

II-es típusú pneumocyta proliferatio immunhisztokémiai jellemzése
kísérletes PRRS fertőzés után

TDK dolgozat

Készítette:

Szilasi Anna Katalin, IV. évfolyam

Témavezető: Dr. Balka Gyula, klinikai állatorvos

1. Tartalomjegyzék	
1. Tartalomjegyzék	1
2. Bevezetés	2
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. A betegség története	3
3.2. Kóroktan	4
3.3 Járványtan	5
3.4. Kórfejlődés	6
3.5. Tünetek	7
3.6. Kórbonctan	8
4. Célkitűzés	11
5. Anyag és módszer	12
6. Eredmény	16
7. Megvitatás	26
8. Összegzés/Summary	29
9. Irodalomjegyzék	33
10. Köszönetnyilvánítás	39

2. Bevezetés

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) széles körben elterjedt megbetegedés, melyet a PRRS vírusa (PRRSV, porcine arterivirus) okoz. Nevét onnan kapta, hogy fiatal állatokban légzőszervi tüneteket, kocákban pedig reprodukciós zavarokat idéz elő. Az újszülött, a szopós korú, illetve a választott malacokban a betegség akár önmagában is, vagy az általa okozott immunszuppresszió következtében kialakuló másodlagos fertőzések révén az állat elhullásához vezethet. Bár nem tartozik az ún. 'A' listás betegségek közé, becsült kártétele az Egyesült Államokban éves szinten 560 millió USD. Ebből 63 millió USD kár a reprodukciós zavarokból adódott, a fennmaradó csaknem 500 millió USD veszteséget felerészben a növendék állatok elhullása (243 millió USD), felerészben pedig a felnevelés során, a romló termelési mutatók, csökkenő testtömeg-gyarapodás és növekvő fajlagos takarmányértékesítés által keletkezett extra költségek (250 millió USD) eredményezték (Neumann et al., 2005).

Magyarországon elsőként 1995-ben azonosítottak szeropozitív állományokat. Az ezredfordulót követően tapasztalt alacsony (2-3%) prevalencia hazánk Európai Unió csatlakozását követően hamar megemelkedett, ugyanis a PRRS 2002-ben kikerült a bejelentési kötelezettség alá tartozó betegségek közül, így Nyugat-Európai, erősen fertőzött országokból ismeretlen eredetű és státuszú állományok érkeztek hazánkba (Balka, 2009). Rendkívül nagy előrelépést jelent a betegség elleni országos szintű védekezésben, hogy a Nemzeti PRRS-mentesítési program keretében 2011 első felében valamennyi ismeretlen státuszú nagylétszámú sertéstartó telep esetében kötelezően el kell végezni az állomány PRRS szerológiai vizsgálatát. Emellett párhuzamosan a kislétszámú, háztáji állományok szűrése is elkezdődött. A vizsgálatok lezárultával megállapítható, hogy a hazai nagylétszámú sertéstelepek 25%-a, a háztáji állományok mintegy 10%-a szeropozitív PRRS tekintetében (Molnár, 2011).

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A betegség története

Először az Egyesült Államokban ütötte fel a fejét a betegség 1987-ben (Keffaber, 1989), majd onnan terjedt tovább Kanadába. Retrospektív szerológiai vizsgálatok alapján találtak 1979-es pozitív mintákat is itt (Carman et al., 1995). A kórok ismeretlensége miatt számos névvel illették a betegséget: Mystery Swine Disease, X disease, swine infertility and respiratory syndrome (SIRS), Európában pedig a gyakori cyanosis miatt a fülvégeken a blue eared pig disease nevet kapta (**ld. 1. kép**). Európában elsőként Németországba (Lindhaus and Lindhaus, 1991) és Hollandiába (1990) jutott el a betegség. A kór végigsöpört a kontinensen (Medveczky et al., 1996), majd eljutott Délkelet-Ázsiába is (Stadejek et al., 2008).



1. kép: Cyanosis a fülön, régi nevén blue eared pig disease

Forrás: <http://blog.naver.com/ultifree/30344165>

A kórokozó igen gyorsan elterjedt világszerte, habár Svájc, Norvégia, Finnország, Új-Zéland, Ausztrália, Brazília, Argentína és Kuba egyelőre PRRS mentesek.

Hazánkban szeropozitivitásról (főleg a Dunántúlon) elsőként import sertésekből származó állományokban számoltak be (Hornyák et al., 1996; Medveczky, 1996).

3.2. Kóroktan

A PRRS vírus (PRRSV) a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjának Arterivirus nemzetségbe tartozó vírusa (Antoine A. F. de Vries et al., 1997; Cavanagh et al., 1997). Lineáris, szimplaszálú RNS-t tartalmazó, pozitív irányítottságú, burkos vírus, melynek átmérője 60 nm. Genomja kb. 15000 nukleotid hosszúságú, mely 9 nyitott leolvasási keretet tartalmaz. Ebbe a nemzetségbe tartozik még a lóarteritis vírusa (Equine arteritis virus), mely a lovak vérereinek megbetegedését okozza, az egerekben előforduló, laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim szintjét növelő vírus (Lactate dehydrogenase virus, LDV), valamint a majmok haemorrhagiás lázának vírusa (Simian haemorrhagic fever virus, SHFV).

A PRRSV-t először 1991-ben Hollandiában izolálták sertés eredetű primer alveoláris macrophag sejtenyészetben (Lelystadt vírus), melyet azóta is referens vírustörzsként tartanak számon (Wenswoort et al., 1991; Pol et al., 1991). 1992-ben az USA-ban izolálták a szintén referens VR-2332 jelű vírustörzset. (Collins et al., 1992). A már izolált vírus más sejtvonalakhoz is hozzászoktatható. Az Európában és az USA-ban izolált törzsek között azonban jelentős különbség van genetikailag (akár 40%-nyi), antigénszerkezet és virulencia alapján is (Halbur et al., 1995). Ezek alapján két különböző genotípusát különítették el a vírusnak: az 1-es (európai) típust (melynek négy szubtípusát ismerjük), és a 2-es (amerikai) típust (Nelsen et al., 1999, Stadejek et al., 2006). Ezek a vírustörzsek azonban a 90-es évek második felében átjutottak egyik kontinensről a másikra, így ma már Európában is előfordul az amerikai szerotípus, és fordítva (Madsen et al., 1998; Ropp et al., 2004). Ázsiában főleg a 2-es típus terjedt el a 80-as évektől kezdve (Stadejek et al., 2006).

A vírus iránt csak a sertés fogékony.

3.3 Járványtan

A PRRSV sertésről sertésre átvihető direkt módon, tehát közvetlen érintkezés útján, illetve indirekt úton, ragályfogó tárgyak segítségével is. A szeronegatív állományok az esetek döntő többségében vírusűrítő állatok bevitelét, illetve fertőzött sperma használatát követően fertőződnek a kórokozóval. A vírust kimutatták fertőzött állatok különböző váladékában (vér, orrváladék, nyál, ondó, bélsár, tej, colostrum). A leggyakoribb horizontális fertőzési út az oronasalis, illetve az ondóval (PCR vizsgálattal akár 92 napig kimutatható a PRRSV, vírusizolálással 43 napig) (Swenson et al., 1994; Christopher-Hennings et al., 1995) történő vírusátvitel. Fiatal állatok, mivel esetükben a viraemia időtartama is jóval hosszabb, akár 6-8 hétig is képesek átadni a vírust a velük együtt tartott, hasonló korú társaiknak, ami esetükben főként az orrváladék, illetve a köhögés során képződő aeroszol segítségével történik (Wills et al., 1997; 2002). A köhögéskor, tüsszögéskor a légutakból aeroszol formájában ürülő vírus fertőzőképességének változását, illetve az aeroszol PRRSV eredetű RNS tartalmának felezési idejét különböző hőmérsékleten, illetve relatív páratartalmi értékeken vizsgálva megállapították, hogy az alacsony hőmérséklet, illetve az alacsonyabb relatív páratartalom kedvez a vírus túlélésének, de ezek közül a hőmérsékleti tényezőnek nagyobb a jelentősége (Hermann et al., 2007). A levegő útján történő fertőzés-fertőződés hatótávolságáról, annak valószínűségéről eltérő adatok állnak rendelkezésre. Kísérletes körülmények között a levegő útján bekövetkező fertőzés általában rövid, egy-két méteres távolságban következik be, ezzel szemben telepi körülmények között, részletes szekvenciavizsgálatokkal alátámasztva kb. 600m-es távolságra történő fertőződést is igazoltak már egy sertéstelep különböző termelési egységei között (Sandri et al., 2006). Egy nagyszámú állatokon elvégzett kísérlet azt bizonyította, hogy elegendőnek bizonyult a PRRS negatív, egészséges állatok fertőződéséhez, ha a hozzájuk bejutó levegő csupán 1%-a származott a fertőzött állatok légtéréből (Kristensen et al., 2004).

Indirekt fertőzési forrásként szerepelhetnek ragályfogó eszközök (ruhadarabok, injekciós tűk, stb.), illetve különböző járművek, de ezek fertőzőközvetítő szerepe a megfelelő

járványvédelmi, illetve higiéniai követelmények betartásával (ruhacsere, csizma- és járműfertőtlenítés stb.) jelentősen csökkenthető. Mechanikai vektorai lehetnek azonban a PRRSV-nek szúnyogok (*Aedes vexans*), illetve a házi légy is (*Musca domestica*) (Otake et al., 2002; 2003). Mivel ezek nem biológiai vektorok, tehát bennük a vírus nem szaporodik, fertőzőközvetítő képességük a felvett vírus mennyiségétől, illetve a külső környezeti hőmérséklettől függ. Leírtak fertőzött állatokkal kapcsolatba került legyek közvetítésével 2,4 km-es távolságra történt vírusátvitelt is (Schurrer et al., 2004).

3.4. Kórfejlődés

A PRRSV először a légutakba jut, ahol az alveoláris macrophagokban és a kis vérerek endothel-sejtjeiben szaporodik. A macrophagok elpusztulnak, az erekben pedig thrombusok képződnek. Leírtak apoptózisra és nekrozisra jellemző folyamatokat egyaránt. Az apoptózis nem csak a fertőzött sejtekben megy végbe, hanem az azok környezetében található sejtekben is, így nagyobb fokú a károsodás (ún. bystander hatás). 1-2 napon belül a vírus a véráramba kerül, viraemia alakul ki, aminek során tömegesen elszaporodik a lymphoid eredetű sejtekben. Ennek következménye immunszuppresszió, ami hajlamosít a másodlagos bakteriális fertőzések megjelenésére. A viraemia 2-14 napig áll fenn, ezalatt a vemhes kocákban a magzatok is fertőződhetnek. Ennek következménye a magzatok elhalása, károsodása, a koraellés, és az így világrahozott gyenge, rendszerint életképtelen utódok számának növekedése (Kim et al., 2002; Miller et al., 2004; Lee et al., 2007).

