

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

Sertés circovírusok járványtani vizsgálata

PhD értekezés

Készítette:

Dr. Cságola Attila

Témavezető: Dr. Tuboly Tamás

2009

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Dr. Tuboly Tamás, egyetemi docens
SZIE-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Kiss István
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Debrecen
Igazgató

Prof. Dr. Éva Nagy
University of Guelph
Dept. of Pathology

Az értekezés Dr.Tuboly Tamás elnökletével Budapesten 2009. február 2-án tartott munkahelyi vita nyomán nyerte el végleges formáját.

Készült 8 példányban. Ez az__ . sz. példány.

.....
Dr. Cságola Attila

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítések jegyzéke	5
Összefoglalás.....	7
Summary	9
1. Bevezetés.....	11
2. Célkitűzések	13
3. Irodalmi áttekintés.....	14
3.1. A sertés circovírusok járványtana	14
3.1.1 Rendszertan, történet, előfordulás.....	14
3.2. A sertés circovírusok jellemzése	19
3.2.1. A vírus szaporodása	21
3.2.1.1. <i>A sertés circovírusok genomjának szerveződése</i>	21
3.2.1.2. <i>Rep' és Rep' fehérje</i>	23
3.2.1.3. <i>Cap fehérje</i>	23
3.3. A PCV2-vel kapcsolatban leírt kórképek.....	25
3.3.1. PMWS	25
3.3.1.1. <i>Klinikai tünetek</i>	25
3.3.1.2. <i>Kórbonctani elváltozások</i>	25
3.3.1.3. <i>Kórszövettani elváltozások</i>	26
3.3.1.4. <i>Kórfejlődés</i>	26
3.3.1.5. <i>Diagnózis</i>	28
3.3.2. PDNS.....	30
3.3.2.1. <i>Klinikai tünetek</i>	30
3.3.2.2. <i>Kórbonctani elváltozások</i>	30
3.3.2.3. <i>Kórszövettani elváltozások</i>	31
3.3.2.4. <i>Kórfejlődés</i>	31
3.3.2.5. <i>Diagnózis</i>	32
3.3.3. Reprodukív rendellenességek	32
3.3.4. Sertések légzőszervi tünetegyüttese (porcine respiratory disease complex, PRDC)	33
3.3.5. PCV2-vel kapcsolatban leírt egyéb kórképek	34
3.4. Sertés circovírus előfordulása más fajokban.....	34
3.5. A PCV2 által okozott károk csökkentésének lehetőségei	35
4. Anyag és módszer	37
4.1. A sertés circovírus kimutatásra használt szervminták származása	37
4.1.1. A sertés circovírus-DNS tisztítás optimalizálásához használt szervminták származása	37
4.1.2. A magyarországi vaddisznó állományban előforduló PCV kimutatásra használt szervminták származása, csoportosítása	37
4.1.3. Romániai PCV2 kimutatására használt minták.....	37
4.1.4. A közép-kelet európai régióban jelen lévő PCV2 szekvenciák meghatározásához használt minták származása	38
4.2. Vírus-nukleinsav tisztítása a szervmintákból.....	40
4.2.1. Emésztés proteináz K-val.....	40
4.2.2. Forralásos módszer.....	40
4.2.3. DNS tisztítás Trizollal.....	41
4.2.4. Mikrogyantás DNS tisztítás	41
4.2.5. DNS tisztítás QIAGEN QIAamp® DNA Stool Mini kit segítségével	41
4.3. A PCV DNS amplifikálása.....	41
4.4. A DNS-fragmentumok tisztítása gélből	44
4.5. Szekvencia-analízis	44

4.6. Sejtek.....	45
4.7. Vírusizolálás.....	45
4.8. Vírus titer meghatározása PCR-rel	46
4.9. Sertés circovírus specifikus sertéssavó készítése.....	46
4.10. Indirekt immunfluoreszcenciás módszer	47
4.10.1 A vérsavók titerének meghatározása.....	47
4.10.2. Vírus titer meghatározása indirekt immunfluoreszcenciás (IIF) módszerrel.....	47
4.11. Állatfertőzési kísérletek	48
4.11.1. Kísérleti állatok	48
4.11.2. Kísérleti elrendezés	48
5. Eredmények	50
5.1. DNS tisztítási módszerek	50
5.2. A 2002 és 2003 közötti, magyarországi vaddisznókból származó PCV2 szekvenciák elemzése	51
5.3. PCV1 szekvenciák elemzése.....	57
5.4. A romániai PCV2 kimutatása	61
5.5. A közép-kelet európai régióban, 2006-2007-ben jelen lévő PCV2 szekvenciák összehasonlítása a GenBank-ban közzétett szekvenciákkal	65
5.6. Egér fertőzési kísérletek eredményei	80
6. Megbeszélés	83
6.1. A 2002 és 2003 közötti, magyarországi vaddisznókból származó PCV szekvenciák elemzése	83
6.2. A romániai PCV2 kimutatása	86
6.3. A közép-kelet európai régióban jelen lévő PCV2 szekvenciák összehasonlítása a GenBank-ban közzétett szekvenciákkal	87
6.4. Egerek fertőzése PCV2-vel	91
7. Új tudományos eredmények.....	94
8. Irodalom	95
9. Publikációk.....	115
10. Mellékletek.....	117
11. Köszönetnyilvánítás	128

Rövidítések jegyzéke

BFDV:	psittacine beak and feather disease virus (papagájfélékben a csőr- és a tollképződés zavarával járó betegséget okozó vírus)
BSA:	Bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)
CRO:	horvát
CZE:	cseh
dNTP:	dezinukleotid-trifoszfát
DNS:	dezoxi-ribonukleinsav
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
FBS:	foetal bovine serum (magzati szarvasmarha szérum)
HUN:	magyar
IIF:	indirekt immunfluoreszcencia
mp:	másodperc
mRNS	messenger RNS (hírvivő RNS)
NaI:	nátrium-jodid
NLS:	nuclear localization signal (sejtmagba jutást irányító jel)
nt:	nukleotid
ORF:	open reading frame (nyílt olvasási keret)
Ori:	origin of replication (megsokszorozódás kezdőpontja)
PBS:	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferolt sóoldat)
PCR:	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PCV:	porcine circovirus (sertés circovírus)
PCVD:	PCV diseases (PCV betegségek)
PDNS:	porcine dermatitis nephropathy syndrome (sertések dermatitisz nefropátia tünetegyüttese)
PMWS:	postweaning multisystemic wasting syndrome (választott malacok circovírus okozta sorvadása)
POL:	lengyel
PPV:	porcine parvovirus (sertés parvovírus)
PRDC:	porcine respiratory disease complex (sertések légzőszervi betegség komplexe)
PRRSV:	porcine reproductive and respiratory syndrome virus (sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó tünetegyüttese)

RCR:	rolling circle replication (gördülő kör alapján történő megsokszorozódás)
RNS:	ribonukleinsav
ROM:	román
SLO:	szlovák
SPF:	specific pathogen free (specifikus patogénektől mentes)
STC:	swine testicular cell (sertés here sejt)
TCID ₅₀ :	tissue culture infective dose 50 % (a szövettenyészet 50 %-át fertőző vírus mennyiség)

Összefoglalás

A sertés circovírusoknak (porcine circovirus, PCV) jelenleg két típusa ismert: az apatogén PCV1 és a patogén PCV2, mely számos kórképpel hozható kapcsolatba jelentős gazdasági károkat okozva a sertésállományokban. A PCV2 által kiváltott leggyakoribb betegséget, a választott malacok circovírus okozta sorvadását (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) először 1991-ben írták le Kanadában. A kórokozó mára az egész világon elterjedt, és retrospektív vizsgálatok szerint a vírus az 1970-es és 1980-as évekből származó sertés eredetű mintákból is kimutatható.

A PCV2-nek két genotípusa ismert, melyek között a legmarkánsabb különbség a genom méretében van: a hosszabb genommal rendelkező PCV2A és a rövidebb PCV2B genotípus. A járvány kezdetén a különböző kórképekből a PCV2A genotípust lehetett gyakrabban kimutatni, 2003-ra Nyugat-Európában és 2005-től Észak-Amerikában azonban a PCV2B genotípus vált elterjedtebbé. Magyarországon az első PMWS eseteket 1999-ben azonosították és 2003-ig hazánkban is a PCV2A genotípus volt a gyakoribb.

Munkánk során felmérést készítettünk 2002-2003-ban a magyarországi vaddisznó állomány PCV fertőzöttségéről. Több mint 2000 mintát gyűjtöttünk az ország különböző részeiről, és csoportosítottunk származási hely szerint. A minták 20,5 %-ából volt kimutatható PCV2, és a két genotípus közel azonos arányban volt jelen a vaddisznó mintákban. Vaddisznóra jellemző szekvenciát nem találtunk. A szekvencia analízis alapján felmerült a két genotípus közötti rekombináció lehetősége, amit később többen is igazoltak. Megállapítottuk, hogy a vaddisznókban a PCV2 mellett az apatogén PCV1 változat is előfordul, és a világon elsőként határoztunk meg vaddisznóból származó teljes PCV1 genomszekvenciát. Ezt megelőzően PCV1-et kizárólag PK-15 sejtvonalból, valamint vakcinából és a szövettenyésztéshez használt tripszin készítményekből mutattak ki. A vaddisznóból kimutatott PCV1 szekvencia nem mutatott nagyobb eltérést a PK-15 sejtvonalat permanensen fertőző PCV1 törzsekben leírtaktól, mint amekkora különbség az eddig ismert PCV1 törzsek között kimutatható volt.

Részt vettünk az első romániai PCV2 által okozott kórképek leírásában, ahol az első PMWS eseteket 2002 májusában, az első PDNS (porcine dermatitis nephropathy syndrome) tüneteit mutató sertéseket pedig két évvel később észlelték. A kórbonctani és kórszövetteni elváltozások megegyeztek a szakirodalomban közzétett adatokkal. Meghatároztuk PMWS és PDNS tüneteit mutató sertésekből származó PCV2 teljes nukleotid szekvenciáját, és megállapítottuk, hogy a két kórképből származó genom azonos.

A közép-kelet európai régióban zajló PCV2 járvány molekuláris hátterének tisztázása érdekében vizsgáltuk, hogy milyen PCV2 szekvenciák fordulnak elő ebben a térségben. Magyarországról, Lengyelországból, Szlovákiából, Csehországból, Horvátországból és Romániából származó teljes PCV2 szekvenciákat határoztunk meg és hasonlítottunk össze a GenBank-ban 2007. december 31-ig közzétett szekvenciákkal. A legrégebbi közép-kelet európai letölthető genomok 2003-ból, Ausztriából és Magyarországról származtak, és a szekvenciák között a PCV2A genotípus dominált. Megállapítottuk, hogy a Nyugat-Európában végbement változashoz hasonlóan, a közép-kelet európai régióban is a PCV2B genotípus vált uralkodóvá, de míg Nyugat-Európában már 2003-ban a PCV2B genotípus volt elterjedtebb, addig térségünkben ez csak 2007-re vált meghatározóvá. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy azokon a területeken, ahol a fertőzöttség még ma is terjedőben van, ott a PCV2 genomok nukleinsav szekvenciájában jelentősebb eltérések vannak, mint az endémiás vidékeken. Ugyanez a tendencia mutatkozik világszerte, a rövidebb genotípus gyorsabban terjed az eredeti PCV2A típusnál, és egy genetikailag egységes járványtani kép van kialakulóban, ami feltételezi, hogy a vírus adaptációja bár lassuló ütemben, de még mindig folyamatban van.

A PCV2 járványtanának és a védekezésnek is meghatározó eleme annak a megismerése, hogy a vírus sertésen kívül képes-e más fajban fennmaradni, szaporodni és ürülve sertéseket fertőzni. Jelenlegi ismereteink rendkívül korlátozottak ezen a területen. A lehetséges vírushordozó fajok közül egereket vizsgáltunk és megállapítottuk, hogy az egerek fertőzhetők PCV2-vel, a vírus képes szaporodni bennük, de betegségre utaló klinikai tüneteket és kórbonctani elváltozásokat nem találtunk. A vírusürítési vizsgálatokkal egyértelművé vált, hogy az egerek ürítik a vírust, és társaikat képesek megfertőzni. Az egerekkel végzett kísérleteink alapján feltételezhetjük, hogy ezek a rágcsálók fontos szerepet játszanak a PCV2 fenntartásában és terjesztésében.

Summary

Two types of porcine circoviruses (PCV) are currently recognized: the non-pathogenic PCV1 and the pathogenic PCV2, later associated with several clinical conditions, referred to as porcine circovirus diseases (PCVDs). PCV2 is responsible for severe economic losses of the swine industry. Among PCVDs, the most frequently diagnosed is the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The first description of PMWS was made in Canada, in 1991, but according to retrospective studies, PCV2 itself has already been present in swine samples from the 1970-ies and 80-ies. By today PCV2 has spread worldwide.

PCV2 is divided into 2 genotypes. The most characteristic difference between them is the genome length: the longer sequence is designated PCV2A and the shorter PCV2B genotype. During the first recognized cases of PCV2 infections viruses belonging mainly into genotype PCV2A were detected, but by 2003 in Western Europe and by 2005 in North-America, PCV2B genotype had become more frequent. The first PMWS case in Hungary was described in 1999. At the beginning of the Hungarian epidemic also PCV2A genomes were detected more frequently, until 2003 when PCV2B started to take over.

One of the purposes of this study was to estimate the prevalence of PCV in Hungarian wild boars, using samples collected between 2002 and 2003. More than 2000 organ samples were collected from different areas of Hungary. PCV2 could be detected in 20,5 % of the samples, and the proportion of the two genotypes was close to even. Wild boar specific sequences could not be detected. Based on sequencing data the possibility of genomic recombination was raised and later it was confirmed by other researchers. We demonstrated that PCV1 was also present in wild boars and were the first ones to determine the complete nucleotide sequence of a PCV1 from an organ sample. The sequence differences of the wild boar PCV1 and PCV1 from *in vitro* sources was not higher than that among the already known PCV1 isolates. During our studies we participated in the first description of PCV2 caused diseases in Romania, both PMWS and PDNS (porcine dermatitis nephropathy syndrome). Complete PCV genome sequences were determined both from PMWS and PDNS affected pigs and they proved to be identical.

To clarify the molecular background of PCV2 epidemiology in the Central European region, PCV2 sequences of this area were studied. Complete PCV2 genomes were determined from Hungarian, Polish, Slovak, Czech, Croat and Rumanian samples. The sequences were compared with other PCV2 sequences deposited in the GenBank until 31 of December, in 2007. The oldest available sequences of the region, from 2003, were available from Hungary and Austria, and PCV2A was the dominant type of the time. According to our findings, similarly to

the situation in Western Europe, PCV2B had also become dominant in Central-Europe although with a few years delay by the year 2007. A similar tendency is observed on a world-wide scale, the shorter genotype is spreading faster than the longer one, and an epidemiologically uniform picture is becoming evident.

An efficient prevention and control of PCVD requires information of the host range of the virus, whether PCV2 can be maintained and spread by animal species other than swine. Mouse as one of the possible vector species, was studied and it was demonstrated, that PCV2 is indeed capable of infecting mice, the virus can replicate and it can be shed to be transmitted to other animals, possibly to swine as well. According to the results of our experiments it is safe to suppose, that this rodent may play an important role in spreading PCV2.

1. Bevezetés

Az egyik legnagyobb gazdasági kártétellel járó vírusos eredetű fertőző betegség a sertésállományokban a sertés circovírusok 2-es típusához (porcine circovirus 2, PCV2) köthető. A PCV2 által okozott betegségek egyik típusát, a választott malacok circovírus okozta sorvadását (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 1991-ben írták le először Kanadában (Harding és Clark, 1996). A kórokozó mára már az egész világon megjelent, és a PMWS mellett kisebb gyakorisággal, de más kórformákból is kimutatták.

A PMWS megjelenése óta a PCV2-vel összefüggést mutató betegségek száma jelentősen bővült, éppen ezért ma már általában PCV okozta betegségekről (PCV diseases, PCVD) szokás beszélni. A PCV2-t idáig a következő kórképekkel hozták kapcsolatba: sertések légzőszervi betegség komplexe (porcine respiratory disease complex, PRDC, Halbur, 1998, Thacker, 2001, Kim és mtsai., 2003b), sertések dermatitisz nefropátiája (porcine dermatitis nephropathy, PDNS, Segalés és mtsai., 1998, Rosell és mtsai., 2000a), magzati miokarditisz és reprodukív rendellenességek (West és mtsai., 1999, Oconnor és mtsai., 2001), elhalásos tüdőgyulladás (proliferative and necrotising pneumonia, Pesch és mtsai., 2000), elhalásos traheitisz (Candotti és mtsai., 2001), exsudative epidermitis (Kim és Chae 2004, Watrang és mtsai., 2002), valamint kongenitális tremor (Stevenson és mtsai., 2001, Choi és mtsai., 2002a).

A PCV2 oktani szerepe a PMWS, a PRDC, a reprodukív rendellenességek és a PDNS egyes esetei kivételével az egyes kórképekben nem minden esetben bizonyított. A vírus jelenléte azonban azt jelzi, hogy ha önállóan talán nem is, de társfertőzősként részt vehet az adott kórkép kialakításában.

A PMWS észak-amerikai megjelenése után sorra bukkant fel Európa és Ázsia országaiban, mára gyakorlatilag mindenütt, ahol sertéstartással foglalkoznak. Észak-Amerikában azonban a PMWS mellett megjelent a PRDC kórkép is, és ott az előfordulása gyakoribbá vált, mint a PMWS kórképé. Ezzel szemben Európában - így nálunk is, és tőlünk keletebbre is - a PCVD-k közül a PMWS dominál. Az Európa nyugati felén elindult PCV járvány folyamatosan terjedt és terjed ma is keleti irányba. A járvány az elmúlt években érte el Lengyelországot, Ukrajnát, Romániát, Szlovákiát és Horvátországot, amely országokban a diagnosztizált PCVD esetek száma még lényegesen alacsonyabb a tőlük nyugatabbra fekvő államokban előforduló esetek számánál. Jelenleg tehát az európai járványtani kép nem egységes, a nyugati területeken a fertőzés enzociássá vált, míg keleti irányba haladva a járvány terjedése tapasztalható. A járványtani kép mellett a kórképben is vannak eltérések a nyugati és keleti helyzetet tekintve. Míg nyugaton egyre gyakrabban jelentkezik a betegség a klasszikusnak tekintett PMWS mellett, attól eltérően, PRDC

formában, addig kelet felé haladva, ahol a járvány még aktívan terjed, továbbra is a PMWS forma dominál. A kórokozó időközben átjutott a vaddisznó populációba is, ami egy esetleges jövőbeni mentesítés lehetőségeit erősen korlátozza, de ha mentesítési programok nem is indulnak el, állandó veszélyforrást fognak jelenteni azokon a területeken, ahol a járvány már lecsillapodott.

2. Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja az volt, hogy a PCV2 járványtanához szolgáltatassunk újabb adatokat. Ezt a következő feladatok elvégzése révén kívántuk elérni:

1. A hazai vaddisznó állomány PCV fertőzöttségének felmérése.
2. A hazai és a közép-kelet európai helyzet megismerése.
3. A rágsálók esetleges PCV2 hordozó és ürítő szerepének vizsgálata.
4. Egy hatékony PCV2 vakcina előállítására alkalmas vírustörzs létrehozása és jellemzése.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A sertés circovírusok járványtana

3.1.1 Rendszertan, történet, előfordulás

A sertés circovírusok (porcine circovirus, PCV) a galamb circovírussal (pigeon circovirus), a kanári circovírussal (canary circovirus), a lúd circovírusával (goose circovirus), a kacsacircovírussal (duck circovirus), a holló circovírussal (raven circovirus), a sirály circovírussal (gull circovirus), a seregély circovírussal (starling circovirus) és a papagájfélékben a csőr- és a tollképződés zavarával járó betegséget okozó vírussal (psittacine beak and feather disease virus, BFDV) együtt a *Circoviridae* családba, a *Circovirus* *genusba* tartoznak. Az egyszálú DNS genom mérete 1,7 (PCV) és 2,5 (BFDV) kilobázis között változik. Szekvencia-sajátosságai és a vírus replikációban megnyilvánuló tulajdonságai alapján a csirkék fertőző anaemiáját okozó vírust (chicken anaemia virus) a *Circoviridae* családon belül a *Gyrovirus* *genusba* sorolták.

A circovírusok a jelenleg ismert legkisebb állati eredetű vírusok közé tartoznak. A vírusszalád elnevezése a vírusgenom körkörös volta utal.

A sertés circovírusoknak két típusa ismert: az egyes típusú sertés circovírus (porcine circovirus 1, PCV1) és a kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus 2, PCV2).

A PCV1 apatogén, megbetegedést nem okoz, először 1974-ben, Németországban PK-15 sejtenyészetben írták le (Tischer és mtsai., 1974, Tischer és mtsai., 1982). PCV1-et a PK-15 sejtvonalon kívül vakcinából (Quintana és mtsai., 2006) és a szövetenyésztéshez általánosan használt tripszin készítményekből is kimutatták (Fenaux és mtsai., 2004). Polimeráz láncreakcióval (polymerase chain reaction, PCR) végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a PCV1 sertésekben is előfordul (Ellis és mtsai., 2000, Calsamiglia és mtsai., 2002). Szerológiai felmérések szerint a PCV1 megtalálható Kanadában (Magar és mtsai., 2000a), Belgiumban (Labarque és mtsai., 2000) házisertésekben és Németországban vadon élő sertésekben is (Tischer és mtsai., 1995, 1986).

A kettes típusú sertés circovírus (PCV2) patogén, a leggyakoribb PCV2-nek tulajdonított kórkép a választott malacok circovírus okozta sorvadása (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS). A PMWS-t először 1991-ben írták le Kanadában (Harding és Clark, 1996), ezt követően a kórképet a világon több helyen is azonosították és a vírust kimutatták (1. táblázat).

1. táblázat. A PCV2 első publikálása.

Ország	Publikálás éve	Szerzők
Kanada	1996	Harding és Clark
Amerikai Egyesült Államok	1998	Kiupel és mtsai.
Észak-Írország	1998	Kennedy és mtsai.
Franciaország	1998	Allan és mtsai.
Írország	1998	Spillane és mtsai.
Dánia	1999	Allan és mtsai.
Japán	1999	Onuki és mtsai.
Kína	1999	Choi és Chae
Spanyolország	1999	Plana-Duran és mtsai.
Taiwan	1999	Yang és mtsai.
Belgium	2000	Labarque és mtsai.
Hollandia	2000	Wellenberg és mtsai.
Korea	2000	Choi és mtsai.
Magyarország	2000	Kiss és mtsai.
Németország	2000	Mankertz és mtsai.
Skócia	2000	Thomson és mtsai.
Mexikó	2001	Trujano és mtsai.
Olaszország	2001	Terregino és mtsai.
Svájc	2001	Borel és mtsai.
Argentína	2002	Sarradell és mtsai.
Csehország	2002	Celera és Carasova
Görögország	2002	Saoulidis és mtsai.
Thaiföld	2002	Kiatipattanasakul és mtsai.
Venezuela	2003	Cano és mtsai.
Brazília	2004	Castro és mtsai.
Bulgária	2004	Motovski és Segalés
Dél-Afrika	2004	Drew és mtsai.
Fülöp-szigetek	2004	Maldonado és mtsai.
Horvátország	2004	Jemersic és mtsai.
Svédország	2004	Wallgren és mtsai.
Szlovénia	2004	Toplak és mtsai.
Taiwan	2004	Wang és mtsai.
Ausztrália	2005	Muhling és mtsai.
India	2005	Saikumar és mtsai.
Új-Zéland	2005	Garkavenko és mtsai.
Oroszország	2007	Shcherbakov és mtsai.
Ukrajna	2007	Shcherbakov és mtsai.
Chile	2007	Noriega és mtsai.

Bár a PMWS megjelenése járványos méreteket csak az utóbbi 10 évben öltött, retrospektív vizsgálatok szerint a kórokozó már hosszabb ideje jelen lehet a sertésállományokban. Így PCV2 specifikus ellenanyagot 1969-ből származó belgiumi szérummintákból is kimutattak (Sanchez és mtsai., 2001a), illetve 1986-ban spanyol, PMWS tüneteit mutató (utólag azonosítva) sertésből származó szövetmintából szintén kimutattak PCV2 nukleinsavat *in situ* hybridizációs módszerrel (Rosell és mtsai., 2000b, Rodriguez-Arrioja és mtsai., 2003). Angliai mintákból polimeráz

láncreakcióval és immunhisztokémiai módszerrel az 1970-es évekig visszamenőleg sikerült a PCV2 jelenlétét igazolni (Grierson és mtsai., 2004a, Staebler és mtsai., 2005). PCV2 antigént mutattak ki 1990-ből származó hokkaidoi (Japán) mintákból, az azt megelőzően gyűjtött mintákból azonban nem (Sato és mtsai., 2000). Dán kutatók (Dupont és mtsai., 2008) 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó mintákból is ki tudtak mutatni PCV2-t, és meghatározták ezeknek a vírusoknak a teljes szekvenciáját is. Svédországban 1993-ból származó mintákból mutattak ki PCV2-t (Wallgren és mtsai., 2007), Ausztráliában pedig 1995-ből származó szérumminták 80 %-ában találtak PCV2 specifikus ellenanyagokat (Finlaison és mtsai., 2007).

Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a PCV2 jelen volt a sertés populációkban, de a PMWS kórkép ritkábban fordult elő (Rosell és mtsai., 2000b), és a betegség jellegtelen tüneteit esetleg más kórokozónak tulajdonították, mint pl. sertés parvovírusnak (porcine parvovirus, PPV) vagy PRRS vírusnak (porcine respiratory and reproductive syndrome virus, PRRSV). Ez magyarázatot adhat arra, miért csak 1991-ben írták le külön kórképként a PMWS-t (Segalés és Domingo, 2002).

A PCV2-nek két genotípusa ismert. A két genotípus megkülönböztetése céljából különféle elnevezések alakultak ki a szakirodalomban. Olvera és mtsai. (2007), valamint Grau-Roma és mtsai. (2008) 1. és 2. genotípusnak, Carman és mtsai. (2006) 321 és 422-nek, de Boisseson és mtsai. (2004), valamint Shuai és mtsai. (2007) I és II-nek, Timmusk és mtsai. (2008) SG1, SG2, SG3-nak, Cheung és mtsai. (2007), valamint Dupont és mtsai. (2008) 1. és 2. csoportnak, Castro és mtsai. (2007), valamint Hesse és mtsai. (2008) PCV2A és PCV2B-nek nevezik a két genotípust. Egységes nevezéktan hiányában mi a továbbiakban az 1768 bázis hosszúságú genomot, mivel ezt írták le korábban, PCV2A genotípusnak, az 1767 bázis hosszúságú genomot pedig PCV2B genotípusnak nevezzük.

A Kanadában elsőként izolált szekvencia a PCV2A genotípusba tartozott. Kanadában és az Amerikai Egyesült Államokban 2004-ig kizárólag a PCV2A genotípusba tartozó vírusok voltak kimutathatók. Kanadában 2004 decemberétől a PCVD esetek száma jelentős emelkedést mutatott, (Carman és mtsai., 2006). Az Egyesült Államokban 2005 második felében kezdett emelkedni a PCVD esetek száma (Cheung és mtsai., 2007). A PCV2 járvány újbóli fellángolásának hátterében az észak-amerikai kontinensen a PCV2B genotípus terjedése áll (Carman és mtsai., 2006, Gagnon és mtsai., 2007, Cheung és mtsai., 2007).

Az első PMWS leírást követően Nyugat-Európa számos országában állapították meg a kórképet, első között Franciaországban, Észak-Írországban, Spanyolországban és Németországban (Allan és mtsai., 1998, 1999a, Meehan és mtsai., 1998, Mankertz és mtsai., 2000). Dániában 2001-ben, Svédországban 2003-ban diagnosztizálták az első eseteket, bár mindkét országban a kórkép megjelenése előtt is jelen volt a vírus (Vigre és mtsai., 2005,

Wallgren és mtsai., 2007, Dupont és mtsai., 2008). Európában először 1998-ban szekvenálták meg a PCV2 teljes genomját (Meehan és mtsai., 1998). Ez a vírus a PCV2B genotípusba tartozott, de már a 2000-es évek előtt jelen volt a PCV2A genotípus is, sőt, a PCV2A genotípusba tartozó szekvenciákat gyakrabban lehetett kimutatni a fertőzött és különböző PCVD tüneteit mutató sertésekből, mint a PCV2B genotípust (Mankertz és mtsai., 2000, Wallgren és mtsai., 2007, Dupont és mtsai., 2008). Nyugat-Európában 2003-2004 körül jelentős változás következett be a két genotípus arányában, ugyanis a fertőzött sertésekből ettől kezdve döntően a PCV2B genotípusba tartozó szekvenciák mutathatók ki, jelentősen háttérbe szorítva a PCV2A genotípust (de Boisseson és mtsai., 2004, Dupont és mtsai., 2008).

A PMWS-t Magyarországon először 1999 decemberében egy Hajdú-Bihar megyei sertésállományban állapították meg a Debreceni Állategészség-ügyi Intézet munkatársai (Kiss és mtsai., 2000). Ezt megelőzően is történtek kísérletek a kórokozó kimutatására, sikertelenül (Kecskeméti és mtsai., 1999). Az első hazai leírást követően a PCV2 rövid idő alatt országszerte elterjedt, mára csaknem valamennyi nagyüzemi sertésállományban jelen van, jelentős gazdasági károkat okozva. Ekkor már hazánkban is jelen volt mindkét genotípus (saját, nem publikált adat), de egy 2003-ban végzett vizsgálat alapján Magyarországon is a PCV2A genotípus volt elterjedtebb (Dán és mtsai., 2003). A 2000-es évek első feléből, Közép-Kelet Európából, Magyarországon kívül csak Ausztriából származó szekvenciák érhetőek el GenBank-ban (www.ncbi.nlm.nih.gov, Exel és mtsai., 2003 nem publikált adat). A közzétett szekvenciák alapján Ausztriában is a magyarországihoz hasonló arányban fordult elő a két genotípus 2003-ban.

Ázsiában, Taiwanon 1999-ben szekvenálták az első PCV2 szekvenciákat (GenBank-i adat, AF154679, AF166528), az első ázsiai PMWS-ről pedig Japánból számoltak be (Onuki és mtsai., 1999). Ott 2003-ig a PCV2A genotípus dominált, de 2004-re a PCV2B genotípust lehetett kimutatni abban az állományban, ahol korábban a másik volt jelen (Takahagi és mtsai., 2008). Kínában, Koreában és Taiwanon a sertésállományok többsége már a 2000-es évek elején is fertőzött volt PCV2-vel. Már ekkor is a PCV2B genotípust lehetett kimutatni a vizsgált állatok többségéből, de a PCV2A genotípus is jelen volt (Wen és mtsai., 2005, Zhou és mtsai., 2006, An és mtsai., 2007, Shuai és mtsai., 2007).

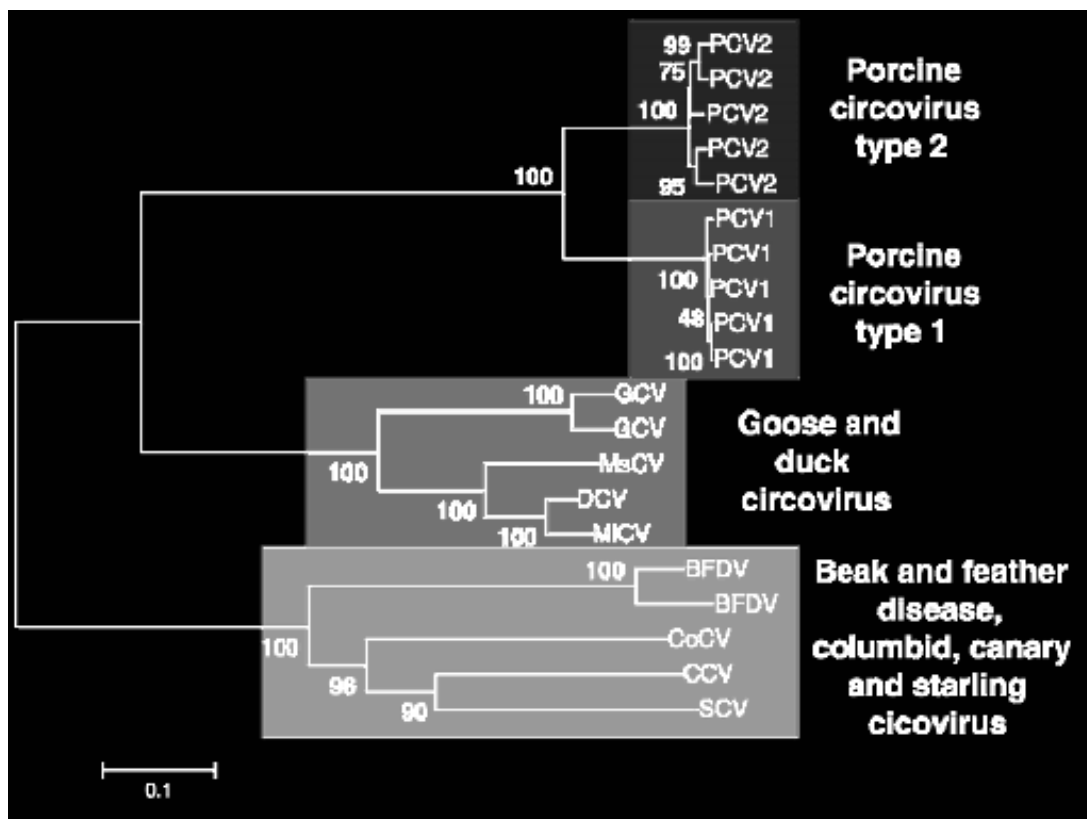
Dél-Amerikában 2001 óta jelen van mindkét genotípus. A minták 2,2 %-ából mutattak ki PCV2-t, amelyek többsége a PCV2B genotípusba tartozott (Sarradell és mtsai., 2002, Castro és mtsai., 2004, 2007).

Ausztráliában az 1995 - 2003 közötti időszakból származó vérsavók 75 - 87,8 %-ából mutattak ki a PCV2-vel reagáló ellenanyagot (Finlaison és mtsai., 2007). Ausztráliában csak a PCV2A genotípusba tartozó szekvenciák vannak jelen ma is, és PMWS kórformát eddig nem

diagnosztizáltak, csak PDNS-t (Muhling és mtsai., 2006, Finlaison és mtsai., 2007).

A sertés circovírusok megjelentek a vaddisznó állományokban is. Szerológiai vizsgálatok alapján az 1999 és 2005 között csehországi vaddisznókból gyűjtött minták 43 %-ából (Sedlak és mtsai., 2008), 2000 és 2003 között spanyolországi vaddisznókból gyűjtött szérumminták 48 %-ából (Vicente és mtsai., 2004) mutattak ki PCV2-vel reagáló antitesteket. Nem csak ellenanyagot, de magát a vírust is kimutatták vaddisznókból. A PCV2 vadonélő és tenyésztett vaddisznókat is képes megbetegíteni, a tünetek, kórbonctani és kórszövettani elváltozások megegyeztek a házi sertésekben PMWS esetén megfigyelttel (Schulze és mtsai., 2003, Ellis és mtsai., 2003, Vicente és mtsai., 2004, Lipej és mtsai., 2007).

