

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A canine distemper virus kutatás módszertanának fejlesztése Nanopore technológia segítségével, monitoring és genomszekvenálás céljából

PhD értekezés tézisei

Lanszki Zsófia



PÉCS, 2024

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A canine distemper virus kutatás módszertanának fejlesztése Nanopore technológia segítségével, monitoring és genomszekvenálás céljából

PhD értekezés tézisei

Lanszki Zsófia

Témavezetők:

Dr. Kemenesi Gábor
egyetemi adjunktus

Dr. Kurucz Kornélia
egyetemi adjunktus



PÉCS, 2024

BEVEZETÉS

A fertőző betegségek korlátozhatják a vadonélő fajok populációméretét és elterjedését. A betegség diagnosztizálási technológiák gyors fejlődésével, az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a vadonélő állatokban előforduló fertőző betegségek és azok hatásainak megismerése és megértése iránt. A virális betegségek kimutatása fontos tényező a védett és ritka fajok megőrzésében, azonban számos ragadozóemlős-faj vizsgálata technikailag és természetvédelmi-etikai okok miatt nehezebb, mint a háziállatok esetében. A passzív monitoring programokra épülő *post-mortem* (részletes boncolásra alapozott) vizsgálatok hatékony eszközt jelentenek a különböző minták gyűjtésére, az ökoszisztéma egészségével kapcsolatos tényezők elemzése és megértése céljából. A szövetminta-gyűjteményekre alapozható retrospektív vizsgálatok eredményei új adatokkal szolgálhatnak a ritka és védett fajokra vonatkozóan, beleértve bizonyos fertőző betegségek előfordulását és genetikai jellemzőit.

A *Canine Morbillivirus* (canine distemper virus, CDV) a szopornyicát okozó vírus, egy negatív egyszálú RNS-vírus, amely a *Paramyxoviridae* családba, azon belül a *Morbillivirus* nemzetségébe tartozik. A Hemagglutinin gén alapú genetikai csoportosítás alapján számos törzse ismert, amelyek különböző gazdaszervezetek és földrajzi területek szerint osztályozhatók. A CDV világszerte elterjedt vírusfertőzés, amely a vadon élő és háziállat populációkat egyaránt érinti. Gyakori a fajok közötti átvitel, ami a ritka és veszélyeztetett fajok esetében természetvédelmi problémákhoz vezethet. Elsősorban

testnedvekkel, például nyállal, légúti cseppekkel, vizelettel és ürülékkel terjed. A vírusfertőzést követően az érintett populációkban magas halálozási arány jellemző, ami a kutyáknál akár 60-80%-os is lehet, vadon élő menyétféléknél megközelíti a 100%-ot.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célunk volt a Magyarországon jelenleg és a múltban megtalálható szopornyica törzsek és az érintett fajok feltérképezése. Célul tűztük ki, hogy feltárjuk a szopornyicával kapcsolatos vizsgálatok tudás- és technológiai hiányosságait. Célunk egy hatékony és sokoldalú, széles körben, a korábbinál hatékonyabban alkalmazható genom szekvenáló módszer kidolgozása, majd annak gyakorlati alkalmazása volt több fajból, különböző országokban és időpontokban gyűjtött vizsgálati mintákon.

1. Technológiai hiányosságok azonosítása a CDV kutatásban – Klinikai esettanulmány házikutya esetében
2. Új genom szekvenáló módszer kidolgozása és alkalmazása a járványok vizsgálatában – CDV vörös rókáknál (*Vulpes vulpes*)
3. CDV retrospektív kimutatás és genom szekvenálás közönséges vidrában (*Lutra lutra*)
4. Genom szekvenálás terrestis menyétfélék (Mustelidae) körében
5. A múltban előforduló járványok megértése – Vörös rókáknál és házikutyák esetében, Olaszországban gyűjtött mintákon
6. Mobil laboratórium tesztelés, genom szekvenálás „snapshot study” – CDV bangladesi kóbor kutyákban

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Klinikai esettanulmány

Egy magyarországi menhelyi kutya fertőzésének lefolyását követtük nyomon. A kutya 2019 februárjától 2020 júniusáig, vagyis 17 hónapig szokatlanul hosszú ideig ürítette a szopornyica vírust.

2. Vörös rókák járvány vizsgálata

2021 tavaszától őszig, Magyarországon legalább 50 vörös róka pusztult el szopornyica fertőzés következtében. Az orális, nazális és rektális tamponmintákat Real-Time RT-PCR-rel vizsgáltuk (n=24) példány esetében a Canine Distemper Virus kimutatása és genom szekvenáló módszer tesztelése céljából.

