zádori Zoltán¹, Hornyák Ákos², Bálint Ádám².

Bevezetés: A sertések légzőszervi és szaporodásbiológiai tünetegyüttese (porcine respiratory and reproductive syndrome, PRRS) az 1980-as évek óta ismert, sertéseket fertőző betegség. Kórokozója a PRRS vírus (PRRSV), egy, az Arteriviridae családba tartozó RNS-vírus, melynek két fő típusa van, melyek közül Európában az I-es, Amerikában és Kelet-Ázsiában a II-es jellemzőbb, habár mindkét típust leírták a világ szinte minden pontján. Az 1990-es évek közepe óta viszonylag nagyszámú törzs részleges szekvenciája ismert Magyarországról. Egy korai, 1994-ben talált izolátum (HU14432/2011) egyik nagy előnye, hogy laborban, sejtenyészeten szaporítható. Ennek az izolátumnak a szekvenciája eddig ismeretlen volt. Egy másik fontos izolátum, a 9625|2012 törzs egy 2012-ben talált súlyosan patogén törzs.

Cél: A két magyarországi PRSSV izolátum összevetése más törzsekkel, esetlegesen a tüneteket okozó mutációk azonosítása.

Módszer: A HU14432/2011 törzs MARC-145 szövetnyészeten fenntartható, a vírust szöveti felülúszóból nyertük. A 9625|2012 törzs kizárólag sertés alveoláris makrofág sejteken (PAM) tartható fenn. Vírus izolátumokból virális RNS-t nyertünk, majd Superscript III (Invitrogen) rendszer segítségével cDNS-t készítettünk. Más törzsek genomszekvenciájának ismeretében a konzervált részekre PCR primereket terveztünk úgy, hogy a termékek átfedjenek. Az amplifikált termékek bázissorrendjét második generációs szekvenálással meghatároztuk, a kapott szekvenciákat pedig a BLAST számítógépes program segítségével génenként összevetettük az NCBI adatbázis tartalmával.

Eredmények: A HU14432/2011 törzs az LV4.2.1 illetve a Lelystad törzsekkel mutat rokonságot. A hasonlóság mértéke 99% fölötti mind DNS-, mind fehérje szinten, illetve az ORF4 esetében fehérje szinten nincs is különbség. A variabilitása miatt általában törzsaanalízisre használt GP5 protein az EU-5a, az EU-11a és a Lelystad vírusokhoz adja a legnagyobb hasonlóságot (99% hasonló vagy ugyanolyan aminosav).

A 9625|2012 törzs esetében a genom szekvencia meghatározása folyamatban van, a szekvencia kb. 80%-a áll készen. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján a törzs nukleinsav szinten az Amervac vakcinatörzsszel és az SHE, valamint a Cresa3267 nevű PRRSV törzsekkel mutatja a legnagyobb rokonságot. A hasonlóság mértéke a meghatározott szakaszokon nukleinsav szinten 96-97%, protein szinten 97% (ORF1a), 99% (ORF1b) az Amervac illetve az SHE törzsekhez. (Az SHE rendkívüli mértékben hasonlít az Amervac törzssre, a kb 15000 nukleotidnyi genomon 25 nukleotid eltérés van a kettő között.) Az ORF6 a fentieknél sokkal nagyobb egyezést mutat fehérje szinten az Olot/91-G2540A nevű és több más izolátummal. A GP5 az Amervac törzsszel fehérje szinten 96% egyezést, 98% hasonlóságot mutat, számos más, spanyol törzsszel pedig még ennél is nagyobb a hasonlóság.

Következtetés: A HU14432/2011 a Lelystad törzs közeli rokona és 1994-ben már jelen volt az országban. A 9625|2012 törzs vélhetően Amervac vakcina eredetű törzs. A genom minden pontján ez a törzs (illetve az SHE és a Cresa3267) mutatja a legnagyobb hasonlóságot, így a rekombináns eredet nem valószínű, a fehérje szintű nagyobb hasonlóságok más törzsekkel inkább reverzióval illetve adaptív folyamatokkal magyarázhatóak.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az MB08C NKTH-OTKA 81187 számú pályázat támogatta.

„*SALMONELLA* PATHOGENITÁSI SZIGET” (SPI-1) GÉNEK (*hilA*, *sipB*, *sptP*)
SZEREPE A *S. HADAR* PATHOGENEZISÉBEN

Szmolka Ama, Imre Ariel és Nagy Béla

Bevezetés: A sejtinvázió, kolonizáció és a korai gyulladáshoz szükséges citokinek termelésének kiváltása a *Salmonella* pathogenezis kezdeti szakaszát képezi. Az inváziós képesség részben az ún. pathogenitási szigeteken (SPI), és azokon belül is főként a SPI-1-n elhelyezkedő virulencia géneknek köszönhető. A pathogenitási szigetek szerepének vizsgálata kapcsán főként a közismerten „invazív” *Salmonella* szerotípusok (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*) kerültek előtérbe, míg a hazai baromfi állományokban ugyancsak gyakori, „nem-invazív” szerotípusok (*S. Hadar*, *S. Infantis*) esetén e szigetek vizsgálatára mindeközéig nem került sor.