Ahogy a fentiekből kitűnik, a PCV2 már a PMWS első kanadai leírása után a Föld szinte minden térségében jelen volt. Kérdéses, hogy honnan származhatnak a mai sertés circovírusok. Jelen ismereteink szerint a sertés circovírus az egyetlen circovírus, amely emlősállatban képes szaporodni, valamennyi már ismert circovírus madaraktól származik. Olvera és mtsai. (2007) szerint a PCV1 és a PCV2 mindkét genotípusa egy közös ősrre vezethető vissza és a sertés circovírusok jól elkülönülnek a különböző madár circovírusoktól (1. ábra).



1. ábra. A circovírus nemzetségbe tartozó vírusok alapján készült filogenetikai fa (Olvera és mtsai. 2007).

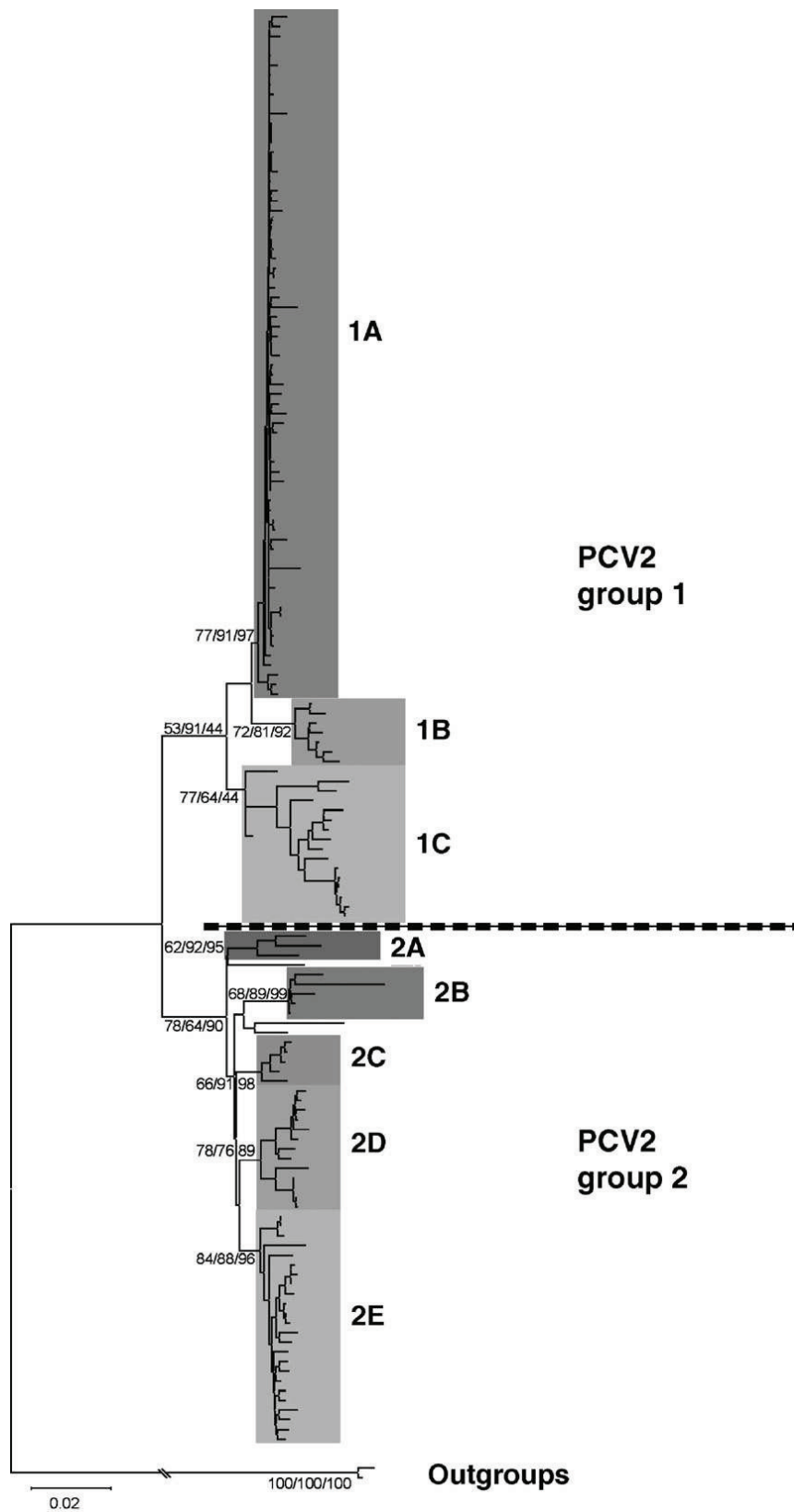
Filogenetikai elemzések alapján a PCV2A és PCV2B genotípus egymástól jól elkülönül. A PCV2A és PCV2B genotípusokon belül a vírusok további csoportokra oszthatók. Az egyik legrészletesebb elemzést Oliveira és mtsai. (2007) végezték. A PCV2B genotípust (PCV2 group 1-nek nevezték) 1A, 1B és 1C csoportokra osztották, a PCV2A genotípusba tartozó szekvenciákat (PCV2 group 2-nek nevezték) pedig 2A, 2B, 2C, 2D és 2E csoportokba sorolták (2. ábra). Vizsgálataik szerint a teljes genom és a kapszid gén elemzése alapján nem volt különbség a vírusok csoportosulásában, de a replikációs fehérjét kódoló gén alapján végzett analízis ezektől némileg eltérő eredményt adott. Mivel az egyes PCV2 szekvenciák között a legtöbb eltérés a kapszid fehérjét kódoló szakaszon fordul elő, a filogenetikai elemzéseket sokszor csak erre a szakaszra alapozva végzik (An és mtsai., 2007, Castro és mtsai., 2007, Shuai és mtsai., 2007, Choi és Chae, 2008, Yang és mtsai., 2008).

A GenBank-ban közzétett adatok alapján megfigyelhető, hogy 2003 után a PCV2B genotípus sokkal gyakrabban mutatható ki a sertésekből, mint a PCV2A genotípus (Oliveira és mtsai., 2007). Hogy miért terjed gyorsan a PCV2B genotípus, egyelőre nem ismert. Egyes vélemények szerint ez azért lehetséges, mert a PCV2B genotípus patogénebb, mint a PCV2A genotípus (Opriessnig és mtsai., 2006, Cheung és mtsai., 2007, Woodbine és mtsai., 2007, Grau-Roma és mtsai., 2008, Timmusk és mtsai., 2008). Más tanulmányok azonban nem találtak patogenitásbeli különbséget a két genotípus között (Pogranichniy és mtsai., 2002, Laroche és mtsai., 2002, 2003, de Boisseson és mtsai., 2004, Grierson és mtsai., 2004b, Castro és mtsai., 2007). Ennek kétséget kizáró bizonyítása további vizsgálatokat igényel, mint ahogy azt is tovább kell vizsgálni, miért terjed még ma is sokkal gyorsabban a PCV2B genotípus a PCV2A genotípusnál.

3.2. A sertés circovírusok jellemzése

A sertés circovírus virionja 17 nm átmérőjű, köbös szimmetriájú, burka nincs. A kapszid T=1 szimmetriájú, 12 pentamerből épül fel, amely pentamerek egyenként 60 fehérje alegységből állnak (Crowther és mtsai., 2003).

A virion igen ellenálló a fertőtlenítő szerekkel szemben, mivel burka nincs, a zsíroló szerek, mint a kloroform, hatástalanok. A pH 3-as kémhatásnak és 70°C-nak is ellenáll (Allan és mtsai., 1994). Egyes oxidálószerekkel (kálium peroximonoszulfát), lúgokkal (nátrium-hidroxid) szemben kevésbé ellenálló laboratóriumi körülmények között, de telepeken nem lehet a fertőtlenítő szereknek optimális körülményeket biztosítani (Royer és mtsai., 2001).

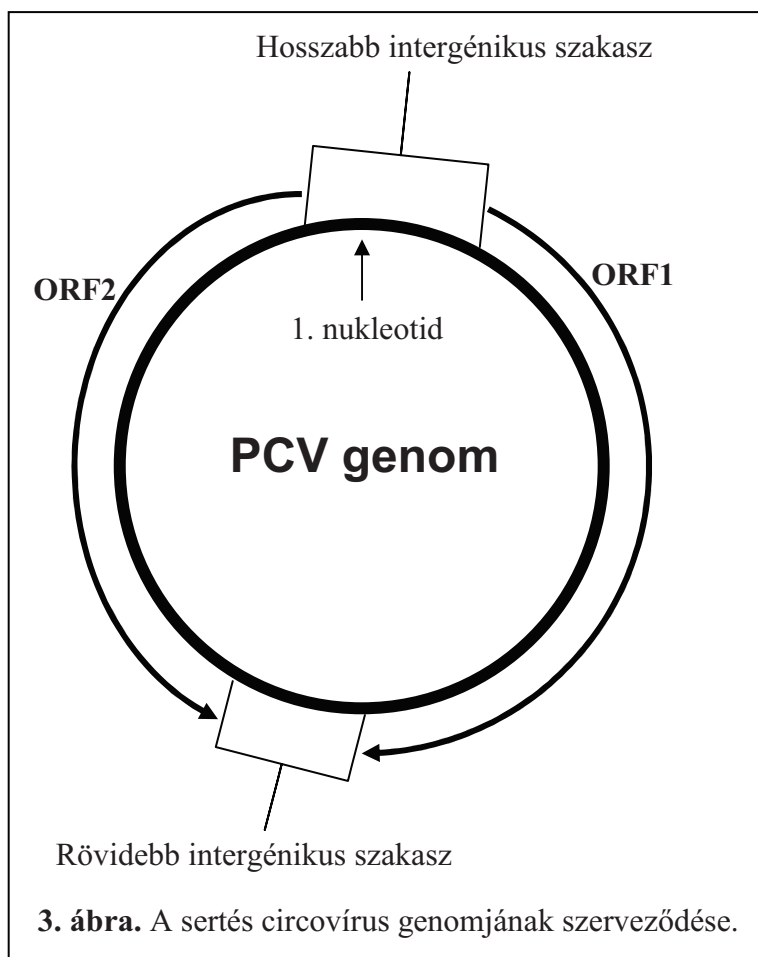


2. ábra. A kettős típusú sertés circovírusok filogenetikai elemzése Oliveira és mtsai. (2007) szerint (magyarázat a szövegben).

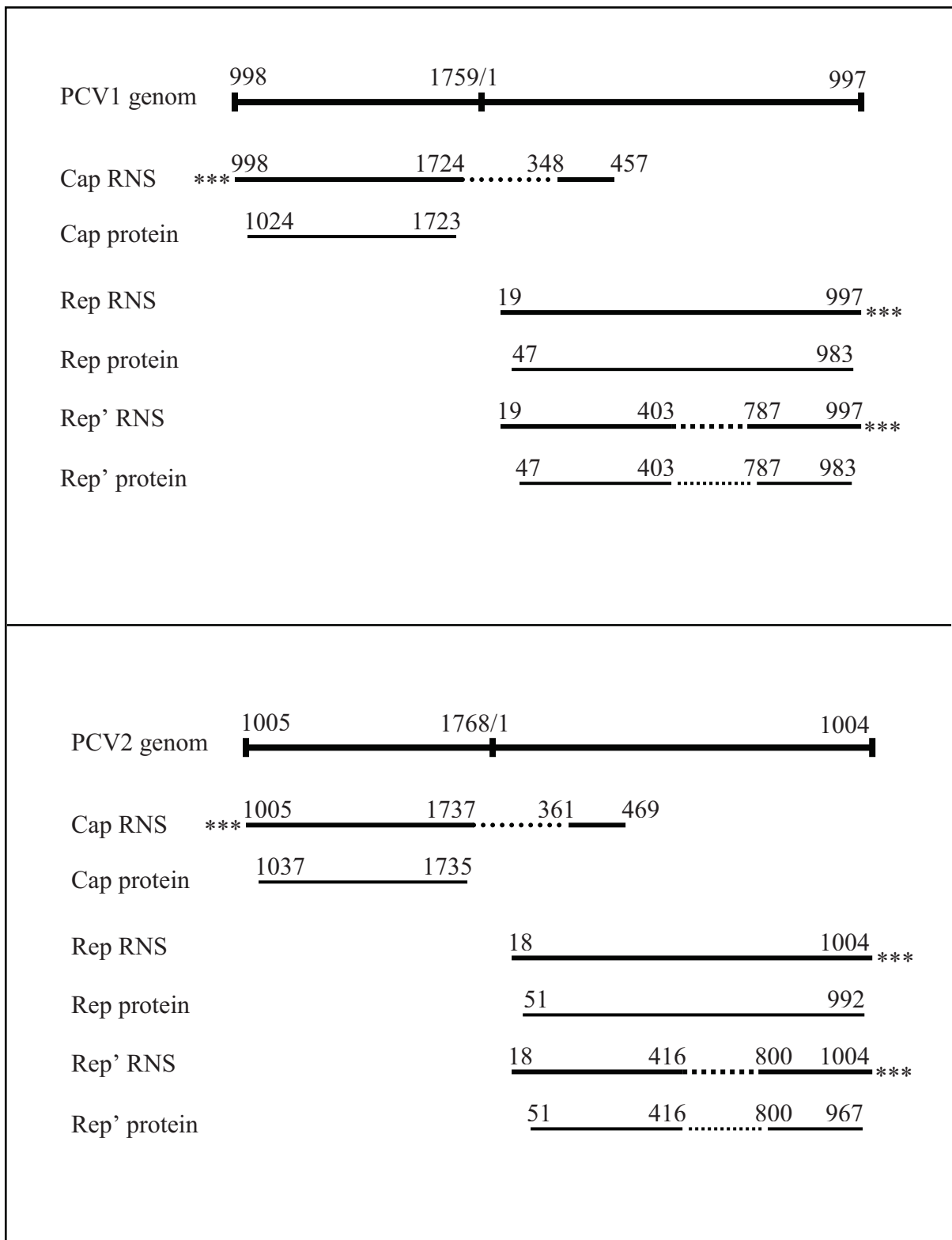
3.2.1. A vírus szaporodása

3.2.1.1. A sertés circovírusok genomjának szerveződése

PCV1 és PCV2 genom organizációja nagymértékben hasonlít a növényi circovírusokéhoz (Meehan és mtsai., 1997). A sertés circovírusok genomja körkörös (3. ábra). A PCV1 teljes genomja 1759 bázisból áll. A PCV2B genotípus 1767, a PCV2A genotípus 1768 bázisból épül fel. A sertés circovírusok genomjában két fő nyílt olvasási keret (open reading frame, ORF) található. A nagyobb az ORF1-nek nevezett gén (Rep gén), a vírus-nukleinsav megsokszorozásáért felelős fehérjét kódolja (Rep, Rep' proteinek), és a pozitív szálon található, amíg a komplementer szálon található kisebb gén (Cap gén), az ORF2, a kapszid fehérjét kódolja (Hamel, 1998, Meehan és mtsai., 1998, Morozov és mtsai., 1998).



A két ORF között két intergénikus szakasz van. A hosszabb intergénikus szakaszon a nukleinsav megsokszorozását irányító genomrészek helyezkednek el (Mankertz és mtsai., 1997). A rövidebb intergénikus szakasz - ahol a két ORF egymással szembe néz - funkciója egyelőre tisztázatlan. A PCV genom organizációját és a potenciális mRNS-ek (messenger RNS) helyeződését a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra. A PCV1 és PCV2 genom szerkezete. A körkörös genom lineáris formában lett feltüntetve. Cap RNS: a kapszid fehérjét kódoló RNS, Cap prot.: kapszid fehérje, Rep RNS: replikációs fehérjét kódoló RNS, Rep prot.: replikációs fehérje, Rep' RNS: a replikációs RNS-ből delécióval képződő RNS, Rep' prot.: a Rep' RNS-ről képződő fehérje, ***: az RNS végén a poli-A-t jelöli, a szaggatott vonal deletálódó részeket jelöl. A számok nukleotid pozícióknak felelnek meg.

A PCV1 genomjáról 12 mRNS (Cheung és Bolin, 2002; Cheung, 2003a,b), a PCV2 genomjáról pedig 9 mRNS képződik (Cheung, 2003a).

Újabb vizsgálatok szerint (Liu és mtsai., 2005, 2006) a sertés circovírusokban létezik egy harmadik nyílt olvasási keret, az ORF3, amelynek szerepe a vírus szempontjából ismeretlen. A szerzők szerint az ORF3 által kódolt fehérjének apoptotikus hatása van, ezért fontos szerepet tulajdonítanak neki a kórfejlődésben. Az ORF3 és az általa kódolt fehérje létezését más tanulmányok nem igazolták (Cheung, 2003a,b,c).

3.2.1.2. Rep és Rep' fehérje

A vírus szaporodásában jelen ismereteink szerint, az RNS molekulák közül csak a Rep és Rep' fehérjéknek van szerepük (Mankertz 1998b, Cheung, 2003c). A Rep' RNS a Rep RNS-ből delécióval jön létre (Mankertz és Hillenbrand, 2002, 4. ábra).

A Rep fehérjéje meglehetősen konzervatív a circovírusokban (Mankertz és mtsai., 1998a). A lánc N-terminális és középső szakasza, más kisméretű DNS vírusokhoz hasonlóan, számos konzervatív elemet tartalmaz (Meehan és mtsai., 1997). Ezek közül háromnak (Motif I, II, III) fontos szerepe van a vírus-DNS gördülő kör mechanizmus (rolling circle replication mechanism, RCR) alapján történő megsokszorozódásában (Ilyina és Koonin, 1992). A Rep fehérje e szakaszait Mankertz és mtsai. (2004) az RCR Rep domain-nek nevezik, amely enzimatis aktivitással rendelkezik. Ez a három szakasz a Rep' fehérjében is megtalálható. Az ezt követő, a fehérje végéig terjedő szakasz a P hurok (P loop), amely a dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) kötéséért felelős. Ez a szakasz feltehetően helikáz aktivitással rendelkezik, ezért Mankertz és mtsai. (2004) ezt a szakaszt Helicase domain-nek nevezik. A P-hurok a Rep' fehérjéről hiányzik.

A Rep és Rep' fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak, feladatuk ellátásához azonban a sejtmagba kell jutniuk. A sejtmagba jutást a fehérjék N-terminális részén (azonos a Rep és Rep' fehérjékben) lévő, bázikus aminosavakban gazdag szakaszok irányítják (nuclear localization signal, NLS, Finsterbusch és mtsai., 2005).

3.2.1.3. Cap fehérje

A Cap RNS a komplementer szálon, PCV1-ben a 457-dik bázistól a 998-dik bázisig tart és a 348-dik és 1724-dik bázis közötti szakasz kivágódik az RNS molekulából. A kapszid fehérje az 1723 -1024 bázis közötti szakaszból képződik és 233 aminosavból áll (4. ábra). PCV2-ben a Cap RNS szintén a komplementer szálról képződik, a 469-dik bázistól az 1005-dik bázisig tart és a

361-dik és 1737-dik bázis közötti szakasz kivágódik az RNS molekulából. A kapszid fehérje a PCV2B genotípusnál az 1734-1036-dik, a PCV2A genotípusnál pedig az 1735-1037-dik bázis közötti szakaszból képződik, és 233 aminosavból áll (Cheung 2003a,b,c, 4. ábra).

A kapszid fehérje N-terminális végén található bázikus aminosavakban gazdag első 41 aminosava felelős azért, hogy a citoplazmában termelődő fehérje bejusson a sejtmagba (nuclear localisation signal, NLS). PCV2-ben a 41 aminosavon belül is a 12-RHRPRSH-18 és 34-HRYRWRRK-41 aminosavak nélkülözhetetlenek a sejtmagba jutáshoz (aláhúzva a bázikus aminosavak, Liu és mtsai., 2001). PCV1-ben a 13-dik helyen H helyett T, a 34-dik helyen H helyett N aminosav van.

PCV1-ben a Cap fehérje sejtmagba jutásáért az első 43 aminosav felelős, ezen belül is a 9-RRRR-12 és 25-RRPYLAHPAFRNRYRWRRK-43 aminosavak (Shuai és mtsai., 2008).

A PCV1 kapszid fehérje szövettenyészetben a fertőzést követő 12-dik órától nagy mennyiségben a sejtmagvacskából mutatható ki, 24 órával a fertőzés után már diffúzan a sejtmagplazmában is megjelenik. 48 órával a fertőzés után a vírus már egyre nagyobb mennyiségben mutatható ki a citoplazmából, és eltűnik a sejtmagvacskából. A kapszid fehérje sejtmagvacskában történő felhalmozódásának biológiai szerepe nem ismert. Elképzelhető, hogy ez a felhalmozódás a fertőzés kezdetén megállítja a sejtet életciklusának S fázisában, és módosítja a sejt saját fehérjéinek képződését. A fertőzés során a kapszid és replikációs fehérjék felhalmozódnak a sejtmagban, amely a vírus-DNS megsokszorozódásának és a virion felépülésének a helye. Végül a vírus-DNS-ből és a kapszomerekből összeálló érett virion kijut a citoplazmába. Ezen feltételezések azonban még további vizsgálatra szorulnak (Fensterbusch és mtsai., 2005).

Mahé és mtsai. (2000), valamint Truong és mtsai. (2001) vizsgálatai szerint (PEPSCAN módszerrel) a kapszid fehérjének telepi körülmények között tartott állatok vérsavóinak vizsgálata alapján három, immunológiai szempontból fontos szakasza van. Az első szakasz a 69-83-dik, a második szakasz a 117-131-dik, a harmadik szakasz a 169-183-dik aminosavak környékén helyezkedik el. Specifikus patogénektől mentes (specific pathogen free, SPF) malacokat immunizálva a 25-39-dik aminosavak közötti fehérje szakasz ellen is képződött ellenanyag. A 25-39-dik és 169-183-dik aminosavak közötti szakaszokat vizsgálva a PCV1 és PCV2 között gyenge immunológiai keresztreakció figyelhető meg (Mahé és mtsai., 2000).

PCV1 és PCV2 kimérésekkel végzett vizsgálatok alapján a PCV2 kapszid fehérjéjének 47-85-dik, 165-200-dik, 230-233-dik aminosavai közé eső szakasza képes reagálni a PCV2 ellen sertésben képződött ellenanyagokkal, míg a 63-85-dik, valamint 165-185-dik aminosav közötti szakasza csak a PCV2 ellen nyúlban képződő ellenanyagokkal reagál (Lekcharoensuk és mtsai., 2004).

3.3. A PCV2-vel kapcsolatban leírt kórképek

3.3.1. PMWS

A választott malacok circovírus okozta sorvadása elnevezésű kórkép a leggyakoribb és egyben felelőse a PCVD-k okozta direkt gazdasági károk többségének.

3.3.1.1. Klinikai tünetek

Fogékony állományokban PMWS-ben a 7-15 hetes korú állatok 5-20 %-a betegszik meg nem specifikus klinikai tünetek között (Harding és mtsai., 1998), amelyek többnyire a választást követő időszakban kezdődnek (innen az elnevezés). Újabb megfigyelések szerint a kórképet egyre gyakrabban észlelik idősebb sertésekben is (Segalés, 2006). Progresszív súlyvesztés mellett szapora, nehezített légzés, köhögés, cianózis, anémia, láz, levertség, bágyadság, étvágytalanság, hasmenés, sárgaság és idegrendszeri tünetek alakul(hat)nak ki. A nyirokcsomók (főleg a lágyéki nyirokcsomók) jelentős mértékben megnagyobbodnak. A kórkép előrehaladtával az állatok a fejlődésben visszamaradnak, szőrzetük durva, fénytelen lesz („csökkent” malacok). Ezekhez a tünetekhez társulnak a szövődmények tünetei is. A kórfejlődés bármely szakaszában hirtelen elhullhatnak a malacok (Harding és mtsai., 1998, Ellis és mtsai., 1998, Harms, 1999).

3.3.1.2. Kórbonctani elváltozások

Kórbonctanilag rossz kondíció mellett a nyirokcsomók (leginkább a lágyéki és bélfodri nyirokcsomók) 3-5-szörös mértékű megnagyobbodása látható. Ezen nyirokcsomók tömött tapintatúak, metszéslapjuk egynemű, fehér, állományukban vérzések, elhalások lehetnek. A tüdő nehéz, nem esik össze, állományában elszórtan sötétvörös lebenyek vannak, a sővények jelentősen megszélesbedtek, bennük savós-kocsonyás beszűrődés látható. A vese tokja alatt szürkés-fehér góccok láthatók, a savós testüregekben nagy mennyiségű, szalmasárga, alvadásra hajlamos folyadék halmozódik fel. A máj sorvadt, tömött tapintatú, lépduzzanat, eperszív, vérfogyottság, sárgaság és gyomorfekély egyaránt kialakulhat. A szövődmények okozta kórbonctani elváltozások szintén megfigyelhetők (Segalés és Domingo, 2002, Rosell és mtsai., 1999, Allan és mtsai., 2000a, Kennedy és mtsai., 2000, Krakowka és mtsai., 2000, Ladekjær-Mikkelsen és mtsai., 2002, Kim és mtsai., 2003a).

3.3.1.3. Kórszöveti elváltozások

Kórszövettanilag a jellemző elváltozások a nyirokszervekben alakulnak ki (Allan és mtsai., 1998, Clark, 1997, Ellis és mtsai., 1998, Kiupel és mtsai., 1998, Rosell és mtsai., 1999). Ezen szervekben a fertőzés elején a perifollikuláris zónában, a B limfocitákat érintve alakul ki limfocita depléció. A folyamat előrehaladtával a T sejtes zónában, a follikulumokra is kiterjed a limfocita depléció, végül a nyirokszervekre jellemző follikuláris szerkezet felismerhetetlenné válik (Sarli és mtsai., 2001, Shibahara és mtsai., 2000). Ezzel egy időben, először a B, majd később a T sejtes zónában is a makrofágok és többmagvú óriássejtek megsaporodása figyelhető meg, bennük bazofil citoplazmazárványok vannak, amelyekből PCV2 mutatható ki (Sarli és mtsai., 2001, Shibahara és mtsai., 2000, Chianini és mtsai., 2003). Az interdigitális és interfollikuláris dentritikus sejtek száma is jelentősen csökken, belőlük is számottevő mennyiségű vírus mutatható ki (Sarli és mtsai., 2001, Shibahara és mtsai., 2000).

A vesében nem gennyes intersticiális nefritisz figyelhető meg, a makrofágokból és a tubuláris sejtekből is kimutatható PCV2. A tüdőben intersticiális tüdővizényő, peribronhiolárisan, perivaszkulárisan a limfoid elemek hiperpláziája, hisztiociták infiltrációja, többmagvú, Langhans-típusú óriássejtek megjelenésével járó intersticiális pneumonia alakul ki. A májban atrófia, nem gennyes kolangiohepatitisz látható. A májsejtekből kevés, amíg a Kupffer sejtekből nagy mennyiségű PCV2 mutatható ki. A bél nyiroktüszőiben szintén limfocita depléció és óriássejtes beszűrődés alakul ki. A lágy agyburokban, a plekszusz korioideuszban, a kis- és nagyagyban perivaszkuláris mononukleáris sejtes infiltráció van, ezen mononukleáris sejtekből szintén PCV2 antigén mutatható ki. A szívbelhártya sejtjeiből és makrofágjaiból is kimutatható a vírus (Kim és mtsai., 2002, Segalés és Domingo, 2002, Chae 2004, Kennedy és mtsai., 2000, Krakowka és mtsai., 2000).

3.3.1.4. Kórfejlődés

A kórfejlődés menete pontosan nem ismert. A kórokozót a fertőzött állatok felköhögött légúti váladékukkal, bélsarukkal, vizeletükkel, spermájukkal, valamint a könnyükkel is ürítik (Shibata és mtsai., 2003, Krakowka és mtsai., 2000, Magar és mtsai., 2000b, Larochele és mtsai., 2000, Caprioli és mtsai., 2006). A kórokozó oronazális úton jut a sertésekbe. Kísérleti állatfertőzések szerint virémia a fertőzést követően 7 nappal még nem, de a 9-dik napra már kialakulhat (Fenaux és mtsai., 2002, Caprioli és mtsai., 2006).

DNS vírusról lévén szó, a PCV2 a sejtmagban szaporodik, de nem tisztázott, hogy a vírus mely sejtekben szaporodik leginkább. A szervezet nagyon sok sejtfeleségéből mutattak ki PCV2

antigént (Sanchez és mtsai., 2003., Kiupel és mtsai., 1999, McNeilly és mtsai., 1999, Rosell és mtsai., 2000c, 1999, Shibahara és mtsai., 2000, Sirinarumitr és mtsai., 2000, Fenaux és mtsai., 2002). Nagy mennyiségű vírus mutatható ki a fagocitotikus aktivitású és antigén bemutatást végző sejtekből, a monocita/makrofág sejtek, dendritikus sejtek és interdigitális dendritikus sejtek citoplazmájából (Allan és mtsai., 2000a,b, Gilpin és mtsai., 2003). A PCV2 felhalmozódása e sejtekben nagy valószínűséggel fagocitózis következménye (Gilpin és mtsai., 2003). Ezen antigén feldolgozásában és az immunfolyamatokban igen fontos szerepet betöltő sejtek nem képesek a vírust megemészteni, feldolgozni, mert a fagoszóma a fagocitózist végző sejtekben nem tud egyesülni a lizoszómával (McCullough, 2006), aminek kulcsszerepe lehet a kórfejlődésben.

Más tanulmányok szerint a monocita/makrofág sejtek, dendritikus sejtek, valamint limfociták magjából is kimutatható PCV2 antigén, igaz csak kis mennyiségben (Rosell és mtsai., 1999, Shibahara és mtsai., 2000, Haruna és mtsai., 2006). Yu és mtsai. (2007a) szerint a stimulált mononuclearis sejtekben, T limfocitákban szaporodik a vírus. *In vivo* vizsgálatok alapján a PCV2 replikációja a fertőzési kapuhoz tartozó nyirokcsomókban (főleg a hörgők körüli nyirokcsomókban) a T és B limfocitákban történik a fertőzés korai szakaszában. A perifériás vér mononukleáris sejtjeiben is képes szaporodni a vírus, de ezeknek a sejteknek a perzisztens fertőzés fenntartásában és a vírus szervezetben belüli terjesztésében van döntő szerepük (Yu és mtsai., 2007b).

Számos tény utal arra, hogy a PMWS kifejlődésében a PCV2 immunszupresszív hatása kulcsszerepet játszik. A nyirokszervekben és a vérképben bekövetkező változások, valamint a fehérvérsejtek által termelt különböző interleukinek, citokinek képződésében (Darwich és mtsai., 2003), az egészséges állapothoz képest bekövetkező eltérés jelzi, hogy az immunrendszer nem képes ellátni megfelelően a feladatát.

A PCV2-vel fertőzött állatokban az immunrendszer működését befolyásoló készítmények, ill. társfertőzések nagymértékben hozzájárulnak a kórkép klinikai megjelenéséhez (Allan és mtsai., 1999b, Krakowka és mtsai. 2000, 2001, Ellis és mtsai., 2000, Kennedy és mtsai., 2000, Allan és mtsai., 2000a, 2001, Harms és mtsai., 2001, Rovira és mtsai., 2002, Kyriakis és mtsai., 2002, Kawashima és mtsai. 2003, Kim és mtsai., 2003a, Opriessnig és mtsai., 2003, 2004a, 2004b Ostanello és mtsai., 2005, Haruna és mtsai., 2006). Az immunszupresszió tényét erősítik a gyakori opportunistá fertőzések is az érintett malacokban (Segalés és Mateu, 2006).

A 5. ábra a PMWS kórfejlődését foglalja össze Darwich és mtsai. (2004) nyomán.

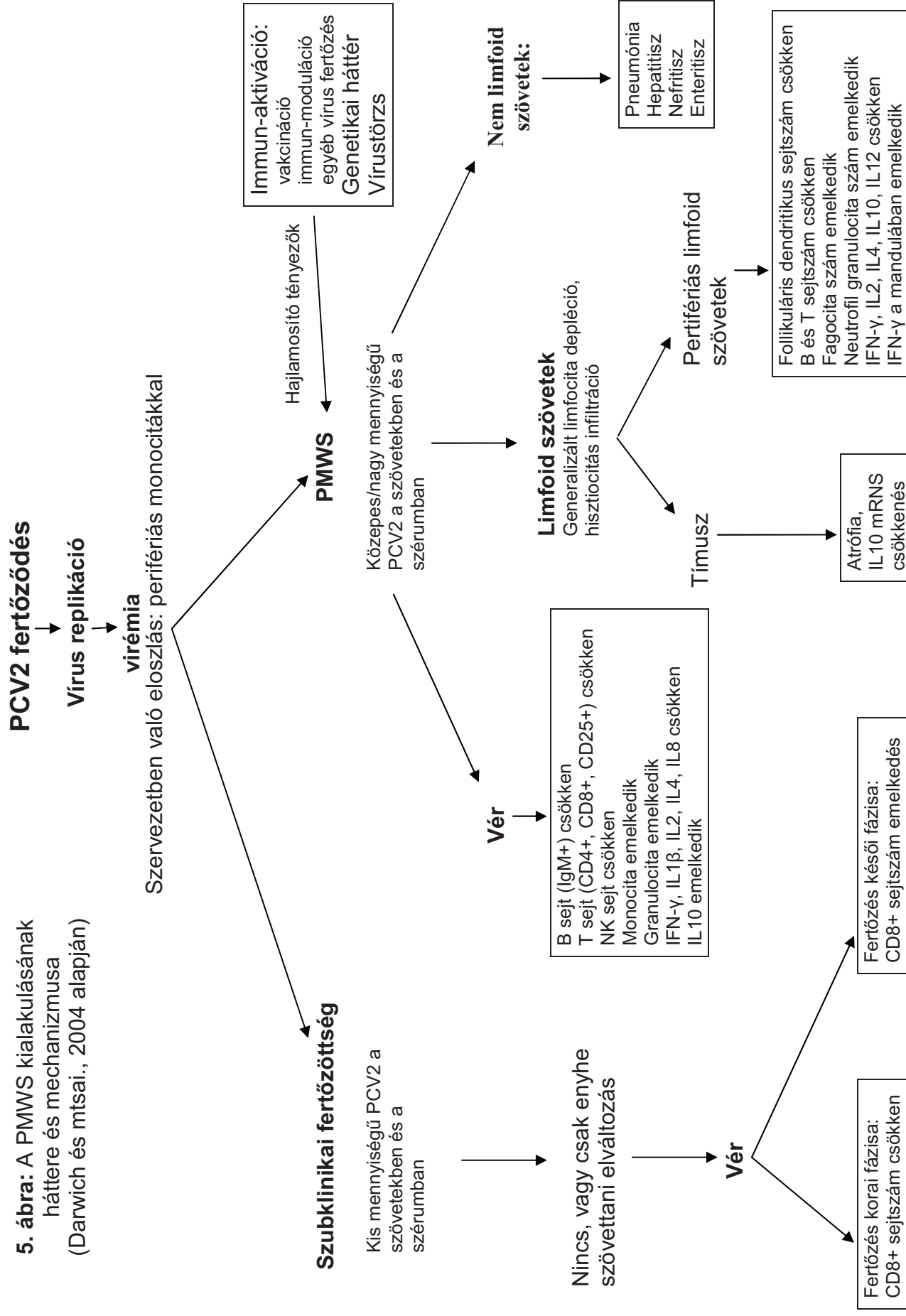
3.3.1.5. Diagnózis

A PMWS diagnózisa a sertésekben akkor megalapozott, ha a következő kritériumok mindegyike teljesül (Sorden, 2000, Segalés és Domingo, 2002):

- a betegségre jellemző klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások kialakultak,
- kórszövettanilag a nyirokszövetekben a karakterisztikus elváltozások szintén kialakultak,
- a PCV2 (antigén vagy nukleinsav) a limfoid léziókból kimutatható.

