

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék

Az EHV hazai kimutatása RNAscope ISH technikával

Szerző: Horváth Dávid Géza

Témavezető: Dr. Balka Gyula, egyetemi docens

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés	3
3. Irodalmi áttekintés	4
a. Történet	4
b. Kóroktan	5
c. Előfordulás és járványtan	6
d. Kórfejlődés	7
e. Klinikum	8
f. Kórbonctan	9
g. Kórjelzés, elkülönítő kórjelzés, kezelés, megelőzés	10
4. Célkitűzések	12
5. Anyag és Módszer	13
a. Esetismertetés	13
b. Patológiai vizsgálat	13
c. RNAscope	13
d. PCR-vizsgálatok és szekvenciameghatározás	17
e. FFPE PCR-vizsgálatok	18
6. Eredmények	20
a. Patológiai vizsgálat	20
b. RNAscope	23
c. PCR-vizsgálatok és szekvenciameghatározás	25
d. FFPE PCR-vizsgálatok	27
7. Megbeszélés / Következtetések	28
8. Összefoglaló	31
9. Summary / Abstract	32
10. Irodalomjegyzék	33
11. Köszönetnyilvánítás és egyéb nyilatkozatok	38

Rövidítések jegyzéke

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

BHV1 / 2 / 4 = Bovine Herpes Virus 1 / 2 / 4

BHQ = black hole quencher

Ct = cycle treshold / ciklus küszöbérték

DIC = disseminated intravascular coagulopathy / disszeminált intravaszkuláris coagulopathia

DIG = digoxigenin

DNA = deoxiribonucleic acid / DNS = deoxiribonukleinsav

EEHV = Elephant Endotheliotropic Herpes Virus

EIBD = Elephant Inclusion Body Disease

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAM = 6-carboxyfluorescein

FFPE = Formalin Fixed and Paraffin Embedded / formalinban fixált és paraffinba ágyazott

gB = Glycoprotein B

H.-E. = hematoxin-eozin

IF = Immunfluoreszencia

IHC = Immunhisztokémia

ISH = *in situ* hibridizáció

PBMC = peripheral blood mononuclear cells / perifériás vér mononukleáris sejtek

PCR = Polymerase Chain Reaction / Polimeráz láncreakció

PPIB = peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B

RNA = ribonucleic acid / RNS = ribonukleinsav

SAA = Serum Amyloid-A

Bevezetés

Az EEHV egy világszerte előforduló herpeszvírus, amelyet az ázsiai és valószínűleg az afrikai elefántok is hordoznak látens formában. Alkalmanként súlyos kórképet idéz elő, és ez bár leginkább fogságban tartott állatok esetében kerül vizsgálatra, vadon élő állatokban is előfordul, csak azok nem kerülnek napvilágra. A kórkép első (és eddig egyetlen) magyarországi előfordulása tavaly novemberben történt, amelynek nyomán a Fővárosi Állat és Növénykert 5,5 éves ázsiaielefánt-borja elpusztult. A kórokozó nagyon veszélyes a fogságban tartott és a vadon élő elefánpopulációkra nézve is, az ellene való védekezés óriási kihívást jelent. Az állatkerti ázsiaielefánt-borjak körülbelül 20%-át érinti a súlyos, heveny forma (vadon élőket is), nagyarányú elhullást, valamint jelentős kezelési és diagnosztikai költségeket is okozva.

A kórokozó egy újonnan leírt, mégis ősinék tartott herpeszvírus-nemzetségbe, a *Proboscivirus* genusba tartozik. Az eddig leírt 7 szubtípusa közül világszerte az 1A a leggyakoribb. Változatos tünetekben megnyilvánuló kórképeket okozhatnak, legjellemzőbbek mégis az érendothel-károsodás nyomán kialakuló vérzések a heveny szisztémás formánál, amely leginkább az ázsiai elefántot érinti. Főként a terjedés és a kórfejlődés részletei nem ismertek, ill., hogy milyen tényezők vezetnek a súlyos, többnyire halálos kórkép kialakulásához.

Az EEHV tulajdonságainak mélyrehatóbb ismerete alapfeltétele az ellene való hatékony védekezésnek. Ezeknek a felderítésében kulcsfontosságúak a megfelelő diagnosztikai eszközök, így az általunk kifejlesztett *in situ* hibridizációs eljárás, amely nagyfokú érzékenységgel és specifikusan mutatja ki a kórokozót és annak szöveti eloszlását. A szabadon hozzáférhető módszer segítségével lehetőség nyílt a terjedés és a kórfejlődés még nem tisztázott részleteinek felderítésére is.

Irodalmi áttekintés

Történet

Az elefántok endotheliotropikus herpeszvírusa (EEHV) egy viszonylag régóta ismert, széles körben elterjedt, de sporadikusan halálos megbetegedést előidézni képes elefánt-herpeszvírus (Long et al., 2016). Az első, dokumentált, a vírusfertőzés nyomán bekövetkezett elhullás egy ázsiai elefántot érintett a washingtoni állatkertben 1995-ben, noha már a 80-as évektől kezdődően azonosítottak elefántmintákban herpeszvírusokra utaló struktúrákat, ill. már a 70-es években is észleltek ilyen jellegű vírusok következtében kialakult körülírt bőrelváltozásokat vad, afrikai elefántokban (Richman et al., 1999). Herpeszvírus-partikulák legelső azonosítása elektronmikroszkóppal afrikai elefánt tüdőgócaiból szintén ezekben az években történt (McCully et al., 1971). 1990-ben Metzler és mtsai 21, fogságban tartott ázsiai elefántot vizsgáltak szerológiaiailag, és mind a 21 pozitív volt 3 szarvasmarha-herpeszvírusra (BHV1, 2, 4) specifikus antitest valamelyikére. A titerek alacsonyak voltak, tehát feltételezhetően ezekkel a vírusokkal rokon, addig még nem azonosított vírus okozta keretszreakcióról volt szó. Richman és mtsai (1999) a klinikum és kórbonctan szempontjából számos gyanús esetet dolgoztak fel újra. Főként a májból, a szívizomból és a nyelvből származó szövetek elektronmikroszkópos és PCR-vizsgálatával igazolták, hogy egy új herpeszvírus által előidézett betegségről van szó. 1995 óta több mint 50 esetet regisztráltak Európában és Észak-Amerikában, az ázsiai eseteket is beleszámítva pedig ez már meghaladja a 100-at (Long et al., 2016).

A vírusfertőzés nyomán kialakult megbetegedés leggyakrabban fiatal (2–8 éves), fogságban született ázsiai elefántokat érint, de vannak dokumentált esetek idősebb állatokról, vadon élő állatokról. Esetenként afrikai elefántok is súlyosan megbetegedhetnek, de náluk általában enyhe lefolyású a betegség (Bronson et al., 2017). A kórképet egyesek az emberi bárányhimlőhöz hasonlítják, a vérérkárosodás és a fiatal kor, mint hajlamosító tényező miatt (Ossent et al., 1990). Észak-Amerikában összesítették az eseteket, és azt találták, hogy az 1962 és 2007 között fogságban, élve született 78 ázsiai elefántból 20-ról bizonyított, hogy ez a kórokozó pusztította el, további 5 pedig meggyógyult a kezelés nyomán. Az érintett állatok az esetek felében 1 és 4 év közöttiek voltak (Blaho, 2012). A tapasztalatok alapján leginkább a 2–3 éves korosztály érintett, a még szopó állatok viszonylag védettek a maternális ellenanyagoknak köszönhetően, így a kritikus időszak a választás környéke és hajlamosító tényező lehet a mesterséges nevelés is (Dr. Sós Endre, személyes közlés).

Kóroktan

Jelenleg az EEHV-t a *Betaherpesvirinae* alcsaládba sorolják (bár sokak szerint célszerűbb lenne az új *Deltaherpesvirinae* alcsaládba [Richman et al., 2000; Ehlers et al., 2001; Zong et al., 2014; Richman et al., 2014]), ezen belül pedig – molekuláris és filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján – az alcsalád egy ősi csoportjának tekintett *Proboscivirus* genusba (Ehlers et al., 2001). A külön genus evolúciós magyarázata az, hogy a ma élő elefántok ősei a többi méhlepényes emlősétől körülbelül 100 millió éve váltak külön, és herpeszvírusaik velük együtt, párhuzamosan fejlődtek. Az EEHV külön típusokra kb. 10–35 millió éve vált szét, jóval azelőtt, hogy a mamutok, vagy az afrikai/ázsiai elefántok különváltak volna, ami hozzávetőlegesen 7 millió évvel ezelőtt történt. Érdekességként megemlíthető, hogy az EEHV1 az első leírt Betaherpeszvírus, amely timidin-kináz génnel rendelkezik (Ehlers et al., 2006).

Elefántban eddig összesen 13 herpeszvírust írtak le. Ebből 7 tartozik az EEHV-csoportba: EEHV1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6 és 7. Ezek közül mindegyik okozhat súlyos, halálos kimenetelű vérzéses betegséget, de az esetek többségéért az 1A szubtypust teszik felelőssé (Denk et al., 2012). A további elefánt-herpeszvírusok egészséges ázsiai és afrikai elefántok szem- és genitális váladékából kimutatott Gammaherpeszvírusok, amelyek csak távolabbi rokonai az EEHV-knek, és nincs köztük az általuk okozott betegséghez sem (Latimer et al., 2011).

A leggyakoribb és egyben legpatogénebb is egyben az EEHV1-es, amelynek 2 szubtypusa van (EEHV1A és 1B). A legújabb vizsgálatok a 3-as típust is erősen patogénnek tekintik, amelynek a genetikai távolsága az EEHV1-hez és EEHV2-höz legalább kétszer akkora (25,4–34,2%), mint az azok között megfigyelhető különbség (Garner et al., 2009). Esetenként azonban akár a legpatogénebb formát is ki lehet mutatni tünetmentes, leginkább felnőtt állatok ormány- és egyéb váladékából (Hardman et al., 2012). Egészséges, felnőtt afrikai elefántok tüdőgócaiból, lépéből a vírus több altípusát is kimutatták már egyszerre (Zong et al., 2016). A vadon élő és a fogságban tartott elefántpopuláció valószínűleg endémiásan fertőzött és látens formában hordozza a vírust, ill. fiatal korban, enyhe formában vészeli át a fertőzést (Zachariah et al., 2013). Egy korábbi tanulmányban 36 állatot, ismert PCR-eredményekkel vizsgáltak a gB-burokfehérje elleni ellenanyagok jelenlétére, 25 pozitív állatból 19 szerológiailag is át volt hangolódva (van den Doel et al., 2015). Egy Indiában végzett felmérésben tünetmentes ázsiai elefántok ormányváladékát vizsgáltak kvantitatív, valós idejű PCR-el, és az állatok 35%-ából (16/46) legalább 1, az ázsiai fajra jellemző altípus kimutatható volt (Stanton et al., 2014).

Felmerül, hogy esetleg az adott vírussal szemben hiányos maternális és protektív immunitás is lehet hajlamosító tényező, mint a kézzel nevelt állatok esetében (a vadonban az

ilyen állat elpusztul) vagy hogy a mostani elefántok genetikailag már sokkal változatosabbak, mint őseik és ez vezethet a betegség kialakulásához (Long et al., 2016). Annyi bizonyosnak látszik, hogy az EEHV egyik elefántfajra nézve sem tekinthető obligát patogénnek, de mindkettőben megtalálható és esetenként meg is betegíti azokat. A vírust sokáig nem sikerült izolálni, még primer, elefántplacenta eredetű endothelsejt-tenyészetben sem (Zong et al., 2014). Egy a múlt hónapban megjelent közlemény azonban leírja, hogy rövid ideig – 28 napig (4 passzázs erejéig) – sikerült szaporítani a vírust *in vitro*, elefánt-fibroblast és fertőzött elefántból származó PBMC-k közös tenyészetén (ko-kultúráján), amit fertőzött állatból származó nyelvminta homogenizátumával oltottak be (Pavulraj et al., 2019).

Előfordulás és járványtan

A fertőzés nyomán kialakult súlyos megbetegedés az Észak-Amerikában és Európában, fogságban született ázsiaielefánt-borjak nagyjából 20%-át érinti és az elhullásuk körülbelül 2/3-áért felelős (Blaho, 2012). Elefánton kívüli előfordulása nem ismert, az eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy a 2, 3, 6, és 7-es szubtypusnak az afrikai, a többinek az ázsiai elefánt a természetes gazdája, a 3-as esetében pedig bizonyított a fajok közti átmenet (Long et al., 2016). (Herpeszvírusos betegség lévén nem lenne szokatlan, hogy a fertőzés a rezervoárfajban tünetmentes, míg más fajban súlyos megbetegedést okoz, ahogyan az Aujeszky-féle betegség vagy a roncsoló orrhurut esetében is megfigyelhető.)