Cél: Ezen hiány részbeni pótlását célozzák jelen vizsgálataink, melyek során mintegy előtanulmányként ismert baromfi eredetű invazív (*S. Enteritidis* 147, *S. Typhimurium* F98) és nem-invazív (*S. Hadar* 18) törzsek invazivitását és citokin (IL-8) választ indukáló képességét hasonlítottuk össze. Ezt követően a nem-invazív szerotípusokat képviselő *S. Hadar* 18 törzs SPI-1-esn lokalizált egyes virulencia géneinek (*sipB*, *hilA*, *sptP*) invázióban, bél-kolonizációban és citokin válaszban betöltött szerepét vizsgáltuk.

Módszer: A vizsgált *Salmonella* törzsek sejt-inváziós képességének meghatározására Vero- és CEF (csirke embrió fibroblaszt) sejteket használtunk. A törzsek szerv-invázióját (máj, lép) illetve kolonizáló képességét 5 napos csibe modellben teszteltük. A *S. Hadar* 18 szülő törzs deléciós mutánsait ($\Delta sipB$, $\Delta hilA$ és $\Delta sptP$) Lambda-Red technikával állítottuk elő, majd a fenti *in vitro* és *in vivo* rendszerekben teszteltük. Az egyes mutánsok sejtben belüli lokalizációjának mértékét elektronmikroszkóppal is vizsgáltuk. A gazdasejt szülő törzs és mutánsaira adott IL-8 választ real-time PCR segítségével mértük.

Eredmény: A különböző invazív illetve nem-invazív *Salmonella* szerotípusok *in vitro* összehasonlítása során azt találtuk, hogy mind a Vero mind a CEF sejtekben a *S. Hadar* 18 a *S. Enteritidis* és *S. Typhimurium*-al megegyező invazivitást mutatott és IL-8 indukáló képessége is megegyezett az invazív szerotípusok törzseiével. Viszont a *S. Hadar* 18 SPI-1-n elhelyezkedő *sipB* illetve *hilA* virulencia gének deléciója a sejt-inváziós képesség csökkenését okozta, továbbá az IL-8 indukciót is negatív irányban befolyásolta. Az invazivitás csökkenését az elektronmikroszkópos vizsgálat is alátámasztotta.

A fenti SPI-1 gének deléciójának következtében fellépő *in vitro* pathogenitásbeli változásokat a csibe modell is igazolta, miszerint a mutánsok a szülő törzsnél alacsonyabb bél-kolonizáló képességgel rendelkeztek, továbbá a parenchymás szervekből (máj, lép) is a vad törzsnél alacsonyabb csíraszámokban voltak izolálhatók. Az *sptP* gén hiánya egyik modellben sem idézett elő a pathogenitásban jelentős változást a *S. Hadar* 18 szülő törzshöz képest.

Következtetés: Az a tény, hogy az egyes SPI-1 gének hiánya, a törzsek pathogenitásában jól látható, bár nem minden esetben szignifikáns változást okoz, arra enged következtetni, hogy az invázió és a citokin indukció komplex szabályozás alatt állnak. Emiatt, e pathomechanizmusok hatékonyabb módosításához további beavatkozások (pl. többszörös gén-deléció illetve a SPI-1 teljes „kiütése”), válhatnak szükségessé. Ezen és a további vizsgálatok nem csak a *Hadar* törzs pathogenitásának jellemzéséhez járulnak hozzá hanem egyéb, hazánk broiler állományában szintén gyakori, nem-invazív *S. Infantis* törzsek jellemzéséhez is kiindulási alapot szolgáltathatnak.

SZARVASMARHA EREDETŰ *ESCHERICHIA COLI* O157:H43 SZEROTÍPUSÚ ATÍPUSOS TÖRZS DRAFT GENOM SZEKVENCIÁJA

Sváb Domonkos¹, Horváth Balázs², Maróti Gergely², Tóth István¹

Bevezetés. Az enterohaemorrhágiás *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7/NM törzsek nagy jelentőségű élelmiszer-közvetítette patogénnek számítanak. A tipikus EHEC O157-es törzsek Shiga-toxint (Stx) termelnek, valamint a locus of enterocyte effacement (LEE) patogenitási szigetet is hordozzák genomjukban, mely többek közt az adhezin funkciót betöltő intimint kódolja. Klinikai és járványtani jelentőségük miatt az *E. coli* O157:H7 törzsek közül többnek a teljes genom szekvenciáját is meghatározták. Az *stx*-negatív O157-es és a H7-től eltérő flagelláris antigént hordozó O157-es törzsekről azonban jóval kevesebb adattal rendelkezünk.

