

MTA ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI BIZOTTSÁGA  
ÁTE ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK**  
(2024. JANUÁR 29-31.)

**VIROLÓGIA**  
**IMMUNOLÓGIA**  
**BAKTERIOLÓGIA**

2023. évi 50. füzet

## ELŐSZÓ

### **Kedves Kollegánók és Kollegák!**

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és az Állatorvostudományi Egyetem Állatorvostudományi Doktori Iskolája 2024. január 29. és 31-én között tartja a legújabb kutatási eredményeink bemutatására szolgáló **Akadémiai Beszámolók** ülésorozatot, amelyre idén 50. alkalommal kerül sor az Állatorvostudományi Egyetemen.

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 találkozására.

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

Az Akadémiai Beszámolókat több év után ismét személyes részvétel formájában tartjuk az Állatorvostudományi Egyetem Tolnay Sándor termében. Az egyes szekcióülések közvetlenül követik egymást. Az előadások időtartama legfeljebb 10 perc, további 5 percet számoltunk a kérdésekre és hozzászólásokra. 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.

Kérjük az egyes szekcióbizottságok elnökeit, titkárait és tagjait, hogy az akadémiai beszámolón aktívan vegyenek részt, kérdéseikkel, hozzászólásaikkal biztosítva a rendezvény magas színvonalát.

A szekciók titkárait arra is kérjük, hogy a szekcióülésről február végéig készítsenek és juttassanak el az Állatorvos-tudományi Bizottság titkárához (fodor.laszlo@univet.hu) egy-egy rövid, közérthető formában megírt, a szekcióelnökökkel egyeztetett tájékoztatót a Magyar Állatorvosok Lapjában való közlés céljából, amely tartalmazza az előadások legfontosabb megállapításait.

Kérjük az intézetek vezetőit, hogy az elektronikus úton megküldött anyagot szíveskedjenek munkatársaik és érdeklődő nyugdíjasaik számára is továbbítani.

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

Szeretettel várunk minden érdeklődőt, az előadóknak pedig sikeres előadást kívánunk.

Solti László  
MTA ÁTB elnöke

Sótonyi Péter  
Rektor, TDK elnök

Bartha Tibor  
ÁODI elnöke

Fodor László  
MTA ÁTB titkára

**MTA Állatorvos-tudományi Bizottság és az ÁTE DI akadémiai beszámolóinak PROGRAMJA és szekcióbizottságai**  
2024. január 29-31.

<b>A szekció megnevezése</b>	<b>A szekcióülés ideje</b>	<b>A szekcióülés helye</b>	<b>Társelnökök</b>	<b>Titkár</b>	<b>Bizottsági tagok</b>
Élettan és biokémia Kórtan Gyógyszertan és toxikológia Morfológia	2024. január 29. hétfő 8.15-15.00	Tolnay Sándor terem	Bartha Tibor Jerzsele Ákos Sótonyi Péter	Farkas Orsolya Mátis Gábor	Csikó György, Halasy Katalin, Rác Bence, Zsarnovszky Attila
Élelmiszerhigiéna Állategészségügyi Igazgatás	2024. január 31. szerda 8.15-12.30	Tolnay Sándor terem	Ózsvári László Nagy Attila Süth Miklós	Darnay Livia	Józwiak Ákos, Kovács Sándor, Lehel József, Szita Géza
Viroológia  Immunológia  Bakteriológia	2024. január 30. kedd 8.15-15.00	Tolnay Sándor terem	Dénes Béla Harrach Balázs  Fodor László Magyar Tibor	Kaján Győző  Sváb Domonkos	Benkő Mária, Dán Ádám, Péntes Zoltán, Soós Tibor, Zádori Zoltán  Bernáth Sándor, Jánosi Szilárd, Gyuranecz Miklós, Makrai László, Szmolka Ama, Tenk Miklós
Parazitológia Állattan Halkórtan	2024. január 31. szerda 13.00-15.45	Tolnay Sándor terem	Baska Ferenc Farkas Róbert	Eszterbauer Edit Hornung Erzsébet Sréter Tamás	Békési László, Csaba György Hornok Sándor, Kassai Tibor Molnár Kálmán, Majoros Gábor, Varga István
Klinikumok	2024. január 30. kedd 15.30-16.30	Tolnay Sándor terem	Bakos Zoltán Bodó Gábor Cseh Sándor Németh Tibor Manczur Ferenc	Becker Zsolt Szelényi Zoltán	Biksi Imre, Gál János, Sterczler Ágnes, Szenci Ottó, Vajdovich Péter
Állathigiéna Állattenyésztés Genetika Takarmányozástan	2024.január 29. hétfő 15.30-17.30	Tolnay Sándor terem	Könyves László Szabó József	Bersényi András	Brydl Endre, Cseh Sándor, Fekete Sándor, Gáspárdy András, Jakab László, Rafai Pál, Zöldág László

# Tartalomjegyzék

## Viroológia

1. TEKNŐSÖK HERPESZ- ÉS ADENOVÍRUSAINAK KIMUTATÁSA ÉS GENETIKAI ÖSSZEHAJONLÍTÓ VIZSGÁLATA  
Berta Péter, Harrach Balázs, Papp Tibor
2. MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ KUTYACIRCOVÍRUS-TÖRZSEK GENETIKAI JELLEMZÉSE  
Császár Dorottya, Balka Gyula
3. AZ ÁTOLTHATÓ (VÍRUSOS) MIRIGYESGYOMOR-GYULLADÁS VIZSGÁLATA HAZAI MINTÁKON  
Dobra Péter Ferenc, Mándoki Míra, Gál János
4. FLAVIVÍRUSOK AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA TELEPESEN KÖLTŐ RAGADOZÓ MADÁR KOLONIÁKBAN KELET-MAGYARORSZÁGON  
Erdélyi Károly, Solt Szabolcs, Soltész Zoltán, Horváth Enikő, Horváth Éva, Marosi András, Forgách Petra
5. ISMERETLEN FUNKCIÓJÚ ASPV FEHÉRJÉK SZEROLÓGIAI ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE  
Görtl Eszter, Olasz Ferenc, Mészáros István, Tamás Vivien, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
6. ÚJONNAN LEÍRT SERTÉSPARVOVÍRUSOK (PPV2–PPV7) ELTERJEDTSÉGÉNEK FELMÉRÉSE ÉS GENETIKAI JELLEMZÉSE MAGYARORSZÁGON  
Igriczi Barbara, Dénes Lilla, Balka Gyula
7. AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS *IN VITRO* REKOMBINÁCIÓS RÁTÁJÁNAK TANULMÁNYOZÁSA SERTÉS ALVEOLÁRIS MAKROFÁGOKBAN  
Mészáros István, Olasz Ferenc, Tamás Vivien, Görtl Eszter, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
8. INFLUENZA A VÍRUSTÖRZSEK *IN VITRO* ADAPTÁLÁSA MADÁR ÉS EMLŐS SEJTVONALHOZ  
Oláh Barbara, Görtl Eszter, Balázs Liliána, Gellért Ákos, Zádori Zoltán, Mészáros István
9. EMLŐS ÉS MADÁRSEJTEKEN IZOLÁLT INFLUENZA A VÍRUS TÖRZSEK QUASISPECIESÉNEK VÁLTOZÁSAI ÉS A NEG8 FEHÉRJE VIZSGÁLATA  
Oláh Barbara, Görtl Eszter, Balázs Liliána, Zádori Zoltán, Mészáros István
10. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS A224L GÉN KORAI PROMÓTERÉNEK STRUKTURÁLIS VIZSGÁLATA  
Olasz Ferenc, Trembácz Nikoletta, Mészáros István, Tamás Vivien, Görtl Eszter, Magyar Tibor, Zádori Zoltán

11. INFLUENZA HEMAGGLUTININ ANTIGÉNEKET KIFEJEZŐ *ESCHERICHIA COLI* VAKCINAJELÖLTEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA  
Pintér Krisztina, Pollák Boglárka, Olasz Ferenc, Mészáros István, Tamás Vivien, Göttl Eszter, Bálint Ádám, Szmolka Annamária, Erdélyi Károly, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
12. MAGYARORSZÁGI PATKÁNYPOPULÁCIÓK SZŰRÉSE POLIÓMAVÍRUSOK JELENLÉTÉRE  
Surján András, Vidovszky Márton, Egyed László
13. AZ AFRIKAI SERTÉS PESTIS VÍRUS STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA COS7 SEJTEKEN  
Tamás Vivien, Mészáros István, Olasz Ferenc, Göttl Eszter, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
14. AZ AFRIKAI SERTÉS PESTIS VÍRUS HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓS KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA  
Tamás Vivien, Mészáros István, Olasz Ferenc, Göttl Eszter, Magyar Tibor, Zádori Zoltán

### **Immunológia**

15. ÖNREPLIKÁLÓDÓ DNS- ÉS RNS- VAKCINÁK ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA PONTYOK TAVASZI VIRÉMIÁJA (SVCV) ELLEN  
Abonyi Flóra, Eszterbauer Edit, Baska Ferenc, Hardy Tímea, Doszpoly Andor
16. KÜLÖNBÖZŐ RIG-I AGONISTÁK DAGANATELLENES HATÁSA VESE ADENOKARCINOMA EGÉRMODELLEN  
Gulyás Dominik, Jankovics István, Dénes Béla, Földi Dóra, Rhiannon Rodgers, Katie Commins, Andócs Gábor, Lőrincz Márta

### **Bakteriológia**

17. A CSÖKKENT ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉG MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA *MYCOPLASMA IOWAE* ESETÉBEN  
Buni Dominika, Wehmann Enikő, Földi Dorottya, Bányai Krisztián, Bali Krisztina, Janet Bradbury, Marco Bottinelli, Salvatore Catania, Inna Lysnyansky, Gyuranecz Miklós, Kreizinger Zsuzsa
18. INAKTIVÁLT *MYCOPLASMA HYORHINIS* VAKCINA FEJLESZTÉS  
Földi Dorottya, Nagy Eszter Zsófia, Beleczi Nikolett, Tóth Lilla, Szeredi Levente, Tenk Miklós, Kollár Anna, Gyuranecz Mikós
19. *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS* TÖRZSEK VIZSGÁLATA GENOMOT CÉLZÓ ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLATTAL (GWAS)  
Kovács Áron Botond, Wehmann Enikő, Bekő Katinka, Gróznér Dénes, Bali Krisztina, Hrivnák Veronika, Chris J. Morrow, Bányai Krisztián, Gyuranecz Miklós
20. ÚJ, ÉLŐ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* VAKCINAJELÖLT TÖRZS VIZSGÁLATA

Kreizinger Zsuzsa, Nagy Dorottya Sára, Buni Dominika, Gróznér Dénes, Gyuris Éva, Thuma Ákos, Makrai László, Tenk Miklós, Wehmann Enikő, Bányai Krisztián, Marton Szilvia, Költő Karola, Sulyok Kinga, Gyuranecz Miklós

21. *MYCOPLASMA HYOPHARYNGIS* IZOLÁLÁSA ÍZÜLETGYULLADÁSBAN SZENVEDŐ SERTÉSEKBŐL, ILLETVE REAL-TIME PCR RENDSZER FEJLESZTÉSE A KÓROKOZÓ KIMUTATÁSÁRA  
Nagy Eszter Zsófia, Földi Dorottya, Wehmann Enikő, Tóth Gergely, Makrai László, Gombos László, Kreizinger Zsuzsa, Gyuranecz Miklós
22. *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS* EFFLUX PUMPA MECHANIZMUSÁNAK FENO- ÉS GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA  
Nagy Eszter Zsófia, Kovács Áron Botond, Wehmann Enikő, Bekő Katinka, Földi Dorottya, Bányai Krisztián, Kreizinger Zsuzsa, Gyuranecz Miklós
23. ÚJ, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI RENDSZEREK FEJLESZTÉSE VÍZIBAROMFI MYCOPLASMÁK GYORS ÉS ÉRZÉKENY KIMUTATÁSÁRA  
Nemesházi Edina, Wehmann Enikő, Gróznér Dénes, Nagy Dorottya Sára, Kovács Áron Botond, Földi Dorottya, Kreizinger Zsuzsa, Gyuranecz Miklós
24. KÜLÖNBÖZŐ ÁLLATFAJOKBÓL IZOLÁLT *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK FENOTÍPUSOS ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA  
Pintér Krisztina, Pollák Boglárka Dóra, Makrai László, Magyar Tibor
25. *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK GENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE  
Pintér Krisztina, Pollák Boglárka Dóra, Wehmann Enikő, Makrai László, Solymosi Norbert, Magyar Tibor
26. HAZAI *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE ÉS ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGÜK VIZSGÁLATA  
Pollák Boglárka Dóra, Pintér Krisztina, Wehmann Enikő, Magyar Tibor
27. INTERFERON- $\gamma$  TERMELÉS MEGHATÁROZÁSA EGÉR LÉPSEJTEKBŐL  
Tóth Lilla, Földi Dorottya, Gyuranecz Miklós

## TEKNŐSÖK HERPEZ- ÉS ADENOVÍRUSAINAK KIMUTATÁSA ÉS GENETIKAI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Berta Péter\*, Harrach Balázs, Papp Tibor

A teknősök vírusainak vizsgálata még mindig marginális területnek számít. A védett fajokat is gyakran tizedelő herpeszvírusok e rend fajainak legfontosabb kórokozói, s mellettük adenovírusok is számos kórképben felbukkantak.

Kutatásunk célja volt, hogy kereskedésekben elhullott, 17 fajt képviselő, 33 teknős egyedből herpesz- és adenovírusokat mutassunk ki, s ezek további genetikai jellemzését elvégezzük, utóbbiak esetében törekedve a teljes-genom meghatározás előkészítésére. A PCR-es szűrés mindkét víruscsalád esetén a DNS-polimeráz gén egy-egy szakaszára irányult; a megfelelő méretű PCR termékeket megszekvenáltuk.

