

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Hüllőkben előforduló adeno-, irido- és paramyxovírusok
kimutatása és jellemzése**

PhD értekezés tézisei

Papp Tibor

2012

Témavezetők és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Harrach Balázs, D.Sc.
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

Dr. Rachel E. Marschang, P.D., FTÄ Mikrobiologie, ZB Reptilien
Környezet- és Állathigiéniái Tanszék
Hohenheim Egyetem, Stuttgart, Németország
témavezető

Prof. Dr. Arthur Pfitzner, Ph.D.
Általános Virologia Osztály
Genetikai Intézet
Hohenheim Egyetem
Stuttgart, Németország
témabizottsági tag

Prof. Dr. Mária Benkő, D.Sc.
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottsági tag

.....
dr. Papp Tibor

Bevezetés

A hüllők virológiai tárgyú kutatása mintegy fél évszázados múltra tekint vissza. Elsőként zoonózist okozó arbovírusok (flavi- és togavírusok) rezervoárját keresték hüllőben, majd egy évtizeddel később saját kórokozó vírusaiknak leírása is megkezdődött. Az egyes hüllő csoportokra jellemző legfőbb vírusos kórokozók eltérőek. A teknősökben a rana- (*Iridoviridae*) és herpeszvírusok, krokodilokban a poxvírusok, kígyókban a paramyxo- és a reovírusok, míg gyíkokban a reo- és adenovírusok találtak a leggyakoribb kóroki ágenseknek.

Adenovírusokat (AdV) eddig főként gyíkokból, de emellett számos kígyófajból és teknősökből, valamint néhány krokodilból is sikerült kimutatni. Úgy tűnik, hogy a pikkelyes hüllők (gyíkok és kígyók) gyűjteményi állományai világszerte fertőzöttek AdV-sal, és vadbefogott kígyókban is kimutatható volt szerológiai áthangolódás. AdV fertőzött pikkelyes hüllőben leggyakrabban leírtak a gyomor-, bél- és májgyulladásos jelek, de központi idegrendszeri tünetek is mutatkozhatnak. A vírusok izolálása és/vagy genetikai jellemzése csak kevés esetben történt meg. Vizsgálataink kezdetekor csupán kígyókból álltak rendelkezésre AdV izolátumok, melyek egy génszakasz szekvenciája alapján egyetlen típusba tartozónak tűntek. Egyik ilyen izolátum teljes genetikai állományát meghatározták 2005-ben Budapesten, s ez a vírus a kígyó-adenovírus 1 (SnAdV-1) nevet kapta.

Az iridovírusok (*Iridoviridae* család) fontos kórokozók hidegvérű gerinces fajokban és számos gerinctelen fajban. A család öt hivatalos nemzetsége közül kettő (*Iridovirus* és *Chloriridovirus*) tagjait korábban csupán gerinctelenekből, elsősorban rovarokból írták le, erre utal angol rövidítésük: IIV ("invertebrate iridoviruses"). A múlt század 90-es éveinek végén egy új IIV-t írt le tücsökökből két német kutatócsoport. Mindkét esetben terrarisztikai eleséggént tartott tücsökállományokban regisztrálták a fertőzést. A tücsök-iridovírust részleges genetikai és egyéb fenotípusos jellemzői alapján az *Iridovirus* nemzetség típusfajának, a CIV-nak (*Chilo iridescent virus*), egy variánsaként sorolták be. Később ugyanezen vírust lesoványodott és/vagy bőrelváltozásos gyíkokban is megtalálta két német csoport egymástól függetlenül. A vírus tücsökről gyíkokra történt gazdafajváltását tételezték fel.

Az első hüllő paramyxovírust (rPMV) 1972-ben egy svájci lándzsakígyó állományból mutatták ki, ahol a fertőzés légző- és központi idegrendszeri tüneteket okozott és 30%-os mortalitással járt. Az izolált vírus a kígyó francia nevéből képzett Fer de Lance virus (FDLV) nevet kapta, s később teljes genomjának nukleotidsorrendjét is meghatározták. Ebben egy új, még ismeretlen szerepű fehérje kódoló egységet (U-gén) találtak az N és P gének között. E gén jelenléte és az FDLV rekonstruált törzsfákon való elkülönült helyeződése miatt egy új nemzetség felállítása (*Ferlavirus*) vált szükségessé a *Paramyxovirinae* alcsaládon belül. Időközben számos más

pikkelyes hüllőből származó ferlavírust mutattak ki és jellemezték, azonban a nemzetségen belüli csoportosításuk nem volt egyértelmű. Munkánk kezdetekor szintén nem álltak még rendelkezésre adatok a különböző típusok előfordulásáról és a fertőzés állományszintű prevalenciájáról kígyókban, valamint ismeretlen voltak a teknősökben előforduló paramyxovírusok (filo)genetikai jellemzői.

Vizsgálataink célja volt e gyakori és fontos hüllő-vírusoknak a jellemzése, új típusok leírása, elterjedtségük, kórokozó képességük, gazdafajlagosságuk vizsgálata, és filogenetikai viszonyaik elemzése.

Anyag és módszer

Minták

Kígyókból, gyíkokból és teknősökből származó összesen 72 diagnosztikai minta (szervek és tampon) került vizsgálatra AdV jelenlétének kimutatása céljából, két-körös konszenzus PCR és sejtenyészeten történő izolálás módszereivel. Egy dániai állatkertben lévő gila (*Heloderma suspectum*) és mexikói viperagyík (*Heloderma horidum*) állomány esetén egy év során négy alkalommal történt mintavétel.

