

Állatorvostudományi Egyetem

Hazai lesőharcsa (*Silurus glanis*) állományok DNS-vírusainak kimutatása és  
jellemzése  
Screening and characterization of DNA viruses of farmed wels catfish (*Silurus  
glanis*) in Hungary

Készítette: Fónagy Eszter

Témavezető: Dr. Doszpoly Andor  
Állatorvostudományi Kutatóintézet, tudományos főmunkatárs  
Budapest, 2022

## Tartalom

1. Bevezetés .....	3
1.1. Az alloherpesvírusokról általánosságban .....	3
1.2. A papillómavírusokról általánosságban .....	4
1.3. Circovírusokról általánosságban .....	6
1.4. Az iridovírusokról általánosságban .....	7
1.5. A lesőharcsa és vírusai .....	9
1.5.1. A lesőharcsa jelentősége, általános jellemzése .....	9
1.5.2. A lesőharcsa herpeszvírusa .....	10
1.5.3. A lesőharcsa papillómavírusa .....	10
1.5.4. A lesőharcsa circovírusa .....	11
1.5.5. A lesőharcsa ranavírusa .....	12
1.6. Célkitűzések .....	12
2. Anyag és módszer .....	13
2.1. A minták származása .....	13
2.2. DNS-kivonás a mintákból .....	13
2.3. Polimeráz láncreakció .....	13
2.4. Agaróz gélelektroforézis .....	16
2.5. PCR-termék előkészítése szekvenáláshoz .....	16
2.6. DNS-szekvenálás .....	17
2.7. Molekuláris klónozás .....	18
2.8. Bioinformatikai és statisztikai elemzések .....	19
3. Eredmények .....	21
4. Diskusszió .....	24
5. Összefoglalás .....	28
6. Summary .....	29
7. Irodalomjegyzék .....	30
8. Köszönetnyilvánítás .....	35
9. Nyilatkozatok .....	36

## 1. Bevezetés

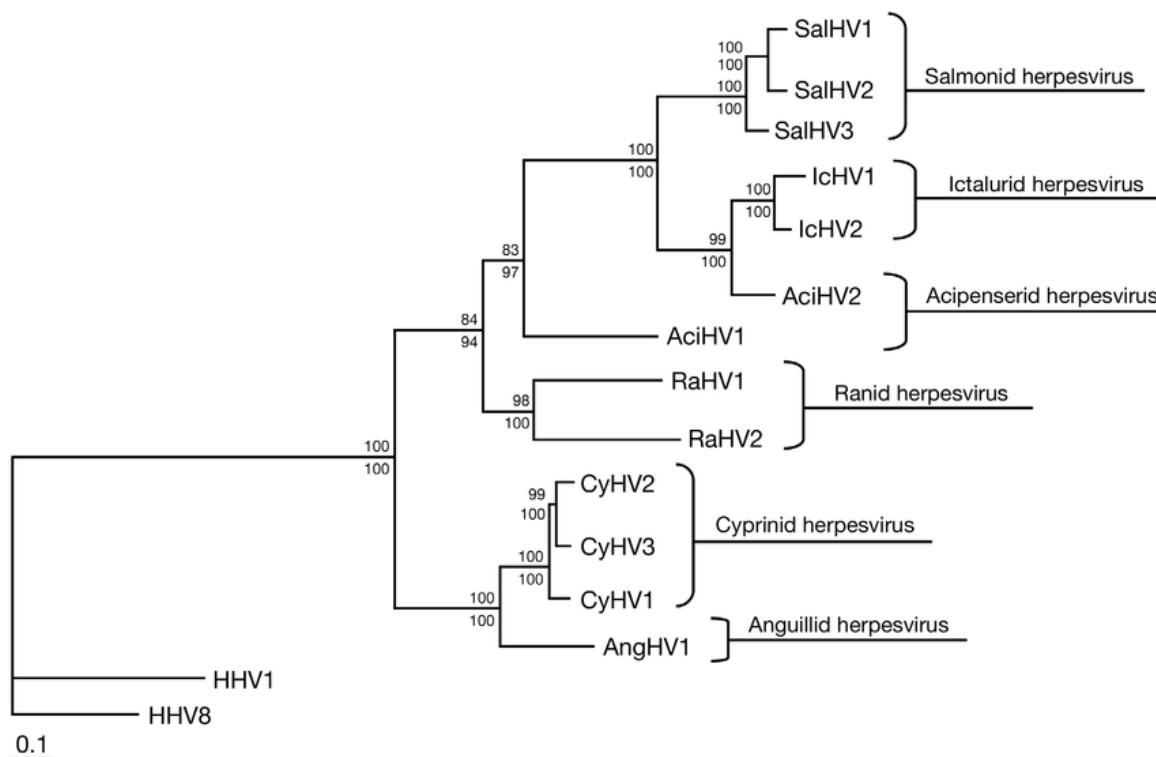
### 1.1. Az alloherpeszvírusokról általánosságban

Az alloherpeszvírusok a *Herpesvirales* rend *Alloherpesviridae* családjába tartozó, sejtmembrán eredetű burokkal rendelkező vírusok. Lineáris, duplaszálú DNS-genommal rendelkeznek, mely 135-294 ezer bázispárról áll. A vírusok genomja mintegy 70–200 fehérjét kódol. [1]

A család négy nemzetséget tartalmaz: *Batrachovirus*, *Cyprinivirus*, *Ictalurivirus* és *Salmonivirus*. A *Batrachovirus* nemzetségbe sorolt három vírus békákat fertőz, a *Cyprinivirus* nemzetség vírusai közül egy gazdaállatai az *Anguilla* nemzetség angolnáit, míg a másik három ide sorolt vírust pontyfélékből (*Cyprinidae*) mutatták ki. Az *Ictalurivirus* nemzetségbe sorolt vírusok törpeharcsafélék (*Ictaluridae*) és tokfélék (*Acipenseridae*) herpeszvírusai, a *Salmonivirus* nemzetségbe pedig a lazacfélék (*Salmonidae*) vírusai tartoznak. [1, 2] Az *Alloherpesviridae* család vírusainak törzsfája, az 1. ábrán látható.

Elmondható tehát, hogy az alloherpeszvírusok gazdaállatai *Teleostei* és *Chondrostei* halak egyaránt lehetnek, ideértve tengeri és édesvízi fajok egyedeit is, valamint az *Anura* rend békáiban is kimutathatóak. Tavasszal, amikor a víz hőmérséklete megfelelő a vírusok replikációjához és a halak immunrendszere még le van gyengülve, gyakoriak az alloherpeszvírusok által okozott járványok. Az alloherpeszvírusokat az általuk okozott tünetek és a betegség lefolyása alapján négy kategóriába lehet sorolni. A gyenge virulenciájú, krónikus, szisztémás megbetegedést okozó herpeszvírusok hatására gyakran figyelhetőek meg az érintett egyedeken különféle bőrelváltozások: eróziók, fekélyek, vérzéses elváltozások, melyet magas mortalitás kísérhet. A lazacfélék herpeszvírusai közül kettő (*Salmonid herpesvirus 1*, illetve *3*) sorolható ezen vírusok közé. Szintén szisztémás, de gyors lefolyású, magas mortalitással járó megbetegedéseket okoznak az alábbi erős virulenciájú vírusok: *Ictalurid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 2*. Gyenge virulenciájú vírusok esetében a jóindulatú vagy enyhe bőrelváltozások alakulnak ki. Az *Anguillid herpesvirus 1* és a lesőharcsából kimutatott herpeszvírus is ezen kategóriába tartozik. Erős virulenciájú vírusok, melyek akut bőrelváltozásokat okoznak és magas mortalitás kíséri őket az *Acipenserid herpesvirus 1* és *2*, a *Salmonid herpesvirus 2* és a *Cyprinid herpesvirus 3*. A vírus hatására a fertőzött sejtek sejtmagja gyakran megnagyobbodik, kromatinállománya szegélyezetté válik. [3, 4, 5, 6]

Általánosságban elmondható, hogy az alloherpeszvírusok gazdaspecifikusak, a családba tartozó vírusok mindegyike egy-egy fajt, esetleg egy nemzetségbe tartozó, egymással rokon fajokat képes megfertőzni. Továbbá hosszú látencia és epitheliotropizmus jellemzi őket. [7]



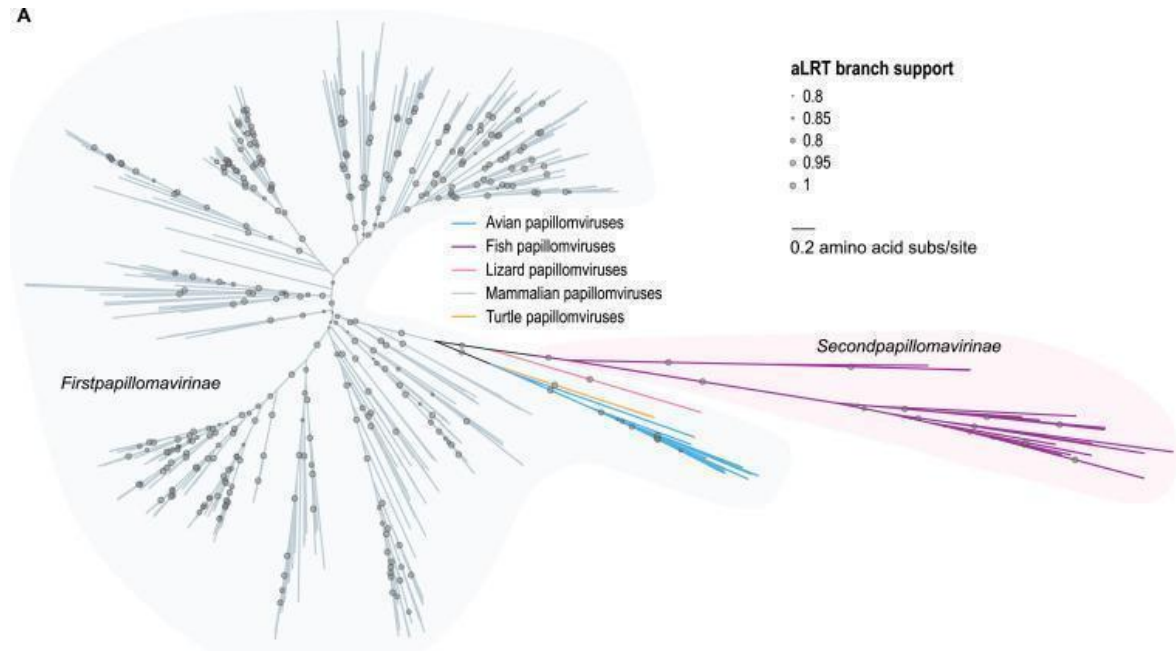
**1. ábra:** A halak és a kétéltűek herpeszvírusainak törzsfája, DNS-polimeráz és termináz gének szekvenciái alapján, maximum likelihood módszert használva. Kulcsoport (HHV1, HHV2): emlős herpeszvírus. [8]

