

MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

**ŐZEK (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) FIBROPAPILLOMATOSISA
MAGYARORSZÁGON**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Erdélyi Károly

Gödöllő

2010

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

témavezető: Dr. Csányi Sándor
egyetemi tanár
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Vadvilág Megőrzési Intézet

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések.....	5
1. Bevezetés, célkitűzések.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. A papillomavírusok	11
2.1.1. A papillomavírusok virológiai jellemzése	11
2.1.2. A papillomavírusok taxonómiája.....	12
2.1.3. Papillomavírusok okozta megbetegedések.....	13
2.1.4. A papillomavírus fertőzések járványtana	14
2.2. Szarvasfélék delta-papillomavírusai	15
2.2.1. A delta-papillomavírusok és az általuk okozott kórképek	15
2.2.2. A delta-papillomavírusok genomszerveződése	17
2.3. Az őz (<i>Capreolus capreolus</i>)	18
2.3.1. Az őz ökológiája.....	18
2.3.2. Európai őzpopulációk populáció-genetikája	19
3. Saját vizsgálatok – Anyag és módszer	23
3.1 Kórtani vizsgálatok.....	23
3.1.1. Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása	23
3.1.2. Szövettani vizsgálat	23
3.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat.....	24
3.1.4. In situ DNS hibridizáció	24
3.2 Virológiai vizsgálatok	26
3.2.1. Mintavétel, minták kezelése, tárolása, DNS kivonás.....	26
3.2.2. Víruskimutatás polimeráz láncreakcióval (PCR)	26
3.2.2.1 Primer tervezés	26
3.2.2.2 PCR.....	27
3.2.2.3 Szekvencia-meghatározás	28
3.2.3. Vírus-genom szekvencia-meghatározás	28
3.2.3.1 Primer tervezés	28
3.2.3.2 Pap2 PCR	29
3.2.3.3 Szekvencia-meghatározás	30
3.2.4. Teljes genom amplifikáció és klónozás.....	30
3.2.4.1 Az RCA reakció	30
3.2.4.2 Restriktív enzim emésztés	31
3.2.4.3 Vírus DNS molekuláris klónozása	31
3.2.4.4 A plazmid DNS tisztítása	32
3.2.5. Filogenetikai vizsgálatok.....	32

3.2.6. A vírusgenom jellemzése, bioinformatikai vizsgálatok.....	33
3.2.7. Vírus-genom kópiaszám meghatározása daganatszövetben RT-PCR-rel	33
3.3 Ökológiai és járványtani vizsgálatok	35
3.3.1. Kérdőíves felmérés	35
3.3.2. Külföldi előfordulási adatok gyűjtése.....	36
3.3.3. Adatkezelés és eredmény összegzés	36
3.3.4. Térinformatikai vizsgálatok	37
3.3.5. Statisztikai módszerek	37
4. Eredmények.....	39
4.1 Kórtani vizsgálatok.....	39
4.1.1. Kórbonctan és kórszövettan	39
4.1.2. Immunhisztokémia és in situ hibridizáció	41
4.2 Virologiai vizsgálatok.....	42
4.2.1. Delta-papillomavírusok kimutatása PCR vizsgálattal szarvasfélékből.....	42
4.2.2. A teljes őz papillomavírus (CcPV1) genom-szekvencia és felépítésének leírása	45
4.2.3. A CcPV1 replikációt és transzkripciót szabályozó elemeinek jellemzése	47
4.2.4. Papillomavírus törzsfá rekonstrukció	48
4.3 Ökológiai és járványtani vizsgálatok	51
4.3.1. Az őz papillomatózis elterjedése Magyarországon	51
4.3.2. Az előfordulás predikciója.....	53
4.3.3. Európai előfordulás.....	56
4.4 A gímszarvas-papillomavírus	56
4.4.1. Járványtani és kórtani eredmények	56
4.4.2. A kimutatott vírus-DNS jellemzése	59
4.5. Új tudományos eredmények	62
5. Következtetések és javaslatok.....	63
5.1. Kórtan.....	63
5.2. Virologiai vizsgálatok	63
5.3. Ökológia és járványtan	64
6. Összefoglalás.....	69
7. Summary.....	71
M.1 Irodalomjegyzék.....	73
M.2 Kérdőív - kísérőlevél	82
M.3 Kérdőív - ábra.....	83
M.4 Kérdőív - űrlap	84
Köszönetnyilvánítás	85

Rövidítések

bp	base pair	bázispár
BPV1	Bovine papillomavirus 1	1-es típusú szarvasmarha-papillomavírus
CcPV1	Roe deer papillomavirus	őz-papillomavírus
CePV	Red deer papillomavirus	gímszarvas-papillomavírus
DPV	Deer papillomavirus	fehérfarkú szarvas papillomavírus
DFI	disease frequency indicator	betegség előfordulási-gyakoriság érték
DNS	deoxy-ribonucleic-acid	dezoxiribonukleinsav
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	dezoxi-ribonukleotid trifoszfát
E2BS	E2 binding site	E2 kötőhely
EEPV	European elk papillomavirus	jávorszarvas-papillomavírus
HE	hematoxin-eozin	hematoxin-eozin
IHC	immunohistochemistry	immunhisztokémia
ISH	in-situ hybridisation	in situ hibridizáció
kb	kilobase	kilobázis
MHC	major histocompatibility cComplex	fő hisztokompatibilitási komplex
mRNS	messenger ribonucleic acid	messenger ribonukleinsav
mtDNS	mitochondrial DNA	mitochondriális DNS
nt	nucleotide	nukleotid
OÁI	Central Veterinary Institute	Országos Állategészségügyi Intézet
OPV1	Ovine papillomavirus 1	1-es típusú juh-papillomavírus
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PBS	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
pRB	retinoblastoma protein	retinoblastoma fehérje
RCA	rolling circle amplification	
REPV	Reindeer papillomavirus	rénszarvas-papillomavírus
RNS	ribonucleic-acid	ribonukleinsav
VGE	game management unit	vadgazdálkodási egység

1. Bevezetés, célkitűzések

A vadon élő állatok betegségeinek, kórokozóinak, illetve parazitáinak elterjedését és a szabadon élő gazdapopulációkra gyakorolt valós hatását a legtöbb esetben igen nehéz pontosan felmérni. Ez fokozottan érvényes az olyan megbetegedésekre, amelyek nem okoznak tömeges elhullásokat, mint például a legtöbb daganatképződéssel járó kórkép. Itt érdemes még megemlíteni a vadbetegségek azon sajátosságát, hogy a mintagyűjtési és módszertani problémákkal nehezített, sikeres oktani vizsgálatok utáni járványtani vizsgálatokat ismét ugyanezek a problémák hatványozottan hátráltatják.

A megfelelő számú és minőségű minta begyűjtésének gyakorlati nehézségeit jó esetben még megelőzi a mintaszám meghatározáshoz szükséges populációnagyság becslés, ami igen gyakran egyáltalán nem egyszerű feladat. A ritka, illetve fajspecifikus kórokozók és paraziták esetében ritkán állnak rendelkezésre megfelelő diagnosztikai (elsősorban szerológiai) módszerek a járványtani vizsgálatokhoz, de még a gyakoribb (szélesebb gazdaspektrumú, háziállatokban is jelentős) kórokozók és paraziták vizsgálatára kifejlesztett és közforgalomban levő tesztek sem alkalmazhatók validálás hiányában, illetve fajspecifikusságuk miatt. A molekuláris genetikai eszköztár univerzális alkalmazhatósága és a releváns genetikai adatok túlnyomó részének internetes hozzáférhetősége viszont igen hatékony segítséget jelent a fenti feladatok legalább részbeni megoldásában.

A vadon élő állatokban nagyobb gyakorisággal előforduló daganatos elváltozások túlnyomó hányadáról bebizonyosodott, hogy oktanukban komoly szerepet játszanak a vírusfertőzések. Ezek a megbetegedések leginkább fajspecifikusak és gyakran endémiásak, azaz egy-egy földrajzilag is behatárolható populációra jellemzőek. A legismertebb ilyen kórképek a szarvasfélék papillomavírusok okozta bőrdaganatai (Sundberg és mtsai, 2001), a tengeri teknős fajok herpeszvírus fertőzéshez társult fibropapillomatózisa (Lackovich és mtsai, 1999), az erdei mormoták hepatitis vírus (woodchuck HV, WHV) okozta hepatocelluláris carcinomája (Tyler és mtsai, 1981), a gyapotfarkú nyúl Shope fibroma vírus (himlővírus) okozta fibrómája (Robinson és

Kerr, 2001), stb.. A halmozódó tendenciát mutató daganatos megbetegedések esetében természetesen az ember okozta környezetszennyezés, radioaktív sugárzás, stb. oktatni szerepét is mérlegelni kell. Az esetek nagy részében viszont ezek nem nevezhetők közvetlen kóroknak, ám az egyéb ökológiai, járványtani és környezeti stresszrel együtt, hajlamosító tényezőként már jelentősebbek lehetnek.

A magyarországi őzállományok egy részében rendszeresen előforduló, halmozódó daganatos jellegű bőrelváltozásokat lehet megfigyelni. Kocsner (1996) és saját korábbi vizsgálataink szerint a kérdéses elváltozás, a többi szarvasféle bőrdaganatos kórképéhez hasonlóan, a bőr hámrétegéből kiinduló jóindulatú, kötőszövet-szaporodással járó, vírusos eredetű fibroma illetve fibropapilloma.

A vadgazdálkodók a megbetegedéssel járó szemetűnő bőrelváltozásokat igen taszítónak találják (nem ritka a férfőkölnyi daganat sem) és időnként a közvéleményt is foglalkoztatja a probléma. A betegség oktatni illetően ilyenkor laikusok és egyes szakemberek körében is előtérbe kerülnek a találgatások, amelyek elsősorban a környezetszennyezés, így például egyes hulladékégetők hatásának, vagy a csernobili balesetből származó sugárfertőzés (Takács és Nagy-Bozsoky, 1998) következményének vélik a kórt. Ezzel ellentétben, szakmailag minden érv a vírusos eredet mellett szól. A papillomavírusokra általában jellemző fajspecifikusságból és az elváltozások jellegéből kiindulva feltételeztük, hogy az őzek megbetegedésének kórokozóját a Delta-papillomavírus genusban, a többi szarvas faj fibropapillomatózist okozó vírusának közvetlen rokonságában kell keresni.

A papillomavírusok evolúcióját sokáig szinte kizárólagosan gazdafajhoz kötött (koevolúciós) folyamatnak tartották (Bernard, 1994; Rector és mtsai, 2007), így vírusaik genetikai vizsgálata a szarvasfélékkel kapcsolatos, részben a mai napig nyitott, filogenetikai és evolúciós kérdések megválaszolásához (Pitra és mtsai, 2004) is fontos adatokat szolgáltat. Ismert, hogy a humán papillomavírusok bizonyos csoportjai rosszindulatú daganatok kialakulásában is szerepet játszanak (zur Hausen, 2002), így a *Papillomaviridae* család többi tagjának megismerése (génállomány, génszerkezet és pathogenitás) összehasonlító kutatások alapjául is szolgál, melyek célja az emberi

megbetegedések pathomechanizmusának feltárása és a védekezés ill. gyógyítás lehetőségeinek felkutatása. Hosszú időn keresztül, az egyik legfontosabb ilyen modell egy delta-papillomavírus, a szarvasmarhák papillomavírusa (BPV1) volt (Campo, 2002).

A szarvasfélék bőrpapillomatózisának járványtanáról nagyrészt csupán feltételezéseink vannak. Feltehetően vérszívó rovarok és a bőr hámrétegének mechanikai sérülései játszanak szerepet a kórokozó terjesztésében (Sundberg és Nielsen, 1981). A betegség, illetve az elváltozások valószínűleg önkorlátozó jellegűek, azaz az elváltozások a kialakuló immunitás hatására gyógyulnak. Ezt a természetes folyamatot viszont külső tényezők, mint pl. a növekvő stressz, vektor- és gazdapopuláció sűrűség, stb. negatívan befolyásolhatják és az esetek halmozott előfordulásához vezethetnek. Emiatt ez a betegség, indikátorként, az őzállományok illetve élőhelyeik egyes komponenseinek minőségét, állapotát is jellemezheti.

Az őz (valamint a gímszarvas) fibropapillomatózis átfogó jellemzéséhez, a fentiekben vázolt kérdéskörök tisztázására, a következő kutatási célkitűzéseket fogalmaztam meg:

Az őz papillomavírus:

- leírása, teljes genomjának meghatározása
- a genom filogenetikai elemzése
- különböző előfordulási helyekről származó izolátumok összehasonlítása
- elterjedtségének felmérése Magyarországon
- kórtanának és jelentőségének vizsgálata
- elterjedését befolyásoló tényezők elemzése

Valamint összehasonlító céllal:

- a gímszarvas fibropapillomás elváltozásának és oktanának jellemzése

A kutatási téma valamennyi elemét, a kérdésfeltevésektől a módszertanig, saját koncepcióm alapján állítottam össze és a vizsgálatok túlnyomó többségét is önállóan végeztem, de azokhoz nélkülözhetetlen gyakorlati és konzultációs segítséget nyújtottak későbbi szerzőtársaim. Emiatt dolgozatom további részeit többes szám első személyben írom.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A papillomavírusok

2.1.1. A papillomavírusok virológiai jellemzése

A papillomavírusok gazdaspecifikus, epitheliotrop, nem-burkos, ikozahedrális virion-szerkezettel rendelkező, 50-55 nm átmérőjű vírusok, amelyeknek 7,4-8,6 kb hosszúságú, dupla szálú DNS genomjuk van. A papillomavírusok széles gazdaspektrummal rendelkeznek a gerinces állatok körében, és daganatképződéssel-járó hámelváltozásokat okoznak számos emlős- és néhány madárfajban (Sundberg és mtsai, 2001), valamint hullókben (Herbst és mtsai, 2009). A papillomavírusok és az általuk okozott daganatok különösen kérődzőkben és emberekben gyakoriak.

Az orvosi kutatások a humán papillomavírusokra összpontosítanak és részben nyilván ennek következménye az, hogy mai ismereteink szerint az ember papillomavírusai a legszámosabbak és biológiai tulajdonságaikat tekintve is a legváltozatosabbak. A következő, nagyszámú ismert papillomavírust hordozó gazdafaj csoport a kérődzők. Jelenleg három elfogadott kérődző-specifikus papillomavírus genust (*Deltapapillomavírus*, *Epsilonpapillomavírus*, *Xipapillomavírus*) különítünk el (de Villiers és mtsai, 2004), de a BPV-7 (Ogawa és mtsai, 2007) szintén önálló genusba sorolható, ahogyan a nyálkahártya papillomát okozó pudu, sörényes szarvas és kameruni törpekecske papillomavírus alkotta különálló csoport is (Gottschling és mtsai, 2008). A *Deltapapillomavírus* genus öleli át a legszélesebb gazdaspektrumot, mivel az ide sorolt vírusok juhban, szarvasmarhában és szarvas-fajokban is okoznak bőrdaganatokat (Bernard és Chan, 1997; Sundberg és Lancaster, 1988).

A papillomavírusok teljes egészében a gazdasejt replikációs mechanizmusát hasznosítják, így valamennyi fehérjéjük, valamint genomjuk egyes szakaszai ennek manipulálására szelektálódott. Emiatt is jellemző erre a víruscsoportra az igen alacsony változékonyság és mutációs ráta (Rector és mtsai, 2007). A papillomavírusok kialakulásának evolúciós mechanizmusai a gazdafajhoz kötött evolúció (koevolúció), a rekombináció (pl. alfa-papillomavírusok esetében (Varsani és mtsai,

2006)), a gazdaváltás és a diverzifikációt nagyban előmozdító adaptív speciáció („adaptive radiation”).

2.1.2. A papillomavírusok taxonómiája

Nehezen tanulmányozható biológiai tulajdonságaik miatt, azaz a vírusizolálás, illetve az in vitro vírus-izolálás megoldatlansága miatt, a papillomavírus csoport volt az egyik legelső, amely taxonómiai jellemzése kezdetektől genomiális DNS-ük tanulmányozásán, majd nukleotid szekvenciáik meghatározásán és elemzésén alapult. A papillomavírus izolátumok hagyományos elnevezése a „típus” („type”) volt, majd a rendszerező kritériumok kialakulásával definiálták a többi rendszertani egységet is, amelyek közül legmagasabb szinten a *Papillomaviridae* család, majd a görög betűkkel jelölt nemzetségek (pl. *Deltapapillomavirus* genus) és az egyes vírusfajok (pl. Deer papillomavirus; DPV), illetve típusok, altípusok és variánsok találhatóak. Az 1998-ig érvényes vírus taxonómiában még egységes *Papovaviridae* családba sorolták a polyoma és a papilloma vírusokat is, de e besorolás tarthatatlanná vált a két víruscsoport genom nagyságának és szerveződésének megismerése után.

Az International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) meghatározta az egyes taxonómiai kategóriákba való besorolás feltételeit, amelyhez némileg leegyszerűsítve, elsősorban az L1 (nagy kapszid fehérje) ORF (open reading frame) szekvenciák nukleotid-azonosságának szintjét vették alapul. Azonos genusba azok a vírusok sorolhatók, amelyek a többi genus tagjaival való összehasonlítás során 60%-nál kisebb L1 ORF, a teljes genom szintjén pedig 23-43% közötti szekvencia azonosságot mutatnak. Önálló papillomavírus fajként, azaz az azonos genusba tartozó vírusoktól elkülönülően definiálhatók a 70% alatti L1 ORF nukleotid azonosságot mutató vírustörzsek, míg előlött egymással rokon típusokról beszélhetünk (deVilliers, 2004). Az új gazdafajokból izolált papillomavírus törzsek illetve fajok azonosítására a gazdafaj tudományos (latin) nevét (rövidítés esetén kezdőbetűit és a „PV” végződést) és a papillomavírus elnevezést alkalmazzuk, több elkülönülő izolátum esetén számmal kiegészítve [pl. Uncia uncia papillomavirus 1 (UuPV1)].

A jelenleg hivatalos besorolási rendszernél kevésbé mechanisztikus a több, hasonló evolúciós rátával rendelkező, ORF szekvenciára épülő, statisztikai módszerekkel kiegészített filogenetikai vizsgálatokra alapozott javasolt vírustaxonómia (Bravo és Alonso, 2007; Gottschling és mtsai, 2007), amely egyben alkalmas a papillomavírusokra ható evolúciós mechanizmusok feltárására, és az egyes taxonok funkcionális jellemzőinek (pl. elszarusodó vagy nem-elszarosodó hám preferencia) behatárolására is.

2.1.3. Papillomavírusok okozta megbetegedések

A papillomavírusok a nyálkahártyákon és a bőrön, hámrétegből kiinduló, körülírt daganatokat okoznak. A fertőzés kialakulásához a vírusnak a hámba, lehetőség szerint a stratum basale-ba kell bejutnia ahhoz, hogy daganatos transzformáció alakuljon ki. A változó mennyiségű kötőszövetes komponens alapján ezek a daganatok papillomák, fibropapillomák illetve fibromák (fibroma molle és durum) lehetnek. Jellemzően a papillomavírusok jóindulatú daganatokat indukálnak, de ez alól kivételt képeznek az emberi méhnyak-rákot okozó alfa-papillomavírusok. A fibromákat és fibropapillomákat okozó papillomavírusok közvetlenül a bőrön keresztül bejutva fertőzik meg a fogékony gazdaállatot, ahogyan azt kísérleti fertőzésekkel is bizonyították (Shope, 1955; Shope és mtsai, 1958; Sundberg és mtsai, 1985a). A vírus a hám felső rétegein átjutva, a stratum basale sejtjeiben kezd replikálódni és fibroblast sejtek proliferációját indukálja a bemeneti kapuban (Sundberg és Nielsen, 1981). Ily módon, a fertőzés következtében a testfelület bármely részén kifejlődhetnek a jól elkülönülő bőrdaganatok. A fehér farkú szarvas fibrómák epidermisében gyakran alakul ki acanthosis, hyper- és parakeratosis, míg az irharétegben a daganat fő tömegét alkotó polygonális fibroblastok nagy mennyiségű kollagént termelnek (Sundberg és Nielsen, 1981; Sundberg és mtsai, 1985b). A fibrómák jóindulatú daganatok, amelyek ritkán képeznek áttétet, és általában kevésbé befolyásolják a fertőzött egyed kondícióját (Shope és mtsai, 1958; Sundberg és Nielsen, 1981).

Eddigi ismereteink szerint az őzek fibropapillomatózisa minden fontos kórtani jellemzőjében megfelel a fent leírtaknak. A többszörös, változatos nagyságú, jóindulatú bőrdaganatok túlnyomórészt a végtagokon és a fejen fordulnak elő. A daganatok tömött tapintatúak és szalonnás fényű kötőszövetből állnak, amit kollagén rost mátrixba ágyazott fibroblastok és fibrocyták alkotnak (Kocsner, 1996).

2.1.4. A papillomavírus fertőzések járványtana

A papillomavírusok többnyire közvetlen érintkezéssel terjednek, így a szociális illetve a nemi kontaktus egyaránt alapvető fontosságú a bőrön, valamint az emésztő- vagy ivarszervek nyálkahártyáin élő papillomavírusok járványtanában. A viszonylag szoros kontaktus szükségessége nagyban meghatározza a papillomavírusok járványtani jellemzőit. Mindez jól összegeződik a fertőzések endémiás jellegében és az egyes jól definiálható gazda-populációkban előforduló vírustörzsek jellegzetes összetételében (Ho és mtsai, 1993).

A szarvasfélék bőr fibropapillomatózisának járványtanában a vérszívó rovarok vektor szerepe (Sundberg és Nielsen, 1981) is felmerül, és potenciálisan a bőr hámrétegének mechanikus sérülései is fokozottan hajlamosítanak a fertőzés kialakulására. A fertőzött gazdaszervezet a papillomavírusok ellen egyrészt celluláris immunválaszt alakít ki, amely elsősorban a dagantok regressziójában játszik szerepet, másrészt a fertőzés során létrejövő humorális immunválasz megakadályozza az ismételt fertőzéseket (Nicholls és Stanley, 2000). A betegség átvészélése utáni immunitás jellege és hatékonysága szarvasfélék esetében nem ismert pontosan. Elsősorban a daganatok kialakulásának és regressziójának időtartamát kellene ismernünk a járványmenet és a betegség ökológiájának pontosabb feltérképezéséhez.

2.2. Szarvasfélék delta-papillomavírusai

2.2.1. A delta-papillomavírusok és az általuk okozott kórképek

A delta-papillomavírusok közös jellemzője, hogy a fertőzött állatok bőrén fibroma vagy fibropapilloma jellegű daganatképződést indukálnak (Sundberg és Lancaster, 1988). Jelenlegi ismeretek szerint a genus legtöbb tagja igen szűk gazdaspektrumú, az EEPV (European elk papillomavirus), REPV (Reindeer papillomavirus) és OPV (Ovine papillomavirus) csak egy fajt fertőz, a BPV (Bovine papillomavirus) a szarvasmarhán kívül ló sarcoidokból is kimutatták, míg a DPV (Deer papillomavirus) fertőzést elméletileg több rokon fajból is kimutatták.

Amerikában és Európában egyaránt számos, a szarvasfélék családjába (*Cervidae*) tartozó fajban számoltak be papillomavirus fertőzéshez társuló fibropapilloma, papilloma vagy fibroma képződésről. A betegséget először Shope írta le 1955-ben fehér farkú szarvasban (*Odocoileus virginianus*), amit későbbi közlemények is megerősítettek (Shope, 1958; Lancaster és Sundberg, 1982). További vírusos eredetű bőrdaganatok kerültek leírásra öszvérszarvason (*Odocoileus hemionus*), (Lancaster és Sundberg, 1982), európai jávorszarvason (*Alces alces*) (Moreno-Lopez és mtsai, 1981), rénszarvason (*Rangifer tarandus*) (Moreno-Lopez és mtsai, 1987), gímszarvason (*Cervus elaphus*) (Moar és Jarrett, 1985; Sundberg, 1987) és végül őzekben is (Kocsner, 2001). Eddig öt szarvas faj papillomavírusának teljes genomja került közlésre (Groff és Lancaster, 1985; Ahola és mtsai, 1986; Stenlund és mtsai, 1983; Moreno-Lopez és mtsai, 1987; Gottschling és mtsai, 2008).