A kórokozó kimutatása a PMWS diagnózis megállapításához nem elégséges, mivel a PCV2 tünetmentes állatokban is jelen lehet. A diagnózis felállításához a laboratóriumi vizsgálat nélkülözhetetlen. Laborvizsgálat céljából, ha mód van rá, célszerű élő, PMWS klinikai tüneteit mutató állatokat küldeni. Kórszövettani vizsgálatra a nyirokszövet a legalkalmasabb (nyirokcsomó, mandula, csípőbél [Peyer plakk], csecsemőmirigy). Tüdő, lép, vese vagy egyéb szerv nem feltétlenül szükséges a PMWS diagnózis felállításához (Segalés, 2006).

5. ábra: A PMWS kialakulásának háttere és mechanizmusa (Darwich és mtsai., 2004 alapján)



3.3.2. PDNS

A sertések dermatitisz nefropátia kórképe (porcine dermatitis nephropathy syndrome, PDNS) tulajdonképpen egy III. típusú hiperszenzitív reakció, amelyet más kórokozókhoz hasonlóan a PCV2 is kiválthat. A PDNS-t retrospektív vizsgálatok alapján sporadikus formában először Chilében 1974-ben (Morales és Guzman, 1976), majd Nagy-Britanniában 1993-ban írták le (Smith és mtsai., 1993), ezt követően világszerte azonosították ezt a kórképet is.

A PDNS tünetei között a 1,5-4 hónapos korú (Smith és mtsai., 1993, Thibault és mtsai., 1998), 20-65 kg közötti (Done és mtsai., 2001, Duran és mtsai., 1997) sertések betegednek meg. Más adatok szerint 30-100 kg közötti (Wellenberg és mtsai., 2004) sertések is érintettek lehetnek. A megbetegedett állatok több, mint 95 %-a elhullik (Segalés, 2006).

3.3.2.1. Klinikai tünetek

Először a bőrben, főként a hátulsó testfélén a gáttájékon, a lábakon, a has és mellkas alján valamint a füleken multifokális, jól körülhatárolt cirkuláris vérzések bőrelváltozások alakulnak ki, amelyek környezetükből kissé kiemelkednek, sötétvörösek, 1-20 mm átmérőjűek. Röviddel ezt követően sápadtság, étvágytalanság, magas láz, levertség, nehezített légzés, hasmenés, súlyvesztés és a végtagokon ödéma alakul ki (Done és mtsai., 2001, Duran és mtsai., 1997, Wellenberg és mtsai., 2004), idegrendszeri tünetként alkalmanként ataxia, parézis is megfigyelhető (Wellenberg és mtsai., 2004). A tünetek kialakulása után az érintett állatok mintegy 20 %-a hirtelen elhullik.

3.3.2.2. Kórbonctani elváltozások

Jellegzetes kórbonctani és kórszövettani elváltozások főleg a bőrben, a vesékben és a nyirokcsomókban figyelhetők meg, de egyéb szervekben is kialakulhatnak elváltozások (Choi és Chae, 2001, Duran és mtsai., 1997, Thibault és mtsai., 1998, Wellenberg és mtsai., 2004).

A bőrben, bőr alatti kötőszövetben ödéma, vérzések figyelhetők meg. A vesék megnagyobbodottak, a kéregállomány halvány, szürkésbarna színű, benne elszórtan 2-4 mm átmérőjű cirkuláris, petecsiális vérzések illetve szürkésfehér elhalásos gócok láthatók. Generalizált limfadenopátia alakul ki, a nyirokcsomók jelentősen megnagyobbodottak (főleg a lágyéki és vesekapui nyirokcsomók), állományukban ödéma és vérzések láthatók. A tüdőben hurutos bronhopneumónia, ödéma, a gyomorban gyomorfekély, a bélfodorban szintén ödéma, a lépben infarktuszok alakulhatnak ki (Ramos-Vara és mtsai., 1997, Wellenberg és mtsai., 2004).

3.3.2.3. Kórszövettani elváltozások

Kórszövettanilag a bőr hámszövetében fibrinoid nekrozis látható, ugyanis a bőr alatti kötőszövet erei trombotizáltak és körülöttük limfo-hisztociták vaszkulitisz figyelhető meg. A vesében exszudatív glomerulonefritisz, intersticiális nefritisz alakul ki, amely a folyamat előrehaladtával intersticiális fibrózisba megy át. A tubulusok kitágultak, fehérjében gazdag anyaggal teltek. A lép erei szintén trombotizáltak, körülöttük limfo-hisztociták vaszkulitisz van (Choi és Chae, 2001, Choi és mtsai., 2002b, Duran és mtsai., 1997, Ramos-Vara és mtsai., 1997, Wellenberg és mtsai., 2004). A PCV2 által kiváltott PDNS esetén a nyirokcsomókban kórszövettanilag a PMWS-re jellemző elváltozások alakulnak ki.

3.3.2.4. Kórfejlődés

A kórfolyamat egyes szerzők (Sierra és mtsai., 1997, Wellenberg és mtsai., 2004) szerint III. típusú hiperszenzitivitási reakcióként magyarázható, ugyanis a vérsavóban extrém magas PCV2 specifikus ellenanyag szint mérhető, és nagy mennyiségű immunkomplex lerakódás figyelhető meg a veseglomerulusok és az erek alaphártyáján. Ezen immunkomplex legnagyobb részét IgM típusú ellenanyagok alkotják, de IgG1 és IgG2 típusú ellenanyagokkal együtt a komplement rendszer C3-as faktora is nagy mennyiségben mutatható ki immunhisztokémiai módszerekkel a glomerulusokból és a trombotizált erek környezetéből. Az immunkomplex kialakításában résztvevő anyagok lényegesen magasabb titerben vannak jelen a PDNS tüneteit mutató állatokban, mint PMWS tüneteit mutató vagy PCV2-vel fertőzött, de tünetmentes állatokban (Wellenberg és mtsai., 2004). Immunkomplex lerakódást és magas ellenanyag szinteket más szerzők is megfigyeltek PDNS tüneteit mutató állatokban (Sierra és mtsai., 1997, Thibault és mtsai., 1998, Molnár és mtsai., 2002). A kórfolyamatban a humorális immunválasz mellett a celluláris immunválasznak is jelentős szerepe lehet, mivel Wellenbergék (2004) a vesében a citotoxikus sejtek számának emelkedését figyelték meg, így a kórfolyamat szerintük nagymértékben hasonlít a nyércek Aleuti betegségéhez.

PCV2 kisebb mennyiségben mutatható ki PDNS tüneteit mutató sertés nyirokszerveiből, mint PMWS tüneteit mutató sertésekből. Sok esetben a kórbonctanilag, kórszövettanilag érintett szervekből nem, vagy csak kis mennyiségű vírus mutatható ki PDNS esetén (Wellenberg és mtsai., 2004). Társfertőzések, mint PRRSV, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus* ssp., stb. szintén kimutatható PDNS tüneteit mutató sertésekből (Segalés és mtsai., 1998, Thibault és mtsai., 1998 Lainson és mtsai., 2002, Thomson és mtsai., 2001, Sierra és mtsai., 1997, Choi és Chae, 2001).

3.3.2.5. *Diagnózis*

A PDNS általában olyan állományban fordul elő, ahol PMWS is jelen van (de nem minden esetben van jelen PMWS!). Az esetek több mint 50-60 %-ában a nyirokcsomókban a PMWS-hez hasonló kórbonctani és kórszövettani elváltozás alakul ki. A PDNS diagnózis felállításának Segalés szerint két kritériuma van (Segalés, 2006):

1. Jellegzetes kórbonctani elváltozások, úgy, mint
 - bőrinfarktuszok
 - magnagyobbodott vese, a felületén petecsiális vérzésekkel.
2. Jellegzetes kórszövettani elváltozások, úgy, mint
 - szisztémás elhalásos vaszkulitisz,
 - nagy mennyiségű fibrinkiválással járó glomerulonefritisz.

Segalés (2006) szerint a vírus kimutatása nem nélkülözhetetlen a PDNS megállapításához. A hasonló tünetekkel jelentkező akut és szubakut klasszikus sertéspestistől illetve afrikai sertéspestistől való elkülönítés jelenti a legnagyobb problémát.

3.3.3. **Reproduktív rendellenességek**

A PCV2-t szaporobásbiológiai rendellenességekkel is kapcsolatba hozzák. Az első leírás (a PMWS-hez hasonlóan) szintén Kanadában történt (West és mtsai., 1999), a vemhesség késői szakaszában vetélt, valamint halva született malacokból mutatták ki a vírust. A második leírás Dániában történt (Ladekjaer-Mikkelsen és mtsai., 2001), ahol egy SPF állományban 1 mumifikált, 8, a vemhesség késői szakaszában elvetélt magzattól és 1 halva született malacból mutattak ki PCV2-t.

Természetes és kísérleti körülmények között szintén leírtak reproduktív rendellenességeket (Johnson és mtsai., 2002, Sanchez és mtsai., 2001b, 2003, Yoon és mtsai., 2004, Pensaert és mtsai., 2004, Park és mtsai., 2005).

A PCV2 át tud jutni a placentán (Kim és mtsai., 2004, Pensaert és mtsai., 2004, Park és mtsai., 2005) és abban szaporodni is képes (Mateusen és mtsai., 2007). Sanchez és mtsai. (2001b) szerint a méhen belül magzatról magzatra nem terjedt a vírus. Pensaert és mtsai. (2004) vizsgálatai azonban azt bizonyítják, hogy a vírus képes méhen belül a szomszédos magzatokra átterjedni.

A magzati élet során PCV2-t mutattak ki a szívizomsejtekből, májsejtekből és a makrofágokból, az életkor előrehaladtával csökkent a vírussal fertőzött sejtek száma. A szívizomsejtek a magzati élet során a vírus fő célpontjai (Sanchez és mtsai., 2003).

A PCV2 kimutatható a női nemi szerv teljes hosszából (Bielanski és mtsai., 2004). A petesejtet, illetve embriót körülvevő zona pellucidán a PCV2 nem jut át (Bielanski és mtsai., 2004, Mateusen és mtsai., 2004), de a felületéről kimutatható a vírus (Mateusen és mtsai., 2004). A kanok a spermával szintén terjeszthetik a kórokozót (Larochelle és mtsai., 2000, Kim és mtsai., 2001, 2003c). A női nemi traktusba bejutott vírus képes megfertőzni az embriót, aminek következménye embrió elhalás, visszaivarzás, illetve vetélés lehet (Mateusen és mtsai., 2007).

A magzati immunkompetencia kialakulása előtt, azaz a vemhesség 70-dik napja előtt fertőződött kocákban alakulnak ki súlyosabb magzatkárosodások (magzatelhalás, mumifikáció, vetélés). A 70-dik nap után a magzat immunrendszere már reagál a fertőzésre, de szaporodásbiológiai rendellenességek, ha kisebb mértékben is, azért kialakulnak (Sanchez és mtsai., 2001b, Kim és mtsai., 2004, Pensaert és mtsai., 2004). Telepi körülmények között a PCV2 nem jelent súlyos szaporodásbiológiai problémát, valószínűleg azért, mert a kocák a vírus széleskörű elterjedtsége miatt immunológiailag áthangolódtak. Ezt alátámasztja az a vizsgálat is, ahol 100 vetélésből származó 293 minta vizsgálata során mindössze 1 esetben tudtak PCV2-t kimutatni (Maldonado és mtsai., 2005).

A diagnózist a következő kritériumok alapján lehet felállítani (West és mtsai., 1999, Segalés, 2006):

- a vemhesség késői szakaszában jelentkezik vetélés vagy halva született magzatok jönnek világra, amelyekben a szív megnagyobbodott,
- a szívben kórszövettanilag kiterjedt fibrózis és/vagy elhalásos szívizomgyulladás van,
- nagy mennyiségű vírus mutatható ki a szívizomból és egyéb magzati szövetekből.

3.3.4. Sertések légzőszervi tünetegyüttese (porcine respiratory disease complex, PRDC)

A sertések légzőszervi tünetegyüttese a 16-22 hetes sertések betegsége. Észak-Amerikában mára ez a kórkép gyakoribbá vált a PMWS-nél. A PRDC kialakításában PCV2 mellett más kórokozók is részt vesznek, mint PRRSV, sertés influenza vírus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* és *Pasteurella multocida* (Halbur, 1998, Thacker, 2001, Kim és mtsai., 2003b). Egyes szerzők szerint a PCV2 szükséges résztvevője a PRDC kialakulásának (Ellis és mtsai., 1999, Kim és mtsai., 2003b). A tünetek jellegtelenekek. Klinikailag lassú növekedés, csökkent takarmány értékesítés, láz, levertség, étvágytalanság, köhögés és nehezített légzés jellemzi (Halbur, 1998, Thacker, 2001). Kórszövettanilag intersticiális pneumonia, valamint peribronhiális, peribronhioláris fibrózis alakul ki. Az alveoláris sövényekben a

makrofágok és kisebb mértékben a limfociták és plazmasejtek száma is megszorodik (Kim és mtsai., 2003b).

Kim és munkatársai (2003b) szerint a PRDC diagnózis a következő szempontok alapján állítható fel:

- antibiotikum kezelésre nem reagáló légzőszervi tünetek,
- a tüdőben kialakuló kórszövettani elváltozások,
- az elváltozásokból kimutatható PCV2 és
- limfoid szövetekben a PMWS-re jellemző kórbonctani és kórszövettani elváltozások

hiánya, e négy kritérium együttes megléte szükséges.

3.3.5. PCV2-vel kapcsolatban leírt egyéb kórképek

A PCV2 szerepe a congenitalis tremor (CT) kialakulásában vitatott. PCV2 nukleinsavat és antigént sikerült kimutatni a központi idegrendszerből *in situ* hybridizációs módszerrel, indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel (IIF) és polimeráz láncreakcióval a CT tüneteit mutató malacokból (Stevenson és mtsai., 2001). Más vizsgálatok azonban cáfolják a setés circovírusok szerepét a CT kialakításában (Kennedy és mtsai., 2003). A kérdés eldöntése további vizsgálatokat igényel.

Az exszudatív epidermitisz kialakulásában a PCV2 szerepe szintén vitatott. A kórkép egyes eseteiben nagy mennyiségben mutatható ki PCV2 és/vagy sertés parvovírus a beteg állatokból, mint feltételezett hajlamosító tényező (Watrang és mtsai., 2002, Kim és Chae, 2004).

3.4. Sertés circovírus előfordulása más fajokban

Nayar és mtsai. (1999) 100 légzőszervi betegségben elhullott szarvasmarha közül 6-nak a tüdejéből, valamint 30 vetélt magzat közül 4-ből mutattak ki PCV2-t, PCR-rel. Egy esetben PCV2 antigént is sikerült kimutatniuk a tüdőből.

Allan és mtsai. (2000c) juhokat fertőztek PCV2-vel, de a kísérletek végéig az állatok tünetmentesek maradtak, kórbonctani, kórszövettani elváltozásokat nem találtak, a kórokozót és PCV2 elleni antitesteket sem sikerült kimutatni. Ebben a tanulmányban 120 ember, 305 szarvasmarha, 120 juh vérsavójából próbálták PCV2 specifikus ellenanyagot kimutatni. A minták összesen 64 észak-ír és francia farmról származtak, sok helyen az állatok szoros kontaktusban voltak PMWS tüneteit mutató sertésekkel, de egyetlen mintából sem sikerült PCV2 specifikus ellenanyagot kimutatni.

Tischer és mtsai. (1995) németországi szarvasmarhából, egerekből és emberekből mutattak ki PCV1 antigénnel reagáló ellenanyagot.

Kiupel mtsai.-val (2001) BALB/c egereket fertőzött PCV2-vel hasüregbe és orron át egyidejűleg. PCV2 elleni ellenanyagot először a 14-dik napon lehetett kimutatni 1:16-os titerbe. Az egereket 7-dik, 14-dik, 28-dik és 42-dik napon extermináltak. A kísérlet végéig az egerek egészségesek maradtak, kórbonctani elváltozás sem volt látható. A nyirokszervekből, májból, veséből egyaránt sikerült PCV2-t kimutatni, minden alkalommal. Kórszövettanilag PMWS-re emlékeztető kórszövettani elváltozásokat, valamint apoptózist találtak.

Quintana és mtsai. (2002) szintén egereket, valamint nyulakat fertőztek PCV2-vel és PCV1-el. A nyulakat 10^4 TCID₅₀ (tissue culture infective dose) PCV2-vel és $10^{2.75}$ TCID₅₀ PCV1-el fertőzték, intranasalisan. Az egereket 10^3 TCID₅₀ PCV2-vel és $10^{1.75}$ TCID₅₀ PCV1-el fertőzték, intraperitoneálisan. Az állatokat a fertőzés utáni 20-dik napig vizsgálták. Egyik kísérleti állatból sem sikerült kimutatni egyik vírust sem. Egyetlen egerből sikerült PCV1 antigénnel reagáló ellenanyagot kimutatni.

3.5. A PCV2 által okozott károk csökkentésének lehetőségei

A kettes típusú sertés circovírus kártételével szemben járványvédelmi intézkedésekkel és vakcinákkal védekezhetünk. A PCV2-vel fertőzött állományokban a lehető legkisebbre kell szorítani az állatokat érő stresszhatást, csökkenteni kell a társfertőzéseket, illetve azok hatásait, valamint az immunrendszert befolyásoló szerek (vakcinák, immunstimuláló és immunszuppresszív szerek) alkalmazását minél alacsonyabb szintre kell szorítani.

Az anyakocák tartásán, takarmányozásán keresztül javítani kell a malacok életképességét, biológiai értékét. Fontos, hogy a malacok megfelelő mennyiségű főcstejhez jussanak életük első napján, hiszen így passzív védelemre tehetnek szert a PCV2-vel szemben. Egy hatékony vakcina az anyakocákon keresztül valószínűleg megvédené a malacokat a kritikus korban a PMWS kialakulásától.

Madec és mtsai. (1999) 20 pontban foglalták össze, azokat az állathigiéniai követelményeket, amelyek betartása nagymértékben csökkenti a PCV2 kártételét a fertőzött állományokban. Ezeket a megállapításokat egyetemünkön évtizedek óta oktatják az Állathigiénia tantárgy keretében.

A PCV2-vel terhelt állományokban a társfertőzések visszaszorítása, illetve behurcolásának megakadályozása elengedhetetlen a veszteségek mérséklése érdekében. A telepi zártság megvalósítása és annak szigorú betartása a vadállatok (főleg vaddisznók) és illetéktelen személyek távoltartása miatt fontos, hiszen ők is fertőzési forrást illetve stresszhatást jelentenek a

sertésállomány számára. A személyi higiénia, fertőtlenítés fokozott ellenőrzése, a fekete-fehér öltöző használata szintén csökkenti a fertőzésveszélyt.

A járványvédelmi intézkedések mellett a PCV2-vel szembeni vakcinázás a kártételek csökkentésének másik módja. Ennek alapvető feltétele egy hatékony oltóanyag előállítása. Mivel a PCV2 *in vitro* csak korlátozott mértékben szaporodik, hatékony inaktivált vakcina készítése nehézségekbe ütközik. Élő vírust alkalmazni vakcinázás céljából nem lehet, mivel kétséget kizáróan egyetlen PCV2 vírustörzsről sem sikerült bebizonyítani, hogy nem betegíti meg az állatot.

Történtek már eddig is kísérletek PCV2 elleni vakcina kifejlesztésére és kereskedelmi forgalomba hozatalára. A kereskedelmi forgalomba került oltóanyagok hatékonyságáról szerzett tapasztalatok azonban ellentmondásosak. A jelenleg kapható oltóanyagok a járvány kezdetén Észak-Amerikában izolált, PCV2A genotípusba tartozó vírustörzsből készültek. Úgy tűnik, hogy világszerte a PCV2B genotípus rendkívül gyorsan terjed, jelentősen visszaszorítva a PCV2A genotípust. Újabb megfigyelések szerint ráadásul a PCV2B genotípus patogénebb, mint a PCV2A genotípus (Opriessnig és mtsai., 2006, Cheung és mtsai., 2007, Woodbine és mtsai., 2007, Grau-Roma és mtsai., 2008, Timmusk és mtsai., 2008). Ezért véleményünk szerint egy PCV2B genotípusba tartozó, magas titerben szaporodó vírus a jövőben alkalmasabb lenne a PCV2-vel szembeni védekezéshez. A hatékony vakcinás védekezéshez elengedhetetlen a vakcinázás optimális időpontjának meghatározása. Ennek megállapításához figyelembe kell venni, hogy a fertőzött állományokban a maternális immunitás a malacokban 6-9 hetes kor között szűnik meg és védtelenné válnak a PCV2 fertőzéssel szemben. Ezt követően a PMWS a 7-10 hetes korban jelentkezik, a PCV2-vel szemben képződő IgM és IgG ellenanyagok titerre pedig 9 hetes kor körül kezd emelkedni a malacokban (Cadar, nem publikálta adat).

A PCV2-vel végzett munkánk során sikerült izolálnunk egy PCV2B csoportba tartozó vírustörzset és kidolgoztunk egy módszert, amellyel ez a vírustörzs kellően magas titerben szaporítható egy hatékony vakcina készítéséhez. A szabadalmi eljárás jelenleg folyamatban van, ezért jelen dolgozat nem tartalmazhatja az ezzel kapcsolatos vizsgálatokat és eredményeket. Reményeink szerint hamarosan kétséget kizáróan hatékony vakcinával lehet védekezni a PCV2 által okozott kórképekkel szemben.

4. Anyag és módszer

4.1. A sertés circovírus kimutatásra használt szervminták származása

4.1.1. A sertés circovírus-DNS tisztítás optimalizálásához használt szervminták származása

A DNS tisztítási módszerek vizsgálatához a szervmintákat a Debreceni Állategészségügyi Intézet Virologiai Osztályáról kaptuk. A házisertés szerveket 1999-től gyűjtötték PMWS-gyanús sertésletelepekről, és -20°C-on tárolták. Elsősorban vese, csontvelő és nyirokcsomó szöveteket vizsgáltunk.

4.1.2. A magyarországi vaddisznó állományban előforduló PCV kimutatásra használt szervminták származása, csoportosítása

A vizsgálat alapjául szolgáló vaddisznó eredetű szervmintákat a Debreceni Állategészségügyi Intézettől és egy vadfeldolgozó üzemből (FIWI-HÜT Kft., Tata) kaptuk 2002 és 2003 között. Munkánk során főként vese és nyirokcsomó, ritkábban mandula, máj és lép mintákat vizsgáltunk. A mintákat -20 °C-on tároltuk a feldolgozásig. Az állatok kórelőzményi adatai ismeretlenek voltak, a kötelező vágóhídi húsvizsgálat adatai megbetegedésre nem utaltak. Az állatok korára vonatkozóan sem álltak pontos adatok rendelkezésre, de főként felnőtt, kilövésre érett vaddisznókból származó mintákat vizsgáltunk. A több mint kétezer, különböző állatból származó szervmintát a származási hely, és a begyűjtés ideje alapján csoportosítottuk. A csoportok tagjait először sertés circovírus specifikus polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk mindaddig, amíg egy csoportból legalább 5 pozitív mintát nem sikerült kimutatni. A vizsgálat részletei és a primer szekvenciák a 4.3. fejezetben kerültek leírásra.

4.1.3. Romániai PCV2 kimutatására használt minták

Az első romániai PMWS és PDNS leírásához a mintákat egy Erdély észak-nyugati részén található sertésállományból kaptuk, ahol megközelítőleg 30000 állatot tartottak (1650 koca, 1320 kocasüldő, 48 kan, 7500 szopós malac, 9700 süldő, 9900 hízó). A sertésletelepen a választás 6 hetes korban történt. A termelés növelése céljából 2000 elején kocákat és kanokat importáltak

Magyarországról. Az első PMWS eseteket 2002 májusában észlelték, a 10-14 hetes korcsoportban. A megbetegedett állatok közül 3 diagnosztikai célból leölésre került. A leölt állatokból vér, lágyéki nyirokcsomó, bélfodri nyirokcsomó, lép, máj, vese és tüdő mintákat gyűjtöttünk szerológiai, kórszövettani és PCR vizsgálat céljából. Ugyanezen a telepen az első PDNS tünetek 2004 októberében jelentkeztek, 15-60 kg közötti sertéseken. A megbetegedési arány 0,02-0,04 % volt, azaz összesen 8 állatban figyelték meg a PDNS tüneteit, melyek közül 4 diagnosztikai célból leölésre került. A leölt állatokból a korábbiakhoz hasonlóan szervmintákat gyűjtöttünk. Valamennyi mintát a feldolgozásig -20 °C -on tároltuk.

A romániai PCV2 teljes genomjának meghatározásához egy PMWS tüneteit mutató sertés tüdejét és egy PDNS tüneteit mutató állat veséjét használtuk mintaként, annak meghatározására, hogy a kétféle kórképből származó PCV2-ben volt-e genetikai különbség.

4.1.4. A közép-kelet európai régióban jelen lévő PCV2 szekvenciák meghatározásához használt minták származása

2007-ben szlovák, horvát, cseh, lengyel, román, valamint magyar kollégáinktól kértünk mintákat, hogy kiderítsük, milyen PCV2 genotípusok fordulnak elő térségünkben és megvizsgáljuk, hogy hogyan változott a járványtani helyzet Magyarországon a kórkép első diagnosztizálása óta. Különböző szervmintákat, kivont DNS-t, PCR terméket, illetve kész szekvenciákat kaptunk a vizsgálathoz. A minták adatait a 2. táblázat tartalmazza.

A házisertések mellett azt is vizsgáluk, hogy 2008-ban vaddisznókban milyen PCV2 genotípusok vannak. Ehhez a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivataltól (Dr. Dán Ádámtól) kaptunk 90 mintát, amelyet eredetileg sertéspestis vizsgálatra küldtek. A vaddisznó minták a szlovák határ mellől, Pest, Nógrád és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékből származtak.

Az elemzésekhez letöltöttük 2007. december 31-ig a GenBank-ban hozzáférhető valamennyi PCV2 teljes genom szekvenciát és ORF2 szekvenciát.

2. táblázat. A közép-kelet európai régióban, 2006-2007-ben jelen lévő PCV2 szekvenciák meghatározásához felhasznált minták származása.

Minta neve (ország kód + szám)	minta eredeti kódja	minta származása (település)	minta
SLO1	3415-17/07	Prievidza	szekvencia
SLO2	6630-31/07	Nitra	szekvencia
SLO3*	32820-21/06	Nitra	szekvencia
SLO4*	13964-65/06	Krupina	szekvencia
SLO5	6908/07	Trnava	szekvencia
SLO6*	41178/06	Partizánske	szekvencia
SLO7*	19015/06	Partizánske	szekvencia
SLO8*	8177-79/06	Komárno	szekvencia
SLO9*	6869-70/06	Trenčín	szekvencia
SLO10*	26890/06	Nové Mesto nad Váhom	szekvencia
CZE1	-	NA	PCR termék
CZE2	-	NA	PCR termék
CZE3	-	NA	PCR termék
CZE4	-	NA	PCR termék
CZE5	-	NA	PCR termék
CZE6	-	NA	PCR termék
CZE7	-	NA	PCR termék
CZE8	-	NA	PCR termék
CRO1	224 11	NA	kivont DNS
CRO2	224 12	NA	kivont DNS
CRO3	299 1	NA	kivont DNS
CRO4	229 2	NA	kivont DNS
CRO7	358	NA	kivont DNS
POL1	PL10.07	NA	kivont DNS
POL2	PL12.07	NA	kivont DNS
POL3	PL13.07	NA	kivont DNS
POL4	PL16.07	NA	kivont DNS
ROM2	-	Brassó	szervek
ROM3	-	NA	szervek
HUN11	1	Hajdúnánás	szervek
HUN12	11	Kaba	szervek
HUN13	12	Újfehértó	szervek
HUN14	13	Vállaj	szervek
HUN15	14	Jászapáti	szervek
HUN16	15	Nyárad	szervek
HUN17	16	Ráckeresztúr	szervek
HUN18	-	Szeged	szervek

SLO: szlovák, CRO: Horvát, CZE: cseh, POL: lengyel, ROM: román, HUN: magyar

* : 2006-ban meghatározott szekvencia

NA: nincs adat.

4.2. Vírus-nukleinsav tisztítása a szervmintákból

Tekintettel a nagyszámú mintára, meghatároztuk, hogy melyik DNS izolálási módszerrel lehet olcsón, egyszerűen, gyorsan, de kellő érzékenységgel dolgozni. Ehhez 25 vaddisznóból és 30 házi sertésből származó mintát használtunk, amelyekből 0,1-0,2 grammot homogenizáltunk. A homogenizált mintákat 600 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM etilén-diamin-tetraacetát, /EDTA/, pH 8,0) vettük fel és 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe tettük. Az így előkészített mintákat -20°C-on tároltuk. A DNS-t proteináz K (Fermentas) emésztéssel, forralásos módszerrel, Trizollal (Sigma) és mikrogyantás (Chelex 100[®] Molecular Biology Grade Resin, Bio-Rad) módszerrel vontuk ki.

4.2.1. Emésztés proteináz K-val

Az előkészített mintákból 200 µl-t kiegészítettünk 200 µl 1 %-os SDS (sodium-dodecilszulfát) oldattal, amely 200 µg/ml proteináz K enzimet tartalmazott, majd 55°C-on 2 órán át inkubáltuk. Az inkubálást követően mikrocentrifugában 6500x g-vel, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 400 µl fenol-kloroform (Reanal) 1:1 arányú elegyével a fehérjéket kivontuk, 5 percig 6500x g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót 400 µl kloroformmal kezeltük és ismét centrifugáltuk. A felső vizes fázisból a DNS-t 100 µl 5M-os kálium-acetát (pH 4,8) és 1 ml 96 %-os etanol segítségével egy éjszakán át -20°C-on precipitáltuk (Sambrook és mtsai., 1989). A precipitált DNS-t 10 perces 6500x g-vel történő centrifugálással üleptítettük, mostuk 70 %-os majd 96 %-os alkohollal, szobahőmérsékleten kiszárítottuk és 50 µl TE pufferben oldottuk fel. Az így kivont DNS-t -20°C-on tároltuk.

4.2.2. Forralásos módszer

A homogenizált szervből 200 µl-t 10 percig forraltunk mikrocentrifuga csőben, majd 5 percen keresztül 6500x g-vel centrifugáltuk és a felülúszót egyéb kezelés nélkül amplifikáltuk, illetve felhasználásig -20°C-on fagyasztva tároltuk.

4.2.3. DNS tisztítás Trizollal

0,1-0,2 gramm szervdarabot 1ml Trizolban homogenizáltunk, 5 percig szobahőmérsékleten tartottuk, majd 0,2 ml kloroformot adtunk hozzá és 15 percig centrifugáltuk mikrocentrifugában 6500x g-n. A centrifugálás alatt az elegy 3 fázisra vált szét. A DNS-t az alsó fázisból 50 µl 5M-os kálium-acetát és 1 ml 96 %-os etanol hozzáadásával, -20°C-on egy éjszakán át inkubálva kicsaptuk. A DNS precipitátumot a proteináz K tisztításnál leírt módon kezeltük és 50 µl TE pufferben oldottuk fel.

4.2.4. Mikrogyantás DNS tisztítás

A DNS tisztításához ez esetben Chelex 100[®] Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad) mikrogyantát használtunk a gyártó utasításainak megfelelő módon.

Röviden: körülbelül 0,1-0,2 g mintát darabokra vágunk és eldörzsöltünk 500 µl steril desztillált vízzel. Ezután kb. 0,1 g Chelex 100[®] mikrogyantát adtunk hozzá, összekevertük, majd 65°C-on húsz percig inkubáltuk. Ezt követően a mintákat tíz percig forraltuk, öt percig jégen hűtöttük, majd 5000x g-vel öt percig centrifugáltuk. A PCR reakcióhoz a felülúszót használtuk.

4.2.5. DNS tisztítás QIAGENE QIAamp[®] DNA Stool Mini kit segítségével

Az egerekkel végzett kísérleteink során a bélsárból és a vizeletből a vírus-nukleinsavat QIAGENE QIAamp[®] DNA Stool Mini kit segítségével vontuk ki, a kezelési útmutatóban foglaltak szerint.

4.3. A PCV DNS amplifikálása

A circovírus-DNS-t polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk. A PCR reakció során használt primereket a GenBank adatai, valamint saját, korábbi vizsgálatainkból származó adatok alapján számítógépes programok (Primer2, Scientific and Educational Software és az Oligo6 program, Molecular Biology Insights Inc.) segítségével terveztük, illetve a nemzetközi szakirodalomban közzétett adatok alapján (Fenaux és mtsai., 2000, Molnár és mtsai., 2002) rendeltük meg a Csertex Kft.-től (Budapest) és a Biomi Kft.-től (Gödöllő). A munkánk során használt primerek szekvenciáit, a kötődési helyüket és specifikusságukat a 3. táblázat tartalmazza.

A teljes genomokat olyan primerpárokkal amplifikáltuk, amelyek a vírus-DNS-t két, egymást átfedő szakaszban állították elő (6. ábra).

A CBB1 és PCIIR primerpárt használtuk a sertés circovírus kimutatásra, mivel ez a primerpár a PCV1 és PCV2 kimutatására egyaránt alkalmas.

A PCV2 genom további részeinek amplifikálásához a CBB1 – CBB2 és CBB3 – CSZ2 primerpárokat használtuk. A CSZ1 primert csak a szekvenálási reakcióhoz használtuk.

A PCV1 genom amplifikálásához a CBB1 és PCIIR primerpár mellett a PCV1-451C – PCV1-1263F és MCV1 – PCV1-1612R primerpárokat használtuk.

A 2008 januárjában, Magyarország észak-keleti részéről származó, PCV2 pozitív vaddisznó mintákat a kapszid fehérjét kódoló szakaszra specifikus CSZ2 és CBB2 primerekkel amplifikáltuk, ugyanis a két primer közötti szakasz alapján megállapítható, hogy a vírus melyik genotípusba tartozik és ORF2 részét részlegesen a CSZ2 primerrel szekvenáltattuk.

A DNS amplifikáció során minden egyes mintából 0,5 µl templát DNS-t használtunk a következő reakció-környezetben: 3 µl MgCl₂ (25 mmol, Fermentas), 1 µl dNTP (1 mmol, Fermentas), 0,5 µl mindkét primerből (25 pmol), 1 egység Taq DNS-polimeráz enzim (Fermentas), PCR puffer 5 µl (Fermentas), 50 µl-re kiegészítve desztillált vízzel.

A DNS amplifikálását a TGradient Thermocycler (Biometra) géppel végeztük a 4. táblázatban összefoglalt programok alkalmazásával.

A PCR termékeket elektroforézissel, 0,4 µg/ml etídium-bromid jelenlétében 1 %-os agaróz gélben (Q-Biogene) futtatva vizsgáltuk.