Célkitűzés. Célunk volt meghatározni egy *E. coli* O157:H43, korábban általunk egészséges szarvasmarhából izolált és jellemzett, *stx*- és *eae*- törzs draft genom szekvenciáját.

Módszerek. A genom szekvencia meghatározása újgenerációs módszerekkel történt (SOLiD 4, IonTorrent PGM, Roche 454 Titanium). A draft genom összeállításához a CLC Genomics Workbench 6.0 programot használtuk, az annotációt az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline felhasználásával végeztük.

Eredmények. Az *E. coli* T22 törzs kromoszómájának mérete 4.971.215 bp, továbbá a genom tartalmaz egy 80.112 bp méretű plazmidot is. A kromoszómában 4581 nyílt leolvasási keret (open reading frame, ORF) található, ezek közül 4471 kódol fehérjét, továbbá 25 rRNS-t és 85 tRNS-t. A plazmid 89 fehérje-kódoló ORF-et és egy tRNS gént tartalmaz. A T22 genom GC tartalma 49,9%. Mind az Stx fágok, mind a LEE patogenitási sziget jellegzetes integrációs helyei érintetlenek. A multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST) alapján a T22 genomja az ST155 csoportba tartozik, e csoportban számos állati és emberi patogén található.

Következtetések. Mivel az EHEC-re jellemző kulcs virulenciagének integrációs helyei épek az *E. coli* O157:H43 törzsben, lehetséges, hogy a törzs egy közbülső evolúciós állapotot képvisel az EHEC kialakulásában, és alkalmas lehet ezen gének felvételére.

Köszönetnyilvánítás. Munkánk az OTKA K 81252 számú pályázati támogatásával valósult meg.

¹Somogy MKH Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság

²SEFAG Zrt., Kaposvár

³NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

GÜMŐKÓRRA GYANÚT KELTŐ KÓRBONCTANI ELVÁLTOZÁSOK VADDISZNÓ-POPULÁCIÓN BELÜLI ELŐFORDULÁSI ARÁNYÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ KOCKÁZATI TÉNYEZŐK ELEMZÉSE

Csivincsik Ágnes¹, Nagy Gábor, Svéda Gergely², Rónai Zsuzsanna³, Jánosi Szilárd³

A szarvasmarha gümőkór elleni védekezés legfőbb akadályozó tényezője Európában a vadállományban előforduló fertőzöttség. A rendszeres tuberkulin-vizsgálaton és a reagáló egyedek eltávolításán alapuló mentesítési és mentesség-fenntartási módszerek az endémiás területeken nem bizonyulnak hatékonyak, ezért fontos az ilyen területek folyamatos vizsgálata, a járványment nyomon követése és a legfontosabb kockázati tényezők meghatározása.

Hazánkban napjainkig két endémiás terület vált ismertté: a Dunazug-hegység és a Dél-Dunántúl. A két terület legfőbb különbsége, hogy míg a Dunazug-hegység természetes és mesterséges barrierekkel jól körülhatárolt (a Duna és az M1-es autópálya által határolt háromszög), addig a Dél-Dunántúl nem rendelkezik ilyen éles határokkal, ennek ellenére e területen a gümőkór kizárólag a zselici vadállományban mutatható ki rendszeresen, míg a régió egyéb részein inkább csak sporadikus előfordulás figyelhető meg.

Vizsgálatunkban négy dél-dunántúli vadászterületet hasonlítottunk össze, hogy meghatározzuk azokat a tényezőket, amelyek feltételezhetően szerepet játszanak abban, hogy a Zselicben tartósan fennmaradhatott a gümőkór endémia a természetes környezetben. Tekintettel arra, hogy az európai kontinensen a vaddisznó a legtöbbet kutatott rezervoár-faj, amely – feltételezhetően – hazánkban is a gümőkór legfőbb természetes fenntartója, ezért munkánk során a vaddisznóban előforduló gümőkórra gyanút keltő kórbonctani elváltozások prevalenciáját arányosnak tekintettük a járványtani kockázat mértékével.

A lehetséges kockázati tényezőként a környezet egyes biotikus és abiotikus jellemzőit vizsgáltuk és vetettük össze a kiválasztott vadászterületeken mérhető kórbonctani prevalenciával.

