

A négy kutatási év alatt számos új burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS (+ssRNS) vírus kimutatása, elemzése és leírása történt meg. Különböző vírusgenotípusok/szerotípusok mellett összesen 19 új vírusfajt és ebből egyben 13 potenciálisan új névadó vírusnemzetséget (■) sikerült 36 elfogadott, illetve benyújtott „peer-reviewed” közleményben (+2 angol és 1 magyar nyelvű felkért könyvfejezetben) publikálni (Σimpakt faktor: 97,475). (A még nem publikált angol nyelvű nemzetközi előadások száma 5.) A felfedezett vírusok között vannak olyanok, melyek gazdafaja már ismert – ebben az esetben az adott vírusnemzetség újabb vírusfajának (●) leírásáról van szó (vírus diverzitás), illetve olyan vírusfajok (○) is, melyek eddig nem ismert, új gazdafajokhoz köthetőek (gazdafaj diverzitás). Az új vírusfajokat egyrészt hagyományos RT-PCR módszerrel, konzervatív génszakaszokra tervezett új alap-primerkombinációkkal, más részüket virális metagenomikai (és nagy átteresztő képességű új generációs szekvenálási+bioinformatikai) módszerekkel sikerült azonosítani. A vírusok teljes genomját 5’-3’ RACE, long-range és tail PCR, adapter ligálás és „primer-walking” módszerek kombinációjával határoztuk meg, majd szekvencia elemző- és filogenetikai módszerekkel jellemeztük őket. Az adott vírusfaj előfordulási gyakoriságát, endémiás jelenlétét, diverzitását, lehetséges klinikai hátterének és pathogenezisének felderítését molekuláris epidemiológiai és tenyésztési módszerekkel vizsgáltuk.

Összesen 14 különböző gazdafajból sikerült új vírusokat azonosítani és leírni, így **emlősökből** (ember, sertés/vaddisznó, szarvasmarha, juh, denevér, macska), **madarakból** (szalakóta, fűrj, pulyka, galamb, csirke, vörös vércse), **hüllőből** (teknős) és **halból** (ponty). Az emlősök és a madarak között vadon élő és házasított állatok is voltak.

Víruscsaládok szerint bontva az **Astroviridae** családban új taxonómiailag elfogadott vírusfajokat azonosítottunk és határoztuk meg **sertésből** (*Mamastrovirus 26*, Archives of Virology, 2011;156:125), **juh**ból (*Mamastrovirus 24*, Archives of Virology, 2012;157:323), elsőként astrovírust **vaddisznóból** (*Mamastrovirus 27*, Archives of Virology, 2013;158:281) és **szalakótából** (Infection, Genetics and Evolution, 2015;közlésre benyújtva). Utóbbi azért is kiemelendő, mert először sikerült mamastrovírust (tehát emlős eredetűnek tartott astrovírust) madárból azonosítani. Az emberhez legközelebb álló **macska** mamastrovírus (*Mamastrovirus 2*, Veterinary Microbiology, 2014;171:102) mellett sikerült az első hazai **humán** astrovírus gastroenteritis járványt leírni (Orvosi Hetilap, 2011;152:45) és tovább 2 hazai astrovírus járvány azonosítani, gyermekek és idősothonok lakói között. A legtöbb felfedezett új vírus a **Picornaviridae** családba tartozik. A **Picornaviridae** családban összesen potenciálisan 11 új vírusnemzetséget azonosítottunk, illetve határoztunk meg. (Összehasonlításképpen, 2008-ban összesen 8 picornavírus nemzetség volt ismert a picornavirológiában!) A 11 új picornavírus nemzetségből négy nemzetséget az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) már hivatalosan elfogadott (*Avisivirus*, *Gallivirus*, *Hunnivirus*, *Megrivirus*), kettőt előterjesztett („Kunsagivirus”, „Sakobuvirus”), háromra a közleményeinkben javaslatot tettünk („Falcovirus”, „Orivirus”, „Rafivirus”), két vírus nemzetségalkotó szerepe még bizonytalan („Mesivirus”, „Phacovirus”). A kutatási pályázat egyik fő célja, a „bovine (szarvasmarha) hungarovirus” és „ovine (juh) hungarovirus” teljes genomjának meghatározása volt **szarvasmarhá**ból és **juh**ból, melyek 2012-ben kerültek publikálásra (Journal of Virology, 2012;86:13295) és az ICTV *Hunnivirus* nemzetség néven fogadott el. A hunnivirusok érdekessége, hogy az 5’ nem kódoló régió (5’UTR), benne az II-es típusú IRES, a humán parechovírusokhoz (*Parechovirus* nemzetség) hasonlít (II-es típusú IRES), míg a kódoló régióban a legközelebbi ismert rokonai a sertés teschovírusok (*Teschovirus* nemzetség), melyek egyébként IV-es típusú IRES-sel rendelkeznek. Ez a mozaikos genetikai mintázat azt veti fel, hogy a hunnivirusok, a humán parechovírusok és a sertés teschovírusok (illetve esetleg további eddig még ismeretlen picornavírus) szorosabb evolúciós rokonságban állhatnak egymással, és talán a nem kódoló RNS elemek moduláris rekombinációját sikerült körükben leírni. **Pulyká**ból több új picornavírust sikerült azonosítani és meghatározni, így a

