

Csirkék fertőző bronchitis vírusának magyarországi előfordulása és genetikai jellemzése

Kojer Judit

Ceva-Phylaxia Zrt., Tudományos Támogató Igazgatóság

Az előadás vázlata

- *Bevezetés*
- *A dolgozat célkitűzése*
- *A kórokozó, a betegség ismertetése*
- *Anyag és módszer*
 - *mintáink*
 - *laboratóriumi módszerek*
- *Eredmények*
 - *százalékos megoszlás*
 - *földrajzi elhelyezkedés*
- *Összefoglalás*



Bevezetés

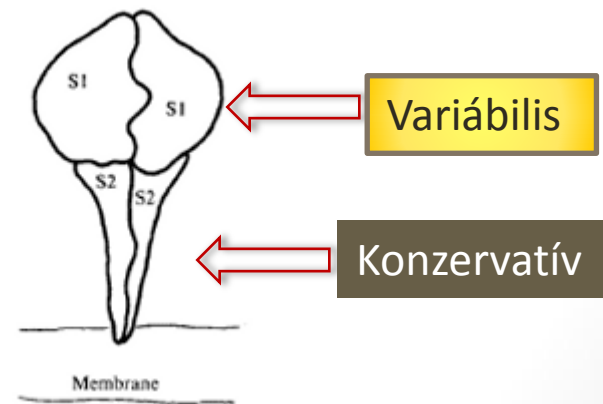
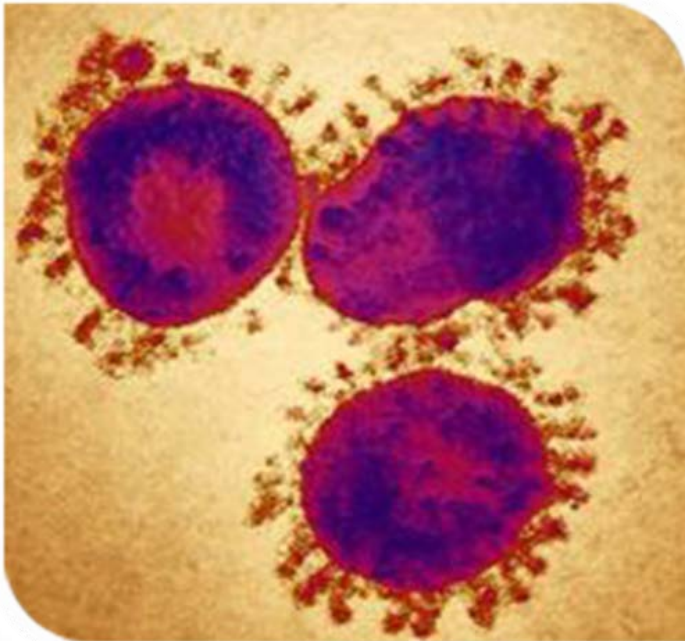
- coronavírus, angol megfelelője infectious bronchitis virus, röv.:IBV
- csirkéket és fácánokat betegít meg
- felső légúti tünetek, de a petevezetőt és a vesét is károsíthatják egyes törzsek
- ismertebb coronavírusok: SARS, MERS, PEDV, FIP, stb.
- ***igen ragályos megbetegedés***
- széles körben elterjedt, 1931-ben írták le először az Egyesült Államokban, Mo.-on 1963 óta ismert
- ***rendkívül változékony RNS-vírus***, amely nehezíti az ellene való specifikus védekezés lehetőségeit

A dolgozat célkitűzése

- a rokonsági viszonyokat feltáró felmérés készítése a Magyarországon előforduló IB törzsekről
- korábban még nem készült ilyen, az egész országot lefedő felmérés
- információszerzés azt illetően, mennyire biztosítanak hatékony védelmet a jelenleg Magyarországon alkalmazott IBV elleni vakcinák

