

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Régi és új madárinfluenza vírustörzsek filogenetikai
vizsgálata járványügyi vizsgálatok céljából**

PhD értekezés

dr. Szeleczy Zsófia

2010

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Dr. Lomniczi Béla
állatorvos-tudomány doktora
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest

Témabizottsági tagok:

.....
Dr. Dán Ádám
PhD
MgSzH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Budapest

.....
Dr. Kulcsár Gábor
PhD, igazgató főállatorvos
MgSzH Központ Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága, Budapest

Készült 8 példányban. Ez a ... sz. példány.

.....
dr. Szelezky Zsófia

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. ÖSSZEFOGLALÁS	6
3. BEVEZETÉS	7
4. CÉLKITŰZÉSEK	9
5. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
5.1. AZ INFLUENZAVÍRUS-FERTŐZÉS ÉS JÁRVÁNYOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	10
5.2. AZ INFLUENZAVÍRUS.....	10
5.2.1. <i>Besorolása és a virion jellemzése</i>	<i>10</i>
5.2.2. <i>Az influenzavírusok előfordulása és evolúciója</i>	<i>11</i>
5.2.3. <i>A viruspatogenitás genetikai háttere</i>	<i>11</i>
5.3. AZ INFLUENZAVÍRUSOK ÁLTAL OKOZOTT MEGBETEGEDÉSEK, A FERTŐZÉS JÁRVÁNYTANA	13
5.3.1. <i>Az influenzavírus gazdaspektruma.....</i>	<i>13</i>
5.3.1.1. <i>Vadmadarak.....</i>	<i>13</i>
5.3.1.2. <i>Házimadarak.....</i>	<i>14</i>
5.3.1.3. <i>Emlősök</i>	<i>14</i>
5.3.2. <i>A baromfi AI-járványai.....</i>	<i>15</i>
5.3.2.1. <i>A jelentősebb HPAI járványok története</i>	<i>15</i>
5.3.2.2. <i>Az LP járványok jelentősége</i>	<i>21</i>
5.3.3. <i>A madárinfluenza vírus okozta tünetek</i>	<i>23</i>
5.4. VÉDEKEZÉS.....	24
5.4.1. <i>Jogszabályi változások</i>	<i>24</i>
5.4.2. <i>Vakcinás védekezés</i>	<i>25</i>
6. ANYAG ÉS MÓDSZER	26
6.1. A VIZSGÁLATOK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÍRUSTÖRZSEK	26
6.1.1. <i>A régi, hazai influenzatörzsek eredete</i>	<i>26</i>
6.1.2. <i>A hazai HP H5N1 járvány vizsgálatra kiválasztott tagjai.....</i>	<i>29</i>
6.1.3. <i>A HP H5N1 járvány időszakában izolált egyéb szubtípusba tartozó vírusok.....</i>	<i>30</i>
6.2. A KIVÁLASZTOTT VÍRUSTÖRZSEK ELSZAPORÍTÁSA	30
6.3. A GENETIKAI VIZSGÁLAT MENETE ÉS KÖRÜLMÉNYEI	31
6.3.1. <i>RNS kivonás.....</i>	<i>31</i>
6.3.2. <i>RNS átírás és PCR</i>	<i>31</i>
6.3.2.1. <i>A régi törzsek vizsgált génjeinek reakciókörülményei.....</i>	<i>31</i>
6.3.2.2. <i>Az új törzsek vizsgált génjeinek reakciókörülményei</i>	<i>33</i>
6.3.3. <i>Agaróz gélelektroforézis, DNS kivonás</i>	<i>33</i>
6.3.4. <i>Szekvenálási folyamat</i>	<i>33</i>
6.3.5. <i>Genetikai és filogenetikai vizsgálat.....</i>	<i>33</i>
7. EREDMÉNYEK	35
7.1. RÉGI HAZAI AIV-TÖRZSEK	35
7.1.1. <i>A régi hazai törzsek szubtípus-kombinációi.....</i>	<i>35</i>
7.1.2. <i>A H5 és a H7 csoportbeli törzsek virulenciája.....</i>	<i>36</i>
7.1.3. <i>Szubtípuson belüli magasabb elkülönülések: földrajzi vonalak.....</i>	<i>37</i>
7.1.4. <i>Szubtípuson belüli alacsonyabb elkülönülések: járványtípusok.....</i>	<i>37</i>
7.1.4.1. <i>Az egyes génfák értékelése</i>	<i>38</i>
7.2. ÚJABB AIV-IZOLÁTUMOK	44
7.2.1. <i>A hazai HP H5N1 izolátumok filogenetikai vizsgálata.....</i>	<i>44</i>
7.2.1.1. <i>A H5N1 HA fa bemutatása</i>	<i>46</i>
7.2.1.2. <i>A H5N1 törzsek további génjeire készített törzsfák bemutatása</i>	<i>48</i>
7.2.2. <i>A H3N8 és a H7N7 szubtípusba tartozó törzsek filogenetikai elemzése.....</i>	<i>50</i>

7.2.3. Az újabb AIV-törzsek virulenciájának meghatározása genetikai módszerrel	51
8. MEGVITATÁS.....	52
8.1. A RÉGI HAZAI AIV-K VIZSGÁLATA	52
8.1.1. A pulyka AIV-fertőzései	53
8.1.2. A primer rezervoár vírusai (vadmadarak vírusai Észak-Amerikában).....	55
8.1.3. Egy mesterséges rezervoár vírusai (a kacsza AIV-fertőzései Kínában).....	56
8.1.4. A régi hazai AIV-törzsek jellegzetességei és eredete	57
8.2. A HAZAI HP H5N1 MADÁRINFLUENZA VÍRUSOK VIZSGÁLATÁBÓL LEVONT KÖVETKEZTETÉSEK.....	59
8.2.1. A hazai törzsek filogenetikai vizsgálataiból levont járványtani következtetések	59
8.2.1.1. Az első hullám: a HU-1 és a HU-2 csoport vírusai	60
8.2.1.2. A második hullám: a HU-3 csoport vírusai	61
8.2.1.3. A harmadik hullám: a HU-4 csoport vírusai	61
8.2.2. Egy sikeres járvány-felderítési eset	62
8.2.3. A reasszortációk vizsgálata	63
8.2.4. A hazai törzsek genomelemző vizsgálataiból levont további következtetések	63
8.3. A KÉT LP VÍRUS VIZSGÁLATÁBÓL LEVONT KÖVETKEZTETÉSEK	66
9. ÚJ EREDMÉNYEK	68
9.1. A RÉGI HAZAI AIV-TÖRZSEKKEL KAPOTT EREDMÉNYEK:	68
9.2. RECENS HAZAI AIV-TÖRZSEK GENETIKAI VIZSGÁLATÁVAL KAPOTT EREDMÉNYEK	69
10. IRODALOMJEGYZÉK	70
11. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	82
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIV	avian influenza virus, madárinfluenza vírus
cDNS	complementary DNS, RNS-ről készült DNS másolat
HA	hemagglutinin
HAG	hemagglutináció-gátlás
HPAI	highly pathogenic avian influenza, magas patogenitású madárinfluenza
LPAI	low pathogenic avian influenza, alacsony patogenitású madárinfluenza
M	mátrix fehérje
NA	neuraminidáz
NP	nukleoprotein
NS	<i>non-structural</i> , nem-szerkezeti fehérje
OIE	Office International des Épizooties, Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction, reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
WHO	World Health Organisation, Egészségügyi Világszervezet

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során két madárinfluenza-víruscsoporttal (*avian influenza*, AI) foglalkoztunk. Az egyik a '70-es években, az ország keleti részén, házikacsa-, pulyka- és gyöngytyúk-állományokból izolált törzsek gyűjteménye. A másik csoportot a 2006-2007-es magas patogenitású (*highly pathogenic*, HP) H5N1 járvány hazai képviselői, valamint az ezen időszak során izolálásra került két alacsony patogenitású (*low pathogenic*, LP), H3N8 és H7N7 szubttípusba tartozó vírusok adták. Genetikai vizsgálatra 15 régi törzset, 13 vadmadárból és 3 baromfiállományból származó HP H5N1 törzset, valamint a két új LP izolátumot választottunk ki.

A régi törzsek genetikai vizsgálatával a következő eredményeket kaptuk: A korábban szerológiai próbával megállapított HA (hemagglutinin)-szubttípusokon (H4, H5, H6, H7 és H10) kívül meghatároztuk az ezekkel kombinálódó NA (neuraminidáz)-alcsoportokat is. A HA-fehérjén levő proteolitikus vágáshely melletti aminosav-szekvenciája alapján megállapítottuk, hogy a H5-és a H7-szubttípusú törzsek mindegyike a mérsékelt patogenitási kategóriába tartozott. A HA-, NA- és NS (nem strukturális) gének filogenetikai vizsgálata több fontos epidemiológiai vonatkozású tényre derített fényt: (i) A hazai izolátumok az AIV eurázsiai ágába sorolhatók. (ii) A H4-törzsek három különböző forrásból származtak (ebből kettő távol-keleti, egy európai), míg a H5-szubttípusúak mindegyike távol-keleti eredetű lehetett. (iii) Az a tény, hogy a H4- és H5-szubttípusok mindegyike reasszortáns (akár többszörös is) volt, amellelt szolt, hogy nem természetes, hanem mesterséges (házikacsa által fenntartott) vírusok rezervoárjaiból származtak.

Az új törzsek genetikai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az első kitörés során két vírusvariáns keringett a hazai vadmadár-populációkban, amelyek a filogenetikai vizsgálattal a 2.2B (HU-1) és a 2.2.1 (HU-2) csoportokba kerültek. A genetikai vizsgálat szerint nem történt reasszortáció a két víruscsoport között. A HU-1 csoport legközelebbi rokonait Horvátországban, míg a HU-2 törzsekét Szlovákiában találtuk. A második hullám Európa legnagyobb HP H5N1 baromfijárványát jelentette. Az ide tartozó törzsek (HU-3) a 2.2A1 csoportba kerültek, németországi és svájci vadmadár- és libaizolátumokkal. A HU-4 törzsek esetében megerősítettük az A/turkey/United Kingdom/750/2007 vírussal való azonosságot.

3. BEVEZETÉS

A 20. századi epidemiológiai tapasztalatok alapján úgy tűnhetett, hogy – mivel a kórokozók globális terjedésében a legfőbb tényező a fertőzött gazda nagy távolságokra való eljutása, gyakran még a lappangási fázisban (pl. légi közlekedés révén) – egy világjárvány kialakulásának csak emberek között van meg a feltétele. Ezt az elképzelést a múlt-században négy influenza-*pandémia* fellépése, és állati megfelelőik hiánya alá is támasztotta. Ennek fényében mutatkozik meg a 2003-as madárinfluenza (*avian influenza*, AI) jelentősége, ami kiterjedése okán, az első influenza-*panzootiának* tekinthető. A járványt egy, a H5N1-szubtípusba tartozó magas pathogenitású AI-vírustörzs (*highly pathogenic*, HPAI-vírus) okozta, ami csirkék, házi vízi szárnyasok és vad vízimadarak között okozott súlyos veszteségeket. Mint ismertes, előbb csak a távolkeleti országokban terjedt szét Kínából, majd eljutott Oroszországba, Európába és néhány afrikai országba is. Azóta, a járvány folyamán, a vírus leszármazottai a kiindulási területeken, és azoktól távol (Egyiptomban, Indiában) *endémia* formájában fordulnak elő. A H5N1-járvány még további *elsőnek* minősíthető jegyeket is mutatott. Pl., korábban nem fordult elő, hogy egy *nagyvirulenciájú* (HPAI) törzs képes lett volna jelentős és összefüggő területi terjedésre. De először tapasztalták azt is, hogy egy HPAI-vírustörzs az influenzavírusok *primordiális* rezervoárjának, a vadon élő vízimadaraknak különböző populációit is megfertőzte, sőt ezek is a *panzootia* részeivé váltak. A járvány 2006 februárjában érte el Magyarországot, de először csak vad vízimadarakban (főként hattyú) jelentkezett. Ezt követően két távolabbi terület libatelepei között ütötte fel a fejét a megbetegedés, 2006 júniusában, illetve 2007 januárjában.

Vizsgálataim egyik részében az ezen kitöréseket okozó magas patogenitású AI-törzsek egy-egy reprezentánsának, ezen kívül szűrővizsgálatok során talált, két alacsony patogenitású (*low pathogenic*, LP) vírustörzs genetikai azonosítását végeztem el. Miután a madárinfluenza ilyen drámaian került a figyelem középpontjába, elhatároztuk, hogy a genetikai azonosítás lehetőségeit felhasználva megvizsgáljuk a Debreceni Állategészségügyi Intézetben őrzött *régi* AI-vírustörzseket is, amelyeket még Dr. Tanyi János izolált az 1970-1980-as években, főként nagyüzemi kacsáállományokban kitört megbetegedésekből (Tanyi, 1970; 1972a, b, c, f; 1973; 1976b; 1983; 1993). Az ilyen korai betegségesetek *epidemiológiai* vonatkozásairól alig tudunk biztosat, minthogy a baromfiállományokban és a vadmadár-populációkban talált vírusok esetleges szubtípus szintű egyezése (ami természetesen nem jelentett közvetlen leszármazási viszonyt) miatt, automatikusan az utóbbiakat tekintették vírusforrásnak. E régi törzsek vizsgálatával az volt a célunk, hogy elhelyezzük őket a korabeli vírusmozgások

viszonylatában, és pontosítsuk ismereteinket ezek *epidemiológiai* és *ökológiai* szerepére vonatkozóan.

A baromfi AIV fertőzéseinek jelentőségére a '60-as évektől kezdve terelődött a figyelem, amikor is szerte a világon különböző *szubtípusokhoz* tartozó vírustörzseket találtak elsősorban nagyüzemi körülmények között tartott pulykák és kacsák állományaiban. Azonban e fertőzések epidemiológiája több ok miatt sem volt egyértelmű. Az egyik, hogy ugyanabban az állományban vagy területen egyszerre többféle szubtípus is előfordult, ami nehezen egyeztethető össze egy bizonyos helyről behurcolt kórokozó okozta tipikus járványmenettel. Mégis, amikor a '70-es években kezdték megismerni a szabadvízi vadmadarakban (különösen kacsafélékben) élő AIV szubtípusok óriási változatosságát és földrajzi eloszlását, úgy vélték, hogy megtalálták a baromfivírusok forrását is, mert a vadmadarak és a baromfitelepeken talált törzsek szubtípusa gyakran megegyezett. A vízimadár populációkban talált ártalmatlan vírusok szubtípus-kombinációinak nagy száma egyébként arra engedett következtetni, hogy ezek a madárfajok az AIV-k *primordiális* gazdái és természetes *rezervoárjai* lehetnek (Webster et al., 1992). Ha pedig ez így van, akkor az ezekkel a primer vírusrezervoárokkal kapcsolatba kerülő baromfipopulációk folyamatosan veszélyeztetve lehetnek, hacsak ki nem derül, hogy a baromfitartás sajátosságai miatt, utóbbiak is képesek fenntartani saját vírusaikat, így ezek *másodlagos* rezervoárnak tekinthetők. Ennek igazolása azonban az egyedi vírusazonosítás hiánya miatt abban az időben nem volt lehetséges. Afelől ugyan kevés kétség lehetett, hogy a baromfi influenzavírusai eredetileg a sokkal régebbi vadmadár-vírusoktól származnak, ami *evolúciós* kapcsolatra utal. Eszerint egy-egy baromfipopulációban található szubtípus-kombináció eredetileg, talán évtizedekkel korábban, valóban a természetes rezervoárból érkezett, de aztán a tartási viszonyok (szaporító-rendszerek, zsúfoltság stb.) során és *adaptáció* következtében már a baromfiban is fennmaradt a fertőzési lánc, és így bizonyos szubtípusok tekintetében *mesterséges* rezervoárok alakultak ki. Ebből az is következik, hogy a termelésbe állított újabb és újabb csoportok megfertőzéséhez már egyáltalán nincs szükség vírusutánpótlást biztosító ismételt *átviteli, epidemiológiai* kapcsolatokra, azaz kívülről történő behurcolásra egy adott rendszerbe.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A régi és az új madárinfluenza vírustörzsek különböző mélységű genetikai jellemzésétől általánosságban járványtani és evolúciós ismereteink gyarapodását reméltük. Ennek érdekében, az alábbi kérdéseket kívántam megvizsgálni:

1. Régi és recens törzsek hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) szekvenciáinak meghatározásával az izolátumok szubtypusát, ill. ezek kombinációját kívántam megállapítani, egyes régi törzsek esetében pedig ezek besorolását megerősíteni és kiegészíteni.
2. A H5 és a H7 alcsoportbeli vírustörzsek virulencia-szintjének megállapítása a HA-polipeptid proteolitikus vágáshelye körüli aminosav-sorrend mintázata alapján.
3. Régi izolátumok szubtypus-kombinációinak földrajzi besorolása filogenetikai vizsgálatok segítségével.
4. A járványtani sajátosságok (endémiás jelenségek vagy új behurcolás), esetleg konkrét kapcsolatok felderítése, alacsony patogenitású törzsek okozta fertőzések esetében is.
5. A három hullámban jelentkező hazai H5N1 kitörések közötti epidemiológiai összefüggés kimutatása vagy kizárása.
6. Az általunk izolált H5N1, H3N8 és H7N7 izolátumok teljesgenom-analízise, olyan már ismert markerek elemzése céljából, melyekből további járványtani következtetések vonhatók le a vírustörzsek előéletére (pl. reasszortációs eseményekre) vonatkozóan.

5. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

5.1. AZ INFLUENZAVÍRUS-FERTŐZÉS ÉS JÁRVÁNYOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

Influenzavírusok okozta megbetegedések világszerte előfordulnak, mind az emberek, mind az emlősállatok, mind pedig a házimadarak körében. A megbetegedés lázzal, az általános állapot romlásával, légzőszervi és/vagy emésztőszervi, esetleg idegrendszeri tünetekkel, súlyos esetben elhullással jár (Varga és mts., 1999). A fertőzés megnyilvánulása és a kialakult tünetek jellege számos tényező függvénye. Ezek közé tartozik egyrészt az érintett gazdafaj (Slemons and Easterday, 1972), annak immunállapota és kora, illetve minden olyan egyéb környezeti hatás (stressz, másodlagos fertőzés, kedvezőtlen tartási körülmények) megléte, mely az egyed ellenállóképességét hátrányosan befolyásolja (Newman et al., 1981; Varga és mts., 1999). Másrészt a betegség megjelenésében döntő szerepe van az adott vírus kórokozó képességének, *patogenitásának* is. Érdekes módon, az emlősök közül önálló influenzája az *emberen* kívül csak a *sertésnek* és *lónak* van, de amíg *emberi* influenzajárványokat évszázadokra visszamenően is sikerült azonosítani, az utóbbiakét főként csak a 20. században ismerték fel. Ezzel szemben a *csirke* nagy patogenitású vírustörzse által kiváltott súlyos megbetegedését már a 19. század végén leírták Olaszországban, de eleinte nem különböztették meg a hasonlóan súlyos és később *Newcastle disease*-nek elnevezett betegségtől (Doyle, 1927). A '60-as évektől egyre több helyen fordult elő üzemi körülmények között tartott pulykák és kacsák megbetegedései is, amelyekből különféle szubtípusú törzseket lehetett izolálni, gyakran olyan szubtípus-kombinációkat, amiket később vadmadarakban is megtaláltak.

Amíg az emberi influenzavírus fertőzések bizonyos időközönként világjárvánnyá, *pandémiává*, fejlődtek, mára szezonálisan is visszatérő jelleggel, addig az állatok fertőzései szinte mindig *lokalizáltak* maradtak. Ezért jelentett nagy újdonságot a 2003-as H5N1-kitörések *panzootiás* jellege.

5.2. AZ INFLUENZAVÍRUS

5.2.1. Besorolása és a virion jellemzése

Az influenzavírusok az *Orthomyxoviridae* családba tartoznak. A *nukleoprotein* (NP) és a *mátrix* (M1) belső fehérjék antigénszerkezete alapján A, B és C *típusba* sorolhatók. Az A-típuson belül a virionok felületén található két fehérje – a kb. 4-5:1 arányban jelen lévő *hemagglutinin* (HA) és *neuraminidáz* (NA) – alapján *szubtípusokba* sorolhatók (Lamb et al., 1996; Swayne et al., 2003). Jelenleg 16 HA és 9 NA szubtípus ismert (Fouchier et

al., 2005), amelyek elvileg összesen 144 lehetséges módon kombinálódhatnak (általában ezek kettősét említik „szubtípus” néven; pl. H5N1 vagy H3N2) (lásd reasszortáció).

Hivatalos neve: *avian influenzavírus* (AIV).

A dolgozat szempontjából lényeges, A típusba tartozó AI-vírusok általában gömb alakúak, átmérőjük 80-120 nm, burokkal rendelkeznek. A virion összetétele: 0,8-1% RNS, 5-8% szénhidrát, 20% lipid és 70% fehérje (Swayne et al., 2003). Helikális szimmetriájú nukleokapszid veszi körül a nyolc szegmensből álló egyszálú, negatív RNS genomot, amely 11 vírusfehérjét kódol, így: a *polimeráz komplex* fehérjéi (PB2, PB1, PB1-F2, PA), a HA, az NP, a NA, az M1- és M2-fehérje, valamint a *nem-szerkezeti* fehérjék (NS1 és NS2) (Chen et al., 2001; Swayne et al., 2003). A teljes genom izolátumtól függően kb. 13600 nukleotid hosszúságú.

A vírus ellenállóképessége viszonylag csekély: hőre, pH változásra, szerves oldószerekre, detergenszerekre, zsírolószerekre és beszáradásra érzékeny (Varga és mts., 1999; Swayne et al., 2003).

5.2.2. Az influenzavírusok előfordulása és evolúciója

Egy AIV-törzs genomjának változása két módon következhet be, amelyek mindegyike antigénszerkezeti átalakulást eredményez. Egyrészt a genom kisléptékű módosulásával (a felszíni HA és NA fehérjék esetében ez az ún. antigén sodródás; *antigenic drift*), amely jórészt az RNS-polimeráz hibajavító (*proofreading*) aktivitásának hiányából adódó RNS-mutációknak köszönhető. Összehasonlításképpen: míg az RNS-polimeráz egy replikációs ciklus alatt minden 10^4 - 10^5 bázisonként épít be egy nem megfelelő bázist, addig ez a DNS-polimeráz működése során csupán 10^8 - 10^{11} bázisonként következik be (Domingo, 1996).

A genom módosulását eredményező másik folyamat a *reasszortálódás*, amelynek során ugyanazon gazdasejt két különböző vírussal való fertőzésekor a két genom egyes szegmensei kicserélődnek. Abban az esetben, ha ez a nagy léptékű változás eltérő alcsoportokba tartozó HA és/vagy NA géneket érint, új szubtípus-kombináció jön létre (Webster et al., 1992), melyet antigén csuszamlásnak (*antigenic shift*) is neveznek. Reasszortáció azonban kizárólag azonos típusú (A, B vagy C) vírusok génjei között jöhet létre.

5.2.3. A viruspatogenitás genetikai háttere

Az AI vírusnál, szemben más fajok influenzavírusaival, két nagy patogenitási (virulencia) kategóriát különböztetünk meg: az alacsony patogenitású (*low pathogenic*, LP), illetve a magas patogenitású (*highly pathogenic*, HP) törzsek csoportját. Amíg a HP törzsek

lényegében 100%-os mortalitás előidézésére képesek, mind gyakorlati, mind kísérleti körülmények között, addig az LP-szintű törzsek elvileg nem halálosak, a hajlamosító tényezőktől függően azonban mégis változó súlyosságú megbetegedés léphet fel. Az emlős gazdáikban csak utóbbi szintű törzsek fordulnak elő, míg a vadmadarak fertőzése tünetmentes.

A csirke influenzavírusok egyedülálló sajátossága volt a H5N1 felbukkanásáig, hogy egy-egy járványkitörést okozó HP-szintű vírustörzs rendszerint helyben keletkezett, egy korábban már endémiásan előforduló LP-törzsből. Érdekes viszont, hogy a virulencia ilyen nagy mértékű növekedése eddig csak a *H5* és a *H7* szubtypusba tartozó vírusokban következett be, és mindig csak *csirkében*, de hónapokig tartó passzálódás során (Röhm et al., 1995; Senne et al., 1996; Lomniczi, 2004). A magas virulenciaszint kialakulásakor a HA-polipeptid proteolitikus vágáshelye előtti, ún. *kötőszekvencia* néhány *bázikus aminosavval* gyarapodik. A HA a vírus célsejtekhez való kapcsolódásért felelős felszíni fehérjéje, ennek ellenére a virionban nem aktivált formában van jelen (*prekurzor*, HA0). Ez azt jelenti, hogy adszorbeálódni ugyan képes az ilyen virion, de a sejtmembránnal fuzionálni (hogy genomja az intracelluláris térbe kerüljön) csak akkor tud, ha egy *proteolitikus enzim*, a fúziós szekvencia előtti fehérjerészt levágja (*aktiválás*), a sejtbehatolást elősegítő *fúziós szekvencia* ui. az aminosav-lánc közepén mélyen „eltemetve”, az említett vágáshely után található. Különös, hogy a HA proteolitikus hasítását a nyálkahártya felületére exkretálódó sejtenzim(ek) végzik el a vírus számára: a fúziós szekvencia ez által szabadul ki és fér hozzá a sejtmembránhoz. Az *aktív* fehérje HA1 és HA2 jelű alegységekből áll, amiket diszulfid hidak kötnék össze. Az eltérő virulenciájú vírusok proteolitikus hasításuk módjában, illetve a folyamat lejátszódásának a helyszínében különböznek.

Az *LP vírusok* HA0 fehérjéjét tripszin vagy tripszin-szerű enzimek hasítják, amik a bélrendszer és a légutak nyálkahártyájában megtalálható sejt felszíni (extracelluláris) enzimek. Ennek következtében az LP vírusok csak a bemeneti kapu helyén képesek szaporodni, és sejtkárosító hatásuk lokálisan, ezen szerveket érintő elváltozásokban érvényesül. Ezzel szemben a *HP törzsek* HA-ja, a már említett extra lúgos aminosavai miatt már aktivált formában épül be a virionba. Ezáltal lehetővé válik a vírus sejtől-sejtbe való közvetlen terjedése is, egy egész szervet érintő, sőt *generalizált* fertőzés kialakulásával.

A két virulencia-csoportba tartozó törzsek genomja közti alapvető különbség a HA protein vágáshelye előtti kötőszekvenciájának aminosav-mintázatában nyilvánul meg. Az LP vírusok kötőszekvenciájának általános képlete B-X-X-R (H5) és B-X-R (H7), ahol B jelentése bázikus aminosav (*arginin/R* vagy *lizin/K*), X jelentése pedig bármely más aminosav. Ezzel szemben a HP vírusok kötőszekvenciája – a vágáshelyhez képest -1 és

-4 (H5), illetve -1 és -3 (H7) pozíciók közötti helyeken – beékelődés (*inszerció*) vagy kicserélődés (*szubsztitúció*) révén további bázikus aminosavakkal gazdagodva *polibázikussá* válik. A kötőszekvencia mintázatát ismerik fel a vágáshelyen hasító extra- vagy intracelluláris enzimek.

Az AIV virulenciáját mindazonáltal több gén, illetve az egyes gének kölcsönhatása, azok meghatározott kombinációja is befolyásolja (Brown, 2000). Kísérletileg igazolt, hogy a HA gén vágáshelyének polibázikus jellege önmagában nem elegendő a magas patogenitású kórforma kiváltásához (Stech et al., 2009).

5.3. AZ INFLUENZAVÍRUSOK ÁLTAL OKOZOTT MEGBETEGEDÉSEK, A FERTŐZÉS JÁRVÁNYTANA

5.3.1. Az influenzavírus gazdaspektruma

A jelen téma szempontjából érdekes *A típusba* tartozó vírusok a madarakat (vadon élő és házimadarakat, illetve díszmadarakat), az emlősállatokat, valamint az embert is képesek megfertőzni.

