

**MEZŐGAZDASÁG-
ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

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

**Doktori (PhD) értekezés
Tézisei**

**Dr. Erdélyi Károly
Gödöllő
2010**

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, 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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

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 fibromája (Robinson és Kerr, 2001), stb. A halmozódó tendenciát mutató daganatos megbetegedések esetében természetesen az ember okozta környezetszennyezés, radioaktív sugárzás, stb. Szerepe is jelentős lehet, de az esetek nagy részében nem nevezhetők közvetlen kóroknak.

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 szembetűnő bőrelváltozásokat igen taszítónak találják (nem ritka a férfiökölnyi daganat sem) és időnként a közvéleményt is foglalkoztatja a probléma. A betegség oktanát illetően sok tévhit kering a köztudatban, amely a környezetszennyezés (pl. hulladékégetők), vagy a csernobili balesetből származó sugárfertőzés (Takács és Nagy-Bozsoky, 1998) következményének véelve 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

Deltapapillomavirus genusban, a többi szarvas faj fibropapillomatózist okozó vírusának közvetlen rokonságában kell keresni.

1.2. Célkitűzések

Az őz (valamint a gímszarvas) fibropapillomatózis átfogó jellemzése, a fentiekben vázolt kérdéskörök tisztázása érdekében, 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

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Kórtani vizsgálatok

Az Országos Állategészségügyi Intézetbe 2004-től 2006-ig, az ország valamennyi részéről beérkezett öztetemeket teljeskörű diagnosztikai vizsgálatnak vetettük alá (kórbonctan, kórszövettan, bakteriológia, stb.). Ebben a három éves időszakban 42 öz esetet vizsgáltunk, amelyekből kórszövetteni vizsgálatra és DNS kivonás céljára gyűjtöttünk szövetmintákat. Külföldi fibropapilloma-gyanús elváltozásokból friss vagy fixált szöveteket, vagy az elváltozásból kivont DNS mintákat kaptunk.

A gímszarvas fibropapillomák vizsgálatát egy Alsó-Ausztriában 2004-ben elejtett egy éves, növendék gímbikából és egy Magyarországon 2007-ben a Kaposvári Egyetem bőszenfai szarvasfarmján rutin, ellenőrző vizsgálat céljára kilőtt, egy éves gím ünőből származó daganatmintán végeztük.

A formalinban fixált majd paraffin blokkokba ágyazott szövetmintákból készített metszeteket hematoxin-eozin festéssel, immunhisztokémiával (IHC) és in situ hibridizációval (ISH) vizsgáltuk. A szövettani elváltozásokat és az IHC és ISH reakciókat fénymikroszkópos vizsgálattal értékeltük ki. A vírusantigén daganatszövetben való kimutatására egy új immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk (Erdélyi és mtsai, 2009b).

A vírus genom jelenlétét és annak lokalizációját a daganatszövetben a szövettani metszeteken elvégzett in situ DNS hibridizációval vizsgáltuk. A reakcióban a CcPV1 genom L1 ORF régiójából (nt 6407-6798; EF680235) PCR-rel szintetizált 392 bp hosszú DIG-gel jelölt DNS próbát használtunk.

2.2. Virologiai vizsgálatok

A virológiai vizsgálatokhoz a kórbonctani vizsgálatok során gyűjtött, majd homogenizált daganatszövet és bőrmintákból vontunk ki DNS-t.

Az öz- és a gímszarvas-papillomavírus DNS daganatszövetekből való kimutatására saját tervezésű polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk (Erdélyi és mtsai, 2008) amely a szarvasfélék delta-papillomavírusainak detektálására alkalmas. A primerek tervezéséhez az addig ismert három, szarvas fajokból izolált

papillomavírus genom teljes nukleotid szekvenciájának (GenBank-i azonosítók: DPV, NC_001523; EEPV, NC_001524 és REPV, NC_004196) illesztését használtuk. A primerek által felerősített PCR termék az L1 és L2 ORF egymással szomszédos régióit (túlnyomórészt az L2-t) foglalja magába, nagysága körülbelül 730 nukleotid bázis-pár (bp).

