

## Szakmai zárójelentés

Az OTKA D 48647 számú,

**"Állategészségügyi és közegészségügyi jelentőségű vírusok molekuláris diagnosztikája"**

című Posztdoktori Kutatási Ösztöndíj támogatásával,

2004.-2007. időszakban végzett kutatómunkáról

Az OTKA posztdoktori támogatás keretében, virológiai témájú kutatásaimat a Szent István Egyetem (Szie), Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékén végeztem. Kutatásaim témája egyrészt a korábban megkezdett vizsgálatok (pl. flavivírusok, a mézelő méh vírusfertőzései) folytatása volt. Emellett olyan új kutatási témákba is belefogtam, amelyek gyakorlati, állategészségügyi problémaként merültek fel (pl. avian nephritis vírus, kacsahepatitisz vírus, PRRS vírus), és tudományos igényű vizsgálatokat tettek indokolttá.

A kutatások gyakorlati lebonyolítása során a hazai és külföldi partner-intézményekkel és kutatócsoportokkal korábban kialakított és hatékony együttműködést tovább folytattam, valamint újabb, elsősorban nemzetközi kutatási kapcsolatokat építettem ki.

Mindegyik, a kutatási keretszerződésben nevesített részterületen végeztem vizsgálatokat, és a vizsgálatok a témák nagyobbik részében tudományosan jelentős (publikált vagy publikációra előkészített) eredményekre vezettek. A kutatások kezdeti szakaszában elért eredmények alapján egyes rész-témák alaposabb és kiterjedtebb vizsgálatára került sor. Vannak olyan témák is, ahol az eddig elért eredmények önmagukban nem elegendőek közlemény megjelentetéséhez, ezért ezek esetében további vizsgálatokra lesz szükség. Egyes, a pályázat benyújtásakor (2004 tavaszán) tervezett vizsgálatokat később technikai és finanszírozási okokból halasztani vagy módosítani kellett. Akadt olyan téma is, amelyik esetében a kezdeti vizsgálatokban részt vettem, viszont később – kapacitási és hatékonysági megfontolásokból – más kutatók (főként Ph.D. hallgatók) vették át a vizsgálatok gyakorlati kivitelezését.

A vizsgálatok költségeinek fedezésére a posztdoktori ösztöndíj által nyújtott támogatáson túl további forrásokat (pl. OTKA F43155, külföldi partner kutatási támogatása) is felhasználtam.

A zárójelentésben bemutatott kutatási eredményekhez kapcsolódó zárójeles irodalmi hivatkozások a jelentés közleményjegyzékben szereplő, az eredményeket részletesen ismertető publikációk sorszámaira utalnak.

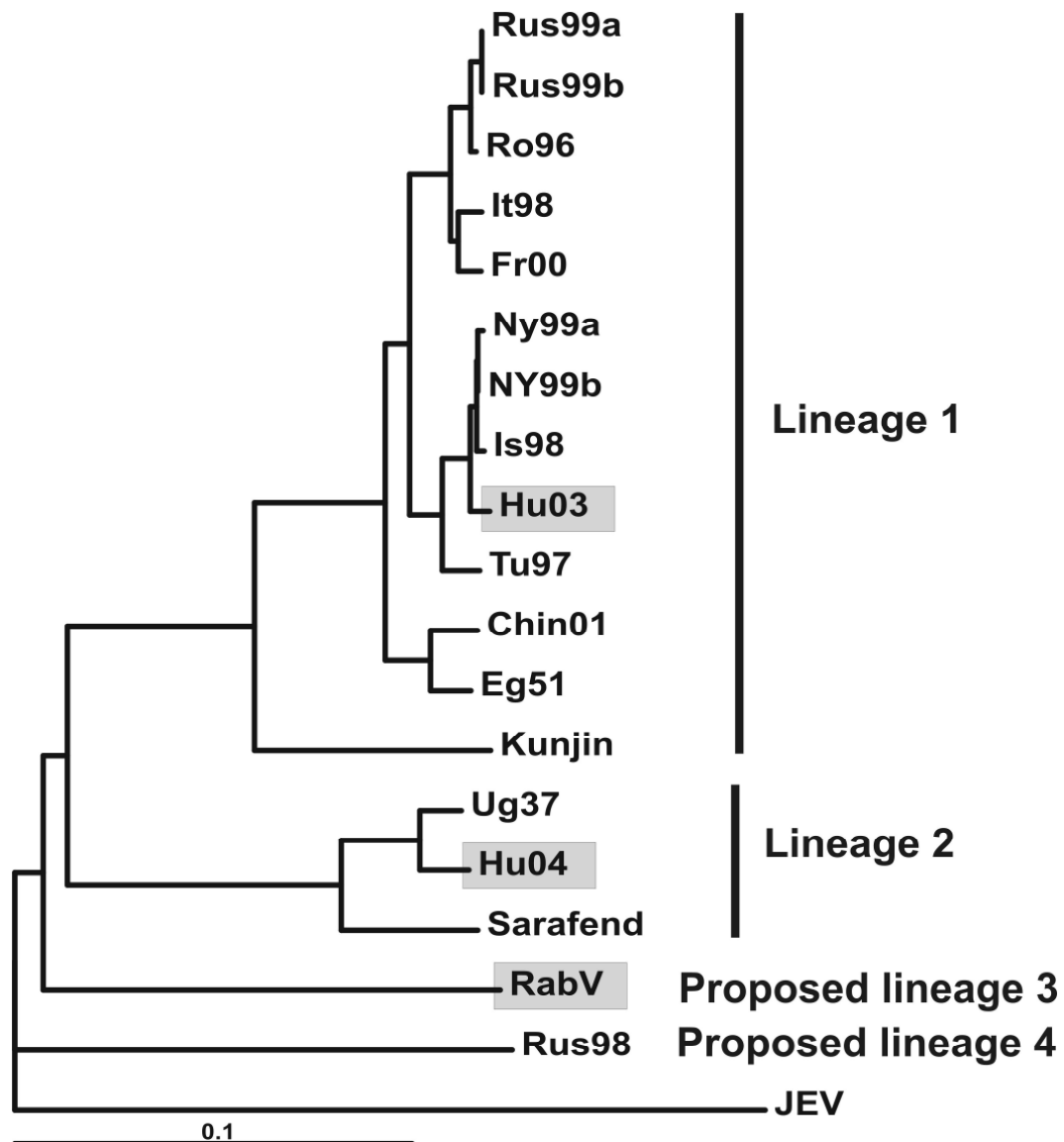
## **I. A nyugat-nílusi vírus magyarországi előfordulásának vizsgálata és a törzsek genetikai jellemzése**

A nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV) világszerte előforduló, ízeltlábú vektorok (elsősorban szúnyogok) által terjesztett kórokozó. A vírus főként madarakban, lovakban és emberekben idézhet elő, olykor súlyos agyvelőgyulladásal járó fertőzéseket. A kórokozót 1999-ben behurcolták az Egyesült Államokba, ahol az óvilágban tapasztaltakhoz képest súlyosabb járványokat okozott a fogékony populációkban. Ezért fokozott tudományos érdeklődés tapasztalható a WNV vizsgálata terén. Magyarországon a kórokozó előfordulása több évtizede ismert, viszont korábban nem tapasztaltak tünetekben megnyilvánuló WNV fertőzéseket az országban. Idegrendszeri tünetekkel és fokozott elhullásokkal járó járvány tört ki egy hazai libaállományban 2003 őszén. Molekuláris biológiai módszerek (reverz-transzkripció polimeráz láncreakció [RT-PCR], nukleotid szekvencia meghatározás) segítségével a WNV nukleinsavát mutattam ki az elhullott madarak agyvelő mintáiból (10). Meghatároztam a vírustörzs teljes genomszekvenciáját és filogenetikai összehasonlításnak vettem alá (17). Megállapítottam, hogy a törzs nagy fokú hasonlóságot mutat az Egyesült Államokba 1999-ben behurcolt, járványos emberi és állati megbetegedéseket okozó törzssel, valamint egy 1998-ban, Izraelben izolált törzssel (1. ábra). A járványtani adatok feldolgozása alapján valószínűsíthető, hogy a törzset 1998-ban, közép-Európában kelt, és ősszel délre vonuló gólyák hurcolták be Izraelbe. A 2003-ban Magyarországon kimutatott törzs valószínűleg annak a vírustörzsnek a leszármazottja, amely Izraelbe és az USA-ba behurcolásra került négy évvel korábban.

Újabb WNV esetek bukkantak fel 2004-ben a Körös-Maros Nemzeti Park területén élő héjájában (*Accipiter gentilis*). Meghatároztam a madaraktól vett mintákból kimutatott WNV törzs teljes genomszekvenciáját (17). Az eredmények alapján a vírustörzs jelentősen eltér a 2003-ban kimutatott hazai törzstől. A WNV-nek két genetikai vonalát írták le. Az első genetikai vonalhoz (lineage 1) világszerte előforduló törzsek tartoznak. A második genetikai vonalhoz (lineage 2) sorolt törzseket korábban csak Afrika Szaharától délre fekvő területeiről, illetve Madagaszkárból mutattak ki. A 2004-ben hazai vadmadaraktól kimutatott vírus a WNV lineage 2 vonalához tartozik (1. ábra). Ez az első eset, hogy ilyen genetikai vonalú vírus Afrikán kívül előfordult és tünetekben megnyilvánuló betegséget idézett elő.

A következő évben ismételt idegrendszeri megbetegedések fordultak elő a nemzeti park héjái között, valamint egy karvaly (*Accipiter nisus*) is megbetegedett. RT-PCR segítségével kimutattam a WNV nukleinsavának jelenlétét a madaraktól, valamint a vírustörzs laboratóriumi izolálására is sor került (32). A törzs részleges nukleotid-szekvencia

meghatározása alapján megállapítottam, hogy az megegyezik a 2004-ben kimutatott törzssel (99,9 % nukleotid hasonlóság).



**1. ábra:** WNV törzsek teljes genomszekvenciáinak neighbor-joining módszerrel végzett filogenetikai összehasonlítása segítségével készített törzsfá. A törzsek adatait az 1. táblázat tartalmazza. A szürke háttérrel kiemelt törzsek szekvenciáját saját kutatásaink során határoztuk meg.

A Debreceni Állategészségügyi Intézetben egy vírust izoláltak 2005 őszén, egy idegrendszeri tünetekkel járó betegségben elhullott anyajuhból. RT-PCR módszer segítségével igazoltam, hogy az izolátum nyugat-nílusi vírus (38). A vírustörzs részleges nukleotid-szekvenciájának vizsgálata arra utal, hogy a törzs gyakorlatilag megegyezik a 2004-ben és 2005-ben, vadmadaraktól kimutatott vírussal. Ez az első eset, hogy a WNV lineage 2 vonalához tartozó

vírustörzs által okozott fertőzést sikerült diagnosztizálni juh fajban. A juh tartási helye kb. 20 km távolságra található a vadmadár esetek helyszínétől, amely adat tovább valószínűsíti a járványtani összefüggést az esetek között.

A vírus ízeltlábú vektor-fajainak felmérése érdekében a 2005-ben vírusaktivitást mutató állattartó telepekről szúnyogmintákat gyűjtöttünk a Természettudományi Múzeum Állattára munkatársának közreműködésével. Összesen 6 fajhoz tartozó 887 egyedet vizsgáltam meg RT-PCR segítségével a vírus nukleinsavának kimutatása céljából. *Culex pipiens* szúnyogokból kimutattam a WNV jelenlétét.