3.5. Tünetek

Gyakori a tünetmentes fertőzöttség. Kísérletes fertőzés során a lappangási idő általában 2-7 nap. A tünetek megjelenését és súlyosságát befolyásolja az állat kora, immunstátusza, valamint a vírustörzs virulenciája.

Súlyos reprodukciós zavarok alakulhatnak ki, úgy, mint koraellés, magzatelhalás (ezáltal halott, néha mumifikált magzatok születése), gyenge, életképtelen utódok születése (az elhullás akár 50%-os is lehet a születés után) (**ld. 2. kép**), valamint jellemző a késői visszaivarzások számának emelkedése. Vetélés általában a vemhesség utolsó szakaszában történik.

Kocákban, kocasüldőkben jelentkezhet még étvágytalanság, 1-2 napig tartó láz, levertség, tüdőgyulladás, nehezített légzés, agalactia, a fülek, külső nemi szervek, farok és orr cyanotikus és hyperaemiás elszíneződése, bőr alatti és hátulsó végtagi oedéma, késői visszaivarzás, ritkán elhullás.

Újszülött malacokban a leggyakoribb tünetek a nehezített légzés, gyors légzés és az elhullás.



2. kép: PRRSV fertőzés következtében frissen elhullott és mumifikált malacok

Növendék- és hízősertésekben gyakran csak szubklinikai fertőzés alakul ki, mely önmagában nem nyilvánul meg klinikai tünetekben, de jelentős szerepet játszik a sertés összetett kóroktanú légzőszervi betegség-komplexében (porcine respiratory disease complex, PRDC), így óriási gazdasági károk keletkeznek. A tünetek ekkor főképp légzőszervi típusúak: láz, tüsszögés, nehezített és szapora légzés, köhögés, tüdőgyulladás, levertség, szem- és orrváladékozás, valamint szem körüli oedéma.

Az előidézett immunszuppresszió miatt gyakoriak a másodlagos bakteriális (néha virális) fertőzések (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma* spp., paratyphus, sertésinfluenza).

3.6. Kórbonctan

Gyakran nem találunk semmilyen kórbonctani elváltozást, más esetekben pedig a másodlagos fertőzések okozta elváltozások fedik el a PRRS okozta léziókat.

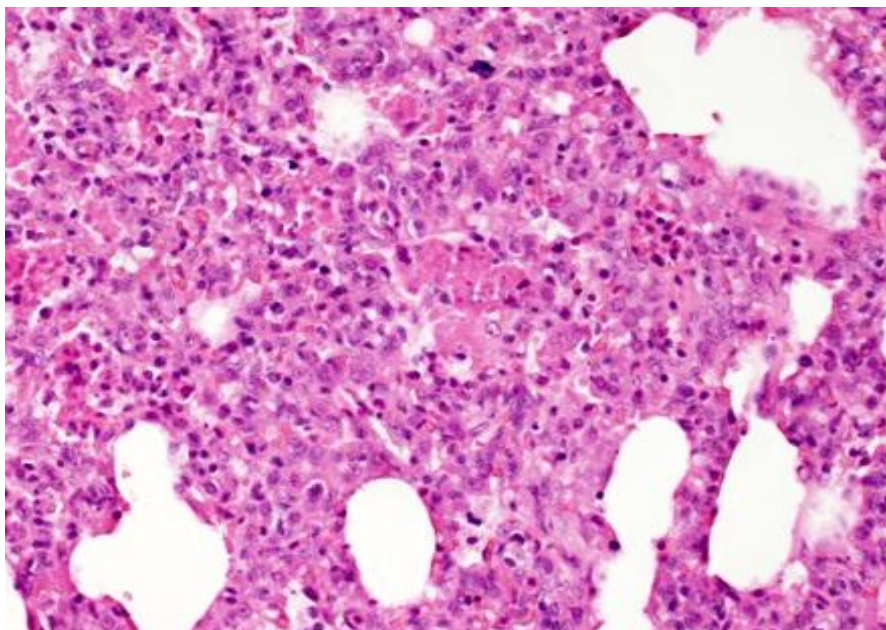
A bőrben cyanosis jelenik meg, esetenként vérzésekkel, a pericardiumban és a mellüregben megnövekedett mennyiségű exsudátumot és tüdőgyulladás jeleit találjuk (**ld. 3. kép**).



3. kép: Tüdőgyulladás a PRRS fertőzés következtében

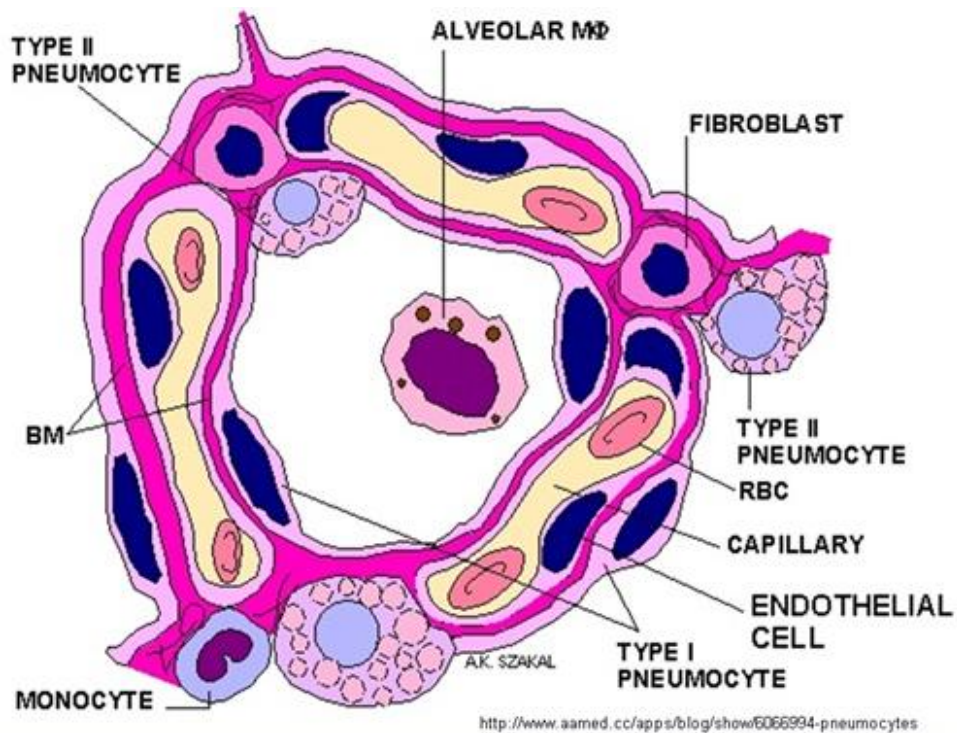
Forrás: http://www.kosvi.com/courses/vpat5215_2/vpat5330/viral/viral08.html

Kórszövettani vizsgálat során láthatjuk, hogy az alveoláris szeptumok megvastagodnak, állományukban, csakúgy, mint a perivaszkuláris terekben, gyulladásos sejtes beszűrődés alakul ki. Intraalveolárisan elhalt sejtörmelék, illetve gyulladásos sejtek halmozódnak fel, valamint jellemző a II-es típusú pneumocyták proliferációja (**ld. 4. kép**).



4. kép: Interstitialis pneumonia PRRS fertőzött tüdőben

A II-es típusú pneumocyták kuboidális sejtek, melyek tipikusan a szeptumok elágazódásánál helyezkednek el (**ld. 1. ábra**). Legfontosabb feladatuk a surfactant faktor termelése, ami csökkenti a felületi feszültséget a tüdőalveolusban, így az nem esik össze kilégzés során. A másik igen fontos feladatuk a proliferációs képességükön alapszik. Az I-es típusú pneumocyták sérülése után (melyek sokkal érzékenyebbek az őket érő káros hatásokra) a II-es típusú pneumocyták progenitor sejként szolgálnak a sérült és levált I-es típusú pneumocyták pótlása során, hogy végül az utóbb említett sejttypussá differenciálódjanak. A Clara sejtek olyan csilló nélküli, mucust nem szekretáló progenitor sejtek, melyek szintén képesek a proliferációra, pótolni tudják a csillós vagy csilló nélküli sejteket a bronchusok terminális részében (Caswell and Williams, 2007).



1. ábra: Tüdőalveolus sematikus rajza

Alveolar m ϕ : alveoláris macrophag; type II pneumocyte: II-es típusú pneumocyta;

RBC: vörösvérsejt; capillary: kapilláris; endothelial cell: endothel sejt; type I pneumocyte: I-es típusú pneumocyta; monocyte: monocyta; BM: alaphártya

A thyroid transcription factor (TTF-1) egy 38 kDa nagyságú homeodomain-t tartalmazó nukleáris fehérje, amely az Nkx2 transzkripció faktor család tagja (Lau et al., 2002). Ezt a fehérjét először a thyreoglobulin, thyreoperoxidáz és a thyrotropin receptorok thyroid-specifikus szabályzójaként írták le. A tüdőszövetben a TTF-1 irányítja a surfactant gén és a Clara sejtek szekréciós protein-génjének átírását (Bohinski et al., 1994; Zhou et al., 1996; Ray et al., 1996). Mivel a TTF-1 kizárólag a II-es típusú pneumocyták és a Clara sejtek magjában képződik, emiatt széles körben alkalmazzák az elsődleges és metasztatikus tüdődaganat diagnosztikájában markerként (Tan et al., 2003).

4. Célkitűzés

Vizsgálatunk célja elsősorban az volt, hogy megállapítsuk, a humanizált TTF-1 ellenanyagok keresztreagálnak-e sertés tüdőszövetében, képesek-e azonosítani a II-es típusú pneumocyta (és Clara sejteket) ebben a fajban?

Másodsorban azt a célt tűztük ki, hogy immunhisztokémiai módszerekkel elemezzük a fent említett sejtek előfordulását, számuk esetleges változását a tüdőben PRRS fertőzést követően különböző időpontokban vett mintákban.