Nyolc különböző IIV izolátumot vontunk genetikai összehasonlító vizsgálatainkba, s közülük hármat az állatfertőzési kísérletekben is vizsgáltunk (1. táblázat). További diagnosztikai mintákat (45 gyík, 27 tücsök), vizsgáltunk IIV jelenlétére hagyományos PCR (nPCR), valós-idejű PCR (qPCR) és vírusizolálás módszereivel.

1. táblázat IIV izolátumaink származása

	gazdafaj	azonosító szám	állomány	IIV pozitív szervek*	tünetek, egyéb
Squamata, Lacertilia	magasfejű kaméleon (<i>Chamaeleo hoehnelii</i>)	Ir.iso.1	A	vese, máj, lép, <i>tüdő</i> , bél	lesoványodás, kerato-konjunktivitisz
	szakállas agáma (<i>Pogona vitticeps</i>)	Ir.iso.2	B	<i>tüdő</i> , szív, nyelv	ismeretlen
	szakállas agáma (<i>Pogona vitticeps</i>)	Ir.iso.3	B	<i>tüdő</i> , agy, nyelv, gyomor, bél	ismeretlen
	tüskésfarkú gyík (<i>Uromastyx sp.</i>)	Ir.iso.4	B	<i>bőr</i>	hiperkeratózis
	négyszarvú kaméleon (<i>Ch. quadricornis</i>)	Ir.iso.5	C	<i>máj</i>	lesoványodás, hirtelen elhullások
	zöld leguán (<i>Iguana iguana</i>)	Ir.iso.6	D	<i>bőr</i>	hiperkeratózis
Arthropoda	házi tücsök (<i>Acheta domesticus</i>)	Ir.iso.7	E	<i>teljes test</i>	tömeges elhullás (eleséggént tartott)
	császársz skorpió (<i>Pandinus imperator</i>)	Ir.iso.8	F	<i>belsőszervek</i>	UV szín elvesztése

*A genetikai összehasonlításban szereplő izolátumok dőlten szedettek, az állatfertőzési kísérletekben használtak aláhúzottak.

Három gén (U, HN, L) szekvenciájára alapozott genetikai összehasonlításban hat kígyóból, három gyíkból és egy tenősből származó paramyxovírus "izolátumot" vizsgáltunk. Ezek közül két (egy németországi gabonasikló, PanGut-GER09 és egy magyarországi boasikló, HoBuc-HUN09) esetben nem állt valódi izolátum a rendelkezésünkre, itt szervmintákat vizsgáltunk. További 21 különféle kígyófaj összesen 102 egyedéből származó 203 minta (szervek és tampon) került szűrővizsgálatra. Ezekben, sejtenyészeten történő izolálás és két-körös L-gén RT-PCR segítségével vizsgáltuk ferlavírusok jelenlétét és típusait.

Szövettenyésztés

A vírusok izolálását hüllőkéből származó permanens sejt kultúráján kísérlettük meg. Az eredeti vírusgazdától függően 3 különböző sejtípust használtunk: leguán szív sejt vonalat (IgH-2) és/vagy vipera szív sejtet (VH-2) és/vagy doboz teknős szív sejt vonalat (TH-1). Az állatfertőzési kísérletek, ellenanyagtermelés és a részleges genom szekvenálás céljából az irido- és adenovírus izolátumokat ugyanezen sejteken szaporítottuk, majd azt követően tisztítottuk és/vagy koncentráltuk.

Kísérleti állat-fertőzés

Három eltérő gazdából származó IIV izolátum fertőzőképességének összehasonlítása céljából (1. táblázat) kétfoltú tücskökkel (*Gryllus bimaculatus*) (n=20) végeztünk 10 fertőzési kísérletet két eltérő állandó hőmérsékleten (20 és 30°C-on). A vírusszaporodást a tücskök zsírtestjében vizsgáltuk.

A szakállas agámákon végzett fertőzési kísérlethez 5 hónapos korú állatokat egyedi terráriumos elhelyezéssel három csoportra osztottunk (5 állat/csoport), és a fertőzésükhöz egy szakállas agámából származó IIV izolátumot (1. táblázat: Ir.iso.3) használtunk. Az „A” csoport egyedei gyomorszondán keresztül 1 ml dializált vírusszuszpenziót kaptak (TCID₅₀=10^{6.5}/ml), a „B” csoport tagjai ezen felül ugyanezen vírusadagot intracoelomikus injekció formájában is. A primer fertőzést követően mindkét csoport tagjait *ad libitum* adagolt növényi táplálék mellett (19-26°C-on, 28-38% relatív páratartalmú környezetben tartva), kísérletileg fertőzött tücskökkel etették 45 napon keresztül, míg az utolsó 2 hétben csak vírusmentes növényi táplálékot kaptak. A negatív kontrol csoport 5 tagja hasonló, de vírusmentes kezelést kapott. 60 nap elteltével a túlélőket feláldoztuk, szerveiket IIV jelenlétére vizsgáltuk.

Mikroszkópos vizsgálatok

A kísérleti állat-fertőzésben feláldozott tücskök és szakállas agámák szerveit fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. Az ezekből készült metszeteket HE festéssel, *in situ* hibridizációs (ISH) és immunhisztokémiai (IHC) eljárással vizsgáltuk. Az ISH

módszerhez, a fő kapszidprotein génhez (MCP) kötődő, digoxigeninnel jelölt próbát hoztunk létre. A szakállaságama izolátum (1. táblázat: Ir.iso.3) felhasználásával poliklonális ellenanyagot termeltettünk nyulakban az IHC módszerhez.