Herpeszvírusra pozitívnak bizonyult egy kínai háromlű teknős (*Mauremys reevesii*), egy kirgiz teknős (*Testudo horsfieldii*), egy görög teknős (*Testudo hermanni*), egy csíkos iszapteknős (*Kinosternon baurii*), egy barna sisakteknős (*Pelusios castaneus*) és egy mór teknős (*Testudo graeca*). A mór teknősben talált vírus a testudinid alphaherpeszvírus 3 szekvenciával mutat 97%-os nukleotid egyezést, míg a többi egyedből származó szekvenciák a testudinid alphaherpeszvírus 1-gyel voltak 99,5%-ban azonosak. Adenovírus pozitívnak bizonyult két indiai csillagteknős (*Geochelone elegans*), egy leopárdteknős (*Stigmochelys pardalis*) és két kínai háromlű teknős. A *Testadenovirus* nemzetségbe sorolható, két eddig ismeretlen vírustörzset találtunk a fentiekből négy esetben. Egy kínai háromlű teknősben a *Siadenovirus* nemzetségbe sorolt, sulawesi teknősökben korábban leírt vírus volt kimutatható. A testadenovírusok hexon-génjét célzó PCR és ezek termékeinek szekvenálása is sikeres volt. Továbbá sikerült összehasonlító filogenetikai vizsgálattal (tanglegram) megerősítenünk kutatócsoportunk hipotézisét, hogy a *Testadenovirus* nemzetség ismert tagjai (jelenlegi számuk 19) és gazdafajaik (15) párhuzamos evolúciós (koevolúciós) utat jártak be.

Támogatás: OTKA NN140356.

## MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ KUTYACIRCOVÍRUS-TÖRZSEK GENETIKAI JELLEMZÉSE

Császár Dorottya<sup>1,2\*</sup>, Balka Gyula<sup>1,2</sup>

A circovírusok kis méretű, burok nélküli, a környezeti feltételeknek rendkívül ellenálló, szimpla szálú cirkuláris DNS-t tartalmazó vírusok, amelyek a *Circoviridae* családba tartoznak.

A kutyacircovírust először 2012-ben azonosították az Egyesült Államokban. Ezt követően világszerte leírásra került, mind egészséges, mind klinikai tüneteket mutató egyedekből. Amennyiben a fertőződés klinikai tüneteket okoz, úgy a leggyakrabban gyomor-bélrendszeri tünetek jelentkeznek. Ennek ellenére kórtani szerepe a mai napig nem tisztázott teljesen, és gyakran egyéb gyomor-bélrendszeri fertőzést okozó vírussal, főleg kutya-protoparvovírral együttesen kerül kimutatásra. Ez utóbbi befolyásolhatja a parvovírus által okozott megbetegedés kórlefolását, súlyosságát.

A kutyacircovírust kedvtelésből tartott kutyák mellett vadon élő állatokból is kimutatták, leginkább vörös rókából, szürke farkasból, Norvégiához tartozó Svalbard szigetén élő sarki rókából, valamint európai borzából.

Fő célkitűzésünk, hogy felmérjük a vírus hazai jelenlétét, prevalenciáját az Állatorvostudományi Egyetem Műszeres Diagnosztikai Osztályáról beérkező gyomor-bélbiopsziás minták, a Patológia Tanszékre érkező elhullott egyedekből származó szervminták, budapesti és vidéki rendelőkben hasmenéses kutyákból gyűjtött bélsártampon-minták, valamint a Parazitológia Tanszékről származó róka-, aranyasakál- és borzszerminták vizsgálatával.

A beérkezett bélsár-, és szövetmintákból a vírus jelenlétét és mennyiségét kvantitatív real-time PCR-módszerrel állapítanánk meg. A további vizsgálatainkban szövetmintákat RNAscope *in situ* hibridizációs módszer alkalmazásával vizsgáljuk annak érdekében, hogy összefüggést találjunk a kórokozó és a patológiai elváltozások, valamint lehetséges kóroki szerepe között.

Eddigi munkánk során 17 darab, tanszékünkre patológiai-diagnosztikai vizsgálatra beérkező, CPV-pozitív egyedből 4 esetben (24%) sikeresen kimutattuk a vírust. A kapott termékeknek Sanger-módszerrel meghatároztuk a nukleotidsorrendjét és azokat a BLAST-elemzés minden esetben egyértelműen kutyacircovírusként azonosította.

Tudomásunk szerint hazánkban elsőként szolgáltatathatunk adatokat a kutyacircovírus jelenlétéről, prevalenciájáról, a különböző törzsek filogenetikai kapcsolatáról, valamint a kutyacircovírus esetleges kórtani szerepéről.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Balka Gyulának a rengeteg támogatásért és iránymutatásért. Hálás köszönet továbbá Schönhardt Kitti kolléganőmnek, aki rengeteg segítséget nyújt a PCR vizsgálatok elvégzésében, valamint köszönöm a támogatást a családomnak, barátaimnak és a páromnak Dr. Kis István Emilnek. A tervezett munkánk elvégzését támogatja a Nemzeti Labor Projekt.



## AZ ÁTOLTHATÓ (VÍRUSOS) MIRIGYESGYOMOR-GYULLADÁS VIZSGÁLATA HAZAI MINTÁKON

Dobra Péter Ferenc<sup>1\*</sup>, Mándoki Míra<sup>1</sup>, Gál János<sup>2</sup>

Az átoltható (vírusos) mirigyesgyomor-gyulladás (transmissible viral proventriculitis /TVP/) elsősorban a fiatal brojlersirkék betegsége, amit a mirigyesgyomor gyulladása és megnagyobbodása jellemez. A betegséget az 1978-as első, Hollandiában történt leírása óta világszerte egyre több országban azonosítják, vagyis ún. „emerging disease”.

A betegség első leírása óta számos vírus kóroki szerepe felmerült. Többek között fertőző bursitis vírust (IBDV), fertőző bronchitis vírust (IBV), reovírust (ARV) és adenovírust (FAdV) gyanítottak a háttérben. Majd 2011-ben, TVP-s esetekkel összefüggésben felfedeztek egy új birnavírust, amit chicken proventricular necrosis virusnak (CPNV) neveztek el. Több kutató úgy véli, hogy ez a vírus okozza a TVP-t, de még nincs konszenzus a betegség etiológiáját illetően. A betegség hazai előfordulása is ismert, azonban erről tudományos publikáció még nem született, és a CPNV birnavírust sem írták még le itthon.

A jellemző klinikai tünetek a romló takarmányértékesítés, a csökkent napi testsúlygyarapodás, a visszamaradt növekedés (állományszinten szétnövés), valamint az emésztetlen vagy rosszul emésztett takarmány jelenléte a bélsárban. A termelési mutatók romlása mellett a törékennyé váló mirigyesgyomor repedése miatti kobzás is jelentős gazdasági kárt okozhat.

Kutatásunk célja a mirigyesgyomor-gyulladást okozó baromfivírusok hazai elterjedtségének feltérképezése, továbbá filogenetikai elemzések segítségével az itthoni és külföldi törzsek összehasonlítása, valamint a kórkép és a vírusfertőzések közötti korreláció feltárása. Eredményeink birtokában teljesebb képet kaphatunk a vírusok okozta mirigyesgyomor-gyulladásról, ill. alátámaszthatjuk vagy cáfolhatjuk a CPNV szerepét a kórkép kialakulásában.

Vizsgálatainkat magyarországi baromfitelepekről származó mirigyesgyomor mintákon végezzük. Kórszövettani vizsgálattal a minták egy részében TVP-re utaló elváltozásokat azonosítottunk. Emellett (RT-)PCR-vizsgálatokkal számos mintából – Magyarországon elsőként – kimutattuk a CPNV vírust, továbbá egyes mintákból IBV, IBDV, vagy ARV vírusokat mutattunk ki. A CPNV vírust házi tyúk mellett – tudomásunk szerint a világon elsőként – fácánból is kimutattuk.

Az eddigi vizsgálatok folytatása mellett tervezzük a kimutatott vírusok szövetbeli lokalizációjának vizsgálatát immunhisztokémiai és/vagy RNS *in situ* hibridizációs módszerrel, illetve az azonosított vírusváltozatok filogenetikai vizsgálatát és részleges genomszekvenciájuk meghatározását, ami segíthet eredetük, terjedésük és genom-evolúciójuk megismerésében.

Ezúton is szeretnénk köszönetet mondani minden kedves kollégának, akik mintagyűjtéssel segítik a vizsgálatainkat.

## FLAVIVÍRUSOK AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA TELEPESEN KÖLTŐ RAGADOZÓ MADÁR KOLÓNIAKBAN KELET-MAGYARORSZÁGON

Erdélyi Károly<sup>1,5\*</sup>, Solt Szabolcs<sup>2</sup>, Soltész Zoltán<sup>3</sup>, Horváth Enikő<sup>1</sup>, Horváth Éva<sup>4</sup>, Marosi András<sup>5</sup>, Forgách Petra<sup>5</sup>

A nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV) két évtizeddel ezelőtti magyarországi megjelenése és elterjedése jelentette az első lépést az addig egzotikusnak számító zoonotikus flavivírus Közép-Európai megtelepedésében és endemikussá válásában. A WNV 2-es genetikai vonala a Kárpát-medencei elterjedés után 2009-től a Földközi-tengeri régióban okozott járványokat, majd a 2018-as kimagasló járványcsúcs már az észak-nyugati expanzió (Németország, Hollandia) része volt. A madár-szúnyog ciklusban fenntartott WNV járványcsúcsainak kialakulásához vezető környezeti tényezők és ökológiai feltételek csak vázlatosan ismertek, ezért ezek azonosítása és jellemzése fontos feladat a járványvédelem és előrejelzés hatékonyságának növelése érdekében. A víruscirkulációt fenntartó és az időszakos WNV amplifikációhoz hozzájáruló társulások vizsgálata nagy jelentőséggel bír a flavivírusok teljes elterjedési területén.

A munka célja: A flavivírusok szezonális aktivitásának jellemzése a Vásárhelyi-pusztá kékvércse telepeinek madár-társulásaiban, valamint a helyi szúnyog faunában.

Módszerek: A 2022. évi költési szezonban a telepesen, illetve területi szinten költő vörös vércsék (*Falco tinnunculus*), kékvércsék (*Falco vespertinus*) és csókák (*Coloeus monedula*) fiókáiból vérmintát vettünk a gyűrűzést és a morfometriai adatfelvételt követően. A mintavételi helyszíneken júniustól szeptemberig heti rendszerességgel csapdáztunk csípőszúnyogokat BG Sentinel szén-dioxidos csapdákkal. A vérminták sejtes frakciójából és a fajhatározást követően fajonként maximum 20 egyed tartalmazó poolokba rendezett szúnyogokból teljes nukleinsav-kivonást végeztünk. A nukleinsav mintákat WNV és Usutu vírus kimutatás céljából valós idejű multiplex TaqMan RT-PCR módszerrel vizsgáltuk, a savóminták szerológiai vizsgálata pedig Ingezim West Nile Compac ELISA kittel történt.

Eredmények: Júniustól augusztus közepéig a költési szezonban összesen 287 madártól gyűjtöttünk mintát, amiből 45 csóka, 181 vörös vércse és 61 kékvércse volt. Az ELISA vizsgálatok pozitív (ill. kétes) eredményt adtak a kékvércsék 32,8, vörös vércsék 44,2 és a csókák 4,4 százalékában. A qPCR vizsgálat során egy csókában Usutu vírus, egy vörös vércsében pedig lineage 2 WNV fertőzést mutattunk ki. A szúnyog csapdázás eredményeként összesen 2728 csípőszúnyog egyed gyűjtöttünk, melyek 90,65%-a *Culex pipiens* volt. A megvizsgált 386 szúnyog pool közül egyben lineage 2 WNV, kettőben pedig Usutu vírussal fertőzöttséget mutattunk ki. Valamennyi fertőzött szúnyog *Culex pipiens* volt.

Következtetés: A vizsgált élőhelyen kimutattuk a szezonális flavivírus aktivitást és a helyi madárpopuláció érintettségét. A vizsgált madárfajok 3-4 hetes fiókáinak szeropozitivitása a szikimmunitásnak tulajdonítható, jellemezve a szülőállomány áthangolódását és kitettségét is. Az ELISA eredmények immunfluoreszcenciás módszerrel való megerősítése és a keresztreakciók kiszűrése folyamatban van. A július végén, illetve augusztus közepén szúnyogokban detektált vírus cirkuláció megfelelt a jellegzetes szezonális flavivírus aktivitásnak, de ehhez képest a vizsgált fiókákban már június, ill. július közepén kimutattuk a WNV ill. Usutu vírus jelenlétét.

A vizsgálatokat az SA-99/2021, TKP-2021-EGA-01, RRF-2.3.1-21-2022-00006, OTKA K 120118 pályázatból finanszíroztuk.

## ISMERETLEN FUNKCIÓJÚ ASPV FEHÉRJÉK SZEROLÓGIAI ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE

Göttl Eszter<sup>1\*</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Tamás Vivien<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** A jelenleg elfogadott paradigma szerint a génmódosított attenuált vakcinák jelenthetik a megoldást a vírus okozta gazdasági károk megelőzésére. Az ilyen géniütéses mutáns vírusok, a virulenciagének deléciójával hatékony vakcinatörzsek lehetnek. Mivel a virulencia faktorokkal kapcsolatos ismereteink még hiányosak az ASPV esetében, ezért ezeknek az azonosítása kiemelt fontosságú a vakcinafejlesztés szempontjából is. Az ASPV eddig azonosított transzmembrán (TM) fehérjéi létfontosságú szerepet töltenek be az ASPV életciklusában, így az ismeretlen funkciójú *in silico* predikciók alapján transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék szerológiai és funkcionális vizsgálata jó kiindulási pont lehet a virulenciafaktorok azonosításához.

**A munka célja:** A vizsgálataink célja az volt, hogy az ASPV három, potenciális membrán fehérjéjét immortalizált sertés sejtvonalakban kifejeztessük és immunogentiásukat, valamint sejten belüli lokalizációjukat vizsgáljuk.

**Módszerek:** Első lépésként megterveztük a primereket ASPV virális fehérjéket (H233R, B169L, CP123L) kódoló génekhez, majd PCR-ral felsokszoroztuk a fragmenteket. Az inszerteket SH1 plazmidba klónoztuk FLAG szekvenciával fuzionáltatva. *Escherichia coli* DH10B törzs kompetens sejtbe transzformáltuk, majd kitisztítottuk. Az immunogenitási vizsgálathoz PT sejtekbe transzfektáltuk a plazmidokat és 7 különböző ASPV pozitív savó segítségével vizsgáltuk, hogy kimutatható-e ellenanyag a vizsgált fehérjék ellen. A fehérjék lokalizációját kotranszfekcióval vizsgáltuk, speciális sejtorganellum markerekkel.

**Eredmények:** A 7 ASPV savó egyike sem tartalmazott kimutatható mennyiségű ellenanyagot a vizsgált ASPV fehérjék ellen. A B169L a használt sejtorganellum markerek közül (endoplazmatikus retikulum (ER), Golgi-készülék, peroxiszóma, mitokondrium, endoszóma) az ER markerrel mutatott kolokalizációt, valamint részleges kolokalizációt mutatott a peroxiszóma markerrel is. A CP123L lokalizációja az ER markerrel mutatott átfedést. A H233R egyik vizsgált sejtorganellum markerrel sem mutatott kolokalizációt.

**Következtetések:** A fehérjék közül egyik sem, vagy csak kis mértékben lehet immunogén, mert a 7 ASPV fertőzött sertés vérsavóból egyiknél sem tudtunk detektálható mennyiségben ellenanyagot kimutatni a vizsgált fehérjék esetén a legalacsonyabb hígításban sem. Ezt a lokalizáció vizsgálata is alátámasztja, mert egyik fehérje sem a sejtmembránban található, ahol könnyen hozzáférhető lenne az immunrendszer számára.

A H233R fehérje egyik használt sejtorganellum markerrel sem mutatott kolokalizációt. Az *in silico* predikció ennél a fehérjénél mutatta a legkisebb valószínűséggel a TM domén jelenlétét. Lehetséges, hogy ennek a fehérjének nincs TM doménje, vagy nem az általunk vizsgált organellumokban expresszálódik. A CP123L egyértelműen az ER membránban lokalizálódik. A B169L hasonlóan az ER-ben, de a peroxiszóma markerrel is részleges lokalizációt mutatott. Az ER-ből képződő peroxiszómák lehet, hogy passzívan viszik magukkal a fehérjét, de szerepet játszhat a képződésükben is. A CP123L és a B169L fehérjék élettani hatása az ER-hez köthető, szerepük lehet a fehérje érési folyamatokban, az ER stresszválasz kialakításában vagy késleltetésében, vagy a virion ER eredetű belső membránjának kialakításában.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatást a H2020 VACDIVA 862874 pályázat keretein belül végeztük.

## ÚJONNAN LEÍRT SERTÉSPARVOVÍRUSOK (PPV2–PPV7) ELTERJEDTSÉGÉNEK FELMÉRÉSE ÉS GENETIKAI JELLEMZÉSE MAGYARORSZÁGON

Igriczi Barbara\*, Dénes Lilla, Balka Gyula

A sertésparvovírusok (PPV-k) kisméretű DNS-vírusok, amelyek közül a PPV1 a sertések szaporodásbiológiai rendellenességeinek egyik leggyakoribb kiváltó oka. Az elmúlt két évtizedben 6 új PPV-t írtak le, amelyeket PPV2–PPV7-ként neveztek el. Genomjuk két fő nyitott olvasási keretet (ORF-et) tartalmaz, amelyek közül az ORF1 a nem szerkezeti fehérjéket (NS), míg az ORF2 a vírus kapszidfehérjéit (VP) kódolja. A PPV-k a *Parvoviridae* családon belül a *Parvovirinae* (PPV1–PPV6) és a *Hamaparvovirinae* (PPV7) alcsaládba sorolandók. Ezeknek az újonnan azonosított vírusoknak az előfordulását már világszerte több országban igazolták, de klinikai, illetve gazdasági jelentőségük nagyrészt ismeretlen. Magyarországi állományok vizsgálata során eddig a PPV2, PPV3, és PPV4 jelenlétét írták le.

Kutatásunk célja, hogy felmérjük a PPV2–PPV7 elterjedtségét és genetikai változatosságát a magyar sertésállományokban. Továbbá célunk a PPV2–PPV7 fertőzés állományon belüli dinamikájának és az egyes korcsoportok fertőzősközvetítő szerepének a vizsgálata.

Összesen 26 sertéstartó telepről érkező, 2505 korcsoportonként vett savóminta, 218 rágóköteleminta és 111 heréléskor felfogott szöveti váladék minta qPCR-vizsgálatát végeztük el. Az erősen pozitív minták esetében az NS1 vagy a VP gén szekvenciájának a meghatározását és filogenetikai elemzését is elvégeztük.

A 26 vizsgált telep közül 24-nél (92%) sikerült kimutatni legalább egy PPV jelenlétét legalább egy mintatípusban. A vírusok összehasonlításakor a PPV2-t 23, a PPV3-at 19, a PPV4-et 13, a PPV5-öt 18, a PPV6-ot 21 és a PPV7-et 22 telepen detektáltuk, de az állományon belüli előfordulási arányok jelentősen eltértek. A legnagyobb előfordulási arányokat a rágókötelemintákban figyeltük meg, ahol a pozitív minták aránya 13% (PPV4) és 53% (PPV7) között változott. A legtöbb PPV-t szintén sikerült kimutatni minden korcsoport savómintáiban, de a 10, 14 és 18 hetes sertések voltak azok a korcsoportok, ahol a leggyakrabban észleltük a vírusokat. Összességében elmondható, hogy a vizsgálat telepeken a PPV2, PPV3 és PPV6 a legelterjedtebb vírusok (23%, 17% és 14%-os pozitívitás), amelyeket különösen alacsony Ct-értékekkel detektáltunk a savómintákban.

Eredményeink azt mutatják, hogy minden újonnan leírt PPV jelen van, és néhányuk széles körben elterjedt Magyarországon. A vizsgált telepeken a vírus alapvetően tünetmentes állatokban, szubklinikai fertőzés formájában van jelen.

Jelen kutatás az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

## AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS *IN VITRO* REKOMBINÁCIÓS RÁTÁJÁNAK TANULMÁNYOZÁSA SERTÉS ALVEOLÁRIS MAKROFÁGOKBAN

Mészáros István<sup>1\*</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Tamás Vivien<sup>1</sup>, Göttl Eszter<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** A vakcinafejlesztési kísérletek során felhalmozott ismeretek alapján a genomszerkesztéssel előállított, attenuált törzsek a legígéretesebb jelöltek az afrikai sertéspestis vírus (ASPV) elleni biztonságos és hatékony vakcina kifejlesztéséhez. Egy élővírusos védőoltás biztonságosságának megítéléséhez azonban feltétlenül szükséges ismerni a vakcinaként használt törzs és más törzsek közötti rekombináció valószínűségét. Annak ellenére azonban, hogy a homológ rekombinációt kihasználó CRISPR/CAS9 módszer segítségével évről-évre egyre több génkiütéses, mutáns törzset állítanak elő, a vírus természetes rekombinációs folyamatairól csak viszonylag kevés és közvetett ismerettel rendelkezünk.

**A munka célja:** Az ASPV *in vitro* rekombinációs rátájának meghatározása és a rekombinációt befolyásoló tényezők vizsgálata sertés alveoláris makrofágokban (PAM).

**Módszerek:** PAM-okat fertőztünk fluoreszcens markert hordozó ASPV törzsekkel (MOI: 3), majd 3 nappal később a felülúszókat begyűjtöttük és visszatitráltuk. ASPV-specifikus ellenanyagokkal végzett immunfluoreszcens festés (IF) után meghatároztuk a rekombinációs frekvenciákat (RF). A kísérleteket elvégeztük azonos törzsbe (Lv17/WB/Rie1) tartozó, azonos genotípusba, de eltérő törzsbe tartozó (Lv17/WB/Rie1 és HU/2018), valamint különböző genotípusba tartozó (Lv17/WB/Rie1 és NH/P68) törzsekkel. Vizsgáltuk továbbá a különböző időpontokban (+ 2, 4 és 6 h) történő koinfekció hatását a rekombinációs arányára.

**Eredmények:** A koinfekciót követő 24. órában csak a sejtek 1,38% volt mindkét szülői törzssel fertőzhető, míg a 48. órában ez már elérte a 12,16%-ot. Vizsgálataink során még az általunk használt két legközelebbi genetikai marker (20000 nt) között is mutattunk ki rekombinációs utódokat (3,82%). 72 órával a fertőzés kezdete után a koinfektált sejtek felülúszójában a markergének távolságától függően 3,82% (20500 nt) és 20,66% (109914 nt) között változott a rekombinációs vírusok aránya (RF). Különböző törzsbe, de azonos genotípusba tartozó, valamint különböző genotípusba tartozó vírusok között alacsonyabb RF értéket tapasztaltunk, mint az azonos törzsekkel történt koinfekció esetén. A rekombinációs arányára jelentős hatást gyakorolt, ha a két szülői törzssel való fertőzés nem azonos időpontban történt: a fertőzések között mindössze két óra különbség a tízedére csökkentette a rekombinációs utódok arányát (pl. 6,67%-ról 0,7%-ra).

**Következtetések:** A Haldane-függvény segítségével egy rekombinációs térképegységet (1 centiMorgan) 2074±680 bp-nak határoztunk meg az ASPV genomában. Ezt és a teljes genom hosszát (~190 kbp) figyelembe véve az ASPV genom rekombinációs szempontból kb. 91.5 cM hosszúságúnak becsülhető. A különböző törzsek és genotípusok közötti alacsonyabb RF értékek a szülői törzsek genomjai közötti kisebb hasonlósággal, a homológ régiók számának és méretének csökkenésével, valamint a rekombinációs életképességének csökkenésével magyarázhatók. A legerősebb negatív hatást a rekombinációs utódok arányára viszont a szülői törzsekkel történő fertőzések időbeli eltolódása esetén tapasztaltuk, amelynek pontos okáról jelenleg csak spekulatív elképzeléseink vannak.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatás a VACDIVA H2020 862874, a KDP-2020 és az ÚNKP-20-3 pályázat keretein belül valósult meg.

## INFLUENZA A VÍRUSTÖRZSEK *IN VITRO* ADAPTÁLÁSA MADÁR ÉS EMLŐS SEJTVONALHOZ

Oláh Barbara<sup>1\*</sup>, Göttl Eszter<sup>1</sup>, Balázs Liliána<sup>1</sup>, Gellért Ákos<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>

**Bevezetés:** Az influenza A vírus Európában endémiásan előforduló, elsősorban madárfajok gyakran tünetmentes, máskor magas lázzal, nagyfokú elesettséggel, légúti, esetenként idegrendszeri tünetekkel, vérzésekkel és hasmenéssel járó betegsége, amely minden évben jelentős gazdasági károkat okoz. Magas mutációs rátája és széles gazdaspecificitása miatt madár- és emlősfajok széles körét képes megfertőzni és hozzájuk adaptálódni; e folyamatok jobb megértése segíthet a hatékonyabb védekezésben.

**A munka célja:** Vizsgálataink célja az influenza A H3N8 és H5N9 szerotípusú törzsek DuO madár és Vero emlős sejtvonalhoz történő adaptációja releváns biológiai tulajdonságok vizsgálatán és szekvenációelemzésen keresztül.

**Módszerek:** Két különböző szerotípusú, víziszárnyasokból izolált madárinfluenza törzssel (H3N8, H5N9) sorozatpasszálást végeztünk madár eredetű DuO és emlős eredetű Vero sejtvonalon. Meghatároztuk az 1. és 3. passzázs szekvenciáját, valamint DuO sejteken a 16. (H5N9) és 7. (H3N8) passzázsig nyomon követtük a törzsek releváns biológiai tulajdonságaiban (citopatogén hatás, fertőző titer (FFU/ml) növekedési görbe, kópiaszám) bekövetkezett változásokat.

**Eredmények:** Az adaptálódás során a H5N9 különböző passzázsszám végtitere a 3. passzázsig csökkent ( $10^7$ - $10^5$  FFU/ml) majd a 9. passzázsig ingadozott. Végül a 15. passzázs után elérte a  $10^8$  FFU/ml-es titert. A H3N8 szerotípus esetében is jelentősebb csökkenést tapasztaltunk a 3. passzázsig ( $10^7$ - $10^5$  FFU/ml), amit titer ingadozása követett. A végtitek változásával együtt a vírus növekedési görbéjének lefutásában gyorsulást, míg a fertőzés hatására megjelenő apoptotikus sejtmagok arányában csökkenést figyeltünk meg. A Vero sejtvonalon a törzsek a 3. passzázsig voltak fenntarthatók, azon túl a fertőzés nem volt átvihető.

A Duo és Vero sejtvonalon passzált vírusok 1. és 3. passzázsából nyert szekvencia (Illumina) adataink alapján, az azonos sejtvonalon történő passzálást követően nem tapasztaltunk változást a master-szekvenciában, azonban a DuO és Veron passzált vírusok szekvenciáit összehasonlítva már az első passzázsban mutációkat azonosítottunk, amelyek a hemagglutinin (HA) fehérje szialinsav kötőhelyét és „nyaki” régióját kódoló génszakaszokat érintették.

**Következtetések:** A fertőző titer és a citopatogén hatás változásai feltehetően az adaptációs folyamattal függenek össze, amelyeket a késői passzázsok szekvenálása igazolhat. A vírus abortív vá válása Vero sejteken vagy a virionok inaktiválódásának vagy egy kevésbé fertőzőképes változat kiszelektálásának a következménye lehet. A különböző sejtvonalon passzált izolátumok esetében gyors, már az első passzáls során megjelenő, széttartó adaptációt észleltünk a HA szialinsav kötő helyében, valamint a „nyaki” régióban, amely a neutralizáló ellenanyagok kötésében is szerepet játszik.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatás az OTKA PD138916-es számú pályázat támogatásával valósult meg.

## EMLŐS ÉS MADÁRSEJTEKEN IZOLÁLT INFLUENZA A VÍRUS TÖRZSEK QUASISPECIESÉNEK VÁLTOZÁSAI ÉS A NEG8 FEHÉRJE VIZSGÁLATA

Oláh Barbara<sup>1</sup>, Göltl Eszter<sup>1</sup>, Balázs Liliána<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>, Mészáros István<sup>1\*</sup>

**Bevezetés:** Az influenza A vírus széles gazdaszereződésének egyik oka a vírus magas mutációs rátája, amely különböző genotípusú, eltérő mutációkat hordozó változatok kialakulását és szelektálódását eredményezi a gazdaszervezetben. Gazdaváltáskor a megváltozott szelektációs nyomás hatására a meglévő változatok közötti arányok is eltolódhatnak. A széles gazdaszereződés másik oka az új gazdához való alkalmazkodást elősegítő virális gének jelenléte. A madárinfluenza A vírus 8. szegmentjén található egy, a negatív szálán kódolt ORF (NEG8), amely rövidebb, mint a humán influenza vírusoké, de feltehetően fehérjét kódol.

**A munka célja:** Vizsgálataink célja influenza A vírusok quasispeciesében történő genetikai változások követése madár és emlős sejtvonalon, valamint a feltételezett NEG8 fehérje sejtben belüli lokalizációjának meghatározása.

**Módszerek:** Víziszárnyasokból származó madárinfluenza A vírus törzseket (H3N8 és H5N9) izoláltunk madár eredetű sejteken, majd háromszor passzáztuk őket kacsza eredetű DuO és emlős eredetű Vero sejtvonalon. Az első és a harmadik passzázsok szekvenciáit és a minták belső heterogenitását újgenerációs szekvenálással határoztuk meg. Meghatároztuk a H5N9-es szerotípus madárinfluenza törzs NEG8 ORF-jének szekvenciáját, és eGFP-N1 eukarióta expressziós vektorba klónoztuk. A plazmiddal DuO sejteket transzfektáltunk, majd immunfluoreszcens (IF) festést végeztünk sejtsejtszervecske markerek használatával.

**Eredmények:** A szekvenciaadatok az SNP-k (single nucleotid polymorphism) csökkent frekvenciáját mutatták az 1. és a 3. passzázsok között, mindkét szerotípus esetén, és az 1. Vero passzázs esetében magasabb heterogenitást tapasztaltunk, mint a DuO sejtvonalon. *In silico* elemzések kimutatták, hogy a madárinfluenza NEG8 fehérjéje 93 aminosav hosszúságú, és tartalmaz egy transzmembrán domént. Transzfektált sejtekben a leíró fehérje szinte teljes lokalizációt mutatott az endoplazmatikus retikulumban (ER) rezidens calretikulinnal, és membrán fúzióra utaló morfológiai elváltozásokat okozott a sejtek ER-jában.

**Következtetések:** Az SNP-k számának csökkenése a passzálások között quasispecies homogenizálódására utalhat, és véleményünk szerint a kevésbé adaptálódott változatok kiszelektálódásának következménye. A Vero sejteken tapasztalt kezdeti magasabb heterogenitás a madár- emlős sejtvonal váltás következménye lehet, amit az is alátámaszt, hogy több esetben is azonosítottunk SNP-eket olyan aminosavak tripletjeiben, amelyekről ismert, hogy befolyásolhatják a virulenciát, patogenitást és a gazdaszereződést (pl. hemagglutinin fehérje 126., 138. és 159. aminosavai). A NEG8 fehérjét korábban csak humán influenza törzsekben vizsgálták, de semmilyen funkciót nem tudtak hozzá kötni. Vizsgálataink azt mutatják/arra utalnak, hogy a madárinfluenza feltételezett NEG8 fehérjéje a gazdasejtek ER-jában lokalizálódik, és az általa okozott morfológiai változások alapján ER-stresszt idéz elő a transzfektált sejtekben.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatást az OTKA PD138916-es számú pályázat támogatta.

## AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS A224L GÉN KORAI PROMÓTERÉNEK STRUKTURÁLIS VIZSGÁLATA

Olasz Ferenc<sup>1\*</sup>, Trembáczi Nikolettá<sup>2</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Tamás Vivien<sup>1</sup>, Göltl Eszter<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** Az afrikai sertéspestis (ASP) megjelenése világszerte komoly veszélyt jelent a sertésenyésztők számára. A betegség súlyos vérzéses és lázas tüneteket okoz mind a házi, mind a vaddisznóknál, és akár az összes fertőzött állat elpusztulásához is vezethet. Az ASPV, vagyis az afrikai sertéspestis vírusa egy nagy, kb. 200 nm átmérőjű, ikozaéder szerkezetű burkos vírus, amely duplaszálú DNS-t tartalmaz.

A vírus génexpressziója szigorúan szabályozott, azonban a promóterek felépítése, a transzkripcióban résztvevő faktorok és az mRNS átírásának pontos szabályozása még nem teljesen ismert. Bár sok kutatás a p72 fehérjét kódoló B646L késői gén promóterére összpontosít, kevés megbízható információ áll rendelkezésre a korai fertőzési fázisban résztvevő gének promótereinek működésére vonatkozóan.

**A munka célja:** Az afrikai sertéspestis vírusának korai génexpressziót szabályozó promótereinek funkcionális vizsgálata.

**Módszerek:** ASPV transzkripciós térképe alapján kiválasztottunk három, a legnagyobb transzkripciós aktivitásúak közé tartozó ORF-et (MGF 110-7L, I73, A224). Ezután az eredeti CMV promótert az említett gének feltételezett promóter régióira cseréltük a peGFP-N1 plazmidban. A promóterek pontos hossza és funkcionális elemei ismeretlenek, így minden promóter esetében több változatot is készítettünk. Az A224L gén promóterének pontos feltérképezése érdekében újabb változatokat is készítettünk, a 3' véget 15, 23 és 41 nukleotiddal rövidítettük. Az eGFP szignál intenzitást Axio Observer D1 típusú inverz fluoreszcens mikroszkóp saját képelemző programjának segítségével mértük.

**Eredmények:** A háromból csak egy funkcionálisan működő promóterrégiót (A224L) sikerült azonosítanunk, a másik kettő (MGF110-7L, I73R) esetében nem tudtunk promóter aktivitást igazolni. Az A224L gén promóterrégiójának további vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a rövidített promóter szakaszok egyre intenzívebb fluoreszcens jelet indukálnak; a 41 nukleotiddal rövidített 55 nukleotid hosszúságú promóter adta a legerősebb szignált.

**Következtetések:** Az MGF110-7L, és az I73R promóterrégiójának azonosítása azért lehetett sikertelen, mert elképzelhető, hogy ezek a gének komplexebb szabályozás alatt állnak: például a klónozott szakaszokban hiányozhatnak a transzkripció iniciációjához szükséges kofaktorok kötőhelyei, vagy átíródásukat nagymértékben befolyásolja a környező gének orientációja és a szabályozó régiók átfedése. Mindazonáltal sikeren azonosítottunk egy rövid, magas génexpressziót támogató korai promótert, amely alkalmas lehet különféle ASPV génmódosításokra. Az A224L rövidebb promóterváltozatainak intenzitásnövekedése azzal is magyarázható, hogy az iniciációs komplexnek és a TATA-boxnak megváltozott a starthelytől való távolsága, és a deletált részek potenciális szabályzó elemeket tartalmaznak.

**Köszönetnyilvánítás:** A vizsgálatokat a VACDIVA H2020 862874 pályázatból finanszíroztuk.



## INFLUENZA HEMAGGLUTININ ANTIGÉNEKET KIFEJEZŐ *ESCHERICHIA COLI* VAKCINAJELÖLTEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA

Pintér Krisztina<sup>1</sup>, Pollák Boglárka<sup>1</sup>, Olasz Ferenc<sup>1\*</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Tamás Vivien<sup>1</sup>, Göttl Eszter<sup>1</sup>, Bálint Ádám<sup>2</sup>, Szmolka Annamária<sup>1</sup>, Erdélyi Károly<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** Az utóbbi években megnőtt a magas patogenitású madárinfluenza járványok száma. A haszonmadarak vakcinázása megakadályozza a szisztémás fertőzést, de az oltások nem akadályozzák meg a nyálkahártyán szaporodó vírusok ürítését.

A természetes mikrobiomban élő, nem patogén rezidens baktériumok vektorként szolgálhatnak a mukozális immunitás kiváltására. Számost laktobaktérium alapú vektort teszteltek már erre a célra, azonban gyakorlati körülmények között végzett vizsgálatok a laboratóriumi kísérletek eredményeit nem igazolták vissza. Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Escherichia coli* (*E. coli*) a laktobaktériumoktól eltérő immunválaszt vált ki, erős IgA és IgY válasz figyelhető meg. Okkal feltételezhető, hogy általuk expresszált más kórokozókól származó idegen fehérjék ellen is hasonló hatékonysággal képesek immunválaszt indukálni.

**A munka célja:** Három *E. coli* alapú influenza A vírus elleni vakcinajelölt baktérium tesztelése tojásból kikelt csirkéken.

**Módszerek:** A kísérlethez olyan *E. coli* törzset választottunk, amely természetes körülmények között is előfordul a csirkék emésztőszervrendszerében. Az izolált törzset három hemagglutinint expresszáló vektorkonstrukcióval transzformáltuk (H5stalk-AIDA, HA1-AIDA, PgsA-HA). A negyven frissen kikelt csibét négy csoportba osztottuk. Mindegyik csoportot eltérő vektorral transzformált, nem patogén *E. coli* fertőztük meg, három csoport kapta a vakcinajelölttel transzformált baktériumokat, a negyedik kontrollcsoportként szolgált, őket egy tdTomato fluoreszcens fehérjét expresszáló *E. coli* fertőztük. Az első héten antibiotikumot adagoltunk a csirkék ivóvizéhez, hogy a vektorral transzformált baktériumok előnyt élvezzenek a környezeti baktériumokkal szemben. Négy hét elteltével egy alacsony patogenitású homológ H5N9 madárinfluenza A (IAV) vírustörzsszel fertőztük az állatokat, majd rendszeres időközönként vér és kloáka tampon mintát vettünk. PCR-rel követtük az influenza kópiaszámának változását, és immunfluoreszcenciával ellenőriztük a vérben található influenza ellenes antitestek jelenlétét.

**Eredmények:** A negyedik héten az állatok harmadából továbbra is kimutatható volt a vektorral transzformált *E. coli* törzs jelenléte, azonban a vérvizsgálatok egyik vakcinázott állat vérében sem találtak influenza ellenes antitesteket. A vírusfertőzés a kontrollcsoportban hét nap alatt lezajlott, amit a vérminták és a kloákatamponok is igazoltak. Ezzel szemben a hemagglutinín antigént expresszáló baktériummal vakcinázott állatok véréből a vírus még 7. napon is nagy mennyiségben kimutatható maradt, ráadásul jelentős mennyiségben ürítették az IAV-t. A kontrollokhoz képest a vírus kópiaszáma lassabban emelkedett, azonban a vakcinázás nem megszüntette, hanem időben kitolta és növelte a vírus ürítést.

**Következtetések:** Az állatokban nem tudtunk kimutatni B-sejtes immunválaszt, ám valamilyen immunológiai áthangolódásnak történnie kellett. *E. coli* alapú mukozális vakcinával a jelenlegi formában nem tudtunk protektív immunitást kiváltani influenza ellen, sőt ezeknek a vektoroknak alkalmazása a vírus ürítés elnyúlásához vezetett.

**Köszönetnyilvánítás:** A vizsgálatokat az SA-98/2021 és a TKP-2021-EGA-01 pályázatból finanszíroztuk.

## MAGYARORSZÁGI PATKÁNYPOPULÁCIÓK SZŰRÉSE POLIÓMAVÍRUSOK JELENLÉTÉRE

Surján András<sup>1</sup>\*, Vidovszky Márton<sup>1</sup>, Egyed László<sup>1</sup>

A poliómavírusok (PyV-ok) a *Polyomaviridae* családba tartozó, kisméretű (40-50 nm átmérő, ikozaéder szimmetriájú kapszid, ~5000 bp), cirkuláris genomú, burok nélküli, duplaszálú DNS vírusok. Elsősorban emlősökben és madarakban fordulnak elő, de metagenomikai elemzések során írtak le poliómavírus szekvenciákat hal, és ízeltlábú fajok mintáiból is. A PyV-ok általában perzisztens fertőzést okoznak az urogenitális szervrendszerben. Legtöbbjük apatogén, de a gazdaszervezet immunrendszerének legyengülése esetén okozhatnak kóros, akár tumoros elváltozást is. Világszerte egyre több fajból írnak le új PyV-okat, rendszertanuk emiatt is fejlődő, gyakran változó.

PhD munkám célja új emlős PyV-ok kimutatása, és azok molekuláris és filogenetikai elemzése a vírus-gazda koevolúció feltárása céljából. Munkám részeként vizsgáltam PyV-ok jelenlétét különböző magyarországi populációkból származó, vándor- (*Rattus norvegicus*) és házi patkány (*Rattus rattus*) szervmintákban.

A PyV-ok kimutatására egy a szakirodalomban bevált széles spektrumú nested PCR-t alkalmaztunk. A módszer a VP1, elsődleges szerkezeti fehérjét kódoló gén, egy erősen megőrzött, ~230 bp méretű szakaszát erősíti fel. Jelen ismereteink szerint, ezzel a módszerrel minden eddig ismert emlős és madár PyV kimutatható. A vizsgált szervszövet minták májból, lépéből, veséből, nyálmirigyből, szívizomból, tüdőből és agyszövetből származtak. Országszerte 232 db, 11 településről származó, elsősorban vándorpatkány-mintát vizsgáltunk.

Összesen 26 minta bizonyult pozitívnak, amelyek mindegyike vándorpatkányból származott. Egy kivétellel mindegyikből ugyan az, az *Alphapolyomavirus ranorvegicus* fajba tartozó PyV volt kimutatható. A 11 település közül 6-ról származott pozitív minta, az ország különböző tájegységeiről. A szekvenált VP1 szakasz alapján 23 esetben pontosan ugyanaz a szekvencia volt kimutatható. Két esetben, 1-1 nukleotid eltérést okozó pontmutációt detektáltunk, amelyek egyike aminosav eltérést is okozott, egy leucin-valin cserét eredményezve. Egy esetben az *Alphapolyomavirus aflavicollis* fajba tartozó, sárganyakú erdeiegeérből (*Apodemus flavicollis*) már korábban kimutatott poliómavírus jelenlétét igazoltuk vándorpatkányban. Korábbi kutatásunk során pirók erdeiegeérből (*Apodemus agrarius*) is sikerült kimutatnom ezt a PyV-t.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a magyarországi patkány állományokban előfordul egy ugyan azon PyV által okozott perzisztens fertőzöttség az ország több területén is. Korábbi és jelenlegi filogenetikai vizsgálataink alapján az *Alphapolyomavirus aflavicollis* fajba tartozó PyV vándorpatkány eredetű, amely képes lehet sárganyakú- és pirók erdeiegeereket is megfertőzni. A vándorpatkány PyV-2-t (*Betapolyomavirus securanorvegicus*) nem mutattuk ki egy mintából sem. Feltételezhetően sokkal ritkábban okoz fertőzést. Vizsgálatunk az eddigi legátfogóbb patkányokat célzó PyV szűrővizsgálat.

Köszönjük az anyagi támogatást: OTKA NKFIH-K-137798, ÁTE NKB 2023 pályázatoknak.

## AZ AFRIKAI SERTÉS PESTIS VÍRUS STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA COS7 SEJTEKEN

Tamás Vivien<sup>1\*</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Göttl Eszter<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** Fogékony gazdaeredetű sejtvonallal hiányában az afrikai sertéspestis vírusának (ASPV) vizsgálatát leggyakrabban fajidegen immortalizált sejtvonalakon végzik. A vírus sejtvonalakon való szaporítása a vírusgenomban bekövetkező változások nagy száma és kiszámíthatatlansága miatt komoly problémákat okoz a kutatók számára. A vírus biológiájáról szóló ismereteink másik része az elsődleges célsejtnek számító sertés pulmonáris makrofágokkal (PAM) végzett kísérletekből származik. Bár az ASPV genetikailag stabilabbnak mutatkozik PAM-okon, a PAM-okkal való munka rendkívül körülményes, és előállításuk költséges.

**A munka célja:** Az ASPV stabilitásának vizsgálata Cos7 sejtvonalon, majd PAM- sejteken történő sorozatpasszázs során bekövetkező változások meghatározása.

**Módszerek:** Az ASPV stabilitásának vizsgálatához 80% konfluenciával rendelkező Cos7 sejteket fertőztünk 3 MOI ASPV Lv17/WB/Rie1 (Lv17) törzssel. 7 nap elteltével 200 ul felülűsöt frissen passzázt Cos7 sejtekre vittünk át. A nyolcadik passzázs után újabb három passzázszt végeztünk PAM-sejteken. Az 5. és 8. Cos7, továbbá a 3. PAM passzázsok felülűsőiből alikvotokat vettünk, majd az így kapott Lv17\_cos5, Lv17\_cos8 és Lv17\_cos8\_pam3 mintákat Illumina módszerrel szekvenáltuk. A 3. PAM-on való passzázs után még további 3 passzázszt végeztünk PAM-okon alacsony hígítású fertőzéssel. Ezután ezt a mintát (Lv17/d24) használtuk *ex vivo* vizsgálatokhoz. Az egyes populációk növekedési kinetikájában és titerében a szülői Lv17 vírushoz képest bekövetkező változásokat immunfluoreszcens festéssel, illetve qPCR-el vizsgáltuk PAM-sejteken.

**Eredmények:** A szekvenálási eredmények alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált minták különböző hosszúságú deléciós mutánsok keverékét tartalmazzák. A három állomány szekvenációja kimutatta, hogy az Lv17 genomja jelentős átrendeződéseket szenvedett el a bal oldali változó régióban (LVR) nagy indelek formájában. Az Lv17\_cos5 és Lv17\_cos8 állományokban a kvázi-species fő vírusösszetevője egy olyan vírusgenom volt, ami több mint 40 kb-os 52 gént kódoló régiót veszített az LVR-ből. A hiányzó régió helyén egy, a genom jobb terminális régiójából származó, közel hasonló méretű (38780 bp, 51 gént kódoló) vírusfragmentum található. Az Lv17\_cos5 és Lv17\_cos8 állományokban viszonylag kis számú genom szakaszt (read) azonosítottunk a genom fordítottan ismétlődő régiójának proximális végpontja és a deléciós töréspont közötti régiója között, ami más genotípus-változatok jelenlétére utal. Az Lv17\_cos8\_pam3-ban az Lv17 egy, az előző passzázsokban nem detektált változata lett a fő variáns. Ebből „mindössze” 42 gén delécióját lehetett kimutatni és olyan genom régiókat is tartalmazott, amelyeket a korábbi passzázsokból vett mintáknál nem tudtunk detektálni. Az *ex vivo* vizsgálatok eredményei szerint az Lv17/d24 vírus lassabban replikálódik, mint a szülői Lv17 vírus, és a végtitere is jelentősen alacsonyabb.

**Következtetések:** Lv17 genetikailag instabil a Cos7 sejtekben, az állományok nem homogének, a vírusok többsége mindössze öt passzázs során körülbelül 40 kb-t veszít a genomjából. A ritkább, szekvenálással nem detektálható genetikai változatok azonban az adaptáció során fennmaradhatnak az alacsony hígítású passzázsokban, különböző tenyésztési körülmények között (jelen esetben PAM-sejteken) szelektálódhatnak, és néhány passzázs után uralkodó genotípussá válhatnak.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatást a H2020-VACDIVA-862874, KDP-2020 és ÚNKP-20-3 pályázat támogatta.

## AZ AFRIKAI SERTÉS PESTIS VÍRUS HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓS KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Tamás Vivien<sup>1\*</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Göttl Eszter<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

**Bevezetés:** Az afrikai sertéspestis vírus (ASPV) evolúciós mechanizmusainak pontosabb megértéséhez és az előállított élővírusos vakcinák biztonságosságának megítéléséhez elengedhetetlen a vírus homológ rekombinációs folyamatainak megismerése. Legjobb tudomásunk szerint azonban az ASPV genomok közötti homológ rekombinációra vonatkozó kísérleti bizonyítékot még nem publikáltak. Bár a Cas9 által kiváltott kettősszál-törések viszonylag nagy gyakorisággal indukálnak rekombinációt az ASPV és a transzfer plazmidok között, csak néhány közvetett bizonyíték utal arra, hogy a homológ rekombináció is hozzájárul az ASPV *in vivo* evolúciójához.

**A munka célja:** Célunk volt az ASPV vírusok koinfekciója során fellépő homológ rekombinációs események vizsgálata, két, markergént tartalmazó ASPV törzs keresztezésével.

**Módszerek:** A koinfekciót mCherry markergént tartalmazó, 9GL fehérjekódoló régió deletált Lv17/WB/Rie1/dGL és eGFP markergént hordozó, 8-CR és CD2V fehérjekódoló régió deletált Lv17/WB/Rie1/dCD homogén mutáns vírusokkal végeztük el. Sertés alveoláris marofágokat (PAM) szélesztettünk, majd szélesztés után 24 órával 3-3 MOI-val fertőztük az Lv17/WB/Rie1/dGL és Lv17/WB/Rie1/dCD vírusizolátumokkal. 1 órás inkubáció után a felülúszót eltávolítottuk, és friss PAM-fenntartó tápfolyadékra cseréltük. A felülúszót 3 nap elteltével összegyűjtöttük. A rekombináns vírusokat manuálisan tisztítottuk fluoreszcens mikroszkóp alatt. Az izolálás és a fertőzés folyamatának ötszöri megismétlésével olyan homogén izolátumot kaptunk, amelyben minden fertőzött sejt piros és zöld fluoreszcenciát mutatott. Miután az állományt homogénnek tekintettük, további két véghígítási lépést végeztünk. Ezután az így kapott homogén Lv17/WB/Rie1/dCD-dGL izolátumot felszaporítottuk és szekvenáltuk, majd PAM sejteken *in vitro* immunfluoreszcens festéssel (IF) és qPCR-rel vizsgáltuk a növekedési kinetikában és specifikus infektivitásban bekövetkező változásokat.

**Eredmények:** A szekvenálás megerősítette az IF festés eredményét, amely szerint a vírusállomány homogén, nem találtunk olyan readet, amely szülői szekvencia jelenlétére utalt volna. A két szülői törzshöz képest hat új mutáció fordult elő a bal oldali variábilis a régióban. Az Lv17/ WB/Rie1/dGL egyedi szekvenciamarkereinek eltűnése és az Lv17/WB/Rie1/dCD egyedi markerének megjelenése a rekombináns Lv17/ WB/Rie1/dCD-dGL genomjában arra utal, hogy a kialakulás során legalább két átkereszteződés történt; az egyik a két fluoreszcens marker végpontjai között, a másik a genom jobb végén. Az *in vitro* vizsgálat során a rekombináns vírus a 108 órás PAM-okon való visszatitrláskor szignifikánsan alacsonyabb titereket mutatott, mint a szülői Lv17/WB/Rie1 vírus. A kópiaszámból és a titerből számított specifikus infektivitás érték is azt mutatta, hogy a rekombináns vírus replikációs képessége alulmaradt a szülői víruséhoz képest.

**Következtetések:** Az eredmények azt mutatják, hogy a különböző ASPV-törzsek között *ex vivo* rekombináció történhet, és történik is viszonylag nagy frekvenciával, és rekombináns törzsek viszonylag könnyen előállíthatók keresztezéssel.

**Köszönetnyilvánítás:** A kutatást a H2020-VACDIVA-862874, KDP-2020 és ÚNKP-20-3 pályázatok támogatták.

## ÖNREPLIKÁLÓDÓ DNS- ÉS RNS- VAKCINÁK ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA PONTYOK TAVASZI VIRÉMIAJA (SVCV) ELLEN

Abonyi Flóra<sup>1\*</sup>, Eszterbauer Edit<sup>1</sup>, Baska Ferenc<sup>2</sup>, Hardy Tímea<sup>1</sup>, Doszpoly Andor<sup>1</sup>

Az akvakultúra az egyik legdinamikusabban fejlődő mezőgazdasági ágazat az egész világon. Az intenzív állattenyésztésekben, s így a halgazdaságokban szintén megjelenő mikrobiális fertőzések jelentős károkat okoznak. A pontyok tavaszi virémiája (SVCV) a *Rhabdoviridae* családba tartozó RNS-vírus, mely az egész világon elterjedt, mely elsősorban a ponty (*Cyprinus carpio*) állományokban okoz jelentős elhullásokat. Megfelelő nukleinsav alapú (DNS-, RNS-, és önreplikálódó-vakcinák) vakcinák fejlesztésének a járványok elleni védekezési stratégiában fontos szerepe van. Halak számára már többféle hagyományos DNS-vakcinát fejlesztettek például rhabdovírusok ellen is, amely a vírus glikoprotein (G) génjét kódolják és mérsékelt vagy teljes védelmet képesek nyújtani, akár egyetlen alacsony dózisban is. Egy másik ígéretes vírusos betegségek elleni nukleinsav-vakcina konstrukció a Salmonid alphavírus alapú replikon (SAV), amely hatékonynak bizonyult atlanti lazacokban (*Salmo salar*). A SAV replikont azonban *in vivo* csak atlanti lazacokon tesztelték.

Munkánk célja SAV önreplikálódó prototípus DNS- és RNS- vakcinák tesztelése pontyfélékben, ezek hatékonyságának összehasonlítása a korábbi DNS-vakcina konstrukciókkal *in vivo* állatkísérletes vizsgálatokban.

A vizsgálatunkban az SVCV-G génjét expresszáló SAV-replikont terveztünk, és hatékonyságát a korábban leírt pcDNA3-SVCV-G konstrukcióval hasonlítottuk össze pontyokban. A SAV-replikont burok nélküli RNS formában (pSAV-RNS-SVCV-G) és DNS alapú vektorként (pSAV-DNS-SVCV-G) is alkalmaztuk. A három különböző vakcina prototípust 20±1 °C-os vízhőmérsékleten, 0,1 µg/g dózisban (n=25 csoportonként) i.m. injekciótuk be. A három vakcinázott csoportot és a kontrollcsoportot (üres pcDNA3 plazmiddal injekciózva) három héttel a vakcinázás után SVCV-vel immerziósan fertőztük 15 °C-on, majd 30 napig követtük az elhullásokat. A vakcinázást követően 3 és 6 nappal izom és lép mintákból immungén expressziós vizsgálatot végeztünk real-time RT-PCR-rel.

A vírusfertőzés után 30 nappal a kontroll és a pSAV-RNS-SVCV-G vakcinázott csoportban 44%, a pcDNA3-SVCV-G csoportban 52%, míg a pSAV-DNS-SVCV-G csoportban a mortalitás csak 8% volt. Eredményeink alapján a burok nélküli RNS-ként alkalmazott SAV-replikont és a pcDNA3-alapú vakcina nem váltott ki védelmet az SVCV-vel szemben, a DNS-ként alkalmazott SAV replikon azonban jelentős védelmet mutatott egyetlen alacsony dózisú i.m. injekciót követően.

Eredményeink azt mutatják, hogy a SAV-alapú replikon vakcinák a jövőben potenciális vakcinajelöltként szolgálhatnak a nem lazacfélék akvakultúrájában is, azonban további klinikai és terepi vizsgálatok szükségesek a hatékonyság megerősítéséhez.

A kutatás a 2022-ben elnyert K142937 OTKA és 2023-ban elnyert NKB pályázat keretén belül valósulhatott meg.

## KÜLÖNBÖZŐ RIG-I AGONISTÁK DAGANATELLENES HATÁSA VESE ADENOKARCINOMA EGÉRMODELLEN

Gulyás Dominik<sup>1,2\*</sup>, Jankovics István<sup>1,2</sup>, Dénes Béla<sup>1,2</sup>, Földi Dóra<sup>1,2</sup>, Rhiannon Rodgers<sup>1,2</sup>, Katie Commins<sup>1,2</sup>, Andócs Gábor<sup>1</sup>, Lőrincz Márta<sup>1,2</sup>

### Bevezetés

A retinsavval indukálható gén I (RIG-I) jelátviteli útvonal aktiválása a tumoros sejtek apoptózisát indukálja, és fokozza az NK-, dendritikus- és effektor T sejt aktivitást. Két különböző RIG-I agonistát alkalmaztunk: tisztított influenzavírus RNS-t (IV RNS), valamint 3p-hpRNS-t (5'-trifoszfát hairpin RNS).

### A munka célja

A vizsgálat célja ezen vegyületek hatékonyságának megállapítása volt a vese adenokarcinóma egérmodelljében (Renca).

### Módszerek

A Renca sejteket szubkután implantáltuk 40 BALB/c egérbe. Az állatokat három kezelési csoportba és egy kontrollcsoportba soroltuk. A specifikus adjuváns kombinációk intratumorális beadását háromszor ismételtük az alábbiak szerint: 1. csoport: korábban már biztató eredményeket adó CpG+anti-OX40, 2. csoport: CpG+3p-hpRNS, 3. csoport: IV. RNS+anti-OX40 és 4. csoport: PBS. A napi monitorozás a primer daganat méretének, és az állatok fiziológiás paramétereinek felmérését foglalta magában. Az elhullott egereket felboncoltuk, és szövettani értékeléseket is végeztünk. A kezelés hatékonyságát a tumornövekedés, a távoli metasztázisok előfordulása és a különböző citokinszintek változása alapján állapítottuk meg.

### Eredmények

A vizsgálat 38. napján a különböző csoportok túlélési arányai a következők voltak: 4. csoport: 20%, 1. csoport: 70% (szig.), 2. csoport: 50% (nsz.) és 3. csoport: 60% (szig.). A primer tumorok méretét az utolsó kezelést követő 17. napon, majd a 38. napig minden hetedik napon megmértük. A 17. napon az 1., 2., 3. és 4. csoportok között nem figyeltünk meg szignifikáns eltéréseket a daganatok méretében. A 24. és 31. napokon a kezelt csoportokban szignifikánsan kisebb primer daganatokat mértünk, mint a 4. csoportban. A 38. napon már nem volt szignifikáns különbség a tumorméretben a csoportok között. Az 1., 2. és 3. csoport kezdeti demarkációt mutatott, míg a 4. csoport diffúz primer tumorokat, amelyeket nekrozis kísért. A távoli metasztázisok kialakulását a kezeléseket mindegyike jelentős mértékben csökkentette.

### Következtetések

A kísérlet lezárása után a kezeléseket ígéretesnek tartjuk. Figyelemre méltó, hogy amíg a kezeléseket hatásai tartottak, kézzelfogható eredményeket tapasztaltunk, de az utolsó kezelést követően az egerek életminősége jelentősen romlott. Eredményeink szilárd alapot jelentenek további kutatásokhoz. A kezelési koktélok összetételének, valamint a kezeléseket gyakoriságának módosításával lehetőség nyílik az elért eredmények további javítására.

### Köszönetnyilvánítás

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

## A CSÖKKENT ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉG MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA *MYCOPLASMA IOWAE* ESETÉBEN

Buni Dominika<sup>1\*</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Földi Dorottya<sup>1</sup>, Bányai Krisztián<sup>1,2</sup>, Bali Krisztina<sup>1</sup>, Janet Bradbury<sup>3</sup>, Marco Bottinelli<sup>4</sup>, Salvatore Catania<sup>4</sup>, Inna Lysnyansky<sup>5</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>

A *Mycoplasma iowae* nagy gazdasági jelentőségű, világszerte elterjedt baktérium, mely csökkent keltethetőséget és lábdeformitásokat okoz fiatal pulykákban. Jelenleg nem érhető el ellene vakcina, így a megfelelő antibiotikum terápia az egyetlen módja a gazdasági károk csökkentésének. A kórokozók antibiotikum érzékenységi profiljának gyors és hatékony meghatározása alapvető fontosságú a megfelelő kezelés kiválasztásában.

Célunk, hogy az emelkedett minimális gátló koncentráció (MIC) értékekkel összefüggésbe hozható pontmutációk segítségével olyan molekuláris biológiai rendszert fejlesszünk, mellyel gyorsan és hatékonyan meghatározhatjuk a *M. iowae* fluorokinolon, makrolid és linkozamid érzékenységét.

A kísérlet első lépéseként meghatároztuk 99 ismert antibiotikum érzékenységi profillal rendelkező, változatos eredetű *M. iowae* törzs teljes genom szekvenciáját. Antibiotikum-rezisztencia kapcsolt génekben kerestünk olyan pontmutációkat, melyek összefüggést mutatnak az emelkedett MIC értékekkel. A megfelelő régióra mismatch amplification mutation assay-t (MAMA) terveztünk. A rendszerben használt egyik allél specifikus primerre egy 15-20 bázispár (bp) hosszúságú GC-farok kerül, mely lehetővé teszi a genotípusok megkülönböztetését a termékek mérete, illetve olvadási hőmérséklete alapján.

A *gyrA*, *parC* és 23S rRNS génekben sikerült azonosítani azokat az SNP-ket (single nucleotide polymorphism), melyek alkalmasak voltak a MAMA rendszer fejlesztésére. A *gyrA* génszekvenciában egy szerin és fenilalanin csere van jelen. A mutációra specifikus rendszer érzékenysége  $10^2$  templát kópia/ $\mu$ l. A *parC* génben egy izoleucin és szerin csere látható, a MAMA érzékenysége itt  $10^3$  templát kópia/ $\mu$ l. A 23S rRNS génben a 2059. pozícióban mind a négy nukleotid megtalálható, ezért olyan rendszert terveztünk, mely négy különböző specifikus primert tartalmaz, ezzel  $10^5$  templát kópia/ $\mu$ l érzékenységet elérve.

A makrolidokra és linkozamidokra specifikus 23S rRNS rendszer jelenleg csak szintenyészetekre alkalmazható, viszont jelentősen gyorsabb, mint a hagyományos antibiotikum érzékenységi vizsgálat. A *gyrA* és *parC* mutációkat célzó MAMA módszerek hatékony, klinikai mintákon is alkalmazható rendszereknek mutatkoznak az emelkedett MIC értékkel rendelkező *M. iowae* törzsek azonosítására fluorokinolonok esetén.

A kutatást a FK21 (137809), SA-27/2021, TKP2021-EGA-01 és az RRF-2.3.1-21-2022-00001 pályázatok, valamint az ITM Kooperatív Doktori Programja támogatták.

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet<sup>1</sup> Bakteriológia  
Fertőző állatbetegségek, antimikrobiális rezisztencia, állatorvosi közegészségügy és  
élelmiszerlánc-biztonság Nemzeti Laboratóriuma<sup>2</sup>  
ÁTE, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék<sup>3</sup>  
\*foldi.dorottya@vmri.hun-ren.hu

## INAKTIVÁLT *MYCOPLASMA HYORHINIS* VAKCINA FEJLESZTÉS

Földi Dorottya<sup>1,2\*</sup>, Nagy Eszter Zsófia<sup>1,2</sup>, Belecz Nikolett<sup>1,2</sup>, Tóth Lilla<sup>1,2</sup>, Szeredi Levente<sup>2,3</sup>,  
Tenk Miklós<sup>2,3</sup>, Kollár Anna<sup>2,3</sup>, Gyuranecz Mikós<sup>1,2,3</sup>

A *Mycoplasma hyorhinis* egy fakultatív kórokozó, ami választási malacokban okoz súlyos ízület- és savóshártyagyulladásal járó kórképet. Az elmúlt években a baktérium előfordulási gyakorisága megnőtt, védekezni azonban jelenleg csak antibiotikum terápiával lehetséges ellene.

Célunk volt egy hatékony védelmet nyújtó inaktivált *M. hyorhinis* vakcina fejlesztése és a vakcinajelöltek hatékonyságának vizsgálata állatkísérletben.

Az antigén előállításához egy klinikai izolátumot használtunk. Ezt a *M. hyorhinis* törzset nagy mennyiségben elszaporítottuk, majd inaktiválás előtt centrifugálással töményítettük. Az inaktiválást kémiai módszerrel végeztük és a kapott antigént három féle adjuvánssal elegyítettük a gyártók utasításai szerint. Az adjuvánssok összetételükben különböztek egymástól, így ásványi és nem ásványi olaj tartalmú készítményeket is kipróbáltunk. Az elkészült vakcinajelölteket három hetes malacokba oltottuk izomba, majd három hét elteltével (hat hetesen) fertőztük őket a korábban felállított fertőzési modellnek megfelelően két egymást követő nap intravénásan. A három vakcinázott csoport mellett, egy fertőzési és egy negatív kontroll csoportot is vizsgáltunk. A kísérlet során rögzítettük a malacok súlygyarapodását, testhőmérsékletét, oltási reakcióit és klinikai tüneteit. Majd a fertőzést követő harmadik héten az állatokat leöltük és kórbonctani vizsgálatot végeztünk, illetve mintát gyűjtöttünk bakteriológia, PCR és *M. hyorhinis* tenyésztés céljából.

Az eredményeink alapján az egyik ásványi olaj tartalmú adjuvánssal készített vakcinajelölt hatékony védelmet biztosít a *M. hyorhinis* fertőzéssel szemben állatházi körülmények között. Ebben a csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a klinikai és kórbonctani elváltozásokat mutató állatok száma, mint a fertőzött csoportban. Illetve ebben a csoportban a vizsgált szervekben *M. hyorhinis* jelenlétét sem tudtuk kimutatni. Ezzel szemben a másik két vakcinajelöltet kapó csoportban szignifikáns különbséget nem tudunk kimutatni a fertőzött csoporthoz képest.

Eredményeink alapján a vizsgált három vakcinajelölt között találtunk egy hatékony védelmet nyújtó jelöltet. A továbbiakban ezzel a készítménnyel tervezünk vizsgálatokat végezni nagyobb állatlétszám mellett, illetve telepi körülmények között.

A kutatást a MTA Lendület program (LP2022-6/2022) és a „Nemzeti Laboratóriumok létrehozása, komplex fejlesztése” pályázat (RRF-2.3.1-21-2022-00001) és a Huvepharma NV támogatták.



## MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS TÖRZSEK VIZSGÁLATA GENOMOT CÉLZÓ ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLATTAL (GWAS)

Kovács Áron Botond<sup>1,\*</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Bekő Katinka<sup>1</sup>, Gróznér Dénes<sup>1</sup>, Bali Krisztina<sup>1</sup>, Hrivnák Veronika<sup>1</sup>, Chris J. Morrow<sup>2</sup>, Bányai Krisztián<sup>1,3</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,3</sup>

A *Mycoplasma anserisalpingitidis* egy elsősorban ludakban előforduló baktérium, azonban más vízibaromfikat is megfertőzhet. A kórokozó főként szaporodásbiológiai problémákat idéz elő, melyek jelentős gazdasági károkhoz vezethetnek az érintett libatelepeken. Jelenleg nem kapható kereskedelmi forgalomban vakcina, a fertőzések által okozott károk mérséklése érdekében antibiotikus gyógykezelésre van lehetőség. A védekezésben komoly problémát jelent az egyre terjedő antibiotikum rezisztencia, melynek vizsgálatára az időigényes leves mikrohígítási módszer áll rendelkezésre.

A vizsgálat célja a gyűjteményünkben megtalálható *M. anserisalpingitidis* törzsek érzékenységének vizsgálata kilenc antibiotikummal szemben, a törzsek genomjának megszekvenálása, illetve a szekvenciák és a fenotípusok közötti összefüggések feltérképezése GWAS segítségével.

A vizsgálatba 110 *M. anserisalpingitidis* törzset vontunk be, melyekkel szemben leves mikrohígítási módszerrel meghatároztuk kilenc antibiotikum minimum gátló koncentrációját (MIC – Minimum Inhibitory Concentration): spektinomycin, linkomicin, tiamulin, enrofloxacin, doxiciklin, oxitetraciklin, tilmikozin, tilozin, tilvalozin. Ugyanezen törzseknek a GenBank adatbázisban elérhető teljes genomjait a SPAdes szoftverrel illesztettük össze, majd k-merekre („k” hosszúságú szekvenciák) bontottuk fel a genomokat. A fenotípusok (MIC) és a genotípusok (k-mer) összevetését a *pyseer* szoftverrel végeztük el. Ezt követően az R szoftver segítségével a CMplot algoritmussal Manhattan plotokat hoztunk létre.

A GWAS statisztikai elemzésekben alacsonyabb *p* értéket alkalmazunk a többszörös összehasonlítás miatt, jelen esetben  $5 \times 10^{-8}$ -nál kisebb vagy egyenlő értékeket. Több esetben is zavaró jelet tapasztaltunk az eredményekben, ami miatt öt atipikus *M. anserisalpingitidis* törzset kizártunk a vizsgálatokból, így végül hét antibiotikum esetén sikerült szignifikáns k-mereket találni. A szignifikáns szekvencia szakaszok gyakran olyan génekben fordultak elő, melyeket korábban már leírtak antibiotikum rezisztenciával kapcsolatban, mint a különböző tRNS ligázokat vagy efflux pumpa tagjait kódoló gének. Emellett számos hipotetikus proteint kódoló gén is szignifikáns asszociációt mutatott a csökkent antibiotikum érzékenységgel.

A szignifikáns asszociációkat mutató k-merekre molekuláris biológiai módszerek tervezhetőek, melyek jelentősen felgyorsíthatják a baktérium antibiotikum érzékenységének diagnosztikáját. Emellett a k-mereket tartalmazó gének további vizsgálatai új, potenciális rezisztencia útvonalakat fedhetnek fel.

A kutatást az RRF-2.3.1-21-2022-00001, KKP19 (129751), SA-27/2021, TKP2021-EGA-01 pályázatok és az ITM Kooperatív Doktori Programja támogatták.

## ÚJ, ÉLŐ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* VAKCINAJELÖLT TÖRZS VIZSGÁLATA

Kreizinger Zsuzsa<sup>1\*</sup>, Nagy Dorottya Sára<sup>1</sup>, Buni Dominika<sup>1</sup>, Gróznér Dénes<sup>1</sup>, Gyuris Éva<sup>2</sup>, Thuma Ákos<sup>2</sup>, Makrai László<sup>3</sup>, Tenk Miklós<sup>3</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Bányai Krisztián<sup>1,3</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Költő Karola<sup>1</sup>, Sulyok Kinga<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,3</sup>

A *Mycoplasma gallisepticum* fertőzésekkel szemben a hosszú távú védekezési lehetőség a vakcinázás, ha a mentesítés nem kivitelezhető. A jelenleg forgalomban lévő vakcinák hatékonysága változó, ezek közül az élő, attenuált törzsek bizonyultak a legalkalmasabbnak az állományok immunizálására.

Azonosítottunk egy természetes úton attenuálódott *M. gallisepticum* törzset, melyet genetikai és fenotípusos karakterizálások után kolonizációs és hatékonysági kísérletekben is vizsgáltunk, hogy megállapítsuk a törzs alkalmasságát egy új vakcina kifejlesztésére.

Meghatároztuk a vizsgált *M. gallisepticum* törzs teljes genom szekvenciáját (Illumina új-generációs szekvenálási platformon), a háztartási gének vizsgálatán alapuló multi-locus sequence typing (MLST) profilját, valamint összehasonlítottuk a hőmérséklettűrő képességét 33°C és 39°C-on leves mikrohígítási módszerrel. Ezekután állatkísérletek során a baktérium tenyészetet szemcsepp formájában juttattuk hét hetes Tetra-SL tojócsirkékbe. A vakcinázást követő 14. napon a törzs ártalmatlanságát ellenőriztük vakcinázott és negatív kontroll madarak összehasonlító kórbonctani és kórszöveti vizsgálataival, a légzőszervrendszerre összpontosítva. Emellett tampon mintákat vettünk a vakcinajelölt törzs szervezetben belüli megtelepedésének és terjedésének felmérésére PCR és tenyésztési vizsgálatokkal, és elemeztük a vakcinázott madarak szerológiai áthangolódását *M. gallisepticum* specifikus ELISA tesztel. A vakcinázást követő 21. napon a vakcinázott és pozitív kontroll madarakat fertőztük egy erősen virulens *M. gallisepticum* tenyésztéssel szemcsepp és belélegeztetés útján. A ráfertőzés után két héttel a kísérletet lezártuk és a madarakat az ártalmatlansági vizsgálatoknál alkalmazott módszerekkel vizsgáltuk.

A kísérletek során megerősítettük korábbi eredményeinket, miszerint a vizsgált *M. gallisepticum* törzs klinikai tüneteket, kóros elváltozásokat nem vált ki, és a vakcinázott madarakban nem okoz szerokonverziót. A laboratóriumi körülmények között történt ráfertőzés során pedig szignifikáns különbségeket találtunk a vakcinázott és a csak fertőzött csoportok között, ami a kiválasztott törzs immunizáló képességét bizonyítja.

Eredményeink alapján potenciálisan alkalmasnak találtuk a vizsgált *M. gallisepticum* törzset egy új, hatékony vakcina kifejlesztésére. Mutagenezissel tervezzük a törzs további legyengítését, valamint a vakcinafejlesztéshez szükséges vizsgálatok elvégzését, hogy a későbbiekben egy biztonságos és hatékony vakcinával támogathassuk az antibiotikumhasználat visszaszorítását a baromfiiparban, a madarak egészségének megőrzése mellett.

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet<sup>1</sup> Bakteriológia  
Fertőző állatbetegségek, antimikrobiális rezisztencia, állatorvosi közegészségügy és  
élelmiszerláncbiztonság Nemzeti Laboratóriuma<sup>2</sup>  
ÁTE, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék<sup>3</sup>  
Autovakcina Kft.<sup>4</sup>  
SzE, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori  
Iskola<sup>5</sup>  
\*nagy.eszter.zsofia@vmri.hun-ren.hu

## MYCOPLASMA HYOPHARYNGIS IZOLÁLÁSA ÍZÜLETGYULLADÁSBAN SZENVEDŐ SERTÉSEKBŐL, ILLETVE REAL-TIME PCR RENDSZER FEJLESZTÉSE A KÓROKOZÓ KIMUTATÁSÁRA

Nagy Eszter Zsófia<sup>1,2\*</sup>, Földi Dorottya<sup>1,2</sup>, Wehmann Enikő<sup>1,2</sup>, Tóth Gergely<sup>2,3</sup>, Makrai László<sup>4</sup>,  
Gombos László<sup>5</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1,2</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2,3</sup>

A *Mycoplasma (M.) hyopharyngis* a sertések felső légútjában megtalálható, jelenleg apatogénként ismert baktérium, mely az elmúlt évek során mandulák mellett más szervekből is kimutatásra került. Azonban a kórokozó előfordulási gyakoriságáról, illetve esetleges kóroktani szerepéről kifejezetten kevés ismerettel rendelkezünk.

Kutatásunk fő célja egy esetismertetés, mely során gyulladt ízületből *M. hyopharyngis* jelenlétét mutattuk ki, emellett célkitűzéseink között szerepelt egy TaqMan-típusú real-time PCR rendszer fejlesztése.

A vizsgált állomány teljes újra telepítése után két nappal, hasmenéssel és septicaemiával járó megbetegedést tapasztaltak. A levett mintákból *Salmonella enterica* serovar Typhimurium jelenlétét mutatták ki. Az első fialást követően ízületgyulladás volt megfigyelhető a 21-25 napos malacok között, illetve nagy mértékű elhullást figyeltek meg. A malacok érintett ízületeiből, bélből, lépéből és mesenterialis nyirokcsomóból mintavétel történt. A *M. hyopharyngis* real-time PCR primerek és probe tervezéséhez a jelenleg elérhető 16S rRNS szekvenciákat vettük alapul.

A sertésállományt érintő bakteriológiai vizsgálatok során az ízületi mintából *Aerococcus viridans*, *M. hyopharyngis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus agalactiae* és *Trueperella pyogenes* baktériumot sikerült kimutatni. Emellett a béltampon mintából *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* került kitenyésztésre, míg a lép és mesenterialis nyirokcsomó bakteriológiai vizsgálata nem vezetett eredményre. A fejlesztett PCR rendszer érzékenysége és specificitása is megfelelőnek bizonyult.

Az ízületgyulladásból kimutatott fakultatív patogén kórokozók fertőzőképességét valószínűsíthetőleg a szervezet csökkent ellenálló képessége befolyásolta, melyet a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fertőzés is kiválthatott. Ez a második olyan tanulmány, mely ízületi gyulladással járó elváltozásból *M. hyopharyngis* jelenlétét írja le, ami felhívja a figyelmet a kórokozó vizsgálatának fontosságára. A fejlesztett PCR rendszer alkalmas a *M. hyopharyngis* előfordulásának felmérése, illetve hozzájárul esetleges sertés egészségügyi jelentőségének feltárásához.

A kutatást a MTA Lendület program (LP2022-6/2022) és a „Nemzeti Laboratóriumok létrehozása, komplex fejlesztése” pályázat (RRF-2.3.1-21-2022-00001) támogatta.

## MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS EFFLUX PUMPA MECHANIZMUSÁNAK FENO- ÉS GENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA

Nagy Eszter Zsófia<sup>1</sup>, Kovács Áron Botond<sup>1</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Bekő Katinka<sup>1</sup>, Földi Dorottya<sup>1</sup>,  
Bányai Krisztián<sup>1,2</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1</sup>

A *Mycoplasma anserisalpingitidis* vízibaromfik körében jelentős, kloáka- és nemi utak gyulladásáért felelős kórokozó. A nem megfelelő antibiotikum használatnak köszönhetően számos esetben tapasztalunk csökkent érzékenységet, melynek hátterében a génmutációk mellett az emelkedett aktivitású efflux pumpa mechanizmus is szerepet játszhat.

Kutatásunk legfőbb célja a *M. anserisalpingitidis* fenotípusos vizsgálata három efflux pumpa gátló szer jelenlétében, illetve az efflux pumpa mechanizmus genetikai hátterének felderítése.

Vizsgálatainkhoz olyan, három-három *M. anserisalpingitidis* törzset választottunk, melyekkel szemben a vízibaromfi telepeken leggyakrabban használt antibiotikumok alacsony-, vagy emelkedett minimális gátló koncentrációt (minimal inhibitory concentration, MIC) mutattak. Emellett az alacsony MIC értékkel rendelkező tenyészetekből is készítettünk az antibiotikumoknak fokozottan ellenálló változatokat. Ezt követően meghatároztuk a kiválasztott törzsekkel szembeni MIC értékeket különböző efflux pumpa gátlók jelenlétében (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP), orthovanadate (OV) és reserpine (R)). Emellett elvégeztük a fokozottan ellenállóvá nevelt változatok teljes genom szekvenálását és összehasonlító elemzését a szülői törzsekkel. Vizsgáltuk továbbá az efflux pumpa gének kifejeződését szabályozó régiók lehetséges szekvenciáit *in silico* módszerek alkalmazásával.

Az antibiotikum érzékenység meghatározása során a CCCP alkalmazása szignifikánsan csökkentette a MIC értékeket az esetek jelentős részében (23/36), míg a gátló koncentrációk OV (24/36) és R (9/36) jelenlétében minimálisan módosultak. Az összehasonlító teljes genom elemzés során hét, az efflux pumpa mechanizmusban szerepet játszó fehérjét kódoló génen határoztunk meg olyan pontmutációt, mely jellemzően a csökkent érzékenységet mutató törzsekben fordult elő. Emellett az enrofloxacin esetében az emelkedett MIC érték összefüggést mutatott egy, a DNA gyrase subunit A (*gyrA*) génben található pontmutációval. Az *in silico* vizsgálatok során meghatároztunk továbbá olyan genom szakaszokat, melyek feltételezhetően részt vesznek a gén kifejeződés szabályozásában.

Ez az első tanulmány, mely *M. anserisalpingitidis* efflux pumpa mechanizmusát vizsgálja. A CCCP hatékonyságát tekintve feltételezhető, hogy a jövőben a különböző efflux pumpa gátlók alkalmazása segítheti az antibiotikum rezisztencia kialakulásának megelőzését.

A kutatás az RRF-2.3.1-21-2022-00001, KKP19 (129751), ELKH SA-27/2021 és TKP2021-EGA-01 pályázatok támogatásával valósult meg.

## ÚJ, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI RENDSZEREK FEJLESZTÉSE VÍZIBAROMFI MYCOPLASMÁK GYORS ÉS ÉRZÉKENY KIMUTATÁSÁRA

Nemesházi Edina<sup>1</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Gróznér Dénes<sup>1</sup>, Nagy Dorottya Sára<sup>1\*</sup>, Kovács Áron Botond<sup>1</sup>, Földi Dorottya<sup>1</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

A vízibaromfikat fertőző mycoplasmák világszerte jelentős gazdasági károkat okoznak. Az ebbe a csoportba tartozó baktérium fajok közül a *Mycoplasma anatis* túlnyomórészt kacsákat fertőz, a *M. anseris* és *M. cloacale* pedig libákban és vadmadarakban található meg. A fertőzés során a nemi szervek és kloáka gyulladása figyelhető meg, valamint légzőszervi-és neurológiai problémák is jelentkezhetnek, gazdasági jelentőségük pedig az okozott csökkent tojáshozamban és megnövekedett embrióhalálozásban rejlik. Ezen mycoplasmák klinikai és gazdasági jelentősége miatt fontos a fertőzés gyors és pontos kimutatása.

Kutatócsoportunk korábbi, fajspecifikus, hagyományos polimeráz láncreakció (PCR) rendszereket fejlesztett e fajok kimutatására. Vizsgálatainkban gyorsabb, pontosabb és érzékenyebb, valós-idejű PCR rendszerek fejlesztését tűztük ki célul.

A fajspecifikus TaqMan PCR rendszerekhez a primerek és próbák megtervezésénél a törzsek annotált teljes genomját használtuk fel. Összesen 28 háztartási gént vizsgáltunk, melyek adott fajra jellemző szekvenciákkal rendelkeztek. A tervezés után a primereket optimalizáltuk és azonos hőprofilhoz igazítottuk. A rendszerek megbízhatóságát az adott fajba tartozó 20 törzsön, valamint további, vízibaromfikat fertőző baktériumfajokhoz tartozó 84 törzsön teszteltük. Ezen felül megvizsgáltunk 32 klinikai mintából származó DNS mintát is, melyek eredményeit összevetettük a hagyományos PCR rendszerek eredményeivel.

Összesen négy rendszert fejlesztettünk és teszteltünk, melyek az adott fajokban lévő géneket célozzák: *M. anseris* (*Mans-dnaN*; DNS polimeráz III béta alegység gén), *M. cloacale* (*Mclo-deoC*; deoxiribóz-foszfát aldoláz gén), valamint *M. anatis* (*Mana-cdd* és *Mana-ylxR*; citidin deamináz and YlxR család protein gének). A kifejlesztett TaqMan PCR rendszerek 100%-os specificitást és magas érzékenységet mutattak, ezzel lehetővé téve az alacsony koncentrációjú, akár 10 vagy 100 kópia/μl DNS jelenlétének kimutatását is. A valós-idejű PCR és a hagyományos PCR kapott eredményei megegyeztek mind a 32 klinikai mintánál *M. cloacale* és *M. anseris* specifikus rendszerek esetében. A hagyományos PCR alapján *M. anatis* pozitív minták közül három (30%,  $n=3/10$ ) negatívnak bizonyult a valós idejű PCR során.

A vizsgálataink során kimutattuk, hogy amíg a kifejlesztett TaqMan PCR rendszerek megbízhatóan használhatók a *M. anatis* fajspecifikus kimutatására, addig a már meglévő hagyományos PCR rendszer fals pozitív eredményt adhat. Összességében tehát az új TaqMan PCR rendszerek megbízhatóak, megfelelő érzékenységgel rendelkeznek és alkalmasak a klinikai diagnosztikában való használatra.

A kutatást a KKP19 (129751), az FK21 (137809), az ELKH SA 27/2021, a TKP2021-EGA-01 és az RRF-2.3.1-21-2022-00001 pályázatok, valamint az ITM Kooperatív Doktori Programja (KDP-2020) támogatták.

## KÜLÖNBÖZŐ ÁLLATFAJOKBÓL IZOLÁLT *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK FENOTÍPUSOS ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA

Pintér Krisztina<sup>1\*</sup>, Pollák Boglárka Dóra<sup>1</sup>, Makrai László<sup>2</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>

Az antibiotikum-rezisztencia terjedése korunk legnagyobb kihívásai közé tartozik, amely megnehezíti a bakteriális betegségek gyógykezelését. A *Pasteurella multocida* számos emlős-, és madárfaj megbetegítéséért felelős, világszerte elterjedt baktériumfaj. A kórokozó antibiotikum-érzékenységének meghatározására számos módszer létezik. A gyakorlatban legelterjedtebb, diffúzió alapuló vizsgálat a korongdiffúzió, de az utóbbi időben egyre nagyobb teret nyer a leveshígítós mikromódszer is, mely segítségével megállapíthatjuk az antibiotikumok minimális gátlókoncentráció (MIC) értékét. Magyarországon eddig csak kevés adat állt rendelkezésre a *P. multocida* törzsek MIC-értékeire vonatkozóan.

Ezért célul tűztük ki, hogy bővítsük a MIC-értékek adatbázisát, valamint összehasonlítsuk a két különböző módszer által biztosított eredményeket.

A vizsgálataink során 143 darab *P. multocida* törzs fenotípusos érzékenységének meghatározását végeztük el az előbb említett két módszer segítségével és különböző antibiotikum osztályokat képviselő antimikrobiális szerek felhasználásával. A jellemzésre szánt törzsek madár (118 db), illetve szarvasmarha (25 db) eredetűek voltak, melyeket Magyarországon (87 db) és Franciaországban (56 db) izoláltak.

Mindkét módszerrel kimutattuk, hogy pasteurellosis ellen a leghatékonyabb antibiotikumok közé a ceftiofúr, tetraciklin, doxiciklin, és a florfenikol sorolható, míg a vizsgált törzsek 100%-os rezisztenciát mutattak klindamicinnel szemben. Munkánk során 11 darab multirezisztens (MDR) törzset figyeltünk meg korongdiffúziós módszert alkalmazva, míg a MIC-értékek alapján 9 db MDR törzset mutattunk ki. Ezek között 5 darab törzs volt az átfedés. Az MDR törzsek a gazdafajt figyelembe véve közel azonos arányban kerültek izolálásra. A földrajzi elhelyezkedést vizsgálva azonban Magyarországról nagyobb arányban mutattunk ki MDR törzseket.

A két ország törzseinek antibiotikum-érzékenységi profiljában mutatkozó eltérések mögött valószínűleg az eltérő kezelési protokoll állhat. A két módszer során tapasztalt eltérések okának feltárása különösen fontos; a későbbiekben sor kerül majd a rezisztenciáért felelős genetikai háttér felderítésére is. Az MDR törzsek kiszűrése céljából elengedhetetlen a célzott kezelés előtti antibiotikum-érzékenységi profil felállítása, és az erre legmegbízhatóbb módszer megtalálása. Hiszen egy jól megválasztott antibiotikum nem csak a gyógykezelést tenné sikeresebbé, de a rezisztencia terjedését, valamint az MDR kialakulását is lassíthatná, mellyel időt nyerhetünk más alternatívák kidolgozására.

A vizsgálatokat a TKP-2021-EGA-01 és az Állatorvostudományi Egyetem normatív kutatásfinanszírozás (NKB) pályázatok biztosították.

## PASTEURELLA MULTOCIDA TÖRZSEK GENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE

Pintér Krisztina<sup>1\*</sup>, Pollák Boglárka Dóra<sup>1</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Makrai László<sup>2</sup>, Solymosi Norbert<sup>3</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>

A *Pasteurella multocida* mind állat-, mind közegészségügyi szempontból jelentős baktériumfaj, melynek törzsei nagyfokú fenó- és genotípusos változékonyságot mutatnak. A törzsek részletes jellemzésével lehetőségünk nyílik az általa okozott kórformák dinamikájának megismerésére, mely elősegíti azok megelőzését, illetve gyógykezelését.

Célunk hazai, illetve francia törzsek genotípusos jellemzése volt, elsősorban a virulencia-, valamint antibiotikum-rezisztenciagénekre fókuszálva. Munkánk során összefüggéseket kerestünk a virulenciagének jelenléte vagy hiánya alapján felállított virulenciagén profil (VGP), a baktériumtörzsek Multi-host MLST szekvenciatípusa (ST), valamint gazdafaji eredete között.

A vizsgálatba azokat a törzseket válogattuk be, melyek egy korábbi fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálat során vagy multirezisztenciát (MDR (n=14)), vagy pedig egyedi rezisztencia profilt mutattak. Végül 66 darab törzs DNS kivonására, valamint teljes genom szekvenálására került sor. A kapott szekvenciák referencia genomokhoz való illesztését követően a *fimA*, *nanH*, *hgbA*, *hgbB*, *hsf-1*, *hsf-2*, *tbpA*, *pfhA*, *tadD*, *ptfA* virulenciagének, illetve a *catIII*, *tetB*, *tetH*, *strA*, *sul2*, *msrE*, *mphE*, *erm(42)*, *aph(3'')-lb*, *aph(3')-la*, *aph(6)-ld* antibiotikum-rezisztenciagének jelenlétét elemeztük.

A vizsgált törzsek 100%-a rendelkezett a *fimA*, valamint a *ptfA* génnel. A további virulenciagének eloszlási aránya a következőképpen alakult: *hgbA* (98,5%), *hsf-2* (90,9%), *nanH* (83,3%), *hgbB* (62,1%), *tadD* (54,5%), *pfhA* (51,5%), *tbpA* (37,9%), *hsf-1* (31,8 %). A kialakult mintázatok alapján a törzseket VGP csoportokba soroltuk. A legtöbb törzs az első csoportba került (ST:1, 3, 197, n=14), de gyakori volt továbbá a 9. (ST:11, 84, 200, n=7), 12., (ST:27, 29, 32, n=7), 15. (ST:124, n=6), illetve a 22. (ST:19, 65, 136, 142, 190, n=5) VGP csoport is. Egyetlen törzs sem rendelkezett *erm(42)* génnel, míg 1 törzsből az *msrE*, *mphE*, *aph(3')-la*, 2-ből a *catIII*, *tetB*, 3-ból az *aph(6)-ld*, 5-ből a *strA* és *aph(3'')-lb*, 6-ból pedig a *tetH*, és a *sul2* géneket sikerült azonosítani. Összeségében elmondható, hogy a leírt géneket nagyobb arányban mutattuk ki a korábban már MDR-nek bizonyult törzsekből. Megfigyeltünk azonban 4 olyan törzset is, melyek ugyan rendelkeztek a *strA*, *aph(3'')-lb*, *tetH*, illetve a *sul2* génnek valamelyikével, azonban a fenotípusos vizsgálatokban nem bizonyultak rezisztensnek. Ezzel ellentétben 6 MDR törzsnél nem tudtunk kimutatni egyetlen rezisztenciagént sem.

Megállapítottuk, hogy az általunk felállított VGP csoportokba meghatározott ST törzsek kerültek. Az eddigi adatok alapján összefüggés figyelhető meg a törzsek gazdafaji eredete, buroktípusa és szerotípusa között is. További antibiotikum-rezisztenciagének azonosítása céljából a jövőben az MDR törzsek esetleges plazmidjait is megvizsgáljuk.

A vizsgálatokat a TKP-2021-EGA-01 és az Állatorvostudományi Egyetem normatív kutatásfinanszírozás (NKB) pályázatok biztosították.

## HAZAI *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE ÉS ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGÜK VIZSGÁLATA

Pollák Boglárka Dóra\*, Pintér Krisztina, Wehmann Enikő, Magyar Tibor

Az *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) világszerte elterjedt, pulykákban és csirkékben elsősorban légúti tünetekkel járó, fertőző megbetegedést okozó baktérium. Horizontális terjedése főleg aeroszollal és itatóvízzel történik, de a vadmadarak is fertőzési forrást jelenthetnek. Az egyes földrajzi régiókban engedélyezett szerektől, azok túlzott használatától függően az egyes antibiotikumokkal (AB) szembeni érzékenység széles határok között mozog, a multirezisztens izolátumok aránya pedig évről-évre növekszik. Az ORT esetében még ma is a korongdiffúziós módszer a legelterjedtebb az AB szembeni érzékenység vizsgálatára, a szakirodalomban alig találni leírást leves mikrohígítási módszerrel történő minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásáról.

A kutatás célja a 90-es évek végétől napjainkig pulykából, csirkéből, galambból és ragadozó madárfajokból izolált ORT törzsek fenotípusos jellemzőinek (szerotípus, hemolitikus aktivitás, telepmorfológia) vizsgálata, egyes AB-okkal szembeni érzékenység meghatározása újonnan kidolgozott leves mikrohígítási módszerrel. Továbbá elemezzük egyes gének, illetve mutációk meglétét/hiányát a rezisztencia hátterében álló genetikai tényezők felderítésére. A vizsgálatokkal lehetőség nyílik a rezisztencia és a fenotípus szintjén megnyilvánuló tulajdonságok közötti összefüggések feltárására.

A szintenyészetek telepmorfológiáját és a hemolízist borjúvérrel kiegészített TSA-n, a szerotípust AGP módszerrel vizsgáltuk. Az optimális tápleves kiválasztását követően kezdtük el a mikrohígítási módszer tesztelését 4 különböző csoportba tartozó AB-al, a MIC-értékek meghatározása resazurin-tartalmú festék színreakcióján alapult. A tesztelt törzsek közül 6 esetben rendelkezünk teljes genom szekvenciával, az illesztést, illetve a gének annotálását a BV-BRC platform és a Geneious Prime szoftverrel végeztük.

A vizsgált törzsek (n=36) között legnagyobb arányban az alfa hemolízis, a közepes telepméret és az A szerotípus fordult elő. Tetraciklin (TET) MIC értékekben gazdafaj szerinti eloszlás volt megfigyelhető (pulyka és csirke -  $16 \leq 4 \mu\text{g/mL}$ , vadmadár -  $0,125-0,03 \geq \mu\text{g/mL}$ ). A vizsgált törzsekben TET rezisztenciával összefüggő *tetQ* és *tetX* géneket azonosítottunk. Az amoxicillin MIC értékei minden gazdafaj csoportban 2 tartományba oszlottak ( $32-2$  és  $0,25-0,06 \geq \mu\text{g/mL}$ ). A béta-laktamáz kódoló *ORR-1* gén megtalálható volt a  $4 \mu\text{g/mL}$  értékkel, de a  $0,06 \geq$  és  $32 \mu\text{g/mL}$  MIC-el rendelkező törzsekben nem, így szerepe kérdéses. Enrofloxacinál (ENRO) a pulyka és csirke-eredetű törzsek a  $8 \leq - 1$ , a vadmadár izolátumok a  $0,06-0,015 \geq \mu\text{g/mL}$  intervallumokban voltak. A *gyrA* génben található SNP-k és az ENRO MIC értékek között lehet kapcsolat, a *gyrB*, *parC* és *parE* esetében ilyen összefüggést nem mutattunk ki. Kloramfenikol esetében a legtöbb törzsben (gazdafajtól függetlenül)  $4$  és  $2 \mu\text{g/mL}$  MIC értéket mértünk.

Elsőként vizsgáltuk párhuzamosan az ORT genotípus-szintű és *in vitro* AB rezisztenciáját; a *tet* gének és a TET rezisztencia, valamint a *gyrA* génben található mutációk és az ENRO érzékenység között összefüggés feltételezhető. További vizsgálataink hozzájárulhatnak olyan diagnosztikai módszer kidolgozásához, mely támogatja az állatorvosokat a célzott antibiotikus kezelés kiválasztásában.

A kutatást a TKP2021-EGA-01 pályázat támogatta.



## INTERFERON- $\gamma$ TERMELÉS MEGHATÁROZÁSA EGÉR LÉPSEJTEKBŐL

Tóth Lilla<sup>1,2\*</sup>, Földi Dorottya<sup>1,2</sup>, Gyuranecz Mikós<sup>1,2</sup>

A vakcinázás (immunizálás) hatására bekövetkező celluláris immunreakciót a T sejtek interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) termelésének meghatározásán keresztül tudjuk a legjobban értékelni. Egerekben a sejtes immunválaszt lépsejtekből határozzuk meg: lépből izolált sejtek stimulálását követően módunk van a szekretált IFN- $\gamma$  mennyiségnek kimutatására egér IFN- $\gamma$  specifikus ELISA módszerrel. Célunk az egér lépsejteken történő vizsgálat beállítása, amely a későbbiekben akár vakcinahatékonysági tesztek elvégzésére is alkalmas lehet.

A rendszer beállításához vakcinázáson át nem esett, tíz hetes BALB/c nőstény egereken végeztünk kísérleteket. Az egerek lépének eltávolítása után a lépet homogenizáltuk, a kinyert sejtekből a vörösvértesteket eltávolítottuk. Ezt követően a sejteket sejttenyésztő lemezen különböző módon stimuláltuk: az általunk vizsgált stimulus *Mycoplasma hyorhinis* antigén volt, Concanavalin A-t pozitív kontrollként kaptak a sejtek, a negatív kontroll sejtjei nem kaptak semmilyen stimulust. A *M. hyorhinis* antigént hat különböző törzs felszaporításából állítottuk elő és több módon kezeltük, annak eldöntése érdekében, hogy mely módon tudjuk a leghatékonyabb IFN- $\gamma$  termelést (vagyis sejtaktivációt) kiváltani: hőinaktivált, valamint két különböző detergenssel (Tween 20 és Triton X-100) kezelt *M. hyorhinis* adtunk a sejtekhez. A sejtek stimulálása 24, 48 és 72 órán keresztül történt. A termelt IFN- $\gamma$  mennyisége a sejtek felülcszójából került megállapításra a már említett egér IFN- $\gamma$  specifikus ELISA módszerrel.

Célunk volt meghatározni, hogy az izolált lépsejtek aktivációjához szükség van-e az állatok előzetes immunizálására? Valamint, hogy az általunk vizsgált stimulus (*M. hyorhinis* antigén) önmagában alkalmas-e a sejtek aktivációjára, vagy szükséges valamilyen előzetes kezelés (például detergenssel) ahhoz, hogy az immunogén részei hozzáférhetőek legyenek az eredményes lépsejt-aktivációhoz?

Eredményeink szerint a leghatékonyabb IFN- $\gamma$  termelést a hőinaktivált *M. hyorhinis* aktivációval érjük el 72 órás inkubáció mellett. Megállapítottuk továbbá, hogy a sejtek magas IFN- $\gamma$  termelésnek kiváltásához nem szükséges az állatok előzetes immunizálása.

Elmondhatjuk tehát, hogy a beállítottunk egy rendszert, amelynek segítségével egér lépsejtek IFN- $\gamma$  termelését tudjuk meghatározni és amely módszer a későbbiekben alkalmas lehet az immunizált egerek sejtes immunválaszának értékelésére, ezáltal pedig a különböző vakcinajelöltek hatékonyságának tesztelésére.

A kutatást a MTA Lendület program (LP2022-6/2022) és a „Nemzeti Laboratóriumok létrehozása, komplex fejlesztése” pályázat (RRF-2.3.1-21-2022-00001) támogatta.