3. Vidra minták retrospektív vizsgálata

Retrospektív módon 2000 és 2021 között gyűjtött vidra tüdőszövet mintákat (n=339) vizsgáltunk szopornyica kimutatása és genom szekvenálás céljából. A minták Magyarország teljes területét lefedték.

4. Terresztris menyétfélék vizsgálata

1997 és 2022 között Magyarországon gyűjtött, főként közúton elgázolt menyétfélék (6 faj) 170 egyedének a lép- és tüdőszövetmintáit vizsgáltuk. Ezek a következők voltak: 64 molnárgörény (*Mustela eversmanii*), 36 közönséges görény (*Mustela putorius*), 36 nyest (*Martes foina*), 18 nyuszt (*Martes martes*), 10 menyét (*Mustela nivalis*) és 6 hermelin (*Mustela erminea*).

5. Szopornyica vizsgálata vörös róka és kutya mintákban, Olaszország
Olaszországban 2005 és 2019 között gyűjtöttek kutyáktól (n=19) és vörös rókáktól (n=3) nyál és ürülék mintákat. A minták tárolása és feldolgozása a Bari Egyetem, Állatorvos-tudományi Tanszékén történt Olaszországban, együttműködésben.

6. Mintagyűjtés kóbor kutyáktól Bangladesben

2023-ban Banglades két nagyvárosában, Rajshahiban és Chattogramban gyűjtöttünk kóbor kutyáktól nyál mintákat (n= 135 és 122, a két város sorrendjében) helyi állatorvostanhallgatók és állatmentők bevonásával.

A minták vizsgálatára valós idejű RT-PCR módszert alkalmaztunk. A teljes vírusgenomot egy újonnan fejlesztett, pan-genotype CDV-specifikus amplikon alapú szekvenálási módszerrel szekvenáltuk, Oxford Nanopore szekvenálási technológia segítségével. Minden esetben filogenetikai elemzést végeztünk. A teresztris menyétfélék esetében rekombináció analízist végeztünk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. Klinikai esettanulmány

Az első vizsgálatban egy magyarországi menhelyi kutya fertőzésének lefolyását követtük nyomon. A kutya 17 hónapig ürítette a vírust 2019 februártól 2020 novemberéig. A filogenetikai analízis alapján az esettanulmányban feltárt CDV törzs a Arctic-like törzsbe tartozott a Hemagglutinin gén alapján.

A munka fő következtetéseként azonosítottuk a megfelelő szekvenálási módszer hiányát a CDV hatékony vizsgálatához. A széles körben alkalmazott Hemagglutinin gén alapú elemzés nem elegendő a genomszintű evolúciós minták, specifikus mutációk vagy rekombinációs események feltárásához. Ezért kifejlesztettünk egy amplikon alapú NGS szekvenálási módszert az összes ismert CDV törzs teljeskörű vizsgálatához.

2. Vörös rókák járvány vizsgálata

2021-ben a tavaszi időszakból 6/5 kölyök és 1/1 kifejlett róka, a nyári időszakból 5/3 kölyök, 10/10 fiatal és 2/2 kifejlett róka mintában igazoltuk a CDV jelenlétét. A vizsgált 24 róka közül összesen 21 volt pozitív a vírusra. Végül 19 teljes CDV genomot szekvenáltunk rókákból az általunk fejlesztett amplikon alapú szekvenálási módszerrel, amely magas szekvenálási lefedettséget eredményezett. A szekvenálási protokoll fejlesztése a jelen dolgozat fő eredménye. Az összes jelenleg ismert törzs filogenetikai analízise alapján a rókákat érintő CDV törzs a Europe törzsbe tartozott, amely Európában széleskörben elterjedt

Emberi járványok (például a közelmúltbeli COVID-19 világjárvány) esetében igen gyakori a gyors, érzékeny és specifikus NGS-alapú genomikai epidemiológiai eszközök kifejlesztése és használata, különösen az amplikon-szekvenáláson alapuló megközelítések alkalmazása. Ezt a tendenciát követve az állatbetegségek megfigyelésében is egyre elterjedtebb a hasonló módszerek alkalmazása. Jelenlegi ismereteink alapján ez az első NGS-alapú amplikon szekvenálási módszer szopornya esetében.

