

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Magyarországon előforduló kutya szopornyica vírusok
molekuláris biológiai vizsgálata**

Készítette: Losonczy Alexandra

Témavezető: Dr. Cságola Attila

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2015

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés	2
II.	Irodalmi áttekintés.....	3
III.	Anyagok és módszerek.....	9
A.	Minták	9
B.	Nukleinsav kivonás	12
C.	Reverz transzkripció, PCR, szekvenálás	13
D.	Szekvencia analízis, filogenetika	14
IV.	Eredmények.....	15
V.	Megbeszélés.....	25
VI.	Összefoglaló	29
VII.	Summary	30
VIII.	Irodalomjegyzék.....	31

I. Bevezetés

A szopornyica vírus már az 1760-as évektől kezdve ismert kórokozó, amely a vakcinák megjelenése előtt országokon át terjedő járványokat okozott. Az oltások hatására a tömeges megbetegedések megszűntek, mára csak sporadikusan fordul elő. Az utóbbi években vakcinázott állatokban is megjelent a nagy fertőzőképességgel, gyakran fatális kimenetellel bíró szisztémás megbetegedéseket okozó vírus. Régebben kizárólag a ragadozók (Carnivores) betegségének tekintették, de a vizsgálatok alapján már sokféle fajban megtalálták, köztük a nem emberszabású majmokban is.

Hatékony, specifikus kezelés a mai napig nincs ellene, csak tünetileg, az immunrendszer és a szervezet támogatásával (folyadékterápia, antibiotikum kezelés) lehetséges. De ennek költsége nagyon magas, és eredményessége kétséges. Ezért inkább a betegség megelőzésére kell fektetni a hangsúlyt, ez pedig a vakcinázás.

A rendszeres vakcinázás hatására a vírusok antigén-szerkezete megváltozik, így a korábban hatékonyan működő vakcinák hatása gyengül. A minél hatásosabb védekezés érdekében szükséges a terjedő vírusok antigén-szerkezetének ismerete. A kórokozó nukleinsav szekvenciája napjainkban könnyen meghatározható molekuláris genetikai vizsgálatokkal, amiből következtethetünk aminosav sorrendjére is. A nukleinsav és aminosav szekvenciák összehasonlításával, elemzésével gond nélkül meghatározható a vírus evolúciója, a különböző mutációk.

Dolgozatomban a hazai és más országokban kimutatott szopornyica vírusok genetikai vizsgálatával, genetikai változékonyságával és ezek lehetséges következményeivel foglalkoztunk. A vírust gyors változékonysága miatt érdemes figyelemmel kísérni, esetleg a jövőbeli emberi megbetegedések elkerülése végett.

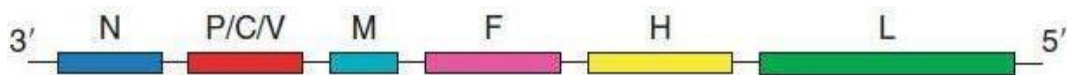
II. Irodalmi áttekintés

A szopornyica vírus nem egy újonnan felfedezett vírus. 1761-ben Ulloa volt az első szerző, aki megfogalmazta a szopornyica klinikai és járványügyi jelentőségeit (Kirk, 1922). 1905-ben Carré írta le először önálló kórokozónak és nevezte el Carré-betegségnek (Kirk, 1922). 1906-ban Lignieres meg is erősítette (Kirk, 1922). De 1911-ben McGowan, 1912-ben Ferry és 1913-ban Torrey és Rahe megcáfolták Carré állítását (Kirk, 1922). Ők nem a szopornyicát tekintették elsődleges kórokozónak, hanem a *Bordatella bronchiseptica* baktériumot tették felelősnek a tünetek kialakulásáért (Kirk, 1922).

1923-ban Puntoni fejlesztette ki az első sikeresen alkalmazott vakcinát, amelynek előállításánál kutyáknak intracerebrálisan bejuttatta a vírust, majd formalin-inaktivált agyszövetből készítette el az oltóanyagot (Appel és Gillespie, 1972). 1930-ban Laidlaw megfigyelte, hogy az inaktivált vakcina nem ad tartós védelmet, ezért egy inaktivált vakcina sorozat után, élő, virulens vakcinával fertőzték őket, így kialakult a megfelelő immunitás, de néhány állat elpusztult közben (Appel és Gillespie, 1972). 1952-ben Cabasso és Cox munkája folyamán a Lederle törzsből, majd 1956-ban Haig fejlesztett ki az Onderstepoort törzsből az oltóanyagot (Soós és Tuboly, 2009). A Lederle vakcinát embrionált tyúktojáson passzált vírustól állították elő (Appel és Gillespie, 1972). Ebben az időszakban, Svédországban egy szopornyica járvány ütötte fel a fejét, amely megfertőzött vakcinázott és nem vakcinázott kutyákat is. A mai nevén Rockborn törzset az egyik svéd kutyának a vesesejtjeiből izolálták, majd attenuálták a vírust. 1962-től nagyon elterjedt vakcinává vált, de a piacvezető szerepét elvesztette 1980-ban, mert felmerült a gyanú, hogy a vakcinázott kutyákban encephalitis alakult ki az oltóanyagból (Martella és mtsai, 2011).

A canine distemper vírus (CDV) jelenleg rendszertanilag a *Mononegavirales* rend *Paramyxoviridae* családjának *Paramyxovirinae* alcsaládjába tartozó, nagyméretű, világszerte sporadikusan előforduló RNS vírus. A *Paramyxovirinae* családon belül a *Morbillivirus* nemzetséghez tartozik. A nemzetséghez tartozó vírusok: a kanyaró vírusa (Measles virus), kiskérődzők pestise vírus (peste des petitis ruminants virus), keleti marhavész vírusa (rinderpest vírus), foka morbillivírusa (phocine distemper virus) és a cetek morbillivírusa (cetacean morbillivirus) (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>).

A CDV egy nem szegmentált, szimplaszálú RNS vírus, átmérője körülbelül 150-300 nm nagyságú (Murphy és mtsai., 1999). Burkos vírus, melynek helikális szimmetriájú capsidjában foglal helyet az 15690 bázisból felépülő RNS szál (Tan és mtsai, 2011). A szopornyica vírusnak 6 strukturális- (hemagglutinin (H), fúziós (F), nucleocapsid (N), phosphoprotein (P), polimeráz (L) és mátrix (M) és 2 nem strukturális fehérjéje van. A 3' végétől indulva N→P→M→F→H→L végződik az 5' végén (Woma és mtsai, 2010) (1. ábra).



1. ábra: Morbillivírusok génsorrendje (Mahy és Regenmortel, 2008)

A H gén a legnagyobb genetikai változékonyságot mutató gén (Lan és mtsai, 2005). Néhány szopornyicavírus a H gén 607 aminosavja helyett csak 604 aminosav látható, mert az utolsó 3 aminosav hiányzik. Ez a rész felelős a glikolizisért (Lan és mtsai, 2005, Ke és mtsai, 2015). A fő szerepe a gazdasejtbe történő kötődésben van, amelyet az 530. és 549. pozícióban jelenlévő aminosav befolyásol (Ke és mtsai, 2015). Ezenkívül a gazdaszervezet védekezőképességében is szerepet játszik (Techangamsuwan és mtsai, 2014).

Jelen ismereteink alapján a CDV a fehérvérsejtek felszínén megjelenő SLAM-hoz (signaling lymphocyte activation molecule) kapcsolódva jut a sejtbe (Seki és mtsai., 2003). Ezek a molekulák az aktivált T- és B-limfociták, makrofágok és dendritikus sejtek felszínén jelennek meg. A CDV a nectin-4-hez, egy epitheliális sejteken megjelenő receptorhoz is képes kötődni, ezáltal hámsejteket fertőzni (Noyce és mtsai, 2013).

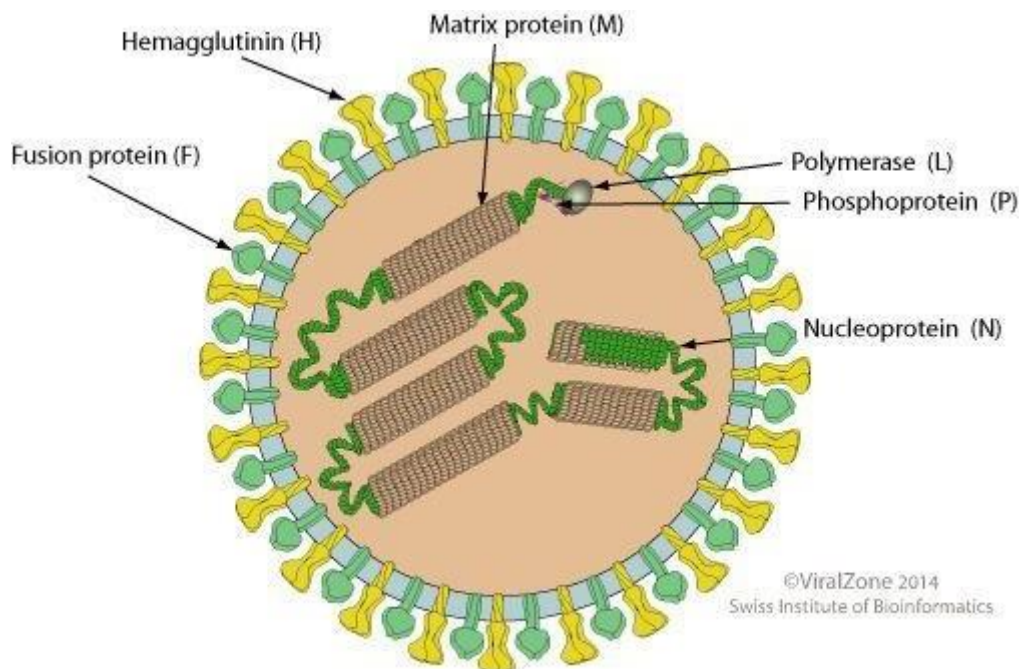
Az F gén felelős a gazdasejtbe történő bejutásért, illetve egyik gazdasejtből a másikba történő átjutásért (Sattler és mtsai, 2014). Az F gén 662 aminosavból áll, amely egy Fsp (pre-signal fehérjét), egy F1 és F2 alegységből tevődik össze (Chulakasian és mtsai, 2010).