A kockázati tényezők közül a tengerszint feletti magasság, az öreg tölgyerdők magasabb előfordulási aránya, illetve a tüdőféreg-fertőzöttség mértéke, valamint a vaddisznó-populáció átlagos tápláltsági állapota mutatott szoros és egyenes arányú összefüggést a gümőkórra jellemző kórbonctani elváltozások prevalenciájával. A *Macracanthorhynchus hirudinaceus* fertőzöttség mértéke és a kórbonctani prevalencia pedig erős negatív korrelációt mutatott. Feltételezésünk, hogy a vaddisznó faj számára ideális életfeltételeket nyújtó makktermő tölgyesek a becsülnél lényegesen nagyobb populációt képesek eltartani, melyben a fertőző kontaktusok aránya magas, így a betegség fenn tud maradni. A tüdőféreg látszólagos járványtani jelentősége, illetve az *acanthocephala*-fertőzöttség esetleges környezeti indikátorszerepe további vizsgálatokat igényel.

MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet¹
Csburgói Állatorvosi Rendelő²
NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság³
Diagon Kft.⁴
SzIE Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék⁵
Borsod-Abaúj-Zemplén megyei Kormányhivatal⁶
University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kassa, Szlovákia⁷

Bakteriológia

BRUCELLA OVIS OMP31 GÉNJÉNEK INAKTIVÁLÓDÁSA AZ IS711 SZAKASZ TERMÉSZETES BEÉKELŐDÉSE KÖVETKEZTÉBEN

Gyuranecz Miklós¹, Kreizinger Zsuzsa¹, Horváth Gábor², Rónai Zsuzsanna³, Dán Ádám³, Nagy Beáta⁴, Szeredi Levente³, Makrai László⁵, Jánosi Szilárd³, Hajtós István⁶, Magyar Tibor¹, Mangesh Bhide⁷, Erdélyi Károly³, Dénes Béla³

Bevezetés: A *Brucella ovis* a kosok mellékhere- és here gyulladását okozó baktérium. Egy magyarországi juhállomány *B. ovis* fertőzöttségtől való mentesítése során egy atípusos *B. ovis* törzset izoláltunk egy fertőzött kos here- és mellékhere szövetéből.

Cél: A vizsgálat célja az atípusos *B. ovis* törzs jellemzése volt.

Módszer: A szeropozitív (ELISA) kos heréjéből és mellékheréjéből kórszövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A baktériumizolálást 10% juhsavó tartalmú TSA táptalajon végeztük. A kitenyészett kórokozót tipizáltuk klasszikus biokémiai módszerekkel, meghatároztuk a szénforrás hasznosítási profilját, agglutináltuk a referencia savókkal, autoagglutinációs próbát végeztünk, tipizáltuk a Bruce-ladder és saját fejlesztésű polimeráz láncreakciókkal (PCR), valamint a fehérje kifejeződés vizsgálata céljából nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk.

Eredmény: A *B. ovis* fertőzésre jellemző makroszkópos és mikroszkópos elváltozások kíséretében, *Brucella*-specifikus immunfestődést figyeltünk meg az érintett állat nemi szerveiben. Az állományból izolált többi *B. ovis* törzssel szemben, az atípusos törzs tenyésztéséhez egy nappal hosszabb (96 óra) inkubációs időre volt szükség. A törzs eltérő szénforrás hasznosítási profillal rendelkezett, „R” szérummal csak gyenge agglutinációt adott és az autoagglutinációra erőteljes hajlamot mutatkozott. Az atípusos törzs „Bruce-ladder” multiplex PCR vizsgálata során az *omp31* külső membrán fehérje génjének amplifikálásánál a várt 1075 bp nagyságú szakasz helyett egy 1915 bp méretű terméket kaptunk. A PCR termék szekvencia elemzése során kiderült, hogy egy 842 bp hosszúságú, ún. IS711 inzerciós szakasz ékelődött az *omp31* gén promoter szakaszának riboszóma kötő helyéhez. A teljes baktériumsejtből készült homogenizátum SDS-PAGE vizsgálata során kimutattuk, hogy az atípusos törzsből hiányzik a 31 kDa méretű fehérjeszakasz.

Következtetés: Az *omp31* gén természetes inaktiválódását és következményesen az Omp31 fehérje hiányát mutattuk ki *B. ovis*-ban. A beékelődött IS711 szakasz ezen új helyeződése alátámasztja azt az elméletet, miszerint ez egy aktív transzpozon a vizsgált *Brucella* fajban.

Köszönetnyilvánítás: Anyagi fedezetet részben az MTA Lendület pályázat (LP2012-22) biztosította

BRUCELLA SPP. OKOZTA FERTŐZÖTTség BORSOD-ABAÚJ-ZEMPLÉN MEGYEI VADDISZNÓ ÁLLOMÁNYOKBAN

Hajtós István¹, Kecskeméti Sándor², Zsigáné Lami Erzsébet³, Jánosi Szilárd³, Dénes Béla³

Bevezetés: Borsod-Abaúj-Zemplén megyében *Brucella suis* 2-es biotípus okozta fertőzöttséget utoljára 1987 tavaszán egy termelőszövetkezeti sertésállományban állapítottunk meg. A szabad vadászterületen élő vaddisznó állományok brucellák okozta fertőzöttségéről megyei adatokkal korábban nem rendelkezünk. Az MgSzH Élelmiszerlánc-biztonsági és Állat-egészségügyi Elnökhelyettese 02.3/2071/2011. számú utasításával elrendelte azt, hogy a 2011. december eleje és 2012. február vége közötti időszakban elejtett vaddisznók klasszikus sertéspestis monitoring céljára beküldött vérmintáiból a NÉBIH ÁDI laboratóriumi brucellosisra irányuló reprezentatív szerológiai vizsgálatot is végezzenek.