Gallivirus-t (Journal of General Virology, 2012;93:2171) az *Avisivirus*-t melyeket tenyésztett, tüneteket mutató házi pulykákból mutattuk ki (Journal of General Virology, 2013;94:1496). E vírus II-es típusú IRES-sel, több 2A régióval jellemezhető és legközelebbi ismert rokona a duck hepatitis A vírus. Úgy néz ki mind a gallivirus, mind az avisivirus igen elterjedt és endémiásan jelen lehet a pulyka farmokon. A vizsgált pulyka minták 63,6%-ban a vizsgált farmok 75%-ban a két vírust egyidejűleg ki lehetett mutatni. Leírtuk, tenyésztettük az első európai pulyka megrivírust (mely az első teljes genom meghatározás) és egy új megrivirus fajt, új gazdafajból, **csirkéből** (Journal of Virology, 2014;88:6434). A megrivirusok az eddig ismert leghosszabb genomú picornavírusok, melyek genom szerveződése is új felismerésekre vezettek: több, akár négy 2A régióval is rendelkezhetnek, szokatlanul hosszúak a 3' nem kódoló régióik, melyek többszörös ismétlődő szekvencia motívumokat és akár egy második ORF-et is tartalmazhatnak, valamint rendkívül heterogén a szerkezeti/nem szerkezeti fehérjéik hasonlósága, mely felveti a rekombináció lehetőségét még ismeretlen picornavírus partnerrel. A megrivirusokkal rokon vírust ("Mesivirus") mutattunk ki az emberhez közel élő, hazai és hong-kongi városi **galambok** fécesz mintáiból (PLoS ONE, 2013;8:e72787). További új, potenciális picornavírus nemzetségeket írtunk le **fürjből** ("Phacovirus", Archives of Virology, 2012;157:525), az Afrikába költöző, vadon élő **szalakótából** („Kunsagivirus”, Journal of General Virology, 2013;94:2029), **macskából** ("Sakobuvirus", Veterinary Microbiology, 2014;171:102), **csirkéből** ("Orivirus", Infection, Genetics and Evolution, 2014;28:333), **teknősből** ("Rafivirus", Archives of Virology, 2015;közlésre benyújtva), mely az első ismert picornavírus hullóból, illetve az eddig ismert picornavírusoktól jelentősen különböző picornavírust **vörös vércséből** ("Falcovirus", Infection, Genetics and Evolution, 2015;nyomtatásban). Utóbbi az első olyan picornavírus I-es típusú IRES-sel, mely nem az enterovírusok közé tartozik. Értelemszerűen, az új nemzetségek egyben új vírusfajokat (alacsonyabb taxonómiai kategória) is jelentenek.

