

**Új picornavírusok azonosítása és meghatározása
molekuláris biológiai módszerekkel**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Pankovics Péter

Témavezető: ¹Dr. Reuter Gábor Ph.D., Med. Habil.

Programvezető: ²Prof. Dr. Emödy Levente

¹Baranya Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi Szakigazgatási Szerve,
Regionális Virologiai Laboratórium,

Gastroenterális Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriuma, Pécs

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai
és Immunitástani Intézet



Pécs

2013.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	2
CÉLKITŰZÉSEK.....	5
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	6
EREDMÉNYEK.....	7
MEGBESZÉLÉS.....	12
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	14

BEVEZETÉS

A picornavírusok (*Picornaviridae* család) igen elterjedtek az élővilágban, számos állati és emberi megbetegedést okozhatnak, melyek morbiditása és mortalitása változatos. A jelenlegi ismereteink szerint a legszámosabb tagú víruscsoportnak tekinthetők, jelen vannak a halaktól a főemlősökig. A Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (ICTV) 2008-ban hivatalosan 12 nemzetséget különített el a családban: *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* és *Tremovirus*. 2013-ban további 5 nemzetséggel bővült a család: *Aquamavirus*, *Cosavirus*, *Dicripivirus*, *Megrivirus* és *Salivirus*. Minden egyes nemzetség számos vírushajt foglal magába.

A picornavírusok burokkal nem rendelkező, kicsi, 22 – 30 nm átmérőjű, pozitív polaritású, egyszálú RNS (+ssRNS) genomú vírusok. A vírus genom 7000-9700 nukleotid (nt) hosszúságú, egy nyílt leolvasási kerettel (ORF) rendelkezik, melyről klasszikusan egy polyprotein íródik át. A genom két végén nem kódoló régiók (UTRs) találhatóak. A picornavírusok 5'UTR-ja változatos hosszúságú és bonyolult másodlagos RNS szerkezettel jellemezhető. Ezen belül is mind strukturálisan, mind a funkció szempontjából kiemelendő a belső riboszóma kötő hely (IRES), melynek jelenleg 5 típusát (IRES I-V) ismerjük. A picornavírus genom 3' végén szintén egy eltérő hosszúságú, másodlagos szerkezetűvel jellemezhető nem kódoló régió (3'UTR) található, melynek végén polyadenin (poly(A)) farok található.

A picornavírusok kódoló régiója három állandó részre osztható: P1, P2 és P3. Egyes picornavírusok a P1 régió előtt 5' irányban még egy Leader proteinek (L-protein) nevezett fehérjét is kódolnak. A P1 régió kódolja a kapszid fehérjéket, amelyek közül az antigenitásért felelős VP1 emelendő ki. A P2 és P3 régiók fehérje termékei a fehérjék hasításában (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) és a virális genom replikációjában (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}) játszanak nélkülözhetetlen szerepet.

Az ismert emberi megbetegedést is okozó picornavírusok (*Enterovírus*, *Hepatovírus*, *Kobuvírus* és *Parechovírus*) változatos kórképek (közönséges megfázás, poliomyelitis, meningitis, akut flaccid paralízis, hepatitis, gastroenteritis myocarditis, herpangina stb.), kialakításában játszhatnak szerepet. A vírusok átvitele egyik gazdaszervezetről a másikra horizontálisan történhet, ahol kulcsfontosságú a fekális-orális és a légúti átvitel.

Az ICTV *Picornaviridae* Study Group taxonómiai osztályozása szerint egy adott picornavírus nemzetségről tagjairól beszélünk, ha (1) az L, a 2A, 2B és 3A vírus fehérjék a nemzetség tagjai között homológok, (2) a nemzetség tagjai alapvetően szerkezetileg homológ IRES-sel (azonos IRES típus) rendelkeznek és (3) az egy nemzetségbe tartozó vírusfajok genomjainak P1, P2 és P3 régiói filogenetikailag kapcsolatban vannak egymással és P1>40%, P2>40% és P3>50% szintű aminosav (aa) azonosságot mutatnak.