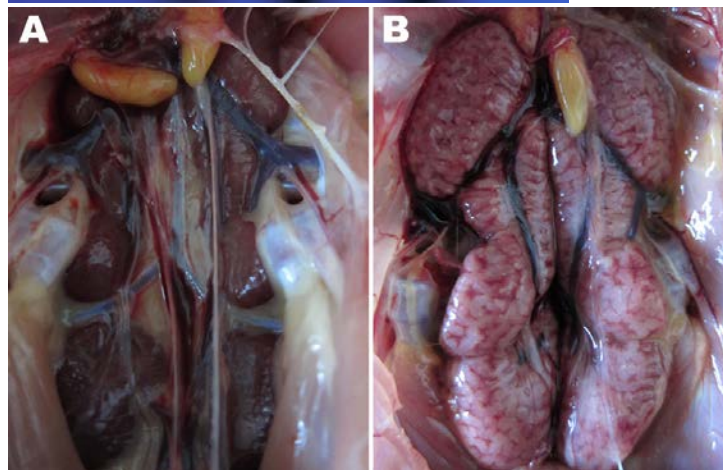
A kórokozó

- Nidovirales rend, Coronaviridae család, Coronavirinae alcsalád, Gammacoronavirus nemzetség
- pozitív, szimplaszálú, burkos RNS-vírus,
- kerek /pleomorfikus, felületén bunkósbot alakú nyúlványok („spike”) helyeződnek > > > korona-szerű megjelenés, fő immunogén fehérje



Tünetek

- felső légúti tünetek: tüszögés, köhögés, orrfolyás, könnyezés
- petevezető károsítása miatt tojástermelési zavarok
- vesekárosító hatás miatt megnövekedett vízfogyasztás, tollborzolás és megnövekedett mortalitás (A: egészséges vesék, B: IB által károsodott vesék)



A vírus terjedése

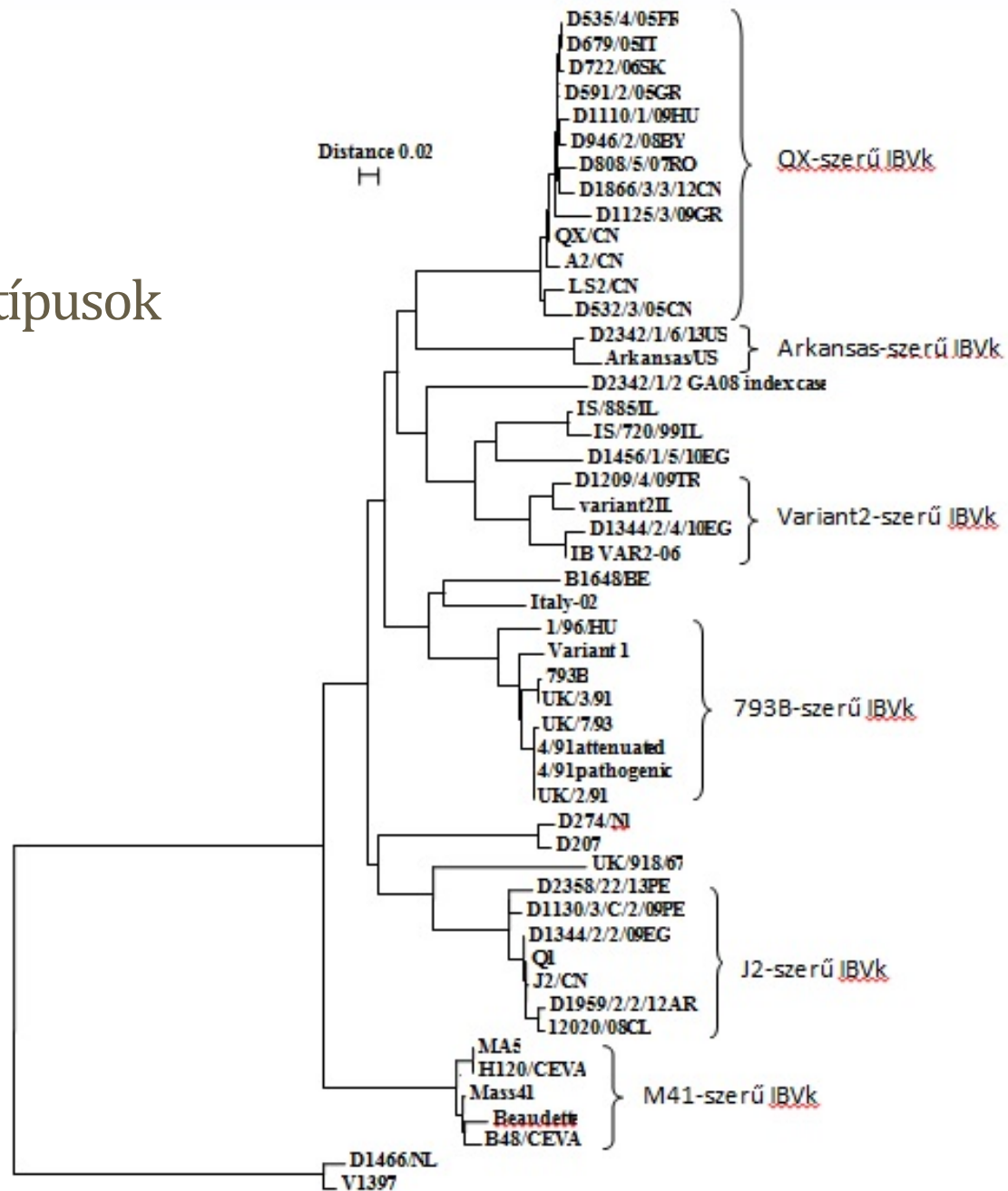
- rendkívül ragályos: ragályfogó tárgyak, alomanyag, takarmány is közvetítheti
- cseppfertőzéssel, ill. direkt kontaktussal terjed
- vertikális átvitele nem ismert
- a tojáshéjra a fertőzőképes virionok a gastrointestinalis traktusból illetve a petevezetőből kerülhetnek, kikeléskor fertőzve ezzel a napos baromfit
- vadmadarak, főleg a víziszárnyasok tünetmentesen hordozhatják, hozzájárulva a vírus terjedéséhez