Az N gén a virális RNS védelmében játszik szerepet, egy capsid réteget képez körülötte (Simon-Martinez és mtsai, 2008). A translatio és transcriptio folyamatában is részt vesz (Mahy és Regenmortel, 2008).

Az M fehérje a vírus fő strukturális eleme, és fontos a morphogenesis kialakításában (Mahy és Regenmortel, 2008). Szerepet játszik a gazdasejtbe történő belépés során (Pardo és mtsai, 2005).

A P gén fő szerepe a transcriptioban és a replicatioban van (MacLachlan és Dubovi, 2011). Az N és P fehérjék aránya befolyásolja, hogy RNS transcriptio vagy replicatio történjen (Mahy és Regenmortel, 2008).

A polimeráz (L) fehérje a legnagyobb. Az N és P fehérjével közösen egy N komplexet alkotnak. A komplex az RNS polimeráz főbb enzimatis aktivitásáért felelős, a transcriptiót és replicatiót hajtja végre, beleértve a cappinget és a polyadenilációt is (MacLachlan és Dubovi, 2011) (2. ábra).



2. ábra: A Morbillivírus nemzetség vírusmodellje (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/86.html)

A szopornyica vírus széles körben fertőz meg különböző fajokat, és bennük más és más tüneteket okoz. Főleg a Canidae, Felidae, Procyonidae, Ursidae, Viveridae, Hyaenidae, Ailuridae, Phocidae családhoz tartozó fajokat betegíti meg. A Procyonidae családból a mosómedvét, farksodrókat, *Bassariscus*-fajokat lehet kiemelni. Az Ailuridae családból a vörös macskamedvét és a Viveridae családból a mongúzfélek, szurikáták, tigrispetymegformák, binturongok, közönséges petymegek (Rentería-Solís és mtsai, 2014) fogékonyak.

A Mustelidae családból a menyétekben, gőrényekben, nyérceken, borzokban, hermelinokban, nyestekben, vidrákban okozta megbetegedéseket (Pardo és mtsai, 2005). A Hyaenidae családból a hiénákat, az Ursidae családból a medvéket, ormányos medvéket, pandákat, a Felidae családból az oroszlánokat, tigriseket fertőzi meg. A Canidae családhoz tartozó kutyákat, dingókat, rókákat, prérifarkasokat, farkasokat és sakálokat betegíti meg (Appel és Gillepsie, 1972). 1991-1992 között egy észak-amerikai állatkert tigrisei (*Panthera tigris*), leopárdjai (*Panthera pardus*) és jaguárjai (*Panthera onca*) fertőződtek meg szopornyica vírussal (Appel és mtsai, 1994; Suzuki és mtsai, 2015). 1994- ben a tanzániai Serengeti Nemzeti Parkban az oroszlánokban (*Panthera tigris*) okozott megbetegedést (Roelke-Parker és mtsai, 1996; Suzuki és mtsai, 2015). A nemrégiben rhesus majmokban (*Macaca mulatta*) (Sun és mtsai, 2010; Qiu és mtsai, 2011; Rentería-Solís és mtsai, 2014), Japán makákókban (*Macaca fuscata*) és közönséges makákókban (*Macaca fascicularis*) történő megbetegedéseket írtak le (Sakai és mtsai, 2013).

Az állatok fertőződhetnek közvetlen érintkezéssel, orrváladékkal, vizelettel, cseppfertőzéssel, szájon át (fertőzött étellel) és intrauterin módon egyaránt. A szopornyica lappangási ideje 1 és 4 hét közé tehető. A fertőződés után 3-6 nappal egy átmeneti, bifázisos lázas állapot jelentkezhet, amikor a vírus a lymphoid szervekben továbbterjed (Noyce és mtsai, 2013).

A CDV kórfejlődésének újabb ismereteit Lempp és mtsai. (2014) foglalta össze. A vírus az oronasalis fertőzést követően a légutak, légzőszervek lymphoid szöveteiben, főleg a macrophagokban található, amely sejtek a mandulába és a bronchiális nyirokcsomókba vándorolnak. Ezekből a primer replicációs helyekből a CDV bekerül a véráramba, elsődleges viraemiát okoz, és eljut az összes lymphoid és hemopoetikus szervbe és szövetbe, mint a lép, thymus, csontvelő, nyirokcsomók valamint a nyálkahártya asszociált lymphoid szövetek (mucosa-associated lymphatic tissues MALT). A CDV fehérvérsejtekben történő szaporodása lymphopeniát, ebből következően immunszuppressziót okoz a fertőzött állatban, aminek következtében könnyebben kialakulhat másodlagos bakteriális fertőződés. A fertőzés kimenetele nagymértékben függ a CDV virulenciájától, az állat korától és immunstátuszától. A hiányzó vagy elégtelen humorális immunválasz esetén egy másodlagos viraemia alakul ki. A másodlagos viraemia során a CDV eljut az epitheliális és mesenchymális sejtekbe, szövetekbe, mint a központi idegrendszer és az epitheliális sejtek, köztük a bronchiális és gastrointestinalis mucosa hámsajtjai (Lempp és mtsai, 2014). A központi idegrendszer elsődlegesen hematogén úton fertőződhet (Green és Appel, 2006).

A szopornyica vírus okozhat akut és krónikus megbetegedést is. Akut fertőzés során főleg gastrointestinális-, légzőszervi- és neurológiai tüneteket mutatnak a kutyák. A gyomor-bélrendszer bántalmak közül leggyakrabban hányás és hasmenés jelentkezik, ami lehet véres is. Ebből adódóan az állatok dehidráltak, lesóványodnak, étvágytalanok, kedvetlenek (Techangamsuwan és mtsai, 2014). A légzőszervi tünetek közül leggyakrabban rhinitis, conjunctivitis, pulmonaris congestio, tüdőgyulladás (Pardo és mtsai, 2005), köhögés, bronchitis és tonsillitis figyelhető meg (Tan és mtsai, 2011). A bőrön vesiculáris és pustuláris dermatitis is jelentkezhet (Greene és Appel, 2006). A szem elváltozásai között szerepel a chorioiditis, retina degeneratio, necrosis és a vakság (Demeter, 2010). Idegrendszeri tünetek akut és krónikus fertőzés esetén is kialakulhatnak. Neurológiai tünetek közül ismétlődő epilepsziás rohamok, myoclonus (Techangamsuwan és mtsai, 2014), nystagmus, ataxia, tetraplegia és tetraparesis (Amude és mtsai, 2007), tic, dysbasia (Shin és mtsai, 1995) fej oldaltartás, koordinációs zavarok, facialis ideg bénulása észlelhető (Kabakci és mtsai, 2004). A túlélő állatokban az orron és talppárnákon hyperkeratosis (hard pad) jelentkezik. Intrauterin fertőzés esetén lehetséges halvaszületés, vetélés, gyenge, életképtelen és idegrendszeri tüneteket mutató kölykök (Nelson és mtsai, 1999). Az újszülött állatok fertőződése során zománc és dentin hypoplasia, oligodontia és részleges erupció tud kialakulni (Pardo és mtsai, 2006).

Kórbonctani vizsgálat során dehidráció, az orrban és szemben mucopurulens váladék látható. A fogakon zománc hypoplasia, az orr és talppárnákon hyperkeratosis, thymus atrophia és generalizált lymphadenopathia fordulhat elő. Serosus, catarrhalis vagy purulens pharyngitis és tracheitis figyelhető meg. Tüdőödéma, interstitialis pneumonia is gyakori elváltozás. Amennyiben másodlagos bakteriális fertőződés is bekövetkezett, bronchopneumonia is észlelhető. A hurutos bélgyulladás mellett megfigyelhető a Peyers-plakkok depletiója is (Beineke és mtsai, 2009).

Kórszövettani vizsgálattal gliosis; intracellulárisan és intracytoplasmatikusan a neuronokban, astrocytáknak és gitter sejtekben zárványok láthatóak. Nem-gennyes encephalitis, ami gyakran a kisagy fehérállományának demyelinizációjával és necrosisával jár. Előfordult acanthosis, parakeratikus hyperkeratosis, szőrtüszők necrosis, a bronchialis epitheliumban syncytialis sejtek fordultak elő. A felsőbb légutakban nagymennyiségű, elhalt törmelék, fibrin kiválás is megfigyelhető. A lymphoid szervek (thymus, lép, nyirokcsomók) depletiója és necrosis fedezhető fel. (McInnes és mtsai, 1992; Lan és mtsai, 2006; Pardo és mtsai, 2005, Techangamsuwan és mtsai, 2014). Az epithel sejtekben (tüdő, vesemedence,

gyomor, húgyhólyag, kötőhártya, agy, lép) 2-5 µm átmérőjű citoplazmazárványok találhatóak, amelyek diagnosztikai értékkel is bírnak (Dobos-Kovács, 1975; Pardo és mtsai, 2005), de egészséges állatokban is előfordulhatnak, így kizárólag kórszövettani vizsgálatokra nem lehet hagyatkozni. Mikroszkópos vizsgálatok során a fertőzött állatokban megfigyelhetőek óriássejtek a különböző szövettípusokban (Green és Appel, 2006).

Diagnózis felállítása nem egyszerű. A kórelőzményi adatok, fizikális vizsgálat elvégzése után további kiegészítő vizsgálatokra van szükség. Ide tartoznak a röntgen-, UH-, és laboratóriumi vizsgálatok (vérvizsgálat, RT-PCR (reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), immunfluoreszcencia). Immunológiai módszerekkel (ELISA, direkt és indirekt immunfluoreszcencia stb.) a fertőzés után 5-21 nappal lehet kimutatni, de a módszerek korlátozottsága miatt fals pozitív eredményhez (Ettinger és Feldman, 2005). Az idegrendszeri tüneteket mutató CD vírussal fertőzött állatokban a szérum IgG és albumin hányadosa magas (Ettinger és Feldman, 2005).

A megbetegedett állatok kezelésének eredményessége nagyon kétséges. Nagyon függ az állat immunstátuszától, a vírustörzstől, az állat életkorától (Maclachlan és Dubovi, 2011). A legjobb kezelési módszer a megelőzés. Ez a forgalomban lévő széles választékban rendelkezésre álló élő, attenuált vakcinákkal lehetséges (Maclachlan és Dubovi, 2011).

A szopornyica vírusok H gén alapján 7 fő csoportra oszthatóak, úgy mint Amerika-1, Amerika-2, Ázsia-1, Ázsia-2, Európa, Európa vadvilága és Arctic (Demeter és mtsai, 2010).