Kobuvírus nemzetség

1991-ben egy új virális kórokozót azonosítottak kagylófogyasztáshoz köthető gastroenteritis járvány székletmintáiból a japán Aichi Prefektúrában. 1998-ban sikerült az új vírusfaj (Aichi vírus; 2013. márciustól *Aichivírus A*) teljes genetikai állományát meghatározni, mely a *Kobuvírus* nemzetség első, prototípus tagja. 2003-ban megtalálták az Aichi vírus rokonát, a bovine (szarvasmarha) kobuvírust (U-1; 2013. márciustól *Aichivírus B*), szarvasmarhák fécesz mintáiban is. A kobuvírus név a japán 'kobu' szóból ered, jelentése dudor, csomó, mely a

vírus elektronmikroszkópos képén látható dudorra vagy csomóra emlékeztető felszíni struktúráira utal. A kobuvírusok L-proteinnel rendelkeznek.

Japán, német, francia és spanyol szeroepidemiológiai tanulmányok alapján a populáció 80-90%-a rendelkezik Aichi vírus elleni antitestekkel már 30-40 éves életkorra. Az Aichi vírusfertőzés valószínűleg hosszú távú védettséget nem ad, az újrafertőzések gyakoriak lehetnek. A kobuvírusok feltehetően fekális-orálisan, közvetlen kontaktussal, szennyezett ételmiszerrel vagy vízzel járványosan is terjedhetnek.

Az Aichi vírus jelenlegi tudásunk szerint hasmenéssel járó megbetegedést okoz embereknél. Fő klinikai tünete a gyomor és bélrendszeri zavarok és hasmenés, de előfordulhat hasi fájdalom, hányinger, hányás és láz is.

Vizsgálataink kezdetéig csak néhány tanulmány foglalkozott az Aichi vírus és szarvasmarha kobuvírus molekuláris biológiai módszerekkel történő kimutatásával. Az Aichi vírust ritkán (<3%) mutatták ki a járványos és sporadikus gastroenterális megbetegedésekben. A szarvasmarha kobuvírus kimutatásával csak Japánban és Thaiföldön foglalkoztak, ahol a kimutatási aránya 17% alatt volt mindkét vizsgálatban. Valószínűsíthető, hogy a vírus endémiásan jelen lehet a szarvasmarha állományokban.

Enterovírus nemzetség

Az *Enterovírus* (EV) nemzetség tagjai sokszínű képet mutatnak mind az ide tartozó vírusok (rhinovírusok, poliovírusok, enterovírusok stb.), mind az általuk okozott megbetegedések tekintetében; kezdve a tünetmentes vagy enyhe felső-légúti (közönséges megfázás) és gastroenterális fertőzésektől egészen a ritka, de súlyos megbetegedésekig, mint például az agyvelő/agyhártyagyulladás vagy a heveny petyhüdt bénulás. A legfontosabb virális kapszid fehérje, a VP1 alapján, a humán enterovírusok (a rhinovírusokon kívül) négy vírusfajba sorolhatóak: EV-A, EV-B, EV-C és az EV-D. A nemzetségen belüli újonnan felfedezett emberi megbetegedést okozó enterovírusok száma rohamosan növekszik. 2008. februárjában, egy új, rekombináns enterovírust (EV-C109) fedeztek fel az EV-C

csoporthoz gyermekkori légúti fertőzésekkel Nicaraguában. Az EV-C109 5'UTR régiója EV-A, míg a kódoló és a 3'UTR régiója EV-C eredetű.

Sapelovírus nemzetség

A *Picornaviridae* családban a *Sapelovírus* nemzetség 2006 óta hivatalosan elfogadott új nemzetség. Az evolúciós összehasonlító elemzések alapján jelenleg három vírusszűrés tartozik a nemzetségbe: a majom, a madár és a sertés sapelovírus.

