

Pályázat

A pályázatot a TÁMOP 4.2.1. projekt keretein belül megrendezett Innovációs Versenyre adom be **Állatorvoslás** tudományterületen. A pályázatom a **galamb circovírus** okozta megbetegedések elleni védekezéssel foglalkozik, különös tekintettel, a vakcinázási lehetőségekre.

A galamb circovírusok (pigeon circovirus, PiCV) okozta fertőzések elterjedtségéről pontos felmérésekre alapozott adatokkal ma még nem rendelkezünk, de ahol ilyen irányú vizsgálatokat végeztek ott a vizsgált állományok 80-100%-os fertőzöttségéről számoltak be. A PiCV a leggyakrabban kimutatható kórokozó a fiatal, változatos tüneteket mutató, klinikailag beteg galambokból (Soike és mtsai., 2001), és emellett számtalan adat igazolja széleskörű elterjedését a sport- és a húsgalambok körében, bármilyen egészségi állapotú és korú egyedről legyen is szó (Todd és mtsai., 2004). A kórokozó a *Circoviridae* családon belül a *Circovirus* genusba tartozik (Todd és mtsai., 2000). Először Észak-Amerikában azonosították (Woods és mtsai., 1993), majd ezt követően világszerte számos országban kimutatták a fertőzést.

A PiCV jellemzően a hám típusú sejtekben, a macrophagokban és a lymphoid sejtekben szaporodik, kifejezetten immunszuppresszív hatású. Utóbbiból fakadóan az általa kiváltott kórképet, számos másodlagos fertőzés súlyosbítja. A megbetegedett madarakban az általános tünetek uralják a klinikai képet (Woods és mtsai., 1994; Raue és mtsai., 2005). A leginkább veszélyeztetett korosztály a 4-12 hetes egyedek csoportja, itt jelentkeznek a tünetek a legintenzívebben. A tünet együttest éppen ezért nevezik "young pigeon disease syndrome"-nak (YPDS, fiatal galamb betegség szindróma).

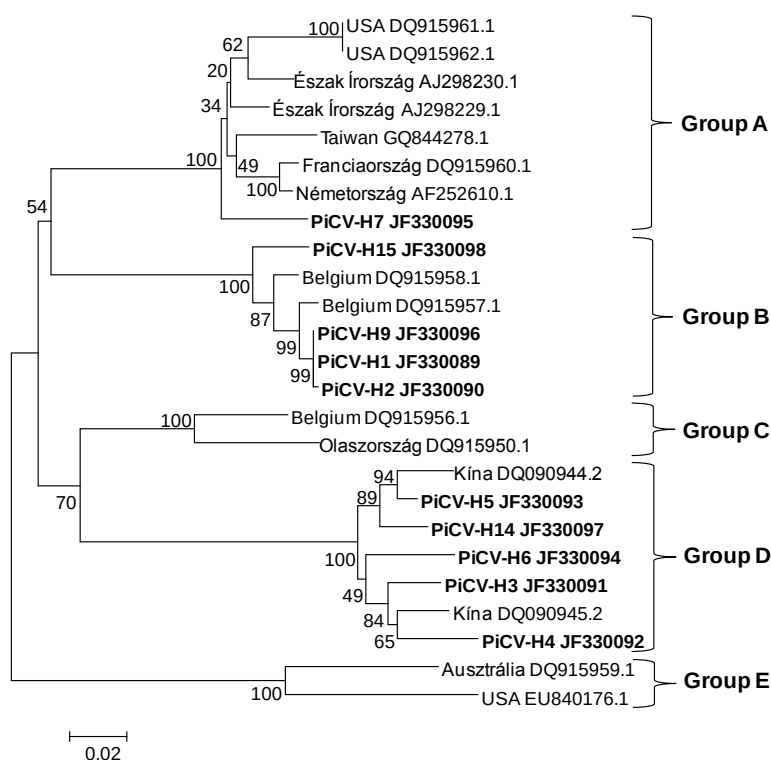
A PiCV genomja megközelítően 2 kilobázis méretű körkörös DNS (Mankerz és mtsai., 2000; Todd és mtsai., 2001). Valamennyi ismert PiCV genomra jellemző, hogy két fő nyílt olvasási keretet (open reading frame, ORF) hordoz. Az ORF1 a pozitív szálon található és a megsokszorozódásért felelős (replication associated, Rep, Rep' proteins) fehérjét kódoló gén. A rövidebb ORF2 az átíródo komplementer szálon foglal helyet és a capsid (Cap) fehérjét kódolja. Mindkét ORF nagy jelentőséggel bír a további kutatások szempontjából. Az ORF1 megismerése a konzervatív jellege miatt elsősorban a molekuláris diagnosztikai eljárások tökéletesítése miatt fontos. Az ORF2 nem kevésbé jelentős, ugyanis az általa kódolt capsid protein felelős a protektív immunválasz kiváltásáért. Ugyanakkor a *Rep* génnél lényegesen variábilisabb, vagyis alkalmas a pontosabb filogenetikai vizsgálatok elvégzésére.