Cél: A szabad vadászterületen élő, emberi fogyasztás céljából elejtett vaddisznók brucellosis fertőzöttségének véletlenszerű mintavételen alapuló felmérése és az intézeti vizsgálati eredmények járványügyi elemzése Borsod-Abaúj-Zemplén megyében.

Módszer: Az elejtett vaddisznók vérmintáinak szerológiai vizsgálata a Nemzetközi Állategészségügyi Hivatal (OIE, Párizs) előírásainak megfelelően, a mindennapi diagnosztikában is használt *indirekt ELISA-próbával* történt. A vizsgálatra alkalmatlan vérminták elemzésünkben nem szerepelnek. A vadászok az elejtett vaddisznókat a következő *három korcsoportba* sorolták: 3-12 hó között; 1-2 év között; 2 év felett. Egy esetben külvárosi kertbe tévedt, lesoványodott, kb. egy éves korú és diagnosztikai célból kilőtt vaddisznó süldő nyirokcsomóiból tenyésztéses bakteriológiai vizsgálatot is végeztünk.

Eredmény: Brucellosisra ELISA próbával megvizsgált 472 vérminta közül 111 (23,5%) adott *szeropozitív* eredményt. A 111 szeropozitív vérminta szám szerinti és százalékos megoszlása a fenti korcsoportok sorrendjében a következő volt: 25 (22,5%); 38 (34,2%); 48 (43,2 %). A 111 szeropozitív vérminta 48 település külterületén elejtett állatból származott. A diagnosztikai célból kilőtt vaddisznó süldőből *Brucella suis* 2-es biotípusú törzset izoláltunk.

Következtetés: Brucellák okozta fertőzöttség Borsod-Abaúj-Zemplén megye vaddisznó állományában is előfordul. Az általunk tapasztalt fertőzöttségi szintek hasonlóak a más megyékre vonatkozó intézeti adatokhoz, valamint a szomszédos (HR, SI, AT, CZ) országokban közölköztekhez. Állategészségügyi, vadegészségügyi és közegészségügyi szempontokat egyaránt figyelembevevő, *országos vadegészségügyi monitoring programra* lenne szükség, amelynek tárgyi, személyi és pénzügyi feltételei jelenleg hiányoznak.

Köszönetnyilvánítás: Előadásunk tisztelgés a Miskolci Állategészségügyi Intézet első igazgatója, néhai dr. Áldásy Pál (1928-1988) emléke előtt, születésének 85. évében.

MAGYARORSZÁGI *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *HOLARCTICA* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Kreizinger Zsuzsa¹, Makrai László², Helyes Georgina¹, Magyar Tibor¹, Erdélyi Károly³, Gyuranecz Miklós¹

Bevezetés: A tularemia kórokozója a *Francisella tularensis*, mely egy zoonótikus bakteriális kórokozó, potenciális biológiai fegyver. Magyarországon az évente bejelentett emberi megbetegedések száma 20 és 148 között alakult az elmúlt évtizedben, melyek kórelőzményében leggyakrabban mezei nyúlal (*Lepus europaeus*) vagy rágsálókkal történt közvetlen kontaktus, illetve kullancscsípés szerepelt. Az emberi tularemia megbetegedések antibiotikumok adásával gyógykezelvek.

Cél: A vizsgálat célja a Magyarország különböző területeiről gyűjtött *F. tularensis* subsp. *holarctica* törzsek *in vitro* érzékenységének meghatározása volt 11 különböző antibiotikummal szemben.

Módszer: A *F. tularensis* subsp. *holarctica* törzseket diagnosztikai mintákból, egéroltas közbeiktatásával, módosított Francis-féle táptalajon izoláltuk. A törzsek azonosítása 16S rRNS alapján végzett polimeráz láncreakció segítségével történt. Az izolátumok antibiotikum érzékenységének meghatározásához a minimális gátló koncentráció (MIC) kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható tesztcsíkokat használtunk. A kapott MIC értékeket a Klinikai és Laboratóriumi Szabványok Intézetének (CLSI) érzékenységet jelző határértékeivel vetettük össze.

