

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

**A szarvasmarha vírusos hasmenését okozó vírus és az általa  
okozott kórképek vizsgálata**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Kóvágó Csaba**

**2016**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Iskolavezető**

*Dr. Vörös Károly*

egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Rusvai Miklós témavezető  
egyetemi tanár, az állatorvos-tudomány doktora  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Patológiai Tanszék

Dr. Egyed László  
tudományos munkatárs, Ph.D  
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi  
Intézet

Dr. Bakonyi Tamás  
egyetemi tanár, Ph.D.  
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

## 1. Bevezetés, célkitűzések

A szarvasmarhák vírusos hasmenését okozó vírus (bovine viral diarrhoea virus; BVDV) Európa számos országában vezető állategészségügyi probléma a szarvasmarha-állományokban. A vírus által okozott fertőzés változatos kórformákat idézhet elő, a szubklinikai fertőzöttségtől és szerológiai áthangolódástól kezdve, a súlyos hasmenéses kórképen és reprodukciós zavarokon keresztül, egészen az esetek jelentős részében fatális kimenetelű nyálkahártya betegségig (mucosal disease; MD). Az említett kórfolyamatok részben közvetlen veszteségeket okoznak a hasmenés és az elhullások révén, de emellett az okozott szaporodásbiológiai zavarok lényegesen csökkentik az állomány reprodukív kapacitását, a fertőzéssel járó immunszuppresszió pedig növeli a más (pl. fakultatív) kórokozók iránti fogékonyságot.

A kórokozó BVDV a *Flaviviridae* család *Pestivirus* genusába tartozik, és mára már világszerte elterjedt. A BVDV törzsek jelenleg két külön vírushalmazba (BVDV-1 és BVDV-2) tartoznak, melyek a hasonló nevű (szero)típusokat foglalják magukba. Ezek közül az utóbbi hosszabb ideig csak az amerikai kontinensen volt megtalálható, az elmúlt 10-15 évben azonban számos új területen, így Európában is kimutatták a jelenlétét. Hazánkban pillanatnyilag a BVDV-1 a meghatározó, BVDV-2-est még nem sikerült kimutatni.

A törzsek képesek transzplacentárisan megfertőzni a magzatot. Ha ez a fertőzés az immunkompetencia kialakulása előtt történik, akkor immuntolerancia alakulhat ki, és ezáltal a vírussal fertőzötten születő, és azt élethosszig hordozó, ún. perzisztensen fertőzött (persistently infected; PI) borjak jelennek meg az állományban. A perzisztens fertőzés kialakulása azért rendkívül veszélyes, mert a gazda ebben az esetben szeronegatív marad, így azonosítása a hagyományos szerológiai módszerekkel nem lehetséges, de egész élete során nagy mennyiségben üríti a fertőzőképes virionokat. Ezért a PI állattal vagy váladékaival érintkezve a csoport többi tagja is fertőződhet, aminek a következménye a szerokonverzió a korábban egészséges egyedeknél, és a már említett reprodukciós problémák a vemhes állatokban. A tartós vírushordozás másik következménye, hogy amennyiben a PI állatokban levő vírus genetikailag megváltozik (mutáció vagy rekombináció révén) akkor ezekben az egyedekben kialakulhat a nyálkahártya betegség. Vizsgálataink során mi is számos esetben talákoztunk (nem egyszer halmozottan jelentkező) nyálkahártya betegséggel.

Tekintve, hogy hazánkban 2014-ig nem jelent meg a BVDV fertőzöttség felméréséről az ország teljes területére kiterjedő vizsgálatok eredményeit összefoglaló közlemény, ezért a lehető legtöbb, nagy létszámú, magyarországi szarvasmarha telep bevonásával új szerológiai

vizsgálatsorozatot terveztünk. Vizsgálati módszernek a vírus ellen termelődő ellenanyagok vérsavóból történő kimutatását választottuk, mivel az ellenanyagok hosszan perzisztálnak a vérben, így megbízhatóbb adatokat kaphatunk a kórokozó prevalenciájával kapcsolatban, mint a direkt víruskimutató módszerek segítségével. Vizsgálatunk célja a járványtani adatgyűjtésen kívül az volt, hogy segítsük az önkéntes BVDV mentesítést. A fertőzöttség lehetőleg minél alaposabb felmérésének hiányában ugyanis nem lehet eredményesen megtervezni a mentesítés stratégiáját, hiszen a választható módszerek közül a fertőzöttség arányának ismerete alapján lehet kiválasztani a leghatékonyabb eljárást. Mivel Magyarországon is esedékes a BVDV elleni mentesítés elindítása, így a vírus prevalenciájának ismerete segíti a későbbi döntéshozatalt. Szerettük volna megtudni, hogy vannak-e olyan állományok a vizsgálatba bevontak között, amelyekben a vírus nincs jelen, mert az ezekből származó állatok lehetnek a forrásai a jövőben a kiselejtezendő tenyészanyag pótlásának a súlyosan fertőzött állományokban. A súlyosan fertőzött állományokban valószínűsíthető a PI egyedek jelenléte, melyek elősegítik a kórokozó folyamatos fennmaradását az állatokban.