5.3.1.1. Vadmadarak

Vadmadarakban AIV-t 2006-ig 26 család, több mint 100 fajában izoláltak (Olsen et al., 2006). A különböző vadmadár fajokban a vírus valamennyi HA (H1-H16 jelűek), illetve NA (N1-N9) altípusa előfordul, a populáció élőhelyétől, a vizsgált időszaktól és a gazdafajtól függően (Stallknecht and Brown, 2007; Webster et al., 2007). Így például a H14 és a H15 szubtypusokat az amerikai kontinensen ezidáig még nem tudták izolálni (Krauss et al., 2007), a H13 és a H16 szubtypusoknak pedig a sirályfélék a gazdái (Fouchier et al., 2005). A genomelemzés segítségével a vadmadarokból származó vírustörzseknél az egyes altípusokon belül *földrajzi* elkülönülést is megfigyelhetünk, így a vírusokat eurázsiai, amerikai és bizonyos esetekben ausztráliai csoportokra oszthatjuk fel (Donis et al., 1989; Webster et al., 1992). Ez a tagozódás arra utal, hogy a vírusok csak a különböző szubtypusok kialakulása után terjedtek el világszerte, majd ezt követően új helyükön folytatták a mai napig is tartó távolodásukat (*diverzifikációjukat*), létrehozva az egyes szubtypusokon belül jól felismerhető földrajzi vonalakat (Lomniczi, 2006). Az amerikai és az eurázsiai kontinensek közötti „átjárás”, és a világ távoli helyeiről, a vadmadarokból származó vírusok keveredése ritka; a többnyire csak egy-egy szegmensre korlátozódó csere a vándormadarak útvonalának részleges átfedéséből adódhat (Makarova et al. 1999; Olsen et al., 2006; Krauss et al., 2007).

A vírusok fenntartásában azért jut kiemelt szerep a vízimadaraknak, mert a vírus terjesztésében a víz elengedhetetlen közvetítő, lévén, hogy ezekben a gazdáknak a vírus a bél és a kloaka hámfájában szaporodik (Webster et al., 1992). Közülük messze a

legmagasabb fertőzöttséget a *lúdalakúak* (*Anseriformes*) rendjébe tartozó vadkacsa (réce) fajokban figyelték meg, míg a hattyúk és ludak, valamint a *lilealakúak* (*Charadriiformes*) rendjének tagjai (a csér- és a sirályfélék) alárendelt szerepet játszanak. Az a sokat emlegetett megállapítás, hogy a szabadvízi vadmadarak a madárinfluenza vírusok természetes gazdái és fenntartói, *rezervoárjai*, azonban nem úgy értelmezendő, hogy a háziállatok és ember influenzáit okozó vírustörzsek fenntartásában is részt vesznek, jóllehet nem kétséges, hogy utóbbiak eredetileg ebből a vadmadarak *primordiális vírus-pool*-jából származhattak. E vírusoknak annál inkább sem tulajdoníthatunk járványtani szerepet, mert fertőzéseik teljesen ártalmatlanok (Olsen et al., 2006; Fouchier et al., 2007). Vadmadarak megbetegedése igen ritka, csak kívülről érkező, házimadarak járványkiteréseit okozó AIV-törzsek fertőzése idézi elő, amint ezt a 2003-as H5N1 panzootia idején is láthattuk.

5.3.1.2. Házimadarak

A baromfi (pulyka, csirke, kacska) AIV-fertőzéseit, az ismétlések elkerülése végett, itt csak röviden tárgyalom, mert hátrább bővebben lesz róluk szó. Közel 10-féle HA-szubtípust ill. ezek bizonyos NA-kombinációit találták meg a különböző gazdafajokban. Zömük az LP kategóriába tartozik, és nagyobb földrajzi területeken belül maradnak. Kivétel talán a H9N2 kombináció, ami úgy tűnik, panzootiás jellegű. Minthogy e vírusok a légzőhámhoz *adaptálódtak*, terjedésükhöz a zsúfoltság és folyamatos fogékony gazda utánpótlása elengedhetetlen, a betegség manifesztációjához pedig a további hajlamosító tényezők (rossz higiénés körülmények). Nagyobb „termelési rendszerekben” *endémiás* fertőzés formájában maradnak fenn, így a baromfi *másodlagos és mesterséges rezervoárja* ezeknek a számára nem ártalmatlan vírusoknak.

A csirkéhez történt adaptálódás egy szélsőséges következménye az *LP→HP* átalakulás csirkében [5.2.3.], amely eddig csak a H5 és a H7 szubtípus esetében fordult elő. Ilyen, HP-törzsek okozta súlyos AI-járványok már a 19. század végén előfordultak, bár a kórokozó eredete természetesen nem volt tisztázott.

5.3.1.3. Emlősök

Az emlősök influenzajárványait okozó vírustörzsek valószínűleg nem közvetlenül vadmadaraktól, hanem inkább a baromfiból származnak (Webster et al., 1992). Vírusevolúciós és/vagy vírusjárványtani szempontból különbséget kell tenni az emlősök influenzájának két nagy csoportja közt (Lipatov et al., 2004).

Az egyik csoportban a madárból származó vírus *gazdaváltásával*, majd *adaptálódásával* „saját”, fajspecifikus influenzavírus-vonal alakult ki, és maradt fenn az adott emlősfajban. Ilyen átlépések a múltban többször is előfordultak, sőt napjainkban is keletkeznek (pl.

sertés eredetű H1N1/2009 emberben), de nemcsak madár→emlős, hanem emlős→emlős viszonylatban is. Az ismertebb fertőzési láncok: (i) *Emberben*: A 20. század három nagy humán influenza *pandémiáját* az A-típus H1N1 (spanyolnátha/1918), H2N2 (ázsiai/1957) és H3N2 (hongkongi/1968) szubtípusba tartozó vírusai okozták. (ii) *Sertésben*: klasszikus vagy amerikai H1N1 és különféle (amerikai és eurázsiai H3N2) stb. (iii) *Lóban*: H3N8 és H7N7 járványok.

A másik csoportba tartozó, emlősöknél észlelt megbetegedésekre jellemzően a vírus nem tud tartósan megtelepedni az érintett fajon belül, és a fertőzés elterjedése egy szűkebb körre (populációra) korlátozódik. Szélsőséges esetben minden egyes megbetegedés gazdaváltás eredménye, ahogy ezt a HP H5N1 járvány idején láttuk, és ma is történik (Subbarao et al., 1998). A tengeri emlősök (fóka) vagy pl. a nyérc ritka, de súlyos megbetegedéseit soroljuk ide (Berg et al., 1990; Webster et al., 1992; Ohishi, 2002).

Ezen túlmenően, a madár-emlős járványtani kapcsolat kétirányú is lehet: sertésből származó vagy sertés és madár eredetű géneket vegyesen tartalmazó „víruskeveréket” leggyakrabban az influenzára egyébként is különösen érzékeny pulykaállományokból izolálnak, elsősorban Észak-Amerikában (Wright et al., 1992; Choi et al., 2004a).

5.3.2. A baromfi AI-járványai

A következőkben röviden bemutatom a mai terminológiával HPAI és LPAI járvány történetét (Alexander (2000), Swayne et al. (2003) és Lomniczi (2004) összefoglalói alapján).

5.3.2.1. A jelentősebb HPAI járványok története

A HPAI fertőzésre utaló első dokumentum egy 1878-ban, csirkeállományokban lezajló, olaszországi járványt ír le. A kórokozót két évtizeddel később, 1901-ben, Olaszországban Centanni és Savunozzi izolálta először, és határozta meg vírus voltát (Petek, 1980). Az angol irodalomban *fowl plague*-nek, nálunk *Manninger* későbbi állásfoglalását követően *klasszikus baromfipestis*nek nevezték. A rákövetkező évtizedekből több *fowl plague*-ként jelölt, a H7 szubtípusba tartozó izolátum maradt fenn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A kezdetben két betegség lefolyásának hasonlósága alapján gyakran összemosódott a *Newcastle disease*-zel (nálunk ázsiaiinak nevezett baromfipestissel). A két kórképet a fertőzési kísérletek alapján *Doyle* különítette el egymástól 1927-ben. A vírust csak 1955-ben sorolták be az influenzavírusok közé (*Schäfer és Rott*; Swayne et al., 2003).

Magyarországon az első AI-járvány valószínűleg 1903-ban zajlott, az első hazai izolátum pedig 1969-ből, gyöngytyúkból származik (Tanyi, 1972b, d).

Az első dokumentált H5 szubtypusú HP-járvány (A/chicken/Scotland/1959 (H5N1)) óta eddig több mint 25 esetben írtak le H5 vagy H7 szubtypusba sorolt HPAIV okozta járványt (Capua and Alexander, 2004).

Ezek közül az 1983-84-ben, Pennsylvániában lezajlott H5N2 járvány segítette hozzá a kutatókat ahhoz a megállapításhoz, hogy az LP vírus – amely már hónapok óta, enyhébb tünetekkel jelen volt a terület több állományában – képes magas patogenitású vírussá alakulni csirkeállományokban. Az itt izolált törzsek tünetekben is megnyilvánuló virulencia-növekedése a polibázikus vágáshelyet elfedő oldallánc eltűnésével következett be (Kawaoka et al., 1984; Deshpande et al., 1987).

Az 1994-95-ös mexikói járvány, szintén H5N2 szubtypusú, de a pennsylvaniaival nem rokon vírusának kötőszekvenciája inszerció és szubsztitúció révén alakult polibázikussá, megnövelve így a vírus patogenitását (Horimoto and Kawaoka 1994; Horimoto et al. 1995).

Hogy a virulencia-fokozódás veszélye miatt, mennyire fontos az LP H5 és H7 fertőzések felismerése, azt jól példázza az 1999-ben indult olaszországi járványsorozat. A tünetek jelentkezésekor az ország – főként pulykatelepekkel zsúfolt – északi részén már igen nagy elterjedtséget mutatott a vírus apatogén változata, mivel azonban a vírus LP jellemzőkkel bírt, az akkori hatósági előírások még nem követelték meg az állományok felszámolását, és nem alkalmaztak szigorú járványvédelmi intézkedéseket sem. Így a magas patogenitásúvá vált vírus végigsöpört az ország északi állattartó telepein. Összesen 13 millió állat hullott el vagy került leölésre (Capua and Maragon, 2000, Capua et al., 2003).

Az olaszországi esethez hasonló okokra vezetik vissza a pakisztáni H7N3 LP→HP járvány okozta igen nagy mértékű veszteségeket is (Naeem et al., 2007).

A 2002-es chilei járványnál az LP vírus (H7N3) érdekes módon vált magas patogenitásúvá: a HA gén vágáshelyéhez rekombináció (vagyis csak egy rövid génszakasz kicserélődése) során, ugyanezen vírus NP génjéből származó, 30 nukleotidból álló szakasz épült be, polibázikussá téve a fehérjét (Suarez et al., 2004). A jelenség megismétlődött a 2004-es brit-kolumbiai H7N3 járványnál, ez utóbbinál azonban az M génből származott a HA génbe ékelődött 21 nukleotid (Pasick et al., 2005).

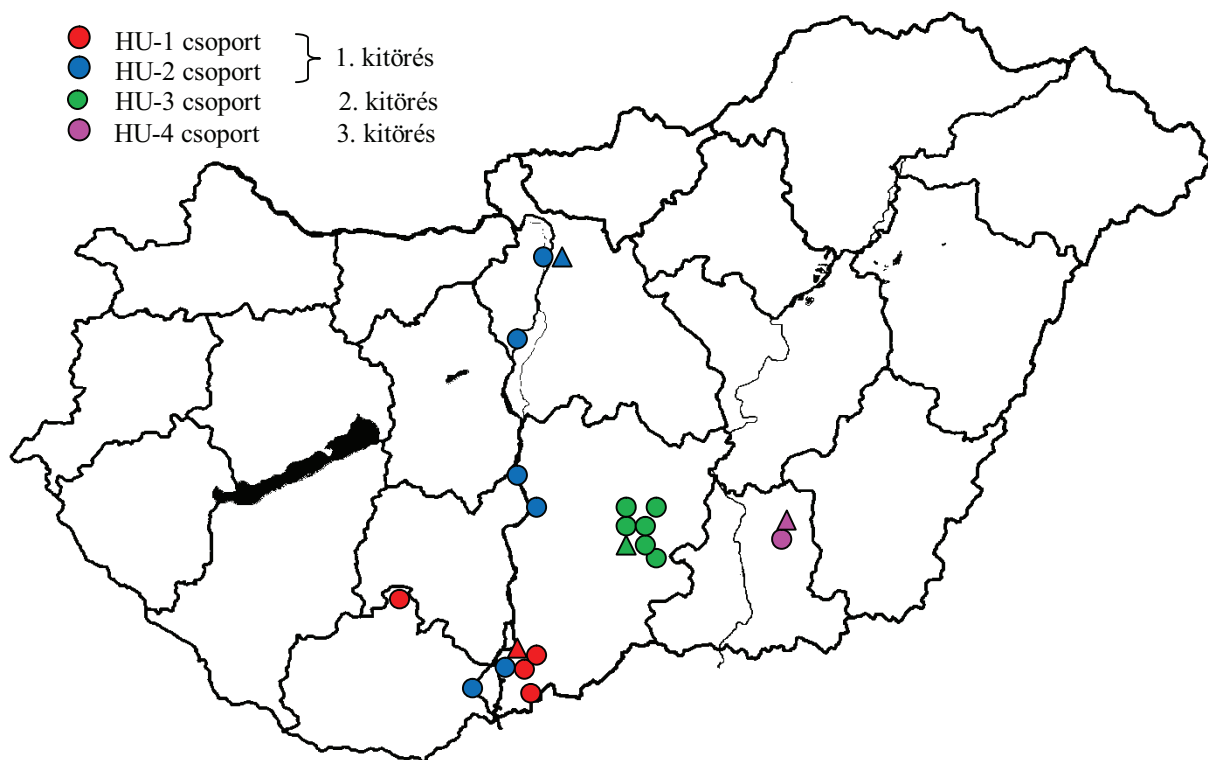
A fentiekkel ellentétben, az eddigi legnagyobb pusztítást végző 2003-as ázsiai H5N1 HPAI járvány vírusának nem találták meg a csirkékre nézve avirulens prekurzorát. A járvány a Kína déli részén fekvő Guangdong tartományban, egy házilúd telepről indult 1996-ban (indextörzs: A/Goose/Guandong/1/96 (H5N1)). Az itt izolált törzs HA génje egyéb (a belső gének tekintetében pl. egy H9N2 szubtypusba tartozó) madárinfluenza vírusokkal képzett reasszortánsa 1997-ben bukkant fel egy csirkeállományban nagy

pusztítást végző járványban (Guan et al., 1999; Xu et al., 1999). Az új reasszortáns azért keltett nagy riadalmat, mert ez volt az első, súlyos légzőszervi tünetekkel és halállal járó (a 18 megbetegedésből 6 esetben végzetes kimenetelű) *emberi* fertőzés, amelyben madárinfluenza vírus közvetlen úton jutott át madárról emberre; tehát előzetes humán vírussal történt reasszortáció vagy valamely emlősben végbement adaptáció nélkül (Subbarao et al., 1998). 2004-re Ázsia több országának baromfitelepein is endémiássá vált a különböző variánsok okozta fertőzés (Li et al., 2004). 2005 áprilisában a vírus egy újabb variánsával történt fertőzés vadmadarak populációiban vezetett nagyarányú pusztuláshoz: pár hét leforgása alatt több ezer vízi vándormadár elhullását jelentették északnyugat Kínából, a *Qinghai*-tó vidékéről (Chen et al., 2005). Ez az úgynevezett „*Qinghai*-típusú” HPAI H5N1 vírus a következő időszakban végigsöpört Közép-Ázsián át egészen a Fekete-tenger partjáig, majd 2006 januárja és márciusa között *18 európai országban* okozott jelentős elhullást mind a házi, mind a vadon élő állatok körében. Európán belül a nyugati irányú, rövidebb távú terjedést a 2006 januári szokatlan vadmadár-vándorlással magyarázzák (Weber et al., 2007; Kilpatrick et al., 2006).

Bár a vírus Európába kerülésének módja mindeddig ismeretlen maradt, az európai kitérőek egyidejű és tömeges megjelenése a vadmadarak és a baromfikereskedelem együttes járványközvetítő hatására utal (Kilpatrick et al., 2006). Egyesek a kereskedelmi útvonalakat látják lefedve a járványkitérőek helyszínei és időbeli előfordulásai által, s ezért az ázsiai gócpontú járvány nyugati terjedésében fontosabbnak tartják az emberi tényezőt (Gauthier-Clerc et al., 2007). Mások szerint viszont az endémiásan fertőzött Ázsiából, főként a vadmadarak vándorlása révén került Európába a vírus (Kilpatrick et al., 2006). Létezik egy nemzetközi kutatás, amely kizárólag a vadmadarakkal történt terjedés rekonstruálását tűzte ki célul (Veen et al., 2007). Ebben meghatározták azokat a madárfajokat, amelyek Ázsiából Európába a legnagyobb valószínűséggel hozhatták, illetve a kontinensünkön belül terjeszthették a fertőzést. Vizsgálták továbbá, hogy mely madarak tartozhatnak a vadmadarak és a baromfitelepek között járványtani kapcsolatot teremtő, ún. „hídfajok” közé. Csakhogy olyan tünetmentes és vírus-hordozó vándormadarakat nem sikerült találni. Ezen túlmenően több tanulmány is az eddigi vizsgálatok gyenge pontjaira hívja fel a figyelmet, és szorgalmazza a vadmadarakat érintő ökológiai és madártani adatok nagyobb mértékű figyelembevételét (Feare et al., 2006; 2007; Yasué et al., 2006; Gauthier-Clerc et al., 2007; Guberti, 2007). Több esetben nehézséget okozott a vadmadár fajának meghatározása, de még a baromfitól való elkülönítése is: vagy azért, mert a két csoport morfológiailag nagyon hasonló, vagy, mert nyílt vízi tartásban vadmadár fajokat nevelnek háziállatként (Feare et al., 2006; Yasué et al., 2006). Sajnálatosan jellemző példa erre az *indiai vadludak* (*Anser indicus*) hosszútávú terjesztő szerepének tényként való prezentálása, a *Qinghai*-tó melléki, eddig

legnagyobb vadmadár-pusztulás kapcsán, jóllehet: mint utóbb kiderült, a fertőzést nem ezek hozták be, hanem a természetvédelmi területen folytatott csirketartás volt felelős. Mivel az eset a járvány elején történt, az indiai vadlúd vált a nagy távolságra való terjesztés szimbólumává, a valóság viszont utólag már alig befolyásolhatta a véleményeket (Butler, 2006).

Magyarországon már a kitörési esetek idő- és térbeli eloszlása, valamint az áldozatul esett madarak faji hovatartozása is arra utalt, hogy három, egymástól független járványvonulattal/menettel lehet dolgunk (Pálmai és mts., 2007). Ezért az alábbiakban járványtani hátterét külön-külön ismertetem (1. ábra).



1. ábra. A hazai HPAI H5N1 kitörések helyszínei. A négy különböző variáns okozta fertőzéseket, a különböző színű körök jelölik. A kiválasztott reprezentatív törzsek izolálási helyszíneit háromszögek mutatják.

Első kitörés (2006 február-március)

Magyarországon a H5N1 járvány 2006. február 6-án jelentkezett először, amikor az ország déli részén, a Duna-Dráva Nemzeti Parkhoz tartozó Duna-menti árterek és mellékágak környékéről (Bács-Kiskun megye) *bütykös hattyúk* (*Cygnus olor*) elhullását jelentették (1. ábra). Ezt pár nappal később, az első kitörés helyétől 60-200 km-rel északra, Pest, Baranya és Tolna megyei esetek követték, a Duna mellett összegyűlt vad

vízimadarak között. A H5N1 fertőzőtségre vírusizolálással is megerősített hattyútetemek felbukkanása heteken keresztül folyamatos volt. Az utolsó pozitív esetet 2006. 03. 22-én állapították meg. Összesen 12 településen erősítették meg a magas patogenitású H5N1-törzs jelenlétét. A közel két hónapig tartó járvány alatt 2109 beküldött minta került feldolgozásra (50% vadmadár, 30% galamb és gerle, 16% víziszárnyas és 4% baromfi). Ebből 60 bütykös hattyú, 1 szárcsa, 1 dankasirály, 1 kormorán és 1 tőkés réce bizonyult pozitívnak a vírusizolálás során (Pálmai és mts., 2007). Figyelemre méltó, hogy a zárlat alatt lévő területeken végzett ellenőrzővizsgálatok baromfi fertőzőtségét nem mutatták ki.

A következő 2 hónapban a területen végrehajtott szűrővizsgálat során 284 mintából (51 galamb, 30 víziszárnyas, 112 baromfi és 91 vadmadár) egyetlen esetben sem sikerült vírust kimutatni.

Második kitörés (2006 június-július)

A járvány második hulláma június 3-i bejelentéssel indult, amikor is szabadon tartott növendék *libákban* észleltek általános és idegrendszeri tünetekkel kísért megbetegedéseket, ezúttal is Bács-Kiskun megyében (Ivanics és mts. 2007a; b). Az elhullások száma a következő napokban meredeken emelkedett, ezért napokon belül az állományt leölték. Az utolsó járványkitörés időpontjáig (2006. július 12.) a megye kb. 50 km átmérőjű területén összesen 29 állományban (13 liba-, 11 pekingi kacsá-, 4 mulardkacsá-, valamint 1 vegyes állományban) jelentkezett fertőzés (1. ábra). A járvány során az Országos Állategészségügyi Intézetben 3811 vérmintát 8374 kloaka vagy légcső tampon mintát és 800 baromfitetemet vizsgáltak meg. A fertőzött és a zárlatok miatt érintett, összesen 675 telepen közel 1 millió állatot öltek le. A járvány rendezése összesen 2 milliárd forintba került.

Harmadik kitörés (2007 január)

Január 21-én egy 3300 *ludat* szabadtartásban nevelő Csongrád megyei törzsállományból (1. ábra) jelentettek egyre emelkedő arányú elhullást, illetve idegrendszeri tünetekkel járó megbetegedést. A diagnosztikai vizsgálatok megerősítették a madárinfluenza gyanúját, ezáltal az állomány leölésre került. Azonban egy héten belül, egy 9 km távolságra lévő növendékludakat tartó telepen is jelentkezett a fertőzés, ahol a járvány további útját sikerült elvágni. Ezen harmadik járvány során összesen 2600 állat hullott el, 6800 állatot pedig leöltek. A harmadik hullám idején annak a gyanúja merült fel az egyik *angliai* pulykanevelő telepen kitört megbetegedéssel kapcsolatban, hogy a vírust Magyarországról hurcolták be. Annak ellenére, hogy mindkét vírus teljes

genomszekvenciáját meghatározták, az átviteli kapcsolat nem volt értékelhető (Defra, 2007; Irvine et al., 2007). Ennek részleteit a Megvitatásban ismertetem.

Magyarországon a járvány ideje alatt *humán* eseteknek még a gyanúja sem merült fel. Napjainkig újabb járványkitörést nem észleltek.

A HP H5N1 járvány számos *újdonst* hozott az AI történetébe. (i) Szemben az eddig tapasztalt AI-járványokkal, ahol a kisebb-nagyobb területen szóródott LP AIV vált patogénné csirkeállományokban, és a HP járvány további útja a fertőzött állomány felszámolásával vagy kipusztulásával rövidesen véget is ért (Röhm et al., 1995), addig a H5N1 járvány patogén formában terjedt el, és nőtt világméretű járvánnyá (*panzootiává*). (ii) A gazdaspektrum változásával megbetegedtek az eddig ellenállónak tartott *házikacsák* is. (iii) További érdekessége a világjárványnak, hogy a csirkében magas patogenitásúvá alakult variáns átkerült *a vadmadarakba*, és ott nagyarányú elhullással és terjedéssel járó megbetegedést okozott (Sturm-Ramirez et al., 2004; Chen et al., 2005; Liu et al., 2005). (iv) Az *emlősök* fogékonyosságát illetően már a járvány kezdetén hozott változást a vírus, és ez volt az, ami miatt tulajdonképpen már 1997-ben felfigyeltek rá: a baromfiról közvetlenül az emberre átterjedt súlyos fertőzések. Több száz ember betegedett meg, és közülük valamivel több, mint a fele halt meg madárinfluenza fertőzés következtében (WHO, 2009). Az attól való kezdeti félelem, hogy a H5N1 vírus emberhez olyan sikeresen adaptálódna, hogy egy folyamatos fertőzési lánc kialakulásával, az 1918-as spanyolnáthához (H1N1) hasonló pandémia jönne létre, szerencsére mind a mai napig nem igazolódott be. Újabb kutatási eredmények a mostani H5N1 és az 1918-as H1N1 vírusok patogenitását érintő közös tulajdonságot mutatnak: az emlősök tekintetében a virulencia fokozódásával járó, PB1-F2 génen történt pontmutáció (S66N) meglétét (Conenello et al., 2007). Ugyanakkor az 1918-as H1N1 szubtypusú vírus magas patogenitásának oka egyelőre még nem tisztázott; pl. a HA vágáshelye monobázikus, ami a csirkében az alacsony patogenitású törzsekre jellemző (de Jong et al., 2006). (v) Néhány esetben még influenzára egyébként nem fogékony *emlősfajok*, mint például macskafélék (házimacska, tigris és leopárd) (Keawcharoen et al., 2004; Klopfeisch et al., 2007) vagy kutya (Songserm et al., 2006) is megbetegedtek, influenzában elpusztult barimfihulla etetése miatt. A 2003-as, nagy veszteségeket okozó *hollandiai H7N7* járvány esetében szintén nagy számban fertőződtek az elfojtásban részt vevő személyek (Fouchier et al., 2004; Koopmans et al., 2004).

5.3.2.2. Az LP járványok jelentősége

Felismerve a fokozottan patogén járványok kialakulásának módját, ezáltal az avirulens H5 és H7 szubtypusú vírusok elterjedésének lehetséges komoly következményeit, nagyobb figyelem irányult az ezen alcsoportokba tartozó LP fertőzésekre és visszaszorításukra. A fertőzés korai diagnosztizálása és a fertőző betegségek esetén alkalmazott intézkedések nagyban segíthetik a veszteségek csökkentését és a HP járvány kialakulásának kockázatát (Alexander, 2003; Capua and Alexander, 2004; Elbers et al., 2004). Ezt kiegészítendő, egyes területeken – pl. Olaszországban, Pakisztánban vagy Mexikóban – vakcinázással próbálják visszaszorítani a házimadarak fertőzöttségét (Capua et al., 2003, Villarreal-Chávez and Rivera-Cruz, 2003).

Természetesen az egyéb szubtypusba tartozó LP vírusok okozta fertőzéseket sem lehet figyelmen kívül hagyni (Alexander, 2007). Akár tünetmentesen, akár csak enyhe tünetekben mutatkoznak, az állományban igen jelentős gazdasági kárt okozhatnak. A veszteségek adódhatnak az érintett állomány csökkent növekedéséből, a tojástermelés visszaeséséből, a másodlagos fertőzések kezelési költségeiből vagy a betegség okozta elhullásokból, továbbá az állomány kényszervágásából, leöléséből, a telep fertőtlenítéséből és a teljes újratelepítéséből. A baromfiállományokban az LP vírusok fennmaradását, keveredését és új reasszortációk létrejöttét több tartástechnológiai tényező/hiba is elősegíti (Lomniczi, 2006). Ezek közé tartozik: (i) a nagy állománysűrűség, mivel az érintett sűrűn telepített területeken a fertőzés feltartóztatása egyszerűen nem tudja utolérni annak terjedését. Ennek tulajdonítható, hogy Kínában vagy Észak-Olaszországban a H6 és H9 szubtypusú törzsek is nagy problémát okoztak/okoznak (Capua et al., 2003); (ii) Az élőállat-piacok rendszere elsősorban Észak-Amerikában és Ázsiában (Senne et al., 1992; Liu et al., 2003; Suarez et al., 2003), ahol különböző baromfifajokat zsúfolnak össze az ország távoli részeiből, ráadásul az állatok fertőzöttségének egyedi vizsgálata természetesen kivitelezhetetlen. Újabban, a H5N1 járványból levont következtetésekből okulva, már külön élőállat piacokat biztosítanak a víziszárnyasoknak, illetve a csirkéknek és a fürjeknek, valamint hetente egy-egy szünnapot iktatnak be a kereskedés menetébe (Kung et al., 2003; Sims, 2007); (iii) A vízi- és nem vízibaromfit nyílt tőrendszerekben együtt nevelő vegyes tartási mód Ázsiában, amely lehetőséget nyit tünetmentes fertőzési láncok fenntartására házikacsák útján (Alexander, 2000; Hulse-Post et al., 2005).