Ezen kívül több új picornavírus genotípust írtunk le **sertésből**: ezek a sertés enterovírus EV-G3 (Infection, Genetics and Evolution, 2011;11:1096), az első vaddisznó enterovírus az EV-G4 (Archives of Virology, 2012;157:981), az első sertés teschovírus vaddisznóból a PTV-13 (Archives of Virology, 2012;157:1573), az első sertés kobuvírus vaddisznóból (Archives of Virology, 2013;150:281) és a sertés pasivírus PaV-A3 (Archives of Virology, 2015;nyomtatásban). Mindegyik esetben a vírusok teljes genomja is meghatározásra és elemzésre került.

Juhból az első juh kobuvírus teljes genomját (Emerging Infectious Diseases, 2010;16:869) és az első állati interspecies rekombináns enterovírust a szarvasmarha/sertés enterovírust (EV-G5, Journal of General Virology, 2012;93:1941) is leírtuk.

Szalakótából további két olyan picornavírus azonosítottunk (a *Kobuvirus* és a *Mosavirus* nemzetségekben), melyeket madaraktól eddig még nem mutattak ki. Mosavírus esetén eddig csak egy részleges mosavírus genom szekvencia (mosavírus A1) volt ismert egérből az USA-ból. A mosavírus A2 egy új genotípus (Archives of Virology, 2014;159:2723), a kobuvírus pedig feltehetően egy új kobuvírus faj (Archives of Virology, 2015;160:345). Itt is meghatározásra és elemzésre került a vírusok teljes genomja.

Emberből az első humán enterovírus C-109 (EV-C109) kimutatása történt meg gyermekkori légúti fertőzésből Európában (Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2012;59:285), illetve sikerült az első hazai humán parechovírusokat beazonosítani (Orvosi Hetilap, 2011;152:1007), genomjukat meghatározni, enterális és központi idegrendszeri fertőzésekből. Az utóbbi molekuláris vizsgálat immár a rutin virológiai diagnosztikai palettánkra is felkerült és országos betegellátási feladatot vállaltunk fel. Feltételezhető virális kóreredetet kerestünk pyroszekvenálás módszerének felhasználásával X-kromoszómához kötött agammaglobulinémia alapbetegségben és központi idegrendszert érintő károsodásban

szenvedő két gyermek agybiopsziás mintájából, azonban felismerhető virális szekvenciákra nem akadtunk (Allergy, 2011;66:1615).

A *Caliciviridae* családban az első, hazai szarvasmarha nebovírus kimutatása és teljes genomjának meghatározása történt meg enterális megbetegedésben elpusztult **szarvasmarha** bélsármintájából (Magyar Állatorvosok Lapja, 2013;1:12). Folytattuk a calicivírusok molekuláris epidemiológiai vizsgálatát a hazai gastroenteritis járványok körében, mellyel fenntartottuk ezen a területen is a nemzetközi kapcsolatainkat, együttműködéseinket. A referencia norovírusaink felhasználásával egy spanyol cég kereskedelmi forgalomban is kapható diagnosztikumot készített.

A *Dicistroviridae* családban egy új dicistrovírus fajt írtunk le **denevérből** (Archives of Virology, 2014;159:3453).

Édesvízi **ponty** (*Cyprinus carpio*) béltartalmából két új burok nélküli, pozitív, egyszálú, dicistronos RNS (+ssRNS) genomú vírust mutattunk ki és határoztunk meg. A dicistrovírus-szerű „Halastavi árva RNA vírus”-ra keresztelt vírus teljes genomja 9565 (PLoS ONE, 2011;6:e29145), a posavírus-szerű vírus („Fisavírus”) 8712 nukleotid hosszúságú (Archives of Virology, 2015;nyomtatásban). Mindkét vírus a *Picornavirales* rend egy új nemzetsége, de egyetlen ismert víruscsaládba sem sorolhatók.