Míg 2006-ban nem találtunk WNV okozta megbetegedéseket az országban, 2007 augusztusában és szeptemberében ismételt WNV aktivitást tapasztaltunk egyes alföldi területeken. A WNV nukleinsavát mutattam ki két dél-alföldi libaállományból. Az állatok mozgászavarokat mutattak, kórszövettani vizsgálatokkal Zenker-féle vázizom-dystrophia volt kimutatható bennük (43). A vírustörzs részleges nukleotid (nt) szekvenciája alapján nagyfokú hasonlóságot mutat (99,8% nt. hasonlóság) a 2004-ben és 2005-ben felbukkant hazai lineage 2 törzshöz. Idegrendszeri tüneteket mutató héjából, illetve beteg és elhullott kékvércséből (*Falco vespertinus*) és vörösvércséből (*Falco tinnunculus*) is sikerült kimutatni a WNV nukleinsavát (43). A madarak a Hortobágyi Nemzeti Park és a Körös-Maros Nemzeti Park területéről származtak. A nukleinsav-szekvencia vizsgálatok az esetek egy részében igazolták a lineage 2 vírus jelenlétét, a további vizsgálatok még folyamatban vannak. 2007 szeptemberében idegrendszeri tünetekben szenvedő lovat vettek fel az Állatorvos-tudományi Kar Üllői Nagyállatkórházába. A ló súlyosbodó tünetei miatt néhány nap múlva euthanasia-t hajtottak végre rajta. RT-PCR és immunhisztokémiai módszerek segítségével a WNV nukleinsavát és antigénjeit lehetett kimutatni a ló központi idegrendszeréből (43). A lovat kb. 20 km távolságra tartották a 2005-ös juh WN eset előfordulási helyétől, és kb. 40-re a 2004-2005-ös vadmadár esetek fellelési helyétől. A vírus részleges nukleotid szekvenciája nagy fokú hasonlóságot mutatott a korábbi esetekből kimutatott WNV lineage 2 törzssel.

A vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az utóbbi öt évben legalább kettő, egymástól jelentősen eltérő nyugat-nílusi vírustörzs fordult elő és okozott idegrendszeri megbetegedéseket hazai madár és emlős fajokban. Az adatok alapján járványtani összefüggés valószínűsíthető az Afrikából behurcolt, lineage 2 törzs által előidézett megbetegedések között; ami arra utal, hogy a vírus képes volt átvészelni a hazai teleket és sikeres ízeltlábú vektor – gerinces gazda ciklust alakított ki. 2003 óta több hazai humán agyvelő- és agyhártyagyulladásos esetek kórokaént WNV fertőzést határoztak meg az Országos Epidemiológiai Intézetben szerológiai módszerek segítségével. Egy 2007-ben elnyert OTKA

pályázat (K67900) támogatásával folytatni kívánjuk a WNV hazai előfordulásának nyomon követését, valamint a fertőzések állategészségügyi és humán-egészségügyi következményeinek vizsgálatát.

**1. táblázat:** A filogenetikai összehasonlításba bevont WNV törzsek (1. ábra) fontosabb adatai.

Kód	Név	Lineage, klád	Izolálás		
			Éve	Gazdafaj	Eredet
NY99a	WNV HNY1999	1a	1999	human	New York, USA
NY99b	WNV NY99flamingo38299	1a	1999	flamingó	New York, USA
Is98	WNV IS98STD	1a	1998	gólya	Izrael
Hu03	WNV goose-Hungary/03	1a	2003	lúd	Magyarország
It98	WNV Italy1998Equine	1a	1998	ló	Olaszország
Ro96	WNV RO9750	1a	1996	<i>Culex pipiens</i>	Románia
Rus99a	WNV VLG4	1a	1999	human	Volgográd, Oroszo.
Rus99b	WNV LEIV-Vlg99-27889	1a	1999	human	Volgográd, Oroszo.
Tu97	WNV PaH001	1a	1997	human	Tunézia
Fr00	WNV PaAn001	1a	2000	ló	Franciaország
Eg51	WNV Eg 101	1a	1951	human	Egyiptom
Chin01	WNV Chin-01	1a	1950s	?	Oroszország
Kunjin	WNV Kunjin MRM61C	1b	1960	<i>Culex annulirostris</i>	Ausztrália
Sarafend	WNV Sarafend	2	Laboratóriumi törzs		
Ug37	WNV B956 (WNFCG)	2	1937	Human	Uganda
Hu04	WNV goshawk-Hungary/04	2	2004	héja	Magyarország
RabV	Rabensburg virus (97-103)	3	1997	<i>Culex pipiens</i>	Csehország
Rus98	WNV LEIV-Krnd88-190	4	1998	<i>Dermacentor marginatus</i>	Kaukázus

Együttműködésben a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem Klinikai Virologia osztályán prof. Norbert Nowotny-val, illetve a Cseh Tudományos Akadémia Emlőbiológia Intézeténél dolgozó prof. Zdenek Hubálekkel, meghatároztam egy Csehország déli részén 1997-ben,

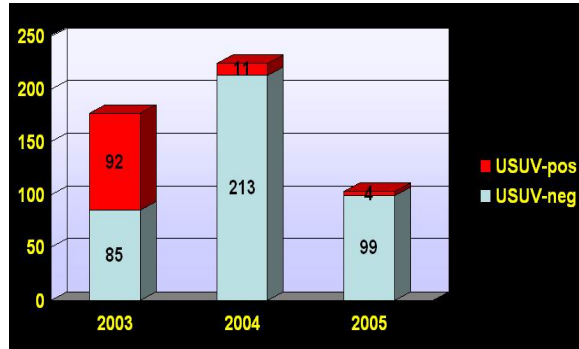
szúnyogból izolált nyugat-nílusi vírustörzs (Rabensburg vírus, RABV) teljes genomszekvenciáját. A filogenetikai összehasonlítások alapján megállapítottuk, hogy a törzs a WNV-nek egy korábban nem ismert, javaslatunk szerinti harmadik genetikai vonalát képviseli (3). Emellett a génbanki szekvenciák elemzése során feltártuk, hogy egy a Kaukázusban 1988-ban kullancsból izolált törzs szekvenciája a WNV negyedik genetikai vonalának létét valószínűsíti (3) (1. ábra).