A fertőző bronchitis változékonyságának oka

- RNS-dependens RNS-polimeráz enzimének nincs proof-reading aktivitása, így **mutációs rátája meglehetősen magas**
- ennek következtében a vírus ún. kvázispecies formában létezik a sejtekben
 - a legnagyobb mennyiségben előforduló variánst „master-szekvenciának”
 - az ettől eltérőeket „mutáns spektrumnak” nevezik
- a fentiekben leírtaknak megfelelően a gyakorlatban **számos szerotípus** került leírásra

Fontosabb IB szerotípusok

az S1 gén fragment
(763-1140 nt)
alapú rokonsági
viszonyait bemutató
törzsfá Neighbor-Joining
módszerrel



A vírus elleni védekezés

- specifikus gyógyszer nincs ellene
- a megelőzésre kell hangsúlyt fektetni
 - nem specifikus eszközökkel: azonos kor és hasznosítás, teremhőmérséklet, szellőzés, telepítési sűrűség
 - specifikus eszközökkel: attenuált és inaktivált vakcinák
- Az általunk vizsgált telepeken alkalmazott IB elleni vakcinák:

Vakcina neve	Használt törzs	Típus	Gyártó	Az immunizálásra javasolt hasznosítási irány:	Immunizálás időpontja
AviPro IB H120	mass 120	élő	Lohmann Animal Health GmbH	növendék	3. és 10. élethét
				broiler	1. nap
Bioral H120	H 120	élő	Merial Laboratorie Porte des Alpes	növendék	1. nap, 4. és 10. élethét
				broiler	1.nap, 3. élethét
Gallivac IB88	CR88121	élő	Merial Laboratorie Porte des Alpes	növendék	4. és 8. élethét
				broiler	14. nap
Nobilis IB H120	H 120	élő	Intervet International B.V.	növendék	1-5. nap, 3., 7., és 16-18. élethét
				broiler	1-5. nap, 3. élethét
Nobilis IB Ma5	Ma5	élő	Intervet International B.V.	növendék	1. nap, 6. élethét
				broiler	1. nap
Nobilis IB 4-91	4-91	élő	Intervet International B.V.	növendék	1. nap, 6. élethét
				broiler	1. nap, később ismételtető
Cevac Bron 120 L	H 120	élő	Ceva-Phylaxia Zrt.	növendék	1. nap, 3. és 10. élethét
				broiler	1. nap, 3. élethét
Cevac Ibird	1/96	élő	Ceva-Phylaxia Zrt.	növendék	10. nap, 3 hetente
				broiler	1. nap
Cevac Mass L	Mass B-48	élő	Ceva-Phylaxia Zrt.	broiler	1. nap
Poulvac IB Primer	H120, D274	élő	Fort Dodge Animal Health	háziyúk	1. nap-tól