## 1.2. A papillómavírusokról általánosságban

A tudomány jelenlegi állása szerint minden ismert papillómavírus a *Zurhausenvirales* rend *Papillomaviridae* családjába sorolható. A papillómavírusok genomjának nagysága 5748 és 8607 bázisbár közé esik, cirkuláris, duplaszálú DNS-sel és sejtmembrán eredetű burokkal rendelkeznek. A halak papillómavírusainak genomja 5600 és 6000 bázispár közötti. [9, 10]

A *Papillomaviridae* család két alcsaládra oszlik: *Firstpapillomavirinae* és *Secondpapillomavirinae*. Előbbibe 52 nemzetség több, mint 130 faja sorolható, utóbbiba egy nemzetség tartozik: az *Alefpapillomavirus*. Az ICTV (Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság) által eddig elfogadott egyetlen, halakat fertőző faj, az *Alefpapillomavirus*

nemzettségbe sorolt *Alefpapillomavirus 1* melyet aranydurbincsából (*Sparus aurata*) mutattak ki. [9] A papillómavírusok E1 fehérjéinek elemzése alapján Kraberger és munkatársai megállapították, hogy halak papillómavírusai jól elkülönült csoportot alkotnak, melyek a madarak és hüllők papillómavírusaival állnak távoli rokonságban. A papillómavírusok filogenetikai viszonyait a 2. ábra szemlélteti. [11]



**2. ábra:** A papillómavírusok maximum likelihood módszerrel készített törzsfája, E1 fehérjék szekvenciái alapján. Kiemelve a halak rendkívül divergens papillómavírusainak alcsaládja, a *Secondpapillomavirinae* és a szárazföldi gerincesek papillómavírusait magába foglaló *Firstpapillomavirinae* alcsalád [11]

A papillómavírusok gazdaállatai közé halak, hüllők, madarak és emlősök is tartoznak. [12] Szűk gazdaspektrum jellemző a család tagjaira. A legtöbb papillómavírus nem patogén vagy nagyon enyhe lefolyású fertőzést okoz. Gyakran papillómaszerű elváltozásokat, az epithel sejtek burjánzását idézi elő, ez a 3. ábrán van szemléltetve. A papillómavírusok kis hányada onkogén, rosszindulatú tumorok kialakulásáért felelős. A kórokozó jellemzően a mukózus, illetve keratinizált hámszövetet fertőzi. [13]

### 1.3. Circovírusokról általánosságban

A *Circulivirales* rendbe sorolt *Circoviridae* család vírusai burok nélküli, egyszálú, cirkuláris DNS-sel rendelkeznek. Kapszidjuk ikozahedrális, genomjuk a legkisebbek között van a vírusok között: 1700-2300 bázispár nagyságú. A család két nemzetségre oszlik: a *Circovirus*, illetve a *Cyclovirus*. A halak circovírusai a *Circovirus* nemzetségbe sorolhatók. [14]

A család tagjai közül a madarak és sertések circovírusai a legrégebb óta ismertek a tudomány által, így ezekről áll rendelkezésünkre a legtöbb információ. 2009-ben fedeztek fel először, circovírus-szerű genomot vízi mintából, tengeri teknős (*Chelonioidea*) eredetű mintában, majd 2010-ben Li és munkatársai emberi és csimpánz eredetű székletmintákból mutattak ki egy új vírust, amit a *Circoviridae* család *Cyclovirus* nemzetségébe soroltak. [15] Ezt követően 2011-ben mutattak ki először halakban előforduló circovírust, rózsás márna (*Barbus barbus*) egyedekből, majd lesóharcsából (*Silurus glanis*), európai angolnából (*Anguilla anguilla*) és garda mintákból (*Pelecus cultratus*) is mutattak ki circovírus örökítőanyagot. [16, 17, 18, 19]

Madarak esetében az egyik legjelentősebb circovírus a *Beak and feather disease virus* (BFDV), melynél a számottevő tollvesztés, illetve a csőr, karmok és tollak rendellenes, nagymértékű növekedése kíséri. A tünetegyüttest csőr- és tollbetegségnek nevezzük. A gyors testsúlycsökkenés, a sport célból tartott madarak teljesítményének romlása és az általános letargia szintén gyakori tünete a circovírus okozta megbetegedésnek. A fertőzés hatására kialakuló immunszupresszió fogékonyá teszi az egyedeket a másodlagos, oportunistá fertőzésekre is. [20, 21]

A sertések circovirusa szisztémás megbetegedést okoz az érintett állatokban: a légzőszervi, enterális, ivarszervi rendellenességekkel járó a tünetegyüttest sertés-circovírussal összefüggő betegségnek hívjuk. A madarak és sertések circovirusa tünetmentes egyedekből is kimutatható. [22, 23, 24]

Bár azok a halak, melyekből circovírust mutattak ki, tüneteket produkáltak, egyes esetekben tömeges elhullást is leírtak a fertőzött halak körében, viszont a vírus és a tünetek közötti kapcsolat eddig nem bizonyított, vagyis a halak circovírus-fertőzését a tudomány jelenlegi állása szerint még nem tudjuk tünetekhez kapcsolni. [16]

#### 1.4. Az iridovírusokról általánosságban

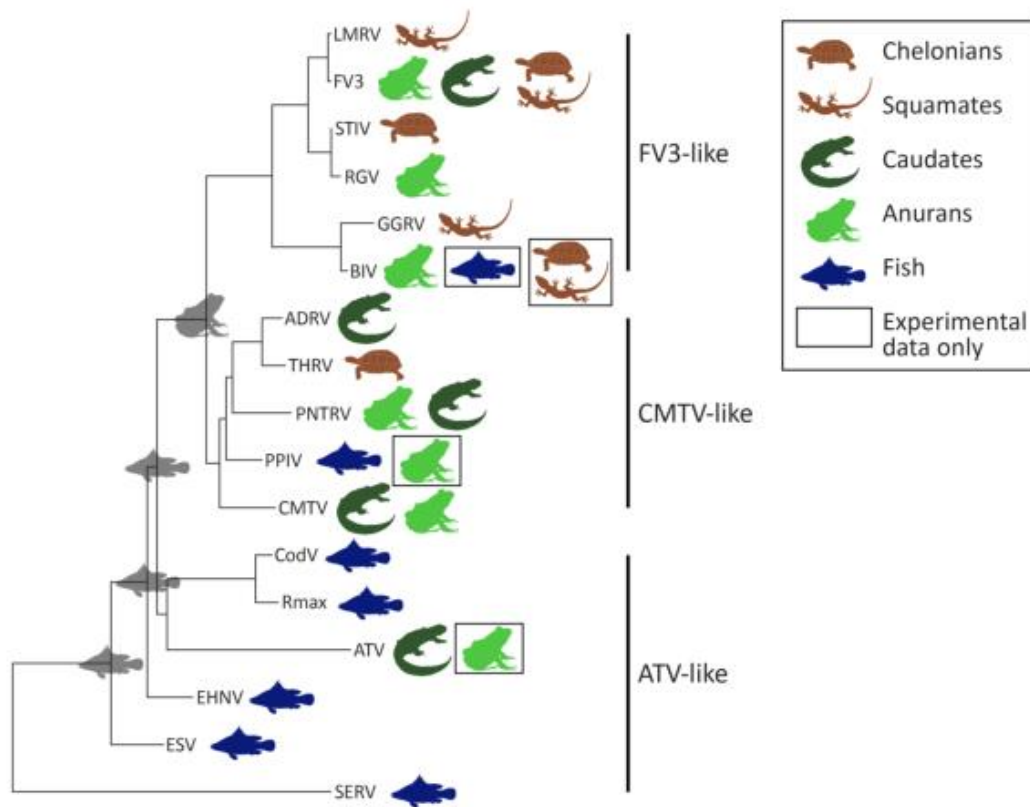
A *Pimascovirales* rend *Iridoviridae* családjának tagjai nagyméretű, ikozahedrális vírusok, melyek duplaszálú DNS genomja 103 és 220 ezer bázispár közötti. Az *Iridoviridae* család két alcsaládra oszlik: *Alphairidovirinae* és *Betairidovirinae*. Az *Alphairidovirinae* alcsaládba jelenleg tartozó 13 vírusfaj három nemzetségbe sorolható: *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* és *Ranavirus*. [25]

A *Lymphocystivirus* nemzetség vírusai több, mint száz édesvízi és tengeri halfajt képesek megfertőzni. Magas morbiditású, de alacsony mortalitást okozó vírusfajok tartoznak közéjük. A *Megalocytivirus* nemzetségbe sorolt vírusok szintén édesvízi és tengeri halfajokat fertőznek, a fertőzés nyomán több belső szerv elváltozása is megfigyelhető. A *Ranavirus* nemzetség tagjai nem csak halakat képesek megfertőzni, a hét jelenleg elfogadott ranavírusfaj gazdaállatai közé csontos halak, hüllők és kétélűek is tartoznak. Némely ranavírus képes egy osztály több fajtát is megfertőzni, de egyes ranavírusok gazdaállatai különböző osztályok fajai közül kerülnek ki (a *Bohle iridovirus* például három kétélű és egy halfaj egyedeiben is előfordul). [26, 27] A *Ranavirus* nemzetség filogenetikai viszonyait és gazdaállatait 3. ábra szemlélteti.