## **II. Az Usutu vírus közép-európai előfordulásának vizsgálata és a törzsek genetikai jellemzése**

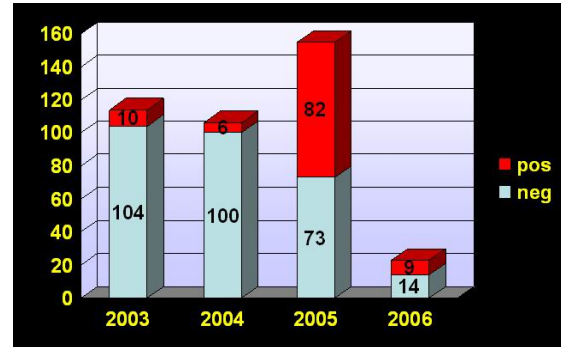
Az Usutu vírus (USUV) a szúnyogok-terjesztette flavivírusok közé tartozik. Előfordulásáról 2001-ig csak Afrika Szaharától délre fekvő területeiről számoltak be. A vírus 2001-ben felbukkant Ausztriában, Bécsben és környékén, és fokozott vadmadár elhullásokat idézett elő. Együttműködésben Nowotny professzorral és a bécsi állatorvos-tudományi egyetem további kutatóival meghatároztuk a vírus teljes genomszekvenciáját és fontosabb biológiai jellemzőit, valamint diagnosztikai módszereket fejlesztettünk ki a kórokozó direkt kimutatására és a fertőzést átvészelt állatok szerológiai vizsgálataira (4, 6, 19, 31, 42). A vírusterjedés nyomon követése céljából 2003 és 2005 között vadmadár-monitoring programot indítottak Ausztria több szövetségi tartományában. Az együttműködés keretében részt vettem a vadmadár minták molekuláris diagnosztikai vizsgálataiban (30). A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a feketeterigók (*Turdus merula*) és egyes bagolyfélék (*Strigiformes*) fokozottan érzékenyek az USUV fertőzésre, és bennük gyakran alakul ki elhullásra vezető agyvelőgyulladás a fertőzés következtében. Az USUV-okozta vadmadár elhullások száma 2003-ig emelkedő tendenciát mutatott, 2004-től viszont jelentősen csökkent a dokumentált ausztriai esetek száma (2a ábra). Emellett a vírus földrajzi terjedését tapasztaltuk Bécs és Alsó-Ausztria területeiről Burgenland és Stájerország irányába (31). A csökkenő esetszám magyarázatára szerológiai vizsgálatokat végeztünk a fertőzött területekről származó vadmadarak immunológiai áthangolódásának megállapítása céljából. Azt tapasztaltuk, hogy 2004-ig csak a madarak kis hányadából lehetett USUV-ellenes ellenanyagokat kimutatni, 2005-től viszont jelentősen megemelkedett a szeropozitív egyedek száma (2b ábra). Az eredmények arra utalnak, hogy széleskörű immunitás fejlődött ki az érintett populációkban, és valószínűleg ez magyarázhatja a járvány csökkenését (45). A kórokozó vektor-fajainak vizsgálata céljából szúnyogmintákat gyűjtöttünk a fertőzött területekről. RT-PCR segítségével kimutattam a vírus jelenlétét *Culex pipiens*, *Culex hortensis*, *Culex territans*, *Culiseta annulata*, *Aedes vexans* és *Aedes rossicus* szúnyogfajokból. Annak felderítése céljából, hogy a vírus mekkora veszélyt jelent gazdasági

haszonállatokra, kísérleti állatfertőzéseket végeztünk tyúk és lúd fajban (6, 19). Az állatkísérletek eredményei alapján a tyúkok alig, a ludak mérsékelten fogékonyak az USUV fertőzésre.

A



B



2. ábra: Az USUV Auszriai előfordulásának nyomon követése során megfigyelt tendenciák. A: 2003. és 2005. között gyűjtött, elhullott vadmadarak vizsgálata során USUV fertőzött és nem fertőzött egyedek száma. B: A 2003. és 2006. között gyűjtött vadmadár savóminták közül USUV elleni ellenanyagokat tartalmazó (pos) és nem tartalmazó (neg) minták száma.

A földrajzi közelség miatt felmérő vizsgálatokat kezdeményeztem magyarországi vadmadár populációkban az USUV hazai megjelenésének kimutatása céljából. Az Ócsai Madárvárta Egyesület és a Magyar Madártani Egyesület munkatársai által gyűjtött vadmadár-tetemek agyvelő mintáit, valamint az Országos Állategészségügyi Intézetbe vizsgálatra beküldött agyvelőgyulladásos vadmadarak mintáit vizsgáltam RT-PCR segítségével. Összesen több mint 400 madár vizsgálatára került sor. A 2004-ben megvizsgált mintákból nem lehetett USUV nukleinsavat kimutatni. A vírus jelenlétét sikerült viszont igazolni egy Budapesten elhullott feketerigóból 2005 augusztusában. A vírustörzs eredetének és rokonsági viszonyainak felderítése céljából meghatároztam a vírus teljes genomszekvenciáját (25). A hazai USUV törzs a legnagyobb (99,8%-os) hasonlóságot a 2001-ben, Bécsben felbukkant vírustörzshöz mutatta. A vírus 2006-ban és 2007-ben további elhullásokat okozott; a kutatások során megvizsgált 16 budapesti feketerigó közül nyolcból sikerült kimutatni a vírus jelenlétét. 2006 szeptemberében – együttműködésben svájci és holland kutatókkal – az USUV felbukkanását diagnosztizáltuk Zürichben és Milano környékén is (42). Mindkét helyen ismételt vadmadár elhullásokat tapasztaltak 2007-ben is, és az ezekből az esetekből származó mintákból is kimutattuk az USUV jelenlétét.

