

Az *Alloherpesviridae* család bemutatása: pontyfélék herpeszvírusainak első molekuláris kimutatása Magyarországon

Doszpoly Andor^{1}, Benkő Mária¹, Csaba György², Dán Ádám², Láng Mária², Harrach Balázs¹*

1| Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Hungária krt. 21.
H-1143 Budapest

*E-mail:

adoszpoly@vmri.hu

2| Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Tábornok utca 2. H-1149 Budapest

A benyújtott DNS szekvenciák GenBank elérési számai:

CyHV-2 HM014349

CyHV-1 HM014350

Összefoglalás. A herpeszvírusok rendszertana nemrégiben gyökeresen megváltozott. 2008-ban létrehozták a *Herpesvirales* rendet, amelyben a *Herpesviridae* mellett két új víruscsalád, az *Alloherpesviridae* és a *Malacoherpesviridae* kapott helyet. Az előbbibe a halak és kételtűek herpeszvírusait, míg az utóbbiba az egyetlen gerinctelenekből izolált osztriga-herpeszvírust sorolták. Korábban ezek a vírusok a *Herpesviridae* családba morfológiai bélyegek alapján kerültek, de annak egyik nemzetségébe vagy alcsaládjába sem illettek be. Az újonnan létesített *Alloherpesviridae* családot jelenleg négy, hivatalosan elfogadott nemzetségre osztják. Ezek közül egy a kételtűek, míg a másik három különféle halfajok herpeszvírusait tartalmazza. A *Cyprinivirus* genusban három, pontyfélékből (Cyprinidae) izolált vírusfaj, nevezetesen a cyprinid herpeszvírus 1, 2 és 3 található. Az 1-es típusú cyprinid herpeszvírus (CyHV-1) okozza az úgynevezett pontyhimlőt, melynek előfordulása hazánkban sem ritka. A 2-es típusú cyprinid herpeszvírust (CyHV-2) aranyhalból (*Carassius auratus*) izolálták először Japánban, de azóta szinte valamennyi földrészén kimutatták. A CyHV-3 a díszponty- és ponty-tenyésztésben világszerte jelentős veszteségeket okozó koi-herpeszvírus hivatalos neve. A szerzők a CyHV-1 és 2 első, hazai, PCR alapú kimutatásáról számolnak be. A világon első alkalommal írják le a CyHV-2 előfordulását nem a megszokott gazdában, az aranyhalban, hanem ezüstkárászban (*Carassius gibelio*). Mindkét vírustól a DNS-függő DNS polimeráz gén 464 bázispár méretű szakaszát erősítették fel PCR-rel. A kapott termékek nukleotid-sorrendjét meghatározták és elemezték. A két vírusfaj egyes törzseiből korábban közölt szekvenciákhoz viszonyítva nukleotid szinten 1% körüli eltérést lehetett megfigyelni, ami azonban a kódolt fehérje aminosav sorrendjében nem eredményezett változást egyik vírus esetében sem.

Introduction of the family *Alloherpesviridae*: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary

Summary. The taxonomy of herpesviruses has recently been changed radically. In 2008, a new order, the *Herpesvirales* was established to contain the family *Herpesviridae* along with two additional new families, *Alloherpesviridae* and *Malacoherpesviridae*. The family *Alloherpesviridae* includes the herpesviruses isolated from amphibians and fish, whereas *Malacoherpesviridae* contains the single herpesvirus originating from an invertebrate host, namely an oyster. Previously, these viruses had been classified into the family *Herpesviridae* based on their characteristic morphology, although they did not fit unambiguously into any genus or subfamily of the family. The newly established family *Alloherpesviridae* is now officially divided into four genera. One of these contains the herpesviruses of amphibians, whereas the other three contain those of different fishes. The genus *Cyprinivirus* includes three virus species originating from cyprinid fishes. *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) is the causative agent of the so called carp pox that occurs commonly also in Hungary. CyHV-2 was isolated from goldfish (*Carassius auratus*) first in Japan, but later it was detected on almost every continent. CyHV-3 is the official taxonomical name for the so called koi herpesvirus that causes devastating losses to the carp and ornamental carp breeders worldwide. In the present work, the authors report the first PCR-based detection of CyHV-1 and 2 in Hungary. For the very first time, the occurrence of CyHV-2 is described in the Prussian carp (*Carassius gibelio*) instead of the usual host the goldfish. A 464 base-pair-long fragment of the DNA-dependent DNA polymerase gene was amplified by PCR from both viruses. The nucleotide sequence of the amplicons was determined and analyzed. In the case of both viruses, the nucleotide sequences exhibited only slight (1%) discrepancies when compared to their counterparts published abroad previously. However, none of these differences resulted in alterations of the amino acid sequences.