Rutin szövettani módszerrel (hematoxin-eozin) festett metszeteken elvégzett pontozásos vizsgálat eredményeit össze kívánjuk hasonlítani az immunhisztokémiai vizsgálatok sejt számlálási eredményeivel. Találunk-e olyan ellenanyagot, amely esetében a meghatározott módon számolt sejtek megfelelő korrelációt mutatnak a rutin festés pontozásos értékeivel? Ezzel egy objektív, sokkal pontosabban meghatározható módszer állna rendelkezésre a meglehetősen hosszadalmas, szubjektívebb pontozásos rendszerrel szemben.

5. Anyag és módszer

Vizsgálatunkhoz 9 hetes növendék sertéseket használtunk, melyek PRRS negatív állományból származtak. A sertések egy csoportját 2.2×10^5 TCID₅₀ mennyiségű 1-es típusú, 1-es szubtypusú virulens PRRSV törzs izolátummal oltottuk be. Negatív kontrollként a másik csoportot vírusmentes sejtkultúra felülszójával oltottunk be, így azok továbbra is PRRS-fertőzés mentesek maradtak. Az állatok egy részénél 10 nappal (10 days post infection, DPI) (n=7), másik részénél (n=5) 21 nappal a fertőzés után került sor eutanáziára. Mind a fertőzött, mind a negatív kontroll csoport esetében a tüdőről kórbonctani elbírálás készült, illetve mind a 7 lebenyből mintavételre került sor. Ezek után 24 órán keresztül fixáltuk a mintákat 8%-os formaldehidoldatban, majd paraffinos blokk készült belőlük. Ezekből a blokkokból 3-4 µm vastag metszetek készültek, amiket hematoxin-eozinnal festettünk meg. Immunhisztokémiai próbára csak a bal középső lebenyből vett mintákat használtuk. Négyféle ellenanyagot használtunk az immunhisztokémiai vizsgálat során: anti-cytokeratin, anti-Ki67, anti-TTF-1 (thyroid transzkripció faktor-1) és anti-myeloid receptor (Mac387) antitesteket.

a) A hematoxin-eozinnal festett minták elbírálása

A mintákon ötféle elváltozást vizsgáltunk súlyosság és kiterjedés szerint (0-tól 3-ig terjedő pontozási rendszerben; 0: nincs elváltozás, 1: enyhe, 2: mérsékelt, 3: súlyos fokú elváltozás; 0: nincs elváltozás, 1: fokális, 2: multifokális, 3: diffúz elváltozás). Az öt elváltozás, amiket vizsgáltunk: (1) pneumocytá hypertrophia és hyperplasia, (2) mononukleáris sejtes infiltráció a szeptumokban, (3) elhalt sejttermelés megjelenése az alveolusokban, (4) gyulladásos sejtek az alveolusokban és (5) perivaszkuláris gyulladásos sejtes beszűrődés.

A kapott súlyossági (maximum 15 pont) és kiterjedési (maximum 15 pont) pontokat összesítettük minden minta esetében.

b) Immunhisztokémiai vizsgálat

A metszeteket először kétszer 15 perces időtartamra xilolba helyeztük (deparaffinálás), majd kétszer 10 percre 96 %-os alkoholba áztattuk őket. Ezután 4 percre desztillált vízbe kerültek (rehidratálás és mosás). 10 percre 3 %-os hidrogén-peroxid (H_2O_2) oldatba helyeztük a metszeteket (endogén peroxid-gátlás), melyet desztillált vizes lemosás követett (4 perc, a Ki67 antitest esetében ez PBS [phosphate buffered saline, foszfát pufferált sóoldat] oldatos lemosás), majd a feltáráshoz került sor TRIS-EDTA (Tris-ethylenediaminetetraacetic acid, Tris-etilén-diamin-tetraecetsav) keverékben, szintén 10 perc időtartammal. Ezt ismételt lemosás követte PBS oldattal (3 perc). Fehérjeblokkolásra a BioGenex Blocking reagents terméket használtuk tízszeres hígításban, 20 perces inkubációs idővel, szobahőmérsékleten. Ezután tettük a metszetekre az elsődleges antitestet:

- anti-Ki67 antitestnél (ready-to-use oldat) az inkubációs idő 1 óra 37°C-os hőmérsékleten
- anti-cytokeratin antitestnél (ready-to-use oldat) az inkubációs idő 30 perc 37°C-os hőmérsékleten
- anti-TTF-1 és anti-myeloid receptor antitestnél 1:500 hígítást alkalmaztunk, az inkubációs idő 30 perc 37°C-os hőmérsékleten

Használt ellenanyagok:

- Anti-Ki67 (BGX-Ki67) BioGenex (A Ki67 nukleáris fehérje, melynek szerepet tulajdonítanak a sejtproliferációban, valamint kapcsolatban áll a riboszomális RNS-sel (rRNS). Inaktiválása a rRNS gátlásához vezet. Az anti-Ki67 antitest ennek a fehérjének az ellenanyaga. Az ellenanyagot széles körben alkalmazzák daganatok proliferációs tulajdonságainak jellemzésére.)

- Anti-Cytokeratin cocktail (AE1 és AE3) BioGenex (A cytokeratinok a hámszövet sejteinek vázában megtalálható keratin tartalmú intermediate filamentumok, jellemzően hám eredetű sejteket jelölnek vele.)
- Anti-TTF-1 (BGX-397A) BioGenex (ld. a Kórbonctan pontban)
- Macrophage Mouse anti-Human Monoclonal (MAC 387) Antibody (LS-C87783) LifeSpan BioSciences (Ez az egérből nyert monoklonális ellenanyag humán monocyta által termelt tisztított fehérje frakció antitestje, macrophagok megjelenítésére alkalmas.) (Brandtzaeg et al., 1988.)

Az inkubációs idő letelte után felkerült a mintákra a másodlagos antitest: Super Sensitive™ One-Step Polymer-HRP Detection System (BioGenex), szobahőmérsékleten 15 percre. Alapos PBS oldatos lemosás után applikáltuk az előhívó folyadékot: DAB substrate solution (BioGenex) (esetünkben 5ml DAB puffer és 5 csepp DAB Chromogen keveréke ellenanyagonként), melynek inkubációs ideje 5 perc szobahőmérsékleten. Ezután ismét PBS oldatos öblítés következett, majd a metszetek 2-3 másodpercre hematoxin oldatba kerültek, ami után ismét lemostuk őket PBS oldatban 5 percen keresztül. A metszeteket, miután leöntöttük róluk a PBS oldatot, felszálló alkoholsorban víztelenítettük, majd 5-10 percre xilolba helyeztük.

Az így elkészült metszeteket hagytuk megszáradni, majd fedőlemezt ragasztottunk rájuk.

c) Az immunhisztokémiai festésű metszetek elbírálása

Csak az anti-TTF-1, anti-Ki67 és anti-myeloid receptor antitestekkel festett mintákat tudtuk értékelni, ugyanis az anti-cytokeratin ellenanyag jelezte az I-es és II-es típusú pneumocyta és a bronchiális hámsejteket is, így ezek a minták nem voltak alkalmasak a sejtszámlálásra. Minden metszeten 50 egymást nem fedő, 0.20 mm²-es területen számoltuk meg a pozitívan reagáló sejteket.

d) A hematoxinilín-eozinnal és az immunhisztokémiával kapott eredmények összehasonlítása

A különböző módon megfestett metszetek elbírálása során kapott számszerű eredmények célzott összehasonlításával azt próbáltuk kideríteni, hogy melyik immunhisztokémiai marker esetében kapunk olyan eredményt, ami megfelelő módon korrelál az adott állat ugyanazon tüdőlebenyének hematoxinilín-eozinnal festett metszetének pontozásos értékével.

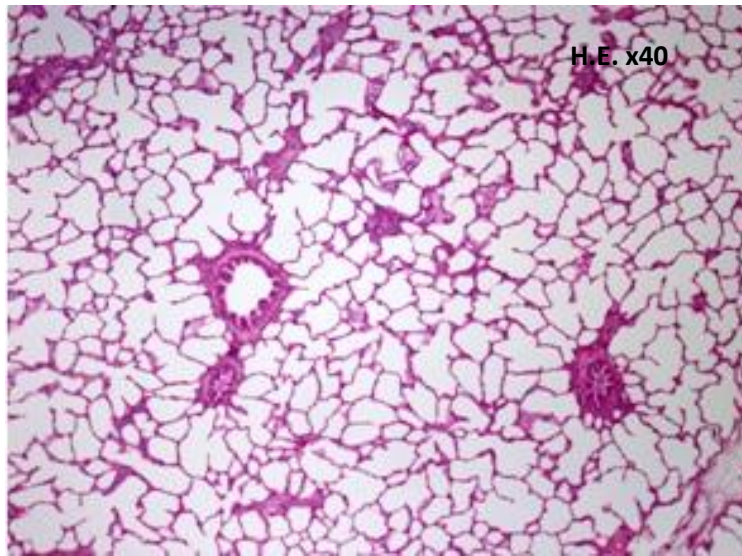
e) Statisztikai vizsgálatok

A hematoxinilín-eozinnal festett metszetek pontozásos értékeinek, illetve az immunhisztokémiai módszerrel jelölt metszeteken számolt pozitív sejtek számának további elemzését az *R.2.3.0* program segítségével végeztük. Az egyes csoportok közötti különbségek szignifikancia vizsgálatához a Student féle T-tesztet, a különböző módszerekkel végzett festések eredményi közötti esetleges korreláció vizsgálatához pedig a Pearson féle korrelációs analízist használtuk.

6. Eredmény

A hematoxilin-eozin festést követően, az adott elváltozás súlyossága, és kiterjedése alapján elvégzett pontozásos bírálat eredményeinek összesítése alapján látható, hogy valamennyi kategória esetében szignifikánsan ($p < 0.05$) növekedett a kapott érték.

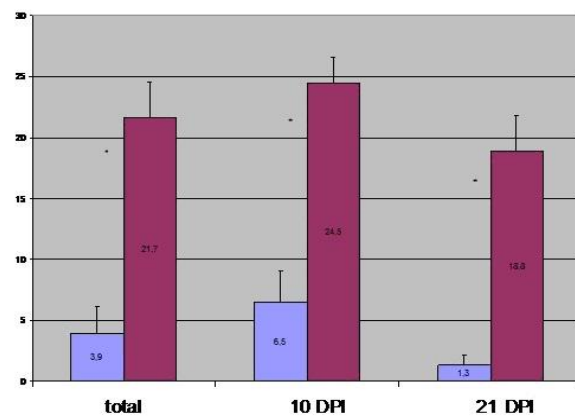
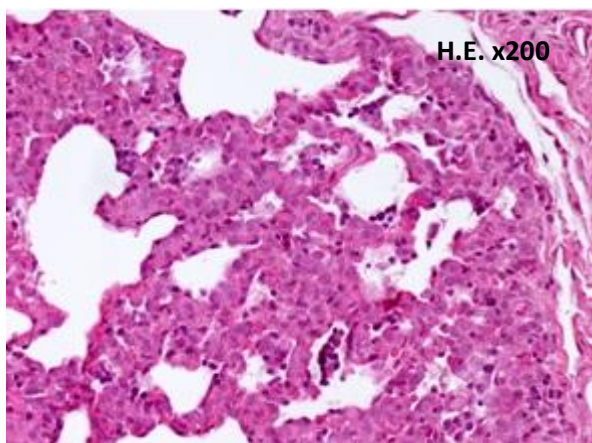
a) Eredmények a hematoxilin-eozinos festés alapján



5. kép: Egészséges tüdőszövet

A normál tüdőszövetben az alveolusok falai vékonyak, üregükben nem található kóros tartalom, illetve nem látunk kóros sejtproliferációt az őket elválasztó sövényekben.

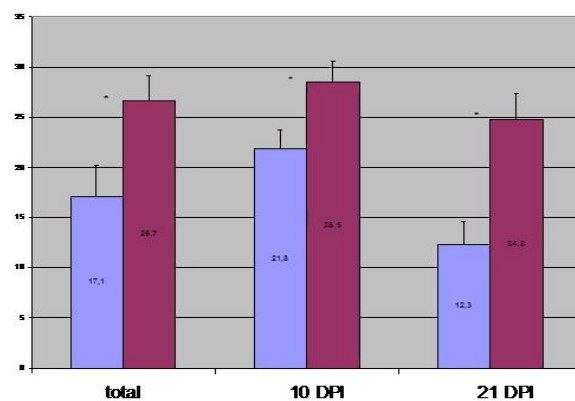
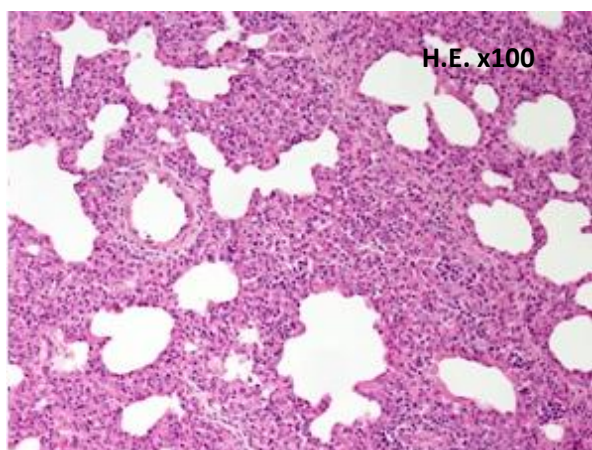
(1) Pneumocystis hypertrophia és hyperplasia



6. kép

Az ábrán jól látható, hogy a 10 és 21 nappal a fertőzés utáni vizsgálat során és az összes mintát tekintve is jelentős volt a pneumocysta hypertrophia és hyperplasia (málya) a kontrollhoz (kék) képest. A képen látható, hogy az alveolusok falát megvastagodott, kuboidális jellegű sejtek alkotják.

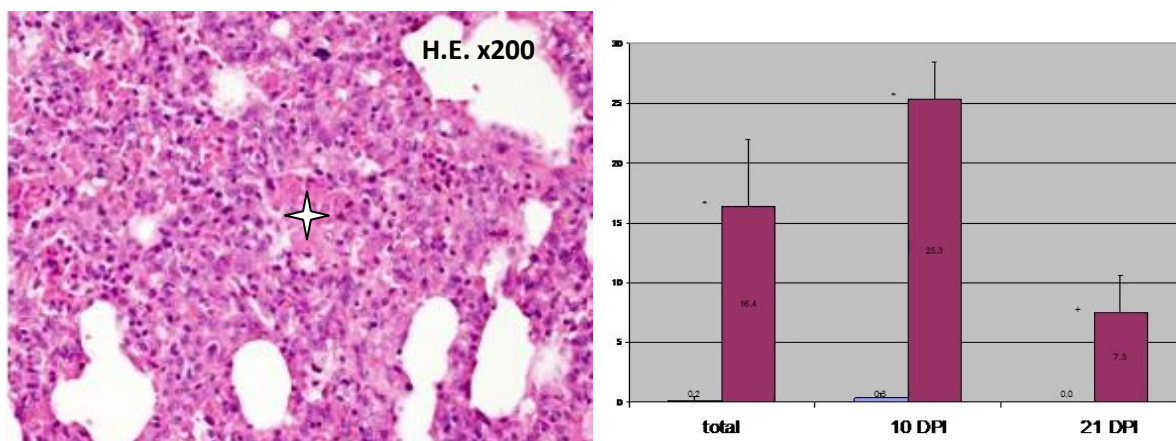
(2) Mononukleáris sejtinfiltráció a szeptumokban



7. kép

Itt is jól látható a grafikonon a kontrolltól való értékbeli eltérés mind a 10 nappal, mind a 21 nappal a fertőzés után vizsgált minták esetén. A képen megfigyelhető számos sötéten festődő magvú mononukleáris sejt a szeptumok állományában.

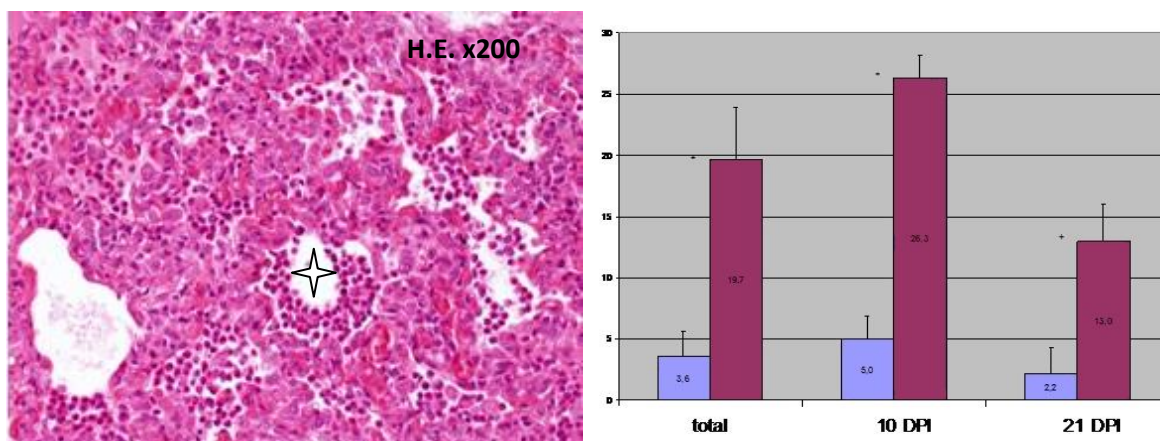
(3) Elhalt sejttörmelék megjelenése az alveolusokban



8. kép

Kimagasló értékeket kaptunk a kontroll pontozáshoz viszonyítva az alveolusokban megjelenő elhalt sejttörmelék (debris) esetén, mely a képen is jól látható, erősen eozinofil festődésű (csillag).

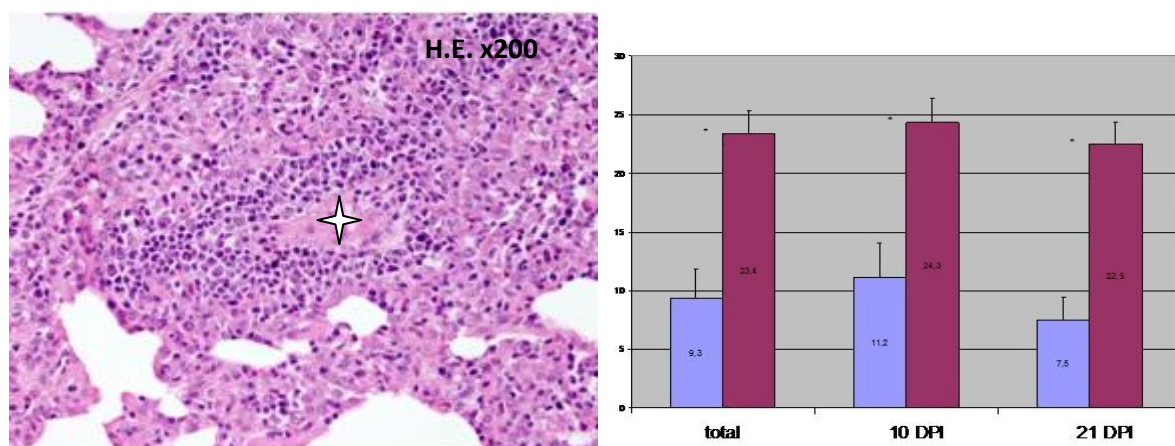
(4) Gyulladásos sejtek felhalmozódása az alveolusokban



9. kép

A fertőzés utáni vizsgálatok eredményei ebben az esetben is egyértelműen magasabb értéket mutattak a kontrollhoz viszonyítva, a képen láthatók az intraalveolárisan helyeződő sötét magvú, gyulladásos eredetű sejtek, melyek zömmel neutrofil granulocyták voltak (csillag).

(5) Perivaszkuláris gyulladásos sejtes beszűrődés



10. kép

Megfigyelhető, hogy a kontroll csoporton végzett pontozáshoz képest ebben a kategóriában is jelentős a számbeli eltérés a fertőzött tüdőszövetekben. A képen jól látható a kis vérér (csillag) körül megjelenő, kifejezetten vastag mononukleáris sejtes beszűrődés.

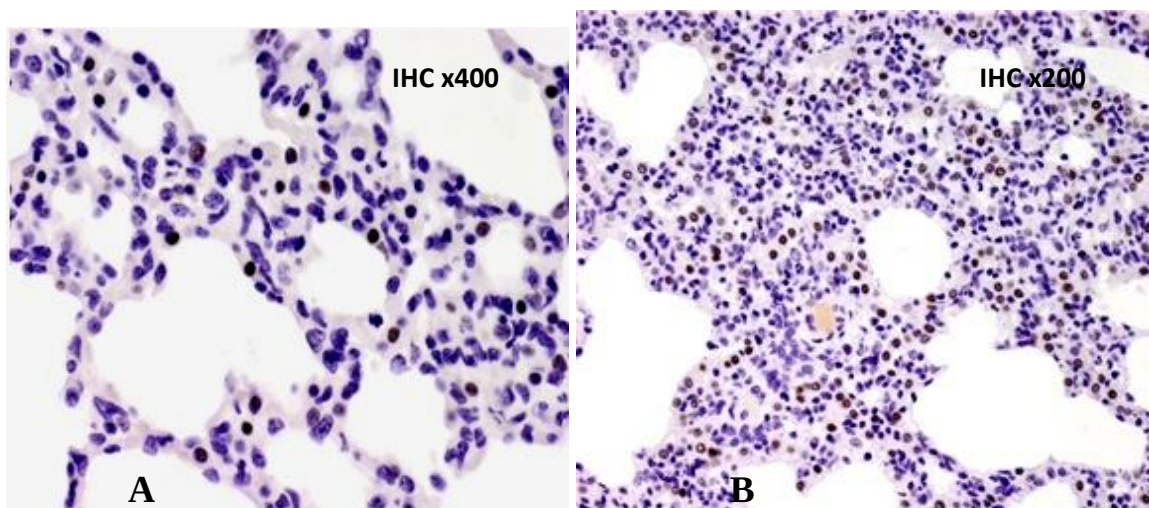
b) Eredmények az immunhisztokémiai festés alapján

Az immunhisztokémiai módszerekkel megfestett metszetek vizsgálata során látható volt, hogy az általunk használt TTF-1 ellenanyag alkalmas a II-es típusú pneumocyták (és Clara sejtek) kimutatására sertés tüdőszövetében. A pozitív sejtek magjában egynemű, intenzív festődést figyeltünk meg, melyek az alveolusok falában, leginkább a septumok elágazásánál voltak láthatóak. Ezen sejtek száma szignifikánsan ($p < 0.05$) megnövekedett 10 nappal a fertőzés után vizsgált állatok tüdejében a kontroll csoportéhoz képest.

Ugyanakkor látható volt a Ki67 és Mac387 pozitív sejtek számának növekedése is, de nem találtunk szignifikáns eltéréseket a kapott értékek között a viszonylag alacsony mintaszám és a relatív nagy szórás miatt. A cytokeratin jelöléssel végzett immunhisztokémiai mintákon nem végeztük el a sejtszámlálást, mivel (ahogy az várható volt) az ellenanyag nem csak a II-es, hanem az I-es típusú pneumocytákkal és a bronchiális hámsejtekkel is reakcióba lépett. Az anti-Ki67

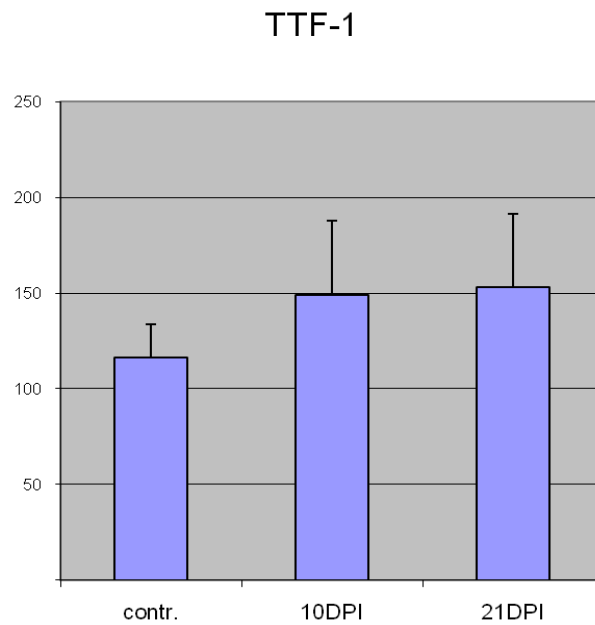
antitestest minták értékei pozitív korrelációt ($p < 0.05$) mutattak a lebeny hematoxin-eozin vizsgálata során tapasztalt elváltozások súlyosságával.

(1) TTF-1 jelölés



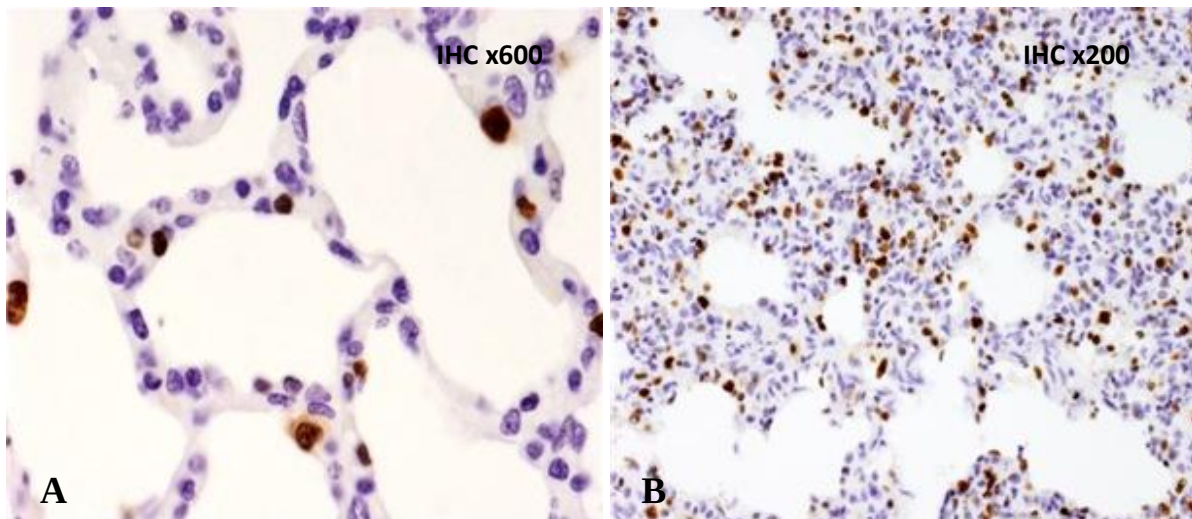
11. kép: Negatív (A) és PRRS-sel fertőzött (B) tüdőszöveti minta anti-TTF-1 antitestest festése

Látható, hogy a TTF-1 pozitív sejtek (barna színűek) száma jelentősen megnövekedett az amúgy is megszélesbedett interstitium állományában.



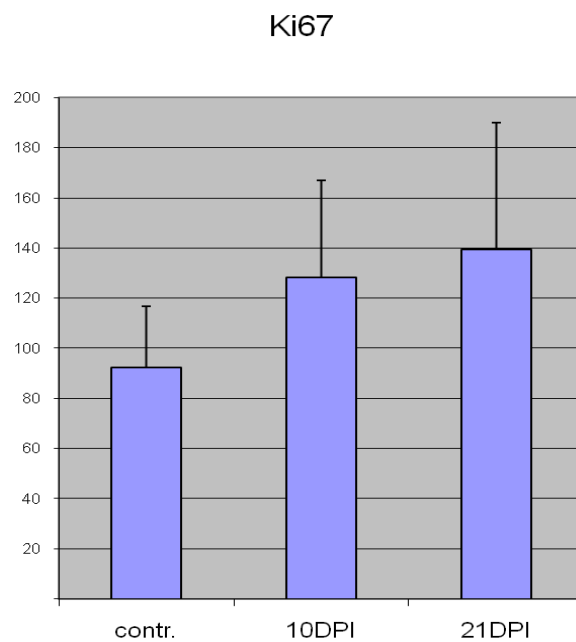
2. ábra: Átlagos TTF-1 ellenanyag pozitív sejtszám a kontroll (contr.) és a fertőzött (10 DPI és 21 DPI) csoportok körében

(2) Ki67 jelölés



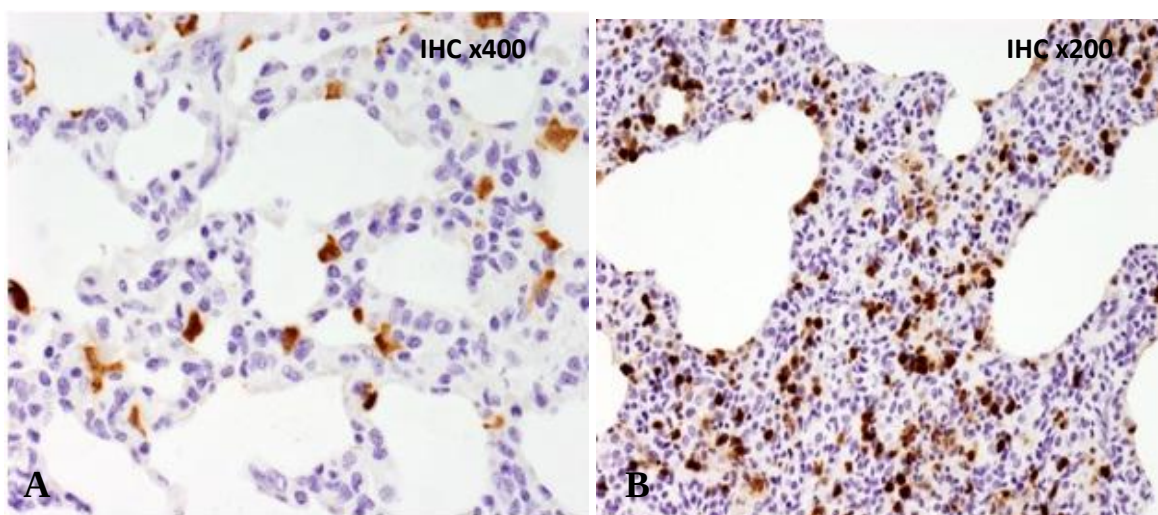
12. kép: Negatív (A) és PRRS-sel fertőzött (B) tüdőszöveti minta anti-Ki67 antitestek festése

A Ki67 reakció során a pozitív sejtek magja intenzív, homogén színreakciót mutatott.

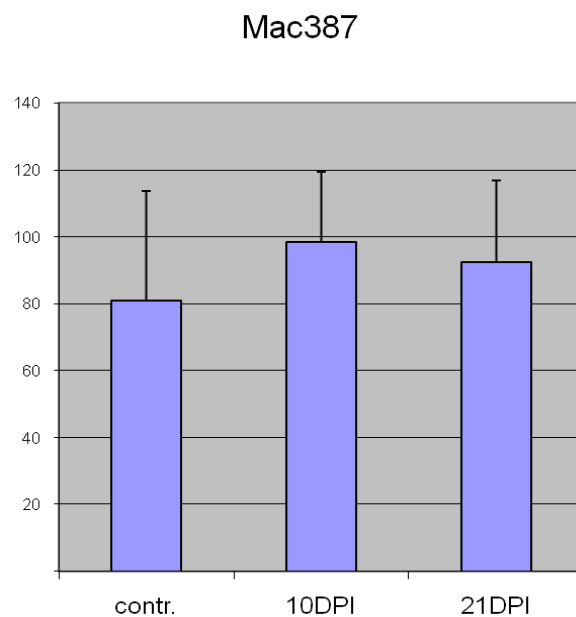


3. ábra: Átlagos Ki67 ellenanyag pozitív sejtszám a kontroll (contr.) és a fertőzött (10 DPI és 21 DPI) csoportok körében

(3) Mac387 jelölés



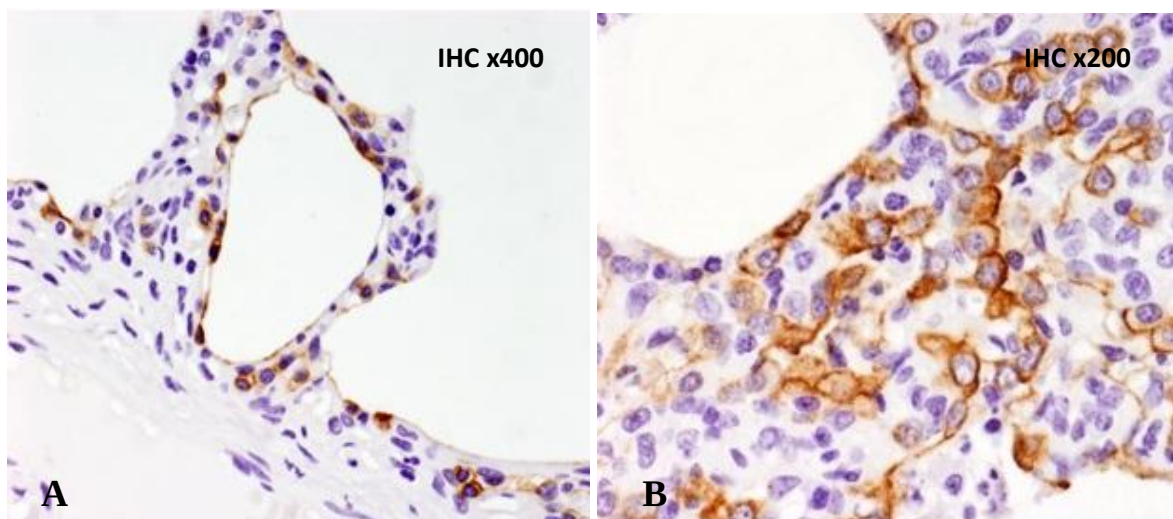
13. kép: Negatív (A) és PRRS-sel fertőzött (B) tüdőszöveti minta Mac387 antitesttes festése



4. ábra: Átlagos Mac387 ellenanyag pozitív sejtszám a kontroll (contr.) és a fertőzött (10 DPI és 21 DPI) csoportok körében

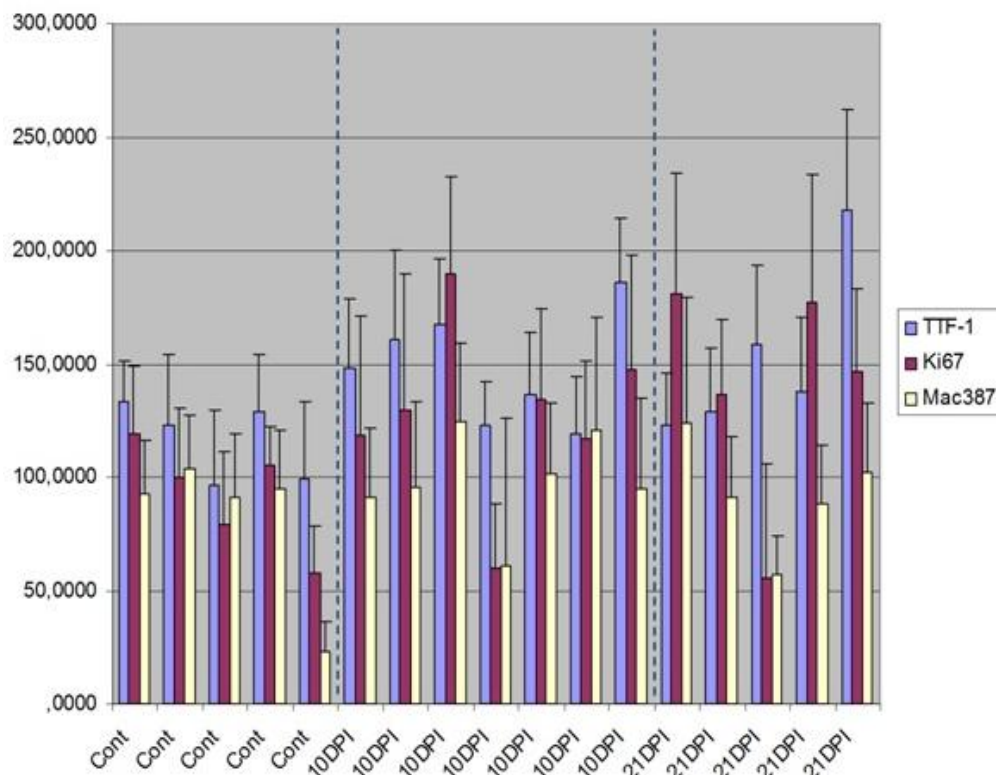
A Mac387 nevű ellenanyag használata során a pozitív sejtek intenzív, diffúz cytoplazma festődést mutattak.

(4) Cytokeratin jelölés



14. kép: Negatív és PRRS-sel fertőzött tüdőszöveti minta anti-cytokeratin antitestek festése

A cytokeratin festés, ahogy az várható volt, pozitív reakciót adott a hám eredetű sejtekben, melyek intenzív, diffúz homogén festődést mutattak. Az I-es típusú pneumocyták, melyek az alveolusokat bélelik, kifejezetten vékony cytoplazmával rendelkeznek, hogy a gázcsere rajtuk keresztül végbemehessen. Ez a metszeten vékony barnás vonalként jelent meg. A II-es típusú pneumocyták ezzel szemben lekerekedett, bőséges cytoplazmával rendelkező sejtek, melyek száma láthatóan megemelkedett a PRRS fertőzött állatokban.

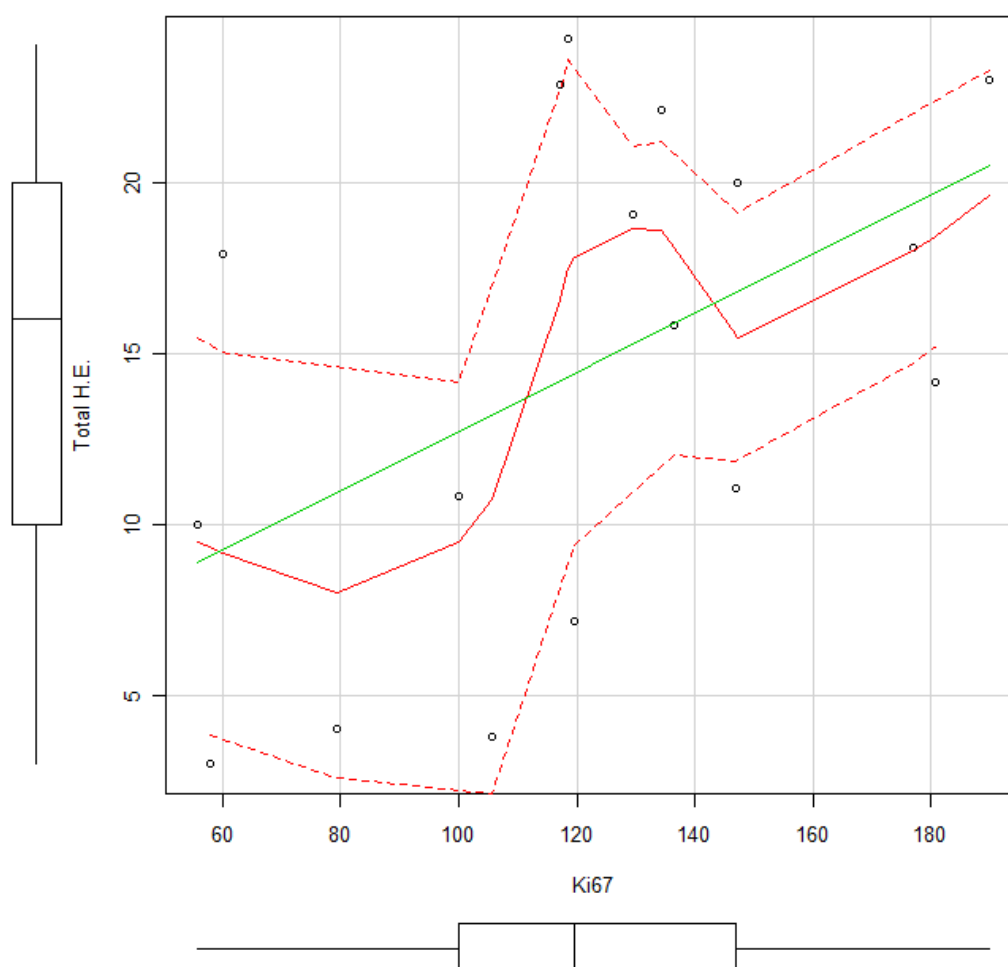


5. ábra: Összesítő táblázat az immunhisztokémiai eredményekről

Ez a grafikon is jól ábrázolja, hogy a negatív kontroll csoporthoz képest valóban volt mind a három ellenanyag esetében látható pozitív sejtszám-növekedés, ami a TTF-1 és a Ki67 antitesteknél jelentősebb, mint a Mac387 ellenanyagnál. A szaggatott vonalak a kontroll (Cont), a 10 és a 21 DPI minták eredményeit választják el egymástól.

c) A hematoxinil-eozinnal és az immunhisztokémiával kapott eredmények összehasonlítása

A különböző immunhisztokémiai jelölések és a hematoxinil-eozinnal festett metszetek értékelése során kapott eredmények korrelációanalízise során egyedül a Ki67 értékek mutattak pozitív korrelációt ($p < 0.05$, $r = 0.503$, ld. 6. ábra).



6. ábra

Az ábrán a haematoxinil-eozinnal festett metszetek összesített pontozásos értékei (Total H.E.), illetve a Ki67 pozitív sejtszámok közötti korreláció látható

7. Megvitatás

PRRS fertőzés során a tüdőben kialakuló kórszövettani elváltozások gyakorlati körülmények között, közönséges sertéstelepekről származó tüdőmintákban nagyon ritkán figyelhetők meg. Az esetek túlnyomó többségében a képet a betegség hatására, a tüdő védekezőképességének jelentős csökkenése miatt kialakuló másodlagos, általában bakteriális fertőzések nyomán kialakuló hurutos-gennyes jellegű elváltozások uralják.

Kísérletes fertőzések során a tüdőben általában az alveolaris szeptumok mononukleáris sejtes infiltrációját, intraalveolaris necrotikus törmelék felhalmozódását, valamint a II-es típusú pneumocyták proliferációját írták le (Rossow et al., 1994; Halbur et al., 1996; Gómez-Laguna et al., 2009). Hematoxin-eozinnal festett metszeteken azonban a II-es típusú pneumocyták kifejezetten hasonlítanak a macrophagokra, amelyek szintén nagy számban lehetnek jelen PRRS fertőzést követően. Célunk az volt, hogy egy specifikus, a II-es típusú pneumocyták jelölésére használatos, az irodalmi adatok alapján sertésben eddig még nem tesztelt ellenanyag segítségével megjelöljük ezeket a sejteket, illetve számuk meghatározásával jellemezzük mennyiségi viszonyait PRRSV-vel mesterségesen fertőzött állatok tüdejében. Ezzel együtt a tüdőszövet proliferációs jellegzetességeit is vizsgáltuk egy olyan ellenanyag segítségével, melyet széles körben alkalmaznak osztódó sejtek számának meghatározására (Ki67). Egy másik ellenanyag segítségével a macrophagokat jelöltük, illetve számoltuk meg (Mac387), illetve egy negyedik markerrel a hám eredetű sejteket tettük láthatóvá (cytokeratin).

Ezen vizsgálatok előtt rutin hematoxin-eozinos metszeteken osztályoztuk a tüdőmintákat öt különböző, általunk jellemzőnek ítélt elváltozás alapján. Ezek esetében azt figyeltük meg, hogy az alveolaris szeptumok mononukleáris sejtes infiltrációja, illetve a perivaszkuláris mononukleáris sejtes felhalmozódás esetében, noha szignifikáns volt az elváltozások súlyosbodása, magas értékeket kaptunk a kontroll csoportban is. Ez azzal magyarázható, hogy az állatok, noha PRRS negatív állományokból származtak, számos egyéb légzőszervi patogénnel voltak szubklinikailag

fertőzöttek, melyek a tüdőszövetekben kórszövettanilag felismerhető aspecifikus jellegű védekező reakciókat váltanak ki. A fertőzést követő 10., illetve a 21. napon kiirtott állatok tüdőelváltozásai szintén mutattak különbséget. Összességében megállapítható, hogy valamennyi kategória esetében a 21. napon vizsgált tüdők pontszámai alacsonyabbak voltak, a tüdőben tehát észlelhető volt a gyógyulási hajlam. Ez leginkább az alveolusokban felgyűlő elhalt sejttörmelék felhalmozódása, illetve az ugyanitt megjelenő gyulladásos sejtek esetében volt jellegzetes. Ezek voltak azok a kategóriák, amelyek értékei a legnagyobb különbséget mutatták a kontroll csoporthoz képest. Ezek feltehetőleg a fertőződést követően gyorsan, a vírus közvetlen sejtkárosító, illetve a fertőzött macrophagokból felszabaduló mediátorok nyomán („bystander” hatás) kialakuló heveny elváltozások, melyek gyorsan képesek gyógyulni olyan esetekben, amikor másodlagos fertőzések nem súlyosbítják a folyamatot.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit kiértékelve statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$) pozitív sejtszám-emelkedést csak a TTF-1 ellenanyag esetében észleltünk. A többi ellenanyag esetében is nőtt a pozitív sejtek átlagos száma, azonban ezek a különbségek a megfigyelt magas szórásértékek miatt nem bizonyultak szignifikánsnak. Rendkívül nagy egyedi eltérések mutatkoztak az egyes csoportokon belüli különböző állatok esetében is (**ld. 6. ábra**). Feltehetőleg ez is hozzájárul a fertőzés nyomán kialakuló tünetek és elváltozások súlyosságában megfigyelt jelentős egyedi eltérésekhez.

Az eredmények statisztikai értékelése során a másik fő szempont a hematoxin-eozinnal festett metszeteken elvégzett pontozásos értékelés, illetve az immunhisztokémiailag jelölt különböző sejtek számai között fennálló bármilyen korreláció. Alkalmas lehet-e ezáltal bármelyik ellenanyag arra, hogy az általa megjelölt sejtek számának meghatározásával kiváltható legyen egy sokkal szubjektívebb, különböző elváltozások súlyosságának, és kiterjedésének osztályozásán alapuló módszer? Ez alapján azt tapasztaltuk, hogy a Ki67 esetében pozitív korreláció van a pozitív sejtek száma, illetve az adott tüdőlebenyben megfigyelt jellegzetes elváltozások súlyossága és kiterjedése alapján kapott összesített pontszám között ($p < 0.05$, $r = 0.503$). Az 6. ábrán jól látható

azonban, hogy a pontok az illesztett egyenestől nagyon eltérnek, a tendenciát jelző piros vonal úgyszintén, ami azt mutatja, hogy az összefüggés nem lineáris. Megállapítható tehát, hogy Ki67 és a Total H.E. között pozitív összefüggés van, de az első nem alkalmas az utóbbi helyettesítésére.

Nem zárható ki, hogy a megfigyelt nagy szórásértékek, egyedi különbségek, illetve a nem lineáris jellegű korreláció összefüggésben van azzal, hogy kísérleti állataink átlagos sertéstelepről származó ún. konvencionális sertések voltak. Nagy valószínűséggel SPF állatokkal elvégezve a kísérletet sokkal alacsonyabb szórásértékeket, kisebb egyedi eltéréseket lehetne megfigyelni. A konvencionális sertéseken elvégzett kísérletek ugyanakkor sokkal jobban képesek modellezni a valós, sertéstelepi körülményeket.

8. Összegzés/Summary

A.

Kutatásunk célja, hogy jellemezzük azokat a tüdőszöveti elváltozásokat, melyeket egy nemrég izolált PRRSV törzzsel való kísérletes fertőzés váltott ki. A vizsgálathoz növendék sertéseket használtunk. Módszer: 9 hetes PRRSV negatív sertéseket oltottunk be $2,2 \times 10^5$ TCID₅₀ mennyiségű 1-es típusú, 1-es szubtypusú virulens PRRSV törzs izolátummal. Negatív kontrollként egy csoport PRRSV negatív sertést vírusmentes sejt kultúra felülszójával oltottunk be. Az állatok elaltatására 10 nappal (n=7) és 21 nappal (n=5) a fertőzés után került sor. A tüdő szöveti elváltozásait azonos korú, nem fertőzött kontroll sertésekből vett tüdőszövet-mintáival hasonlítottuk össze.

A vizsgálat első fázisában a mintákat hematoxin-eozin festéssel bíráltuk el. A mikroszkópos vizsgálat során a mintákról nem tudtuk, melyik csoportban lévő sertésből származnak. A léziók a következő pontozási rendszer alapján kerültek elbírálásra: (1) pneumocyt hypertrophia és hyperplasia, (2) mononukleáris sejtinfiltratio a szeptumokban, (3) intraalveoláris nekrotikus sejttörmelék megjelenése, (4) intraalveoláris gyulladásos sejtek jelenléte és (5) perivaszkuláris gyulladásos sejtes beszűrődés.

A további, részletesebb elbírálás érdekében immunhisztokémiai festést alkalmaztunk anti-cytokeratin, anti-Ki67, anti-TTF-1 (thyroid transzkripciós faktor-1) és anti-myeloid receptor (MAC387) antitestekkel, hogy azonosítsuk az alveoláris epithel sejteket, sejtproliferációkat, II-es típusú pneumocytákat és macrophagokat. A Ki-67, TTF-1 és a MAC387 esetében a jelölt sejteket nagy nagyításon (0.20 mm^2) számoltuk, minden mintában 50 egymást nem fedő, és egymást követő látótérben. A statisztikai analízishez R szoftvert használtunk.

Az immunhisztokémiai festések értékelése során kiderült, hogy a humanizált anti-TTF-1 antitestek segítségével sikeresen kimutathatók a II-es típusú pneumocyták sertés tüdőszövetében. TTF-1 pozitív sejtek jelentősen ($p < 0.05$) megnövekedett száma jelezte a sejtproliferációt heveny esetben, összevetve a kontroll tüdőszövet mintákkal. Megfigyelhető a Ki67 és MAC387 pozitív

sejtek megtöbbszöröződése is, de a kísérleti állatok viszonylag alacsony száma és a szórás magas értékei miatt ezeknek az értékeknek a növekedését nem találtuk statisztikailag szignifikánsnak. A cytokeratin jelölés jelezte az I-es és II-es típusú pneumocytaakat és a bronchiális epithel sejteket is, így ezek a minták nem voltak alkalmasak a sejtszámlálásra.

Amikor a rutin szövettani értékelést összehasonlítottuk az immunhisztokémiaileg pozitív sejtek számával, a Ki67 antitesttel jelölt minták adatai pozitív korrelációt ($p < 0.05$) mutattak a tüdőbeli elváltozások súlyosságával.

B.

The aim of the study was to characterize immunohistochemically the lung lesions after a challenge with a recently isolated PRRSV field strain in growing pigs. Methods: 9-week-old PRRSV negative pigs were challenged with 2.2×10^5 TCID₅₀ of a Type 1, subtype 1 virulent PRRSV field isolate. Negative control pigs were inoculated with virus free cell culture supernatant. Animals were euthanized on 10 DPI (n=7) and 21 DPI (n=5). Lung lesions were compared to age matched pigs of the non-infected control group.

In the first phase of the study lung lesions were evaluated on routine HE stained slides. The microscopic evaluation of the lung lesions was performed as a blinded analysis and the lesions were scored based on the following criteria: (1) pneumocyte hypertrophy and hyperplasia, (2) septal mononuclear infiltration, (3) intraalveolar necrotic debris, (4) intraalveolar inflammatory cell accumulation and (5) perivascular inflammatory cell accumulation.

For further characterization of the lung lesions, immunohistochemical stainings were performed using anti-cytokeratin, anti-Ki67, anti-TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1) and anti-myeloid receptor (MAC387) antibodies to identify alveolar epithelial cells, proliferating cells, type II pneumocytes, and macrophages, respectively. In case of Ki67, TTF-1 and MAC387 the labelled cells were counted in 50 non-overlapping and consecutively selected high magnification fields of 0.20 mm². R software was applied to carry out statistical analyses.

The evaluation of the immunohistochemical stainings revealed that humanized anti TTF-1 antibodies can successfully identify type II pneumocytes in porcine lung tissues. Marked proliferation of these cells was confirmed by a significant ($p < 0.05$) increase of TTF-1 positive cells in acute cases compared to the lungs of control pigs. Upregulation of Ki67 and MAC387 positive cells was also observed, however due to the relative low number of the sample animals and high values of standard deviation, the increase of these values were found not to be statistically

significant. Cytokeratin labelling marked the type I, and type II pneumocytes as well as bronchial epithelial cells, however this staining was not suitable for cell counting purposes.

When the routine histological scores were compared to the number of immunohistochemically positive cells, Ki67 cell counts were found to show positive correlation ($p<0.05$) with the overall severity of the lesions.

9. Irodalomjegyzék

- 1) Balka Gyula: A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi járványtani helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek genetikai tulajdonságainak vizsgálata, 2009, PHD dolgozat
- 2) Bohinski, R. J., DiLauro, R., Whitsett, J. A.: Lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3 indicating common mechanisms for organ-specific gene expression along the foregut axis In: Molecular and Cellular Biology, 1994, vol. 14., pp. 5671-5681
- 3) Brandtzaeg, P., Jones, D. B., Flavell, D. J., Fagerhol, M. K.: Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen In: J. Clin. Pathol., 1988, vol. 41., pp. 963-970.
- 4) Carman, S., Sanford, S.E. and Dea, S.: Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario – 1978 to 1982 In: Can. Vet. J., 1995, vol. 36., pp. 776-777.
- 5) Caswell, C. L., Williams, K. J.: Respiratory system In: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Edited by Maxie, M. G. Saunders, Elsevier, 2007
- 6) Cavanagh, D.: *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae* In: Arch. Virol., 1997, vol. 142., pp. 629-633.
- 7) Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmermann, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A.: Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars In: J. Vet. Diagn. Invest., 1995, vol. 7., pp. 456-464.

- 8) Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W.: Swine infertility and respiratory syndrome (Mystery swine disease) In: Proc. Minn. Swine Vet. Conf., 1992, pp. 15-17.
- 9) De Vries, A. A. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M., de Groot, R. J.: The Genomo Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses, In: Seminars in Virology, 1997, vol. 8., pp. 33-47.
- 10) Gómez-Laguna, J., Salguero, F. J., Barranco, I., Pallarés, F. J., Rodríguez-Gómez, I. M., Barnabé, A., Carrasco, L.: Cytokine Expression by Macrophages in the Lung of Pigs Infected with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus In: J. Comp. Path., 2010, vol. 142., pp. 51-60.
- 11) Halbur, P. G., Paul, P. S. et al.: Comparison of the pathogenicity of two U. S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus In: Vet. Pathol., 1995, vol. 32, pp. 648-660.
- 12) Halbur, P. G., Paul, P. S., Meng, X., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A.: Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model In: J. Vet. Diagn. Invest., 1996, vol. 8., pp. 11-20.
- 13) Hermann, J.R., Hoff S.J., Muñoz-Zanzi, C., Yoon K.J., Roof, M., Burkhardt A.C., Zimmermann, J.J.: Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols In: Vet. Res., 2007, vol. 38., pp. 81-93.
- 14) Hornyák Á., Pálfi, V. és Karakas M.: Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon, Akadémiai beszámoló, 1996, 10. előadás

- 15) Keffaber, K.K.: Reproductive failure of unknown etiology In: American Association of Swine Practitioner Newsletter, 1989, vol. 1., pp. 1-9.
- 16) Kim, T.S., Benfield, D.A., Rowland, R.R.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis In: Vir. Res., 2002, vol. 85., pp. 133-140.
- 17) Kristensen, C.S., Bøtner, A., Takai, H., Nielsen, J.P., and Jorsal, S.E.: Experimental airborne transmission of PRRS virus In: Vet. Microbiol., 2004, vol. 99., pp. 197-202.
- 18) Lau, S. K. M. D., Luthringer, D. J. M. D., Eisen, R. N. M. D.: Thyroid Transcription Factor-1: A Review In: Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2002, vol. 10., pp. 97-102.
- 19) Lee, S.M., and Kleiboeker, S.B.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway In: Virology, 2007, vol. 365., pp. 419-434.
- 20) Lindhaus, W., Lindhaus, B.: Rätselhafte Schweinkrankheit In: Prkat. Tierarzt, 1991, vol. 72., pp. 423-425.
- 21) Madsen, K. G., Hansen, C. M., Madsen, E. S., Strandbygraand, B., Bøtner, A., Sorensen, K. J.: Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds In: Arch. Virol., 1998, vol. 143., pp. 1683-1700.
- 22) Medveczky, I.: Áttekintés a sertés reprodukciós és légzőszervi szindrómájának (PRRS) újabb ismereteiről In: Magyar Állatorvosok Lapja, 1996, sz. 51., ol. 367-371.
- 23) Miller, L.C., Fox, J.M.: Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus In: Vet. Immunol. Immunopathol., 2004, vol. 102., pp. 131-142.

- 24) Molnár Tamás: Egyes fertőző sertésbetegségek aktuális járványügyi kérdései, 2011, 20. Köves Napok Konferencia (előadás)
- 25) Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents In: J. Virol., 1999, vol. 73., pp. 271-280.
- 26) Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., Zimmermann, J.: Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States In: JAVMA, 2005, vol. 227., pp. 385-392.
- 27) Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C.: Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes (*Aedes vexans*) (Meigen) In: Can. J. Vet. Res., 2002, vol. 66., pp. 191-195.
- 28) Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Tricando, C., Pijoan, C.: Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*) In: Vet. Rec., 2003, vol. 152., pp. 73-76.
- 29) Pol, J. M., van Dijk, J. E. et al.: Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)) In: Vet. Quart., 1991, vol. 13., pp. 137-143.
- 30) Ray, M.K., Chen, C.Y., Schwartz, R.J., DeMayo, F. J.: Transcription regulation of a mouse Clara cell-specific protein (mCC10) gene by the Nkx transcription factor family members thyroid transcription factor 1 and cardiac muscle-specific homeobox protein (CSX). In: Mol. Cell. Biol., 1996, vol. 16, pp. 2056-2064.

- 31) Ropp, S. L., Wees, C. E. et al.: Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States In: J. Virol., 2004, vol. 78., pp. 3684-3703.
- 32) Rossow, K. D., Bautista, E. M., Goyal, S. M., Molitor, T. W., Murtaugh, M. P., Morrison, R. B., Benfield, D. A., Collins, J. E.: Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs In: J. Vet. Diagn. Invest., 1994, vol. 6., pp. 3-12.
- 33) Sandri, G.P., Pesente, P., Sperati-Ruffoni, L., Giovanardi, D., Piemonti, D.: PRRSV aerosol transmission: a documented case in the real world In: Proc. Intl. Pig Vet. Congr. I., 2006, p. 235.
- 34) Schurrer, J.A., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Mahlum, C., Mondaca, E., Otake, S., Fano, E., Collins, J.E., Pijoan, C.: Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs In: Am. J. Vet. Res., 2004, vol. 65., pp. 1284 - 1292.
- 35) Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Potapchuk, D., Podgórska, K.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes In: Gen. Virol., 2006, vol. 87., pp. 1835-1841.
- 36) Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B, Scherbakov, A.V., Timina, A.M., Krabbe, J.S., Chabros, K., Potapchuk, D.: Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe In: Arch. Virol., 2008, vol. 153., pp. 1479-1488.

- 37) Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmermann, J.J., Evans L.E., Landgraf J.G., Wills R.W., Sanderson T.P., McGinley, J.M., Brevik, A.J., Ciszewski, D.K., Frey, M.L.: Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars In: J. Am. Vet. Med. Assoc., 1994, vol. 204., pp. 1943-1948.
- 38) Tan, D., Li, Q., Deeb, G., Ramnath, N., Slocum, H.K., Brooks J., Cheney R., Wiseman S., Anderson T., Loewen G.: Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study In: Hum Pathol., 2003, vol. 34., pp. 597-604.
- 39) Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M., ter Laak, E. A., Bloemraad, M., de Kluyver, E. P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuysen, J. M., Moonen, P. L. J. M., Zetstra, T., de Boer, E. A., Tibben, H. J., de Jong, M. F., de Veld, P., van't Groenland, G. J. R., van Gennip, J. A., Voets, M. T., Verheijden, J. H. M., Braamskamp, J.: Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus In: Vet. Quart., 1991, vol. 13., pp. 121-128.
- 40) Wills, R. W., Doster, A., Osorio, F.: Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) to age-matched sentinel pigs In: J. Swine Health Prod., 2002, vol. 10., pp. 161-165.
- 41) Wills, R.W., Zimmermann, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffmann, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt K.B.: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Routes of excretion In: Vet. Microbiol., 1997, vol. 57., pp. 69-81.
- 42) Zhou, L., Lim, L., Costa, R.H., and Whitsett, J.A.: Thyroid transcription factor-1 hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung In: J. Histochem. Cytochem., 1996, vol. 44., pp. 1183-1193.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban Dr. Balka Gyulának, aki témavezetőként mindig a segítségemre volt tudományos munkám során, és biztosította számomra azt a szakmai háttérrel, ami nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Továbbá köszönettel tartozom Pop Renáta szakasszisztensnek, aki irányította tevékenységemet a kórszövettani munkálatok elvégzése során. Köszönöm Abonyi-Tóth Zsolt-nak a statisztikai vizsgálatokhoz nyújtott segítségét.

Köszönöm a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék többi munkatársának, hogy munkám során segítségemre voltak, és minden eszökhöz hozzáférést biztosítottak.

A dolgozat elkészültét a Bolyai János kutatatási ösztöndíj, illetve a TÁMOP-4.2.2. B-10/1 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” nevű pályázat támogatta.