Tételesen a következő új vírusok, vírusfajok (○ vagy ●), vírus nemzetségek (■) azonosítása, genomjának meghatározása és molekuláris epidemiológiai jellemzése történt meg a pályázat ideje alatt (GenBank szám, **publikáció megjelenési éve**):

I. az *Astroviridae*:

1. egy új porcine (sertés) astrovírus (mamastrovírus) (●) (GU562296) (**2011**);
2. az első hazai humán astrovírus járvány leírása (HQ398856) (**2011**);
3. az első wild boar (vaddisznó) mamastrovírus (●,○) (JQ340310) (**2012**);
4. egy új ovine (juh) mamastrovírus (●) (JN592482) (**2012**);
5. mamastrovírus kimutatása macskából (KF374704) (**2014**);
6. az első (és új) mamastrovírus faj (●,○) leírása madárból (szalakóta) (KP663426) (**2015**);

II. a *Picornaviridae*:

1. az első ovine (juh) kobuvírus (○) (GU245693) (2010, teljes genom meghatározás **2011**);
2. egy új porcine (sertés) enterovírus (●) (HQ702854-HQ702859) (**2011**);
3. az első hazai humán parechovírusok leírása (GU125390-GU125398, JF799975) (**2011**);
4. az első és új wild boar (vaddisznó) enterovírus (○) (JN807387-JN807389) (**2012**);
5. az első és új picornavírus (phacovírus?) fürjben (○,■) (JN674502) (**2012**);
6. az első és új állati interspecies rekombináns bovine/porcine enterovírus juhban (●) (JQ277724-JQ277726) (**2012**);
7. az első humán enterovírus 109 (EV109) kimutatása Európában (JN900470) (**2012**);
8. az első és új sertés teschovírus (JQ429405) (○) genotípus (PTV-13) leírása vaddisznókból, (**2012**);
9. egy új turkey (pulyka) picornavírus (gallivírus) pulykákban (○,■) (JQ691613-JQ691615) (**2012**);
10. egy új ovine (juh) picornavírus hungarovírus (hunnivírus) juhban (○,■) (HM153767) (**2012**);
11. egy új bovine (szarvasmarha) hungarovírus (hunnivírus) szarvasmarhákból (○,■) (JQ941880) (**2012**);
12. az első porcine kobuvírus kimutatása vaddisznókból (JX177612) (**2013**);

13. egy új turkey (pulyka) picornavírus (avisivírus) leírása pulykákban (○,■) (KC465954-KC465958) (**2013**);
14. egy új picornavírus (kunsagivírus) leírása szalakótában (○,■) (KC935379) (**2013**);
15. egy új picornavírus (mesivírus) leírása városi galambokból (○,■) (KC811837) (**2013**);
16. az első európai pulyka megrivírus kimutatása pulykákban (■) (KF961188) (**2014**);
17. egy új megrivírus (○) kimutatása csirkékből (KF961186-KF961187) (**2014**);
18. egy új picornavírus (orivírus) leírása csirkékből (○,■) (KM203656) (**2014**);
19. egy új picornavírus (sakobuvírus) leírása macskákból (○,■) (KF387721) (**2014**);
20. egy új mosavírus (első kimutatás Európában) leírása új gazdafajból, madárból (szalakóta) (○) (KF958461) (**2014**);
21. egy új pasivírus genotípus (PaV-A3) kimutatása és teljes genom elemzése sertésből (KM259923) (**2015**);
22. egy új az eddig ismert picornavírusoktól nagymértékben különböző picornavírus (falcovírus) leírása vörös vércséből (○,■) (KP230449) (**2015**);
23. az első kételtű, új picornavírus (rafivírus) leírása teknősből (○,■) (KJ415177) (**2015**);
24. egy új kobuvírus faj leírása és a kobuvírus első kimutatása madárból (szalakóta) (○) (KJ934637) (**2015**);