A teljes őz-papillomavírus genom-szekvencia meghatározásában több polimeráz láncreakciót is alkalmaztunk. Az először detektált szekvencia terminális szakaszaiból kiindulva, először a cirkuláris genom fennmaradó részét erősítettük fel KOD Hot Start DNS polimerázzal, majd ezt a terméket (7900 bp) a továbbiakban templátként használva határoztuk meg a genom ismeretlen részének nukleotid szekvenciáját. A teljes genom-szekvenciát végül 27 darab, részben degenerált primer segítségével felerősített genom szakaszok direkt, illetve pGEM-T (Promega) plazmidba való klónozás utáni szekvenálásával határoztuk meg.

A teljes őz- és gímszarvas-papillomavírus genomot a cirkuláris DNS mennyiségének megsokszorozására alkalmas, Phi29 bakteriofág DNS polimerázt hasznosító „rolling cycle amplification” (RCA) módszerrel amplifikáltuk. A felszaporított vírus DNS-t a genomban csak egy hasítási hellyel rendelkező restrikciós enzimmel (*SacI*) emésztve linearizáltuk, majd az őz papillomavírus genomot pUC19 plazmidba klónoztuk.

Az őz-papillomavírus filogenetikai jellemzését az L1 ORF teljes szekvenciájára, valamint a négy fő ORF (L1, L2, E1 és E2) egyesített, 3561 bp hosszúságú szekvenciájára alapoztuk. Mindkét elemzéshez további 70 teljes genomot választottunk ki a génbankban rendelkezésre álló papillomavírusok közül. A gímszarvas-papillomavírus filogenetikai vizsgálatai a részleges L2 ORF aminosav szekvenciákra igazított nukleotid szekvenciákon történtek. A filogenetikai vizsgálatokat neighbour-joining és maximum parsimony módszerrel végeztük.

A papillomavírusok általános leírása a teljes genom-szekvencia elemzés eredménye alapján történik. A jellemzés része a genom hossza, a „klasszikus” ORF-ek azonosítása és leírása, a nem kódoló, terminális szabályozó genomszakasz (URR) hossza és összetétele, valamint a szabályozó nukleotid szakaszok megléte, száma és

lokalizációja a genomban. Kiszámítottuk az azonosított vírusfehérjék molekuláris tömegeit, valamint az őz-papillomavírus és a kiválasztott papillomavírusok fő ORF szekvenciái közti hasonlóságot. A transzkripció faktorok kötődési helyeit, jellegzetes motívumait és a fehérje doméneket, vagy manuálisan kerestük, vagy internetes kereső szoftvereket és adatbázisokat alkalmaztunk erre a célra.

A daganatszövet vírus-genom kópiaszámának meghatározására egy EvaGreen alapú valós-idejű PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) módszert alakítottunk ki.

2.3 Ökológiai és járványtani vizsgálatok

Az őz fibropapillomatózis magyarországi elterjedésének felmérésére és ökológiájának tanulmányozására kérdőíves felmérést alkalmaztunk. A kérdőíveket 2006 márciusának végén postáztuk az Országos Vadgazdálkodási Adattár (OVA) nyilvántartásában szereplő összes (1201) vadgazdálkodási egység címére, ezzel lefedve az ország teljes területét. A zárt-végű kérdőív mellé a felmérés célját és a megbetegedést bemutató kísérőlevelet mellékelünk, amely fényképes illusztrációt is tartalmazott a jellegzetes elváltozásokról. A nem válaszoló vadásztársaságoknak emlékeztető leveleket postáztunk.

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 gímszarvas fibropapillomatosis magyarországi előfordulásáról a kérdőívben szereplő, egyéb fajok érintettségét firtató kérdéssel próbáltunk információt szerezni.

Az őzek bőrdaganatainak európai előfordulásának és elterjedésének felmérésére adatokat gyűjtöttünk a vadbetegségek diagnosztikájával foglalkozó, illetve vadon élő állatokban megállapított betegségek adatbázisait fenntartó Francia, Német, Svéd és Nagy-Britanniai intézményektől. A rendelkezésre álló adatbázisokból az őzekben diagnosztizált bőrdaganatokat, illetve szűkítve a papilloma, fibropapilloma és fibroma diagnózisokat gyűjtöttük ki és rögzítettük az adott időszakban megvizsgált őz minták teljes számát is.

A magyarországi őzállományokra, valamint külön a bakokra, sutákra és gidákra vonatkozó éves becslési és teríték adatok az Országos Vadgazdálkodási Adattárból származtak. Vizsgálatainkban az egyes vadgazdálkodási egységek hat évet (2001-2006) átfogó állománybecslési adatainak teljes állományra vonatkozó átlagából számolt őzpopuláció sűrűségi adatokat használtuk.