Az LP vírusok közül a *H9N2 szubtypusba* tartozó törzsek kiemelkedő jelentőséggel bírnak, mivel az utóbbi évtized során széles körben elterjedtek mind az eurázsiai, mind az amerikai kontinensen (Alexander, 2000; Capua and Alexander, 2004). A szubtypus kiválasztódásának és sikeres előretörésének oka még felderítetlen, mindenesetre a két földrész járványai között nincs rokonsági kapcsolat, vagyis egymástól függetlenül tett

szert a két H9N2 szubtypus vonal a terjedéséhez szükséges valamely előnyös tulajdonságra. Ezen túlmenően, még Ázsián belül is nagy a szubtypus genetikai változatossága, és a folyamatosan zajló – többek között a HP H5N1 vírus egyes génjeivel is képzett – reasszortáció révén több, eltérő tulajdonsággal rendelkező variáns alakult ki egymás mellett (Guo et al., 2000; Choi et al., 2004b). Ismeretes, hogy az ázsiai H5N1 jelű vírus belső génjei, reasszortáció révén, eredetileg egy H9N2 szubtypusú vírustól származtak (Guan et al. 1999). Néhány esetben, Kínában, a H9N2 is átjutott madárról közvetlenül emberre (Lin et al., 2000, Butt et al., 2005; Xu et al., 2007).

A hazai LP járványokat – és ezáltal a rendelkezésünkre álló régi vírusok hátterét – Dr. Tanyi János, elsősorban a Magyar Állatorvosok Lapjában (Tanyi, 1970; 1972a, b, c, f; 1976b; 1983;) és disszertációiban (Tanyi, 1973, 1997b) közöltek alapján ismertetem. A terület nagyüzemi baromfiállományaiban több éven keresztül folytatott szűrőpróbaszerű vírusizolálást, vagy olyankor, amikor azokban influenzára gyanút adó körülmények merültek fel (Tanyi, 1976a). A megbetegedési esetek, amelyekből a vírustörzsek származtak Magyarország keleti térségében (Tanyi, 1976a), házikacsa-, gyöngytyúk- és pulyka-állományokban jelentkeztek, leggyakrabban a késő nyári és az őszi hónapokban (Tanyi, 1995). Az általa 1969 és 1987 között izolált AIV-törzsek fontosabb adatai a 2. táblázatban láthatók.

A vizsgált telepek mindegyikén említ tartási, takarmányozási és higiénias problémákat, ami nem elhanyagolható körülmény, ismervé az avirulens AI faktorbetegség jellegét (Varga és mts., 1999). Néhány esetben kacsahépatitisz és baromfikolera fertőzést is diagnosztizált. Az általa megfigyelt állományokban a fertőzés lefolyása többnyire hasonló volt: A 2-4 hetes korcsoportokban általános és légzőszervi tünetek (*sinusitis*) és akár 10%-os elhullási arány jelentkezett. A *kifejlett* kacsákban is általános tünetek és az elhullások arányának enyhe emelkedése volt megfigyelhető, amelyet a tojóállományoknál a tojástermelés és a kelési százalék sokszor drasztikus csökkenése kísért. Mindazonáltal a kísérletes állatfertőzések során többnyire nem tudták kiváltani a betegség tüneteit, ami önmagában még nem mond ellent annak, hogy az AIV-törzsek szerepet játszhattak a megbetegedések kiváltásában.

Az állományok közötti terjedésért a kereskedelem közvetítette vírusátvitelt tartották felelősnek (Tanyi, 1995), de vírusforrásként felmerült a hortobágyi vadmadár-populáció is, különösen, hogy a tartási rendszer nyíltak volt tekinthető (Tanyi, 1976c ;1995).

A HA szubtypusát hemagglutináció-gátlási (HAG) próbával határozták meg. Az 1. táblázatban az izolátumok állatfajonkénti és szubtypus-szerinti, összesített eloszlását tüntettem fel.

1. táblázat. Dr. Tanyi János által, 1969 és 1987 között izolált törzsek állatfajonként és szubtípusonként összesítve.

állatfaj	H3	H4	Hav 3-4	H5	H6	H7	H10	H11	nem besorolt	összesen
házikacsa	1	14	2	3	4		5		11	40
pézsmakacsa				2	2					4
vadkacsa									3	3
gyöngytyúk						2		1	6	9
pulyka			2			21	3		10	36
összesen	1	14	4	5	6	23	8	1	30	92

A magyarországi vadmadár populációk AIV-fertőzöttségét abban az időben Romváry és munkatársai vizsgálták (Romváry és mts., 1976a; b). Ők összesen 3 törzset izoláltak a Tisza mellett, tőkés récékből (*Anas platyrhynchos*), amik a H6-os és a H11-es szubtípusba tartoztak. A vadmadarak tartózkodási helyének közelében fekvő házikacsa és fogságban nevelt tőkés réce telepeken H6, H11 és H5 szubtípusú antitesteket mutattak ki néhány állatból. A Budapesti Állatkertben tartott, vagy berepült madarakban pedig H3-, H5- és H10-szeropozitivitást találtak.

5.3.3. A madárinfluenza vírus okozta tünetek

Egy állomány vagy populáció madárinfluenza vírussal történt fertőzésének tünetmentes vagy éppen tünetekkel járó jellegét és a kialakult tünetek súlyosságát számos tényező befolyásolja (Swayne et al., 2003). Az általánosak közül ide tartoznak a különböző stressz-faktorok, így a nem megfelelő tartási és takarmányozási körülmények és az állomány egyéb kórokozókkal (pl. *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*) való terheltsége. Ezek az LP vírusokkal történő fertőzés klinikai megjelenését szinte minden esetben súlyosbítják.

A specifikusabb tényezők közül, amint az a fentiekből is kiderült, a fertőzés kimenetelénél az egyik döntő kérdés az érintett állat *faja*. A vadmadarak természetes fertőzése tünetmentes. Megbetegedést eddig mindössze két esetben észleltek. Az elsőt egy H5N3-kombináció okozta halászmadarokban, 1961-ben Dél-Afrikában (A/tern/South Africa/1961), mivel azonban a törzs magas patogenitású volt, nem lehetett kétséges a külső, csirkeállományból való eredet (Alexander, 2000). A másik, a panzootiás ázsiai HP H5N1 vírus okozta vadmadár-pusztulások, melyek mögött, amint ezt utólag kiderült, gyakran ott állt az „emberi tényező” és természetesen a baromfijárványok. A baromfifajok közt is különbséget kell tennünk a fogékonyabb, főként tyúkfélék egyedei (elsősorban a pulyka és a csirke, de a gyöngytyúk, a fácán és a fogoly is fokozottan érzékeny), valamint a kevésbé fogékony vízibaromfi közt. Az előbbieket körében

gyakrabban fordul elő megbetegedés, ezzel szemben a házi vízibaromfi többnyire tünetmentes hordozóként vészeli át, és adott esetben tartja is fenn endémiás jelleggel az akár fokozottan patogén vírussal való fertőzést is (Hulse-Post et al., 2005).

A tünetek megjelenésének különbözőségeire az állatok *életmódja* is hatással lehet: míg a vízibaromfi főként a bélcsatornára szorító tüneteket mutat, addig a szárazföldi madarakra inkább a légzőszervi megbetegedés a jellemző (persze a HP vírusok mindkét esetben generalizált, teljes szervezetet érintő megbetegedést okoznak). A különbség elsősorban a vírus terjedéséből fakad: vagy a bélsárral ürül nagy mennyiségben, és a víz közvetítésével fertőz (pl. a 0°C hőmérsékletű vízben a vírus akár több, mint 30 napig fertőzőképes lehet (Stallknecht et al., 1990)), vagy a levegőbe jutva, cseppfertőzés révén a légutakat támadja. LP AIV-fertőzés hatására tojóállományokban a reprodukciós zavarok mellett, a megbetegedések és elhullások száma is magasabb, különösen a termelési periódus csúcán, illetve a nagyobb termelési szintű csoportokban (Tanyi, 1972a, b; 1983).

A fentiek mellett a tüneteket befolyásoló másik lényeges tényező a *vírus patogenitása*. A *HP vírusok* okozta fertőzés fogékony állományban minden esetben manifesztálódik, és akár 100%-os morbiditással és mortalitással jár (a fertőzés olyan súlyos is lehet, hogy az elhullások hirtelen, tünetek nélkül, ún. *perakut* formában jelentkeznek).

5.4. VÉDEKEZÉS

5.4.1. Jogszábeli változások

A HPAI-járványok megfékezéséhez szükséges Európai Uniósi eljárási rendet, és az ehhez kapcsolódó fogalom-meghatározásokat, valamint járványvédelmi szabályokat és intézkedéseket az utóbbi néhány évben átalakították (Pittman, 2007). Ezt a kérdést azért érintem itt, mert jó példája annak, hogy a tudományos kutatás eredményei hogyan változtatták meg a védekezés koncepcióját. A módosítás a *potenciálisan* magas patogenitásúvá váló H5 és H7 szubtypusú, LP járványok megfékezését célozza meg, az ezekre vonatkozó bejelentési kötelezettség és a szigorúbb járványvédelmi intézkedések bevezetésével. Ennek fontos eleme az évenkénti szerológiai és virológiai monitoring (EU Tanácsa, 2005) a tünetmentes H5 vagy H7 fertőzés felfedezésére. A változtatás szellemét az is jelzi, hogy az újabb, 2005-ben készült 2005/94/EK jelölésű tanácsi irányelv (EU Tanácsa, 2006) az állatok kíméletét is figyelembe veszi a járványvédelmi intézkedések előírása során.

5.4.2. Vakcinás védekezés

Az AI-járvány elleni védekezés része lehet a vakcina alkalmazása, amely azonban szigorú Európai Uniói szabályozás alatt áll. Ennek fontos kitétele az olyan oltóanyag használata, amely lehetővé teszi a *vakcinázott és a fertőzött állományok elkülönítését* (EU Tanácsa, 2005). Az új rendelkezések a vakcinázás lehetőségét kibővítik annak érdekében, hogy minél kevesebb állat kerüljön leölésre. Az egyik lényeges változás, hogy – a korábbi előírástól eltérően – *preventív vakcinázás* is megengedett azokon a területeken, ahol a háziállatok fertőzési veszélye folyamatosan fennáll. További eltérés, hogy *endémiás* területeken rutinszerű vakcinázás alkalmazható a H5 és a H7 szubtípusú LP vírus ellen is, a fertőzés terjedésének visszaszorítása céljából. Ezekon kívül, a régi szabályozás szerint is megengedett rövidtávú, ún. *sürgősségi* vakcinázás végezhető a már kialakult járvány megfékezésére.

Az állományok vakcinázása azonban kizárólag a szigorú járványvédelmi szabályok betartása mellett lehet hatékony eszköz a fertőzés továbbterjedése ellen. Ennek az az oka, hogy a vakcina a tünetek kialakulását, és az állatok elhullását megakadályozhatja ugyan, ám a vírus szaporodását, ürülését és terjedését csupán csökkenteni tudja. A járványügyi intézkedések nélkül végzett oltási program vezethetett Mexikóban és Pakisztánban a H5, illetve H7 LPAI törzsek *endémiássá* válásához a baromfiállományokban, amely fertőzöttség Damoklész kardjaként lebeg felettük az időről-időre valóban realizálódó HPAI-járvány kialakulásának veszélyével (Swayne et al. 1999; Villarreal-Chávez and Rivera-Cruz, 2003; Capua and Maragon, 2007).

Az oltóanyagok fejlesztésénél figyelembeveendő szempont, hogy *élő* vírust tartalmazó vakcina, a reasszortáció veszélye miatt, *nem alkalmazható*. A hagyományos oltóanyagok vagy inaktivált törzseket tartalmaznak vagy rekombináns-alegység vakcinák (OIE, 2009), és HA szubtípus-specifikusak (Swayne et al., 2003).

6. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1. A VIZSGÁLATOK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ VÍRUSTÖRZSEK

6.1.1. A régi, hazai influenzatörzsek eredete

A régi, hazai madárinfluenza járványok felderítéséhez szükséges vírustörzsek a Debreceni Állategészségügyi Intézet (ma: az MGSzH-ÁDI debreceni laboratóriuma) törzsgyűjteményében maradtak fenn. A kb. 90 különböző, több esetben azonos járványból származó izolátumot (2. táblázat) Dr. Tanyi János gyűjtötte kelet-magyarországi pulyka, kacska és gyöngytyúk telepeken, az 1969-től 1987-ig terjedő időszakban észlelt megbetegedésekből.

2. táblázat. A debreceni intézetben liofilizált formában fennmaradt, 1969 és 1987 közötti időszakban izolált AIV-k listája és a kitörések némelyikéhez kapcsolódó korabeli irodalmi hivatkozás. A genetikai vizsgálatra kiválasztott törzseket félkövéren szedtük. *: a régi nevezéktan szerinti jelölés, a mai nomenklaturával: a Hav3=H11 szubtípusnak felel meg.

Vírusterzs	Szuberpus	Jelölés	Gazdafaj	Dátum	MÁL hivatkozás
		1061-V/B2/80		1980.12.18.	
	H10	941-V/TLcs/87	pulyka	1987.05.12.	
	H10	1058-V/87 (1675-V/86)	pulyka	1987.06.23.	
	H10	1191-V/87 (1675-V/86)	pulyka	1987.06.23.	
		1561-V/T/87	pulyka	1987.09.21.	
A/turkey/Hung/22/85		1632-V/TL/III/85	pulyka	1985.10.10.	
A/duck/Hung/1/235/70	H6N2		kacska		Tanyi, 1972a Tanyi 1972c
A/duck/Hung/2/265/70	H4H11		kacska		
A/duck/Debrecen/70/265/70	H4H11		kacska		
A/duck/Hung/3/70	H4		kacska		
A/duck/Hung/11/75	H5	770-V/75	kacska		
A/duck/Hung/1/82		917-V/T	kacska		
A/duck/Hung/2/82	H4	918-V/T	kacska		
A/duck/Hung/3/82		918-V/S1	kacska		
A/duck/Hung/4/82		918-V/S2	kacska		
A/duck/Hung/5/82		918-V/S3	kacska		
A/duck/Hung/6/82		918-V/S4	kacska		
A/duck/Hung/2/84	H6	1164-V/84	kacska		
A/duck/Hung/1/84		1134-V/T/84	kacska		
A/duck/Hung/1/87	H10	660-V/25/87			
	H10	660-V/40/A/87			
	H10	660-V/40/TLcsNycs/87			
		397-V/74		1975.02.28.	

A/muscovy duck/Hung/1/75	H5	733-V/75/ pézsmakacsa	p.kacsa		Tanyi, 1995
A/duck/Hung/2/77	H5	720-V/77	kacsa		
A/duck/Hung/2/70	Hav3-4*		kacsa		Tanyi, 1972e
A/duck/Hung/3/70	H4		kacsa		
A/duck/Hung/4/70	H4		kacsa		
A/duck/Hung/1/75	H10?	398-V/75/kiskacsa	kacsa		
A/wild duck/Hung/75/2	?	633- V/75/növ.vadkacsa	vadkacsa		Tanyi, 1995
A/duck/Hung/1/75	H10	398-V/75/ kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/2/75	H6	398-V/75/kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/3/75	H5	553-V/75/kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/4/75	H4	553-V/100/75/ kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/5/75	H4	570-V/T/75	kacsa		
A/duck/Hung/5/75	H4	570-V/T/75	kacsa		
A/duck/Hung/6/75	H4	591-V/75/kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/7/75	H4	614-V/75	kacsa		
A/duck/Hung/9/2/75	H4?	715-V/2/75/kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/8/3/75	H4?	715-V/3/75/ kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/8/4/75	H4?	715-V/4/75/kiskacsa	kacsa		
A/duck/Hung/10/75	H4?	746-V/75	kacsa		
A/duck/Hung/1/74			kacsa		
A/duck/Hung/2/74			kacsa		
A/duck/Hung/1/77	H6	720-V/77	kacsa		
A/muscovy duck/Hung/1/76	H6		pézsmakacsa		Tanyi, 1995
938-V/81	H7?		kacsa		
A/duck/Hung/Debrecen/265/70			kacsa	1970.11.03.	Tanyi 1972f
A/wild duck/Hung/633-V/T/75			vadkacsa	1975.08.12.	Tanyi, 1995
A/wild duck/Hung/633-V/S/75			vadkacsa		
A/muscovy duck/Hungary/1/76	H6	650-V	pézsmakacsa	1976.09.24.	
A/muscovy duck/Hung/1/75	H5	733-V	pézsmakacsa		
		1868-V/88	kacsa	1988.09.20.	
A/turkey/Hung/1/85	H7	1267-V/T/11/85	pulyka		
A/turkey/Hung/2/85	H7	1267-V/Pf/11/85	pulyka		
A/turkey/Hung/3/85	H7	1267-V/T/9/85	pulyka		
A/turkey/Hung/4/85	H7	1267-V/Pf/9/85	pulyka		
A/turkey/Hung/5/85	H7	1298-V/T/9/85	pulyka		
A/turkey/Hung/6/85	H7	1298-V/Pf/9/85	pulyka		
A/turkey/hung/7/85	H7	1298-V/T/11/85	pulyka		
A/turkey/Hung/8/85	H7	1318-V/T/13/85	pulyka		
A/turkey/Hung/9/85	H7	1318-V/Pf/13/85	pulyka		
A/turkey/HUng/10/85	H7	1318-V/T/15/85	pulyka		
A/turkey/Hung/11/85	H7	1318.V/Pf/15/85	pulyka		
A/turkey/Hung/12/85	H7	1318-V/T/10/85	pulyka		
A/turkey/Hung/13/85	H7	1326-V/T/10/85	pulyka		
A/turkey/Hung/14/85	H7	1326-V/Pf/10/85	pulyka		
A/turkey/Hung/15/85	H7	1326-V/T/12/85	pulyka		
A/turkey/Hung/16/85	H7	1326-V/Pf/12/85	pulyka		
A/turkey/Hung/17/85	H7	1353-V/H/10/85	pulyka		
A/turkey/Hung/18/85	H7	1353-V/T/10/85	pulyka		

A/turkey/Hung/19/85	H7	1387-V/tenyészt	pulyka		
A/turkey/Hung/20/85	H7	1387-V/növendék	pulyka		
A/turkey/Hung/21/85	H7	1455-V/TLcs	pulyka		
		1675-V/TLcs/86	pulyka		
	H6	1061-V/2/80	pulyka		Tanyi, 1983
	H6	1061-V/8/80	pulyka		
	H6	1061-V/11/80	pulyka		
	H6	1061-V/B2/80	pulyka		
	H6	1118-V/4/80	pulyka		
	H6	1118-V/5/80	pulyka		
A/guinea fowl/Hung/1/69	Hav3-4*		gyöngytyúk		Tanyi, 1972b Tanyi, 1972d
A/guinea-fowl/Hung- Debrecen/69		30/1/70	gyöngytyúk		
A/guinea fowl/1/72	Hav 3-4*		gyöngytyúk		
A/guinea fowl/Debrecen/ 130/70			gyöngytyúk		
A/guinea fowl/ Hung/2/75	H11?		gyöngytyúk		
A/guinea fowl/Hung/3/75	H7?		gyöngytyúk		
A/guinea fowl/Hung/1/84	H7		gyöngytyúk		
A/guinea fowl/Hung/2/76		367-V/76	gyöngytyúk		
A/guinea fowl/Hung/1/76		356-V/76	gyöngytyúk		
		1911-V/84	gyöngytyúk		
		1916-V/84	gyöngytyúk		

A fenti táblázatban szereplő törzsek közül 15 olyan vírustörzset választottunk ki genetikai vizsgálatainkhoz, amelyek az izolátumokat beazonosító adatok és az irodalmi ismeretek (Tanyi, 1970; 1972a, b, c, f; 1973; 1976b, 1983; 1997b) alapján nagy valószínűséggel külön eseteket, vagy éppen ellenkezőleg – a H4 szubtypusnál – egy járványmenetet reprezentálhattak (3. táblázat). A genetikai vizsgálatot a kiválasztott törzsek külső fehérjéit kódoló, a szubtypusba sorolás alapját adó géneken (HA és NA), valamint a belső fehérjéit kódoló gének közül az NS szegmensnek egy-egy szakaszán kívántuk elvégezni.

3. táblázat. A genetikai vizsgálatra kiválasztott régi törzsek

Izolátum	Szubtypus
A/duck/Hung/3/70	H4
A/duck/Hung/Debr/265/70	H4
A/duck/Hung/1/235/70	H6N2
A/guinea fowl/Hung/1/72	H4
A/guinea fowl/Hung/2/75	H11?
A/duck/Hung/3/75	H4
A/duck/Hung/4/75	H4
A/duck/Hung/8/3/75	H4

A/duck/Hung/1/75	H10
A/duck/Hung/11/75	H5
A/muscovy duck/Hung/1/75	H5
A/duck/Hung/2/77	H5
A/duck/Hungary/2/82	H4
A/duck/Hung/660/87	H10
A/turkey/Hung/1561/87	?

6.1.2. A hazai HP H5N1 járvány vizsgálatra kiválasztott tagjai

A 2006 és 2007 közötti időszak járványkitörései során a beérkezett minták teljeskörű diagnosztikai vizsgálatát elvégezték Intézetünkben. Ezt követően a 64 vadmadárból és 31 baromfiállományból származó valamennyi HPAI H5N1 izolátumot részleges molekuláris elemzésnek vetették alá (Pálmai és mts., 2007). Ennek során a HA és NA gén szubtípusa, valamint a HA gén vágáshelye környéki szekvencia *reverz transzkripció*s (RT) -PCR-rel került beazonosításra. A HA génhez az Európai Unió (EU) Közösségi Referencia Laboratóriuma (Avian Virology Laboratory; VLA, Weybridge) leírása alapján (CRL, 2007) a J3/B2a jelöléssel ellátott primereket használták, míg az NA génhez használt – N1-1/N1-2 jelölésű – primerek szekvenciáját a WHO 2005-ös javaslata (WHO, 2005) tartalmazza.

Jelen munkánk keretében a vadmadaraktól származó izolátumok közül – földrajzi előfordulásuk alapján – kiválasztott 13 vírustörzs (4. táblázat) részletes genetikai vizsgálatát végeztük el. Ezek közül, az előzetes, részleges vizsgálatok alapján külön genetikai csoportba tartozó egy-egy reprezentatív törzsnek (A/mute swan/Hungary/3472/2006 és A/mute swan/Hungary/4571/2006) mind a nyolc génjén, míg a fennmaradó tizenegy törzs HA génjén végeztünk genetikai elemzést.

A házimadaraktól származó mintákból (4. táblázat) az A/goose/Hungary/14756/2006 izolátumnak, és a rákövetkező évi járványkitörésből az A/goose/Hungary/2823/2007 izolátumnak határoztuk meg a teljesgenom szekvenciáját.

A 2007. évi megbetegedésekből származó A/goose/Hungary/2823/2007 és az A/goose/Hungary/3413/2007 izolátum valamennyi génjének az EU Referencia Laboratóriuma által meghatározott részleges szekvenciája az EF446768-446775, illetve az EF446776-446783 génbanki azonosító szám alatt található meg.

4. táblázat. A genetikai vizsgálatra kiválasztott magyarországi H5N1 AI izolátumok. A teljesgenom-analízist a vastag betűkkel szedett törzseken végeztük el. A csillaggal jelölt törzsek genomjának részleges szekvenciája EF446768-446775, illetve az EF446776-446783 génbanki azonosító szám alatt található.

Izolátum	Izolálás helye	Izolálás ideje	Genetikai vizsgálat
A/mute swan/Hungary/3472/2006	Nagybaracska	2006.02.06.	teljes genom
A/mute swan/Hungary/4571/2006	Dunakeszi	2006.02.16.	teljes genom
A/mute swan/Hungary/4912/2006	Csátalja	2006.02.18.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/4999/2006	Bátmonostor	2006.02.20.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/5203/2006	Dunaszentbenedek	2006.02.21.	hemagglutinin
A/coot/Hungary/5217/2006	Dávod	2006.02.21.	hemagglutinin
A/black-headed gull/Hungary/5237/2006	Százhalombatta	2006.02.21	hemagglutinin
A/mallard/Hungary/5239/2006	Szentendre	2006.02.21.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/6170/2006	Hercegszántó	2006.03.03.	hemagglutinin
A/mute/swan/Hungary/6945/2006	Százhalombatta	2006.03.07.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7054/2006	Mohács	2006.03.07.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7055/2006	Dunaföldvár	2006.03.07.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7060/2006	Szaltnak	2006.03.07.	hemagglutinin
A/goose/Hungary/14756/2006	Bodoglár	2006.06.03.	teljes genom
A/goose/Hungary/2823/2007*	Szentes-Lapistó	2007.01.21.	teljes genom
A/goose/Hungary/3413/2007*	Derekegyház-Ördögös	2007.01.25	teljes genom

6.1.3. A HP H5N1 járvány időszakában izolált egyéb szubtypusba tartozó vírusok

A vizsgálat alapjául szolgáló vírusok egy lelőtt tőkésréce kloákatampon mintájából (A/mallard/Hungary/19616/2007 (H3N8)), valamint egy elhullott bütykös hattyú teteméből (A/mute swan/Hungary/5973/2007 (H7N7)) kerültek izolálásra Intézetünkben. A két izolátum teljesgenom-elemzését tűztük ki célul.

6.2. A KIVÁLASZTOTT VÍRUSTÖRZSEK ELSZAPORÍTÁSA

A *liofilizált* régi vírustörzseket az OIE által kiadott Diagnosztikai Kézikönyvben (OIE, 2004) meghatározottak alapján szaporítottuk. Eszerint a minták penicillin (10 000 U/ml) és streptomycin (1 mg/ml) antibiotikumot (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) tartalmazó foszfát-pufferes sóoldatban (PBS, pH 7,0-7,4) készített oldatának 0,1 ml-ét, mintánként 5 darab, 9-11 napos embrionált, SPF tyúktojás allantoiszüregébe oltottuk. Az új törzsek izolálására minden egyes állat szerveiből két mintát készítettünk: (1.) a légcső, tüdő és agy; illetve (2.) a máj és belek eldörzsölésével. Az eldörzsölt mintákat centrifugálással (6000 x g, 10 perc) ülepitettük, és az így kapott felülúszó 0,1 ml-ét oltottuk a tojásokba. A fertőzött tojásokat 5 napon át inkubáltuk, miközben az embriók esetleges elhullását naponta lámpázással ellenőriztük. Az inkubációs időt túlélő embriót tartalmazó tojásokat

4 °C hőmérsékletre hűtöttük. A vírus elszaporodását – az embriók elhullását vagy az inkubációs idő leteltét követően – *hemagglutinációs próbával* (HA) ellenőriztük (OIE, 2004), majd szükség esetén további (egy vagy két) passzázst végeztünk a vírustiter megnövelése érdekében. Az összegyűjtött allantoisz folyadékot a felhasználásig -70 °C hőmérsékleten tároltuk. A régi izolátumok esetében a törzsgyűjtemény fenntartására a vizsgált törzsek szuszpenziójából friss liofilizátumokat készítettünk.

6.3. A GENETIKAI VIZSGÁLAT MENETE ÉS KÖRÜLMÉNYEI

6.3.1. RNS kivonás

A vírus RNS-t a régi törzsek esetében 140 µl fertőzött allantoisz folyadékból kiindulva, QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) felhasználásával, a protokollban megadottak szerint tisztítottuk ki. Az új törzsekhez 200 µl allantoisz folyadékból a vírus RNS-t High Pure Viral RNA Extraction Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) segítségével nyertük ki, szintén a cég által megadott protokoll szerint. A kapott RNS szuszpenziókat a felhasználásig -70 °C hőmérsékleten tároltuk.

6.3.2. RNS átírás és PCR

A tisztított vírus RNS komplementer DNS-sé (cDNS) való *reverz transzkripció*s (RT) átírását és a cDNS PCR-rel történő megsokszorozását ugyanabban a reakcióközegben végeztük. A reakcióhoz OneStep RT-PCR Kit-et (Qiagen, Hilden, Germany) használtunk a gyártó utasítása alapján.