A legismertebb és legnagyobb elterjedésű szarvas PV az elsősorban fehér farkú szarvast fertőző DPV Észak Amerikában (Shope, 1958; Sundberg és Lancaster, 1988). Feltételezhetően ugyanez a vírus betegíti meg az azonos elterjedési területen élő közeli rokon fajokat is, az öszvérszarvast és a fekete-farkú szarvast (*Odocoileus hemionus*) is (Sundberg és Lancaster, 1988). Az európai jávorszarvas papillomavírusa (European elk papillomavirus, EEPV) a következő, nagyobb területen elterjedt szarvas PV, amely bőrdaganatokat (Borg, 1975) és a DPV-hez

hasonlóan (Koller és Olson, 1971), gócos tüdő-fibromatózist is okoz (Moreno-Lopez és mtsai, 1986) a skandináv jávorszarvas populációkban.

A DPV járványtanának vizsgálata azt valószínűsíti, hogy ezek a PVk direkt kontaktus és vérszívó ízeltlábú vektorok útján terjednek a vadon élő szarvas populációkban (Sundberg és Nielsen, 1981). A DPV okozta megbetegedést önkorlátozó jellegűnek tekintik, és elsősorban a fiatal állatokat érinti. Ezzel ellentétben, az EEPV okozta megbetegedés idősebb jávorszarvasokban gyakoribb (Sundberg, 1987).

Az őzek fibropapillomatózisa (Takács és Nagy-Bozsoki, 1998; Kocsner, 2001) az észak amerikai szarvasfélék DPV fertőzése és a svédországi jávorszarvasok EEPV fertőzése által okozott jellegzetes bőrdaganatokhoz hasonló elváltozások kialakulásával járó endemiás megbetegedés, amely a Kárpát-medence őz-populációiban fordul elő. Eddig Magyarország valamennyi régiójában, Ausztria keleti területein (Theodora Steineck személyes közlés), Horvátország északi csücskében (Salajpal és mtsai, 2006), valamint Szlovákia délnyugati részén (Rajský és mtsai, 2009a, 2009b) fordult elő a megbetegedés.

Az őzek fibropapillomatózisáról az első beszámolók az 1960-as évekből származnak (Kocsner, 1996), de a betegséggel kapcsolatos ismeretek első leírására az elmúlt évtizedben került sor (Kocsner, 1996). Kocsner (2001) három fertőzési gócról számol be Magyarországon és a betegség prevalenciáját 1,1%-ra becsüli egy intenzíven monitorozott őzpopulációban. Takács és Nagy-Bozsoki (1998) egy negyedik fertőzési gócot is azonosított az Alföldön 1996-ban. Az őz fibropapillomák kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatával papillomavírus antigén jelenlétét először Kocsner (2001) mutatta ki az elváltozásokban.

Fibropapillomák szórványos előfordulásáról gímszarvasokban is beszámoltak Magyarországon (Hönich és mtsai, 1978) valamint Európa néhány más országában is (McDiarmid, 1975; Moar és Jarrett, 1985; Pérez és mtsai, 2002; Rajský és mtsai, 2009c). Ezek valamennyi esetben szoliter, vagy csak néhány daganat kialakulásával járó formában és igen ritkán, szórványosan fordultak elő.

2.2.2. A delta-papillomavírusok genomszerveződése

A delta-papillomavírusok cirkuláris, duplaszálú DNS genomja 8,0-8,4 kb hosszúságú. A vírusgenom a papillomavírusokra jellemző módon funkcionálisan három fő részre tagolható: korai és kései fehérjéket kódoló szakasz, valamint a nem-kódoló szabályozó régió. A delta-papillomavírus genomokban összesen kilenc fehérje kódoló ORF található, amelyek mind azonos leolvasási irányúak, és részben, vagy teljesen átfedhetik egymást, mivel más leolvasási keretben helyezkednek el.

A korai régióban a vírus transzkripciót és replikációt szabályozó fehérjéket kódoló ORF-ek (E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9) találhatóak. Ezek közül az E1 és az E2 valamennyi papillomavírusban jelen van. Az E6 ORF minden papillomavírus genom része, ez alól kivételt képeznek a madár papillomavírusok és néhány emlős papillomavírus, amelyekben hasonló funkciójú homológ, illetve nem homológ felépítésű ORF-ek találhatóak. Az E6 ORF anti-apoptotikus hatását a p53-as tumor szupresszor fehérje megkötésével éri el és a sejtek proliferációját szabályozó rendszert is befolyásolja (Mietz és mtsai, 1992). Az E7 fontos onkogén szerepet tölt be, amit a pRB (retinoblastoma protein) megkötésével valósít meg, és ezáltal megakadályozza annak kölcsönhatását az E2F-1 transzkripció faktorral, ami többek között a sejt replikációs géneinek aktiválódását eredményezi (Münger és mtsai, 2001). A delta-papillomavírusok E7 ORF-jéből viszont hiányzik a pRB-kötő hely, ami az E5 ORF funkciójával együtt kapcsolatba hozható a fibroma kialakulással, azaz a fibroblasztok transzformációjával (Narechania és mtsai, 2004). Az E5 ORF a gazdasejt transzformációjának egyik legfontosabb résztvevője (Petti és Ray, 2000), míg az E4 ORF fő funkciója a sejt osztódási ciklusainak szabályozása (Nakahara és mtsai, 2002).

A kései fehérjéket kódoló szakaszon az L2 és az L1 ORF található. Az L1 a nagy, az L2 pedig a kis kapszid fehérjét kódolja. Érdekes módon a valamennyi papillomavírusban előforduló „törzs” ORF-ek között az L1 az egyik legkonzervatívabb, míg az L2 az egyik legváltozékonyabb. Az L1 fehérjéje a papillomavírusok egyik legfőbb antigénje, amely önmagában spontán módon is összeépülhet. Így az in-vitro expresszált L1 fehérjékből összeálló vírusszerű képletek sikeresen

alkalmazhatók papillomavírus vakcinaként. Az L2 fehérje egyik fő szerepe a sejtbe való bejutás után a virion felnyitása és a vírus DNS „kiszabadítása”, amihez előzőleg egy intracelluláris enzimes (furin) hasítás szükséges.

A hosszú szabályozó régió (long control region, LCR) vagy más néven untranslated regulatory region (URR) nem kódol fehérjét, hanem a papillomavírusok transzkripció és transzláció mechanizmusának szabályozó elemeit tartalmazza. Ezek közül a legfontosabbak a vírus replikációs origója, valamint az mRNS-ek polyadenilációs helyei (AATAAA).

2.3. Az őz (*Capreolus capreolus*)

2.3.1. Az őz ökológiája

Az őz (*Capreolus capreolus*), a szarvasfélék egyik legsikeresebben alkalmazkodó képviselője, amely az utolsó jégkorszak utáni európai térfoglalás óta a mai napig sikeresen képes alkalmazkodni a környezeti változásokhoz (Andersen és mtsai, 1998). Az élőhelyi változások azonban egyre nagyobb mértékben befolyásolhatják az európai populáció életét. A várható negatív hatású tényezők közül talán a földrajzi és genetikai elszigetelődés, azaz a populációk felaprózódása a leglényegesebb (Danilkin és Hewison, 1996). Ez elsősorban a növekvő emberi sűrűség, a változó mezőgazdasági gyakorlat és az infrastruktúra-fejlesztés (pl. autópálya építés) következménye lehet.

Magyarország őzállománya igen jelentős, több mint 350000 egyedre tehető. A populáció aránylag egyenletes eloszlású az ország egész területén, de a populáció-sűrűség a síkvidéki területeken a legnagyobb, és a hegyvidékeken a legkisebb. Az őzállomány fenotípusos differenciálódása tetten érhető az erdei őz – síkvidéki őz viszonylatban, illetve részben a trófeaminőség területenkénti alakulásában, amely természetesen sok tényező együttes hatásának tudható be (Csányi és Lehoczki, 2007).

2.3.2. Európai őzpopulációk populáció-genetikája

Az európai őzpopulációk genetikai jellemzőit számos szemszögből és több módszerrel is vizsgálták. Egy-egy gazdafaj parazitákkal (pl. vírusokkal) szembeni fogékonyságát, a paraziták virulencia fokát legalább részben genetikai tényezők határozzák meg. Így az őz-papillomavírus elterjedésének és ökológiájának vizsgálata során sem kerülhető meg a kórokozó genetikai jellemzése mellett a gazdafaj genetikai jellemzőinek áttekintése.

Mikroszatellita polimorfizmus

Coulon és szerzőtársai (2004) összesen 648 franciaországi őzmintát felölelő 12 mikroszatellita marker vizsgálata igen alacsony (0,02) általános populáció heterozigotitást állapított meg, amit nem túl régi keletű alapító hatás okozhatott. 2006-os közleményükben (Coulon és mtsai, 2006) már 1148 egyed között mért genetikai távolságokat viszonyították a terület földrajzi adottságaihoz és megállapították, hogy a földrajzi akadályok (autópálya, folyók és csatornák) alacsonyabb „génáteresztő képességük” folytán szerepet játszanak a vizsgált őzpopuláció genetikai strukturálódásában.

Mitochondriális DNS

Verneszi (2002) a mitochondriális DNS kontroll-régiójának első hipervariábilis fragmensének 160 állatból származó szekvenciáját összehasonlítva 49 különböző haplotípust és 41 polimorf bázishelyet talált a vizsgált 342 bp hosszú DNS szakaszban. A haplotípusokat két nagy csoportba lehetett besorolni. Az A csoport elsősorban a nyugat- és közép-európai, míg a B csoport a kelet-európai populációkra volt jellemző. További 3 alcsoportot (A1, A2, A3) lehetett kialakítani az A csoporton belül. Földrajzilag az A1 csoportba firenzei és arezzoi, az A2 csoportba a Sienából és Castelpolizianoból (pl. az összes *C. capreolus italicus* alfajba sorolt egyedből) származó, az A3 csoportba igen széles területről Spanyolországból, Franciaországból, Norvégiából, Lengyelországból és az Alpokból származó, míg a B csoportba a szlovéniai, szlovákiai, bulgáriai és magyarországi, valamint 3 ausztriai, 1 tarvisi és 1 lengyelországi minta került. Érdekes, hogy a

liguriai minták szintén a B csoportba tartoznak, itt ugyanis az őzpopulációt dokumentáltan betelepítésekkel állították helyre.

A további elemzések alapján megállapították, hogy az európai őzállományban igen nagy a genetikai változatosság, amelynek csupán 40%-a közös a populációk között, a 0,6 körüli Φ_{ST} értékekkel (Vernesi, 2002). Ezek a genetikai változatosság mutatók a legmagasabbak közé tartoznak a szarvasfélék és a patások között. Kialakulásában valószínűleg főleg a suták területhűsége, és részben az újabb keletű élőhely fragmentáció játszhatott szerepet. A nagy változatosság ellenére, az egyes populációk közti genetikai távolságok nem arányosak a köztük levő földrajzi távolságokkal, így ez a tény további magyarázatot igényel. A legvalószínűbb hipotézis szerint ez megmagyarázható a késő pleisztocén jégkorszakok során létrejött elszigetelődéssel és az európai kontinensnek ezen beszűkült menedékterület(ek)ről való rekolonizációjával. Az elmélet alapján a kutatások eredményei a három elkülönülő déli területről (Ibéria, Itália és Balkán) való, körülbelül 135000 évvel ezelőtti újratelepülést valószínűsítik.

Randi és szerzőtársai (2004) 704 őz-minta mitochondriális DNS (mtDNS) kontroll-régióját szekvenálták meg, és 617 minta 11 autoszomális mikroszatelitáját (STR) genotipizálták. Az elemzés szerint a mtDNS szekvenciák három nagy, jól elkülönülő csoportot alkottak: 1. Nyugati csoport (ibériai minták), 2. Keleti csoport (görögországi és balkáni minták), 3. Központi csoport (Európaszerte elterjedt, ideértve a keleti országokat és az Ibériai-félszigetet, Görögország kivételével). Ezek a csoportok az utolsó, illetve utolsó előtti jégkorszak alatt alakulhattak ki az Ibériai-, illetve a Balkán-félszigeten. A keleti és a nyugati csoport csak kevésbé járult hozzá a jelenlegi közép európai mtDNS diverzitáshoz, amely területet a központi csoport haplotípusai népesítették be. Ugyanezen a csoporton belül önálló alcsoportot alkottak az olaszországi *C. c. italicus* alfaj egyedei.

Lorenzini és Lovari (2006) két mitochondriális génszakasz (D-loop és ND1) PCR amplifikáció utáni restriktív enzim emésztéssel kapott DNS fragmens polimorfizmus alapján az általuk vizsgált mintákat két fő csoportba tudta sorolni: 1. Dél- és kelet-európai (közép és dél

Olaszország, Görögország, Törökország, Ausztria, Románia, Litvánia és Lengyelország), 2. Nyugat, közép és észak európai (Ibériai félsziget, keleti Olasz Alpok, Franciaország, Dánia és Svédország).

Egy másik vizsgálatban Randi és mtsai (1998) mitochondriális DNS kontroll-régiójának polimorfizmusa alapján sikerrel különítették el az ázsiai, ezen belül a szibériai és a mandzsúriai, illetve az európai őz (*Capreolus pygargus* és *C. capreolus*) populációkat is.

MHC polimorfizmus

A fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) széleskörű és igen változatos élettani szerepet tölt be valamennyi gerinces fajban. Igen fontos funkciója van az immunfolyamatokban, a szervezet mikro- és makroparaziták elleni védekezésében, a különböző MHC genotípusú fajtársak elkülönítésében (rokon felismerés illetve párválasztás), valamint ismert az MHC polimorfizmus pozitív hatása az általános fitnesszre, illetve a fiatalok túlélésére stb.

Ez a rendszer, a korábbiakban taglalt szelekciós szempontból általában semleges genetikai markerektől eltérően, pozitív szelekció tárgyát képezi valamennyi természetes populációban. Működésének alapja ugyanis az igen nagyfokú variabilitás, de az egyes élőhelyekhez, környezeti viszonyokhoz, parazitás nyomáshoz való alkalmazkodás következtében a megfelelő allélok lokálisan szelekciós előnyt élveznek. Ennek következtében a populációk finomabb felbontású differenciálódása figyelhető meg az MHC, mint például a mikroszatellita lokuszok polimorfizmusa alapján.

Mikko és szerzőtársai (1999) az MHC II DRB lokuszának polimorfizmusát vizsgálta pézsmatulok (Kanada, Grönland), jávorszarvas (Svédország, Norvégia, Kanada, Alaszka), őz (Svédország, Norvégia), rénszarvas (Svalbard, Norvégia), dóm (Svédország, Norvégia) és gím (Norvégia) mintákból. Teljes monomorfizmus jellemezte a pézsmatulok és dóm mintákat. Mérsékelt polimorfizmust találtak a Svalbaddról származó jávor- és rénszarvas, illetve az őz minták között, míg az amerikai bölény, juh, kecske, szarvasmarha, gím és a norvégiai rénszarvas minták közepes, illetve erős DRB diverzitást mutattak. A jávorszarvasban, őzben és dómokban mért alacsony fokú

MHC diverzitás kapcsán a szerzők felhívják a figyelmet az első két faj múlt századi drámai populáció növekedésére.

Magyarországi őzállományok összehasonlító populációgenetikai jellemzéséről csupán Ernhaft 1996-os közleménye érhető el. Kutatásai során négy állományból (Gödöllő (dombvidék), Pély, Gyomaendrőd, Nagyszénás (síkság)) 83 egyed enzimeinek (malic enzyme (ME), izocitrát-dehidrogenáz (IDH), savanyú foszfatáz (ACP), hexokináz (HK), glutamát-dehidrogenáz (GDH), kataláz (CAT)) polimorfizmusát vizsgálta keményítő gél elektroforézises módszerrel. A polimorfizmus és a heterozigotitás magasabb volt a síkvidéki populációkban. A genetikai változatosság az ME, IDH és GDH enzimeknél volt a legmagasabb, a kataláz esetében viszont csupán egyetlen fenotípust detektált.

3. Saját vizsgálatok – Anyag és módszer

3.1 Kórtani vizsgálatok

3.1.1. Állatok, mintavétel, minták kezelése, tárolása

Az Országos Állategészségügyi Intézetbe 2004-től 2006-ig, az ország valamennyi részéről beérkezett őz tetemetek vetettük alá teljeskörű diagnosztikai vizsgálatnak (kórbonctan, kórszövettan, bakteriológia, stb). A három éves időszakban 42 őz eset került vizsgálatra, amelyekből kórszövettani vizsgálatra 10%-os pufferolt formalin oldatba gyűjtöttünk mintákat, DNS kivonás céljára pedig -20°C-ra fagyasztottunk le szöveteket. A külföldi fibropapilloma-gyanús elváltozásokból származó mintákat fagyasztott (Ausztria – őz, gím) vagy paraffin blokkba ágyazott szövetminta (Franciaország – őz, gím; Nagy Britannia – dám; Spanyolország - gím), illetve az elváltozásokból kivont DNS (Spanyolország – gím; Horvátország – őz) formájában kaptuk kézhez.

A gímszarvas fibropapillomák vizsgálatát két egyedből származó mintákon végeztük. Alsó Ausztriában 2004-ben ejtettek el egy egy éves, növendék gimbikát, amelyen több pigmentált, esetenként 10x7 cm méretet is elérő bőrelváltozást találtak (1. eset). Az általános tüneteket mutató állatban a kórbonctani vizsgálat során gennyes agyvelő- és agyhártyagyulladást állapítottak meg. Magyarországon 2007-ben a Kaposvári Egyetem bőszenfai szarvasfarmján a rutin, ellenőrző vizsgálat céljára kilőtt, egy éves gím ünő (2. eset) külső vizsgálata során, a has bőrén találtak egy tömött, 6x5 cm nagyságú, ovális képletet (15. ábra).

3.1.2. Szövettani vizsgálat

A 10%-os pufferolt formalinban fixált szövetmintákat paraffin blokkokba ágyaztuk, amelyekből 4 µm vastag metszeteket készítettünk. Minden blokkból 3 metszetet szilánnal (3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA)) kezelt tárgylemezre húztunk. Egy-egy metszetet rutin hematoxilin-eozin festéssel (HE), immunhisztokémiai módszerrel

(IHC) és in situ hibridizációval (ISH) vizsgáltunk. Az egyes metszeteken a szövettani elváltozásokat és az IHC és ISH reakciókat fénymikroszkópos vizsgálattal értékeltük ki.

3.1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat

A vírusantigén daganatszövetben való kimutatására egy új immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk (Erdélyi és mtsai, 2009b). A metszeteket antigénfeltárás céljából 0,1% proteáz XIV oldattal (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) kezeltük 37°C-on 10 percig, majd 3% H₂O₂ oldattal kezeltük 10 percig. A 20 perces 2%-os zsírszegény tejpor-oldatban való inkubálás után egy éjszakán keresztül 4°C-on reagáltattuk a BPV-1 L1 capsid fehérje ellen házinyúlban termelt poliklonális ellenanyagokat (B0580, DAKO, Glostrup, Denmark) a mintával, 40000-szeres hígításban. Az ellenanyag kapcsolódást torna-peroxidázzal jelölt polimerrel (EnVisionTM+ Kit; Dako, Glostrup, Denmark) detektáltuk.

3.1.4. In situ DNS hibridizáció

A vírus genom jelenlétét és annak lokalizációját a daganatszövetben a szövettani metszeteken elvégzett in situ DNS hibridizációval vizsgáltuk. A CcPV1 genom L1 ORF régiójából (nt 6407-6798; EF680235) PCR-rel egy 392 bp hosszú DIG-gel jelölt DNS próbát szintetizáltunk. A művelethez a PCR DIG Probe Synthesis Kit-et (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) használtuk a gyártó protokollja szerint. A próba szintézishez a CcPV1 genom-szekvencia meghatározáshoz is használt (Erdélyi és mtsai, 2008) eredeti Pap2 fragmenst használtuk templátként. A reakcióban használt UPV1 (5'-HATWSARGAYGGDGANATG-3') és UPV2 (5'-CCRTTRTTHHDDCCYTG-3') primer párt eredetileg a delta PVk detektálására terveztük a PRIMER2 (Scientific and Educational Software, Stateline, PA, USA) és a Lasergene szoftvercsomag (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) PrimerSelect programjával. A hibridizációs reakciót a Schwarzscher és Harrison (2000) kézikönyvének "In-situ hybridisation to DNA in cells and tissue sections" protokollja alapján végeztük. Az eljárás során a felhúzott metszeteket a rutin módszer szerint deparaffináltuk, majd 37°C-on 30 perces proteináz K (20 µg/ml) kezelés után 4%

paraformaldehydes fixálásnak vetettük alá 4°C-on 20 percig. Valamennyi metszetet 200 µl hibridizációs pufferrel kezeltük (50% formamid; 2x citrát puffer (SSC); 1 mM Tris HCl, pH 7; 0.1 mM EDTA; 30 ng/µl ssDNS; 10% dextrán szulfát) 2 órán keresztül 42°C-on. A puffert óvatosan lecsepegtettük és a metszetekre 60 µl hibridizációs puffert tettünk, amely 50 ng/µl DIG-gel jelölt DNS próbát tartalmazott. A metszetben található target DNS-t és a rajta levő próbot 95°C-on 10 percig denaturáltuk, majd fokozatos hűtés után 42°C-on egy éjszakán át (20 óra) inkubáltuk nedveskamrában. A metszeteket 2x SSC oldatban öblítettük, majd 45 percig 42°C-on óvatosan rázattuk poszthibridizációs, szigorú hibridizációs körülményekhez alkalmazandó („stringent wash”) oldatban (0.1x SSC; 2 mM MgCl₂; 0.1% Tween 20). A metszeteket végül kétszer 10 percig szobahőmérsékleten mostuk 1x SSC oldatban, majd egyszer 5 percig 1x PBS oldatban. A hibridizációs reakció láthatóvá tételéhez a DIG Nucleic Acid Detection Kittet (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) használtuk a gyártó protokollja szerint, amit metil-zöld oldattal való kontrasztfestéssel zártunk.

3.2 Virologiai vizsgálatok

3.2.1. Mintavétel, minták kezelése, tárolása, DNS kivonás

A kórbonctani vizsgálatok során valamennyi daganatos elváltozást mutató egyedről gyűjtöttünk mintát. A fibropapillomákból steril eszközökkel kimetszett szövetdarabokat eppendorf csövekben - 20°C-on tároltuk feldolgozásig. A homogenizált daganatszövet és bőrmintákból a DNS-t a DNEasy Blood and Tissue Kit-tel (Qiagen) vontuk ki és tisztítottuk a gyártó használati utasításának megfelelően.

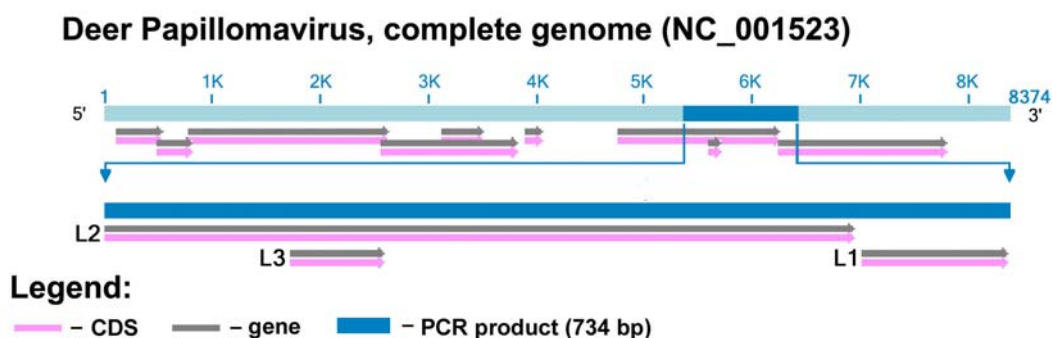
3.2.2. Víruskimutatás polimeráz láncreakcióval (PCR)

Az öz- és a gímszarvas-papillomavírus DNS daganatszövetekből való kimutatására saját tervezésű polimeráz láncreakciót alkalmaztunk (Erdélyi és mtsai, 2008).