A *Ranavirus* nemzetségbe jelenleg 7 vírusfaj tartozik, mely az ICTV által elfogadott: a *Ambystoma tigrinum virus* (ATV), a *Common midwife toad virus* (CMTV), az *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV), a *European North Atlantic ranavirus* (ENARV), a *Frog virus 3* (FV3), a *Santee-Cooper ranavirus* (SCRV) és a *Singapore grouper iridovirus* (SGIV). [28]

Az EHNV fajba két, egymáshoz morfológiailag hasonló vírus is tartozik: a European catfish virus (ECV) és a European sheatfish virus (ESV). Ezeket a vírusokat számos halfajból mutatták ki eddig kutatók: csapósügérből (*Perca fluviatilis*), fekete törpeharcsából (*Ameiurus melas*), lesőharcsából (*Silurus glanis*), nagy rombuszhalból (*Scophthalmus maximus*) és fogassüllőből (*Sander lucioperca*) is. [29, 30, 31, 32, 33]

A ranavírus-fertőzés több belső szervet is érint, szisztémás megbetegedést okoz, gyakran magas morbiditással és magas mortalitással jár nemcsak tenyésztett hal- és kétélűállományokban, de szabadon élő, veszélyeztetett fajok esetében is. [25, 34]



**3. ábra:** A ranavírusok közötti filogenetikai viszonyok és gazdaállataik. Feltételezett ősi gazdaállatok (halak vagy kétéltűek) szürkével jelölve a náduszoknál. A törzsfá topológiája Stohr és munkatársai (2007) 3. ábráján alapszik, annak leegyszerűsített változata. Rövidítések: FV3-like: *Frog virus 3*-szerű; CMTV-like: *Common midwife toad virus*-szerű; ATV-like: *Ambystoma tigrinum virus*-szerű; SERV: *short-finned eel ranavirus*; ESV: *European sheatfish virus*; ESNV: *Epizootic haematopoietic necrosis virus*; ATV: *Ambystoma tigrinum virus*; Rmax: *Ranavirus maximus*; CodV: *Cod iridovirus*; CMTV: *common midwife toad virus*; PPIV: *pike-perch iridovirus*; PNTRV: *Portuguese newt and toad ranavirus*; THRV: *Testudo hermanni ranavirus*; ADRV: *Andrias davidianus ranavirus*; BIV: *Bohle iridovirus*; GGRV: *German gecko ranavirus*; RGV: *Rana grylio iridovirus*; STIV: *Soft-shelled turtle iridovirus*; FV3: *Frog virus 3*; LMRV: *Lacerta monticola ranavirus*. [35]



## 1.5. A lesőharcsa és vírusai

### 1.5.1. A lesőharcsa jelentősége, általános jellemzése

A lesőharcsa vagy európai harcsa (*Silurus glanis*) a sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*) osztályába, a harcsaalakúak (*Siluriformes*) rendjébe és a harcsafélék (*Siluridae*) családjába tartozó faj. Őshonos fajnak számít nyugat-keleti irányban a Rhône folyótól az Urálig, észak-déli irányban pedig Svédországtól és Észtországtól Görögország, Törökország, Észak-Írán és Tádzsikisztán területéig fordul elő édesvízi tavakban és folyókban. [36]

A nagytestű csúcsragadozók központi szerepet töltenek be az ökoszisztémák stabilitásának fenntartásában. Ha egy csúcsragadozó faj eltűnik a táplálékhálózatból, elkezdődhet az úgynevezett trofikus kaszkád folyamat, mely eredményeképp az ökoszisztéma felépítése és a tápanyagkörforgás gyökeresen megváltozik. Tavakban ha megfelelő nagyságú csúcsragadozó populáció van jelen, akkor a kisebb testű, zooplanktonnal és fitoplanktonnal táplálkozó halak abundanciája csökken. Ennek eredményeképp a több zooplanton több fitoplanktont fog fogyasztani, így a fitoplanktonmennyiség csökken. Így a tó CO<sub>2</sub>-abszorpciójának mértéke is csökken, több CO<sub>2</sub> fog a légkörbe jutni, mint amennyit elnyel, nettó CO<sub>2</sub>-forrásként tekinthetünk ebben az esetben a tóra. Vagyis csúcsragadozó jelenlétében a tó CO<sub>2</sub>-ot bocsát ki a légkörbe, míg ha a csúcsragadozó hiányzik vagy nem elég nagy a populációja, akkor a fent leírt folyamatok ellenkezője következik be. Szélsőséges esetben megváltozik a tó és a légkör közötti szénáramlás iránya, a tó fog CO<sub>2</sub>-t abszorbeálni. Elmondható tehát, hogy a lesőharcsa, mint édesvizeink csúcsragadozójának jelenléte létfontosságú az ökoszisztéma működésének egyensúlya érdekében. Ha egy vírusfertőzés miatt az állományuk lecsökken, az nemcsak az adott élőhely többi fajára, de az anyag- és energiaáramlásra is hatással lehet. [37]

A lesőharcsa gazdasági jelentősége megkérdőjelezhetetlen, hazánkban is előszeretettel fogyasztják húsát az emberek, az Amerikai Egyesült Államokban pedig a negyedik legtöbbször fogyasztott halfaj. A kereskedelmi forgalomba kerülő lesőharcsák nagyrésze a természetes vizekből kifogva érkezik, de egyre több helyen tartják intenzív haltenyészetekben is, többek között Magyarországon is. A herpesz-, illetve papillómavírussal fertőzött egyedek bőrén megjelenő papillóma-szerű kinövések undort keltőek, csökkentik a halak értékesíthetőségét. [38]

Egyes országokban a rekreációs horgászok által kedvelt halként tartják horgásztavakban, máshol a húsán kívül a bőrét és az ikráit is felhasználják. [39]

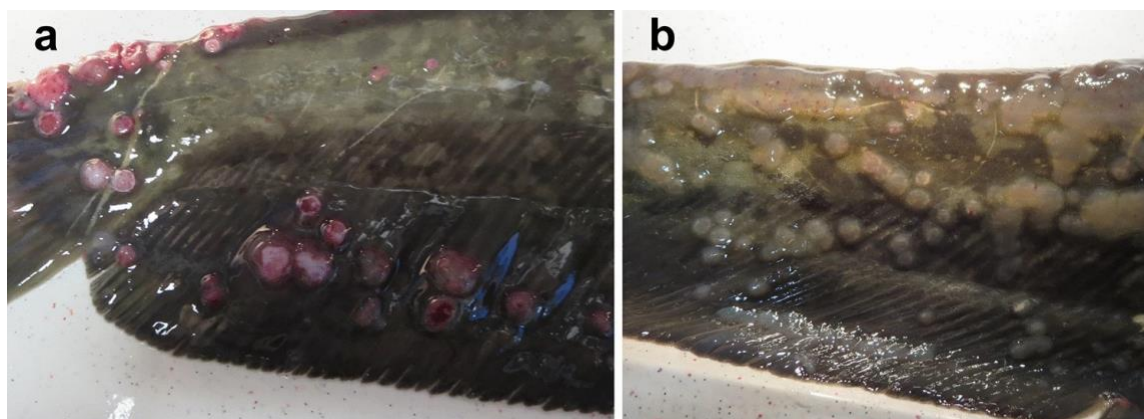
### 1.5.2. A lesőharcsa herpeszvírusa

A harcsákban előforduló herpeszvírust magyar kutatók írták le a 80-as években. A vírussal fertőződött egyed bőrén gyakran pontyhimlő-szerű epidermális elváltozásokat figyelhetünk meg, illetve a hámszövet hiperpláziáját. 1980 előtt - bár a klinikai tünetek ismertek voltak - herpeszvírus által okozott mortalitást nem figyeltek meg lesőharcsáknál. 1980-1982-ben súlyos bőrelváltozások által kísért, magas mortalitású herpeszvírus-fertőzést írtak le Magyarországon. A patológiai vizsgálatok során a bőrt egyes részeken beborító sűrű, rugalmas réteget, illetve a fejen nyálkás burkot diagnosztizáltak. A bőr és a máj kivételével minden szerv épnek bizonyult, a máj dystrophiát mutatott. A beteg egyedeket fénymikroszkóppal vizsgálva a dermis megvastagodását figyelték meg. Egyes epidermális sejtekben a sejtmag megnagyobbodott és Cowdy-A típusú acidofil zárványtesteket tartalmazott. A sejtmag szabálytalan alakú volt, egyes esetekben szétesett. [40]

Molekuláris vizsgálatokat csak az elmúlt években kezdtek el végezni a lesőharcsa herpeszvírusával, a kutatócsoportban, ahol a szakdolgozatomat készítettem. A meglévő, még nem publikált szekvenciák alapján a lesőharcsákból kimutatott herpeszvírus, a *Cyprinivirus* nemzetségbe sorolható. (Tarján ZL, személyes közlés)