6.3.2.1. A régi törzsek vizsgált génjeinek reakciókörülményei

A HA gének, szekvenáláshoz megfelelő mennyiségű DNS-ének kinyerésére, kettős PCR-t (*nested PCR*) alkalmaztunk. Előbb a teljes génszakaszokat írtuk át és sokszoroztuk meg a kapott cDNS-t. A reakciót OneStep RT-PCR Kit segítségével a gyártó utasítása alapján végeztük, 2 µl RNS-szuszpenzió mintából kiindulva, 50 µl végtérfogatban, az RNS védelmének nagyobb biztonsága érdekében a reakciókeveréket 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitorral kiegészítve (Fermentas, Vilnius, Lihuania). A teljes gén átírásához és *amplifikációjához* az irodalomban leírt (Bragstad et al., 2005) primereket használtunk, primerenként 0,6 µM végső koncentrációban. A primerek HA gén specifikusak és valamennyi szubtípushoz képesek kapcsolódni, a különböző szubtípusba tartozó HA gének végén található, nem kódoló, konzervatív régióinak hasonlósága okán (Hoffmann et al., 2001; Bragstad et al., 2005). A teljes reakciót – némi módosítással – a cikkben (Bragstad et al., 2005) leírt körülményeknek megfelelően végeztük, vagyis: RNS átírás (reverz transzkripció, RT) 50 °C, 30 perc; denaturáció 95

°C, 15 perc; majd PCR 40 ciklus (94 °C, 30 mp, 53 °C, 30 mp; 72 °C, 2 perc); 72 °C, 10 perc, végül 4 °C hőmérsékleten tartva.

A kapott terméken – a későbbiekben ismertetett, agarózgélből történt kitisztítási eljárás után – egy második PCR-t futattunk le. A teljes gén egy belső, rövidebb szakaszát átfogó, szubtípus- specifikus primereket (5. táblázat) a CLC Gene Workbench 2.2.3. (CLC bio A/S, Arthus, Denmark) program segítségével terveztük. A H7 szubtípushoz az irodalomban leírt primerpárt használtuk (CRL, 2007).

5. táblázat. A HA gén belső, rövidebb szakaszait átfogó, saját tervezésű primerek szekvenciái

HA4F174	5'-ARGAACTGGTRGAATCAC-3'
HA4R1103	5'-GAATCCATACCAWCCATC-3'
HA5F642	5'-AGCTCTATCAAAACCCAAC-3'
HA5R1320	5'-GTCCAAACATCTAGRAAYC-3'
HA6F421	5'-AAAGTACATGGGCAGGAG-3'
HA6R1090	5'-CCATCTATCATTCCAGTCC-3'
HA10F368	5'-CAGAAAATMATGGAAAGTG-3'
HA10R1397	5'-GTTGCTTCCTCACTCTCTC-3'

A reakciókeverék összetétele:

2,5 µl	MgCl ₂ (Fermentas (25mM))
2,5 µl	10x Taq puffer, KCl tartalmú (Fermentas) (100 mM Tris-HCl; pH 8,8 25 °C hőmérsékleten, 500 mM KCl, és 0,8% (v/v) Nonidet P40)
4 x 0,5 µl	dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10mM) (Fermentas)
2,5 µl	BSA (Sigma-Aldrich (1mg/ml))
2 x 0,5 µl	primerek (25µM)
0,1 µl	Taq DNA polimerase (5U/µl) (Fermentas)
1,5 µl	cDNS minta
12,9 µl	H ₂ O (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a reakciókeverék végtérfogata 25 µl.

A HA gének második, „belső” PCR folyamata a következők szerint zajlott: 94 °C, 3 perc; 35 ciklus (94 °C 30 mp; 53 °C, 30 mp; 72 °C, 1 perc) 72 °C, 10 perc; majd tartva 4 °C hőmérsékleten.

Az NA (Bragstad et al., 2005) és az NS (Hoffmann et al., 2001) géneken a hivatkozott irodalmakban leírt primerek segítségével a HA gén első, teljes genomot átfogó lépésénél leírt körülmények szerint végeztük el az RT-PCR-t, szintén OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) felhasználásával.

6.3.2.2. Az új törzsek vizsgált génjeinek reakciókörülményei

A polimeráz géneket Li és munkatársai (2007), míg a többi gén teljes kódoló szakaszát Hoffmann és mts. (2001), illetve Kiss és mts. (2008) által leírt primerek felhasználásával ártírtuk, és *amplifikáltuk*. A reakciókeveréket a készlet protokollja szerint állítottuk össze, és az RT-PCR folyamatot a következők szerint végeztük: 50 °C, 30 perc; 94 °C, 15 perc; 35 ciklus (94 °C, 30 mp, 50 °C, 30 mp; 72 °C, 2 perc); 72 °C, 7 perc; 4°C hőmérsékleten tartva.

6.3.3. Agaróz gélelektroforézis, DNS kivonás

A kapott PCR termékeket nagyságuktól függően 1 vagy 2% sűrűségű agaróz gélben (UltraPure™ Agarose, Invitrogen), 1xTAE pufferben (trisz-acetát-EDTA puffer; Sigma-Aldrich) futtattuk 100 V feszültségen, 45 percen keresztül.

A futtatás segítségével az egyéb DNS „szennyeződésektől” elválasztott PCR termékeket a gélből kivágtuk, majd a kivágott géldarabból a DNS-t Gel Out Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), illetve QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) felhasználásával, a protokoll szerint kivontuk.

6.3.4. Szekvenálási folyamat

A régi törzsek DNS-mintáit a PCR során használt primerek felhasználásával, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ (Gödöllő) szekvenálta.

Az új törzsek mintáinál a szekvenálási reakciót a PCR során alkalmazott primerekkel, ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával végeztük; a minták futtatása Gödöllőn, ABI PRISM 3130 szekvenáló automatán történt.

6.3.5. Genetikai és filogenetikai vizsgálat

A kapott szekvenciákat BioEdit 7.0.7. (Hall et al., 1999) és a DNASTAR 7.1 (Lasergene, WI, USA) programokkal szerkesztettük, és építettük össze. A szegmensek azonosítását a nemzetközi adatbázisban (GenBank, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nih.gov>) fellelhető szekvenciákhoz illesztve, BLAST program segítségével végeztük. A távolságalapú *neighbor-joining* (NJ) módszer (Kimura-2 paraméteres modell

alkalmazásával) és a karakteralapú *maximum parsimony* (MP) módszer segítségével felállított törzsfák készítéséhez MEGA 4.1 programot használtunk (Tamura et al., 2007).

A régi magyar törzsek filogenetikai vizsgálatához a GenBanki BLAST program által kiadott (NS gén), illetve a korabeli, szubtípus szerint egyező (HA és NA gén) influenzavírus szekvenciákat használtuk fel. A hazai H5N1 törzsek filogenetikai vizsgálatát a (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA;) honlapján (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>) megtalálható ázsiai, közel-keleti, afrikai és európai törzsek szekvenciájával összevetve végeztük (Bao et al., 2006). A H3N8 és H7N7 izolátumok vizsgálatához a gének szekvenciáit – a vírusok genotípusának és a lehető legközelebbi rokon törzsek meghatározásának, illetve a lehetséges reasszortációk kimutatásának érdekében – betápláltuk az A típusú influenza izolátumokat genotípusonként rendszerező adatbázisba (Influenza A Virus Genotype Tool; www.flugenome.com).

A lehetséges glikozilációs helyeket a NetNGlyc 1.0 program segítségével határoztuk meg (Gupta et al., 2004).

7. EREDMÉNYEK

A régi és az újabb hazai törzsekkel kapott eredményeket, a jobb érthetőség, és az ismétlések elkerülése érdekében elkülönítve tárgyalom.

7.1. RÉGI HAZAI AIV-TÖRZSEK

Ezt az anyagrészt a MÁL-ban (Szelezcky és mts., 2008) megjelent közleményünk alapján, azt némileg átszerkesztve ismertetem.

A szekvenálást követően a hazai izolátumok és a génbankban található korabeli törzsek szekvenciáinak felhasználásával törzsfákat készítettünk a vírustörzsek rokonságának megállapítására.

7.1.1. A régi hazai törzsek szubtípus-kombinációi

A HA és az NA gének szekvenálása tulajdonképpen kettős célt szolgált. (i) Az NA szubtípusok megismerését, ugyanis egyetlen kivétellel, ezek nem voltak meghatározva. (ii) A HA gén szekvencia-analízisével pedig egyrészt a szerológiai módszerrel (HAG-próbával) megállapított alcsoportba tartozást kívántuk megerősíteni, másrészt szubtípuson belüli finomabb eltérések alapján földrajzi elkülönüléseket megismerni és epidemiológiai vizsgálatokat végezni.

A genetikai vizsgálat sokkal érzékenyebb, mint a szerológiai próba, ezért aligha meglepő, hogy a hazai törzsek HA-jei most a nukleotid (nt) szekvencia alapján is a korábban szerológiai alapon megállapított megfelelő HA szubtípusba kerültek (2. és 3. ábra). Miután megállapítottam az NA-k hovatartozását, most már lehetővé vált az alcsoportok kombinációinak megállapítása is. Ezek összesített eredményét a 6. táblázatban tüntettem fel. Az egyes *szubtípus-kombinációk* előfordulásának epidemiológiai jelentőségéről és az egyes alcsoportokban felfedett reasszortánsok *gyakoriságából* levonható következtetésekről a Megvitatásban adunk számot.

6. táblázat. A genetikai módszer segítségével meghatározott HA/NA szubtípus-kombinációk, és csoportba sorolás az NS gének alapján

Izolátum	Szubtípus (Tanyi)	Szubtípus (saját)	NS gén csoportok
A/duck/Hung/3/70	H4	H4Nx	B
A/duck/Hung/Debr/265/70	H4	H4Nx	A
A/duck/Hung/1/235/70	H6N2	H6N2	A
A/guinea fowl/Hung/1/72	H4	H4N6	A
A/guinea fowl/Hung/2/75	H7	H7N1	A

A/duck/Hung/3/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/4/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/8/3/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/1/75	H10	H10N4	A
A/duck/Hung/11/75	H5	H5N9	A
A/muscovy duck/Hung/1/75	H5	H5N3	A
A/duck/Hung/2/77	H5	H5N2	B
A/duck/Hungary/2/82	H4	H4N6	A
A/duck/Hung/660/87	H10	H10N7	B
A/turkey/Hung/1561/87	?	H9N2	A

7.1.2. A H5 és a H7 csoportbeli törzsek virulenciája

Mielőtt továbbmennénk ezen az epidemiológiai/ökológiai vonalon, előbb röviden kitérünk a vírustörzsek virulenciájával kapcsolatos eredményekre, mert mint korábban már volt róla szó, a virulencia foka *állatfertőzés nélkül* is meghatározható a HA ún. *proteolitikus* enzimre érzékeny vágáshelye előtt található aminosav-mintázat alapján. Jóllehet az eredeti vizsgálatok idején elvégzett kísérleti állatfertőzéskor nem volt jele magas virulenciának, a H5 és a H7 szubtypusú törzsek csoportjában mégis indokolt volt a patogenitás ellenőrzése a nt-szekvenciákkal is. Egyrészt, mert LP→HP átalakulást eddig csak ezekben figyeltek meg, másrészt, mert a tapasztalatok szerint, egy járvány kitörését megelőzően keletkeznek olyan, ún. átmeneti (*prekurzor*) törzsek is, amiknek állatkísérletben még nem patogének, szekvenciájuk viszont már a magas patogenitású törzsekére jellemző (Webster et al., 1992, Lomniczi, 2004).

A gének nt-sorrendjéből a BioEdit 7.0.7. program segítségével *aminosav*-szekvenciát generáltam, és azonosítottam a HA polipeptiden a vágáshelyet. A differenciálás alapja az, hogy az LP törzsek ezen szekvencia-motívumán kevesebb, a HP törzsekén viszont több *lúgos* aminosav található.

Azt találtam, hogy a régi hazai H5-törzsek vágáshely (†) körüli szekvenciája jellegzetesen *avirulens*, „LP-motívum”, **PQRETR**[†]GLF volt, csakúgy, mint bármely, máshol izolált alacsony patogenitású törzsé a csoportban. Egyébként, a motívumok eleje (P, *prolin*) és vége (R, *arginin*) minden egyes altípusnál (H1 – H16) azonos; csak a közrefogott aminosavakban mutatkoznak eltérések, úgy a szubtypusok között, mint az *avirulens* és *virulens* törzsek között. A H7-törzs vágáshelye körüli aminosav-szekvencia, **PEIPKER**[†]GLF volt, ami szintén egy egyszerű, LP motívumnak felel meg. Tehát a virulencia szempontjából érdekes egyik alcsoport törzsein sem találtunk olyan genetikai változást, amely a magasabb virulencia irányába való elmozdulásra utalna.

7.1.3. Szubtípuson belüli magasabb elkülönülések: földrajzi vonalak

Hogy a genetikai vizsgálat mennyivel *érzékenyebb* és informatívabb, mint a szerológiai, jól illusztrálja az a tény, hogy az azonos szubtípusú HA-kat feltüntető fákön megjelenik egy olyan fontos és nem is várt információ, amely a szerológiai vizsgálatnál elképzelhetetlen. Ez pedig nem más, mint a törzsek területi eloszlása. A legtöbb génfán külön csoportba (ágra vagy genetikai vonalba) – *eurázsiai*, *amerikai* és *ausztráliai* – rendeződnek a nagyobb földrajzi területekről (kontinensekről) származó törzsek (2. és 3. ábra).

A szekvencia-analízis alapján a következő fontos megállapításunk az volt, hogy akármelyik szubtípusról van is szó, a hazai AIV-törzsek vizsgált génjei kivétel nélkül az *eurázsiai* genetikai vonalba tartoztak. Az, hogy a genetikai vizsgálat könnyedén kimutatta a globális szétterjedés *hosszú ideje* alatt létrejött nagyobb (>10%) genetikai eltéréseket, nem túlságosan meglepő. A szekvencia-analízis kivételes értéke azonban abban mutatkozik meg, hogy amikor *két járványesetből* származó vírus vagy gén szekvenciája között *azonosságot* (vagy csak kismértékű, legfeljebb 1-2% eltérést) állapít meg a módszer, abban biztosak lehetünk, hogy az *epidemiológiai* (recens vírusátviteli) *kapcsolatot* is igazol. Nem úgy, mint a jóval kevésbé érzékeny HAG-próba, amely a törzseknek még a földrajzi elkülönüléseit sem érzékeli, és jelentős genetikai különbségeik ellenére is azonos csoportba sorolja őket.

Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy az AIV-gének mutációs diverzifikációja következtében létrejött kategóriák hierarchiája a következő: legfelül van a *szubtípus*, ezen belül *területi*, majd ez alatt az epidemiológiai vonalak vagy *járványtípusok* ismerhetők fel. Tehát egyedül csak a szubtípusok közötti nagy különbség éri el azt a fokot, amelyet az egyszerű HAG-próbával is ki lehet mutatni. (Ezek mértéke a 2. és a 3. ábra fáin feltűnő.)

Most nézzük a járványtípusokat külön-külön.

7.1.4. Szubtípuson belüli alacsonyabb elkülönülések: járványtípusok

A szekvencia-analízis tehát azért nélkülözhetetlen az epidemiológiai összefüggések megállapításához, hogy meghatározhassuk azt a *legnagyobb* nukleotid-sorrendbeli *különbséget* két vagy több törzs között, amelyen belül, a különbségek ellenére, epidemiológiailag még összetartoznak, azaz egyazon járványmenet tagjainak, járványtípusnak, tekinthetjük őket. Vagyis a genetikai távolságot valahogy *időre* kell váltani.

Hozzá kell azonban tenni, hogy a szegmentált genomú vírusoknál, mint amilyen az influenzavírus is, az átviteli kapcsolat igazolásához szükséges *vírusazonosítást* zavarhatja, ha egy fertőzési vonulat során *reasszortánsok* is keletkeznek

(részletesebben lásd a Megvitatásban.) A továbbiakban mégis egymagában a *HA gént* tekintetem olyan viszonyítási alapnak, mint ami az egész vírust reprezentálja. Ez tulajdonképpen azért nem önkényes, mert ez mutatja a legnagyobb diverzifikálódást, azaz ennek van a *legtöbb antigénszerkezeti és genetikai csoportja*, így praktikus szempontból nézve is, ennek segítségével folytathatunk leghatékonyabban epidemiológiai vizsgálatokat (feltéve persze, ha léteznek összevethető vírustörzsek, illetve szekvenciák).

7.1.4.1. Az egyes génfák értékelése

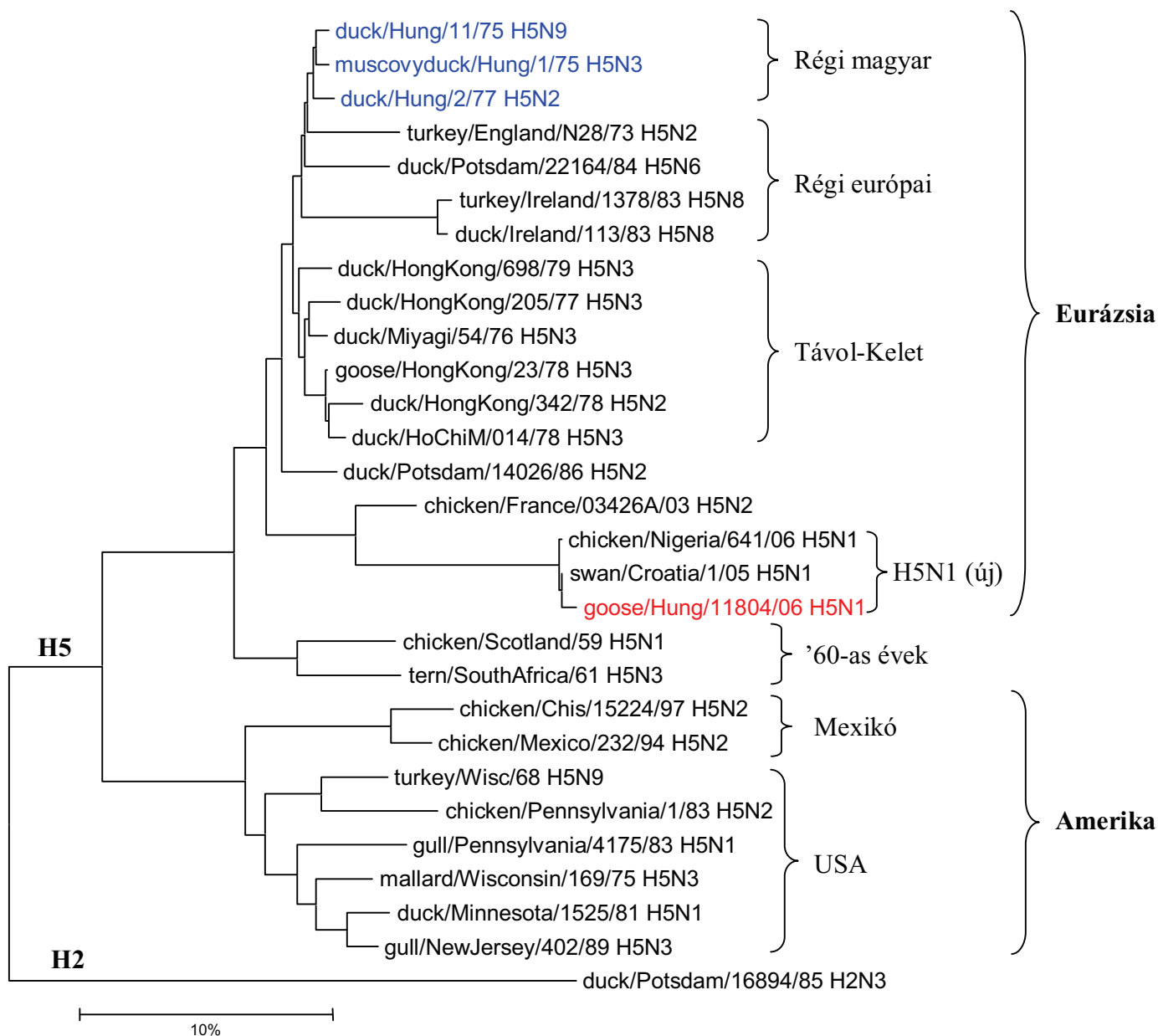
A mélyebb összefüggések feltárására most vegyük sorra az egyes génfákból nyerhető információkat.

A H5 szubtypus HA génjének törzsfáján legalább három nagy elkülönülést látunk (2. ábra). Ebből a legalsó nem tartozik közvetlenül a témához. [Ez egy H5-ön *kívüli* szubtypus (itt a H2), a szerkesztés eszköze: egy önkényesen választott ún. gyökér (*root*) amihez az összehasonlításra kiszemelt H5-ös törzseket viszonyítjuk.] Magukat a H5-beli törzseket egy fő divízió az *eurázsiai* és *amerikai* vírusokra különíti el (lásd a 7.1.3-ban is). Az *eurázsiai* csoport alsó részén a viszonylag közeli rokonságban levő régebbi *távolkeleti* törzsek találhatóak, és ezek „tőcsájából” (gén- vagy vírus-*pool*jából) válik ki egy nagyon hosszú ágon a mai HP H5N1 genetikai vonal is (itt csak három reprezentánsát mutatjuk). (A *pool* vagy „tőcsa” több szubtypussal is fertőzött gazdapopuláció vírusai ill. génjeinek összessége.)

A régi hazai törzsek (kacsából származó három izolátum) külön csoportot alkotnak az eurázsiai ágon belül, és egymással közeli rokonságban vannak (ezt jelzi a köztük levő mindössze 1-1,6% nukleotid eltérés). Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy a két évet átfogó izolátumok folyamatosan is jelen lehettek a területen, azaz akár egyetlen behurcolással is magyarázható megjelenésük. Azonban, ha az NA alcsoportokat is figyelembe vesszük a kombinációban, látható, hogy ezek minden törzsből különböznek (N2, N3 vagy N9), vagyis a három izolátum mindegyike reasszortáns. És lehet, hogy nem is csak az NA viszonylatában (egyszeresen), hanem más géneket (amelyeket nem vizsgáltunk) tekintve is (többszörösen). Erre utal, hogy az NS szegmens törzsfáján (5. ábra) további különbségek is vannak köztük: a három H5-ös törzs közül egy az NS génnek a B-, míg kettő az A-csoportjába került. A Megvitatásban kifejítjük, hogy mire lehet következtetni ebből a rendkívül bizarr, ellentmondásos kombinációból (bizarr, mert a reasszortánsok „színes csokrában” genetikailag szinte azonos HA gének találhatóak).

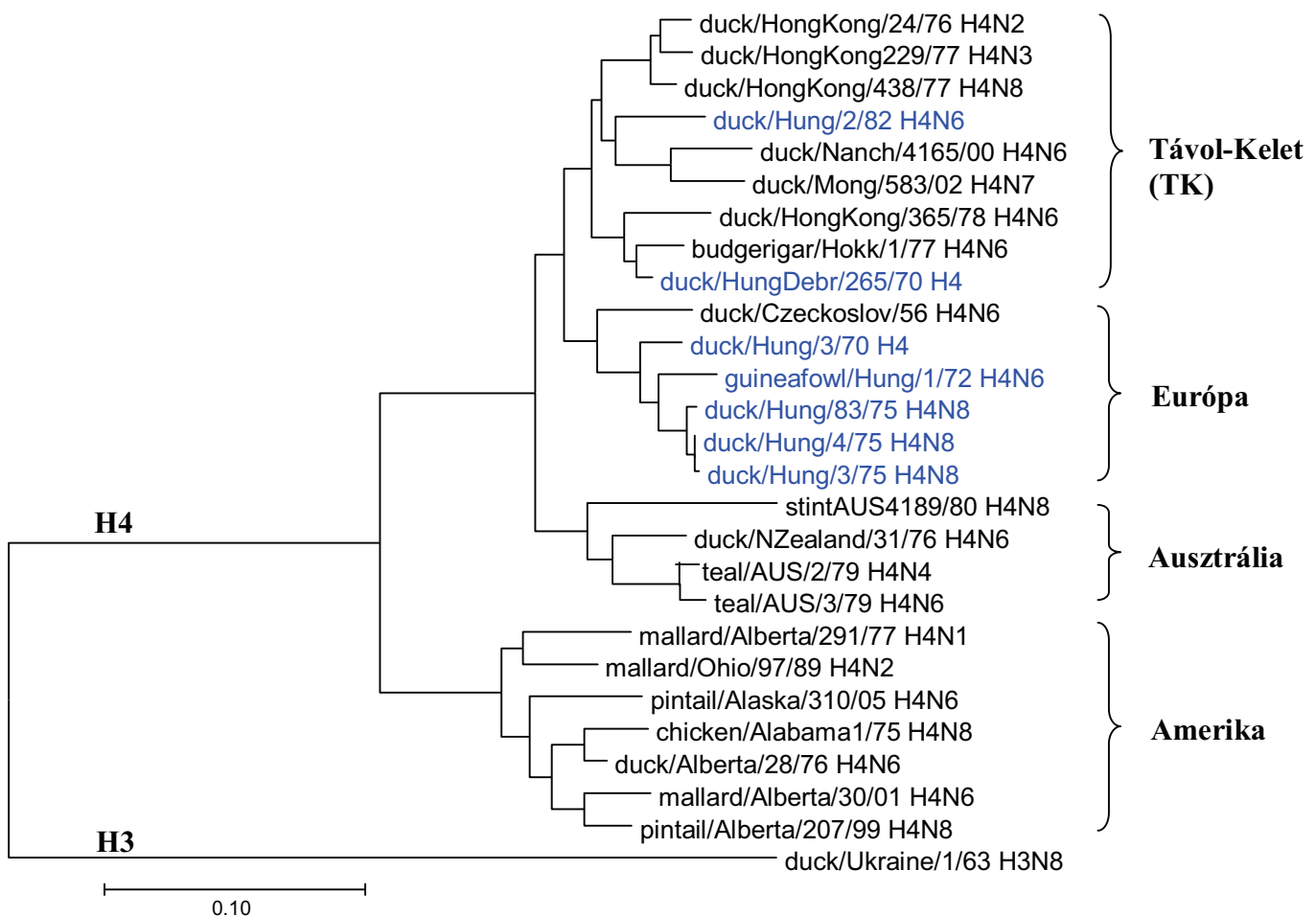
Csak érdekességként említem meg, hogy az amerikai ágon található az a H5N2 szubtypusba tartozó törzs, amiről elsőként mutatták ki, hogy LP→HP átalakulás eredménye volt, amikor 1983-ban óriási A1-járványt okozott Pennsylvániában (Kawaoka

et al., 1984; Deshpande et al., 1987). Bár ezen utóbbi és a mexikói törzs között nincs közvetlen epidemiológiai kapcsolat, nem sok kétségünk lehet afelől, hogy mindketten egy észak-amerikai közös ős leszármazottai, és jelenleg csak ott perzisztáló víruspopuláció tagjai. És természetesen epidemiológiai semmi közük az eurázsiai H5-höz.



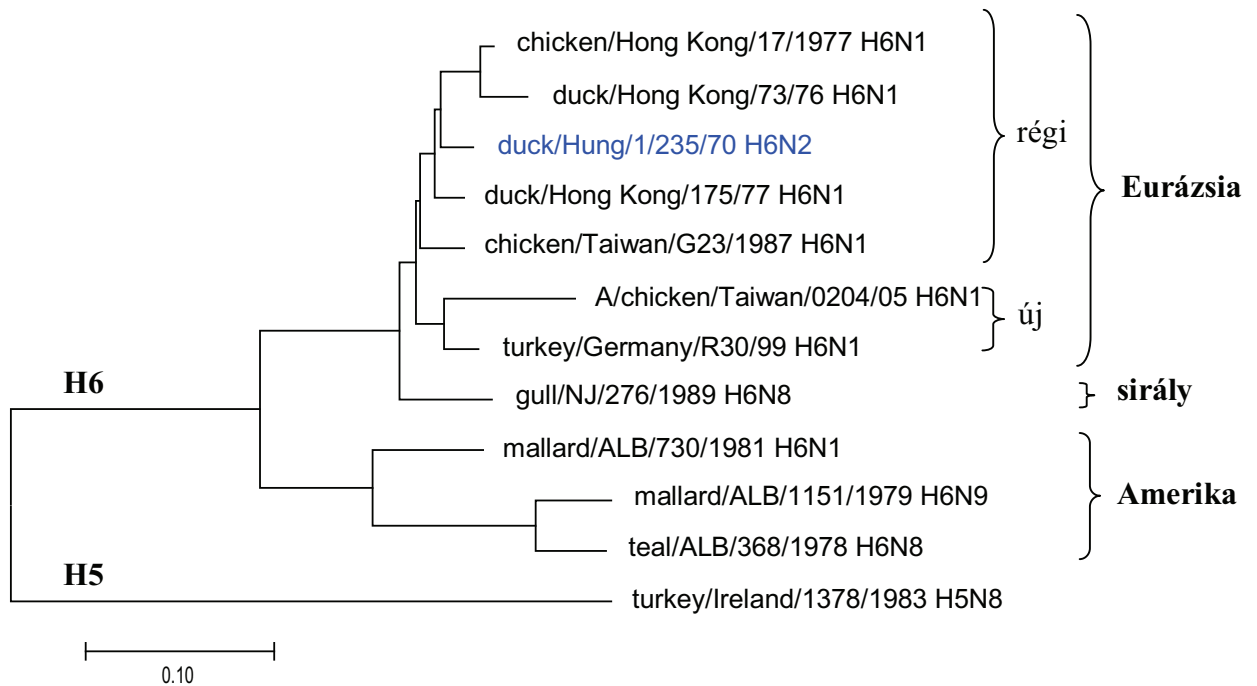
2. ábra. Az AIV törzsek filogenetikai viszonyai és megoszlása a H5 gén alapján. A hazai, régi LP törzseket kékkel, míg egy újabb, HP törzset pirossal jelöltünk.