CÉLKITŰZÉSEK

- Célunk volt a házi sertések fészes mintáiból véletlenül felfedezett (sertés) kobuvírus molekuláris genetikai módszerekkel történő vizsgálata és meghatározása.
- Célunk volt a sertés kobuvírus teljes nukleotid sorrendjének meghatározása, jellemzése és filogenetikai elemzése. Cél volt az 5'UTR és IRES másodlagos szerkezetének meghatározása.
- Célunk volt a sertés kobuvírus molekuláris epidemiológiai vizsgálata és nyomon követése sertés fészes/szérum minta párokból; a sertés kobuvírus viremia lehetőségének keresése, valamint evolúciós vizsgálata, két teljes genom ismerete alapján.
- Célunk volt a kobuvírus kimutatása más fajba tartozó haszonállatok (pl.: szarvasmarha, juh) fészes mintáiból.
- Célunk volt az Aichi vírus kimutatása gyermekektől származó széklet- és légúti mintákból.
- Célunk volt a kobuvírusok konzervatív génregiójára újonnan tervezett UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F szűrőprimerpár alkalmazásával a kobuvírusok keresése emberi és fűj székletmintákból.
- Célunk volt a molekuláris biológiai/genetikai módszerek (RT-PCR, Long-Range RT-PCR, „primer walking” PCR, 5'/3' RACE RT-PCR) laboratóriumi beállítása és fejlesztése a picornavírusok teljes genomjának meghatározása érdekében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati minták

A vizsgálati mintákat 2000 és 2011 között gyűjtöttük. A vizsgált állatoktól fécesz, szérum és tojás felszínéről vett mintákat használtunk. Humán minták esetén székletet és nasopharyngeális váladékot vizsgáltunk. A bélsármintákat hasmenéses betegektől, illetve tünetmentes és tünetekkel rendelkező állatoktól gyűjtöttük. Az állati székletminták házi sertés (*Sus scrofa domestica*), szarvasmarha (*Bos taurus*), juh (*Ovis aries*) és házi fürjtől (*Coturnix coturnix*) származtak.

RNS extrakció, RT-PCR és 5'/3' RACE módszer

A székletmintákat PBS-sel 10-50%-ra hígítva használtunk. A szérum mintákat és nasopharyngeális váladékot nem hígítottuk. A teljes RNS mennyiséget TRIzol®/TRIzol LS® Reagensekkel (*Serva; Gibco BRL*) vontuk ki a gyártó utasítása szerint, majd az RNS-t a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A virális RNS felszorzozását RT-PCR-rel végeztük. A teljes virális genomok meghatározásához a „primer walking” módszert alkalmaztuk, az 5'/3' régiók meghatározása a „rapid amplification of cDNA ends” (5'/3' RACE, *Roche*) módszerrel történt a gyártó utasításai szerint. A vizsgálatok kulcs primerpárját az UNIV-Kobu-R (5'ATGTTGTTRATGATGGTGTGA3', antisense, R: A/G) és az UNIV-Kobu-F (5'TGGAYTACAAGTGTTTTGATGC3', sense, Y: C/T) primerek nukleotid szekvenciáját a kobuvírusok 3D (RNS-függő RNS polimeráz) gén konzervatív szakaszára terveztük. A vizsgálatokhoz tervezett szűrő és szekvencia specifikus primereket az IDT (Belgium) szintetizálta.

Gélelektroforézis, szekvencia és filogenetikai elemzés

A PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélben Tris-Borát-EDTA pufferben futtattuk és etidium-bromiddal festettük. A PCR-termékeket direkt módon BigDye Terminator Kit-el szekvenáltuk és kapilláris szekvenátoron futtattuk a gyártó leírása alapján. A filogenetikai elemzéseinkhez a GenBank adatbázisát és a ClustalX, GeneDoc és MEGA programokat használtuk.