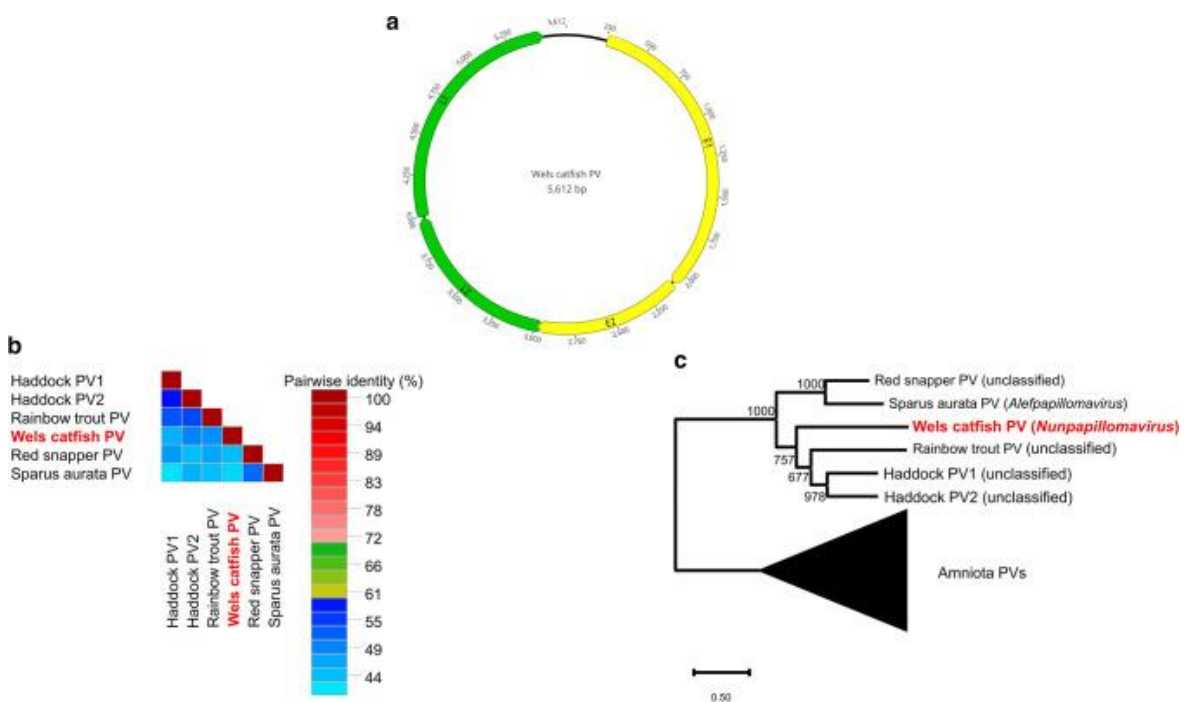
### 1.5.3. A lesőharcsa papillómavírusa

Papillómavírust először harcsa herpeszvírussal fertőzöttállatok molekuláris vizsgálatával mutattak ki. Himlőszerű epidermális elváltozások és papillómaszerű függelékek voltak megfigyelhetőek az érintett halakon. Ez a 4. ábrán látható. [41]



4. ábra: Papillómák lesőharcsa bőrén [41]

A lesőharcsa papillómavírusának genomja csak az E1, E2, L1, L2 backbone géneket tartalmazza, az onkogének (E5, E6 és E7), melyek jellemzően előfordulnak magasabbrendű gerincesek papillómavírusaiban, nem található meg benne (5. ábra (a)). Az L1 gén páros illesztése során kiderült, hogy az 60% alatti egyezést mutatott más halakat fertőző papillómavírusokkal (5. ábra (b)). Mivel a *Papillomaviridae* családba tartozó fajok 70%-os szekvenenciaegyezés felett tekinthetők egy fajnak és 60%-os egyezés felett sorolhatók egy nemzetségbe, így a lesőharcsa papillómavírusát Surján és munkatársai új fajként terjesztették elő az ICTV felé. Az új fajt *Nunpapillomavirus siluri* néven, egy új, *Nunpapillomavirus* nevű nemzetségbe helyezték. Az új faj elhelyezkedése a törzsfán az 5. ábra c részén látható. [41]



**5. ábra:** (a) a lesőharcsa papillómavírusának genomjának szerveződése, zölddel a késői (L1, L2), sárgával a korai (E1, E2) gének jelölve; (b) az L1 core gén aminosavszekvenciájának összehasonlítása halak papillómavirusaival; (c) Az E1, E2 és L1 gének maximum likelihood alapú filogenetikai analízise alapján készített törzsfá (középen gyökereztetve, az *Amniota* klád papillómavírusai összevonva) [41]

#### 1.5.4. A lesőharcsa circovírusa

2011-ben a Balatonban az előző évtizedeknél nagyobb mértékű volt a lesőharcsák elhullása. 6 és 50 kilogramm közötti, elpusztult, illetve súlyosan betegnek tűnő egyedekből vett máj-, lép-, kopolyú- és gonádmintákból Lőrincz és munkatársai egy a tudomány számára új circovírust írtak le. A vírussal fertőzött egyedek bőrén léziókat figyeltek meg,

továbbá értágulatot írtak le a bőrszövetben. Ezen kívül a gasztrointesztinális rendszer gyulladását és a vérképző szervek sejtjeinek sérülését írtak le a patológiai vizsgálatok. A teljes genom leírása és a filogenetikai analízis alapján megállapították, hogy a lesőharcsákból kimutatott circovírus a korábban leírt rózsás márna circovírusával áll rokonságban, a *Circovirus* nemzetségbe sorolható. [17]

#### **1.5.5. A lesőharcsa ranavírusa**

Először Ahne és munkatársai írtak le iridovírust lesőharcsából 1989-ben, miután egy németországi haltenyésztésben rendkívül nagymértékű mortalitást figyeltek meg a lesőharcsaállományban. Az izolált vírus a *European sheatfish virus* (ESV) nevet kapta, melynek magas virulenciája a halivadékok hirtelen elhullását okozta. A fertőzött halak alultápláltak, apátia figyelhető meg rajtuk, mozgásuk bizonytalanná válik (ataxia) és a melegebb vízben gyűlnek össze. Elhullás előtt a beteg egyedek lassan mozognak, néha viszont gyorsan, spirál alakban úsznak. [31, 42]

Bőr alatti, illetve belső vérzések jelentkeznek, amely egyes esetekben a szemet, a szaglógödröt is érinti. Boncoláskor megfigyelték, hogy az iridovírossal fertőzött lesőharcsák mája és lépe gyakran duzzadt, fakó színű, az emésztőrendszerük nem tartalmaz táplálékot. Az ESV endotheliotrop vírus, a szaporodás az endotheliumban történik, ami a kapillárisok falának gyengülését okozza, ezáltal a vérerek permeabilitása nő. Emelett a vérképzőszervek, a máj és a lép szövetének általános degenerációja kíséri a betegséget. Mindez ödémát, vérzéses diatézist és a perifériás keringés zavarát okozza. Siwicki és munkatársai kimutatták, hogy a lesőharcsák iridovírusa az elővese makrofágjainak és a limfocitáknak a működését szupresszálja. [43, 44]

#### **1.6. Célkitűzések**

Szakedolgozatom célja hazai lesőharcsaállományokban, 2014 és 2021 között vett mintákból herpesz-, papillóma, circo- és iridovírusok kimutatása és jellemzése volt, illetve ezen vírusok prevalenciájának meghatározása. A vizsgált vírusok tünetekhez kapcsolását is célul tűztem ki, hiszen a vírusok által okozott tünetek, esetleges tünetegyüttesek, betegségek ismeretének birtokában a kórokozók elleni védekezés hatékonyságát növelni tudjuk.

## **2. Anyag és módszer**

### **2.1. A minták származása**

Az általam vizsgált 68 minta mind halgazdaságokból származott, a minták többsége rutin bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatokra érkezett az intézetünkbe. 25 minta Rétimajorból, 17 minta Hársasberekéről, 7 Dalmandról, 6 Varsádról, 6 Keszthelyről, 3 a Balatonról, 3 Tapolcáról, 1 Szarvasról érkezett. A minták közül 53 máj-lép-vese elegy volt, 9 máj, 3 tumor eredetű, 3 esetben pedig az egész ivadékot felhasználva történt a DNS-extrakció.

### **2.2. DNS-kivonás a mintákból**

A DNS extrakciót a NucleoSpin RapidLyse kit (Macherey-Nagel, Németország) használatával végeztem el, a gyártó utasításait követve. A kivont DNS-t -20 °C-os fagyasztóban tároltam.

### **2.3. Polimeráz láncreakció**

A circovírusok kimutatása kétkörös, nested polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával történt, míg a herpesz-, papillóma- és iridovírusokat egykörös PCR-rel vizsgáltam.

Minden esetben volt negatív kontroll, aminél a mintából kivont DNS-t Milli-Q vízzel helyettesítettem a reakció összeállításakor. A pozitív kontrollt tartalmazó csőbe olyan mintát helyeztem, amely korábbi PCR és szekvenálás alapján pozitívnak bizonyult az adott vírusra. A reakcióelegy végtérfogata 50 µl volt, összetétele az egy-, illetve kétkörös PCR során az 1., illetve 2. táblázatban leírtak szerint alakult.

A herpesz-, papillóma- és iridovírusok kimutatására szolgáló egykörös PCR idő- és hőmérséklet protokollja a 3. táblázatban látható. A circovírust kimutató kétkörös PCR protokollját a 4. táblázat részletezi. A reakció végeztével a PCR gép a termékeket +10 °C-on tartotta, majd az agaróz gélelektroforézis elvégzéséig +4 °C-on tároltam őket.

A PCR-hez használt primerszekvenciák az 5. táblázatban láthatók. Az alábbi gének kerültek felerősítésre a PCR által: a herpeszvírus esetén a DNS-polimeráz gén (Tarján ZL, személyes közlés), a papillómavírusnál az E2 gén [41] az iridovírusnál a fő kapszid fehérje génje [45] a circovírusnál pedig a replikációért felelős gén [46] A reakciókhoz DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mixet (Thermo Fisher Scientific, USA) használtam.