A H4 génfára (3. ábra) újabb (1990-2005 közötti) izolátumokat is tettünk, mert csak kevés ilyen régi vírusszekvenciát találtunk a génbankban. Itt is teljesen félreérthetetlen az eurázsiai (sőt, benne az ausztráliai ág) és az amerikai izolátumok csoportjainak elkülönülése. A hét hazai törzs azonban az eurázsiai ágon belül, nem kevesebb, mint három, jelentősen elkülönült genetikai vonal között oszlik meg. Ezekből az egyik régi távol-keleti (TK) vírusokat tartalmaz, a másik egészen újakat. A többi magyar izolátum viszont közeli rokonságot mutat (~ 1%) egymással, és közös ágon ül az egyik legelső AIV-vel, az 1956-ban izolált (és referenciának számító) Csehszlovákiában izolált kacsavírussal (EU). Tehát 1970-ben legalább *három* egymástól független helyről hurcolhattak be H4 szubtypust Magyarországra, feltéve, hogy már korábban is nem fordultak itt elő. Ahogy fentebb a H5-ös törzseknél, itt is megnéztük, hogy a H4-génfán még viszonylag egységes járványvonulatnak tűnő négy hazai törzs az NA és NS génjük tekintetében reasszortánsok-e. Látható, hogy ezek között is vannak egyszeres és többszörös reasszortánsok (6. táblázat).



3. ábra. Az AIV törzsek filogenetikai viszonyai és megoszlása a H4 gén alapján. A hazai, régi törzseket késsel jelöltük.

A H6 szubtypust csak egyetlen magyar törzs reprezentálja (4. ábra), és a génbankban fellelhető régi eurázsiai izolátumok közül ez a legelső (1970-ből), Európából pedig az egyetlen. Az 1972-1987-es időszak, Hong Kongból és Taiwanról származó törzseivel nem mutat közelebbi rokonságot, így eredetéről összehasonlításhoz szükséges törzsek hiányában – még a fa sem nyújt kellő információt.



4. ábra. Az AIV törzsek filogenetikai viszonyai és területi megoszlása a H6 gén alapján. A hazai, régi törzset kézzel jelöltük.

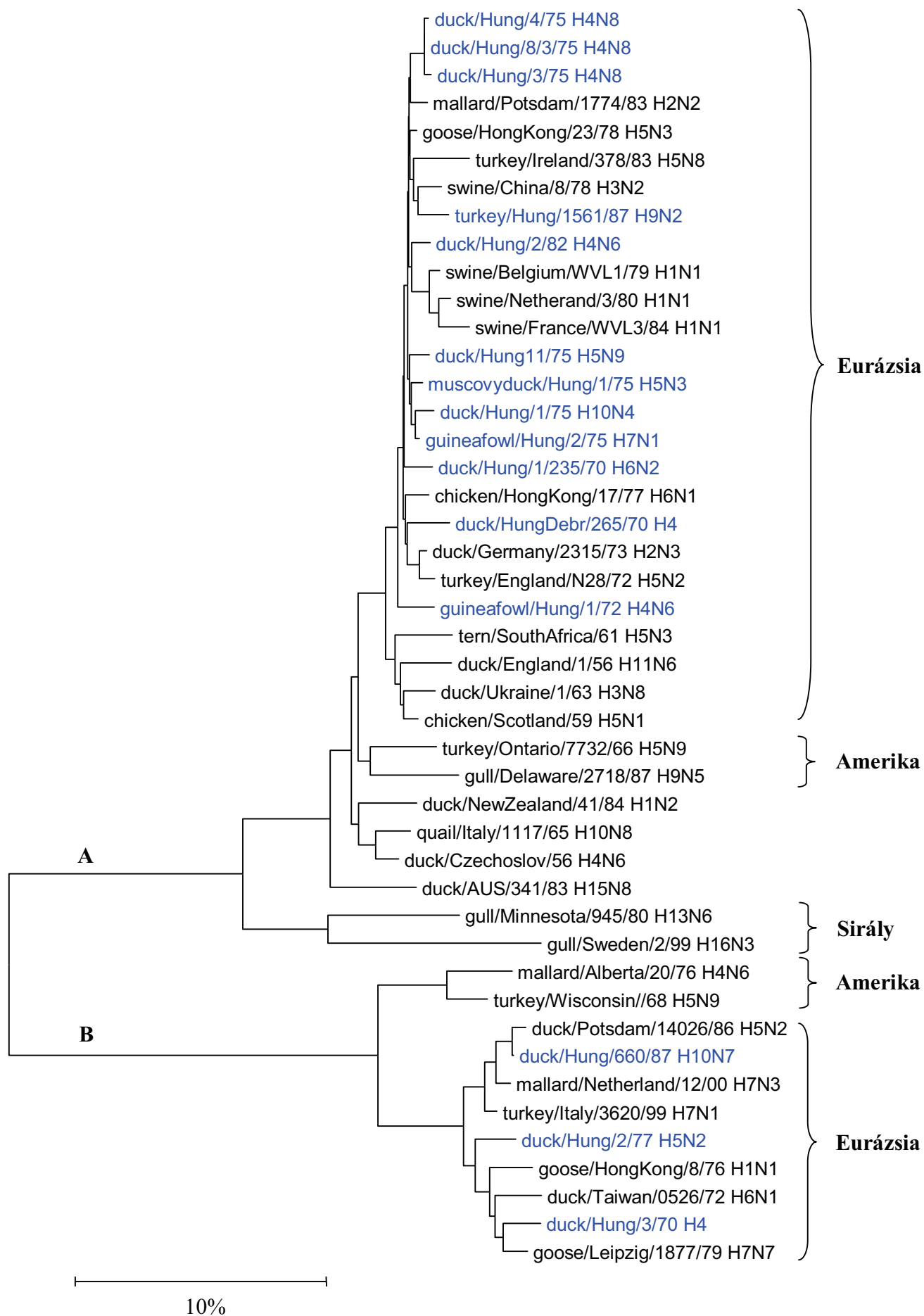
A H7 szubtypusú magyarországi vírus, ami gyöngytyúkból származik, egymagában ül az európai csoporton belül, és nincs köze a korabeli esetekből (pl., Anglia) meglévő AIV-törzsekhez (nem mutatjuk). Genetikai távolsága igen nagy (> 10% nukleotid eltérés), ami több évtizednyi különállást is jelenthet. Várható, hogy előbb-utóbb ennek rokonságából is felbukkannak szekvenciák a génbankban.

A magyarországi H9 szubtypusba tartozó törzs az eurázsiai nagy csoporton belül egy, csak hongkongi izolátumokat tartalmazó kisebb ágra került, azoktól kb. 5-6% távolságra. A nagy genetikai távolság azonban kizárja a fertőzési kapcsolatot. Az A/turkey/Hung/1561/87 (H9N2) egyébként a második, ebből az időszakból származó, európai H9 szubtypusú izolátum (nem mutatjuk).

A H10-génfa esetében még szegényesebb a kép, mivel a génbank mindössze hét régi eurázsiai izolátumot tartalmaz. Ezeknek két külön csoportjába kerültek a hazai kacsból

származó törzsek. Ez a szétválás nagyon nem meglepő, egyrészt, mert a hazai izolálások között 12 év telt el, másrészt mind NA (N4 és N7), mind NS génjüket tekintve ezek is reasszortánsok (6. táblázat).

Végül röviden szólni kell a *nem-strukturális* (NS) fehérje génből készített törzsfáról (6. ábra). Az NS gének mindössze két nagyobb csoportra válnak szét, ezeket jobb híján A- és B-allélnak nevezik. Az NS fehérjék távolsága alig haladja meg az egymáshoz legközelebbi rokonságban levő két HA-szubtípusét. Ezért mondjuk, hogy az NS viszonylag konzervatív. Minthogy az A- és a B-csoport megközelítően szubtípus nagyságrendű szétválásnak felel meg, ebből két dolog következik: (i) egyező HA/NA-kombinációk esetén rejtett reasszortációs eseményről tájékozathat, ahogy fent már láttuk; (ii) mindkettőn belül feltűnik a már HA- és NA-szubtípusoknál is megismert eurázsiai és amerikai elkülönülés. Szó volt róla és a 6. táblázatból is látható, hogy a H4, H5 és H10 alcsoportbeli törzsek között többszörös reasszortánsok vannak.



5. ábra. Az AIV törzsek filogenetikai viszonyai és területi megoszlása az NS gén alapján. A hazai, régi törzseket kékkel jelöltük.

7.2. ÚJABB AIV-IZOLÁTUMOK

Ebben a részben a 2006-07-es AIV-járványok idején izolált 16 HPAI H5N1-törzs és két LP AIV genetikai analizisének eredményeit ismertetem.

7.2.1. A hazai HP H5N1 izolátumok filogenetikai vizsgálata

A közel egyéves járványperiódus alatt 64 vadmadár- és 31 baromfiállományból származó HP H5N1-izolátum gyűlt össze az osztályon. Ezek közül 13 vadmadár-törzset és 3 baromfi-izolátumot választottam ki analizisre, amelyek közül két vadmadár- és két baromfi-törzsnek határoztam meg a teljes genomszekvenciáját.

7. táblázat. A részletes genetikai vizsgálatra kiválasztott magyarországi H5N1 influenzavírus izolátumok besorolása. A teljesgenom-analízist a vastag betűkkel szedett törzseken végeztük el. A *-gal jelölt törzsek genomjának részleges szekvenciája EF446768-446775, illetve az EF446776-446783 génbanki azonosító szám alatt található.

Izolátum	Izolálás helye	Izolálás ideje	Genetikai vizsgálat
HU-1 csoport; 1. járvány			
A/mute swan/Hungary/3472/2006	Nagybaracska	2006.02.06.	teljes genom
A/mute swan/Hungary/4912/2006	Csátalja	2006.02.18.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/4999/2006	Bátmonostor	2006.02.20.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/6170/2006	Hercegszántó	2006.03.03.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7060/2006	Szaltnak	2006.03.07.	hemagglutinin
HU-2 csoport; 1. járvány			
A/mute swan/Hungary/4571/2006	Dunakeszi	2006.02.16.	teljes genom
A/mute swan/Hungary/5203/2006	Dunaszentbenedek	2006.02.21.	hemagglutinin
A/coot/Hungary/5217/2006	Dávod	2006.02.21.	hemagglutinin
A/black-headed gull/Hungary/5237/2006	Százhalombatta	2006.02.21.	hemagglutinin
A/mallard/Hungary/5239/2006	Szentendre	2006.02.21.	hemagglutinin
A/mute/swan/Hungary/6945/2006	Százhalombatta	2006.03.07.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7054/2006	Mohács	2006.03.07.	hemagglutinin
A/mute swan/Hungary/7055/2006	Dunaföldvár	2006.03.07.	hemagglutinin
HU-3 csoport; 2. járvány			
A/goose/Hungary/14756/2006	Bodoglár	2006.06.03.	teljes genom
HU-4 csoport; 3. járvány			
A/goose/Hungary/2823/2007*	Szentes-Lapistó	2007.01.21.	teljes genom
A/goose/Hungary/3413/2007*	Derekegyház-Ördögös	2007.01.25.	teljes genom

A vadmadarokból kiválasztott 13 reprezentatív H5N1 vírusizolátum (7. táblázat) teljes HA génjének szekvencia-elemzése arra utalt, hogy a *vadmadarokból* származó vírustörzsek két alcsoportba tartoznak. A két csoportot HU-1 és HU-2 jelöléssel láttuk el. A HU-1 csoportba tartozó öt vírus HA génje egy nukleotid eltéréssel azonos (az A/mute swan/Hungary/4912/2006 törzsben egy A1017T szubsztitúció található, amely azonban aminosav szinten nem mutatkozik). Hasonló a helyzet a nyolc HU-2 csoportba tartozó vírus HA-gén szekvenciájával is: ott az A/mute swan/4571/2006 tartalmaz egy néma, aminosav szinten nem jelentkező szubsztitúciót az *alcsoport* többi tagjához képest, míg a többi szekvenciája azonos volt.

A *baromfi*ban pusztító 2006-os járvány 29 izolátumát a HU-3 csoportba soroltuk. A csoporton belül nem találtunk genomeltérést a vizsgált részleges HA és NA szakaszokon.

A 2007-ben, lúdállományokban jelentkező kitörés izolátumait a HU-4 jelölésű csoport tartalmazza. Ez utóbbi csoport tagjai gyakorlatilag azonosnak mutatkoztak (99.99% nukleotid hasonlóság).

A H5N1 vírusok különféle, főként földrajzi eredet alapján kialakított csoportosításának és nomenklatúrájának egységesítésére a WHO/OIE/FAO egy munkacsoportja a HA génre kidolgozva egy egységes jelölési módot hoztak létre, amely bevezetése óta maga is sok változtatáson esett át (WHO/OIE/FAO, 2008). A nevezéktan folyamatos bővítést tesz lehetővé. A génbankban található, most már több száz szekvencia filogenetikai elemzésével tíz fő „kládot” (valójában csoportot) kaptak (jelölésük: 0 – 9), ahol a csoporton belüli genetikai távolság nukleotidszinten 1,5% alá, míg a különböző csoportok tagjai közötti átlagos távolság 1,5% fölé esik (WHO/OIE/FAO, 2008). A besorolásnál ezen kívül figyelembe kell venni a közös ős csomópontjában megjelenő, és a fa szerkezeti megbízhatóságának mérőszámaként megadott ún. „*bootstrap*” százalékos értékét is (>60).

A főbb csoportok további másod- és harmadrendű alcsoportokra válnak szét, amelyeket decimális rendszerű számozással, illetve az ABC betűivel vezetnek le.

E rendszerezés alapján az összes megvizsgált *hazai törzs a 2.2-es alcsoportba* került. Ez a *Qinghai*-tó környékén 2005-ben kitört járvány izolátumait, valamint azok Európába, Közel-Keletre és Afrikába eljutott leszármazottait foglalja magában. A 2.2 alcsoport madarokból és humán esetekből származó izolátumokat egyaránt tartalmaz. A 2.2 alcsoporton belül a 2.2.1 jelölésű harmadrendű alcsoport, valamint több kisebb vonal (genetikai alág, *sublineage*) különül el (6. ábra).

7.2.1.1. A H5N1 HA fa bemutatása

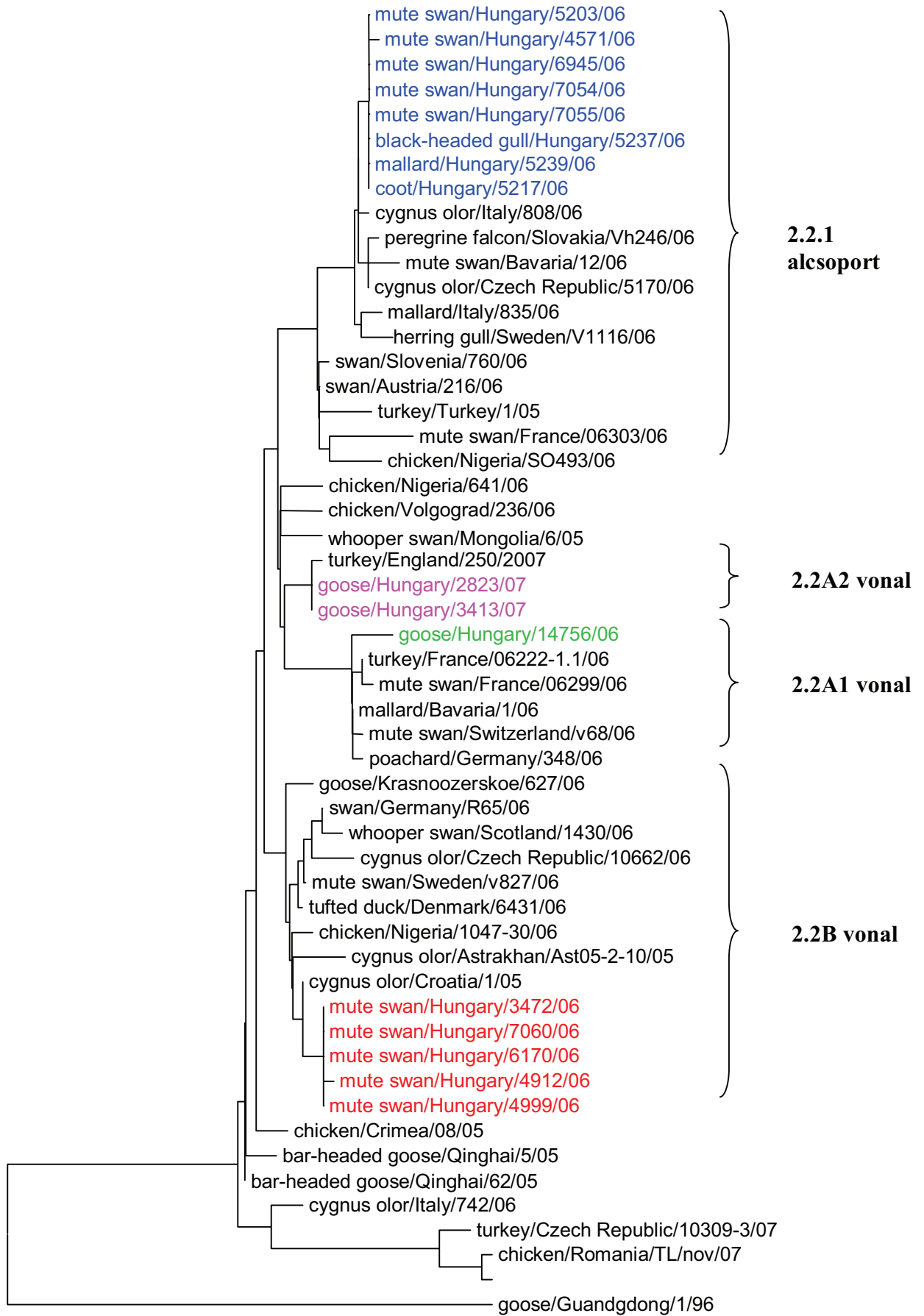
A magyarországi törzsek a génbankból kiválasztott 2.2 alcsoportba tartozó vírusok környezetében, négy viszonylag távoli csoportra válnak szét (6. ábra).

Az általunk HU-1 jelölésű csoportba sorolt, 2006-os, hattyúból származó törzsek a 2.2B csoportban foglalnak helyet. A 2.2B csoport további tagjai a németországi törzsek ún. „északi-csoportjának” vírusai, valamint horvát-, cseh-, svéd-, és oroszországi, dániai és angolai izolátumok, illetve az ún. „afrikai A alághoz” tartozó nigériai törzsek (Ducatez et al., 2006).

A 2006-ból, vadmadaraktól származó HU-2 csoport izolátumai a 2.2.1 csoportba kerültek, amelyben a legközelebbi rokonuk egy olaszországi hattyú-izolátum (99,9 % egyezéssel). Szűkebb környezetük szlovákiai, cseh- és németországi („2-es genotípusú” bajor), olasz- és svédországi törzseket foglal magában. A 2.2.1 csoport egyéb ágain Ausztriából, Szlovéniából, Franciaországból, Törökországból, Egyiptomból és Nigériából (az ún. „afrikai B alágból”) származó izolátumokat találunk.

A HU-3 csoportból kiválasztott A/goose/Hungary/14756/2006 reprezentatív törzs, valamint az „1-es genotípusú” bajorországi, a „2-es alcsoportba” tartozó franciaországi, a „déli-csoportba” tartozó németországi és a svájci izolátumok együttesen a jól körülhatárolható 2.2A1 csoportot adják.

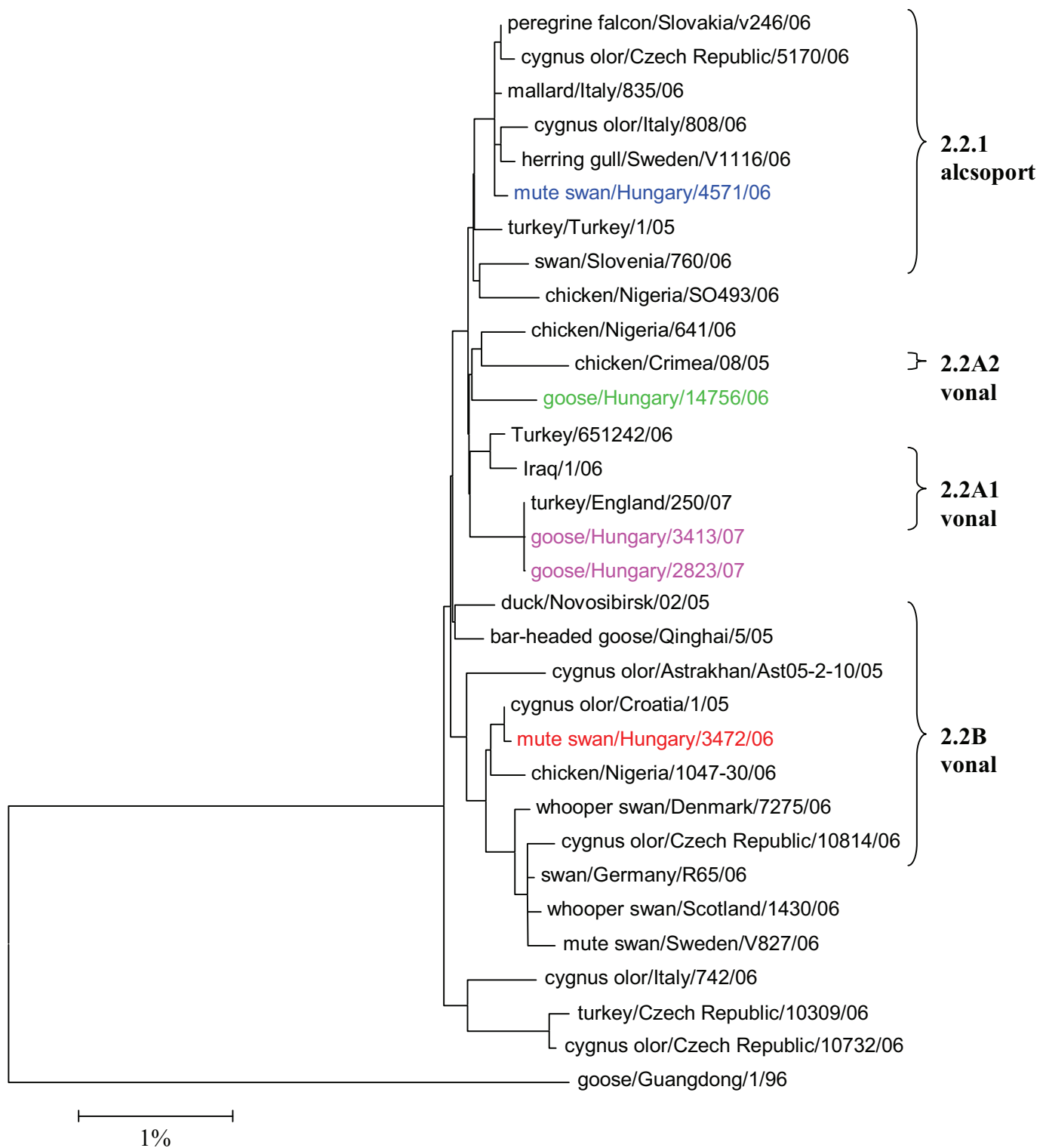
A HU-4 csoport (A/goose/Hungary/3413/2007 és A/goose/Hungary/2823/2007) tagjai a 2.2A2 csoportba kerültek, az A/turkey/England/250/2007 izolátummal együtt. A 2.2A2 csoportba tartozó legközelebb álló törzsek közé tartoznak az oroszországi, a mongoliai, a nigériai, az ún. „afrikai C alághoz” tartozó vírusok, valamint a 2005-ben és 2006-ban izolált szudáni és elefántcsontparti H5N1 vírusok.



6. ábra. A HPAI H5N1 törzsek HA génje alapján készített filogenetikai fa. A HU-1 csoportot pirossal, a HU-2-t kézzel, a HU-3-mat zölddel és a HU-4-et lilával jelöltük.

7.2.1.2. A H5N1 törzsek további génjeire készített törzsfák bemutatása

A hazai törzsek közül teljesgenom-elemzésre kiválasztott négy reprezentatív törzs többi génjére a HA gén vizsgálatához hasonló felépítésű génfákat kaptunk. A 7. ábra a PB2 szegmens, mint belső géneket reprezentáló gén törzsfáját mutatja. A HA génhez képest tapasztalt eltérések csupán abból adódtak, hogy a többi gén esetében – így a PB2-nél is – jóval kevesebb teljes génbanki szekvencia állt rendelkezésünkre: olyannyira kevés, hogy a 2.2A2 csoportban a *A/goose/Hungary/14756/2006* izolátumon kívül nincs is teljes genomszekvenciával bíró izolátum.

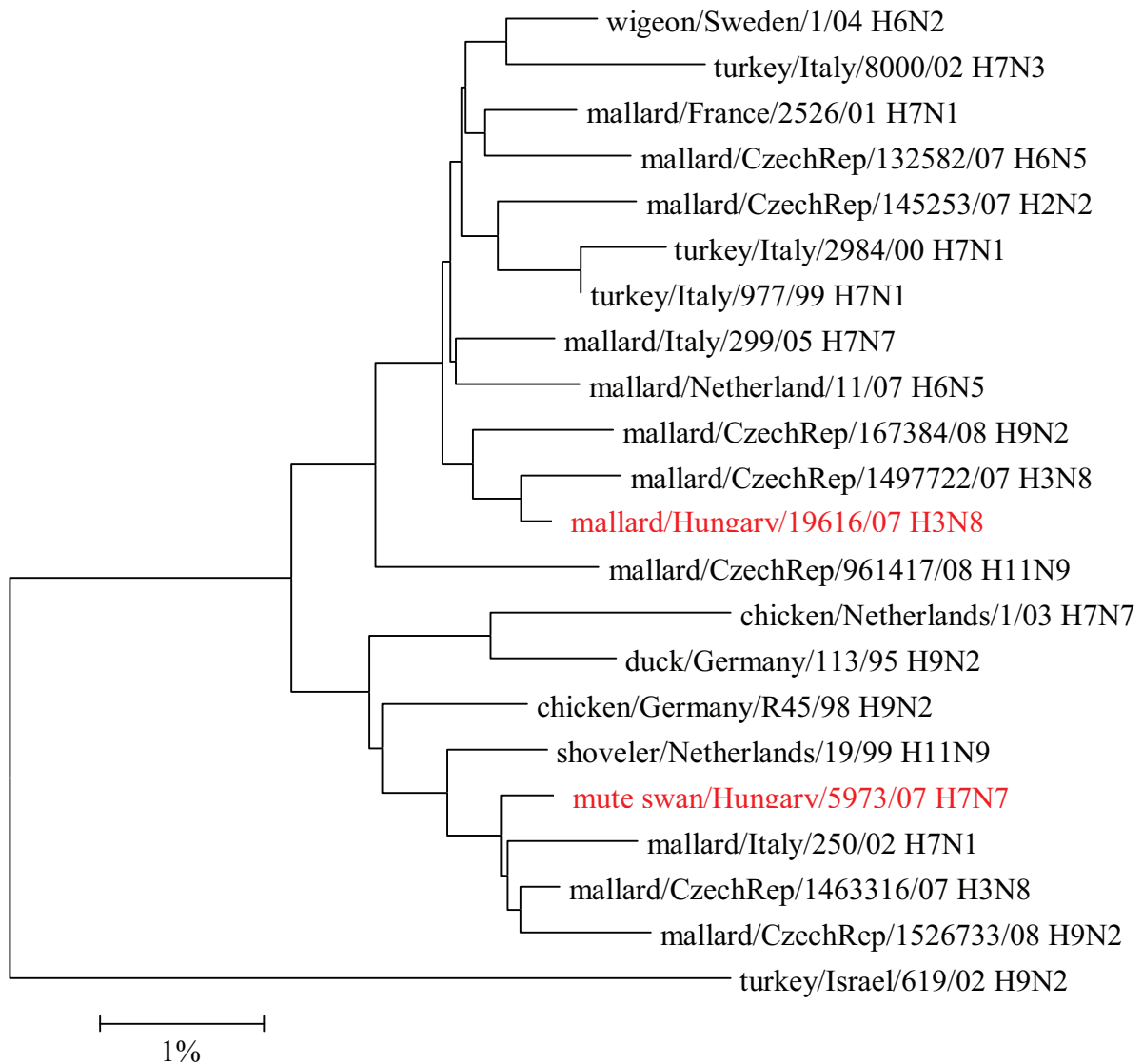


7. ábra. A HPAI H5N1 törzsek PB2 génje alapján készített filogenetikai fa. A HU-1 csoportot pirossal, a HU-2-t kézzel, a HU-3-mat zölddel és a HU-4-et lilával jelöltük.