3. Vidra minták retrospektív vizsgálata

A vizsgált vidra minták Magyarország mind a tizenkilenc megyéből származtak. Összesen (n=2/339) mintában azonosítottuk a szopornya RNS-ét. Mindkettő Nyugat-Magyarországról származott. Az egyiket 2006-ban, a másikat 2010-ben gyűjtötték. Az első fertőzött állat egy fiatal (4-5 hónapos) rossz kondícióban lévő hím volt, ami a Kis-Balaton területéről származott. A második egy jó kondícióban lévő, kifejlett hím volt, amit a Rába folyó közelében találtak elpusztulva. A vidrákból származó mindkét vírusszekvencia a Hemagglutinin gén és a teljes genom filogenetikai analízis alapján a Europe törzsbe tartozott. Ezek az első CDV teljes genom és Hemagglutinin gén szekvenciák vidrából, gazdagítva a rendelkezésre álló CDV genomok sokféleségét.

Bár a vidra ökológiai szempontból a vízi élőhelyek jól tanulmányozott „kulcsfaja”, mikrobiológiai szempontból mégis alulkutatott. A CDV kimutatása vidrákban Magyarországon értékes betekintést nyújt a fajt érintő betegségek megismeréséhez.

4. Terresztris menyétfélék vizsgálata

A szopornyica RNS-t a 6 vizsgált fajból 3-ban mutattak ki: molnárgörény (n=64/2), közönséges görény (n=36/1) és nyest (n=36/2) esetében, míg nyuszt (n=18), menyét (n=10) és hermelin (n=6) minták esetében nem azonosítottuk a betegséget. A teljes genomok filogenetikai analízise alapján ezek a szekvenciák mindegyike a Europe törzsbe tartozott. A SimPlot analízis megerősítette a Hemagglutinin gén rekombinációját. Emellett több további rekombinációs pontot is megerősített a genomban.

A munka alátámasztja a szopornyica endemikus jelenlétét a hazai menyétfélék körében. A munka során szekvenálásra került az első két teljes CDV genom molnárgörényből, azonosítva egy új vírusgazdát. A rekombináns vírus jelenlétének feltárásával bizonyítottuk a teljes genom adatok fontosságát. Ez a megközelítés végső soron a CDV evolúciójának jobb megértéséhez vezethet, mivel a részleges genomfragmensek nem alkalmasak arra, hogy megértsük a rekombinációs események hatását a CDV evolúciójában vagy a Hemagglutinin géntől eltérő kódoló régiók szerepét. Bizonyítottuk, hogy az úton elpusztult tetemek értékes lehetőséget biztosítanak a szopornyica vizsgálatára a vadon élő fajokban.

5. Szopornyica vizsgálata vörös róka és kutya mintákban, Olaszország

A módszer magyar CDV törzseken való sikeres alkalmazását követően a vizsgálatot térben és időben is kiterjesztettük. Olaszországban, hosszabb időtartamban gyűjtött kutyák és vörös rókák pozitív mintáit szekvenáltuk. A szekvenálást követően a

filogenetikai analízis alapján a kutyák esetében 4 szekvencia tartozott a Europe, 14 szekvencia pedig Arctic-like törzsbe. A 3 vörös rókából származó szekvenciák mind a Europe törzsbe tartoztak. A munka fő újdonsága, hogy betekintést kaptunk a CDV genomikai epidemiológiájába Olaszország középső részére vonatkozóan.

Mindazonáltal kutatásunk hangsúlyozta a CDV evolúció genom szintű monitorozásának fontosságát, amely első lépésként szolgálhat a genomi evolúció megértéséhez. A retrospektív vizsgálati módszerek értékes lehetőséget kínálnak a jelenlegi járványok gyors értékelésére, valamint arra, hogy következtessenek a jövőbeni terjedési mintákra és a potenciális gazdafajokra. Ezek a módszerek segítenek a vírus megértésében, és döntő szerepet játszanak a jövőbeni járványokra való felkészülésben.

6. Mintagyűjtés kóbor kutyáktól Bangladesben

Annak érdekében, hogy demonstráljuk a mobilizálható genom szekvenálás megvalósíthatóságát az állatok fertőző betegségeinek megértésében, rövidtávú vizsgálatban teszteltük Bangladesben, kóbor kutyákon. Összességében a vizsgált állatok 3,9%-a (10/257) volt pozitív CDV-re RT-PCR-rel. CDV RNS-t csak a Rajshahi városában gyűjtött mintákban mutattunk ki, ahol a nyálminták 7,4%-a (10/135) volt pozitív. A genomszekvenálás során 4 teljes szekvenciát sikerült előállítanunk. Az eredmények alapján a kimutatott vírus az India-1/Asia-5 törzsbe tartozott.

