

MTA ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI BIZOTTSÁGA
Szie ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK
(2015. JANUÁR 26-29.)

VIROLÓGIA, IMMUNOLÓGIA
BAKTERIOLÓGIA

2014. évi 41. füzet

ELŐSZÓ

Kedves Kolleganók és Kollegák!

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és a SzIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskolája 2015. január 26-29. között tartja a legújabb kutatási eredményeink bemutatására szolgáló **Akadémiai Beszámolók** ülésorozatot, amelyre idén 41. alkalommal kerül sor a SzIE Állatorvos-tudományi Karán.

Az előző évek gyakorlatának megfelelően a beszámolókon PhD-hallgatók és a kiemelkedő munkát végző TDK-hallgatók szereplését külön is szorgalmazzuk, és reméljük, hogy a rendezvény jó alkalmat nyújt a különböző tudományos-szakmai műhelyeket és korosztályokat képviselő, egymás munkája iránt érdeklődő szakemberek találkozásának.

Az előadások összefoglalóit – szekciófüzetekbe csoportosítva – elektronikus úton adjuk közre. A beszámoló füzetek anyaga az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet honlapján (www.vmri.hu / MTA – Állatorvos-tudományi Bizottság) megtalálható.

Az előadások és azt követő megvitatás időtartama legfeljebb: 10 + 5 perc. Kérjük, hogy a megadott időtartamot senki ne lépje túl. Az előző évek gyakorlatának megfelelően, nem az előadások számára, hanem azok szakmai-tudományos értékére helyezzük a súlyt. Aki azonos témán belül jelentett be 2 vagy több előadást, kérjük, próbálja meg ezeket összevonni.

A résztvevőket, különösen a bizottsági tagokat és az üléelnököket arra kérjük, hogy kérdéseikkel, megjegyzéseikkel, javaslataikkal, segítsék az előadottak részletesebb megismerését, értékelését és a beszámoló szakmai műhelyek további munkáját. A tudományos előrehaladást a fiatalok tudományos fórumokhoz való szoktatását a vita éppúgy szolgálja, mint maga az előadás.

Az egyes szekciók titkárait arra is kérjük, hogy a szekcióülésről február végéig készítsenek és juttassanak el az Állatorvos-tudományi Bizottsághoz (akademia@vmri.hu) egy-egy rövid, közérthető formában megírt, a szekció elnökkel (elnökökkel) egyeztetett tájékoztatót (a Magyar Állatorvosok Lapjában való közlés céljából), amely tartalmazza nem csak az előadások, hanem a vita legfontosabb megállapításait is.

Kérjük az intézetek vezetőit, hogy az elektronikus úton megküldött anyagot továbbítsák munkatársaik és érdeklődő nyugdíjasaik számára is. Kérjük, továbbá, hogy tegyék lehetővé munkatársaik részvételét az üléseken.

Előre is köszönjük a szekció elnökök, a titkárok, a bizottsági tagok és valamennyi előadó munkáját.

Kívánunk mindenkinek eredményes és hasznos tanácskozást.

Gálfi Péter
MTA ÁTB elnöke

Sótonyi Péter
Dékán, TDK elnök

Rusvai Miklós
ÁODI elnöke

Magyar Tibor
MTA ÁTB titkára

MTA Állatorvos-tudományi Bizottság és SZIE-ÁOTK DI akadémiai beszámolóinak PROGRAMJA és szekcióbizottságai
(2015. január 26-29.)

A szekció megnevezése	A szekcióülés ideje	A szekcióülés helye	Társelnökök	Titkár	Bizottsági tagok
Élettan és biokémia Kórtan Gyógyszertan és toxikológia Morfológia	I. 26 hétfő 8.30-	Élettan tanterem	Bartha Tibor Frenyó V. László Csikó György Sótonyi Péter	Jakab Csaba Jerzsele Ákos Neogrády Zsuzsanna	Halasy Katalin Kutas Ferenc Rác Bence Sályi Gábor Zsarnovszky Attila
Élelmiszerhigiénia Állategészségügyi Igazgatás	I. 26 hétfő, 11.00 -	Továbbképzés tanterem	Lacza Péter Ózsvári László	Erdősi Orsolya	Dán Ádám Józwiak Ákos Kovács Sándor Lehel József Szita Géza
Állathigiénia Állattenyésztés Genetika Takarmányozástan	I. 26. hétfő 8.30-	Belgyógyászat tanterem	Kovács Melinda Könyves László Szabó József	Bersényi András	Brydl Endre Cseh Sándor Fekete Sándor Gáspárdy András Jakab László Rafai Pál, Zöldág László
Virologia Immunológia	I. 27. kedd, 8.30-	Élettan tanterem	Bakonyi Tamás Harrach Balázs Tuboly Tamás	Pálfi Vilmos	Benkő Mária Dán Ádám, Hornyák Ákos, Pénzes Zoltán Rusvai Miklós, Soós Tibor
Bakteriológia	13.00-		Nagy Béla Varga János Magyar Tibor	Jánosi Szilárd	Fodor László Hajtós István Bernáth Sándor Makrai László Tenk Miklós
Parazitológia Állattan Halkórtan	I. 28. szerda 8.30-	Élettan tanterem	Baska Ferenc Farkas Róbert Hornung Erzsébet	Eszterbauer Edit Sréter Tamás	Békési László, Csaba György Hornok Sándor, Kassai Tibor Molnár Kálmán Majoros Gábor Varga István
Klinikumok	I. 29. csütörtök 8.30-	Belgyógyászat tanterem	Bodó Gábor Cseh Sándor Németh Tibor Vörös Károly	Bajcsy Árpád Csaba Pápa Kinga Tóth Balázs	Biksi Imre Csébi Péter Vajdovich Péter

TARTALOMJEGYZÉK

Virologia (8:30-tól)

1. SERTÉS PARVOVÍRUS FERTŐZÉS HATÁSA A SERTÉS DNS POLIMERÁZOK TRANSZKRIPCIÓS SZINTJÉRE
Tod Pál, Tóth Renáta, Mészáros István, Zádori Zoltán
2. A CpG METILÁCIÓ HATÁSA A PARVOVÍRUSOK REPLIKÁCIÓJÁRA
Tóth Renáta, Mészáros István, Stefanicsik Rajmund, Bartha Dániel, Bálint Ádám, Zádori Zoltán
3. AZ ÁTFEDŐ ORF-RŐL LEÍRÓDÓ SAT FEHÉRJE HATÁSA A SEJTLÍZISRE ÉS AZ APOPTÓZISRA A SERTÉS PARVOVÍRUS KRESSE TÖRZSÉBEN
Mészáros István, Tóth Renáta, Zádori Zoltán
4. EGY II-ES TÍPUSÚ FECV TÖRZS 3-AS ÉS A FIPV-DF2 TÖRZS 7-ES RÉGIÓJÁNAK *IN VITRO* TRANSZKRIPCIÓS ÉS TRANZLÁCIÓS VIZSGÁLATA
Viszovszki Andrea, Olasz Ferenc, Bálint Ádám, Hornyák Ákos, Zádori Zoltán
5. AZ ÚJ FEHÉRJÉT KÓDOLOÓ ORF7A VIZSGÁLATA A PRRSV-BEN
Olasz Ferenc, Viszovszki Andrea, Dénes Béla, Bálint Ádám, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
6. EGY VAD, NEM MLV EREDETŰ 2-ES TÍPUSÚ MAGYARORSZÁGI PRRSV TÖRZS TELJES GENOM VIZSGÁLATA
Olasz Ferenc, Balka Gyula, Bálint Ádám, Kiss István, Bányai Krisztián, Rusvai Miklós Tomasz Stadejek, Xiong Wang, Douglas Marthaler, Michael Murtaugh, Zádori Zoltán
7. EQUID HERPESVIRUS 5 KÓROKOZÓ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA, A VÍRUS ELTERJEDTSÉGÉNEK FELMÉRÉSE EGY MAGYARORSZÁGI VADLÓ ÁLLOMÁNYBAN
Moravszki Leticia, Kutasi Orsolya, Tóth Eszter, Biksi Imre, Bakonyi Tamás
8. PESTIVIRUSOK GENETIKAI REKOMBINÁCIÓINAK KERESÉSE *IN-SILICO* MÓDSZEREKKEL
Kővágó Csaba, Hornyák Ákos, Rusvai Miklós
9. JEGESMEDVÉBEN TALÁLT ÚJ ADENOVÍRUS GENOMIKAI ÉS FILOGENETIKAI VIZSGÁLATA
Böszörményi Kinga, Sós Endre, Iva I. Podgorski, Harrach Balázs
10. ÚJ ROTAVIRUS FAJ KIMUTATÁSA KUTYA FEKÁLIS VIROMJÁBAN
Mihalov-Kovács Eszter, Gellért Ákos, Marton Szilvia, Farkas L Szilvia, Fehér Enikő, Jakab Ferenc, Vito Martella, Bányai Krisztián

11. KÜLÖNBÖZŐ EGZOTIKUS FAJOKBÓL SZÁRMAZÓ HÜLLŐ
ORTHOREOVÍRUSOK FILOGENETIKAI ÉS SZEKVENCIA ANALÍZISE
Kugler Renáta, Marton Szilvia, Fehér Enikő, Rachel E. Marschang, Bányai Krisztián,
Farkas L. Szilvia
12. SZARVASMARHA VÍRUSOS HASMENÉSÉNEK VÍRUSÁVAL (BVDV)
PERZISZTENSEN FERTŐZÖTT EGYEDEK SZERVEINEK
IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA
Szabára Ágnes, Ózsvári László, Jakab Csaba
13. A BVDV, MINT A SZARVASMARHA ANAPLASMOSIS INDIKÁTOR
KÓROKOZÓJA
Szabára Ágnes, Jakab Csaba
14. ÁLLATGYÓGYÁSZATI VAKCINÁK FOTO-STABILITÁSA:
ELŐZETES TANULMÁNY KOCKÁZATBECSLÉSHEZ
Farsang Attila, Lévai Réka, Barna Tímea, Fábián Katalin, Kulcsár Gábor
15. MAGYARORSZÁGON TÖRZSKÖNYVEZETT KLASSZIKUS SERTÉSPESIS
ELLENI VAKCINA HATÉKONYSÁGI VIZSGÁLATA HÁZI SERTÉSEN
Lévai Réka, Farsang Attila, Barna Tímea, Fábián Katalin, Sandra Blome, Kulcsár
Gábor

Bakteriológia (13:00-tól)

16. HAZAI BAROMFI FAJOKBÓL ÉS VADMADARAKBÓL IZOLÁLT
BORDETELLA AVIUM ÉS *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* TÖRZSEK
ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA
Szabó Réka, Magyar Tibor
17. NYÚL ÉS SERTÉS EREDETŰ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* TÖRZSEK
ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA
Khayer Bernadett, Sulyok Kinga Mária, Domokos Judit, Magyar Tibor, Wehmann
Enikő
18. B:2 TÍPUSÚ *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK ELSŐ MAGYARORSZÁGI
IZOLÁLÁSA
Ujvári Barbara, Szeredi Levente, Pertl László, Tóth Gergely, Erdélyi Károly, Jánosi
Szilárd, Molnár Tamás, Magyar Tibor
19. HAZAI *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *HOLARCTICA* TÖRZSEK
GENETIKAI ÖSSZEHOSONLÍTÓ VIZSGÁLATA
Kreizinger Zsuzsa, Pásztor Alexandra, Elin Nilsson, Kerstin Myrtennäs, Sulyok Kinga
Mária, Makrai László, Mats Forsman, Gyuranecz Miklós

20. HAZAI *BACILLUS ANTHRACIS* TÖRZSEK GENETIKAI JELLEMZÉSE
Pásztor Alexandra, Kreizinger Zsuzsa, Dán Ádám, Makrai László, Rónai Zsuzsanna, Dawn Birdsell, Talima Pearson, Sulyok Kinga Mária, Jánosi Szilárd, Fodor László, Paul Keim, Gyuranecz Miklós
21. *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS* TÖRZSEK HAZAI ELTERJEDTSÉGE ÉS MIRU-VNTR ELEMZÉSE
Rónai Zsuzsanna, Csivincsik Ágnes, Gyuranecz Miklós, Kreizinger Zsuzsa, Szőgyényi Zsuzsanna, Dán Ádám, Jánosi Szilárd
22. *BRUCELLA MICROTI* ELSŐ MAGYARORSZÁGI IZOLÁLÁSA
Rónai Zsuzsanna, Kreizinger Zsuzsa, Dán Ádám, Bányai Krisztián, Szeredi Levente, Jánosi Szilárd, Gyuranecz Miklós
23. MAGYARORSZÁGON IZOLÁLT NEM BESOROLHATÓ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* TÖRZSEK JELLEMZÉSE
Sárközi Rita, Makrai László, Birgermajer Anetta és Fodor László
24. *MYCOPLASMA BOVIS* TÖRZSEK FLUOROQUINOLON ÉRZÉKENYSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL
Sulyok Kinga Mária, Rónai Zsuzsanna, Nagy Sára, Makrai László, Kecskemétiné Turcsányi Ibolya, Kovács Péter, Jánosi Szilárd, Gyuranecz Miklós
25. FLAVOBACTERIUM OKOZTA MEGBETEGEDÉS HAZAI HALFAJOKBAN
Varga Zsuzsanna, Sellyei Boglárka, Paulus Petra, Papp Melitta, Molnár Kálmán, Székely Csaba
26. *RHODOCOCCUS EQUI* OKOZTA TÜDŐGYULLADÁS MACSKÁBAN; ESETISMERTETÉS
Szeredi Levente, Rónai Zsuzsa, Jánosi Szilárd, Bálint Ádám