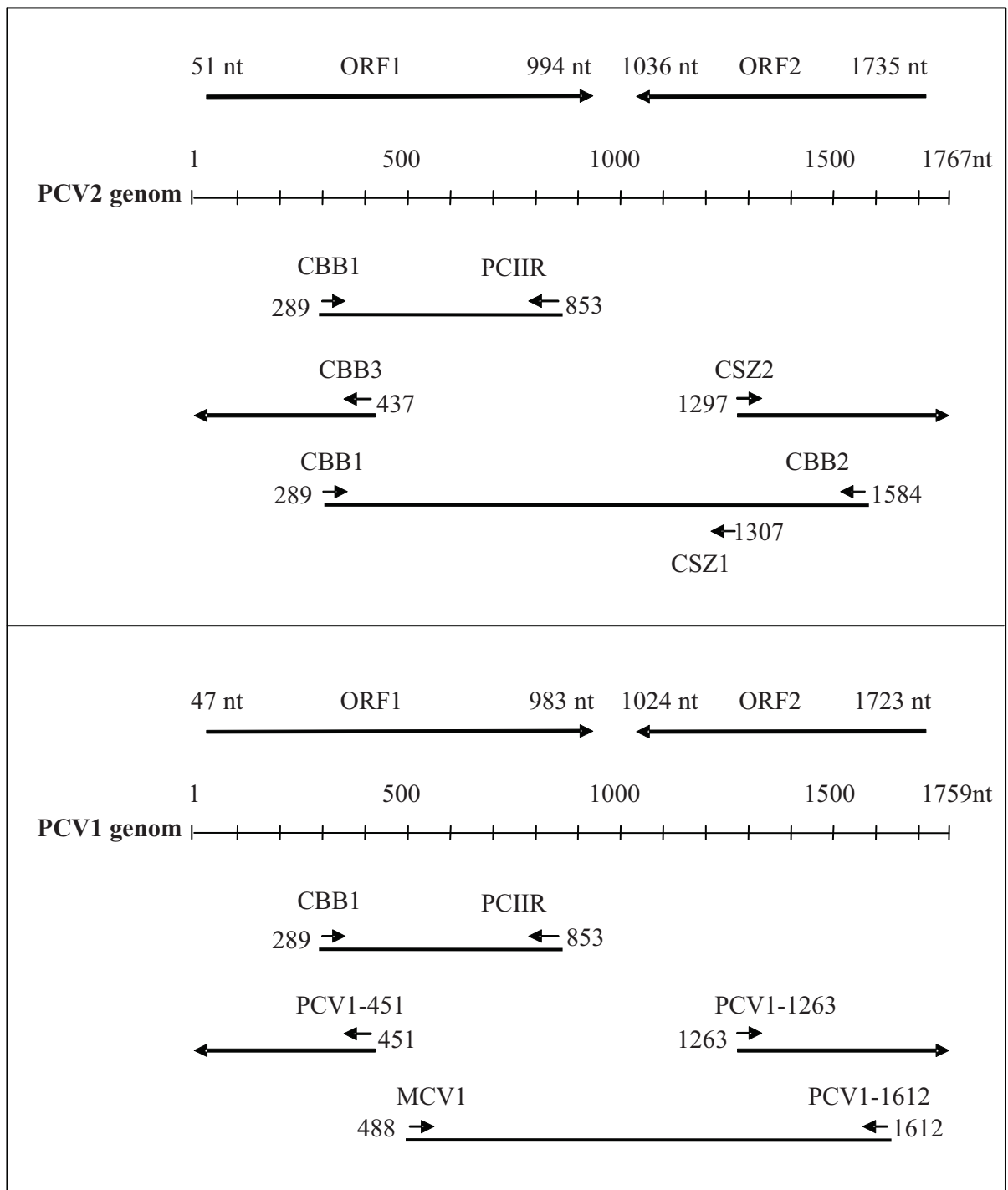
3. táblázat. A táblázatban a munkánk során használt primerek neve mellett szekvenciájukat, a kötődési helyüket és specifikusságukat tüntettük fel.

Primer neve	Primer szekvencia	Kötődés	Specifikusság
CBB1	5'-GCT GCC ACA TCGAGAA-3'	289-305 nt	PCV1,2
CBB2	5'-CGC ACC TTC GGA TAT AC-3'	1584-1568 nt	PCV2
CBB3	5'-GCT CTC CAA CAA GGT ACT -3'	437-420 nt	PCV2
PCIIR*	5'-ACA GCA GTT GAG GAG TAC C -3'	853-835 nt	PCV1,2
CSZ1	5'-ACT ACT CCT CCC GCCATA C-3'	1307-1289 nt	PCV2
CSZ2	5'-GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG G-3'	1297-1318 nt	PCV2
MCV1**	5'- GCT GAA CTT TTG AAA GTG AGC GGG-3'	488-511 nt	PCV1,2
PCV1-1612R	5'- TAC AGA TGG CGC CGA A -3'	1612-1597 nt	PCV1
PCV1-1263F	5'- GGC TGC CTT ATG GTG -3'	1263-1277 nt	PCV1
PCV1-451C	5'- CTG CTC GGC TAC AGT -3'	451-437 nt	PCV1

nt: nukleotid

* Molnár és mtsai., 2002.

** Fenaux és mtsai., 2000.



6. ábra. A PCV genomok lineárisan lettek feltüntetve. A felső nyilak az ORF-ek helyét és irányát jelölik. Az alsó nyilak a teljes genomok elkészítéséhez használt primerek kötődési helyét és irányát jelzik.

4. táblázat. A polimeráz láncreakciókhoz használt programok.

Primerpár	Előmelegítés	35 ciklus		Végső lánchosszabbítás	Befejezés	
CBB1-PCIIR	95°C, 5 perc	95°C, 30 mp	52°C, 30 mp	72°C, 60 mp	72°C 7 perc	4°C
CBB1-CBB2			55°C, 30 mp	72°C 120 mp		
CBB3-CSZ2			55°C, 30 mp	72°C 120 mp		
MCV1-PCV1-1612R			56°C, 30 mp	72°C 105 mp		
PCV1-1263F-PCV1-451C			56°C, 30 mp	72°C 105 mp		
CSZ2-CBB2			55°C, 30 mp	72°C, 35 mp		

4.4. A DNS-fragmentumok tisztítása gélből

A PCR fragmentumokat GeneClean Kit (Q-Biogene) segítségével vontuk ki az agaróz gélből, a használati utasításban foglaltak szerint. Röviden: az agaróz gélben futtatott PCR terméket kivágtuk a gélből, majd ezt a géldarabot 500 µl 6 M nátrium-jodid (NaI) oldatban 55 °C-on feloldottuk és 3 µl üvegtejet (glass milk) adtunk hozzá. Folyamatos keverés mellett öt percig inkubáltuk a mintát, ez alatt a DNS az üvegtejhez kötődött. Centrifugálás után a GeneClean Kit-hez tartozó mosó folyadékkal (wash solution) mostuk ki a NaI-ot. Az üvegtejből centrifugálással eltávolítottuk a mosófolyadékot, kiszárítottuk és a DNS-t steril desztillált vízzel oldottuk le. Az így tisztított DNS-t szekvenáltuk.

4.5. Szekvenancia-analízis

A szekvenáláshoz a PCR-reakciót Big Dye Kit-tel (Applied Biosystems, USA) végeztük. 2 µl mintához 2 µl steril desztillált vizet, 2 µl puffert, 2 µl Big Dye-t és a megfelelő, 2 pmol-os primer-ből szintén 2 µl-t tettünk. Az itt használt primerek megegyeztek az amplifikálásnál használtakkal és ezt a reakciót is a TGradient Thermocycler (Biometra) géppel végeztük a következő program szerint:

96°C	4 perc	} 30 ciklus
96°C	10 mp	
50°C	5 mp	
60°C	4 perc	

A szekvenálási reakciót a következő módon tisztítottuk: minden mintához 1 µl 3 M-os nátrium-acetátot és 25 µl 100 %-os alkoholt adtunk, és 15 percig szobahőn inkubáltuk, majd 1650x g-vel 45 percig centrifugáltuk. A csövekből eltávolítottuk a folyadékot, majd 35 µl 70 %-os alkoholt mértünk a csövekbe. Ismét 1650x g-vel centrifugáltuk a csöveket 15 percig, eltávolítottuk a folyadékot majd 37°C-on 20 perc alatt kiszárítottuk.

A szekvenálási reakciók leolvasását a Genodia Molekuláris Diagnosztika Kft. (Budapest) és a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte Big Dye kittel ABI310 automata szekvenáló készülékben a DNS amplifikációhoz használt primerekkel. A BioEdit version 5.0.6. programot használtuk a szekvenálás eredményeinek értékelésére, valamint a teljes szekvenciák összeillesztéséhez. A MEGA version 4.0 programmal végeztük a replikációs és kapszid fehérjét kódoló DNS szekvenciák aminosav sorrenddé alakítását, valamint a teljes genomok, illetve fehérje szekvenciák összehasonlítását ClustalW multiple alignment algoritmussal. A filogenetikai analízist szintén a MEGA version 4.0 programmal végeztük, a bootstrap érték 1000 volt (Tamura és mtsai., 2007).

4.6. Sejtek

A sertés circovírust PCV1 és PCV2 mentes STC (sertés here sejtek, swine testicular cell) sejteken szaporítottuk. Munkánk során Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Sigma) tápfolyadékot használtunk 10 % hőinaktivált foetal bovine serum-mal (FBS, Gibco), 50 egység/ml penicillinnel (Sigma), 0,05 mg/ml streptomycinnel (Sigma), 29,2 mg/ml L-glutamine-nal (Sigma) kiegészítve.

4.7. Vírusizolálás

A ROM1 jelű PCV2 vírustörzset a Romániából származó tüdőmintából izoláltuk (GenBank-i kódja: DQ233257). A tüdő elváltozást mutató részéből borsónyi darabot homogenizáltunk 1,5 ml DMEM tápfolyadékban. A homogenizátumot 10 percig 6500x g-vel centrifugáltuk, majd MILLIPORE szűrőn (0,22 µm pórus nagyság, Millipore, Franciaország) a felülúszót átszűrtük. A szűrletet 10^4 PCV mentes STC sejthez adtuk 15 ml DMEM tápfolyadékkal, és a vírust 25 cm²-es szövettenyésztő palackban szaporítottuk. A fertőzött sejtek passzálását a következő módon végeztük: a sejtek 3-4 nap alatt benőtték a palackot, ekkor 0,5 ml steril tripszin oldattal leemésztettük a sejteket a palackról, és 1/4 részét új, 25 cm²-es szövettenyésztő palackba tettük, majd 15 ml DMEM tápfolyadékkal feltöltöttük. A 3. passzázs után a sejteket 3x mostuk 50 ml PBS (phosphate buffered saline) oldatban (összetétele: NaCl 8

g/l, KCl 0,2 g/l, vízmentes Na₂HPO₄ 1,15 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l). Mosás után a sejtekből kivontuk a DNS-t, és PCR-rel ellenőriztük, hogy a sejtek fertőződtek-e. A szaporodó vírust 3-5 naponta passzáltuk.

4.8. Vírus titer meghatározása PCR-rel

A ROM1 vírustörzset 25 cm²-es szövettenyésztő palackban szaporítottuk, 15 ml DMEM tápfolyadékban. A vírus titerének meghatározásához a benőtt palackot -20°C-ra tettük. A sejtekből a vírust háromszori lefagyasztással és felolvasztással szabadítottuk ki. A harmadik fagyasztás és felolvasztás után a folyadékot 3000x g-vel 30 percig centrifugáltuk, hogy a sejttörmeléseket eltávolítsuk.

Amikor még nem volt PCV2 specifikus ellenanyagunk, a titer meghatározását a következő módszerrel végeztük: a vizsgálandó víusból 10-es alapú hígítási sort készítettünk. Mindegyik hígításból 2-2 vizsgálatot készítettünk. A vizsgálatokat 24 lyukú szövettenyésztő lemezen végeztük. A hígított mintából 1 ml-t mértünk a lyukakba, majd minden lyukba 5x10³ PCV mentes STC sejtet tettünk 200 µl steril DMEM tápfolyadékban. A sejteket 3 nap elteltével steril tripszinnel leemésztettük, utána 25 cm²-es szövettenyésztő palackba helyeztük. A sejteket ezt követően 3-5 naponta passzáltuk. A 4-dik és az 5-dik passzáls után PCR-rel vizsgáltuk, melyik hígításból mutatható ki a vírus.

Miután kidolgoztuk a PCV2 kimutatásának indirekt immunfluoreszcenciás (IIF) módszerét (lásd később), a vírus titerét IIF módszerrel határoztuk meg (lásd 4.10.2. fejezet).

A 6-dik, a 20-dik, a 35-dik, az 50-dik és a 65-dik passzázs után meghatároztuk a ROM1 vírustörzs titerét.

4.9. Sertés circovírus specifikus sertéssavó készítése

Öt, három hónapos sertést oronazálisan fertőztünk 2x10³ TCID₅₀ mennyiségű vírussal, a ROM1 vírustörzsből. (Ehhez a titer meghatározását PCR-rel végeztük, lásd fent). A fertőzés előtt minden állatból vért vettünk. A fertőzés után 4 héttel szintén 2x10³ TCID₅₀ mennyiségű vírust kaptak az állatok, izomba. Három héttel az izomba történt oltás után a sertéseket extermináltuk és összegyűjtöttük a vérüket. A vért hagytuk kihűlni szobahőmérsékleten, majd +4°C-ra tettük éjszakára. Másnap elválasztottuk a vérsavót az alvadéktól, és -20°C-on tároltuk felhasználásig. A savók PCV ellenanyag tartalmát indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgáltuk.

4.10. Indirekt immunfluoreszcenciás módszer

4.10.1 A vérsavók titerének meghatározása

A ROM1 vírustörzssel fertőzött sejttenyészetet tripszinnel leoldottuk a 75 cm² szövettenyésztő palackról majd 50 ml tápfolyadékban mostuk a sejteket. A sejteket 50 ml-es steril centrifuga csőben 259x g-vel 10 percig centrifugáltuk. A mosófolyadék elöntése után a sejteket 5 ml tápfolyadékba reszuszpendáltuk, majd steril tárgylemezre tettünk 150 µl-t, kb. 1,5 cm² nagyságú felületre szélesztve. A lemezeket ezt követően 4 órán át inkubáltuk nedves kamrában, 37 °C-on, 5 % CO₂-ot tartalmazó inkubátorban. A letapadt sejteket tömény aceton és etanol 1:1 arányú keverékében 10 percen keresztül +4 °C-on tartva rögzítettük a tárgylemezre, és -20 °C-on tároltuk felhasználásig. Az így elkészített lemezek segítségével mutattuk ki a vérsavókból a PCV2 ellen képződött antitesteket.

Hasonló módon állítottuk elő a PCV mentes sejtekből a negatív kontrollként szolgáló lemezeket is.

A vizsgálandó savókból tízes (sertés savók), illetve kettes (egér savók) alapú hígításokat készítettünk. A savókat 0,5 % BSA-t (Bovine serum albumin) tartalmazó PBS oldatban hígítottuk. A hígított mintákból 100 µl-t ráértünk a ROM1 vírustörzssel fertőzött sejteket tartalmazó tárgylemezre, majd 37 °C-on nedves kamrában egy órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a savót desztillált vízzel leöblítettük, és a lemezeket 3x5 percig PBS oldatban mostuk, majd ráértünk 100 µl-t a használati utasításoknak megfelelően előkészített sertés IgG, illetve egér IgG specifikus, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt ellenanyagból (konjugátum, Sigma). Egy óra inkubálás után 3x5 percig ismét mostuk PBS oldatban a lemezeket, majd 1 mg/l koncentrációjú, steril desztillált vízben oldott Evans kézzel (Reanal) kontrasztfestettük a sejteket. Desztillált vizes öblítés után fedőlemezzel takartuk a mintát, és fluoreszcens mikroszkóp (Nikon H550S mikroszkóp) alatt vizsgáltuk.

4.10.2. Vírus titer meghatározása indirekt immunfluoreszcenciás (IIF) módszerrel

A vírusok titerének IIF módszerrel történő meghatározását 96 lyukú szövettenyésztő lemezen (Spektrum) végeztük. A lyukakba 10³ PCV mentes STC sejtet tettünk. A vizsgálandó vírustól 10-es alapú hígítási sort készítettünk, és minden hígításból 5x100 µl-t mértünk a lyukakba. A fertőzés utáni 4-dik napon aceton-etanol 1:1 arányú keverékében fixáltuk a sejteket. Ezt követően 100 µl, 1:500 arányban hígított PCV2 specifikus sertéssavót (1:10000 IIF végtiterű savó) mértünk a lyukakba. 60 perc inkubálás után a lyukakat 3x5 percig mostuk 200 µl PBS

oldattal, majd bemértük a lyukakba a használati utasításnak megfelelően hígított konjugátumot. Egy óra inkubálás után ismételten mostuk a lyukakat 3x5 percig 200 µl PBS oldattal, majd kontrasztfestettük a sejteket Evans kék oldattal. Desztillált vizes öblítés után a lemezeket fluoreszcens mikroszkóp (Nikon H550S mikroszkóp) alatt vizsgáltuk.

4.11. Állatfertőzési kísérletek

A kísérletek során a vírus koncentrációja a hasüregbe történt oltások esetén 10^3 TCID₅₀/ml volt. A vírus-szuszpenzióból 0,5 ml-t oltottunk az egerek hasüregébe, ami 5×10^2 TCID₅₀ vírusnak felel meg.

4.11.1. Kísérleti állatok

Állatkísérleteinkhez NMRI 25-29 grammos (6 hetes) nőtény fehér egereket használtunk, amelyeket a TOXI-COOP KKT-től (Budapest) vásároltunk.

4.11.2. Kísérleti elrendezés

Patogenitási vizsgálat: 2 negatív kontroll mellett 4 egeret hasüregbe oltottunk három alkalommal, két hetes időközzel a ROM1 vírustörzsből. Minden egerbe 5×10^2 TCID₅₀ vírust juttattunk. Az utolsó oltás után két héttel az egereket extermináltuk az állatvédelmi előírásoknak megfelelően, és a következő mintákat gyűjtöttük belőlük: vérsavó, csecsemőmirigy, máj, lép, vese, bélfodri nyirokcsomó, csontvelő. A szervmintákból a vírus-nukleinsavat a fent leírt gyantás eljárással vontuk ki és PCR-rel vizsgáltuk. A vérsavóból indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel próbáltuk kimutatni a sertés circovírusok ellen képződött ellenanyagokat.

Vírusreplikáció vizsgálata: 28 egeret oltottunk hasüregbe egy alkalommal, 5×10^2 TCID₅₀ mennyiségű vírussal a ROM1 vírustörzsből. Ezt követően kétnaponta extermináltunk 4 egeret és a következő mintákat gyűjtöttük belőlük: vérsavó, csecsemőmirigy, máj, lép, vese, bélfodri nyirokcsomó, csontvelő. Ezt követően az előző kísérlettel azonos módon vizsgáltuk őket.

Vírusürítési vizsgálat 1.: 4 egeret oltottunk hasüregbe 5×10^2 TCID₅₀ vírussal a ROM1 vírustörzsből. Az oltás után 6 nappal 4 oltatlan egeret hozzátettünk az oltott egerekhez. Az oltás után 24 nappal két oltott és két oltatlan egeret, majd az oltás után 28 nappal a másik két oltatlan egeret is extermináltunk. A maradék 2 hasüregbe oltott egeret az oltás után 42 nappal extermináltuk. A mintákat az előző kísérletekben leírtak szerint PCR-rel vizsgáltuk.

Vírusürítési vizsgálat 2.: 3x6 egeret szájon át fertőztünk a ROM1 vírustörzssel. Az első csoport 8×10^4 , a második csoport 6×10^4 , a harmadik csoport 5×10^4 mennyiségű vírust kapott. Az első csoporttól naponta gyűjtöttünk bélsár és vizelet mintát. Ezen mintákból QIAGEN QIAamp[®] DNA Stool Mini kit segítségével vontuk ki a DNS-t, majd PCR-rel vizsgáltuk a vírusürítést.

A szájon át történt fertőzés után 12, 19 és 26 nappal 2-2 egeret extermináltunk mindhárom csoportból.

Az első csoporthoz a fertőzést követően 12 nappal 6 PCV negatív egeret tettünk (kontakt egerek), majd ezeket 15 és 18 nappal később, tehát a fertőzés után 27 és 30 nappal extermináltuk.

Az egerekből vérsavó, lép, máj, vese, tüdő, csecsemőmirigy, bélfodri nyirokcsomó és csípőbél mintákat gyűjtöttünk és PCR-rel vizsgáltuk a vírus jelenlétét.

5. Eredmények

5.1. DNS tisztítási módszerek

A házi sertés és vaddisznó mintákból több módszerrel kíséreltük meg a circovírus nukleinsav tisztítását. Összehasonlítottuk a proteináz K emésztést, a mikrogyantás tisztítást, a forralásos módszert és a Trizollal történő DNS izolálást. A vírus nukleinsavat PCR-rel amplifikáltuk a CBB1 és PCIIR primerekkel.

Valamennyi módszer alkalmas volt a DNS izolálására, vagy legalábbis feltárására, hatékonyságuk azonban eltérőnek bizonyult. A kísérleteket 30 házi sertés mintán és 25 vaddisznóból származó mintán végeztük. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Házi sertésekből és vaddisznókból származó minták PCR eredményei különböző feltárási módszereket alkalmazva.

Származás	Mintaszám	Tisztítás módja, a PCR pozitív minták száma és aránya (%)			
		Proteináz K	Forralás	Mikrogyanta	Trizol
Házisertés	30	28	19	27	15
		93 %	63 %	90 %	50 %
Vaddisznó	25	11	9	12	7
		44 %	36 %	48 %	28 %
Összesen	55	39	28	39	22
		71 %	51 %	71 %	40 %

Bár valamennyi módszer használata esetében sikerült PCV DNS-t kimutatni, leggyakrabban a proteináz K emésztéssel és a mikrogyantás módszerrel kinyert minta bizonyult pozitívnak. A két módszer nem minden alkalommal adott azonos eredményt (3 % különbség), egyes mintákon a proteináz K emésztés, míg másokon a mikrogyantás módszer adott a CBB1 és PCIIR primerekkel pozitív reakciót. A vizsgálatot a proteináz K emésztéssel és a mikrogyantás módszerrel újra elvégezve sem kaptunk megegyező eredményt. A forralással feltárt DNS és a Trizollal szeparált DNS lényegesen kevesebb alkalommal adott pozitív PCR eredményt.

A következő PCR reakciókhoz már csak a mikrogyantás feltárási módszert használtuk, tekintve, hogy hatékonyságában megegyezett a proteináz K módszerrel, viszont annál technikailag egyszerűbben és gyorsabban kivitelezhető.

5.2. A 2002 és 2003 közötti, magyarországi vaddisznókból származó PCV2 szekvenciák elemzése

A több mint kétezer, különböző vaddisznóból származó szervmintát a származási hely és a begyűjtés ideje alapján csoportosítottuk. A vizsgált minták 35,5 %-ában volt jelen PCV. A pozitív minták 57,8 %-ában volt kimutatható PCV2, amely a vizsgált összes minta 20,5 %-a volt.

A szekvencia adatok alapján a vaddisznó eredetű PCV2-t 7 csoportba soroltuk. A 7-ből 3 csoport a PCV2B genotípusba (WB-H1, WB-H5 és WB-H6), amíg 4 csoport a PCV2A genotípusba (WB-H2, WB-H3, WB-H4, WB-H7) tartozott. A PCV2 pozitív minták elterjedési aránya között területi megoszlás tekintetében nem volt különbség. A különböző csoportokba sorolt circovírus szekvenciák az ország minden részéről kimutathatók voltak. Egy adott területen több genotípus is jelen volt. A teljes szekvencia összehasonlítása alapján az egyes csoportok között 94,7-99,4 %-os volt a hasonlóság. A hasonlóság az egyes csoportok között a replikációs fehérjék alapján 98,1-100 %-os, a kapszid fehérjék alapján 90,1-100 %-os volt. A teljes genomok nukleinsav sorrendjét, valamint a jósolt replikációs fehérjék és kapszid fehérjék aminosav sorrendjét összehasonlítva a GenBank-ban található, a Föld különböző térségeiből származó, valamint a magyarországi házi sertésekből kimutatott kettes típusú sertés circovírusok nukleotid és származtatott aminosav szekvenciáival (6. táblázat) a következőket lehetett megállapítani.

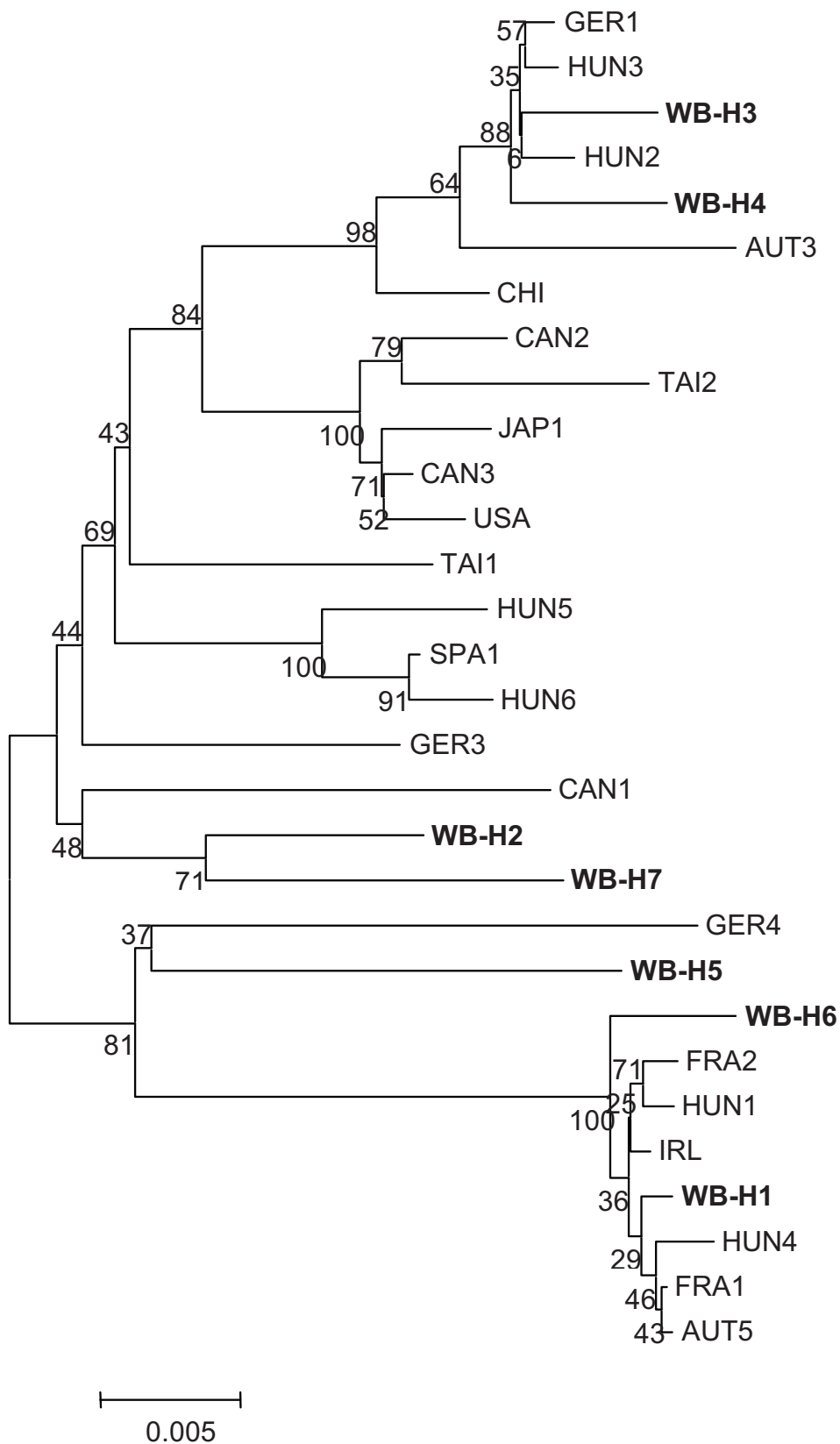
Olyan PCV genomot, amely kizárólag vaddisznóra lenne jellemző, nem találtunk. A teljes genom alapján (7. ábra) néhány vaddisznóból származó vírus szoros rokonságot mutatott a korábban magyarországi házi sertésekből származó vírusokkal (Dán és mtsai., 2003), nevezetesen a WB-H1 és WB-H6 a HUN1 és HUN4, amíg a WB-H3 és WB-H4 a HUN2 és HUN3 vírusokkal mutatott közelebbi rokonságot. A WB-H2 és WB-H7 szekvenciák egy kanadai izolátummal míg a WB-H5 vírus az egyetlen, GenBank-ban megtalálható vaddisznóból származó német GER4 vírussal mutatott nagyobb hasonlóságot.

Hasonló eredményt kaptunk, amikor e vírusok kapszid fehérjéinek aminosav sorrendjét hasonlítottuk össze (8. ábra).

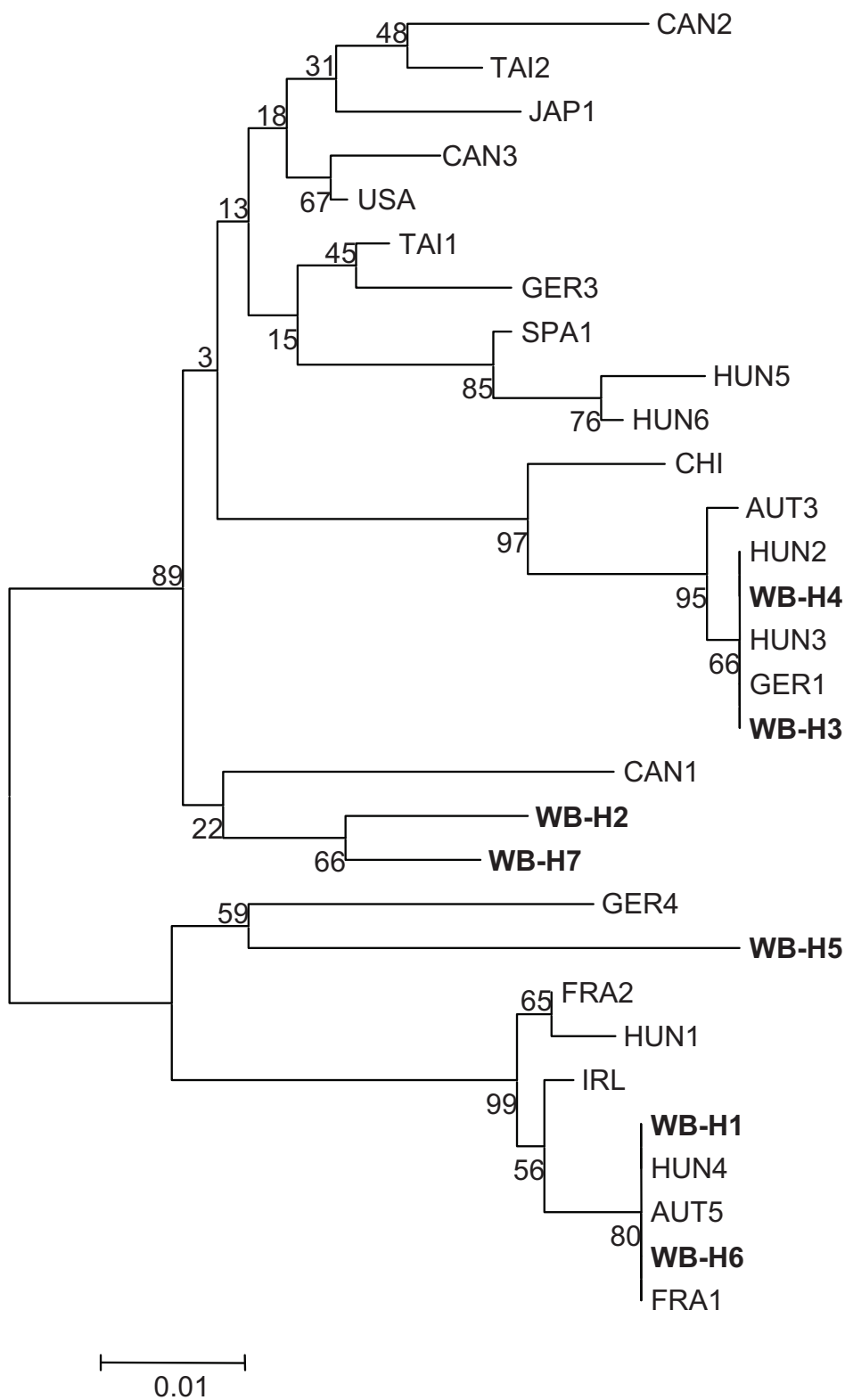
A vírus replikációért felelős fehérjéinek összehasonlító vizsgálata a teljes genomhoz és a kapszid fehérjéhez képest eltérő eredményt adott. A magyarországi házisertésekből származó PCV2-k közül a HUN2 és HUN3 replikációs fehérjéi nem mutattak szoros rokonságot a vaddisznókból származó vírusok replikációs fehérjéivel. A WB-H3 és WB-H6, valamint a WB-H2 és WB-H7 replikációs fehérjéinek aminosav szekvenciája eltért a házisertésekből származó PCV2 vírusok replikációs fehérjéinek aminosav sorrendjétől. A replikációs fehérje aminosav szekvenciája alapján a WB-H1 a HUN1 és HUN4, amíg a WB-H4 és WB-H5 a HUN5 és HUN6 vírusokkal mutatott nagyfokú hasonlóságot (9. ábra).

6. táblázat: A vaddisznókból származó illetve romániai PCV-k filogenetikai összehasonlításához használt PCV genomok listája.