Munkánk során a szopornyica vírusok genetikai változékonyságával foglalkoztunk hazai és más országokban kimutatott vírusok viszonylatában, illetve ezek lehetséges következményeivel.

III. Anyagok és módszerek

A. Minták

Munkánk során Magyarország különböző területeiről, kutyákból vett kilenc darab vizelet- és egy darab szervmintákkal dolgoztunk. Ezen mintákat 2012 és 2014 között a Patológia Tanszékre küldték be, és diagnosztikai PCR vizsgálattal mindegyik pozitívnak bizonyult. A pozitív mintákat saját primereinkkel is leellenőriztük. Az állatok életkora nagyon változó volt, 4 hónapos és 8 és fél éves között.

1-es számú 1,5 éves, keverék szuka kiskunfélegyházi származású kutya. Kombinált oltásokat kapott. Kullancs volt benne, és helyi állatorvos kezelte. A klinikára történő megérkezésekor bágyadt, kicsit dehidrált, száraz szájnyálkahártyákkal rendelkezett, de icterus jelei nem voltak láthatóak. 39,5°C testhőmérsékletű volt. A szemében és orrában gennyes jellegű váladék található. A hastapintása nem volt fájdalmas. Másnapra a nehezített légzése fokozódott, így Augmentin, Bisolvon kezelést kapott. 30 perccel az Augmentin beadást követően az alsó szemhéja feldagadt, a hasán csalánkiütés jelent meg. A szopornyica PCR tesztje pozitív lett. Másnap rossz általános állapot, a szájnyálkahártyák halvány rózsavörösek, a kapilláris újratelődés ideje 2,5 másodperc volt és magas láza (40,6°C) volt. Enyhén gennyes conjunctivitis. Súlyos fokú tachypnoe, dyspnoe, vegyes típusú dyspnoe volt tapasztalható. A pulzusa 65/ perc, erős, aritmiás, AV-blokk jellegű, pulzusdeficit nem volt észlelhető. A sav-bázis vizsgálat enyhe dekompenzált respirációs acidosist és enyhe hypokalaemiát mutatott. Másnap éjszaka a légzése romlott, fulladt. Nem volt lázas. Tachypnoe és dyspnoe volt megfigyelhető. Mellkas röntgen súlyos pneumoniát jelzett. Reggelre az állapota romlott, agonizált. A tulajdonos kérésére a kutyát elaltatták.

2-es számú kutya 8 és fél éves keverék szuka, 1 hónapot töltött a menhelyen, 5 kutyával egy kennelben. Előtte nap este hozták el, tünetmentesen. Veszetség oltást évente kapott, kombinált oltása nem volt. Az 5 kutya közül az egyik, 12 évesen váratlanul elpusztult, ismeretlen okok miatt. A menhelyről elhozott állat másnapra kedvetlenné vált, nem ivott, nem evett. A szeméből és orrából gennyes váladék ürült, köhögött és tüszөгött és hőemelkedéssel érkezett a klinikára. A vizeletminta PCR vizsgálattal pozitív lett, eutanáziát végeztek el.

3-as számú magyar vizsla egy 1,5 éves féreghajtott, veszetség és kombinált oltással rendelkező szuka kutya. 3 hónappal a klinikán történő megjelenése előtt került gazdájához,

erdőszéli kertés házba, Tápiószecsőre. Társát, 1 hónappal előtte fogadták be, egy 5 hónapos oltatlan kölyökkutyát, aki 5 napja pusztult el invaginatio és pneumonia miatt. Az örökbefogadáskor kezdődtek a vizsla tünetei is. A vizsgálatkor az ínye és a kötőhártyája gyulladt volt, köhögés gyakran jelentkezett. A tulajdonos elmondása szerint napszakhoz nem volt köthető, korábban nedves, majd fokozatosan száraz köhögéssé vált. A marja és jobb mellső lába ödémás volt, szemét vakarta. Előtte nap este hányt. A klinikára történő érkezéskor a testhőmérséklete 39,3°C, alulfejlett, korpázó bundájú volt. A jobb bordaív mentén borsónyi bőr alatti csomó volt tapintható, amely nem volt fájdalmas és a környezetétől jól elmozdítható. A tulajdonos elmondása szerint nem kapott erre a területre injekciót. Könnyen megköhögthető volt, amely kissé nedves, nem csattanó. Enyhén felerősödött kilégzési dyspnoe és légeső feletti stridor volt tapasztalható. Mellkas felett intenzív bronchiális zörejek. A pulzusa 96/perc, erős ritmusos. A has tapintásakor fájdalmat jelzett. A szemnél súlyos fokú blepharitist, előesett harmadik szemhéjat és zöldes, gennyes, tapadós váladékot lehetett észlelni. 2 nappal később a köhögés megszűnt, de a gyógyszer kihányta. A hátán új duzzanat jelent meg. A nyak merev, érintésre fájdalommal reagál. Másnap 39°C testhőmérsékletű, a rectumban pépes, közepesbarna színű bélsár található. Következő nap 38,3 °C testhőmérsékletű, 102/perc a pulzus, kapilláris újratelődés ideje 2,5 s, 5%-os dehidráltság. A szeméből még mindig zöldes, tapadós váladék ürült. Blepharospasmus és chemosis volt látható. 4 nappal később a PCR eredménye megérkezett, amely pozitív eredményt adott szopornyica vírusfertőzöttségre. 6 nappal később az állapota javult, már nem hányt, hízott, de hasmenése még többször is van egy nap. Két nappal később a szeme meggyógyult, kicsit hunyorgott. Jó étvágyal evett. A hasmenése véres, tenesmus lépett fel. Az anus kipirult, a rectumban világosbarna pépes bélsár volt. A fej bőrén enyhe hyperaesthesia volt megfigyelhető.

4-es számú kutya egy 4 hónapos, 2,2 kilogrammos keverék szuka. A tulajdonoshoz 2 hónappal ezelőtt került az Illatos úti menhelyről. Egyedül tartott, lakásban tartott, sétálni sem viszik ki az utcára. Méreganyagokhoz nem tudott hozzáférni. Tápot nem szereti, főtt csirkehúst, rizst és kefirt kapott enni. A menhelyre vissza kellett vinni, mert hányt, étvágytalan és hasmenése volt. Azóta kétnaponta levert, hányt. A klinikára történő behozatal előtt 20 perccel etették meg, miután a szája habozni kezdett, és dezorientálttá vált, a falnak nekiment. A vizsgálatkor remeget, szája továbbra is habos volt. Jobbra tartó körmozgást végzett. A testhőmérséklete 39,1°C volt. Rossz általános állapotú, lesóványodott, dehidratált állapotba hozták be. A fizikális vizsgálat idejére elmúlt a nyálzás, a dezorientáció és a

körmozgás. Tompult tudatú, szimmetrikus, fényre szűkülő pupillákat lehetett látni. A hasüregben diffúzan kortyogó belek voltak tapinthatóak. A bélsár kenőcsös, sárgás volt. A kórházba történő felvételt követően az állkapocsra és a fülre 1 percig tartó myoclonusos epizódok jöttek rá, amelyek mellett a mellső lábak spasztikusak voltak. A hasi ultrahang lelete negatív lett. A vérvizsgálata során alacsony vörösvérsejt számot (5,04T/l, normális:5,5-8,5T/l között), alacsony hemoglobin szint (94 g/l, normális: 120-180g/l között). A szopornyica PCR pozitív eredményt adott. Másnap már tünetmentes volt, érdeklődő, játékos, ezért hazaadásra került. Az állat további sorsáról több információ nem áll rendelkezésünkre.

6-os számú pulit 1 hónappal a klinikán történő megjelenés előtt hozták el a makói menhelyről, 1 veszettség oltást kapott. A menhelyről történő hazavitel után pár napig tünetmentes volt, majd a nyakán, dorsalisán diónyi méretű tályog jelent meg, a tünetek a tályog megnyitása után kezdődtek. Kedvetlenné, étvágytalanná vált és lesóványodott (BSC 1/5). Vizsgálatkor csökkent bőrturgor, beesett szemek voltak tapasztalhatóak. Az orrtükrök száraz, cserepes. A szőre ápolat, az izomzata sorvadt, a fogain fogkő volt látható. A jobb mellső végtag 3.-4. lábujjak közötti területen gyógyuló, varos, horzsolt sebek voltak láthatóak. A szeméből közepes mennyiségű, mucopurulens váladék ürült, a kötőhártyája erősen kipirult volt. Enyhe belégzési típusú nehezített légzése volt. A trachea felett enyhe kilégzési stridor volt tapasztalható. A bal orrnyílás enyhe nasalis stridora volt észlelhető. Diffúzan felerősödött az alaplégzés. A belek üresek. A bal oldali cornea reflex kiesett, a jobb oldali renyhébb. A pupilla reflex során a pupillák renyhén reagálnak. A baloldali szem fényre ventromedialis strabizmussal reagált. A gerincvelői reflexek: mellső lábakon többször enyhe myoclonus volt megfigyelhető. A jobb hallójáratba egy toklász fúródott. A hasi ultrahang negatív lett. A savbázis vizsgálaton a pH savas 7,27-es értéket mutatott (7,35-7,45 között normális). Az ABE -5,7 (+/-3,5 a normálérték). A szopornyica PCR vizsgálata pozitív eredményt adott.

A további felhasznált mintákról a táblázatban lehet információt találni (1. táblázat).