EREDMÉNYEK

A sertés kobuvírus felfedezése

A vizsgálataink kezdeti célja a sertés calicivírusok kimutatása és molekuláris epidemiológiai elemzése volt házi sertések fécesz mintáiból RT-PCR módszerrel. 2007. februárban összesen 60 egészséges malactól (*Sus scrofa domestica*) gyűjtöttünk székletmintát egy kelet-magyarországi farmról. A calicivírusok RNS-függő RNS-polimeráz génrégiójára tervezett p289/p290 „szűrő” primerpár használatával sapovírust 3,3%-ban, míg a minták 35%-ában következetesen egy „calicivírusokra nem specifikus” méretű ~1100 nt hosszúságú PCR-terméket kaptunk. E szekvenciák (swine/S-1-HUN/2007, EU787450) a kobuvírus nemzetségbe tartozó szarvasmarha (U-1 vírus) és humán (Aichi vírus) kobuvírus 3C^{pro}/3D^{pol} génrégióival mutattak rokonságot. A sertés kobuvírus (S-1-HUN) teljes genomjának hossza 8210 nt, a kódoló régió 7467 nt (2488 aa) hosszú. Az S-1-HUN 5'UTR (576 nt) első 108 nt-ja és másodlagos RNS szerkezete nagyon hasonló az U-1 és Aichi vírusokéhoz, azonban az 5'UTR további része, benne az IRES, jelentősen eltér. Az S-1-HUN vírusnak *hepacivírus/pestivirus*-szerű (HP), IV-es típusú IRES-e van, melynek minden jellegzetes motívumát megtaláltuk. A 3'UTR régiójára (167 nt) nem kaptunk szekvencia hasonlóságot. A genom L-fehérjét kódol. Az L, P1, P2 és P3 aa azonossága 23/34%, 53/61%, 59/68% és 63/71% az Aichi és szarvasmarha kobuvírusok megfelelő régióihoz. Az S-1-HUN P1 régióján belül a legnagyobb különbségek a VP1 régióban vannak. A P2 fehérjék közül a 2A-ban találhatóak a **HWAL** és **NCTHFV** konzervatív aa motívumok. A 2B-ben (viroporin?) egy egymás után ismétlődő 30 aa **AANRVAESIETTAS(T)V** (/A)VREADLARSTLNISM hosszúságú motívum (tandem repeat) található. A 2C-ben megtalálható a konzervatív helikáz aa motívum a **GPPGTGKS**, a P3 régió fehérjéiben pedig a **GMCGA** (3C) és a **KDEL**R, **YGDD**, **FLKR**, **GNPSG** (3D) motívumok. Az S-1-HUN genom magas (52,4%) G+C aránnyal jellemezhető.

A sertés kobuvírus kimutatása új, általános kobuvírus szűrőprimer segítségével

Az Aichi, U-1 és S-1-HUN kobuvírusok 3D régiójára egy általános kobuvírus „szűrő”-primerpárt (UNIV-kobu-F/UNIV-kobu-R) terveztünk. A 60 sertés fécesz mintát ismételten megvizsgálva az egészséges állatok mintáinak 65%-ából sikerült a sertés kobuvírust kimutatni: a 10 napos állatok mindegyikéből (100%), a 3 hetes állatok 93,3%-ból, a 3 hónapos állatok 20%-ból és a 6 hónapos állatok 46,7%-ból.

A sertés kobuvírus fertőzés nyomon követése és a vírus evolúciója

A sertés kobuvírus endemikus elterjedtségét és in vivo evolúcióját vizsgáltuk a sertésstelepen, ahol a prototípus S-1-HUN vírust kimutattuk. Huszonegy hónappal az első mintavételezés után ismételten 60 fécesz/szérumminta párt vizsgáltunk RT-PCR módszerrel. A sertés kobuvírus RNS-t összesen 32 (53,3%) esetben azonosítottuk a bélsármintákban, míg a vírust 16 (26,6%) esetben a szérumból is ki tudtuk mutatni. Kilenc olyan minta pár volt (szérum-fécesz), ahol mind a féceszben, mind pedig szérumban megtaláltuk a sertés kobuvírus RNS-t. A második mintavételezésből gyűjtött, kobuvírust tartalmazó székletminta közül az egyik vírusnak meghatároztuk a teljes genom szekvenciáját (kobuvirus/swine/K-30-HUN/2008/Hungary; GQ249161) és összehasonlítottuk a prototípus S-1-HUN vírus szekvenciájával. A legmagasabb és a legalacsonyabb nt szintű mutációs változást az L és a 3D régiókban találtuk, míg a legmagasabb szintű aa változások a 2C, 2A és a VP3 régiókban voltak. Aminosav változást a VP1, 3A és 3B régiókban nem tapasztaltunk.

A szarvasmarha kobuvírus első európai kimutatása

A 2002. februárban egy farmról gyűjtött 32 szarvasmarha fécesz minta közül 2 (6,25%), az 1-7,6 éves korcsoportba tartozó állat bélsármintájából lehetett szarvasmarha kobuvírust (kobuvirus/bovine/Aba-Z20/2002/Hungary; FJ225406) kimutatni, RT-PCR módszerrel az UNIV-kobu primerekkel, Európában először.