Valószínűsíthető, hogy a többi herpeszvírushoz hasonlóan gyenge a vírus környezeti hatásokkal szembeni ellenálló képessége, így a közvetett terjedési útvonalaknak a szerepe nem lényeges (Blaho, 2012). Az a korábbi elmélet, miszerint ázsiai és afrikai, valamint a vadon és fogságban született ázsiai elefántok közötti hosszabb távú érintkezés korlátozása megelőzheti a fertőzést (Richman et al. 2000), mára már helytelennek bizonyult. Észak-amerikai tanulmányok a létesítmények közti terjedést kizárták, úgyhogy erősen valószínűsíthető, hogy az ázsiai elefántok többsége (sokan úgy vélik, hogy az összes elefánt) fiatal korától kezdve vírushordozó. Tovább erősíti ezt a feltételezést, hogy sok beteg borjú biztosan nem érintkezett afrikai elefánttal, hisz korábban úgy vélték, hogy ettől a fajtól ered a fertőzés (ez az elképzelés is biztosan megdőlt mára). A mesterséges termékenyítés valószínűleg szintén nem játszik szerepet a terjedésben, mivel bizonyított, hogy egyetlen bikától vagy tehéntől származó több utód eltérő időpontokban pusztult el más-más törzsektől, és amikor 2 borjú egyszerre betegedett meg vagy pusztult el ugyanabban a létesítményben, akkor azt mindig ugyanaz a vírustörzs okozta (Ryan and Thompson, 2001). Nem zárható ki azonban a hüvelytornácon időnként kifehélyesedő göbök révén, ill. a transzplacentáris úton való terjedés (Richman et al., 2000).

Mivel kimutatták a vírust tünetmentes állatok nemi, kötőhártya, valamint szájüregi váladékaiból, felmerül ezek fertőzésterjesztő szerepe is (Hardman et al., 2012).

A vírus terjedésének addig nem tisztázott részleteit fedheti fel egy nemrégiben megjelent tanulmány (Kochagul et al., 2018). Ebben a herpeszvírusokban igen konzervatív gB burokképlete ellen termeltettek nyúlban poliklonális ellenanyagokat. A gB-nek, valamint a gH-nak és a gL-nek fontos szerepe van a membránfúzióban és a sejtbe jutásban is, így a fertőzőképesség egyik meghatározó tényezője *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Az ellenanyagokkal végzett immunfluoreszcenciás eljárással vizsgálták a szövettropizmust, a sejtropizmust és a lehetséges terjedési útvonalakat. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a közvetlen érintkezés mellett a nyál, a bélsár és az ormány váladéka lehetnek a lehetséges terjesztő közegek (Kochagul et al., 2018).

Kórfejlődés

A kórfejlődés lehetséges részleteinek tisztázásában is új eredményekre mutatott rá az előbb említett közlemény (Kochagul et al., 2018). A poliklonális anti-gB ellenanyagokkal végzett IF- és IHC-vizsgálatokkal a vírust nagy számban találták meg a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben, az úgynevezett PBMC-kben. Valószínűleg a primer fertőzést követően ezen sejteken keresztül valósul meg a viraemia, leginkább az ázsiai elefántban. Emellett nagy vírusrészlet volt kimutatható a tápcsatorna hámsejtjeiben, főleg a gyomorban és a bélrendszerben. Ez nagyban valószínűsíti a vírus emésztőrendszeri váladékokkal, ill. bélsárral való lehetséges terjedését bár ilyen irányú vizsgálatokat még nem végeztek. Megtalálták a vírust a nyálmirigyben – ahol valószínűleg a primer replikáció zajlik –, ami miatt feltehetően a nyál is fertőzési forrás, ill. a *per os* fertőzést valószínűsíti. A látencia helyét ezen vizsgálat nem tudta beazonosítani, de a többi Betaherpesvírushoz hasonlóan ez leginkább a nyálmirigyekben és a lymphoreticularis szövetekben történhet. A nyálmirigy a legvalószínűbb helye a primer replikációnak és a látenciának is.

Nagyvonalakban a kórfejlődés ezek alapján a következő: a vírus bejut és elszaporodik a nyálmirigyekben, majd a PBMC-khez kötődően viraemiát okoz. (A viraemia alatt a SAA-szint jelentősen megemelkedik, aminek a kórjelzés szempontjából van jelentősége [Stanton et al., 2013a]). A vírus így eljut a célsejtekhez, ahol a szekunder replikáció zajlik. Ezek főleg az ereket bélelő endothelsejtek amiről a kórokozó a nevét is kapta, valamint a tápcsatorna hámsejtjei. Ennek megfelelően alakulnak ki a betegségre jellemző tünetek és kórbonctani elváltozások. Egy korábbi tanulmány szerint a klinikai tünetek megjelenése előtt már akár 28 nappal a vérben kimutatható a vírus-DNS, majd megjelenik az ormányváladékban is (Stanton et al., 2013b).

Egy elefánt egyszerre több EEHV-törzssel is fertőzött lehet, egy tünetmentes állat ormányváladékában lévő vírus-DNS pedig egy már lezajlott és a látenciából aktiválódott fertőzésre is utalhat (Stanton et al., 2013b). Hogy ezek miben befolyásolják egymást és a betegség többi részletét, az további kutatásokat igényel. A kórokozó emberre való terjedését, továbbá, hogy a különböző EEHV-szubtípusokkal való fertőződés eredményez-e keresztimmunitást a genus többi tagjával szemben, semmilyen vizsgálat nem igazolta eddig.

Klinikum

A kórokozó tehát mind az ázsiai mind az afrikai elefántokat megbetegítheti, de súlyos tünetek általában csak az előbbiben jelentkeznek. A legsúlyosabb kórforma a többnyire fiatal ázsiai elefántokat érintő heveny vérzéses betegség, ami a viraemiát követő szisztémás endothelkárosodásnak tudható be. Ennek nyomán a véralvadás intrinsic útjának aktiválódása révén DIC alakul ki, ill. számos létfontosságú szerv súlyosan károsodik, mint pl. a szív és a máj (Ossent et al., 1990). A kapillárisok fala tehát károsodik, vérzések, következményes vérvesztés, érgyulladás, ill. ischemiás infarktusok alakulnak ki, amelyek, ha a szívizomzatban is jelentkeznek, az állat szívelégtelenség miatti sokkban elpusztul (Kochagul et al., 2018). A heveny vérzéses forma van, hogy akár 24 óra alatt, de általában 5–7 napon belül az állat halálával jár. A becsült elhullási arány 80–85% (Hayward, 2012). Sokszor csak általános levertség látható, jellemzőek lehetnek a szájüreg fekélyei/vérzései, egyesek merev ízületekkel való járást figyeltek meg, később ödéma volt látható a fejen/nyakon. Idősebb ázsiai elefántokban leírtak a vírushoz köthető, helyi nyálkahártya-elváltozásokat a szájüregben és a hüvelyben súlyosabb tünetek kialakulása nélkül (Schafteenaar et al., 2010).

Afrikai elefántokban a kórkép általában jóindulatúan zajlik, fiatal állatokban, rózsaszínes göbök kialakulásával a fej és a törzs bőrében, valamint tünetmentes, felnőtt állatok boncolása során körülírt lymphoid sejtproliferáció eredményeként kialakuló kis fehér góccal a tüdőben (Basson et al., 1971). A bőrben ezek az elváltozások papillomaszerű növedékek formájában jelentkeznek, amelyek később ki is fekélyesedhetnek (Jacobson et al., 1986). Lymphoid növedékek előfordulhatnak továbbá a hüvelytornácon is (Stanton et al., 2010).

Az ázsiai elefántokra jellemző heveny kórforma esetén a beteg állatok leverték, étvágytalanok, a szívverésük szapora, nyálkahártyáik sápadtak, nyelvük cyanotikussá válik (a hegyén kezdődik és végigterjed rajta), szájüregükben fekélyek alakulnak ki, a fejük, ormányuk, nyakuk és a mellső lábaik ödémásak lesznek. Szaporodásbiológiai zavarok, továbbá uraemia, thrombocytopenia és lymphopenia is felléphet, ezen kívül megfigyeltek sántaságot, kólikás tüneteket és hasmenést is (Long et al., 2016). Láz szintén kísérheti, de nem minden esetben

(Sripiboon et al., 2017). A thrombocyták és monocyták erőteljes csökkenését a kórjelzés szempontjából igen hasznos és specifikus tényezőnek találták, és rendszeresen mérik is a fertőzés korai felderítésére (a javasolt heti vérvétel esetén jóval a klinikai tünetek megjelenése előtt felveti a gyanút) vagy a klinikailag beteg állatok kórlefolrásának monitorozására (Long et al., 2016).

Kórbonctan

A kórbonctani képet hasvízkór, zsigeri vizenyő, testszerte pontszerű és nagyobb kiterjedésű vérzések (különösen kifejezettek az endo- és epicardium alatt, valamint diffúzan a myocardiumban) megjelenése, folyadékfelhalmozódás a szívburokban, bélüregbeli vérzés és nyálkahártyafekélyek jellemzik (főleg a szájüreg, gége és vastagbél területén), a 3-as típusnál ezen túlmenően súlyos vesevelő-vérzés is megfigyelhető. A belső szervek megnagyobbodnak, a nyirokcsomók megduzzadnak (Garner et al., 2009).

A kórszövettani elváltozások igen változatosak lehetnek: az erek körül kis vérzések, vizenyő, endothelsejt-hyperthrophia vagy -elhalás, az erek falának fibrinoid elfajulása, thrombosis és lympho-histiocytás vasculitis figyelhető meg (Richman et al., 2000). Nemcsak a kapillárisok, hanem a nagyobb erek endothelrétege is érintett lehet, főleg a lépburok, a vesevelő, a retina és a szivárványhártya artériái esetében. Sejtmagzárványokat a kapilláris-endothelsejtekben mindenhol, de leginkább a májban, (a sinusoidok falában is), a szívben és a nyelvben találhatunk, ezekben a szervekben a legnagyobb ugyanis a vírusszámosság (Schmitt et al., 2000; Seilern-Moy et al., 2016). A zárványok Cowdry-A típusúak, amelyek egyesek szerint kórjelző értékűek (Richman et al., 2000), a kórkép korábbi neve, az EIBD (Elephant Inclusion Body Disease) is innen ered. A 3-as típusnál viszonylag nagy sűrűségben vannak zárványok a vesevelő nagyobb artériáiban (Garner et al., 2009). Testszerte, többek között a vázizom, a szívizom, a tápcsatorna, a bélfodor és bőr alatti kötőszövet zsírszöve, valamint a máj és a mellékvesék területén találhatunk kisebb neutrophil granulocytá aggregátumokat a vérzésekkel és a megnövekedett áteresztőképességgel összefüggésben (Ossent et al., 1990). A nyirokcsomókban enyhe erythrocytaphagia és hemosiderosis látható a velő sinusaiban, a májsinusoidokban Kuppfer-sejt hypertrophia, az állományában májsejtkárosodás és -elhalás, valamint enyhe neutrophil granulocytás beszűrődés. Gyakran megfigyelhetők az úgynevezett kék testecskék ("blue bodies") a máj sinusoidokban, ritkábban a vese peritubularis kapillárisaiban. Ezek nagyjából gömb alakú, 15–20 µm átmérőjű basophil képletek, tulajdonképpen degeneratív gyulladáso sejtek (Garner et al., 2009). Leírtak enyhe rhabdomyolysist a vázizomokban, a végtagokban és a nyelvben. Az emésztőrendszerben enyhe-

mérsékelt vérzést és hámsejtelhalást, -leválást, villus atrophíát és lympho-histiocytás-plasmasejtes infiltrációt írtak le, főleg a gyomorban és a végbél cryptáinak hámsejtjeiben. A lépben és a nyirokcsomókban mérsékelt lymphoid depléciót tapasztaltak (Kochagul et al., 2018).

A nyelv alatti nyálmirigyekben sejt- és sejtmagduzzanat, valamint mérsékelt lympho-histiocytás infiltráció mellett a korábban említett gB-burokfehérje ellen termeltetett ellenanyagok kimutatására irányuló IF-vizsgálatban azt találták, hogy pozitív festődés leginkább a szerózus és mucinózus mirigyvégkamrák acinussejtjeiben volt, továbbá a kivezető járatok köbhámsejtjeiben, hengerhám-sejtjeiben és a lumenben lévő elhalt hámsejtekben (Kochagul et al., 2018).

Kórjelzés, elkülönítő kórjelzés, kezelés, megelőzés

A diagnózis, amelynek időben történő felállítása kulcskérdés az állat túlélésének szempontjából, legegyszerűbben és leggyorsabban kvantitatív, valós idejű PCR-vizsgálattal végezhető el az élő állatok nyálkahártya-elváltozásaiból és véréből (Pursell et al., 2016). Sokszor azonban ezt nem érdemes megvárni, hanem a gyanús tünetek jelentkezésekor egyből el kell kezdeni a kezelést. További gondot jelent, hogy nincs univerzális PCR-módszer az összes EEHV-változat kimutatására. (Ha a víruskimutatás a virális DNS-t célozza a vérben, akkor egyértelmű pozitív eredményt a tünetek megjelenése után ad csak, hiszen látens formában nincs viraemia [Latimer et al., 2011]). Ugyanakkor TaqMan-rendszerű valós idejű PCR-technikát használva az EEHV1-et tünetmentes ázsiai elefántok ormány-, kötőhártya-, hüvely- és szájpadlásváladékából is kimutatták már, tehát önmagában a vírus jelenléte még nem jelenti súlyos kórkép kialakulását (Hardman et al., 2012), ezért kell párhuzamosan a vérképet is vizsgálni. Diagnosztikai célú ELISA-teszt még nincsen a gyakorlatban, de van lehetőség a szeropozitív állatok kiszűrésére egy olyan típusával, ami a gB-ellenes ellenanyagokat mutatja ki, noha ez sem képes az egyes típusok elkülönítésére (van den Doel et al., 2015). További gondot jelent, hogy a PCR-pozitív állatok kb. 80%-a mutat csak szerológiai áthangolódást (Kochagul et al., 2018). A thrombocytaszám rendszeres mérése szintén nagy segítséget nyújthat a klinikai megjelenés előrejelzésére vagy nyomon követésére (Long et al., 2016).