A Corine Land Cover 2000 (CLC2000) (EEA) adatbázis környezeti változóit vadgazdálkodási egységekre (VGE) leválogatva használtuk fel a térinformatikai vizsgálatokban. 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.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Kórtani vizsgálatok

3.1.1. Kórbonctan és kórszövettan

Az Országos Állategészségügyi Intézetbe a 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, 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.

A daganatok felszíne néha 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 eróziók, gennyes folyamatok, illetve elhalások.

A kórszövetteni 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 daganatot fedő epidermis rendszerint acanthózis és hiperkeratózis jeleit mutatja.

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

3.1.2. Immunhisztokémia és in situ hibridizáció

Vizsgálataink során a daganatos elváltozások epidermisében sikerült kimutatnunk mind a papillomavírus L1 fő kapszidfehérje antigén, mind az L1 ORF-et kódoló DNS jelenlétét.

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 sejteiben sokkal nagyobb számú pozitív keratinocytát figyeltünk meg, amelyek mind a magjukban, mind a citoplazmájukban tartalmaztak vírus DNS-t.

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

3.2 Virologiai vizsgálatok

3.2.1. Delta-papillomavírusok kimutatása PCR vizsgálattal szarvasfélékből

A delta-papillomavírusok kimutatására kifejlesztett PCR reakciót sikerrel alkalmaztuk az őz és a gímszarvas-papillomavírus kimutatására. Nyolc őz-papillomavírus PCR terméket megszekvenáltuk és a vizsgált L2 ORF szakaszokat 100%-ban azonosnak találtuk.

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

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

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

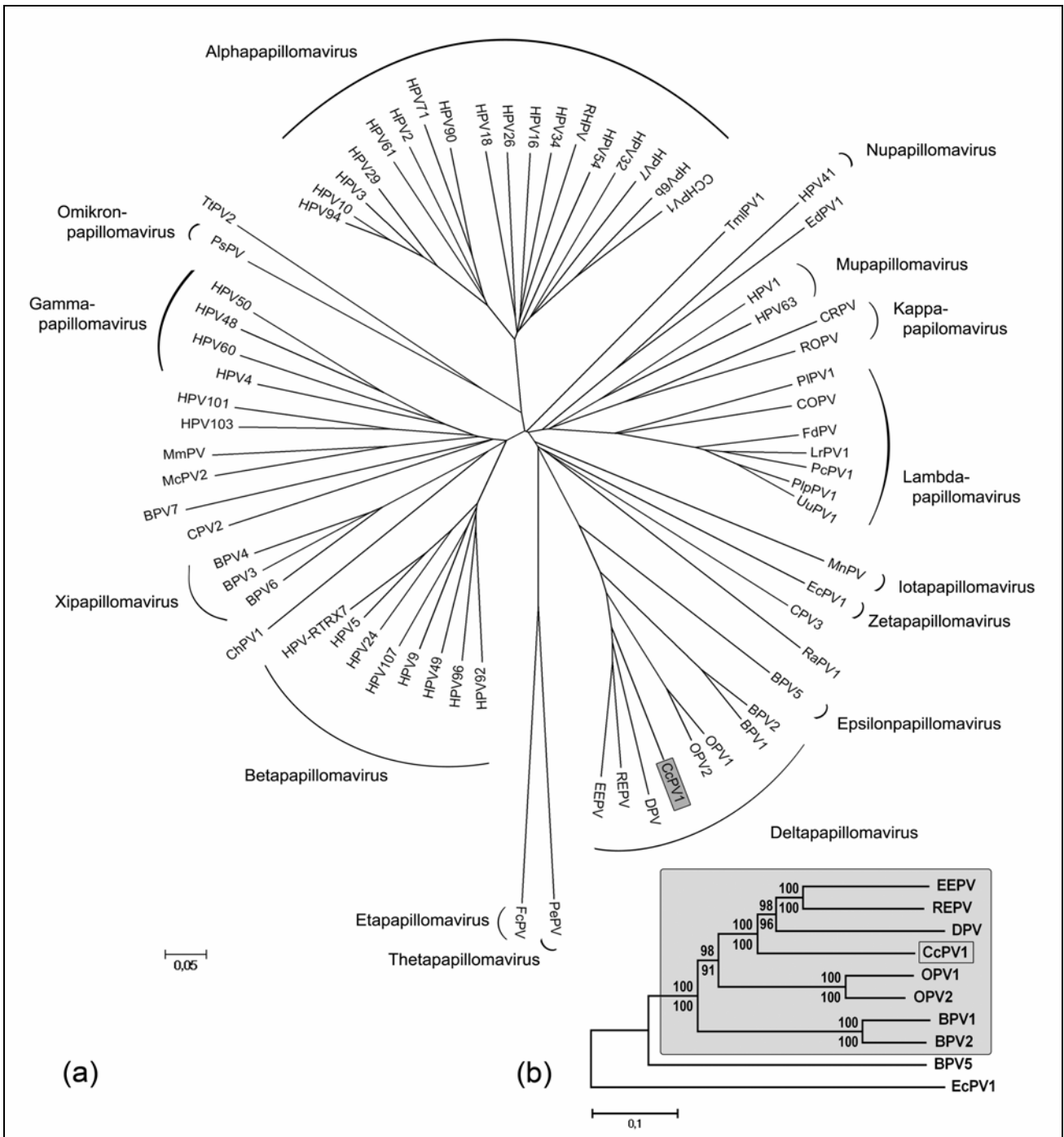
A CcPV1 genom 8032 bp hosszúnak bizonyult. A teljes CcPV1 vírusgenomot benyújtottuk a GenBank adatbázisba, ahol az EF680235 illetve teljes vírusgenomként az NC_011051 (Western roe deer papillomavirus 1) nyilvántartási számon érhető el.