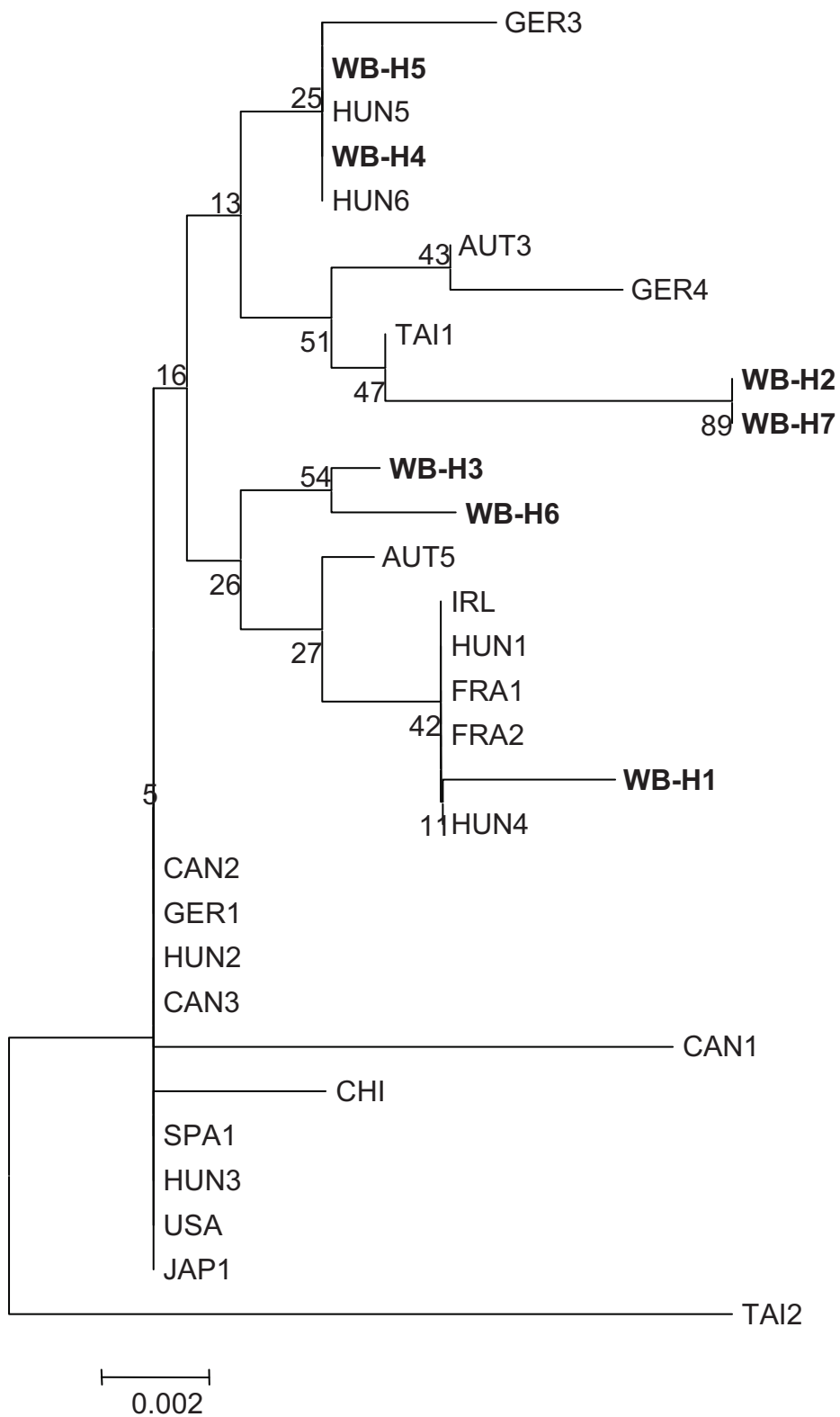
Név	GenBank kód	Eredeti név	Szerző
AUT3	AY424403	AUT3	Exel és mtsai., 2003 nem publikált
AUT5	AY424405	AUT5	Exel és mtsai., 2003 nem publikált
CAN1	AF109398	-	Hamel és mtsai., 2000
CAN2	AF118097	IAF-4370	Ouardani és mtsai., 1999
CAN3	CQ768115	-	Allan és mtsai., 2004 nem publikált
CHI	AF381176	HR	Lu és mtsai., 2001 nem publikált
FRA1	AY322000	Fd1	de Boisseson és mtsai., 2004
FRA2	AY321984	Fd3	de Boisseson és mtsai., 2004
FRA3	AY321993	Fd16	de Boisseson és mtsai., 2004
DEN	EF565360	-	Dupont és mtsai., 2008
GER1	AF201305	GER1	Mankertz és mtsai., 2000
GER3	AF201307	GER3	Mankertz és mtsai., 2000
GER4	AY713470	-	Knell és mtsai., 2004 nem publikált
IRL	CQ768114	-	Allan és mtsai., 2004 nem publikált
JAP1	AB072301	PCV33	Imai és mtsai., 2001 nem publikált
SPA1	AF201308	SPA1	Mankertz és mtsai., 2000
TAI1	AY146991	Pingtung-1	Liao és mtsai., 2002 nem publikált
TAI2	AF465211	SC	Wang, és mtsai., 2002 nem publikált
USA	AJ223185	ISU-31	Morozov és mtsai., 1998
HUN1	AY256460	375	Dán és mtsai., 2003
HUN2	AY256456	224	Dán és mtsai., 2003
HUN3	AY256458	326	Dán és mtsai., 2003
HUN4	AY256457	304	Dán és mtsai., 2003
HUN5	AY256459	336	Dán és mtsai., 2003
HUN6	AY256455	212	Dán és mtsai., 2003
WB-H1	AY874163	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H2	AY874164	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H3	AY874165	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H4	AY874166	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H5	AY874167	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H6	AY874168	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H7	AY874169	-	Cságola és mtsai., 2006
WB-H8	DQ648032	-	Cságola és Tuboly, 2005, nem publikált
PCV1.1	AY184287	-	Cheung A. K.,2003
PCV1.2	AY193712	-	Zhou és mtsai.,2002, nem publikált
PCV1.3	Y09921	-	Mankertz és mtsai., 1997
PCV1.4	AY099501	-	Choi és mtsai., 2002
PCV1.5	U49186	-	Meehan és mtsai., 1997
PCV1.6	AY219836	-	Wang és mtsai., 2003, nem publikált
PCV1.7	AF012107	-	LeCann és mtsai., 1997, nem publikált
PCV1.8	AF071879	-	Niagro és mtsai., 1998
PCV1.9	AY660574	-	Cao és mtsai., 2004, nem publikált
PCV1.10	AY699796	-	Fenaux és mtsai., 2004



7. ábra. A PCV2 teljes genom szekvenciák összehasonlítása a magyarországi vaddisznókból származó PCV2 szekvenciákkal. A magyarországi vaddisznókból származó genomok **félkövér** betűkkel vannak jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

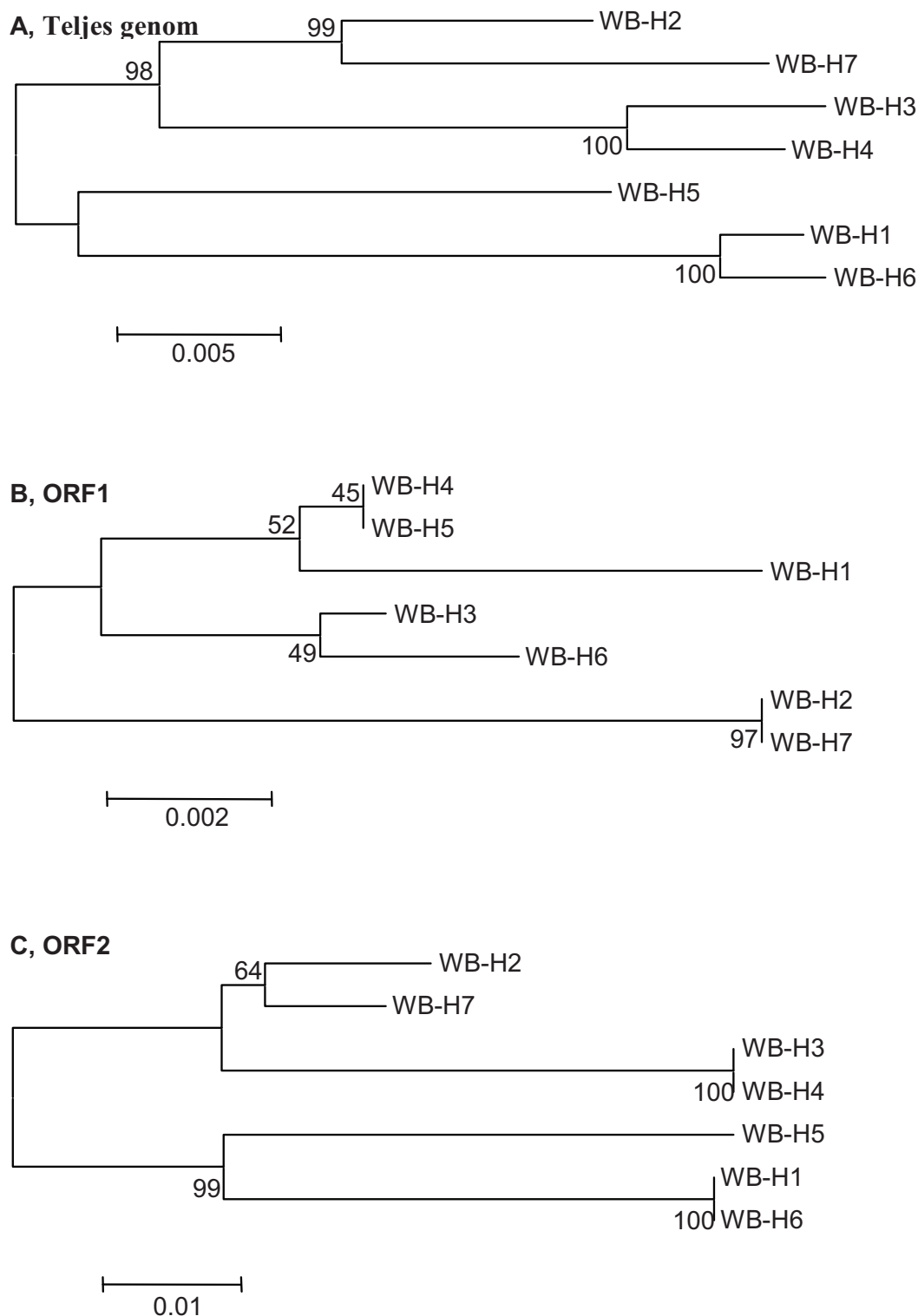


8. ábra. Az ORF2-ből származtatott kapszid fehérjék aminosav szekvenciája alapján készített filogenetikai fa. A magyarországi vaddisznókból származó genomok **félkövér** betűkkel vannak jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.



9. ábra. Az ORF1-ből származtatott replikációért felelős fehérjék aminosav szekvenciája alapján készített filogenetikai fa. A magyarországi vaddisznókból származó genomok **félkövér** betűkkel vannak jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

Elvégeztük csak a vaddisznókból származó PCV2-k összehasonlítását is. A teljes nukleinsav szekvenciák és a kapszid fehérjék aminosav szekvenciája alapján készített filogenetikai fa nagyfokú hasonlóságot mutatott. A replikációs fehérjék aminosav szekvenciája alapján készített filogenetikai fa azonban jelentős eltérést mutatott a teljes nukleinsav szekvencia alapján készített filogenetikai fától (10. ábra).



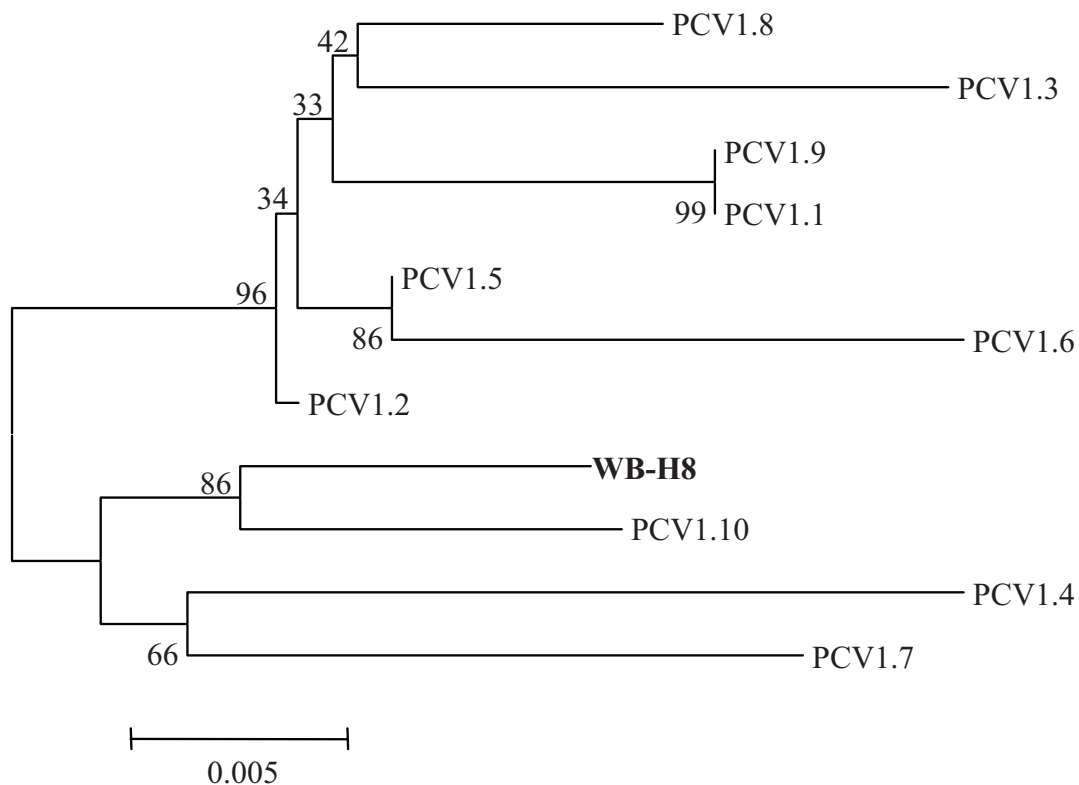
10. ábra. A magyarországi vaddisznókból származó genomok összehasonlítása. A: teljes genom, B: ORF1 aminosav szekvencia, C: ORF2 aminosav szekvencia.

A WB-H4 és a WB-H5 vírusok replikációs fehérjéi 100 %-ig megegyeztek egymással és a WB-H2 és WB-H7 replikációs fehérjéi is azonosak voltak. A kapszid fehérjéket tekintve 100 %-os azonosság volt megfigyelhető a WB-H3 és a WB-H4 vírusok között, valamint a WB-H1 és a WB-H6 kapszid fehérjéje is megegyeztek. A WB-H4 vírus kapszid fehérjéje a WB-H3 kapszid fehérjéjével, amíg a replikációs fehérjéje a WB-H5 vírus replikációs fehérjéjével volt azonos (10. ábra). Ezt a megfigyelést alátámasztja, ha a kapszid- és replikációs fehérjéket kódoló nukleinsav szekvenciákat hasonlítjuk össze. Mindössze 0,4 % (3 nukleotid) különbség volt a WB-H3 és WB-H4 vírusok ORF2 szekvenciái között, amíg ezen a genom szakaszon a WB-H1 és WB-H6 vírusok 100 %-ig azonosak voltak. Az ORF1 nukleinsav szekvenciáit tekintve a WB-H4 és WB-H5 vírusok között 1,7 %, a WB-H2 és WB-H7 vírusok között 0,7 % különbség volt. A replikációs fehérje aminosav szekvenciája konzervatívabb, mint a kapszid fehérje aminosav szekvenciája, amint az a 10., 11. és 12. ábrákon is látható.

5.3. PCV1 szekvenciák elemzése

A PCV pozitív vaddisznó mintákból CBB1 és PCIIR primerpárral részleges szekvencia analízist végeztünk. A szekvencia analízis alapján PCV1 pozitív minták közül kiválasztottunk egyet (46-os számú vaddisznó), és meghatároztuk a teljes genom szekvenciáját (WB-H8) az MCV1 PCV1-1612R és a PCV1-451C PCV1-1236F primerpárokkal (6. ábra). A WB-H8 teljes nukleotid szekvenciáját összehasonlítottuk a GenBank-ban a tanulmány megírásakor fellelhető összes PCV1 szekvenciával. A munkánk során használt PCV1 szekvenciák adatait a 6. táblázat tartalmazza.

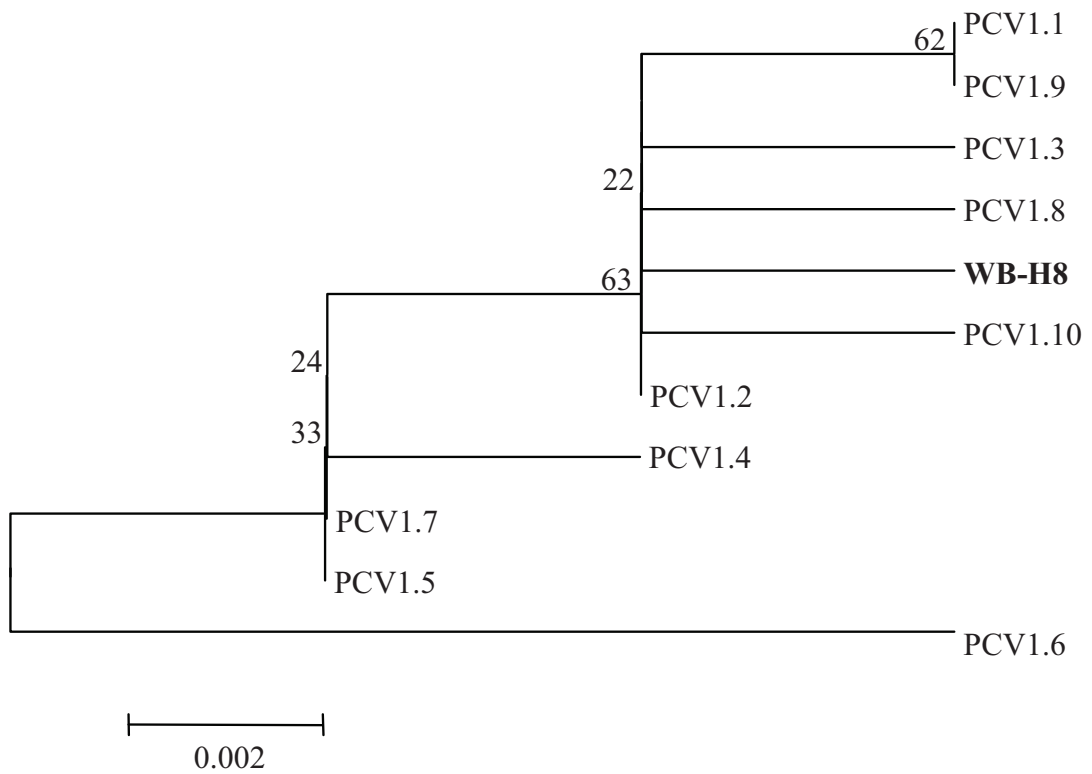
A WB-H8 1759 bázis hosszúságú, hasonlóan az ismert PCV1-ekhez. A teljes genom a legnagyobb azonosságot az általunk PCV1.10 névvel jelzett vírussal mutatott, az 1759 bázisból mindössze 12 különbözött, ami 99,32 %-os azonosságot jelent. A legnagyobb mértékben az általunk PCV1.6-al jelölt PCV1 szekvencia különbözött a WB-H8-tól, de itt is csak 26 bázis eltérés található az 1759-ből, ami 98,52 %-os azonosságot jelent. A PCV1 teljes nukleinsav szekvenciák alapján készített törzsfá a 11. ábrán látható.



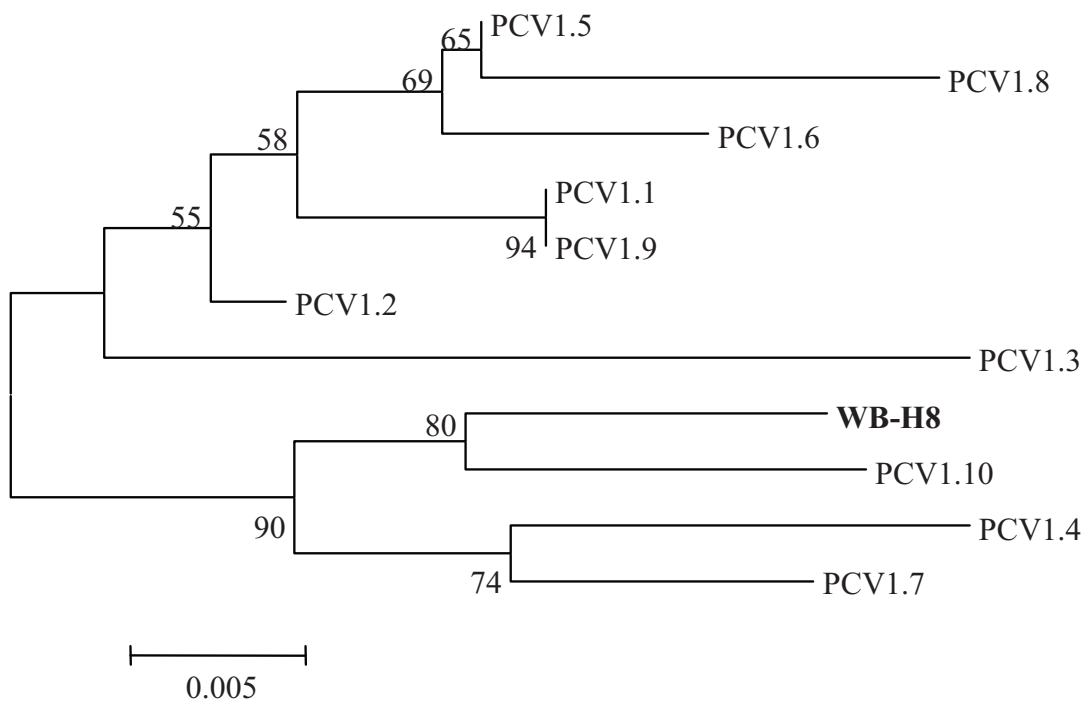
11. ábra. A WB-H8 genom filogenetikai összehasonlítása a GenBank-ban fellelhető PCV1 szekvenciákkal. A magyarországi vaddisznóból származó genom **félkövér** betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

A vaddisznóból származó PCV1 vírus replikációs fehérjéjének aminosav szekvenciája szintén az általunk PCV1.6-al jelölt PCV1 aminosav sorrendjétől különbözött leginkább. A 312 aminosavból álló fehérjén összesen 6 eltérés volt található, ez 98.08 %-os azonosságot jelentet. A legnagyobb azonosságot a PCV1.2-vel jelölt vírus replikációs fehérjéjével mutatta a WB-H8, ez 1 aminosav különbséget jelentett a 74-dik pozícióban, ami 99,68 %-os azonosság. Itt valamennyi szekvenciában megtalálható volt ez az eltérés (leucin helyett fenilalanin). A fehérje szekvenciák alapján készített törzsfá a 12. ábrán látható.

A WB-H8 kapszid fehérje, a teljes genomhoz hasonlóan, a PCV1.10 vírussal mutatott nagyfokú azonosságot. A két vírus 233 aminosavból álló kapszid fehérjeje mindössze 5 aminosavban tért el egymástól, és így 97.85 %-os azonosságot mutatott. A kapszid fehérje tekintetében a WB-H8 vírus a PCV1.3 vírustól különbözött a legnagyobb mértékben. A 233 aminosavból ez esetben is csak 13 tért el, ami 94.42 %-os azonosságot jelentett. Ezen fehérje szekvenciák alapján készített törzsfá a 13. ábrán látható.

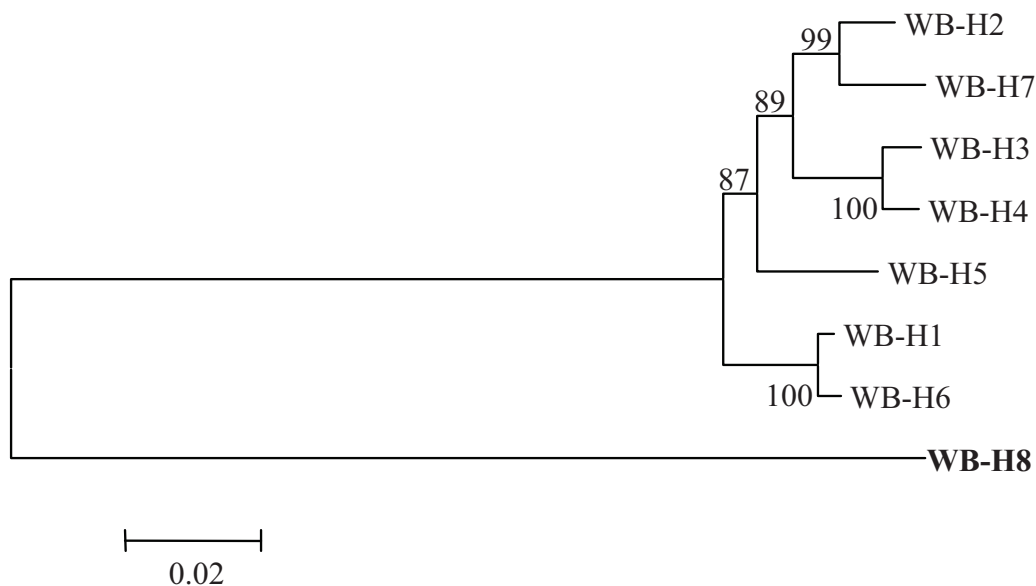


12. ábra. A WB-H8 replikációs fehérjéjének összehasonlítása a GenBank-ban fellelhető valamennyi PCV1 replikációs fehérjéjével. A magyarországi vaddisznóból származó genom **félkövér** betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

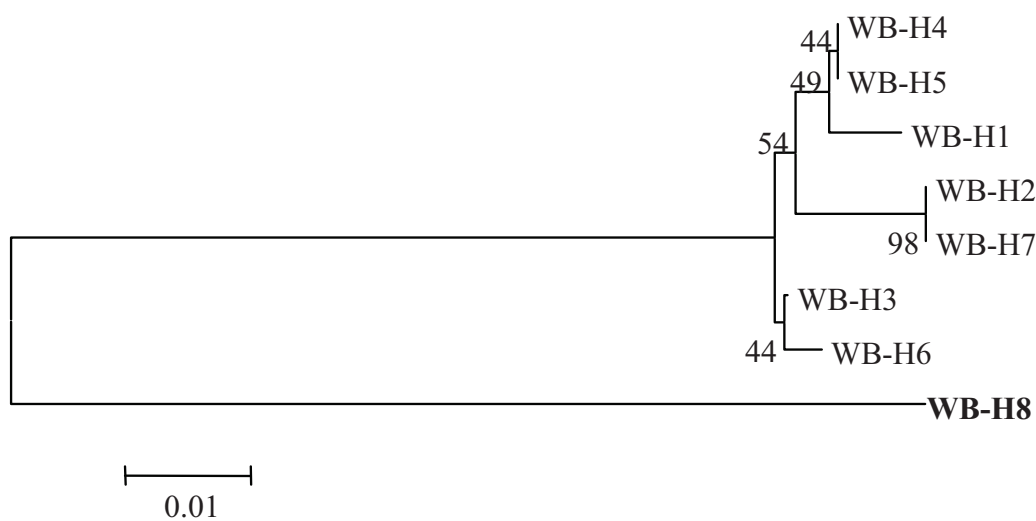


13. ábra. A WB-H8 kapszid fehérjéjének összehasonlítása a GenBank-ban fellelhető összes PCV1 kapszid fehérjéjével. A magyarországi vaddisznóból származó genom **félkövér** betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

A vaddisznókban található PCV2 szekvenciák jelentős különbséget mutattak a 46-os vaddisznó mintában talált PCV1 szekvenciához képest. A teljes genomok alapján a WB-H8 és a vaddisznókból származó PCV2 szekvenciák között 75,73 - 76,63 % volt a azonosság. A két vírus-típus teljes szekvenciája alapján készített törzsfát a 14. ábra mutatja.



14. ábra. A magyarországi vaddisznóból származó teljes PCV1 és PCV2 szekvenciák összehasonlítása. A vaddisznóból származó PCV1 genom **félkövér** betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

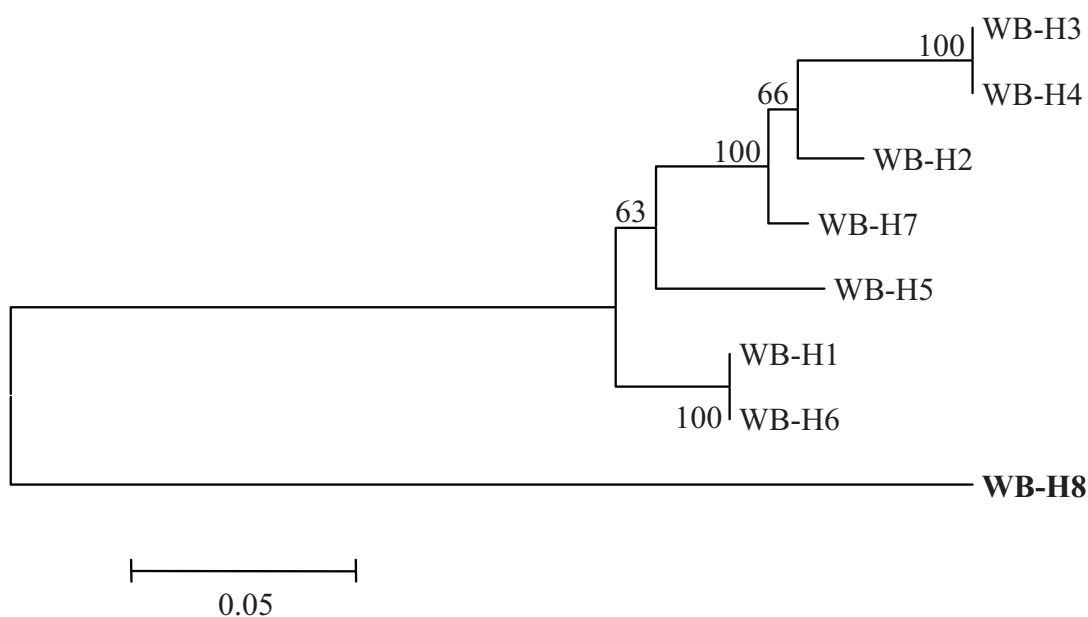


15. ábra. A magyarországi vaddisznóból származó PCV1 és PCV2 replikációs fehérjéinek összehasonlítása. A vaddisznóból származó PCV1 **félkövér** betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

A WB-H8 és a vaddisznókból származó PCV2 vírusok replikációs fehérjei között a teljes szekvenciához képest nagyobb azonosság volt kimutatható, szám szerint 85,40 – 86,35 %. Az ORF1 fehérje szekvenciák alapján készült törzsfát a 15. ábra mutatja.

A két vírus-típus között a kapszid fehérje tekintetében volt a legkisebb a azonosság, az aminosav sorrend mindössze a 64,68 – 67,66 %-ban egyezett meg a PCV1 és PCV2 vírusokban.

Az vaddisznókból származó circovírusok kapszid fehérje szekvenciái alapján készült törzsfát a 16. ábra mutatja.



16. ábra. A magyarországi vaddisznókból származó PCV1 és PCV2 kapszid fehérjeinek összehasonlítása. A vaddisznókból származó PCV1 félkövér betűvel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

5.4. A romániai PCV2 kimutatása

A romániai sertéstelepen 2002 májusában észleltek először sertés circovírusra utaló klinikai tüneteket. A 10-14 hetes korú állatok között nagyarányú „szétnövés”, súlyvesztés, lesóványodás volt megfigyelhető. Az állatok szőrzete sűrű lett és megvastagodott, nehezített légzés, sápadtság és hasmenés is kialakult az érintett malacokban. A választás utáni elhullás a betegség kitörése utáni első hónapban az eredeti 8,3 %-ról 16,3 % fölé emelkedett. A megbetegedett állatok száma csaknem megduplázódott, 10 %-ról 23 %-ra emelkedett.

A PMWS tünetei között elhullott állatok kórbonctani vizsgálata során sárgaság volt megfigyelhető, a nyirokcsomók (főleg a lágyéki és belfodri nyirokcsomók) jelentősen megnagyobbodtak, a tüdő nem esett össze. A vese tokja alatt szürkésfehér góccok voltak. A máj

sorvadt, tömött tapintatú volt, lépduzzanat és gyomorfekély egyaránt kialakult.

Kórszövettanilag a lépben súlyos fokú, a nyirokcsomókban közepes fokú limfocita depléció és elhalásos góccok alakultak ki. A tüdőben intersticiális pneumónia volt látható. A vesében nem gennyes intersticiális nefritisz volt megfigyelhető. A májban atrófia, nem gennyes kolangiohepatitisz alakult ki. Az érintett szervekben többmagvú óriássejtek mutatkoztak.

In situ hybridizációval PCV2 DNS-t lehetett kimutatni a limfociták és makrofágok citoplamájából, a vese glomerulusokban a Bowman-tok hámsejtjeiből és a tubuláris hámsejtekből (Rosell és mtsai., 1999, a vizsgálatot Dr. Deim Zoltán végezte a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatalban, Cadar és mtsai., 2007). A kórszövettani vizsgálatokat Trichrom Goldner festési eljárás után értékeltük (Muresan és mtsai., 1974, Kiernan 1990, a vizsgálatot Dr. Daniel Cadar végezte, Cadar és mtsai., 2007).

A sertéstelepen két évvel később, 2004 októberében észlelték az első PDNS tüneteit mutató sertést (PMWS tüneteit mutató állatok szintén voltak a farmon, de alacsonyabb arányban, mint 2 évvel korábban). A megbetegedési arány alacsony volt, a 3 és 6 hónapos kor közötti sertések közül csak 8 állat mutatott PDNS-re jellemző tüneteket. A bőrben, főként a hátulsó testfélen, a gáttájékon, a lábakon, a has és mellkas alján, valamint a füleken szabálytalan alakú, vérzéses bőrléziók alakultak ki, amelyek környezetükből kissé kiemelkedtek, sötétvörösek voltak.

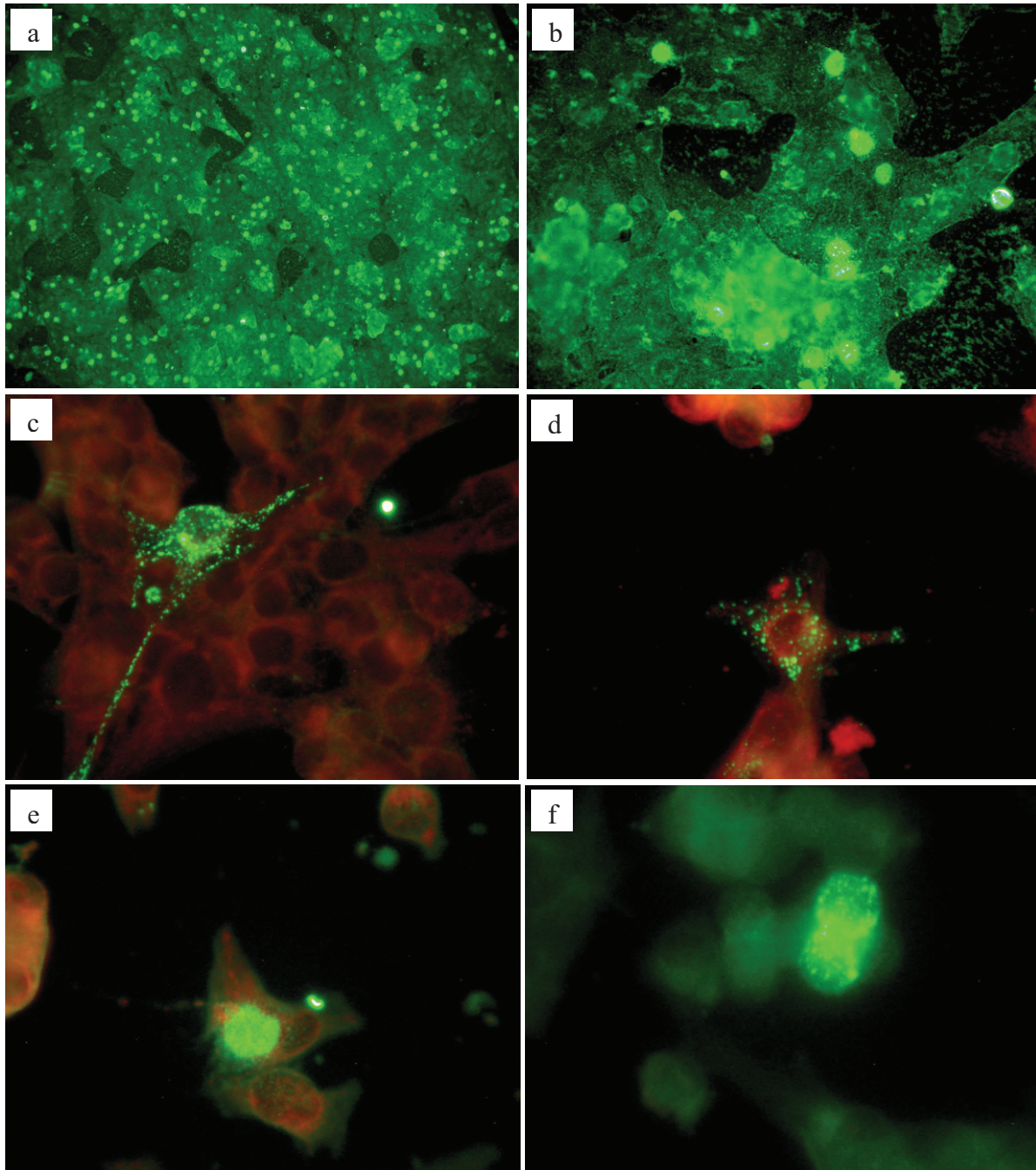
Kórbonctani vizsgálat során a vesék megnagyobbodtak, halvány színűek voltak, kéregállományukban peteciális vérzések alakultak ki. A nyirokcsomók szintén megnagyobbodtak, gyomorfekély és tüdőgyulladás is megfigyelhető volt.