**1. táblázat:** A herpesz-, papillóma- és iridovírus kimutatására szolgáló PCR összetétele, illetve a circovírus kimutatására irányuló kétkörös PCR első körének összetétele (utóbbi esetben az outer primerek használatával zajlott az első kör)

	egykörös, illetve első kör PCR esetén
Milli-Q víz	21 $\mu$ l
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)	25 $\mu$ l
Forward primer	1 $\mu$ l
Reverse primer	1 $\mu$ l
DNS	2 $\mu$ l
<i>Végtérfogat</i>	<i>50 <math>\mu</math>l</i>

**2. táblázat:** A circovírus kimutatására irányuló kétkörös PCR második körének összetétele

	második kör circovírus PCR esetén
Milli-Q víz	18 $\mu$ l
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)	25 $\mu$ l
Forward, inner primer	1 $\mu$ l
Reverse, inner primer	1 $\mu$ l
Első körös PCR-termék	5 $\mu$ l
<i>Végtérfogat</i>	<i>50 <math>\mu</math>l</i>

**3. táblázat:** A herpesz-, papillóma- és iridovírus kimutatására szolgáló PCR protokollja.

Rövidítések magyarázata: hőm. - hőmérséklet, t – idő, ism. - ismétlésszám

Herpeszvírus			Papillómavírus			Iridovírus		
hőm. (°C)	t (perc:mp)	ism.	hőm. (°C)	t (perc:mp)	ism.	hőm. (°C)	t (perc:mp)	ism.
95	3:00	1	95	3:00	1	94	3:00	1
95	0:30	45	95	0:30	45	94	0:30	40
55	0:30		65	0:30		50	1:00	
72	1:00		72	0:30		72	1:00	
72	3:00	1	72	3:00	1	72	10:00	1
10	∞		10	∞		10	∞	

**4. táblázat:** A circovírus kimutatására szolgáló PCR protokollja

Első kör			Második kör		
hőm. (°C)	t (perc:mp)	ism.	hőm. (°C)	t (perc:mp)	ism.
95	5:00	1	95	5:00	1
95	0:30	45	95	0:30	45
46	1:00		56	1:00	
72	1:00		72	1:00	
72	5:00	1	72	5:00	1
10	∞		10	∞	

**5. táblázat:** A PCR vizsgálatokhoz használt primerek szekvenciái

kimutatandó vírus		primer szekvencia
herpeszvírus		fo: 5'-CTT CTT GGC GTC GTT TCA AA-3' re: 5'-CGC ACA TGT TCT CCA CGT TT-3'
papillómavírus		SgPV1_E2_fo: 5'-CAG AAG CAG CAG ATC CAC CA-3' SgPV1_E2_re: 5'-GCT TCA GCG TAG TGG TCT GT-3'
iridovírus		RanaMCP-Fb: CCA GTC CAC ATG GTC AAC CC RanaMCP-Rb: GAT AAT GTT GTG GTT GAT GGC C
circovírus	első kör	Cv-s: 5'-AGA GGT GGG TCT TCA CNH TBA AYA A-3' Cv-as: 5'-AAG GCA GCC ACC CRT ARA ART CRT C-3'
	második kör	Cn-s: 5'-AGC AAG GAA CCC CTC AYY TBC ARG G-3 Cn-as: 5'-ACG ATG ACT TCN GTC TTS MAR TCA CG-3'

**2.4. Agaróz gélelektroforézis**

A keletkezett PCR-termékek méret szerinti elválasztása, a PCR vizsgálat pozitívitásának ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt. 100 ml gélhez 1% agaróztartalmú gélhez 4 µl GelRed (Biotium, USA) festéket adtam. A mintafelvívő zsebekbe a mintákból, illetve a pozitív és negatív kontrollból is 10-10 µl-t mértem ki, míg a molekulatömeg markerből (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, USA) 4 µl-t. A futtatáshoz használt puffer 0,5x TAE (triz-(hidrometil)-amino-metán, ecetsav, etilén-fiamin-tetraecetsav) volt. A kisebb méretű futtatókádban történő futtatáskor 90 V, nagyobb kád alkalmazása esetén 110 V feszültséget állítottam be. A futtatás nagyjából 30 percig zajlott.

**2.5. PCR-termék előkészítése szekvenáláshoz**

Azon minták PCR-termékeit, amelyek a gélelektroforézis alapján pozitívnak mutatkoztak, a szekvenálás előtt tisztítani kellett. Erre kétféle módszert alkalmaztam: ha csak specifikus termék keletkezett, akkor az ExoProStar 1-Step (Cytiva, USA) kitet használtam, a folyamat során használt idő- és hőmérsékletprotokoll a 6. táblázatban látható.



Nem-specifikus termékek jelenléte esetén a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel, Németország) végeztem a tisztítást a gyártó utasításainak megfelelően.

**6. táblázat:** A ExoSap protokoll

hőmérséklet (°C)	idő (perc:mp)
37	15:00
80	15:00
25	∞

**2.6. DNS-szekvenálás**

A tisztított PCR-termékek szekvenciáját a DNS mindkét szálán meghatároztam BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitet (Thermo Fisher Scientific, USA) használva. A diagnosztikai PCR-ekhez használt primereket alkalmaztam a szekvenálás során is, a circovírusok esetében a belső primerekkel végeztem a szekvenálási reakciót. A primert 5 pmol koncentrációra hígítva használtam. A szekvenálási reakció összetételét a 7. táblázat, míg az idő- és hőmérsékletprotokollt a 8. táblázat részletezi.

**7. táblázat:** A szekvenálási reakció összetétele

Milli-Q víz	3 µl
BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	1 µl
primer	1 µl
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 µl
DNS	3 µl
<i>Végtérfogat</i>	<i>10 µl</i>

## 8. táblázat: A szekvenálási reakció protokollja

hőmérséklet (°C)	idő (perc:mp)	ismétlésszám
96	0:10	1
96	0:10	35
50	0:05	
60	4:00	
4	∞	

Miután a szekvenálási reakció végbement, alkoholos precipitálást végeztem. A kicsapás első lépéseként 40 µl kicsapó mixet mértem minden mintára (1,5 µl 3M nátrium-acetát, 31 µl 96% alkohol, 7,5 µl Milli-Q víz), majd egy óvatos keverést követően 15 perc szobahőmérsékleten történő, fénytől elzárt inkubáció következett. Ezt követően a centrifugát 2100 g-re állítva 45 percig centrifugáltam a mintákat szobahőmérsékleten. Ezután a felülúszót eltávolítottam, majd minden csőbe 70 µl 70%-os etanolt mértem és 2100 g-t alkalmazva 15 percig szobahőmérsékleten centrifugáltam a mintákat. A következő lépés a felülúszó eltávolítása volt, majd a csöveket nyitva hagyva 10 percig szobahőmérsékleten szárítottam őket. A kapilláris gélelektroforézist a Szegedi Biológiai Kutatóközpont munkatársai végezték.

### 2.7. Molekuláris klónozás

Azokban az esetekben, amikor nem kaptam megfelelő minőségű hullámokat a direkt szekvenálás során, molekuláris klónozást végeztem. Ennek első lépése a PCR-termék ligálása volt a Clone Jet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével, a gyártó utasításai alapján. A ligátumot -20 °C-on tároltam. Ezt követően a hősokkal való transzformálás következett. Ekkor hűtött pipettahegyekkel és csövekkel dolgoztam. 50 µl TOP10 (Thermo Fisher Scientific, USA) baktériumhoz 5 µl ligátumot adtam, majd 30 perc jégen való inkubálás után 90 másodperc 42 °C-os vízfürdő, végül 2 perc jégen való inkubálás következett. Ezután 250 µl SOC tápfolyadékot mértem a transzformátumra és 37 °C-on inkubáltam egy órán át folyamatos rázatás kíséretében.

Az egy óra leteltével 100 µl baktériumot ampicillint (100 µl/ml) tartalmazó táptalajra szélesztettem, majd 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltam. A másnapra nőtt telepeket

átoltottam 100 µl/ml ampicillin tartalmú LB tápfolyadékba, majd folyamatos rázatás mellett ismét 37 °C-os, egy éjszakán át tartó inkubáció következett.

A plazmid DNS-t miniprep módszerrel, a NucleoSpin Plasmid Mini Kit (Macherey-Nagel, Németország) használatával vontam ki, a gyártó utasításait követve. Az így kapott DNS-t egy restrikciós endonukleázzal emésztettem, 2 órán keresztül, 37 °C-on. A reakció összetétele a 9. táblázat szerint alakult. Az emésztés után gél elektroforézist végeztem a 2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően, de 20 µl mintát téve a mintafelvívő zsebekbe.

**9. táblázat:** a plazmid DNS emésztése restrikciós endonukleázzal

Minipreppel kivont plazmid DNS	2 µl
10x Buffer O (Thermo Fisher Scientific, USA)	2 µl
Milli-Q víz	15 µl
BGIII enzim (Thermo Fisher Scientific, USA)	1 µl
<i>végtérfogat</i>	<i>20 µl</i>

Ha a gél elektroforézis eredménye megfelelő volt, összeállítottam a szekvenálási reakciót a Clone Jet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) szekvenáló primereit használva. A reakció idő-, és hőmérsékletprotokollja a 8. táblázatban leírtakkal egyezik meg. Az alkoholos precipitálás és a kapilláris gélelektroforézis a 2.6. fejezetben kifejtett módon történt.

## 2.8. Bioinformatikai és statisztikai elemzések

A kapott szekvenciákat a BioEdit nevű elektroforetogram megjelenítő program segítségével ellenőriztük, és szükség esetén manuálisan javítottuk. [47]

A DNS szekvenciák azonosítását homológia kereső programok, BLASTX és BLASTN segítségével online végeztük a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbankjában (GenBank). [48] Egyazon PCR termék forward és reverse primerekkel kapott szekvenciáit a Staden program segítségével illesztettük össze. [49]

A nukleotidsorrendeknek, a GenBankban illetve saját adatbázisunkban találhatóaknak, a pozícionális illesztését (alignment) a MultAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) online alkalmazásával végeztük el.

Hogy megvizsgáljam, hogy az egyes vírusok előfordulása között van-e összefüggés, Fisher-féle egzakt próbát végeztem. Kis elemszám mellett ez a teszt pontosabb eredményt ad, mint a  $\chi^2$ -próba, ezért ezt alkalmaztam.