Eredmény: Az ország különböző részéről izolált huszonkilenc *F. tularensis* subsp. *holarctica* törzs mezei nyulakból és egy állatkerti huszármajomból (*Erythrocebus patas*) származott. Az összes törzs érzékenynek mutatkozott aminoglikozidokkal (MIC90 értékek: sztreptomycin: 6,0 mg/L, gentamicin: 0,75 mg/L), tetraciklinekkel (MIC90 értékek: tetraciklin: 0,5 mg/L; doxiciklin: 1,0 mg/L), klóramfenikollal (MIC90: 1,5 mg/L) és fluorokinolonokkal (MIC90 értékek: ciprofloxacin: 0,047 mg/L; levofloxacin: 0,023 mg/L) szemben, mely antibiotikumok az emberi tularemia esetek gyógykezelésében elsődlegesen használt szerek. Szintén hatásosnak bizonyult *in vitro* körülmények között a tigeciklin (MIC90: 0,19 mg/L) és a rifampicin (MIC90: 1,0 mg/L). Eritromicinre (MIC90: 256 mg/L<) és linezolidra (MIC90: 32 mg/L) azonban az összes törzs rezisztens volt.

Következtetés: A vizsgált *F. tularensis* subsp. *holarctica* törzsek levofloxacinnal és a tigeciklinnel szembeni érzékenysége további, *in vivo* vizsgálatok elvégzésére biztatnak, annak érdekében, hogy ezen antibiotikumok a jövőben alkalmazhatóak lehessenek esetleg az emberi tularemia esetek gyógykezelésében is.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokhoz az anyagi fedezetet a Lendület (LP2012-22) és az OTKA-78139 pályázatok biztosították.

LIBÁBÓL IZOLÁLT ELTÉRŐ PATHOGENITÁSÚ *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK SZIALIDÁZ GÉNJÉNEK (*nanB*) ALLÉLTÍPUSAI

Varga Zsuzsanna¹, Volokhov Dmitriy², és Thuma Ákos³

A baromfikolera kórokozója, a *Pasteurella multocida* baktérium széles gazdaspektrummal rendelkezik és a fajon belül igen eltérő virulenciával rendelkező izolátumok fordulnak elő. Öt buroktípus, 16 szomatikus szerotípus, 13 biotípus elkülönítése ellenére keveset tudunk a virulenciáért felelős sajátosságokról, génekről. Az elmúlt években számos gént határoztak meg, amelyekről kimutatták vagy feltételezték, hogy szerepet játszanak a *P. multocida* megbetegítő képességében és ezen „virulencia gének” jelenléte alapján kívánnak következtetni a törzsek megbetegítő képességére.

Saját vizsgálatainkban libában igen eltérő megbetegítő képességet mutató *P. multocida* izolátumokat hasonlítottunk össze virulencia gének jelenlétére (*toxA*, *tbpA*, *pfhA*, *hgbA*, *hgbB*, *nanH*, *nanB*, *fimA*, *hsf-1* és *pmHAS*). Nem tudtunk összefüggést kimutatni a vizsgált virulencia gének jelenléte, ill. hiánya és a törzsek pathogenitása között. Az erősen virulens L-arabinóz bontó *P. multocida* izolátumokról megállapítottuk, hogy negatív reakciót adnak a más baktériumoknál a patogén törzsekre jellemző szialidáz enzimek génjeire (*nanB* és *nanH*) tervezett PCR reakcióban.

A *nanB* gén esetében új primerek tervezésével valamennyi L-arabinóz bontó izolátumból kimutattuk a gén jelenlétét. Néhány izolátum PCR termékének megszekvenálásával megállapítottuk, hogy L-arabinóz bontó izolátumaink közeli hasonlóságot mutatnak a génbankban található *P. multocida* 36950 izolátum adott génjével. Ugyanakkor mutációk voltak találhatóak az általunk korábban használt primerek kötődési helyén (Tang és mtsai 2009), megmagyarázva ezzel a negatív reakciót.

Vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy a „virulencia gének” pusztá jelenlétének meghatározása sokszor esetleges az allélok jelenléte és a kötőhely mutációja miatt, ráadásul az sem zárható ki, hogy a virulens típusban előforduló eltérő allél szerepet játszik a törzs fokozott megbetegítő képességében.

SERTÉSEKBŐL IZOLÁLT *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* TÖRZSEK SZEROTÍPIZÁLÁSA ÉS ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Sárközi Rita¹, Makrai László¹, Tóth Alexandra² és Fodor László¹

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* egy Gram-negatív, fakultatív anaerob, igényes baktérium, amely kizárólag a sertést betegíti meg. A baktérium világszerte, így hazánkban is előfordul, vérzéses-elhalásos tüdőgyulladással és fibrines mellhártyagyulladással járó megbetegedést okoz, elsősorban a 12-16 hetes sertésekben. Fakultatív patogén kórokozóról lévén szó, a hajlamosító tényezőknek nagy szerepe van a betegség kialakulásában. A baktérium a tonsilla kriptáiban képes túlélni, és az állat élete végéig hordozza és üríti a kórokozót. A baktérium tenyésztése során bizonyos törzsei élesztőkivonatot igényelnek, ezek az ún. NAD-dependens, 1-es biotípusba tartozó törzsek, míg a NAD-independens törzseket a 2-es biotípusba sorolják. A korábbi szerotipizálási rendszereket egyesítve 15 szerotípust különböztetünk meg.