A vírus elleni védekezés

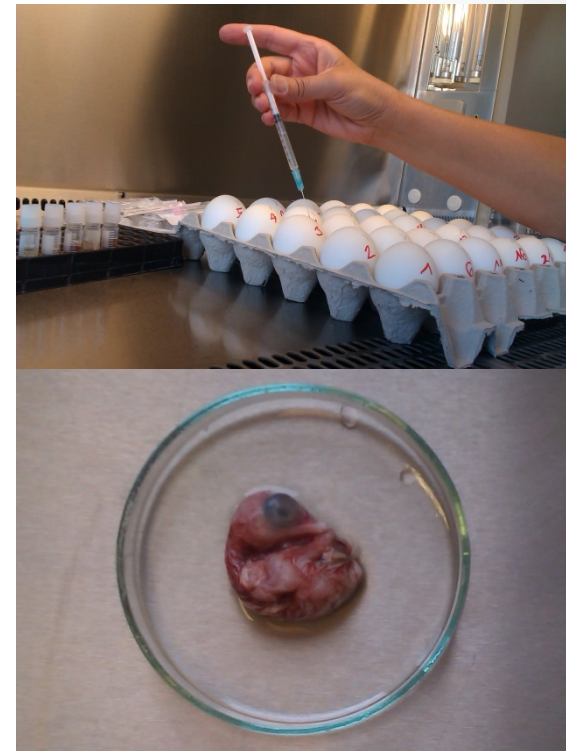
- **napos kori** vakcinázáshoz ált. **élő, attenuált** vakcinákat alkalmaznak
- broilerállományok booster immunizálása 7-14 nappal később
- tenyész- és tojóállományokat többször, különböző szerotípusokat tartalmazó IB törzsekkel
- ha a booster vakcinázást homológ törzssel végzik, akkor nő az immunválasz homogenitása
- ha azonban a booster vakcinázás heterológ vakcinavírussal történik, az szélesíti a védelem spektrumát
- **inaktivált vakcinatörzset** tartalmazó oltóanyagot ált. **tojóállományok** booster oltásaiként használnak > > >
- megfelelő maternális immunitást alakítva ki

Anyag és módszer

- a mintavételeket a **Ceva Phylaxia Belkereskedelmi Igazgatóságának munkatársai** szervezték a vállalat **partnergazdaságai** körében
- coecalis tonsilla, légcső tamponminta, vese
- az állomány adatainak felvételéhez **kísérőiratot** szerkesztettünk, amely kitért
 - a mintázott állomány hasznosítási iránya, az állatok életkora
 - az állomány tünetei
 - vakcinázási protokoll
 - kórbonctani lelet
 - elhullási adatok
 - a beküldött szervek típusa
- 6 db mintát a NÉBIH ÁDI bocsátott rendelkezésünkre

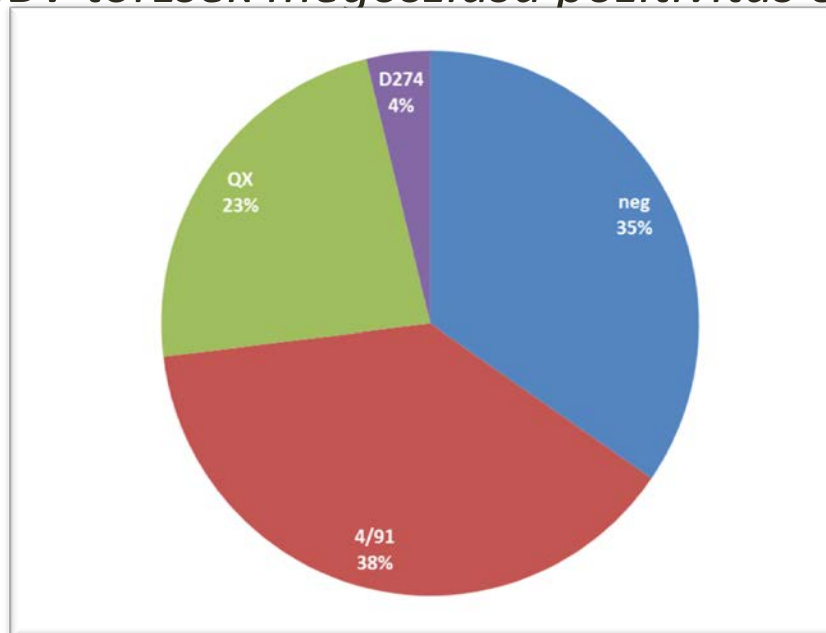
A minták vizsgálata során alkalmazott laboratóriumi módszerek

- Vírusizolálás
 - 9-10 napos SPF-tojásokat alkalmaztunk
 - allantoisz üregbe oltottunk
- PCR
 - egylépéses RT-PCR:
 - Előszűrés: konzervatív, az 5'-UTR-re specifikus real-time PCR
 - Tipizálás: S1-gént célzó gél-alapú PCR → szekvenálás
- Nukleotid-sorrend meghatározás
 - PCR-rel pozitív mintákból részleges S1 gén szekvenálást végeztünk
- Bioinformatikai analízis
 - a kapott szekvenciák rokonsági viszonyait és nukleotid összetételük %-os hasonlóságát vizsgáltuk MEGA5 és a CLC programcsomagok segítségével (Neighbor-Joining algoritmussal)