Az AdV izolátumok esetében a szövettanészeti felülúszóból készült negatív kontraszt festésű mintákban JEM-1011 típusú transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével mutattuk ki a vírus partikulumokat.

Molekuláris biológiai technikák

Állati minták homogenizátumaiból és vírusfertőzött szövettanészeti felülúszókból történt a vírus-nukleinsav kivonása. Az AdV izolátumok DNS-ének emésztett fragmentumait véletlenszerű molekuláris klónozással Phagemid pBluescript® II KS(+/-) vektorba juttattuk szekvencia meghatározás céljából.

A paramyxovírusok RNS-éből RT-PCR-rel, míg a DNS vírusok esetében konvencionális PCR-rel erősítettünk fel géneket és génszakaszokat. Az AdV esetén 6 szakirodalomban leírt és 38 újonnan tervezett, IIV esetén 14 irodalmi és 57 újonnan tervezett, míg PMV esetén 10 szakirodalmi és 12 új primert alkalmaztunk.

Amennyiben a PCR termékek közvetlen DNS-szekvenálása nem volt kivitelezhető vagy bizonytalan eredményt adott, úgy ezek tompa-végű klónozását pJET PCR Cloning Kit (Fermentas) segítségével végeztük el. Gélből kivágott és tisztított (Invisorb Spin DNA Extraction Kit) PCR amplikonok és kittel (Qiaprep) tisztított plazmid preparátumok nukleotid szekvenciájának meghatározásához a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.1.1-et alkalmaztunk. Szekvenáláshoz a PCR-hez használt primereket vagy plazmidok esetében a pJET-F és -R primereket, valamint a T3 és T7 primereket alkalmaztuk. A futtatást ABI prism 310 automata DNS szekvenáló gépen magunk végeztük, vagy szolgáltató cégekkel végeztettük. A nyert szekvenciák javítására és szerkesztésére a STADEN Package version 2003.0 programjait használtuk, majd homológia kereső programok segítségével egybevetettük ezeket a GenBankban lévő adatokkal. A különböző szekvenciák pozicionális illesztését a BioEdit program ClustalW algoritmusával végeztük. Filogenetikai számításokhoz a PHYLIP programcsomagot és TOPALi v2.5 platform MrBayes programját használtuk. Az IIV és PMV szekvenciák esetében az esetleges rekombinációs helyeket a SimPlot for Windows v.3.5.1 programmal derítettük fel. Az IIV izolátumok exonukleáz és DNS polimeráz származtatott aminosav szekvenciája alapján a fehérjék másodlagos szerkezetét próbáltuk megállapítani a GENTle v1.9.4. és SWISS-MODEL programok segítségével és hasonlítottuk a CIV homológ fehérjéihez.

Nyolc IIV izolátum (1. táblázat) MCP génjének azonosnak bizonyult szekvenciái alapján terveztünk TaqMan qPCR-t az IIV-ok kimutatására a Primer Express v.3.0 program segítségével. A qPCR reakciókat StepOne™ PCR berendezésben futattuk és

érzékenységüket IIV izolátumok gélből tisztított MCP gén PCR termékével (Ir.iso.7) és plazmidba épített MCP gén részletével (Ir.iso.4) határoztuk meg és standardizáltuk.

Eredmények

Adenovírusok kimutatása és jellemzése

Adenovírusokat tudtunk kimutatni PCR-el 25 pikkelyes hüllőből (4 gyík és 1 kígyófaj), és ezek közül a két mérgegyík faj három egyedéből sikerült a vírust szövettenyészetben is izolálni. Ezek az első leírt gyík-adenovírus izolátumok. Ebből a két gazdafajból két különböző típusba sorolható vírus volt kimutatható, melyek minden esetben fajspecifikusan fordultak elő. A gilából származó vírus a gyík-AdV-1 (LAdV-1), míg a mexikói viperagyík vírusa a gyík-AdV-2 (LAdV-2) nevet kapta. Ezek mellett egyazon agamid AdV típus 5 variánsát és egy varánusz-AdV-t találtunk, valamint a kígyó-AdV-2 típusát tudtuk kimutatni. A különböző vírusok DNS polimeráz-gén szakaszaiban a G+C nukleotidok aránya kiegyenlített volt: 42,5-58,3%. Törzsfarekonstrukciós számítások alapján valamennyien az *Atadenovirus* nemzetség tagjainak bizonyultak.

A két gyík-AdV izolátum részleges genomszekvenálása során a LAdV-1 esetében 13.4 kb összesített hosszúságú 3 szegmenst, míg a LAdV-2 estén 17.4 kb összhosszúságú 2 szegmenst határoztunk meg, 43,3% és 43,8% G+C tartalommal. A két vírus homológ génjei nagyfokú hasonlóságot mutattak egymáshoz (81-99% és 77-99% a nukleotid és aminosav szekvenciákat tekintve), valamint genomszerkezetük is nagyrészt megegyezett, csupán néhány esetben mutatkozott különbség a gének és a gének közötti szakaszok (IGR) hosszában. E gyík-adenovírusok legközelebbi rokona bizonyult a ma ismert genomú AdV-ok közül a kígyó-AdV-1. Legfőbb különbségnek tekinthető, hogy míg a SnAdV-1 egyetlen fiber-gént tartalmaz, addig a LAdV-ok esetén egy rövidebb (fiber-1) és egy hosszabb (fiber-2) gén követi egymást a homológ genomrészben, s a jelek szerint mindkető működő fehérjét kódol. Ezek az első atadenovírusok, melyekben több mint egy fiber-gén jelenléte ismert.