1. táblázat: A munkánk során felhasznált minták

Név	Kutya származása	Menhelyen tartózkodott-e	Vakcinázott-e	Minta típusa	Kutya kora	Kutya fajtája	Kutya neme	Mintagyűjtés dátuma
1	Kiskunfélegyháza	n.a.	n.a.	Vizelet	3,5 éves	Keverék	szuka	2013.05.07
2	Zsámbok	igen (1 hónappal előtte)	Nem	Vizelet	8,5 éves	Keverék	szuka	2014.08.07
3	Tápiószecső	n.a.	igen (2-szer)	Vizelet	1,5 éves	Magyar vizsla	szuka	2013.01.14
4	Erdőkeretes	igen (2 hónappal előtte).	igen (1-szer)	Vizelet	4 hónapos	Keverék	szuka	2013.02.26
5	Budapest	igen	Nem	Vizelet	1 éves	Keverék	kan	2012.10.09
6	Budapest	igen (1 hónappal előtte)	Nem	Vizelet	n.a.	Puli	kan	2013.07.17
7	Dunakeszi	n.a.	n.a.	Vizelet	8 éves	Golden retriever	kan	2012.11.09
8	Ózd	igen	igen	Vizelet	6 hónapos	Puli	n.a.	2013.02.28
9	Kecskéd	n.a.	n.a.	Vizelet	1 éves	Staffordshire terrier keverék	kan	2013.10.10
10	Mohács	n.a.	n.a.	Szervek	7 éves	Tacskó keverék	n.a.	2013.03.11

n.a.: nincs adat

B. Nukleinsav kivonás

A kivonást az innuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena, Biometra, Németország) segítségével végeztük. A 450 µl Lysis Solution (RLD) oldathoz hozzáértünk 150 µl mintát. Ezt követően vortexszel összekevertük, és 15 perces várakozási idő után folytattuk. A mixhez hozzáadtunk még 600 µl Binding Solution-t (RBD). A homogén oldatból 650µl-t a filteres csőbe tettünk és 1 percig 10000xg fordulattal centrifugáltuk. A cső kicserélése után, a maradék mintát hozzáadtuk, és ismét centrifugáltuk. Ezután hozzáadtunk 500 µl Washing Solution HS mosófolyadékot, és ezt is lecentrifugáltuk. Kicseréltük a csövet, és hozzáértünk 650 µl Washing Solution LS mosófolyadékot. A cső csere után ismét

centrifugáltuk 2 percig, a maradék mosófolyadék eltávolítása, szárítás céljából. A szárított filtert egy Elution csőbe tettük, és hozzáadtunk 80µl RNáz mentes vizet. 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 10000xg-vel 1 percig centrifugáltuk.

C. Reverz transzkripció, PCR, szekvenálás

A CDV RNS kimutatását reverz transcriptio során cDNS-é alakítottuk amit polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction, PCR) módszerrel mutattunk ki. Az átírást és a PCR-t TGradient Thermocycler (Biometra) géppel végeztük.

A mintákból kivont RNS átírását Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo scientific) használatával végeztük. A templát RNS-ből 6 µl-t összemértünk 4 µl 5x reakció pufferrel, 2 µl Maxima Enzyme Mix-szel és 8 µl steril nukleáz mentes vízzel. Az RNS átírást a következő programmal végeztük: 25°C 10 perc, majd 50°C 30 perc, enzim inaktiválás 85°C 5 perc.

A PCR vizsgálatokat a 2. táblázatban található saját tervezésű oligonukleotid primerekkel végeztük. A nukleinsav kimutatáshoz a CDVDF és CDVDR, a Hemagglutinin gén amplifikálásához a CDV6362F és CDV7868R valamint CDV7637F és CDV9337R primerpárokat használtuk (3. táblázat).

A nukleinsav amplifikálás során a cDNS-ből 4 µl mennyiséget mértünk be a következő reakcióelegybe: 5 µl DreamTaq Green DNA Polymerase puffer (Thermo scientific), 3 µl dNTP (1 mmol Thermo Scientific), 1-1 µl primer (25 pmol), 2 egység (0,2 µl) DreamTaq Green DNA Polymerase enzim (Thermo scientific), steril desztillált vízzel 50 µl mennyiségre kiegészítve.

2. táblázat: A PCR vizsgálathoz használt primerek neve és szekvenciái

Primer neve, kötődés helye	Szekvencia
CDV1578DF	GAAGCAATCGCCAAGATG
CDV1873DR	CAGGAGGATTCTCTCTGAGG
CDV7637F	AGATGCAGTGGAGCTACTAC
CDV9337R	GAGATGACTCGATCCTGTG
CDV6362F	ATCTTGTGCTCGGACCTTG
CDV7868R	GCATGTCATTCAGCCACC

3. táblázat: A PCR vizsgálathoz használt primerek és az eljáráshoz használt hőmérsékletek illetve időtartamok

Primerpárok	Termék mérete (bp)	Előmelegítés	35 ciklus			Végző lánc-hosszabbítás	Befejezés
CDV1578DF - CDV1873DR	295	94°C 5 perc	94°C 30mp	56°C, 30 mp	72°C, 45 mp	72°C 7 perc	4°C
CDV6362F - CDV7868R	1506			60°C, 30 mp	72°C 90 mp		
CDV7637F - CDV9337R	1700			55°C, 30 mp	72°C 90 mp		

A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel vizsgáltuk GR Safe DNA Stain (Biocenter) segítségével, az eredményt Dark Reader transilluminátor (Clare Chemical Research, USA) vizualizáltuk. A PCR termékek szekvenálási reakcióit szintén a táblázatban található primerekkel végeztettük (Baseclear, Hollandia).

D. Szekvenca analízis, filogenetika

A szekvenálási reakciók eredményeit, a nukleinsav szekvenciákat és a származtatott aminosav sorrendet a BioEdit szoftverrel (Hall, 1999) vizsgáltuk, a filogenetikai analízist a MEGA7 programmal végeztük (Kumar és mtsai., 2015). A kapott szekvenciáinkat a különböző csoportokat reprezentáló CDV szekvenciákkal hasonlítottuk össze, amelyeket a GenBank-ból töltöttünk le, irodalmi adatok alapján (Demeter és mtsai, 2010).

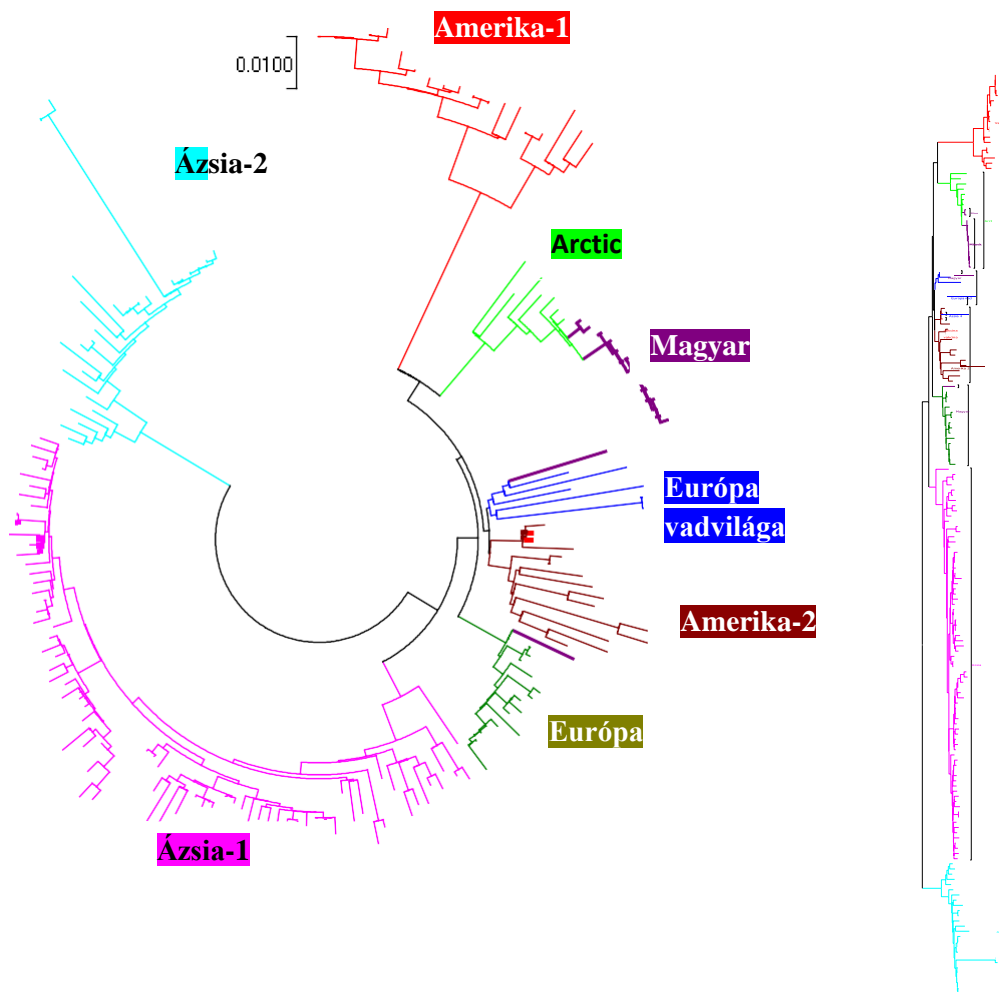
IV. Eredmények

A PCR módszerrel történő nukleinsav kimutatás eredményeként a vizsgált 10 minta mindegyike pozitív lett szopornyica vírusra az alkalmazott primerpárral, amelyek magyarországi kutyákból, 2012-2014 közötti megbetegedésekből származnak. Az elemzett minták mindegyike a SzIE Patológia Tanszék által előzetesen végzett PCR vizsgálatával pozitív eredményt mutatott.

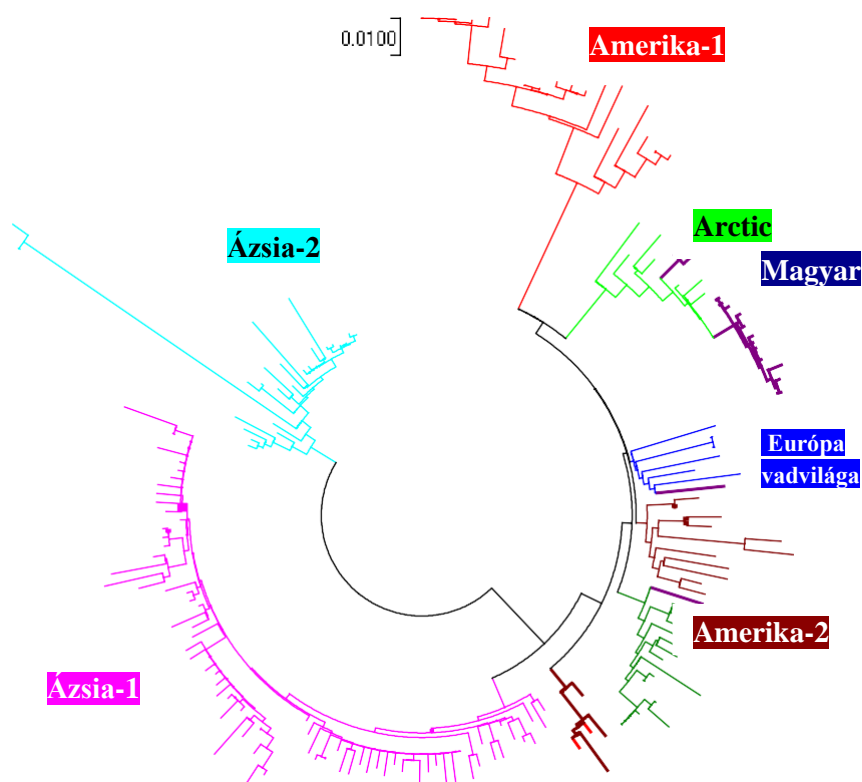
Az aktuális filogenetikai csoportosítás szerint nukleinsav szinten az általunk vizsgált minták mindegyike az Arctic csoportba tartozik. Az Arctic csoporthoz legközelebb helyezkedik el az Amerika-1 csoport, ahová a legtöbb vakcina törzs is tartozik. Ettől távolabb található az Európa vadvilága és Amerika-2 csoportok, amelyek egymással közelebbi rokonságban vannak. A négy csoporttól távolabb az Európa csoport tagjai tartoznak. Az Amerika-1 tagjaihoz képest a legtávolabb az Ázsia-1 és Ázsia-2 csoportok helyezkednek el (3. ábra). Aminosav szinten történő összehasonlításakor annyi változás történt, hogy az Amerika-2 vizsgált tagjai közül öt (AF178038, AF178039, FJ461702, AY964114, FJ705238) vírus egy önálló csoportot hoztak létre, amely az Európa csoporthoz helyezkedik el legközelebb (4. ábra).

Az Arctic csoporthoz tartozó vírusokat vizsgáltunk, amelyeket egy Bajkál-tóból származó fókából (X84998), egy kínai rókából (EF445052), illetve Grönlandról (Z47760). Az Amerikai Egyesült Államokból (AY964112), Olaszországból (DQ226087, DQ226088) és Magyarországról (DQ889182, DQ889186) származó kutyákból mutatták ki. A legkisebb hasonlóságot nukleinsav szinten (96,4%) az AF172241 és X84998 között fedezhetünk fel. A legnagyobb hasonlóságot nukleinsav (99,7%) és aminosav (99,6%) szinten is a DQ889182 és DQ889186 között mutatható ki. Aminosav szinten összehasonlított vírusok a legnagyobb genetikai távolságot (95,7%) (AF172241-X84998, DQ889186-X84998) között figyelhető meg. A 2012-2014 között Magyarországon kimutatott vírusokat az Arctic csoport többi tagjával összehasonlítva a legnagyobb hasonlóságot nukleinsav (99,2%) és aminosav (99,1%) szinten is egy erdőkeresi kutyából származó vírus és a DQ226087, DQ226088 GenBank számú vírusok között láthatjuk. A legnagyobb genetikai távolságot nukleinsav szinten (96,4%) X84998 és Magyarországon Ózdról, Budapestről származó kutyákból kimutatott vírusokban fedezhető fel. Aminosav szinten 95,8%-os hasonlóság látható a budapesti kutyából és az X84998-as számú vírusok között. A legnagyobb hasonlóságot aminosav

(99,1%) és nukleinsav (99,2%) szinten is az erdőkeresési kutyából és az olaszországi kutyákból származó vírusok között mutatható ki.



3. ábra: CDV H gén nukleinsav szekvenciák filogenetikai összehasonlítása



4. ábra: CDV H gén aminosav szekvenciák filogenetikai összehasonlítása

Az Amerika-1 csoporthoz tartoznak főként a vakcinák. A csoporton belül a legnagyobb hasonlóságot (99,8%) az AY466011 és az AF542312-es számú kórokozók között található. Aminosav szerinti összehasonlításban a legnagyobb hasonlóságot (99,8%) AB250741-D00758, AB250741-AF014953 és AY466011-AF542312 között fedezhetünk fel. A legnagyobb genetikai távolságot (94,9%) nukleinsav szinten a csoporton belül az AB286953-as és az EU143737-es számú vírusok között találhatunk. Aminosav szinten 91,7%-os hasonlóságot mutatnak.

Az Európa vadvilága csoportba egy dániai nyércből (Z47759), egy olasz rókából (DQ228166), egy németországi görényből (X84999), egy Amerikai Egyesült Államokbeli (AY964110) és egy magyarországi kutyából (DQ889189) mutatták ki a vírust. A legnagyobb genetikai távolságot DQ228166 és AY964110 GenBank kódú vírusok között láthatjuk, amely nukleinsav szinten 94,4%-os, aminosav szinten 94,3%-os hasonlóságot mutat. A legnagyobb hasonlóságot nukleinsav szinten (97%) Z47759 és X84999 között, aminosav szinten (96,5%) Z47759 és DQ889189 között fedezhető fel.

Az Amerika-2 csoporthoz egy kínai vörös macskamedvéből (AF178039), egy észak-amerikai kutyából (AY964114) és Amerikai Egyesült Államokbeli kutyákból (AF112189, AF164967, Z477628), javelinából (Z477647), mosómedvékből (Z477659, AY498692, AY649446, AY443350), fekete párducokból (Z47763, Z54166) és kínai leopárdból (Z54156) mutatták ki. A vakcinák közül az FJ705238-as (VaccP, tajvani) és az FJ461702-es (Vanguard) számúak tartoznak a csoporthoz. Az összehasonlított vírusok között a legnagyobb genetikai távolságot (95,2%) nukleinsav szinten és aminosav szinten (93,4%) is az AY964114 és az AY649446 GenBank számú vírusok között fedezhető fel. A legnagyobb hasonlóságot nukleinsav szinten (99,7%) és aminosav szinten (99,3%) is az AF164967 és AF112189 között látható. Nukleinsav szinten az Amerika-2 csoporthoz tartozik (AF178038, AF178039, AY964114). Aminosav szinten vizsgálva ezen vírusok és a 2 vakcina egy külön csoportot alkotnak.

Az Európa csoporthoz egy magyarországi kutyából (DQ889177), németországi kutyákból (X85000, Z77672, Z77673, Z77671), olaszországi kutyákból (DQ494317, DQ494318, DQ494319), egy törökországi kutyából (AY093674) és dániai kutyákból (Z47761, AF478548, AF48550, AF478543, AF478544) mutatták ki a vírust. Nukleinsav alapján összehasonlított vírusok közül a legnagyobb genetikai távolságot (97,5%), aminosav szinten 96,2%-os DQ889177 és AY093674 között látható. A legnagyobb hasonlóságot (99,9%) az AF478548 és az AF478550 között fedezhető fel. Aminosav szinten összehasonlítva a legnagyobb hasonlóságot (99,8%) Z47761-AF478548, Z47761-AF478550, DQ494318-DQ494319 között található.

Az Ázsia-2 csoporthoz dél-koreai kutyákból (FJ868161, FJ868160, EU716073, EU716075), japán kutyákból (AB040767, AB040768, AB040766, AB476403, AB295482, AB025270, AY297453, AY297454, AB212730, AB252717, AB252718, AB250668), egy kínai kutyából (EU743934), dél-koreai nyestkutyákból (FJ868174, FJ868171, FJ868169, JQ319396, JQ319393), egy dél-koreai nyestből (EU716074) és egy kínai rókából (EU743935) mutatták ki a vírusokat. Nukleinsav szinten vizsgálva a legnagyobb hasonlóságot (99,9%) az AB212730-AB250668 és az AB259482-AB476403 között fedezhető fel. Aminosav szerinti összehasonlítás során a legnagyobb hasonlóságokat (99,8%) az AB295482 -AB025270, AB250668-AB212730, AB295482-AB212730, AB250668-AY297453, AB250668-AY297454, AB476403-AB295482 közötti vírusok között találhatunk. A legnagyobb genetikai távolságot aminosav (87,4%) és nukleinsav (92,7%) szinten is az FJ868171 és az EU743935 kórokozók között figyelhetünk meg.

Az Ázsia-1 csoporthoz kínai pandából, Japán kutyákból, kínai majmokból, kínai rókákból, Japán borzokból, tajvani kutyákból, thaiföldi kutyákból, kínai nyércből, kínai nyestkutyákból, dél-koreai kutyákból kimutatott vírusok. A legnagyobb hasonlóságot (99,9%) az FJ705236-os és az FJ705235-ös számú Tajvanon kutyákból kimutatott vírusok között figyelhetünk meg. Aminosav szinten összehasonlított kórokozók között 99,8%-os hasonlóságot fedezhetünk fel FJ705236-AY378091, EF445051-EF042818, FJ705235-FJ705236 és FJ810215-FJ848534 között láthatunk. A legkisebb hasonlóság (95,3%) nukleinsav szinten a csoporton belül az EU296492 és AF178038, ugyanez a két törzs aminosav szinten 94,2%-os hasonlóságot mutat. A Kínában majmokból kimutatott vírusokat a többi csoportban vizsgált vírusokkal történő összehasonlítást nukleinsav szinten a 4. táblázatban és aminosav szinten az 5. táblázatban látható.

4. táblázat: A majmokban talált szopornyica vírusok (FJ405223, FJ405224) nukleinsav szinten történő összehasonlítása a többi csoporttal

	Maximum	Minimum	Átlag
Amerika-1	91,7	90,2	90,91
Amerika-2	96,1	93,5	94,72
Arctic	94,1	93,4	93,66
Ázsia-1	99,1	96,1	97,37
Ázsia-2	94	89,5	92,78
Európa	95,3	94,3	94,86
Európa vadvilága	95	93,5	94,18
Saját minták	93,4	93	93,3

5. táblázat: A majmokban talált szopornyica vírusok (FJ405223, FJ405224) aminosav szinten történő összehasonlítása a többi csoporttal

	Maximum	Minimum	Átlag
Amerika-1	91,4	88,9	89,98
Amerika-2	96,3	93	94,66
Arctic	93,9	92,5	93,1
Ázsia-1	98,8	95,8	97,54
Ázsia-2	94,2	85,5	92,48
Európa	95,5	93,5	94,72
Európa vadvilága	95,2	93,5	94,38
Saját minták	93,2	92,4	92,85

A H-gén aminosav szekvenciáit hasonlítottuk össze a különböző csoportok aminosav szekvenciáival. Összehasonlítási alapnak az Amerika-1-es csoportból származó AB212966-os számú szekvenciát választottuk, amelyet az 5., 6., 7., és 8. ábrán látható.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
AF258736	J	M	S	V	K	V	A	K	V	A	K	V	A	K	V	A
AF258737	Q	P	S	G	S	S	K	S	S	K	S	S	K	S	S	K
AF258738	Q	P	S	G	S	S	K	S	S	K	S	S	K	S	S	K
AF258739	Q	P	S	G	S	S	K	S	S	K	S	S	K	S	S	K
AF258740	V	S	P	G	S	S	K	S	S	K	S	S	K	S	S	K
AF172541	I	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AY964112	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
247760	ERT	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
247759	ERT	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
156	Jobes	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
415	Endler	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
895	Kiskur	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1128	Hjorsh	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1628	Fudap	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1877	Mo	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7841	cdy_t	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nr_cdy_tel	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
teddy	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Yamos bun	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AY964110	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DQ228166	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DQ889189	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
X8499	Yad	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AF112189	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AY443350	F	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AY964114	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
54776	JAY	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AF478543	A	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AF478548	D	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AY386315	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DQ494319	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
877672	Kut	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB01874	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AF319036	P	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB21296	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8029588	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8029582	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8029589	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80293894	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80848338	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB025270	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB252717	k	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E0716074	F	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E0743935	F	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AB301066	I	L	S	Q	I	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

5. ábra: A szopornyica vírus H gén aminosav szekvenciáinak összehasonlítása (1.-160. aminosav)

	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
AK200360	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
AK250736	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
E233682	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
E305239	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
AF172415	S	L	L	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AY964112	S	L	V	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E47760	S	L	V	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E47759	S	L	V	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
156_Mohar	S	L	G	S	A	R	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
415_Erdker	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
895_Kisur	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
1128_Hosea	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
1628_Buder	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
1877_Jc	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
7841_cdy t	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
Nr_cdy te	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
teddy	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
Yamao Fur	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AY964110	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
DQ228166	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
DQ889189	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E64999	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AF112189	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AY443350	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AY964114	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E47764	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AF478543	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AF478548	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AY386315	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
DQ494319	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E77672	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E3015776	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AF178038	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E8212364	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0296461	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0296462	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0296491	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0501864	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E3048532	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AB025270	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AB252717	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0716074	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
E0743935	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G
AB301066_1	S	L	G	S	S	S	S	Y	G	K	FQ	I	I	D	N	G

6. ábra: A szopornyica vírus H gén aminosav szekvenciáinak összehasonlítása (161.-320. aminosav)

	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
AF225716	G	G	G	G	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF2259352	G	G	G	G	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF172411	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF964112	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
247760_KM	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
247759_JM	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
156_Mohes	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
415_Epket	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
895_Kiskun	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
1128_Hroza	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
1628_Budap	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
1877_Mo	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
7841_cstv_t	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
Nr_gstv_tel	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
tesdov	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
ymas_hun	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AY964110	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
DQ228166	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
DQ889189	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
284999_vac	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF112189	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AY443350	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AY964114	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
247764_Jav	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF478543	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF478548	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AY386315	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
DQ494319	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
277672_Kat	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
28216776	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AF178039	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
28212964	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
20296493	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
20296482	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
20296491	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
20593894	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
F0448532	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AB025270	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AB252717	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
E0716074	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
E0743335	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I
AB301066_1	G	G	G	V	V	V	V	G	G	G	G	G	G	G	G	I

7. ábra: A szopornyica vírus H gén aminosav szekvenciáinak összehasonlítása (321.-480. aminosav)

	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
AF172241
AB303716
AF259852
AF172241
AY964112
U47760_kan
U47759_oxf
156_Mobca
415_Ericker
895_Kisakur
1128_Hroza
1628_Budap
1877_Mo
7841_ody_t
Nr_ody_tel
teddy
vamos_hun
AY964110
DQ228166
DQ889189
U84999_vac
AF112189_k
AY443350
AY964114_k
U47764_jav
AF478543
AF478548_L
AY386315
DQ494319
U77672_kut
AB015776
AF172038
AB212344
U2296481
U2296482
U2296491
U2593894
U3848532
AB025270
AB252717
EU716074
EU743935_I
AB301066_1

8. ábra: A szopornyica vírus H gén aminosav szekvenciáinak összehasonlítása (481.-607. aminosav)

V. Megbeszélés

A szopornyica vírust 1761-ben írták le először, amely országokon át terjedő járványokat okozott (Kirk, 1922). A vakcinázás megjelenésével sikerült visszaszorítani a terjedését, így világszerte, sporadikusan előforduló kórokozóvá vált. Az elmúlt években vakcinázott állatokban is kimutatták a CDV-t (Demeter és mtsai, 2010), melynek hátterében többféle magyarázat is lehetséges:

- Szimplaszálú RNS vírus, genetikai információtartalmának köszönhetően egy folyamatosan változó, egyre szélesebb gazdaspektrummal rendelkező kórokozó. A vírusban végbemenő mutációknak köszönhetően a vakcina- és a vadvírusok között egyre nagyobb különbségek fedezhetőek fel, így az oltóanyagok hatékonysága folyamatosan csökken.
- Az oltásokat nem megfelelő időben hajtják végre. A leggyakoribb hiba, hogy az állat a vakcinázás idején még magas maternális ellenanyagszinttel (1:20 arány felett) rendelkezik. Ha ilyenkor adják be az oltást, nem tud kialakulni megfelelő immunválasz, illetve a maternális ellenanyag szintje csökkenhet a korai vakcinázás következtében (Povey, 1986).
- az állat immunrendszere nem működik megfelelően (Povey, 1986). Ez létrejöhet exogén és endogén okok miatt is. Exogén okok között szerepel a túlszűfolt tartás (pl. menhelyek), környezetváltozások (pl. nagy hőmérséklet és páraingadozás), bizonyos gyógyszerek (glükokortikoidok, azathioprim, cyclosporin, tetraciklinek, klóramfenikol, daganatellenes szerek) immunszuppresszív hatása (Povey, 1986). Endogén okok között szerepel a vírussal, baktériummal, parazitával és gombával történő fertőződés (Povey, 1986).

A magyarországi mintáink szerint a szopornyicával fertőzött állatok gyakran menhelyeken betegedtek meg, esetleg tünetmentesen fogadták őket örökbe, és csak később alakultak ki a kutyákban klinikai tünetek. A rossz higiéniai körülmények megszüntetésével a szopornyica vírus könnyen inaktiválható (például ultraibolya sugárzással, detergens és antioxidánsok segítségével). Az 56-60°C között vagy annál magasabb hőmérsékleten, illetve pH 4,5 alatti és pH 9 feletti kémhatáson a vírus inaktiválódik, de a hidegebb hőmérsékleten fertőzőképes marad.

A munkánk során a H gén vizsgálatával foglalkoztunk, a többi gén terjedelmi okok miatt nem került bele a dolgozatba. A választás oka, hogy a 6 gén közül a leggyakrabban vizsgált, a legnagyobb genetikai variabilitást mutatja és a legnagyobb szerepet játssza a gazdasejthez kapcsolódásban (Lan és mtsai, 2006; Ke és mtsai, 2015). A különböző irodalmakban más és más csoportosítási módokat találtunk. Demeter és mtsai (2010) által írt cikk alapján - a H-gén nukleinsav és aminosav szinten – az alábbi hét fő csoportra való (Amerika-1, Amerika-2, Európa, Európa vadvilága, Arctic, Ázsia-1 és Ázsia-2) felosztást követtük. A választásunk oka, hogy a többi csoport inkább földrajzi beosztást követ. Az általunk nem alkalmazott Ázsia-3 csoportba besorolt szekvenciák (mint pl. egy kínai kutyából [EU743935] kimutatott vírus) (Willi és mtsai, 2015) az általunk preferált beosztás szerint ez az Ázsia-2 csoporthoz tartozik, a vizsgált vírusok közül átlagosan 94,9%-os hasonlóságot mutat. Az Ázsia-4 csoportként jelölt szekvenciák (AB301066, AB301065, Techangamsuwan és mtsai, 2014), az általunk követett besorolás szerint az egyértelműen az Európa vadvilága csoporthoz tartozik. E csoport vizsgált vírusai között átlagosan 95,4%-os hasonlóság látható. A Dél-Afrika csoporthoz dél-afrikai kutyákból kimutatott vírusokat soroltak be (Liao és mtsai, 2015), amelyek az általunk választott beosztás szerint az Amerika-2 csoporthoz tartoznak. A korábban Demeter és mtsai. (2010) által leírt és általunk is követett filogenetikai csoportosítást alkalmazva a 7 csoportba minden eddigi CDV szekvencia besorolható, egyéb, főleg földrajzi alapon alkotott csoportok kialakítása filogenetikai vizsgálatokban nem indokolt.

Egy 10 évvel ezelőtti vizsgálat során 3 különböző csoportba tartoztak a vírusok, amelyek Magyarországon előfordultak. Az Európa csoporthoz egy 2004 telén Budapestről származó, vakcinázott, csak neurológiai tüneteket mutató vizslából (DQ889177) mutatták ki. Az Európa vadvilága csoporthoz tartozó DQ889189-es számú vírus 2005 telén kelet-magyarországi térségről, légző-és emésztőszervi tüneteket mutató kutyából származik. Az Arctic csoportba egy 2005 tavaszán, négy hónapos labrador kölyök (DQ889182) vizelet mintájából mutatták ki. A másik egy 2006 tavaszán, légzőszervi tüneteket mutató, budapesti menhelyről származó keverék szukából (DQ889186) mutatták ki (Demeter, 2009). Az általunk szekvenált vírusok 2012 és 2014 között Magyarország különböző területeiről származnak (1. táblázat). Ezen vírusok mindegyike az Arctic csoportba tartozik, nukleinsav szinten az elemzett szekvenciák közül a legnagyobb hasonlóságot a korábban szintén Magyarországon kimutatott Arctic csoportba tartozó szekvenciákkal mutatnak. Így valószínűsíthető, hogy a Magyarországon jelenleg terjedő, megbetegedéseket okozó

szopornyica vírusok a DQ889182 és/vagy a DQ889186 GenBank-i kódú vírusokból származhatnak.

Munkánk jelentőségét növelheti, hogy más állatfajokban is megjelent a szopornyicával történő fertőzöttség. A közönséges makákókban hasonlóan kutyákhoz légzőszervi-, emésztőszervi-, és idegrendszeri tüneteket tapasztaltak (Sakai és mtsai, 2013). A vörös rókáknban, menyétekben és hiúzokban idegrendszeri (pl. vadon élő állatként keresték az ember társaságát) esetleg légzőszervi tünetek voltak észlelhetőek (Origgi és mtsai, 2012). Cibetekben és vadonélő farkasokban kutyákhoz hasonlóan idegrendszeri-, emésztőszervi- és légzőszervi bántalmakat tapasztaltak (Di Sabatino és mtsai, 2014; Techangamsuwan és mtsai, 2014).

A szopornyica vírus nem emberszabású főemlősökben is képes fatális kimenetelű megbetegedéseket, járványokat előidézni (Yoshikawa és mtsai., 1989; Sun és mtsai., 2010; Qiu és mtsai., 2011; Sakai és mtsai, 2013). A majmokat fertőzni képes CDV-k a H-gén alapján nagy hasonlóságot mutatnak más fajokból kimutatott vírusokkal is. Így az emberi fertőződés lehetősége sincs kizárva a jövőben, amelynek lehetőségét már régóta vizsgálják. Az egyik kísérletet 1931-ben Nicolle hajtotta végre. Emberekbe oltotta be a virulens szopornyica vírust, és vizsgálta annak hatását. Az emberekben tüneteket nem produkált, de a beadást követően a levett vérben fertőzőképes vírus volt kimutatható (Appel és Gillespie, 1972).

A morbillivírusok általában fajspecifikusok, kivételt képez ez alól a szopornyia vírus, amely különböző fajok széles sorát képes megfertőzni és megbetegíteni (Bieringer és mtsai., 2013). A CDV a fehérvérsejteken megjelenő SLAM és a különböző szervek epitheliális sejtein megjelenő nectin-4 receptorokhoz kötődve jut be a sejtekbe (Seki és mtsai., 2003; Noyce és mtsai, 2013). Számos tanulmány vizsgálta a humán sejttenyészetek, illetve humán SLAM receptort hordozó különböző sejttenyészetek szopornyica vírussal való fertőzhetőségét. Nectin-4 receptort termelő humán tüdő carcinoma eredetű H358 sejttenyészetben bizonyították, hogy a CDV képes a humán Nectin-4 receptorhoz kötődni és fertőzni sejteket (Otsuki és mtsai., 2013a). A vírus sejtbe jutásért felelős H fehérjéje és az F fehérje a sejttenyészetben történő szaporodás során változatlan maradt, de a vírus egyéb részein történtek mutációk, amelyek alkalmassá tették a vírust a humán eredetű sejtekben való szaporodásra (Bieringer és mtsai., 2013). A morbillivírusok H fehérjéjének 500-550-dik aminosav pozíciói között elhelyezkedő aminosavak felelősek a SLAM receptorhoz való

kötődéshez (Bieringer és mtsai., 2013). A humán SLAM receptorhoz való kötődéshez a CDV a H fehérje 540-es aminosav pozíciójában történt mutáció révén vált képessé (Bieringer és mtsai., 2013), ahol az aszparaginsav egy glicin aminosavra cserélődött. Ez a mutáció nem befolyásolja a vírus kutya SLAM receptorokhoz való kötődését. A H fehérje 540-es pozíciójában glicint tartalmazó vad szopornyica vírus a természetben is előfordul (AB061776,

8. ábra), ami potenciálisan magába hordozza az emberi fertőzések veszélyét. Az embereket fertőzni képes nagy ragályozó képességű morbillivírus, a kanyaró vírussal szemben alkalmazott vakcina keresztvédekettséget biztosít a szopornyica vírussal szemben (Appel és mtsai., 1984). A kanyaróval szembeni széleskörű védekezés ezért nagymértékben csökkenti a CDV okozta kockázatot. A kanyaró vírus eradikációját követően az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization WHO) tervei szerint 2020-ra megszüntetik a vírussal szembeni vakcinás védekezést (Strebel és mtsai., 2011), aminek a szopornyica vírus szempontjából különös jelentősége lehet. A CDV járványok nyomon követése és a hatékony védekezés ezért nem csak állategészségügyi szempontból fontos.

VI. Összefoglaló

A szopornyica vírus (canine distemper virus CDV) egy világszerte gyakran kimutatott kórokozó. Régebben kizárólag a ragadozók (Carnivores) betegségének tekintették, de a vizsgálatok alapján már sokféle fajban megtalálták (Ailuridae, Mustelidae, Viverridae, Procyonidae, Phocidae, Felidae), köztük a nem emberszabású majmokban is (*Macaca fuscata*, *Macaca mulatta*). A CDV egy nagy fertőzőképességű, gyakran fatális kimenetelű, szisztémás megbetegedést okozó vírus. Hatékony, specifikus gyógymód nincs ellene, az érintett állatok kezelése csak tünetileg lehetséges, aminek költsége nagyon magas, és eredményessége kétséges. A betegség megelőzése vakcinázással lehetséges, amihez hazánkban számos oltóanyag áll rendelkezésre.

Az elmúlt években egyre több fiatal és felnőtt, oltott és oltatlan kutya is fertőződött szopornyica vírussal. Hogy feltérképezzük a jelenleg megbetegedést okozó vírustörzseket, az érintett egyedekből származó mintákat molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk. Filogenetikai vizsgálatok alapján a CDV-kat leggyakrabban 7 csoportba (Amerika 1 és 2, Ázsia 1 és 2, Arctic, Európa, Európa vadvilága) sorolják.

Eredményeink alapján a jelenleg Magyarországon terjedő, megbetegedéseket okozó vírusok az Arctic csoportba tartoznak, egymással nagyon szoros rokonságot mutatnak, és a filogenetikai elemzés alapján egy 2006-ban szintén hazánkban kimutatott vírustól eredeztethetők. Bár a Hemagglutinin fehérje vizsgálata szerint ez a csoport van legközelebb a vakcina törzseket magába foglaló Amerika 1 csoporthoz, az aminosav szinten jelentkező különbségek elegendőnek tűnnek ahhoz, hogy az általunk kimutatott vírusok akár többször vakcinázott állatokban is képesek legyenek fertőzést és megbetegedést is előidézni. A rendszeres vakcinázások szelektív nyomást gyakorolnak a vírusokra, aminek hatására a vírus antigén-szerkezete megváltozik, így a vakcinák hatékonysága idővel gyengül.

A CDV többször okozott főemlősökben is elhullásokkal járó járványokat, valamint humán sejtenyészeteket is sikerrel fertőzhetőek a vírussal. Ezért fennállhat a veszélye annak, hogy a CDV emberhez adaptálódik, aminek a következményei rendkívül súlyosak lehetnek. Ezért fontosnak tartjuk a vírus evolúciójával lépést tartó vakcinák fejlesztését, használatát az érintett fajokban, hogy minimalizálni lehessen az emberre való terjedés kockázatát.

VII. Summary

Canine distemper virus (CDV) is frequently detected pathogen worldwide. Previously, CDV infection was considered as a disease specific to carnivores, but today's CDV caused disease has been found in many different species (Ailuridae, Mustelidae, Viverridae, Procyonidae, Phocidae, Felidae), including non-human primates (*Macaca fuscata*, *Macaca mulatta*). CDV is a highly contagious pathogen that often causes fatal, systemic disease. There is no effective specific treatment for the disease, the symptomatic therapy is the only option, which is highly expensive and there are doubts about its efficiency. The CDV caused diseases could be prevented by vaccination, and many different vaccines are available in Hungary. In recent years, increasing number of CDV caused clinical signs and deaths were observed in young and adult, vaccinated and unvaccinated dogs.

In order to survey the virus strains causing the current diseases, samples were collected from affected animals, and examined with molecular biological methods. Based on phylogenetic examinations, CDVs are generally divided into seven clusters (America 1 and 2, Asia 1 and 2, Arctic, Europe and European wildlife).

Our results indicate that the viruses causing diseases in Hungary belongs to the Arctic group, and they have very close relationship to each other. Based on the phylogenetic analysis, the currently spreading CDVs may originate from a virus detected in 2006 in Hungary. Although, according to the analysis of Hemagglutinin protein, the CDVs belonging to Arctic cluster shows the higher similarity to America 1 group containing most of vaccine strains, the differences on the amino acid level could be sufficient enough so that the detected CDVs in this study can results severe clinical signs and deaths even repeatedly vaccinated animals, too. Regular vaccinations means selective pressure on the virus, resulting changes in antigen structure of the virus, thus the efficiency of the vaccine decreases over time.

The CDV caused fatal epidemics more times in primates, and even human cell cultures could be successfully infected with the virus. Therefore there might be a risk that the virus will adapt to humans, which could have very serious consequences. Hence why we think it is important to develop a vaccine that could keep up with the evolution of the virus, and to use these vaccines in order to minimize the risk of the virus spreading to the human population.

VIII. Irodalomjegyzék

AMUDE, A. M., ALFIERI, A. A., & ALFIERI, A. F., 2007: Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Research in Veterinary Science*, 82(3), 416-422.

APPEL, M.J.G, GILLESPIE J.H., 1972: Virology Monographs. Canine Distemper Virus. Wien, *Springer-Verlag*, 1-3., 34., 68-72.

APPEL, M. J. G., SHEK, W. R., SHESBERADARAN, H., NORRBY, E., 1984: Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Archives of Virology*, 82, 73–82.

APPEL, M. J., YATES, R. A., FOLEY, G. L., BERSTEIN, J. J., SANTINELLI, S., SPELMAN, L. H., MILLER, L.D., ARP, L.H., ANDERSON, M., BAR, M., ÉS MTSAI. 1994: Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 277-288.

BEINEKE, A., PUFF, C., SEEHUSEN, F., BAUMGÄRTNER, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), 1-18.

BIERINGER, M., HAN, J. W., KENDL, S., KHOSRAVI, M., PLATTET, P., SCHNEIDER-SCHAULIES, J., 2013: Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry CD150. *PLoS One*, 8(3), e57488.

CHULAKASIAN, S., LEE, M. S., WANG, C. Y., CHIOU, S. S., LIN, K. H., LIN, F. Y., HSU, T. H., WONG, M. L., CHANG, T. J., HSU, W. L., 2010: Multiplex Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) for diagnosis of natural infection with canine distemper virus. *Virology Journal*, 7(1), 122.

DEMETER, Z., 2009: Polymerase chain reaction-based investigations of canine distemper and parvovirus strains from Hungary. Doctoral Thesis. Szent István University Postgraduate School of Veterinary Science, Budapest.

DEMETER, Z., PALADE, E. A., HORNYÁK, Á., RUSVAI, M., 2010: Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 420-426.