SERTÉS PARVOVÍRUS FERTŐZÉS HATÁSA A SERTÉS DNS POLIMERÁZOK TRANSZKRIPCIÓS SZINTJÉRE

Tod Pál¹, Tóth Renáta², Mészáros István², Zádori Zoltán²

Bevezetés: A mutációk által létrehozott DNS szekvencia variabilitás okozza azokat a polimorfizmusokat az élőlényekben, amelyre a természetes szelekció hathat. A mutációk a genom különböző régióiban nem azonos valószínűséggel fordulnak elő és létrejöttük nem véletlenszerű folyamat. A baktériumokban a GC nukleotidok gyakorisága a 25%-tól a 75%-ig változhat. Az egyik legvalószínűbb elmélet szerint a GC gazdag genommal rendelkező baktériumok esetében a neutrális mutáció a GC nukleotidok kialakulását részesíti előnyben. Az AT gazdag fajoknál viszont AT nukleotidok létrejötte a valószínűbb. Az eukarióta szervezeteket fertőző vírusok esetén feltételezzük, hogy hasonló mechanizmusok működhetnek. A DNS vírusok két nagyobb taxonra oszthatók fel. A nagyméretű DNS vírusok kódolják a saját DNS polimerázukat, ezzel ellentétben a kisméretűek nem, ezért így ezek a gazdasejt saját polimerázaira vannak utalva replikációjuk során. Ezt figyelembe véve három fontos tényezőt különíthetünk el, amelyek befolyásolhatják a kisméretű DNS vírusok mutációs rátáját. A nukleotid összetétel a vírus genomban, a gazdasejt DNS polimerázai, és egyéb, a DNS-sel és a DNS polimerázokkal kölcsönható gazdasejttől függő faktorok.

Cél: Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogyan változik a sertés parvovírus DNS-ét replikáló, gazdasejt eredetű DNS polimerázok mRNS-einek szintje a vírus fertőzés hatására.

Módszerek: Sertés here sejtenyészetet 3 MOI (multiplicitási index) parvovírussal fertőztünk, hogy vizsgálni tudjuk a DNS polimeráz mRNS-ek szintjének változását a vírusfertőzés hatására. A vírusfertőzés mértékét immunfluoreszcens detektálással validáltuk. Huszonnégy óra elteltével Ribosol[®] oldattal kinyertük a sejtekből a totál RNS-t. A 17 darab sertés polimerázból 13-nak ismert a kódoló szekvenciája. Az exonok és exonhatárok szekvenciájának figyelembevételével terveztünk a polimerázokra specifikus primereket, ezzel biztosítva, hogy csak a DNS polimerázok mRNS-eit detektáljuk. Kvantitatív EvaGreen alapú RT-PCR segítségével mértük a fertőzött és a nem fertőzött tenyészetből származó minták mRNS szintjeit. Az eredményeket GAPDH mRNS segítségével normalizáltuk.

Eredmények: Eredményeink alapján az általunk vizsgált DNS polimerázok közül a legnagyobb mértékben a PolE transzkripció szintje csökkent le a fertőzött sejtenyészetben. Kimutatható volt még a PolA, PolB, PolG, PolI, PolZ, REV1, TdT polimerázok mRNS-ek szintjének a csökkenése is a sertés parvovírus hatására. Ezzel ellentétben, a PolM enzim transzkripció szintje emelkedett. A PolD1, PolH, PolK, PolS enzimek transzkripció szintjét a vírusfertőzés nem befolyásolta.

Következtetések: Irodalmi adatokból ismert, hogy a sertés parvovírust a gazdasejt PolD1 nevű polimeráza másolja le. Eredményeink alapján a fertőzött és a nem fertőzött sejtekben ennek a szintje nem változik. Viszont a replikáció során keletkező hibákat kijavító polimerázok transzkripció szintje csökken. Ez alapján feltételezzük, hogy a parvovírus a replikációja során, még nem ismert mechanizmus szerint, ezeket az enzimeket gátolja, így elősegítve önmaga replikációját és ezáltal is növelve a mutációs rátáját.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a K108607 számú OTKA pályázat támogatta.

FlyBase, University of Cambridge²NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság³

A CpG METILÁCIÓ HATÁSA A PARVOVÍRUSOK REPLIKÁCIÓJÁRA

Tóth Renáta¹, Mészáros István¹, Stefanicsik Rajmund², Bartha Dániel¹, Bálint Ádám³, Zádori Zoltán¹

Bevezetés: A DNS metiláció kulcsszerepet játszik a gazdaszervezetek életfolyamatainak szabályozásában és nagyban befolyásolja egyes DNS vírusok életciklusát is. A *Parvovirinae* alcsalád 32 tagjának GC-tartalmát vizsgálva 3 csoportot különíthetünk el. A sertés parvovírus (*Ungulate protoparvovirus 1*) (PPV) alacsony GC-tartalmával (60 CpG), illetve alacsony megfigyelt/várt CpG arányával (34%) az I. csoportba tartozik, míg az adeno-asszociált dependoparvovírus A (AAV2) a III. csoport tagja, mivel genomjában igen magas GC-tartalom (266 CpG), valamint igen magas megfigyelt/várt CpG (79%) arány figyelhető meg. Korábbi vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az önálló replikációra képes PPV genomja a replikáció helyétől függetlenül, a vírus teljes életciklusa alatt hipometilált marad, valamint az *in vitro* metilálással létrehozott hipermetilációnak csak mérsékelt hatása van a vírus szaporodóképességére.

Cél: Az AAV2 teljesen más genomszerveződést és más szaporodási stratégiát mutat, mint a PPV, mivel replikációjához helper vírus jelenlétét igényli, annak hiányában a gazdagenomba integrálódik, illetve episzómálisan perzisztál. Célunk a CpG metiláció szerepének feltárása az AAV2 replikációs stratégiájában, az AAV2 metilációs mintázatának meghatározásával, valamint *in vitro* CpG metilálás virális replikációra kifejtett hatásának vizsgálatával.

Módszer: Első lépésként meghatároztuk az AAV2 virionba pakolódott és integrálódott genomjának metilációs mintázatát biszulfid PCR segítségével. A CpG dinukleotidokat tartalmazó genom részeket a módosított szekvenciára tervezett 21 primerpárral amplifikáltuk, majd ezt követően újgenerációs (Illumina) szekvenálást végeztünk. A metilációs mintázat replikációra kifejtett hatásának vizsgálatához olyan transzfekciós kísérleteket terveztünk szövettenyészetben, amelyek során bakteriálisan, illetve CpG metiláz segítségével hipermetilált vírusok replikációs iniciációs képességét vizsgáltuk kvantitatív PCR segítségével.

Eredmény: Eredményeink alapján az AAV2 genomja integrált állapotban hipermetilált, míg virionba pakolódva hipometilált. Transzfekciós kísérleteink alapján, az *in vitro* metilálással létrehozott hipermetilációnak – ugyanúgy, mint a PPV esetében – csak mérsékelt hatása van az AAV2 szaporodási képességére.

Következtetés: A virionba pakolódott genom hipometiláltságából arra következtethetünk, hogy a replikálódó AAV2 genom nem szubsztrátja a gazdasejtekben található metilázoknak, integrálódott formájának hipermetiláltsága pedig a kromoszomális DNS-en található szignálok miatt jöhet létre. Transzfekciós kísérletünk eredménye alapján az *in vitro* metilálással létrehozott teljes genom metiláció nem akadályozza a helper mediált replikációt episzómális állapotban. Ezekből arra következtethetünk, hogy az esetleges metilációs gátlás feloldása a helper vírus általi szabályozás eredménye lehet, így a CpG metilációnak csak közvetett hatása lehet az AAV2 evolúciójára.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a K108607 OTKA számú és a Mobilitás 08-C OTKA 81187 pályázat támogatta.

AZ ÁTFEDŐ ORF-RŐL LEÍRÓDÓ SAT FEHÉRJE HATÁSA A SEJTLÍZISRE ÉS AZ APOPTÓZISRA A SERTÉS PARVOVÍRUS KRESSE TÖRZSÉBEN

Mészáros István, Tóth Renáta, Zádori Zoltán

Bevezetés: A parvovírusok fehérjéinek többsége két fő nyitott leolvasási keretről (open reading frame – ORF) íródik át. Számítógépes vizsgálatokkal a *Parvovirinae* alcsalád minden nemzetségében azonosítottak további, rövid, nemzetség-specifikus leolvasási kereteket, amelyek átfedésben vannak a VP fehérjék ORF-jével. A sertés parvovírus NADL-2 attenuált törzsben az átfedő ORF-ről leíró fehérje (SAT) teljes vagy részleges funkcióvesztése „lassan terjedő” mutáns törzsek létrejöttéhez vezetett szövettenyésztésben. A feltételezések szerint ez a SAT fehérje hiányából következő nagymértékű sejtlízis csökkenéssel magyarázható.

Cél: Az általunk létrehozott mutáns PPV Kresse törzsek segítségével vizsgálni szeretnénk az alternatív ORF-ről leíró SAT fehérje hatását a vírus terjedésére, az apoptózisra és a sejtlízisre.

Módszer: 24 vájatú sejtenyésztő lemezen, 50%-os konfluenciájú sertéshere sejt kultúrát fertőztünk (3-as, 0,1 és 0,01-es MOI) a sertés parvovírus vad típusú Kresse és SAT⁻ mutáns Kresse törzsével. A fertőzés után (PI) 2 órával a tápfolyadékot lecseréltük, majd PI 12 órától két óránként mintát vettünk a felülúszóból és a sejteket fixáltuk. A fertőzés sikerességét immunfluoreszcens (IF) festéssel ellenőriztük, a vírusok replikációját qPCR segítségével követtük nyomon, melyhez a felülúszókból tisztítottuk a vírus-nukleinsavat. A sejtlízis mértékét a magas multiplicitású fertőzésből származó felülúszókban lévő laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim aktivitása alapján állapítottuk meg. Az LDH a jodotetrazólium-kloridot formazanná alakítja, melynek az abszorpcióját 490 nm-en mértük. A halott és apoptotikus sejtek számát PI 24 és 48 órával propídium-jodid és Hoechst-festéssel is meghatároztuk.

Eredmény: A vad típusú Kresse törzs magas multiplicitású fertőzéskor mért kópiaszáma PI 24 órával már egy nagyságrenddel magasabb, mint a SAT⁻ mutánsnál mért érték, mely különbség PI 48 órával is fennmarad ($8,23 \times 10^{10}/\text{ml}$ a vad típusú és $3,65 \times 10^9/\text{ml}$ a SAT⁻ mutáns vírussal). Az alacsony multiplicitású fertőzésnél végzett IF festés alapján a SAT⁻ vírus terjedése lelassult. A felülúszókban mért LDH aktivitás is magasabb volt a vad típusú vírussal fertőzött sejtek felülúszójában (PI 48 óra: 1,51), mint a mutáns vírussal fertőzött sejteknél (PI 48 óra: 0,72) és a nem fertőzött sejteknél mért érték (0,38). A propídium-jodidos festés alapján PI 24 órával a halott sejtek száma 2-3-szor alacsonyabb (szignifikánsan) a SAT⁻ mutáns vírussal fertőzött szövetnél ($p=0,0097$), míg PI 48 órával a különbség már nem szignifikáns ($p=0,1762$). Hasonlót tapasztaltunk az apoptotikus sejtmagok vizsgálatakor. PI 24 órával a p értéke 0,0147 volt, PI 48 órával 0,0972.

Következtetés: A PPV Kresse törzsnél a SAT fehérje delécioja „lassú terjedéshez” vezet szövettenyésztésben, mely együtt jár a vírustiter csökkenésével is. Ezért egyrészt a vírus DNS alacsonyabb kópiaszáma lehet a felelős, másrészt a SAT fehérje hiánya miatt későbbre tolódó apoptózis és sejtlízis. Ez különbözik az NADL-2 törzsnél tapasztaltakkal, ahol a „lassú terjedés” nem járt együtt a vírus titerének csökkenésével.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a K108607-es számú OTKA pályázat támogatta.

EGY II-ES TÍPUSÚ FECV TÖRZS 3-AS ÉS A FIPV-DF2 TÖRZS 7-ES RÉGIÓJÁNAK *IN VITRO* TRANSZKRIPCIÓS ÉS TRANZLÁCIÓS VIZSGÁLATA

Viszovszki Andrea¹, Olasz Ferenc¹, Bálint Ádám², Hornyák Ákos², Zádori Zoltán¹

Bevezetés: A macska koronavírusoknak (Feline coronaviruses; FCoV) jelenleg két patotípusa ismert, a FIPV és a FECV. A FIPV-re jellemző súlyos tünetek kialakulásának feltételezhető oka, hogy ebben az esetben jelentősen megnő a vírus replikációs képessége a makrofágokban és monocitákban. A jelenlegi biológiai és epidemiológiai adatok alapján az *in vivo* mutációs hipotézis a leginkább elfogadott teória, amely szerint a FIPV a FECV-ből keletkezik. Az eddigi kutatások alapján a vírus három régiója tűnik meghatározónak a FECV és a FIPV közötti szövettropizmus és fertőzőképesség megváltozásában. Az egyik ilyen szakasz az S gént meghatározó régió, másik kettő az ORF3c és az ORF7b régió, melyeken belül deléciókat és nonszensz mutációkat sikerült azonosítani.