3.2.2.1 Primer tervezés

A szarvasfélék delta-papillomavírusainak detektálására alkalmas PCR primer-pár (Pap1f (5'-CTGCAGGCTCGTATGTC-3') és Pap1r (5'-CTGCCTCCKACACCTGTGAC-3')) tervezéséhez az addig ismert három, szarvasfajokból izolált papillomavírus genom teljes nukleotid szekvenciájának (GenBank-i azonosítók: DPV, NC_001523; EEPV, NC_001524 és REPV, NC_004196) illesztésére alapoztuk. Az illesztést a Multalin internetes alkalmazással (Corpet, 1988) készítettük, amelyen a finomításokat és a végleges szerkesztést a BioEdit számítógépes programban (Hall, 1999) végeztük. A primer tervezéshez a PRIMER2 (Scientific and Educational Software) és a Lasergene szoftvercsomag (DNASTAR) PrimerSelect alkalmazását használtuk.

A primereket az L2 és L1 kapszidfehérjét kódoló génszakaszok (ORF) konzervatív szakaszaira terveztük. A felerősített PCR termék az L1 és L2 ORF egymással szomszédos régióit (túlnyomórészt az L2-t) foglalja magába, nagysága körülbelül 730 nukleotid bázis-pár (bp) (1. ábra).



1. ábra: Az L2 és L1 ORF-et átívelő Pap1 PCR termék lokalizációja a DPV genomban.

3.2.2.2 PCR

A vírus DNS daganatokból való kimutatására kifejlesztett Pap1 PCR reakciót 50 µl reakcióelegyben végeztük, amelyben mindkét primerből (Pap1f és Pap1r) 1 µM, 1,5 µl dNTP mix (minden deoxi nukleotid trifoszfátból 10 mM), 2 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 10x REDTaq PCR Reaction Buffer (Sigma-Aldrich), 0,125 egység (2,5 µl) REDTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), és 1 µl templát DNS volt. A kezdeti denaturáció 94°C-on 3 percig tartott, amit 35 amplifikációs ciklus követett a következő paraméterekkel: 95°C 30 másodpercig, 54°C 30 másodpercig és 72°C 45 másodpercig. Az utolsó ciklus után egy további 3 perces elongációs szakasz következett 72°C-on.

A PCR termékeket és a későbbiekben a restrikciós enzimekkel vágott DNS fragmenteket agaróz-gél elektroforézissel választottuk el, várható nagyságuk szerint 0,8–1,0%-os agaróz gélben, ami 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazott. Az elektroforézis horizontális gélrendszerben, 0,5-szörös TBE pufferben történt 180 V feszültséggel. A mintafelvivő puffer 2,5 mg/ml brómfenolkéket és 400 mg/ml szacharózt tartalmazott. Az elektroforézist követően a géleket 302 nm hullámhosszú ultrabolya fényvel megvilágítva tettük láthatóvá a DNS fragmentumokat. Az eredmények rögzítésére video kamerát és a Grab-IT számítógépes programot (Synoptics Ltd., Cambridge, UK) használtunk. A keletkezett fragmentumok méretét a párhuzamosan futtatott GeneRuler™ 100 bp és GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) DNS molekula tömeg marker segítségével határoztuk meg.

3.2.2.3 Szekvencia-meghatározás

A felerősített PCR termékeket közvetlenül a reakcióban használt Pap1f és Pap1r primerekkel szekvenáltuk mindkét irányból az ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a gyártó protokollja szerint és ABI 373A automata DNS szekvenáló készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) olvastuk le.

3.2.3. Vírus genom szekvencia-meghatározás

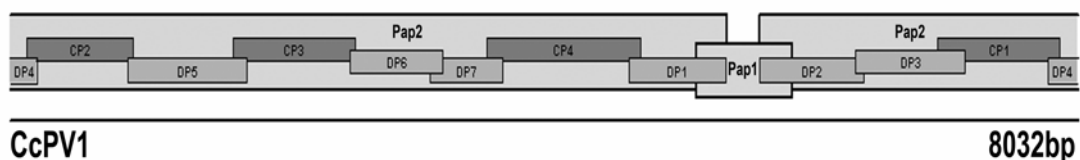
A teljes CcPV1 genom-szekvencia meghatározásában több polimeráz lánreakciót is alkalmaztunk. Először a Pap1 termék terminális szakaszaiból kiindulva, a cirkuláris genom további (nagyobb) részét erősítettük fel (Pap2 PCR), majd ezt a terméket a továbbiakban templátként használva határoztuk meg a genom ismeretlen részének nukleotid szekvenciáját.

3.2.3.1 Primer tervezés

A Pap1 termék terminális szakaszaira a fentiekben (3.2.2.1) leírt programokkal terveztük a kifelé irányuló Pap2f (5'-CATCTGCACAAGGTCAAGGT-3') és Pap2r (5'-ACCACCTTAGGCACTCATTC-3') primer párt, hogy felerősítsük a cirkuláris genom majdnem 7900 bp hosszú fennmaradó részét.

Mivel a lépésenkénti, úgynevezett „primer walking” stratégia, feltehetően ismétlődő nukleotid szakaszok miatt nem hozott maradéktalan sikert, ezért a víruskimutatáshoz készített három szarvas PV genom szekvencia illesztésének konszenzus szekvenciáját felhasználva, 27 darab, részben degenerált primert terveztünk (ld. 1. táblázat), amelyekkel részben random módon erősítettünk fel hét átfogó genom szakaszt (DP1-DP7), amelyeket pGEM-T (Promega) plazmidba való klónozás után szekvenáltunk.

A Pap2 fragmentum, és egyben a teljes genom, összefüggő szekvenciáját a DP1-DP7 fragmentumok összeillesztése után fennmaradó rések (CP1-CP4) áthidalására további négy specifikus primer párt terveztünk. A teljes szekvenálási stratégia vázlatát a 2. ábrán mutatjuk be.



2. ábra: A CcPV1 genom nukleotid sorrendjének meghatározásánál alkalmazott szekvenálási stratégia vázlatos ábrázolása. Pap1 és Pap2 – az elsőként felerősített genom-fragmentumok; DP1-DP7 – degenerált primererekkel szintetizált fragmentumok; CP1-CP4 – specifikus primerekkel felerősített áthidaló fragmentumok.

1. táblázat: A munka során használt primerek és az általuk felerősített DNS szakaszok kódja

Termék	Primer A	Szekvencia (5'-3')	Primer B	Szekvencia (5'-3')
Pap1	Pap1f	CTGCAGGCTCGTATGTC	Pap1r	CTGCCTCCKACACCTGTGAC
Pap2	Pap2f	CATCTGCACAAGGTCAAGGT	Pap2r	GAATGAGTGCCTAAGGTGGT
DP1	PVAR2	TTYTTYTYTGTRTGGTG	M8rev	CCAGTGACATATCCACGGACA
DP2	M8fw	TGGAGGACGGTGATATGATGG	UPV2	CCRTTRTTHHDDCCYTG
DP3 (M29)	M9R2	TCCAGGGCGAAAGGATCCCCA	PSQ9r	TTGGGAGGTRAAYYTA AA
DP4	M9F1	ACAGACAAGCCAGATGCAGG	PSQ9r	TTGGGAGGTRAAYYTA AA
DP5 (M31)	PSQ5	WRBCRTTCSGGGAAACCA	PSQ6R	TATGCWMWRTGTGCWGGK
DP6 (M27)	PSQ1	TMTWGAWTCHCCTGCWAC	PSQ2	AAGGTRGAWGCWMRSCGAT
DP7	PVSP1f	CCTGGTGGRCWGTVGGVGAG	PVSP2r	TCAAATGAWTATYTACAYCT
CP1 (M25b)	M25FR2 F	GCTCCGTGCAATTA ACTCCT	M25FR2 R	AAGTTACAGCATCGCTGACG
CP2	M25/32F	TGCCTCATGCCAGACAAT	M25/32R	GCACAGCAGTGATGAGGATT
CP3	M31/27F	TCAGGCCACCTCCACATA	M31/27R	AGAAGATGAGTGCAGCCAG
CP4	M17F	TGGGAACCAGGTGAAGT	M17R	CTGGGACAGACTCAGGAATAA TAAC
	UPV1	HATWSARGAYGGDGANATG	UPV2	CCRTTRTTHHDDCCYTG

3.2.3.2 Pap2 PCR

A cirkuláris vírusgenom azon 7881 bp hosszú szakaszát, amely a Pap1 termék két végét köti össze a Pap2 PCR reakcióban erősítettük fel. A nagy termékre és annak későbbi PCR, illetve szekvenálási templátként történő alkalmazására való tekintettel ebben a reakcióban egy igen alacsony

hibaszázalékkal dolgozó és a hosszú DNS fragmentumok szintézisére alkalmas DNS polimerázt alkalmaztunk; a KOD Hot Start polimerázt (Novagen). A Pap2 PCR protokollja a következő: 50 µl reakcióelegybe mindkét primerből (Pap2f és Pap2r) 1 µM, minden dNTP-ből 0,3 mM, 1,5 mM MgSO₄, 5 µl 10x KOD Hot Start DNA Polymerase puffer (Novagen), 0,02 U KOD Hot Start DNA Polymerase és 1 µl templát DNS. Az első denaturáció 94°C-on 3 percig tartott, amit 35 amplifikációs ciklus követett a következő paraméterekkel: 94°C 30 másodpercig, 61°C 30 másodpercig, és 68°C 8 percig. Az utolsó ciklus után egy további 10 perces elongációs szakasz következett 68°C-on.

A DP1-DP7 PCR reakciókat a Pap1 PCR-rel megegyező reakcióelegyben végeztük, de a primerek tapadási hőmérsékletét 48-56°C-os tartományban 2 fokos intervallumokban állítottuk be a gradiens PCR készüléken (Techne TC-512 Thermal Cyclers, Techne Scientific).

3.2.3.3 Szekvencia-meghatározás

A DP1-DP7 PCR termékeket pGem-T plazmidba (Promega) klónoztuk majd a plazmid saját szekvenáló primereit (T7 és M13) felhasználva két irányból szekvenáltuk, míg a CP1-CP4 PCR termékeket tisztítás után, saját primereikkel szekvenáltuk mindkét irányból. A szekvenálási reakcióhoz az ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használtuk a gyártó protokollja szerint. A nukleotid sorrend leolvasása ABI 373A automata DNS szekvenáló készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) történt.

3.2.4. Teljes genom amplifikáció és klónozás

3.2.4.1 Az RCA reakció

A cirkuláris DNS mennyiségének megsokszorozására kiválóan alkalmas a Phi29 bakteriofág DNS polimerázt hasznosító, nem szekvencia-specifikus „rolling circle amplification” (RCA) módszer, melyet a szimpla szálú és a dupla szálú cirkuláris DNS vírusgenomok (pl. circovírusok, polyomavírusok, papillomavírusok) felsokszorozására is jó hatékonysággal lehet alkalmazni. Ha a

felszaporított DNS „gombolyagot” a vírusgenomban csak egy hasítási hellyel rendelkező restrikciós enzimmel emésztjük, akkor teljes hosszúságú (papillomavírusok esetében jellemzően 7400-8600 bp közötti), lineáris vírusgenomok jól elkülöníthetők agaróz gélen. A reakciót az Illustra TempliPhi 100 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint, kisebb módosítások beiktatásával. Az 5 µl mintaelőkészítő pufferbe 1 µl templát (Pap1 PCR reakcióhoz használt daganatból kivont DNS) és a nagy genomra való tekintettel 112-225 µM extra dNTP is került. Az elegyet 3 percig 95°C-on denaturáltuk, majd azonnal jégre tettük. A mintához hozzámértük a jégen összeállított 5 µl reakció puffert és 0,2 µl enzimet tartalmazó reakcióelegyet, majd 16 órán keresztül 30°C-on inkubáltunk. A jégen +4°C-ra hűtött reakcióelegyet 10 percig 65°C-on inaktiváltuk, majd 40 µl MQ vízzel vagy TE pufferrel hígítottuk. Pozitív kontrollként a kitben található plazmid DNS-t alkalmaztuk. A reakció sikerességét 1-2 µl elegy restrikciós enzimes emésztésével ellenőriztük.

3.2.4.2 Restrikciós enzimes emésztés

A plazmidba való klónozásnál, illetve az RCA reakció termékének vizualizációja során restrikciós enzimes emésztéseket végeztünk, amihez New England Biolabs (NEB) és Fermentas enzimeket használtunk a gyártók útmutatásai alapján. Rendszerint 20 µl térfogatban 1–1,5 órán keresztül végeztük az emésztéseket. A reakcióelegyek általános összetétele 2 µl 10x puffer, 5-10 U restrikciós enzim, 1-2 µg DNS, amit 20 µl térfogatra egészítettünk ki MQ vízzel.

3.2.4.3 Vírus DNS molekuláris klónozása

A degenerált primerekkel közvetlenül nem szekvenálható PCR termékeket és az RCA reakcióban amplifikált, majd *SacI* restrikciós enzimmel hasított teljes vírusgenomot klónoztuk. A PCR termékeket pGEM-T (Promega) plazmidba, a teljes vírusgenomot pedig pUC19 plazmidba a *SacI* hasítási helyre építettük be. A ligálás T4 DNS ligázzal (New England Biolabs), egy éjszakán keresztül, +4°C-on történt. A ligálási keverékkel kompetens *E. coli* törzseket transzformáltuk (XL1

Blue és DL5) hősokk vagy elektroporáció segítségével. Az elektroporációhoz Bio-Rad elektroporációs készüléket alkalmaztuk 25 μ F, 2,5 V és 200 Ω paraméterekkel. A transzformált baktériumokat ampicillin és X-Gal tartalmú (50 μ l) agar géltre szélesztettük, majd a kapott rekombináns telepeket (klónokat) β -galaktozidáz aktivitásuk alapján szelektáltuk. A megfelelő klónokat az antibiotikum (ampicillin) rezisztencia, illetve a kék-fehér szín alapján válogattuk ki.

3.2.4.4 A plazmid DNS tisztítása

A megfelelő, pozitív rekombináns klónok szaporítására és azonosítására a random kiválasztott baktériumtelepeket ampicillinnel kiegészített 3 ml folyékony Luria-Bertani (LB) tápoldatba oltottuk, majd egy éjszakás, 37°C-on történő rázatásos tenyésztést követően a QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk ki a plazmidokat. A kivonást körülbelül 2,5 ml baktérium kultúra 3 percig tartó 8000 fordulat/perc fordulatszámra való centrifugálását követően az üledékből végeztük a gyártó utasításainak megfelelően.

3.2.5. Filogenetikai vizsgálatok

A CcPV1 filogenetikai jellemzésére az L1 ORF teljes szekvenciáját, valamint a négy fő ORF (L1, L2, E1 és E2) egyesített szekvenciáját használtuk. Mindkét elemzéshez további 70 teljes genomot választottunk ki a génbankban rendelkezésre álló papillomavírusok közül. A CePV filogenetikai vizsgálatait a részleges L2 ORF aminosav szekvenciákra igazított nukleotid szekvenciákon végeztük.

A szekvenciák szerkesztését a BioEdit (Hall, 1999), a szekvenciák egyesítését pedig a DAMBE 4.5.55 (Xia és Xie, 2001) programmal végeztük. A 71 PV négy ORF aminosav szekvenciájának illesztését külön-külön végeztük el a DAMBE programba integrált ClustalW alkalmazással. A négy aminosav szekvencia illesztésre igazítottuk a nukleotid szekvenciákat és az így kapott nukleotid illesztést egyesítettük egy összefüggő, 3561 bp hosszúságú állománnyá a DAMBE segítségével, amely később a filogenetikai vizsgálatok alapját képezte. A filogenetikai

vizsgálatokat a MEGA 4 szoftverrel (Tamura és mtsai, 2007) végeztük neighbour-joining (NJ) és maximum parsimony (MP) módszerrel.

3.2.6. A vírusgenom jellemzése, bioinformatikai vizsgálatok

A papillomavírusok általános leírása a teljes genom-szekvencia elemzés eredménye alapján történik. A jellemzés része a genom hossza, a „klasszikus” ORF-ok (E1, E2, L1, L2, E6, E7, E5, E4, E9, stb.) megléte és leírása, a nem kódoló, terminális szabályozó genomszakasz (URR, Untranslated Regulatory Region) hossza és összetétele, valamint a szabályozó nukleotid szakaszok megléte, száma és lokalizációja a genomban.

Az ORF-ok azonosítására az NCBI honlapján működtetett ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) alkalmazást használtuk, az azonosított vírusfehérjék molekuláris tömegeit pedig a Compute pI/Mw internetes eszközzel (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) számítottuk ki. A CcPV1 és néhány kiválasztott papillomavírus (EEPV, REPV, DPV, OPV1, BPV1, BPV5, BPV3, EcPV1, HPV16, RaPV1, PePV) fő ORF szekvenciája közti hasonlóságot a GraphAlign program (Spalding és Lammers, 2004) segítségével határoztuk meg. A CePV részleges L2 ORF-jának aminosav és DNS szekvenciáját szintén e szoftver segítségével hasonlítottuk össze a többi Delta PV homológ genom-szakaszával.

A transzkripciós faktorok kötődési helyeit, jellegzetes motívumait és a fehérje doméneket, vagy manuálisan kerestük a BioEdit szoftverben, vagy internetes kereső szoftvereket és adatbázisokat alkalmaztunk: ScanProsite (<http://www.expasy.ch/prosite>), PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>), valamint TRANSFAC adatbázis keresés TFSEARCH szoftverrel (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

3.2.7. Vírus-genom kópiaszám meghatározása daganatszövetben RT-PCR-rel

A daganatszövet vírus-genom kópiaszámának meghatározására egy valós-idejű PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) módszert adaptáltunk. A Pap1 PCR protokollt módosítottuk

EvaGreen hozzáadásával, ami így alkalmassá vált a reakció RT-PCR készüléken való (Corbett Rotor-Gene 6000 real-time PCR system - Corbett Life Science) lefuttatására.

Az eredeti Pap1 PCR reakcióban amplifikált Pap1 terméket kivágtuk az agaróz gélből és megtisztítottuk. A kapott oldat DNS koncentrációját GenQuant fotométerrel (Amersham) lemértük és az interneten elérhető URI Genomics & Sequencing Center kalkulátorával (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>) kiszámoltuk az oldatban levő Pap1 termék kópiaszámát.

A Pap1 termékből ($4.43 \times 10^8 - 10^3$ kópia) három azonos hígítási sort készítettünk, mindegyikben nyolc-nyolc elemmel, tízszeres hígításban. Valamennyi hígítási elemet a Pap1 RT-PCR reakcióban használtuk templátként, két pozitív és egy negatív őz bőrszövet-minta DNS kivonatával együtt. Az ismert kiindulási DNS mennyiségek logaritmusához és az azokhoz tartozó átlagos Ct értékekhez (mean threshold cycle) illeszkedő regressziós görbéket az RT-PCR készülék Rotor-Gene szoftverével (Corbett Life Science) számítottuk ki.

3.3 Ökológiai és járványtani vizsgálatok

3.3.1. Kérdőíves felmérés

Az öz fibropapillomatózis magyarországi elterjedésének feltérképezésére és ökológiájának megismerésére kérdőíves felmérést végeztünk valamennyi vadgazdálkodási egység (VGE) megkeresésével. A kérdőíveket 2006 márciusának végén postáztuk az Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA) nyilvántartásában szereplő 1201 vadgazdálkodási egység címére, ezzel lefedve az ország teljes területét.

A postázott borítékokba az egy oldalas zárt-végű kérdőív mellé szintén egy oldalas, a felmérés célját és a megbetegedés lényegét bemutató kísérő levelet tettünk, amely fényképes illusztrációt is tartalmazott a jellegzetes elváltozásokról. A kitöltött kérdőíveket az azokon szereplő adatfelhasználást jóváhagyó nyilatkozattal egyetemben a vadásztársaságok elnökeinek kellett aláírniuk, de a konkrét adatokat leggyakrabban a VGE hivatásos vadászai szolgáltatták. A kérdőívek visszaküldési határideje után két héttel a nem válaszoló vadásztársaságoknak emlékeztető leveleket postáztunk.

Ismert, hogy a vadásztársaságok túlnyomó többsége nem vezet átfogó nyilvántartást a területén előforduló járványkitörésekről, elhullásokról, illetve az esetleges vizsgálatok eredményéről, ezért a kérdőívben a betegség előfordulásáról, a megállapítás gyakoriságáról, a fertőzöttség alakulásáról, a különböző korosztályok és ivarok érintettségéről és az elváltozások elhullott állatokon való előfordulásáról előre definiált, kategoriális adatokat gyűjtöttünk.

A betegség előfordulására vonatkozó kérdés (ld. M4) így hangzott: „Előfordul-e területükön a mellékelt képeken látható bőrelváltozásokkal járó megbetegedés?”. A lehetséges válaszok: 1. Nem, 2. Időnként, 3. Állandó jelenlét. Arra a kérdésre, hogy milyen gyakorisággal találnak bőrdaganatos állatot a vadászterületen, szintén három lehetőség közül kellett választani: 1. Évente több beteg, 2. 1-2 beteg évente, 3. Néhány évente 1-1 beteg. Ezeket a kategóriákat a későbbi elemzések során a térbeli elterjedés és fertőzés intenzitás jellemzéséhez Betegség Gyakoriság Indikátor értékekké (Disease Frequency Indicator, DFI) kódoltuk; DFI 1-3-ig. A leginkább érintett korosztály

megjelölésére a bakoknál négy (1. Gida, 2. Fiatal, 3. Középkorú és 4. Öreg), míg a sutáknál három (1. Gida, 2. Fiatal és 3. Öreg), a gyakorlatban biztonsággal elkülöníthető kategóriát definiáltunk. Arra a kérdésre, hogy az elhullott állatokon észlelnek-e daganatos elváltozást, igennel vagy nemmel kellett válaszolni. A megbetegedés trendjét az előfordulási gyakoriság legutóbbi 5 évre vonatkoztatott változásaként definiáltuk: 1. Nőtt, 2. Állandó vagy 3. Csökkent. További információt kértünk a hasonló bőrelváltozások más fajokon (pl. gím, dám, mezei nyúl) való előfordulásáról.

A gímszarvas fibropapillomatosis magyarországi előfordulásáról az őz fibropapillomatosis helyzetet felmérő kérdőívben szereplő, egyéb fajok érintettségét firtató kérdéssel próbáltunk információt szerezni, amelyben név szerint is szerepelt a gímszarvas, mint megnevezhető, illetve bejelölhető válaszlehetőség.

3.3.2. Külföldi előfordulási adatok gyűjtése

Az őzek bőrdaganatainak európai előfordulásának és elterjedésének felmérésére adatokat gyűjtöttünk a vadbetegségek diagnosztikájával foglalkozó, illetve vadon élő állatokban megállapított betegségek adatbázisait fenntartó intézményektől.

A rendelkezésre álló adatbázisokból az őzekben diagnosztizált bőrdaganatokat, illetve szűkítve a papillomának, fibropapillomának és fibromának meghatározott daganatokat gyűjtöttük ki, és egyben rögzítettük az adott időszakban megvizsgált őz minták teljes számát. A fenti adatokat rendelkezésünkre bocsátó intézmények a következők voltak: AFSSA-LERRPAS (SAGIR database) Franciaország; Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW) Berlin, Németország; National Veterinary Institute (SVA) Uppsala Svédország; Veterinary Laboratories Agency Diseases of Wildlife Scheme (VLADoWS), Egyesült Királyság.