Munkánk során húsz *A. pleuropneumoniae* törzset vizsgáltunk meg, amelyeket húsz vágóhídról származó, kórtani elváltozásokat mutató sertéstüdőből izoláltunk klasszikus bakteriológiai módszerekkel. A minták tíz különböző megyéből származtak. Az izolált törzsek tenyésztési és biokémiai tulajdonságai alapján a törzseket a NAD-dependens, 1-es biotípusba soroltuk. Az izolátumok szerotípusát passzív hemagglutinációval, a felületi antigénjeik alapján határoztuk meg. Ennek eredményeként 12 törzs a 2-es szerotípusba, 2 törzs a 8-as, 2 törzs a 9-es, valamint 1 törzs a 12-es szerotípusba tartozott. Három törzset nem sikerült egyik szerotípusba sem besorolni.

Az izolált törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálatát korongdiffúziós és leveshígítós módszerrel végeztük el öt olyan antibiotikummal szemben, amelyeket az állatorvosi gyakorlatban alkalmaznak *A. pleuropneumoniae* okozta tüdőgyulladás kezelésére. Az elvégzett antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során a következő eredményeket kaptuk: a baktérium érzékeny a penicillin-G-re, ceftiofurra, enrofloxacinra és tiamulinra, viszont rezisztensnek bizonyult az oxitettraciklinnel szemben.

Munkánkat a SZIE Állatorvos-tudományi Kara az NKB pályázat keretében támogatta.

KÜLÖNBÖZŐ GAZDAFAJOKBÓL SZÁRMAZÓ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* TÖRZSEK VIRULENCIA FAKTORAINAK VIZSGÁLATA

Khayer Bernadett, Magyar Tibor, Wehmann Enikő

A *Bordetella bronchiseptica* széles körben elterjedt, légúti fertőzéseket okozó Gram-negatív baktérium. Kiemelt szerepet játszik a sertések torzító orrgyulladásában, a kutyák kennel köhögésében, de sporadikusan humán megbetegedéseket is okozhat immunszupresszált egyéneknél. A széles gazdaspektrum kialakításában számos virulencia faktor vesz részt (toxinek és adhezinek). Korábbi vizsgálatainkban a haemolizin-adenilát-ciklázt (*cyaA*), a fimbriát (*fimA*) és a flagellint (*flaA*) kódoló génszakaszokat PCR-RFLP-vel elemeztük.

Munkánk célkitűzése a PCR-RFLP vizsgálatokban kapott főbb típusokat reprezentáló törzsek szekvencia- és filogenetikai analízise volt, annak eldöntésére, hogy az egyes virulencia faktorok miképpen tükrözik a gazdához való adaptálódást nukleinsav illetve aminosav szinten. A filogenetikai számításokkal az egyes törzsek leszármazási viszonyairól kívántunk adatokat kapni.

A vizsgálandó szakaszokra (*cyaA*, *fimA* és *flaA*) kidolgozott PCR-rendszerekben felsokszorozott DNS-minták bázissorrendjének megállapítása kapilláris szekvenálással (Macrogen) történt. Az így kapott adatokat a BioEdit Sequence Alignment Editor szoftver segítségével elemeztük. A génbanki referenciaszekvenciákhoz történő illesztését (multiple alignment) a ClustalW 1.8. programmal végeztük, míg a távolság-mátrix alapú filogenetikai számításokat Kimura-féle két-paraméteres korrekciós számítással kiegészítve a Megalign program segítségével hajtottuk végre.

Az eltérő gazdafajokból származó törzsek *cyaA* (1775 bp) génjei között 0,0-3,6% genetikai távolságot találtunk, és a filogenetikai analízis során két nagy csoportot tudtunk elkülöníteni. Az azonos gazdafajból származó törzsek szétszórtan helyezkedtek el a törzsfán, a gazdaadaptációra utaló jeleket nem tártunk fel. A *fimA* (454 bp) génszakasz elemzése során a *cyaA*-hoz hasonló eredményeket kaptunk; a szekvenciák legkevesebb 93%-ban voltak azonosak és filogenetikailag szintén két csoportot alkottak. A *flaA* gént (1057 bp) 40 törzs esetében vizsgáltuk. A génszakasz közbülső része hipervariábilis, ez a változatosság (0,0-14,6%) nukleotid és aminosav szinten is megjelent. A filogenetikai vizsgálatok során négy csoportot mutattunk ki, melyeknél fellelhetőek a gazdához való adaptáció jegyei. Az első csoportba főleg nyúl, kutya és ló eredetű törzsek kerültek, a második csoportba a humán izolátumok és két, az RFLP vizsgálat során egyedi hasítási mintázattal rendelkező törzs kapott helyet. A sertésből izolált törzsek 85%-a a harmadik csoportba került, míg a negyedik csoportba humán, macska és tengerimalac eredetű törzseket találtunk.

Gazdaadaptációra utaló jeleket csak a *flaA* szekvenciák esetében tudtunk kimutatni, viszont valamennyi vizsgált virulencia faktor génje megtalálható a human izolátumokban, és nagy változatosságot tapasztaltunk közöttük. Ez a megfigyelés kiemelheti a *B. bronchiseptica* zoonózisokban játszott szerepét.

Kutatásainkat az OTKA K83332 sz. pályázata támogatta.

BÚZA ÉS KUKORICA ALAPÚ TÁPOK HATÁSA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* KOLONIZÁCIÓJÁRA BROJLERCSIRKÉBEN

Molnár Andor¹, Claudia Hess², Pál László¹, Husvéth Ferenc¹, Michael Hess² és Dubleczy Károly¹

Az utóbbi években a legtöbb élelmiszer közvetítette emberi megbetegedést az EU országaiban a campylobacteriosis okozza. A fertőzések túlnyomó többségéért a *C. jejuni* felelős, mely baktériumot a baromfi tünetek nélkül hordozza a bélcsatornájában (legmagasabb számban, a vakbélben), azonban emberben a fertőződés egy akut hasmenéssel járó kórképet alakít ki. A hazai körülmények között a baromfi tápok legnagyobb hányadát képviselő gabonafélék – a kukorica és a búza – bekeverési arányaiban jelentős különbségek lehetnek. Mindkét gabonát energiaforrásként használják a tápokban, azonban az alkalmazási arányaik különbözősége hatással van az állatok emésztés-élettanára, főképpen az eltérő nem-keményítő szénhidrát (NSP) tartalomnak köszönhetően, amely a búzában nagyobb mennyiségben található. Ez utóbbi komponens mennyiségi különbségei a béltartalom viszkozitására is jelentős hatással van. Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy búzára, illetve kukoricára alapozott eltérő tápok befolyásolják-e a *C. jejuni* bélbeli megtelepedését brojlercsirkében.

A kísérlet kezdetén Ross-308-as naposcsibéket háromféle takarmányozási csoportba osztottunk: kukorica alapú (KA), búza alapú (BA) és búza alapú NSP bontó enzimmelkiegészített (BAEK); minden csoportba 24 csibe került. Az állatoknak *ad libitum* biztosítottuk a takarmányt és a vizet. Naponta feljegyeztük a víz és takarmányfogyasztást, az állatok testtömegét a 10. és 24. napon mértük meg. A 14. napon minden csibét 10^8 CFU *Campylobacter jejuni*val (NCTC 12744-es referencia törzs) fertőztünk szájon át. A fertőzést követően (FK) a 3., 7., 14. és 21. napon csoportonként 6-6 állatot leöltünk és mintát vettünk a vakbélből és éhbélből *C. jejuni* tenyésztésre (Campyloset agaron, 41°C-on, 48 órán át), a pH, valamint az éhbélből viszkozitás mérésre.

Az eltérő takarmánykezelések különbségeket eredményeztek a béltartalom viszkozitálásában. A BA csoportban az éhbél minták viszkozitása szignifikánsan nagyobb volt a mintavételezés 3., 14. és 21. napján, mint a KA csoportban. Ezzel szemben a BAEK táp viszkozitás értékei a BA, KA csoport közé estek minden esetben. A táp fajtája önmagában nem, de az enzimmelkiegészítés befolyásolta a *Campylobacter* kolonizációját a béltartalmakban. A három takarmányozási csoportot egybevéve a vakbél minták 50%, 66%, 89% és 100%-a lett *Campylobacter* pozitív, a fertőzést követő 3, 7, 14 és 21 napokon. Ezek az értékek hasonló tendenciát követtek az éhbél minták esetében is. Az éhbél- és vakbélbeli *C. jejuni* szám 14 nappal a fertőzést követően szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a BAEK csoportban, összehasonlítva a BA ($p < 0.01$) és KA ($p = 0.03$) csoporttal, a többi időpontban azonban nem mutatkoztak különbségek. Csökkenés volt tapasztalható a vakbél minták pH értékeit tekintve a BAEK csoportban, 14 és 21 nappal a fertőzést követően.

Munkánkat a CEPO – Baromfi Kiválósági Központ projekt keretében végeztük. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Ausztria-Magyarország Határon Átnyúló Együttműködési Program 2007-2013 és a magyar állam társfinanszírozásával valósul meg.