Az OTKA K67900 pályázat keretében további vizsgálatokat tervezünk az USUV európai terjedésének és járványtani folyamatainak nyomon követése céljából.

### III. A mézelő méh vírusfertőzéseinek vizsgálata

A Ph.D. tanulmányaim keretében végzett korábbi felmérő vizsgálatok rávilágítottak a heveny méhbénulás vírus (acute bee paralysis virus, ABPV) széles körű hazai elterjedtségére. Ezért kollégáimmal a mézelő méhben fertőzést okozó további vírusok esetleges magyarországi előfordulásának kimutatására irányuló vizsgálatokkal folytattuk a kutatást. Az irodalmi adatok alapján kórtani szempontból leginkább jelentős öt méhvírus, a lárvatömlősödés vírusa (sacbrood virus, SBV) a fekete anyabölcső vírus (black queen cell virus, BQCV), a méhek szárnydeformitását okozó vírus (deformed wing virus, DWV), a krónikus méhbénulás vírus (chronic bee paralysis virus, CBPV), és a Kasmír méhvírus (Kashmir bee virus, KBV) kimutatására alkalmas RT-PCR rendszereket dolgoztunk ki és/vagy alkalmaztunk a korábbi ABPV vizsgálatoknak alávetett méhmintákon. A méhészetekből beküldött, többnyire a kaptárak aljáról gyűjtött, elhullott méheket, lehullott törmeléket, parazitákat stb. tartalmazó mintákat *Varroa destructor* atka jelenlétére is vizsgáltuk. Az RT-PCR vizsgálatok során ausztriai és németországi pozitív kontrollok alkalmazásával győződünk meg a diagnosztikai rendszerek működőképességéről, valamint a pozitív leleteket egyes esetekben a képződött termék direkt szekvenálásával és a génbanki vírusszekvenciákhoz történő illesztésével ellenőriztük. Az eredmények összegzését az 2. táblázat mutatja.

**2. táblázat:** Vírusfertőzések előfordulási gyakorisága magyarországi méhészetekben.

Vírusok	Fertőzött méhészetek		Társfertőzés jellege
	száma	aránya	
Mindegyik vírusra negatív	3	6 %	3 (6 %)
ABPV	3	6 %	Egy vírus 19 (37 %)
BQCV	5	10 %	
CBPV	0	0 %	
DWV	11	21 %	
SBV	0	0 %	
ABPV & BQCV	4	8 %	Kettő vírus 24 (46 %)
ABPV & DWV	6	12 %	
BQCV & DWV	13	25 %	
DWV & SBV	1	2 %	
ABPV & BQCV & DWV	6	12 %	Három vírus 6 (12 %)



Együttműködésben a bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem klinikai virológia osztályával, hasonló felmérő vizsgálatot végeztünk ausztriai méhészetekből származó mintákon is (18). Az eredmények összehasonlíthatósága céljából a két felmérésben ugyanazokat a diagnosztikai módszereket alkalmaztuk. Eredményeinket összehasonlítottuk egy franciaországi felmérés eredményeivel is (3. táblázat). Azt állapítottuk meg, hogy egyes vírusok (pl. SBV, CBPV, KBV) előfordulási aránya jelentősen alacsonyabb a hazai méhészetekben, mint az említett nyugati-európai állományokban (34).

**3. táblázat:** Egyes méhvírusok előfordulási gyakoriságának összehasonlítása különböző európai országokban

Vírusok	Magyarország	Franciaország	Ausztria
	(52 méhminta)	(36 méhminta)	(131 méhminta)
DWV	72 %	97 %	91 %
BQCV	54 %	86 %	30 %
SBV	2 %	86 %	49 %
ABPV	37 %	58 %	68 %
CBPV	0 %	28 %	9 %
KBV	0 %	17 %	0 %
<b>Vírusok</b>	<b>11 atka minta</b>	<b>22 atka minta</b>	<b>nem vizsgált</b>
DWV	81 %	98 %	–
SBV	0 %	14 %	–
ABPV	36 %	10 %	–
KBV	0 %	1 %	–
BQCV	0 %	0 %	–
CBPV	0 %	0 %	–

Mivel a hazai mintákat 1999 és 2004 között gyűjtöttük, az eredmények az Európai Unió csatlakozás előtti helyzetet mutatják. Az EU csatlakozás miatt várhatóan felélénkülő nemzetközi méh-, és méhészeti termék kereskedelem hatással lehet egyes vírusok hazai elterjedtségére is. Néhány év múlva végzett hasonló jellegű felmérések alkalmasak lehetnek a változások nyomon követésére.

A CBPV és a KBV jelenlétét nem lehetett kimutatni az 1999 és 2004 között gyűjtött mintákból. A KBV előfordulására irányuló vizsgálatok eredményeit megosztottuk egy németországi kutatócsoporttal, akiknek először sikerült KBV-t kimutatni Hessen

tartományban. Az eredmények arra utalnak, hogy a KBV-t az utóbbi években hurcolták be Nyugat-Európába (feltételezhetően az Egyesült Államokból), és a vírus egyelőre nem jutott el a közép-európai méhészetekbe (14). Egy 2005-ben gyűjtött méhminta vizsgálata során viszont a CBPV jelenlétét is sikerült igazolni hazánkban RT-PCR és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével (9). 2006-ban és 2007-ben további CBPV pozitív méhállományokat találtunk és genetikai összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a hazai vírustörzseken (40).