Az NS gén filogenetikai vizsgálata szerint (itt nem mutatjuk), a H5N1 vírusok többségéhez hasonlóan (Zohari et al., 2008), a magyarországi törzsek is az NS gén „A” csoportjába tartoznak – szemben például az ázsiai HP H5N1 járvány első, B csoportba tartozó izolátumával (indextörzs: A/goose/Guandong/1/96).

7.2.2. A H3N8 és a H7N7 szubtypusba tartozó törzsek filogenetikai elemzése

A két alacsony patogenitású vírus részletes filogenetikai elemzését az idevonatkozó cikkünk tartalmazza (Szeleczyk és mts., 2010). Az egyes génekre felállított törzsfák alapján mindkét vírus az eurázsiai csoportba tartozik (8. ábra), ám szorosabb rokonsági viszonyaik génenként eltérnek.



8. ábra. A két, hazai LP törzs M génje alapján készített filogenetikai fa eurázsiai ága

7.2.3. Az újabb AIV-törzsek virulenciájának meghatározása genetikai módszerrel

Az újabb izolátumok esetében is a genetikai vizsgálatok célkitűzéseinek egyik pontja a H5 és H7 szubtípusú törzsek virulenciájának meghatározása volt a HA-szekvenciák vizsgálatával, csakúgy, mint a 7.1.2. részben. A vágáshely polibázikus jellege (**PQGERRRKKR[↓]GLF**) megerősítette, hogy a terepen elhullásokat okozó H5 vírustörzsek a HP virulencia-kategóriába tartoztak.

Ezzel szemben az A/mute swan/Hungary/5973/2007 (H7N7) törzs az LP H7 vírusokra jellemző **PEIPKGR[↓]GLF** aminosav motívumával, alacsony patogenitásúnak bizonyult. Csak emlékeztetek rá, hogy az ugyancsak H7 szubtípusba tartozó régi A/guinea fowl/Hung/2/75 izolátum **PEIPKER[↓]GLF** motívummal, míg a régi H5-alcsoportbeliek **PQRETR[↓]GLF** motívummal rendelkezik (lásd ott).

Négy H5N1 törzs teljesgenom-analízise lehetővé tette nemcsak a proteolitikus vágáshely aminosav-sorrendjének meghatározását, de ezen túl egyéb, főként egyes biológiai tulajdonságokat is érintő egy vagy több aminosav megváltozásában megnyilvánuló *markerek* vizsgálatát is. Bár szorosan nem tartozik a diagnosztikai értékű jegyekhez, megemlítem, hogy a HA génen leírtak két olyan mutációt (S145L és az A172T), amelyek a vírus szárazföldi baromfifajokra vonatkozó fokozott patogenitásával járnak együtt (Perdue et al., 2000). Mint látható a 8. táblázatból, ezek a hazai törzsek egyikénél sem fordulnak elő.

Az ismétlődések elkerülése végett a többi fehérjén talált primer szerkezeti *motívumokat* és azok jelentőségét a Megvitatás-ban ismertetem.

8. MEGVITATÁS

8.1. A RÉGI HAZAI AIV-K VIZSGÁLATA

Mint az Irodalmi áttekintésből is kiderült, a baromfi *alacsony patogenitású* törzsekkel való fertőzöttsége és ezek kártétele többféle gyakorlati kérdést vet fel, ezekből azonban a régi magyar törzsgyűjteménnyel kapcsolatos vizsgálataim során szinte csak egyetlen probléma megválaszolására koncentráltam. Ez pedig a baromfiban előforduló AIV-törzsek *eredetének* kérdéséhez kapcsolódik.

A baromfiban található LP törzsekről a legutóbbi időkig voltak olyan nézetek, hogy közvetlenül, azaz *epidemiológiai* szinten is a *vad vízimadarakból* (mint primer gazdákból) származnak, amikkel a baromfi akár közös vírusrezervoárt alkothat egyes területeken. A másik lehetőség, hogy üzemi feltételek között tartott házimadár-fajok populációiban tartósan is fennmaradhatnak bizonyos szubtípusok (ezáltal *mesterséges* vírusrezervoárokat képezve), ezek meg is betegíthetik gazdáikat, és terjednek az állományok között. A tisztánlátást azonban nehezíti, hogy a vad- és házimadarak vírusátviteli viszonyában ökológiai, evolúciós és epidemiológiai elemek egyaránt előfordulnak. Mégis az egyes baromfifajok fertőzései között abban különbség mutatkozik, hogy milyen arányban jelenítik meg az említett elemeket.

Mindezekből két fontos tényező emelhető ki, amelyek befolyásolják a mérsékelt patogenitású AIV-fertőzések manifesztációját és járványtanát. Az *egyik*, hogy jelentős eltérés lehet az egyes baromfifajok fogékonysága között (vagy biológiájukból fakadóan, különböző fokban érzékenyek a természetellenes tartási viszonyokra), ami meghatározza, hogy egyáltalán jelentkeznek-e bennük valamilyen specifikus tünetek, vagy sem. Például, a hatvanas években, amikor már üzemi méretekben álltak rendelkezésre baromfiállományok, a fertőzések eleinte csak *pulyka*állományokban jelentkeztek klinikai tünetek kíséretében, kiskacsákban csak néha, csirkében viszont nem.

A *másik*, hogy a „célgazda” rezervoárrá is válik-e vagy sem. Az elmúlt évtizedek kutatása is arról tanúskodik, hogy milyen nehéz elkülöníteni a két szituációt, különösen ott, ahol a baromfiállományok és vadmadár-populációk területi okok miatt érintkezhetnek (baromfi telepek elhelyezkedése és/vagy a madarak vándorlása miatt). Minthogy a védekezés szempontjából nem mindegy, hogy külső vagy belső forrása van-e a fertőzésnek (esetleg mindkettő), munkám során ezzel foglalkoztam részletesebben.

Erre annál inkább is figyelemmel kellett lennem, mert éppen ilyen területnek tekinthető Magyarországon a *Hortobágy*, amelynek térségéből a tanulmányozott törzsek jó része származott. Ideális esetben a magyarországi kacsállományok fertőzöttségének

forrásáról a környezetükben előforduló vadmadaraktól, és/vagy máshonnan (más telepekről, de akár a környező országokból) származó házikacsák vírustörzseivel való összehasonlítás révén tudnánk képet alkotni. Sajnos azonban sem az ökológiai, sem a szélesebb járványkapcsolatok vizsgálatához ilyen hazai törzsek nem álltak rendelkezésre. Sőt, még a génbankban is csak kevés régi törzs szekvenciája lelhető fel, különösen Európából.

A viszonylag hiányos adatok ellenére is úgy gondoltuk, hogy a szűkebb területről származó törzsegüttes önmagában való vizsgálata, szélesebb körű és/vagy kifejezetten epidemiológiai kapcsolat feltárása nélkül is elegendő információt tartalmazhat legalább annak megállapítására, hogy a törzsek forrása *természetes* vagy *mesterséges rezervoár* lehet-e. Ebben segítségünkre lehet az az alapvető megállapítás, amit a különböző vírusok filogenetikai vizsgálata tárt fel, nevezetesen, hogy *az endémiás fertőzésekre a nagyfokú és gyors genetikai diverzifikálódás jellemző*. Azonban ennek figyelembevételével is felmerül a kérdés, egyfelől, hogy 'mihez képest', lévén, hogy sem egyidejű vadmadár-izolátumok, sem más területek kitöréseiből származó vírustörzsek nem álltak rendelkezésre az összehasonlításhoz. Másfelől pedig az, hogy konkrétan milyen természetű és/vagy fokú diverzifikációra gondolunk.

Mégis, hogy némi fogalmat alkothassunk a téma bonyolultságáról, a madárinfluenza szinte áttekinthetetlen irodalmából röviden ismertetünk egyes baromfifajokban és vadmadarak között még a '70-es években lefolytatott néhány feltáró vizsgálat eredményeiből. Már ezek is rámutattak arra, hogy a *baromfiban* előforduló fertőzéseknek olyan sajátosságai vannak, amelyek kétségessé teszik, ezek epidemiológiájában a vadmadár→baromfi közti vírusátvitel játszaná a döntő szerepet.

8.1.1. A pulyka AIV-fertőzései

A pulykák AIV-hez való viszonya azért érdemel figyelmet, mert ha van faj, amelynél a vadvilágból származó törzsek szerepe epidemiológiai szinten is érvényesülhet, akkor, valószínűleg nagy fogékonysága miatt, a pulyka az az, még ha nem is feltétel nélkül. Tulajdonképpen az 1964-ben, Kanadában megjelent pulykainfluenza volt az első olyan járványszerű megbetegedés, amely megmutatta, hogy valójában mire képesek (a *fowl plague*, azaz a HP-virulencia szintjét el nem érő) AIV-törzsek, amiket csak később soroltak be az LP-kategóriába (Lomniczi, 2004). *Ontarioban* 8 év alatt mintegy 50 kitörést regisztráltak, és csak 1971-re szűnt meg fokozatosan, miután áttértek a zárt tartásra (Lang, 1981). Ez, ha közvetve is, de azt bizonyítja, hogy a vadmadarak vírusainak lehetett szerepe a pulyka AIV-fertőzéseiben, ha más módon nem is, egy-egy állomány 'beoltásával', és aztán a termelési rendszer megoldotta a törzsek fennmaradását és terjesztését. Ugyanakkor a betegségesetekből tucatnyi *szubtípus-*

kombinációt izoláltak, ami vagy arra utalt, hogy mindegyik kombináció külön-külön a vadvilágból jött, és a pulyka nem vált vírusrezervoárrá, vagy arra, hogy a talátnál kevesebb kombináció ugyan származhatott kívülről, de a reasszortációk akár a pulykában is bekövetkezhetnek. Ez a kérdés abban az időben nem volt eldönthető, legfőképpen azért nem, mert a területen élő vízimadarak vírusairól eleinte mit sem tudtak. Másrészt, és ez talán kevésbé ismert, hogy e vírustörzsek eredetének vizsgálatára csak *retrospektív* alapon kerülhetett sor, egyszerűen azért, mert a vadmadarakban az első felmérő vizsgálatokat csak több évvel később végezték, és nem is Kanada keleti, hanem nyugati részén. Tehát e korai vizsgálatok eredményeit, némileg leegyszerűsítve, abban foglalhatjuk össze, hogy a pulyka feltehetően azért került a madárinfluenza kérdés középpontjába, mert ekkor derült ki, hogy különlegesen érzékeny AIV-törzsek fertőzéseire. Emellett szólt az a tény is, hogy miközben *Ontarioban*, a pulykánál kb. tízszer több *csirkét* is tartottak, utóbbiakban mégsem észleltek megbetegedéseket (Lang, 1981).

Az USA-ban (*Minnesota* államban) pedig egészen különleges helyzet állt elő: a kitörések jelentős hányadát nem is *avian* törzsek okozták, hanem a csak náluk honos, amerikai „*klasszikus*” *sertésinfluenza*-vírusok (swH1N1). E probléma jelentőségét domborítja ki az a tény is, hogy egyfelől a *legelső* AI-vakcinát az USA-szerte elterjedt *sertés eredetű* pulykainfluenza ellen vetették be (Lomniczi, 2004; 2006; Lomniczi és Czeglédi, 2005), másfelől pedig az, hogy ez a „*sertésben készült*” swH1N1 Észak-Amerikában, és csak ott, a *vadmadarakban* is megjelent (lásd hátrább). Ezek a megfigyelések indirekt módon valóban arra utaltak, hogy a pulykákat megbetegítő vírustörzseknek nem a pulykák voltak a rezervoárjai.

Természetesen, ha a vadmadarak és valamelyik baromfifaj epidemiológiai (azaz közvetlen vírusátviteli) kapcsolatát kívánjuk bizonyítani, akkor ehhez olyan felmérésekre lenne szükség, amelyek átfedő területen és időben végrehajtott mintavételeken, valamint elegendően nagyszámú mintán és vírustörzset (vagy gént) egyedileg is azonosítani képes módszeren alapul. Ilyen vizsgálatok azonban nem folytak, amelyek pedig igen, azokban az itt említett kritériumoknak csak egy része teljesült.

De egyes felmérésekből így is használható következtetések vonhatók le, ha nem is az epidemiológiára, de a vírustörzsek *ökológiájára* és *evolúciós változására* (területi jellegzetességeire) vonatkozóan. Erre utal a '70-es évek végén lefolytatott két, viszonylag nagyobb felmérés is, amelyeknek eredményeit azért érdemes megismerni és egymással összevetni, mert bár a Föld ellentétes pontjain (Kanada és Hong Kong) folytatták le őket, két érdekes és hasznosítható észlelet olvasható ki belőlük, nevezetesen a talált *szubtípus-kombinációk* (csak HA/NA) fajtái, illetve hányada az összes izolátumhoz képest. A legfeltűnőbb és egyben meglepő az volt, hogy a

szubtípusok, ill. ezek-kombinációinak fajtái milyen nagyfokú hasonlóságot mutattak a két távoli területen, mintha csak közvetlen átviteli kapcsolat lett volna közöttük. A másik az, hogy a szubtípusok átfedése dacára is, a kombinációk *előfordulási hányada* feltűnően eltért a különböző területeken, feltehetően aszerint, hogy természetes vagy mesterséges rezervoárt vizsgáltak-e. Ezt az arányszámot használtuk fel egyfajta kalibrációs támpontnak a régi hazai törzsegyüttes eredetének felbecsülésére.

8.1.2. A primer rezervoár vírusai (vadmadarak vírusai Észak-Amerikában)

Ezek felfedezése, meglepő módon, csak a '70-es évek közepétől számítható: amíg 1972-ig már száznál is több vírust izoláltak baromfiból és díszmadaraktól, addig vadmadaraktól mindössze kettőt (Alexander, 1982; Shortridge, 1982). Ergo utóbbiak szerepe, mint vírusforrás, komolyan fel sem merülhetett addig. Az első nagyobb volumenű és több évet (1976-78) felölelő vizsgálat (*surveillance*) színhelye Kanadában, *Alberta* tartomány (az ország nyugati részén) volt (Hinshaw et al., 1980). Az eredményekből az egyes szubtípusokra és ezek kombinációira, ill. előfordulásuk *gyakoriságára*, sőt időbeli *dinamikájára* is lehetett következtetni. (Az ismétlések elkerülése végett ezeket a következő részben, kínai házikacsák felmérésének eredményeivel összevetve ismertetjük tételelesen.)

Ez volt az első olyan felmérés, amely, bár *ökológiai* célzatú volt, mégis *járványtani* vonatkozású eredményt is hozott, mégpedig többet is. Először is, retrospektív módon ugyan, de ekkor derült ki, hogy a vad vízimadarak populációiban nagyrészt ugyanazok a szubtípus-kombinációk fordulnak elő, mint amelyeket a '60-as évek pulyka-eseteiből izoláltak. Ez a vírusok eredetét illetően (*ökológiai* szinten) a szabadvízi vadmadarakra, mint primer rezervoárra mutat, de hogy *epidemiológiai* kapcsolat is volt-e, azaz kitörésenkénti átvitel, és milyen gyakorisággal, az csak az egykori törzsek genetikai összehasonlításával derülhetne ki. Hogy ez az óvatosság nem indokolatlan, azt egy másik korabeli megfigyelés is alátámasztja: jóllehet a kanadai vadkacsák vándorlási útvonala Minnesotán át (is) vezet, a pulykából itt izolált H6 és a vadkacsák H6 szubtípusú törzsei meglepő módon *nem* voltak *azonosak*, bár a megelőző években izolált vírusok között találtak közelebbi rokonságot mutató párokat is. Vagyis, még a pulykák esetében is számolni kell egyes törzsek cirkulációjával pulykaállományok között. A harmadik, és nagyon fontos megállapítás, hogy a *vadmadár*-izolátumok 4%-a swH1N1 volt, ami nem más, mint az amerikai típusú (klasszikus) *sertésinfluenza* (sw) vírusa, vagyis ami messze nem tartozik a primer rezervoárba, hanem sertések lakója (Hinshaw et al., 1980). Ez pedig azt jelenti, hogy a vadmadarakban képes megtelepedni egy háziállathoz adaptált vírus, bár lehet, hogy nem is közvetlenül a sertéstől, hanem inkább

pulykától kapták. Tehát az átvitel irány fordítva is működik. (Ennek jelentőségét a HP H5N1-gyel napjainkban lejátszódott folyamatok világítják meg (Lomniczi, 2006).

8.1.3. Egy mesterséges rezervoár vírusai (a kacsza AIV-fertőzései Kínában)

Bár első látásra úgy tűnik, hogy a hazai esetek és izolátumok szempontjából releváns adatokat leginkább a Dél-Kínában (közelebbről, a Hong Kong-ban) tartott, illetve ottani vágóhidakon vágott házikacsák AIV-fertőzése szolgáltatott (Shortridge, 1981; 1982), tény, hogy csak ennek ismerete nem tette volna lehetővé a kétféle rezervoár hatásának felismerését a benne lakozó vírusok összetételére vonatkozóan. Ideális esetben a másodlagos gazdának számító házikacsa vírusait távol-keleti vadmadarakéval kellene összehasonlítani, ilyen felmérés azonban akkor nem készült, így ezeket a kanadai vadkacsafajokban találtakkal fogjuk összevetni.

(i) Hongkongi vágóhídi mintákból közel 600 AIV-törzset izoláltak. A gazdafaj fontosságát tükrözi az izolálási gyakoriságok az egyes baromfifajokban: kacsza (6.5%), liba (1.1%) és csirke (0.4%). Fontos körülmény, hogy eltérően a hazai esetektől, az ottani vírustörzsek tünetmentes állományokból származtak.

(ii) Abban az időben még csak 12 HA-t (a mai 16 helyett), de már mind a 9 NA szubtypust ismerték. Az ezek által elméletileg lehetséges 108 kombinációból 47-et találtak a területen 600 izolátumra vetítve. Tulajdonképpen ez viszonylag magas szám, ha a kanadai, ősidők óta fennálló, természetes rezervoárban kimutatott 27 kombinációhoz viszonyítjuk, ráadásul ott 1262 izolátumból (Hinshaw et al., 1980). A szerzők konklúziója az volt, hogy Dél-Kínában a házikacsa az AIV rezervoárjának tekinthető.

(iii) A szubtypusok arányát és időbeli előfordulását is érdemes összevetni a kanadai természetes rezervoárban találtakkal. A listavezető kombináció a H4N6. Itt az összes izolátum 24%-a; míg a kanadai vadmadarakban 18%-kal ez a 3. leggyakoribb. Ezt követi a H3N8: itt 11%, Kanadában 28%-kal a 2. helyen áll, majd a H3N6: itt 6%, Kanadában 3%-kal az 5. helyen. A H6N1 (6%), H6N2: itt ugyan „csak” 5%, Kanadában viszont 41%-kal az 1. helyen volt, de különös módon, csak a felmérés 3. évében jelent meg hirtelen, és végül a H10N5 (5%).

A fentiek után természetesen fel kell tenni a kérdést, hogy mi a helyzet az akkor már „híres” (vagy később azzá váló), emlősgazdáiban járványt okozó alcsoportokkal, mint amilyen a H1N1: emberben és sertésben, a H2N2: emberben, a H3N2: emberben és sertésben, a H3N8 és a H7N7: lóban, valamint a N7-kombinációk, mint a csirke súlyos madárinfluenzáát (*fowl plague*) okozó törzsei, amik a század kezdete óta okoztak járványokat, – hogy csak a legismertebbeket említsem? Nos a H1N1: HK-ban <1%, Kanadában 4%-kal a 4. helyen áll, de, mint említettem, ennek a sertéshez adaptálódott

(sw) változatáról van szó. A H5N3-kombináció Hong Kongban: 3%, a H7N2: mindössze 1 törzs (Kanadában 1%), de mindkettő csak LP-változatban. A H9N2, ami manapság a csirke panzootiás törzsének számít, mindössze 3%-ban fordult elő.

Tehát egyes szubtypusok – H3N8, H4N6, H4N2, H6N1 és H6N2 – területi előfordulása meglepő egyezéseket mutat a két távoli kontinensen, sőt ebben az összehasonlításban a *természetes* és a *mesterséges* rezervoárok között is. Ebből a képből azt a következtetést lehetne levonni, hogy itt valami miatt sikeres szubtypusok világméretű elterjedtségének lehetünk tanúi. Csakhogy, mint fentebb már kifejtettük [Eredmények, 5.1.5.], ezek a viszonylag érzéketlen szerológiai módszerrel kimutatott egyezések genetikailag olyan nagyfokú és földrajzi eloszlást is mutató elkülönüléseket rejtenek, melyeknek kialakulása régmúltba visszanyúló evolúciós folyamat. Ennek következtében az alcsoportokon belül a HA (de az NA és a többi) gén genetikai távolságai olyan nagyok, hogy az epidemiológia kapcsolat a két kontinens, egyébként megegyező szubtypusba tartozó vírusai között teljes mértékben kizárt. Így az egyezésekre más magyarázatot kell találni. Talán a H4 és H6 általában „nagyobb affinitással” rendelkezik nemcsak a vad vízimadarakra, hanem az egyes házimadár-fajokra is, és ez a tulajdonság független a földrajzi eredettől, tehát amerikai és eurázsiai változatokra egyaránt érvényes.

Üzemi körülmények között tartott kacsákból ebben az időben, Angliában is a Kínából ismert kombinációk fordultak elő: H3N8, H4N6 és H6N2 (Alexander, 1981).

8.1.4. A régi hazai AIV-törzsek jellegzetességei és eredete

A fenti természetes (észak-amerikai) és mesterséges (távol-keleti) rezervoárok szubtypusainak elemzése, véleményem szerint, olyan adatokat tárt fel, amelyekhez annak reményében viszonyíthatók a sporadikus esetekhez kötődő magyarországi izolátumok, hogy utóbbiak eredetére vonatkozóan is nyerhetünk epidemiológiai adatokat. Nézzük, hogy milyen következtetéseket lehetett levonni az összehasonlításokból a hazai törzsek eredetére vonatkozóan. Három szempontból fogom megvizsgálni a lehetőségeket.

(i) A filogenetikai vizsgálatok már a szubtypuson belüli *földrajzi* változatokat is tévedhetetlenül felfedték, ami azonnal eloszlatta a szerotípus-azonosságból levezethető hamis következtetést, nevezetesen, hogy bármiféle epidemiológiai kapcsolat lehet a háttérben a két távoli kontinens viszonylatában. A hazai törzsek, a genetikai hierarchia csúcsáról indulva, mindhárom vizsgált gén alapján is az *eurázsiai vonalba* tartoznak, amely viszont messze nem homogén képződmény, sem területileg, sem a természetes/mesterséges elkülönülést tekintve. Ami a még közvetlenebb *epidemiológiai* vonatkozásokat illeti, a filogenetikai vizsgálatok és szubtypusok eloszlása alapján

feltételezhető, hogy a *magyarországi izolátumok* egyik-másika is *mesterséges vírus-poolból* származott (lásd alább), amelyet házikacsa tarthatott fenn. Még *Európán* belül is akár több *regionális* rezervoár is létezhetett, ahogy erre a H5 fa egyes hosszú ágai utalnak. Ennek fényében meglepő viszont, hogy a hazai H5 gének közelebbi rokonságban vannak a távol-keletiekkel, mint bármelyik európaival. (Már amelyikekről adatunk van, ez ugyanis lehet a kis mintavételből eredő egyoldalúság következménye is. Amint több régi vírus szekvenciája lesz hozzáférhető, ezt a hipotézist is lehet tesztelni.) A H4-nél viszont egy régi és egy máig fennmaradt (*recens*) távol-keleti ágon is azonosítható magyarországi vírus, bár a többség európai. Ezekből világosan kitűnik, hogy a szerológiai próbával talált *szubtípus-egyezéseknek* önmagukban mennyire nincs járvány-diagnosztikai értéke (nem is lehet, hiszen még a *kontinentális* elkülönüléseket sem érzékelik), legfeljebb kizárásos esetben.

(ii) Az egyes *szubtípusok gyakorisága* a rezervoár természetéről tájékoztat. Amint ezt láthattuk a kínai házikacsákban jóval nagyobb (47/600) a szubtípus-kombináció és izolátum aránya, mint a természetes populációkban (27/1262). A hazai törzsek száma ugyan nem mérhető a fenti vizsgálatok volumenéhez, mégis ezen a kevés mintán is látszik, hogy még *kínainál is magasabb* a szubtípus-kombinációk száma (10/13 eset). Ennek alapján arra következtethetünk, hogy ezek a törzsek is egy szűkebb terület rezervoár(jai)ban (pl., tenyészkacsa állományai) perzisztáltak, mielőtt izolálásra kerültek, nem pedig kinti vízimadarokban.

(iii) De nemcsak a szubtípusok változatossága nagy a feltételezett *mesterséges* rezervoárban, ahonnan pl., a hazai H5-szubtípusú törzsek származhattak, hanem ennek *okára* is lehet következtetni, ami nem más, mint a *gyors reasszortáció*. Ha ezt filogenetikailag jelentősen elkülönült HA-val rendelkező törzsek esetén látnánk, semmi meglepő nem lenne benne, mert ugyanabban a rezervoárban élő törzsek között elég hosszú idő alatt miért ne jöhetnének létre szegmens-cserék. Márpedig úgy tűnik, hogy épp fordított lehet a helyzet. A hazai H5-be tartozó HA gének szekvencia-különbsége ugyanis olyan *kisfokú diverzifikációt* mutat, hogy ennek alapján egyazon járványtípus tagjainak kell tekinteni őket. Mégis mindegyik legalább egyszeres, de van, amelyik kétszeres reasszortáns, és akkor még nem is tudjuk, hogy a többi szegmensben mi a helyzet. Ezek a géncserék tehát viszonylag *rövid intervallumban* zajlottak le. Ebből az is következik, hogy reasszortánsok (szubtípus-kombinációbeli különbségek) jelenléte egy adott területen csak akkor utalhat különböző behurcolásokra, ha a HA gén is nagy diverzifikációt mutat az adott intervallumban. Ha nem, mint a H5-ös törzsek esetében, akkor a géncserék a kitörésekhez kapcsolódó *mesterséges* (kacsa)rezervoárból származhatnak, ami lehetővé teszi az ilyen ütemű reasszortációt.

Meg kell jegyezni, hogy ilyen típusú információhoz filogenetikai vizsgálat nélkül nem juthattunk volna, de legalább ilyen fontos körülmény, hogy szerencsés összetételű (vagyis módszeresen végrehajtott, hézag nélküli izolálási sorokból álló) gyűjtemény áll rendelkezésemre. Az elmondottakon kívül, alkalmas lehet annak ellenőrzésére is, hogy egy ilyen viszonylag lokálisnak és időben behatároltnak tűnő rezervoárban hány reasszortáció léphet fel vírusonként. Végül pedig arra is használható, hogy akár csak HA génjük nagyfokú genetikai hasonlósága alapján is, a törzseket egyetlen *járványtani* csoportba soroljuk, függetlenül attól, hogy kifelé hány szubtípus-kombinációt mutatnak. Megkockáztatható az a megállapítás, hogy az alacsony géndiverzifikáció és magas reasszortáció fölöttébb bizarr kombinációja szinte *diagnosztikai* értékű a házikacsa *vírusrezervoár* voltának felismerésére. Ezzel van összhangban az a megfigyelés is, hogy a pl., a mostani kínai H5N1 kialakulását közel több tucat ismert reasszortációs esemény előzte meg (Lomniczi, 2006).