Célkitűzés: Fő célkitűzésünk a macska koronavírusok 3-as és 7-es régiójának működése mögött álló molekuláris mechanizmusok megismerése, szerepük tisztázása a FECV enterotropizmusának fenntartásában és a betegséget okozó FIPV kialakulásában. Ennek érdekében tanulmányozni kívántuk egy II-es típusú FECV törzs 3-as és a FIPV-DF2 törzs 7-es régióban lévő három (3a, 3b, 3c) illetve két (7a, 7b) ORF-ek transzlációját *in vitro*, valamint a képződött fehérjék lokalizációját.

Módszerek: A kiválasztott régiók transzkripció vizsgálatát RT-PCR-rel végeztük. A különböző ORF-ek transzlációjának tanulmányozásához pEGFP-N1 vektor alapú konstrukciókat hoztunk létre. A konstrukciók a régiók ORF-jeit tartalmazzák, eGFP-t (Enhanced Green Fluorescent Protein) fuzionáltatva az utolsó ORF karboxi-terminális végéhez. A plazmidokat macska embrió sejtekbe (*Felis catus* whole fetus, FCWF) transzfektáltuk, a kapott eredményeket fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük. A fluoreszcens szignál megjelenése annak az ORF-nek az átíródását jelenti, melyhez az eGFP-t fuzionáltattuk. A képződött fehérjék méretét Western blottal vizsgáltuk.

Eredmények: A PCR vizsgálatok eredményeként azt kaptuk, hogy a 3-as és 7-es régió előtt is egyetlen core szekvencia található, ami arra utal, hogy ezekről a régiókról egyetlen mRNS íródik le. Ezt a 3-as régió esetében RT-PCR-rel megerősítettük. A 3-as régió ORF-jeinek transzlálódását tanulmányozva minden egyes esetben (3a, 3b, 3c, 3ab, 3bc, 3abc) detektálható GFP jelet kaptunk. A képződött fehérjéket Western blottal vizsgáltuk. A vizsgálat szerint az ORF3 gének mellett a *gfp*-ről önmagában is történt transzláció, amely leaky scanning vagy IRES jelenlére utal a régióban. A *gfp* transzlációjának kiküszöbölésére olyan ORF3 és ORF7 fúziós konstrukciókat hoztunk létre, amelyekben a GFP kezdő metioninját pontmutációval elimináltuk. A tény, hogy ezekkel a konstrukciókkal is minden esetben sikerült GFP jelet detektálnunk azt bizonyítja, hogy mind a 3-as, mind a 7-es régióban található összes ORF leíródhat egyetlen mRNS-ről.

Következtetések: Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a 3-as és 7-es régiókról transzlálódó fehérjék száma a nem kanonikus transzlációs mechanizmusok következményeként akár meg is haladhatja a régiókban található eddig felismert ORF-ek számát.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást az OTKA K108607 számú pályázat támogatta.

AZ ÚJ FEHÉRJÉT KÓDOLÓ ORF7A VIZSGÁLATA A PRRSV-BEN

Olasz Ferenc¹, Viszovszki Andrea¹, Dénes Béla², Bálint Ádám², Magyar Tibor¹, Zádori Zoltán¹

A légzési megbetegedést és a kocáknál szaporodási zavarokat okozó PRRSV (sertés légzési és reprodukciós szindróma vírus) gazdaságilag jelentős kórokozó. A vírus a *Nidovirales* rendbe és az *Arteriviridae* családba tartozik, genomja egy megközelítőleg 15 kilobázis méretű pozitív, egyszálú RNS, amelyen legalább nyolc, egymással részben átfedő open reading frame-et (ORF-et) írtak le. Korábban bioinformatikai vizsgálatokkal két darab új konzervatív ORF-et találtunk. Az egyiket az ORF6-on belül, amelyet ORF6a-nak neveztünk el, és egy másikat az ORF7-en belül, amelynek az ORF7a nevet adtuk. A két alternatív ORF transzlációját korábban GFP fúziós rendszerrel sikerült megfigyelni.

Célkitűzés: A korábban *in vitro* kapott eredmény megerősítése más módszerekkel, vagyis az esetleges artifact eredmény kizárása, ezenkívül az ORF7a biológiai tulajdonságainak feltárása.

Módszer: *In vitro* módszerekkel (GFP és FLAG fúziós fehérje konstrukciókkal) vizsgáltuk a fehérjetranszlációt az ORF7a-ról. Az ORF7a-t bakteriális expressziós rendszerben expresszáztuk, majd szintetizáltattuk a további biológiai vizsgálatokhoz. A következő lépésekben ELISA-val, protein-protein és nukleinsav-protein electrophoretic mobility shift assay-val (EMSA) és komplement kötési próba gátlásával vizsgáltuk az ORF7a biológiai tulajdonságait. Egérben és sertésben termeltettünk ellenanyagot az ORF7a ellen, majd ELISA és immunfluoreszcenciás (IF) technikával vizsgáltuk a kapott szérumok immunológiai tulajdonságait.

Eredmény: Kétféle módszerrel sikeresen megerősítettük az ORF7a peptid *in vitro* transzlációját. Megfigyeltük, hogy bakteriális expresszió során a fehérje baktériumokra toxikus hatású és azok pusztulását okozza, lehetetlenné téve a fehérje kinyerését. Ezért a további vizsgálatokhoz szintetikus fehérjét használtunk. Az ELISA kísérletek feltárták, hogy az ORF7a képes az IgG-t kötni, a fő kötőhely az ellenanyag Fc részén található. Az IgG-hez való kötődést EMSA-val sikeresen megerősítettük. A komplement fixációs tesztben a vörösvértest lízisének gátlása arra utalt, hogy a fehérje az IgG (Fc) fragment CH2 doménjéhez kötődik. Ezt a megfigyelést a komplement és az IgG közötti kölcsönhatás krisztallográfiás vizsgálatokból nyert adatai is támogatják. A fehérje képes aspecifikus RNS és DNS kötésre is, ami magyarázza a bakteriális toxicitást is. Immunizációs kísérletekben a fehérje nem bizonyult immunogénnek, azonban antinukleáris ellenanyagokat indukált mind egérben, mind sertésben.

Következtetés: A víusról régóta ismert, hogy hosszú ideig képes perzisztálni a fertőzött állatokban és ebben az ORF7a is fontos szerepet játszhat. A peptid valószínűleg az IgG Fc részéhez kötődik, ezáltal befolyásolhatja a komplementkötést és az IgG immunsejtek Fc receptorához való kötődést is, amelynek szerepe van a fagocitózisban, ellenanyag mediálta citotoxicitásban és immunsejtek aktiválásban. A nukleinsav kötő tulajdonsága miatt interferálhat a DNS és az RNS szenzorokkal, amelyeknek a veleszületett immunitásban van nagy jelentősége.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a K108607 számú OTKA pályázat támogatta.

MTA ATK ÁOTI¹; SZIE ATK Patológiai Tanszék²
Nébih Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság³;
Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals Co. LTD.⁴; Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw
University of Life Sciences⁵; Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University
of Minnesota⁶

Viroológia

EGY VAD, NEM MLV EREDETŰ 2-ES TÍPUSÚ MAGYARORSZÁGI PRRSV TÖRZS TELJES GENOM VIZSGÁLATA

Olasz Ferenc¹, Balka Gyula², Bálint Ádám³, Kiss István⁴, Bányai Krisztián¹, Rusvai Miklós²
Tomasz Stadejek⁵, Xiong Wang⁶, Douglas Marthaler⁶, Michael Murtaugh⁶, Zádori Zoltán¹

A sertés légzési és szaporodási szindrómát okozó vírus (PRRSV) világszerte komoly gazdasági károkat okoz a sertésállományokban. A vírusnak két fő genotípusa van: az 1-es, vagy európai genotípus, illetve a 2-es, vagy észak-amerikai genotípus. A 2-es típust Európában először 1996-ban észleltek, ez egy MLV (Modified Live Vaccine, vagyis módosított élő vakcina) eredetű törzs volt. A legtöbb, Európában előforduló PRRSV MLV eredetű, de 2005-ben nem vakcina eredetű 2-es típusú izolátumokat (Hu12, Hu21) azonosítottak Magyarországon is.

Célkitűzés: Egy magyarországi, enyhe tüneteket mutató állatból, 2012-ben izolált (PRRSV-2 Hungary 102/2012 vagy 102HU) nem MLV eredetű, 2-es típusú PRRSV genetikai vizsgálata.

Módszer: A vírus genomját reverz transzkriptázzal átírtuk cDNS-sé, ezután PCR-rel öt egymással átfedő fragmentet hoztunk létre. A fragmentekből új generációs szekvenálással (Ion Torrent) határoztuk meg a vírus bázissorrendjét. A vírus rokonsági viszonyait a Maximum Likelihood módszerrel a Tamura-Nei modell alapján MEGA6 számítógépes program segítségével határoztuk meg. A szerkezeti fehérjék glikozilációs helyeinek pozícióját NetNGlyc 1.0 programmal prediktáltuk.

Eredmény és következtetések: A teljes genom filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy 102HU egy eddig ismeretlen vírus, amely közeli rokonságot mutat a 2-es típusú PRRSV-k őseivel. Az elérhető teljes genomszekvenciák alapján a legközelebbi rokona a 87%-os szekvencia egyezést mutató vad típusú VR-2385 észak-amerikai törzs. A teljes genom analízis alapján az MLV eredet teljesen kizárható a vírussal és a 216 hozzáférhető teljes genom vizsgálata alapján a rekombináció nagy valószínűséggel nem játszott szerepet a 102HU genomjának kialakulásában. A sokkal több szekvenciát tartalmazó ORF 5 adatbázis alapján a vírus a 2-es típus 2-es szubtypusába sorolható és nagyon nagy hasonlóságot mutat egy 1993-as kelet-kanadai PRRSV mintával (92%), ám a kanadai eredet megbízható adatok hiányában nem bizonyítható. Az antigén régiókat és glikozilációs helyeket a GP2, GP3, GP4 és GP5 szerkezeti fehérjékben elemeztük. Mind a négy fehérje N-terminális szignálpeptid régiója kiugróan magas változékonyságot mutat. A GP4 és GP5 fehérjék esetében az aminosav változások nagy része az ismert B- és T-sejt epitópokon helyezkedik el. A GP4 egyik neutralizációs epitópja (15 aminosav) 5 aminosavban mutat változást, amely erős szelekciós nyomásra utal. A GP5 protein egy rendkívül ritka glikozilációs mintázatot mutat (N30, N34, N35, N44, N51) a 27-51 antigén régióban, amely magában foglalja a 32-34 pozitív szelekciós nyomás alatt álló aminosavakat is. A legközelebbi rokonságot mutató, 2005-ben izolált HU12, HU21 vírusok ORF5 ektodomén szekvenciája csak 3%-os nukleotid különbséget mutat a 102HU-hoz. Ez a meglepően alacsony eltérés a vírus egyik legváltozékonnyabb régiójában arra utalhat, hogy az 1-es típusú vakcinázott állományokban, ahol a 2-es típusú vírusok izolálása történt, a vakcinázás gyenge szelekciós nyomást gyakorol a 2-es típusú PRRSV vírusokra.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a K108607 számú OTKA pályázat támogatta.

EQUID HERPESVIRUS 5 KÓROKOZÓ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA, A VÍRUS ELTERJEDTSÉGÉNEK FELMÉRÉSE EGY MAGYARORSZÁGI VADLÓ ÁLLOMÁNYBAN

Moravszki Letícia¹, Kutasi Orsolya¹, Tóth Eszter¹, Biksi Imre², Bakonyi Tamás³

Bevezetés: Az Equid herpesvirus 5 (EHV-5) kórokozót egy nemrégiben leírt kórképpel az equine multinodular pulmonary fibrosis-sal (EMPF) hozták összefüggésbe, azonban a pontos pathomechanizmus még nem tisztázott. A lovak EHV-5 fertőzöttségét már több országban vizsgálták, jelenlétét hazánkban is kimutatták. Különböző populációkat vizsgálva eltérő EHV-5 fertőzöttséget tapasztaltunk, azonban az elterjedtségéhez képest kevés esetben alakul ki az EMPF kórkép. Az EHV-5 gyakrabban került kimutatásra az orrtamponokból, mint más eredetű mintákból, ezért a fertőzöttség megállapítására ez tűnik a legalkalmasabb mintavételi módszernek. Az eddig EMPF-fel diagnosztizált esetekből, a betegek bronchoalveolaris lavage (BAL) mintáiból minden alkalommal kimutattuk az EHV-5 nukleinsavának jelenlétét, ezek alapján a BAL minta a körjelzés felállításában fontos szerepet tölt be.

Cél: Jelen tanulmány célja, hogy felmérjük, hogy egy magyarországi zárt, vadló populációban előfordul-e a vírus. A vírus előfordulása különböző légúti mintákban korrelál-e valamilyen alsó légúti megbetegedés előfordulásával.