Kobuvírus leírása és teljes genomjának meghatározása juhokból

A bárányoktól (*Ovis aries*) 2009. márciusban gyűjtött 8 fécesz minta közül 5 (62,5%) esetben tudtunk kobuvírust kimutatni RT-PCR módszerrel az UNIV-kobu primerekkel. A juh kobuvírus (kobuvírus/sheep/TB3-HUN/2009/Hungary; GU245693) teljes genomjának hossza 8378 nt, a kódoló régió 7404 nt (2468 aa) hosszú. A TB3-HUN 5'UTR (797 nt) másodlagos RNS szerkezete a szarvasmarha kobuvírus 5'UTR-hez hasonlít (V-ös típusú IRES-sel). A 3'UTR régiója (174 nt) a szarvasmarha kobuvírushoz mutatott szekvencia rokonságot. A genom L-fehérjét kódol. Az L, P1, P2 és P3 aa azonossága 28,54/36%, 48/81/60%, 61/88/67% és 62/92/71% az Aichi, szarvasmarha és sertés kobuvírusok megfelelő régióihoz. A polyprotein lehetséges hasítási helyei - a 3B/3C határ kivételével - megegyeztek az U-1 víruséval. A juhokból kimutatott kobuvírusok a szarvasmarha kobuvírusokkal mutatnak közeli filogenetikai rokonságot.

Aichi vírus (humán kobuvírus) kimutatása Magyarországon

Az előzőleg bakteriális kórokozót, rota-, adeno- és calicivírust nem tartalmazó, 12 év alatti gyermekektől származó 65 székletmintából 1 (1,5%) esetben sikerült Aichi vírust (HUN298/2000/HUN; FJ225407) RT-PCR módszerrel azonosítani az UNIV-kobu primerekkel. A székletminta egy járó beteg szakellátáson megjelent 3 éves kislánytól származott, akinek mind felső-légúti, mind pedig enterális (gastroenteritis) tünetei is voltak. A HUN298/2000/HUN vírus 100% aa azonosságot mutatott egy németországi (BAY-1-03-DEU, AY747174) Aichi vírushoz, ami az A genotípusú Aichi vírusok csoportjába tartozik.

Új picornavírus azonosítása háziasított fűrj fécesz mintából az UNIV-kobu primerekkel

Háziasított fűrj (*Coturnix coturnix*) 2010. júliusában vett fécesz mintájából az UNIV-Kobu primerekkel egy erős, specifikus méretű PCR-terméket kaptunk. A nt szekvencia hasonlóságot mutatott a humán enterovírus 99 (EF015012) és a majom picornavírus 17 (YP_001718553) vírusok 3D régiójához. Meghatároztuk a fűrj picornavírus (QPV1-HUN/2010, JN674502) teljes genomját, mely 8159 nt hosszúságú (kódoló régió 7449 nt, 2482 aa). A QPV-1 5'UTR (494 nt) IV-es típusú IRES-sel jellemezhető. Az IRES-ben fontos szerkezeti különbségek figyelhetők meg, például a III-as domén igen hosszú csúcsi része. E helyen az IRES egy 20 nt hosszúságú konzervatív motívumot is tartalmaz („8”-aszerű másodlagos szerkezet), melyet további 4 picornavírusban [fóka picornavírus (EU142040), galamb picornavírus B (FR727144), kacsza hepatitis vírus 1 (DQ249299) és pulyka hepatitis vírus (HQ189775)] is felleltünk. A QPV-1 3'UTR (216 nt) részlegesen a kacsza sapelovírus 3'UTR szekvenciájához hasonlít. A QPV1 genom kódol (egy valószínűleg komplex funkciójú) L-fehérjét (390 aa), mely ciszteinben gazdag (9,5%) és amelyben egy 34 aa hosszúságú ismétlődő motívum található. A 2A régió viszont rendkívül rövid (11 aa). A P1 (2571 nt, 857 aa), P2 (1374 nt, 458 aa) és P3 (2334 nt, 777 aa) hosszúságú régiók 43%, 39% és 47% aa azonosságot mutattak a madár sapelovírushoz (kacsza picornavírus, AY563023). A polyprotein lehetséges hasítási helyei – VP4/VP2 és VP2/VP3 határok kivételével – a Q/G határoknál voltak. A fűrj picornavírus a közel egy időben felfedezett galamb picornavírus A és B vírusokkal (önálló nemzetségbe nem besorolt picornavírusok) és a sapelovírusokkal (*Sapelovírus* nemzetség) mutat filogenetikai rokonságot. Kilenc hónappal később, ugyanarról a fűrjtelepről gyűjtött fécesz minták 30%-ból is sikerült a fűrj picornavírust RT-PCR módszerrel az UNIV-kobu primerekkel kimutatni. A kereskedelmi forgalomban kapható fűrj tojások felszínéről a fűrj picornavírus RNS-t viszont nem tudtuk RT-PCR módszerrel kimutatni.