III. a *Caliciviridae*:

1. az első hazai szarvasmarha nebovírus (JX018212) leírása szarvasmarhából (**2013**);

IV. a *Dicistroviridae*:

1. egy új dicistrovírus faj (*Dicistroviridae*) kimutatása denevérből (●) (KJ802403) (**2014**);

V. új, dicisztronos genomú +ssRNS ("Unassigned" család, *Picornavirales* rend) vírusok:

1. egy új, édesvízi pontyból (*Cyprinus carpio*) kimutatott „Halastavi árva RNS vírus”-ra keresztelt vírus (○,■) (JN000306) (**2011**);
2. egy új, posavírus-szerű vírus (fisavírus, "Unassigned" család, *Picornavirales* rend) kimutatása és leírása édesvízi pontyból (*Cyprinus carpio*) (○,■) (KM434233) (**2015**);

Ezen túl számos további +ssRNS genomú vírus azonosítása történt már meg (ezek felsorolásától, megadásától eltekintettem), de teljes genomjuk meghatározása és a publikálása a pályázati időn túl fog befejeződni.

A virális metagenomikai vizsgálatok módszertanából következően „melléktermékként” új, fontos dsRNS vírusokat, például seadornavírust (*Reoviridae*), macska és avian rotavírust (*Reoviridae*), picobirnavírust, valamint DNS vírusokat, egy új circuláris ssDNS vírust (család nélkül), bocavírust (*Parvoviridae*) és két új avian parvovírust (*Parvoviridae*) is sikerült azonosítani, meghatározni különböző állatokból, melyek publikálásra kerültek. A *Seadornavírus* nemzetségbe tartozó új vírust (Balaton vírus, JX947843-JX947850 és KC522611-KC522612), mely a BSL-3 veszélyességi csoportba tartozó Banna vírushoz áll filogenetikailag a legközelebb (mely szúnyogok közvetítette encephalitist okozó emberi ágensként volt eddig ismert csak Dél-Kelet Ázsiában) hazai édesvízi pontyok (*Cyprinus carpio*) bélsármintájából mutattuk ki (Archives of Virology; 2013;158:2163).

Először sikerült, a lovakból frissen leírt non-primate hepaticusvírus-t (NPHV; *Flaviviridae*) – mely a hepatitis C vírus (HCV) eddig ismert legközelebbi genetikai rokona - klinikai kórképpel (hepatitis) összefüggésben lókból leírni (KF177391) (Acta Veterinaria Hungarica, 2014;62:422).

Az ismereteket két felkért összefoglaló cikkben (avian picornavirus és kobuvírus) és két felkért könyvfejezetben (sertés calicivírusok és sertés astrovírusok) is összefoglaltuk angol nyelven.

Az új, burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS vírusokat széklet, légúti váladék, szövettanyészlet, biopsziás anyag (szív, bél, tüdő, bőr, agy), szérum, liquor, konjunktíva mintákban kerestünk. A minták **emberi** (humán) és **állati** (rovaroktól az emlősökig) eredetű minták voltak, melyek egészséges és beteg egyedektől származtak. Külön érdekesség, hogy egy-egy mintából akár több, különböző víruscsaládhoz, vírusnemzetséghez, vírusfajhoz tartozó új +ssRNS vírust is sikerült kimutatni és meghatározni. A metodológiát is fejlesztettük több területen. Kidolgoztunk és alkalmazunk egy új 5'/3' RACE módszert a polyadenilált RNS-ek végeinek meghatározására, kettősszálú RNS terméken keresztül (sajnos a kéziratot eddig még nem sikerült elfogadtatni).