Szisztémás elhalásos vaszkulitisz, a bőrben vérzések és elhalások voltak megfigyelhetőek kórszövettani vizsgálattal. A vesékben heveny, diffúz glomerulonefritisz, limfo-hisztiocitás intersticiális nefritisz, egy esetben tubuláris dilatációval és atrófiával kísért fibrózis alakult ki.

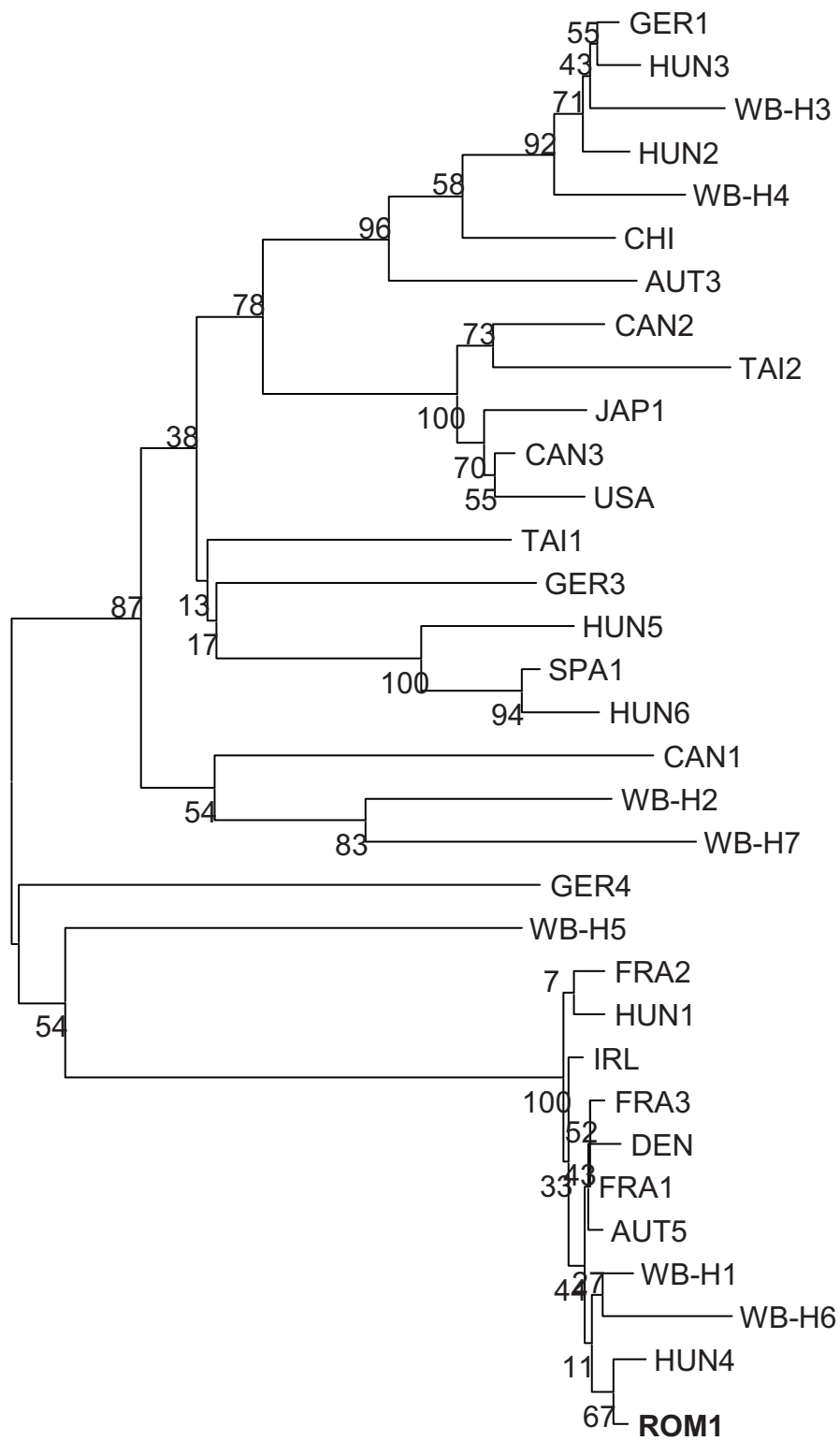
A PMWS és PDNS tüneteit mutató sertések vérsavójából PCV2-vel reagáló ellenanyag volt kimutatható (1. kép).

A szekvencia analízis alapján a PMWS és PDNS esetekből származó PCV2-k genetikailag 100 %-ig azonosak voltak. A genom mérete 1767 bázis (GenBank-i kódja: DQ233257).

A romániai PCV2 teljes genomot összehasonlítottuk az előzőekben vizsgált PCV2 teljes szekvenciákkal. A romániai vírus (ROM1) nagyfokú azonosságot mutatott a HUN4 vírussal, az 1767 bázis hosszúságú genomban mindössze 3 bázis különbség volt, ami 99,83 %-os azonosságot jelentett. A román PCV2-vel osztrák (AUT5), francia (FRA3, Fd16), valamint magyar vaddisznó izolátumok (WB-H1, WB-H6) is jelentős azonosságot mutattak (17. ábra). A román vírus a legnagyobb mértékben egy magyar vaddisznó izolátumtól (WB-H7) tért el, a két genom között 84 bázis eltérés volt, ami 95,25 %-os azonosság.



1. kép. PCV2-vel reagáló ellenanyag kimutatása a romániai PMWS és PDNS tüneteit mutató sertések vérsavójából, IIF módszerrel. Az „a” és „b” képeken a ROM1 vírustörzssel fertőzött sejtek láthatóak, kis nagyítással. A „c” és „d” képeken a vírusfehérjék a citoplazmában, az „e” képen a sejtmagban láthatók. Az „f” képen PCV2-vel fertőzött sejt osztódásának befejeződése közben látható.



17. ábra. A PCV2 teljes genom szekvenciák összehasonlítása a romániai házisertésekből származó PCV2 szekvenciákkal. A Romániából származó PCV2 (ROM1) genom **félkövér** betűkkel van jelölve. A GenBank-i kódokat a 6. táblázat tartalmazza.

5.5. A közép-kelet európai régióban, 2006-2007-ben jelen lévő PCV2 szekvenciák összehasonlítása a GenBank-ban közzétett szekvenciákkal

Megvizsgáltuk, hogy 2007-ben milyen PCV2 szekvenciák voltak jelen a közép-kelet európai régióban. Ehhez Magyarországról, Lengyelországból, Csehországból, Szlovákiából, Horvátországból és Romániából kaptunk mintákat (2. táblázat, 40. oldal). Meghatároztuk a mintákban található kettes típusú sertés circovírusok teljes szekvenciáját. Az összesen 37 minta vizsgálata során 34-ből a PCV2B genotípusú szekvencia volt kimutatható, és mindössze 2 magyar és 1 horvát szekvencia tartozott a hosszabb, PCV2A genotípusba.

Letöltöttük a GenBank-ban 2007. december 31-ig elérhető valamennyi PCV2 teljes genomot, illetve kapszid fehérjét kódoló ORF2 szekvenciát, és elemeztük, hogy a föld különböző térségeiben, különböző időpontokban izolált PCV2 teljes genomokhoz és ORF2 szekvenciákhoz hogyan viszonyulnak a Közép-Kelet Európából származó genomok. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a vírusokat a szekvencia analízis alapján csoportokra osztottuk.

A teljes genom alapján a PCV2A genotípust 5 (A/1, A/2, A/3, A/4, A/5), a PCV2B genotípust 7 (B/1, B/2, B/3, B/4, B/5, B/6, B/7) csoportba soroltuk (18. ábra). Az alábbi táblázatokban azt jeleztük, hogy csoportonként az adott kontinensen melyik évben hány PCV2 teljes genom volt.

Az általunk vizsgált 411 teljes genom közül 149 tartozott a B/1 csoportba (7. táblázat, 18. ábra). Ebbe a csoportba tartozott 2007-ben izolált 6 magyar, 2 lengyel, 2 román, 4 horvát, 8 cseh, 3 szlovák és öt 2006-os szlovák szekvencia, valamint szintén ide tartozott a 2003-ban izolált WB-H1, WB-H6, HUN4 és ROM1 szekvencia is (1. melléklet).

7. táblázat. B/1 csoport.

B/1	1999	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	-	24	23	-	5	35	88
Ázsia	-	2	7	17	8	2	22	58
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	3	-	3
Összes	1	2	31	40	8	10	57	149

A B/1 csoportba tartozó szekvenciák közül a SLO1 és CZE5, CZE6, CZE8 szekvenciák egy 2003-as kínai (AY291316), egy 2004-es dán (EF5653569) és egy 2005-ös kínai szekvenciával mutattak nagyfokú hasonlóságot. A CRO4, HUN17, valamint a CZE1, CZE2, CZE3, CZE4 szekvenciák egy 2007-es kínai (EU266593), valamint egy 2003-as (EF565361) és egy 2007-es (EU136713) dán szekvenciával csoportosultak. A CRO7 egy 2003-as holland (AY484409), valamint egy 2005-ös (AY969004) és egy 2007-es (EF524529) kínai szekvenciához hasonlított. A HUN15-ös szekvencia egy 2003-as holland (AY484415), két 2003-as francia

(AY321990, AY321991), valamint egy kínai (EF524528) és két 2006-os brazil (DQ923523, DQ923524) szekvenciával mutatott hasonlóságot. A CRO1 és SLO8 szekvenciák egy 2003-as (AY291318), hét 2004-es (AY641542, AY578327, AY604430, AY651850, AY682993, AY686764, AY579893) és öt 2007-es (EF524519, EF524520, EF524521, EU266597, EU266599) kínai szekvenciával csoportosult. A SLO2, SLO3, SLO4, SLO5, SLO6, valamint a ROM2 szekvenciák a 2003-as magyar HUN4 (AY256457) és román ROM1 (DQ233257) szekvenciákkal, valamint 2003-as francia (AY321997, AY321998) és holland (AY484416), 2002-es (AY181945) és 2004-es (AY682997) kínai szekvenciákkal mutattak nagyfokú hasonlóságot. Kisebb mértékben, de ezekhez hasonlított a SLO7 is. A HUN16, a HUN18 és a CZE7 szekvencia egy 2003-as (AY288134), két 2004-es (AY691679, AY536756) és egy 2005-ös (AM086384) kínai szekvenciához, valamint két 2003-as francia (AY321992, AY321993) szekvenciához hasonlított leginkább. A HUN12, HUN14, POL2, POL4, ROM3, valamint CRO3 szekvenciák a magyarországi vaddisznókból származó WB-H1 és WB-H6, illetve egy 2007-es (EF421973) kínai szekvenciával csoportosultak.

A közép-kelet európai régióból a B/2 csoportba csak egy magyar 2003-as, házisertésből származó genom tartozott (HUN1, AY256460). Európából kizárólag 2004 előtti, Ázsiából és Észak-Amerikából csak 2004 utáni szekvenciák tartoztak ide (8. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

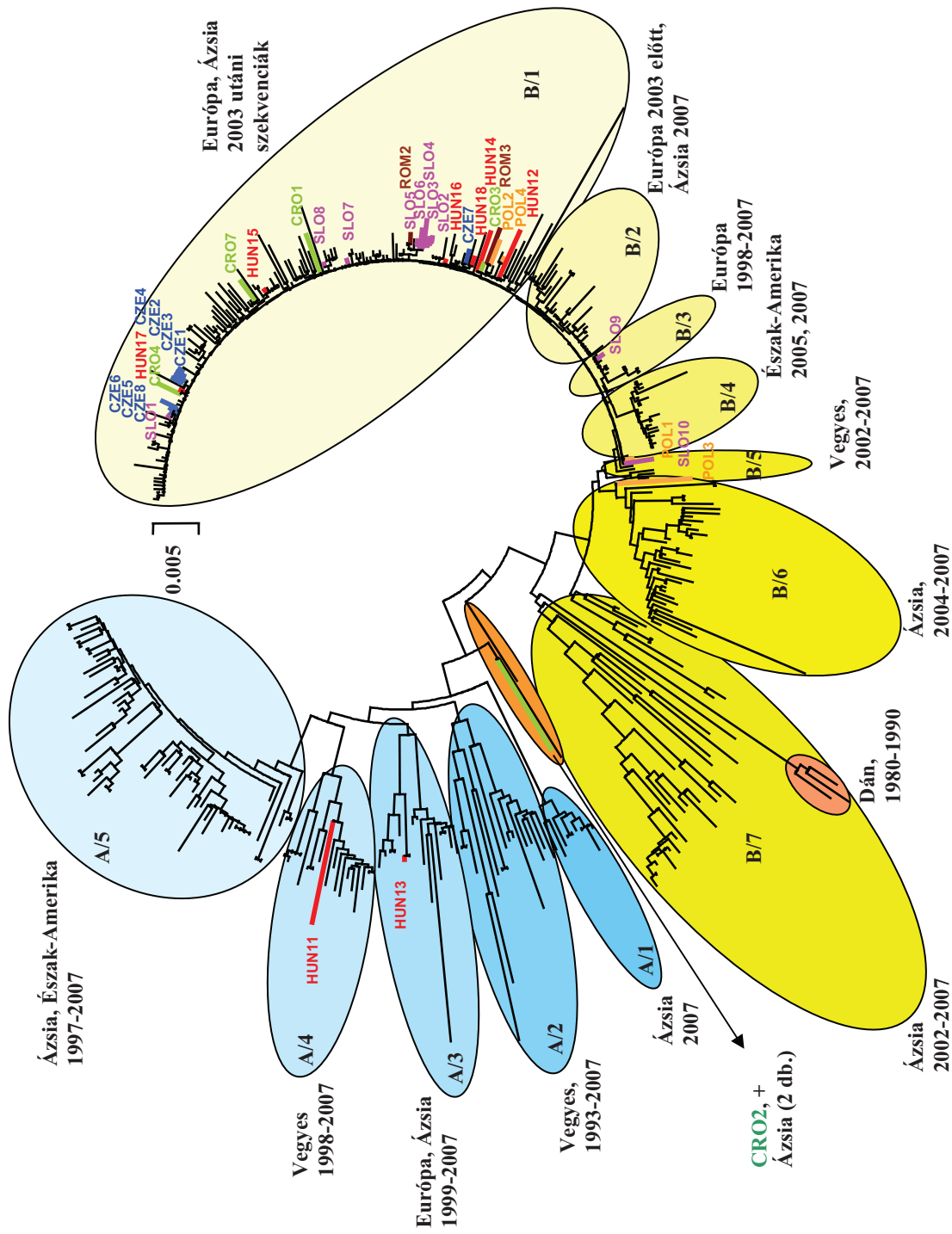
8. táblázat. B/2 csoport.

B/2	1998	1999	2003	2004	2005	2007	Összes
Európa	1	1	7	1	-	-	10
Ázsia	-	-	-	1	1	13	15
Észak-Amerika	-	-	-	-	2	2	4
Összes	1	1	7	2	3	15	29

A B/3 csoportba tartozott a SLO9, amely leginkább egy 2004-es dán (EF565357) és két 2003-as (AF321986, AF321984) francia szekvenciához hasonlít (9. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

9. táblázat. B/3 csoport.

B/3	1998	1999	2002	2003	2004	2007	Összes
Európa	1	3	-	3	1	1	9
Ázsia	-	-	1	-	-	-	1
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	1	1
Összes	1	3	1	3	1	2	11



18. ábra. A GenBank-ban 2007. december 31-ig megtalálható PCV2 teljes szekvenciák és a közép-kelet európai régióban előforduló PCV2 teljes szekvenciák alapján készített törzsfá. A közép-kelet európai régióban előforduló PCV2 teljes szekvenciák a következő színekkel vannak jelölve: magyar: piros, szlovák: lila, cseh: kék, román: barna, horvát: zöld, lengyel: narancs.

A B/4 csoportba csak az észak-amerikai kontinensről, 2005-ben és 2007-ben meghatározott szekvenciák tartoztak (10. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

10. táblázat. B/4 csoport.

B/4	2005	2007	Összes
Észak-Amerika	16	3	19

A B/5 csoportba tartozó POL1 szekvencia egy 2005-ös (DQ180392) kínai, valamint kisebb mértékben a SLO10 szekvenciára hasonlított (11. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

11. táblázat. B/5 csoport.

B/5	2002	2003	2005	2007	Összes
Európa	-	3	-	2	5
Ázsia	2	-	-	-	2
Észak-Amerika	-	-	1	-	1
Összes	2	3	1	2	8

A POL3 szekvencia ugyanakkor 36, túlnyomó többségében a 2007-ben izolált kínai szekvenciával mutatott nagyobb egyezőséget a B/6 csoportban (12. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

12. táblázat. B/6 csoport.

B/6	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	-	-	-	1	1
Ázsia	5	3	5	23	36
Összes	5	3	5	24	37

A B/7 csoport tagjai egymástól és a többi PCV2B genotípustól már nagyobb mértékben különböztek (18. ábra). Ebbe a csoportba tartozott néhány európai szekvencia, közöttük a 2003-ban magyar vaddisznóból izolált WB-H5, de döntően Ázsiából származó vírusok alkották ezt a csoportot (13. táblázat, 1. melléklet).

13. táblázat. B/7 csoport.

B/7	1980	1987	1990	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	1	1	-	3	1	-	-	-	7
Ázsia	-	-	-	2	2	9	7	1	10	31
Összes	1	1	1	2	5	10	7	1	10	38

Retrospektív vizsgálatokkal (Dupont és mtsai., 2008) dániai 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó mintákban talált PCV2 genomok szintén a B/7 csoportba sorolhatók, de azon belül

egy jól elkülöníthető ágat alkottak (18. ábra).

A PCV2A genotípusba tartozó szekvenciák közül a CRO2 egy PCV2B genotípusba tartozó 2007-es (EF524523) kínai, valamint egy PCV2A genotípusba tartozó szintén 2007-es (EF524518) kínai szekvenciához hasonlított, de ezek nem voltak egyik csoportba sem besorolhatók (18. ábra).

Az A/1 csoportba csak kínai szekvenciák sorolhatók, döntően 2007-ből (14. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

14. táblázat. A/1 csoport

A/1	2004	2007	Összes
Ázsia	1	8	9

Az A/2 csoport tagjai ugyanakkor a Föld csaknem minden részéről kimutathatók. Ide tartoztak a 2003-ban magyar vaddisznókból izolált WB-H2 és WB-H7 szekvenciák is (15. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet). Ebbe a csoportba tartoztak - a retrospektív vizsgálat során talált dániai (Dupont és mtsai., 2008) - az 1993-as (EU148506) és 1996-os (EU148507) szekvenciák is.

15. táblázat. A/2 csoport.

A/2	1993	1996	1998	1999	2001	2002	2003	2004	2007	Összes
Európa	1	1	-	1	-	-	2	-	1	6
Ázsia	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2
Észak-Amerika	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
Ausztrália	-	-	-	-	-	-	-	6	-	6
Összes	1	1	2	1	1	1	2	6	1	16

Az A/3 csoport tagja a HUN13, amely a 2003-ban izolált magyar HUN5 (AY256459) és HUN6 (AY256455), valamint az 1999-es spanyol (AF2001309, AF201308, AF201310) szekvenciákra hasonlított (16. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet). Ennek a csoportnak észak-amerikai tagja nincsen.

16. táblázat. A/3 csoport.

A/3	1999	2001	2002	2003	2007	Összes
Európa	3	-	-	2	1	6
Ázsia	2	3	4	-	-	9
Összes	5	3	4	2	1	15

Az A/4 csoportba tartozó HUN11 szekvencia a magyar vaddisznókból származó WB-H4 és WB-H3 szekvenciák mellett a 2003-as magyar HUN2 (AY256456), HUN3 (AY256458), 2003-as francia (AY322004), 1999-es német (AF201305, AF201306), 1998-as kanadai (AF109399) és

2005-ös amerikai (DQ870484) szekvenciákra hasonlított (17. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

17. táblázat. A/4 csoport.

A/4	1998	1999	2000	2001	2003	2004	2005	2007	Összes
Európa	-	2	-	-	8	-	-	1	11
Ázsia	-	-	-	1	1	-	-	-	2
Észak-Amerika	1	-	1	-	-	1	1	-	4
Összes	1	2	1	1	9	1	1	1	17

Az A/5 csoportban található vírusokat főleg 2003 előtt, Észak-Amerikában izolálták. Az első PCV2 szekvenciák is ide tartoztak. Ebben a csoportban európai szekvenciák nem találhatóak 2007. december 31-ig (18. táblázat, 18. ábra, 1. melléklet).

18. táblázat. A/5 csoport.

A/5	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2007	Összes
Ázsia	-	-	-	-	6	3	-	-	3	3	15
Észak-Amerika	4	10	3	5	6	6	1	2	2	4	43
Dél-Afrika	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Ausztrália	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Összes	4	10	3	5	12	9	2	3	5	7	60

A GenBank-ból 2007. december 31-ig a 411 teljes PCV2 szekvencia mellett 148 PCV2 ORF2 szekvencia volt letölthető. Elkészítettük és összehasonlítottuk valamennyi elérhető PCV2 kapszid fehérje feltételezett aminosav szekvenciáját. A könnyebb áttekinthetőség érdekében, a teljes genomokhoz hasonlóan, ez alkalommal is csoportokra osztottuk a vírusokat. A PCV2B genotípust és a PCV2A genotípust egyaránt 5-5 csoportba soroltuk a kapszid fehérje aminosav szekvenciája alapján.

A B/1ORF2 csoportba túlnyomó többségében 2003 után izolált, Európából és Ázsiából származó vírusok tartoztak (19. táblázat, 19. ábra, 1., 2. mellékletek). A csoport tagjait főként a teljes genom alapján is B/1 csoportba sorolt szekvenciák alkották, de a teljes genom alapján B/6 és B/7 csoportba tartozó szekvenciák is megtalálhatók voltak a B/1ORF2 csoportban (1., 2. mellékletek).

19. táblázat. B/1ORF2 csoport.

B/1ORF2	1999	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	-	22	25	1	6	52	107
Ázsia	-	2	5	32	21	13	37	110
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	9	1	10
Észak-Amerika	-	-	-	-	3	-	-	3
Összes	1	2	27	57	25	28	90	230

A csoport egy tagjának (HUN15) ORF2 aminosav sorrendjét a 20. ábra mutatja. Ehhez a szekvenciához hasonlítottuk az összes PCV2B genotípusba tartozó szekvenciát.

A közép-kelet európai régióban, 2007-ben izolált 37 genom közül 28 tartozott a B/1ORF2 csoportba. A 28 izolátum közül 16-nak 100 %-ig megegyezett a kapszid fehérje származtatott aminosav szekvenciája a HUN15 aminosav sorrendjével és további 95 európai és ázsiai szekvencia szintén 100 %-ig azonos volt ezekkel a szekvenciákkal (3. melléklet).

A CRO1, CRO4, CZE1, SLO2, SLO3, SLO4, SLO6, POL2, POL3, valamint a HUN12 és HUN18 szekvenciák is a B/1ORF2 csoportba tartoztak, de ezek néhány aminosavban eltértek a HUN15 szekvenciától és egymástól is (20. ábra, a SLO2 és SLO3 kapszid fehérjéjének aminosav szekvenciája azonos). A teljes genom alapján ezek a szekvenciák a B/1 csoportba tartoztak a POL3 kivételével, ez a szekvencia ugyanis a B/6 csoportba tartozott a teljes genomot tekintve.

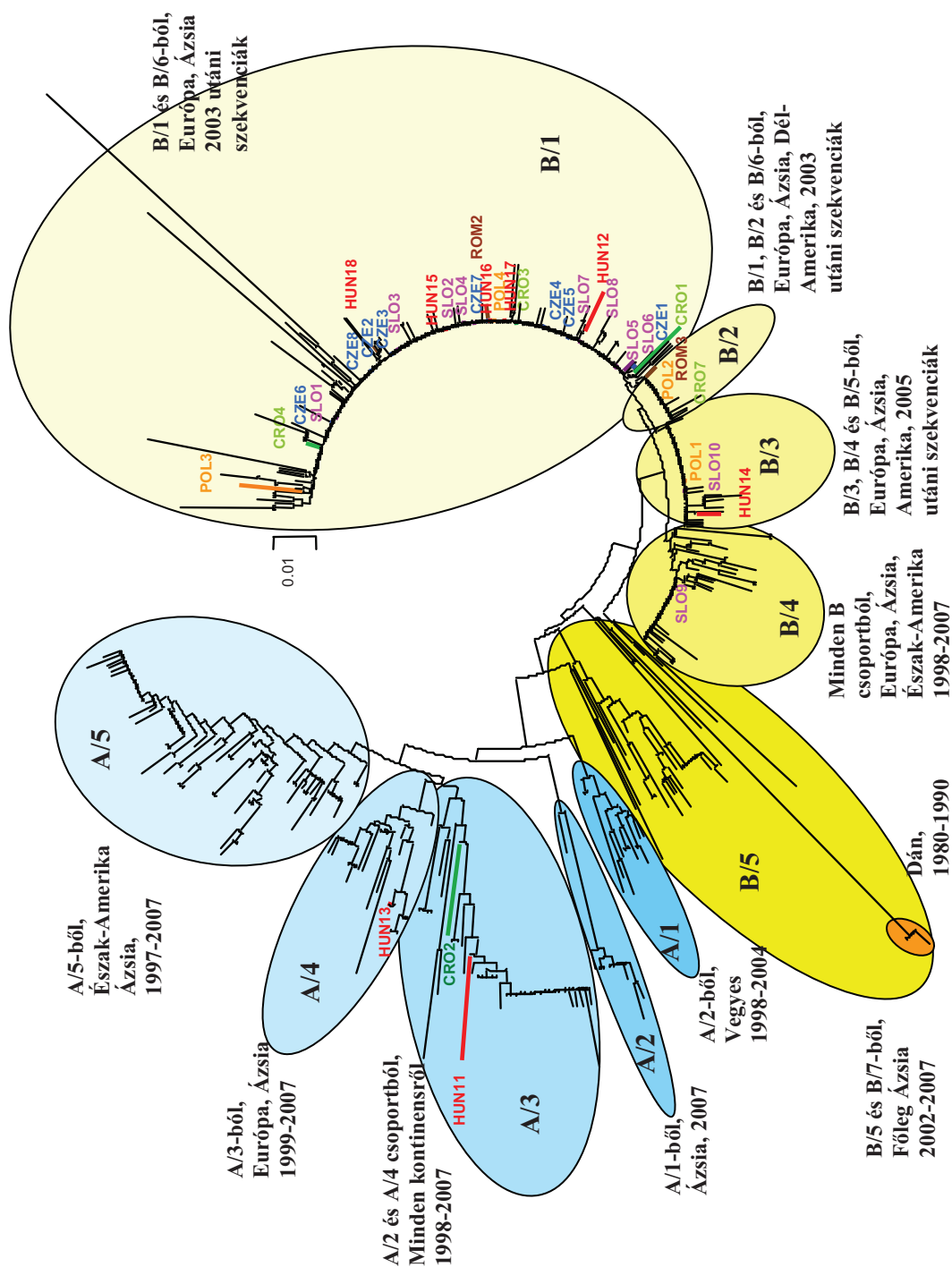
A POL2 szekvencia 100 %-os azonosságot mutatott 3 európai, 5 kínai és 8 brazil ORF2 aminosav szekvenciával (4. melléklet). Ezek a szekvenciák csak egy helyen különböztek a HUN15 szekvenciától (20. ábra).

A B/2ORF2 csoportba 2003 után izolált európai, ázsiai és dél-amerikai vírusok tartoztak (19. ábra, 20. táblázat). A teljes genom alapján ezeket a szekvenciákat a B/1, B/2 és B/6 csoportba tudtuk sorolni (1. és 2. mellékletek).

20. táblázat. B/2ORF2 csoport.

B/2ORF2	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	2	-	-	3	6
Ázsia	1	1	5	1	5	13
Dél-Amerika	-	-	-	7	-	7
Összes	2	3	5	8	8	26

Ebbe a csoportba tartozott a ROM3 és a CRO7 szekvencia is. Ezek a szekvenciák csak 2 aminosavban térnek el a HUN15-től (20. ábra). A CRO7 vírus ORF2 aminosav sorrendjével 3 európai (EF371528, EF371529, EF371533) és egy ázsiai (AY885225) szekvencia 100 %-os egyezést mutatott.



19. ábra. A GenBank-ban 2007. december 31-ig megtalálható PCV2 kapszid fehérje szekvenciák és a közép-kelet európai régióban előforduló PCV2 kapszid fehérje szekvenciák alapján készített törzsfa. A közép-kelet európai régióban előforduló PCV2 fehérje szekvenciák a következő színekkel vannak jelölve: magyar: piros, szlovák: lila, cseh: kék, román: barna, horvát: zöld, lengyel: narancs.

HUN15	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115
CRO4
SLO6
CZE1
SLO2
HUN18
SLO4
HUN12
POL3
CRO1
POL2
ROM3
CRO7
SLO10
HUN14
SLO9
HUN15	125	135	145	155	165	175	185	195	205	215	225	233
CRO4
SLO6
CZE1
SLO2
HUN18
SLO4
HUN12
POL3
CRO1
POL2
ROM3
CRO7
SLO10
HUN14
SLO9

20. ábra. A Közép–Kelet Európából származó, PCV2B genotípusba tartozó vírusok kapszid fehérje aminosav szekvenciáinak összehasonlítása. Az ábra csak azokat a szekvenciákat mutatja, amelyek különböznek egymástól. A pontok a HUN15 szekvenciával azonos aminosav jelölnek. Az eltérések az aminosav kódjával vannak jelölve.

A HUN14, SLO10 és POL1 vírusok a B/3ORF2 csoportba tartoztak (19. ábra, 21. táblázat). A SLO10 és POL1 vírusok kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája 100 %-ig azonos volt és csak egy helyen tért el a HUN15 szekvenciától (20. ábra). A HUN14 és HUN15 vírusok kapszid fehérjéi között 3 aminosav különbség volt (20. ábra).

21. táblázat. B/3ORF2 csoport.

B/3ORF2	2002	2005	2006	2007	Összes
Európa	-	-	-	3	3
Ázsia	2	2	2	5	11
Dél-Amerika	-	-	-	1	1
Észak-Amerika	-	28	-	10	38
Összes	2	30	2	19	53

A B/3ORF2 csoportba tartozó 53 szekvenciából 36-nak egyezett meg az ORF2 aminosav szekvenciája a SLO10 és POL1 vírusokéval (5. melléklet). Ezek a szekvenciák Ázsiából, Észak-Amerikából és Argentínából származtak, és mindegyiket 2005 után izolálták.

A B/3ORF2 csoportot alkotó izolátumok a teljes genom alapján a B/1, B/3, B/4, B/5, B/6 és B/7 csoportok között oszlottak meg (1. és 2. mellékletek).

A SLO9 vírus a kapszid fehérje aminosav szekvenciája alapján a B/4ORF2 csoportba tartozott és két aminosavban tért el a HUN15 vírustól (20. ábra). A csoportban Európából elsősorban 2004 előtti, Ázsiából és Észak-Amerikából leginkább 2004 utáni izolátumok voltak (22. táblázat).

22. táblázat. B/4ORF2 csoport.

B/4ORF2	1998	1999	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	2	4	-	14	2	-	-	1	23
Ázsia	-	-	1	1	2	4	1	20	29
Észak-Amerika	-	-	-	-	-	3	-	7	10
Összes	2	4	1	15	4	7	1	28	62

A teljes genom alapján minden csoportból található volt szekvencia a B/4ORF2 csoportban (1. és 2. mellékletek).

A B/4ORF2 csoportba tartozó 62 szekvencia közül 17-nek 100 %-ig megegyezett a kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája a SLO9 izolátumával (6. melléklet).

A B/5ORF2 csoportba tartozó szekvenciák egymástól és a többi PCV2B genotípustól nagymértékben különböztek (19. ábra). Ezeket a szekvenciákat azért soroltuk egy csoportba, mert

tagjai más csoportokba nem sorolhatók, és sok kis csoport létrehozása sem célszerű.

Ide tartozott néhány európai szekvencia, közöttük a 2003-ban magyarországi vaddisznóból izolált WB-H5, de döntően Ázsiából származó vírusok vannak ebben a csoportban (23. táblázat), többek között egy 2007-es kínai szekvencia is (EF524523), amely a teljes genom alapján nem volt besorolható egyik csoportba sem. Az 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó dániai PCV2 genomok is a B/5ORF2 csoportba tartoztak (19. ábra).

23. táblázat. B/5ORF2 csoport.

B/5ORF2	1980	1987	1990	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	1	1	-	2	1	-	-	-	6
Ázsia	-	-	-	2	2	9	6	2	10	31
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Összes	1	1	1	2	4	10	6	3	10	38

A PCV2A genotípusba tartozó vírusok a kapszid fehérjék aminosav szekvenciái alapján hasonlóan csoportosultak, mint a nukleotid szekvenciáik alapján.

A származtatott aminosav szekvenciák alapján a PCV2A genotípusba tartozó vírusok között jóval nagyobb különbségek voltak, mint a PCV2B genotípusba tartozó vírusok között. Ez alól a B/5ORF2 csoport kivétel, mivel az ide tartozó aminosav szekvenciák között jelentősebb különbségek voltak (19. ábra).

Az A/1ORF2 csoportot a teljes genom alapján A/2 csoportba sorolt szekvenciák alkották (1. és 2. melléklet). Valamennyi kontinensről származtak szekvenciák ebben a csoportban, de csak 2004 előtt leírtak (24. táblázat).

24. táblázat. Az A/1ORF2 csoport.

A/1ORF2	1993	1998	2001	2003	2004	Összes
Európa	1	-	-	2	-	3
Ázsia	-	-	1	-	-	1
Észak-Amerika	-	2	-	-	-	2
Ausztrália	-	-	-	-	6	6
Összes	1	2	1	2	6	12

Az A/2ORF2 csoportot egy svéd ORF2 aminosav szekvenciát kivéve (EF184225), döntően 2007-ben izolált kínai szekvenciák alkották (25. táblázat). Ezek a vírusok a teljes genom szerint az A/1 csoportba tartoztak (1. és 2. melléklet).

25. táblázat. Az A/2ORF2 csoport.

A/2ORF2	2004	2006	2007	Összes
Európa	-	1	-	1
Ázsia	1	-	7	8
Összes	1	1	7	9

Az A/3ORF2 csoportban döntően európai szekvenciák voltak, de minden kontinensen azonosítottak ide tartozó vírusokat (26. táblázat).

Az A/3ORF2 csoportba tartozott a HUN11 és CRO2 szekvencia. Szintén ide tartoztak a magyar vaddisznókból származó WB-H2, WB-H3, WB-H4 és WB-H7 mellett a 2003-as magyar HUN2 (AY256456) és HUN3 (AY256458) szekvenciák is.

Ezek a szekvenciák a teljes genom alapján az A/3 és A/4 csoportokba tartoztak (1. és 2. mellékletek) a CRO2 kivételével, ugyanis a CRO2 szekvencia a teljes genom alapján nem volt besorolható egyik csoportba sem.

A CRO2 kapszid fehérjéjének aminosav szekvenciája 13 helyen tért el HUN11 vírusétól (21. ábra).

26. táblázat. Az A/3ORF2 csoport.

A/3ORF2	1996	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	-	2	-	-	-	12	1	-	1?	6?	23
Ázsia	-	-	-	-	1	1	1	-	-	2	-	5
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5
Észak-Amerika	-	1	-	1	-	-	-	1	1	-	-	4
Összes	1	1	2	1	1	1	13	2	1	8	6	37

?: a közleményből (Timmusk és mtsai., 2008) nem derül ki pontosan, hogy a minta melyik évből származik.

Az A/4ORF2 csoportot kizárólag európai és ázsiai genomok alkották (27. táblázat). Ide tartoztak a HUN13 mellett a 2003-ból származó magyar HUN5 (AY256459) és HUN6 (AY256455) vírusok is.

27. táblázat. Az A/4ORF2 csoport.

A/4ORF2	1993	1999	2001	2002	2003	2004	2007	Összes
Európa	2	4	-	-	4	1	3	14
Ázsia	-	2	3	4	-	-	-	9
Összes	2	6	3	4	4	1	3	23

A HUN13 kapszid fehérjéjének aminosav szekvenciája 18 helyen tér el a HUN11 vírusétól (21. ábra). Ezek a szekvenciák a teljes genom alapján az A/2 és A/3 csoportokba tartoztak (1. és 2. mellékletek).

	5	15	25	35	45	55
HUN11	MTYPRRRFR	RRHRPRSHLG	QILRRRPWL	HPRHRYRWR	KNGIFNARLS	RTFGYTVKAT
HUN13LT
CRO2YTI.R
HUN15YTI.R

	65	75	85	95	105	115
HUN11	TVSTPSWSVD	MLRFNLDDFV	PPGGGTNKIS	IPFEYYRIRK	VKVEFWPCSP	ITQGDRGVGS
HUN13	..R...A..	.M..KI...
CRO2	..K...A..	.G....A..
HUN15	..K...A..	.M...IN..LS.PR.	V.....

	125	135	145	155	165	175
HUN11	SAIILDDNFV	MKVPAQTYDP	YVNYSSRHTI	TQPFYSYHSRY	FTPKPVL DST	IDYFQPNNKR
HUN13	T.V.....F	P.ST.L....
CRO2	I.AT.....	P.....
HUN15	..V.....	T.AT.L....

	185	195	205	215	225	
HUN11	NQLWMRLQTS	RNVDHVLGT	AFENSKYYQD	YNIRVTMYVQ	FREFNLKDPP	LKP*
HUN13L....	A.....I.D..*
CRO2D..*
HUN15L....A	G.....I.D.EN.*

21. ábra. A Közép-Kelet Európából származó, PCV2A genotípusba tartozó szekvenciák aminosav sorrendjének összehasonlítása. A pontok a HUN11 szekvenciával azonos aminosavat jelölnek. Az eltérések az aminosav kódjával vannak jelölve. Az alsó sorban a PCV2B genotípusba tartozó HUN15 kapszid fehérjéjének aminosav szekvenciája látható, a két genotípus közötti különbségek szemléltetése céljából.

Az A/5ORF2 csoportban Európán kívül minden földrésről található szekvenciák (28. táblázat). Ez a csoport megfelel a teljes genom alapján felállított A/5 csoportnak (1. és 2. mellékletek). Ide tartozott egy, a teljes genom alapján nem besorolt 2007-es kínai vírus is (EF524518).

28. táblázat. Az A/5ORF2 csoport.

A/5ORF2	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2007	Összes
Ázsia	-	-	-	-	6	3	-	2	3	4	18
Észak-Amerika	4	10	3	5	6	8	1	2	2	8	49
Ausztrália	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Dél-Afrika	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Összes	4	10	3	5	12	11	2	5	5	12	69

A PCV2A genotípusba tartozó szekvenciák az észak-amerikai kontinensen közel azonos mértékben voltak jelen a járvány kezdete óta, amíg Európában kezdetben ez a genotípus uralkodott, de 2007-re jelentősen visszaszorult a PCV2B genotípussal szemben (29., 30. táblázatok).

Európa nyugati részén 2000 előtt még közel azonos arányban izolálták a kétféle genotípust, 2003 után azonban a PCV2B genotípus vált dominánssá. Európa közép-keleti térségében 2003-ban még a PCV2A genotípusból volt több a GenBank-i adatok alapján, de 2007-re itt is megfordult az arány, és a minták túlnyomó többségéből a PCV2B genotípust lehetett kimutatni (29., 30. táblázatok).

Ázsiában is az európaihoz hasonló folyamatok voltak megfigyelhetők a két genotípus elterjedtségének változásában (29., 30. táblázatok). Ugyan szám szerint több PCV2A genotípust találtak 2007-ben, mint az azt megelőző években, de a vizsgált mintaszám is lényegesen nagyobb, így a PCV2B genotípusba tartozó szekvenciák száma jelentősen meghaladta a PCV2A genotípusba tartozó szekvenciákét (29., 30. táblázatok).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy 2008 januárjában, a magyarországi vaddisznókban milyen PCV2 genotípusok voltak jelen. A vizsgált 90 mintából 40 esetben volt kimutatható PCV2 a CSZ2-CBB2 primerpárral. A 40, PCV2 pozitív mintából 16-ot részlegesen szekvenáltunk a CSZ2 primerrel. A részleges szekvenciák alapján megállapítható, hogy a 16-ból 15 szekvencia a PCV2B, egy pedig a PCV2A genotípusba tartozott.

29. táblázat. A PCV2B genotípusának elterjedtsége.

PCV2B	1980	1987	1990	1998	1999	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	1	1	1	2	5	-	39	30	1	6	59	145
Ázsia	-	-	-	-	-	7	9	44	38	19	77	194
Észak-Amerika	-	-	-	-	-	-	-	-	34	-	17	51
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	2	19
Összes	1	1	1	2	5	7	48	74	73	42	155	409

30. táblázat. A PCV2A genotípusának elterjedtsége.

PCV2A	1993	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Összes
Európa	3	1	-	-	6	-	-	-	18	2	-	2	9	41
Ázsia	-	-	-	-	2	-	11	8	1	3	3	2	11	41
Észak-Amerika	-	-	4	13	3	6	6	8	1	3	3	-	8	55
Dél-Amerika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5
Ausztrália	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	7
Dél-Afrika	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Összes	3	1	4	13	11	6	17	16	21	15	6	9	28	150

5.6. Egér fertőzési kísérletek eredményei

Az egerekkel végzett kísérleteink során a román vírus sejthez adaptált változatával (ROM1 vírustörzs) fertőztük az állatokat.

Patogenitási vizsgálat: Ebben a kísérletben az egereket 2 hetes időközzel, 3 alkalommal oltottuk hasüregbe a ROM1 vírustörzssel. A harmadik oltás után 14 nappal exterminált egerek klinikailag tünetmentesek maradtak és kórbonctani elváltozást sem mutattak. A csecsemőmirigyből, csontvelőből, lépből, veséből és májból egyaránt sikerült vírus-DNS-t kimutatni (31. táblázat).

31. táblázat. A patogenitás vizsgálat eredményei.

1. kísérlet	Csecsemőmirigy	Csontvelő	Lép	Vese	Máj
1. egér	-	-	+	-	-
2. egér	+	+	+	+	-
3. egér	+	+	-	-	+
4. egér	+	+	+	-	+
Kontroll 1. egér	-	-	-	-	-
Kontroll 2. egér	-	-	-	-	-

Vírusreplikáció vizsgálata: Ebben a kísérletben egy alkalommal oltottuk az egereket hasüregbe a ROM1 vírustörzssel. Az oltást követően és utána a kísérlet végéig minden egér klinikailag tünetmentes maradt, és kórbonctani elváltozás sem volt megfigyelhető. Oltás után 2 naponként extermináltunk 4-4 egeret. A második nap kimutatható volt a vírus-DNS, de a negyedik nap egyetlen szerv sem adott pozitív reakciót. A hatodik naptól ismét volt kimutatható vírus-nukleinsav egy-egy szervből, de a vizsgált szervek többsége a 12-dik naptól vált PCR-rel pozitívvá (32. táblázat).

Vírusürítési vizsgálat 1.: Ez esetben 4 hasüregbe oltott egér közé az oltást követő 6-dik napon 4 oltatlan egeret tettünk. A kísérlet végéig minden egér klinikailag tünetmentes maradt, és később kórbonctani elváltozás sem volt megfigyelhető. A hasüregbe fertőzött egerekből, valamint az általunk nem fertőzött egerek közül kettőből sikerült a ROM1 vírustörzset kimutatni PCR-rel (33. táblázat). Az oltás után 42 nappal még mindig ki lehetett mutatni a vírust.

Vírusürítési vizsgálat 2: 18 egeret fertőztünk szájon át a ROM1 vírustörzssel. A fertőzést követő 12-dik napon 6 egeret tettünk a fertőzött egerek közé (kontakt egerek). A kísérlet végéig minden egér klinikailag tünetmentes maradt, és kórbonctani elváltozás sem volt megfigyelhető. Az általunk szájon át fertőzött 18 egér közül 11-ből (34. táblázat), valamint az általunk nem fertőzött 6 egér közül 5-ből sikerült a ROM1 vírustörzset kimutatni PCR-rel (35. táblázat).

32. táblázat. A vírusreplikáció vizsgálatának eredményei.

R	Egér kód	Nyirokcsomó	Csecsemő- mirigy	Csontvelő	Lép	Vese	Máj
2. nap	R1	+	-	+	-	-	+
	R2	-	+	-	-	-	-
	R3	-	+	-	+	+	+
	R4	-	-	+	-	+	+
4. nap	R5	-	-	-	-	-	-
	R6	-	-	-	-	-	-
	R7	-	-	-	-	-	-
	R8	-	-	-	-	-	-
6. nap	R9	-	-	-	-	-	-
	R10	-	-	-	-	-	+
	R11	-	-	+	-	-	-
	R12	+	-	+	-	-	-
8. nap	R13	-	-	+	-	-	-
	R14	-	-	+	-	-	-
	R15	-	-	+	-	-	-
	R16	-	-	+	-	-	+
10. nap	R17	-	-	+	-	-	-
	R18	-	-	+	-	-	-
	R19	-	-	+	-	-	-
	R20	-	-	+	-	+	-
12. nap	R21	-	-	+	-	-	-
	R22	+	-	-	+	+	+
	R23	-	-	-	+	-	-
	R24	-	-	+	+	-	-
14. nap	R25	-	+	+	+	-	+
	R26	-	-	-	+	+	+
	R27	+	-	+	+	+	+
	R28	-	-	+	+	+	+

33. táblázat. Az első vírusürítési vizsgálat eredményei.

Nap	Egér kód	Nyirokcsomó	Csecsemő- mirigy	Csontvelő	Lép	Vese	Máj
24. nap	RIP1	+	-	-	-	-	+
	RIP2	-	-	-	-	+	+
24. (18.) nap	NF1	-	-	-	-	-	-
	NF2	-	-	-	+	+	-
28. (22.) nap	NF3	-	-	-	-	-	-
	NF4	+	+	-	+	+	-
42. nap	RIP3	-	-	-	-	-	+
	RIP4	+	-	-	+	-	+

RIP: ROM1 vírustörzssel intraperitoneálisan fertőzött egér
 NF: általunk mesterségesen nem fertőzött egér

34. táblázat. A második vírusűrítési vizsgálat eredményei. Szájon át fertőzött egerek.

Nap	Egér kód	Nyirokcsomó	Csecsemő- mirigy	Tüdő	Lép	Vese	Máj	Bél
12. nap	R1	-	-	-	-	+	+	-
	R2	-	-	-	-	-	+	-
	R3	-	-	-	-	-	-	-
	R4	-	-	-	-	+	-	-
	R5	+	-	+	-	-	-	-
	R6	-	-	-	-	-	-	-
19. nap	R7	-	-	-	-	-	+	-
	R8	-	-	-	-	-	-	+
	R9	-	-	-	-	-	-	-
	R10	-	-	-	-	-	-	-
	R11	-	-	-	-	-	-	-
	R12	-	-	-	-	-	-	-
26. nap	R13	-	-	-	-	-	-	-
	R14	-	-	-	+	+	+	-
	R15	-	-	-	+	+	+	-
	R16	-	-	-	-	-	+	-
	R17	-	-	-	-	+	+	-
	R18	-	-	-	-	-	+	-

35. táblázat. A második vírusűrítési vizsgálat eredményei. Kontakt egerek.

Nap	Egér kód	Nyirokcsomó	Csecsemő- mirigy	Tüdő	Lép	Vese	Máj	Bél
15. nap	R19	-	-	-	-	+	+	-
	R20	-	-	-	-	-	+	-
	R21	-	-	-	-	-	+	-
18. nap	R22	-	-	-	-	-	-	-
	R23	-	-	-	-	+	-	-
	R24	+	-	-	-	-	-	-

A szájon át fertőzött egerektől naponta bélsár és vizelet mintákat gyűjtöttünk, a fertőzést követő 24-dik napig. A bélsárból a 14-dik napon, a vizeletből a 22-dik napon sikerült csak 1-1 alkalommal kimutatni a vírust.

Egerekkel végzett kísérleteink során egyetlen egérből sem sikerült sertés circovírussal reagáló ellenanyagot kimutatnunk az általunk használt IIF módszerrel.

6. Megbeszélés

6.1. A 2002 és 2003 közötti, magyarországi vaddisznókból származó PCV szekvenciák elemzése

Az első PMWS tünetei között megbetegedett sertéseket Magyarországon először 1999-ben diagnosztizálták (Kiss és mtsai., 2000). Kezdetben a betegség előfordulása sporadikus volt (Dán és mtsai., 2003), de a PCV2 néhány hónap leforgása alatt gyakorlatilag az összes magyarországi nagyüzemi sertésállományban megjelent. Annak ellenére, hogy a vírus világszerte széles körben elterjedt, kevés adat áll rendelkezésre a PCV2 vadon élő állatokban való előfordulásáról, és ezek is elsősorban szerológiai adatok. Néhány genetikai alapon végzett járványtani vizsgálat azért ma is rendelkezésre áll, 8 szlovén vaddisznóból (Toplak és mtsai., 2004), egy németországi vaddisznóból és egy keresztezett állatból (Schulze és mtsai., 2004) származó vírust mutattak ki PCR-rel. Elsősorban részleges szekvenciák állnak rendelkezésre vaddisznókból, csak egyetlen német vaddisznóból származó teljes PCV2 genom található a GenBank-ban, amelyet GER4-ként jelöltünk.

Jelen tanulmány eredményei bebizonyították, hogy PCV1 és PCV2 egyaránt jelen van a magyar vaddisznó állományban. A PCV2 előfordulási aránya a vizsgált mintákban 20,5 %, ami kismértékben alacsonyabb, mint a hasonló módszerrel vizsgált szlovén vaddisznó állományban, ahol a minták 25 %-ából mutattak ki PCV2-t (Toplak és mtsai., 2004). A magyar populáció kisebb fertőzöttsége ugyan nem zárható ki, azonban a különbség abból is adódhat, hogy a szlovén tanulmányban lényegesen kisebb mintaszámmal dolgoztak. Szerológiai felmérések alapján szintén magasabb PCV2 fertőzöttség volt megállapítható az 1999 és 2005 között vizsgált cseh vaddisznókban (43 %, Sedlak és mtsai., 2008), valamint a 2000 és 2003 között vizsgált spanyol vaddisznókban (48 %, Vicente és mtsai., 2004), de a szerológiai vizsgálat és a PCR vizsgálat közvetlenül nem feleltethető meg egymással.

A PCV2-t világszerte több országban leírták házisertésekből és ezen genom szekvenciák elérhetők a GenBank-ban. A különböző országokból, közöttük Magyarországról és Ausztriából származó PCV2 teljes genomokat hasonlítottunk össze a magyar vaddisznókból származó PCV2 teljes genomokkal. Nem találtunk vaddisznó specifikus szekvenciát, azonban a WB-H5 és a GER4-ként jelölt vaddisznóból származó PCV2 külön csoportot képeztek, ha a teljes genomot nézzük, és akkor is, ha a kapszid fehérjét vizsgáljuk. A konzervatívabb replikációs fehérje aminosav szekvenciája alapján azonban a WB-H5 vírus két magyar házisertésekből izolált PCV2 (HUN5 és HUN6) vírussal és egy vaddisznóból származó (WB-H4) vírussal mutatott nagyfokú hasonlóságot.

A WB-H1-WB-H7 vírusok a teljes genom, a replikációs fehérje és a kapszid fehérje alapján készített törzsfákon is eltérő csoportokat alkottak (10. ábra). A teljes genom és a kapszid fehérje aminosav szekvenciája alapján a vírusok hasonló csoportokat alkottak, amíg a replikációs fehérje aminosav szekvenciája alapján készített törzsfán a vírusok ezektől eltérően csoportosultak. A szekvenciabeli különbség egyik esetben sem volt elég nagy további következtetések levonására, de az valószínűtlen, hogy önmagában csak a mutáció eredményezett ilyen különbségeket. Feltételezésünk szerint a vírusok közötti rekombináció eredményezhette a teljes genom, illetve kapszid fehérje alapján készített törzsfákon és a replikációs fehérjék alapján készített törzsfán a vírusok eltérő csoportosulását. A rendelkezésünkre álló adatok alapján elsőként jeleztük a rekombináció PCV2 evolúciójában játszott szerepének lehetőségét, amit később igazoltak (Ma és mtsai., 2007, Hesse és mtsai., 2008).

A PMWS-t túlnyomórészt házisertésekkel kapcsolatban írták le. A betegséget európai vaddisznókban is diagnosztizálták, amikor a vaddisznó kapcsolatba került a nagyüzemi sertésállománnyal, vagy amikor nagyüzemi körülmények között tartottak vaddisznókat (Schulze és mtsai., 2004, Ellis és mtsai., 2003, Vicente és mtsai., 2004). A klinikai PMWS ritka előfordulása vaddisznókban felveti a kérdést, hogy ezek az állatok kevésbé fogékonyak a fertőzésre, vagy magára a betegségre, vagy kisebb a fertőzöttség, mint házisertésekben. Lehetséges, hogy a klinikai tünetek, vagy elhullások, kórbonctani elváltozások észrevétlenek maradnak, mert a beteg állatok is folyamatosan kóborolnak, és könnyen esnek ragadozók áldozatául, illetve az elhullott állatokat felfalják egyéb vadállatok. Becslések szerint, az elmúlt években Magyarországon a vaddisznóállomány folyamatosan növekszik, valószínűsítve, hogy a vaddisznókban a PCV2 fertőzés nem olyan pusztító, mint a házisertésekben. Tekintettel arra, hogy a vírus házisertés állományokban nagyon gyorsan terjed, a vaddisznókban mért alacsonyabb fertőzöttség oka lehet, hogy a vaddisznók ellenállóbbak a fertőzéssel szemben. Azok a faktorok, amelyek elősegítik a vírus terjedését a nagyüzemi sertésállományokban, mint pl. nagy létszám, zsúfolt tartás, alacsony genetikai rezisztencia, korai választás és különböző vakcinázások, nincsenek jelen a vadállományban. A vakcinák, különösen a modern, hatékony adjuvánsokkal potenciált oltóanyagok erőteljesen stimulálják az immunrendszert és nemcsak, hogy előidézik a PMWS kirobbanását (Krakowka és mtsai., 2001, Kyriakis és mtsai., 2002, Darwich és mtsai., 2004), és hozzájárulnak a környezet magas vírus terheléséhez, de tömegoltásokkal hozzájárulnak a vírus direkt, állatról állatra történő gyors terjedéséhez. Különböző társfertőzések szintén hozzájárulnak a PMWS kiterjedéséhez házisertésekben (Segalés és Domingo, 2002).

Különböző PCV2 törzsekkel való kevert fertőzést nem találtunk munkánk során.

Az eredményekből kitűnik, hogy a vaddisznóból kimutatott egyes típusú sertés circovírus nem mutatott nagyobb eltérést a PK-15 sejtvonalat permanensen fertőző PCV1 törzsektől, mint

amekkora különbség az eddig ismert PCV1 törzsek között kimutatható volt. Ezt azért fontos megjegyezni, mert ez az első olyan teljes genom szekvencia, amelyet állatból határoztak meg. Különös tekintettel arra, hogy ez a vírus vaddisznóból származott, kizárható, hogy közvetlenül PCV1-et tartalmazó vakcinázás eredményeként jutott az állatba. Kereskedelmi forgalomban kapható vakcinából a nemzetközi szakirodalomban is mutattak már ki PCV1-et (Quintana és mtsai., 2006), és saját vizsgálataink alapján a Magyarországon forgalmazott oltóanyagok egy részében is előfordult ez a vírus (nem publikált adat). Ezért nem lenne meglepő, ha vakcinázott sertésállományból származó mintában kapnánk hasonló eredményt.

Az eredmények azt sugallják, hogy a PCV1 egy konzervatív genetikai állományú vírus. A konzervativizmus a nukleinsav megsokszorozásában szerepet játszó DNS-szakaszon sokkal kifejezettebb, mint a kapszid fehérjét kódoló részen. Az utóbbi a PCV2 törzsek esetében is kijelenthető.

A nemzetközi szakirodalomban nem találtunk adatot arra vonatkozóan, hogy honnan került a PCV1 a sejttenyészetbe. Feltételezhető, hogy abból az állatból származott, amelyik állat veséjéből létrehozták a sejttenyészetet. Ugyanakkor azt sem lehet teljesen kizárni, hogy utólag kerülhetett a vírus a PK-15 sejttenyészetbe pl. PCV1-gyel fertőzött tripszin révén.

Vizsgálataink alapján, és az ezt megelőző szerológiai vizsgálatok szerint valószínűsíthető, hogy a PCV1 a házi- és vadon élő sertésállományokban hosszabb ideje jelen van, meglehetősen állandó genetikai állománnyal rendelkezik, és mivel bizonyítható gazdasági károkat idáig nem okozott, a tudomány nem szentelt nagy figyelmet e vírus tanulmányozásának. A kettes típusú sertés circovírus kártételének felismerése óta azonban egyre több tanulmány lát napvilágot a PCV1 szaporodásának molekuláris mechanizmusairól, modellként használva a vírust, mivel permanensen fenntartható a PK-15 sejtvonalonban, sejtkárosító hatás nélkül (Cheung, 2003b, 2004a,b, 2005; Mankertz és mtsai., 1997, 1998a,b, 2002, 2003, 2004, Steinfeldt és mtsai., 2001, Finsterbusch és mtsai., 2005).

Az eddigi vizsgálatok alapján az sem zárható ki, hogy a PCV1-el fertőzött oltóanyaggal kezelt házi sertésekből kerülhetett a vírus a vadállományba. A PCV1 jelenléte a vaddisznókban arra utal, hogy nemcsak a patogén forma, de az apatogén vírusok is képesek állatról állatra terjedni. Eredményeink alapján számos olyan újabb kérdés vetődik fel a circovírusok járványtanát illetően, amelynek tisztázása további laboratóriumi vizsgálatokat igényel.

6.2. A romániai PCV2 kimutatása

Az első romániai bizonyítottan sertés circovírushoz köthető megbetegedést egy Erdély észak-nyugati részén található sertésállományban észlelték. Az állományban megközelítőleg 30000 állat volt. A termelés hatékonyságának növelése érdekében 2000 elején kocákat és kanokat importáltak Magyarországról.

Az első PMWS-re utaló tüneteket 2002 májusában figyelték meg, 10-14 hetes malacokon. Ezt követően rövid időn belül csaknem másfélszeresére nőtt a megbetegedési arány a választás utáni időszakban, a kórkép megjelenése előtti időszakhoz képest. Ugyanezen időszakban a választás utáni elhullás majdnem megduplázódott.

A diagnózis felállításának kritériumai (Sorden, 2000, Segalés és Domingo, 2002) teljesültek, hiszen a betegségre jellemző klinikai tünetek (az állomány „szétnövése”, súlyvesztés, lesóványodás, nehezített légzés, köhögés, sápadtság, láz, étvágytalanság, hasmenés, sárgaság) és kórbonctani elváltozások (főleg a nyirokszervekben, vesékben, tüdőben) kialakultak, a PMWS-re utaló kórszövettani kép (a nyirokszervekben limfocita deplécio, makrofágok és többmagvú óriássejtek megszorodása, bennük bazofil citoplazmazárványok, a vesében nem gennyes intersticiális nefritisz, többmagvú, Langhans-típusú óriássejtek megjelenésével járó intersticiális tüdőgyulladás, a májban atrófia) szintén megfigyelhető volt, valamint a kórokozót ki tudtuk mutatni a limfoid léziókból.

Az első PDNS-re utaló tüneteket 2004 októberében észlelték. Ekkor mindössze nyolc, 3 és 6 hónapos kor közötti sertésen jelentkeztek a tüneteket. A PMWS még mindig jelen volt az állományban, de a megbetegedési és elhullási arány ekkorra már mérséklődött.

A PDNS diagnózis felállításához szükséges kritériumok (Segalés, 2006) adottak voltak, hiszen a jellegzetes kórbonctani elváltozások (bőr infarktuszok, megnagyobbodott vese, a felületén peteciális vérzésekkel) és kórszövettani elváltozások (szisztémás elhalásos vaszkulitisz, nagy mennyiségű fibrinkiválással járó glomerulonefritisz) egyaránt megfigyelhetőek voltak az érintett állatokban és szerológiai vizsgálatok alapján klasszikus sertéspestistől mentesek voltak.

Vizsgálataink során meghatároztuk egy PMWS és egy PDNS tüneteit mutató állatból származó PCV2 teljes genom szekvenciáját. A két kórképből izolált vírus genetikai állománya 100 %-ig azonos volt, egyetlen nukleotid eltérést sem találtunk. Ez azt bizonyítja, hogy a két kórkép kialakulásának okát nem a PCV2-ben kell keresni, hanem egyéb tényezőkben, mint pl. sertések genetikai háttere, társfertőzések stb.

A romániai PCV2-t összehasonlítottuk a GenBank-ban megtalálható PCV2 szekvenciákkal. Annak kiderítése érdekében, hogy honnan származhat a vírus, különös figyelemmel voltunk a Közép- és Kelet Európából származó teljes PCV2 szekvenciákra. A

romániai izolátum a HUN4 vírussal mutatta a legnagyobb hasonlóságot, de osztrák, francia és magyar vaddisznókból származó PCV2 izolátumok is szoros rokonságot mutattak a román PCV2-vel. A magyar vírussal való nagyfokú hasonlóság ellenére sem állítható teljes biztonsággal, hogy Magyarországról származott a kórokozó. Igaz ugyan, hogy a betegség megjelenése előtt 2 évvel Magyarországról származó sertéseket vittek a telepre, de kérdéses, hogy miért nem jelentkezett 2 év alatt egyik kórkép sem. A két vírus között 3 bázis eltérés volt. Az első PMWS esetekből, és az ez után 2 évvel megjelent PDNS esetekből származó vírus genetikailag 100 %-ig azonos volt. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az állományba bekerült sertés circovírus genetikai állománya meglehetősen stabil.

6.3. A közép-kelet európai régióban jelen lévő PCV2 szekvenciák összehasonlítása a GenBank-ban közzétett szekvenciákkal

A PMWS leírása után az első kettes típusú sertés circovírus genomok 1997-től váltak ismerté. Ezek a szekvenciák Észak-Amerikából származtak (3 kanadai: AF027217: Hamel és mtsai., 1998; BD087175, BD087177: nem publikáltak; és egy amerikai: AJ223185: Morozov és mtsai., 1998), és kivétel nélkül a PCV2A genotípusba tartoztak. Ezt követően retrospektív vizsgálatok során nem csak kimutatták korábbi mintákból a kórokozót, de azok teljes genomját is szekvenálták (Dupont és mtsai., 2008, Timmusk és mtsai., 2008). Ma már több száz teljes és részleges PCV2 szekvencia tölthető le a GenBank-ból. Az első leírást követően a Föld csaknem valamennyi kontinensén kimutatták a kórokozót.

A járvány kezdeti időszakában elsősorban a PCV2A genotípus volt detektálható a PCV2 által okozott különböző kórképekben és fertőzött, de tünetmentes sertésekben is világszerte.

A PCV2B genotípust először 1998-ban franciaországi sertésekben azonosították (AF055393, AF055394: Meehan és mtsai., 1998), és a PCV2B genotípus ugyan úgy kimutatható minden PCVD-ből, mint a PCV2A genotípus.

Retrospektív vizsgálatok szerint (Dupont és mtsai., 2008) mindkét genotípus az 1990-es éveket megelőzően is jelen volt a sertésállományokban, de úgy tűnik, a PCV2 fertőzöttség az 1990-es évek végétől öltött járványos méreteket. A járvány kezdetén a PCV2A genotípus dominált világszerte, azonban a 2000-es évek első felétől kezdve Nyugat-Európában és Ázsiában egyre gyakrabban volt kimutatható a PCV2B genotípus, majd 2003 után ezeken a területeken egyértelműen a PCV2B genotípus vált dominánssá, a GenBank-ban közzétett szekvenciák alapján.

A közép-kelet európai régióból csak 2003-tól vannak letölthető teljes PCV2 szekvenciák a GenBank-ban, kizárólag Ausztriából és Magyarországról. Ezen szekvenciák alapján

megállapítható, hogy térségünkben, 2003-ban még a PCV2A genotípus dominált. 2007-re azonban, lengyel, cseh, szlovák román, horvát és magyar minták vizsgálata alapján elmondható, hogy a térségben a PCV2A genotípus háttérbe szorult, ugyanis a házisertésekből származó minták túlnyomó többségéből a PCV2B genotípus mutatható ki.

Vizsgáltuk, hogy a magyarországi vaddisznó populációban hogyan változott a két genotípus aránya 2003 óta. 2008 januárjában Magyarország észak-keleti részéről gyűjtött vaddisznó mintákból származó kettes típusú sertés circovírusok genomjának részleges elemzése alapján megállapítható, hogy vaddisznókban is megfordult az arány, ugyanis a PCV2B genotípus dominált, míg 2003-ban még a PCV2A genotípus volt a gyakoribb. Igaz ugyan, hogy a vizsgálatot az ország egy kisebb részén és alacsonyabb mintaszámmal végeztük, mint 2002-2003 között, de ezek alapján is megállapítható, hogy a vaddisznó populációban jelentősen nőtt a fertőzöttség mértéke, hiszen 2003-ban a vaddisznókból származó minták 20,5 %-ából, 2008-ban azonban a minták 44 %-ából tudtunk PCV2-t kimutatni PCR-rel, és a két genotípus arányában jelentős változás történt.

Észak-Amerikában először 2005-ben Kanadában (Gagnon és mtsai., 2007), majd az USA-ban (Cheung és mtsai., 2007) jelent meg a PCV2B genotípus, és kezdett járványos méreteket ölteni, a PCVD kórképek 2005 utáni fellángolásának hátterében ugyanis a PCV2B genotípusát lehetett kimutatni.

Letöltöttük a GenBank-ban 2007. december 31-ig közzétett valamennyi PCV2 teljes szekvenciát, valamint ORF2 szekvenciákat, és elemeztük, hogy a különböző kontinensekről különböző időpontokban izolált PCV2 genomok hogyan viszonyulnak egymáshoz. Általánosságban elmondható, hogy a PCV2A genotípusba tartozó vírusok között sokkal nagyobbak a genetikai különbségek, mint a PCV2B genotípusba tartozó szekvenciák között (18., 19. ábrák). A könnyebb áttekinthetőség érdekében a törzsfák alapján, a két genotípuson belül a szekvenciákat csoportokba soroltuk. Ahol lehetett, a csoportok kialakításakor figyelembe vettük a szekvenciák izolálásának dátumát és a földrajzi származását.

A teljes genom alapján a PCV2B genotípusba tartozó szekvenciákat 7 csoportra osztottuk. Az első 4 csoportba tartozó szekvenciák - néhány kivételtől eltekintve - nagymértékben hasonlítottak egymásra.

A B/1 csoportban csak 2003 után izolált vírusok voltak. Három dél-amerikai vírustól eltekintve, csak Európából és Ázsiából származó szekvenciák tartoztak ide. Ebbe a csoportba tartozott a közép-kelet európai régióban, 2007-ben jelen lévő PCV2 szekvenciák túlnyomó többsége is (37-ből 30).

A B/2 csoportban Európából csak 2003 előtti, míg Ázsiából és Észak-Amerikából 2004 utáni szekvenciák voltak.

A B/3 csoportban - 1 kínai szekvenciától eltekintve - csak európai vírusok voltak. Ezek a vírusok 1998 óta napjainkig jelen vannak Európában.

A B/4 csoport tagjai kizárólag Észak-Amerikából származtak, döntően 2005-ből. A B/4 csoport szekvenciái a B/3 csoport szekvenciáival, tehát az Európában a járvány kezdete óta jelen lévő szekvenciákkal mutattak szorosabb rokonságot.

A B/5 csoport tagjai már nagyobb mértékben különböztek egymástól, mint az előző csoportok tagjai. Ebben a csoportban 2002-2007 között izolált vírusok voltak. Először Ázsiából, majd Európából, és 2005-ben Észak-Amerikából is ki tudtak mutatni ide tartozó szekvenciákat.

A B/6 csoportban Kínából származó vírusok voltak 2002-től napjainkig. Ehhez a csoporthoz soroltuk a POL3 szekvenciát, mivel ezekre a kínai vírusokra hasonlított a legnagyobb mértékben, bár a csoport többi tagjától jelentős eltérést mutatott (18. ábra).

A B/7 csoportban, a B/6-hoz hasonlóan, döntő többségében Ázsiából származó szekvenciák voltak, de található itt európai izolátumok is. Az ide sorolt szekvenciák között már igen nagymértékűek voltak a filogenetikai különbségek (18. ábra). A B/7 csoporton belül, de jól elkülönülve található 3, retrospektív vizsgálatok során elkészített szekvencia Dániából (18. ábra, Dupont és mtsai., 2008).

A teljes genomok alapján a PCV2A genotípust 5 csoportra osztottuk. Az A/1 csoportban döntően 2007-ből származó szekvenciák voltak, amelyek kivétel nélkül Kínából származtak.

Az A/2 és A/4 csoportokba tartozó genomokat térben és időben távol izolálták egymástól. Az A/2 csoportba tartozó vírusok között jelentős filogenetikai különbségek voltak (20. ábra).

Az A/3 csoportba tartozó szekvenciákat időben szintén távol izolálták egymástól, de csak európai és ázsiai szekvenciák tartoztak ide, észak-amerikaiak nem.

A 2007-ben izolált PCV2A genotípusba tartozó magyar szekvenciák az A/3 és A/4 csoportba tartoztak. Ezek a vírusok Magyarország észak-keleti részéről származtak, csakúgy, mint a 2008 januárjában izolált, egyetlen PCV2A genotípusba tartozó, vaddisznó mintából származó vírus.