Módszer: A Hortobágyi Nemzeti Parkban élő 200 feletti egyedszámú zárt, vadló állományból gyűjtöttük a mintáinkat. 11 Przewalski lóból orrtampon, a perifériás vér lymphocytáinak frakciója, és tüdőszövet került vizsgálatra. Az EHV-5 nukleinsavának jelenlétét polimeráz láncreakció segítségével, vírus specifikus primerek felhasználásával vizsgáltuk. A tüdő kórszöveti vizsgálatakor hematoxilin-eozin festést alkalmaztunk.

Eredmény: A 11 egyedből 6 (54,5%) esetben került kimutatásra az EHV-5 legalább a vizsgált minták egyikéből. Az orrtampon minták esetében 5/11 (45,5%), a vér minták esetében 3/9 (33,3%), míg a tüdő mintáknál 3/10 (30%) volt pozitív. Egy esetben sikerült csak vérből kimutatni a vírust, két esetben csak orrtamponból, egy esetben orrtamponból és tüdőszövetből és két esetben mind három minta típusból. A tüdő minták kórszöveti vizsgálatakor 2 esetben állapítottunk meg fibrózist, mindkét esetben PCR-rel is igazoltuk az EHV-5 jelenlétét.

Következtetés: A vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az EHV-5 viszonylag széles körben fordul elő a vizsgált vadló állományban. A vírus jelenléte a tüdőszövetben két esetben fibrózissal is társult, egy esetben azonban nem volt kórszövettanilag igazolható elváltozás. További céljaink között szerepel annak vizsgálata, hogy milyen EHV-5 virulencia-markerek, illetve milyen gazda-eredetű faktorok játszhatnak közre a kórkép kifejlődésében.

Köszönetnyilvánítás: Köszönettel tartozom a vizsgálatban részt vevő lovak biztosításáért és az együttműködésért dr. Soós Istvánnak és a Hortobágyi Nemzeti Parknak, valamint a pénzügyi támogatást nyújtó Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságnak.

PESTIVIRUSOK GENETIKAI REKOMBINÁCIÓINAK KERESÉSE *IN SILICO* MÓDSZEREKKEL

Kővágó Csaba¹, Hornyák Ákos², Rusvai Miklós³

Bevezetés: A genetikai rekombináció fontos eszköze a vírusok evolúciójának. A folyamat akkor történhet meg, ha ugyanazt a sejtet szimultán két különböző genotípusba tartozó vírus fertőzi meg. Ekkor a két vírus genetikai információjának keveredése történik, melynek eredményeképpen nagyszámú, de sokszor működésképtelen (replikációban defektes) víruskópia keletkezik. Vannak azonban esetek, amikor olyan kombináció áll elő, mely képes további fertőzést kialakítani, így új vírustörzs alakul ki rövid idő alatt.

Cél: Vizsgálataink során génbanki szekvenciák tanulmányozásával kívántunk felderíteni lehetséges rekombináns vírustörzseket. Fontosnak tartottuk felderíteni azok eredetét, a rekombináció alapjául szolgáló szülői („parent”) törzseket is. Ezenközben igyekeztünk a rendelkezésre álló, rekombinációk keresésére alkalmas programokat összehasonlítani és kiválasztani közülük a legjobbat.

Módszer: Vizsgálatainkhoz két szekvencia-csomagot használtunk. Az elsőben szekvenciát hasonlítottunk össze, ezek között Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) 1 és 2-es típus, Border Disease Virus (BDV) és klasszikus sertéspestis vírus (CSF) törzsek szerepeltek. A második csomagban kizárólag BVDV törzseket vizsgáltunk, 1-es és 2-es genotípusúakat egyaránt. Jelen összehasonlításhoz mindkét esetben teljes genomokat használtunk fel, a szekvenciákat a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adatbázisából szereztük be.

A rekombináció kereséséhez a SimPlot 3.5.1 és a Recombination Detection Program (RDP) 4.39-es verzióit alkalmaztuk. A rekombináció-kereséshez a vizsgálandó szekvenciákat egymáshoz kellett illeszteni, erre a feladatra a Unipro UGENE 1.9.8 programot használtuk.

Eredmény: Az általunk vizsgált törzsek közül kevés esetben találtunk olyat, melynek esetében a rekombináció bizonyítható. Érdekes a rekombinánsnak bizonyuló törzsek megoszlása: míg a CSF törzsek között gyakoribbnak mutatkozik a rekombináció, addig a BVDV és BDV törzsek vizsgálatakor elvélve talákoztunk a jelenséggel.

A sertéspestis vírustörzsek közül az AF407339 jelű törzs esetében volt a legtöbb és legerősebb bizonyíték a törzs rekombináns voltára, ezt a jelenséget már korábban leírták. Bizonyítható még a DQ127910 és a AY663656 esetében a korábbi rekombinációs esemény,

A BVDV vírustörzsek közül összesen két bizonyítható rekombinációra találtunk bizonyítékot. Az eredmények alapján a vizsgált genomok közül a GQ888686 és az AY149216 jelű mutatkozik rekombináns vírusnak. Megjegyzendő, hogy mindkét törzs a BVDV 2-es genotípushoz tartozik, és az eredmények alapján a rekombinációt létrehozó donor törzsek is a BVDV 2 genotípus tagjai.

Következtetés: Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az általunk alkalmazott vizsgálati módszerek alkalmasak a genetikai rekombinációk kimutatására. Erre utal a korábban már leírt rekombináció megerősítése. Feltűnő, hogy a rekombinációk incidenciája a CSF vírusok között gyakoribb, mint a BVDV genomok között. Erre magyarázatot adhat a BVDV azon tulajdonsága, hogy szimultán fertőzés esetén, feltéve, hogy az egyik törzs citopathogén tulajdonságú, kialakul a nyálkahártya-betegség, mely fatális jellege miatt nem kedvez az esetlegesen keletkező rekombináns törzsek továbbadásának.

JEGESMEDVÉBEN TALÁLT ÚJ ADENOVÍRUS GENOMIKAI ÉS FILOGENETIKAI VIZSGÁLATA

Böszörményi Kinga¹, Sós Endre², Iva I. Podgorski¹, Harrach Balázs¹

Az adenovírusok (AdV) ikozaéder alakú, burok nélküli vírusok, melyek genomja duplaszálú, lineáris DNS. Különböző gerinces gazdáiban való széleskörű elterjedésük miatt ideális modellnek bizonyultak a vírusevolúció tanulmányozására. AdV-t a gerincesek minden osztályának képviselőjéből írtak már le, azonban ezek között érthetően kevés az egzotikus állat. Munkánk során olyan állatkerti emlősállatokat vizsgáltunk, melyekből még nem írták le AdV jelenlétét.

A Fővárosi Állat- és Növénykertben elpusztult egy jegesmedve (*Ursus maritimus*). A kórboncolás krónikus, multifokális vesefibrosist, vese amyloidosist és multifokális glomerulonephritist mutatott ki, valamint a máj epeutáiban tekintélyes méretű cystadenomát. Az állat közvetlen elhullását béta-2 toxint termelő *Clostridium perfringens* enterotoxaemia okozta. Bár a kórbonctani leletek nem tulajdoníthatók AdV által okozott fertőzésnek, a hulla tüdő- és májmintájából megkíséreltük AdV kimutatását.

DNS-t vontunk ki mindkét szervből, majd PCR-rel próbáltunk felerősíteni különböző AdV genomszakaszokat. A PCR-hez jól megőrzött génszakaszokra tervezett, degenerált primereket használtunk, melyek segítségével a DNS polimeráz, a hexon és a IVa2 gén egyes szakaszait felerősítő PCR pozitívnak bizonyult. A PCR termékeket gél-elektroforézissel vizsgáltuk, majd a DNS-t ugyanezzel tisztítottuk és a PCR során használt primerek segítségével elvégeztük velük a Sanger szekvenálási reakciókat. A kapilláris elektroforézis a Szegedi Biológiai Központban történt automata szekvenálón. A kapott szekvenciákat a GenBank-ban elérhető szekvenciákkal összehasonlítva vizsgáltuk, hogy valóban AdV-t tartalmazott-e a minta, illetve hogy új AdV-ről van-e szó. Hosszabb genom szakaszok felerősítése érdekében (a kapott génszakaszok összekötéséhez) specifikus primereket terveztünk a degenerált primerekkel nyert szekvenciák alapján. Az átfedő szekvenciák összeillesztését Staden programcsomaggal (Gap4) végeztük. A filogenetikai számításokhoz a távolsági mátrix analízist (PhyML) használtunk. A fák megjelenítésére a Mega 6 programot használtunk.

Mindkét szervből sikerült adenovírust kimutatni, és mind a két mintában (legalább is a vizsgált szakaszon) ugyanaz a mastadenovírus volt jelen. A GenBank-ban levő szekvenciákkal való összehasonlítás megerősítette, hogy ezt a vírust sem jegesmedvéből, sem más fajból nem írták még le, és filogenetikailag jól elkülönül az eddig leírt adenovírusoktól. Jelentőségét az adja, hogy medvefélékből eddig még nem sikerült molekulárisan azonosított AdV-t kimutatni. A hosszabb genomszakaszok szekvenálása segítené a vírus további összehasonlító tanulmányozásában. Váratlan szerencsével sikerült a IVa2 és a hexon gének közötti hosszú, kb. 13.000 bp-nyi, genomszakaszt egyetlen PCR-rel felerősíteni. Ennek szekvenálása, egyedileg tervezett szekvenáló primerekkel („primer walking”) jelenleg folyik. Nagyon hasznos lenne a vírus izolálása és szaporítása, azonban erre kicsi az esély alkalmas sejtvonallal hiányában. Az eddigi próbálkozásaink különböző sejtvonalakon nem jártak sikerrel.

Támogatás: ADVance (EU FP7-290002, Initial Training Network)

ÚJ ROTAVIRUS FAJ KIMUTATÁSA KUTYA FEKÁLIS VIROMJÁBAN

Mihalov-Kovács Eszter¹, Gellért Ákos², Marton Szilvia¹, Farkas L. Szilvia¹, Fehér Enikő¹,
Jakab Ferenc³, Vito Martella⁴, Bányai Krisztián¹

Bevezetés: A *Reoviridae* víruscsalád *Rotavirus* nemzetségébe a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság érvényes besorolása szerint jelenleg öt vírusfaj tartozik (*Rotavirus A-E*, *RVA-RVE*), de további három lehetséges faj ide sorolását is kezdeményezték (*Rotavirus F-H*, *RVF-RVH*). Az új fajok kijelölésénél figyelembe veszik a szerológiai keresztreakciót, szekvencia hasonlóságot és a vírus gazdaspektrumát.

Célok és módszerek: Kölyökkutyák fekális viromjában azonosítottunk újszerű rotavírusokat metagenomikai módszerekkel.

Eredmények: A szerkezeti fehérjéket kódoló gének szekvencia analízise, valamint filogenetikai elemzése alapján alacsony szintű genetikai hasonlóságot figyeltünk meg a két törzs (KE135/2012 és KE528/2012) és a különböző RV fajok képviselői között. Törzseink a legnagyobb aminosav (aa) szintű hasonlóságot szerkezeti fehérjék esetében az *RVH* törzsekkel mutatták. A VP1, VP2, VP3, VP6 és VP7 szerkezeti fehérjék külön-külön 58%, 46%, 39%, 46% és 28% hasonlóságot mutattak *RVH* törzsek megfelelő fehérjéinek szekvenciáival, míg az új kutya rotavírus törzsek VP4 antigénjének aa szekvenciája leginkább az *RVG* referencia törzshöz hasonlított, 28% azonosságot mutatva. A VP6 aa szintű hasonlósága megfelelt a RV fajok elkülönítésében figyelembe vett határértéknek (<53% aa hasonlóság). A nem-szerkezeti fehérjéket kódoló gének aa szintű összehasonlítása és filogenetikai elemzése szintén távoli rokonságot sejtetett az ismert RV fajokkal. Az NSP1 30%-ban hasonlított a referencia *RVH* törzssre. Az NSP2 és NSP3 42%- illetve 26%-ban volt hasonló a referencia *RVB* törzsszel, az NSP4 19%-os aa szintű hasonlóságot mutatott *RVF* törzsszel, az NSP5 pedig 30%-ban hasonlított a kiválasztott referencia *RVG* törzssre.

Következtetés: A két újonnan leírt kutya rotavírus törzs 11 génszegmensének genetikai analízise alapján úgy véljük, hogy azok egy új RV fajba tartoznak (*RVI*).

Köszönetnyilvánítás: A tanulmány létrejöttét az MTA Lendület programja valamint a 108793 sz. OTKA pályázat támogatta. G.Á. további támogatásban részesült a Bolyai kutatói ösztöndíj jóvoltából. J.F. támogatásban részesült a TÁMOP által (4.2.4.A/2-11-1-2012-0001).