A méhek szárnydeformitását okozó vírus (DWV) első hazai és ausztriai kimutatását követően, – együttműködésben osztrák, lengyel és német kutatókkal – filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a vírus változékonyságának és a törzsek genetikai rokonságának felderítése céljából. Öt közép európai országból (Ausztria, Lengyelország, Magyarország, Németország, Szlovénia) és öt Európán kívüli országból (Egyesült Arab Emírátsok, Kanada, Nepál, Sri-Lanka, Új-Zéland) gyűjtött méhmintákat vizsgáltunk a DWV jelenlétére. Az új-zélandi minták kivételével mindegyikből sikerült kimutatni a DWV nukleinsavának jelenlétét. Összességében 34 vírustörzset vontunk be a filogenetikai analízisbe. A törzsek között tapasztalt nagy fokú hasonlóság (98-100%) miatt a statisztikai analízis nem eredményezett egyértelmű, földrajzi alapon magyarázható elkülönülést a genotípusok között. Az általunk meghatározott szekvenciákat összehasonlítottuk más kutatók, génbankban elhelyezett DWV szekvenciáival, és ezekben az esetekben is magas hasonlósági értékeket tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy a jelenleg rendelkezésre álló adatok szerint a DWV világszerte előforduló törzsei nagyon szoros genetikai rokonságban állnak egymással (29). Mivel arra semmi sem utal, hogy a DWV mutációs rátája alacsonyabb lenne, mint más RNS vírusoké, a jelenség legvalószínűbb magyarázatának azt találtuk, hogy a vírus evolúciós szempontból a közeli múltban terjedt el a föld mézélő méh populációiban. Ennek az elterjedésnek a hátterében valószínűleg a *Varroa destructor* atka utóbbi negyven évben tapasztalt gyors „világhódítása” állhat, mivel ez az atka hordozója és hatékony vektora a vírusnak. Az atkák nagy arányú fertőzöttségét saját vizsgálataink is alátámasztják.

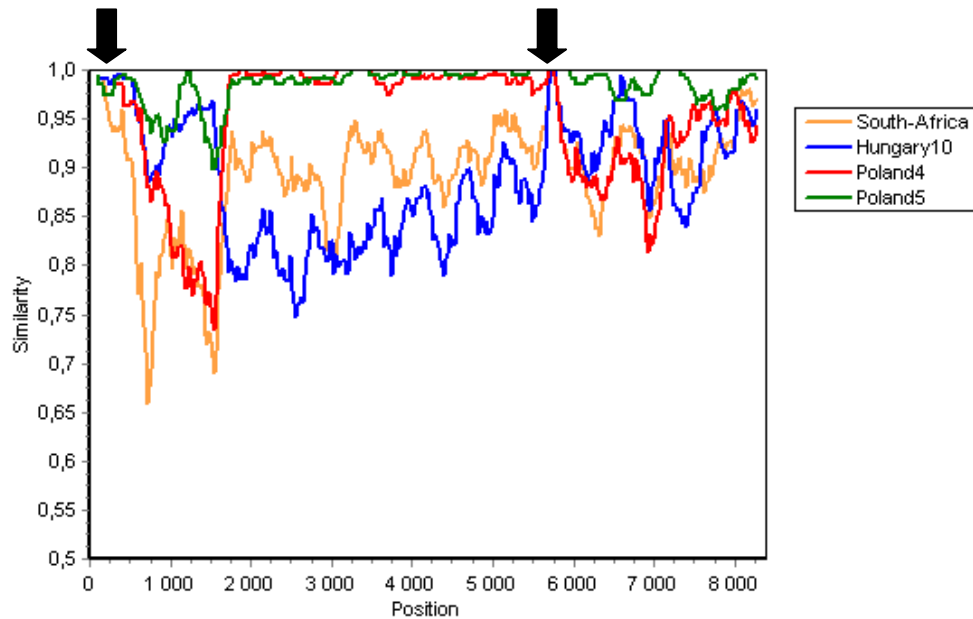
A fekete anyabölcső vírus (BQCV) első hazai és ausztriai kimutatását követően a DWV esetében ismertett filogenetikai összehasonlítást végeztünk a közép-európai genotípusok közötti rokonsági viszonyok és a vírustörzsek változékonyságának jellemzése céljából. Ebben az esetben is két genom régiót, a helikáz enzimet és a szerkezeti fehérjéket kódoló területeket választottuk a filogenetikai analízis alapjául. A vizsgálatokba 10 magyarországi, 7 lengyelországi és 5 ausztriai törzset vontunk be, amelyek részleges nukleotid szekvencia meghatározását követően összehasonlítottunk a dél-afrikai referencia szekvenciával. A

helikáz régió alapján végzett törzsfá-rekonstrukciós vizsgálatok során a közép-európai törzsek egyértelműen elkülönültek a dél-afrikai referencia törzstől, viszont a csoporton belül nem lehetett megfigyelni statisztikailag megalapozott további elkülönülést. Meglepő módon három lengyelországi törzs különálló csoportot képezett (3a. ábra). A szerkezeti fehérjék régiója alapján konstruált törzsfában a közép-európai vírusokon belül a magyarországi és ausztriai genotípusok képeztek egy ágat, a lengyelországi vírusok pedig egy másik ágba rendeződtek. A korábban elkülönülő három lengyelországi törzs közül kettő betagozódott a többi lengyelországi törzs közé (Poland 5, 6), egy viszont változatlanul elkülönülő ágat alkotott (Poland 4). A közép-európai törzsek ezen a törzsfán is egyértelműen elkülönültek a dél-afrikai referencia törzstől (3b. ábra).



**3. ábra:** A BQCV vizsgált genotípusai közötti feltételezett rokonságot illusztráló filogram, A: a részleges helikáz gén szekvenciái alapján; B: a részleges szerkezeti fehérjéket kódoló genomterület alapján. A 70% feletti bootstrap értékek feltüntetésre kerültek.

A két törzsfá topológiájában talált eltérések, illetve lengyelországi törzsek szokatlan helyeződése okainak vizsgálata céljából további vizsgálatokat végeztünk kiválasztott vírustörzsek bevonásával. A három lengyelországi genotípus (a 3. ábrán Poland 4, Poland 5 és Poland 6), valamint egy magyarországi vírus (Hungary 10) közel teljes genomszekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákat összehasonlítottuk egymással és a dél-afrikai referencia szekvenciával, és megállapítottuk a változékony és konzervált genomterületek helyeződését (4. ábra).



**4. ábra:** BQCV törzsek egyes genomterületeinek hasonlósága a referenciaként választott Poland 6 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a nagyfokban konzervált nem kódoló régiók helyeződését mutatják.

Megállapítottuk, hogy a vírus enzimeket kódoló, első leolvasási kerete nagyobb változékonyságot mutat, mint a második, szerkezeti fehérjét kódoló szakasz. A két leolvasási keret közötti terület teljes homológiát mutatott a vizsgált vírusokban, amely arra utal, hogy ez a régió központi jelentőségű a vírus szerkezeti fehérjéinek translációjában (az ún. "internal ribosomal entry site" területe). A lengyelországi BQCV törzsek különböző genomterületei között megfigyelt eltérések a hasonlósági értékekben a genomok közötti rekombinációra utalnak. Az eredményeket tudományos konferenciákon ismertettük (16), valamint egy cikk kéziratát állítottuk össze, amelyet jelenleg a külföldi társszerzők javítanak, illetve kiegészítik saját gondolataikkal. Terveink szerint rövidesen sikerül kialakítani a publikációra kész, végleges változatot.

A méhvírusok kimutatása klasszikus virológiai módszerekkel időigényes, nehézkes és speciális feltételeket (méhbábok, típussavók) igényel. A molekuláris biológiai (pl. PCR) alapú

diagnosztikai módszerek alkalmazásával kiküszöbölhetők az említett problémák. Saját vizsgálataink is alátámasztják, hogy a méhekben gyakori a szimultán vírusfertőzések előfordulása (2. táblázat). Ezért általában indokolt ugyanannak a mintának több vírus jelenlétére irányuló vizsgálata. A vizsgálatok egyszerűsítése, és különösen a költségek csökkentése szempontjából előnyös, ha több vírus egyidejű kimutatására alkalmas diagnosztikai módszer áll rendelkezésünkre. Együttműködésben a bécsi állatorvos-tudományi egyetem munkatársaival, olyan multiplex RT-PCR módszert fejlesztettünk ki, amely megbízható módon képes közös reakcióban kimutatni az ABPV, a BQCV és az SBV jelenlétét méhmintákban. A rendszer optimalizálását és érzékenységének meghatározását követően annak gyakorlati alkalmazhatóságát is vizsgáltuk méhészetekből gyűjtött minták felhasználásával (35).

A továbbiakban is folytatni kívánjuk a méhvírusok előfordulására, genetikai- és kórtani jellegzetességeire irányuló kutatásainkat. Jelenleg egy a 2007.-2008. évre elnyert szlovén-magyar TÉT pályázat keretében kívánunk *in situ* hibridizációs módszer kifejlesztési a méhvírusok vizsgálatára, valamint a BQCV méhanya-nevelésre kifejtett hatását vizsgáljuk (46).

#### **IV. Új kórokozók kimutatására irányuló molekuláris diagnosztikai fejlesztés és a kimutatott törzsek filogenetikai vizsgálata**

Együttműködésben Prof. Z. Hubálek és Prof. N. Nowotny kutatócsoportjaival, RT-PCR alapú diagnosztikai módszert dolgoztam ki két bunyavírus, a Tahyna vírus és a Sedlec vírus kimutatására és genetikai jellemzésére. Meghatároztam egy magyarországi, egy szlovákiai, egy csehországi és egy ausztriai Tahyna vírus törzs részleges genomszekvenciáit (S, M és L szegment), valamint elvégeztem a törzsek filogenetikai összehasonlítását (2). A közép-európai Tahyna vírus törzsek közeli genetikai rokonságát állapítottam meg. Elsőként határoztam meg a Sedlec vírus részleges genom szekvenciáját (L szegmens).

A Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem munkatársaival kialakított kutatási együttműködés keretében egy sertés agyvelőgyulladásos esetből izolált reovírus-törzs genetikai jellemzéséhez kezdtünk hozzá. Nyolc genomszegmens részleges nukleotid szekvenciájának eddigi (a teljes genom 25%-át érintő) meghatározása alapján megállapítható, hogy a vírustörzs az emlős orthoreo-vírusok egy eddig nem ismert genetikai vonalához tartozik.

Együttműködésben a SzIE, Állatorvos-tudományi Kar, Kórbonctani és Igazságügyi-állatorvostani Tanszékének munkatársaival RT-PCR alapú diagnosztikai módszert dolgoztunk ki az avian nephritis vírus hazai előfordulására és a törzsek változékonyságára irányuló

vizsgálatokhoz (13). A kórokozó széles körű előfordulását állapítottuk meg hazai csirkeállományokban, valamint kimutattuk a törzsek nagy fokú genetikai változékonyságát is (22, 23).