3.3.3. Adatkezelés és eredmény összegzés

A magyarországi őzállományokra, valamint külön a bakokra, sutákra és gidákra vonatkozó éves becslési és teríték adatok az Országos Vadgazdálkodási Adattárból származtak. Csak az adathasználatot jóváhagyó, komplett kérdőívet aláíró és visszaküldő vadgazdálkodási egységek

adatait használtuk fel. Kiszámoltuk az egyes vadgazdálkodási egységek hat évet (2001-2006) átfogó állománybecslési adatainak teljes állományra vonatkozó átlagát. Vizsgálatainkban az adott VGE területén élő őzpopuláció sűrűségi adatát használtuk, amit a teljes állomány-átlagának a VGE területével való elosztásából kaptunk.

A hazai viszonyokkal való összehasonlításhoz használt retrospektív, teljes Franciaország területét lefedő, Département-szintű őzállomány adatokat (teríték) a Réseau Ongulés Sauvages - ONCFS-FNC-FDC bocsátotta rendelkezésünkre.

3.3.4. Térinformatikai vizsgálatok

A térinformatikai vizsgálatokat és az eredmények megjelenítését az ArcGIS 9.0 (Environmental Systems Research Institute) szoftverrel végeztük. A Corine Land Cover 2000 (CLC2000) (European Environment Agency) adatbázisban szereplő egyes környezeti változókat vadgazdálkodási egységekre leválogatva használtuk fel az elemzésekben. A statisztikai elemzésekhez és az eredmények megjelenítéséhez az R programcsomagot (R Development Core Team, 2008; <http://www.R-project.org>) használtuk (Solymosi, 2008).

3.3.5. Statisztikai módszerek

A megbetegedés előfordulása szempontjából ismert státuszú VGE-ket a státusz és a területükre eső CLC2000 felszín-borítottság kategóriák arányát felhasználva rangsoroltuk a Random Forest számítógépes algoritmussal (Breiman, 2001). A továbbiakban a magyarországi őz populációsűrűségi adatok és a CLC2000 által definiált környezeti változók alapján prediktáltuk az algoritmussal a megbetegedés előfordulási státuszát a kérdőívre nem válaszoló VGE-k területén és ezáltal a tágabb földrajzi elterjedést. A betegség előfordulása és a környezeti változók, valamint a gazdapopuláció sűrűség közötti korrelációt logisztikus regresszióval és a Pearson-féle korrelációs együtthatóval jellemeztük.

4. Eredmények

4.1 Kórtani vizsgálatok

4.1.1. Kórbonctan és kórszövettan

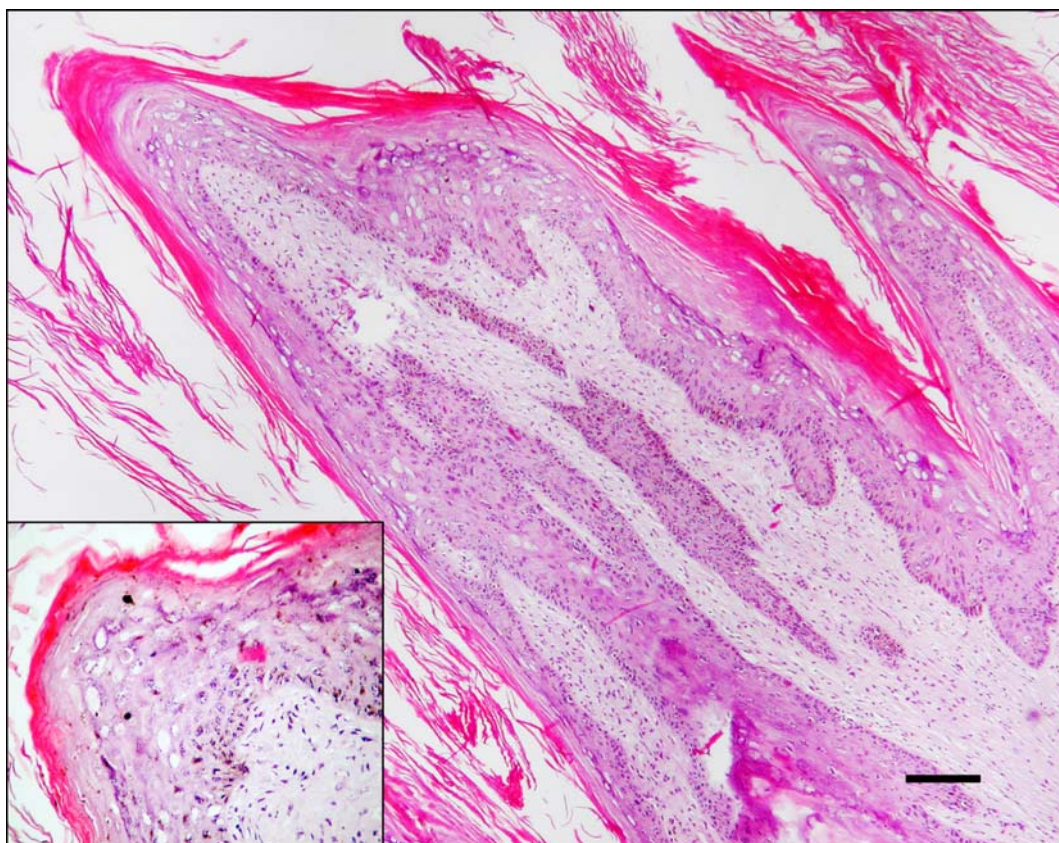
Az Országos Állategészségügyi Intézetbe 2004-től 2006-ig terjedő hároméves időszakban diagnosztikai vizsgálatra érkezett 42 őz tetem közül a kórbonctani vizsgálat során 14 egyed bőrén találtunk fibropapillomát. Ezek a daganatok változó számúak, nagyságúak, pigmentáltak, lekerekedettek, tömött tapintatúak voltak. Megfigyeléseink szerint átlagosan 3-5 cm átmérőjűek (3. ábra), de esetenként előfordul 11-15 centiméteres elváltozás is. Az egy állaton előforduló daganatok száma általában tíznél kevesebb, de nem ritkák az erősen fertőzött egyedek sem, amelyeken akár 150 daganatos elváltozásnál is több található. A fibropapillomák jellemzően a fejen, nyakon, hason és a lábakon, elsősorban azok belső felületén helyezkednek el.



3. ábra: Jellemzőes fibropapillomák egy őz bak fején és hátulsó végtagjain.

A daganatok felszíne néha, átmeneti jelleggel, papillás szerkezetet mutat, de az igazán jellemző daganat sima felszínű, szőrtelen, tömött képlet, amelyet sima verrukózus hámréteg fed. A hám leginkább pigmentált, és a nagyobb daganatok felületén gyakran fordulnak elő hámsérülések, eróziók, gennyes folyamatok, illetve elhalások.

A kórszövettani vizsgálat eredményeként megállapítható, hogy a daganat fő részét az irha stratum reticulare rétegében helyeződő kompakt kollagén rostok tömege és az abba ágyazott proliferálódó fibroblasztok csoportjai alkotják. A corium hámréteg alatti laza kollagén rostos stratum papillare-ja általában jól azonosítható. A daganatot fedő epidermis rendszerint acanthózis és hiperkeratózis jeleit mutatja (4. ábra). A stratum spinosumban elszórtan közepes mennyiségű sötétbarna, durva-szemcsés melanin rögöt tartalmazó keratinociták csoportjait lehetett megfigyelni, a stratum granulosum sejtjei pedig változó mennyiségű basophil festődésű keratohyalin rögöt tartalmaztak.

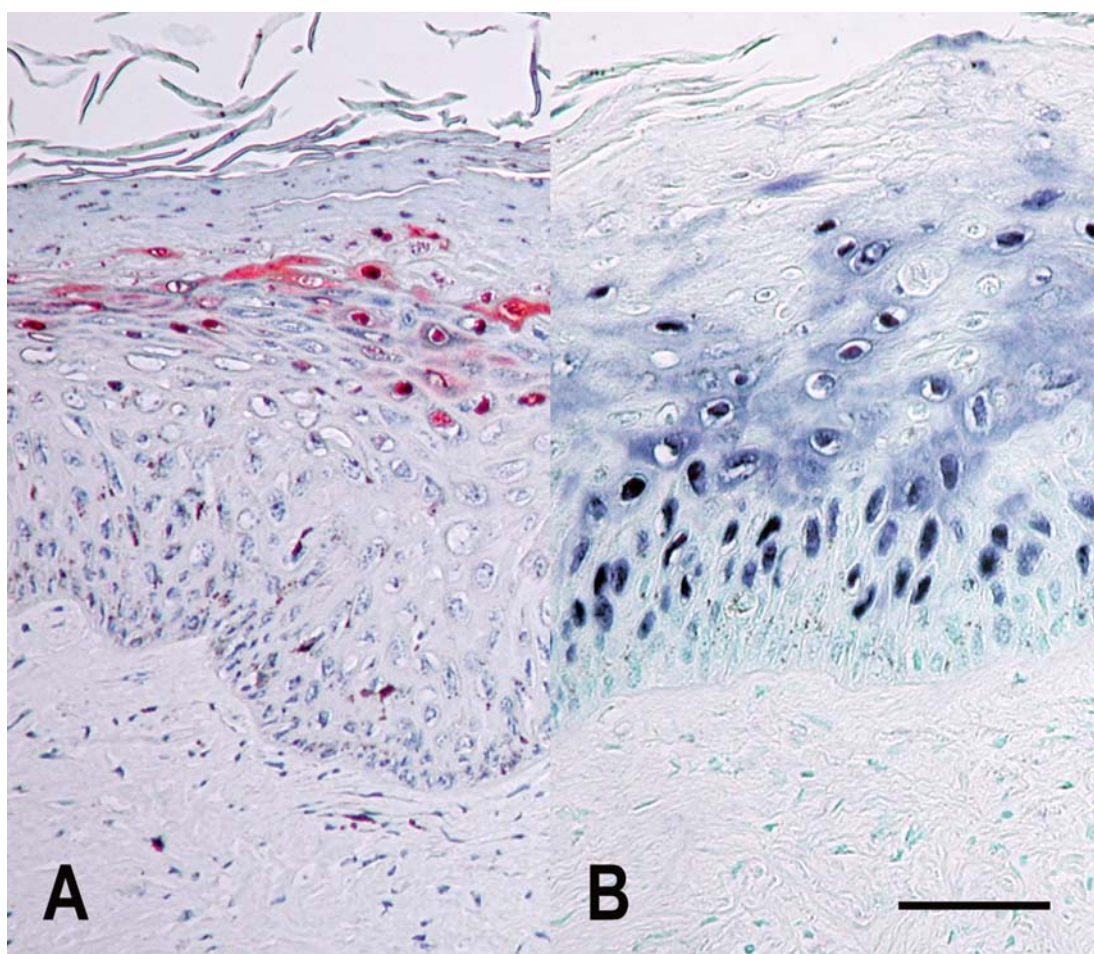


4. ábra: Egy fibropapilloma jellegzetes szövettani képe, gócosan proliferálódó fibroblasztok és kollagén rostok alkotta papilláris szöveti struktúrával, hiperkeratózis és helyenként acanthosis (ld. inzert) jeleit mutató epidermisszel. Hematoxinil-Eosin, Mércse = 50 μ m.

A DPV és az EEPV fertőzés során időnként előforduló tömött, göcos tüdőfibrózist nem láttunk a vizsgált állatokban, viszont két esetben mérsékelt, diffúz fibrózist állapítottunk meg.

4.1.2. Immunhisztokémia és in situ hibridizáció

Vizsgálataink során a daganatos elváltozások epidermisében sikerült kimutatnunk mind a PV L1 fő kapszidfehérje antigén, mind az L1-et kódoló DNS jelenlétét (5. ábra).



5. ábra: A) A CcPV1 fő kapszid antigénjének (virionjainak) aggregálódása a keratinocyták magjaiban és cytoplasmájában (stratum granulosum) és a stratum corneum elszarusodó hámsejtjei között. B) A CcPV1 L1 ORF DNS megjelenítése in situ hibridizációval a stratum spinosum és a stratum granulosum keratinocytáinak magjában és cytoplasmájában, valamint néhány pozitív keratinocytá mag a stratum basale-ban. A) anti BPV1 IHC; B) CcPV1 L1 ISH. Mércse = 100 μ m.

Az ISH vizsgálat eredményei szerint az L1 ORF szekvenciájával homológ DNS szakasz jelen volt a stratum basale néhány keratinocytájának magjában, de a stratum spinosum és a stratum granulosum sejtjeiben sokkal nagyobb számú pozitív keratinocytát figyeltünk meg, amelyek mind a magjukban, mind a citoplazmájukban tartalmaztak vírus DNS-t (5.B ábra).

A fő kapszidfehérje antigént túlnyomóan a stratum granulosum keratinocytáinak magjában és citoplazmájában lehetett kimutatni (5.A ábra), de gyakran találtunk összezsapódott antigén rögöket a stratum corneum elszarusodott hámsejt rétegei között is.

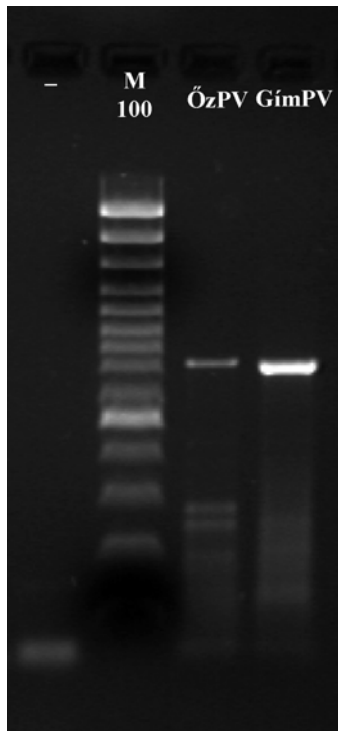
A két mintában is tapasztalt tüdő fibrózis elváltozásokban sem az alkalmazott IHC, sem az ISH vizsgálatokkal nem mutattunk ki CcPV1 L1 antigént és DNS-t.

4.2 Virologiai vizsgálatok

4.2.1. Delta-papillomavírusok kimutatása PCR vizsgálattal szarvasfélékből

A delta-papillomavírusok kimutatására kifejlesztett Pap1 PCR reakciót sikerrel alkalmaztuk az őz és a gímszarvas-papillomavírus kimutatására (6. ábra). Az őz daganatból kivont DNS mintából generált termék nukleotid szekvenciája 54,9-57,1%-os hasonlóságot mutatott a GenBank-ban található három szarvas papillomavírus megfelelő genom-szakaszával.

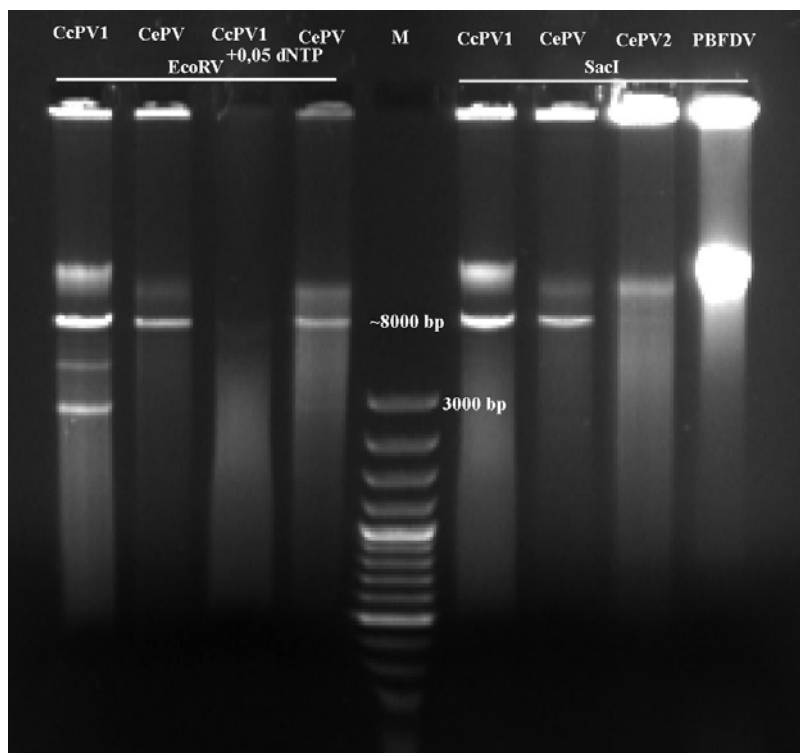
A Pap1 PCR-t 8 egymástól független őz fibropapilloma (6 minta Magyarország más-más területéről, 1 minta Horvátországból, 1 minta pedig Ausztriából származott), 6 gímszarvas fibropapilloma és három egészséges őz bőr DNS kivonatán teszteltük. A vizsgálat a három gímszarvas minta és az egészséges őz bőrminták kivételével (2 postán szállított spanyolországi DNS kivonat és egy paraffinba ágyazott mintából kivont DNS) valamennyi esetben pozitív eredménnyel végződött. A 8 CcPV1 Pap1 PCR terméket megszekvenáltuk és a vizsgált L2 ORF szakaszokat 100%-ban azonosnak találtuk.



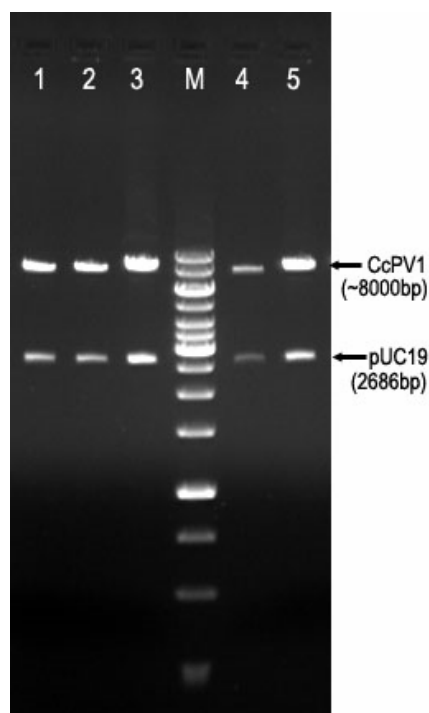
6. ábra: A Pap1 PCR termékek (kb. 730bp) jellemző gélképe őz és gímszarvas PV mintából („M” – molekulatömeg marker, „-” negatív kontroll).

Az őz daganatmintákból elvégzett RT-PCR vizsgálatra alapozott vírusgenom kópiaszám számításaink eredménye alapján a fibropapilloma hámrétegében $1.8-2.1 \times 10^{10}$ vírusgenom található 1 μg teljes DNS kivonatban.

RCA reakcióval felerősítettük a teljes cirkuláris CcPV1 és CePV genomot. Az amplifikált DNS genomokat sikeresen linearizáltuk restriktációs enzimes (*EcoRV* és *SacI*) vágással (7. ábra), de a gélből való izolálás nehézségei miatt csak a CcPV1 genomot tudtuk plazmidba klónozni (8. ábra). A klónokba integrált vírusgenom azonosságát szekvenálással és Pap1 PCR-rel ellenőriztük.



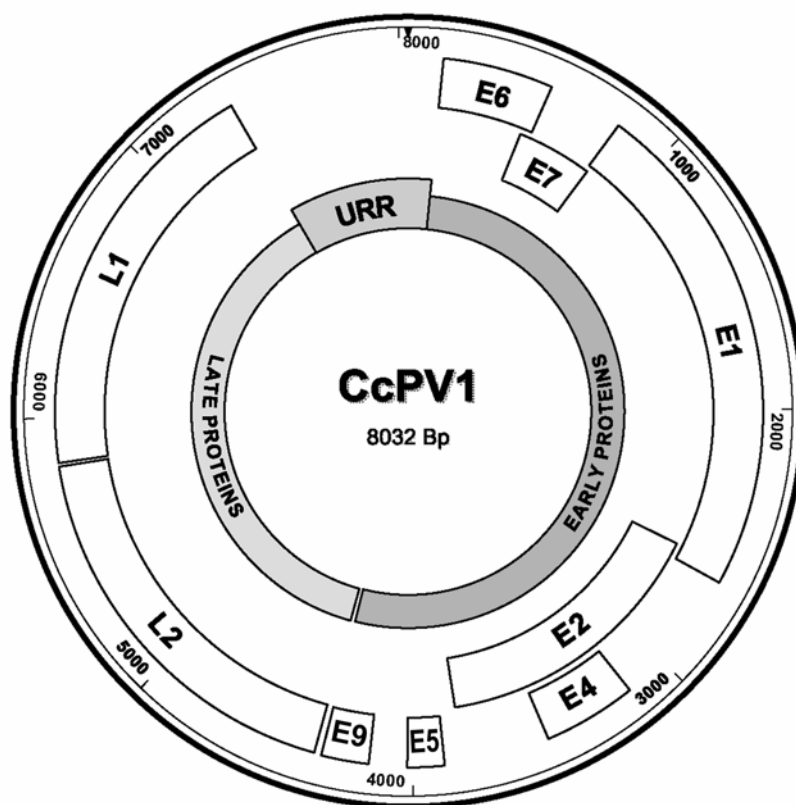
7. **ábra:** Az RCA reakciók eredménye a restriktív enzimes (*EcoRV* és *SacI*) vágással kapott linearizált genomok (kb 8000 bp) agaróz gél elektroforézise után



8. **ábra:** A pUC19 plazmidba klónozott CcPV1 genom *SacI* restriktív enzimmel való ellenőrző vágás utáni gélképe. (M - GeneRuler™ 1 kb (250-10000 bp), 1-5 – CcPV1 klónok)

4.2.2. A teljes őz papillomavírus (CcPV1) genom-szekvencia és felépítésének leírása

A szekvencia fragmensek összeillesztése után kapott CcPV1 genom 8032 bp hosszúnak bizonyult. A teljes CcPV1 vírusgenomot benyújtottuk a GenBank adatbázisba, ahol EF680235 nyilvántartási számon érhető el.



9. ábra: A CcPV1 genom ORF térképe a nem kódoló szabályozó régióval (URR) valamint a korai (early proteins) és kései fehérjéket (late proteins) kódoló régiók határai.

A genomban azonosítottuk mind a kilenc delta-papillomavírusokra jellemző fehérje kódoló ORF-et (9. ábra), a potenciális fehérjék becsült molekulatömegeit pedig a 2. táblázatban mutatjuk be. A korai fehérjéket kódoló genomszakasz végén az Eriksson és mtsai által (1994)

leírt, a többi szarvasféle papillomavírusára is jellemző E9 ORF-et, amely itt 174 bp hosszú volt. A hosszú szabályozó régió (long control region; LCR) vagy más néven untranslated regulatory region (URR) 799 bp hosszú volt.

A CcPV1 és további 11 papillomavírus (EPPV, REPV, DPV, OPV1, BPV1, BPV5, BPV3, EcPV1- Equus caballus Papillomavirus 1, HPV16 – Human Papillomavirus 16, RaPV1 – Rousettus aegypticus Papillomavirus 1, PePV – Psittacus erithacus Papillomavirus) fő ORF szakaszai közti GraphAlign szoftverrel számított hasonlóságát a 3. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat: A CcPV1 genomban található ORF-ek helyeződése, hossza és az általuk kódolt vírusfehérjék molekulatömege.

ORF	Start	Stop	Hossz (bp)	Hossz (aminosav)	Molekula tömeg (kDa)
E6	129	533	405	134	15,4
E7	493	819	327	108	11,8
E1	812	2650	1839	612	68,3
E2	2592	3815	1224	407	45,0
E4	3157	3498	342	113	12,4
E5	3885	4019	135	44	5,3
E9	4160	4333	174	57	6,9
L2	4361	5824	1464	487	52,3
L1	5838	7361	1524	507	57,2

3. táblázat: A CcPV1 és 11 további PV fő ORF-jainak százalékos nukleotid (és aminosav)

egyezése a GraphAlign (Spalding és Lammers, 2004) szoftver számításai szerint.

Vírus	GenBank	ORF Nukleotid (Aminosav) illesztés - % Azonosság								
		L1	L2	E1	E2	E6	E7	E4	E5	E9
EEPV	NC_001524	71,2 (77,6)	65,3 (63,3)	69,2 (66,9)	62,0 (50,5)	57,0 (48,1)	54,2 (42,6)	57,5 (50,8)	60,0 (41,3)	32,8 (27,6)
REPV	AF443292	70,3 (78,6)	63,1 (61,2)	70,1 (67,6)	62,6 (53,4)	55,1 (51,1)	56,7 (50,0)	54,8 (45,0)	55,9 (41,3)	39,7 (21,1)
DPV	NC_001523	69,2 (74,2)	62,9 (56,9)	70,8 (68,2)	63,7 (53,7)	53,7 (45,2)	52,4 (36,7)	57,8 (48,0)	60,3 (34,8)	35,8 (24,6)
OPV1	NC_001789	67,3 (71,8)	52,4 (54,4)	66,3 (62,6)	59,7 (52,2)	46,2 (39,0)	48,5 (39,4)	57,0 (50,0)	55,1 (47,8)	30,1 (8,8)
BPV1	NC_001522	67,1 (74,0)	51,5 (40,0)	62,0 (56,2)	58,5 (50,2)	51,9 (41,5)	46,9 (37,0)	53,1 (37,6)	58,1 (37,0)	41,8 (10,2)
BPV5	NC_004195	60,1 (58,1)	49,6 (35,2)	58,1 (49,5)	53,7 (42,5)	46,2 (37,4)	36,3 (30,4)	X	X	X
BPV3	NC_004197	55,5 (49,8)	43,5 (24,1)	51,2 (39,4)	46,8 (26,2)	X	34,9 (23,3)	34,7 (12,6)	X	X
EcPV1	NC_003748	54,6 (48,1)	42,7 (25,8)	54,4 (41,1)	49,0 (33,6)	44,4 (22,7)	40,7 (27,4)	38,4 (17,8)	X	X
HPV16	NC_001526	52,5 (44,2)	43,8 (21,9)	50,1 (37,8)	41,7 (23,8)	40,2 (21,7)	42,2 (21,8)	35,4 (16,4)	29,7 (17,9)	X
RaPV1	NC_008298	49,6 (44,6)	42,2 (23,9)	47,0 (35,6)	46,6 (27,8)	38,2 (18,0)	34,4 (17,4)	41,5 (9,8)	X	X
PePV	NC_003973	48,5 (40,4)	39,4 (17,5)	42,0 (27,1)	42,8 (23,0)	X	X	X	X	X

4.2.3. A CcPV1 replikációt és transzkripciót szabályozó elemeinek jellemzése

Az E7 ORF két cink-kötő domént (CXXC-X29-CXXC) tartalmazott, míg az E6 ORF egyet. A többi delta-papillomavírushoz hasonlóan (Narechania és mtsai, 2004) az E7 ORF-ben nem lehetett pRB-kötő domént (L-X-C-X-E) azonosítani. Az E1 ORF szekvenciájában egy SF3 ATP-függő helikáz domént (nt 413–563) azonosítottunk, amely egy foszfát-kötő (P-loop) motívummal ([AG]-x(4)-G-

K-[ST] (GPPNSGKS; nt 439-446) (Titolo és mtsai, 1999) ellátott, megőrzött ATP-kötő helyet tartalmazott. Ugyanitt két, ún. „leucine zipper” mintázatot (LX6LX6LX6L) is találtunk (E1 ORF: nt 259-280 és nt 266-287), amelyek viszont hiányoztak az E2 ORF-ből, ahol általában előfordulnak.

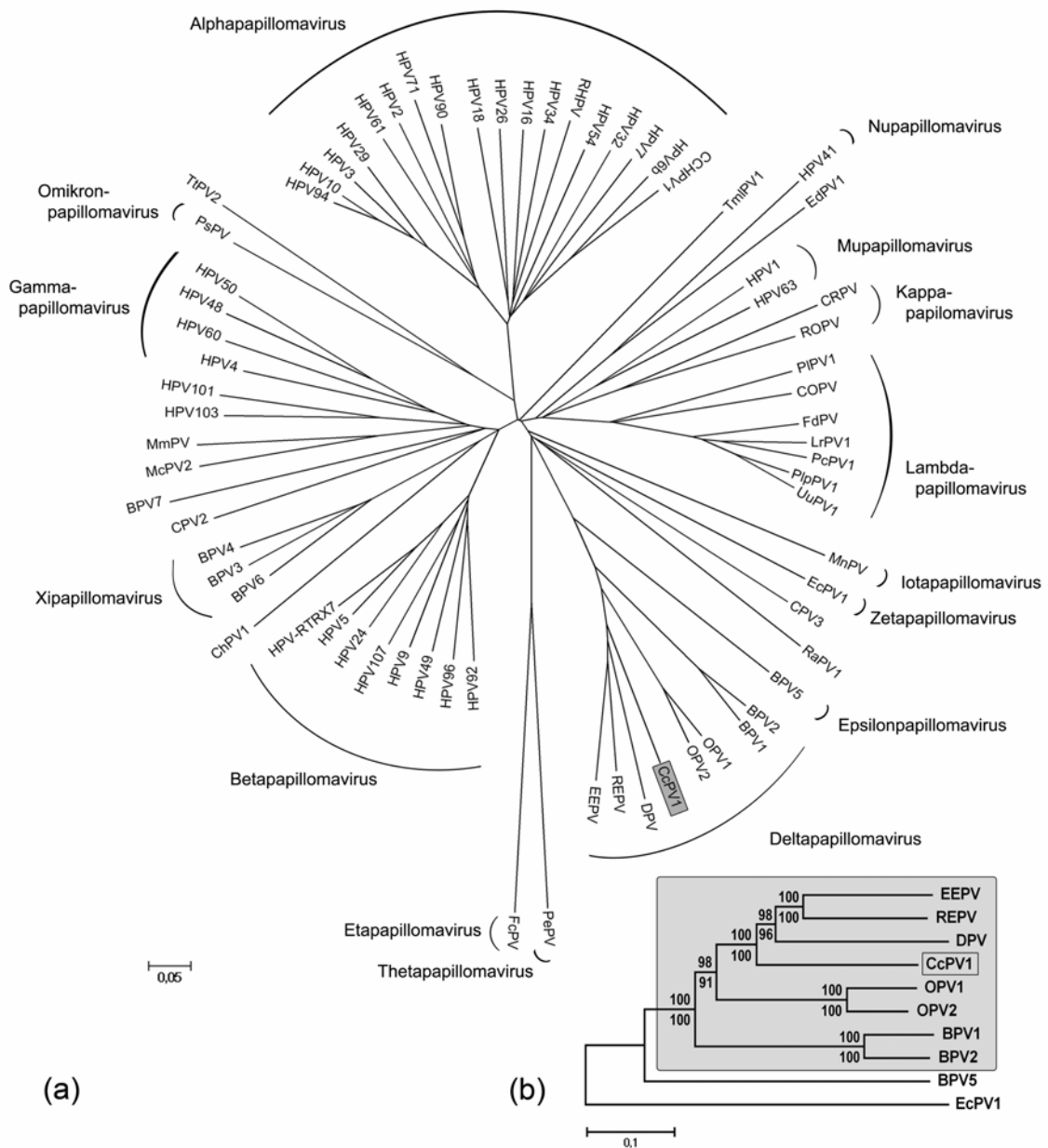
Az E4 ORF start kodonnal kezdődött és prolin-tartalma 11,40% volt, ami hasonló, mint a többi delta-papillomavírus E4 ORF esetében (BPV1-11,57%, REPV 12,31%, EEPV 14,68%, DPV 15,45%, BPV2-12,39%, OPV1-9,91%). A 174 bp hosszú E9 ORF jól konzervált amino-terminális régióval rendelkezett, amely azonos hidrofób mintázatot mutatott a DPV, EEPV és az REPV E9 ORF-jával. Az L2 ORF 3' végén helyeződött egy sejtmag kapcsolódási jel („nuclear localization signal”), de ugyanezt a motívumot az L1 ORF-ban már nem tudtuk azonosítani PSORT II szoftverrel.

Az URR-ben azonosítottuk a CcPV1 replikációs origójának elemeit. A nt 8024 helyen található az E1 felismerési hely (AAGATTGTTGTTAACAAT) amely a nt 60 helyen egy TATA box (TATAAA) mellett, két E2 kötőhely között (E2BS) helyezkedett el. Összesen kilenc E2BS (ACC-N6-GGT) volt jelen a CcPV1 genomban. Egy E2BS volt az E2 ORF-ban (nt 3770-3781) és 8 az URR-ben (nt 7476-7487, 7661-7672, 7711-7722, 7794-7805, 7818-7829, 7858-7869, 7982-7993, 73-84). Négy polyadenilációs jelet (AATAAA) azonosítottunk a genomban, köztük a feltételezett korai (nt 4351-4356) és kései (nt 7429-7434) mRNS polyadenylációs helyet, valamint további két jelet nt 6399-6404 és nt 7704-7709-nél.

4.2.4. Papillomavírus törzsfa rekonstrukció

Ahhoz, hogy meghatározhassuk az őz-papillomavírus helyét a *Papillomaviridae* családon belül, elvégeztük a frissen meghatározott vírusgenom filogenetikai vizsgálatát. Az elemzésbe vont 71 papillomavírus genom teljes L1 ORF szekvenciájának és a négy fő ORF (L1, L2, E1 és E2) összevont szekvenciájának (3861bp) illesztését neighbour-joining (NJ) és maximum parsimony (MP) módszerekkel vizsgálva megállapítottuk, hogy a CcPV1 jól elkülönülő, önálló ágon helyezkedik el az OPV és a többi ismert szarvasféle papillomavírus között a delta-papillomavírus

genusban (10. ábra). Az elemzést a Phylip programcsomaggal elvégzett távolsági mátrix és parszimónia módszerek is alátámasztották, azonos topológiát, és majdnem megegyező bootstrap értékeket eredményezve. A nyolc delta-papillomavírus fő ORF-jeinek (E6, E7, E1, E2, L1 és L2) valamint az URR szekvenciák önálló illesztéséből számított NJ és MP törzsfák minden esetben az összevont ORF illesztés törzsfájával azonos topológiát mutattak.

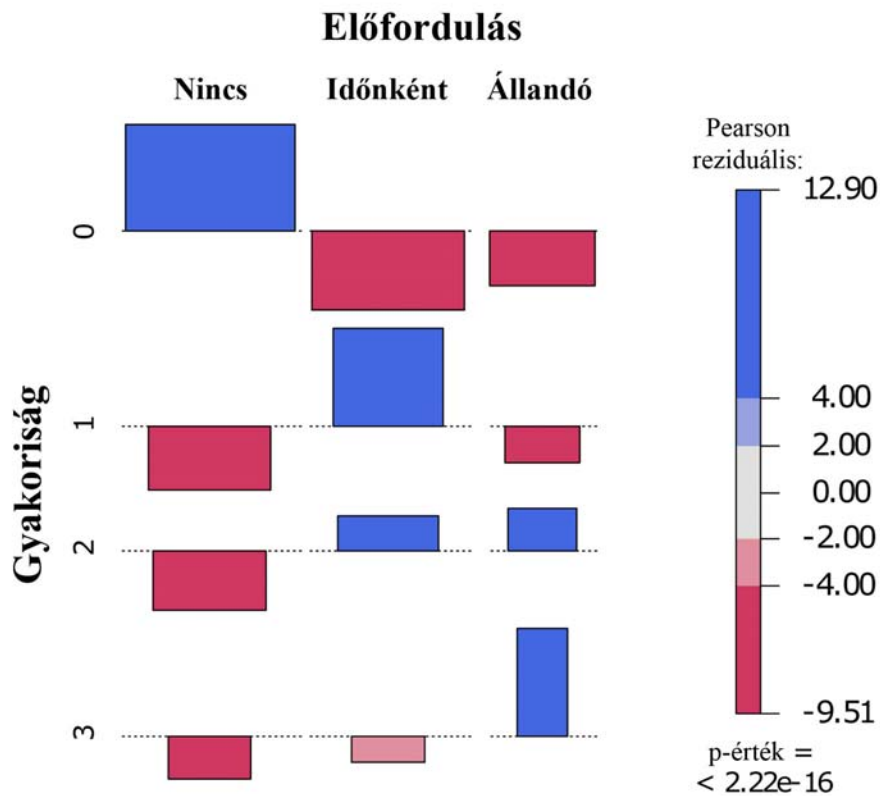


10. ábra: (a) A CcPV1 és további 70 papillomavírus (ld. kiegészítő táblázat) 3861bp hosszú négy ORF-ből (E1-E2-L2-L1) összevont szekvenciájának neighbour-joining (NJ) módszerrel számított törzsfája. (b) A delta papillomavírus genus (satírozott) tagjai közti filogenetikai távolságokat ábrázoló NJ törzsfá. Az azonos elágazásokon feltüntetett bootstrap értékek közül a felsők NJ, az alsók pedig maximum parsimony elemzés eredményei. A megjelenített filogenetikai vizsgálatok MEGA4 programmal történtek (mérce: egy nukleotid pozícióra eső bázis szubsztitúció).

4.3 Ökológiai és járványtani vizsgálatok

4.3.1. Az óz papillomatózis elterjedése Magyarországon

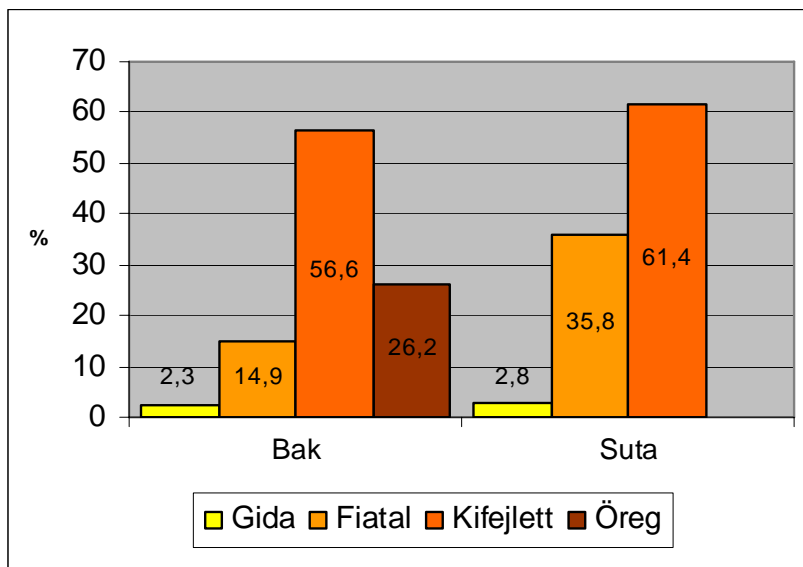
Az 1201 VGE-nek kiküldött kérdőívből 539-et küldtek vissza kitöltve. A válaszadási arány így 45,3% volt, ami a VGE-k összterületének 50,9%-át, azaz gyakorlatilag az ország területének felét reprezentálta. A betegség előfordulását 293 VGE-ből jelentették (a válaszadók 54,4%-a), ebből 200 területen (37,1%) rendszertelen, 93 területen (17,4%) pedig állandó jelleggel. A megbetegedés észlelésének gyakoriságát illetően néhány évente 1-1 esetet (DFI=1) 126 VGE-ből (a pozitív területek 43%-a), évente 1-2 eset előfordulást (DFI=2) 109 VGE-ből (37,2%), míg évi 2 esetnél többet (DFI=3) 58 VGE-ből (19,8%) jelentettek. A betegség jelenlétének a DFI kategóriákkal való összefüggésének elemzésében használt chi-négyzet próba szignifikáns ($p < 0.001$) kapcsolatot mutatott az állandó betegség jelenlét és a 2-es valamint a 3-as DFI kategória, illetve a rendszertelen betegség jelenlét és az 1-es és a 2-es DFI kategória között. A megfigyelt gyakoriságok várható gyakoriságokhoz való viszonyának mélyebb elemzését lehetővé tevő asszociációs ábrát (association plot) mutatja a 11. ábra.



11. ábra: A Pearson reziduálisokat a betegség előfordulási gyakoriság kategóriákra (DFI) vetítve megjelenítő asszociációs ábra, amely átfedő, pozitív és szignifikáns ($p < 0.001$) összefüggést jelez az állandó betegség jelenlét és a magasabb DFI értékek (2 és 3), valamint a rendszertelen betegség jelenlét és az alacsonyabb DFI értékek (1 és 2) között.

A betegség előfordulási gyakoriságának változását 60 VGE-ben (21,1%) csökkenő, 187 VGE-ben (65,6%) állandó, 38 VGE-ben (13,3%) pedig növekvő tendenciával jellemezték. A bakok kicsivel nagyobb százalékban betegedtek meg (51,2%) mint a suták (48,4%), de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (McNemar-féle chi-négyzet teszt, kontinuitás korrekcióval, $p = 0.7657$). Az elsődlegesen érintett korosztályok aránya a két ivaron belül (bakok/suták) a következő volt: gidák - 2,3%/2,8%, fiatalok -14,9%/35,8%, középkorú bakok 56,6%, öreg bakok 26,2%, kifejlett suták 61,4% (12. ábra). A betegség előfordulási gyakoriságának korcsoportok közötti eloszlásában detektált különbségek szignifikánsnak bizonyultak (Pearson-féle chi-négyzet

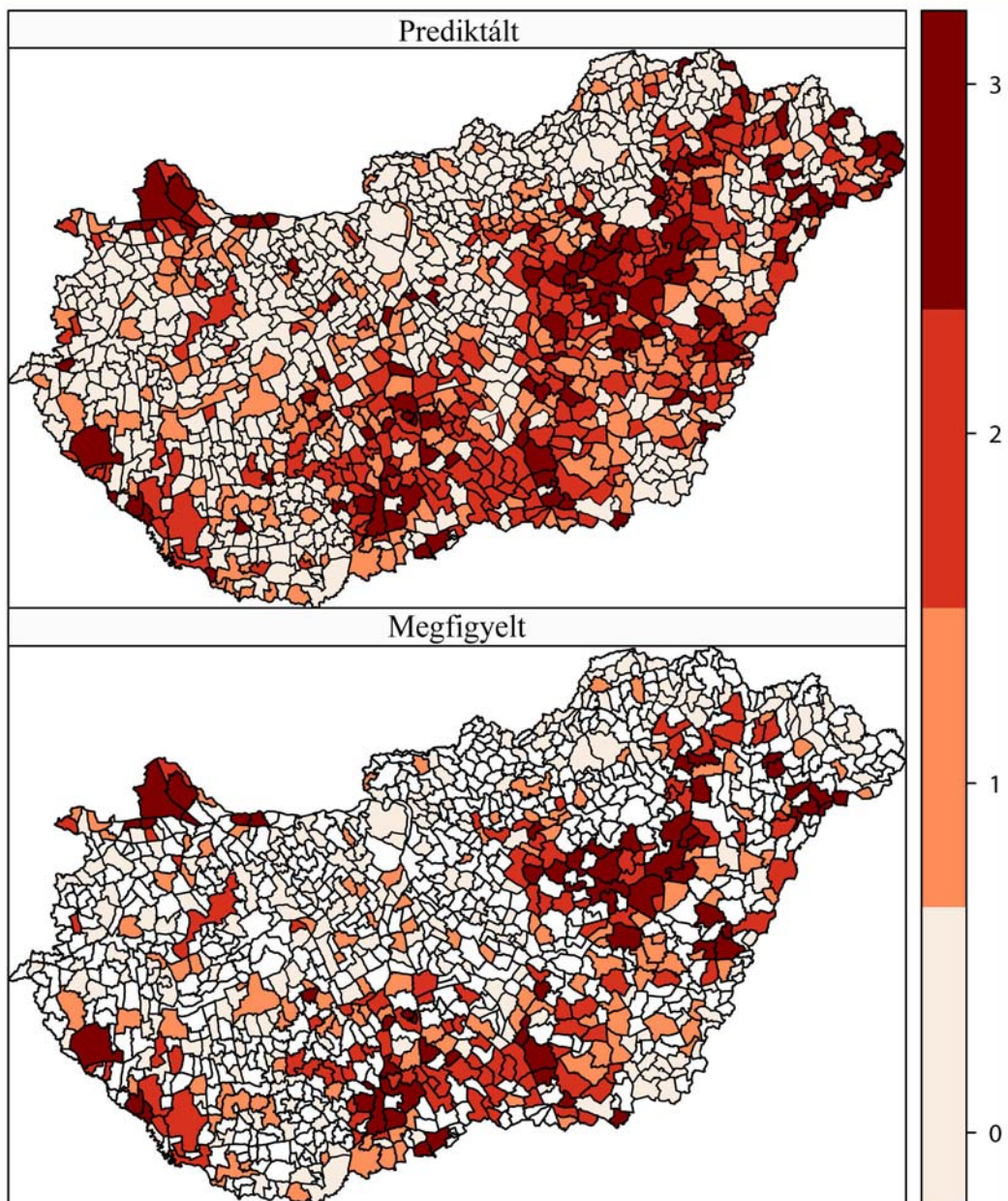
teszt; $p < 0.001$) egy-egy ivaron belül. Elhullott őzekben 34 VGE-ben (válaszadók 11%-a) találtak daganatos elváltozást.



12. ábra: A fibropapillomatózis által elsődlegesen érintett őz korosztályok ivaronkénti eloszlása.

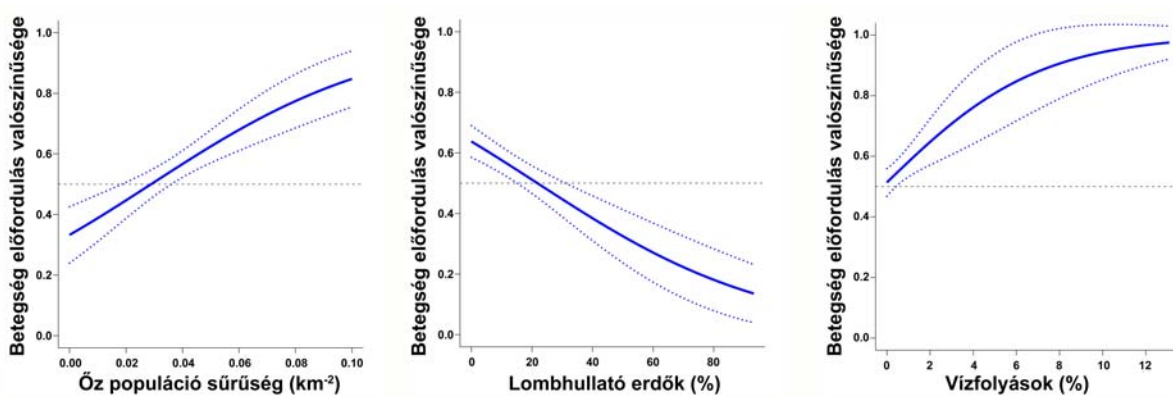
4.3.2. Az előfordulás predikciója

Mind a betegség előfordulási, mind a betegség gyakorisági adatokra épülő random forest algoritmus a következő változókat hasznosította: nem öntözött szántóföldek (211 CLC-kód), legelők (231 CLC-kód), lombhullató erdők (311 CLC-kód), vízfolyások (511 CLC-kód) és őz sűrűség. A megbetegedés kérdőíves adatok alapján megállapított (adatszolgáltató VGE-k) és prediktált (nem válaszoló VGE-vel kibővített) térbeli elterjedését a 13. ábrán mutatjuk be. A betegség jelenlétét a DFI értékekkel jellemeztük.



13. ábra: Az őz fibropapillomatózis elterjedése és DFI értékekkel (1-3) jelölt előfordulási gyakorisága a Vadgazdálkodási Egységekben (VGEk) a kérdőíves felmérés alapján (Megfigyelt) és a Random forest algoritmusra alapozott predikció a nem válaszoló VGEk területére (Prediktált).
 DFI értékek: 0 – Nincs megbetegedés; 1 – Néhány évente egy-egy eset; 2 – Egy-két eset évente; 3 – Több eset évente. Üres poligonok – Nem érkezett válasz.

Mivel a betegség elterjedésének előzetes, vizuális értékelése és a random forest által számolt ún. változó-fontosság értékek („variable importance value”) egyaránt az alacsony fekvésű területek és a fő vízfolyások szerepére utaltak a CcPV1 elterjedésében, ezért teszteltük a betegség előfordulás valamint a szántóföldek, legelők, lombhullató erdők, vízfolyások és az őz populáció sűrűség közti összefüggést. A logisztikus regresszió eredménye szerint az őz populáció sűrűség (OR: 1.284, 95% CI: 1.151-1.433, $p < 0.001$) és a vízfolyások jelenléte (OR: 1.318, 95% CI: 1.105-1.572, $p = 0.002$) növelte, a lombhullató erdővel való terület borítottság pedig csökkentette (OR: 0.974, 95% CI: 0.965-0.984, $p < 0.001$) a CcPV1 fertőzés valószínűségét (14. ábra). A Pearson-féle korrelációs együttható elemzés igen gyenge pozitív, de nem szignifikáns összefüggést mutatott ($R = 0.07$, $p = 0.12$) a vízfolyások jelenléte és az őz populáció sűrűsége között. Gyenge negatív összefüggést ($R = -0.244$, $p < 0.001$) találtunk viszont a lombhullató erdővel való borítottság és az őz populáció sűrűsége között, illetve mérsékelt pozitív összefüggést a nem öntözött szántóföld és az őz populáció sűrűsége között ($R = 0.303$, $p < 0.001$).



14. ábra: A logisztikus regresszió eredménye, amely szerint az őz populáció sűrűség (A) (OR: 1.284, 95% CI: 1.151-1.433, $p < 0.001$) és a vízfolyások jelenléte (B) (OR: 1.318, 95% CI: 1.105-1.572, $p = 0.002$) növeli, míg a lombhullató erdők csökkentik (C) (OR: 0.974, 95% CI: 0.965-0.984, $p < 0.001$) a CcPV1 fertőzés valószínűségét.

4.3.3. Európai előfordulás

A szakirodalom átfogó tanulmányozása és az európai vadegészségügyi adatbázisokban való keresések eredménye alapján kijelenthető, hogy az őzek endémiás jellegű fibropapillomatózisát nem regisztrálták máshol Európában. A megbetegedést a felmérésben résztvevő egyik vadegészségügyi laboratórium sem diagnosztizálta Franciaországban, Svédországban, Németországban vagy az Egyesült Királyságban.

Franciaországban az 1986 és 2007 közötti időszakban 10585 őz tetem kórbonctani vizsgálatát végezték el. Ezek közül csupán egyetlen esetben diagnosztizáltak bőr eredetű daganatot, egy 2005-ben elhullva talált egyed szemhéján találtak egy sarcoid-szerű elváltozást. A Svéd Állategészségügyi Intézetben 1947-től 1982-ig megvizsgált 4168 őz esetet feldolgozó tanulmányában Borg (1991) nem említi fibropapillomás elváltozást a diagnosztizált daganatok között. Egy korábbi összefoglalóban (Borg, 1970) viszont szerepel egy őz fején lokalizált, fibroma-szerű, szoliter tumor fotója. Az SVA 1986 és 2008 májusa között feldolgozott további 2417 őz mintájának diagnózisai között szerepel még egy-egy szoliter bőr fibroma és fibrosarcoma diagnózisa.

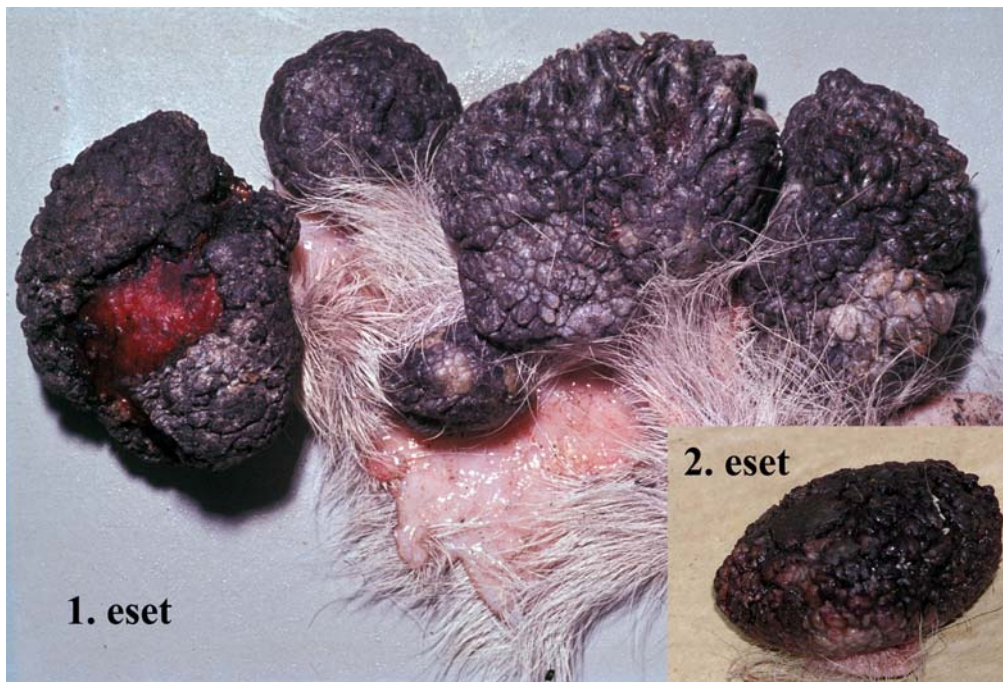
A berlini IZW-ben 1972 és 2008 között vizsgált 231 őz esete közül egyben sem diagnosztizáltak daganatos bőrelváltozást. Az Egyesült Királyságban a VLA Diseases of Wildlife Scheme (VLADoWS) adatbázisában nem szerepelt bőrdaganat a 2000 és 2008 között vizsgált 70 őz tetem diagnózisai között.

4.4 A gímszarvas-papillomavírus

4.4.1. Járványtani és kórtani eredmények

A két különböző helyről származó egyed daganatának morfológiai tulajdonságai majdnem teljesen azonosak voltak (15. ábra). Az ovális, tömött képletek felülete mérsékelt papilláris struktúráltságú, durva, szőrtelen, pigmentált volt. Eróziók csupán az 1. eset néhány daganatos elváltozásának

felszínén voltak láthatók. A daganatok metszészlapja az öz daganatokhoz hasonlóan szürkésfehér, szalonnás fényű volt.

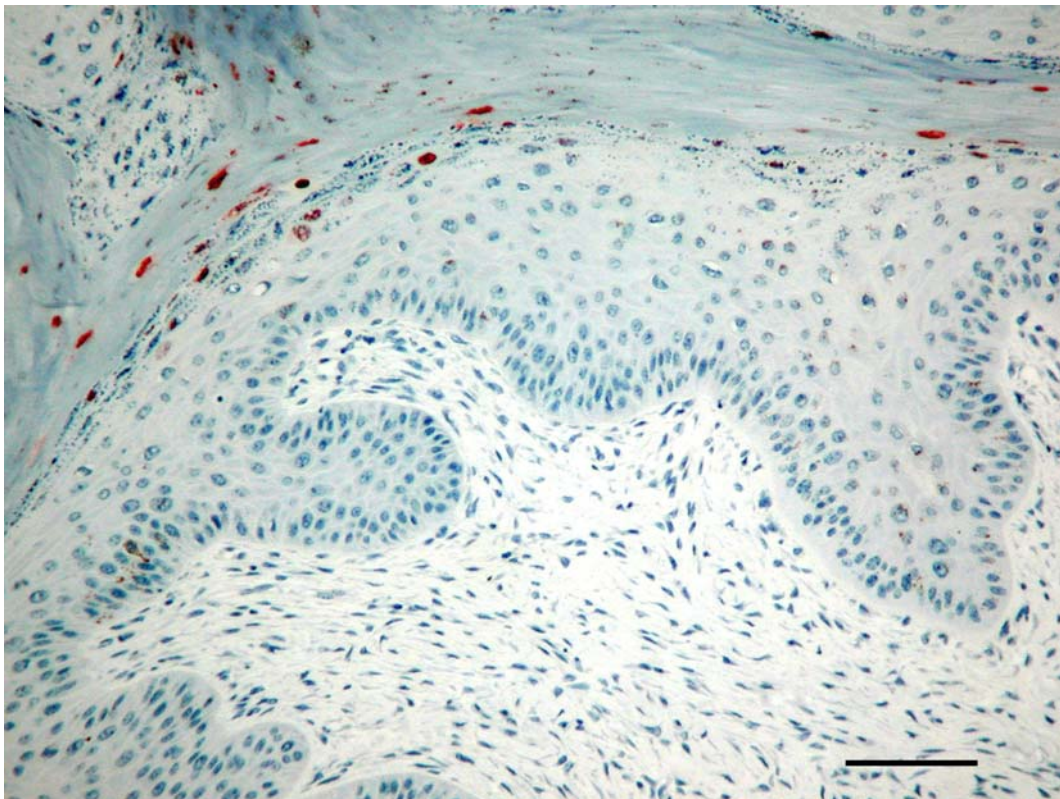


15. ábra: Gímszarvas hastájékáról származó összetett és szoliter, sötét barna színű, szörtelen, egyenetlen felületű fibropapillomák Ausztriából (1. eset) és Magyarországról (2. eset).

A minták szövettani vizsgálata során megállapítottuk, hogy mindkét daganat fibropapilloma, amely fő tömegét az irharétegben sarjadzó fibroblasztok, fibrocyták és rostkötegek alkotják. A daganat felületét fedő epidermiszben hyperkeratózis, parakeratózis és acanthosis látható, elszórtan gócos gyulladással és sejtes beszűrődéssel. A hám stratum basale rétege intakt volt, több helyen melaninban gazdag, és jól kapcsolódott a bazális membránhoz. A 3-6 hámsejt réteg alkotta stratum spinosumban szintén megfigyelhető volt gócos pigment-felhalmozódás. A stratum granulosum sejtjeinek citoplazmájában jelentős mennyiségű basophil granulom volt látható, ahol (a stratum spinosummal egyetemben) több megnagyobbodott, koilocyta-szerű sejt is előfordult. A stratum corneum jelentősen megszélesedett. A daganat strómáját nagyszámú, nagy, ovális magvú fibroblast alkotta, amelyek között kisebb számban megnyúlt magvú fibrocyta kötegek helyezkedtek

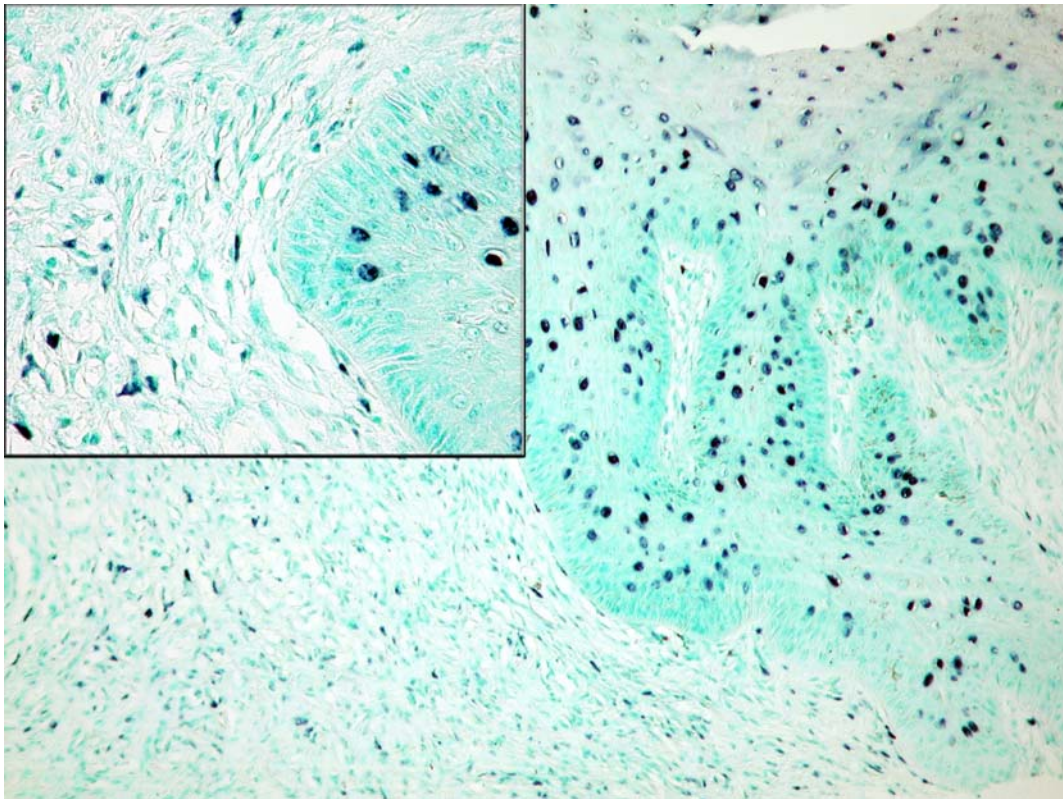
el. Ugyanitt, örvényszerűen, laza, párhuzamos nyálábokba rendeződő kollagén rostok hálójá, illetve nagyszámú vimentin-pozitív fibroblast is látható volt (Erdélyi és mtsai, 2009b).

IHC vizsgálattal a papillomavírus antigén jelenlétét mindkét mintában kimutattuk. A vírus antigén elsősorban a stratum granulosum koilocyta-szerű hámsejtjeinek magjában, illetve ritkábban cytoplazmájában, valamint a stratum corneum elszarusodó sejtrétegei között aggregálódott jól láthatóan mindkét esetben (16. ábra).



16. ábra: A papillomavírus antigén (piros) aggregációja a stratum granulosum sejtjeinek magjában és a stratum corneum elszarusodott sejtrétegei között. IHC, BPV1 ellenanyagokkal. Mércse = 100 μm .

A fenti mintákat a CcPV1 esetében alkalmazott ISH módszerrel megvizsgálva a CePV genomiális DNS-ét mindkét mintában ki tudtuk mutatni. A vírus DNS lokalizációja mindkét gímszarvas mintában megegyezett a CcPV1 DNS őz mintákban kimutatott lokalizációjával. Meglepetésünkre, az epidermis hámsejtjein kívül a 2. esetben a daganat kötőszövetes strómájában található fibroblastok magjában is kimutatható volt a CePV DNS (17. ábra).



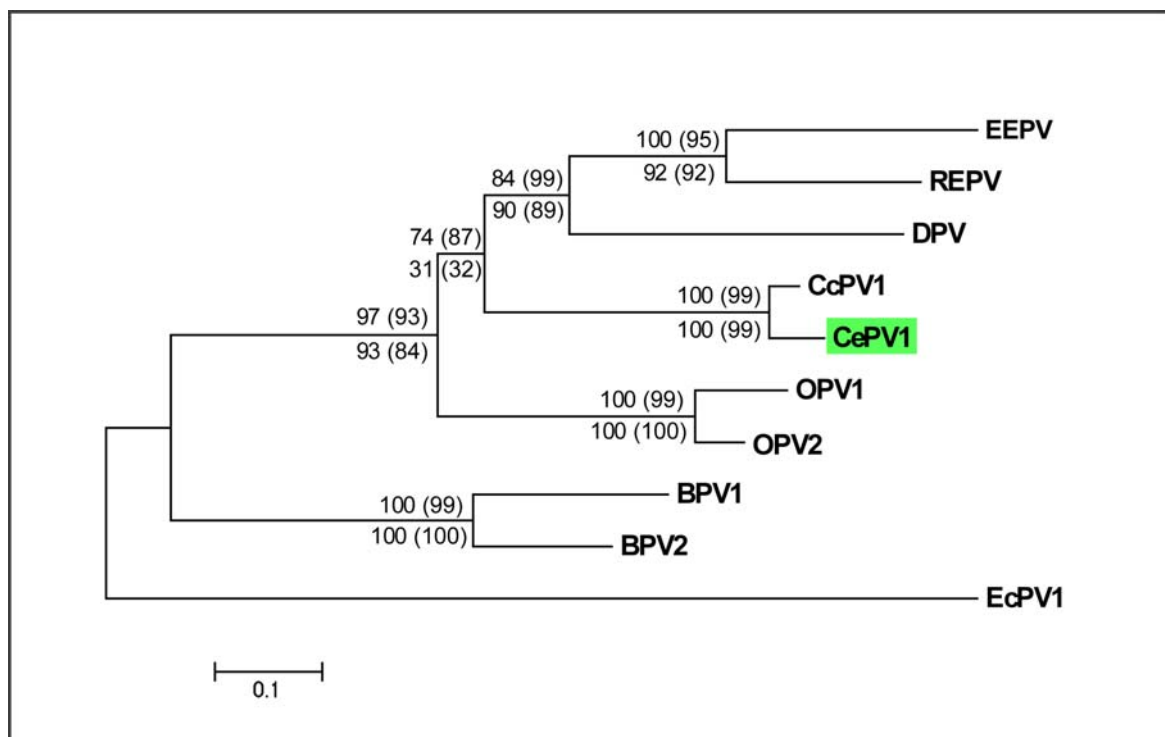
17. ábra: CcPV1 L1 próbbal elvégzett ISH vizsgálat eredménye: CePV genomiális DNS jelenléte (szürkéskek) a hámsejtek magjában és a kötőszövetes stroma fibroblastjainak és fibrocytáinak magjában.

4.4.2. A kimutatott vírus-DNS jellemzése

A PCR vizsgálat csupán az 1. eset fagyasztott szövetmintájának DNS kivonatából járt eredménnyel. A 2. eset sikertelen PCR vizsgálata feltehetően a formalin DNS károsító hatásának következménye lehet. A kapott PCR terméket 588 bp hosszúságban szekvenáltuk és a GenBank adatbázisban EU881493 nyilvántartási számmal helyeztük el. Ahogy azt vártuk is, a szekvencia az L2 ORF 3' terminális szakaszának felelt meg. A parciális CePV L2 ORF nukleotid (és aminosav) szekvenciájának a többi Delta-papillomavírus megfelelő genomszakaszával való összevetése a következő százalékos hasonlósági értékeket (Critical Identity Values - GraphAlign) mutatta: 93% (92%) őz-papillomavírus (CcPV1 – EF680235); 61% (58%) (fehérfarkú) szarvas PV (DPV – NC_001523); 58% (56%) rénszarvas PV (REPV – AF443292) és jávorszarvas PV (EPPV –

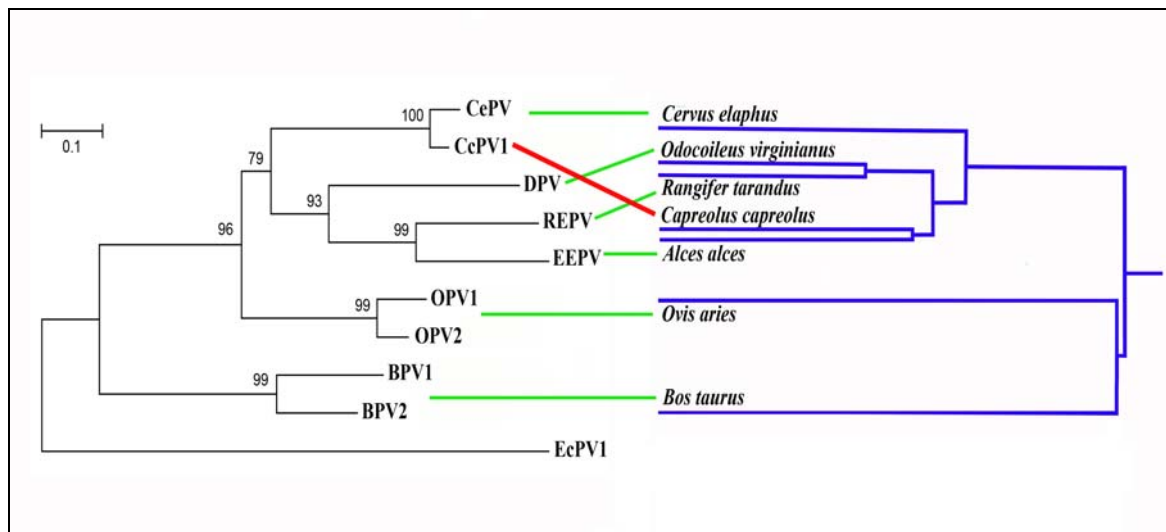
NC_001524); 64% (60%) juh PV (OPV1 – NC_001789) és 49% (38%) szarvasmarha PV (BPV1 – NC_001522).

Kilenc delta-papillomavírus és a ló PV (EcPV1) részleges L2 ORF nukleotid szekvencia illesztésének neighbour-joining és maximum parsimony módszerrel elvégzett filogenetikai vizsgálata megerősítette, hogy a gímszarvas-papillomavírus nagyon közeli rokona az őz-papillomavírusnak (18. ábra).



18. ábra: Kilenc delta-papillomavírus (CePV – (EU881493) gímszarvas-papillomavírus; CcPV1 – (EF680235) őz-papillomavírus; DPV – (NC_001523) szarvas PV; REPV – (AF443292) rénszarvas PV; EEPV – (NC_001524) európai jávorszarvas PV; OPV1 – (NC_001789) juh PV1; OPV2 – (U83595) juh PV2; BPV1 – (NC_001522) szarvasmarha PV1; BPV2 – (M20219) szarvasmarha PV2) és a ló 1-es papillomavírus EcPV1 – (NC_003748) részleges L2 ORF nukleotid szekvencia illesztéséből számított neighbour-joining (NJ) törzsfá. Az elágazásoknál feltüntetett bootstrap értékek a nukleotid és az aminosav (zárójelben) szekvencia illesztések neighbour-joining (fent) és maximum parsimony (alul) elemzésének eredményei.

A CcPV1 és CePV egymáshoz, illetve gazdafajajukhoz való viszonyát tisztázandó, összehasonlítottuk a Delta-papillomavírusok és gazdáik törzsfáját. Az összehasonlításhoz jó alapot szolgáltatott az átfogó, 4510 emlős faj, molekuláris törzsfáját felállító friss közlemény (Bininda-Emonds, 2007) eredményei. Az emlős törzsfának a szerző honlapján elérhető grafikai ábrázolásából először kiemeltük a párosujjú patások csoportját, majd a törzsfát, a vizsgált fajok egymástól való elágazási pontjainak filogenetikai távolságát és gyökerét megtartva egy egyszerűsített törzsfát rekonstruáltunk. Az így rendelkezésre álló két fa ágainak egyszerű vírus-gazda párosítása után kapott eredményt a 19. ábrán szemléltetjük. A két törzsfá párhuzamos topológiát mutatott, ami a delta-papillomavírusok gazdafajhoz kötött evolúciójára utal, de ez alól az őz-papillomavírus kivételt képez. A CePV és a CcPV1 viszonylag friss szétválása, valamint a CcPV1 és az őz nem párhuzamos elhelyezkedése azt valószínűsíti, hogy az őz-papillomavírus gazdaváltás révén alakult ki egy CePV-vel közös gímszarvas-papillomavírus ősből.



19. ábra: A delta-papillomavírusok és gazdafajajuk törzsfájának összevetésével demonstrálható a gazdafajhoz kötött evolúcióra utaló párhuzamos topológia. Az őz-papillomavírus kivételt képez, esetében a gazdaváltással való adaptáció valószínűsíthető.