Iridovírus vizsgálatok

A kidolgozott qPCR érzékenynek és specifikusnak bizonyult; a mérésen belül és mérések közötti reprodukálhatóságra vonatkozó variációs koefficiens értékek megfelelőek voltak. IIV izolátumokkal és azok génszakaszaival végzett érzékenységi vizsgálatban a qPCR a korábbi két-körös nPCR-rel azonos érzékenységűnek mutatkozott és képes volt akár 1 kópia/μl DNS koncentráció kimutatására is. A szövettenyészetben való izolálás érzékenysége 10^2 - 10^3 -szor alacsonyabbnak mutatkozott.

A gyíkokból és izeltlábú gazdákból (1. táblázat) származó IIV izolátumok genetikai összehasonlítását 15 génszakasz (köztük 8 teljes gén) szekvenciái alapján végeztük el. A legtöbb esetben a vizsgált génszakaszok valamennyi izolátumban megegyeztek, s csupán az exonukleáz és a DNS polimeráz génekben mutatkozott alacsony (0,1-0,4%) fokú variancia. Ezen szekvenciaelemzés alapján valamennyi izolátumot a tücsök-iridovírus (GbIV) egy variánsának tekintettünk. Meglepően nagyfokú különbséget mutattunk ki e GbIV variánsok és a típusfaj, a CIV egyes homológ génjeinek szekvenciái között (2. táblázat). Rekombinációs pontokra bukkantunk két helyen, ahol feltehetőleg más csoportba tartozó IIV-től átvett genomszegmensek jelennek meg.

2. táblázat Hasonlóság (%) a IIV izolátumaink (GbIV) és a CIV homológ génjei között

Gén:	Exonuk.	Polim.	ATPáz	„Viral Antibiotic Peptide” gén és szomszédos gének					Ligáz	Tim. szint.	„Major Capsid Protein” gén szomszédos gének				I.E. prot.
ORF	012L	037L	075L	155L	157L	159L	160L	161L	205L	225R	orf011 WIV	274L	281R	282R	393L
DNS	91,2	97,0	97,8	97,4	95,4	54,5*	73,6	99,3	95,8	95,7	43,8*	94,5	84,9	98,1	97,8
FEHÉRJE	91,6	96,7	100	99,2	98,0	46,0*	39,6	100	97,2	92,4	NA	95,5	78,8	97,6	96,3

*rekombinációs helyek mutathatók ki

A tücsök fertőzési kísérletekben nem sikerült jelentős különbséget kimutatni az egyes izolátumok között. A qPCR segítségével megállapítottuk, hogy a „súlyosan” fertőzött (patently infected) tücskökben a vírus-DNS kópiaszáma 10^7 - 10^{10} /mg jóval meghaladja a rejtett „szubklinikai” fertőzöttségű (covert infection) egyedekben fellelhető kópiaszámot (10^2 - 10^4). A „súlyosan” fertőzött állatok aktivitásának növekedése, a potrohuk teriméjének növekedése, boncolás során pedig a zsírtestjük irizáló színe volt megfigyelhető. Ezekből a magas qPCR kópiaszámú egyedekből ISH módszerrel is kimutatható volt a vírus-nukleinsav. Az esetlegesen mutatkozó virulencia különbségek nem tekinthetők szignifikánsnak, mivel ugyanazzal az izolátummal végzett megismételt fertőzési kísérletek a standardizált feltételek ellenére is jelentősen eltérő eredményt adtak.

Az agáma fertőzési kísérlet során egyetlen fertőzött állat sem mutatott klinikai tünetet a kísérlet alatt. Táplálékfelvételük általában megfelelt az elvártnak. Az „A5” jelzésű állat étvágytalanság, levertség tünetei mellett a 16. napon elpusztult. A kórbonctani vizsgálat során látott egyetlen kóros eltérés az enyhén sárgás, törékeny máj volt, ahol a kórszöveti vizsgálat glikogén-felhalmozódás és lipidosist mutatott ki. Valamennyi fertőzött állat száj- és kloaka-tamponjából kimutatható volt a vírus az első héttől kezdődően, ugyanakkor a kontrol csoport tagjaiból nem. A kísérlet végén eutanizált, fertőzött agámák közül mindössze kettőben (A1, A4) volt kimutatható az

elhullott állathoz hasonló májelváltozás, más kóros elváltozást nem tapasztaltunk. A direkt víruskimutatás (részben általunk kifejlesztett) különböző módszerei – izolálás, nPCR, qPCR, ISH, IHC, EM – közül az első három bizonyult használhatónak az agámák különféle szerveinek a vizsgálatában. A vírusizolálás és a PCR-ek sikeresen kimutatták az IIV jelenlétét a fertőzött állatok különböző szerveiben, míg a negatív csoport állataiban nem reagáltak. Sem ISH, sem EM módszerrel nem sikerült a vírus nyomára bukkani a fertőzött állatokban, az IHC módszer pedig aspecifikusan is reaktívnak bizonyult, így az értékeléshez nem alkalmaztuk.

Paramyxovírus vizsgálatok

A görög teknősből származó PMV izolátum (THer-GER99) esetében csupán az L-génből sikerült specifikusan DNS-t felerősíteni és annak szekvenciáját meghatározni. A többi pikkelyes hüllő „izolátumnál” ez mindhárom vizsgált gén esetében sikeres volt. Két gyík-izolátum (Xeno-USA99; Var-GER95) L-, HN- és U-gén szekvenciái egymással megegyeztek, míg a harmadik gyík-izolátum esetében (Igu-GER00), annak HN-génje egyezett kígyó izolátumokéval (Pyth-GER01, Crot-GER03). A filogenetikai számítások azt mutatták, hogy a valamennyi általunk vizsgált és GenBank-ból lehívott hüllő-PMV szekvencia a *Ferlavirus* nemzetségbe sorolja ezeket a vírusokat. A nemzetségen belül a görög teknős-vírus egy ősi leágazásként szerepel, s ezt követően a pikkelyes hüllők ferlavírusai három monofiletikusan elkülönülő csoportba (A, B és C) sorolhatók.

A diagnosztikai felmérő vizsgálat során 28 (a vizsgált egyedek 27,5%-a) kígyóból származó, összesen 50 (a vizsgált szervek 24,6%-a), minta bizonyult pozitívnak, ezek közül 38 esetben meghatároztuk a felerősített génszakasz nukleotidsorrendjét. A pozitív minták közül 47 esetben elvégzett HN-gén PCR csupán 16 alkalommal (34%) adott pozitív eredményt, a vírus izolálása pedig mindössze 3 (10,7%) esetben sikerült. Azon két esetben, amikor a direkt szekvenciák alapján feltételezhető volt, hogy azok több egymástól eltérő szekvenciájú PCR termék egyidejű olvasásából adódhatnak, e termékeket molekuláris klónozással választottuk szét, és az egyes klónok nukleotidsorrendjét ismét meghatároztuk. Élő állatoknál a 46 vizsgáltból 12 esetben sikerült a tampon-mintából PMV-t kimutatni (26,1%). A PMV pozitívnak bizonyult elhullott kígyóknál a szervek szerinti megoszlás a következőképpen alakult: bél (11 poz./15 vizsg.), tüdő (11/13), vese (10/14), máj (3/5), légcső (2/4) és nyelőcső (1/1), míg a néhány lép (0/2), vér (0/1) és agy (0/1) minta negatív volt. Ezek mellett egy leopárdteknős 12 megvizsgált szerve közül a máj, a szív, a vékonybél és a kloákatampont bizonyult PMV pozitívnak.

Tizenhárom különböző szekvencia-variáns volt megkülönböztethető a vizsgált kígyó-ferlavírus L-gén szakaszokon, melyek a squamatid ferlavírusok A csoportjába (7

variáns) vagy annak B csoportjába (8 variáns) sorolódtak. Nyolc szekvencia megegyezett korábban leközöltekkel, öt variáns új volt. Számos esetben azonos variánst találtunk egyazon állat különböző szerveiben, vagy egy állomány különböző egyedeiben. De arra is számos példa akadt, hogy több ferlavírus egyidejű jelenléte volt kimutatható egy kígyó állományon, egy kígyó egyeden vagy akár annak egy szervén belül. A súlyos légzőszervi tünetekkel elhullott leopárdeknős PMV pozitív szervei szintén 4 különböző „szekvencia variánst” képviseltek. Közülük csak három (szív, vékonybél, máj) volt olyan hasonlóságú egymáshoz, hogy azok ugyanazon vírushajtóból származtathatók legyenek. Tehát legalább 2 különböző PMV fajjal volt fertőzött a teknős, amelyek nem is a görög teknős izolátummal (THER-GER99) mutattak rokonságot, hanem a squamatid PMV-ekkel.

Megbeszélés

Adenovírus vizsgálatok

A konszenzus PCR segítségével 6 szakállas agáma, 3 mexikói viperagyík, 2 gila, 1 smaragdvaránusz és 1 áspisvipera esetében mutattunk ki atadenovírusokat, melyek közül a rövid, részleges polimeráz-gén szekvenciája alapján kettő eddig ismeretlen típus volt, 4 pedig korábban leírtak új variánsa. Valamennyi itt leírt AdV a *Atadenovirus* nemzetség tagjának bizonyult, a vizsgált génszakasz G+C tartalma (42,5%-58,3%) kiegyensúlyozott volt. Mindezen új ismeretek támogatják az atadenovírusok pikkelyes hüllőkből eredeztetésének és velük párhuzamos (ko)evolúciójának az elméletét.

Vizsgálataink kezdetéig csupán kígyókból származó hüllő-AdV izolátumok voltak ismertek. Két élő gila tampon-mintáiból (LAdV-1) és egy elhullott mexikói viperagyík szerveiből (LAdV-2) izolált két vírus típus, így az első gyík-adenovírusnak tekinthető. Ezeket az izolátumokat külföldi együttműködő kollégák rendelkezésére bocsátottuk további vizsgálatok céljából (pl. háromdimenziós fehérje-szerkezeti vizsgálatok). Mi, Stuttgartban, a genomszekvenciájuk meghatározását kezdtük el, szoros együttműködésben az MTA ÁOTKI-val Budapesten.

Az általunk vizsgált genomrészekben a LAdV-ok G+C tartalma alacsonyabb (43,3% és 43,8%) volt, mint a kígyó-AdV-1 (SnAdV-1) homológ genom-részeiben (50,2%). Elsőként írtuk le egynél több fiber-gén jelenlétét atadenovírusokban. Ilyen, korábban csak a *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* és *Ichtadenovirus* nemzetség bizonyos tagjaiban volt ismeretes. A fiberek származtatott aminosav sorrendjének elemzése azt mutatta, hogy mindkét LAdV típus mindkét fibere valószínűleg működőképes, mivel a farki részükön megtalálhatóak a megőrzött motívumok, valamint ezt támogatták a Madridban végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok is. Annak az

eldöntése, hogy a két fiber jelenléte kapcsolatba hozható-e a vírusok új gyíkfajokhoz történő adaptációjával, további vizsgálatokat igényel.