Irodalmi áttekintés

Újonnan bevezetett változások a herpesvírusok rendszertanában

A különféle halfajokban napjainkig talált herpesz-szerű vírusok, azaz újabb nevükön alloherpeszvírusok száma 20 felett van. A gazdahalak között édesvízi és tengeri fajok, valódi csontos halak (Teleostei) és porcos vérteshalak (Chondrostei) egyaránt előfordulnak. A sejtmembrán eredetű burokkal és lineáris, duplaszálú DNS genommal rendelkező virionokban megfigyelhető az úgynevezett tegument jelenléte az envelop és a nukleokapszid között. Az eddig tanulmányozott genomok mérete 130 és 290 ezer bázispár között van. Jellemző morfológiai bélyegeik alapján ezeket a vírusokat korábban a *Herpesviridae* családba sorolták. Az első teljes genom-szekvenciát a pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) herpesz-szerű vírusából, az *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1) -ből közel 20 évvel ezelőtt tették közzé (6). A magasabb rendű gerincesek herpeszvírusaira jellemző, megőrzött génblokkok hiánya miatt azonban az IcHV-1 a meglévő (*Alpha*-, *Beta* és *Gammaherpesvirinae*) alcsalád egyikébe sem illett. Így hosszú évekig a *Herpesviridae* családba sorolták, a speciálisan számára kialakított *Ictalurivirus* nemzetség tagjaként.

Időközben folyamatosan növekedett a hal-herpeszvírusokból meghatározott genom-szekvenciák száma (2, 29), valamint az osztriga-herpeszvírus (9) és a két béka-herpeszvírus (7) genomjának teljes nukleotid-sorrendjét is publikáltak. Számos további hal-herpeszvírus PCR-rel felsokszorozott DNS szakaszának nukleotid-sorrendje is ismertté vált. Mindezek lehetővé tették filogenetikai számítások és összehasonlító genom-elemzések elvégzését, amiknek alapján a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 2008-ban jelentős változtatásokat vezetett be. Jelenleg a *Herpesviridae* család *Alphaherpesvirinae* alcsaládjába emlősök, madarak és hüllők, azaz magzatburkosok (Amniota) herpeszvírusait tartalmazza, míg a *Beta*- és *Gammaherpesvirinae* alcsaládban csak emlősök vírusait találjuk. Két új víruscsaládot alakítottak ki, melyek közül az egyik, az *Alloherpesviridae* a halak és kételtűek, tehát magzatburok nélküliek (Anamnia) herpeszvírusait tartalmazza. A puhatestűekről elnevezett, új családban (*Malacoherpesviridae*) az egyetlen gerinctelen gazdából (osztriga) származó herpeszvírus kapott helyet.

A három víruscsaládot a szintén újonnan létrehozott *Herpesvirales* rendbe sorolták be (8). Megjegyzendő, hogy a vírusok esetében a rend (ordo) pillanatnyilag a legmagasabb szintű taxon. A *Herpesvirales* mellett további öt vírusrendet különböztetünk meg, és a ma elismert 87

víruscsalád közül mindössze 22 van a hat rend valamelyikébe besorolva (<http://www.ictvonline.org>).

Az új *Alloherpesviridae* család benépesítése és az evolúciót hűen tükröző felosztása alcsaládokra, illetve nemzetségekre még folyamatban van. Jelenleg négy, hivatalosan elfogadott nemzetséget (genus) tartalmaz. A *Batrachovirus* nemzetségben két béka-herpeszvírus található. A *Cyprinivirus* genus három, pontyfélékből (Cyprinidae) leírt vírust tartalmaz. Az *Ictalurivirus* genusban törpeharcsák és tokfélék, a *Salmonivirus* nemzetségben pedig lazacfélék (Salmonidae) herpeszvírusai találhatóak. Tucatnál több olyan vírust is leírtak, amelyeket eddig DNS-szekvencia adatok hiányában egyik genusba sem lehetett beosztani. Ezeknek a vírusoknak a nagyobb részét nem sikerült izolálni sem. Ezért vagy csak morfológiai bélyegeik alapján feltételezhető, hogy alloherpeszvírusok, vagy a genom jól megőrzött részeire irányuló PCR segítségével kinyert, rendszerint nagyon rövid DNS szakaszok szekvenciája utal erre.

Az alloherpeszvírusok kórtani szerepe

Az alloherpeszvírusok általában tavasszal okoznak járványokat, amikor a vizek hőmérsékletének emelkedése nyomán a vírus-replikáció beindul, és a tél miatt a halak immunrendszere még gyengén működik. A hal-herpeszvírusokat az általuk kiváltott betegségek lefolyása (akut vagy krónikus), illetve a tünetek kiterjedése (általános vagy csak a kültakaróra korlátozódó) alapján négy csoportra lehet osztani (28) a következők szerint. **I.** Magas virulenciájú vírusok, melyek akut, szisztémás fertőzést és nagy mortalitással járó megbetegedéseket okoznak. Idesorolható az IcHV-1 (15) és a CyHV-2 (22). **II.** Alacsony virulenciájú vírusok, melyek krónikus, szisztémás megbetegedést okoznak. Ilyen például a *Salmonid herpesvirus 1* (SalHV-1) (14). **III.** Magas virulenciájú vírusok, melyek akut, elsősorban bőrtünetekkel (eróziókkal, fekélyekkel, vérzéses elváltozásokkal) járó, nagy mortalitással kísért megbetegedéseket idéznek elő. Az *Acipenserid herpesvirus 1* (AciHV-1) és 2 (31), a SalHV-2 (24), CyHV-3 (19), japán lepényhal-herpeszvírus (21). **IV.** Alacsony virulenciájú vírusok, melyek rendszerint enyhe vagy jóindulatú bőrelváltozásokat okoznak, mint például az *Anguillid herpesvirus 1* (3) vagy a szürkeharcsa (*Silurus glanis*) hazánkban is megfigyelt herpeszvírusa (4).

Az úgynevezett pontyhimlő (epithelioma papulosum) leírását több évszázada készült, tudományos művekben is megtalálhatjuk már (16). A hatvanas évek óta ismert, hogy a betegséget a CyHV-1 fertőzés idézi elő, amely természetes vizekben rendszerint nem okoz számottevő mortalitást. Intenzív tartásban azonban néha elhullások is lehetnek főleg fiatal, 2

hetes kor körüli pontyok között. A betegség jellegzetes tünete a fejen, az úszókon és testszerte előforduló, kerekded vagy ovális, súlyos esetben térképszerűen összefolyó, a felszín fölé emelkedő, gyertya-viasszerű bőrelváltozások (papillómák) megjelenése (1. ábra).

Amennyiben nem alakul ki másodlagos bakteriális fertőzés, a bőrelváltozások spontán gyógyulhatnak, de később újra megjelenhetnek. Ugyanis a herpeszvírusokra jellemző módon a CyHV-1 is életre szóló, gyakran látens fertőzést alakít ki. A betegség előfordulását a hasonló tünetek alapján eddig többek között pontyban (*Cyprinus carpio*), dévérkeszegben (*Abramis brama*), szélhajtó küszben (*Alburnus alburnus*), márnában (*Barbus barbus*), aranyhalban (*Carassius auratus*), széles kárászban (*Carassius carassius*), fejes domolykóban (*Leuciscus cephalus*), jászkeszegben (*Leuciscus idus*), compóban (*Tinca tinca*), bodorkában (*Rutilus rutilus*) és vörösszárnyú keszegben (*Scardinius erythrophthalmus*) írták le, de nem bizonyított, hogy valamennyi esetben ugyanaz a vírus-e a kórokozó (10).

A CyHV-2 aranyhalakban az úgynevezett herpeszvírus-okozta vérképzőszervi elhalás (herpesviral haematopoietic necrosis) okozója. Először Japánban írták le, ahol a vírust izolálták is (22), de hamarosan felismerték Észak-Amerikában, Taiwanon, Ausztráliában és az Egyesült Királyságban is (17, 18, 27). Néhány további cyprinid halfajt nem találtak fogékonyak (20). Mivel a vírus a vérképző szerveket támadja meg, a beteg halakat általában letargia, anorexia jellemzi. A szokásosnál halványabb kopoltyún vérzések és elhalások lehetnek. Kórbonctani vizsgálat során a kopoltyú és a belsőszervek (máj, lép, vese) vérfogyottsága tűnik szembe. A bél rendszerint üres. A lép és a vese vérképző állománya duzzadt. Ez utóbbi szervek mellett a májban, hasnyálmirigyben és a belekben is előfordulhatnak szürkésfehér, elhalásos góccok. A mortalitás esetenként a 100%-ot is elérheti. Minden korcsoport érintett lehet. Ha a víz hőmérséklete 25°C fok fölé emelkedik, akkor a vírus nem képes szaporodni. Magyarországi eset leírásáról nincs tudomásunk.

A CyHV-3, vagy más néven koi-herpeszvírus, jelenleg az egyik legnagyobb gazdasági károkat okozó hal-herpeszvírus, ezért áll a kutatások középpontjában. Felbukkanása óta súlyos veszteségeket okoz a halgazdaságoknak szerte az egész világon (2). A bejelentési kötelezettség alá tartozó betegség tipikus külső tünetei a kopoltyú nekrozisa, enophthalmus és haemorrhagiás bőrelváltozások az úszók tövéénél. Eddigi tapasztalatok szerint csak pontyban és koi pontyban okoz betegséget, de egyes kutatók feltételezik, hogy bizonyos halfajok tünetmentes vírushordozók lehetnek (5). Hazánkban még nem bizonyított a CyHV-3 megjelenése, de számítanunk kell rá, ugyanis a környező országok többségében már kimutatták jelenlétét (25, 26).

Saját vizsgálat

Jelen munkánk célja két cyprinid herpeszvírus, a CyHV-1 és 2, PCR segítségével történő kimutatása volt. Hazai tógazdaságból származó, pontyhimlős bőrelváltozást mutató pontyot, valamint elhullott ezüstkárászt (*Carassius gibelio*) vizsgáltunk. A PCR termékek nukleotid-sorrendjét meghatároztuk, és a hazai vírusok szekvenciáját összehasonlítottuk a szakirodalomban korábban közölt külföldi adatokkal.

Anyag és módszer

Egy közepes kondícióban lévő, kétnyaras ponty boncolása során a hal fején és törzsén néhány, jellegzetes pontyhimlős kiütést találtunk. A belső szervekben kóros eltérést nem lehetett megfigyelni. Mintát vettünk a hámon keletkezett elváltozásból, a kopolytúból, májból és veséből. A másik minta ezüstkárász volt, amelyet egy hazai tógazdaságban történt tömeges elhullást követően küldtek az MGSzHK ÁDI-ba. Ebben az egyedben a boncolás során kóros elváltozást nem találtunk. A PCR-hez a hal belső szerveinek (lép, máj, vese) keverékét használtuk mintaként. A szervmintákat homogenizáltuk, proteinázzal emésztettük, és guanidin-hidrokloridos kezelést követően a nukleinsavakat etanollal precipitáltuk.

A hal-herpeszvírusok általános kimutatására javasolt polimeráz láncreakciót (PCR-t) használtuk (23). A primerek az alloherpeszvírusok DNS-függő DNS polimeráz génjéből egy kb. 450 bp méretű, erősen megőrzött szakasz felsokszorozódását teszik lehetővé. A módszert korábban már teszteltük különböző tok-herpeszvírus izolátumokon (12, 13). Az érzékenység fokozása érdekében ugyanazon primerek alkalmazásával két teljes reakciót hajtottuk végre.

A PCR-hez Phusion DNS polimeráz enzimet (Finnzyme) használtunk. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 34 µl desztillált víz, 10 µl 5X Phusion puffer (Finnzyme), 1,5 µl dNTP (10 mM) oldat, 1–1 µl primer (50 pmol/µl), 0,5 µl Phusion DNS polimeráz enzim (Finnzyme) és 2 µl minta DNS oldat. A reakciók második körében mintaként az első kör reakcióelegyének 5 µl-ét használtuk, és ennek megfelelően csökkentettük a desztillált víz mennyiségét.

A PCR programban a kezdeti denaturálás 98°C-on 5 perc volt, majd ezt követte 45 ciklus, melynek lépéseit a következő paraméterek jellemezték: 98°C 30 mp; 46°C 30 mp; 72°C 60 mp. A végső szintézis 72°C-on 10 perc volt.

A PCR termékeket 1%-os agaróz gél-elektroforézissel vizsgáltuk. A pozitív reakciók termékeit a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk, majd a PCR primerek használatával, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) alkalmazásával mindkét irányban elvégeztük a szekvenálási reakciót. Az elektroforézist automata DNS szekvenálón (ABI Prism® 3100) az MTA Szegedi Biológiai Központban végezték, és az eredményeket elektronikus levélben kaptuk meg. A nukleotid-szekvenciákat a BLASTX homológia kereső program segítségével azonosítottuk. A szekvenciák további elemzéséhez a már korábbi közleményekben részletezett módszereket és programokat használtuk (12). A filogenetikai számításokat a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel, WAG szubsztitúciós modellt alkalmazva, illetve távolsági mátrix (distance matrix) módszerrel JTT modellt használva is elvégeztük. A törzsfarekonstrukciók megbízhatóságát mindkét esetben bootstrap analízissel ellenőriztük (1000 mintavétellel).

Eredmények

A PCR mindkét hal mintájából pozitív eredményt adott. Az úgynevezett pontyhimlős tüneteket mutató pontyból a máj kivételével valamennyi szerv pozitív lett (**2. ábra**). Az alkalmazott PCR kvantitatív meghatározásra nem alkalmas, azonban az ábrán bemutatott gél alapján mégis becsülhető, hogy valószínűleg a bőrelváltozásból vett minta tartalmazta a vírust legnagyobb mennyiségben. Mivel pozitív kontroll nem állt rendelkezésünkre, negatív kontrollt sem használtunk, de a májminta annak tekinthető. A ezüstkárász vegyes szerv-mintája szintén pozitív lett.

A pozitív reakciókban keletkezett termékek nukleotid-sorrendjét minden esetben meghatároztuk. A vírusok DNS-függő DNS polimeráz génjének 464 bp hosszú szakaszát nyertük ki. A szekvenciákat benyújtottuk a GenBank-ba, ahol a CyHV-1 elérhetőségi száma HM014350, a CyHV-2-é pedig HM014349 lett. Aminosav szinten mindkét vírus vizsgált szakasza tökéletesen megegyezett a korábban Nyugat-Európában, Észak-Amerikában és Japánban leírt törzsek megfelelő szakaszával. Nukleinsav szinten bizonyos génbanki izolátumokkal 100%-os az egyezés, míg más törzsekkel szemben minimális eltérés (1%) figyelhető meg, mely a tripletek harmadik tagjának variálódásából adódik.

Az általunk alkalmazott PCR-t a hal-herpeszvírusok általános kimutatására ajánlották (23), így e génszakasz szekvenciája számos további alloherpeszvírusból is ismert, ezért

kiválóan alkalmas filogenetikai számításokhoz is. A **3. ábrán** látható törzsfa-rekonstrukció az aminosav-szekvenciák alapján készült. A törzsfa-rekonstrukció célja az *Alloherpesviridae* család jelenleg ismert tagjai közötti genetikai rokonsági viszonyok feltárása és bemutatása volt.

Megvitatás

A pontyhimlő kialakításért felelős CyHV-1 előfordulása régóta ismeretes, de ez az első alkalom, hogy DNS-szekvencia adatok kinyerése után a világ más részein leírt törzsekkel összehasonlíthattunk egy hazai vírust. Megállapítottuk, hogy a virális DNS-függő DNS polimeráz génnek ezen a jól megőrzött szakaszán számottevő, azaz az aminosav-szekvenciát is befolyásoló eltérés nem mutatható ki. Előreláthatólag hamarosan ismertté válik a CyHV-1 teljes genom-szekvenciája is, és ekkor lehetőség nyílik majd egyéb gének illetve géntermékek, például az immunogenitás szempontjából legjelentősebb envelop fehérjék és glükoproteidek összehasonlító vizsgálatára is.

Több évtizede tapasztalható hazánkban időnként tömeges elhullás ezüstkárász tenyészetekben. Az elhullások okát eddig nem sikerült kideríteni, ami részben a kárászok csekély gazdasági jelentőségével magyarázható. A CyHV-2 kimutatása az első alkalom e vírus hazai jelenlétének igazolására. Ezen túlmenően a világon elsőként írunk le a CyHV-2 fertőzést ezüstkárászban. Korábban ezt a vírust csak aranyhalakban mutatták ki. A ezüstkárász és az aranyhal nagyon közeli rokonságot mutató halfajok, sőt korábban egy egységes faj *Carassius auratus* alfajainak tekintették az ezüstkárászt (*Carassius auratus gibelio*) illetve az aranyhalat (*Carassius auratus auratus*). A herpeszvírusok döntő többsége szűk gazdafaj-spektrummal rendelkezik, de nem különösebben váratlan, hogy ugyanaz a herpeszvírus megtalálható e két nagyon közeli fajban. Aranyhalakban a CyHV-2 fertőzés nyomán kialakuló jellegzetes kóros elváltozások között van az eozinofil magzárványok és elhalásos gócok kialakulása a lépben, a vese vérképző szöveteiben, valamint a pancreasban és a belekben. A vérszegénység mellett a kopoltyúban krónikus branchitis jelentkezik (27). A ezüstkárászban okozott klinikai tünetek, illetve betegség azonban valószínűleg eltér az aranyhalakban ismert kórképtől, és ennek tanulmányozását tervezzük a jövőben.

Az újonnan nyert, valamint a nyilvános adatbankokban elérhető szekvenciák bevonásával törzsfa-rekonstrukciót készítettünk az eddig megismert alloherpeszvírusok genetikai viszonyainak illusztrálásához. A **3. ábrán** bemutatott fán az *Alloherpesviridae*

család négy, jól elkülönülő főbb ágra oszlik. Az egyik ágon, amely a *Batrachovirus* nemzetségnek felel meg, a kétéltűek vírusai (RaHV-1 és 2) található. Egy másik nagy ágon látható a *Cyprinivirus* nemzetség (CyHV-1, 2 és 3) és az angolna herpeszvírusa (AngHV-1). Az ICTV-hez idén benyújtott javaslat szerint az AngHV-1 is a *Cyprinivirus* genusba sorolandó. A harmadik ágon található az *Ictalurivirus* és a *Salmonivirus* nemzetség tagjai, nevezetesen az AciHV-2, IcHV-1 és 2, valamint a SalHV-1, 2 és 3. Megjegyzendő, hogy ezek között a genetikai távolság általában nem éri el a két béka-herpeszvírus közötti távolságot. Azok mégis egy nemzetségbe lettek sorolva, míg itt két nemzetséget alakítottak ki. Érdekes módon az AciHV-1, amelyből sajnos csak nagyon kevés szekvencia adat áll rendelkezésünkre, egyértelműen egyik csoportba sem sorolható, és elképzelhető, hogy egy negyedik leszármazási vonalat (és ennek megfelelően alcsaládot) képvisel.

A *Herpesviridae* családkhoz hasonlóan az alloherpeszvírusok esetében is feltételezik a koevolúciót, azaz a vírusok és gazdafajaik sok millió év óta tartó közös fejlődését. Az eddigi eredmények ezt részben alátámasztják. A jelenlegi *Batrachovirus*, *Cyprinivirus* és *Salmonivirus* nemzetségbe sorolt vírusok gazdafajai genusonként azonosak, illetve közeli evolúciós rokonságban állnak. Az egyetlen kivétel az *Ictalurivirus* nemzetség, amelybe sorolt vírusok gazdafajai között találunk törpeharcsaféléket (*Ictaluridae*) és tokféléket (*Acipenseridae*) is. A fekete törpeharcsából (*Ameiurus melas*) leírt IcHV-2 (1) és a lénai tokból (*Acipenser baeri*) izolált szibériai tokherpeszvírus (SbSHV) előfordulását eddig még nem írták le Magyarországon, de az előbbi vírus Észak-Olaszországban, az utóbbi pedig Oroszországban már megjelent. A két vírus genetikai és evolúciós szempontból meglehetősen távoli halfajt fertőz, mégis egyaránt az *Ictalurivirus* nemzetségbe sorolható (12, 13).

Ennél a nemzetségnél gazdaváltást kell feltételeznünk, melynek irányát egyelőre nem lehet biztosan megállapítani. Elképzelhető, hogy az ictalurivírusok eredetileg a törpeharcsafélék herpeszvírusai, és a tokfélékbe gazdaváltás során jutottak. Ha ezt a feltételezést elfogadjuk, akkor esetleg az AciHV-1 képviseli a tokfélék "saját" herpeszvírusainak a vonalát.

Az *Alloherpesviridae* család felosztása alcsaládokra jelenleg már aktuálisra vált kérdés, de megosztja a témán tevékenykedő kutatókat. Egy részük javaslata szerint két alcsalád kialakítása szükséges (29, 30), melyek közül egyikbe a *Cyprinivirus* nemzetség tartozna, a másikba pedig az összes többi genus. Ezzel szemben a mi kutatócsoportunk legalább három alcsalád kialakítását tartja indokoltnak a **3. ábrán** látható törzsfá főbb elágazódásainak megfelelően. Javaslataink szerint egy alcsaládba tartozhatnának a kétéltűek herpeszvírusai, egy másikba a cyprinivírusok és AngHV-1, egy harmadik pedig az ictaluri- és

salmonivírusokat lehet sorolni (11, 12). Az AciHV-1 rendszertani helyének tisztázásához e vírus genom szerveződése és szekvenciája tekintetében további információkra lenne szükség.

Az alcsalád szintű felosztásra vonatkozó javaslatunkat nem csak a filogenetikai számítások, hanem a vírus genomok szerveződése és mérete is alátámasztja (2, 7, 11, 29).

Következtetések

PCR módszer segítségével először sikerült bizonyítani a CyHV-1 és 2 hazai előfordulását. Megállapítható, hogy a Magyarországon kimutatott vírusok lényegesen nem térnek el a külföldön korábban már vizsgált törzsektől, legalábbis az általában jól megőrzött DNS-függő DNS polimeráz gén alapján. Elképzelhető, hogy kevésbé megőrzött genom szakaszokon nagyobb eltéréseket tapasztalnánk. Ez az első publikáció, amely természetes körülmények között a CyHV-2 előfordulását nem aranyhalban, hanem ezüstkárászban írja le.

Az ezüstkárász pontyhoz viszonyított csekélyebb gazdasági jelentősége ellenére érdemes lenne további vizsgálatokat végezni, hogy felmérjük a hazai állományok fertőzöttségét, illetve, hogy meghatározhassuk a CyHV-2 esetleges szerepét az időről időre előforduló tömeges ezüstkárász elhullások hátterében.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokhoz az OTKA K61317 számú pályázata nyújtott támogatást. A szerzők ezúton fejezik ki köszönetüket Dr. Molnár Kálmánnak a pontyhimlős egyed rendelkezésünkre bocsátásáért.

IRODALOM

1. ALBORALI, L. – BOVO, G. et al.: Isolation of an herpesvirus in breeding catfish (*Ictalurus melas*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 1996. 16. 134–137.
2. AOKI, T. – HIRONO, I. et al.: Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. J. Virol., 2007. 81. 5058–5065.

3. BÉKÉSI, L. – HORVÁTH, I. – KOVÁCS-GAYER, É. – CSABA, G.: Demonstration of herpesvirus like particles in skin-lesions of European eel (*Anguilla anguilla*). J. Appl. Ichthyol. 1986. 2. 190–192.
4. BÉKÉSI, L. – KOVÁCS-GAYER, É. – RÁTZ, F. – TURKOVICS, O.: Skin infection of the sheatfish (*Silurus glanis* L.) caused by a herpesvirus. Symp. Biol. Hung., 1984. 23. 25–30.
5. BERGMANN, S. M. – LUTZE, P. et al.: Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 2010. 30. 74–84.
6. DAVISON, A. J.: Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. Virology, 1992. 186. 9–14.
7. DAVISON, A. J. – CUNNINGHAM, C. et al.: Genome sequences of two frog herpesviruses. J. Gen. Virol., 2006. 87. 3509–3514.
8. DAVISON, A. J. – EBERLE, R. et al.: The order *Herpesvirales*. Arch. Virol., 2009. 154. 171–177.
9. DAVISON, A. J. – TRUS, B. L. et al.: A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. J. Gen. Virol., 2005. 86. 41–53.
10. DIXON, P. F.: Virus diseases of cyprinids. In: EIRAS, J. C. – SEGNER, H. et al. (eds) Fish Diseases. Volume 1., Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2008. p 87–184.
11. DOSZPOLY, A. – BENKŐ, M – BOVO, G. – LAPATRA, S. E. – HARRACH, B.: Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus *Ictalurivirus*. Intervirology, 2011. (in press) DOI: 319430
12. DOSZPOLY, A. – KOVÁCS, E. R. – BOVO, G. – LAPATRA, S. E. – HARRACH, B. – BENKŐ, M.: Molecular confirmation of a new herpesvirus from catfish (*Ameiurus melas*) by testing the performance of a novel PCR method, designed to target the DNA polymerase gene of alloherpesviruses. Arch. Virol., 2008. 153. 2123–2127.
13. DOSZPOLY, A. – SHCHELKUNOV, I. S.: Partial genome analysis of Siberian sturgeon alloherpesvirus suggests its close relation to AciHV-2. Acta Vet. Hung., 2010. 58. 269–274.
14. EATON, W. D. – WINGFIELD, W. H. – HEDRICK, R. P.: Prevalence and experimental transmission of the steelhead herpesvirus in salmonid fishes. Dis. Aquat. Organ., 1989. 7. 23–30.
15. FIJAN, N. N. – WELLBORN, T. L. – NAFTEL, J. P.: An acute viral disease of channel catfish. US Fish Wildl. Serv. Tech. Pap., 1970. 43. 1–11.

16. GESSNER, C.: *Historiae Animalium Liber IIII, qui est Piscium et Aquatilium Animantium Natura*. Tiguri, Zürich, 1558.
17. GOODWIN, A. E. – KHOO, L. et al.: Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 2006. *18*. 11-18.
18. GOODWIN, A. E. – MERRY, G. E. – SADLER, J.: Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (Cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method. *Dis. Aquat. Organ.*, 2006. *69*. 137–143.
19. HEDRICK, R. P. – GILAD, O. et al.: A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, 2000. *12*. 44–57.
20. HEDRICK, R. P. – WALTZEK, T. B. – MCDOWELL T. S.: Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish, and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health*, 2006. *18*. 26–34.
21. IISA, Y. – MASUMURA, K. et al.: A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquat. Anim. Health*, 1989. *1*. 7–12.
22. JUNG, S. J. – MIYAZAKI, T.: Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J. Fish Dis.*, 1995. *18*. 211–220.
23. KELLEY, G. O. – WALTZEK, T. B. et al.: Genetic relationships among herpes-like viruses isolated from sturgeon. *J. Aquat. Anim. Health*, 2005. *17*. 297–303.
24. KIMURA, T. – YOSHIMIZU, M.: Salmonid herpesvirus: OMV, *Oncorhynchus masou* virus. In: AHNE, W. – KURSTAK, E. (eds) *Viruses of Lower Vertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, 1989. p 171–183.
25. MAREK, A. – SCHACHNER, O. et al.: Characterization of Austrian koi herpesvirus samples based on the ORF40 region. *Dis. Aquat. Organ.*, 2010. *88*. 267–270.
26. NOVOTNY, L. – POKOROVA, D. et al.: First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 2010. *30*. 85–91.
27. PHYLBEY A. W.: Herpesvirus haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) in the UK. *Vet. Rec.*, 2006. *158*. 800–801.
28. SHCHELKUNOV, I. S. – SHCHELKUNOVA, T. I. et al.: First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia. *Dis. Aquat. Organ.*, 2009. *86*. 193–203.

29. VAN BEURDEN, S. J. – BOSSERS, A. et al.: Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.*, 2010. *91*. 880–887.
30. WALTZEK, T. B. – KELLEY, G. O. et al.: Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis. Aquat. Organ.*, 2009. *84*. 179–194.
31. WATSON, L. R. – YUN, S. C. et al.: Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Dis. Aquat. Organ.*, 1995. *22*. 199–210.

Ábra aláírások

1. ábra. A *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) által okozott betegség jellegzetes tünete a fejen, az úszókon és testszerte előforduló, kerekded vagy ovális, súlyos esetben térképszerűen összefolyó, a felszín fölé emelkedő, gyertya-viasszerű bőrelváltozások megjelenése.

Figure 1. Typical skin lesions caused by *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1).

2. ábra. CyHV-1 polimeráz génjére irányuló PCR eredménye 1%-os agaróz gél elektroforézis után. A minták jelölése: M: molekulatömeg marker; 1: elváltozást mutató hámszövet; 2: kopoltyú; 3: máj; 4: vese.

Figure 2. Gel electrophoresis of the PCR products for the detection of CyHV-1.

Abbreviations: M: molecule mass marker; 1: epithelial tissue; 2: gill; 3: liver; 4: kidney.

3. ábra. Az *Alloherpesviridae* család törzsfá rekonstrukciója, maximum likelihood (WAG szubsztitúciós modell) és distance matrix (JTT modell) módszerrel számítva a polimeráz gén részleges szekvenciájából. A két módszer bootstrap értékei egymás alatt láthatóak. A szaggatott vonallal bekarikázott vírusok a jelenleg elfogadott nemzetségeket jelölik. A folyamatos vonallal bekarikázottak a szerzők által javasolt alcsoportokra való felosztást mutatják. Rövidítések: AciHV-1: acipenserid herpesvirus 1; AciHV-2: acipenserid herpesvirus 2; AngHV-1: anguillid herpesvirus 1; CyHV-1: cyprinid herpesvirus 1; CyHV-2: cyprinid herpesvirus 2; CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3; IchHV-1: ictalurid herpesvirus 1; IchHV-2: ictalurid herpesvirus 2; RaHV-1: ranid herpesvirus 1; RaHV-2: ranid herpesvirus 2; SalHV-1: salmonid herpesvirus 1; SalHV-2: salmonid herpesvirus 2; SalHV-3: salmonid herpesvirus 3.

Figure 3. Phylogenetic tree of the family *Alloherpesviridae* based on maximum likelihood (WAG substitution model) and distance matrix (JTT model) analysis from the partial sequences of polymerase gene. The viruses encircled by dotted lines represent the officially accepted genera. Continuous-line circles show the subfamilies proposed by the authors.

Abbreviations: AciHV-1: acipenserid herpesvirus 1; AciHV-2: acipenserid herpesvirus 2;

AngHV-1: anguillid herpesvirus 1; CyHV-1: cyprinid herpesvirus 1; CyHV-2: cyprinid herpesvirus 2; CyHV-3: cyprinid herpesvirus 3; Ictalurid herpesvirus 1; Ictalurid herpesvirus 2; RaHV-1: ranid herpesvirus 1; RaHV-2: ranid herpesvirus 2; SalHV-1: salmonid herpesvirus 1; SalHV-2: salmonid herpesvirus 2; SalHV-3: salmonid herpesvirus 3.