Noha eredetileg a hetente való vérvételt tűzték ki célul, a Fővárosi Állat és Növénykert protokollja alapján 2 hetente vettek vért, mivel azt az állatok együttműködő képessége nagyban befolyásolja. A vérvizsgálat leginkább a thrombocytaszám, a hematokrit érték és a monocytaszám ellenőrzésére irányul.

Elkülönítő kórjelzés szempontjából az E-vitamin-hiány, *Citrobacter freundii* fertőzés, Clostridium enterotoxaemia, lépfene, vírusos encephalomyocarditis és a salmonellosis jön szóba (Ortega et al., 2015; Cracknell 2016).

Az esetek mintegy 1/3-ában a gyorsan megkezdett, intenzív és több hetes (legalább 4 hetes) antivirális kezelés, leginkább *per os* vagy végbélen keresztül alkalmazott famciclovirrel vagy ganciclovirrel gyógyulást eredményezhet (Schmitt et al., 2000). A hatóanyag a famciclovir esetében egy pro-drug, a hatékony forma neve penciclovir. A probléma ezzel nemcsak az, hogy drága, hanem csak az esetek egy részében hatásos és az leginkább a korai felismeréshez és az azonnal megindított kezeléshez kötött. Továbbá egyesek megkérdőjelezik a végbélen keresztül alkalmazott famciclovir hatékonyságát, helyette antivirális készítmény iv. adagolását, valamint plazmapótlást és antibiotikum alkalmazását javasolják (Dastjerdi et al., 2016). Parenterális aciclovir alkalmazásával is értek már el gyógyulást (Sripiboon et al., 2017). A vírusellenes kezelés mellett sokktalanítani is kell az állatokat. A houstoni állatkert protokollja alapján a leghasznosabb a plazmapótlás, szükség esetén vérátömlesztés, továbbá oxigénterápia, antibiotikum és fájdalomcsillapító alkalmazása is javasolt. A kezeléseik közben és utána is rendszeresen monitorozni kell az állatokat (www.asesg.org).

A megelőzés szempontjából mindenképp törekedni kell az állatokat érő stresszhatások csökkentésére (Stanton et al., 2014). A vírussal kapcsolatos további, mélyre terjedő vizsgálatok és kutatások szükségesek nemcsak a fogságban tartott elefántok, hanem a vadon élő törékeny populációk védelme miatt is. Vakcina egyelőre nincs, de a jelenleg is folyó intenzív kutatások alapján ígéret van rá, hogy 2 éven belül elérhetővé válhat. A genetikailag igen változékony *Proboscivirus* nemzetség, ill. a vírusizolálás sikertelensége tovább nehezíti az ilyen irányú előrelépéseket (Zong et al., 2014), noha jelentős igény lenne rá az ázsiai elefántok vírus iránti érzékenysége folytán (Fickel et al., 2003).

Célkitűzések

Az alapvető célkitűzésünk az EEHV szövetmintákban való kimutatása volt egy újfajta, RNS alapú *in situ* hibridizációs eljárással. A vizsgálati minták a Budapesti Állatkertben 2018 novemberében elpusztult 5,5 éves ázsiaielefánt-borjúból származtak. Az FFPE-szervmintákon ezzel párhuzamosan végzett valós idejű PCR-vizsgálattal a vírusgenom kópiaszámának mennyisége és a vírusreplikáció során képződő, általunk kimutatott RNS mennyisége közötti összefüggést is felmértük, amivel a módszer érzékenységét is értékeltük. A kimutatott vírus részleges nukleotidsorrendjének meghatározását is elvégeztük, hogy összevessük ezen hazai törzs genetikai hasonlóságát a génbankban fellelhető más vírustörzsekkel, továbbá az evolúciós kapcsolatainak szemléltetésére törzsfát rekonstruáltunk.

Anyag és Módszer

Esetismertetés

A Fővárosi Állat- és Növénykertben 2013-ban született, 5,5 éves ázsiaielefánt-borjú 2018. november 22-én 16 óra körül bizonytalan tüneteket mutatott, nehezebben mozgott, majd 23-án reggel fél 8 környékén már egyértelmű levertség, kedvetlenség tüneteit mutatta, később pedig hasi ödéma is megjelent nála. A klinikai protokoll alapján ezt megelőzően az állattól 2 hetente vettek vért, főleg a monocyták és a thrombocyták számának ellenőrzése végett, amelyek a 23-ai vérvétel idején már igen jelentősen csökkent értékeket mutattak. A teljes kedvetlenség és a vérértékek változása alapján felmerült az EEHV által okozott kórkép alapos gyanúja, ezért azonnal megkezdték a szedálást (detomidin és butorphanol) követő intenzív vírusellenes kezelést (35 l rektális folyadék, 5 mg/ttkg rektális ganciclovir, 150 ml iv. plazmatranszfúzió felnőtt bikától, marbofloxacin és 100 mg dexamethason im.). Erre 14 óra környékén került sor, ekkora került beszerzésre az összes gyógyszer, ami több millió forintnyi tételt jelent. Ennek ellenére sem tudták megmenteni az állat életét, november 24-én délelőtt 11 óra fele, 2 nappal az első tünetek jelentkezése után elpusztult. Ezt követően a tetemet az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Üllői Diagnosztikai Laboratóriumába küldték boncolásra.

Patológiai vizsgálat

Az állat teteme az Állatorvostudományi Egyetem Patológiai Tanszékének Üllői Diagnosztikai Laboratóriumába 2018. november 24-én részletes patológiai vizsgálatra került.

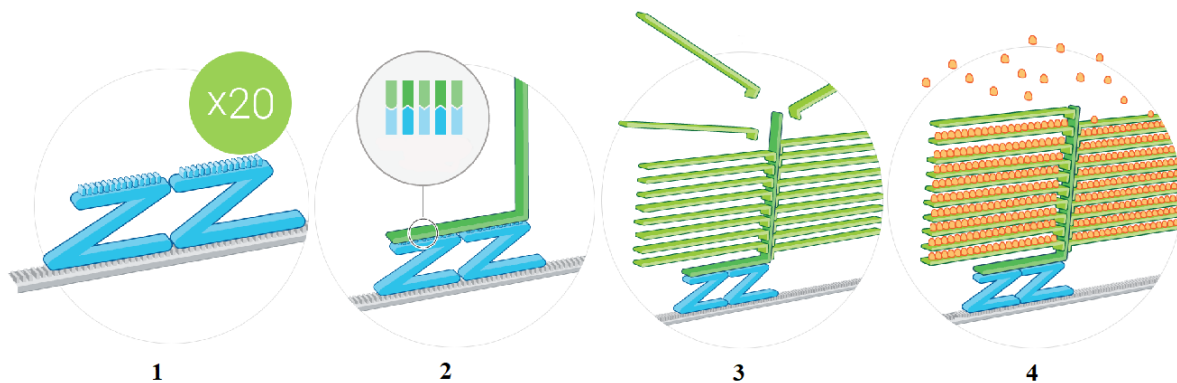
A boncolás során vett szervminták fixálása szobahőmérsékleten, 10%-os semleges pufferezt formaldehyd-oldatban zajlott 24–48 órán át. Ezt követően a mintákat víztelenítő automatával, etanol és xilol segítségével dehidratáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A paraffinblokkokból üvegtárgylemezre 3–4 μm -es metszeteket készítettünk, amelyeket rutin eljárással hematoxilinnel és eozinnal festettünk meg.

RNAscope ISH

A vizsgálatokat egy újfajta, RNS alapú *in situ* hibridizációs módszerrel, RNAscope-al végeztük. Az eljárás, a próbák hibridizációját követően több lépésben felerősíti a célspecifikus jeleket úgy, hogy az úgynevezett háttérzajt, háttérfestést nem (Wang et al., 2012).

Ami igazán újfajta és hatékony módszerré teszi az RNAscope-ot az a dupla Z próbák alkalmazása. Ez két független próba, amelyeket úgy terveznek, hogy egymás mellé tapadjanak a célmolekulán. Minden célzott RNS-szakaszra 20 db Z próba pár lett tervezve, amelyek három

részből épülnek fel. Az alsó, hibridizációs régió 18–25 bázisból áll és komplementer a cél RNS-el. A távtartó/összekötő rész az alsó és a felső régiót köti össze (a Z ferde szára). A felső szekvencia 14 bázisból áll, a 2 egymás melletti próba együtt egy 28 bázis hosszúságú kötőhelyet biztosít az L alakú előerősítő reagensnek (az L alsó rövid szára). Ezt követően erősítő molekulák kapcsolódnak az előerősítők nagyszámú kötőhelyéhez az L alakú próba hosszú szárán. Végül a jelölt próbák, amelyek kromogén vegyületet aktiváló enzimet tartalmaznak bekötődnek az erősítők számos kötőhelyére (1. ábra).



1. ábra. A Z alakú próbák RNS-hez kötődnek (1), majd az általuk képzett kötőhelyre kapcsolódik az L alakú előerősítő (2), amelyhez számos további erősítőmolekula csatlakozik (3). Végül ezen erősítőkhöz kötődnek az enzimtartalmú, jelölt próbák (4). Forrás: www.acdbio.com

A próba nagyon érzékeny, egyetlen RNS molekula kimutatásához már három dupla Z próba bekötődése elegendő. Emellett a próba kifejezetten specifikus is, hiszen egy szimpla Z próba nem specifikus régióhoz tapadása nem biztosít kötőhelyet az előerősítőnek és megelőzi a nem specifikus jelek felerősítését, ami csak két Z próba egymás mellé való hibridizálódása révén valósul meg. A módszer további előnye, hogy degradálódott, részlegesen bomlott mintákon is működőképes, mivelhogy a dupla Z próbás kialakításnak relatíve rövid a célrégiója, összesen mintegy 40–50 bázis, ez pedig lehetőséget biztosít a hibridizációra ilyen körülmények között is (Wang et al., 2012).

A próbák elvégzéséhez és a reakciók validálásához elengedhetetlenek a megfelelő kontrollminták és próbák, hogy validálják a reakciót és a minta RNS-minőséget. A rendszer pozitív kontrollnak egy egyszerű háztartási gént, negatív kontrollnak nem specifikus bakteriális gént használ. Ázsiai elefánt esetében az emlősökön eddig használt (esetünkben sertés, macska), általános PPIB- (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B) próba nem működött, ezért újra kellett tervezni az ázsiai elefánt (*Elephas maximus*) génbanki genomszekvenciái alapján. Az új próba

az ázsiai elefánt 07-B beta actin-like mRNS-ének részleges szekvenciáját célozta, mivel az említett PPIB-gén szekvenciáját még nem publikálták ebben a fajban.

A negatív kontrollpróba alapvető feladata kizárni az esetleges aspecifikus festődést. Az ACDBio által kifejlesztett univerzális negatív próbák célgénje a *Bacillus subtilis* SMY törzsének DapB génje.

Saját vizsgálatunkban az EEHV genomjának egy konzervatív szakaszára, a gB burokfehérje génjére terveztük a próbákat, ezt céloztuk a hibridizációval. A referenciaszekvenciát egy észak-amerikai EEHV1A-törzs génbanki szekvenciája adta, ami az általunk vizsgált hazai vírustörzssel a polimeráz génszakaszon 100%-os nukleotidszekvencia-egyezeit mutatott.

A herpeszvírusok dupla szálú DNS vírusok de a szaporodásuk során képződő RNS-t képesek vagyunk kimutatni az általunk alkalmazott hibridizációs módszerrel. A sejtek magjában, a korai transzkripció alkalmával a virális genomról a celluláris enzimek termelik a hírvivő RNS-eket, továbbá a késői transzkripció során az utód DNS-ekről termelődik még nagy mennyiségben ilyen jellegű nukleinsav.

A technikai kivitelezés szempontjából a módszert a következő főbb részekre lehet tagolni:

Permeabilizálás: a szövetrészeket és azokban a sejtek tárgylemezre fixálása és előkezelése az RNAscope előkezelő Kittel, hogy áteresztővé tegye a sejteket és felfedje a cél-RNS-t.

Hibridizáció: 20 célspecifikus, Z alakú dupla próba kötődik a célzott RNS-molekulákhoz.

Jelerősítés: Az egymás mellé kötődött Z alakú próbák révén a rendszer további reagensei felerősítik a hibridizációs jeleket az erősítőmolekulák és a jelölt próbák egymáshoz való hibridizációjával.

Vizualizálás: minden jelpont egy célzott RNS-molekulát jelöl, ami fénymikroszkóppal, ill. esetünkben szövetszkennel történő digitalizálást követően monitoron vizsgálható (Wang et al., 2012).