A Bangladesből származó CDV törzsekre vonatkozóan nem állt rendelkezésre információ, ezért mobilizált PCR diagnosztikai és

szekvenálási laboratóriumi kapacitásunk segítségével gyors felmérést végzünk utcai kutyák körében. Bemutattuk a szekvenálási módszerünk gyors és hatékony alkalmazhatóságát, annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a CDV epidemiológiájába egy távoli és alacsony erőforrású földrajzi régióban. Tudomásunk szerint ezek az első CDV szekvenancia adatok Bangladesből. A kutatást helyi szakértőkkel együttműködve végeztük, a tudásmegosztásra és a kóbor kutyák CDV diagnosztikájának javítására összpontosítva.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az eredmények elsősorban arra hívják fel a figyelmet, hogy a CDV Magyarországon az elmúlt két évtizedben jelen volt a kutya- és a vadonélő ragadozó populációkban, továbbá, hogy ezeknek a jelenlévő törzseknek a megismeréséhez az új genomikai adatok és a teljes genom szekvenálási módszer alkalmasnak bizonyul. A CDV hatása a vadonélő ragadozópopulációkra jelenleg nem ismert. Mindazonáltal figyelemre méltó, hogy a vizsgálatunkban szereplő fertőzött állatok az ország különböző régióiból és különböző évekből származtak, ami arra utal, hogy ezek a törzsek Magyarországon endemikusnak tekinthetők. A munkánk során sikerült olaszországi mintákból teljes genomokat szekvenálni, ami lehetőséget ad a korábbi járványok felderítésére és megértésére. A további vizsgálatok szempontjából fontos, hogy egy földrajzilag távol álló területen, Bangladesben egy, az Európában található törzsektől filogenetikailag jól elkülönülő és távol eső új szopornycica törzsön is sikeresen teszteltük az általunk fejlesztett módszert.

Összefoglalva, felmértük a CDV-kutatás és -diagnosztika technológiai és tudásbeli hiányosságait, alternatív és modern megoldást kínáltunk a vírus genomikai vizsgálatának előmozdítására. Módszerünk több összeállításban történő bemutatását követően jelentős mennyiségű elérhető CDV genom szekvenciát biztosítottunk, mintegy 53 teljes genom adat keletkezett és két újabb gazdaszervezetet sikerült azonosítani a munka során.

PUBLIKÁCIÓK

Összesített Impakt Faktor (2023): 96.073

Az értekezésalapjául szolgáló publikációk IF: 14,418

H-index (2023): 7

Az értekezésalapjául szolgáló tudományos közlemények:

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G. E., Cserkész, T., Csorba, G., Görföl, T., Csathó, A.I., Jakab, F., Kemenesi, G. (2022) Detection and sequence analysis of Canine morbillivirus in multiple species of the Mustelidae family. *BMC Veterinary Research*, 18, 450. DOI:10.1186/s12917-022-03551-7

IF: 2.600

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G.E., Zeghibib, S., Jakab, F., Kemenesi, G. (2022) Retrospective Detection and Complete Genomic Sequencing of Canine morbillivirus in Eurasian Otter (*Lutra lutra*) Using Nanopore Technology. *Viruses*, 14, 1433. DOI: 10.3390/v14071433

IF: 4.700

Lanszki, Z., Tóth, G.E., Schütz, É., Zeghibib, S., Rusvai, M., Jakab, F., Kemenesi, G. (2022) Complete genomic sequencing of canine distemper virus with nanopore technology during an epizootic event. *Scientific Reports*, 12, 4116 DOI:10.1038/s41598-022-08183-3

IF: 4.600

Lanszki, Z., Zana, B., Zeghibib, S., Jakab, F., Szabó, N., Kemenesi, G. (2021) Prolonged Infection of Canine Distemper Virus in a Mixed-Breed Dog. *Veterinary Sciences*, 8, 61. DOI: 10.3390/vetsci8040061

IF: 2.518

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek:

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G.E., Cserkész, T., Jakab, F., Kemenesi, G. *Canine Morbillivirus* detection and sequence analysis in different carnivores in the last two decades from Hungary, 8th European Congress of Virology 2023, Poland, Gdańsk, 2023

Lanszki Z. Szopornyica vizsgálata hazai ragadozóemlős-fajokban, Magyar Természettudományi Múzeum, II. Emlőskutatók Szakmai Napja, Budapest, 2023

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G.E., Csorba, G., Cserkész, T., Zeghibib, S., Jakab, F., Kemenesi, G. Canine Distemper Virus (Szopornyica) vizsgálata hazai ragadozóemlős-fajokban, XIII. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Pécs, 2022

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G.E., Zeghibib, S., Jakab, F., Kemenesi, G. Canine Distemper Virus detecting in wild carnivores, in Hungary, 22. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, 2022

Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G.E., Jakab, F., Kemenesi, G. Retrospective detection and sequencing of Canine Distemper Virus in road-killed Eurasian otter (*Lutra lutra*) samples from the last two decades, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED), Online-Bécs, 2021