A galambtartók tapasztalatai alapján a PiCV fertőzöttség egyre elterjedtebb és egyre súlyosabb egészségi problémát jelent. A védekezés jelenleg még az alapvető járványvédelmi

lehetőségek szintjén sem megoldott. Specifikus vakcina nem áll rendelkezésre. Az innováció alapjául szolgáló kutatómunkám a lehetséges vakcinák tervezéséhez szükséges ismeretek megszerzésére irányult.

Magyarország területéről, széles területi eloszlásban gyűjtött több mint száz klinikailag egészséges galambból származó mintát vetettünk vizsgálat alá. A nukleinsav kivonást követően, PiCV-specifikus PCR reakciókat végeztünk, első megközelítésben azt vizsgálva, hogy a PiCV milyen arányban van jelen az egyes állományokban illetve az ország területén a galamb populációkban. Az eredmények egyértelműen egybecsengtek a nemzetközi adatokkal, miszerint a fertőzés intenzitása korcsoportonkénti eltérést mutat, a legalacsonyabb a 28 napnál fiatalabb fiókákban, ezt követően pedig a korral egyre növekszik. A fertőzött dúcokban az egy éves kort betöltött egyedek gyakorlatilag 100%-a pozitív.

A GenBankban elérhető 15 ORF2 gén szekvenciához mi további 10-t adtunk, és ezek segítségével elvégeztük a vírusok filogenetikai elemzését, ami alapján 5 különböző csoportot lehetett elkülöníteni (1. Ábra).

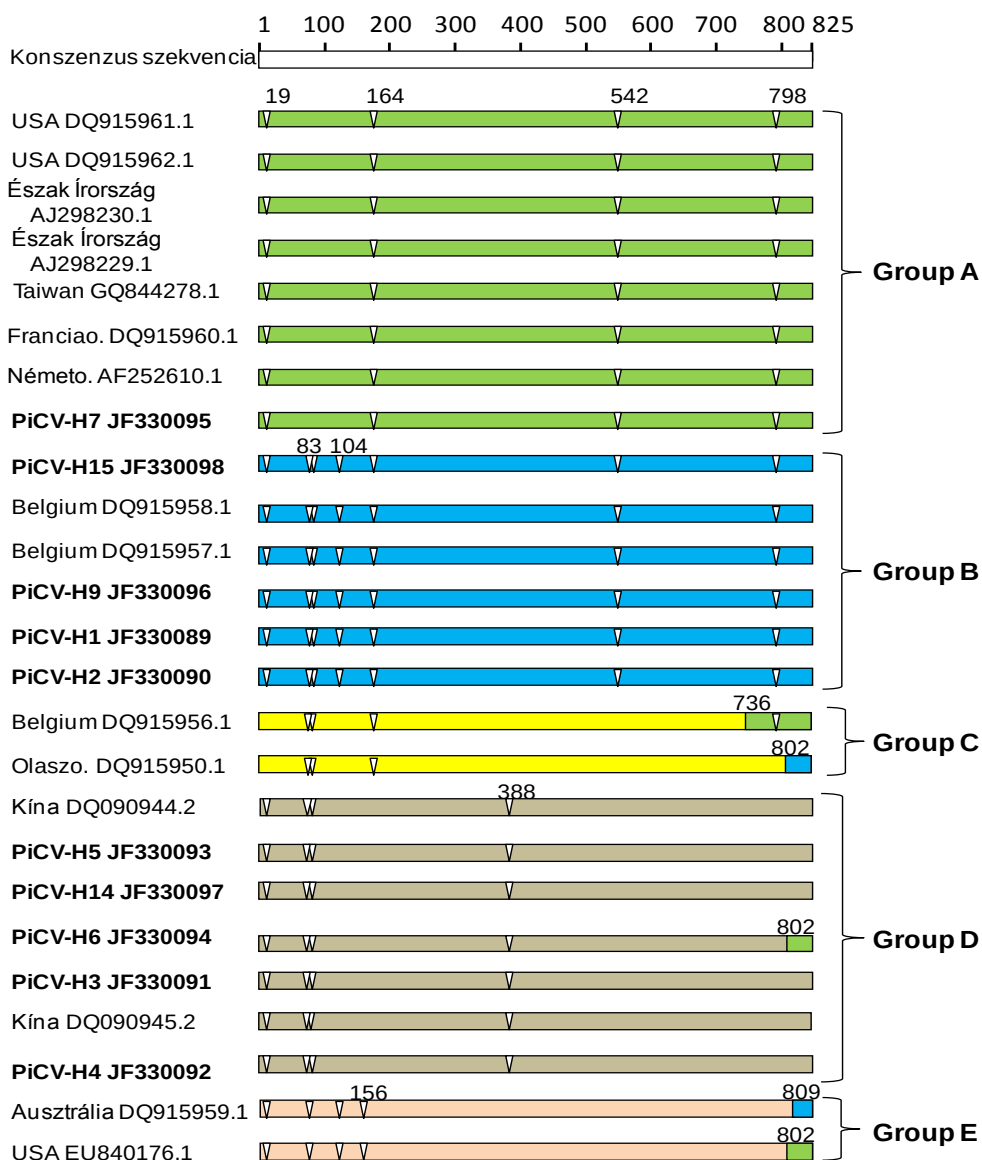


1. Ábra. A teljes PiCV ORF2 nukleinsav szekvenciák filogenetikai összehasonlítása. Az egyes vírusokat az izolálás helye (ország) és a Genbank kód alapján neveztük el. A jelen tanulmányban azonosított szekvenciákat félkövér betűkkel emeltük ki. Az egyes filogenetikai csoportokat (Group A-E) az ábra jobb oldalán jelöltük.

Az egyes csoportokon belül a tagok közti hasonlóság általában 92% fölött volt (nukleinsav és aminosav szinten egyaránt), kivételt az E csoport 2 vírusa alkotott. A

csoportokon belül jelentős földrajzi távolságok tapasztalhatók, az egyes csoportok nem köthetők kisebb földrajzi egységekhez, de még csak kontinensekhez sem, ami a versenyek során természetes keveredéssel illetve a gyakori importtal magyarázható. Erre a legjellemzőbb példa a D csoport, ahol a 2 kínai szekvencia mellett 5 magyar foglal helyet és a galambászok elmondása alapján több ízben is vásároltak galambokat Kínából.

A ORF2 gének nukleinsav szekvenciáinak összehasonlítását követően (2. Ábra) további érdekes megfigyeléseket lehetett tenni.



2. Ábra. A PiCV ORF2 gének nukleinsav szekvencia különbségei. A vírusok jelölése azonos a 1. Ábrán alkalmazott jelölésekkel. A vízszintes szalagok színe csoportonként eltérő. Legfelül az ismert PiCV ORF2 szekvenciák alapján megállapított lehetséges leghosszabb (mesterséges) konszenzust ábrázoltuk, 100 bázisonkénti beosztással. Az üres nyílhegyek a konszenzushoz képest delécióként mutatják be a bázis triplet eltéréseket. A lehetséges (jósolt) rekombinációs események helyét a gén 3' végén, a C, D és E csoportokban, a donor szekvenciának megfelelő szín jelzi.

A C D E csoportok esetében összesen 5 szekvenciánál volt detektálható a csoportok közötti rekombináció jelensége a 3' végen. Emellett a csoportokon belül megmutatkozott az úgynevezett bázis triplet (a fehérjén aminosav) deléciók (a konszenzus szekvenciához képest) jelensége. Ezek halmozottan az 5' -terminálishoz közel helyeződtek, de előfordultak attól lefelé is. Fontos megjegyezni, hogy minden esetben a csoportokon belül karakterisztikus pozícióban találhatók, és nem okoznak elcsúszást az olvasási keretben.

Ennek a kutatásnak az elsődleges céljai azok voltak, hogy betekintést nyerjünk a PiCV magyarországi előfordulásának gyakoriságába és elkészítsük az itt előforduló vírusok genetikai jellemzését, összehasonlításban a már publikált adatokkal. Mindezt azzal a céllal tettük, hogy a szerzett adatok ismeretében olyan specifikus vakcinát lehessen a továbbiakban előállítani, ami hatékonyan véd a PiCV okozta károsító hatásoktól, hiszen ma még ez semmilyen formában nem áll rendelkezésre.

ORF1-ből készült szekvencia, ahogyan azt vártuk, kisebb változásokat leszámítva egészében konzervatívnak mutatkozott. Az ORF2 gén esetében már számítottunk nagyobb fokú eltérésekre, az eredmények azonban így is számos meglepetéssel szolgáltak. Tekintve, hogy a capsid fehérje az egyetlen strukturális protein a virionban és egymagában felelős a protektív immunitás kiváltásáért, nagyon valószínű, hogy a változások a vírus fertőzőképességének a megőrzését szolgálják olyan környezetben, ami akár már áthangolódott egy másik csoportbeli vírussal szemben.

A vizsgálatokból kiderült, hogy a vírus nagyfokú változékonyságra képes, vagyis egy vakcinázási stratégiának ezzel számolnia kell. Képes lehet a PiCV arra, hogy antigénszerkezetét megváltoztatva egy nem tökéletesen illeszkedő antigénszerkezetű vakcina által indított immunválasz hatása alól kibújjon. Éppen ezért a vizsgálataink egyik talán legfontosabb következtetése az, hogy egyetlen vírus csoportba tartozó antigénnel nem lehet hatékonyan védekezni, ez csak akkor lehetséges, ha ezeknek a Cap fehérjéknek olyan kombinációját használjuk vakcinázásra egyidejűleg, ami valamennyi lehetséges antigén variánssal epitop-szerkezeti átfedést nyújt.

Ezen felfedezéseken alapulva elindult vakcina fejlesztési kutatás, ami az itt előállított pBacPak9 plazmid alapú ORF2 klónokra épült és egy baculovírus expressziós rendszeren keresztül 3 különböző capsid fehérje előállításával és kombinációjával megkezdődött. Az első vakcinázási kísérletek azt mutatják, hogy a stratégia, ami a megelőző genetikai vizsgálatokra épül sikeres.

Wladár Zsófia V. éves hallgató
SzIE-Állatorvos-tudományi Kar
Budapest, 2012. 02. 09.

Referencia Jegyzék

MANKERZ A., HATTERMANN K., EHLERS B., SOIKE D. (2000) Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a genus circovirus from pigeons. *Archives of Virology* 145, 1-11

RAUE R., SCHMIDT V., FREICK M., REINHARDT B., JOHNE R., KAMPHAUSEN L., KALETA E. F., MÜLLER H., KRAUTWALD-JUNGHANNS M-E. (2005) A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology* 34(5), 418-425

SOIKE D., HATTERMAN K., ALBRECHT K., SEGALÉS J., DOMINGO M., SCHMITT C., MANKERTZ A. (2001) A diagnostic study on columbid circovirus infection. *Avian Pathology* 30, 605-611

TODD D. (2004) Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMVS. *Veterinary Microbiology* 98, 169-174

TODD D., MCNULTY., M. S., MANKERZ A., LUKERT P. D., DALE J. L., RANGLES J. W. (2000) Family Circoviridae. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. 33 A., Javis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Proceedings of the Seventh Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York* 299-303

TODD D., WESTON J. H., SOIKE D., SMYTH J. A. (2001) Genome Sequence Determinations and Analyses of Novel Circoviruses from Goose and Pigeon. *Virology* 286, 354-362

WOODS L. W., LATIMER K. S., BARR B. C. (1993) Circovirus-like infection in a pigeon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 609-612

WOODS L. W., LATIMER K. S., NIGARO F. D., RIDELL C., CROWLEY A. M., ANDERSON M. L., DAFT B. M., MOORE J. D., CAMPAGNOLI R. P., NORDHAUSEN R. W. (1994) A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 156-164