A pályázat kutatóinak (RG, PP, BÁ) személyében változás nem volt. A munkákhoz hozzájárult, hogy a témavezető 2011. május-júniusban, 21 napos tanulmányútra mehetett a pályázat anyagi segítségével a Blood Systems Research Institute-ba (BSRI, San Francisco, USA), ahol a 454-pyroszekvenáláshoz 50 ígéretes hazai mintát (a partner által biztosított további ~kb. 5M Ft értékű reagens felhasználásával) előkészíthetett, és igénybe vehetett plusz költségek nélkül nagy értékű műszereket a minták elemzéséhez (Roche 454 GS-FLX Titanium platform és a Stanford University, San Francisco, USA, szuperszámítógépe) és személyes, hosszú távra tervezett kutatási kapcsolatot alakíthatott ki Eric Delwart-tal (BSRI, San Francisco, USA). 2012-ben és 2013-ban újabb 45-45 ígéretes hazai minta virális metagenomikai vizsgálata és pyroszekvenálása történt meg a BSRI-ben, a partner által biztosított reagens és nagy értékű műszerek segítségével. A témavezetőt az a megtiszteltetés/elismerés érte 2011. év végén, hogy az International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), *Picornaviridae* Study Group (PSG) 15 fős tagjai közé fogadták. Intenzív szakmai kapcsolat és egyeztetés folyt az új picornavírusok leírása kapcsán Nick J. Knowles-al (Pirbright, UK) az ICTV PSG vezetőjével és csoport tagjaival, a témavezető (RG) munkacsoportbeli tagságából (ICTV Member No.1590) következő feladatokon túl is, melyek közös közleményekhez vezettek. 2014-ben RG és BÁ részt vett a 18th International Picornavirus Meeting-en és RG az ICTV *Picornaviridae* Study Group ülésén (Blankenberge, Belgium).

A kutatás témájában a témavezető (RG) 2013. november 13-án benyújtotta MTA Doktori értekezését, melynek nyilvános vitája 2015. március 19-én lesz; valamint PP 2014. áprilisában megvédte PhD doktori értekezését a Pécsi Tudományegyetemen.

A pályázati célok megvalósítását akadályok, problémák nem hátráltatták. A költségvetésben lefektetett pénzüsszegek a tervezett célokra és ütemben kerültek felhasználásra. A kutatási tervben megfogalmazott előre belátható, közvetlen célok már a kutatás második év végére teljesültek. A pályázatban külön nevesített vírusok genomjainak meghatározása, első molekuláris epidemiológiai elemzése és publikálása angol nyelvű, „peer-reviewed” folyóiratokban ekkor már megtörtént. A harmadik, illetve a negyedik évben pedig számos új RNS vírus azonosítása, meghatározása és publikálása történt meg.

Az (re)emerging fertőző betegségek folyamatos fenyegetést jelentenek a házi és vadon élő állatokra és az emberre. A kutatásaink alátámasztják, hogy feltételezésünk helyes és eredményre vezet, ha a lehetséges gazdafajokat szisztematikusan vizsgálva próbálunk meg új, burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS vírusokat azonosítani, a már ismert rokon vírusok genom-jellegzetességeinek figyelembe vételével. A munka eredményei hozzájárultak a +ssRNS genomú vírusok diverzitásának megismeréséhez, a vírustaxonómia fejlődéséhez, a vírusok közötti mélyebb (valósabb) genetikai és evolúciós összefüggések, gazdafaj-specifititás és váltás (gazdafaj diverzitás), a rezervoár szerep, valamint a faji-határátlépések

összefüggéseinek megértéséhez és erősítette az ember-állat-környezet egységében, a „One Health” koncepcióban való gondolkodást, együttműködést.

Összességében a pályázat kutatói sikeresnek ítélik meg az elmúlt 4 év munkáját és eredményeit, melyre a következő kutatási években is támaszkodhatnak, építhetnek. Számos víruscsaládban ezen belül elsősorban a picornavírusok körében sikerült az ismeretek nemzetközi szinten jelentősen bővíteni. Köszönetünket fejezzük ki az OTKA részére, hogy a kutatásnak bizalmat szavaztak és a zavartalan és eredményes kutatáshoz szükséges anyagi háttérrel mindvégig biztosították.

Pécs, 2015. február 2.



Dr. Reuter Gábor
témavezető