Ugyancsak vizsgálni kívántuk egy új, a különböző statisztikai-analitikai módszereket ötvöző rekombináció-azonosító eljárást használva az új genotípusok megjelenését eredményező genetikai rekombinációk gyakoriságát és esetleges következményeit a BVDV evolúciójában. Ezt azért tartottuk lényegesnek, mert hazánkban is több évtizeden keresztül, kiterjedten használtak olyan élővírusos vakcinát, amely esetleg perzisztens fertőzést okozhatott, amennyiben vemhes állatok oltására használták. Továbbá, az ilyen oltóanyagot alkalmazó állományokban fennmaradva, új BVDV variánsok kialakulását indukálhatta szimultán fertőzések és következményes rekombinációk révén. Jelen kutatásunkban arra kerestük a választ, hogy a BVDV milyen, részben egyéb BVDV törzsekből, részben esetleg más pestivirusokból származó rekombinációkat hordozhat, és egyáltalán, mennyire tekinthető gyakorinak a rekombináció a BVDV evolúciójában.

Vizsgálataink egyik további célja volt egy elsődlegesen a BVDV-fertőzött, és az ellen a vemhes tehenek vakcinázásával védekező állományokban előforduló kórkép, a borjak újszülöttkori pancytopeniája (bovine neonatal pancytopenia, BNP) néven ismert betegség itthoni előfordulásának és a BVD-vel való esetleges kapcsolatának vizsgálata, mivel a kórkép hazai előfordulása idején ez az összefüggés még nem volt tisztázott.

A BVDV fertőzés az esetek nagy többségében tünetmentesen zajlik, de rendszeresen előfordul klinikai tünetekkel járó kórkép kialakulásával járó, sőt esetenként elhullást előidéző forma is. A betegség jellegében és súlyosságában elsődleges szerepe van a fertőző törzs

korábban említett *in vitro* sejtkárosító (cp) tulajdonságának. A cpBVDV fertőzés egészséges, nem vemhes szarvasmarhában hasmenéssel járó kórképet idézhet elő, míg az ncpBVDV törzs gyakran tünetmentes fertőzést, szerológiai áthangolódást és legfeljebb enyhe immunszuppressziót okoz.

Vemhes tehén fertőződésekor a klinikai képet és a gynecopathologiai következményeket nem csak a vírus biotípusa, hanem a fertőződés időpontja is befolyásolja. A magzat fokozottan érzékeny a virulensebb cpBVDV törzssel való fertőzésre: a kezdeti szakaszban embrióelhalás, embriófelszívódás és visszaivarzás jelentkezik, a későbbiekben pedig gyakran alakul ki vetélés, illetve a vemhesség utolsó harmadában magzatkárosodás. Ez utóbbi esetben csontrendszeri elváltozások (ankylosis, végtagdeformitás, koponyatorzulás), illetve a csontrendszer kialakulását követő időszakban történt *in utero* fertőzés esetén a központi idegrendszer fejlődési zavarai (hydrocephalia, cerebellaris hypoplasia) jelentkezhetnek.

A kevésbé virulens ncpBVDV törzsek csak a vemhesség legkorábbi szakaszában végzetesek az utódszervezetre. Ekkor ugyancsak embrióelhalást, embriófelszívódást okoznak, a tehén pedig visszaivarzik. Amennyiben a vemhesség kb. 40. napja után, de még az immunkompetens szervek (csontvelő, thymus, lép stb.) kialakulása előtt fertőződik a magzat, akkor az immunitásban, a saját-idegen antigének elkülönítésében kulcsszerepet játszó magzati sejtek funkcionális kialakulása alatt jelenlevő vírusantigént is sajátjaként fogadja el a szervezet, az immunsejtek a vírus jelenlétét a továbbiakban tolerálják. Az önfelismerés szakaszában (kb. a vemhesség 40-120 napja között) *in utero* fertőződött, és ezért a BVDV iránt immuntoleránsan született borjakban a vírus folyamatosan jelen marad, így alakulnak ki a PI egyedek. A kórformák közül a vírus fennmaradása és evolúciója szempontjából legnagyobb jelentőségű a perzisztens fertőzés, mivel ebben az esetben a vírus hosszú időn át képes ürülni a PI állatból, a kialakult immuntolerancia miatt az ilyen egyed vakcinázása hatástalan. A PI állat közvetítésével a vírus horizontálisan és vertikálisan egyaránt képes terjedni.

A PhD-értekezésben leírt munkák három témakör köré csoportosíthatók:

- 1.) A BVDV hazai elterjedtségének felmérése
- 2.) A BVDV fertőzéssel kapcsolatba hozott, borjak között előforduló újszülöttkori pancytopenia (bovine neonatal pancytopenia, BNP) vizsgálata
- 3.) A BVDV intramolekuláris rekombináció-készségének felmérése a nemzetközi génbankban letétbe helyezett genomok számítógépes elemzése alapján

## **2. A BVDV hazai elterjedtségének felmérése**

A szerológiai vizsgálat eredményei alapján a felmérésben résztvevő gazdaságokat a következő csoportokba soroltuk: Az 1. csoportba kerültek azok az állományok, melyek 100%-os vagy ahhoz nagyon közeli szeroprevalenciát mutattak, vagyis a vizsgált savók mindegyike pozitívnak bizonyult. A 2. csoportba soroltuk azokat a telepeket, amelyekben ellenanyag változó arányban (10-85%) volt kimutatható, de a vizsgált savók száma és a pozitív savók aránya alapján kétségtelenül jelen volt a vírus. A 3. csoportba sorolt állományok alacsony szeroprevalenciát (<10%) mutattak. Esetenként csak egy-egy minta volt pozitív, illetve az ELISA vizsgálatnál kapott OD érték a módszer hibahatárába esett (kétes eredmény, vagy küszöb-közeli, nagyon alacsony értékű pozitivitás).

A 4. csoportba sorolt állományokból származó vizsgálati minták már negatív eredményt adtak ugyan, de ezek esetében a teljes vizsgálat szempontjából fontos adatok (pl. életkor) hiányoztak, vagy a mintaszám túl alacsony volt. Ezért statisztikailag nem volt értékelhető az eredmény. Az adatok az adott állomány értékelésére alkalmasak, de feltehetően további következtetések levonása hiba lenne. Az 5. csoportba sorolt állományok BVDV-mentsek. Nagyszámú állatból küldtek mintát, az eredmény statisztikailag értékelhető lett volna, de mivel az állatok koráról nincs információ (azon kívül, hogy 6 hónaposnál idősebbek), így ez sem teljes értékű eredmény. A 6. csoportban BVDV ellenanyag-mentes állományok találhatóak, amelyekben a mintázott állatoknak az életkori adatok alapján lett volna lehetőségük fertőződni a vírussal. Emellett ezekből az állományokból statisztikailag reprezentatív mintamennyiséget sikerült vizsgálni, így valóban nagy valószínűséggel BVDV-mentesnek mondhatók.

A gazdasági jelentőség miatt minél hamarabb célszerű volna hazánkban is mentesítési kampányt indítani a betegség felszámolása érdekében, ehhez azonban szükséges a jelen helyzet ismerete, ennek érdekében végeztük el szerológiai felmérő vizsgálatunkat. A vakcinás védekezés csak a gazdasági veszteségek csökkentésére alkalmas, nem pedig a betegség leküzdésére. A vakcinás védekezés háttérében a vírus tovább perzisztálhat az állományokban. Emellett a PI állatok nem vakcinázhatók sikeresen, és tovább terjesztik a vírust.

Összefoglalva szerológiai vizsgálatunk eredményeit, az 1200 minta közül 43,4% mutatkozott szeropozitívnak az összesítésben (521 állat). Ez az eredmény magasabb, mint a skandináv országok szeroprevalencia értékei, de ott korábban elindult a betegség elleni mentesítési folyamat, így sikeresen csökkenteni tudták a fertőzött állatok számát. Más országokban (pl. Ausztria egyes régiói illetve Dánia), a prevalencia alacsonyabb.

Amennyiben állományszinten vizsgáljuk a fertőzöttség mértékét, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy a vizsgált állományok 29,6%-a mentesnek bizonyult. Ez az arány cáfolja a korábbi, szinte teljes átfertőzöttségről szóló feltételezéseket. A negatív állományok szolgálhatnak a mentesítés megindítása esetén a fertőzött állományokból eltávolított egyedek pótlásának forrásául. Ezek a gazdaságok magasabb árat érhetnek el állataik értékesítésekor (sőt egyes országokba csak ezek exportálhatnak), mivel ezek az állatok biztosan nem terjesztik a vírust. Ez igaz mind bel-, mind külkereskedelmi értelemben, hiszen a környező országokban megindult mentesítés miatt egyre nagyobb a kereslet a BVDV-mentes állatokra.

A vizsgált állományoknak további 11,1%-a igen alacsony szeropozitivitást mutatott. Ezekben az esetekben az ELISA kiértékelésénél az OD érték vagy éppen elérte a pozitív szintet, vagy kétségesnek mutatta az ominózus 1 mintát 15-20 minta közül. Ezeket az állatokat célszerű lett volna újrazsálgálni, hiszen az eredményt befolyásolhatja számos körülmény, leginkább a mintában a tárolás hibájából kialakult haemolízis, mely könnyen hamis pozitív OD értéket eredményezhet. A mintavétel azonban nem a mi szervezésünkben zajlott, így az ismételt vizsgálatra nem volt lehetőségünk. A szerológiaiilag negatív állatokat a perzisztensen vagy esetleg frissen fertőződött, de szerológiaiilag még át nem hangolódott egyedek felismerése érdekében a vírus jelenlétére is meg kell vizsgálni. Erre alkalmas a fülszám behelyezésekor nyert mintának, a vér lymphocytáinak és/vagy a vérsavónak a vizsgálata, a vírusnukleinsav kimutatása céljából RT-PCR-rel, illetve a vírus antigénjeinek a kimutatása érdekében Ag-ELISA-val. A vírus pozitív állatokat az állományból el kell távolítani, lehetőség szerint le kell vágatni.

Amennyiben egy állományon belül igen magas a szeropozitív állatok száma, úgy nincs lehetőség a szelekciós mentesítésre. A megoldást a teljes állománycsere jelentheti, ami nagy költséggel jár. Köztes módszerként javasolható az, hogy a frissen született borjakat amint lehet, válasszák el az anyjuktól, és elkülönítve, fertőzésmentes környezetben neveljék, miközben minden újszülött borjú krotáliázásánál nyert fülminta-korongóját megvizsgálják BVDV jelenlétére, hogy a megszületett PI borjakat azonnal el lehessen távolítani. Így belső forrásból meg lehet oldani a mentesítési folyamatot, de megemlítendő, hogy az eljárás csak olyan gazdaságban alkalmazható, amely egymástól földrajzilag elkülönülő telepekkel rendelkezik, és így biztonságosan megoldható a mentes állatok elkülönítése a fertőzött állományrésztől.

A vizsgálataink alapján mentesnek mutakozó állományokban lehetőleg meg kell őrizni ezt a státuszt. Ennek érdekében alkalmazni kell minden általános járvány megelőzési eljárást, a gazdálkodás minden műveletében, beleértve a tenyésztést és az állatbeszerzést is. Ezen felül

fokozottan ügyelni kell a személyi és a telepre behajtó gépjárművekre vonatkozó higiéniai követelmények betartására.

### **3. A BVDV fertőzéssel kapcsolatba hozott, borjak között előforduló újszülöttkori pancytopenia (bovine neonatal pancytopenia, BNP) vizsgálata**

A tünetek 1–4 hetes borjakon jelentkeztek és a kórképet a kifejezett vérzékenység uralta. A vérárvadási zavart jelezte a minden bőrsérülést (injekció beadását, vérszívó rovarok szúrását) követő tartós vérzés mellett a spontán vérzések megjelenése (vérvizelés, orrvérzés, ínyszerzés stb.). A klinikai tünetek jelentkezése után a borjak általában rövid időn belül (2–7 nap) elhullottak. Az elhullások aránya igen nagy volt, a beteg borjak többsége elpusztult.

A boncolások során kiterjedt vérzéseket lehetett látni testszerte, a bőrben, a bőr alatti kötőszövetben, a nyálkahártyák alatt, az emésztőszervek falában, a zsigerekben. A savós testüregekben vörhenyes exsudátum halmozódott fel. Kórszövettani vizsgálattal kiterjedt, multifocalis vérzések voltak megfigyelhetők ugyanezekben a területeken. Kifejezett volt a csontvelő aplasiája. A lépben lymphoid depletiót, a recésgyomor falában kiterjedt vérzéseket és érfalkárosodást láttunk. A csontvelőben súlyosfokú aplasiát, a tüdőben vérzéseket, az alveolusokban nagy mennyiségű fibrint, illetve disseminált intravasalis coagulatio (DIC) jeleit figyeltük meg.

A PCR-en alapuló kimutatási kísérletek valamennyi vizsgált kórokozó (circovirus, herpeszvírus, BVD vírus) esetében minden mintából negatív eredménnyel zárultak. A vizsgált borjak lépéből és csontvelőjéből baktériumokat nem lehetett kitenyészteni.

A BNP kórkép kialakulásának magyarázatára számos elmélet vetődött fel, de ezek egyike sem bizonyult hosszú távon elfogadhatónak. Újabban a különböző vírusvakcinák előállításakor használt, szarvasmarha eredetű szövettenyészetek sejtjeinek felszínén levő immunhisztokompatibilitási (major histocompatibility complex, MHC) fehérjemolekulák szerepét feltételezik a kórkép kialakulásának hátterében. Eszerint a BVDV-fertőzés okozta gazdasági károk csökkentésére, elsősorban a szaporodásbiológiai zavarok kivédésére vemhes állatokban széles körben használt inaktivált vakcinában (Pregsure, Pfizer Inc.) alkalmazott immunstimuláns adalékanyagok olyan mértékben felerősítik a vakcina alapanyagként szolgáló vírustenyészetben levő, sejteredetű szennyeződésen előforduló allogenetikus MHC molekulákat, hogy azok ellen a vakcinával immunizált tehénekben ellenanyagok képződnek. Természetesen csak azok ellen az MHC-molekulák ellen képződik ellenanyag, amelyek nem

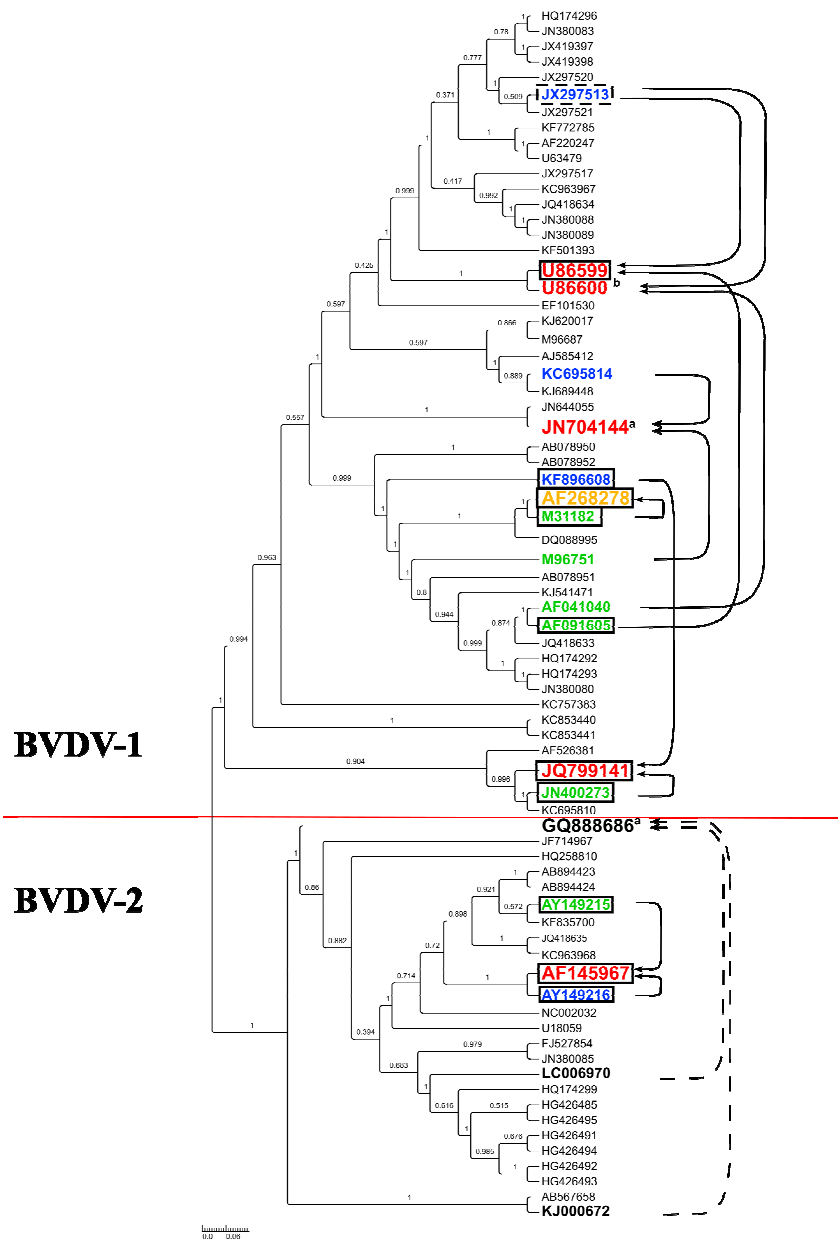


fordulnak elő a tehénben, hiszen a saját MHC antigénjeire toleráns minden állat. Ezek az ellenanyagok (a többi ellenanyaghoz hasonlóan) a kolosztrummal átjutnak az újszülött borjúba, és amennyiben a borjúnak a bikától örökölt sejtfelszíni MHC antigénjei között vannak olyanok, amelyek ellen képződtek ellenanyagok az anyaállatban a vakcinázás mellékhatásaként, akkor ezekhez kapcsolódva citotoxikus reakciót indítanak meg. Ez a cytotoxicus reakció elsősorban csontvelő-károsodást és következményes pancytopeniát okoz. Ez egyben megfelelő magyarázatot adhat arra is, hogy miért csak (sőt miért elsősorban!) a jó tartási körülmények között élő, rendszeresen vakcinázott tehenektől születő, kolosztrummal bőven ellátott borjakon jelentkezik a kórkép, ahogyan az az általunk vizsgált esetben is történt.

Az általunk megfigyelt esetek a BNP legjellegzetesebb tüneteit mutatták. Mivel a vizsgálatok idején egyértelműen elfogadható magyarázat még nem volt a kórkép oktatán illetően, vizsgálatainkat számos más irányba is kiterjesztettük, ezen belül is külön gondot fordítottunk a BVDV esetleges kórtani szerepének kizárására. Ez minden esetben megtörtént, de a vizsgálatra érkezett tetemek egyikéből sem sikerült BVD-vírust kimutatni. Ugyanakkor a vizsgálat során alkalmazott PCR-alapú tesztek más vírusok jelenlétét sem mutatták ki, és baktériumokat sem sikerült az elváltozott területek szöveteiből kitenyészteni. A BVD-elleni vakcinázás, a betegség által okozott gazdasági károk ismeretében, továbbra sem mellőzhető a fertőzött telepeken. Tekintettel a betegség gazdasági jelentőségére, a károk csökkentése érdekében továbbra is rendelkezésre áll hatékony, Magyarországon engedélyezett vakcina, de a vemhes tehenek többszöri vakcinázását mindenképpen kerülni kell. A kórkép immunpatológiai háttere felveti annak lehetőségét, az igen hatékony adjuválószerrel miatt a borjak újszülöttkori pancytopeniájához hasonló kórképek kialakulására más vakcinák és más fajok esetében is számítani kell.

#### **4. A BVDV intramolekuláris rekombináció-készségének felmérése a nemzetközi génbankban letétbe helyezett genomok számítógépes elemzése alapján**

A rekombinációs „hot-spot” kereséshez használt „breakpoint p-distribution plot” analízis négy lehetséges területet azonosított a BVDV-1 genomján, ezek helyeződése az „általános” genomon: A: 0,5 kb; B: 1 kb; C: 7,5; D: 12 kb. A fentebb bemutatott rekombinációs események végpontjai elfogadhatóan korrelálnak ezekkel a pontokkal. A csúcsok nem élesek, tehát nem egyes nukleotid pozíciókat jelölnek, hanem inkább szakaszokat. Az 50 BVDV-2-es szekvencia vizsgálatakor a fent említett „hot-spot”-ok közül kettőt sikerült azonosítani, de a helyeződésük kissé eltér a BVDV-1 esetén tapasztaltaktól, a BVDV-2 genomjában ezek 0,15 kb és 11,7 kb környékén találhatók.



A 112 BVDV törzs vizsgálata alapján készült szűkített törzsfá. Azok közül a genomok közül, melyek 98%-nál jobban hasonlítanak egymásra csak egyet tüntettünk fel a fán, így 72 teljes genom hasonlósági viszonyai láthatók. Vörös: rekombináns; Kék: major parent; Zöld: minor parent; Narancs: mesterséges kiméra, kontrollként használtuk. Azokat a rekombinációkat, melyeket korábban mások is leírtak nem kereteztük be <sup>a, b</sup>.

A legjobban alátámasztott BVDV rekombinációs események, amelyeket teljes genomok illesztésének analízisével kaptunk. Néhány esemény korábban leírtak [<sup>a</sup> <sup>b</sup>], de vizsgálatunk új “szülő” szekvenciákat azonosított bizonyos esetekben (részletek a szövegben). A kettős vonal a BVDV-1 és BVDV-2 törzseket választja el egymástól. (<sup>c</sup>A mi vizsgálataink ezt a rekombinációt nem erősítették meg, de az ábrán és a táblázatban szerepeltetjük, mert kiemelten foglalkoztunk vele a módszer érzékenységeinek bizonyítása miatt.)

Végpontok (rekombináns)		Rekombináns szevencia	“Szülői” (parent) szekvenciák		A vizsgálati eljárások által számított valószínűségi értékek <sup>*</sup>							
Start	Vég		Minor	Major	RDP	GENE- CONV	Bootscan	Maxchi	Chim-aera	SiSscan	LARD	3Seq
7780	11923	JQ799141	JN400273	KF896608	$1.73 \times 10^{-136}$	$1.02 \times 10^{-145}$	$9.71 \times 10^{-156}$	$1.49 \times 10^{-45}$	$5.62 \times 10^{-35}$	$2.29 \times 10^{-69}$	$1.44 \times 10^{-217}$	$1.12 \times 10^{-80}$
7348	8500	U86599	AF091605	JX297513	$8.57 \times 10^{-27}$	$3.71 \times 10^{-05}$	$8.00 \times 10^{-39}$	$5.97 \times 10^{-13}$	$3.91 \times 10^{-15}$	$2.83 \times 10^{-25}$	$1.29 \times 10^{-09}$	NS
332	1004	AF268278	Unknown	M31182	$2.38 \times 10^{-159}$	$5.98 \times 10^{-113}$	$1.80 \times 10^{-147}$	$4.41 \times 10^{-34}$	$1.14 \times 10^{-29}$	$2.76 \times 10^{-26}$	$7.96 \times 10^{-314}$	$2.61 \times 10^{-165}$
2939	4536	JN704144 <sup>a</sup>	M96751	KC695814	$6.22 \times 10^{-177}$	$4.38 \times 10^{-164}$	$2.23 \times 10^{-87}$	$5.23 \times 10^{-45}$	$7.23 \times 10^{-43}$	$1.72 \times 10^{-68}$	$1.60 \times 10^{-152}$	$1.28 \times 10^{-230}$
8783	12046	JN704144 <sup>a</sup>	M96751	KC695814	$4.90 \times 10^{-147}$	$2.73 \times 10^{-143}$	$1.01 \times 10^{-146}$	$1.59 \times 10^{-58}$	$1.93 \times 10^{-58}$	$3.08 \times 10^{-89}$	$1.24 \times 10^{-221}$	$1.55 \times 10^{-166}$
5976	6575	U86600 <sup>b</sup>	AF041040	JX297513	$5.52 \times 10^{-7}$	$1.35 \times 10^{-05}$	$7.89 \times 10^{-34}$	$1.680 \times 10^{-15}$	$7.99 \times 10^{-15}$	$9.89 \times 10^{-11}$	$2.52 \times 10^{-62}$	NS
11490	11679	AF145967	AY149215	AY149216	$7.74 \times 10^{-19}$	$4.40 \times 10^{-18}$	$3.05 \times 10^{-20}$	$1.74 \times 10^{-05}$	$1.26 \times 10^{-04}$	$4.24 \times 10^{-07}$	$8.36 \times 10^{-19}$	$9.39 \times 10^{-08}$
3586	7357	GQ888686 <sup>a,c</sup>	Unknown	AY149215	$1.31 \times 10^{-14}$	NS	$4.04 \times 10^{-14}$	$8.5 \times 10^{-14}$	$2.77 \times 10^{-14}$	$1.24 \times 10^{-22}$	$6.46 \times 10^{-12}$	$7.57 \times 10^{-08}$

Vizsgálatunkban az algoritmusok olyan genomokat választottak ki „szülői” szekvenciaként, melyek az adott illesztésben a legvalószínűbbnek tűntek a rekombinációk létrehozásában. Ez nem jelenti azt, hogy a rekombinációban pont ezek a törzsek vettek részt, mivel meglehetősen valószínű, hogy a valódi szekvencia donor törzsek nincsenek még megszekvenálva, így nem kerülhettek be a GenBank-ba. Így lehetséges az, hogy a rekombináns szakaszok nem egyeznek meg 100%-osan a program által „szülő”-ként azonosított genomok megfelelő szakaszaival, csak nagyon közeli rokonságuk bizonyítható.

Az általunk használt módszerek robusztusságának igazolására bevontuk a vizsgálandó genomok közé az AF268278-as rekombináns törzset (BVDV-1), mivel a szakirodalom és a GenBank-i adatok áttanulmányozása után kiderült, hogy a törzs egy mesterséges kiméra, melyben a kutatók a BVDV N<sup>pro</sup> génjét egy human hepatitis C vírus eredetű szakasszal cserélték ki. A vizsgálat során csak az egyik „szülő” törzset (major parent) lehetett azonosítani, ez az M31182, a minor parent keresése nem hozott eredményt, így a program erre a „szülőre” unknown, azaz ismeretlen eredményt adott, mivel hepatitis C genomok nem képezték részét az elemzésnek. Eredményeink megerősítették Weber és mts-ai 2015-ben leírt, a JN704144 törzsben felderített kettős rekombinációs eseményt melynél a rekombináns törzs két eltérő helyen is átvette a minor parent genomszakaszait.. A rekombináns törzs egy kínai esetből származik, a major parent az Av69-es Védévac törzs, melyet szintén Kínában szekvenáltak, a minor parent pedig szintén egy telepi mintából származó izolátum, az SD1-es törzs. Amellett, hogy ez a rekombinációs esemény ritka példája a kettős rekombinációnak, rávilágít az élő, attenuált vakcinák használatának kockázataira.

A következő rekombináns, a JQ799141, melyet szintén Kínában izoláltak, ugyanúgy, mint a „szülő” törzseket, a JN400273-ast és a KF986608-at. Érdekessége a jelenségnek, hogy míg a rekombináns törzs gazdafaja a jak volt, az egyik parent-et, a JN400273-t sertésből izolálták. Logikus, hogy ez a törzs szarvasmarha és jak állományokban is perzisztál, máskülönben nem jöhetett volna létre a rekombináció. A tény, hogy ebben a tripletben mindhárom törzs (a két „szülő” és a rekombináns is) három különböző gazdafajból (szarvasmarha, sertés, jak) származik, igen fontos járványtani szempontból. A JQ799141 rekombináns törzs megtalálása megerősíti azt, hogy azonos vírusfajba tartozó törzsek – melyeket különböző gazdafajokból izoláltak – közötti rekombinációra lehetőség van. A keresztfertőzés lehetősége (BVDV-1 sertésben) pedig felvetheti a különböző fajok, különböző fajú vírusainak egymással történő rekombinációjának lehetőségét is.

Az U86599-es törzs más szempontból vált érdekessé. Ennek a genomszekvenciája nagyon hasonlít az U86600-ra, melyben korábban SimPlot analízis segítségével felderítettek

lehetséges rekombinációs eseményt. Az általunk kapott eredmény szerint a korábban meghatározott JX297513 valóban a major parent, de a minor parent tekintetében új eredményt tudunk bemutatni: az AF041040 helyett a AF091605 az új minor parent az általunk használt fejlettebb programverzió eredményei szerint. Mindazonáltal a vizsgálatok szerint az AF091605 igen közeli rokona a korábbi „szülőiként” azonosított szekvenciának. Mivel az U86600 nagyon közeli rokona az U86599-nek (kevesebb, mint 1%-ban tér el tőle), így az eredményt összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az U86599 az eredeti rekombináns törzs, az U86600 pedig ebből származik, az eltérést a kettő között pedig a rekombináns kialakulása óta elszenvedett pontmutációk eredményezték. További zavaró körülményként jelentkezik a genom szokatlanul nagy mérete (15521 nt). Mint a vizsgálat során kiderült, ennek az oka a genomba az NS2-3 régióba beékelődő 3263 nt hosszú szakasz. Ez a szakasz a vírus bizonyos génjeinek részleges repetíciója (részleges NS2, NS2-3 és NS3 gén), melyek bizonyos átfedéssel épültek be a genom említett területére. A szakasz genetikai hasonlósági viszonyainak felderítése után kiderült, hogy a beékelődő szakasz legközelebbi „rokona” ugyanannak a törzsnek a megfelelő helyen lévő saját génjeiből összeálló régió.

Az általunk elvégzett elemzés során, amikor a teljes 112 genomot tartalmazó illesztést vizsgáltuk és az elfogadási küszöbértéket  $p < 0,005$ -re ( $5 \cdot 10^{-3}$ ) állítottuk, egyetlen módszer sem jelölte meg a GQ888686 törzset rekombinánsként. Amikor az ábrán látható filogenetikai fa alapjául szolgáló szűkített illesztést, 72 genommal analizáltuk, az RDP módszer ismét nem fogadta el rekombinánsnak a szekvenciát, és a többi módszer is csak viszonylag gyenge  $p$ -értékeket adott. A korábban leírt „szülő” szekvenciák mindkét esetben részét képezték az illesztéseknek. Eredményeinket összefoglalva a GQ888686 törzset az új, továbbfejlesztett algoritmussal vizsgálva nem tekintjük rekombinánsnak.

Eredményeink áttekintése során kiderült, hogy a vizsgálat törzsek közül a BVDV-2 fajba tartozók között igen kis számban sikerült rekombinációs eseményt kimutatni. A kis számú rekombináns a BVDV-2-es törzsek között jelentheti a faj nagyobb genetikai stabilitását, melyet megerősít, hogy összehasonlítva a BVDV-1-gyel, lényegesen kevesebb szubgenotípus csoportba sorolják a törzseket az 5' UTR szekvenciák alapján. Az AF145967 genom 3' vége felé, az NS5b génben egy 195 nt hosszúságú rekombináns területet sikerült azonosítani. Az eredmények szerint ez a terület az AY149215-ös törzsből származik, amely szintén a BVDV-2-es fajba tartozik. A kérdéses rekombináns területet vizsgálva kiderült, hogy BLAST keresést alkalmazva 100%-os egyezést találtunk egy BVDV-1 törzssel, melynek részleges genomja KF896612 jelzéssel szerepel a GenBank-ban.

Eredményeink igazolják a rekombinációs események relatív gyakori előfordulását a BVDV törzsekben. A genomátrendeződés és a genetikai csuszamlás jelensége régóta ismert a szegmentált genetikai állománnyal rendelkező vírusfajok (influenzavírusok, bluetongue vírus) esetén, de ritkább a nem-szegmentált genomú vírusoknál, mint amilyen a BVDV is. Figyelembe véve a BVDV patomechanizmusában a PI állatok által játszott szerepet, az endémiásan fertőzött területeken a PI állatok elősegíthetik a rekombinációk, ezen belül fajok közötti rekombinációk létrejöttét. A rekombinációk keresésére szolgáló módszerek alkalmazásakor mindenképpen indokolt a lehetséges eljárások, a különböző algoritmusok párhuzamos használata, mert így, kombinációban a programok egymás erősségeinek kihasználásával és gyengeségeiknek az ellensúlyozásával megbízhatóbb eredményt adnak.

## 5. Saját közlemények

Kővágó, C., Hornyák, Á., Kékesi, V., Rusvai, M.: Demonstration of homologous recombination events in the evolution of bovine viral diarrhoea virus with in silico investigations, Acta Vet Hung, 2016, Közlésre elfogadva.

Kővágó, C., Balka, G., Mándoki, M., Abonyi, T. and Rusvai, M.: **A borjak újszülöttkori pancytopeniája néven ismert kórkép és annak hazai előfordulása**, Magy. Áo. Lapja **135**(5): 259-266. 2013

Kővágó, C., Forgách, P., Szabára, Á., Mándoki, M., Hornyák, Á., Duignan, C., Gere, E. P. and Rusvai, M.: **Seroprevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Hungary - Situation before Launching an Eradication Campaign**, Acta Vet Hung **63**(2): 255-263. 2015