

**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

.....  
dr. Szeleczky Zsófia

## Bevezetés

A 20. századi epidemiológiai tapasztalatok alapján úgy tűnhetett, hogy világjárvány kialakulásának csak emberek között van meg a feltétele, tekintve, hogy a kórokozók globális terjedésében a legfőbb tényező a fertőzött gazda nagy távolságokra való eljutása, gyakran még a látens fázisban (pl. légi közlekedés révén), aminek állati járványok esetén nincsenek meg a feltételei. Ezt az elképzelést a múlt-században négy *influenza-pandémia* fellépése, és állati megfelelőik hiánya alá is támasztotta. Ezek 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 patogenitású AI-vírusterzs (*highly pathogenic*, HPAI-vírus) okozta, ami csirkék, házi vízi szárnyasok és vad vízimadarak között okozott súlyos veszteségeket. Mint ismert, előbb csak a távolkeleti országokban terjedt szét Kínából, majd eljutott Oroszországba, Európába és néhány afrikai országba is. Azóta, a járvány folyamánként a vírus leszármazottai a kiindulási területeken, de 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-vírusterzs 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 hazai kitöréseket okozó magas patogenitású AI-törzsek egy-egy reprezentánsának, ezen kívül szűrővizsgálatok során talált, két alacsony patogenitású (*low pathogenic*, LP) vírusterzs 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-vírusterzseket is, amelyeket még Dr. Tanyi János izolált az 1970-1980-as években, főként nagyüzemi kacsáállományokban kitört megbetegedésekből. Az ilyen korai betegségesetek epidemiológiai vonatkozásairól még ma is alig tudunk valami biztosat, ezért a régi hazai 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 vírusterzseket 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 szubtypus 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 szubtypusok óriási változatosságát és földrajzi eloszlását, úgy vélték, hogy megtalálták a baromfivírusok forrását is, mert a vadmadarak és a baromfitelepeken talált törzsek szubtypusa, szerológiai próbában, gyakran megegyezett. Azonban az évtizedekkel később elterjedt genetikai azonosításon alapuló módszerek rámutattak, hogy a szubtypus megfelelés önmagában nem elegendő a közvetlen vírusátviteli kapcsolat bizonyítására. A vad vízimadarak populációkban talált influenzavírusok szubtypus-kombinációinak nagy száma arra engedett következtetni, hogy ez az egyébként ártalmatlan vírus-gazda viszony már igen hosszú ideje állhat fenn, ezért e madárfajok az AIV-k primordiális gazdái és természetes rezervoárjai lehetnek. Ma úgy gondoljuk, hogy a baromfi influenzavírusai eredetileg a sokkal régebbi vadmadár-vírusoktól származnak, ami evolúciós kapcsolatra utal. Eszerint egy-egy baromfipopulációban található szubtypus-kombináció eredetileg egy 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 szubtypusok 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. Ilyen megkülönböztetések igazolása azonban az egyedi vírusazonosítás hiánya miatt abban az időben nem volt lehetséges.

### **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. A régi és az új törzsek hemagglutinin (HA) és neuraminidáz (NA) szekvenciáinak meghatározásával az izolátumok szubtypusát ill. ezek kombinációját kívántam megállapítani, egyes, hiányos adattal rendelkező 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 új 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.

## **Anyag és módszer**

### A vírustörzsek eredete és szaporítása

A régi, hazai madárinfluenza vírustörzseket Dr. Tanyi János (Állategészségügyi Intézet, Debrecen) gyűjtötte kelet-magyarországi pulyka, kacska és gyöngytyúk telepeken, az 1969-től 1987-ig terjedő időszakban észlelt megbetegedésekből. A 2006/07-es madárinfluenza-járvány során 13 vadmadárból és 3 baromfiállományból származó HPAI H5N1 törzseket, valamint a járvány alatti szűrővizsgálatból izolált két alacsony patogenitású vírust az MGSzH-ÁDI budapesti víruslaboratóriumában izolálták. A vírustörzseket 9-11 napos embrionált, specifikus kórokozótól mentes tyúktojások allantoiszüregébe oltva szaporítottuk el.

### RNS kivonás

Az allantoisz folyadékokból a régi vírusok RNS-ét QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), az új vírusokét RNS-t High Pure Viral RNA Extraction Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) segítségével nyertük ki, a cégek által megadott protokoll szerint.

### RNS átírás, PCR reakció

A tisztított vírus RNS komplementer DNS-sé (cDNS) való *reverz transzkripció*s (RT) átírását és a cDNS polimeráz láncreakcióval (PCR) történő megsokszorozását OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) felhasználásával végeztük, a gyártó utasítása alapján.

A régi törzsek HA génjéhez kettős PCR-t (nested PCR) alkalmaztunk. Előbb a teljes génszakaszokat írtuk át és sokszoroztuk meg a kapott cDNS-t, az irodalomban leírt *primerek* segítségével, majd az így kapott termékeken egy második PCR-reakciót futtatunk saját tervezésű, rövidebb szakaszokat átfogó primerek felhasználásával. A primereket CLC Gene Workbench 2.2.3. (CLC bio A/S, Arthus, Denmark) program segítségével terveztük. A régi törzsek NA és NS génjének, valamint az új törzsek teljes RNS-ének átírása és PCR reakciója irodalmi primerek felhasználásával történt.

### DNS tisztítás

Az agaróz gélelektroforézissel elválasztott DNS termékeket Gel Out Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), illetve QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) felhasználásával, a protokoll szerint tisztítottuk.

### Szekvenálási folyamat

A régi törzsek DNS-mintáit a PCR reakcióban 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.

### Genetikai és filogenetikai vizsgálat

A kapott szekvenciákat BioEdit 7.0.7 és a DNASTAR 7.1 (Lasergene, WI, USA) programokkal szerkesztettük, és építettük össze. A távolságalapú *neighbor-joining* módszer (Kimura-2 paraméteres modell alkalmazásával) és a karakteralapú *maximum parsimony* módszer segítségével felállított filogenetikai fák készítéséhez MEGA 4.1 programot használtunk. A lehetséges glikozilációs helyeket a NetNGlyc 1.0 program segítségével határoztuk meg.

## **Új eredmények**

A régi hazai AIV-törzsekkel kapott eredmények:

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

<b>Izolátum</b>	<b>Szubtípus (Tanyi)</b>	<b>Szubtípus (saját)</b>	<b>NS gén csoportok</b>
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-szubtípusai 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 szubtípusok eurázsiai ágához tartoztak. Ezen belül azonban, a H5-szubtípusokat 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 reasszortációt fedett fel a H4 és a H5 szubtípusú törzsek esetében. Annál a 13 törzsnél, amik megítélésünk szerint független járványesetekből származhattak, nem kevesebb, mint 10 szubtípus-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 szubtípusú NA (N2, N3 és N9) tartozott.
- A HA gének vágáshely-szekvencia mintázata alapján a H5 és H7 szubtípusba tartozó valamennyi törzset alacsony patogenitásúnak (LP) találtam.

#### Recens hazai AIV-törzsek genetikai vizsgálatával kapott eredmények

- A 2006-2007-ben előfordult HP H5N1-járványesetekből izolált törzsek filogenetikai vizsgálata és az epidemiológiai adatok arra utalnak, hogy a járvány három időbeli hulláma négy egymástól független behurcolás eredménye volt. Ennek megfelelően HU-1-4 jelű járványesetekről lesz szó.
- 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 jelű (első) járványeset 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 a 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.

## **Tudományos közlemények**

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

Szeredi, L., Dán, Á., Pálmai, N., Ursu, K., Bálint, Á., Szeleczy, 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.