Iridovírus vizsgálatok

Az IIV-ok fontos kóroki tényezők a rovartenyészetekben, valamint a terráriumi hullók potenciális kórokozóiként is számon tartják őket. Ezért éreztük fontosnak egy megbízható, érzékeny, ugyanakkor kontaminációra kevésbé hajlamos módszer kidolgozását IIV-ok széles gazdakörből való kimutatására. A kifejlesztett valós-idejű PCR a korábban használt két-körös nPCR-rel azonos érzékenységű, ugyanakkor kevesebb munkafázissal, gyorsabban szolgáltat informatívabb eredményt.

A különböző gazdafajokból származó IIV izolátumok (1. táblázat) restriktív fragmens-eloszlásuk és hat gén teljes, valamint hat gén részleges nukleotidszekvenciája alapján egymással megegyeznek. További két génben elenyésző különbség mutatkozott (max. 0,4%) az egyes izolátumok között. Az MCP-gén szekvenciáját tekintve izolátumaink azonosak voltak a korábban leírt tücsök-IIV (GbIV) izolátumokkal, így annak variánsainak tekintettük őket. Ugyanakkor jelentős különbségeket is kimutattunk a GbIV variánsok és a CIV homológ génei között (2. táblázat). Két génszakaszon rekombinációs helyekre bukkantunk, továbbá egy harmadik gén esetében (DNS polimeráz) a származtatott fehérje egyik aktív központjának (katalitikus DEDDY domén) mutattunk rá feltételezett konformációváltozására. Ezen jelentős különbségekre alapozva javasoljuk, hogy a GbIV-t célszerű lenne külön vírusfajnak tekinteni. Az emellett tapasztalt alacsony pontmutációs arány pedig arra enged következtetni, hogy a GbIV egy nemrég történt gazdafajváltás során jött létre a CIV-ből.

A tücsökön végzett kísérletek során három IIV izolátum (1. táblázat) fertőzőképességét kívántuk összevetni. Eredményeinkből az volt látható, hogy az egyes izolátumok között mutatkozó virulencia különbség nem tekinthető szignifikánsnak, mivel ugyanazzal az izolátummal végzett megismételt fertőzési kísérletek a standardizált feltételek ellenére is jelentősen eltérő eredményt adhatnak. Megállapítottuk, hogy az alacsony kópiaszámú, ún. „rejtett” fertőzések aránya meglepően alacsony minden izolátum és hőmérséklet esetén, ami egybecseng a korábbi még nem standardizált fertőzési kísérletünk eredményével.

A szakállas agámákon végzett IIV fertőzési kísérlet során nem sikerült a Koch posztulátumokat igazolni. Egyetlen elhullott egyed lesoványodása kivételével (A5), a fertőzött agámák nem mutattak semmilyen klinikai tünetet a kísérlet alatt. A kórbonctani vizsgálat során látott egyetlen kóros eltérés: glikogén-felhalmozás és lipidosis a májban, feltehetőleg toxikózis következményei, amihez hasonló irodalmi adatok szerint a CIV is kivált egerekben. Valamennyi fertőzött állat száj- és kloaka-

tamponjából kimutatható volt a vírus jelenléte az első héttől kezdődően, ugyanakkor a kontrol csoport tagjaiból nem. A vírusizolálás és a PCR-ek sikeresen kimutatták az IIV jelenlétét a fertőzött állatok különböző szerveiben, míg a negatív csoport állataiban nem reagáltak. A vastagbélben, illetve a GI traktus egyéb részein mért magas vírusrészlet (a 2 hetes növényi diéta dacára) az ott maradt fertőzött tücskökből származó maradványnak tekinthető. Sajnos sem ISH, sem EM módszerrel nem sikerült a vírus replikációját a szövetekben igazolni. Az A5 számú állat elhullása nem volt egyértelműen összefüggésbe hozható IIV fertőzéssel, de szerveiben a vírus mind izolálással, mind PCR módszerekkel kimutatható volt, ami a virémiára utal.

Paramyxovírus vizsgálatok

Kígyókban ezidáig csupán óriáskígyókból, siklófélekből, mérgessiklókból és viperafélekből írtak le paramyxovírusokat. A beszámolóink az első boasikló-ferlavírus leírást nyújtja, emellett szintén elsőként közöl genetikai adatokat varánusz, leguán és bütykösgyík, valamint teknős eredetű PMV-ből. Eredményeink további bizonyítékként szolgálnak a *Paramyxovirinae* alcsaládon belül, a Kurath által javasolt *Ferlavirus* nemzetség létjogosultságához, amelyben a pikkelyes hüllők (squamata) vírusai gazdafajtól függetlenül, a görög teknős-PMV izolátumtól azonban jól elkülönülő csoportokban helyeződnek. Ez a teknős-PMV egy ősi leágazást képvisel, melyben vizsgálataink tanulsága szerint még nincs jelen a szünapomorf tulajdonságként a pikkelyes hüllő-ferlavírusokra jellemző U-gén. A korábban nem egyértelműen definiált squamatid ferlavírusok csoportjainak (A és B) módosítására tettünk javaslatot, s két újabb, az eddig ismert kígyó-izolátumoktól jelentősen eltérő kígyó-PMV képviselővel, egy újabb csoporttal (C) is bővítettük azt. Ez a csoportbeosztás alapját képezheti a ma még nem definiált vírusfaj beosztásnak az új nemzetségben belül.

Az izolátumokkal végzett munka eredményeire alapozva, a legérzékenyebbek bizonyult L-génre tervezett két-körös RT-PCR-t tudtuk alkalmazni elsődleges diagnosztikai módszerként a kígyókból (és egy leopárdteknősből) végzett diagnosztikai PMV-felmérő vizsgálatok során. A pozitívnak talált kígyók egy részében jellegzetesnek vélt tüneteket figyeltek meg, míg másoknál csak az állományi kórelőzményi adatok keltettek gyanút PMV fertőzésre. A beteg, elhullott és az egészséges állatokban mért előfordulási gyakoriság megegyező volt. Vizsgálataink eredményeképp először írtuk le több ferlavírus típus együttes előfordulását egy populáción, ill. egy egyedben belül számos kígyó állományban és egy tüdőgyulladásos leopárdteknősben. Ez utóbbi esetben, feltételezésünk szerint, a squamatid PMV-ok egy legyengült immunrendszerű „specifikus gazdában”, s nem primer kórokozóként voltak jelen, a pikkelyes hüllő ferlavírusok eddig is ismert széles gazdaspektrumát tovább bővítve.

Új tudományos eredmények

1. Két új hüllő-adenovírus típus, 4 új agamid-AdV variáns kimutatása, melyek valamennyien az *Atadenovirus* nemzetség tagjai. Újabb támogató adatok a koevolúciós hipotézis és az atadenovírusok pikkelyes hüllőkből eredeztetésének elmélete mellett.
2. Az első (két) gyík-AdV sikeres izolálása, szaporítása, részleges genom-szekvencia meghatározása. Két fiber-gén jelenléte; ezek első leírása atadenovírusokban.
3. Új diagnosztikai módszerek (qPCR, ISH) kidolgozása II. csoportbeli gerinctelen iridovírusok (IIV) kimutatására és alkalmazásuk kísérleti állat-fertőzésekben.
4. Nyolc gén és hét génszakasz szekvenciái alapján (>14 kb) a különböző állatokból (gyíkok, skorpió, tücsök) származó IIV izolátumok alig/nem különböznek egymástól, ugyanakkor a típusfajként számon tartott CIV-től mutatott eltérés sokkal jelentősebb mint az korábban ismert volt. Egyetlen IIV típus széles elterjedtségének kimutatása Németországban.
5. Szakállas agáma kísérletben az IIV fertőzéssel korábban kapcsolatba hozott tünetek nem bizonyultak reprodukálhatónak. A vírus szóródása igen, de szaporodása nem volt kimutató a különböző szövetekben.
6. Korábban molekulárisan nem jellemzett hüllő-paramyxovírus (PMV) izolátumok *Ferlavirus* nemzetségbe sorolása. Új csoport („C”) és új csoporthatárok („A” és „B”) kijelölése. Az első adatok teknős PMV-ből, amely ősi típus, és benne U-gén nem volt kimutatható.
7. „A” és „B” csoportú PMV variánsok magas prevalenciája (27,5%) kígyótenyészetekben. Több típussal való egyidejű fertőzöttség első kimutatása kígyókban, valamint egy leopárd teknősben.

Tudományos közlemények

Az értekezés témakörében, lektorált folyóiratban

Weinmann, N., Papp, T., Alves de Matos, A.P., Teifke, J.P., Marschang, R.E.: **Experimental infection of crickets (*Gryllus bimaculatus*) with an invertebrate iridovirus isolated from a high-casqued chameleon (*Chamaeleo hoehnelii*),** *J. Vet. Diag. Invest.* 19, 674-679. 2007.

Marschang, R.E., Papp, T., Frost, J.W.: **Comparison of paramyxovirus isolates from snakes, lizards and a tortoise,** *Virus Res.* 144, 272-279. 2009.

Papp, T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján, G.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterisation of new adenoviruses found in reptiles, and the first successful isolation of a lizard adenovirus,** *Vet. Microbiol.* 134, 233-240. 2009.

Papp, T., Pees, M., Schmidt, V., Marschang, R.E.: **RT-PCR diagnosis followed by sequence characterization of paramyxovirus infections in clinical samples from snakes reveals concurrent infections within populations and/or individuals,** *Vet. Microbiol.* 144, 466-472. 2010.

Papp, T., Seybold, J., Marschang, R.E.: **Paramyxovirus infection in a leopard tortoise (*Geochelone pardalis babcocki*) with respiratory disease,** *J. Herpet. Med. Surg.* 20, 64-68. 2010.

Abbas, M.D., Marschang, R.E., Schmidt, V., Kasper, A., Papp, T.: **A unique novel reptilian paramyxovirus, four atadenoviruses and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany,** *Vet. Microbiol.* 150, 70-79. 2011.

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, 551-561. 2011.

Papp, T., Gál, J., Abbas, M.D., Marschang, R.E., Farkas, S.L.: **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,** *Vet. Microbiol.* (in press) DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.08.010, 2012.

Nem az értekezés témakörében, lektorált folyóiratban

- Papp, T., Gubányi, A., Rácz, G.: **Establishing microsatellite analysis for locally endangered populations of root vole (*Microtus oeconomus*)**, *Acta Zool. Sci. Hung.* 46, 259-264. 2000.
- Sainsbury, A.W., Adair, B., Graham, D., Gurnell, J., Cunningham, A.A., Benkő, M., Papp, T.: **Isolation of novel adenovirus associated with splenitis, diarrhoea, and mortality in translocated red squirrels (*Sciurus vulgaris*)**, *Verh. ber. Erkr. Zootiere* 40, 265-270, 2001.
- Graham, D.A., Calvert, V., Benkő, M., Curran, W., Wylie, M., Snodden, D.A., Moffet, D.A., Papp, T., Adair, B.M., Smyth, J.A.: **Isolation of bovine adenovirus serotype 6 from a calf in the United Kingdom**, *Vet. Rec.* 156, 82-86. 2005.
- Marschang, R.E., Gleiser, C.B., Papp, T., Pfitzner, A.J.P., Böhm, R., Roth, B.N.: **Comparison of eleven herpesvirus isolates from tortoises using partial sequences from three conserved genes**, *Vet. Microbiol.* 117, 258-266. 2006.
- Poschetto, L.F., Ike, A., Papp, T., Mohn, U., Böhm, R., Marschang, R.E.: **Comparison of the sensitivities of noroviruses and feline calicivirus to chemical disinfection under field-like conditions**, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5494-5500. 2007.
- Gál, J., Landauer, K., Demeter, Z., Palade, E.A., Ursu, K., Bálint, Á., Papp, T., Farkas, S.L.: **Amursikló (*Elaphe schrenki*) vírus okozta savós-fibrines tracheitise és következményes fulladása**, *Magyar Állatorvosok Lapja* 130, 421-424. 2008.
- Marschang, R.E., Papp, T., Ferretti, L., Hochscheid, S., Bentivegna, F.: **Detection and partial characterization of herpesviruses from Egyptian tortoises (*Testudo kleinmanni*) imported into Italy from Libya**, *J. Zoo Wildl. Med.* 40, 211-213. 2009.
- Marschang, R.E., Papp, T.: **Isolation and partial characterization of three reoviruses from lizards**, *J. Herpet. Med. Surg.* 19, 13-15. 2010
- Alves de Matos, A.P., Caeiro, M.F., Papp, T., Matos, B.A., Correia, A.C., Marschang, R.E.: **New viruses from *Lacerta monticola* (Serra da Estrela, Portugal): further evidence for a new group of nucleo-cytoplasmic large deoxyriboviruses (NCLDVs)**, *Microsc. Microanal.* 17, 1-8. 2011.
- Stumpf, P., Failing, K., Papp, T., Nazir, J., Böhm, R., Marschang, R.E.: **Accumulation of low pathogenic avian influenza viruses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)**, *Avian Dis.* 54, 1183-1190. 2011.

Köszönetnyilvánítás

Rengeteg embernek tartozom köszönettel azért, hogy ez a dolgozat és velem együtt magam is idáig jutottunk. A külföldi kollégáknak és segítőknek az angol nyelvű disszertációban és tézisekben fejezem ki hálámat. Témavezetőm, *Dr. Rachel E. Marschang* nevét azonban itt is ki szeretném emelni. Neki nem csupán a témát, a szakértő segítséget, a kutatási pénzt és a külföldi állást köszönhettem, hanem annál sokkal többet: folyamatos baráti támogatást. Remélem jó kapcsolatunk a jövőben is fennmarad.

Az itthoni témavezetőm, *Prof. Dr. Harrach Balázs* és konzultánsom, *Prof. Dr. Benkő Mária* nevét is ki kell emelni. Nekik köszönhetem a virológiában való elmélyülés lehetőségét, valamint hogy az MTA ÁOTKI (ma: MTA ATK ÁOTI) második otthonommá válhatott. E dolgozat javításakor is elsősorban az ő segítségükre támaszkodtam. Természetesen része volt az otthonosság érzésében a sok kedves *régi és mai kollégának*, akikre szeretettel gondolok. Közülük *Dr. Farkas Szilviával*, *Pénzes Judittal*, *Dr. Doszpoly Andorral*, és *Dr. Kaján Győzővel* együttműködésben végzett munkák is részét képezik az itt bemutatott dolgozatnak.

Számos *barát és ismerős* (elsősorban a stuttgarti magyarok köréből) tette a külhonban eltöltött időt számomra még tartalmasabbá és emlékezetesebbé. Köszönöm ezt nekik! S köszönöm azoknak az itthon maradt barátoknak is a biztatást, akikkel nem szakadt nem a kapcsolat a kint töltött időszak alatt sem. Meg az újaknak, akiket hazaérkezés óta ismertem meg, s közülük is különösen Egynek!

Az Állatorvos-tudományi Egyetem (ma: SZIE ÁOTK) oktatóira is hálával gondoltam külföldön, amikor azt tapasztaltam, hogy a Budapesten megszerzett elméleti képzettség a nyugati egyetemeken végzett kollégákénál sok esetben átfogóbbnak bizonyult.

A sárospataki *Alma Mater*-nek is köszönöm, hogy gazdagon megrakott tarisznyát akasztott a nyakamba. Különösen *Sipos Tanár Úr* órán kívüli foglalkozásai hagytak kitörölhetetlen nyomot bennem. Talán ő is felelőssé tehető azért, hogy az élettudományi pályát választottam. Köszönjük Neki a tudás- és emberség-cseppeket. Isten éltesse, anekdotázós jó kedvben, még sokáig!

Legvégül, de legnagyobb köszönet illeti *családomat*! *Szüleim* értem hozott áldozatait, szeretetüket. Nekik és a család többi tagjának a támogatást soha, semmivel nem fogom tudni kellően meghálálni. De majd igyekezni fogok ezt továbbadni...