Az elemzések bebizonyították, hogy a fenti természetes (észak-amerikai) és mesterséges (távol-keleti) rezervoárok szubtípusainak megoszlásából levont következtetések termékeny megközelítésnek számítottak a magyarországi, zömében kacsából származó izolátumok eredetének vizsgálatához (2. táblázat).

Úgy véljük, hogy ez a régi vírusgyűjtemény is értékes információkkal egészítette ki tudásunkat, de még több, külföldi eseteket reprezentáló korai törzs vizsgálata további ismeretek forrása lehet.

8.2. A HAZAI HP H5N1 MADÁRINFLUENZA VÍRUSOK VIZSGÁLATÁBÓL LEVONT KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen vizsgálatunkkal a 2006 és 2007 közötti időszakban, Magyarországon előforduló HPAI H5N1 AIV-törzsek filogenetikai kapcsolatait és genetikai jellemzőit kívántuk feltárni. Célunk a hazai törzsek lehető legközelebbi rokonainak kimutatása, valamint a járvány Magyarországra kerülésének, illetve országon belüli terjedésének feltérképezése volt.

8.2.1. A hazai törzsek filogenetikai vizsgálataiból levont járványtani következtetések

A három hullámban zajló magyarországi H5N1 fertőzés a vadmadarak között elsősorban *bütykös hattyúkban*, míg a házimadaraknál főként *lúdállományokban* pusztított. A házi madarakban kitört fertőzés Magyarország déli részén jelentkezett, ahol az országban a legnagyobb a liba-, illetve a kacsállományok sűrűsége. Az influenzafertőzés szempontjából további kockázati tényezőként tartják számon az ezen a területen hagyományosan jellemző nyílt rendszerű állattartást, ahol megvan a lehetőség a házimadarak vad vízimadarakkal történő keveredésére, illetve közvetett kapcsolatára.

8.2.1.1. Az első hullám: a HU-1 és a HU-2 csoport vírusai

A magyarországi törzsek HA génjének molekuláris elemzése kimutatta, hogy az első, 2006-os járvány során két különböző vírus terjedt a vadmadarak között, amelyek a nemzetközileg egységes elnevezés szerinti 2.2B (HU-1), illetve 2.2.1 (HU-2) csoportokba kerültek. Elvégeztük a két csoport egy-egy kiválasztott törzsének – A/mute swan/Hungary/3472/2006 és A/mute swan/Hungary/4571/2006 – mind a nyolc génjére kiterjedő, teljesgenom-meghatározását, valamint az ezekre épülő filogenetikai és genomelemző vizsgálatokat. A kiválasztott izolátumok valamennyi génszakasza a HA génnél említett alcsoportokba tartozott, továbbá filogenetikai elrendezkedésük is hasonlóan alakult. Így megállapítottuk, hogy – bár a két különböző csoportba tartozó vírus *néhány héten* keresztül ugyanabban a vad vízimadár populációban cirkulált –, az általunk vizsgált törzsek között nem jött létre reasszortáció.

A 2.2B csoport eredetét korábbi genetikai vizsgálatok (Salzberg et al., 2007) az oroszországi Asztrahán és Kurgán vidéki járványokat jelölik meg. Egyes feltételezések szerint Európát innen két eltérő úton (Rinder et al., 2007), valószínűleg a főbb vadmadár vándorlási útvonalaknak megfelelően érthette el a fertőzés (Olsen et al., 2006). Ez összhangban van a filogenetikai elemzéseink azon eredményével, miszerint a 2.2B csoport európai törzsei a génfákon két külön nagy ágra kerültek: az egyik ágat a hazai és a horvátországi izolátumok adták, míg a másik ágon a 2006 februárjának elején Észak-Németországban, és az ezt követően a környező európai országokban – Dániában, Svédországban, Csehországban és Skóciában – izolált törzsek ültek.

Látható, hogy a rendkívül gyors vírusazonosítás révén elég pontosan behatárolhatók azok a *területek*, ahova ugyanannak a vírusnak a leszármazottai jutottak el, mégsem állítható, hogy sikerült volna felderíteni a vírusmozgások irányait vagy részleteit (Feare, 2007). Még olyan egyszerűnek tűnő esetben is, mint az alábbi, nem lehetett egyezsége jutni a „behurcolást” illetően. Amikor egy Balaton mellett meggyűrűzött hattyú tetemét találták meg Horvátországban, kb. három héttel később, ott behurcolásról beszéltek, noha teljesen valószínűtlen ilyen *hosszú idő* látens fázis. „Innen” nézve az a valószínűbb, hogy ez a példány a végső telelőhelyén, Horvátországban fertőződött meg, nem pedig tünetmentes vírushordozóként kezdte a vándorlást. Ráadásul a Balaton menti hattyúk között sem akkor, sem később nem észleltek influenzajárványra jellemző elhullásokat.

A 2.2.1. csoportba tartozó H5N1 izolátumok Európában legelőször 2006 februárjának elején, Olaszországban jelentek meg (OIE), majd ezután a vírust több országban (Szlovénia, Ausztria, Franciaország, Szlovák Köztársaság, Cseh Köztársaság, valamint Dél-Németország) is izolálták. Magyarországon is ezekkel az új kitérésekkel egy időben jelentkezett a fertőzés. Az előzményeket illetően amellet, hogy a 2.2.1. alcsoportot már

2006 januárjában izolálták Nigériában, a génbankban olyan, 2005-ös romániai izolátumokat is találtunk, amelyek a filogenetikai elemzéssel szintén ebbe az alcsoportba kerültek. Vagyis a 2.2.1 csoport tagjai már jóval a 2006-os olaszországi izolálás előtt Európában keringtek. A 2005-ös 2.2.1 törzsek eredetére eddig még nem derült fény, és további kérdéseket vet fel az a tény is, hogy a romániai mellett – szintén ebből az időből származó – törökországi izolátumokat is tartalmaz ugyanezen csoport.

8.2.1.2. A második hullám: a HU-3 csoport vírusai

A Magyarországot érintő második hullám 2006 júniusában jelentkezett, és Európa legnagyobb *vízibaromfit* érintő járványává vált anélkül, hogy vadmadarak megbetegedése társult volna hozzá. A genetikai és filogenetikai vizsgálatok alapján a HU-3 csoport reprezentatív törzse (A/goose/Hungary/14756/2006) a 2.2.A1 jelű csoportba került besorolásra.

A 2.2.A1 csoport első képviselői *Bajorországban* jelentek meg baromfiállományok és vadmadarak között, egy héttel a 2.2.1 vírusok felbukkanását követően. A 2.2.A1 csoport vírusainak közvetlen ősei nem ismertek, az azonban érdekes, hogy a törzsfá ezen ágán egyéb, Közép-Európán kívüli területről (Svájc, Francia- és Németország) származó izolátum nem található. A csoport eredetének feltárására elvégzett filogenetikai vizsgálattól – a rendelkezésre álló járványtani és genetikai adatok szegényes köre miatt – csak korlátozott eredményeket várhattunk, azonban az nyilvánvalóvá vált, hogy a *bajorországi és a hazai* vírustörzsek *közvetlen közös őssel* bírtak. A itteni kitöréssel egy időben Romániából is nagyarányú H5N1 járványt jelentettek, ám ezen vírusszekvenciák hiányában nem tudtuk vizsgálni kapcsolatukat a hazai törzsekkel.

8.2.1.3. A harmadik hullám: a HU-4 csoport vírusai

A harmadik kitörés Magyarországon 2007 januárjában, egy huzamosabb járványmentes időszak után következett be. Az ekkor megjelent HU-4-gyel jelölt izolátumok az eddigi csoportoktól élesen elkülönülő, 2.2A2 csoportba kerültek. Ez a kis létszámú csoport a saját vírusainkon kívül csak az A/turkey/United Kingdom/750/2007 törzset foglalja magában. A magyarországi és az angliai izolátumok között a közvetlen járványtani kapcsolat már bizonyításra került (Irvine et al., 2007), de ez a mi genetikai vizsgálatunkból is nyilvánvaló. A járványtanilag azonosnak mondható vírus (a három törzs mind a nyolc génje – 0, illetve 1 nukleotid eltéréssel – szinte vagy teljesen megegyező) két távoli országban, kis időeltolódással (Magyarország: 2007.01.21. és 01.25., illetve Anglia: 2007.02.01.) történő megjelenése jól mutatja a kereskedelem szerepét a járvány terjedésében. Az Egyesült Királyság Környezetvédelmi, Élelmezési és Vidékfejlesztési Minisztériumának (*Department of Environment, Food and Rural Affairs*;

DEFRA) kutatócsoportja a magyar kollégák segítségével elvégzett átfogó járványtani kutatása (Defra, 2007) a következő eredményeket hozta: (i) A járványkitörések észlelésének időpontjai azt a gyanút vetik fel, hogy a fertőzés Magyarországról terjedt a szigetországba. (ii) Az egyetlen lehetséges járványtani kapcsolat egy kaposvári pulykavágóhid és az angliai telep között állhatott fenn, mivel a vágóhid rendszeresen exportált friss vagy fagyasztott pulykahúst a *suffolki* telep szomszédságában működő pulykafeldolgozó üzembe. (iii) A kaposvári vágóhidat ellátó – a vizsgálat során a H5N1 vírusra negatívnak mutakozó – pulykatelep, valamint a két fertőzött libatelep (Lapisztó és Derekegyháza) között nem találtak kapcsolatot. (iv) Végző megállapításként arra az eredményre jutottak, hogy Magyarországról, egy még *tünetmentes, de fertőzött* pulykaállományból került volna a vírus a *suffolki* pulykatelepre, méghozzá egy fertőzött vágóhídi hússzállítmány útján.

8.2.2. Egy sikeres járvány-felderítési eset

Hogy kedvező esetben milyen eredményt várhatunk egy genetikai vizsgálattól, példaként bemutatom egy nemzetközi járvány feldolgozását és annak eredményeit. A választás a németországi, 2006 és 2007 között zajló HPAI H5N1 járványra esett, mivel az ott történtek nagymértékben hasonlítanak a hazai helyzethez, valamint az alkalmazott módszerek és kitűzött célok is nagyrészt megegyeztek a mieinkkel (Rinder et al., 2007; Weber et al., 2007; Starick et al., 2008).

A németországi AI-járvány 2006 februárjában jelentkezett először, vadmadár – főként *hattyú* – állományokban. Ezt követően, 2006 áprilisában egy *pulykaállományban* tűnt fel a vírus. Ugyanebben az évben még egy esetben izolálták a vírust: egy *állatkertben* tartott hattyúból. 2007 nyarán a fertőzés újra megjelent, tömegesen ismét elsősorban vadmadarak között, de emellett néhány *kacsa- és libaállományban* is. Decemberben három elszigetelt, észak-németországi háztáji, *csirkéket* tartó gazdaságban szintén felbukkant, ezúttal a vadmadarak negatív eredményű felmérő vizsgálata mellett.

A kiválasztott reprezentatív törzsek filogenetikai vizsgálatával a következő eredményekre jutottak (Rinder et al., 2007; Weber et al., 2007; Starick et al., 2008): (i) valamennyi izolátumuk a 2.2 kládba tartozik; (ii) a 2.2 kládon belül vírusaik három, filogenetikailag egymástól jól elkülöníthető csoportba sorolhatók (2006-ban 2 csoport volt jelen: az ún. „északi” és a „déli” típusú törzsek (2.2A és 2.2B csoport); 2007-ben pedig még egy új típus (2.2C csoport) jelent meg; (iii) meghatározták a kiválasztott törzsekhez legközelebb álló génbanki izolátumokat; (iv) a három csoportba sorolt vírusok eredete és a behurcolás módja azonban *tisztázatlan* maradt.

A harmadik hullám (2.2C csoport) 2007 decemberi, három gazdaságot érintő influenzakitörésének járványtani nyomozása azonban a későbbiekben eredményt hozott

(Harder et al., 2009). Az elvégzett genetikai vizsgálat a telepekről izolált törzsek legközelebbi rokonának a 2007 augusztusi, dél-németországi járvány egy tünetmentesen fertőzött kacsállóomány – egyébként már a mélyfagyasztott termékből származó – törzseit adta ki, olyannyira, hogy a vizsgált HA génen gyakorlatilag nem mutatkozott nukleotid-eltérés. Bár a teljes nukleotid-egyezés közvetlen járványtani kapcsolatra utal, azonban a nagy időtávlat kizárja, hogy mindez egy élő, több fajt is érintő fertőzési láncon keresztül valósult volna meg. A járványtani nyomozás terepen végzett szakasza vezetett végül a megoldásra: a három telep tulajdonosai különböző, de ugyanahhoz a nagy bolthálózathoz tartozó üzletekben, októberben vásároltak fagyasztott, nyers kacsabelsőseget, ehhez juthattak hozzá a csirkék. A fagyasztott termékek alapanyaga egy észak-németországi vágóhídról származott, ahol a szokásos vágóhid időszakos nyári szüneteltetése miatt az említett, fertőzött dél-németországi telep kacsállóományának egy részét is vágták.

Ez a példa tanulságként szolgál arra, hogy a genetikai vizsgálatok mellett mennyire fontosak a *helyszíni járványtani adatgyűjtés* hagyományos módszerei.

8.2.3. A reasszortációk vizsgálata

Amint a régi törzsek vizsgálatánál, úgy a mai H5N1 járványtagnak tagjainál is segítséget nyújtott a reasszortációk létrejöttének számbavétele a járványkitörések jellegének megállapításában. Emlékeztetőül: a régi törzsek elemzése kapcsán arra a megállapításra jutottunk, hogy az összes mintaszámhoz viszonyított magas reasszortációs arány *endémiás* állapot fennállását jelzi. Az endémiás fertőzés kialakulására a HP H5N1 járvány esetében is találunk példát, mégpedig a már említett dél-ázsiai területek elmaradott járványvédelemmel kísért, házi kacs/liba és csirke egyes tartási rendszerében. Ez a terület volt a helyszíne (és egyben kiindulópontja) *számtalan új* H5N1 reasszortáns kialakulásának a panzootiát megelőző években. Ezzel szemben a H5N1 *vadmadarakat* érintő felmérései igencsak más eredményt mutatnak. Vadmadarakban sem tünetmentes fertőzést, sem reasszortációkat nem figyeltek meg. Ebből a fenti elméletet alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a H5N1 vírus képtelen volt tartósan megtelepedni a vadmadár populációkban, és csak átmeneti, másodlagos fertőzések formájában ütötte fel a fejét, kisebb-nagyobb elhullások képében.

8.2.4. A hazai törzsek genomelemző vizsgálataiból levont további következtetések

A kiválasztott négy törzs teljes, mind a nyolc gént érintő analízise során figyelemmel voltunk a HP H5N1 járvány során ezidáig leírt, ismert vagy még ismeretlen szerepű és hatású genetikai *markerekre* (8. táblázat). Az eredmények részletes bemutatását a

témában készült cikkünk (Szeleczky és mts., 2009) tartalmazza, itt csak a legfontosabbakat emelném ki ezek közül.

8. táblázat: A teljesgenom-elemzésre kiválasztott négy indextörzs genetikai vizsgálatának összefoglalása

Vírus törzs	HA							NA	
	Aminosav pozíció							Deléció (49-68)	Aminosav pozíció
	99	145	172	238	240	268	Hasítási mintázata	hely	110
3472									
4571									
14756	I	S	A	Q	G	N	PQGERRRKKR/G	van	R
2823									

Vírus törzs	NS1				
	Csoport	Deléció (80-84)	Aminosav pozíció		
42			92	149	
3472					
4571					
14756	A	van	S	E	A
2823					

Az AIV gazdaváltásának és egy emlős gazdafajhoz történő adaptálódásának képessége, továbbá az ott kifejtett virulencia mértéke minden bizonnyal egy több génhez kötött tulajdonság. Egy faj adott vírussal szembeni *fogékonyságában* meghatározó szerepe van a HA gén receptorkötő aminosav mintázatának. Ezek segítségével a madárinfluenza vírusok jellemzően az α -2,3-NeuAcGal kötésű, madarak nyálkahártyáján megtalálható szíalsav receptorhoz, míg a humán vírusok az α -2,6-NeuAcGal kötésű, humán légutakra jellemző szíalsav receptorhoz képesek kötődni (Matrosovich et al., 1997; Ha et al., 2001). A kiválasztott izolátumaink receptorkötő helyein talált Q238 és G240 aminosavak (226-os és 228-as pozíció a H3 szubtypus tekintetében) a madarak nyálkahártyájának receptoraihoz való illeszkedésre alkalmasak, hasonlóan valamennyi eddig izolált HP H5N1 vírushoz – legyen szó akár madárból, akár emlősből származó törzsről.

A receptorkötő helyek mellett az azok környékén található *szénhidrát oldalláncok* megléte is hatással lehet a vírus patogenitására és faji adaptációjára (Matrosovich et al., 1999; Banks and Plowright, 2003; Iwatsuki-Horimoto et al., 2004; Hulse-Post et al., 2004). A HA gének aminosav-szekvenciáját az NetNglyc 1.0 programba beillesztve, az NXT/S (X = bármely aminosav) általános képlet alapján megkaptuk a lehetséges *glikozilációs* helyeket, mégpedig a 27., 39., 181., 209., 302., 500. és az 559. pozíciókban. A 2.2 kládra jellemző markerek (I99, G240, N268 és R339G) (Chen et al., 2006) a hazai törzsekben is előfordultak.

Ilyen, a 2.2 kládra jellemző markereket az NA génen is találunk (Chen et al., 2006): így a 20 aminosavat érintő *deléció*t, csirkéhez való adaptálódás markereként, a 49-68 közötti pozícióban (Matrosovich et al., 1999; Guan et al., 2002), valamint a 110-es helyzetű arginin (R) jelenlétét.

A 275-ös helyzetű hisztidin (H) a vírus oseltamivir (NA-gátló gyógyszerhatóanyag) érzékenységét mutatja (Gubareva et al., 2001), így ezen marker megléte alapján a hazai törzseket is gyógyszerérzékenynek vehetjük. Egyéb aminosavak, rezisztenciát kiváltó szubsztitúciójának hiánya – E119V (a hazai izolátumokra vonatkozó számozás szerint: E99V), R292(273)K és N294(275)S – szintén a törzseink oseltamivir-érzékenységét mutatta (Kiso et al., 2004). Az NA génen a fenti program segítségével három lehetséges glikozilációs helyet kaptunk a 68., 126. és a 215. AS helyeken.

Az NS gén több mutációjáról is feltételezik, hogy szerepük van a vírus fokozott virulenciájában, többek között a *citokin*-hatás *gátlása*, azaz a fertőzött szervezet védekezőképességének csökkentése révén. Ilyen, virulenciával kapcsolatban álló, eddig kimutatott mutációk a 80-84. aminosavak kiesése (Long et al., 2008), valamint a P42S (Jiao et al., 2008), a D92E (Seo et al., 2002) és a V149A (Li et al., 2006) szubsztitúciók létrejötte – ezen módosulások a hazai törzseinkben is megtalálhatók voltak (a négy aminosavat érintő deléció miatt a V149A mutáció a 144. helyre került). Egérmodellen végzett vizsgálatok alapján, az NS1 fehérje C-végén lévő X-S/T-X-V általános képletű, ún. PDZ-kötő (*post synaptic density protein*) mintázat is felelős lehet a fokozott virulenciáért, mégpedig a gazdasejt jelátviteli fehérjeiben található PDZ doménekhez való kapcsolódása révén (Obenauer et al., 2006; Jackson et al., 2008). Izolátumainkban ez a mintázat ESKV vagy EPKV aminosavakból állt. A HU-3 törzseinknél talált EPKV aminosav-motívum egyedülálló az európai H5N1 vírusok között – a hasonló aminosav mintázattal rendelkező, a mieinkhez legközelebbi rokonságban álló törzsek az oroszországi asztraháni járványból származnak.

8.3. A KÉT LP VÍRUS VIZSGÁLATÁBÓL LEVONT KÖVETKEZTETÉSEK

Végül megemlítem még a hazai HP H5N1 járvány kapcsán vadmadaraktól izolált – egyéb szubtypusokba tartozó, *alacsony patogenitású* – influenzatörzsek genetikai vizsgálatának idevágó megállapításait.

Az *A/mallard/Hungary/19616/2007* (H3N8) és az *A/mute swan/Hungary/5973/2007* (H7N7) izolátumok járványtani és virológiai vizsgálata érdekében azokat teljesgenom-elemzésnek vetettük alá. Az influenzavírus nyolc génjének „külön mozgását” jól mutatja a fenti két vírus esete. A gyakorlatilag véletlenszerűen, mindenféle járványtani háttértörténet nélkül kezünkbe került két vírus összes génjére filogenetikai fákot készítettünk (8. ábra). A nyolc-nyolc génfa *topológiája* a vírusokon belül egymástól eltérő

volt, ami többszörös reasszortációra utal. Az általunk izolált vírusok hosszú utat tettek meg, míg hazánkba kerültek. Ha közvetlen rokonaikat nem is találtuk meg, egyes génjeik távolabbi rokonaiból (azaz Európa és Ázsia járványainak különböző időkből származó izolátumaiból) mégis összeállt vírusaink múltja.

9. ÚJ EREDMÉNYEK

9.1. A RÉGI HAZAI AIV-TÖRZSEKKEL KAPOTT EREDMÉNYEK:

- Megerősítettem, illetve meghatároztam a kiválasztott 15 régi izolátum HA és NA szubtypusát, valamint megállapítottam NS-génjeik csoportját.

Izolátum	Szubtípus (Tanyi)	Szubtípus (saját)	NS gén csoportok
A/duck/Hung/3/70	H4	H4Nx	B
A/duck/Hung/Debr/265/70	H4	H4Nx	A
A/duck/Hung/1/235/70	H6N2	H6N2	A
A/guinea fowl/Hung/1/72	H4	H4N6	A
A/guinea fowl/Hung/2/75	H7	H7N1	A
A/duck/Hung/3/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/4/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/8/3/75	H4	H4N8	A
A/duck/Hung/1/75	H10	H10N4	A
A/duck/Hung/11/75	H5	H5N9	A
A/muscovy duck/Hung/1/75	H5	H5N3	A
A/duck/Hung/2/77	H5	H5N2	B
A/duck/Hungary/2/82	H4	H4N6	A
A/duck/Hung/660/87	H10	H10N7	B
A/turkey/Hung/1561/87	?	H9N2	A

Amíg abban az időben Hong Kongban a házikacsák, Kanadában pedig vadkacsák (és egyéb vízimadarak) leggyakoribb HA-szubtypusai a H4, H3, H6 és H10 volt, addig nálunk a gyakorisági sorrend: H4, H5 és H10.

- A HA gének részleges nukleotidsorrend meghatározásával és ezek filogenetikai elemzésével megállapítottam, hogy a hazai izolátumok HA-jai, minden esetben, a szubtypusok *eurázsiai* ágához tartoztak. Ezen belül azonban, a H5 szubtypusokat egy *régi európai* alágba lehetett sorolni, míg a H4-ek három különböző forrásból származtak: egy *régi európai* csoportba és egy *régi távol-keleti*, valamint egy *újabb távol-keleti* csoportba tartoztak.
- Emellett az NA és az NS gének genetikai azonosítása számos egyszeres vagy többszörös *reassortációt* fedett fel a H4 és a H5 szubtypusú törzsek esetében. Annál a 13 törzsnél, amik megítélésünk szerint független járványesetektől származhattak, nem kevesebb, mint 10 szubtypus-kombinációt azonosítottam. Ez

a természetes víruspoolban talált (Kanada), de még az ismert mesterséges rezervoárhoz (Hong Kong) képest is *igen magas* arány (10 reasszortáció/13 betegségeset), arra utalt, hogy a régi hazai törzsek génkombinációi nem természetes, hanem *mesterséges* vírusrezervoárban, tehát *üzemi* szintű tartás során jöhettek létre. Ezt a véleményt egyértelműen igazolták azok a *különleges* kombinációk, amelyekben három, szinte *azonos* szekvenciájú H5 szegmenshez három *különböző* szubtipusú NA (N2, N3 és N9) tartozott.

- A HA gének vágáshely-szekvencia mintázata alapján a *H5* és *H7* szubtipusba tartozó valamennyi törzset *alacsony* patogenitásúnak (LP) találtam.

9.2. RECENS HAZAI AIV-TÖRZSEK GENETIKAI VIZSGÁLATÁVAL KAPOTT EREDMÉNYEK

- A 2006-2007-ben előfordult HP H5N1-járványesetektől izolált törzsek filogenetikai vizsgálata és az epidemiológiai adatok arra utalnak, hogy a járvány három hulláma négy egymástól független behurcolás eredménye volt.
- A filogenetikai vizsgálat és a genomon található ismert *markerek* segítségével megállapítottam a törzsek helyét egy nemzetközileg javasolt csoport-besorolásban. Eszerint valamennyi izolátum a *2.2 alcsoportba* tartozik, ahova oroszországi, európai de afrikai törzsek is. Ezen belül a HU-1 tagjai a 2.2.B-ághoz, a HU-2 a 2.2.1-be; a HU-3 tagjai 2.2.A1-be és a HU-4 tagjai a 2.2.A2-ághoz tartoznak.
- A HU-1 törzsek legközelebbi rokonait Horvátországban, a HU-2 törzsekét pedig Szlovákiában, Cseh- és Svédországban találtam, ami arra utal, hogy a hattyúk valahol a területen kívül, de nem túl távol fertőződtek, mert még az inkubációs időn belül érték el utolsó állomásukat.
- Mivel a HU-1 és HU-2 törzsek hosszú időn át – majdnem két hónapon keresztül – együttesen voltak jelen egy szűk területen a Duna mentén, megvizsgáltam, hogy nem lépett-e fel reasszortáció. A kiválasztott reprezentatív törzsek teljesgenom-elemzése azonban reasszortációs eseményt nem mutatott ki.
- A libaesetek közvetlen eredete annak ellenére megállapíthatatlan, hogy a 2.2A1-ágon (HU-3 hullám) németországi és svájci vadmadár- és libaizolátumok egyaránt találhatóak. A HU-4-kitörésekből származó libatörzsek esetében megerősítettük az A/turkey/United Kingdom/750/2007 vírussal való azonosságot, ami viszont egy angliai pulykajárványból származik.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Alexander, D.J. (1981) Current Situation of Avian Influenza in Poultry in Great Britain. In: Proc. 1st International Symposium on Avian Influenza, Beltsville, MD. R. A. Bankowski, ed. United States Animal Health Association, Richmond, VA. pp. 35-45.
- Alexander, D.J. (1982) Avian influenza – recent developments. *Vet. Bull.* 52: 341-359.
- Alexander, D.J. (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 74(1-2): 3-13.
- Alexander, D.J. (2003) Should We Change the Definition of Avian Influenza for Eradication Purposes? *Avian Diseases* 47: 976-981.
- Alexander, D.J. (2007) Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Dis.* 51: 161-166.
- Banks, J. and Plowright, L. (2003) Additional Glycosylation at the Receptor Binding Site of the Hemagglutinin (HA) for H5 and H7 Viruses May Be an Adaptation to Poultry Hosts, but Does It Influence Pathogenicity? *Avian Diseases* 47: 942–950.
- Bao, Y., Bolotov, P., Demovoy, D., Kiryutin, B., Zaslavsky, L., Tatusova, T., Ostell, J. and Lipman, D. (2008) The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information. *Journal of Virology* 82(2): 596-601.
- Berg, M., Englund, L., Abusugra, I.A., Klingeborn, B., Linné, T. (1990) Close relationship between mink influenza (H10N4) and concomitantly circulating avian influenza viruses. *Arch Virol.* 113(1-2): 61-71.
- Bragstad, K., Jørgensen, P.H., Handberg, K.J., Mellergaard, S., Corbet, S., Fomsgaard, A. (2005) New avian influenza A virus subtype combination H5N7 identified in Danish mallard ducks. *Virus Res.* 109(2):181-190.
- Brown, E.G. (2000) Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother.* 54(4): 196-209.
- Butler, D. (2006) Blogger reveals China's migratory goose farms near site of flu outbreak. *Nature* 441(7091): 263.
- Butt, K.M., Smith, G.J.D., Chen, H., Zhang, L.J., Leung, Y.H.C., Xu, K.M., Lim, W., Webster, R.G., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M. and Guan, Y. (2005) Human Infection with an Avian H9N2 Influenza A Virus in Hong Kong in 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11): 5760-5767.
- Capua, I., Marangon, S. (2000) The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathol.* 29(4): 289-294.
- Capua, I., Marangon, S., Pozza, M.d., Terregino, C. and Cattoli, G. (2003) Avian Influenza in Italy 1997–2001. *Avian Diseases* 47: 839-843.
- Capua, I., Alexander, D.J. (2004) Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.* 33(4): 393-404.