KÜLÖNBÖZŐ EGZOTIKUS FAJOKBÓL SZÁRMAZÓ HÜLLŐ ORTHOREOVÍRUSOK FILOGENETIKAI ÉS SZEKVENCIA ANALÍZISE

Kugler Renáta¹, Marton Szilvia¹, Fehér Enikő¹, Rachel E. Marschang², Bányai Krisztián¹,
Farkas L. Szilvia¹

Bevezetés: A hüllő reovírusok gyakori előfordulású patogének, melyek sejtenyészeten jellegzetes citopatológiai elváltozást okoznak. Teljes genom szekvencia mindössze egyetlen hüllő reovírus izolátum, a zöld bozótvipérából (*Atheris squamigera*) származó, 47/02-es vírustörzs esetében érhető el. A génbankban a legtöbb esetben csak az RNS-függő RNS-polimeráz részleges szekvenciája található meg.

Cél: Kutatásaink során különböző egzotikus hüllőfajokból származó orthoreovírusokat izoláltunk és jellemeztünk, genetikai sokféleségük és evolúciós kapcsolataik feltérképezése céljából.

Módszer: A hüllő szervmintákat hagyományos és modern molekuláris virológiai módszerekkel dolgoztuk fel. A hüllő orthoreovírusok detektálása egy, az RNS-függő RNS-polimerázt kódoló gén konzervatív szakaszára tervezett konszenzus kétkörös PCR reakció segítségével történt, valamint hüllő sejtvonalakon vírusizolálást végeztünk. A közel teljes genom szekvenciákat újgenerációs szekvenálással határoztuk meg. Vizsgálatainkba Németországban izolált reovírus törzseket is bevontunk.

Eredmény: A vizsgált vírusokat királypítóból (KP3; *Python regius*), egy zöld leguánból (2013/54; *Iguana iguana*) illetve egy ismeretlen kígyó fajból (643/47) izoláltuk. A német törzsek egy kaméleonból (2702/97), egy mór teknősből (97/96; *Testudo graeca*), egy szőnyegpítóból (55/02; *Morelia spilota*) és egy leguánból (111/99) származtak.

Az egyes genom szegmensek nukleotid szekvenciáit külön-külön elemeztük. A genomsegek szekvencia illetve filogenetikai analízise alapján a hüllő orthoreovírusok legalább három jól elkülönülő csoportba sorolhatóak. Egyéb tulajdonságok mellett az *Orthoreovirus* nemzetségen belül a fajok elkülönítése szekvencia hasonlósági adatokon alapszik, mely határértékeit az ICTV állapítja meg. A homológ nukleotid szekvenciák közti legalább 75%-os hasonlóság esetén két vírustörzset egyazon fajba sorolunk, míg a 60%-nál alacsonyabb hasonlóság a homológ szekvenciák között jelzi a vírustörzsek különböző fajba tartozását. Érdekes módon a teknősből származó 97/96 jelzésű vírustörzs esetén a nukleotid szekvenciák hasonlósága az alsó határérték közelében volt, jelezve a hüllő orthoreovírusok közötti genetikai távolságot.

Köszönetnyilvánítás: Kutatásaink anyagi háttérét az MTA Lendület Programja valamint az OTKA K108727 sz. pályázat biztosította.

SZARVASMARHA VÍRUSOS HASMENÉSÉNEK VÍRUSÁVAL (BVDV) PERZISZTENSEN FERTŐZÖTT EGYEDEK SZERVEINEK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA

Szabára Ágnes¹, Ózsvári László¹, Jakab Csaba²

Munkánk során célul tűztük ki, hogy BVD vírusával perzisztensen fertőzött borjú különböző szövetein immunhisztokémiai vizsgálatot végzünk, amely a kvalitatív eredmények mellett segít a vírus szövetbeli mennyiségét is meghatározni. Jelen immunhisztokémiai vizsgálatot hazánkban először alkalmazzuk átfogó, több különböző szervből származó szövetmintára kiterjedően, általunk validált protokoll alapján, manuális immunhisztokémiai laboratóriumunkban.

Immunhisztokémiai tanulmányunkat egy heveny BVD fertőzés jeleit mutató nagy létszámú, tejelő Holstein-fríz állományban végeztük. A PI egyedek felkutatása céljából minden újonnan született borjú fülporcmintáját a helyszínen a vírus antigénjének kimutatására alkalmas ag-ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.) gyorseszttel vizsgáltuk és a BVDV-pozitív borjak vérmintájából a BVDV nukleinsavának kimutatására irányuló qRT-PCR vizsgálatokat kértünk a NÉBIH ÁDI Virologiai osztályától. Egy 3 és egy 3,5 hónapos, valamint egy 2 napos PI borjú necropsiás vizsgálata során mintákat vettünk a kórszöveti és immunhisztokémiai analízisekhez a kültakaróból, a testtájéki nyirokcsomókból, az emésztő-, a légző-, az ivar-, a hormon-, a perifériás- és a központi idegrendszer, továbbá a keringési-szervrendszer szerveiből. A mintákat neutrális, 10%-os pufferolt formaldehid-oldatban tároltuk. A szövetmintákat Shandon excelsior szövetelőkészítő automatával tettük alkalmassá a további feldolgozásra. A paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk Reichert típusú mikrotómmal, amelyek közül egy-egy példányt első lépésben haematoxilinnal és eosinnal (H.E.) festettünk meg, Shandon Varistain 24-4 automata segítségével. A metszeteket Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóppal tanulmányoztunk 40x-, 100x-, 200x- és 400x-os nagyításokon. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket kétszer váltott xyloban, majd háromszor váltott alkoholban deparaffináltuk, majd 1x-es PBS-sel való mosás után antigénfeltárást végeztünk proteinázos emésztéssel. Az endogén-peroxidáz aktivitást 0,3%-os H₂O₂-dal, metanolban blokkoltuk. Az immunhisztokémiai reakciókat avidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (Dako LSAB2 Kit) és diamino-benzidin (DAB) kromogénnel tettük láthatóvá. A kontrasztfestés Mayer-féle haematoxilinnel történt. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során anti-BVDV-1 E2 (gp53) IgG2a izotípusú (VMRD, Inc.) monoclonalis ellenanyagot használtunk.

Pozitív kontrollként nyirokcsomószövetet használtunk fel, amelyek sinus-histiocytáiban, follicularis dendriticus sejtjeiben a BVDV-pozitivitás multifocalis, intenzív, barna, granularis, cytoplasmaticus pozitív jelként volt észlelhető. A beválogatott PI-borjú szervmintákban észlelt BVDV-pozitivitás nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív eredményeket is produkált, mivel tájékoztatott a BVDV egyes szövetekben való mennyiségi előfordulásáról is. Ez utóbbi felhívja a figyelmet az egyes szervek vírusürítésben történő szerepére, ill. a szerv vírus rezervoár hátterére.

A tudományos munka a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar 2014. évi Kutató Kari keretének és a Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságnak a támogatásával valósult meg.

A BVDV, MINT A SZARVASMARHA ANAPLASMOSIS INDIKÁTOR KÓROKOZÓJA

Szabára Ágnes¹, Jakab Csaba²

Munkánk során célul tűztük ki, hogy egy szarvasmarha-állományban több éve megbúvó szubklinikai anaplasmosis, akut BVDV-fertőzés hatására történő heveny, klinikai tünetekben megjelenő formáját vizsgáljuk.

A vizsgálatainkat egy 800 tehénlétszámú és kb. 1600 öszléltszámú, a dél-alföldi régióban található, tejelő tehenészetben végeztük. Az állomány a vérvizsgálatok alapján legalább 2002 óta BVD-mentes. 2012-ben az immunkompetens, fogékony vemhes üszők egy része legeltetés során BVDV-vel fertőződött. A fertőzöttség megállapítását követően a vírusürítés csökkentése és a BVDV állományon belüli további intenzív terjedésének, valamint a magzati fertőzés megakadályozása céljából kétszer, 4 hetes időközzel megtörtént a teljes állomány alapimmunizálása. Az 1. oltást követő 5-6. héten 33 tehénél tapasztaltunk magas lázat, bágyadságot, étvágytalanságot, majd anaemiát és icterust, amelyekből 18 állat oxytetracyclin (OTC) kezelésre gyógyult. Emellett 7 vetélés és 3 koraellés történt. Az ismételt vakcinázást követően 4 állatnál jelentkeztek az anaplasmosisra jellemző klinikai tünetek, amelyek OTC kezelésre gyógyultak. A vetélések és a holtellés esetében a magzatok szerveinek és az anyaállat vérmintáinak laboratóriumi vizsgálatával a brucellosis, az EBL, az IBR, a Listeria, a leptospirosis, a BVD és a Schmollenberg vírus (SBV) oktatni szerepét kizárták. A toxikológiai vizsgálat kizárta a rézmérgezést, a haematológiai-, a biokémiai-, a PCR-, a haemocytológiai- és a necropsziás vizsgálat pedig megállapította az *A. marginale* fertőzöttséget. Az állomány fertőzöttségének felmérése céljából korcsoportonként általunk meghatározott számú egyedből *A. marginale* elleni ellenanyagok kimutatására irányuló ELISA-vizsgálatot végeztünk. Eredményeink a szakirodalmi adatoknak megfeleltek, az idősebb korcsoportokban (3-4 év, >4 év) jelentősen nagyobb volt a szeropozitív állatok aránya (50%), a fiatalabb korcsoportokhoz képest (10-30%). A születést követő időben azt tapasztaltuk, hogy a 0 napos egyedben, még a kolosztrom itatását megelőzően minden egyed szeronegatív volt, viszont a 3 napos borjak között már volt szeropozitív állat.

Az epidemiológiai vizsgálat során megfigyelhető, hogy a BVD vírus terjedése a fogékony állományban a vakcinázás előtt jelentős volt (BVD szeropozitivitás 2013. április: 10%, 2013. szeptember: 45-50%), viszont ez idő alatt nem jelentkezett anaplasmosisra utaló megbetegedés. Ennek oka, hogy *anaplaszával* perzisztensen fertőzött egyedben a megbetegedés újbóli fellángolása nem lehetséges a benne kialakult aktív védettség miatt, még a vírus jelentős immunszuppresszív hatására sem. Vagyis a vakcinázás során elsősorban az *A. marginale* kórokozó, hordozó állatból fogékony és BVDV-vel tranziensen vagy esetleg az immunizáláskor iatrogén úton fertőzött állatba történő terjedése okozta a heveny, több állatot érintő szarvasmarha anaplasmosis kialakulását az állományban. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy amennyiben egy adott - *anaplaszára* és BVDV-re fogékony - egyed, nagyjából egy időben fertőződik a két kórokozóval, akkor a BVDV immunszuppresszív hatása segíti az *A. marginale* fertőzés megeredését és a betegség akut, klinikai tünetekben történő megnyilvánulását.

A tudományos munka a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar 2014. évi Kutató Kari keretének és a Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságnak a támogatásával valósult meg.

**ÁLLATGYÓGYÁSZATI VAKCINÁK FOTO-STABILITÁSA:
ELŐZETES TANULMÁNY KOCKÁZATBECSLÉSHEZ**

Farsang Attila, Lévai Réka, Barna Tímea, Fábrián Katalin, Kulcsár Gábor

Bevezetés: Az újabb trendek szerint az állatgyógyászati oltóanyagok átlátszó műanyag dobozba történő csomagolása egyre inkább tért hódít. Ez és az oltóanyagoknak állandóan megvilágított, üvegajtajú hűtőkben való tárolása foto-stabilitási kérdéseket vet fel, különösen annak fényében, hogy a hatályos Európai Gyógyszerkönyvi rendelkezések, illetve a vakcina SPC-jében megfogalmazott ajánlások a „fénytől védendő” kitételt tartalmazzák. A kérdéssel az Európai Gyógyszerügynökség több bizottsága is foglalkozott, illetve időről-időre foglalkozik.

Cél: A foto-stabilitás és az oltóanyag hatékonysága közötti tentatív összefüggés vizsgálata.

Módszer: Kísérletünkhöz egy hazai klasszikus sertéspestis elleni vakcinát választottunk, amelyet 253.7 nm hullámhosszon 6000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UV-C sugárterhelésnek tettünk ki. A besugárzott és a kezeletlen oltóanyag alikvótokkal tömény és 1:40 hígításban 5-5 malacot oltottunk, míg 5 állatot kezeletlen kontrollként tartottunk. Az állatokból vért vettünk a D0, D14, D18 napokon és a vérmintákban meghatároztuk az ellenanyag szintet ELISA-val (IDEXX HerdChek® CSFV Ab ELISA Test Kit).

Eredmény: Eredményeink szerint az UV sugárzás jelentősen csökkentette a vakcinák ellenanyag indukáló képességét. A besugárzott tömény és a 1:40 hígítású vakcinák esetében 7 %, illetve 30%-os csökkenést tapasztaltunk.

Következtetés: A foto-stabilitás nehezen mérhető, de mindenképpen jelenlévő probléma, amivel foglalkozni kell. Az átlátszó csomagolás és a „fénytől védve tárolandó” utasítás ellentmondását a résztvevők (gyártó, hatóság, végfelhasználó) másképpen értelmezik és bizonytalanság tapasztalható annak megítélésében is, hogy a fénytől való védelem kinek a felelőssége. E tekintetben a hatósági iránymutatás mindenképpen szükségesnek látszik, az eszközök (tájékoztató füzetek, illetve hatásvizsgálatokra kötelezés) megválasztása további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás: A munka pályázati és pénzügyi háttérét az AniBioThreat Action Grant (Home/2009/ISEC/AG/191) biztosította.