A genomban azonosítottuk mind a kilenc delta-papillomavírusokra jellemző fehérje kódoló ORF-et és kiszámoltuk a potenciális fehérjék molekulatömegeit. A korai fehérjéket kódoló genomszakasz végén megtaláltuk az Eriksson és mtsai. által (1994) leírt, a többi szarvasféle papillomavírusára is jellemző E9 ORF-et is. A hosszú szabályozó régió (long control region; LCR) vagy más néven untranslated regulatory region (URR) 799 bp hosszú volt és azonosítottuk benne a CcPV1 replikációs origójának elemeit.

3.2.3. Papillomavírus törzsfa rekonstrukció

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.

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.



1. ábra: (a) A CcPV1 és további 70 papillomavírus 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 törzsfa. Az azonos elágazásokon feltüntetett bootstrap értékek közül a felsők NJ, az alsók pedig maximum parsimony elemzés eredményei.

3.3. Ökológiai és járványtani vizsgálatok

3.3.1. Az őz fibropapillomatózis 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 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 $p=0.7657$). 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%. A betegség előfordulási gyakoriságának korcsoportok közötti eloszlásában detektált különbségek szignifikánsnak bizonyultak (Pearson-féle chi-négyzet teszt; $p<0.001$) ivaron belül. Elhullott őzekben 34 VGE-ben (válaszadók 11%-a) találtak daganatos elváltozást.

3.3.2. 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. 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. 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 sűrűség között, illetve mérsékelt pozitív összefüggést a nem öntözött szántóföld és az őz populáció sűrűség között ($R: 0.303$, $p < 0.001$).

3.3.3. 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 (SAGIR: 1986-2007; 10585 őz tetem vizsgálata), Svédországban (SVA Uppsala: 1947-2008; 6585 őz vizsgálat), Németországban (IZW Berlin: 1972-2008; 231 őz eset) vagy az Egyesült Királyságban (VLADoWS: 2000-2008; 70 őz tetem vizsgálata).

3.4. A gímszarvas-papillomavírus

3.4.1. Járványtani és kórtani eredmények

A két különböző helyről származó egyed daganatának morfológiai tulajdonságai majdnem teljesen azonosak voltak. Az ovális, tömött képletek felülete mérsékelt papilláris struktúráltságú, durva, szőrtelen és pigmentált volt. Eróziók csupán az 1. eset néhány daganatos elváltozásának felszínén voltak láthatók. A daganatok metszészlapja az őz daganatokhoz hasonlóan szürkésfehér, szalonnás fényű.

A minták szövettani vizsgálata során megállapítottuk, hogy mindkét daganat fibropapilloma, amely fő tömegét az irharétegben sarjadzó fibroblastok, fibrocyták és rostkötegek alkotják. A daganat felületét fedő epidermiszben hyperkeratózis, parakeratózis és acanthosis látható, elszórtan gócos gyulladáisos sejtes beszűrődéssel.