A FFPE-metszeteket Superfrost+ (Thermo Scientific) tárgylemezre vittük fel. A metszeteket termosztátban (HybEZ™ Oven) egy óráig, 60 °C-on inkubáltuk, majd elszívófülke alatt 2 × 5 percig xilolban, 2 × 2 percig 96%-os etanolban mostuk, ezután 5 percig száradni hagytuk. A hibridizációs termosztátot 40 °C-ra előmelegítve, a hibridizációs kamrájába a használat előtt fél órával vízzel átitatott párasító lapot tettünk és ezt a már felmelegített termosztátba (HybEZ™ Oven) helyeztük. Párhuzamosan előkészítettünk 700 ml Target

Retrieval oldatot egy főzőpohárban, majd fóliával lefedve forraltuk. A deparaffinált metszetekre ezt követően 5–8 csepp RNAscope hidrogén-peroxid-oldatot cseppentettünk. 10 percnyi szobahőmérsékleten való inkubációt követően a metszeteket kétszer, desztillált vízzel mostuk, majd Target Retrieval oldatban forraltuk 15 percig. Ezután kétszer desztillált vízzel, majd 96%-os etanolban mostuk. Az etanolból eltávolítva, levegőn, szobahőmérsékleten száradni hagytuk. Ezt követően Immedge™ hidrofób barrier tollal hozzávetőlegesen 3 alkalommal körberajzoltuk a mintákat, majd legalább 2 percig szobahőmérsékleten szárítottuk. Ezután 5 csepp RNAscope® Proteáz Plus oldatot cseppentettünk a tárgylemezre úgy, hogy a mintákat teljesen fedje. Ezt követően a 40 °C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban inkubáltuk a mintákat fél óráig, végül desztillált vízzel kétszer mostuk őket. Első lépésben a metszetekről leittattuk a felesleges folyadékot, majd pedig minden mintára cseppentettünk kb. 4 csepp hibridizációs próbát úgy, hogy az egész metszetet ellepje. Ezt követően a mintákat 2 órán keresztül inkubáltuk a korábbiakban 40 °C-ra előmelegített hibridizációs termosztátban. Az inkubációs idő letelte után a metszeteket az előzőleg elkészített mosópuffer-oldatban kétszer, 2 percen keresztül mostuk szobahőmérsékleten. Ezt a 6 db amplifikáló reagens alkalmazása követte. Kezdetnek az 1-est cseppentettük a metszetekre, melynél 40°C-os 30 perces inkubáció volt szükséges. Ezután mosó pufferben kétszer mostuk, szobahőmérsékleten, egyenként 2 percig. Ugyanezt megismételtük a többi amplifikáló reagenssel. Az inkubációs idők a 40°C-os termosztátban 15 perc, 30 perc és 15 perc volt. Az 5-ös és a 6-os reagensnél szobahőmérsékleten inkubáltunk 30, majd 15 percig. Ezután Fast RED-B és -A oldatok 1/60 arányú keverékével kezeltük a metszeteket. Ebből hozzávetőlegesen 120 µl-t pipettáztunk minden tárgylemezre, ezt pedig 10 perces, szobahőmérsékleten való inkubáció követte a hibridizációs kamrában. Desztillált vízzel mostuk, majd 2 percre 50%-os hematoxin I oldatba helyeztük őket. Desztillált vízzel kétszer mostuk a mintákat, majd 10 másodpercig kékítettük 0,02%-os ammónia oldatban, ismét desztillált vízzel mostuk, végül pedig 60°C -on szárítottuk körülbelül 20 percig. Teljes száradás után a metszeteket xilolba helyeztük, majd EcoMount-reagenst cseppentettünk rájuk, és fedőlemezzel lefedtük. A fénymikroszkópos vizsgálat előtt a tárgylemezeket 5 percig, levegőn szárítottuk.

Mind a rutin, hematoxilinnal és eozinnal festett, mind a hibridizált metszeteket Panoramic Midi 2 szövetszkennel (3D Histech, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk és archiváltuk, majd a CaseViewer (3D Histech) programmal tettük láthatóvá és felvételeket készítettünk róluk.

A mennyiségi PCR-reakciókkal való összehasonlíthatóság céljából az RNAscope eredmények kiértékelését követően szemikvantitatív, relatív mennyiségi kiértékelést

végeztünk, amit erőteljes (+++), mérsékelt (++) és kismértékű (+) festődésként határoztunk meg az egyes szerminták esetében.

PCR-vizsgálatok és szekvenciameghatározás

Az állat boncolása során vett szervmintákból borsónyi méretű darabokat 4 mm-es acél csapágygolyóval homogenizáltuk 1,5 ml steril PBS (7,4 pH-jú foszfát pufferált sóoldat, 10mM Nátrium-foszfát, 150mM Nátrium-klorid]) pufferben, egy MagNALyser (Roche, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) félautomata homogenizáló készülékben 3500-as frekvencián 30 másodpercig. Egy perces, 10000 rpm fordulaton történő, hűtött centrifugálást követően 200 µl felülúszót használtunk a DNS-kivonásra, amit KingFisher (KF) Flex roboton a Nucleomag Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A tisztított DNS-t 100 µl-ben oldottuk fel és -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatokhoz. Ezekből DNS-templátként a PCR-reakciókba 5 µl-t pipettáztunk.

A diagnosztikai PCR-reakció során az EEHV polimeráz génjére tervezett kétkörös (nested) PCR-reakciót alkalmaztunk (Ehlers et al., 2001). Az első reakció 428, a második pedig 316 bázispár hosszúságú terméket adott. A denaturáció 15 percig 95 °C-on zajlott, majd 40 ciklus után (minden egyes ciklusban 1 perces denaturációval 94 °C-on, 1 perces primertapadási lépéssel 63 °C-on és 1 perces szálépítéssel 72 °C-on), egy végső láncépítési lépés következett 72 °C-on 5 percig. A második körben az első reakció termékét templátként alkalmazva azonos körülményeket használtunk, kivéve, hogy a primertapadás hőmérséklete 65°C volt. A terméket agarózgél-elektroforézissel tettük láthatóvá.

A nukleotiszekvencia meghatározását is az így kapott termékeken végeztük el, amelyeket az agaróz gélből NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Németország) segítségével tisztítottuk ki. A szekvenálási reakciókban ugyanazokat a primereket használtuk, mint a PCR reakciókban. A szekvenálási reakciókat és a szekvenciafuttatást BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) segítségével a Biomi Kft.l (Gödöllő, Magyarország) végezte ABI Prism 3400 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) készüléken a gyártó utasítása alapján. A két irányból leolvasott szekvenciákat a Geneious Prime® 2019.2.3 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) programmal illesztettük össze. Az illesztés és a törzsfarekonstrukciós vizsgálatokat MEGA X program (Kumar et al., 2018) segítségével a génbankból letöltött további 52 EEHV polimeráz génszakasz felhasználásával végeztük, amelyek az EEHV teljes filogenetikai spektrumát lefedték. A törzsfá pontosságát és

megbízhatóságát 1000 ismétléses bootstrap-vizsgálattal értékeltük, amelyet százalékos értékeként tüntettünk fel a főbb elágazásoknál.

FFPE PCR-vizsgálatok

A vizsgálatokhoz a paraffinos blokkokból egyenként 4 db 10 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd azokat Eppendorf-csőben 1 ml xilolba tettük, 10 másodpercig vortexeltük, majd 2 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd a csapadékot 1 ml 96%-os etanollal vortexeltük 10 másodpercig, majd 2 percig ismét centrifugáltuk. Az etanol a mintában maradt xilol eltávolítása miatt volt szükséges. A felülúszó pipettával való óvatos eltávolítása után (a csapadék felkavarása nélkül) finoman eltávolítottuk a maradék etanolt egy vékony pipettával. Nyitott fedővel inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig (amíg az összes maradék etanol el nem párolgott). 150 µl PKD-pufferrel reszuszpendáltuk a csapadékot és megpöccintettük a csövet, hogy fellazítsuk azt. 10 µl proteináz K hozzáadása után újra vortexeltük, majd 56 °C-on 15 percig inkubáltuk. Ezt követően jégen tartottuk 3 percig, hogy megfelelően lehűljön a minta. Ezt egy 15 perces 25000 rpm-es centrifugálás követte, majd a felülúszót a csapadék fellazítása nélkül óvatosan leöntöttük. Szobahőmérsékleten való lehűlése után a csapadék újraszuszpendálása 180 µl ATL-pufferben történt, amit 40 µl proteináz K hozzáadása után újra vortexeltünk. Ezt egy 1 órás 56 °C-os majd egy 2 órás 90 °C-os inkubáció követte mozzgatás nélkül. Az utóbbinak a szerepe a formaldehid DNS-re gyakorolt káros hatásainak visszafordítása. Röviden centrifugáltuk mikrocentrifuga csőben, hogy eltávolítsuk a fedél belső oldalán lévő cseppeket. 200 µl AL-puffer majd 200 µl 96%-os etanol hozzáadása után is vortexeltük (fontos volt a teljesen homogén oldat elérése, az ilyenkor esetleg látható fehér kicsapódás nem zavarja az eljárást). Az egész mintát átöntöttük QIAamp MinElute gyűjtőcsőbe helyezett szilikamembránt tartalmazó csőbe. A fedél óvatos zárását követően legalább 10000 rpm-en centrifugáltuk 1 percig (addig amíg a minta teljesen át nem jutott a membránon), majd átmostuk a gyűjtőcsövet AL-pufferrel. A membránt tartalmazó oszlopot ezután egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztük. 700 µl AW1-puffer hozzáadása után óvatosan zártuk a fedelet és 15 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltuk, hogy átmostuk a szilikamembrán alapú csövet. A membrános csövet ezután új gyűjtőcsőbe helyeztük melyhez 700 µl AW2-es puffert adtunk, majd a fedél óvatos zárása után 10000 rpm-en centrifugáltuk 15 másodpercig, hogy átmostuk a membránt. Ugyanezt megismételtük 700 µl 96%-os etanol hozzáadása után, majd új 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztük a membrán alapú csövet, a fedelének felnyitása után pedig 5 percig maximális fordulatszámon centrifugáltuk (erre az etanol eltávolítása miatt volt szükség). Ezután a szilikamembrán

oszlopot új, 1,5 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztük, majd 30–100 µl ATE-puffert adtunk közvetlenül a membránhoz. Óvatosan zártuk a fedőt, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 1 percig maximális fordulatszámon centrifugáltuk.

A valós idejű TaqMan-rendszerű PCR-reakció során használt primerek és a próba az EEHV1 termináz génjére lett tervezve (Hardman et al. 2012). A próbát jelölő fluorofór molekula a próba 5' végén FAM, az elnyelő/quencher pedig BHQ volt a 3' végen. A kapott ampikon 91 bázispár hosszúságú volt. A reakciót minden egyes minta 3-as alikvotján végeztük el. A reakció egy kezdeti 95 °C-os 5 perces, majd 40 ciklus 94 °C-os 15 másodperces, 50°C-os 15 másodperces, 72 °C-os 1 perces végül 72 °C-os 7 perces lépésekből állt. Ezt a real-time PCR rendszert LightCycler 480 II real-time berendezésre (Roche Molecular Systems, Rotkreuz, Svájc), adaptáltuk és optimalizáltuk, az adatokat pedig a készülék saját szoftverének segítségével értékeltük ki. Az így kapott Ct-értékeket összevetettük az RNAscope vizsgálatok eredményeivel.

Pozitív kontrollként mindkét PCR-reakció esetében megerősített, pozitív EEHV1 esetet használtunk, negatív kontrollként pedig templát nélküli reakcióelegy szolgált.

Eredmények

Patológiai vizsgálat

Az Üllői Diagnosztikai Laboratóriumban végzett diagnosztikai boncolás során makroszkóposan a savóshártyák alatt és a csepleszen (2. ábra) pontszerű vérzéseket, a gyomorban frisskeletű, multifokális fekélyképződést és bővérűséget (3. ábra), a vastagbél nyálkahártyában pontszerű és összefolyó vérzéseket, kifejezett bővérűséget, falában diffúz vizenyőt (4. ábra), a duzzadt bélfodri nyirokcsomókban vérzéseket és véres beivódást, a tüdő állományában (5. ábra) és a légcső nyálkahártyájában (6. ábra) vérzéseket, a szívizomzatban pontszerű és összefolyó vérzéseket találtunk (7. ábra). A vérzések frisskeletűek voltak.



2. ábra. Pontszerű vérzések a csepleszen



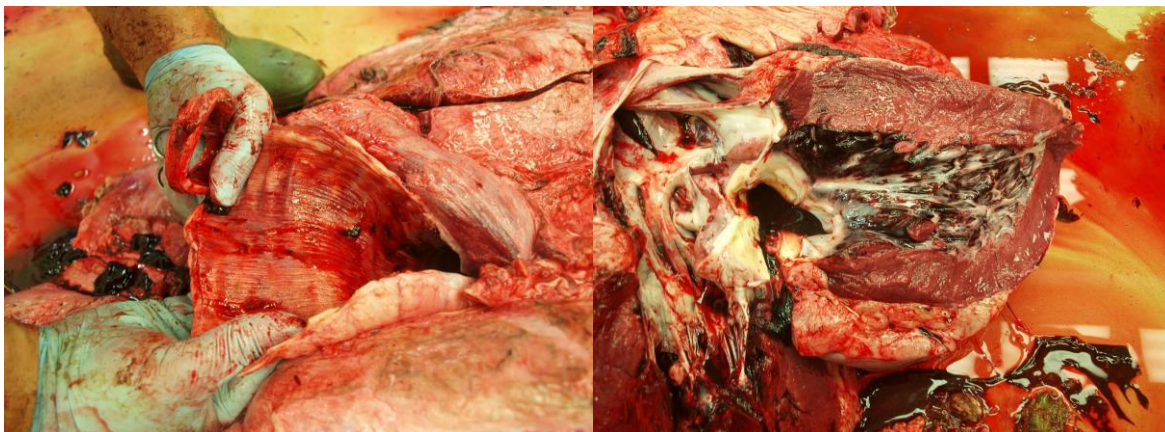
3. ábra. Gyomorfekély és bővérűség



4. ábra. Duzzadt, kipirult és vérzéses vastagbél



5. ábra. Vérzések a tüdő állományában

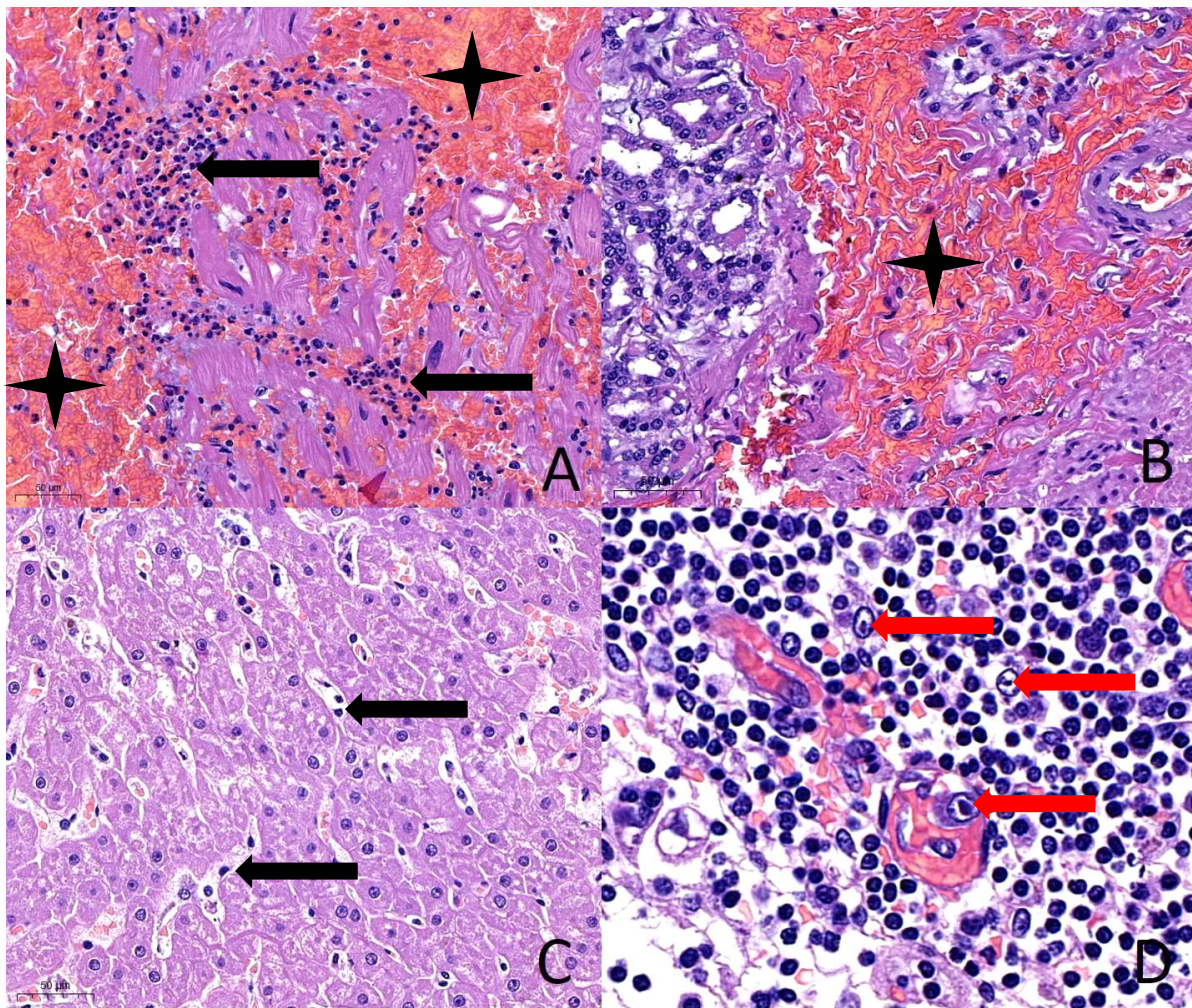


6. ábra. Vérzések a légső nyálkahártyájában

7. ábra. Kiterjedt vérzések a szív endocardiuma alatt

Kórszövettani vizsgálattal a szívizomzatban frisskeletű vérzések és enyhe fokú diffúz vizenyő volt megállapítható egyéb kóros elváltozás nélkül. A jobb szívfülcében súlyos fokú, az izomrostokat szétoló frisskeletű összefolyó vérzést találtunk. Itt a kis vérerek endothelsejtjeinek duzzanatát, némelyik sejtmagban basophil zárványok jelenlétét lehetett megfigyelni, az izomrostok között pedig enyhe fokú multifocalis vegyes sejt, neutrophil granulocytákat is tartalmazó gyulladással besűrűsödés volt látható, néhány izomsejt magjában regresszív elváltozásokkal (8/A. ábra). A tüdőnek egy részletében csak heveny diffúz hyperaemia, emphysema, frisskeletű pontszerű vérzések voltak láthatók. Egy másik részletben ezeken kívül a kitágult kapillárisok és kis vérerek endothelsejtjeinek duzzanata, egy-egy sejt magjában pedig basophil zárvány volt megfigyelhető. A gyomorban frisskeletű diffúz hyperaemia és frisskeletű apró vérzések mellett a hámban enyhe fokú felületes multifocalis elhalásos gyulladást tapasztaltunk, ezen területeken egyes erekben fibrinoid necrosis jelei voltak láthatók, az endothelsejtek duzzanata mellett zárványok jelenlétét itt nem lehetett megállapítani (8/B. ábra). A vastagbél egy részletében mérsékelt felületes autolysis mellett a submucosában súlyos fokú diffúz vizenyőt, a propriában és a submucosában frisskeletű vérzéseket találtunk, néhány vérzés környezetében a kis arteriolákban pedig súlyos fokú fibrinoid necrosis jeleit tapasztaltuk. Zárványokat a vizsgált szövetrészletben nem lehetett megfigyelni. A vékonybélrészletben többé-kevésbé ép hám mellett a submucosában súlyos fokú diffúz vizenyőt, enyhe fokú diffúz felületes gyulladással sejt besűrűsödést, a bélfal mindegyik rétegében frisskeletű vérzéseket találtunk. Zárványokat ezen szövetrészekben sem lehetett megfigyelni. A vesékben csupán heveny diffúz bővérűség jeleit találtuk. A májban mérsékelt, heveny diffúz hyperaemia mellett a májsejtek megnagyobbodását, enyhe intracellularis cholestasis jeleit, kifejezett Kupffer-sejt hypertophiát, a sinusoidokban kifejezett mononuclearis sejt, elszórtan neutrophil granulocytás besűrűsödést, továbbá enyhe portalis

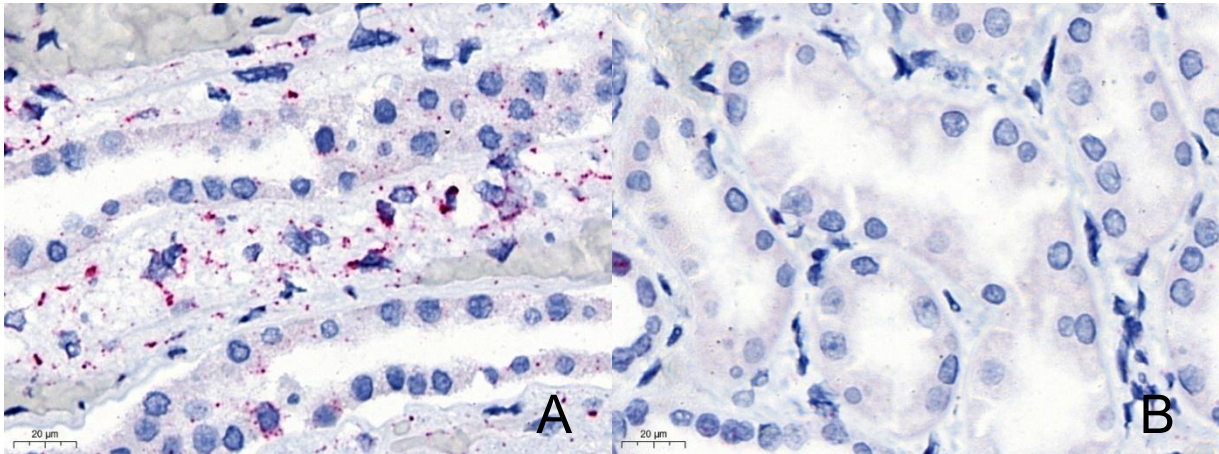
lympho-plasmocytás infiltrációt tapasztaltunk (8/C. ábra). A lépben heveny diffúz bővérűség jelei mellett siderocytosist, frisskeletű vérezéseket, a kis véretek környezetében lymphoid-sejtes beszűrődést, az endothelsejtek magjában zárványszerű képleteket lehetett megfigyelni. A nyirokcsomókban megtartott szerkezet mellett elszórtan frisskeletű vérezéseket figyeltünk meg, ezen területeken prominens endothelsejtekkel rendelkező kis véretek tűntek elő, a lymphoid-sejtek magjában észlelt basophil zárványszerű képletek mellett. A trabecularis sinusokban vörösvértesteket phagocytált macrophagokat lehetett megfigyelni (8/D. ábra).



8. ábra. **A:** A jobb szívfülcében az izomrostok között kiterjedt vérzés (csillagok), ill. neutrophil granulocytás beszűrődés látható (nyilak); **B:** A gyomorfalban kiterjedt vérzés látható (csillag); **C:** A májban bővérűség és májsejtduzzanat, ill. Kupffer-sejt hypertrophia (nyilak) látható; **D:** A nyirokcsomóban friss vérzés, továbbá egy duzzadt endothelsejt és a vérzés körüli gyulladással sejtek magjában zárványszerű képletek láthatók (nyilak)
H.–E.; A, B, C: 200×, D: 400×

RNAscope in situ hibridizáció

Az alkalmazott RNAscope *in situ* hibridizációval a pozitív kontroll metszetekben az általunk tervezetett ázsiai elefánt 07-B beta actin-like mRNS-ét sikeresen láthatóvá tettük a vizsgált szövetekben, ami azok alkalmasságát bizonyította a rögzítés, a szövetelőkészítés, a feltárás és a permeabilizálás szempontjából (9. ábra). A negatív kontrollként szolgáló bakteriális DapB gén nem kötődött be, így aspecifikus téves pozitív reakciót nem láttunk.

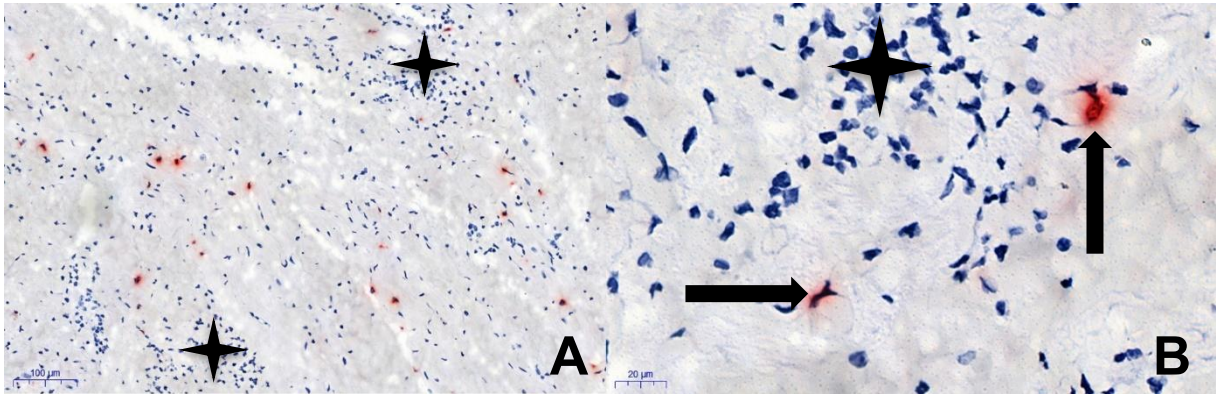


9. ábra. *A: A pozitív kontrollmintában a 07-B beta actin-like mRNS piros színreakcióként jelent meg, míg B: a negatív kontrollmintában a Bacillus subtilis DapB génjére tervezett próba nem adott aspecifikus színreakciót ISH; 400×*

Az EEHV1-re tervezett próbákkal végzett hibridizációt követően számos szervben figyeltünk meg jól felismerhető, egyértelmű, pozitív (piros) színreakciót a vizsgált szervekben, eltérő intenzitással, elhanyagolható háttérfestődés mellett. A legtöbb pozitív sejtet a szívizomban, a jobb szívfülcében (10. ábra), ill. a májban (11. ábra) figyeltük meg. A szívizomzatban leginkább az izomrostok közötti kapillárisok endothelsejtjei festődtek, amit leginkább a jobb szívfülcse nagy nagyítású felvételein lehetett beazonosítani, ahol nagyszámú pozitív sejt volt megfigyelhető az izomrostok közötti vérzéses-gyulladásos területeken. A máj esetében a pozitív sejtek többnyire a májsejtsorokon kívül helyeződtek, valószínűleg sinusoidalis endothelsejtek, ill. Kupffer-sejtek mutattak pozitivitást az EEHV jelenlétére.

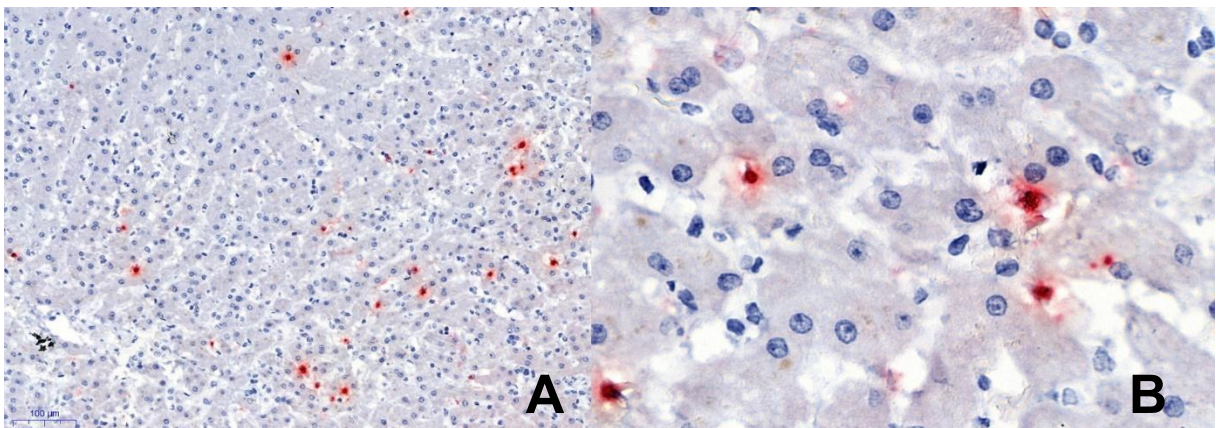
Kisebb intenzitású festődést lehetett megfigyelni a nyirokcsomó, a lép, ill. a gyomor, a vékony- és a vastagbélminták submucosájában. A lépben pozitív sejteket leginkább a nyiroktüszők körüli, ún. parafollicularis területeken, ill. az artériák körüli lymphoid hüvelyben figyeltünk meg, ahol leginkább T-lymphocyták fordulnak elő (12. ábra). A nyirokcsomóban számos területen sikerült kapillaris-endothelsejtekben megfigyelni pozitív magfestődést (13. ábra), amelyek körül esetenként vérzések is láthatók voltak. A gyomor-bélcsatorna esetében

hibridizációs jelet leginkább a submucosalis izomrétegben futó kapillárisok endothelsejtjeiben figyeltünk meg. Sok esetben a pozitív sejteket a vérzéses területek közepén megtalálható erek falában találtuk (14. ábra).



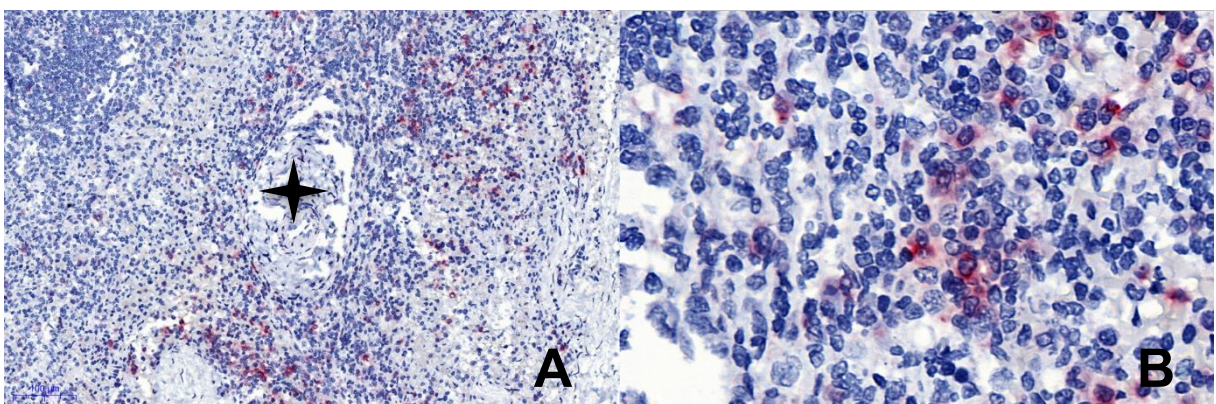
10. ábra. A jobb szívfülcében pozitív sejtek láthatók a vérzéses-gyulladásos elváltozások (csillagok) körüli kapilláris-endothelsejtek magjában (nyilak)

ISH; A: 100×, B: 400×



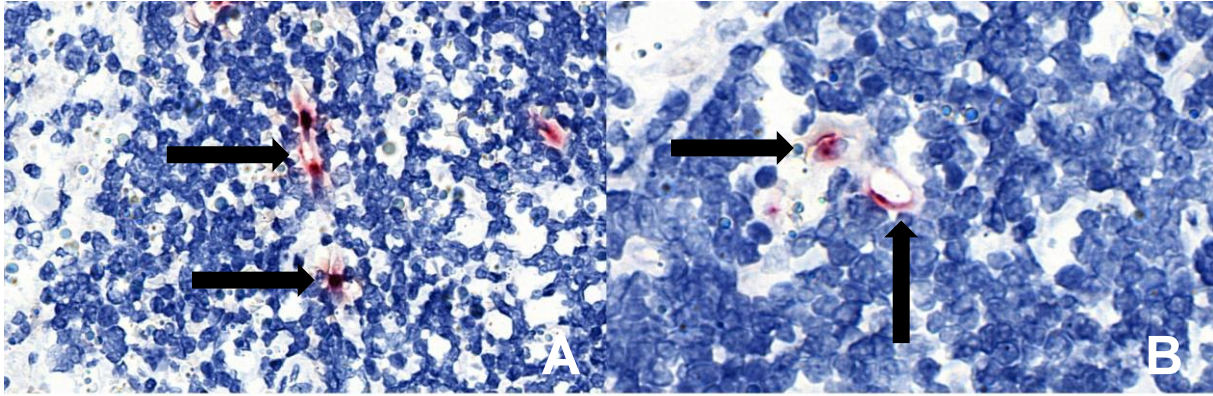
11. ábra. A máj esetében leginkább a májsorokon kívüli sejtek festődtek

ISH; A: 100×, B: 400×



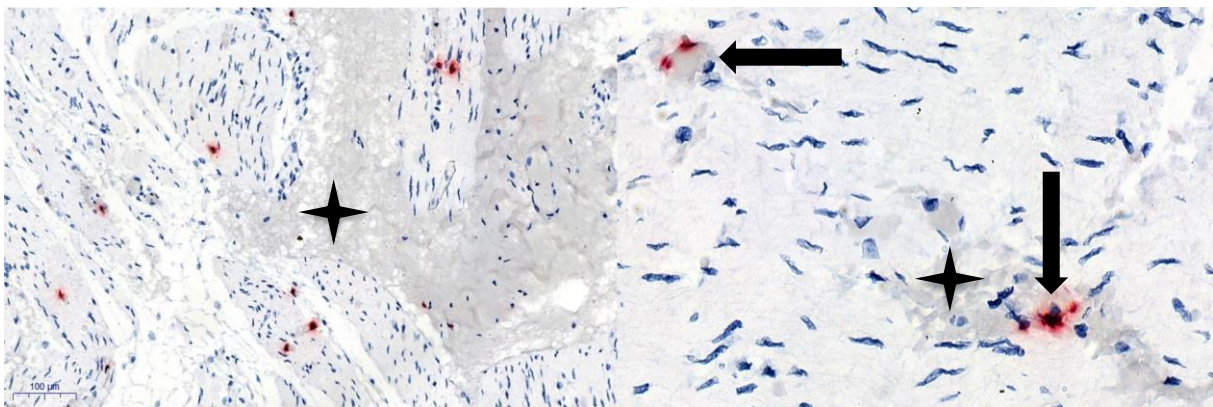
12. ábra. A lépben a pozitív sejtek az artériák (csillag) körüli T-lymphocytás területeken voltak megfigyelhetők

ISH; A: 100×, B: 400×



13. ábra. A vizsgált nyirokcsomó esetében a vírus egyértelműen azonosítható volt a kapilláris-endothelsejtekben (nyilak)

ISH; A: 200×, B: 600×



14. ábra. A vastagbél falának izomrétegében a pozitívás leginkább a vérzések (csillagok) területén futó kapilláris-endothelsejtekben volt megfigyelhető (nyilak)

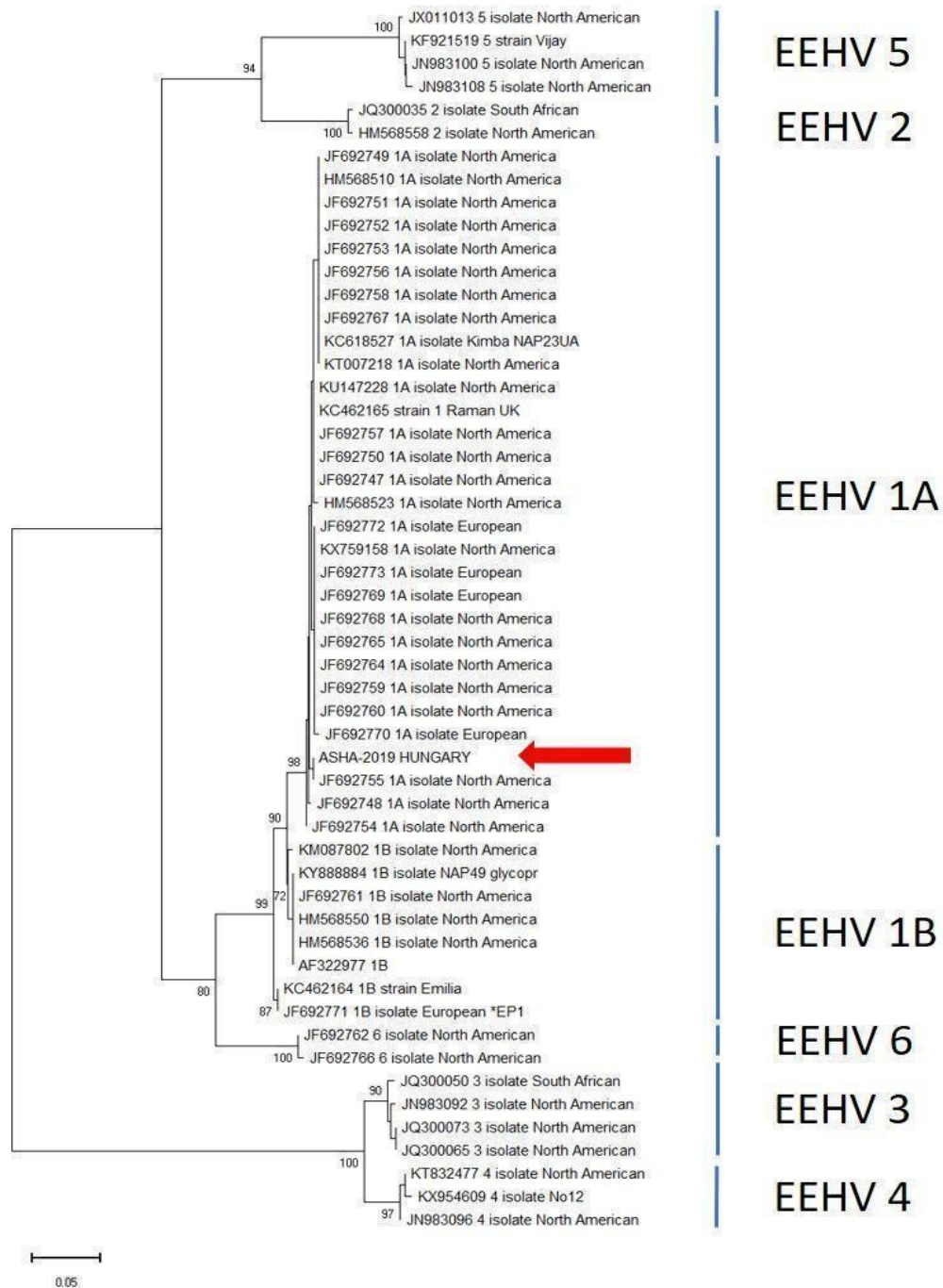
ISH; A: 100×, B: 400×

A mennyiségi meghatározások során erőteljes (+++) volt a festődés a szívizomzat, a jobb szívfülcse, és a máj esetében, mérsékelt (++) volt a lép és a vastagbélminta, ill. kismértékű a nyirokcsomó esetében (+). Nem láttunk pozitív sejteket a vesékben, a csepleszben és a tüdőmintákban (Táblázat).

PCR-vizsgálatok és szekvenciameghatározás

A PCR-vizsgálatok során mind a natív, mind az FFPE-szervekből kaptunk pozitív reakciót, amely a pozitív kontrollmintához hasonlítva egyértelműen bizonyította az EEHV-fertőzést. A PCR-eredmények további megerősítésére a natív minták esetében nukleotidszekvencia-meghatározást is végeztünk. A két irányból leolvasott, egymáshoz illesztett szekvenciát először a BLAST-algoritmus segítségével a génbanki szekvenciákhoz hasonlítottuk, amely alapján nagyfokú, szinte teljes hasonlóságot figyeltünk meg az Észak-Amerika, ill. Európa más területein talált EEHV1A törzsek génbankba feltöltött szekvenciáival.

Az általunk kapott, összesen 399 nukleotid hosszúságú szekvencia és további 52, génbankból letöltött szekvencia segítségével törzsfa-rekonstrukciót végeztünk Neighbor-Joining-módszerrel, amelyen a magyarországi törzs egyértelműen az 1A szubtipusú törzsek által alkotott csoportba került. Ugyanezen a törzsfán megfigyelhető az EHV további altípusainak egyértelmű elkülönülése (15. ábra).



15. ábra. Neighbor-Joining-módszerrel készített törzsfa. A felhasznált további 52 izolátum tulajdonságai az ágak mellett vannak feltüntetve. Az 1000 ismétlés alapján számolt százalékos bootstrap-értékek az elágazódásoknál láthatók. A piros nyíl a magyarországi szekvenciát mutatja. A jobb oldali feliratok az egyes altípusok elkülönülését mutatják.

FFPE PCR-vizsgálatok

Az FFPE-mintákon, az RNAscope ISH-val párhuzamosan elvégzett valós idejű, mennyiségi PCR-vizsgálatok során valamennyi szerv esetében pozitív reakciót kaptunk < 30 Ct-értékekkel. A pozitív és a negatív kontrollminták is a megfelelő eredményt adták (1. táblázat). A mennyiségi viszonyok összehasonlításával megállapítható, hogy a legnagyobb relatív vírusgenom-mennyiség (legkisebb Ct-értékek) a szívizomzatban, ill. csökkenő sorrendben a máj, a jobb szívfülcse, a lép, a gyomor-bél rendszer, a nyirokcsomó, a cseplesz, a vese és a tüdő esetében voltak megfigyelhetők. A Ct-eredményeket az RNAscope-festések relatív intenzitási értékeivel összevetve megállapítható, hogy a virális DNS-mennyiségek (PCR) összhangban voltak az RNAscope-módszerrel megjelölt EEHV-RNS relatív mennyiségi viszonyaival. A legintenzívebb festődés (+++) a 19-es Ct alatti szervekben, a mérsékelt jelerősség (++) a 22, a kismértékű festődés (+) pedig a 23 alattiban volt látható. Azokban a szervekben, ahol a Ct 23 feletti volt (cseplesz, vese, tüdő) nem láttunk ISH-pozitivitást (Táblázat).

Táblázat: A paraffinba ágyazott szervek qPCR-vizsgálatának Ct-értékei az RNAscope ISH mennyiségi eredményeivel összevetve

Szerv	qPCR Ct-érték	RNAscope ISH
Szívizom	15,98	+++
Máj	17,52	+++
Jobb szívfülcse	18,47	+++
Lép	21,7	++
Gyomor-bél rendszer	21,86	++
Nyirokcsomó	22,79	+
Cseplesz	23,41	–
Vese	23,46	–
Tüdő	24,7	–
Pozitív kontroll	25	n. a.*
Negatív kontroll	negatív	n. a.

n.a. = nem meghatározott

Megbeszélés/ Következtetések

2018 novemberében az ÁTE Patológiai Tanszékének Üllői Diagnosztikai Laboratóriumába érkezett diagnosztikai boncolásra a Fővárosi Állat és Növénykert 5,5 éves ázsiaielefánt-borjának teteme. Az állat hirtelen kezdett el tüneteket mutatni, és az ott dolgozók által megkezdett szakszerű kezelés ellenére sem sikerült megmenteni az életét, mindössze 2 napos kórlefolyással az állat elpusztult. Az EEHV, amely igen veszélyes kórképet tud okozni leginkább ázsiai elefántokban, nem ismeretlen az ezen állatokkal foglalkozó szakembereknek. Annak ellenére, hogy az intenzív kutatásoknak köszönhetően az EEHV már jó néhány tulajdonságára fény derült, a legkritikusabb pontokon (terjedés, kórfejlődés, kezelés és megelőzés) továbbra sem értek el átütő sikereket. Az állat diagnosztikai boncolása során megfigyelt túlnyomórészt vérzéses elváltozások megegyeztek a betegséggel kapcsolatos szakirodalmi leírásokkal.

A kórkép leglényegesebb eleme az endothelsejtek vírusfertőzés általi károsodása, ami vérzéses elváltozásokkal jár és az állat keringési elégtelenség miatti pusztulását okozza. Meg kell említeni továbbá a súlyos thrombocytopeniát is, ami tovább súlyosbítja a vérzéses elváltozásokat. A thrombocyták és a monocyták számát 2 hetente ellenőrizték az állatkert protokollja szerint (hetente lenne optimális, de az állat együttműködő képessége ezt nem tette lehetővé), amely az elhullás előtti napon a normál érték 25%-a volt csupán.

A boncolás során vett szövetminták kórszövetteni vizsgálatával a leginkább patognomisztikus elváltozások az egyes vérerek és gyulladásosejtek magjában megfigyelt zárványok voltak, emellett számos egyéb olyan elváltozást is megfigyeltünk, amelyek mind a vírus replikációs helyein való szaporodása nyomán alakultak ki.

Az EEHV szövetekben való kimutatása céljából egy RNS alapú *in situ* hibridizációs rendszerben (RNAscope) specifikus próbát terveztük a vírus egyik konzervatív (a gB-burokfehérjét kódoló) génszakaszára, ill. az arról átíródó RNS-molekulára. Ennek segítségével sikeresen kimutattuk a vírust a szövetekből, legnagyobb mennyiségben a szívizomból, a májból, a jobb szívfülcéből, a lépéből, a vastagbélből és a nyirokcsomóból. Ezt a módszert most elsőként alkalmaztuk az EEHV szöveti jelenlétének és lokalizációjának láthatóvá tételére, aminek a legnagyobb előnye a hagyományos molekuláris diagnosztikai eljárásokkal szemben, hogy a vírus sejtekben és szövetekben való eloszlása is vizsgálható.

Egy korábbi közleményben leírtak már digoxigenin alapú ISH-rendszert, amelynek hasonló, FFPE-mintákon elvégzett vizsgálata alapján a legnagyobb látható vírusrészlet a májban, a szívben és a lépben volt. A mintákban lévő RNS-hez digoxigeninnel jelölt

oligonukleotid-próbákat hibridizáltak, amelyek a termináz és a polimeráz gén egyes szakaszait célozták (Kochakul et al., 2018). Ezen eljárás szintén láthatóvá teszi a vírus szöveti eloszlását, de valószínűleg nincs akkora érzékenysége, mint az RNAscope-nak, ill. ez egy ún. in house megoldás, azaz jelenleg csak az adott laboratóriumban elérhető. Ezzel szemben az RNAscope-módszeréhez általunk tervezett próbák a katalógusszám alapján szabadon hozzáférhetők és megrendelhetők a világ bármely pontján.

Az RNAscope-rendszerben elsőként fejlesztettünk ázsiai elefántra specifikus pozitív ún. „háztartási” kontrollpróbát is a sejtek 07-B beta actin-like mRNS-ét célozva. Erre azért volt szükség, mert az emlősökben eddig általánosan, sikeresen alkalmazható PPIB- (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B) génre tervezett próba nem mutatott kötődést a vizsgált állatfajon, feltehetőleg a nagy genetikai különbségek miatt. Ez a próba szintén hozzáférhető a gyártó adatbázisában, így mostantól bármilyen, ázsiai elefántban keresett kórokozó kimutatásakor, esetleg génexpressziós vizsgálatokkor alkalmazható pozitív kontrollként.

Valamennyi szövettani metszet esetében az archiválást, a kiértékelést és a dolgozatban bemutatott felvételeket Panoramic Midi II szövetszkennelrel (3DHitech, Budapest, Magyarország) történt digitalizást követően számítógépen készítettük. Ezzel a módszerrel a hagyományos, fénymikroszkóphoz kapcsolódó kamerákhoz képest sokkal gyorsabban, könnyebben, pontosabban és jobb minőségben tudunk felvételeket készíteni, ráadásul a rendszer használata a szkennelési folyamat kivételével nem helyhez kötött. Amennyiben a digitális metszetek adataihoz hozzáférünk, kiértékelésük és a felvételek elkészítése bármely, megfelelő teljesítményű számítógépen elvégezhető.

Az *in situ* hibridizációval párhuzamosan elvégeztük a EEHV-DNS valós idejű PCR-rel való kvantitatív meghatározását is az FFPE-metszetekből. Az így kapott Ct-értékeket összehasonlítva az RNAscope nyomán kapott festődés szemikvantitív módon meghatározott intenzitásértékeivel, valamennyi szerv esetében jó korrelációt figyeltünk meg. Minél nagyobb vírusgenom-mennyiséget (azaz kisebb ciklus küszöbértéket) találtunk az adott szerv esetében annál nagyobb volt a jelintenzitás mértéke *in situ* hibridizációval. Mivel az RNAscope RNS-molekulákat céloz, a módszer nemcsak a vírus jelenlétét, hanem annak aktív replikációját is mutatja a pozitív sejtekben.

Elvégeztük a virális DNS nukleotidszekvenciájának meghatározását is. A kapott szekvenciát BLAST-vizsgálat segítségével a génbanki adatokkal összevetve nagy fokú (szinte 100%-os) hasonlóságot állapítottuk meg egyes észak-amerikai, európai és az általunk kimutatott EEHV1A vírustörzsek között. A nagyfokú egyezést megerősítettük törzsfarekonstrukciós módszerrel is, amely során a törzsfán jelentős bootstrap-értékek mellett

egyértelműen elkülönültek egymástól a különböző EEHV-szubtípusok. Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy az állat (Asha) elhullását az EEHV1A által okozott súlyos, heveny vérérkárosodással és thrombocytopeniával járó vérzéses kórkép okozta. A megbetegedés hátterében álló esetleges hajlamosító tényezőket nem sikerül beazonosítani.

Kitűzött célunk még a módszer tesztelése további pozitív FFPE-szervmintákon. Ennek érdekében felvettük a kapcsolatot egyesült államokbeli, dániai, angliai és németországi kutatócsoportokkal azzal a céllal, hogy retrospektív módon, korábban elhullott elefántok mintáinak segítségével validáljuk módszerünket a vírus jelenlétének és szövetekben való eloszlásának kimutatására, esetleg a terjedés még nem tisztázott részleteinek kiderítésére.

Ezen túlmenően a rendszer felhasználható minden további EEHV által okozott kórkép nyomán elhullott, vagy biztosan fertőzött, de egyéb okból elhullott elefánt szöveteinek vizsgálatára. Ez utóbbi különösen hasznos lehet a látencia jelenleg még ismeretlen helyének meghatározása céljából.

Összefoglaló

Az EEHV(elephant endotheliotropic herpesvirus)a vadon élő és fogságban tartott elefántokban egyaránt előforduló herpeszvírus, amely a Betaherpesvirinae alcsaládba, azon belül pedig a nemrégiben leírt Proboscivirus nembe tartozik. Míg vadonéló állatokban nagyfokú elterjedtsége ellenére általában tünetmentes fertőzést okoz, fogságban tartott, főleg fiatal ázsiai elefántokban egy igen súlyos kórkép okozója. A betegség rendkívül gyors lefolyású, amelyre a kiterjedt endothelkárosodás miatt testszerte jelentkező vérzések jellemzőek. Magyarországi előfordulása is ismert. A betegség terjedéséről, kórfejlődéséről viszonylag kevés adat érhető el a szakirodalomban. Izolálása és szövettenyészetben való sikeres fenntartása, passzálása még nem megoldott, ami miatt vakcinák sem állnak rendelkezésre. A Patológiai Tanszéken RNS alapú in situ hibridizációs eljárást fejlesztettünk az EEHV genetikai állományának kimutatása céljából. A módszer segítségével a Fővárosi állat-és növénykertben született, majd a tavalyi év folyamán EEHV-fertőzésben elpusztult 6 éves ázsiai elefánt formalinban rögzített és paraffinba ágyazott szervmintáiban sikeresen azonosítottuk a kórokozót. A legerősebb pozitivitást a szívizomzatban és a májban, gyengébb festődést pedig a lépben és a nyirokcsomóban figyeltünk meg. A párhuzamosan elvégzett qPCR vizsgálatok hasonló eredményre vezettek az egyes szervek esetében.

Summary / Abstract

Detection of EEHV in Hungary with the RNA Scope ISH method

The EEHV(elephant endotheliotropic herpesvirus) is a herpesvirus in the newly described Proboscivirus genus within the Betaherpesvirinae subfamily that infects wild and captive elephants as well. Despite of its worldwide of distribution, in wild animals it usually causes an asymptomatic infection, while mainly in captive asian elephants it can cause a very serious disease. The clinical course of the disease is very rapid with severe endothelial cell damage in the blood vessels leading to hemorrhages in various organs. There are still gaps in the knowledge about the transmission and the pathogenesis in the scientific literature. The isolation, and passage of the virus on cell cultures are not successful yet, thus there are no vaccines available. In the Department of Pathology we developed an RNA based in situ hybridization method for the detection of the viral genome. With this method we could successfully identify the pathogen in formalin fixated and paraffin embedded organ samples obtained from a 6 years old Asian elephant calf that was born in the Budapest Zoo and died last year. The strongest positivity was found in the heart muscle and in the liver, while less positive cells were identified in the spleen and in the lymph node. The paralely performed qPCR tests showed similar results regarding the virus levels in the different organs.

Irodalomjegyzék

Basson P. A., McCully R. M., Vos V. D., Young E. W., Kruger S. P.: Some parasitic and other natural diseases of the African elephant in the Kruger National Park. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 1971. 4. 239–254.

Blaho J. A.: From the Hallowed Halls of Herpesvirology: A Tribute to Bernard Roizman. *World Scientific*, 2012.

Bronson E., McClure M., Sohl J., Wiedner E., Cox S., Latimer E. M., Pearson V. R., Hayward G. S., Fuery A., Ling P. D.: Epidemiologic evaluation of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus 3B infection in an African elephant (*Loxodonta africana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2017. 2. 335–343. <https://doi.org/10.1638/2016-0063R.1>.

Dastjerdi A., Seilern-Moy K., Darpel K., Steinbach F., Molenaar F.: Surviving and fatal Elephant Endotheliotropic Herpesvirus-1A infections in juvenile Asian elephants – lessons learned and recommendations on anti-herpesviral therapy. *BMC Veterinary Research*, 2016. 1. 178. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0806-5>.

Denk D., Stidworthy M. F., Redrobe S., Latimer E., Hayward G. S., Cracknell J., Claessens A., Steinbach F., McGowan S., Dastjerdi A.: Fatal Elephant Endotheliotropic Herpesvirus Type 5 Infection in a Captive Asian Elephant. *Veterinary Record*, 2012. 15. 380–381. <https://doi.org/10.1136/vr.e6833>.

van den Doel P. B., Prieto V. R., van Rossum-Fikkert S. E., Schaftenaar W., Latimer E., Howard L., Chapman S., Masters N., Osterhaus A. D., Ling P. D., Dastjerdi A., Martina B.: A Novel Antigen Capture ELISA for the Specific Detection of IgG Antibodies to Elephant Endotheliotropic Herpes Virus. *BMC Veterinary Research*, 2015. 1. 203. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0522-6>.

Ehlers B., Burkhardt S., Goltz M., Bergmann V., Ochs A., Weiler H., Hentschke J.: Genetic and ultrastructural characterization of a European isolate of the fatal endotheliotropic elephant herpesvirus. *Journal of General Virology*, 2001. 3. 475–482. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-475>.

Ehlers B., Dural G., Marschall M., Schregel V., Goltz M., Hentschke J.: Endotheliotropic Elephant Herpesvirus, the First Betaherpesvirus with a Thymidine Kinase Gene. *Journal of General Virology*, 2006. 10. 2781–2789. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81977-0>.

Fickel J., Lieckfeldt D., Richman L. K., Streich W. J., Hildebrandt T. B., Pitra C.: Comparison of Glycoprotein B (GB) Variants of the Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) Isolated from Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *Veterinary Microbiology*, 2003. 1. 11–21.

Garner M. M., Helmick K., Ochsenreiter J., Richman L. K., Latimer E., Wise A. G., Maes R. K., Kiupel M., Nordhausen R. W., Zong J. C., Hayward G. S.: Clinico-Pathologic Features of Fatal Disease Attributed to New

Variants of Endotheliotropic Herpesviruses in Two Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *Veterinary Pathology*, 2009. 1. 97–104. <https://doi.org/10.1354/vp.46-1-97>.

Hardman K., Dastjerdi A., Gurralla R., Routh A., Banks M., Steinbach F., Bouts T.: Detection of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus Type 1 in Asymptomatic Elephants Using TaqMan Real-Time PCR. *Veterinary Record*, 2012. 8. 205. <https://doi.org/10.1136/vr.100270>.

Hayward G. S.: Conservation: Clarifying the Risk from Herpesvirus to Captive Asian Elephants. *Veterinary Record*, 2012. 8. 202–203. <https://doi.org/10.1136/vr.e1212>.

Houston Zoo Asian Elephant EEHV Protocol 2010. URL:

<https://asesg.org/PDFfiles/2011/Houston%20Zoo%20Asian%20Elephant%20EEHV%20Protocol.pdf>

Jacobson E. R., Sundberg J. P., Gaskin J. M., Kollias G. V., O'Banion M. K.: Cutaneous Papillomas Associated with a Herpesvirus-like Infection in a Herd of Captive African Elephants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1986. 9. 1075–1078.

Jonathan Craknell 2016 Elephant Endotheliotropic Herpes Virus (EEHV) Protocol. URL: <http://eehvinfo.org/wp-content/uploads/2016/07/BIAZA-eehv-protocol.pdf>.

Kochagul V., Srivorakul S., Boonsri K., Somgird C., Sthitmatee N., Thitaram C., Pringproa K.: Production of Antibody against Elephant Endotheliotropic Herpesvirus (EEHV) Unveils Tissue Tropisms and Routes of Viral Transmission in EEHV-Infected Asian Elephants. *Scientific Reports*, 2018. 1. 4675. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22968-5>.

Kochakul V., Boonsri K., Tiwananthagorn S., Somgird C., Thitaram C., Pringproa K.: Development of in Situ Hybridization for Detection of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus in Asian Elephants. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018. 4. 628–632. <https://doi.org/10.1177/1040638718773810>.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018. 35. 1547-1549.

Latimer E., Zong J.-C., Heaggans S. Y., Richman L. K., Hayward G. S.: Detection and Evaluation of Novel Herpesviruses in Routine and Pathological Samples from Asian and African Elephants: Identification of Two New Probosciviruses (EEHV5 and EEHV6) and Two New Gammaherpesviruses (EGHV3B and EGHV5). *Veterinary Microbiology*, 2011. 1–2. 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.042>.

Long S. Y., Latimer E. M., Hayward G. S.: Review of Elephant Endotheliotropic Herpesviruses and Acute Hemorrhagic Disease. *ILAR Journal*, 2016. 3. 283–296. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv041>.

McCully R. M., Basson P. A., Pienaar J. G., Erasmus B. J., Young E.: Herpes nodules in the lung of the African elephant, *Loxodonta africana*. 1971. (BLUMENBACH, 1797)

Metzler A. E., Ossent P., Guscetti F., Rübél A., Lang E. M.: Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 1990. 1. 41–49. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-26.1.41>.

Ortega J., Corpa J. M., Orden J. A., Blanco J., Carbonell M. D., Gerique A. C., Latimer E., Hayward G. S., Roemmelt A., Kraemer T., Romey A., Kassimi L. B., Cazares M.: Acute Death Associated with *Citrobacter Freundii* Infection in an African Elephant (*Loxodonta Africana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015. 5. 632–636. <https://doi.org/10.1177/1040638715596034>.

Ossent P., Guscetti F., Metzler A. E., Lang E. M., Rübél A., Hauser B.: Acute and Fatal Herpesvirus Infection in a Young Asian Elephant (*Elephas Maximus*). *Veterinary Pathology*, 1990. 2. 131–133. <https://doi.org/10.1177/030098589002700212>.

Pavulraj S., Eschke K., Prah A., Flügger M., Trimpert J., van den Doel P.B., Andreotti S., Kaessmeyer S., Osterrieder N., Azab W.: Fatal Elephant Endotheliotropic Herpesvirus Infection of Two Young Asian Elephants. *Microorganisms*, 2019. 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100396>

Pursell T., Tan J., Peng R., Ling P. D.: Generation and Validation of New Quantitative Real Time PCR Assays to Detect Elephant Endotheliotropic Herpesviruses 1A, 1B, and 4. *Journal of Virological Methods*, 2016. 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.010>.

Richman L. K., Montali R. J., Garber R. L., Kennedy M. A., Lehnhardt J., Hildebrandt T., Schmitt D., Hardy D., Alcendor D. J., Hayward G. S.: Novel Endotheliotropic Herpesviruses Fatal for Asian and African Elephants. *Science*, 1999. 5405. 1171–1176. <https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1171>.

Richman L. K., Zong J.-C., Latimer E. M., Lock J., Fleischer R. C., Heaggans S. Y., Hayward G. S.: Elephant Endotheliotropic Herpesviruses EEHV1A, EEHV1B, and EEHV2 from Cases of Hemorrhagic Disease Are Highly Diverged from Other Mammalian Herpesviruses and May Form a New Subfamily. *Journal of Virology*, 2014. 23. 13523–13546. <https://doi.org/10.1128/JVI.01673-14>.

Richman L., Montali R.J., Hayward G.S.: Review of a newly recognized disease of elephants caused by endotheliotropic herpesviruses. *Zoo Biology*, 2000. 383–392. [https://doi.org/10.1002/1098-2361\(2000\)19:5<383::AIDZOO8>3.3.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1098-2361(2000)19:5<383::AIDZOO8>3.3.CO;2-O).

Ryan S. J., Thompson S. D.: Disease Risk and Inter-Institutional Transfer of Specimens in Cooperative Breeding Programs: Herpes and the Elephant Species Survival Plans. *Zoo Biology*, 2001. 2. 89–101. <https://doi.org/10.1002/zoo.1009>.

Schaftenaar W., Reid C., Martina B., Fickel J., Osterhaus A. D.: Nonfatal Clinical Presentation of Elephant Endotheliotropic Herpes Virus Discovered in a Group of Captive Asian Elephants (*Elephas maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2010. 626–632. <https://doi.org/10.2307/40962305>.

Schmitt D. L., Hardy D. A., Montali R. J., Richman L. K., Lindsay W. A., Isaza R., West G.: Use of Fanciclovir for the Treatment of Endotheliotropic Herpesvirus Infections in Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2000. 4. 518–522. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0518:UOFFTT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0518:UOFFTT]2.0.CO;2).

Seilern-Moy K., Darpel K., Steinbach F., Dastjerdi A.: Distribution and load of Elephant Endotheliotropic Herpesviruses in tissues from associated fatalities of Asian elephants. *Virus Research*, 2016. 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.012>.

Sripiboon S., Angkawanish T., Boonprasert K., Sombutputorn P., Langkaphin W., Ditcham W., Warren K.: Successful treatment of a clinical Elephant Endotheliotropic Herpesvirus infection: the dynamics of viral load, genotype analysis, and treatment with acyclovir. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2017. 4. 1254–1259. <https://doi.org/10.1638/2016-0141R1.1>.

Stanton J. J., Cray C., Rodriguez M., Arheart K. L., Ling P. D., Herron A.: Acute Phase Protein Expression during Elephant Endotheliotropic Herpesvirus-1 Viremia in Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2013. 3. 605–612. <https://doi.org/10.1638/2012-0174R1.1>.

Stanton J. J., Nofs S. A., Zachariah A., Kalaivannan N., Ling P. D.: Detection of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus Infection among Healthy Asian Elephants (*Elephas Maximus*) in South India. *Journal of Wildlife Diseases*, 2014. 2. 279–287. <https://doi.org/10.7589/2012-09-236>.

Stanton J. J., Zong J-C., Eng C., Howard L., Flanagan J., Stevens M., Schmitt D., Wiedner E., Graham D., Junge R. E., Weber M. A., Fischer M., Mejia A., Tan J., Latimer E., Herron A., Hayward G. S., Ling P. D.: Kinetics of Viral Loads and Genotypic Analysis of Elephant Endotheliotropic Herpesvirus-1 Infection in Captive Asian Elephants (*Elephas Maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2013. 1. 42–54. <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.42>.

Stanton J. J., Zong J-C., Latimer E., Tan J., Herron A., Hayward G.S., Ling P. D.: Detection of Pathogenic Elephant Endotheliotropic Herpesvirus in Routine Trunk Washes from Healthy Adult Asian Elephants (*Elephas Maximus*) by Use of a Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay. *American Journal of Veterinary Research*, 2010. 8. 925–933. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.8.925>.

Wang F., Flanagan J., Su N., Wang L.-C., Bui S., Nielson A., Wu X., Vo H.-T., Ma X.-J., Luo Y.: RNAscope. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2012. 1. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>.

Zachariah A., Zong J.-C., Long S. Y., Latimer E. M., Heaggans S. Y., Richman L. K., Hayward G. S.: fatal herpesvirus hemorrhagic disease in wild and orphan Asian elephants in Southern India. *Journal of Wildlife Diseases*, 2013. 2. 381–393. <https://doi.org/10.7589/2012-07-193>.

Zong J.-C., Heaggans S. Y., Long S. Y., Latimer E.M., Nofs S. A., Bronson E., Casares M., Fouraker M. D., Pearson V. R., Richman L. K., Hayward G. S.: Detection of Quiescent Infections with Multiple Elephant Endotheliotropic Herpesviruses (EEHVs), Including EEHV2, EEHV3, EEHV6, and EEHV7, within Lymphoid Lung Nodules or Lung and Spleen Tissue Samples from Five Asymptomatic Adult African Elephants. *Journal of Virology*, 2016. 6. 3028–3043. <https://doi.org/10.1128/JVI.02936-15>.

Zong J.-C., Latimer E. M., Long S. Y., Richman L. K., Heaggans S. Y., Hayward G. S.: Comparative Genome Analysis of Four Elephant Endotheliotropic Herpesviruses, EEHV3, EEHV4, EEHV5, and EEHV6, from Cases of Hemorrhagic Disease or Viremia. *Journal of Virology*, 2014. 23. 13547–13569. <https://doi.org/10.1128/JVI.01675-14>.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Patológiai Tanszék minden munkatársának az időt és a segítséget, különösképp témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Balka Gyulának a téma és a dologi feltételek biztosítását, ill. a dolgozat megírásában nyújtott segítségét, továbbá Dénes Lillának a labormunkában nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Sós Endrének, Dr. Biksi Imrének és Dr. Dán Ádámnak, hogy rendelkezésemre bocsátották Asha klinikai, patológiai és molekuláris biológiai vizsgálati eredményeit. Köszönöm továbbá Dr. Szász Attila Marcellnek (Semmelweis Egyetem) a reagensek megrendelése során nyújtott anyagi segítségét.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP–3.6.3-VEKOP–16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Balta Gyula igazolom, hogy
..... Homoki Balint György (a hallgató neve)
..... Az EETU hazai elnöktársa KNA scye
..... ISH technikával
.....

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 20.

Dr. Balta Gyula

Balta Gyula

a témavezető neve és aláírása

Patológia

tanszék

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott Hornóthi Ádám Géza nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe Az FEH U Lancia Rendszerének KNT-je
ISH technológiával
.....
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. 11. 20.

..... Hornóthi Ádám Géza
..... Hornóthi Ádám Géza

a hallgató neve és aláírása

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: *Hodaghe Alvil Gera*
Elérhetőség (e-mail cím): *hodage01@gmail.com*
A feltöltendő mű címe: *Az Eötvös Loránd Tudományegyetem
RNA-seq-e ISH technikával*
A mű megjelenési adatai: *2019*
Az átadott fájlok száma: *1*

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédt PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatáról is:

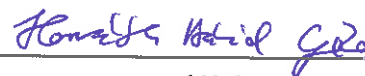


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év 11 hó 20 nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyont elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyónának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*