MAGYARORSZÁGON TÖRZSKÖNYVEZETT KLASSZIKUS SERTÉSPESIS ELLENI VAKCINA HATÉKONYSÁGI VIZSGÁLATA HÁZI SERTÉSEN

Lévai Réka¹, Farsang Attila¹, Barna Tímea¹, Fábíán Katalin¹, Sandra Blome², 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 Állatgyógyászati Termékek Igazgatóságának (NÉBIH ATI) Oltóanyag Osztálya egy Magyarországon törzskönyvezett, állami járványvédelmi célra elérhető klasszikus sertéspestis elleni vakcina egy adagjának hatékonyságát pestivírusokkal szemben szeronegatív malacokon az Európai Gyógyszerkönyv (Ph.Eur.) 7.7 04/2013:0065 és 7.0 04/2008:50207 számú monográfiáival összhangban beállított, ráfertőzéses állatkísérletben vizsgálta.

A bemutatott kísérletbe 20 darab 6-10 hetes, pestivírusok elleni anyai ellenanyagokkal nem rendelkező (MDA-) malacot állítottunk be. Négy csoportot alakítottunk ki: egy oltatlan kontroll és három, a vakcina különböző hígításaival (cc, 1:40, 1:160) intramuscularisan (im) vakcinázott csoportot. A vakcinázást követő 14. napon nagy virulenciájú „Koslov” CSF vírustörzssel 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 PCR vizsgálatokhoz alvadásában gátolt vért vettünk az állatokból.

A kontroll állatok a CSF tipikus klinikai tüneteit mutatva a kísérlet lezárása előtt elpusztultak. Az vakcinázott állatok mindhárom csoportban a kísérlet lezárásáig egészségesek maradtak. Az ellenanyag-ELISA vizsgálatok alapján a kontroll állatok közül háromnak a mintája vált szeropozitívvá az elhullásuk előtt, a kezelt állatok megfelelően áthangelődtek. Az antigén-ELISA vizsgálatok alapján a vakcinázott állatok egyik mintája sem lett pozitív, míg a kontroll malacokban a fertőzést követő hetedik naptól virémiát tapasztaltunk. A PCR minták vizsgálata folyamatban van.

Megállapítható, hogy a kezelt állatokban a vakcina különböző hígításokban is védettséget biztosított, a hatékonysága megfelelő.

A munka pályázati és pénzügyi háttérét az AniBioThreat Action Grant (azonosító: Home/2009/ISEC/AG/191) biztosította.

HAZAI BAROMFI FAJOKBÓL ÉS VADMADARAKBÓL IZOLÁLT *BORDETELLA AVIUM* ÉS *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Szabó Réka¹, Magyar Tibor¹

Bevezetés: Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedése mind orvosi, mind állatorvosi szempontból aggodalomra ad okot. A rezisztens kórokozók elterjedéséhez az állatorvosi gyakorlat gyakran túlzott antibiotikum használata is hozzájárul. Az élelmiszeripar ezzel szemben élelmiszer-termelő állatokban az antibiotikum-használat minimalizálását várja el. A légzőszervi megbetegedések világszerte jelentős gazdasági károkat okoznak a baromfiiparban. A *Bordetella avium* és az *Ornithobacterium rhinotracheale* egyike a számos légzőszervi kórokozónak. A hazai izolátumok antibiotikum érzékenységéről szóló aktuális adatok ezért nélkülözhetetlenek a hatékony, célzott antibiotikum használathoz.

Cél: Munkánk célja *B. avium* és *O. rhinotracheale* törzsek antibiotikum-érzékenységének meghatározása volt.

Módszer: Az antibiotikum rezisztenciát korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk, a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) nehezen tenyészthető Gram negatív baktériumokra kiadott ajánlásának megfelelően, majd három antibiotikum esetén a MIC (minimális gátló koncentráció) értékeket mikrohígítási módszerrel határoztuk meg, ugyancsak a CLSI ajánlásokat követve.

Eredmény: Minden *O. rhinotracheale* törzs érzékeny volt ampicillinre, chloramphenicolra, spectinomycinre és a legtöbb tilmocossinra is, azonban a törzsek nagy része rezisztensnek bizonyult gentamicinnel, nalidixsavval, sulphomethoxazol/trimethoprimmal, polymixin B-vel és sulfonamidokkal szemben. A héja és galamb eredetű törzsekkel szemben több antibiotikum volt hatékony, mint a baromfiból származó törzsekkel szemben. Az erythromicin, lincomycin, penicillin and polymyxin B a 2001-ben gyűjtött törzsekkel szemben hatékonyak bizonyultak, a 2009-2012 között izoláltak ellen azonban kevésbé. A vizsgált törzseknek 48, illetve 41%-a volt érzékeny amoxicillinra és az erythromicinre.

Az összes *B. avium* izolátum rezisztens volt ceftiofurral és lincomycinnel szemben, és érzékeny doxyciklinre, gentamicinre, polymixin B-re, spectinomycinre and sulfonamidokra. A tilmicosin és a sulphomethoxazol/trimethoprim is hatékonyak bizonyultak. A német törzsek a többitől eltérő rezisztencia mintázatot mutattak: rezisztensek voltak ceftiofurral szemben, de érzékenyek penicillinre és ampicillinre.

Következtetés: A tény, hogy a vadmadárból származó törzs több antibiotikumra volt érzékeny, alátámasztja azt a feltételezést, hogy a jelenlegi antibiotikum használat hozzájárul a rezisztens kórokozók terjedéséhez. Ezt erősíti meg az is, hogy a német *B. avium* törzsek rezisztencia mintázata eltért a hazai izolátumokétól, amit a két országban és két időszakban követett eltérő terápiás gyakorlat magyarázhat.

NYÚL ÉS SERTÉS EREDETŰ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA

Khayer Bernadett, Sulyok Kinga Mária, Domokos Judit, Magyar Tibor, Wehmann Enikő

A *Bordetella bronchiseptica* világszerte elterjedt Gram-negatív baktérium, amely változatos légzőszervi megbetegedéseket képes előidézni különböző emlősfajokban. Az általa okozott megbetegedések közül legnagyobb gazdasági jelentőséggel a sertések torzító orrgyulladására bír. Egyre jelentősebbé válik azonban a nyulak bordetellózisa is, amely tetemes károkat eredményezhet a különböző laboratóriumi, hobbi, vagy húsnyúl állományokban.

A bakteriális fertőzésekkel szemben máig az antibiotikumos terápia a leghatékonyabb eljárás, de a célzott terápia érdekében elengedhetetlen az adott kórokozó antibiotikum rezisztenciájának ismerete. A *B. bronchiseptica* törzsek antibiotikum érzékenységről meglehetősen keveset tudunk, hazai adatokkal pedig egyáltalán nem rendelkezünk. Sertésekből és nyulakból izolált *B. bronchiseptica* törzsek retrospektív vizsgálatával ezt a hiányt szeretnénk pótolni.

Vizsgálatainkhoz 15-15, eltérő időből és földrajzi régióból izolált sertés és nyúl eredetű *B. bronchiseptica* törzset választottunk ki. A törzseket aerob körülmények között, 5% juhvért tartalmazó Columbia agaron tenyésztettük. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat 14 különböző antibiotikummal Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel végeztük el. Kiértékeléskor a kialakult gátlási zónák nagyságát a NÉBIH ÁDI által kidolgozott határértékekkel hasonlítottuk össze. A plazmid izolálást QIAprep Spin Miniprep Kit segítségével hajtottuk végre, a kapott termékek gélelektroforézise 0,6%-os TopVision agaróz gélben történt.

Az összes törzs érzékeny volt a kolisztinra, de rezisztenciát mutáltak a penicillinnel, a ceftiofurral, a vankomicinnel és a linkomicinnel szemben. A vizsgálatba bevont további antibiotikumokra nézve a törzsek eltérő módon viselkedtek, a sertés eredetű törzsek között nagyobb arányú antibiotikum rezisztenciát írtunk le. Ampicillinnél a törzsek nagyfokú változatosságát figyeltük meg gazdafajtól függetlenül, nalidixsav és enrifloxacin antibiotikumokra csupán 1-1 törzs reagált a többi baktériumtól eltérően. Szulfonamidokra a törzsek általában érzékenyek voltak, de nyúl eredetű törzsek közül egy, és a sertésből származó törzsekből öt darab teljes rezisztenciát mutatott szulfonamidokra. Az egyik szulfonamid-rezisztens sertés eredetű törzsnél tetraciklin rezisztenciát is leírtunk. A plazmid izolálást követően összesen 5 törzsből mutattunk ki különböző méretű plazmidokat (20-60 kb), melyek kizárólag szulfonamid-rezisztens törzsekből származtak. Annak eldöntésére, hogy ez a rezisztencia plazmidon vagy a kromoszómán van-e kódolva további konjugációs és/vagy PCR vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy leghatékonyabbnak a polimixinek és a nukleinsavak szintézisére ható antibiotikumok bizonyultak *in vitro*. Valószínűsíthető, hogy az egyes állattartó telepeken alkalmazott antibiotikum terápia befolyásolja a baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységét.

Kutatásainkat az OTKA K83332 számú pályázata támogatta.

B:2 TÍPUSÚ *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK ELSŐ MAGYARORSZÁGI IZOLÁLÁSA

Ujvári Barbara¹, Szeredi Levente², Pertl László³, Tóth Gergely², Erdélyi Károly², Jánosi Szilárd², Molnár Tamás², Magyar Tibor¹

Bevezetés: A *Pasteurella multocida* egy széles gazdaspektrummal rendelkező, világszerte előforduló baktériumfaj. A *P. multocida* burkát alkotó különböző mukopoliszacharidok alapján ötféle (A, B, D, E, és F) buroktípust különítünk el. A különböző buroktípusok előfordulása összefüggésbe hozható az egyes gazdafajokkal és megbetegedésekkel. A tüdőgyulladásos kórképekben, gazdafajtól függetlenül, az A buroktípussal rendelkező törzsek dominálnak. A toxint termelő D (újabbán pedig A) buroktípusú törzsek a sertések torzító orrgyulladásának okozói. Az eredetileg pulykákból izolált F buroktípusú törzsek, az A buroktípus kísérőjeként, a baromfikolerában és a nyulak „ragadós náthájában” játszhatnak szerepet. A B és E buroktípusú törzsek szubtrópusi területeken a kérődzők vérvészes vérfertőzését idézik elő. 2013 augusztusában egy eddig nálunk nem tapasztalt megbetegedést sikerült azonosítanunk háztáji sertésekben, egy 5 km átmérőjű területen, az északnyugat-magyarországi régióban.

Cél: A megbetegedések hátterében álló *P. multocida* törzsek jellemzése.

Módszer: A baktériumizolálást 10% juhvért tartalmazó Columbia táptalajon végeztük. A kitenyésztett kórokozó biokémiai profilja alapján meghatároztuk a biotípust, majd polimeráz láncreakciókkal (PCR) a fajt és a buroktípust is azonosítottuk. A szomatikus szerotípus meghatározásához PCR-RFLP-t alkalmaztunk. A törzsek további jellemzéséhez az M13 PCR „genetikai ujjlenyomat” technikát használtuk. A filogenetikai viszonyokat a háztartási gének szekvencia analízisén alapuló multi-lókuszos szekvencia tipizálással (MLST) térképeztük fel.

Eredmény: Három törzset sikerült izolálnunk, melyeket *P. multocida* ssp. *multocida*-ként azonosítottunk: mindegyik törzs képest volt hasznosítani a xilózt és szorbitolt, és ornitindekarboxiláz aktivitással is rendelkezett. Negatív reakciót kaptunk az arabinóz, laktóz, maltóz, trehalóz és dulcitol bontást vizsgáló reakciókban, így a törzseket a 3-as biotípusba soroltuk. A törzsek mindegyike a B buroktípusúnak és 2-es szomatikus szerotípusúnak bizonyult. Az M13 PCR használatával három genetikai profilt tudtunk elkülöníteni. A B:2 szerotípusú törzsek esetében egyező mintázatot kaptunk. Az MLST vizsgálat során kapott adatok alapján egy új szekvenciatípust azonosítottunk (ST61). Az *aroA* (558 bp) génszakasz elemzése során egy új allélt sikerült azonosítanunk. A filogenetiai vizsgálatok során az MLST adatbázisban fellelhető izolátumok szekvencia adataival vetettük össze saját adatainkat. Az elemzés során a B:2 szerotípusú, haemorrhagiás szeptikémiát okozó törzsek egy jól elkülönülő klasztert alkottak.

Következtetés: A B:2 szerotípusú *P. multocida* törzsek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a szeptikémiás tüneteket okozó izolátumok feno- és genotípusos diverzitása rendkívül alacsony, az izolátumok egy jól elkülönülő klonális komplexet alkotnak.

HAZAI *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *HOLARCTICA* TÖRZSEK GENETIKAI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Kreizinger Zsuzsa¹, Pásztor Alexandra¹, Elin Nilsson², Kerstin Myrtenäs², Sulyok Kinga Mária¹, Makrai László³, Mats Forsman², Gyuranecz Miklós¹

Bevezetés: A *Francisella tularensis* Gram-negatív baktérium, zoonótikus kórokozó, a tularaemia előidézője. A *F. tularensis* fajon belül négy alfajt különböztetnek meg, melyek közül Európában, így hazánkban is a *holarctica* alfaj endémiás. A kontinensen izolált törzsek két fő filogenetikai csoportba sorolhatók, a B.FTNN002-00 csoport elsősorban Dél-Nyugat-Európában, míg a B.13 csoport főként Észak, Kelet és Közép-Európában jellemző. A *Francisella* nemzetség tagjai viszonylag alacsony genetikai változékonyságot mutatnak, hasonlóan a *Bacillus* vagy a *Yersinia* nemzetségekhez, így az egyes törzsek közötti rokonsági viszonyok felderítésére nagy felbontóképességű vizsgálati módszerek szükségesek.

Cél: A vizsgálatok során Magyarország különböző területeiről és különböző gazdafajokból származó *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek genetikai tulajdonságait határoztuk meg canSNP (canonical single-nucleotide polymorphism) vizsgálat, MLVA (multi-locus variable-number of tandem repeats analysis) elemzés és teljes genom szekvenálás segítségével.

Módszer: A genotipizálás során 2003 és 2014 között, Hajdú-Bihar, Békés, Csongrád, Jász-Nagykun, Bács-Kiskun és Győr-Moson-Sopron megyékből gyűjtött, 66 mezei nyúlból (*Lepus europaeus*), 1 huszármajomból (*Erythrocebus patas*), 1 szavannacerkófból (*Chlorocebus aethiops*) és 1 aranykezü tamarinból (*Saguinus midas*) származó *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzs DNS-ét vizsgáltuk. A törzsek filogenetikai csoportokba történő besorolásához 13 canSNP meghatározására alkalmas ún. melt-MAMA (mismatch amplification mutation assay) rendszert használtunk. Az így kialakult filogenetikai csoportok további felbontására és elemzésére az MLVA módszert alkalmaztuk, mely során 11 lókuszon határoztuk meg az ismétlődő szakaszok számát, fragment analízis révén. Továbbá 9 törzs teljes genomjának szekvenálására és analízisére is sor került egy új-generációs szekvenáló gép (Miseq, Illumina Inc.) és az ABySS szoftver segítségével.

Eredmény: A filogenetikai vizsgálatok alapján az összes magyar törzset az ún. B.13-as csoportba soroltuk. A csoporton belül az SNP-tipizálás alapján 9 alcsoportot különítettünk el, melyek közül hármat (B.20/21/33, B.33/34, B.34/35) az MLVA elemzés alapján további, összesen 13 alcsoportra osztottunk fel. Az SNP-tipizálás alapján a törzsek 88%-a (61/68) a Közép-Kelet Európában jellemző B.33/34-es alcsoportba (68%, 47/69), vagy annak leszármazott csoportjaiba tartozott.

Következtetés: A hazai *F. tularensis* ssp. *holarctica* törzsek a régióra jellemző filogenetikai főcsoportba (B.13) tartoznak. A főcsoport további felbontása alapján a törzsek közötti rokonsági viszonyok szorosak, és nem állnak összefüggésben a törzsek izolálási idejével, gazdafajával, az általuk okozott elváltozásokkal, vagy a törzsek földrajzi eredetével.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat a Lendület pályázat (LP2012-22) támogatta.

HAZAI *BACILLUS ANTHRACIS* TÖRZSEK GENETIKAI JELLEMZÉSE

Pásztor Alexandra¹, Kreizinger Zsuzsa¹, Dán Ádám², Makrai László³, Rónai Zsuzsanna², Dawn Birdsell⁴, Talima Pearson⁴, Sulyok Kinga Mária¹, Jánosi Szilárd², Fodor László³, Paul Keim⁴, Gyuranecz Miklós¹

Bevezetés: A *Bacillus anthracis* spóraképző Gram-pozitív baktérium, a lépfene kórokozója. Az ellenálló spórák a talajban évtizedekig képesek fertőzőképes állapotban fennmaradni. A *B. anthracis* genetikailag meglehetősen homogén szervezet, ami nehézségeket okoz a molekuláris evolúciós vizsgálatok során. Lépfenes esetek Magyarországon sporadikusan fordulnak elő.

Cél: A vizsgálatunk célja Magyarországon izolált *B. anthracis* törzsek genotipizálása volt canonical single nucleotide polymorphism (canSNP) meghatározásával és az izolátumok elhelyezése egy globális törzsfán.

Módszer: A genotipizálás során 1933 és 2014 között, Magyarország különböző területeiről gyűjtött, 45 *B. anthracis* törzset vizsgáltunk. A törzsek filogenetikai csoportokba történő besorolásához 15 canSNP meghatározására alkalmas melt mismatch amplification mutation assay-ek (Melt-MAMA) rendszert használtunk.

Eredmény: A canSNP analízis eredményeként 5 genotípust különböztettünk meg a magyarországi törzsek között. Három izolátum a „B” főcsoport B.Br.CNEVA elágazásába tartozott. A másik 42 izolátum az „A” főcsoport transz-eurázsiai (TEA) elágazásán található, azon belül további 4 szubkládba különültek el: A.Br.008/09 (n=7), TEA7 (n=1), TEA04/08 (n=10), TEA03 (n=24). 17 törzs esetén ismerjük az izolálás helyét, ezek a TEA04/08 és a TEA03 csoportokba tartoznak. A TEA04/08 szubkládba tartozó izolátumok Jász-Nagykun-Szolnok megyéből (n=5) és a ma már Románia területén található Tasnádról (n=1) származnak. A TEA03 csoportba tartozó törzsek származási helyei elszórtan találhatók meg az ország területén (Nógrád, Pest, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Bács-Kiskun, Fejér és Zala megyékben) (n=11).

Következtetés: A transz-eurázsiai csoport, amelybe a legtöbb magyarországi törzs (93%) tartozik, jellemző Kelet- és Közép-Európában. Bár ezen a csoporton belül találunk genetikai változatosságot, további genotipizáló rendszerekre lenne szükség az evolúciós kapcsolatok tágabb értelmezéséhez. Tervezzük reprezentatív számú törzs teljes genom szekvenálását, amely lehetőséget adhat további SNP-k feltérképezésére. A „B” főcsoport ritka, és ebből a térségből nem áll rendelkezésre teljes genomszekvencia ebből a genotípusból, így mindenképpen értékes információt nyújthat ezen izolátumok teljes genomszekvenciája. Az idei esetek vonatkozásában a vizsgálatból megállapítható, hogy a 2014 tavaszán a debreceni állatkertben előforduló és 2014. júliusi tiszafüredi esetek nem állnak egymással összefüggésben, az innen származó minták eltérő genotípusba tartoznak.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat a Lendület pályázat (LP2012-22) támogatta.

NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság¹
Somogy megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági
és Állategészségügyi Igazgatóság²
MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet³
NÉBIH Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóság⁴

Bakteriológia

MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. *PARATUBERCULOSIS* TÖRZSEK HAZAI ELTERJEDTSÉGE ÉS MIRU-VNTR ELEMZÉSE

Rónai Zsuzsanna¹, Csivincsik Ágnes², Gyuranecz Miklós³, Kreizinger Zsuzsa³, Szőgyényi Zsuzsanna⁴, Dán Ádám¹, Jánosi Szilárd¹

Bevezetés: A paratuberkulózis a kérődző állatok idült bélgyulladásban megnyilvánuló, csillapíthatatlan hasmenéssel, fokozatos lesoványodással járó betegsége. Habár a betegség hazai előfordulását az 1980-as években Körmeny és munkatársai behatóan tanulmányozták, az elmúlt években alig néhány közlemény látott napvilágot a magyarországi helyzetet illetően.

Cél: Vizsgálataink célja az volt, hogy az elmúlt években diagnosztizált paratuberkulózis esetek alapján képet adjunk a betegség hazai előfordulásáról és az izolált törzsek elemzésével megismerjük genetikai változatosságukat.

Módszer: Az izolált törzseket az alfajra specifikus IS900 inzerációs elem jelenlétével azonosítottuk, elvégeztük a különböző altípusok meghatározását, majd "Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats" (MIRU-VNTR) elemzését. Mindemellett adatokat gyűjtöttünk a fertőzött szarvasmarhák koráról, fajtájáról, neméről, rokonsági kapcsolataikról és tartási helyeikről.

Eredmény: 569 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) törzset izoláltunk az elmúlt 8 év alatt 9 különféle állatfajból. Magyarországon elsőként izoláltunk MAP törzseket vaddisznóból, gímszarvasból, rókából, sertésből és bivalyból. Az izolált törzsek 15 különböző genotípusba tartoztak. A különböző genotípusok függetlenek voltak az állatok korától és nemétől, de feltételezésünk szerint összefüggésben lehetnek fajtájukkal, hasznosítási irányukkal.

Következtetés: Habár a legnagyobb szarvasmarha állatlétszámmal Hajdú-Bihar, Bács-Kiskun és Békés megyékben találoztunk, a vizsgált mintákból a legnagyobb arányban Komárom-Esztergom, Zala és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben izoláltunk MAP törzseket. A 15 különböző genotípusból 2-be tartozott a törzsek több mint 80%-a. Kimutattuk a MAP törzsek átvitelét különböző állatfajok, állományok és egyedek között. A vadállomány fertőzés fenntartó szerepe itt is kihangsúlyozandó, nem beszélve a szabad tartású szarvasmarha állományok számára jelentett fertőzés közvetítő kockázatról.

Köszönetnyilvánítás: A szerzők köszönetet mondanak a NÉBIH-ÁDI minden dolgozójának, akik segítették a munka megvalósítását. A vizsgálatok az FP7-KBBE-2007-212414 TB-STEP pályázat társfinanszírozásával valósultak meg, Gyuranecz Miklóst és Kreizinger Zsuzsát pedig a Lendület (LP2012-22) program támogatta.

BRUCELLA MICROTI ELSŐ MAGYARORSZÁGI IZOLÁLÁSA

Rónai Zsuzsanna¹, Kreizinger Zsuzsa², Dán Ádám¹, Bányai Krisztián², Szeredi Levente¹, Jánosi Szilárd¹, Gyuranecz Miklós²

Bevezetés: A *Brucella* genus az elmúlt években több új taggal bővült (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. inopinata*), melyek különböző állatokban okoznak megbetegedést. A *B. microti* 2007-ben mutatták ki először elhullott mezei pockokból (*Microtus arvalis*) Csehországban, azóta pedig alig néhány további esetben izolálták talajból és rókából Dél-Morvaországban és Alsó-Ausztriában.

Cél: Vizsgálataink célja az volt, hogy a 2014 őszén egy Rajka mellett elejtett vaddisznó (*Sus scrofa*) áll alatti nyirokcsomójából izolált *B. microti* törzs morfológiai, biokémiai és genetikai elemzését elvégezve összehasonlíthassuk saját izolátumunkat a korábbi törzsekkel.

Módszer: Az izolált törzset *B. microti* specifikus primerpárt tartalmazó módosított Bruce-Ladder, és Suis-Ladder PCR-ekkel azonosítottuk, majd klasszikus biokémiai és növekedési próbák mellett API20NE lemezen is megvizsgáltuk. A genetikai elemzés során 16 lókuszon alapuló multi-locus variable-number tandem-repeat analízist (MLVA-16) végeztünk valamint megszekvenáltuk (200 bp-os single read, Ion Torrent) a kitenyészett törzs teljes genomját. Továbbá a vaddisznó áll alatti nyirokcsomó mintán szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk.

Eredmény: Az izolált törzs Gram negatív, Köster pozitív apró coccoid pálca volt. Biokémiai reakcióit tekintve oxidáz és ureáz pozitívnak bizonyult, kén-hidrogént nem termelt, M és A savóval agglutinált, azonban R valamint *B. ovis* és *B. canis* ellen termelt savókkal nem reagált, bázikus fukszin és thionin tartalmú táptalajokon növekedett. API20NE profilja az *Ochrobactrum anthropi*-hoz hasonlított. A hazai törzs és a génbankban elérhető cseh törzs (CP001578, CP001579) genom szekvenciája (3,34 Mbp) között csupán 30 nukleotid különbség volt. A hazai törzs MLVA profilja csak a variábilis markerekben különbözött az MLVA bankban fellelhető 12 *B. microti* törzstől. A vaddisznó nyirokcsomóján elvégzett szövettani vizsgálat érdemleges elváltozást nem mutatott ki, az immunhisztokémiai próbák *B. abortus*, *B. suis* és *B. canis* savókkal egyaránt negatívnak bizonyultak.

Következtetés: Magyarországon először és vaddisznóból elsőként sikerült kimutatni a *B. microti*-t 2014 őszén. A vaddisznó a törzset nagy valószínűséggel a környezetből vette fel; esetleg közvetlenül a talajból, vagy egy rágcsálót fogyasztott el. A vaddisznóban kórtani elváltozás nem alakult ki, csupán hordozóként viselkedett. A hazai *B. microti* törzs nagyfokú genetikai rokonságát a korábbi *B. microti* izolátumokkal a közeli földrajzi eredet és a *Brucella* fajokra jellemző kismértékű genetikai változékonyság is magyarázza.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat részben a Lendület (LP-2012-22) program támogatta.

