

OTKA F67847

Magyarországi hüllő és kétéltű gyűjtemények virológiai vizsgálata, különös tekintettel a járványos megbetegedést okozó vírusokra

Szakmai zárójelentés

1. Célkitűzések

Munkámban célul tűztem ki a magyarországi gyűjteményekben, tenyészetekben tartott kétéltű és hüllő fajok egyes járványtani szempontból jelentős vírusainak monitoring vizsgálatát hagyományos és modern vírus-diagnosztikai módszereket alkalmazva. A kimutatott vírusok részleges szekvenciáját meghatározva lehetőség nyílt szekvencia elemzésre és filogenetikai számítások elvégzésére a vírusok közötti rokonsági viszonyok felderítése céljából, valamint hatékonyabb diagnosztikai módszerek kidolgozására. A mintákat magyarországi terraristák, állatkereskedések, a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszéke és a Fővárosi Állat- és Növénykert bocsájtották rendelkezésemre. Mivel Magyarországon korábban nem végeztek ilyen jellegű vizsgálatokat, izgalmasnak ígérkezett annak megvizsgálása, hogy a magyarországi állományokban mely vírusok fordulnak elő, és azok milyen genetikai rokonságot mutatnak az eddig megismert vírusokkal. A németországi együttműködés keretében lehetőség nyílt külföldi reovírus és picornavírus izolátumok szekvenciájának meghatározására, és genetikai jellemzésére.

2. Személyi változások és eltérések a kutatás időzítésében

A 2008/2009-es tanévben Anders Severson, állatorvos hallgató segítette a kutatómunkát, elkészítette és sikeresen megvédte diplomamunkáját „Occurrence of paramyxoviruses in exotic reptile species in Hungary” címmel.

2009. július 1-től 2011. június 30-ig tartó 2 éves időszakra az OTKA kutatás ideiglenes felfüggesztését kértem GYES miatt. Az OTKA Iroda megadta az engedélyt a projekt felfüggesztésére.

Mivel rajtunk kívül álló okok miatt az Ion-Torrent szekvenáló berendezés beüzemelése, így a szekvenálás optimalizálása is késedelmesen történt, a szekvenálások során nyert adatok feldolgozására és az eredmények publikálására már nem volt lehetőség. Az adatok feldolgozása után pályázatomhoz kapcsolódóan további publikációk megjelenése várható. A publikációk megjelenése után szeretném kérni pályázatom újraértékelését.

3. Eredmények

Az OTKA-téma segítségével sikerült elsőként beszámolnunk hazai mintákban előforduló adenovírus-, parvovírus- és feltételezett coronavirus-fertőzöttségről:

Coronavirus-szerű részecskék kimutatása amursikló savós-fibrines légcsőgyulladásával összefüggésben (Gál és mtsai, 2008)

Egy kifejelett amursiklóban (*Elaphe schrenki*) a légcső elzáródásával járó, savós-fibrines, a légcsövet bélelő hámsejtek proliferációjával kísért légcsőgyulladást állapítottunk meg. A légcső üregében található fibrindugóból elektronmikroszkópos vizsgálattal coronavirusokra jellemző morfológiájú vírus-részecskéket sikerült kimutatni. Sajnos az általános coronavirusok kimutatására irányuló RT-PCR vizsgálatok negatív eredményre vezettek, ami származhat többek között abból is, hogy a konszenzus coronavirus primerek nem alkalmasak hullók coronavirusainak kimutatására.

Adenovírus okozta sejtzártványos hepatitis és másodlagos parvovírus-fertőzés első hazai leírása Hagen-viperában (Farkas & Gál, 2008)

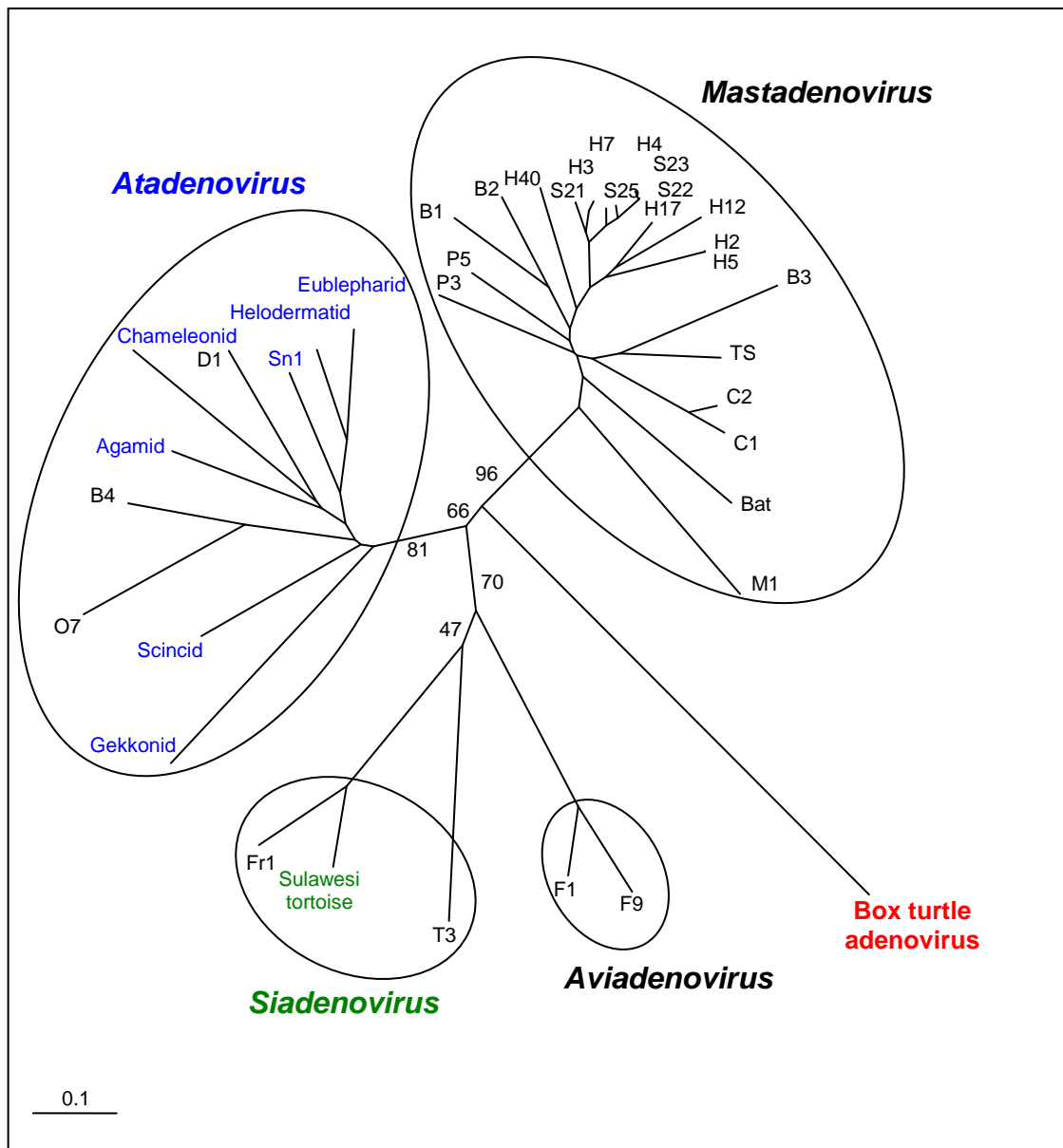
Az atadenovírusok igen elterjedtek, az általunk vizsgált hazai egzotikus hulló mintákban megközelítőleg 10% az előfordulásuk aránya. Egy Hagen-viperában [*Parias (Trimeresurus) hageni*] adenovírusok okozta sejtmagzárványok képződésével járó hepatitist állapítottunk meg. A kígyó májából és a bélből az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozó vipera adenovírust mutattunk ki PCR segítségével. A vipera-adenovírus a DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges szekvenciája alapján azonosnak bizonyult az áspis vipera (*Vipera aspis*) egy németországi laboratóriumban kimutatott adenovírusával.

Mivel adenovírusok mellett parvovírusok is gyakran előfordulnak, ezért a dependovírus genom konzervatív szakaszaira konszenzus primerpárt terveztem, mely segítségével egy kb. 1300 nukleotid hosszúságú szakaszt lehet felerősíteni. Így a Hagen-viperából az adenovírus mellett egyidejűleg mintegy 1297 nukleotid méretű parvovírus szakaszt is sikerült felerősíteni az új primereket alkalmazva. Az így nyert adatok alapján megállapíthattuk, hogy az általunk kimutatott parvovírus mindössze 71%-os azonosságot mutatott a már korábban leírt kígyó-adenó-asszociált-vírussal (SAAV), valamint a gerincesek parvovírusainak nem strukturális génjének egy szakaszával végzett filogenetikai számítások szerint a dependovírusokkal, köztük a liba Derzsy-féle betegségét okozó vírussal és a barbari kacsza parvovírusával mutatta a legközelebbi rokonságot és a filogenetikai fán a SAAV mellett egy különálló ágat képezett.

Adenovírus- és mycoplasma-fertőzöttség dobozteknősben, (Farkas & Gál, 2009)

Egy felnőtt dobozteknősben (*Terrapene ornata ornata*) az adenovírus fertőzöttségre jellemző zsíros májelfajulást, szövettani vizsgálattal sejtzárványos hepatitist állapítottunk meg. PCR-rel adenovírusok jelenlétét sikerült kimutatni. A DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges aminosav szekvenciája alapján elvégzett elemzések és filogenetikai számítások szerint a dobozteknős adenovírusa igen érdekesnek bizonyult. A filogenetikai fán a korábban megismert kígyó, gyík és teknős adenovírusokkal ellentétben a dobozteknős adenovírusa egy teljesen különálló ágat képezett és egyik eddig megismert nemzetséggel sem mutatott rokonságot (1. ábra). A vírus pontos taxonómiai besorolásának megállapításához azonban további szekvenciák meghatározása és a vírus genomszerveződésének ismerete szükséges.

A dobozteknősben egy eddig csak Amerikában kimutatott *Mycoplasma* faj jelenlétét is sikerült kimutatnunk és meghatároztuk annak ISR szekvenciáját, mely további megerősítésül szolgált arra vonatkozóan, hogy a dobozteknősökben található *Mycoplasma* faj elkülönül az eddig ismert teknős *Mycoplasma* fajoktól.



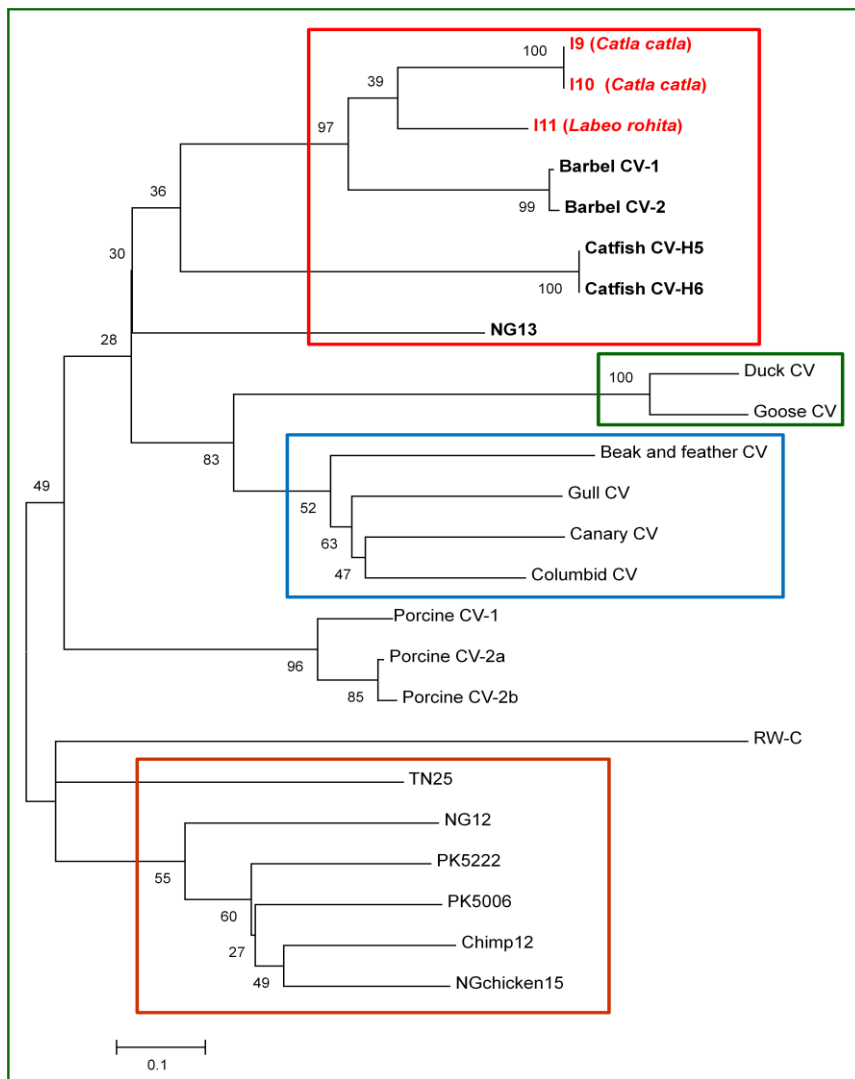
1. ábra Az *Adenoviridae* család törzsfa-rekonstrukciója a DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges szekvenciája alapján.

Circovírusok kimutatása alacsonyabb rendű gerincesekből (Lőrincz és mtsai, 2011; Farkas és mtsai, 2012)

A SZIE mtsaival együttműködésben alacsonyabb rendű gerinces fajok monitoring vizsgálata során több mint 100 kételtű és hüllő mintában circovírusok előfordulását általános circovírus PCR-rel nem sikerült bizonyítani, azonban a világon elsőként dokumentáltuk circovírusok jelenlétét hazai halakban. Márnaék mesterséges szaporítása során az ivadékok tömeges pusztulását tapasztalták. A minták circovírus vizsgálata pozitív eredményt hozott. Az első rövid ampikonok szekvenálása során bebizonyosodott, hogy valóban egy új, a márnaékban előforduló circovírus fajról van szó. A szekvenciák alapján tervezett primerekkel sikerült a teljes vírusgenomot amplifikálni és azt szekvenálás után elemezni. A filogenetikai

elemzés megállapította, hogy az újonnan kimutatott hal circovírus nem azonos az eddig kimutatott vírusokkal.

Ezt követően circovírusokat detektáltunk gazdasági szempontokból is jelentős indiai halfajokból is. 2009 novemberében az indiai Uttar Pradesh Államban lévő halgazdaságban (Parisitgarh Fish Farm), ill. közösségi halastavakban (Khajuri ponds) tenyésztett két indiai pontyféléből (*Labeo rohita* és *Catla catla*) gyűjtött minták közül a PCR vizsgálatok két catla és egy labeo esetében pozitív eredményt hoztak. A PCR során amplifikált rövid szakaszok szekvenciájának elemzése mindkét halfajban circovírusok jelenlétét igazolta. A két catla-ból kimutatott circovírus nukleotid szekvenciája a felerősített szakaszon 100%-ban megegyezett, a labeo circovírusával pedig 67,85% azonosságot mutatott. Szekvencia és filogenetikai analízis (2. ábra) alapján megállapíthattuk, hogy az újonnan kimutatott circovírusok nem azonosak a korábban kimutatott márna és a későbbiekben szintén Magyarországon kimutatott harcsa circovírusokkal.



Hal circovírus

Lúdalakúak circovírusa

Madár circovírus

Sertés circovírus

Circovírus-szerű genom

Cyclovírus

2. ábra Filogenetikai analízis a labeo és catla circovírusok Rep génjének részleges várható aminosav szekvenciája alapján.

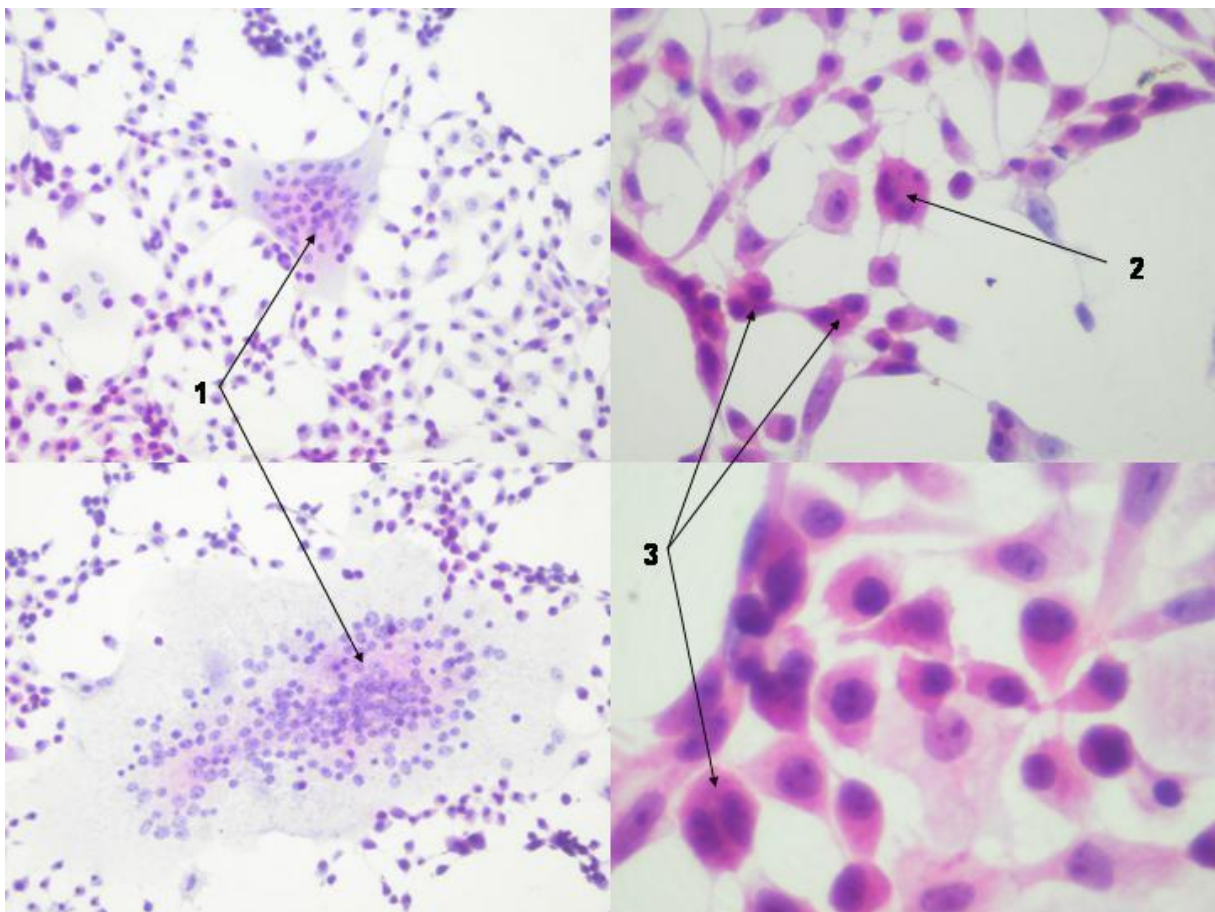
Paramyxovírus fertőzöttség jávai boasiklóban (Papp és mtsai, 2012)

Különféle hüllő fajok paramyxovírus fertőzöttségét külföldön már igen gyakran leírták. A vírus elsősorban légzőszervi és központi idegrendszeri tünetekkel járó megbetegedést okoz, súlyosabb, tömeges elhullást okozó formáját elsősorban viperafélék (Viperinae) alcsaládjába sorolt fajokból álló gyűjteményekben dokumentálták. Monitorning vizsgálataink során paramyxovírus-fertőzöttséget kizárólag importált állatokban, összesen a feldolgozott hazai minták csupán 2%-ban sikerült megállapítani. Egy egzotikus állatkereskedőtől vásárolt, majd fél évvel később elpusztult, elhullása előtt légzőszervi tüneteket mutató jávai boasiklót (*Homalopsis buccata*) küldtek intézetünkbe virológiai vizsgálatra. A kígyót elhullása előtt 4 fajtársával együtt tartották, a vásárlást követően fél éven belül valamennyi kígyó elpusztult. A kórelőzmény, a kórbonctani és kórszövetteni elváltozások alapján paramyxovírus fertőzöttség gyanúja merült fel, melyet később az RT-

PCR vizsgálatok és a PCR termékek szekvenálása igazolt. Az RNS-függő RNS-polimeráz (L), a hemagglutinin-neuraminidáz (HN) és az „ismeretlen” (unknown, U) gének részleges szekvenciájának elemzése rámutatott arra, hogy a kimutatott vírus HoBuc-HUN09 a nemrégiben leírt „C csoport” tagja a *Ferlavírus* nemzetségen belül. Munkánk során egy új hulló paramyxovírust sikerült jellemeznünk egy homalopsid kígyó mucopurulens tüdőgyulladással járó elhullásával kapcsolatban.

Reovírusok kimutatása

Orthoreovírus fertőzöttség a hazai és a külföldi kereskedésekből származó hulló mintákban igen gyakran kimutatható vírusizolálás és/vagy általános RT-PCR segítségével. A hazai mintákból kimutatott orthoreovírusok szekvenciája többségében megegyezett a génbankban található szekvencia adatokkal, azonban egy csoport importált zöld fűsiklóból (*Opheodris aestivus*) egy érdekes, az RNS-függő RNS-polimeráz gén részleges szekvenciája alapján új hulló reovírust sikerült kimutatni és izolálni (3. ábra).



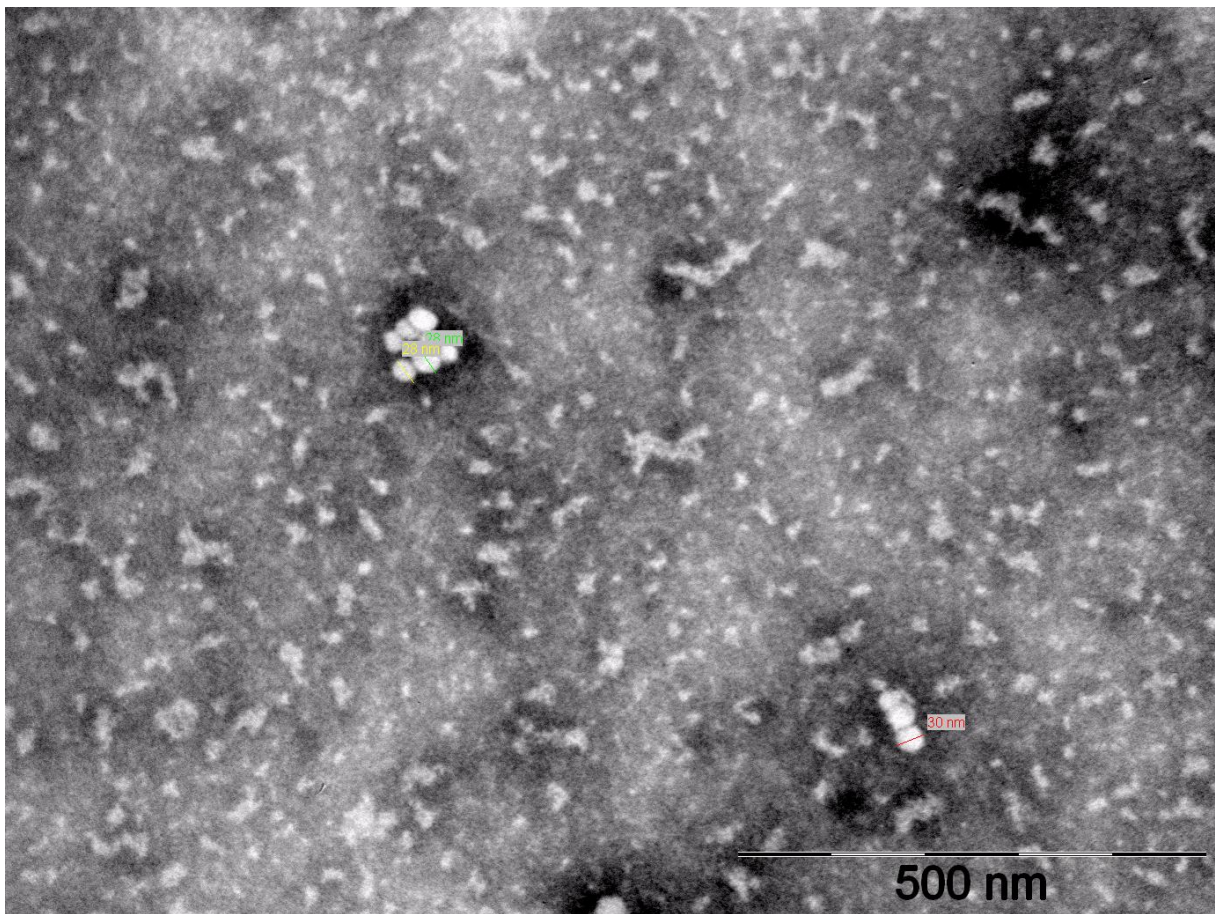
3. ábra Hulló reovírusok által kiváltott citopatógen hatás, sejtfúzió viperaszív sejtvonalon (VH-2).

Sajnos az eddig publikált általános RT-PCR rendszerek segítségével az orthoreovírusok RNS-függő RNS-polimeráz génjének csak egy igen rövid szakasza (kb. 30

vagy 75 aminosav hosszúságú) erősíthető fel, mely csak a vírusok előzetes jellemzésére alkalmas. Hüllő reovírusokból mindeddig csak részleges szekvencia volt elérhető a génbankban, azonban az Ion-Torrent új generációs szekvenáló berendezés segítségével sikerült több hüllő reovírus izolátumot szekvenálni. Az új szekvencia-adatok alapján hatékonyabb diagnosztikai rendszer kidolgozására is lehetőség nyílik.

Picornavírusok molekuláris jellemzése

Németországi együttműködésünk keretében eddig nem ismert picornavírus izolátumok (4. ábra) szekvenciáját részlegesen meghatároztuk.



4. ábra Picornavírusra emlékeztető vírusrészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

Védett hüllő állományok virológiai vizsgálata

A Rákosi vipera-védelmi Központban, a rákosi vipera fajmegőrzését célzó LIFE-program keretében szaporított 55 növendék rákosi viperából vettünk száj és kloáka tampon mintákat. A tampon mintákat általános, a hüllő paramyxovírusok RNS-függő RNS-polimeráz (L) génjének egy szakaszát felerősítő RT-PCR-rel vizsgáltuk. A paramyxovírusok jelenlétére irányuló vizsgálat negatív eredménnyel zárult, a fenti módszerrel aktív vírusürítéssel járó fertőzést nem tudtam megállapítani.

4. OTKA kutatáshoz kapcsolódó eddig megjelent közlemények

1. T. Papp, J. Gál, M. D. Abbas, R. E. Marschang, S. L. Farkas: A novel type of paramyxovirus found in Hungary in a masked water snake (*Homalopsis buccata*) with pneumonia supports the suggested new taxonomy within the *Ferlavirus* genus. **VETERINARY MICROBIOLOGY**. Közlésre elfogadva.
2. S. L. Farkas, J. Gál: Adenovirus and Mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. **VETERINARY MICROBIOLOGY**. 138. pp. 169-173. (2009)
3. M. Lőrincz, A. Cságola, S. L. Farkas, C. Székely, T. Tuboly: First detection and analysis of a fish circovirus. **JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY**. 92. pp. 1817-1821. (2011)
4. Dandár E., Borzák R., Bányai K., Farkas L. S.: Hüllők, madarak és emlősök orthoreovírus okozta megbetegedései. Irodalmi áttekintés. **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**. 134. pp. 564–573. (2012)
5. Papp T., Farkas L. S., Abbas M. D., Apfelbacher N., Seybold J., Erdélyi K., Marschang R. E.: Hüllők paramyxovírus okozta fertőzései: újabb ismeretek az utóbbi évek kutatásai alapján. **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**. 133. pp. 551-561. (2011)
6. Farkas L. S., Gál J.: Adenovírusok okozta sejtzárványos hepatitis és másodlagos parvovírusfertőzés első hazai leírása Hagen-viperában [*Parias (Trimesurus) hageni*]. **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**. 130. pp. 755-761. (2008)
7. Gál J., Landauer K., Demeter Z., Palade A. E., Ursu K., Bálint Á., Papp T., Farkas S. L.: Amúrsikló (*Elaphe schrenki*) vírus okozta savós-fibrines tracheitise és következményes fulladása, **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**. 130. pp. 421-424. (2008)
8. Farkas L. S., Singh H. S., Cech G., Bányai K., Tuboly T., Székely C.: Circovírusok kimutatása tenyésztett indiai pontyfélékből. XXXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás. Konferencia helye, ideje: Szarvas, Magyarország, 2012.05.23-2012.05.24. Szarvas: HAKI, p. 24.
9. J. Gál, M. Mándoki, M. Rusvai, J. Tavaszi, L. S. Farkas: Reovirus related pathological lesions and consequential death in rough green snake, 8th International Congress of Veterinary Virology: 20 years of ESVV: Integrating classical and molecular virology; Programme and Proceedings., 2009.