Enterovírus C109 (EV-C109) első európai kimutatása

2005/2006 és 2006/2007-es légúti szezonokban légúti betegségekkel kórházban kezelt gyermekektől gyűjtött 92 garatmosó folyadékból egy (1,1%) esetben sikerült specifikus méretű PCR terméket kapni az UNIV-kobu primerekkel (majd specifikus EV-C109 primerekkel). A részleges szekvencia a coxsackievírus A17 (G12, AF499639) vírus nt szekvenciájával 85%-os, míg az enterovírus C104 (AGA18499) vírus aa szekvenciájával 94%-os azonosságot mutatott. Majd 2010-től elérhető új, prototípus enterovírus EV-C109 (NICA-08-4327, GQ965517) vírushoz hasonlítva 96% aa azonosságot kaptunk. Meghatároztuk a vírus (L87/HUN/2007, JN900470) teljes genomját (7354 nt). A P1, P2 és P3 régiók 98%, 98% és 97% aa azonosságot mutattak a prototípus EV-C109 megfelelő régióival. Az L87 vírus rekombinációs mintázata prototípus EV-C109-al egyezik: EV-A-szerű nukleotid szekvencia az 5'UTR részen és EV-C-szerű nukleotid szekvencia a kódoló és a 3'UTR régiókban. A 2,5 éves fiúgyermeket 2007. januárjában bronchitis és pneumónia miatt kezelték.

MEGBESZÉLÉS

A burok nélküli, pozitív, egyszálú RNS (+ssRNA) genomú picornavírusok fontos humán és állati kórokozók, egyben a legnépesebb ismert víruscsalád is. A *Picornaviridae* családba jelenleg 17 nemzetség és 37 vírúsfaj tartozik. Az újonnan felfedezett picornavírusok száma rohamosan növekszik, jelenleg is számos új picornavírus vár rendszertani besorolásra, több közülük egy-egy potenciálisan új nemzetség első tagja. E mellett a változások érintik a picornavírusok alapdefinícióját is. Az eredeti meghatározás szerint, minden picornavírus egy ORF-el rendelkezik, azonban 2012-ben kutyák fécesz mintájából olyan új picornavírust (cadicivírus A, *Dicipivirus*) fedeztek fel, melynek genomja a P1 és P2 régiók között egy IRES-sel rendelkező intergenetikus régiót is tartalmaz.

A doktori értekezésben a *Kobuvirus*, az *Enterovirus* és egy jelenleg még be nem sorolt picornavírus nemzetségbe tartozó új, picornavírus fajokról számoltunk be emberi és állatoktól származó mintákból. A pozitív, egyszálú RNS genomú vírusok sikeres azonosításának kezdetben véletlen, módszertani okai voltak. A molekuláris módszer (RT-PCR) során az adott vírusok genom részeire specifikusnak hitt olyan primerekkel dolgoztunk, melyekről a használat során derült ki, hogy addig ismeretlen vírusok kimutatására is alkalmasak. Ez vezetett új, eddig nem ismert vírusok azonosításához. A kezdeti lépésben a p289/p290 jelű általános calicivírus primerpár használatával a sertés kobuvírus, majd az UNIV-kobu-R/UNIV-kobu-F primerpár használatával – a humán Aichi, a szarvasmarha, a juh és a sertés kobuvírus – mellett a fűrj picornavírus és egy új, humán légúti virális kórokozó az EV-C109 vírus azonosítását tette lehetővé.

A következő új felismeréseket tettük a picornavírusok körében:

- Az általános calicivírus primerekkel (p289/p290) – véletlenül – azonosítottunk egy új picornavírus fajt sertések fécesz mintáiból. A sertés kobuvírus a *Kobuvirus* nemzetségbe tartozik, melyet az ICTV 2013. márciusában *Aichivirus C* néven fogadott el új vírúsfajként.