MAGYARORSZÁGON IZOLÁLT NEM BESOROLHATÓ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* TÖRZSEK JELLEMZÉSE

Sárközi Rita¹, Makrai László¹, Birgermajer Anetta² és Fodor László¹

Az *Actinobacillus pleuropneumoniae* az egész világon, így hazánkban is megtalálható, sertések vérzéses-elhalásos tüdő- és fibrines mellhártyagyulladását okozó baktérium. Főként a 12-16 hetes sertésekben okoz túlheveny, heveny megbetegedést, de súlyos formában jelentkezhet a hizlalás végén is, ezáltal nagy gazdasági kárt okozhat. A betegség megjelenését különféle hajlamosító tényezők, elsősorban a nagyüzemi, zárt tartástechnológiából adódó stressz és zsúfoltság, valamint a társfertőzések segítik elő. A betegség túlheveny, heveny és idült formában jelentkezhet, diagnosztizálásában segítséget nyújt a jellemző klinikai és kórbonctani kép kialakulása.

A kórokozó a Pasteurellaceae családba tartozó igényes, Gram-negatív baktérium. Két biotípusát és azon belül 15 szerotípusát különböztetjük meg, melyek között gyakoriak a keresztreakciók. Az 1-es biotípusba tartozó törzsek növekedésükhöz NAD-ot igényelnek, míg a 2-es biotípusba tartozók NAD nélkül is tenyészthetők.

Munkánk során a tanszék törzsgyűjteményéből származó kettő, korábban be nem sorolt és heveny elváltozásokat mutató sertés tüdőkből frissen izolált három *A. pleuropneumoniae* törzset szerotipizáltunk klasszikus- és molekuláris biológiai módszerrel. A törzsek öt állományból, négy megyéből származtak és mindegyiket a tenyésztési és biokémiai tulajdonságaik alapján a NAD-dependens, 1-es biotípusba soroltuk. Az *A. pleuropneumoniae* fajba tartozást 16S riboszómális RNS PCR módszerrel és BIOLOG vizsgálattal is igazoltuk. A szerotipizálást passzív hemagglutinációval, majd toxingének kimutatásán alapuló PCR próbával is elvégeztük, hogy a kapott eredményeket összehasonlíthassuk.

A típustörzsekkel szemben termeltetett savókkal végzett passzív hemagglutinációs próba során egyik törzset sem sikerült szerotipizálnunk. Ezek, az elfogadott szerotípusok egyikébe sem besorolható törzsek csupán az ellenük frissen termeltetett hiperimmun savókkal adtak pozitív reakciót. A toxingénekre alapozott PCR próba alapján a törzsek 5a/5b szerotípusba tartoznak. Ez a két szerotípus a toxinprofil alapján nem választható szét, ugyanis ezzel a módszerrel a keresztreakciók előfordulása miatt a szerotípusoknak csak négy csoportját tudjuk elkülöníteni.

Vizsgálataink eredménye alapján egy új, nem besorolható szerotípust sikerült izolálnunk.

A vizsgálatokat az OTKA 84220 és az NKB 15906 pályázat támogatásával végeztük.

MYCOPLASMA BOVIS TÖRZSEK FLUOROQUINOLON ÉRZÉKENYSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Sulyok Kinga Mária¹, Rónai Zsuzsanna², Nagy Sára¹, Makrai László³, Kecskemétiné Turcsányi Ibolya², Kovács Péter⁴, Jánosi Szilárd², Gyuranecz Miklós¹

Bevezetés: A *Mycoplasma bovis* izolátumok antibiotikum érzékenységének minél gyorsabb meghatározása elősegíti a megfelelő terápiás szer kiválasztását, így növelve a kezelés hatékonyságát. *M. bovis* törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása a klasszikus mikroleves hígítós módszerekkel azonban igen pénz- és időigényes feladat, ezért a diagnosztikai laboratóriumokban ritkán alkalmazzák.

Cél: A vizsgálat célja a *M. bovis* fluoroquinolon rezisztenciával összefüggő mutációinak azonosítása, illetve ezen pontmutációk gyors detektálására – és így a rezisztens valamint érzékeny izolátumok elkülönítésére – alkalmas PCR rendszerek kifejlesztése volt.

Módszer: Vizsgálatainkba 35, Magyarország különböző területeiről izolált *M. bovis* törzset vontunk be. A törzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékeit mikroleves hígítós módszer segítségével határoztuk meg három különböző fluoroquinolonnal szemben (danofloxacin, enrofloxacin és marbofloxacin). A fluoroquinolon rezisztenciával összefüggő mutációk azonosítására a quinolon rezisztenciát meghatározó régió (QRDR) négy génjének (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) szekvenciáját vizsgáltuk. A rezisztenciával összefüggő pontmutációk detektálására SYBR Green típusú real-time PCR alapú, illetve agaróz gél alapú MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) rendszereket fejlesztettünk ki. Teszteltük a rendszerek érzékenységét és specifitását (különböző szarvasmarhában előforduló *Mycoplasma* fajok: *M. agalactiae*, *M. alvi*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. canadense* és *M. verecundum* bevonásával), valamint vizsgáltuk hatékonyságukat közvetlenül klinikai mintákon is (tüdő, orrtampon).

Eredmény: A mikroleves hígítós módszer eredményeként három törzsnél kaptunk magas MIC értéket (>10 µg/ml) a vizsgált fluoroquinolonokkal szemben. A DNS giráz B alegységét kódoló *gyrB*, illetve a topoizomeráz IV C alegységét kódoló *parC* génekben egy-egy aminosav szinten is megnyilvánuló pontmutációt azonosítottunk ezeknél a törzseknél. Ezen mutációkra tervezett MAMA rendszerek eredményei egybeváltak a hagyományos levehígítós módszernél kapott eredményekkel. A real-time PCR alapú rendszer érzékenysége 10¹ CCU-nak, míg az agaróz gél alapúé 10² CCU-nak bizonyult. Egyik rendszer sem reagált az egyéb vizsgált szarvasmarha eredetű *Mycoplasma* fajok örökítőanyagával.

Következtetés: Az általunk fejlesztett MAMA rendszerek megbízhatóak, gyorsak, költséghatékonyak, specifikusak és relatíve érzékenyek. A módszer lehetővé teszi, hogy a baktérium időigényes és költséges izolálása nélkül elkülönítsük a rezisztens és az érzékeny *M. bovis* törzseket, így növelve a gyógykezelés hatékonyságát.

Köszönetnyilvánítás: A vizsgálatokat a Lendület pályázat (LP2012-22) támogatta.

FLAVOBACTERIUM OKOZTA MEGBETEGEDÉS HAZAI HALFAJOKBAN

Varga Zsuzsanna¹, Selleyi Boglárka¹, Paulus Petra², Papp Melitta², Molnár Kálmán¹, Székely Csaba¹

A halak fekélyes bőrgyulladásos kórképét mintegy 100 éve írták le (Davis, H. S. 1922). A kórokozó baktérium taxonomiai státusa többször változott, végül 1996-ban a 16S rRNS gén szekvenciája alapján a *Flavobacterium* nemzetségbe sorolták és a *F. columnare* nevet kapta (Bernardet és mtsai). A betegség elsődlegesen a meleg égövi országokban tenyésztett halakban okoz komoly elhullással járó gazdasági veszteséget, de a klímaváltozással járó felmelegedés és az intenzív haltenyésztés bevezetése folytán a mérsékelt égövi területeken is megjelent. A kórképet Csaba és munkatársai 1977-ben Magyarországon is észlelték.

A vizekből és halakból, de a talajból is kimutatható Gram negatív, pálca alakú baktérium kitenyésztéséhez speciális tápanyagszegény, de nagy nedvességtartalmú szelektív táptalajra van szükség. Vizsgálataink során az izoláláshoz neomycinnel és polymyxin B-vel kiegészített Cytophaga agart használtunk.

Mintáink tógazdasági és természetes vízből származó halak (ponty, compó, garda, dévérkeszeg, karika keszeg, ezüstkárász, csapósüger, fogassüllő, kősüllő és szibériai tok) fekélyes elváltozást mutató bőrből, szemérből, kopoltyújáról, belső szerveiből (lép, vese, máj), ill. az egészséges egyedek kopoltyújáról származtak. A „gyanús” telepeket a Bader és munkatársai által a 16S rRNS génre tervezett (2003) *F. columnare* fajspecifikus PCR eljárással azonosítottuk; 25 izolátum mutatott pozitív reakciót.

A genomtípus meghatározása során Darwish és munkatársai ugyancsak a 16S rRNS génre tervezett PCR reakció termékét HaeIII és RsaI restriktív enzimmal hasítva 4 genomtípust (2005) különítették el. Esetünkben mind a kapott fragmentnagyság, mind a hasítási kép eltért a szakirodalom eredményeitől. 20 minta azonos méretű fragmentet adott és RFLP-mintázata is egyezett, további 3 ill. 1 törzs egyik restriktív enzimmal kapott hasítási mintázata különbözött az előbbiektől, míg 1 törzs mindkét restriktív enzimmal eltérő mintázatot mutatott.

Az eltérő genomtípusoknak megfelelően kiválogatott törzsek 16S rRNS génjének mintegy 1550 bp nagyságú szakaszát megszekvenálva megerősítést nyert, hogy nem *F. columnare*-t, hanem 23 esetben egy közeli fajt, a 2004-ben leírt *F. johnsoniae*-t izoláltunk. Mintáink 97-99%-os hasonlóságot mutattak a faj ismert szekvenciáival. A fennmaradó 2 izolátum egyike *Chryseobacterium piscium* volt, míg a másik egy név nélküli *Chryseobacterium* fajjal bizonyult azonosnak.

Az izolált törzsek multirezisztenciát mutattak a vizsgált antibiotikumokkal szemben annak ellenére, hogy az izolátumok többsége antimikrobiális szerrel nem kezelt állományból vagy természetes vízből származott.

Támogatás: KTIA-AIK-12-1-2013-0017. sz. és OTKA K 100132. sz. szerződés.

**RHODOCOCCUS EQUI OKOZTA TÜDŐGYULLADÁS MACSKÁBAN;
ESETISMERTETÉS**

Szeredi Levente, Rónai Zsuzsa, Jánosi Szilárd, Bálint Ádám

Bevezetés: A *Rhodococcus equi* világszerte előforduló talajlakó baktérium, amely elsősorban lovakat betegít meg. A fertőzést macskákban is megfigyelték, ahol leggyakrabban a végtagokon és a nyakon kialakuló nem gyógyuló sebek és tályogok formájában fordul elő. A fertőzés a belső szervekre macskában csak ritkán terjed át.

Cél: Hazánkban *R. equi* okozta megbetegedést lovon kívül más állatfajban eddig még nem írtak le, ezért indokoltnak tűnt, hogy egy macskában megállapított fertőzést részletesebb vizsgálatnak vessünk alá.

Módszer: Egy 3,5 hónapos korban végleges elaltatásra került nőstény, birman fajtájú macska rutin kórbonctani, kórszövettani és bakteriológiai vizsgálatával *R. equi* okozta megbetegedést állapítottunk meg. A virulens törzsekre jellemző VapA antigén kimutatása céljából immunhisztokémiai, az esetlegesen előforduló macska leukosis és a macska-AIDS kimutatása érdekében pedig PCR vizsgálatot is végeztünk.

Eredmény: Az állat néhány nappal a vásárlás után súlyos nehezített légzés tüneteit mutatva megbetegedett. Az eladó tenyészetében abban az időszakban megbetegedések nem fordultak elő. A kórbonctani vizsgálattal a mediastinumban és a jobb hátulsó tüdőlebenyben egy-egy, kb. 2 cm átmérőjű, fallal nem rendelkező, gennyel telt üreget, a hörgőkörüli nyirokcsomók és a máj megnagyobbodását és az utóbbi állományában elszórtan elmosódott határú, 1-2 mm átmérőjű szürkésfehér gócot figyeltünk meg. A kórszövettani vizsgálattal a tályogokban számos neutrophil granulocytat és macrophag sejtet, a lépben és a tüdőben pyogranulomatosus gyulladást, a májban multifokális elhalásos gyulladást valamint heveny centrolobularis elfajulást, végül a vesében friss keletű vérzéseket láttunk. A tályogokban továbbá a lépben, a májban valamint a tüdőben a gyulladás területén Brown-Brenn festéssel a macrophagokban Gram pozitív coccusokat találtunk. A Ziehl-Neelsen festéssel sav- és alkoholálló baktériumokat nem figyeltünk meg. A tályogból készített kenetekben a macrophagok cytoplasmájában nagy számban Stamp festéssel pirosra festődő, Gram pozitív coccusokat figyeltünk meg. A lépből és a májból dús, közel szintenyészetben, kissé nyálkás, szürkésfehér színű telepeket tenyésztettünk ki, amelyek Drigalsky talajon nem fejlődtek. A biokémiai próbák alapján a baktériumot *R. equi*nek határoztuk meg. A VapA antigén és a macska leukosis valamint a macska-AIDS kimutatását célzó vizsgálatok negatív eredményre vezettek.

Következtetés: Első alkalommal kerül leírásra *R. equi* okozta megbetegedés egy hazai macskában. A baktériumtörzs az immunhisztokémiai vizsgálat alapján nem a virulens törzsekhez tartozott. Az állat fiatal korán túl más megbetegedésre hajlamosító tényezőt nem sikerült kimutatni.