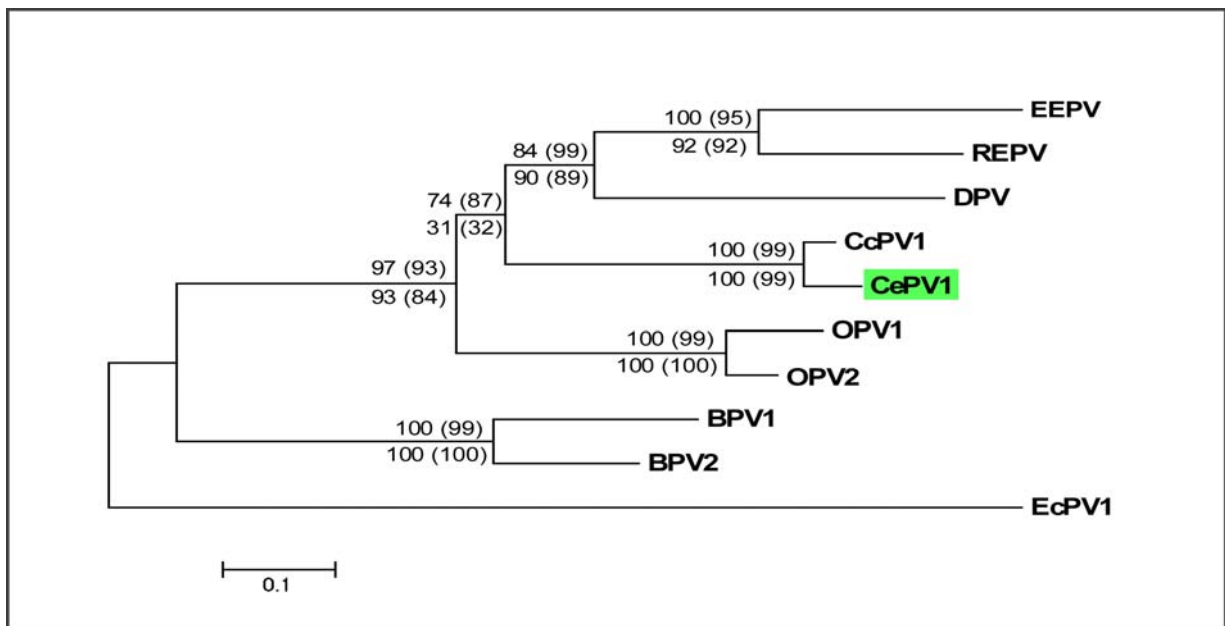
IHC vizsgálattal a papillomavírus antigén jelenlétét mindkét mintában kimutattuk. A vírus antigén elsősorban a stratum granulosum koilocyta-szerű hámsejtjeinek magjában, illetve ritkábban cytoplazmájában, valamint a stratum corneum elszarusodó sejtrétegei között aggregálódott jól láthatóan.

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.

3.4.2. A kimutatott gímszarvas-papillomavírus 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. 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 (2. ábra).

A CcPV1 és CePV egymáshoz, illetve gazdafajaikhoz való viszonyát tisztázandó, összehasonlítottuk a Delta-papillomavírusok és gazdáik törzsfáját. A gazdafajok filogenetikai viszonyait egy átfogó, 4510 emlős faj, molekuláris törzsfáját felállító közlemény (Bininda-Emonds, 2007) eredményei alapján rekonstruáltuk. A két törzsfá párhuzamos topológiát mutat, 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.



2. ábra: Kilenc delta-papillomavírus részleges L2 ORF nukleotid szekvencia illesztéséből számított neighbour-joining (NJ) törzsfa. A bootstrap értékek a nukleotid és az aminosav (zárójelben) illesztések neighbour-joining (fent) és maximum parsimony (alul) elemzések eredményei.

3.5. Új tudományos eredmények

1. Az őz papillomavírus (CcPV1) kimutatása PCR-rel, teljes genomjának szekvenálása és jellemzése
2. Az őz papillomavírus (CcPV1) genomiális DNS in situ kimutatása a fertőzött szövetekben in situ hibridizációval
3. A gímszarvas papillomavírus (CePV) kimutatása PCR-rel, továbbá capsid antigénjének in situ kimutatása immun-hisztokémiával és genomiális DNS-ének in situ kimutatása in situ hibridizációval a fertőzött szövetekben
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

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

4.1. 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. 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 kórbonctani 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.