Eredmények

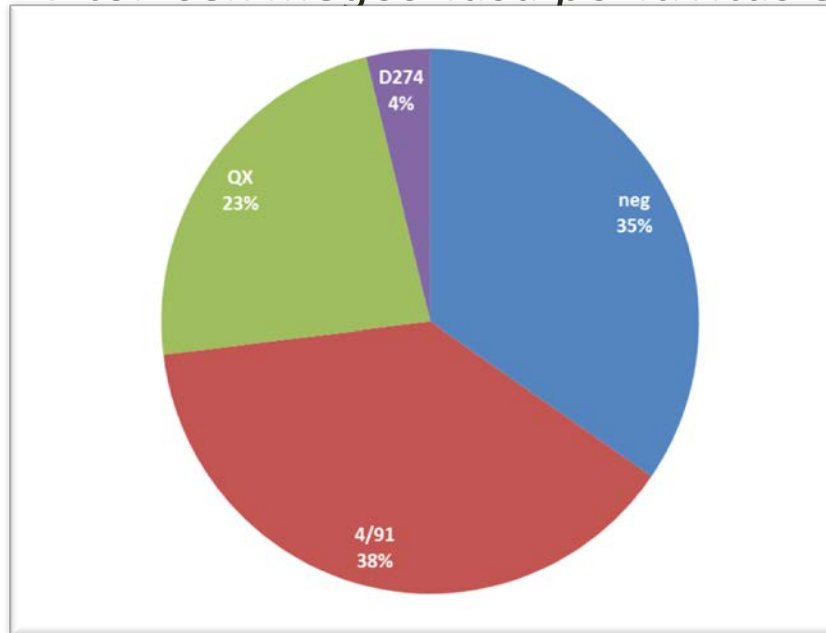
A kimutatott IBV törzsek megoszlása pozitivitás és szerotípus szerint:



- 38%-ban, 10 esetben **4/91 típusú törzset** mutattunk ki, melyről a vizsgált S1 génszakasz alapján **nem állapítható meg** hogy vakcinavírus vagy vadvírus törzs-e
- az esetek többségében az alkalmazott vakcina is 4/91-t tartalmazott, de volt, ahol nem (ragályfogó tárgyak? vadmadarak? vadvírus? szomszéd telepek?)

Eredmények

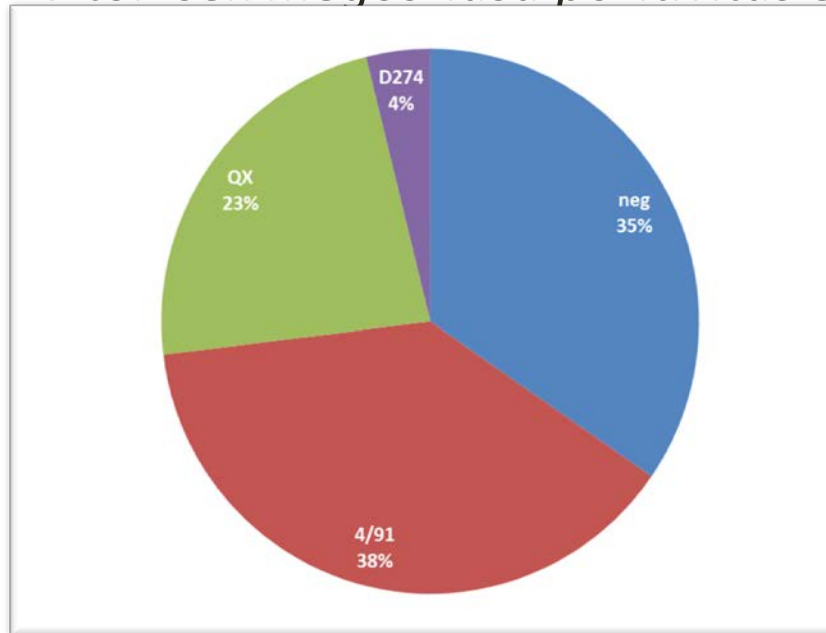
A kimutatott IBV törzsek megoszlása pozitivitás és szerotípus szerint:



- **D274-es** típus 4%-ban, 1 esetben volt kimutatható, de: Poulvac IB Primer vakcinát alkalmaztak

Eredmények

A kimutatott IBV törzsek megoszlása pozitivitás és szerotípus szerint:

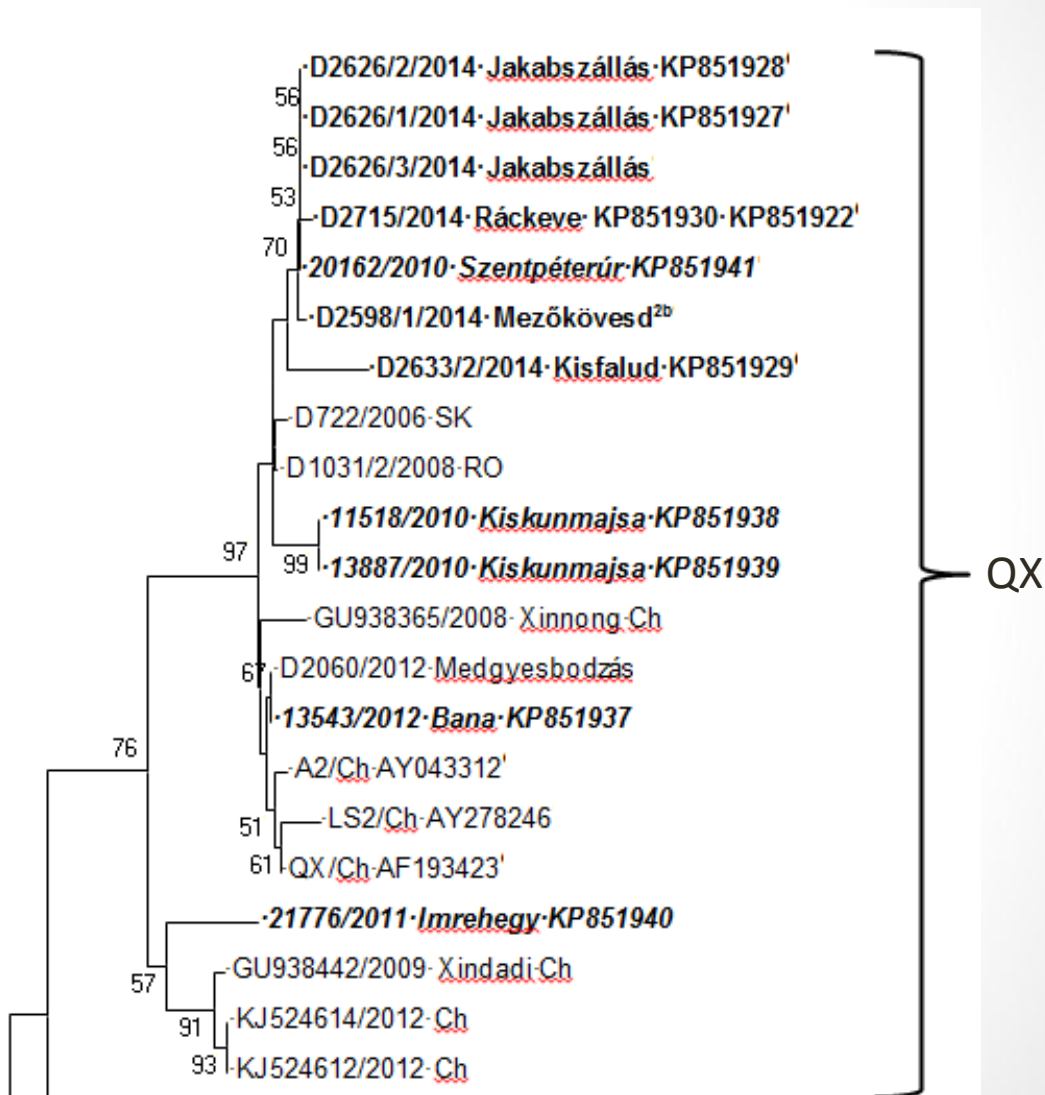


- **QX-szerotípus** 23%-ban, 6 esetben történt kimutatásra, az alkalmazott vakcinák nem nyújtanak kielégítő védelmet a QX-típus ellen
- QX típusú törzsek csoporton belül is nagy változékonyságot mutatnak (Imrehegyi minta elkülönül))

Eredmények

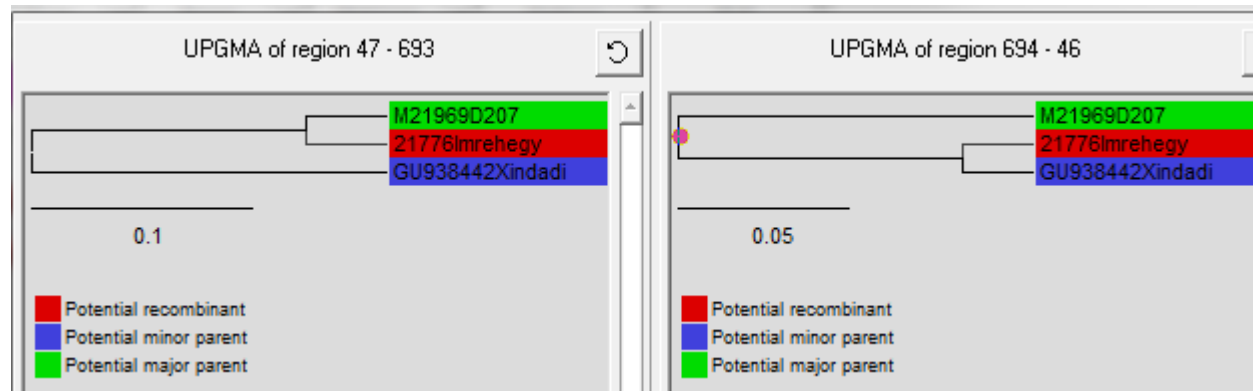
A kimutatott QX-szerű
törzsek rokonsági
viszonyai az S1 gén
763-1140 nt közötti
szakasza alapján,
Neighbor-Joining
módszerrel vizsgálva