### 3. Eredmények

Az elvégzett vizsgálatok alapján a herpeszvírusra vizsgált 68 mintából 13 bizonyult pozitívnak, vagyis 19%-os prevalenciáról beszélhetünk. A 68 minta közül, amit papillómavírusra teszteltem, 28 volt pozitív, ami vizsgált minták nagyjából 42%-át teszi ki. Circovírusra 48, iridovírusra 59 mintát teszteltem, ezek egyikében sem fordultak elő ezen vírusok. A vizsgált vírusokra pozitív minták arányát, a minták származási helye szerint elkülönítve a 11. és 12. táblázat szemlélteti.

**11. táblázat:** a vizsgált vírusok előfordulása (pozitív minták száma/összes vizsgált minta) a különböző helyekről származó mintákban

minták származása	herpeszvírus	papillómavírus	circovírus	iridovírus
Rétimajor	0/25	6/25	0/14	0/25
Hársasberek	5/17	10/17	0/17	0/17
Dalmand	0/7	3/7	0/7	0/7
Varsád	6/6	4/6		
Keszthely	0/6	1/6	0/6	0/6
Balaton	1/3	3/3	0/3	0/3
Tapolca	1/3	1/3		
Szarvas	0/1	0/1	0/1	0/1
összesítve	13/68	28/68	0/48	0/59

**12. táblázat:** a vizsgált vírusok prevalenciája a különböző helyekről származó mintákban

minták származása	herpeszvírus	papillómavírus	circovírus	iridovírus
Rétimajor	0%	24%	0%	0%
Hársasberek	29,41%	58,82%	0%	0%
Dalmand	0%	42,86%	0%	0%
Varsád	100%	66,66%		
Keszthely	0%	16,67%	0%	0%
Balaton	33,33%	100%	0%	0%
Tapolca	33,33%	33,33%		
Szarvas	0%	0%	0%	0%
összesítve	19,12%	41,18%	0%	0%

A papillóma PCR 220 bázispár hosszúságú terméket adott. A szekvenciák elemzése során a primerek levágása után egy 180 bázispár hosszúságú szakasz nukleotid sorrendjét hasonlítottuk össze a 28 pozitív esetből. Mindössze egy esetben tapasztaltunk egy nukleotid eltérést a génbanki adathoz képest, ám ez sem eredményez aminosav cserét a keletkező fehérjében. [41] A herpeszvírus PCR 267 bázispárt erősített fel, a primerek eltávolítása után 227 bázispár maradt. A herpeszvírusra pozitív minták esetében nem volt eltérés a Tarjánék által átadott szekvenciákhoz képest, 100% volt a nukleotidazonosság.

A Fisher-féle egzakt próbához készített kontingenciatáblázat a 13. táblázat. A próba eredményeként kapott p-érték 0,0051 -  $p < 0,05$  - vagyis a herpeszvírus és a papillómavírus előfordulása közötti szignifikáns kapcsolat áll fent, egymástól nem függetlenek.

**13. táblázat:** kontingenciatáblázat a herpesz- és a papillómavírus előfordulására (db)

	Papillómavírusra pozitív	Papillómavírusra negatív
Herpeszvírusra pozitív	10	3
Herpeszvírusra negatív	18	37

A 23 tünetmentesnek mutakozó hal közül öt volt, ami papillóma és herpeszvírussal is fertőzött volt és nyolc minta esetében csak a papillómavírus jelenlétét tudtam kimutatni, vagyis a tünetmentes egyedek esetében csaknem 57%-volt papillómavírus prevalenciája.

Azon egyedek melyek csak a herpeszvírusra adtak pozitív eredményt a következő tünetekkel lettek beküldve: papillómaszerű bőrelváltozások (két varsádi minta esetében), egy tapolcai mintánál pedig a fej egyik oldalán és az azonos oldali mellúszó körül 4-5 cm-es sávban az intakt, de színvesztett bőr alatt az izom teljesen elhalt, lágyszöveti gyulladás volt megfigyelhető, illetve fajilag nem beazonosított bakteriális fertőzést mutattak ki a vizsgálatok.

A csak papillómavírusos egyedeken a következő tünetek voltak megfigyelhetők: kopolyúfedőn szövetburjánzásból származó tumor, ivadékelhullást megelőzően spirál alakban úszás, csonkolódott bajusz, vese táji bevérzés, hole-in-head betegségre utaló tünetek, a korábban említett necrosis és bakteriális fertőzés.

A herpesz- és papillómavírussal is fertőzött tíz hal közül öt tünetmentes volt, négy testén papillómaszerű epidermális elváltozásokat figyeltek meg, egy esetében az egyetlen rendellenesség az ivadékelhullás volt.

#### 4. Diskusszió

A lesőharcsa gazdasági és ökológiai szempontból is jelentős halfaj. Ahogy az emberiség igénye növekszik a hal, mint tápanyagforrás iránt, egyre nő a tenyésztett halak szerepe. Az intenzív akvakultúrák elterjedésével és azokban a tenyésztett halak abundanciájának növekedésével, a vírusos megbetegedések előfordulása is egyre gyakoribb lett. A lesőharcsa vírusainak átfogó ismerete segíthet ezen megbetegedések, járványok visszaszorításában.

A lesőharcsák hepreszvírusa több évtizede ismert, Békési és munkatársai 1984-ben írták le először, azonban ekkor még csak a hisztopatológiai tünetek, illetve a fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei kerültek publikálásra. [40] A molekuláris vizsgálatok csupán az elmúlt években kezdődtek, a kutatócsoportban, ahol a szakdolgozatomat készítettem. Ezen vizsgálatok nélkülözhetetlenek a vírus teljes megismeréséhez.

A lesőharcsákból egy éve kimutatott papillómavírus, új faj révén számos ismeretlen hatással lehet az akvakultúrákra. A halállományok stabilitását úgy tudjuk a legbiztosabban fenntartani, ha a halakat fertőző vírusok biológiáját ismerjük. Ennek része az új vírusok prevalenciájának felmérése. Ha a halállományokban nagymértékű fertőzöttséget tudunk kimutatni és jelentős károkat okoz az új vírus, akkor célszerű lehet vakcinafejlesztésbe kezdeni.

A halgazdaságokból származó mintákat herpesz-, papillóma-, circo- és iridovírusra teszteltem. Utóbbi két vírust egy mintából sem tudtam kimutatni, a herpesz- és papillómavírus viszont nagy arányban fordult elő, tünetmentes és különféle tüneteket mutató állatok is fertőzöttek bizonyultak. A továbbiakban a herpesz- és papillómavírus előfordulását, potenciális kapcsolódó tüneteit jellemzem.

Rétimajorból érkezett 25 mintából csak papillómavírust tudtam kimutatni, összesen 6 esetben. Ezek közül kettőnél tudunk tüneteket kapcsolni a vírusfertőzéshez: kopoltyúfedő szélén elhelyezkedő, szövetburjánzásból származó tumor; spirális vonalban úszás, circovírus tünetek által kísérve, majd ivadékelhullás. A hat papillómavírusra pozitív minta közül négy tünetmentes egyedekből származott, melyek közül egy egyed bár tünetmentes volt, tömeges ivadékelhullásban pusztult el. Hat olyan, ivadékelhullásból származó rétimajori mintát vizsgáltam, melynél az elhullás előtt a halak spirális vonalban úsztak, és a tünetek alapján feltehetően circovírusal lehettek fertőzöttek. [17] A vizsgálatok során ezen hipotézis



megdőlt: a hat mintából egy volt pozitív papillómavírusra, circovírus viszont egyikből sem volt kimutatható. Két olyan mintát is kaptunk ebből a halgazdaságból, amelyek szintén elhullásból származtak, de az állatok tünetmentesek voltak. Ezek egyikében sem fordultak elő a vizsgált vírusok.

A 17 hársasberki mintát vizsgálva ötből tudtam herpeszvírust és papillómavírust is kimutatni. Ezen felül volt 5 másik minta is, ami csak papillómavírusra mutatott pozitív eredményt. Két olyan, májeredetű minta érkezett, melynél az egyedek betegsége utaló tüneteket mutattak. Ez a két minta 50-60 cm nagyságú egyedekből származott, melyeket kórosan soványnak ítélték meg, testsúlyuk 1-1,5 kg közé esett. Ebből a két egyedből egyik vizsgált vírus sem volt kimutatható.

Dalmandról hét minta származott, ezekből a négy vizsgált vírus közül csak a papillómavírus volt kimutatható. A három papillómavírusra pozitív minta közül kettő tünetmentes egyedekből származott, egy minta pedig egy csonkolódott bajuszú egyed májából lett kinyerve. Volt egy másik ugyanilyen tüneteket mutató egyed is, amely viszont negatív volt papillómavírusra. Ez alapján nem tekinthetjük egyértelműen papillómavírus tünetének a csonkolódott bajuszt, elképzelhető, hogy a vírustól független az elváltozás.

Varsádról hat minta érkezett, ezek mindegyike pozitív volt herpeszvírusra, négyből pedig papillómavírust is kimutattam. A halak mindegyike a herpeszvírus-fertőzés klinikai tüneteit mutatta, illetve a bőrükön papillómaszerű elváltozások voltak megfigyelhetőek.

A Keszthelyről kapott hat minta közül öt esetében nem fordult elő a négy vizsgált vírus egyike sem, annak ellenére, hogy mind az öt állatban tumort találtak a boncolás során. A hatodik keszthelyi mintából papillómavírust mutattam ki, ezen az állaton hole-in-headre utaló jelek mutatkoztak és vesetáji bevezést lehetett megfigyelni. A Balaton más részéről érkezett három minta mind papillómavírussal volt fertőzött, egyből pedig emellett herpeszvírust is kimutattam. Az a minta, amelyikben mindkét vírus megtalálható volt, ivadékelhullás során elpusztult halból származott. A másik két, papillómavírusra pozitív minta tünetmentes lesőharcsákból való volt.

A tapolcai halgazdaságból származó három minta egyikéből herpeszvírust, egy másiktól papillómavírust mutattam ki, a harmadik negatív volt ezekre a vírusokra. Mindhárom minta azonos tüneteket mutató állatokból származott: a fej egyik oldalán és az azonos oldali mellúszó körül 4-5 cm-es sávban az intakt, de színvesztett bőr alatt az izom teljesen elhalt, légyszöveti gyulladás volt megfigyelhető, illetve fajilag nem beazonosított

bakteriális fertőzést mutattak ki a vizsgálatok. A bakteriális fertőzés bemeneti kapuja a fejtetői seb volt, innen a bőr alatti szövetekben terjedve emésztette fel a szöveteket a fertőzés.

Szarvasról kaptunk egy olyan egyedből származó máj mintát, aminek bőrén testszerte vérzéses gyűrűk voltak megfigyelhetők, ez a minta a négy vizsgált vírus mindegyikére negatívnak bizonyult.

Összességében elmondható, hogy tünetmentes és különféle tünetekkel rendelkező lesőharcsákból is kimutatható a herpesz- és papillómavírus. Egyes egyedek egy adott vírus tüneteit produkálva nem bizonyultak erre a vírusra pozitívnak, míg más halak tünetmentességük ellenére herpesz-, illetve papillómavírussal voltak fertőzöttek. A Rétimajorból származó, elpusztulásuk előtt spirál alakban úszó ivadékok közül - melyek a hipotézis szerint circovírussal fertőzöttek - egy esetben volt kimutatható papillómavírus, viszont circovírusra mindegyik negatívnak bizonyult. Azok a halak, melyek egyetlen tünete az alutápláltság volt, a vizsgált vírusok közül egyikkel sem voltak fertőzöttek. Ezen eredmények alapján az alutápláltság önmagában nem tünete a vizsgált vírusoknak. Az ivadékelhullás és spirál alakban úszás sem jelentette azt, hogy a vizsgált négy vírus közül egy (vagy több) fertőzte meg az állatokat, ezek között is számos egyed volt, amiből nem tudtam kimutatni a szóban forgó vírusokat.

Azon öt hal közül, melyek testén tumor fordult elő, egy volt bizonyítottan papillómavírussal fertőzött, ez alapján a tumort sem tekinthetjük a papillómavírus jellemző tüneteinek. Hasonlóképp a csonkolódott bajusz sem bizonyult a papillómavírus fertőzés biztos indikátorának, két egyedden figyelték meg ezt a tünetet, közülük egyből mutattam ki papillómavírust.

A kutatásom során nem sikerült tipikus tüneteket kapcsolni a lesőharcsa papillómavírusához. A jövőben sikeres vírusizolálás után állatkísérletek elvégzésével lehetséges lenne bizonyítani, hogy a papillómavírus okoz-e elhullást, illetve a fertőzést milyen tünetek kísérik.

Az irido- és herpeszvírusokat kísérő, Ahne és Békési által leírt magas mortalitásra a vizsgálataim során nem kaptam megerősítést, ám a kis elemszámú minta miatt cáfolni sem tudom a mortalitásra vonatkozó állításokat. [31, 40] Iridovírust egy mintából sem tudtam kimutatni, a herpeszvírussal fertőzött mintáknak pedig csak kis hányada származott ivadékelhullásból (a 13 pozitív mintából egy).

Egyes halfajok esetében már megfigyelték a kutatók, hogy a vírusaik előfordulása között szoros kapcsolat van, gyakran több vírus egyszerre fordul elő a fertőzött egyedekben. Ilyen összefüggést írtak le a *Lymphocystic disease virus* (LCDV) által okozott betegség és egy papillóma-, illetve egy poliómavírus között is. Az *Iridoviridae* család *Lymphocysticirus* nemzetségébe sorolt *Lymphocystic disease virus 1*-hez hasonló LCDV vizsgálata közben López-Bueno és munkatársai egy új papillómavírust és egy új poliómavírust fedeztek fel. Azt figyelték meg, hogy ezen új vírusok külön-külön, illetve együtt is gyakran fordulnak elő az LCDV okozta betegség tüneteit mutató aranydurbincs egyedekben. [10] Hasonlóképp Chinchar és munkatársai leírták az *Alloherpesviridae* családba sorolt *Ictalurid herpesvirus 1* és a *Reoviridae* családba tartozó, eddig pontosabban nem besorolt Channel catfish reovirus együtt való előfordulását pettyes harcsában (*Ictalurus punctatus*) és törpeharcsában (*Ameiurus nebulosus*) is. [50]

A lesőharcsa herpesz- és papillómavírusának előfordulása között is elképzelhető hasonló kapcsolat. A 68 vizsgált minta 19%-a mutatott pozitív eredményt a herpeszvírusra való tesztelés során, míg papillómavírus örökítőanyagot nagy hányaduk, 41%-uk tartalmazott. Egy korábbi tanulmány során herpeszvírus tüneteket produkáló lesőharcsákból mutattak ki papillómavírust, azonban ebben a tanulmányban nem került bizonyításra, hogy az újonnan felfedezett papillómavírus, a *Nunpapillomavirus siluri* és a lesőharcsák herpeszvírusának előfordulása között van-e összefüggés. A statisztikai számításaim alapján a herpesz- és papillómavírus előfordulása között szignifikáns összefüggés áll fent. Ha egy mintából herpeszvírust tudunk kimutatni, akkor szignifikánsan nagyobb valószínűséggel van benne papillómavírus örökítőanyag, mint a herpeszvírussal nem fertőzött mintákban. Ha pedig nem mutatható ki belőle herpeszvírus, akkor szignifikánsan kisebb valószínűséggel fertőzött papillómavírus által. Ez fordítva is igaz, ha nincs herpeszvírus egy mintában, akkor szignifikánsan kisebb valószínűséggel lesz benne papillómavírus, mint a herpeszvírussal fertőzött egyedekben és ha nincs benne papillómavírus, akkor szignifikánsan kisebb valószínűséggel fogunk tudni belőle herpeszvírust kimutatni. Ahhoz, hogy minden kétséget kizárólag igazoljuk a két vírus előfordulása közötti kapcsolatot, nagyobb mintaelemszámú vizsgálatok szükségesek. Azt azonban biztosan állíthatjuk, hogy a herpeszvírus és a papillómavírus jelen lehet egyidejűleg a lesőharcsában. [41]

## 5. Összefoglalás

A kutatásom során négy, lesőharcsákban bizonyítottan előforduló vírus jelenlétét vizsgáltam lesőharcsa-mintákban: herpeszvírus, papillómavírus, circovírus és iridovírus. A lesőharcsa herpeszvírusának jellemző tünete az epithelium papillómaszerű elváltozása, de herpeszvírust tünetmentes állatokból is mutattak ki korábban kutatók. Az újonnan leírt papillómavírus herpeszvírussal fertőzött, herpeszvírus-tüneteket produkáló lesőharcsákból, ezen túlmenően tünetmentes és egyéb tüneteket mutató állatokból is kimutatható volt. A circo- és iridovírusjárványokat gyakran a lesőharcsák tömeges elhullása, illetve a vérképzőszervek necrosis-a kíséri. A négy vírus hatásai a lesőharcsaállományokra kevésbé ismertek, így célul tűztem ki a vírusokhoz kapcsolható tünetek feltérképezését és a vírusok prevalenciájának meghatározását. Ezen ismeretek birtokában megelőzhetjük a járványok kialakulását, illetve hatékonyan kezelhetjük azokat.

A 2014 és 2021 közötti időszakból származó minták, magyarországi halgazdaságoktól érkeztek rutin bakteriológiai és parazitológiai vizsgálatokra, ezeket volt lehetőségem nekem is tanulmányozni. A vírusok kimutatását a DNS-extrakció után PCR-rel végeztem. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam, ami ez alapján pozitívnek tűnt, annak DNS-szekvenálással meghatároztam a nukleotidsorrendjét, majd a GenBankban található szekvenciákkal összevetve nyertem bizonyosságot arról, hogy az adott minta melyik vírus örökítőanyagát tartalmazza.

Circo-, illetve iridovírus egy mintában sem fordult elő annak ellenére, hogy voltak olyan halak, amik a circovírus jellegzetes tünetét produkálták. A papillómavírus gyakran nem okoz tüneteket, a tünetmentes egyedek esetében 52% volt a papillómavírus prevalenciája. A vizsgált minták 19%-ában herpeszvírus, 41%-ában pedig papillómavírus örökítőanyagot mutattam ki. A statisztikai elemzés során bizonyosságot nyert, hogy ezen vírusok előfordulása között szignifikáns kapcsolat áll fent.

## 6. Summary

My research was focused on four viruses that has been proven to infect wels catfish: herpesvirus, papillomavirus, circovirus and iridovirus. The typical symptoms of the herpesvirus of wels catfish are the papilloma-like lesions of the epithelium, but it was isolated from asymptomatic specimens as well. The novel papillomavirus was found in wels catfish showing clinical signs that are known to be connected to catfish herpesvirus disease. The epidemics of circovirus and iridovirus are often cause mass mortality events and the necrosis of hematopoietic organs of wels catfish. Effects of the four viruses on the wels catfish population are rather undiscovered hence the aims of my study were to identify the symptoms associated with the above-mentioned viruses and their prevalence. These pieces of information are essential for preventing and effectively handling epidemics.

The samples were provided by Hungarian fish farms between 2014 and 2021 and were sent to our institution for routine bacteriology and parasitology analysis. After the DNA extraction viruses were detected by PCR. The PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis and the positive PCR products were sequenced. The DNA sequences were compared against the sequences in the GenBank to determine which specimens were positive to either of the four viruses.