4.2. Virologiai vizsgálatok

A filogenetikai és a kórtani vizsgálatok eredményei alapján kijelenthető, hogy az őz fibropapillomatózis kórokozója az általunk azonosított őz-papillomavírus (CcPV1). 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.

A CcPV1 a *Papillomaviridae* család Delta-papillomavírus genusába sorolható, és valamennyi közeli rokon vírustól eléggé különbözik ahhoz, hogy javasoljuk új és önálló vírusfajként való elismerését. 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 alátámasztott topológiája, valamint a filogenetikai távolságok egyaránt az önálló vírus fajként való meghatározás mellett szólnak.

A gímszarvas-papillomavírusát filogenetikai és kórtani jellemzői szintén a Delta-papillomavírus genusba sorolják, így a mi eredményeink is alátámasztják Moar és Jarrett (1985) Southern blot eredményeit, miszerint a gímszarvas-papillomavírus közeli rokonságban áll a BPV1-gyel és BPV2-vel. A CcPV1 és a CePV közti szoros rokonság valós mértékéről majd a CePV teljes genomjának szekvenálása után lehet végleges képet alkotni.

4.3. 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 fertőzőtként azonosított, terület státusát, a felmérést követően beküldött minták vizsgálatával is megerősíthettük.

A betegség előfordulásának a gazdasűrűséggel 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. Nem zárható ki viszont 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 fogékonyságát befolyásoló gazdaspecifikus genetikai tényezők potenciális hatásának lehetőségét (Erdélyi és mtsai, 2008).

A CcPV1 gazdaváltással való kialakulásának valószínűségét a molekuláris filogenetikai vizsgálatok mellett tovább erősíti, hogy míg a gímszarvas fibropapillomatózis (azaz a CePV) szórványosan Európaszerte előfordul, addig az őz fibropapillomatózis (CcPV1) halmozott, endémiás jelenléte a Kárpát-medencére, egy genetikailag is lehatárolható gazdapopulációra korlátozódik.

Kivitelezhetősége és gyakorlati hasznossága mellett, az általunk alkalmazott felmérési módszer gyengéje az, hogy a kérdőívvel begyűjtött kategorikus adatokból nem lehet 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 helye a vadbetegségek ökológiájának tanulmányozásában. Elsősorban a könnyen felismerhető, jellegzetes megjelenésű kórképek lehetnek ilyen vizsgálatok tárgyai. 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.

5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

5.1. Tudományos közlemények folyóiratban

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.

5.2. Idegen nyelvű könyvrészlet

Erdélyi, K. Roe deer and other ungulate papillomaviruses. In: Gavier-Widén, D., Duff, J. P., Meredith, A. (eds) *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*, Wiley-Blackwell, In-Press

5.3. Konferencia kiadványban megjelent publikációk

Erdélyi, K., Ursu, K. (2005): Molecular evidence for the existence of a roedeer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. 42nd International Symposium on Diseases of Zoo and Wildlife, Prague, Proceedings, 42, 212-213. p.

Erdélyi, K., Ursu, K., Steineck, T. (2006): Identification of a red deer (*Cervus elaphus*) papillomavirus by molecular methods. Proceedings of the 7th Meeting of the European Wildlife Disease Association, St. Vincent, Italy.

Erdélyi, K., Lehoczki, R., Heltai, M., Sonkoly, K., Csányi, S., Solymosi., N. (2007): A questionnaire survey of roe deer fibropapillomatosis - findings and lessons. In: Conference abstracts - Ecology and Management of Wildlife Diseases, York, UK, 2007, p.44.

Rajský, D., Pliešovský, J., Sokol, J., Lešník, F., **Erdélyi, K.**, Danihel, Ľ., Juriš, P., Garaj, P. (2009): 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. (2009): 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.

5.4. Egyéb előadás:

Erdélyi, K. (2008): Szarvasfélék deltapapillomavírusainak evolúciója. Paraziták és más patogének evolúciója és ökológiája. A Magyar Biológiai Társaság Ökológiai Szakosztályának, Környezet és Természetvédelmi Szakosztályának, Magyar Ökológusok Tudományos Egyesületének és a Magyar Parazitológusok Társaságának közös előadójának. 2008. november 14., Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest.