

T 046 200 sz. OTKA-pályázat zárójelentése

A baromfipestis vírus (NDV) törzsek evolúciós változásának
következményei a vakcinázás hatékonyságára**A. ELŐZMÉNYEK**

A téma **fontosságát** a baromfipestis (hivatalosan: Newcastle-betegség, az irodalomban: *Newcastle disease*, ND) gazdasági jelentősége és a járványhelyzet *ellentmondásossága* adja. A kórokozó(k) – az NDV *virulens* törzsei – a fogékony csirkék 100%-át képesek elpusztítani, és a 20. században minden más baromfibebetegségnél nagyobb gazdasági kárt okoztak. Az 1950-es évektől bevezetett olcsó és *hatékony* tömegvakcinázások alkalmazásával ezt részben sikerült mérsékelni, sőt az iparszerűvé váló baromfitartást rentábilissá is tenni. Ennek ellenére, azt látjuk, hogy tipikus **emergens** fertőzésként viselkedik.

Az ND-járványok történéseit és területi előfordulását **előző OTKA**-kutatásaink (T016 345, 1995-97; T025 297, 1998-2000; T038254, 2002-2004) során részletesen feltártuk.

A **mostani** pályázat a hatékonynak számító vakcinázások és a fertőzés emergens volta közti **ellentmondás** mibenlétével és okaival, valamint a virulens genotípusok keletkezésének mechanizmusával foglalkozik.

Hipotézisünk szerint az NDV járványtörzsei olyan evolúciós változáson mentek át az elmúlt évtizedekben, amelynek következtében a jelenleg használt vakcinák *fertőzés elleni* hatékonysága csökkenhetett. Ennek lehetséges oka, hogy a megfelelő klinikai védelmet nyújtó immunitás mellett is egyre *terjedőképesebb* (invazivabb) variánsok szelektálódnak ki és terjednek el. Ezek ellenőrzésére alapvető fontosságú egy természetes fertőzést szimuláló kísérleti modell kidolgozása.

B. EREDMÉNYEK**1) Az NDV-törzsek invazivitásának kimutatására alkalmas kontakt fertőzési modell**

Mivel alkalmas modell az irodalomban nem létezett, számos variáció kipróbálása után egy olyan elrendezést választottunk, amely **3 összetevő**ből állt: (a) *tesztcsoporthoz* (különböző módon immunizált csoportok egyesítve, létszám akár 100 is); (b) *vírusdonor* (2, orrba fertőzött negatív csirke), amelyeknek a tesztcsoporthoz helyezésével indul a

fertőzés; (c) szentinel (2, nem fertőzött csirke. Mivel megbetegedésük már pár nappal követte a donorokét, jelezték, hogy a kontakt fertőzés valóban beindult, és hogy az immunizáltak is ugyanolyan eséllyel vehették fel a vírust, mint ezek.) *Naponta nyálmintát* vettünk a szájrés tájékáról, majd plakktitrálással mértük az **ürített vírus** mennyiségét. Mivel az immunizált teszt-csirkék még a legenyhébb (*alap*)immunizáláskor is látszólag *egészségesek* maradtak, a **testtömeg** mérésével követtük egészségi állapotukat.

A **kontakt**-fertőzési modell egyaránt alkalmas különböző vakcinázási módokkal kiváltott *fertőzés elleni immunállapotok* vizsgálatára, és különböző járványvírusok *terjedőképességének* összehasonlítására fix *alapimmunitás* esetén.

2) Különböző vakcinázási kombinációk fertőzés elleni hatékonysága

A következőkben összevontan mutatom be a védési kísérletek főbb megállapításait, amelyek egyfelől az irodalomhoz képest újak, másfelől a későbbiekben, a vírustörzsek evolúciójával kapcsolatosan is kapnak hangsúlyt. Ezekben a kísérletekben különböző genotípusba tartozó *újabb* vagy *recens* járványtörzseket használtunk: magyar/1972 (V. gt), dél-koreai 1998-t (VI. gt) és indonéziai/1988-t (VII. gt). Korábbi vizsgálatink alapján az 1960-as évek táján, illetve ez után megjelent V.-VIII. genotípusok törzseit soroltuk ide.

a) *Egyszeri* immunizálás *nyálkahártyára* különféle (élő) lentogén törzsekkel (ezt tekintjük *alapimmunitásnak*) *nem tudja* megállítani a virulens törzs (V. gt) terjedését (ráfertőzés 3 vagy 5 héttel a vakcinázás után). A csirkék (SPF) 95-100%-a fertőződött *kontakt* úton a következő 3-4 hétben.

b) *Kétszeri* immunizálás (az 1.: lentogén törzs *nyálkahártyára*, a 2.: ugyanaz, vagy mezogén (erősebb) H-, vagy inaktivált-vakcina) valamelyest csökkenti, de nem gátolja meg a virulens (VI. gt) vírus terjedését. **SPF** csirkék kb. 80%-a fertőződik 2 hét alatt, a vírusürítés tartamának átlaga pedig a 2.0-2.4 nap/csirke (beleszámolva a nem ürítőket is) értékkel jellemezhető a különböző csoportokban. Azonban az ürített *vírus* mennyisége, a negatív kontrollkéhoz viszonyítva, jelentősen csökkent. Pl., a donorban és szentinelben a mért maximális, $10^6 - 10^7$ PFE/ml (hígítatlan nyálra számolva) csúcserkékek általában (legalább) 1000-szer alacsonyabbak voltak az immunizált csirkékben, azonban ez is elég volt a terjedéshez.

Egy teljesen *hasonló* elrendezésű kísérletben a VII. gt-sú törzssel **brojler** csirkéket fertőztük. Az eredmény szinte megegyezett az előzővel, azzal a különbséggel,

hogy minden csoportban, gyakorlatilag a csirkék 100%-a fertőződött. A vírusürítés átlagtartama 3.7- 4.8 nap/csirke volt.

3) Különböző járványvírusok terjedőképességének összehasonlítása

Mivel az NDV törzsek időbeli előfordulásával kapcsolatban korábban kimutattuk, hogy a *háború előtti, régi* járványok törzsei (**II.-IV.** gt-ok) a vakcinázás elterjedése (1960-as évek) utáni évtizedben visszaszorultak, majd fokozatosan eltűntek, kézenfekvő volt megvizsgálni, hogy van-e kísérletesen is megfogható tény a jelenség hátterében. **Alapimmunitással** (1x-i nyálkahártyára oltás) ellátott csirkékben hasonlítottunk össze két régi [USA/1968 (**II.** gt) és olasz/1960 (**IV.** gt)] és három recens járványtörzset [a szaúdi-arábiai/1995 (**VI.** gt), valamint a már fent bemutatott KR-5/98-t (**VI.** gt) és ID-5/88-t (**VII.** gt)].

A két **régi** járványtörzs az *immunizált* csirkékben rendkívül *csekély terjedést* mutatott. A különböző tesztcsoportokban legfeljebb 1-2 állat, 1-1 napon át, igen kevés vírust ürített, így az összes csirkére eső ürítési napok száma: 0-0.2 volt.

Más régi törzsekkel hasonló eredményeket kaptunk: a legrégebbi izolátum, a **Herts'33**, ami, bár a legvirulensebb törzsek közé tartozik, még a szentinelekre sem terjedt át, ezért *kontakt fertőzésre alkalmatlannak* bizonyult. (Pedig fontos lett volna bevonni, mert jelenleg ez a nemzetközileg elfogadott, *standard ráfertőző* törzs ND-**vakcinák hatékonysági** vizsgálatában.)

A **recens** törzsek közül a szaúdi **VI.** gt-sú törzsnél 0.9-1.1 (a csirkék 60%-a ürített), míg az indonéz (**VII.**) és dél-koreai (**VI.**) törzsnél 2.3 és 4.0 volt az ürítési napok/csirke érték (a csirkék 80-100%-ában eredt meg a fertőzés). Tehát amíg a szaúdi törzs a terjedést tekintve *átmenetet* képviselt, a másik kettő ismét *magas* értékekkel tűnt ki. Figyelemre méltó, hogy közel 2x-es különbség mutatkozott két olyan vakcinatörzs hatékonysága között, amelyeknek egyébként mindegyike produkálta az *alapimmunitást*. Ez a kontakt-fertőzésen alapuló kísérleti modell nagyfokú érzékenységről tanúskodik.

Gyakorlati következtetések (1-3)

(i) Abból a meglepő tényből, hogy lényegében **nincs különbség** sem az 1x-i és 2x-i vakcinázás, sem az *alapimmunitás* (1x nyálkahártyára) és egy igen hatékonynak tekinthető *kombinált* immunizálás (nyálkahártyára applikálás + *booster* inaktivált vakcinával) hatékonysága között, nagyrészt megmagyarázza, hogy a **recens járványtörzsek** fertőzési láncai miért tudnak **fennmaradni immunizált** populációkban.

(ii) A **gyakorlatban** ez azt jelenti, hogy az *immunitás áttörésére* képes (továbbiakban : **Imm+**) *recens* járványtörzseknek adott területről való kipusztításához a **vakcinázás**, *önmagában*, biztos, hogy elégtelen. De még ennek az egyoldalú használatnak is vitathatatlan *haszna*, hogy ugyan **tünetmentes** fertőzés árán, de mégis biztosítja a termelés rentabilitását. Viszont ugyanebből következik *hátránya* is: a klinikai védettség árnyékában kialakuló *rejtett* fertőzés egyrészt direkt módon *segíti elő* a virulens járványtörzsek terjedését, másrészt szelekciós hátteret is biztosít egyre terjedőképesebb törzsek evolúciójához.

(iii) A fentiekkel szemben, a **régi** járványtörzsek terjedőképesége még alapimmunitással rendelkező állatok populációjában is olyan csekély (továbbiakban **Imm—**), hogy ez megmagyarázza **kipusztulásukat**. Sőt, ennek fényében inkább az a rejtély, hogy hogyan sikerült egy-egy elszigetelt területen fennmaradniuk a '80-as évekig.

(iv) A kísérletek az NDV olyan biológiai tulajdonságát (**Imm** karakter) jellemezték, amelyek segítségünkre lesznek a járványtörzsek *keletkezésének* megértésében is.

4) Az **Imm—** és **Imm+** jegyek evolúciós vonatkozásai

Ha bizonyítani akarjuk, hogy az **Imm+** jegy az Imm—-állapothoz képest jelentős **evolúciós újítás** (*apomorfia*), akkor nem elég csak azt dokumentálni, hogy szorosan kötődik egy olyan új keletű vírus-gazda-viszonyhoz (immunizált csirke), amely erős **szelekciós nyomást** gyakorol az ilyen átalakuláshoz, hanem azt is, hogy (a) az ilyen jegyeket hordozó vírusok között közvetlen **leszármazási** kapcsolat is van. (b) És az is tisztázandó, hogy a csirkében talált régi és új virulens genotípusok *azonos módon* alakultak-e ki.

Az elsőt a legegészségesebben úgy lehetne tisztázni, ha **kísérletesen** ki lehetne mutatni az átalakulást ugyanazon genetikai vonalon belül. Bár eredetileg terveztünk is ilyen kísérletet, erre nem lett szükség, mert hozzájutottunk 2003-ban izolált **marokkói** törzsekhez, amikről kiderült, hogy éppen egy ilyen, *természetes viszonyok között* lezajlott kísérlet evolúciós végtermékei. Nem kis meglepetésre, egyrészt a **IV. genotípusba** tartoztak, másrészt **Imm+**-ak voltak. Tudomásunk szerint ez az egyetlen zug, ahol ez a csoport napjainkig fennmaradt. Ráadásul, némi szerencsére, az **olasz** genetikai vonalból „nőttek ki”, amelyben a fent már bemutatott, Imm— olasz/1960 a legközelebbi rokona. Lehet, hogy régi olasz törzsek már a múlt század közepén Marokkóba kerültek, és mivel ott is vakcináznak, nem sok kétség maradt, hogy végül Imm+ törzsek szelektálására is

sor került. Ezzel igazolódott, hogy lehetséges Imm⁻ → Imm⁺-átalakulás a gyakorlatban, a tulajdonságok pedig ősi (*pleziomorfia*)-leszármazott (*apomorfia*) viszonyban vannak.

A virulens genotípusok kialakulásával kapcsolatban azonban felmerül a kérdés, hogy az **újabb** genotípusok esetében 4 független alkalommal ismétlődött-e meg a „marokkói modell”, vagy csak egyszer, és a létrejött *alapító* ez után kezdett szokatlan tempójú diverzifikációba (ami valószínűleg a „rosszabb hír”).

5) Virulens genotípusok keletkezése és evolúciója

‘Evolúció = filogenetika + szelekció’ leegyszerűsített képletéből kiindulva, első lépésben megkonstruáltuk az NDV *genotípusok genealógiáját*, majd erre, mint történeti vázra, „rátérképeztük” a **vírus-gazda-viszony** három olyan *szelektálható* attribútumát, mint az általunk jellemzett **Imm**-karaktert (Imm⁻ → Imm⁺), a virulenciát (avirulens → virulens) és a vírusfenntartó rezervoárokat (primer: vad vízimadár → szekunder: csirke) (*pleziomorf* → *apomorf* állapotok).

A **filogenetikai** analízissel megállapítottuk, hogy az eddig ismert NDV-k *legmélyebb* divíziója mindössze **két** olyan alapvető csoportot (a *class I*- és a *II*-t) eredményez, melyeknek távolsága (aminosav szinten) kb. **20%**. (A sok tekintetben hasonló madárinfluenza vírusoknak ezzel szemben 16 olyan, szubtípusnak titulált csoportja van, amelyeknél még a legközelebbi távolság is meghaladja a 20%-ot!) A **genotípus** „méretű” csoportok eloszlása a két fő ágon különös aszimmetriát mutat: az I.-VIII. genotípus (tehát az összes virulens) a *class II*-ben található.

A filogenetikai fa megerősítette azt a korábbi megfigyelésünket, hogy az **újabb** (V.-VIII.) genotípusok *monofiletikus* csoportot alkotnak. De még ennél is erősebb bizonyíték ezek *egyetlen ősből* való leszármazása mellett az a 6 nukleotidból (nt) álló *inszerció* az NP-gén nem kódoló szakaszán, ami *szünapomorfiaként* értékelhető. Az **ősi** állapot a 6 nt **hiánya** (sem a *class I*-ben, sem az I.-IV. genotípusokban nem fordul elő). Ezek, természetesen, kihatással vannak a **genom-méretére** is, amelynél az ősi → leszármazott *irány*: 15186 → 15192 nt. (Csak a teljesség kedvéért említem meg, hogy miután megszekvenáltunk egy *class I* vírust kiderült, hogy RNS-e, egy a P-génbe történt „beékelődés” miatt 12 nt-del hosszabb (15198 nt), mint a (primitív) genom *alappmérete* (15186 nt), és ezzel az NDV törzsek 3. *genom-méret* csoportját azonosítottuk.)

A **recens** genotípusok közös leszármazása és **Imm⁺** állapotnak tulajdonított evolúciós szerep korrelációja megengedi azt a feltételezést, hogy ez a négy genetikai

vonal **egyetlen** Imm+ vírus(populáció)ból (sőt virionból!) terjedt szét. A mód: **adaptív radiáció**: mégpedig nemcsak genotípuson belül, hanem **felett is**: 4 genotípus és ezeken belül is, rengeteg genetikai vonal született. (Hogy egyébként a 6 nt-beékelődésnek ehhez van-e köze, arra jelenleg nincs adat, de reverz genetikával ellenőrizhető.) Tehát nem az egyes genotípusok, hanem csak a **közös ő**s (Imm—) evolválódott a *marokkói modell* szerint, de még egy 6 nt „dekorációval” is megajándékozta a kutatókat. Valószínű, hogy ennél mélyebbre *kísérletes* úton már nem juthatunk, mert további vírusok nem maradtak ránk. Még egy indirekt bizonyíték: a *recens* genotípusokban *sehol* sem találunk *avirulens* (primitív) változatokat. Mi ennek a jelentősége? Az, hogy a virulens genotípus **eredetének** van egy másik változata is: az avirulens→virulens átalakulás. Kérdés csak az, hogy milyen feltételekkel.

Ez az *ausztrál modell*, amely a szemünk előtt zajlott le. (1998-ban a csirkéket évtizedek óta fertőző *I genotípusú* avirulens törzs virulenssé vált, és ennek nyomán járványok törtek ki.) Ebből következik, hogy valahányszor azonos genotípusban avirulens (vagy csökkent virulenciájú) és virulens törzsek egyaránt előfordulnak, akkor azt egy *ilyen átalakulás evolúciós markerének* tekinthetjük.

Evolúciós következtetések (4 és 5)

Az NDV virulens genotípusai keletkezésének tehát **két**, evolúciósan is elváló **mechanizmusát** fedtünk fel, amelyek az általunk kimutatott **Imm**-karakter állapotai nélkül nehezen értelmezhetők.

(i) A korábbi („ősi”) változatra az immunizálások bevezetése *előtt*, tehát csak **negatív** csirkében kerülhet(ett) sor, és *két lépésben* zajlik. **Kolonizációval** indul, ami nemcsak szimpla gazdafaj váltást (vad vízimadár→csirke), hanem egyúttal új ökológiai rezervoár létrehozását is jelenti. A csirkéhez adaptálódott avirulens vírus egy idő után **virulenssé** válik. Ez természetes körülmények között nem fordul elő. Úgy tűnik, ennek során genotípus-szintű *diverzifikáció* nem is történik: amelyik genetikai vonal kolonizált, az vált virulenssé. Az ausztráliai **I. genotípuson** kívül (ahol, a csirkék tünetmentes fertőzését fenntartó avirulens törzsek megegyeztek a környékbéli vízimadarakéval) ezt a stratégiát követte a **II. genotípus**, amely az észak-amerikai ND történetét meséli el, ahol felfedezésük idején (az 1940-es években) a virulenciabeli átmenetek egész sorát találták meg. Valószínű, hogy a **III. genotípusban** is ez történt, bár erre itt már csak egyetlen tanú (a H-vakcinatörzs) van.

(ii) A másik változat, egy evolúciós újítás, amely *immúnis* csirkepopulációkban következik be. Itt csak *virulens* kategórián belüli Imm- → Imm+ **átalakulás** zajlik le (valószínű *bottle-neck*-en keresztül), majd ezt követően az Imm+-mutánsok **genotípus-szintű diverzifikációja** (*adaptív radiáció*).

A fentiekből egyértelműen levezethető az ND **emergens** jellege: (a) A 140 baromfitartó ország kb. 60%-ában (benne a legnagyobbakkal, mint Kína) mára *endémia* alakult ki, és az elmúlt évtizedben, kb. 30 olyan országba is (egy vagy több alkalommal) behurcolták, amelyek mentes állapotot igyekeznek fenntartani. (b) Észak-Amerikát kivéve, minden kontinensen megjelent és terjed a Kínából kiinduló **VII.** genotípus valamelyik szubtípusa.

Az NDV evolúciójának vázolt eseményei összevetésre csábítanak a hasonló ökológiájú **madárinfluenzával**, és bizonyos *predikciókat* is lehetővé tesznek. Immunizálás hiányában, a múlt század megannyi influenzajárvány-kitörése, azaz *virulens* populáció keltezése az (i) stratégia szerint történt. A H5N1 volt az első, aminek sikerült kitörni ebből az „evolúciós karanténból”, és *önálló* járványos formát ölteni, olyat, amilyen az ND-t már vagy évszázada jellemzi. De (még) nem azért, mert Imm+ mutánsai áradtak volna szét, hanem azért, mert akadt egy *rejtett* (tünetmentes) fertőzést biztosító *szatellit-gazdája* (a kacska). Az immunitást áttörő törzsek keltezésének ideje azonban majd csak a vakcinázás elterjesztésével következhet el.

C. IRODALOM

- 1) 1.-3. ponthoz: Horváth és mtsai, 2005 a, b, c
- 2) 4.-5- ponthoz: Czeglédi et al., 2005; Lomniczi és Czeglédi, 2005; Lomniczi 2006 a, b;
- 3) A témából további két kézirat készül külföldi lapba.