DI SABATINO, D., LORUSSO, A., Di FRANCESCO, C. E., GENTILE, L., DI PIRRO, V., BELLACICCO, A. L., GIOVANNINI, A., DI FRANCESCO, C. E., MARRUCHELLA, G., MARSILIO, F., SAVINI, G., 2014: Arctic lineage-canine distemper virus as a cause of death in Apennine wolves (*Canis lupus*) in Italy. *PLoS One*, 9(1), e82356.

DOBOS-KOVÁCS, M., 1975: Studies on the diagnostic value of cell inclusions in canine distemper. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 25(2-3), 185-200.

ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C., 2005: Textbook of Veterinary Internal Medicine 6th Edition. St.Louis, Missouri, Elsevier Saunders, 650.

GREENE, C.E., APPEL, M.J.G., 2006: Infectious diseases of the dog and cat 3rd Edition. St.Louis, Elsevier Saunders, 25-41.

KABAKCI, N., YARIM, M., KARAHAN, S., GUYEVENC, T., YAGCI, B. B., GURCAN, I. S., 2004: Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52(3), 327-337.

KE, G.-M., HO, C.-H., CHIANG, M.-J., SANNO-DUANDA, B., CHUNG, C.-S., LIN, M.-Y., SHI, Y.-Y., YANG, M.-H., TYAN, Y.-C., LIAO, P.-C., CHU, P.-Y., 2015: Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 164.

KIRK, HAMILTON 1922: Canine Distemper. Its complication sequelae and treatment. London, Bailliére, Tindall and Cox, 8. Henrietta Street, Covent Garden, 3-4.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K., 2015: MEGA7 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). Publication PDF available at: <http://www.megasoftware.net>

LAN, N. T., YAMAGUCHI, R., INOMATA, A., FURUYA, Y., UCHIDA, K., SUGANO, S., TATEYAMA, S., 2006: Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology*, 115(1-3), 32-42.

LEMPP, C., SPITZBARTH, I., PUFF, C., CANA, A., KEGLER, K., TECHANGAMSUWAN, S., BAUMGÄRTNER, W., SEEHUSEN, F., 2014: New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 6(7), 2571-2601.

LIAO, P., GUO, L., WEN, Y., YANG, Y., CHENG, S., 2015: Phylogenetic features of hemagglutinin gene in canine distemper virus strains from different genetic lineages. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4), 6607-6612.

MACLACHAN, N.J., DUBOVI, E.J., 2011: Fenner's Veterinary Virology 4th Edition. United States of America, Academic Press.

MAHY, B.W.J., VAN REGENMORTEL, M.H.V., 2008: Encyclopedia of Virology 3rd Edition Oxford, Academic Press.

MARTELLA, V., BLIXENKRONE-MOLLER, M., ELIA, G., LUCENTE, M.S., CIRONE, F., DECARO, N., NIELSEN L., BÁNYAI K., CAEMICHAEL, L.E., BUONAVOGLIA, C., 2011: Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine*, 1, 29(6), 1222-1227.

MCINNES, E. F., BURROUGHS, R. E. J., DUNCAN, N. M., 1992: Possible vaccine-induced canine distemper in a South American bush dog (*Speothos venaticus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 614-617.

MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., 1999: Veterinary Virology. San Diego, Calif, Academic Press.

NELSON, R.W., COUTO, C.G. ,1999: Manual of Small Animal Internal Medicine. St. Louis, Mosby, 809-812.

NOYCE, R. S., DELPEUT, S., RICHARDSON, C. D., 2013: Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, 436(1), 210-220.

ORIGGI, F. C., PLATTET, P., SATTLER, U., ROBERT, N., CASAUBON, J., MAVROT, F., PEWSNER, M., WU., N., GIOVANNINI, S., OEVERMANN, A., STOFFEL, M. H., GASCHEN, V., SEGNER, H., RYSER-DEGIORGIS, M. P., 2012: Emergence of Canine Distemper Virus Strain With Modified Molecular Signature and Enhanced Neuronal Tropism Leading to High Mortality in Wild Carnivores. *Veterinary Pathology*, 49(6), 913-29.

OTSUKI, N., SEKIZUKA, T., SEKI, F., SAKAI, K., KUBOTA, T., NAKATSU, Y., CHEN, S., FUKUHARA, H., MAENAKA, K., YAMAGUCHI, R., KURODA, M., TAKEDA, M., 2013a: Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor. *Virology*, 435(2), 485-492.

OTSUKI, N., NAKATSU, Y., KUBOTA, T., SEKIZUKA, T., SEKI, F., SAKAI, K., KURODA, M., YAMAGUCHI, R., TAKEDA, M., 2013: The V protein of canine distemper virus is required for virus replication in human epithelial cells. *PLoS One*, 8(12), e82343.

PARDO, I. D., JOHNSON, G. C., KLEIBOEKER, S. B., 2005: Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5009-5017.

POVEY, R. C., 1986: Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. *The Canadian Veterinary Journal*, 27(9), 321-323.

QIU, W., ZHENG, Y., ZHANG, S., FAN, Q., LIU, H., ZHANG, F., WANG, W., LIAO, G., HU, R., 2011: Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1541-1543.

RENTERÍA-SOLÍS, Z., FÖRSTER, C., AUE, A., WITTSTATT, U., WIBBELT, G., KÖNIG, M., 2014: Canine distemper outbreak in raccoons suggests pathogen interspecies transmission amongst alien and native carnivores in urban areas from Germany. *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), 50-59.

ROELKE-PARKER, M. E., MUNSON, L., PACKER, C., KOCK, R., CLEAVELAND, S., CARPENTER, M., O'BRIEN, S.J., POSPISCHIL, A., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H., MWAMENGELE, G. L., MGASA, M. N., MACHANGE, G. A., SUMMERS, B. A., APPEL, M. J. 1996: A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379(6564), 441-445.

SAKAI, K., NAGATA, N., AMI, Y., SEKI, F., SUZAKI, Y., IWATA-YOSHIKAWA, N., SUZUKI, T., FUKUSHI, S., MIZUTANI, T., YOSHIKAWA, T., OTSUKI, N., KURANE, I., KOMASE, K., YAMAGUCHI, R., HASEGAWA, H., SAIJO, M., TAKEDA, M., MORIKAWA, S., 2013: Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *Journal of Virology*, 87(2), 1105-1114.

SATTLER, U., KHOSRAVI, M., AVILA, M., PILO, P., LANGEDIJKL, J. P., ADER-EBERT, N., ALVES, L. A., PLATTET, P., ORIGGI, F. C., 2014: Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. *Journal of Virology*, 88(14), 8057-8064.

SEKI, F., ONO, N., YAMAGUCHI, R., YANAGI, Y., 2003: Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of Virology*, 77, 9943-9950.

SHIN, Y.S., MORI, T., OKITA, M., GEMMA, T., KAI, C., MIKAMI, T., 1995: Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57(3), 439-445.

SIMON-MARTINEZ, J., ULLOA-ARVIZU, R., SORIANO, V. E., FAJARDO, R., 2008: Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *The Veterinary Journal*, 175(3), 423-426.

SOÓS T., TUBOLY S., 2009: Vakcinológia. A fertőző állatbetegségek immunprophylaxisa. Budapest, A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft.. 216-218.

STREBEL, P. M., COCHI, S. L., HOEKSTRA, E., ROTA, P. A., FEATHERSTONE D, BELLINI, W. J., KATZ, S.L., 2011: A world without measles. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(1), S1–3.

SUN, Z., LI, A., YE, H., SHI, Y., Hu, Z., ZENG, L., 2010: Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterinary Microbiology*, 141(3-4), 374-378.

SUZUKI, J., NISHIO, Y., KAMEO, Y., TERADA, Y., KUWATA, R., SHIMODA, H., MAEDA, K., 2015: Canine distemper virus infection among wildlife before and after the epidemic. *Journal of Veterinary Medical Science*, (0).

TAN, B., WEN, Y. J., WANG, F. X., ZHANG, S. Q., WANG, X. D., HU, J. X., SHI, X.C., YANG, B.C., CHEN, L.Z., CHENG, S.P., WU, H., 2011: Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virology Journal*, 8, 520.

TECHANGAMSUWAN, S., BANLUNARA, W., RADTANAKATIKANON, A., SOMMANUSTWEECHAI, A., SIRIAROONRAT, B., LOMBARDINI, E. D., RUNGSIPIPAT, A., 2014: Pathologic and Molecular Virologic Characterization of a Canine Distemper Outbreak in Farmed Civets. *Veterinary Pathology*, 52(4), 724-731.

WILLI, B., SPIRI, A. M., MELI, M. L., GRIMM, F., BEATRICE, L., RIOND, B., BLEY, T., JORDI, R., DENNLER, M., HOFMANN-LEHMANN, R., 2015: Clinical and molecular investigation of a canine distemper outbreak and vector-borne infections in a group of rescue dogs imported from Hungary to Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 11, 154.

WOMA, T. Y., VAN VUUREN, M., BOSMAN, A. M., QUAN, M., OOSTHUIZEN, M., 2010: Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), 126-132.

YOSHIKAWA Y, OCHIKUBO F, MATSUBARA Y, TSURUOKA H, ISHII M, SHIROTA K, NOMURA Y, SUGIYAMA M, YAMANOUCHI K., 1989: Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology*, 20(3), 193-205.

5. melléklet Nyilatkozat TDK- és szakdolgozat azonosságáról

NYILATKOZAT

Alulírott LOSONCZI ALEXANDRA..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ KUTYA SZO-
PORNYICA VÍRUSOK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2015.....
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017. 11. 20.....

Losonczy Alexandra
LOSONCZI ALEXANDRA
a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: LOSONCZI ALEXANDRA
Elérhetőség (e-mail cím): alexandra.losoncz.1992@gmail.com
A feltöltendő mű címe: MAGYARORSZÁGON FÉLŐRJDULÓ KUTYA SZOPOR-
NYICA...YI'RUSOK...MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA
A mű megjelenési adatai: 2015
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 másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, 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 anyagrész 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 használatról 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 törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2017. év11.....hó ..20....nap

Losonczi Alexandra

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, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, 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 tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

Aláírom: FODOR LA'SZLÓ Igazolom, hogy

LÓFONCHI Alexandr (a hallgató neve)

Magyar nyelv és irodalom tantárgyból...

című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 11. 20.

Fodor László

a témavezető neve és aláírása

tanszék