Együttműködésben az Országos Állategészségügyi Intézet, a Debreceni Állategészségügyi Intézet és a SzIE, ÁOTK Kórbonctani Tanszék munkatársaival RT-PCR módszert dolgoztam ki a kacsahépatitisz vírus (Duck hepatitis virus, DHV) kimutatására (24). A közreműködő intézményekbe küldött kacsamintákból kimutatott DHV törzsek részleges nukleotid szekvenciáit összehasonlítottuk a génbankban található távol-keleti törzsekkel, valamint a kacsák immunizálására alkalmazott gyengített vakcina törzssel. A törzsek földrajzi elkülönülése mellett a hazai törzsek vakcina törzshöz mutatott közeli rokonságát állapítottuk meg (26).

Témavezetésem alatt dr. Forgách Petra Ph.D. hallgató a hepatitis E vírus (HEV) magyarországi előfordulásának felmérésére, a törzsek genetikai jellemzésére, valamint a kórokozó zoonosis jellegének tanulmányozására irányuló vizsgálatokat végez. Az eredmények a HEV széles körű előfordulását igazolták hazai sertés- és vadállományban, valamint közeli genetikai rokonságot, és egyéb járványtani összefüggéseket sikerült kimutatni az állatokból és emberekből származó törzsek között (8, 33, 44).

Az említett kutatási témák mellett részt vettem a sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS) hazai előfordulására és filogenetikai jellemzésére irányuló vizsgálatokban. Megállapítottuk a vírus széles körű hazai elterjedtségét, valamint a sertésállományokban alkalmazott vakcinák és a kóresetekből kimutatott törzsek között szoros genetikai rokonságot találtunk (27).

Munkatársaimmal RT-PCR alapú diagnosztikai eljárásokat fejlesztettünk ki az equid herpesvirus-1 és -4 (rhinopneumonitis), az equid herpesvirus-2, a lovak fertőző arteritisének vírusa, a szarvasmarha herpesvirus-1 (IBR), a szarvasmarha vírusos hasmenés vírusa (BVDV), a kutya parvovírusos hasmenés vírusa, a szopornyica vírus, a kutya herpesvirus-1, az avian leukosis vírus, a galamb-paramyxovírus, a madárinfluenza vírus, a dengue vírus, alacsonyabb rendű gerincesek adenovírusai, egy új méhvírus, valamint a méhek *Nosema cerenae* fertőzésének kimutatására (1, 7, 11, 12, 15, 20, 21, 28, 36, 37, 39, 41). A módszereket sikeresen alkalmaztuk klinikai és kórbonctani minták vizsgálata során, illetve segítségükkel a kórokozók eredetére, elterjedtségére, rokonsági viszonyaira és változékonyságára irányuló kutatásokat végeztünk.

#### **IV. A kutatás közvetlen tudományos és gyakorlati haszna**

Az OTKA D48647 Posztdoktori Kutatói Ösztöndíj által támogatott időszakban végzett kutatásaim hozzájárultak 21, referált nemzetközi szakfolyóiratban megjelent publikáció és 3 magyar nyelvű, referált lapban megjelent publikáció létrejöttéhez, melyek összesített impakt faktora 52,47. Jelenleg további egy elbírálás alatt álló (USUV járványtani modellezés) és egy publikációra előkészített (BQCV genom analízis) kéziratban szeretnénk ismertetni a kutatások legfrissebb eredményeit. Emellett egy könyv és egy könyvfejezet létrejöttében társszerzőként működtem közre, valamint 30 nemzetközi és 36 hazai konferencián ismertettük vizsgálataink eredményeit. Három nemzetközi konferenciára meghívott előadóként kértek fel. A méhvírusok genetikai vizsgálatai terén elért eredményeim alapján meghívást kaptam a „Bee Research and Virology in Europe” tudományos konferenciára (5), hogy a méhek vírusai közti filogenetikai kapcsolatról előadást tartsak. Az előadást követően felkértek a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), ízeltlábúak vírusai albizottság (Invertebrate Subcommittee) *Dicistroviridae* és *Iflavirus* munkacsoport (Studygroup) tagságára, amely további elismerése az eddigi kutatásoknak.

Az egyes kutatási rész témákba bevontam graduális és posztgraduális egyetemi képzésben résztvevő hallgatókat is. A program keretében végzett kutatásai eredményeiről három állatorvostan-hallgató Tudományos Diákköri (TDK) konferencián számolt be, nyolcan pedig szakdolgozatot állítottak össze és azt sikeresen megvédték. Az ausztriai kutatócsoportokkal együttműködésben végzett kutatásokban közreműködő, magyar állampolgárságú, de a bécsi állatorvos-tudományi egyetemen végzett hallgató doktori fokozatot szerzett. A posztdoktori ösztöndíjas kutatásaim során segítséget nyújtottam dr. Forgách Petra, Tapaszi Zsuzsanna, dr. Mándoki Míra, dr. Kővágó Csaba, dr. Balka Gyula, és dr. Demeter Zoltán doktorandusz hallgatóknak Ph.D. kutatásaik megtervezése, végrehajtása, és az eredmények publikálása terén.

Az ösztöndíj támogatásával végzett kutatásaim jelentősen hozzájárultak ahhoz, hogy a SzIE Doktori és Habilitációs Tanácsához 2007-ben benyújtott pályázatomat a Tanács támogatta és "dr. habil" fokozatot ítélte oda nekem. Emellett a kutatások eredményei lehetővé tették további kutatási pályázatok (pl. OTKA K67900, Bolyai János kutatói ösztöndíj) elnyerését és a megkezdett vizsgálatok folytatását.

A kutatási program támogatásával munkatársaimmal olyan diagnosztikai módszereket dolgoztunk ki, amelyekkel gyorsan és megbízhatóan kimutathatók és genetikailag azonosíthatók a vizsgált kórokozók. A módszereket hozzáférhetővé tettük más virológiai laboratóriumok számára gyakorlati diagnosztikai felhasználás céljából.