A papillomavírusok egyes kisebb taxonómiai egységein belül (pl. macska lambda-papillomavírusok) jól dokumentált a gazdafajhoz kötött evolúció (Rector és mtsai, 2007), viszont több papillomavírus genus is igen tág és változatos gazdaspektrummal rendelkezik.

4.5. Új tudományos eredmények

1. Az őz papillomavírus (CcPV1) kimutatása PCR-rel, a teljes genom szekvenálása és jellemzése
2. Az őz papillomavírus (CcPV1) genomiális DNS in situ kimutatása a fertőzött szervezetben in situ hibridizációval
3. A gímszarvas papillomavírus (CePV) kimutatása PCR-rel, továbbá a vírus genomiális DNS és a capsid antigén in situ kimutatása a fertőzött szervezetben in situ hibridizációval illetve immunhisztokémiával
4. Az őz papillomavírus (CcPV1) és a gímszarvas papillomavírus (CePV) filogenetikai jellemzése
5. Az őz fibropapillomatózis elterjedésének felmérése, ökológiai és járványtani sajátosságainak jellemzése
6. Az őz fibropapillomatózis földrajzi elterjedésének predikciója

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Kórtan

Az őz-papillomavírus fertőzés pathomorfológiai és járványtani jellemzői nagyon nagy hasonlóságot mutatnak a fehérfarkú szarvas és más Észak-Amerikában őshonos szarvas fajok DPV fertőzéséhez. A kóros elváltozások, a DPV okozta noduláris tüdő-fibromatózis kivételével, azonosnak tekinthetők. A CcPV1 szerepének tisztázása a két esetben tapasztalt egyértelmű, bár enyhébb fokú tüdő-fibrózis oktanában még további vizsgálatokat igényel. Az ezzel kapcsolatos kérdésekre a vírusfertőzés korai szakaszában aktív vírusfehérjék és gének in situ kimutatására tett kísérletek adhatnak megfelelő választ. Az, hogy a megbetegedés, ivarra való tekintet nélkül, elsősorban az idősebb korosztályok egyedeit érinti, a fiatal egyedekben elváltozást okozó DPV fertőzéssel ellentétben, az európai és az amerikai jávorszarvas fibropapillomatózisának járványtanához hasonló. Ez a sajátosság a megbetegedés kumulálódó jellegére és az elváltozások lassú regressziójára utalhat, de a jelenlegi adatok nem teszik lehetővé, hogy megbecsüljük a betegség lefolyásának időtartamát.

A gímszarvas papillomák kóronctani és kórszövettani jellemzői, valamint a vírus antigén lokalizációja azonosnak mondható a korábban leírtakkal (Moar és Jarrett, 1985). Az IHC reakcióban a CcPV1 és a CePV kimutatására egyaránt sikerrel alkalmazott BPV1 elleni ellenanyagokkal való keresztreakció ténye további bizonyíték a Delta-papillomavírusok szoros antigén rokonságára. Sem a vizsgált gímszarvas, sem az őz esetekben nem találtunk bizonyítékot a daganatok szóródására, illetve azok malignizálódására.

5.2. Virologiai vizsgálatok

Az elsőként általunk azonosított és jellemzett őz-papillomavírus (CcPV1) filogenetikai és a kórtani vizsgálatainak eredményei alapján kijelenthetjük, hogy ez a vírus az őz fibropapillomatózis kórokozója. Amint az várható volt, a CcPV1 amplifikáció sikere azt támasztotta alá, hogy a többi

Delta-papillomavírushoz hasonlóan a CcPV1 genomja is episzomális formában van jelen az őzek fibropapillomás elváltozásaiban.

Ez a vírus a *Papillomaviridae* család Delta-papillomavírus genusába sorolható, és valamennyi közeli rokon vírustól eléggé különbözik ahhoz, hogy javasolható legyen önálló vírus fajként való elismerése az ICTV részéről. Mindez annak ellenére is állítható, hogy a CcPV1 és a legközelebbi rokon EEPV és REPV L1 ORF-jének nukleotid hasonlóságának mértéke (71.2 és 70.3%) meghaladja az új PV fajok elkülönítésére meghatározott 70%-os küszöböt (deVilliers és mtsai, 2004). Véleményünk szerint a törzsfa egyértelmű, statisztikailag is maximálisan alátámasztott topológiája, valamint a filogenetikai távolságok egyaránt az önálló vírus fajként való meghatározás mellett szólnak.

Az először szintén általunk kimutatott gímszarvas-papillomavírus DNS szekvencia filogenetikai és kórtani jellemzői ezt az új vírust is a Delta-papillomavírus genusba sorolják. Ezáltal, a mi eredményeink is alátámasztják Moar és Jarrett (1985) Southern blot eredményeit, melyek szerint az általuk vizsgált gímszarvas fibropapillómában kimutatott papillomavírus közeli rokonságban áll a BPV1-gyel és BPV2-vel. Bár az általunk vizsgált L2 szekvencia a Delta-papillomavírus genomok második legváltozékonyabb ORF-je (García-Vallvé és mtsai, 2005), ennek ellenére alkalmas a genuson belüli filogenetikai viszonyok rekonstrukciójára, elsősorban távolsági mátrix alapú számításokkal (mint pl. a neighbour-joining). A CcPV1 és a CePV közti szoros rokonság valós mértékéről majd a CePV teljes genomjának szekvenálása után lehet végleges képet alkotni.

5.3. Ökológia és járványtan

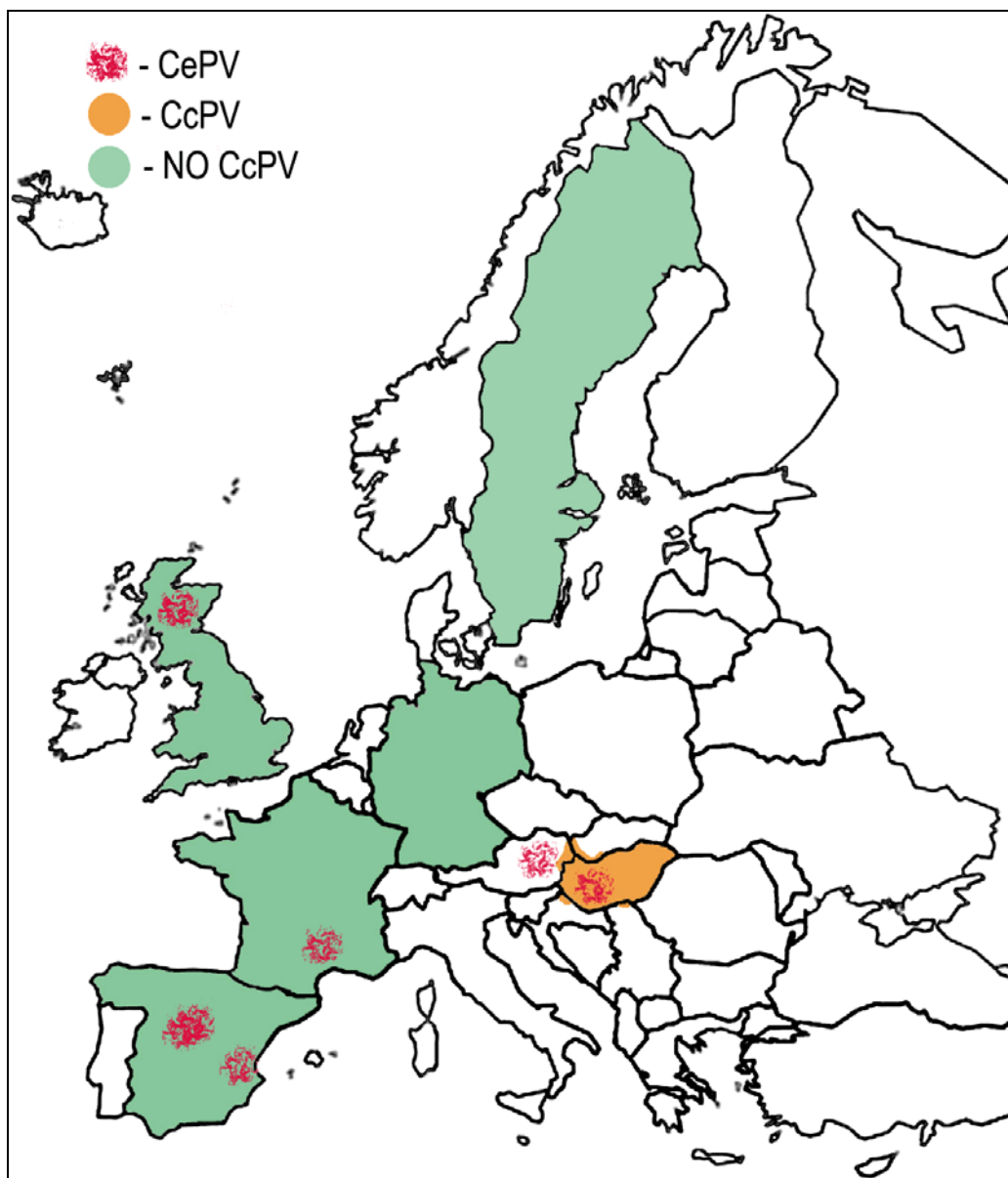
A kérdőíves felmérés eredménye igazolta a betegség előfordulását a korábbi vizsgálatok által (Kocsner, 1996; Kocsner, 2001; Takács és Nagy-Bozsoki, 1998) azonosított területeken, valamint az összes olyan területen is, ahonnan a korábban intézetünkbe küldött mintákon diagnosztizáltuk a

megbetegedést. Több, a kérdőívben fertőzöttként azonosított, terület státusát, a felmérést követően beküldött minták vizsgálatával is megerősíthettük.

A betegség előfordulásának a gazda sűrűséggel és a vízfolyásokkal kimutatott pozitív statisztikai kapcsolata, valamint a két utóbbi változó közötti összefüggés hiánya azt valószínűsíti, hogy a vízfolyásoknak önálló hatása lehet az őz fibropapillomatózis elterjedésére. Az egyik lehetséges magyarázat erre az eredményre az lehet, hogy ezek az élőhelyek kifejezetten előnyösek a CcPV1 ízeltlábú vektorai számára, amelyek komoly szerepet játszhatnak a CcPV1 ökológiájában. Ezt a hipotézist természetesen kísérletben is tesztelni kellene. Mindenesetre, nem zárható ki ezeknek az élőhelyeknek a mezőgazdasági művelésű területeken élő őzpopuláció fokozott, szezonális aggregációját kiváltó hatása sem, aminek a megfigyelt összefüggés akár közvetlen járványtani következménye is lehet.

Az őz populációk genetikai strukturálódásának és az őz fibropapillomatózis endémiás, földrajzilag behatárolt elterjedésének egybeesése tovább erősíti az őz populációk fogékonyágát befolyásoló gazdaspecifikus genetikai tényezők potenciális hatásának lehetőségét (Erdélyi és mtsai, 2008). Felvetődik ugyanis, hogy amennyiben a többi európai őzpopuláció is fogékony lenne a CcPV1 fertőzés iránt, akkor a magas átlagos őzsűrűségek (pl. Franciaország: 9,503 km⁻², Magyarország: 3,404 km⁻²) az általános, mindenhol jelenlevő környezeti stressz-tényezők és az endémiás területekről történt ismételt betelepítések nyomán (Vernesi és mtsai, 2002), a CcPV1 fertőzésnek már Európa más részein is nagy valószínűséggel meg kellett volna jelenni.

A CcPV1 gazdaváltással való kialakulásának valószínűségét a molekuláris filogenetikai vizsgálatok mellett az a tény is tovább erősíti, hogy a gímszarvas fibropapillomatózis (azaz a CePV) szórványosan Európaszerte előfordul, míg az őz fibropapillomatózis (CcPV1) csupán a Kárpát-medencében endémiás, egy genetikailag is lehatárolható, feltehetően fokozottan fogékony gazdapopulációban (20. ábra).



20. ábra: Európai felmérésünk alapján öz fibropapillomatózistól mentes területek (zölddel), az endémiás terület (narancssárgával) és a gímszarvas fibropapillomatózis esetek tágabb környezete (pirossal).

Kivitelezhetősége és gyakorlati hasznossága mellett, az általunk alkalmazott felmérési módszer gyengéje az, hogy a kérdőívvel begyűjtött kategorikus adatokból nem lehetséges klasszikus járványtani mutatókat számítani (pl. betegség prevalencia és incidencia) és hogy a válaszadók által szolgáltatott becslésekben még így is előfordulhat torzítás. Ez elsősorban ott feltételezhető, ahol a betegség előfordulása ritka és felismerésének pontossága alacsony.

Mindenesetre, vizsgálataink eredményei azt jelzik, hogy a kérdőíves felméréseknek van bizonyos helye a vadbetegségek ökológiájának tanulmányozásában. Elsősorban azok a kórképek lehetnek ilyen vizsgálatok tárgyai, amelyek könnyen felismerhetők, megjelenésük jellegzetes, és nem téveszthetők össze túl könnyen más kórképekkel. Ilyen szempontból a fibropapillomatózis alkalmasnak tekinthető kérdőíves felmérésre, de itt említhető a rétisasok ún. „pinching off” szindrómájaként ismert tollfejlődési zavar is (Müller és mtsai, 2007). Véleményünk szerint a területi alapon szerveződő vadgazdálkodási és természetvédelmi szervezetek és rendszerek alkalmasak lehetnek arra, hogy alapadatokat szolgáltatassanak egyes vadbetegségek előfordulásáról, elterjedéséről, és azok vélt vagy becsült hatásáról illetve jelentőségéről. Az ilyen tájékoztató vizsgálatok eredményeire a későbbiekben konkrét kórokozók vagy gazda populációk monitoringja és célzott kutatások alapozhatók.

6. Összefoglalás

Vizsgálataimmal a magyarországi őzállományokban rendszeresen előforduló daganatos bőrelváltozásokkal kapcsolatos oktani, kórtani és járványtani-ökológiai ismeretek hiányát igyekeztem betölteni. Dolgozatomban ismertetem továbbá a gímszarvas bőrdaganatok hasonló mélységű vizsgálatának eredményeit és a kórokozóként azonosított vírusok evolúciós kapcsolatáról kialakított megállapításaimat.

A betegség az őzekben könnyen felismerhető bőrdaganatok kialakulásával jár, és nagyon hasonlít az Észak Amerikai szarvasfélékben ismert szarvas papillomavírus (DPV) fertőzéshez. Molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottuk az eddig ismeretlen őz-papillomavírust és az elváltozásokban kimutattuk mind a papillomavírus antigén (immunhisztokémiai vizsgálat), mind az őz-papillomavírus genom jelenlétét (in situ hibridizáció). A daganatok, ivartól függetlenül, leggyakrabban a kifejlett egyedekben jelentkeznek, változatos nagyságúak és igen nagyok is lehetnek, ami felveti a fertőzés kumulatív tendenciájának lehetőségét. Megállapítottuk, hogy az őz-papillomavírus (CcPV1) fertőzés okozta bőrdaganatos megbetegedés endémiás a Kárpát medence őz populációiban (Magyarországon, Ausztriában, Horvátországban és Szlovákiában). A CcPV1 elterjedése véleményünk szerint valóban csak az általunk azonosított területekre korlátozódik, amit az európai vad-patológusok körében (Spanyolország, Franciaország, Egyesült Királyság, Portugália, Svédország és Németország) elvégzett felmérésünkre, valamint arra a tényre alapozunk, hogy a szakirodalomban Európa más területeiről nem található a betegsége vonatkozó közlés. A betegség iránti fogékonyság alakításában a gazdapopulációk közti genetikai különbségeknek is szerepe lehet, mivel az európai őz korábbi vizsgálatok által definiált két fő genetikai csoportja (dél- és kelet-európai illetve nyugat-, közép- és észak-európai) közti határvonal egybeesik a CcPV1 elterjedésének nyugati határával. A megbetegedés magyarországi elterjedését egy minden vadgazdálkodási egységre (VGE) kiterjedő kérdőíves felméréssel térképeztük fel. A kapott adatok térinformatikai és statisztikai értékelése során megállapítottuk, hogy a kórkép jelenléte pozitív kapcsolatot mutat az őz populáció sűrűségével és a vízfolyások jelenlétével, míg az erdősültség csökkenti a fertőzés

valószínűségét. A Random forest algoritmusra alapozva prediktáltuk a betegség előfordulásának valószínűségét a nem válaszoló VGE-k területére.

A magyarországi fibropapillomás bőrelváltozásokból amplifikáltuk és szekvenáltuk az általunk leírt őz-papillomavírus (CcPV1) teljes genomját, amely 8032 bp hosszú, tartalmazza a delta-papillomavírusokra jellemző ORF-eket (E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9, L2 és L1) és a 799 bp hosszú nem kódoló, szabályozó régiót (URR) is. A négy fő ORF (E1, E2, L2, L1) 3861 bp hosszú összevont illesztésén és a fő ORF-ek önálló illesztésén alapuló filogenetikai vizsgálataink szerint a CcPV1 a juh és a többi szarvasféle papillomavírusai között, egy önálló ágon helyezkedik a *Deltapapillomavirus* genuson belül. A CcPV1 L1 ORF szekvencia a jávorszarvas (*European elk papillomavirus*), valamint a rénszarvas-papillomavírussal (*Reindeer papillomavirus*) mutatta a legmagasabb fokú hasonlóságot (71,2% és 70.3%).

Magyarországon, Ausztriában és Spanyolországban szórványosan gímszarvason (*Cervus elaphus*) is regisztráltak bőrdaganatok előfordulását. Egy-egy magyarországi és ausztriai eset szövettani vizsgálatával megállapítottuk, hogy kifejezett fibroblast proliferációval és a hámréteg hypekeratóziséval, parakeratóziséval és acanthosissal, valamint helyenként gócos gyulladással járó fibropapillomás elváltozásokról van szó. Az elváltozásokban immunhisztokémiai vizsgálattal kimutattuk a papillomavírus antigén, in situ hibridizációval pedig a CcPV1-hez hasonló DNS jelenlétét. PCR reakcióval az osztrák mintából és spanyol DNS kivonatokból sikeresen kimutattuk a papillomavírus DNS jelenlétét. A gímszarvas-papillomavírus részleges L2 ORF szakasza magas fokú hasonlóságot mutatott a delta-papillomavírusok homológ szakaszaival, elsősorban a CcPV1-gyel (93%). A részleges L2 szekvenciára alapozott neighbour-joining és maximum parsimony alapú filogenetikai vizsgálat megerősítette, hogy a gímszarvas-papillomavírus nagyon közeli rokonságban áll az őz papillomavírussal és feltételezésünk szerint gímszarvas-papillomavírus lehet a nem túl régen kialakult őz-papillomavírus őse.

7. Summary

In this study I attempted to fill in the knowledge gaps regarding the etiology, pathology, epidemiology and ecology of the cutaneous neoplastic disease occurring regularly in Hungarian roe deer populations. In my theses I disclose the results of the similarly detailed study of sporadically occurring red deer skin tumours and the evolutionary relationship between the viruses identified as the causative agent of the above diseases.

Roe deer fibropapillomatosis is a wide-spread disease occurring endemically at low prevalence in roe deer populations of the Carpathian basin (Hungary, Austria, Croatia and Slovakia). Pathological features of CcPV1 infection closely resemble DPV infection of North American cervids. We identified a novel roe deer papillomavirus (CcPV1) by molecular methods and have also demonstrated the presence of both papillomavirus antigen (by immunohistochemistry) and viral DNA (by in-situ hybridisation) in the lesions. Tumours most often occur in older adults of both sexes, they can greatly vary in size and may eventually become very large, suggesting a cumulative tendency in the incidence of the infection. Based on enquiries among European wildlife pathologists in Spain, France, UK, Portugal, Sweden and Germany, and the lack of scientific reports on the occurrence of fibropapillomas of roe deer elsewhere in Europe, we suspect that the distribution of CcPV1 may be limited to the above mentioned populations. The possibility of genetically determined differences in susceptibility of host populations can not be excluded, since the boundary between the two major genetic clusters of European roe deer populations (Southern and Eastern European vs. Western, Central and Northern European) established by earlier studies corresponds to the westernmost distribution limits of CcPV1. The distribution of the disease was assessed by a questionnaire survey among Hungarian game management units (GMUs). By statistical and GIS methods we established that disease distribution showed positive correlation with roe deer population density and the presence of waterways while the presence of deciduous forests decreased the odds of CcPV1 infection. The probability of disease occurrence was predicted for non-responding GMUs by the Random forest algorithm.

The complete genomic DNA of CcPV1 was amplified and sequenced from skin lesions of Hungarian roe deer. The CcPV1 genome was 8032 bp long and contained open reading frames (ORFs) typical for Delta-papillomaviruses (E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9, L2, and L1) and a 799 bp long untranslated regulatory region (URR). Phylogenetic analysis based on the 3861bp long concatenated sequence of the E1-E2-L2-L1 ORFs and on separate alignments of all major ORFs using both Neighbour-Joining and Maximum Parsimony methods placed CcPV1 on a distinct branch between *Ovine papillomavirus 1* and the other deer papillomaviruses within the *Delta-papillomavirus* genus, although pairwise nucleotide alignments of L1 ORF sequences determined highest identities with European elk papillomavirus (71.2%) and Reindeer papillomavirus (70.3%).

Sporadic occurrence of fibropapillomas on red deer (*Cervus elaphus*) was registered in Hungary, Austria and Spain. Histological examination of the Hungarian and Austrian cases classified the tumours as fibropapillomas, showing marked proliferation of fibroblasts and connective tissue, accompanied by the hyperkeratosis, parakeratosis, acanthosis of the overlying epidermis, and occasional foci of inflammation. The presence of papillomavirus antigen and of a DNA sequence very similar to CcPV1 DNA was demonstrated by immunohistochemistry and in-situ DNA hybridisation in both cases. Papillomavirus specific DNA was successfully amplified by PCR from the Austrian and Spanish samples. The partial nucleotide sequence of the Red deer papillomavirus L2 ORF exhibited highest critical identity values with the homologous regions of Delta-papillomaviruses, especially the *Roe deer papillomavirus* (93%). Phylogenetic analysis of the partial L2 ORF sequence alignment of 10 papillomaviruses confirmed that the red deer PV is very closely related to the CcPV1. Furthermore, the phylogenetic analysis of Delta-papillomaviruses suggests that the Red deer papillomavirus could be a fairly recent ancestor of CcPV1.

M.1 Irodalomjegyzék

- Ahola, H., Bergman, P., Strom, A. C., Moreno-Lopez, J., Pettersson., U. (1986): Organization and expression of the transforming region from the European elk papillomavirus (EEPV). *Gene* 50 (1-3) 195-205. p.
- Andersen, R., P. Duncan, and J.D.C. Linnell, (Szerk.) (1998): The European Roe Deer: The Biology of Success. Scandinavian University Press, Oslo, 376 p.
- Bernard, H.-U., Chan, S.-Y. (1997): Animal Papillomaviruses, in: Myers, G., Sverdrup, F., Baker, C., McBride, A., Munger, K., Bernard, H.-U., Meissner, J. (Szerk.): Human Papillomaviruses: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 100-109. p.
- Bernard, H.U. (1994): Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends in Microbiology*, 2 (4) 140-143. p.
- Bininda-Emonds, O.R., Cardillo, M., Jones, K.E., MacPhee, R.D., Beck, R.M., Grenyer, R., Price, S.A., Vos, R.A., Gittleman, J.L., Purvis, A. (2007): The delayed rise of present-day mammals. *Nature*, 446 (7135) 507-512. p.
- Borg, K. (1970): On mortality and reproduction of roe deer in Sweden during the period 1948-1969. *Viltrevy*. 7 (2) 121-149. p.
- Borg, K. (1975): Viltsjukdomar. L. T. Forlag, Stockholm, Sweden, 191 p.
- Borg, K. (1991): Rådjur, Dödsorsaker, miljöpåverkan och rättsmedicin. Naturvårdsverket, [Roe deer. Causes of death, environmental factors and forensics. Swedish environmental protection agency, report no. 3921] in Swedish. Solna, Sweden, 108 p.
- Bravo, I. G., Alonso, A. (2007): Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*, 34 (3) 249-262. p.
- Breiman, L. (2001): Random Forests. *Machine Learning*. 45 (1) 5–32. p.
- Campo, M. S. (2002): Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*, 89 (2) 249-261. p.

- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16 (22) 10881-10890. p.
- Coulon, A., Cosson, J. F., Angibault, J. M., Cargnelutti, B., Galan, M., Morellet, N., Petit, E., Aulagnier, S., Hewison, A. J. (2004): Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13 (9) 2841-2850. p.
- Coulon, A., Guillot, G., Cosson, J.F., Angibault, J.M., Aulagnier, S., Cargnelutti, B., Galan, M., Hewison, A.J. (2006): Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology*, 15 (6) 1669-1679. p.
- Csányi, S., Lehoczki, R. (2007): Európai őz, in: Bihari, Z., Csorba, G., Heltai, M. (Szerk.): Magyarország emlőseinek atlasza. Kossuth Kiadó, Budapest, 257-260 p.
- Danilkin, A., Hewison, A. J. M. (Szerk.) (1996): Behavioural ecology of Siberian and European roe deer. Chapman & Hall, London, 277 p.
- Erdélyi, K., Bálint, Á., Dencső, L., Dán, Á., Ursu, K. (2008): Characterisation of the first complete genome sequence of the roe deer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. *Virus Research*, 135 (2) 307-311. p.
- Erdélyi, K., Dencső, L., Lehoczki, R., Heltai, M., Sonkoly, K., Csányi, S., Solymosi, N. (2009a): Endemic papillomavirus infection of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Veterinary Microbiology*, 138 (1-2) 20-26. p.
- Erdélyi, K., Gál, J., Sugár, L., Ursu, K., Forgách, P., Szeredi, L., Steineck, T. (2009b): Papillomavirus associated fibropapillomas of red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 57 (2) 337-344. p.
- Eriksson, A., Stewart, A.C., Moreno-Lopez, J., Pettersson, U. (1994): The genomes of the animal papillomaviruses European elk papillomavirus, deer papillomavirus, and reindeer papillomavirus contain a novel transforming gene (E9) near the early polyadenylation site. *Journal of Virology*, 68 (12) 8365-8373. p.

- Ernhart, J. (1996): Összehasonlító populációgenetikai vizsgálatok magyarországi őzpopulációkban. *Vadbiológia*, 5, 92-97. p.
- García-Vallvé, S., Alonso, Á., Bravo, I. (2005): Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in Microbiology*, 13 (11) 514-521. p.
- Gottschling, M., Stamatakis, A., Nindl, I., Stockfleth, E., Alonso, A., és Bravo, I. G. (2007): Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (5) 1242-1258. p.
- Gottschling, M., Wibbelt, G., Wittstatt, U., Stockfleth, E., Nindl, I. (2008): Novel papillomavirus isolates from *Erinaceus europaeus* (Erinaceidae, Insectivora) and the Cervidae (Artiodactyla), *Cervus timorensis* and *Pudu puda*, and phylogenetic analysis of partial sequence data. *Virus Genes*, 36 (2) 281-287. p.
- Groff, D. E., Lancaster, W. D. (1985): Molecular cloning and nucleotide sequence of deer papillomavirus. *Journal of Virology*, 56 (1) 85-91. p.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposia*, Ser. 41, 95-98. p.
- Ho, L., Chan, S. Y., Burk, R. D., Das, B. C., Fujinaga, K., Icenogle, J. P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P. és mtsai. (1993): The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*, 67 (11) 6413-6423. p.
- Herbst, L. H., Lenz, J., Van Doorslaer, K., Chen, Z., Stacy, B. A., Wellehan, J. F. Jr, Manire, C. A., Burk, R. D. (2009): Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology*, 383 (1) 131-135. p.
- Hönich, M., Sugár, L., Kemenes, F. (1978): A vadon élő állatok betegségei. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 180-181. p.
- Kocsner, T. (1996): Az őzek bőrfibromatózisának hazai előfordulása. Szakdolgozat. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest.

- Kocsner, T. (2001): Az őzek bőrfibromatózisa. Szakállatorvosi szakdolgozat. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék, Budapest.
- Koller, L. D., Olson, C. (1971): Pulmonary fibroblastomas in a deer with cutaneous fibromatosis. *Cancer Research*, 13 (10) 1373-1375. p.
- Lackovich, J. K., Brown, D. R., Homer, B. L., Garber, R. L., Mader, D. R., Moretti, R. H., Patterson, A. D., Herbst, L. H., Oros, J., Jacobson, E. R., Curry, S. S., Klein, P. A. (1999): Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37 (2) 89-97. p.
- Lancaster, W. D., Sundberg, J. P. (1982): Characterization of papillomaviruses isolated from cutaneous fibromas of white-tailed deer and mule deer. *Virology*, 123 (1) 212-216. p.
- Lorenzini, R., Lovari, S. (2006): Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: the refuge area theory revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88 (1) 85–100. p.
- McDiarmid, A. (1975): Some disorders of wild deer in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 97 (1) 6-9. p.
- Mietz, J. A., Unger, T., Huibregtse, J. M., Howley, P. M. (1992): The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO Journal*, 11 (13) 5013-5020. p.
- Mikko, S., Roed, K., Schmutz, S., Andersson, L. (1999): Monomorphism and polymorphism at Mhc DRB loci in domestic and wild ruminants. *Immunological Reviews*, 167 (1) 169-178. p.
- Moar, M. H., Jarrett, W. F. (1985): A cutaneous fibropapilloma from a red deer (*Cervus elaphus*) associated with a papillomavirus. *Intervirology*, 24 (2) 108-118. p.
- Moreno-Lopez, J., Ahola, H., Eriksson, A., Bergman, P., Pettersson, U. (1987): Reindeer papillomavirus transforming properties correlate with a highly conserved E5 region. *Journal of Virology*, 61 (11) 3394-3400. p.
- Moreno-Lopez, J., Morner, T., Pettersson U. (1986): Papillomavirus DNA associated with pulmonary fibromatosis in European elks. *Journal of Virology*, 57 (3) 1173-1176. p.

- Moreno-Lopez, J., Pettersson, U., Dinter, Z., Philipson, L. (1981): Characterization of a papilloma virus from the European elk (EEPV). *Virology*, 112 (2) 589-595. p.
- Müller, K., Altenkamp, R., Brunberg, L., Fasungová, L., Freymann, H., Frölich, K., Kollmann, R., Krone, O., Literák, I., Mizera, T., Sömmer, P., Schettler, E. (2007): Pinching off syndrome in free-ranging white-tailed sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) in Europe: frequency and geographic distribution of a generalized feather abnormality. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 21 (2) 103-109. p.
- Münger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M., Zacny, V. L. (2001): Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, 20 (54) 7888-7898. p.
- Nakahara, T., Nishimura, A., Tanaka, M., Ueno, T., Ishimoto, A., Sakai, H. (2002): Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *Journal of Virology*, 76 (21) 10914-10920. p.
- Narechania, A., Terai, M., Chen, Z., DeSalle, R., Burk, R. D. (2004): Lack of the canonical pRB-binding domain in the E7 ORF of artiodactyl papillomaviruses is associated with the development of fibropapillomas. *Journal of General Virology*, 85 (5) 1243-1250. p.
- Nicholls, P. K., Stanley, M. A. (2000): The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73 (2) 101-127. p.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shirasawa, H. (2007): Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of General Virology*, 88 (7) 1934-1938. p.
- Pérez, J., García, P. M., Mozos, E., Astorga, R., Borge, C., Arenas, A. (2002): Multiple fibropapilloma in a red deer (*Cervus elaphus*). [in Spanish] *Información Veterinaria (España)* No.236, 43-46. p.
- Petti, L. M., Ray, F. A. (2000): Transformation of mortal human fibroblasts and activation of a growth inhibitory pathway by the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Cell Growth and Differentiation*, 11 (7) 395-408. p.

- Pitra, C., Fickel, J., Meijaard, E., Groves, P. C. (2004): Evolution and phylogeny of old world deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33 (3) 880-895. p.
- Rajský, D., Danihel, L., Šišovský, V., Lebocký, T., Kantíková, M., Sokol, Pliešovský, J., Juriš, P., Mračko, I. (2009a): Fibromatóza cervidov – etiológia, výskyt a plošná distribúcia na Slovensku. *Slovenský veterinársky časopis*, 34 (1) 45-49. p.
- Rajský, D., Pliešovský, J., Sokol, J., Lešník, F., Erdélyi, K., Danihel, L., Juriš, P., Garaj, P. (2009b): Aktuálne problémy zdravia jeleňovitých na Slovensku so zameraním na fibromatózu (fibropapilomatózu) u srnčej zveri. Výživa a veterinárna problematika chovu jeleňovitých, Zborník referátov z medzinárodnej konferencie, Nitra, 12.11.2009. pp. 44-57. p.
- Rajský, D., Erdélyi, K., Sugár, L., Krajniak, E. (2009c): Najnovšie doplnky (november 2009) k prognóze rozšírenia fibromatózy (fibropapilomatózy) v rámci zástupcov podčeláde *Cervinae* na Slovensku. Výživa a veterinárna problematika chovu jeleňovitých, Zborník referátov z medzinárodnej konferencie, Nitra, 12.11.2009. pp. 88-89. p.
- Randi, E., Pierpaoli, M., Danilkin, A. (1998): Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*, 80 (4) 429-437. p.
- Randi, E., Alves, P. C., Carranza, J., Milosevic-Zlatanovic, S., Sfougaris, A., Mucci, N. (2004): Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13 (10) 3071-3083. p.
- R Development Core Team [2008]: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rector, A., Lemey, P., Tachezy, R., Mostmans, S., Ghim, S. J., Van Doorslaer, K., Roelke, M., Bush, M., Montali, R. J., Joslin, J., Burk, R. D., Jenson, A. B., Sundberg, J. P., Shapiro, B., Van Ranst, M. (2007): Ancient papillomavirus-host co-speciation in *Felidae*. *Genome Biology*, 8 (4) R57. p.

- Robinson, A. J., Kerr, P. J. (2001): Poxvirus infections, in: Williams, E. S., Barker, I. K. (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 179-201.
- Salajpal, K., Sostaric, B., Vickovic, I., Tonicic J. (2006): Cutaneous fibroma of roe deer (*Capreolus capreolus*) – still a “novel” disease in Croatia. Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Wildlife Disease Association, August 6-10, 2006, Storrs, Connecticut, USA. 125 p.
- Schwarzacher, T., Harrison, P. H. (2000): *Practical In Situ Hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. 203 p.
- Shope, R. E. (1955): An infectious fibroma of deer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 56: 793-802.
- Shope, R. E., Mangold, R., Macnamara, L. G., Dumbell, K. R. (1958): An infectious cutaneous fibroma of the Virginia whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Experimental Medicine*, 108 (6) 797-802. p.
- Solymosi, N. (2008): Vektorokkal terjedő kórokozók elterjedtségének predikciója környezeti tényezők alapján. Magyar Parazitológusok Társaságának tudományos ülése, Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, Hungary, 2008. november 27.
- Spalding, J. B., Lammers, P. J. (2004): BLAST Filter and GraphAlign: rule-based formation and analysis of sets of related DNA and protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 32, W26-W32. p.
- Stenlund, A., Moreno-Lopez, J., Ahola, H., Pettersson, U. (1983): European elk papillomavirus: characterization of the genome, induction of tumors in animals, and transformation in vitro. *Journal of Virology*, 48 (2) 370-376. p.
- Sundberg, J. P. (1987): Papillomavirus infections in animals. *In*: Syrjanen, K., Gissmann, L., Koss, L. (Szerk): *Papillomaviruses and Human Disease*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 40-103. p.
- Sundberg, J. P., Chiodini, R. J., Nielsen, S. W. (1985a): Transmission of the white tailed deer cutaneous fibroma. *American Journal of Veterinary Research*, 46 (5) 1150-1154. p.

- Sundberg, J. P., Williams, E. S., Hill, D., Lancaster, W. D., Nielsen, S. W. (1985b): Light and electron microscopic comparisons of cutaneous fibromas in white-tailed and mule deer. *American Journal of Veterinary Research*, 46 (10) 2200-2206. p.
- Sundberg, J., Lancaster, W.D. (1988): Deer papillomaviruses. *Developments in Veterinary Virology*, 6, 279-291. p.
- Sundberg, J. P., Nielsen, S. W. (1981): Deer fibroma: a review. *Can. Vet. J.* 22(12): 385-388.
- Sundberg, J. P., Van Ranst, M., Jenson, A. B. (2001): Papillomavirus infections, in: Williams, E. S., Barker, I. K. (Szerk.): *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press, Ames, IA 223-231. p.
- Takács, A., Nagy-Bozsoki, J. (1998): Fibromatosis magyarországi előfordulása az őz (*Capreolus c. capreolus*) bőrében nagyalföldi őzállományokban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 120 (7) 431-433. p.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8) 1596-1599. p
- Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P. W., Amin, A., Cordingley, M. G., Archambault, J. (1999): Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *Journal of Virology*, 73 (7) 5282-5293. p.
- Tyler, G. V., Summers, J. W., Synder, R. L. (1981): Woodchuck hepatitis virus in natural woodchuck populations. *Journal of Wildlife Diseases*, 17 (2) 297-301. p.
- Varsani, A., van der Walt, E., Heath, L., Rybicki, E. P., Williamson, A. L., Martin, D. P. (2006): Evidence of ancient papillomavirus recombination. *Journal of General Virology*, 87 (9) 2527-2531. p.
- Vernes, C., Pecchioli, E., Caramelli, D., Tiedemann, R., Randi, E., Bertorelle, G. (2002): The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, 11 (8) 1285-1297. p.

- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., zur Hausen, H. (2004): Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324 (1) 17-27. p.
- Xia, X., Xie. Z. (2001): DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92 (2) 371-373. p.
- zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2 (5) 342-50. p.

M.2 Kérdőív – kísérelvél

Országos Állategészségügyi Intézet
Emlős Kórbonctani és Vadbetegségek Osztály
1149 Budapest, Tábormok u. 2.

Tel.: 06-1-4606356
06-20-9572776
Fax: 06-1-2525177
e-mail: kerdelyi@gmail.com

Tisztelt Vadgazdálkodó!

Magyarország egyes özállományaiban rendszeresen előfordul egy, a közvéleményt folyamatosan foglalkoztató, daganatos bőrelváltozásokkal járó megbetegedés. Ezek a bőrelváltozások igen kiterjedtek és taszítók lehetnek (ld. a hátlapon mellékelt képeket és leírást). A vadgazdálkodók körében a megbetegedésnek tulajdonított jelentőséget az Országos Állategészségügyi Intézetbe (OAI) az elmúlt évek során beküldött növekvő számú vizsgálati minta is jelzi.

Ma már tudjuk, hogy a kérdéses betegség, a bőr jóindulatú, kötőszövet-szaporodással járó daganata, azaz fibropapilloma. A betegséget vadfajonként elkülönülő papillomavírus okozza, amelyek emberre veszélytelenek. Az őzekben előforduló fertőzések általános kórtani hatásáról keveset tudunk, de a nagy kiterjedésű, látást, táplálkozást és mozgást is korlátozó bördaganatokon túl, valószínűleg egyéb szervi elváltozásokat is okoznak, amelyek végül általános kondíció-romláshoz vezethetnek. A kórokozó feltehetően vérszívó rovarok csípésével és borsérülések fertőződésével terjed. A betegség illetve a bőrelváltozások az esetek egy részében a kialakuló immunitás hatására gyógyulnak, ezt a folyamatot viszont külső tényezők, mint pl. a növekvő stressz, vektor- és gazdapopuláció sűrűség, stb. negatívan befolyásolhatják, ami végül az esetek halmozódásához vezethet a populációban.

A megbetegedéssel kapcsolatban felmerülő kérdések tisztázására az OAI és a gödöllői Szent István Egyetem Vadbiológiai és Vadgazdálkodási Tanszékének szakemberei vállalkoztak az FVM Vadászati Halászati és Vizgazdálkodási Főosztályának támogatásával. Ezzel a kérdőívvel, a megbetegedés országos elterjedtségét és vadgazdálkodási jelentőségét szeretnénk felmérni. A beérkező adatok alapján lehetőség nyílik majd az őz papillomavírus kártételének és elterjedtségének értékelésére, elterjedését befolyásoló tényezők elemzésére, vadgazdálkodási és védekezési javaslatok kidolgozására.

Az Önök által közölt adatokat bizalmasan kezeljük, és kizárólag a tanulmány elkészítéséhez használjuk fel. A felmérés eredményeit nem vadgazdálkodási egység szinten közöljük, így a szolgáltatott információk a vadgazdálkodási egység érdekeivel szemben nem használhatók fel. Ugyanez vonatkozik a vadgazdálkodási egység Országos Vadgazdálkodási Adattárban szereplő özállomány adatainak felhasználására is, melyekre a kórokozó ökológiai vizsgálatához van szükség. Kérjük, hogy ezen adatok felhasználásához a kérdőívben szereplő nyilatkozat aláírásával járuljon hozzá.

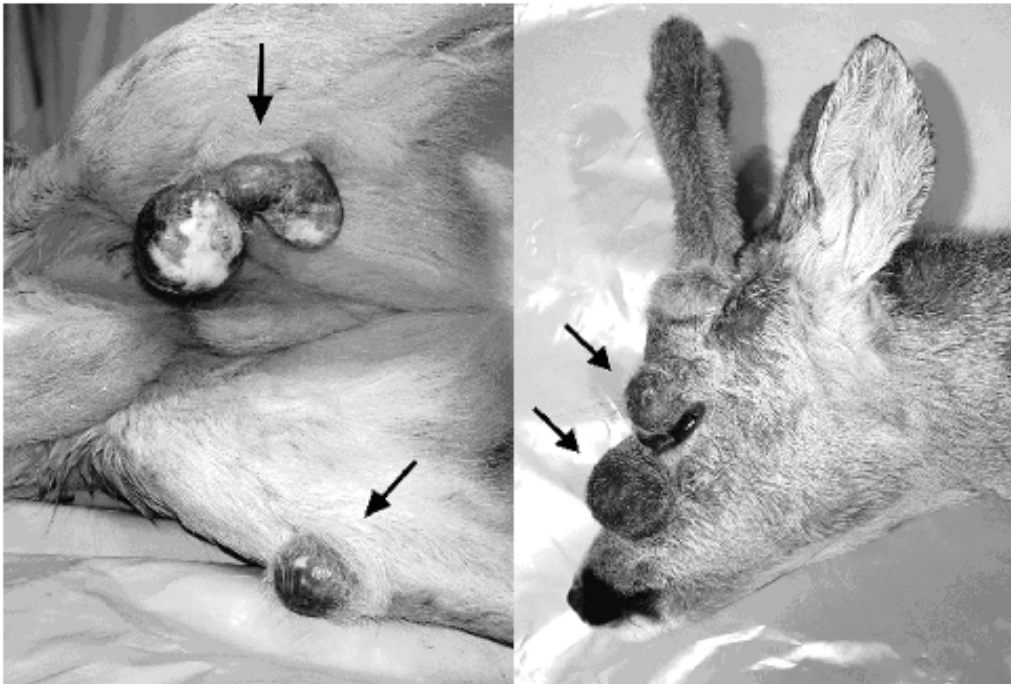
Az adatlap figyelmes elolvasása, kitöltése (a megfelelő válasz beikszelésével) és aláírása után, kérjük, juttassa azt vissza az Országos Állategészségügyi Intézet címére, legkésőbb 2006. április 30-ig. Ha a kitöltéssel kapcsolatban bármilyen kérdése van, a 06-1-4606356 ill. a 06-20-9572776-es (dr. Erdélyi Károly) telefonszámon szívesen adunk felvilágosítást.

Segítségét előre is köszönjük!

Budapest, 2006. 03. 01.

dr. Erdélyi Károly

M.3 Kérdőív – ábra



Jellegzetes daganatos elváltozások egy őzbak hátsó lábain és fején. Az elváltozások a borsónyitól a férfiókól nagyságúig bármilyen méretűre fejlődhetnek. Általában több daganat alakul ki egyidejűleg, de nagyságuk eltérő lehet. Felületükön hámsérülés, belsejükben elhalás és gennyesedés is kialakulhat.

M.4 Kérdőív – űrlap

Önkéntes adatközlő lap az őzek daganatos bőrelváltozásának előfordulásáról	
1.1. Előfordul-e területükön a mellékelt képeken látható bőrelváltozásokkal járó megbetegedés? Nem <input type="checkbox"/> Időnként <input type="checkbox"/> Állandó jelenlét <input type="checkbox"/>	
1.2. Milyen gyakorisággal találunk bórdaganatos állatot? Évente több beteg <input type="checkbox"/> 1-2 beteg évente <input type="checkbox"/> Néhány évente 1-1 <input type="checkbox"/>	
1.3. A leginkább érintett <i>bak</i> korosztály: Gida <input type="checkbox"/> Fiatal <input type="checkbox"/> Középkorú <input type="checkbox"/> Öreg <input type="checkbox"/>	
1.4. A leginkább érintett <i>suta</i> korosztály: Gida <input type="checkbox"/> Fiatal <input type="checkbox"/> Öreg <input type="checkbox"/>	
1.5. Elhullva talált állatokon észlelnek-e daganatos elváltozást? Igen <input type="checkbox"/> Nem <input type="checkbox"/>	
1.6. Az előfordulás gyakoriságának változása az utóbbi 5 évben. Nőtt <input type="checkbox"/> Állandó <input type="checkbox"/> Csökkent <input type="checkbox"/>	
1.7. Más fajokon (pl. gím, dám, mezei nyúl) észleltek-e hasonló bőrelváltozást? (Ha igen, melyiken?) Igen <input type="checkbox"/> Nem <input type="checkbox"/>	
1.8. Egyéb megjegyzés, vélemény, megfigyelés:	

Nyilatkozat

Hozzájárulok, a vadászterületünkre és őzállományára vonatkozó Országos Vadgazdálkodási Adattárban szereplő adatoknak a „Magyarországi őzállományok fibropapillomás fertőzöttségének felmérése és a betegség oktanának tisztázása” című kutatási témában való felhasználásához.

2006. _____, _____

Vadásztársaság Elnöke

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm családomnak a végtelen türelmet, támogatást és szeretetet!

Hálás vagyok valamennyi szerzőtársamnak, Bálint Ádámnak, Dencső Lászlónak, Dán Ádámnak, Ursu Krisztinának, Solymosi Norbertnek, Lehoczki Róbertnek, Heltai Miklósnak, Sonkoly Krisztinának, Csányi Sándornak, Theodora Steinecknek, Gál Jánosnak, Sugár Lászlónak, Szeredi Leventének és Forgách Petrának a munkában való részvételükért, tanácsaikért és a kutatás sikeréhez való önzetlen hozzájárulásukért.

Köszönettel tartozom a következő külföldi kollégáknak az adatszolgáltatásért és kutatásaim során nyújtott hathatós segítségükért: Marie-Eve Terrier (AFFSA, SAGIR database, France), Olivier Alabaric (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, France), Erik Agren (SVA, Uppsala, Sweden), Gudrun Wibbelt (IZW, Berlin Germany), Paul Duff (VLADoWS, United Kingdom), Christine Saint-Andrieux (ONCFS, France), Prof. Dr. E.-M. deVilliers (DKFZ, Heidelberg).

Különös hálával tartozom Mészáros Ágnesnek kórszövetteni laboratóriumi munkájáért és Ottingerné Máriának, valamint Juhász Ágnesnek a molekuláris diagnosztikai laboratóriumban nyújtott segítségéért és a türelméért.

Kutatásaim anyagi háttérét egyrészt az Országos Állategészségügyi Intézet (MGSZH –ÁDI (Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal – Állateü. Diagnosztikai Igazgatóság)) másrészt az FVM Vadgazdálkodási Alap (222/2006/PO) illetve a T049157 OTKA kutatási pályázat biztosította.