Neither circovirus nor iridovirus was present in any sample, although some of the fish showed the characteristic symptoms of circovirus. Papillomavirus frequently causes no clinical signs of infection as it has a prevalence of 52% among asymptomatic fish. Herpesvirus was detected in 19% and papillomavirus in 41% of the samples. Statistical analysis confirmed that there is a significant connection between the prevalence of these two viruses.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Pellet P, Davison A, Eberle R (2012) Family Alloherpesviridae. In: King A, Adams M, Carsten E (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Oxford, pp 108-110
2. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154:171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
3. Doszpoly A, Benkő M, Csaba G, Dán Á, Láng M, Harrach B (2011) Az Alloherpesviridae család bemutatása: pontyfélék herpeszvírusainak első molekuláris kimutatása Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 133:174–181
4. Sano T, Fukuda H, Furukawa M (1985) Herpesvirus cyprini: Biological and oncogenic properties. *Fish Pathol* 20:381–388. <https://doi.org/10.3147/jsfp.20.381>
5. Sano T, Morita N, Shima N, Akimoto M (1991) Herpesvirus cyprini: lethality and oncogenicity. *J Fish Diseases* 14:533–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00608.x>
6. Watson L, Yun S, Groff J, Hedrick R (1995) Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Dis Aquat Org* 22:199–210. <https://doi.org/10.3354/dao022199>
7. Hanson L, Dishon A, Kotler M (2011) Herpesviruses that Infect Fish. *Viruses* 3:2160–2191. <https://doi.org/10.3390/v3112160>
8. Waltzek T, Kelley G, Alfaro M, Kurobe T, Davison A, Hedrick R (2009) Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis Aquat Org* 84:179–194. <https://doi.org/10.3354/dao02023>
9. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard H-U, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, ICTV Report Consortium (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology* 99:989–990. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>
10. López-Bueno A, Mavian C, Labella AM, Castro D, Borrego JJ, Alcami A, Alejo A (2016) Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *J Virol* 90:8768–8779. <https://doi.org/10.1128/JVI.01369-16>
11. Kraberger S, Austin C, Farkas K, Desvignes T, Postlethwait JH, Fontenele RS, Schmidlin K, Bradley RW, Warzybok P, Van Doorslaer K, Davison W, Buck CB, Varsani A (2022) Discovery of novel fish papillomaviruses: From the Antarctic to the commercial fish market. *Virology* 565:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.10.0071>.
12. Rector A, Van Ranst M (2013) Animal papillomaviruses. *Virology* 445:213–223. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.007>

13. Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, Abramson AL (1983) Laryngeal Papillomavirus Infection during Clinical Remission. *N Engl J Med* 308:1261–1264. <https://doi.org/10.1056/NEJM198305263082104>
14. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *Journal of General Virology* 98:1997–1998. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000871>
15. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango J-BN, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E (2010) Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. *J Virol* 84:1674–1682. <https://doi.org/10.1128/JVI.02109-09>
16. Lőrincz M, Cságola A, Farkas SL, Székely C, Tuboly T (2011) First detection and analysis of a fish circovirus. *Journal of General Virology* 92:1817–1821. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031344-0>
17. Lőrincz M, Dán Á, Láng M, Csaba G, Tóth ÁG, Székely C, Cságola A, Tuboly T (2012) Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*). *Arch Virol* 157:1173–1176. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1291-1>
18. Doszpoly A, Tarján Z, Glávits R, Müller T, Benkő M (2014) Full genome sequence of a novel circo-like virus detected in an adult European eel *Anguilla anguilla* showing signs of cauliflower disease. *Dis Aquat Org* 109:107–115. <https://doi.org/10.3354/dao02730>
19. Borzák R, Sellyei B, Székely C, Doszpoly A (2017) Molecular detection and genome analysis of circoviruses of European eel (*Anguilla anguilla*) and sichel (*Pelecus cultratus*). *Acta Veterinaria Hungarica* 65:262–277. <https://doi.org/10.1556/004.2017.026>
20. Pass DA, Perry RA (1984) The pathology of psittacine beak and feather disease. *Australian Vet J* 61:69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1984.tb15520.x>
21. Todd D, McNulty MS, Adair BM, Allan GM (2001) Animal circoviruses. In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp 1–70
22. Allan GM, Ellis JA (2000) Porcine Circoviruses: A Review. *J VET Diagn Invest* 12:3–14. <https://doi.org/10.1177/104063870001200102>
23. Opriessnig T, Meng X-J, Halbur PG (2007) Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. *J VET Diagn Invest* 19:591–615. <https://doi.org/10.1177/104063870701900601>
24. Ramamoorthy S, Meng X-J (2009) Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev* 10:1–20. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001461>

25. Chinchar VG, Hick P, Ince IA, Jancovich JK, Marschang R, Qin Q, Subramaniam K, Waltzek TB, Whittington R, Williams T, Zhang Q-Y, ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology* 98:890–891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
26. Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T (2009) Family Iridoviridae: Poor Viral Relations No Longer. In: Van Etten JL (ed) *Lesser Known Large dsDNA Viruses*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 123–170
27. Moody N, Owens L (1994) Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, Bohle iridovirus, for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Dis Aquat Org* 18:95–102. <https://doi.org/10.3354/dao018095>
28. (2021) International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The ICTV report on virus classification and taxon nomenclature, Iridoviridae, Ranavirus [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/dsdna-viruses/w/iridoviridae/616/genus-ranavirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/iridoviridae/616/genus-ranavirus) Accessed 10 April 2021.
29. Langdon JS, Humphrey JD (1987) Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *J Fish Diseases* 10:289–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb01073.x>
30. Pozet F, Morand M, Moussa A, Torhy C, de Kinkelin P (1992) Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish *Ictalurus melas*. *Dis Aquat Org* 14:35–42. <https://doi.org/10.3354/dao014035>
31. Ahne W, Schlotfeldt HJ, Thomsen I (1989) Fish Viruses: Isolation of an Icosahedral Cytoplasmic Deoxyribovirus from Sheatfish (*Silurus glanis*). *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 36:333–336. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00611.x>
32. Bloch B, Larsen J (1993) An indovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis Aquat Org* 15:235–240. <https://doi.org/10.3354/dao015235>
33. Tapiovaara H, Olesen N, Lindén J, Rimaila-Pärnänen E, von Bonsdorff C (1998) Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis Aquat Org* 32:185–193. <https://doi.org/10.3354/dao032185>
34. Williams T, Barbosa-Solomieu V, Chinchar VG (2005) A Decade of Advances in Iridovirus Research. In: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp 173–248
35. Price SJ, Ariel E, Maclaine A, Rosa GM, Gray MJ, Brunner JL, Garner TWJ (2017) From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. *Virology* 511:272–279. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.001>
36. Herman O (1887) *A Magyar Halászat Könyve (The Book of Hungarian Fisheries)*. A.K.M. Természettudományi Társulat, Budapest, Hungary, p 355



37. Estes JA, Terborgh J, Brashares JS, Power ME, Berger J, Bond WJ, Carpenter SR, Essington TE, Holt RD, Jackson JBC, Marquis RJ, Oksanen L, Oksanen T, Paine RT, Pikitch EK, Ripple WJ, Sandin SA, Scheffer M, Schoener TW, Shurin JB, Sinclair ARE, Soulé ME, Virtanen R, Wardle DA (2011) Trophic Downgrading of Planet Earth. *Science* 333:301–306. <https://doi.org/10.1126/science.1205106>
38. Martin J, Poli J, Petillot F (1995) Etude des composantes de la qualité de la chair du silure glane (*Silurus glanis* L.). 1. Examens physicochimiques et rhéologiques. *La pisciculture française* 121:33–45
39. Proteau J, Schlumberger O, Albiges C (1993) Catfish and pike-perch. *Aqua revue* 47:17–26
40. Békési L, Kovács-Gayer É, Rátz F, Turkovics O (1984) Skin infection of the sheatfish (*Silurus glanis* L.) caused by a herpes virus. *Symp Biol Hung* 25–30
41. Surján A, Fónagy E, Eszterbauer E, Harrach B, Doszpoly A (2021) Complete genome sequence of a novel fish papillomavirus detected in farmed wels catfish (*Silurus glanis*). *Arch Virol* 166:2603–2606. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05123-w>
42. Sano M, Nakai T, Fijan N (2011) Viral diseases and agents of warmwater fish. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders*, 2nd ed. CABI Pub, Wallingford, UK, pp 167–244
43. Ogawa M, Ahne W, Fischer-Scherl T, Hoffmann R, Schlotfeldt H (1990) Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent. *Dis Aquat Org* 9:187–191. <https://doi.org/10.3354/dao009187>
44. Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Volatier C, Terech-Majewska E (1999) Effects of iridovirus-like agent on the cell-mediated immunity in sheatfish (*Silurus glanis*)—an in vitro study. *Virus Research* 63:115–119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00064-7)
45. Ohlemeyer S, Holopainen R, Tapiovaara H, Bergmann S, Schütze H (2011) Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV. *Dis Aquat Org* 96:195–207. <https://doi.org/10.3354/dao02370>
46. Halami MY, Nieper H, Müller H, Johne R (2008) Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research* 132:208–212. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.001>
47. Hall T (1999) Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/ Nt. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
48. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

49. Staden R (1996) The staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:233–241. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>
50. Chinchar VG, Logue O, Antao A, Chinchar GD (1998) Channel catfish reovirus (CRV) inhibits replication of channel catfish herpesvirus (CCV) by two distinct mechanisms: viral interference and induction of an anti-viral factor. *Dis Aquat Organ* 33:77–85. <https://doi.org/10.3354/dao033077>

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Doszpoly Andornak a rengeteg segítséget, magyarázatot és támogatást, amivel a szakdolgozatom elkészüléséhez hozzájárult.

A laboratórium minden dolgozójának köszönettel tartozom, hogy segítőkészségüknek és kedvességüknek hála kellemes légkörben teltek számomra a laboratóriumban töltött hónapok.

Köszönöm szüleimnek és testvéreimnek, hogy bátorítottak, támogattak a tanulmányaim alatt és köszönöm páromnak, Dánielnek a végtelen türelmét, amivel a szakdolgozatom készítése alatt fordult felém.

Alulírott Dr Doszpoly Andor Igazolom, hogy Fónagy Eszter Hazai lesőharcsa (*Silurus glanis*) állományok DNS-vírusainak kimutatása és jellemzése című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2022.04.27.



a témavezető neve és aláírása

Dr Doszpoly Andor

Állatorvostudományi Kutatóintézet

tanszék