- Meghatároztuk a sertés kobuvírus genomjának teljes nukleotid sorrendjét.
- Elemeztük az S-1-HUN nem kódoló régióit (UTRs) és meghatároztuk az S-1-HUN belső riboszómakötő helyének (IRES) másodlagos RNS szerkezetét (IV-es típusú IRES).
- Elemeztük az S-1-HUN kódoló régióit és összehasonlítottuk az Aichi vírus és az U-1 prototípus kobuvírus szekvenciákkal. A 2B genomrégióban egy ismétlődő szekvenciát (tandem repeat) azonosítottunk.
- Molekuláris epidemiológiai módszerekkel vizsgáltuk a sertés kobuvírus jelenlétét különböző korcsoportú sertések fécesz mintáiban. Kimutattuk a sertés kobuvírus gyakori és endémiás jelenlétét a vizsgált sertésfarmon.
- Igazoltuk a sertés kobuvírus jelenlétét szérum mintákban, ezzel felvetettük a virémia lehetőségét a kobuvírus fertőzések során.
- Elvégeztük a sertés kobuvírus *in vivo* evolúciós vizsgálatát a kb. 2 évvel később, ugyanarról a farmról kimutatott (K-30-HUN) és a prototípus vírus (S-1-HUN) teljes genomjainak összehasonlításával. Meghatároztuk az egyes régiók nukleotid/aminosav változását és megadtuk azok gyakoriságát.
- Először mutattunk ki szarvasmarha kobuvírust (*Aichivirus B*) szarvasmarha fécesz mintákból Európában.
- Először mutattunk ki kobuvírust (*Aichivirus B*) juhok fécesz mintáiból. A vírus (TB3-HUN) teljes genomját meghatároztuk.
- Először mutattunk ki *Aichi* vírust (*Aichivirus A*) gyermekektől származó székletmintákból hazánkban.
- Azonosítottunk egy új picornavírust – fűrj picornavírus – fűrj fécesz mintákból, melynek teljes genomját meghatároztuk és elemeztük.
- Először mutattuk ki egy új rekombináns enterovírust – EV-C109 – Európában 10 év alatti, légúti tünetekben szenvedő gyermektől származó légúti mintában.
- Sikeresen adaptáltunk és fejlesztettünk molekuláris biológiai/genetikai módszereket a picornavírusok kimutatása és teljes genomjának meghatározása érdekében.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Reuter G., Boldizsár Á., Kiss I., **Pankovics P.**: Candidate new species of kobuvirus in porcine hosts. *Emerg. Infect. Dis.* 2008. 12, 1968-1970. (IF: 6,449)

Reuter G., Boldizsár Á., **Pankovics P.**: Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus, *Kobuvirus* family *Picornaviridae*. *Arch. Virol.* 2009. 154, 101-108. (IF: 1,909)

Reuter G., Boldizsár Á., Kiss I., Kecskeméti S., **Pankovics P.**: Sertés kobuvírus: egy új vírushaj leírása a *Picornaviridae* család *Kobuvirus* nemzetségében. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2009. 131, 459-461. (IF: 0,2)

Reuter G., Boldizsár Á., Papp G., **Pankovics P.**: Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Arch. Virol.* 2009. 154, 1529-1532. (IF: 1,909)

Reuter G., Kecskeméti S., **Pankovics P.**: Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 2010. 16, 696-698. (IF: 6,859)

Reuter G., Boros Á., **Pankovics P.**, Egyed L.: Kobuvirus in domestic sheep, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 2010. 16, 869-870. (IF: 6,859)

Reuter G., Boros A., **Pankovics P.**: Kobuviruses – a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* 2011. 21, 32-41. (IF: 7,2)

Pankovics P., Boros A., Reuter G.: Novel picornavirus in domesticated common quail (*Coturnix coturnix*). *Arch. Virol.* 2012. 157, 525-530. (IF: 2,03)

Pankovics P., Boros A., Szabó H., Székely G., Gyurkovits K., Reuter G.: Human enterovirus 109 (EV109) in acute paediatric respiratory disease in Hungary. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2012. 59, 285-290. (IF: 0,646)

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 34,061

Összes impakt faktor: 88,1

Független idézetek száma: 296