Legnagyobb nukleotid
különbség: 11,3%.



Az Imrehegyi-törzs további vizsgálata

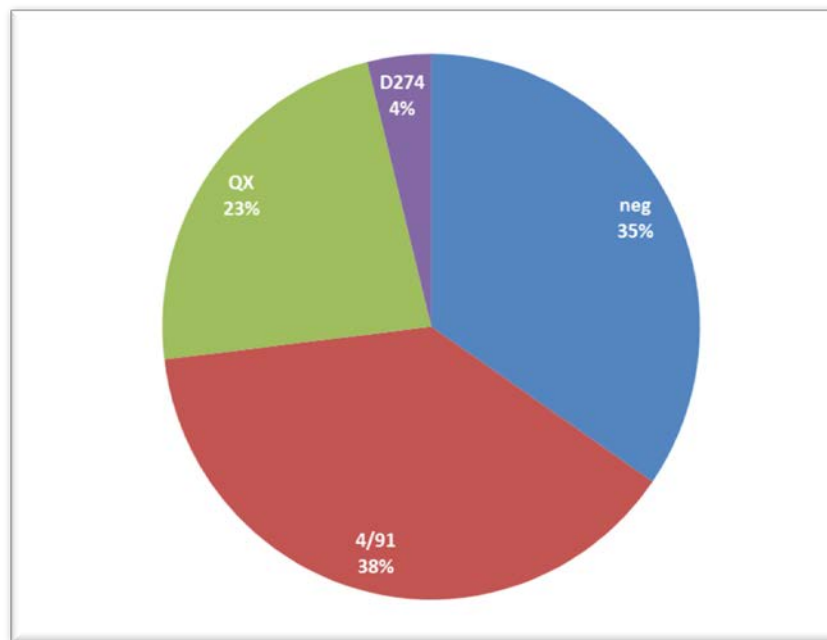
- Rekombinációs analízis az RDP 4.0-s szoftverrel
- Az S1 gén alapján Imrehegyi törzs egy *rekombináns vírus*:
 - Egy D274-es típusú (zöld) és egy Xindadi-szerű vírus (kék) részvételével



- Ugyan a D274-es törzset tartalmazó vakcinát Magyarországon is alkalmazzák a madarak immunizálására, mégis az imrehegyi rekombináns származása egyelőre ismeretlen; a pontos származás felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek

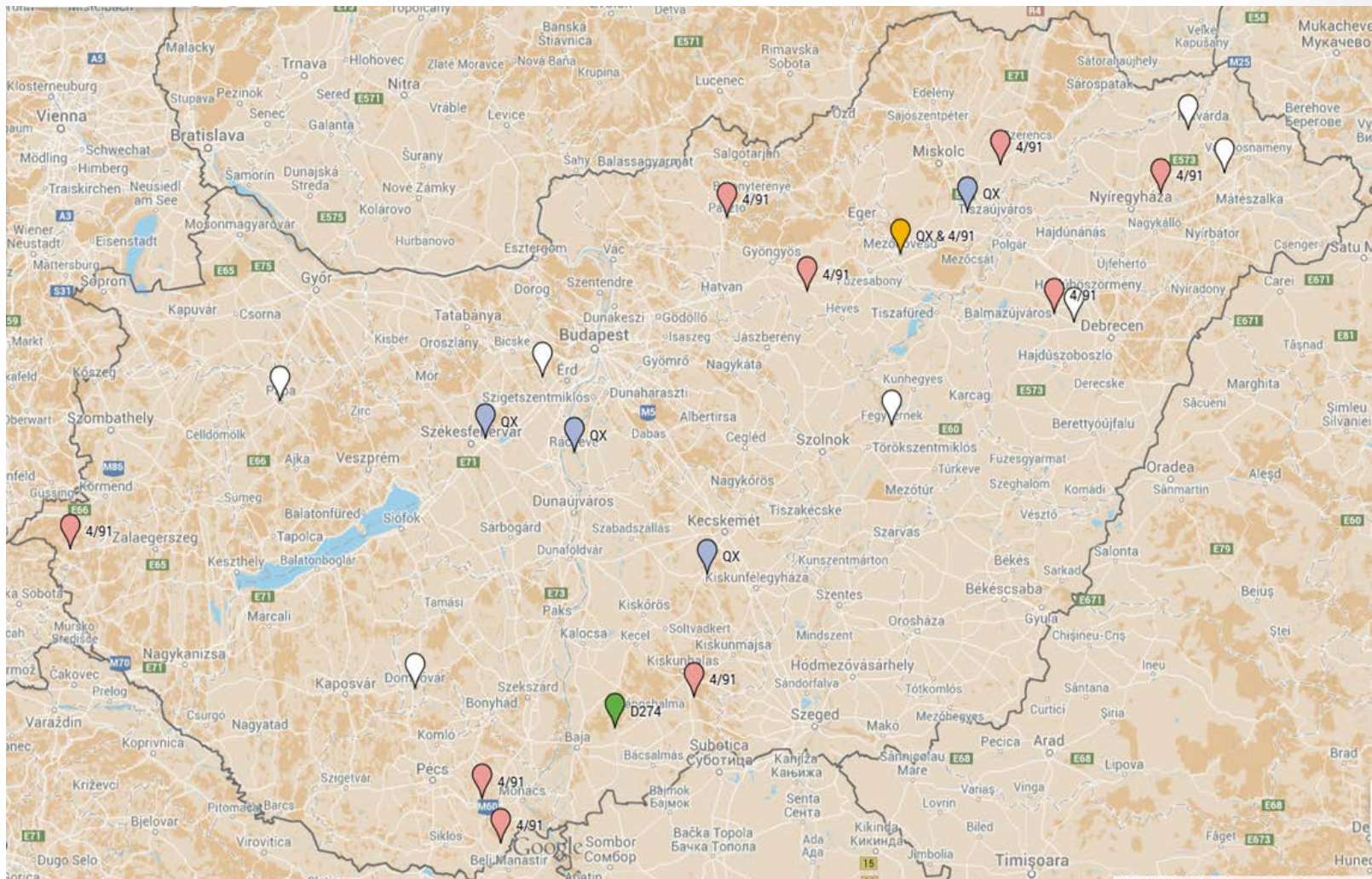
Eredmények

A kimutatott IBV törzsek megoszlása pozitivitás és szerotípus szerint:



- Érdekesség: az Ma5 és H120 törzseket tartalmazó vakcinák **széleskörű alkalmazása ellenére sem** mutattunk ki önmagában ilyen típusokat mintáinkból (1 esetben QX mellett mutattuk ki)

- *A mintavételek és a pozitív minták földrajzi megoszlása:*



- fehér – negatív; piros – 4/91; kék – QX; zöld – D274; sárga – QX, és ugyanott csak más telepen 4/91.

Összefoglalás

- **többségében 4/91-es törzset mutatunk ki**, melyek kórtörténet alapján, többségében, valószínűsíthetően vakcinavírusok, de volt, ahol IB ellen nem vakcináztak, vagy nem ilyen törzset tartalmazó vakcinával (vadmadarak? ragályfogó tárgyak?)
- 1 esetben **D274-es szerotípust** mutattuk ki, amely **valószínűsíthetően vakcina** eredetű
- a QX-törzsek hazai előfordulása és meglehetősen változékonysága megfelel az európai tendenciának
- **nagyfokú hasonlóságot** találtunk egymástól földrajzilag
 - *kevésbé elkülönülő* (Hajdúnánás-Mezőnyárád)
 - *jól elkülönülő* (Bana-Medgyesbodzás) QX-törzsek között is
- ilyen, rendszeresen frissített vírustérkép elkészítése nagy segítséget nyújthat a diagnosztikával és vakcinafejlesztéssel foglalkozó szakemberek számára

Köszönetnyilvánítás

- A Ceva-Phylaxia Zrt. Tudományos Támogató Igazgatóságának dolgozói
- A Ceva-Phylaxia Zrt. Belkereskedelmi Igazgatóságának dolgozói
- A felkeresett telepek ellátó állatorvosai, munkatársai
- Dr. Tuboly Tamás, SZIE-ÁOTK
- Dr. Bálint Ádám, dr. Farsang Attila, NÉBIH



Köszönöm a figyelmet!