Capua, I., Marangon, S. (2007) The challenge of controlling notifiable avian influenza by means of vaccination. *Avian Dis.* 51: 317-322.

Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine* 7. 1306-1312

Chen, H., Smith, G.J., Zhang, S.Y., Qin, K., Wang, J., Li, K.S., Webster, R.G., Peiris, J.S.M. and Guan Y. (2005) Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436: 191-192.

Chen, H., Smith, G.J., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., Zhang, J.X., Zhang, L.J., Guo, C.T., Cheung, C.L., Xu, K.M., Duan, L., Huang, K., Qin, K., Leung, Y.H., Wu, W.L., Lu, H.R., Chen, Y., Xia, N.S., Naipospos, T.S., Yuen, K.Y., Hassan, S.S., Bahri, S., Nguyen, T.D., Webster, R.G., Peiris, J.S., Guan, Y. 8 (2006) Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(8): 2845-2850.

Choi, Y.K., Lee, J.H., Erickson, G., Goyal, S.M., Joo, H.S., Webster, R.G. and Webby R.J. (2004a) H3N2 Influenza Virus Transmission from Swine to Turkeys, United States. *Emerging infectious Diseases* 10(12): 2156-2160.

Choi, Y.K., Ozaki, H., Webby, R.J., Webster, R.G., Peiris, J.S., Poon, L., Butt, C., Leung, Y.H.C. and Guan, Y. (2004b) Continuing Evolution of H9N2 Influenza Viruses in Southeastern China. *Journal of Virology*, 78(16): 8609-8614.

Community Reference Laboratory (CRL) (2007) One Step RT PCR for detection of H5 & H7 avian influenza & cleavage site sequencing This protocol is a copy of the standard operating procedure used by the avian influenza CRL at the Veterinary Laboratories Agency.
http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_ai_vi545.pdf

Conenello, G.M., Zamarin, D., Perrone, L.A., Tumpey, T. and Palese, P. (2007) A Single Mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 Influenza A Viruses Contributes to Increased Virulence. *PLoS Pathog.* 3(10): 141.

DEFRA Outbreak of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Suffolk in January 2007 – a report of the epidemiological findings by the National Emergency Group, Defra (2007) Available from: http://defraweb/animalh/disease/ai/pdf/epid_findings050407.pdf.

de Jong, M.D., Hien, T.T. (2006) Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 35: 2-13.

Deshpande, K.L., Fried, V.A., Ando, M. and Webster, R.G. (1987) Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *PNAS* 84(1): 36-40.

Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S.F., Quer, J., Novella, I.S. and Holland, J.J (1996) Basic concepts in RNA virus evolution. *The FASEB Journal* 10: 859-864.

Donis, R.O., Bean, W.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G. (1989) Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. *Virology.* 169(2): 408-417.

Doyle, T.M (1927) A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus. *J. Comp. Pathol.*, 40: 144–169.

Ducatez, M.F., Olinger, C.M., Owoade, A.A., De Landtsheer, S., Ammerlaan, W., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Muller, C.P. (2006) Avian Flu: Multiple introductions of H5N1 in Nigeria *Nature* 442: 37.

Elbers, A.R.W., Fabri, T.H.F., de Vries, T.S., de Wit, J.J., Pijpers, A. and Koch G. (2004) The Highly Pathogenic Avian Influenza A (H7N7) Virus Epidemic in the Netherlands in 2003 – Lessons Learned from the First Five Outbreaks. *Avian Diseases* 48: 691-705.

Európai Unió Tanácsa: A Tanács 2005/94/EK irányelve (2005. december 20.) a madárinfluenza elleni védekezésre irányuló közösségi intézkedésekről és a 92/40/EGK irányelv hatályon kívül helyezéséről. (2006) Európai Unió Hivatalos Lapja L 010, 0016 – 0065

[http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:010:0016:01:HU:HTML)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:010:0016:01:HU:HTML](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:010:0016:01:HU:HTML)

Feare, C.J., Yasué, M. (2006) Asymptomatic infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 in wild birds: how sound is the evidence? *Virology Journal* 17(3): 96.

Feare, C.J. (2007) The role of wild birds in the spread of HPAI H5N1. *Avian Diseases.*: 51. 440-447.

Fouchier, R.A., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., Van Doornum, G.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., Osterhaus, A.D. (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1356-61.

Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D. (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 79(5): 2814-2822.

Fouchier, R.A., Munster, V.J., Keawcharoen, J., Osterhaus, A.D. and Kuiken, T. (2007) Virology of avian influenza in relation to wild birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 43. 7-14.

Gauthier-Clerc, M., Lebarbenchon, C., Thomas, F. (2007) Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1: a critical review *Ibis* 149: 202–214.

Guan, Y., Shortridge, K.F., Krauss, S. and Webster, R.G. (1999) Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9363-9367.

Guan, Y., Peiris, J.S., Lipatov, A.S., Ellis, T.M., Dyrting, K.C., Krauss, S., Zhang, L.J., Webster, R.G. and Shortridge, K.F. (2002) Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8950-8955.

Gubareva, L.V., Kaiser, L., Matrosovich, M.N., Soo-Hoo, Y., Hayden, F.G. (2001) Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. *J Infect Dis.* 183(4): 523-531.

- Guo, Y.J., Krauss, S., Senne, D.A., Mo, I.P., Lo, K.S., Xiong, X.P., Norwood, M., Shortridge, K.F., Webster, R.G., Guan, Y. (2000) Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*. 267(2): 279.
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. Available online at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (2001) X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(20): 11181–11186.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* 41. 95-98. Available online at: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Harder, T.C., Teuffert, J., Starick, E., Gethmann, J., Grund, C., Fereidouni, S., Durban, M., Bogner, K.H., Neubauer-Juric, A., Repper, R., Hlinak, A., Engelhardt, A., Nöckler, A., Smietanka, K., Minta, Z., Kramer, M., Globig, A., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J. and Beer, M. (2007) Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in Frozen Duck Carcasses, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15(2): 272–279.
- Hinshaw, V.S., Webster, R.G., Turner, B. (1982) The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol.* 26(5): 622-629.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 146(12): 2275-2289.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y. (1994) Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J. Virol.* 68(5): 3120-3128.
- Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y., Webster, R.G. (1995) Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213(1): 223-230.
- Hulse-Post, D.J., Webster, R.G., Russell, R.J., Perez, D.R. (2004) Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J Virol.* 78(18): 9954-9964.
- Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S.P., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Webster, R.G. (2005) Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *PNAS* 102(30): 10682-10687.
- Irvine, R.M., Banks, J., Londt, B.Z., Lister, S.A., Manvell, R.J., Outtrim, L., Russell, C., Cox, W.J., Ceeraz, V., Shell, W., Landeg, F.J., Wilesmith, J.W., Alexander, D.J., Brown, I.H. (2007) Outbreak of highly pathogenic avian influenza caused by Asian lineage H5N1 virus in turkeys in Great Britain in January 2007. *Vet Rec.* 161(3): 100-101.
- Ivanics, É., Bálint, Á., Pálmai, N., Márton, L., Dán, Á., Ursu, K., Szeredi, L., Rigó, D., Deim, Z., Tekes, L., Zarka, P., Nagy, E., Dobos-Kovács, M., Glávits, R. (2007a) A

madárinfluenza erősen virulens (H5N1 altípusú) vírustörzse okozta megbetegedések hazai liba- és kacsáállományokban. Magyar Állatorvosok Lapja 129: 387-399.

Ivanics, É., Glávits, R., Bálint, Á., Palya, V., Márton, L., Dán, Á., Ursu, K., Szeredi, L., Rigó, D., Deim, Z., Pálmai, N., Tekes, L., Dobos-Kovács, M., Kovács, Z. (2007b) Tömegesen előforduló vesekárosodás és köszvény H5N1 altípusú madárinfluenza vírussal fertőződött mulardkacsa állományban. Magyar Állatorvosok Lapja 129: 535-541.

Iwatsuki-Horimoto, K., Kanazawa, R., Sugii, S., Kawaoka, Y. and Horimoto, T. (2004) The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor-binding properties from a virulent avian influenza virus. Journal of General Virology 85: 1001-1005.

Jackson, D., Hossain, J., Hickman, D., Perez, D.R. and Lamb, R.A. (2008) A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(11): 4381-4386.

Jiao, P., Tian, G., Li, Y., Deng, G., Jiang, Y., Liu, C., Liu, W., Bu, Z., Kawaoka, Y., Chen, H. (2008) A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. J Virol. 82(3): 1146-1154.

Kawaoka, Y., Naeve, C.W., Webster, R.G. (1984) Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? Virology 139(2): 303-316.

Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R.A., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, A.D., Poovorawan, Y. (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis. 10(12): 2189-2191.

Kilpatrick, A.M., Chmura, A.A., Gibbons, D.W., Fleischer, R.C., Marra, P.P., Daszak, P. (2006) Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 19368-19373.

Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., Hayden, F.G., Sugaya, N., Kawaoka, Y. (2004) Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. The Lancet 364(9436): 759-765.

Kiss, I., Gyarmati, P., Zohari, S., Wilbe Ramsay, K., Metreveli, G., Weiss, E., Brytting, M., Stivers, M., Lindström, S., Lundkvist, A., Nemirov, K., Thorén, P., Berg, M., Czifra, Gy., and Belák, S. (2008) Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in Sweden in 2006. Virol J. 5: 113.

Klopfleisch, R., Wolf, P.U., Uhl, W., Gerst, S., Harder, T., Starick, E., Vahlenkamp, T.W., Mettenleiter, T.C. and Teifke, J.P. (2007) Distribution of Lesions and Antigen of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in Domestic Cats after Presumptive Infection by Wild Birds. Vet Pathol 44: 261-268.

Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A.D., Bosman, A. (2004) Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 363(9409): 587-593.

Krauss, S., Obert, C.A., Franks, J., Walker, D., Jones, K., Seiler, P., Niles, L., Pryor, S.P., Obenauer, J.C., Naeve, C.W., Widjaja, L., Webby, R.J., Webster, R.G. (2007)

Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange PLoS Pathog 3(11): e167.

Kung, N.Y., Guan, Y., Perkins, N.R., Bissett, L., Ellis, T., Sims, L., Morris, R.S., Shortridge, K.F., Peiris, J.S. (2003) The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong. *Avian Diseases* 47: 1037-1341.

Lamb, R.A. and Krug, R.M. (1996). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, 3th edition Edited by.: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman and S.E. Straus Lippincott-Raven Press, Philadelphia

Lang, G. (1981) A Review of Influenza in Canada Domestic and Wild Birds. In: Proc. 1st International Symposium on Avian Influenza, Beltsville, MD. R. A. Bankowski, ed. United States Animal Health Association, Richmond, VA. pp. 19-20.

Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430: 209-213.

Li, O.T., Barr, I., Leung, C.Y., Chen, H., Guan, Y., Peiris, J.S., Poon, L.L. (2007) Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 haemagglutinin subtypes. *J. Virol. Methods.* 142(1-2): 218-22.

Li, Z., Jiang, Y., Jiao, P., Wang, A., Zhao, F., Tian, G., Wang, X., Yu, K., Bu, Z., Chen, H. (2006) The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol.* 80(22): 11115-11123.

Lin, Y.P., Shaw, M., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., Klimov, A., Subbarao, K., Guan, Y., Krauss, S., Shortridge, K., Webster, R.G., Cox, N., Hay, A. (2000) Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17): 9654-9658

Lipatov, A.S., Govorkova, E.A., Webby, R.J., Ozaki, H., Peiris, M., Guan, Y., Poon, L. and Webster, R.G. (2004) Influenza: Emergence and Control. *Journal of Virology*, 78(17): 8951-8959.

Liu, J., Xiao, H., Lei, F., Zhu, Q., Qin, K., Zhang, X.W., Zhang, X.L., Zhao, D., Wang, G., Feng, Y., Ma, J., Liu, W., Wang, J., Gao, G.F. (2005) Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309(5738): 1206.

Liu, M., He, S., Walker, D., Zhou, N., Perez, D.R., Mo, B., Li, F., Huang, X., Webster, R.G., Webby, R.J. (2003) The influenza virus gene pool in a poultry market in South central china. *Virology.* 305(2): 267-275.

Lomniczi, B. (2004) A madárinfluenza és a baromfipestis patogenitás, epidemiológia és evolúció Magyar Állatorvosok Lapja 126: 87-100.

Lomniczi, B., Czeglédi, A. (2005) A baromfipestis története 1. Az NDV molekuláris epidemiológiája és evolúciója. Magyar Állatorvosok Lapja 127: 707-719.

Lomniczi, B. (2006) Az influenzák története az ázsiai H5N1 madárinfluenza-járványok kapcsán Magyar Állatorvosok Lapja 128: 67-81

Long, J.X., Peng, D.X., Liu, Y.L., Wu, Y.T., Liu, X.F., Fan, Y., Rakestraw, K.M., Webster, R.G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., Naeve, C.W. (2008) Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*. 36(3): 471-478.

Makarova, N.V., Kaverin, N.V., Krauss, S., Senne, D. and Webster, R.G. (1999) Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *Journal of General Virology* 80: 3167-3171.

Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., Teneberg, S., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S., Karlsson, K.A. (1997) Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233(1): 224-234.

Matrosovich, M.N., Zhou, N., Kawaoka, Y., Webster, R.G. (1999) The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73(2): 1146-1155.

Naeem, K., Siddique, N., Ayaz, M. and Jalalee, M.A. (2007) Avian Influenza in Pakistan: Outbreaks of Low- and High-Pathogenicity Avian Influenza in Pakistan During 2003–2006. *Avian Diseases* 51: 189-193.

Newman, J., Halvorson, D. and Karunakaran, D. (1981) Complications associated with avian influenza infections. In: Proc. 1st International Symposium on Avian Influenza, Beltsville, MD. R. A. Bankowski, ed. United States Animal Health Association, Richmond, VA. pp. 8–12.

Obenauer, J.C., Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D.B., Xu, X., Wang, J., Ma, J. (2006) Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 311(5767): 1576-1580.

Office International des Epizooties (OIE): http://www.oie.int/eng/en_index.htm

Office International des Epizooties (OIE) Chapter 2.7.12., Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl plague). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5. Edition, OIE, Paris, France, 2004.
http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_summry.htm

Ohishi, K. (2002) Influenza virus infection in marine mammals. *Otsuchi Marine Science* 27: 7-12.

Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A. (2006) Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Review. Science* 312(5772): 384 – 388

Pálmai, N., Erdélyi, K., Bálint, A., Márton, L., Dán, A., Deim, Z., Ursu, K., Löndt, B.Z., Brown, I.H., Glávits, R. (2007) Pathobiology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in mute swans (*Cygnus olor*). *Avian Pathol.* 36(3): 245-249.

Pasick, J., Handel, K., Robinson, J., Copps, J., Ridd, D., Hills, K., Kehler, H., Cottam-Birt, C., Neufeld, J., Berhane, Y., Czub, S. (2005) Intersegmental recombination between the

haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.* 86(3): 727-731.

Perdue, M.L., Suarez, D.L. (2000) Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol.* 74(1-2): 77-86.

Petek, M. (1982) Current situation in Italy. In: Proc. 1st International Symposium on Avian Influenza, Beltsville, MD. R. A. Bankowski, ed. United States Animal Health Association, Richmond, VA. pp. 31-34.

Rinder, M., Lang, V., Fuchs, C., Hafner-Marx, A., Bogner, K.H., Neubauer, A., Büttner, M., Rinder, H. (2007) Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) into Bavaria, Germany. *J Vet Diagn Invest.* 19(3): 279-282.

Röhm, C., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Süß, J., Webster, R.G. (1995) Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology* 209(2): 664-670.

Romváry, J., Mészáros, J., Tanyi, J., Rózsa, J. and Fábrián, L. (1976a) Influenza Infectedness of Captured and Shot Wild Birds on North-Eastern and South-Eastern Parts of Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 26. 363-368.

Romváry, J., Mészáros, J., Tanyi, J., Rózsa, J. and Fábrián, L. (1976b) Spreading of Virus Infection Among Wild Birds and Monkeys During the Influenza Epidemic Caused by the Victoria /3/75 Variant of A/H3N2/ Virus. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 26: 369-376.

Salzberg, S.L., Kingsford, C., Cattoli, G., Spiro, D.J., Janies, D.A., Aly, M.M., Brown, I.H., Couacy-Hymann, E., De Mia, G.M., Dung do, H., Guercio, A., Joannis, T., Maken Ali, A.S., Osmani, A., Padalino, I., Saad, M.D., Savić, V., Sengamalay, N.A., Yingst, S., Zaborsky, J., Zorman-Rojs, O., Ghedin, E., Capua, I. (2007) Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg Infect Dis.* 13(5): 713-718.

Senne, D.A., Pearson, J.E., and Panigrahy, B. (1992) Live poultry markets: a missing link in the epidemiology of avian influenza. In: Proc. Third International Symposium on Avian Influenza. B. C. Easterday, ed. U.S. Animal Health Association, Richmond, VA. pp. 50-58.

Senne, D.A., Panigrahy, B., Kawaoka, Y., Pearson, J.E., Süß, J., Lipkind, M., Kida, H., Webster, R.G. (1996) Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases* 40: 425-437.

Seo, S.H., Hoffmann, E. and Webster, R.G. (2002) Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Medicine* 8: 950-954.

Shortridge, K.F. (1981) Epidemiology of Avian Influenza and Sources of Infection in Domestic Species. In: Proc. 1st International Symposium on Avian Influenza, Beltsville, MD. R. A. Bankowski, ed. United States Animal Health Association, Richmond, VA pp. 54-68.

Shortridge, K.F. (1982) Avian influenza A viruses of southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man. *Bull World Health Organ.* 60(1): 129-135.

Sims, L.D. (2007) Lessons Learned from Asian H5N1 Outbreak Control. *Avian Diseases* 51: 174-181.

Slemons, R.D. and Easterday, B.C. (1972) Host response differences among 5 avian species to an influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/66 (Hav5N?) Bull World Health Organ. 47(4): 521–525.

Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. (2006) Fatal Avian Influenza A H5N1 in a Dog. Emerging Infectious Diseases 12(11): 1744-1747.

Stallknecht, D.E., Shane, S.M., Kearney, M.T., Zwank, P.J. (1990) Persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis. 34(2): 406-411.

Stallknecht, D.E. and Brown, J.D. (2007) Wild birds and the epidemiology of avian influenza. Journal of Wildlife Diseases, 43: 15-20.

Starick, E., Beer, M., Hoffmann, B., Staubach, C., Werner, O., Globig, A., Strebelow, G., Grund, C., Durban, M., Conraths, F.J., Mettenleiter, T., Harder, T. (2008) Phylogenetic analyses of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. Vet Microbiol. 128(3-4): 243-252.

Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schröer, D., Vahlenkamp, T.W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T.C., Stech, J. (2009) Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. J Virol. 83(11): 5864-5868.

Sturm-Ramirez, K.M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrting, K., Rehg, J.E., Poon, L., Guan, Y., Peiris, M. and Webster, R.G. (2004) Reemerging H5N1 influenza A viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. J. Virol. 78: 4892-4901.

Suarez, D.L., Spackman, E., Senne, D.A. (2003) Update on Molecular Epidemiology of H1, H5, and H7 Influenza Virus Infections in Poultry in North America. Avian Diseases 47: 888-897.

Suarez, D.L., Senne, D.A., Banks, J., Brown, I.H., Essen, S.C., Lee, C.W., Manvell, R.J., Mathieu-Benson, C., Moreno, V., Pedersen, J.C., Panigrahy, B., Rojas, H., Spackman, E., Alexander, D.J. (2004) Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. Emerg Infect Dis. 10(4): 693-699.

Subbarao, E.K., Klimov, A. Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. (1998) Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. Science 279.(5349): 393-396.

Swayne, D.E., Beck, J.R., Garcia, M. and Stone, H.D. (1999) Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. Avian Pathology, 28.(3): 245-255.

Swayne, D. E. and D. A. Halvorson. (2003) Influenza. In: Diseases of poultry, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 135–160.

Szeleczy, Zs., Kecskeméti, S., Kiss, I., Lomniczi, B. (2008) Régi, hazai madárinfluenzavírusok genetikai jellemzése. Magyar Állatorvosok Lapja, 130: 165-179.

Szeleczy, Zs., Dán, Á., Ursu, K., Ivanics, É., Kiss, I., Erdélyi, K., Belák, S., Muller, C.P., Brown, I.H. and Bálint, Á. (2009) Four different sublineages of highly pathogenic avian influenza H5N1 introduced in Hungary in 2006-2007. *Veterinary microbiology* 139(1-2):24-33.

Szeleczy, Zs., Bálint, Á., Gyarmati, P., Metreveli, G., Dán, Á., Ursu, K., Belák, S., Lomniczi, B., Kiss, I. (2010) Characterization of two low pathogenic avian influenza viruses isolated in Hungary in 2007. *Veterinary Microbiology* doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.008

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599. <http://www.megasoftware.net>.

Tanyi, J. (1970) A-típusú influenzavírus gyöngytyúkokban (Előzetes közlemény). *Magyar Állatorvosok Lapja* 25: 554-555.

Tanyi, J. (1972a) A 6-os szérotípusú madár-influenzavírusokról. *Magyar Állatorvosok Lapja* 27: 3-4.

Tanyi, J. (1972b) A gyöngytyúk influenzájáról. *Magyar Állatorvosok Lapja* 27: 5-8.

Tanyi, J. (1972c) Influenzavírus kacsákban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 27: 9-11.

Tanyi, J. (1972d) Type A Influenza virus Infection in Guinea Fowls. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 22: 125-131.

Tanyi, J. (1972e) Type A Influenza vírus Infection of Duck Flocks in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 22: 271-278.

Tanyi, J. (1972f) Újabb influenzavírusok növendék és kifejlett kacsákban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 27: 13-16.

Tanyi, J. (1973) Madárinfluenza-vírusok előfordulása Magyarországon. Kandidátusi értekezés. Debrecen, (Védve: 1974. február 13.)

Tanyi, J. (1976a) Madárinfluenza-vírusok előfordulása Magyarországon. *Agrártudományi Közlemények* 35: 405-412.

Tanyi, J., Romváry, J., Temessy, Z., Sári, I. (1976b) Az influenzavírus szerepe kacsák tömeges sinusitisében. *Magyar Állatorvosok Lapja* 31: 263-266.

Tanyi, J., Romváry J. (1976c) A madárinfluenzákról. *Állategészségügyi és Takarmányozási Közlemények* 66-73.

Tanyi, J., Temesi, Z., Czirják, L., Kaszanyitzky, É. és Al Imadi, M.A. (1979) A pulyka fertőző és parazitás betegségei III. A pulyka fontosabb vírusbetegségei. *Állategészségügyi és Takarmányozási Közlemények*. Phylaxia, 99-107.

Tanyi, J. (1983) Madárinfluenza pulykában. *Magyar Állatorvosok Lapja* 38: 409-413.

Tanyi, J. (1995) Influenza investigations in the Veterinary Health Institute, Debrecen, Hungary. *Hungarian Agricultural Research* 2: 19-26.

Tanyi, J. (1997a) A madárinfluenzák helye és szerepe az influenzakörben. Magyar Állatorvosok Lapja 119: 718-723.

Tanyi, J. (1997b) Egyes állatbetegségek diagnosztikai eredményeinek értékelése. MTA doktori értekezés.

Varga J., Tuboly S., Mészáros J. (1999) A háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.) Mezőgazda kiadó 427-436.

Veen, J., Brouwer, J., Atkinson, P., Bilgin, C., Blew, J., Eksioglu, S., Hoffmann, M., Nardelli, R., Spina, F., Tendi, C., Delany, S. (2007) Further identification and first field assessment of Higher Risk Species. Ornithological data relevant to the spread of avian influenza in Europe (phase 2). Wetlands International Edited and coordinated by: J. Veen, J. Brouwer and S. Delany

Villarreal-Chávez, C. and Rivera-Cruz, E. (2003) An Update on Avian Influenza in Mexico. Avian Diseases 47: 1002-1005.

Weber, S., Harder, T. Starick, E., Beer, M., Werner, O., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C. and Mundt, E. (2007) Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. J. Gen. Virol. 88(2): 554-558.

Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. and Kawaoka, Y. (1992) Evolution and ecology of influenza viruses. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 56. 152-179.

Webster, R.G., Krauss, S., Hulse-Post, D. and Sturm-Ramirez, K. (2007) Evolution of influenza A viruses in wild birds Journal of Wildlife Diseases 43: 1-6.

WHO (World Health Organization); www.who.int/en

WHO (World Health Organization): Recommended laboratory tests to identify influenza A/H5 virus in specimens from patients with an influenza-like illness. (2005) Available online at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/en/avian_labtests1.pdf

WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (2008) Toward a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Emerging Infectious Diseases 14(7).

Wright, S.M., Kawaoka, Y., Sharp, G.B., Senne, D.A. and Webster, R.G. (1992) Interspecies Transmission and Reassortment of Influenza A Viruses in Pigs and Turkeys in the United States. American Journal of Epidemiology 136(4): 488-497.

Xu, X., Subbarao, K. Cox N.J. and Guo Y. (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/ 96(H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology 216: 15-19.

Yasué, M., Feare, C.J. Bennun, L. Fiedler, W. (2006) The Epidemiology of H5N1 Avian Influenza in Wild Birds: Why We Need Better Ecological Data. BioScience, 56(11): 923-929.

Zohari, S., Gyarmati, P., Thorén, P., Czifra, Gy., Bröjer, C., Belák, S., Berg, M. (2008) Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus Genes* 36(1): 117-125.

11. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Szeleczky, Zs., Kecskeméti, S., Kiss, I., Lomniczi, B. (2008) Régi, hazai madárinfluenzavírusok genetikai jellemzése. Magyar Állatorvosok Lapja 130. 165-179

Szeleczky, Zs., Dán, Á., Ursu, K., Ivanics, É., Kiss, I., Erdélyi, K., Belák, S., Muller, C.P., Brown, I.H. and Bálint, Á. (2009) Four different sublineages of highly pathogenic avian influenza H5N1 introduced in Hungary in 2006-2007. Veterinary microbiology 139(1-2):24-33.

Szeleczky, Zs., Bálint, Á., Gyarmati, P., Metreveli, G., Dán, Á., Ursu, K., Belák, S., Lomniczi, B., Kiss, I. (2010) Characterization of two low pathogenic avian influenza viruses isolated in Hungary in 2007. Veterinary Microbiology
doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.008

Szeredi, L., Dán, Á., Pálmai, N., Ursu, K., Bálint, Á., Szeleczky, Zs., Ivanics, É., Erdélyi, K., Rigó, D., Tekes, L., Glávits, R. (2010) Tissue tropism of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in naturally infected mute swans (*Cygnus olor*), domestic geese (*Anser anser* var. *domestica*), pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) and mulard ducks (*Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*). Acta Veterinaria Hungarica 58. 133-145.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezen a helyen szeretném megköszönni mindazoknak a segítségét, akik lehetővé tették a disszertáció elkészülését.

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Lomniczi Bélának a szakmai vezetésért – a kutatás menetének irányításáért és a kapott eredmények értékeléséért.

Köszönettel tartozom az MGSzH-ÁDI igazgatójának, Dr. Tekes Lajosnak azért a segítségért, amit a munkámhoz szükséges feltételek megteremtésével és a támogatásával nyújtott, továbbá a Baromfi-virológiai Osztály vezetőjének, Dr. Bálint Ádámnak, aki számos szakmai tanáccsal látott el.

Szeretném megköszönni a volt Debreceni Állategészségügyi Intézet igazgatójának, Dr. Kiss Istvánnak és a Virologiai Osztály vezetőjének, Dr. Kecskeméti Sándornak az értékes szakmai segítséget.

Természetesen köszönöm valamennyi budapesti és debreceni kollégám laboratóriumban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családtagjaim türelméért, amit a disszertáció készítése során tanusítottak.