Az A/5 csoportban európai szekvenciák nem voltak, csak ázsiaiak és főleg észak-amerikaiak. Ide tartoztak a járvány kezdetén izolált genomok, de Észak-Amerikában és Ázsiában, 2007-ben is találtak ebbe a csoportba tartozó vírusokat.

Két kínai és egy horvát szekvencia egyik csoportba sem sorolható. Mindháromat 2007-ben izolálták. Bár a horvát szekvencia (CRO2) és az egyik kínai szekvencia (EF524518) a PCV2A genotípusba, a másik kínai szekvencia (EF524523) a PCV2B genotípusba tartozik, ez a 3 vírus egymásra hasonlít legnagyobb mértékben a teljes genom filogenetikai vizsgálata alapján (18. ábra).

A kapszid fehérjék aminosav szekvenciája alapján készített filogenetikai fa szerint a

PCV2B genotípusba tartozó izolátumok másként csoportosultak, mint a teljes genom alapján.

A B/1ORF2 csoportban a teljes genom alapján B/1 csoportba tartozó szekvenciák voltak túlnyomó többségben, de a B/6 és B/7 csoportok tagjai is megtalálhatók ebben a csoportban, ugyanis egyes, teljes genom alapján B/6 és B/7 csoportba tartozó vírusok kapszid fehérjéjének aminosav szekvenciája 100 %-ig megegyezett a B/1 csoportba tartozókéval (3. melléklet). A különbség ezek között az izolátumok között a replikációs fehérjét kódoló szakaszon volt.

A B/5ORF2 csoportba tartozó vírusok, amelyek között viszonylag jelentős filogenetikai különbségek voltak, a teljes genom alapján a B/7 csoportba tartoztak.

Néhány kivételtől eltekintve tehát a B/1ORF2 és a B/7ORF2 csoportba tartozó genomok a teljes genomokhoz hasonlóan csoportosultak, míg a többi csoportba tartozó vírus az ORF2 aminosav szekvenciája alapján keveredik a teljes genomok szerint alkotott csoportokhoz képest. Az észak-amerikai kontinensről származó PCV2B genotípusba tartozó vírusok sem különültek el a többi vírustól a kapszid fehérje aminosav szekvenciája alapján, mint ahogy elkülönültek a teljes genom alapján.

A PCV2A genotípusba tartozó szekvenciák a kapszid fehérje aminosav szekvenciája alapján közel hasonlóan csoportosultak, mint a teljes genom alapján. A különbség abból adódott, hogy a teljes genom alapján az A/2 csoportba tartozó szekvenciák megoszlottak az A/1ORF2, A/3ORF2 és az A/4ORF2 csoportok között.

A teljes genomok nukleotid szekvenciája és a kapszid fehérjék aminosav szekvenciája alapján elvégzett elemzések eltérő eredményeire alapozva megállapíthatjuk, hogy a minél pontosabb következtetések érdekében a kettes típusú sertés circovírusok filogenetikai analízisét célszerű a teljes genom alapján elvégezni.

Úgy tűnik, jelenleg a PCV2B genotípus, és azon belül is a B/1, illetve B/1ORF2 csoportba tartozó vírusok jóval gyorsabban terjednek világszerte, és így a közép-kelet európai régióban is, mint a PCV2A genotípus. Ezt támasztják alá más, kisebb földrajzi területekre korlátozódó filogenetikai vizsgálatok is, amelyek vagy a teljes genom analízise alapján (Dupont és mtsai., 2008) vagy csak a PCV2 kapszid fehérjét kódoló szakaszának analízise alapján készültek (Yang és mtsai., 2008, Grau-Roma és mtsai., 2008, Timmusk és mtsai., 2008, Shuai és mtsai., 2007, An és mtsai., 2007). Hogy mi lehet ennek hátterében, egyelőre nem ismert. Lehetséges, hogy a vírus valamely más fajból került át sertésbe, és jelenleg is tart az adaptációja a sertéshez (Hughes és mtsai., 2008). Ez az adaptációs folyamat magyarázatot adhat arra is, hogy miért nem az egyre nagyobb fokú genetikai változatosság irányába mutat jelenleg a PCV2 evolúciója, hanem inkább egy genetikailag rendkívül egységes járványtani kép van kialakulóban. Ennek az elképzelésnek az igazolásához meg kell találni azt a fajt, amelyből a vírus átmehetett a sertésbe. Az erre irányuló vizsgálatoknál két tényt mindenképpen figyelembe kell venni. Az egyik, hogy sertésen kívül

(szarvasmarhából származó PCV2-t kivéve, Nayar és mtsai., 1999) emlősállatból nem, csak madaraktól mutattak ki circovírusokat. A másik, hogy kísérletes úton sikerült egereket fertőzni, és a fertőzött egerek képesek fertőzni társaikat. Idáig nem publikált eredményeink alapján a PCV2 kimutatható sertésstelepek környékéről származó házi- és mezei egerekből, valamint patkányokból is. Ezekből az állatokból származó vírusok szekvencia analízise és kórszövettani vizsgálata jelenleg folyamatban van.

A PCV2 sertéshez való adaptációját valószínűleg befolyásolni fogja a nemrégiben elkezdődött vakcinás védekezés. Hogy ez milyen hatással lesz a PCV2 evolúciójára, jelen ismereteink alapján nehéz lenne megítélni. Az adaptációs elmélet helyes vagy téves voltát valószínűleg csak évek múlva lehet megítélni, addig azonban nagyon sok vizsgálatot kell elvégezni a járvány és a PCV2 által okozott veszteségek mérséklése érdekében.

6.4. Egerek fertőzése PCV2-vel

A sertés circovírusok járványtanának megértése és a védekezés módszereinek kidolgozása miatt fontos kérdés, hogy a sertésen kívül a vírus képes-e egyéb állatfajokat is fertőzni, abban szaporodni, illetve a fertőzött állat üríti-e a kórokozót.

A nemzetközi szakirodalomban erre vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre, azok is ellentmondásosak. Elsőként Kiupel és mtsai. (2001) fertőztek BALB/c egereket PCV2-vel, hasüregbe és orron keresztül egyszerre. 0,2 ml 1600-as ELISA titerű fertőző anyagot juttattak az egér hasüregébe, illetve 0,02 ml-t ugyanannak az egérnek az orrába. A mi eredményeinkhez hasonlóan, sikerült kimutatni a vírust az egerekből, még a fertőzés után 42 nappal is. Klinikai tüneteket, kórbonctani elváltozásokat nem tapasztaltak. Kórszövettanilag a nyirokszervekben a PMWS-hez hasonló elváltozásokat írtak le. A kórokozót PCR-rel és *in situ* hybridizációs módszerrel egyaránt ki tudták mutatni a nyirokszervekből, a májból és a veséből is. A nyirokszervekben apoptózis is kialakult (Kiupel és mtsai., 2001, 2005).

Quintana és mtsai. (2002) Új-Zélandi nyulakat fertőztek intranasalisán 10^4 TCID₅₀ PCV2-vel és $10^{2,75}$ TCID₅₀ PCV1-gyel, valamint ICR-CD1 egereket fertőztek intraperitonealisán 10^3 TCID₅₀ PCV2-vel és $10^{1,75}$ TCID₅₀ PCV1-gyel. A fertőzés utáni 20-dik napig nem tudtak egyetlen állatból sem circovírust kimutatni PCR-rel és *in situ* hybridizációs módszerrel sem.

Tekintettel az irodalomban fellelhető ellentmondásokra, a „Patogenitási vizsgálat” kísérletben arra kerestünk választ, hogy a sertés circovírus képes-e egerekben megbetegedést előidézni. Az általunk fertőzött állatok klinikai tüneteket nem mutattak, és kórbonctani elváltozások sem voltak megfigyelhetőek bennük. Feltételeztük, hogy 2 héttel az utolsó fertőzés után, ha a vírus egérben nem képes szaporodni, az első két oltás után kialakult immunválasz

következtében a vírusokat az egerek immunrendszere eliminálja, így nem sikerül kimutatnunk azokat. Minden fertőzött egerből sikerült PCR-rel a harmadik oltás után 2 héttel vírust kimutatni, igazolva, hogy a PCV2 képes egerben szaporodni.

A „Vírusreplikáció vizsgálata” kísérletben azt próbáltuk tisztázni, hogy a fertőzést követően mikor, mely szervekben jelenik meg a vírus. A hasüregbe történt fertőzés után 2 nappal különböző szervekből (nyirokcsomó, csecsemőmirigy, csontvelő, máj, lép, vese) volt kimutatható a vírus. Mivel a csecsemőmirigyből is kimutatható volt a vírus-nukleinsav, ezért kizárható, hogy csak a szervek falára tapadt befecskendezett vírust mutattuk ki, hiszen azok eljutottak a mellüregbe is. A 4-dik napon vett minták egyikében sem volt kimutatható sertés circovírus, viszont a 6-dik naptól ismét voltak circovírus pozitív szervek. A fertőzés után 12-14 nappal már a vizsgált szervek többségéből biztonságosan kimutatható volt a vírus. Ez arra enged következtetni, hogy a vírus képes az egerekben szaporodni.

Kiupel és mtsai.-nak (2001) az egy alkalommal intraperitonealisan és intranasalisan fertőzött egerekből a 7-dik, 14-dik, 28-dik és 42-dik napon is sikerült vírust kimutatni a nyirokszervekből (hörgő körüli és bélfodri nyirokcsomók, lép), valamint a májból és a veséből is.

A „Vírusürítési vizsgálat 1.” kísérletben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a fertőzött egerek ürítik-e a PCV2-t és képesek-e megfertőzni társaikat. Ilyen vizsgálatot korábban még nem végeztek. Négy, hasüregen keresztül fertőzött egeret a fertőzés után hat nappal négy nem fertőzött egér mellé helyeztünk. Mivel nem volt ismert, hogy mikortól ürítik a vírust az egerek, ha egyáltalán van vírusürítés, és az sem, hogy szájon át vagy belégzés útján terjed-e a vírus, ezért választottunk az összerakás utáni 18 és 22 napos, tág intervallumot. A négy, általunk mesterségesen nem fertőzött egér közül kettőből sikerült PCV2-t kimutatni, ami arra utalt, hogy az egerek ürítik a vírust és szájon át és/vagy belélegezve képesek azt felvenni. Ezt megerősíti a "Vírusürítési vizsgálat 2.” kísérlet, ahol az egereket szájon át fertőztük PCV2-vel. Az általunk szájon át fertőzött 18 egér közül 11-ből sikerült kimutatni a vírust. A bélsárból a 14-dik, a vizeletből a 22-dik napon sikerült kimutatni a kórokozót, igaz, csak 1-1 alkalommal. Valószínű, hogy a vírusürítés ennél az 1-1 napnál lényegesen hosszabb, de az általunk alkalmazott vírus kimutatási módszer nem kellően érzékeny bélsár és vizelet minták esetén (pedig QIAGENE QIAamp[®] DNA Stool Mini kittel vontuk ki a DNS-t a mintákból), ugyanis e minták nagyon sok Taq DNS-polimeráz inhibitorot tartalmaznak. Ezt a feltevést arra alapozzuk, hogy a módszer hatékonyságát ellenőrizendően, a negatív kontrol egér bélsárhoz 10^3 TCID₅₀ vírust kevertünk a ROM1 jelű vírustörzsből a DNS tisztítást megelőzően, de a mintából PCR-rel nem sikerült kimutatni a kórokozót.

Az egerekkel végzett kísérleteink számos, eddig tisztázatlan kérdést vetnek fel. Az egyik legfontosabb, hogy a sertésstelepeken lévő egerekből és patkányokból is kimutatható-e sertés

circovírus. Felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe van ezeknek a rágcsálóknak a vírus terjesztésében, ugyanis ez nagymértékben befolyásolja a védekezés módját. E kérdések megválaszolásán jelenleg is dolgozunk.

Eddigi eredményeink alapján azonban a PCV2 kártétele elleni hatékony védekezés érdekében fontosnak tartjuk a hatékony rágcsálóirtást a sertéstelepeken.

7. Új tudományos eredmények

Felmértük a házisertés és vaddisznó állományok PCV2 fertőzöttségét és megállapítottuk, hogy a vadállományban ugyanazok a vírusok vannak jelen, mint a házisertésekben és a házisertésekben bekövetkezett jelentős járványtani változások a vaddisznó állományban is végbementek.

Vizsgálataink alapján elsőként jeleztük a rekombináció szerepét a PCV2 evolúciójában, amit azóta többen megerősítettek Észak-Amerikában és Ázsiában is.

Szintén elsőként határoztunk meg PCV1 teljes genomot fertőzött szervből, nevezetesen vaddisznó mintából, azelőtt csak sejttenyészetekből származó vírusok voltak ismertek.

Részt vettünk az első romániai PMWS és PDNS esetek megállapításában és bizonyítottuk, hogy a két kórformát ugyanaz a vírus képes előidézni.

Jelentős szerepet vállaltunk az első román, cseh, lengyel és horvát teljes PCV2 szekvenciák meghatározásában, és megállapítottuk, hogy a közép-kelet európai régióban a PCV2B genotípusba tartozó vírusok terjedtek el.

Elsőként bizonyítottuk, hogy az egerek szájon át fertőzhetőek sertés circovírussal, és az egerek ürítik is a vírust, ami alapján megállapítottuk, hogy az egerek igen fontos szerepet játszanak a vírus terjesztésében és fenntartásában.

8. Irodalom

- ALLAN G.M., PHENIX K.V., TODD D., McNULTY M.S.: Some biological and physico-Chemical properties of Porcine Circovirus. *J. Vet. Med. B*, 1994. 41(1), p.: 17-26.
- ALLAN G.M., McNEILLY F., KENNEDY S., DAFT B., CLARK E.G., ELLIS J.A., HAINES D.M., MEEHAN B.M., ADAIR B.M.: Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998. 10(1), p.: 3-10.
- ALLAN G.M., McNEILLY F., ELLIS J., KRAKOWKA S., MEEHAN B., McNAIR I., WALKER I., KENNEDY S.: Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) potentiates PCV2 replication. *Arch. Virol.* 2000a. 145(11), p.: 2421-2429.
- ALLAN G.M., ELLIS J.A.: Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000b. 12(1),p.: 3-14.
- ALLAN G.M., McNEILLY F., McNAIR I., CURRAN M.D., WALKER I., ELLIS J., KONOBY C., KENNEDAY S., MEEHAN B.: Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch.Virol.* 2000c. 145(4), p.: 853-857.
- ALLAN G.M., KENNEDY S.: Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 1999b. 121(1), p.: 1-11.
- ALLAN G.M., McNEILLY F., McNAIR I., O'CONNOR M., MEEHAN B., GILPIN D., ELLIS J., TOWNSEND H., LASAGNA C., BORIOSI G., KRAKOWKA S.: Neonatal vaccination for mycoplasma hyopneumoniae and post-weaning multisystemic wasting syndrome: a field trial. *Pig Journal* 2001. December, p.: 48.
- ALLAN G.M., McNEILLY F., MEEHAN B.M, KENNEDY S., MACKIE D.P., ELLIS J.A., CLARK EG., ESPUNA E., SAUBI N., RIERA P., BOTNER A., CHARREYRE C.E.: Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 1999a. 66(2), p.: 115-23.
- AN D.J., ROH I.S., SONG D.S., PARK C.K., PARK B.K.: Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res.* 2007. 129(2), p.: 115-22.
- BIELANSKI A., LAROCHELLE R., ALGIRE J., MAGAR R.: Distribution of PCV2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV2 antibody-positive pigs. *Vet. Rec.* 2004. 155(19), p.: 597-598.

- BOREL N., BURGI E., KIUPEL M., STEVENSON G.W., MITTAL S.K., POSPISCHIL A., SYDLER T.: Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV 2) in Switzerland. *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 2001. 143(5), p.: 249-55.
- CADAR D., CSÁGOLA A., DÁN A., DEIM Z., SPÎNU M., MICLĂUȘ V., KÖBÖLKUTI L., CZIRJÁK G., TUBOLY T.: Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania--short communication. *Acta. Vet. Hung.* 2007. 55(1) p.: 151-6.
- CALSAMIGLIA M., SEGALES J., QUINTANA J., RORELL C., DOMINGO M.: Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40(5), p.: 1848-50.
- CANDOTTI P., PINONI C., LAVAZZA A., CANTONI A.M., Di LECCE R., FERRARI M.: Necrotizing tracheitis: is it a new PCVII pathological form? *Proc. ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates, Saint-Malo 2001. ZOOPOLE developpement (ISPAIA), France,* p.: 90.
- CANO J.P., SEGALÉS J., SOGBE E., RODRÍGUEZ C., UTREEA V., DÍAZ C.T., OLIERA A., CALSAMIGLIA M.: First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Venezuela. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases – 2003. Rome June 29th – July 2nd.
- CAPRIOLI A., McNEILLY F., McNAIR I., LAGAN-TREGASKIS P., ELLIS J., KRAKOWKA S., McKILLEN J., OSTANELLO F., ALLAN G.: PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 2006. 81(2), p.: 287-92.
- CARMAN S., MCEWEN B., DELAY J., VAN DREUMEL T., LUSIS P., CAI H., FAIRLES J.: Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can. Vet. J.* 2006. 47(8), p.: 761-762.
- CASTRO A.M., CORTEZ A., RUIZ V.L., LEOMIL H., MORENO A.M., DOTO D.S., RICHTZENHAIN L.J.: Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet. Rec.* 2004. 154(23), p.: 728-9.
- CASTRO A.M., CORTEZ A., HEINEMANN M.B., BRANDÃO P.E., RICHTZENHAIN L.J.: Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Arch. Virol.* 2007. 152(8) p.: 1435-45.
- CELERA V.JR., CARASOVA P.: First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection of pigs in the Czech Republic by semi-nested PCR. *J. Vet. Med. B.* 2002. 49(3), p.: 155-9.
- CHAE C.: Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal* 2004. 168(1), p.: 41-49.

- CHEUNG A.K.: Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 2003a. 305(1), p.: 168-180.
- CHEUNG A.K.: Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and non-pathogenic circoviruses. *Virology* 2003b. 310(1), p.: 41-49.
- CHEUNG A.K.: The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 2003c. 313(2), p.: 452-459.
- CHEUNG A.K.: Palindrome regeneration by template strand switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. *J. Virol.* 2004a. 78(17), p.: 9016-9029.
- CHEUNG A.K.: Detection of template strand switching during initiation and termination of DNA replication of porcine circovirus. In: *J. Virol.* 2004b. 78(8), p.: 4268-4277.
- CHEUNG A.K.: Detection of rampant nucleotide reversion at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 1. *Virology* 2005. 333(1), p.: 22-30.
- CHEUNG A.K., BOLIN S.R.: Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch. Virol.* 2002. 147(1), p.: 43-58.
- CHEUNG A.K., LAGER K.M., KOHUTYUK O.I., VINCENT A.L., HENRY S.C., BAKER R.B., ROWLAND R.R., DUNHAM A.G.: Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 2007. 152(5), p.: 1035-44.
- CHIANINI F., MAJO N., SEGALES J., DOMINGUEZ J., DOMINGO M.: Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003. 94(1-2), p.: 63-75.
- CHOI C., CHAE C.: In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 1999. 121(3), p.: 265-270.
- CHOI C., CHAE C.: Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Vet. Pathol.* 2001. 38(4), p.: 436-441.
- CHOI K.S., CHAE J.S.: Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Republic of Korea. *Res. Vet. Sci.* 2008. 84(3) p.: 497-501.
- CHOI C., CHAE C., CLARK E.G.: Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000. 12(2), p.: 151-3.
- CHOI C., KIM J., KANG, I.J., CHAE C.: Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Vet. Rec.* 2002b. 151(16), p.: 484-485.
- CHOI C., STEVENSON G.W., KIUPEL M., HARRACH B., ANOTHAYANONTHA L.,

- KANITZ C.L., MITTAL S.K.: Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 2002a. 66(4), p.: 217-224.
- CLARK E.G.: Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. American Association of Swine Practitioners, Quebec 1997. Canada*, 28, p.: 499-501.
- CROWTHER R.A., BERRIMAN J.A., CURRAN W.L., ALLAN G.M., TODD D.: Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J. Virol.* 2003. 77 (24), p.: 13036-13041.
- DÁN Á., MOLNÁR T., BIKSI I., GLÁVITS R., SHAHEIM M., HARRACH B.: Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet. Hung.* 2003. 51(4), p.: 551-562.
- DARWICH L., PIE S., ROVIRA A., SEGALÉS J., DOMINGO M., OSWALD I.P., MATEU E.: Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Gen. Virol.* 2003. 84(8), p.: 2117-2125.
- DARWICH L., SEGALÉS J., MATEU E.: Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 2004. 149(5), p.: 857-874
- de BOISSESON C., BEVEN V., BIGARRE L., THIERY R., RORE N., EVENO E., MADEC F., JESTIN A.: Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J. Gen. Virol.* 2004. 85(2), p.: 293-304.
- DONE S., GRESHAM A., POTTER R., CHENNELLS D.: PMWS and PDNS - two recently recognised diseases of pigs in the UK. *Practice* 2001. 23, p.: 14-21.
- DREW T.W., GRIESSON S.S., KING D.P., HICKS D., DONE S., NESER J.A., EVANS D.P., GRIMBEEK P., BANKS M.: Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Vet. Rec.* 2004. 155(5), p.: 149-51.
- DUPONT K., NIELSEN E.O., BAEKBO P., LARSEN L.E.: Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 2008. 128(1-2), p.: 56-64.
- DURAN C.O., RAMOS-VARA J.A., RENDER J.A.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health and Production* 1997. 5, p.: 241-245.
- ELLIS J.A., BRATANICH A., CLARK E.G., ALLAN G., MEEHAN B., HAINES D.M.,

- HARDING J., WEST K.H., KRAKOWKA S., KONOBY C., HASSARD L., MARTIN K., McNEILLY F.: Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000. 12(1), p.: 21-7.
- ELLIS J., HASSARD L., CLARK E., HARDING J., ALLAN G., WILLSON P., STROKAPPE J., MARTIN K., McNEILLY F., MEEHAN B., TODD D., HAINES D.: Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 1998. 39(1), p.: 44-51.
- ELLIS J., KRAKOWKA S., ALLAN G., CLARK E., KENNEDY S.: The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus has expanded since 1987; an alternative perspective. *Vet. Pathol.* 1999. 36(3), p.: 262-265.
- ELLIS J., SPINATO M., YONG C., WEST K., McNEILLY F., MEEHAN B., KENNEDY S., CLARK E., KRAKOWKA S., ALLAN G.: Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003. 15(4), p.: 364-368.
- FENAUX M., HALBUR P.G., GILL M., TOTH T.E., MENG X.J.: Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38(7), p.: 2494-503.
- FENAUX M., HALBUR P.G., HAQSHENAS G., ROYER R., THOMAS P., NAWAGITGUL P., GILL M., TOTH T.E., MENG X.J.: Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathological lesions. *J. Virol.* 2002. 76(2), p.: 541-551.
- FENAUX M., OPRIESSNIG T., HALBUR P.G., XU Y., POTTS B., MENG X.J.: Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. *J. Gen. Virol.* 2004. 85(11), p.: 3377-82.
- FINLAISON D., KIRKLAND P., LUONG R., ROSS A.: Survey of porcine circovirus 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome in New South Wales piggeries. *Aust. Vet. J.* 2007. 85(8), p.:304-310.
- FINSTERBUSCH T., STEINFELDT T., CALISKAN R., MANKERTZ A.: Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology* 2005. 343(1), p.: 36-46.
- GAGNON C.A., TREMBLAY D., TIJSSEN P., VENNE M.H., HOUDE A., ELAHI S.M.: The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can. Vet. J.*

2007. 48(8), p.: 811-9.

- GARKAVENKO O., ELLIOTT R.B., CROXSON M.C.: Identification of pig circovirus type 2 in New Zealand pigs. *Transplant. Proc.* 2005. 37(1), p.: 506-9.
- GILPIN D.F., McCULLOUGH K., MEEHAN B.M., McNEILLY F., McNAIR I., STEVENSON L.S., FOSTER J.C., ELLIS J.A., KRAKOWKA S., ADAIR B.M., ALLAN G.M.: In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003. 94(3-4) p.: 149-161.
- GRAU-ROMA L., CRISCI E., SIBILA M., LÓPEZ-SORIA S., NOFRARIAS M., CORTEY M., FRAILE L., OLVERA A., SEGALÉS J.: A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 2008. 128(1-2), p.: 23-35.
- GRIERSON S.S., KING D.P., SANDVIK T., HICKS D., SPENCER Y., DREW T.W., BANKS M.: Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch. Virol.* 2004a. 149(6), p.: 1171-83.
- GRIERSON S.S., KING D.P., WELLENBERG G.J., BANKS M.: Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res. Vet. Sci.* 2004b. p.: 77, 265–268.
- HALBUR, P.G.: Porcine respiratory disease. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress 15, 1998.* p.: 1-10.
- HAMEL A.L., LIN L.L., NAYAR G.P.: Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 1998. 72(6), p.: 5262-7.
- HAMEL A.L., LIN L.L., SACHVIE C., GRUDESKI E., NAYAR G.P.: PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 2000. 64(1) p.: 44-52.
- HARDING, J.C.S., CLARK E.G.: Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 1996. 5, p.: 201-203.
- HARDING, J.C.S., CLARK E.G., STROKAPPE J.H., WILLSON P.I., ELLIS J.A.: Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 1998. 6, p.: 249-254.
- HARMS P.A.: Post-weaning multisystemic wasting syndrome-case investigations. In: *Proc Seventh Annual Swine Disease Conference of Swine Practitioners, Ames 1999.* Iowa State University, Iowa, p.: 43-47.
- HARMS P.A., SORDEN S.D., HALBUR P.G., BOLIN S.R., LAGER K.M., MOROZOV I., PAUL P.S.: Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 2001. 38(5), p.: 528-539.

- HARUNA J., HANNA P., HURNIK D., IKEDE B., MILLER L., YASON C.: The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can. J. Vet. Res.* 2006. 70(4), p.: 269-76.
- HESSE R., KERRIGAN M., ROWLAND R.R.: Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res.* 2008. 132(1-2), p.: 201-7.
- HUGHES A.L., PIONTKIVSKA H.: Nucleotide sequence polymorphism in circoviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2008. 8(2) p.: 130-8.
- ILYINA T.V., KOONIN E.V.: Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Research* 1992. 20, p.: 3279-3285.
- JEMERSIC L., CVETNIC Z., TOPLAK I., SPICIC S., GROM J., BARLIC-MAGANJA D., TERZIC S., HOSTNIK P., LOJKIC M., HUMSKI A., HABRUN B., KRT B.: Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from Croatia. *Res. Vet. Sci.* 2004. 77(2), p.: 171-5.
- JOHNSON C.S., JOO H.S., DIREKSIN K., YOON K.J. CHOI Y.K.: Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J. Vet. Diag. Invest.* 2002. 14(6), p.: 507- 512
- KAWASHIMA K., TSUNEMITSU H., HOEINO R., KATSUDA K., ONODERA T., SHOJI T., KUBO M., HARITANI M., MURAKAMI Y.: Effects of Dexamethasone on the Pathogenesis of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Piglets. *J. Comp. Path.* 2003. 129(4), p.: 294-302.
- KECSKEMÉTI S., KISS I., TUBOLY T.: Sertéscircovirusok. *MÁL.* 1999. 11, p.: 639-642.
- KENNEDY S., ALLAN G., McNEILLY F., ADAIR B.M., HUGHES A., SPILLANE P.: Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 1998. 142(18), p.: 495-6.
- KENNEDY S., MOFFETT D., McNEILLY F., MEEHAN B., ELLIS J., KRAKOWKA S., ALLAN G.M.: Reproduction of Lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. *J. Comp. Path.* 2000. 122(1), p.: 9-24.
- KENNEDY S., SEGALES J., ROVIRA A., SCHOLLES S., DOMINGO M., MOFFETT D., MEEHAN B., O NEILL R., McNEILLY F., ALLAN G.: Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J. Vet. Diag. Invest.* 2003. 15(2), p.: 151-156.
- KIERNAN J.A.: *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice* Pergamonn Press, 1990. p.: 119-124.
- KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA W., TANTILERTCHAROEN R., SUZUKI K.,

- ALBARENQUE S.M., THANAWONGNUWECH R., NAKSYAMA H., DOI K.: Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *Vet. Med. Sci.* 2002. 64(5), p.: 449-52.
- KIM J., HAN D.U., CHOI C., CHAE C.: Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 2001. 98(1), p.: 25-31.
- KIM J., HAN D.U., CHOI C., CHAE C.: Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 2003c. 65(6), p.: 741-744.
- KIM J., CHAE C.: Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative dermatitis in pigs. *The Veterinary Journal* 2004. 167(1), p.: 104-106.
- KIM J., CHOI C., CHAE C.: Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 2003a. 128(1), p.: 52-59.
- KIM J., CHUNG H.K., JUNG T., CHO W.S., CHOI C., CHAE, C.: Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J. Vet. Med. Sci.* 2002. 64(1), p.: 57-62.
- KIM J., CHUNG H.K., CHAE C.: Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 2003b. 166(3), p.: 251-256.
- KIM J., JUNG K., CHAE C.: Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet. Rec.* 2004. 155(16), p.: 489-92.
- KISS I., KECSKEMÉTI S., TUBOLY T., BAJMÓCY E., TANYI J.: New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet. Hung.* 2000. 48(4), p.: 469-475.
- KIUPEL M., STEVENSON G.W., KANITZ C.L., ANOTHAYANONTHA L., LATIMER K.S., MITTAL S.K.: Cellular localization of porcine circovirus in postweaning pigs with chronic wasting disease. *Eur. J. Vet. Pathol.* 1999. 5, p.: 77-82.
- KIUPEL M., STEVENSON G.W., MITTAL S.K., CLARK E.G., HAINES D.M.: Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet. Pathol.* 1998. 35(4), p.: 303-7.
- KIUPEL M., STEVENSON G.W., CHOI J., LATIMER K.S., KANITZ C.L., MITTAL S.K.: Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet. Pathol.* 2001. 38(1), p.: 74-82.

- KIUPEL M., STEVENSON G.W., GALBREATH E.J., NORTH A., HOGENESCH H., MITTAL S.K.: Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. *BMC Vet. Res.* 2005. 31;1:7.
- KRAKOWKA S., ELLIS J.A., McNEILLY F., RINGLER S., RINGS D.M., ALLAN G.: Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet. Pathol.* 2001. 38(1), p.: 31-42.
- KRAKOWKA S., ELLIS J.A., MEEHAN B., KENNEDY S., McNEILLY F., ALLAN G.: Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 2000. 37(3), p.: 254-63.
- KYRIAKIS S.C., SAOULIDIS K., LEKKAS S., MILIOTIS ChC., PAPOUTSIS P.A., KENNEDY S.: The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 2002. 126(1) p.: 38-46.
- LABARQUE G.G., NAUWYNCK H.J., MESU A.P., PENZAERT M.B.: Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Vet. Q.* 2000. 22(4), p.: 234-6.
- LADEKJAER-MIKKELSEN A.S., NIELSEN J., STORGAARD T., BOTNER A., ALLAN G., McNEILLY F.: Transplacental infection with PCV2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet. Rec.* 2001. 148(24), p.: 759-60.
- LADEKJAER-MIKKELSEN A.S., NIELSEN J., STADEJEK T., STORGAARD T., KRAKOWKA S., ELLIS J., McNEILLY F., ALLAN G., BOTNER A.: Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-weekold piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 2002. 89(2-3), p.: 97-114.
- LAINSON F.A., AITCHISON K.D., DONACHIE W., THOMSON J.R.: Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40(2), p.: 588-593.
- LAROCHELLE R., BIELANSKI A., MULLER P., MAGAR R.: PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38(12), p.: 4629-32.
- LAROCHELLE R., MAGAR R., D'ALLAIRE, S.: Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res.* 2002. 90, p.: 101-112.
- LAROCHELLE R., MAGAR R., D'ALLAIRE S.: Comparative serologic and virologic study of

- commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 2003. 67, p.: 114–120.
- LEKCHAROENSUK P., MOROZOV I., PAUL P.S., THANGTHUMNIYOM N., WAJJAWALKU W., MENG X.J.: Epitope mapping of the major kapszid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 2004. 78(15), p.: 8135-8145.
- LIPEJ Z., SEGALÉS J., JEMERSIĆ L., OLVERA A., ROIĆ B., NOVOSEL D., MIHALJEVIĆ Z., MANOJLOVIĆ L.: First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet. Hung.* 2007. 55(3) p.: 389-404.
- LIU Q., TIKOO S.K., BABIUK L.A.: Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 2001. 285(1), p.: 91-99.
- LIU J., CHEN I., DU Q., CHUA H., KWANG J.: The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 2006. 80(10), p.: 5065-73.
- LIU J., CHEN I., KWANG J.: Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 2005. 79(13), p.: 8262-74.
- LU Y., YANG H.: Nucleotide sequences of three different isolates of circovirus isolated in pigs with various clinical syndromes. Nem publikált. PubMed: AF381176, 2001.
- MA C.M., HON C.C., LAM T.Y., LI V.Y., WONG C.K., OLIVEIRA T., LEUNG F.C.: Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. *J. Gen. Virol.* 2007. 88(6), p.:1733-1737.
- MADEC F., EVENO E., MORVAN P., HAMON L., MORVAN H., ALBINA E., TRUONG C., HUTET E., CARIOLET R., ARNAULD C., JESTING A: La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France 1 – Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées Rech. Porcine en France.* 1999. 31, p.: 347-354.
- MAGAR R., LAROCHELLE R., THIBAUT S., LAMONTAGNE L.: Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV 2) in weaned pigs: a sequential study. *J. Comp. Path.* 2000b. 123(4), p.: 258-69.
- MAGAR R., MULLER P., LAROCHELLE R.: Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 2000a. 64(3), p.: 184-6.
- MAHÉ D., BLANCHARD P., TRUONG C., ARNAULD C., Le CANN P., CARIOLET R., MADEC F., ALBINA E., JESTIN A.: Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 2000. 81(7), p.: 1815-1824.

- MALDONADO J., SEGALES J., CALASMIGLIA M., LLOPART D., SIBILA M., LAPUS Z., RIERA P., ARTIGAS C.: Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. *J. Vet. Med. Sci.* 2004. 66(5), p.: 533-7.
- MALDONADO J., SEGALES J., MARTÍN-RZ-PUIG D., CALASMIGLIA M., RIERA P., DOMINGO M., ARTIGAS C.: Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal* 2005. 169(3), p.: 454-456.
- MANKERTZ J., BULK H.J., BLAESS G., MANKERTZ A.: Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 1998b. 16(3), p.: 267-276.
- MANKERTZ A., CALISKAN R., HATTERMANN K., HILLENBRAND B., KURZENDOERFER P., MUELLER B., SCHMITT C., STEINFELDT T., FINSTERBUSCH T.: Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet. Microbiol.* 2004. 98(2), p.: 81-8.
- MANKERTZ A., DOMINGO M., FOLCH J.M., LeCANN P., JESTIN A., SEGALÉS J., CHMIELEWICZ B., PLANA-DURÁN J., SOIKE D.: Characterization of PCV2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 2000. 66(1), p.: 65-77.
- MANKERTZ A., HILLENBRAND B.: Analysis of transcription of porcine circovirus type 1. *J. Gen. Virol.* 2002. 83(11), p.: 2743-2751.
- MANKERTZ A., MANKERTZ J., WOLF K., BULK H.J.: Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J. Gen. Virol.* 1998a. 79(2), p.: 381-383.
- MANKERTZ A., MUELLER B., STEINFELDT T., SCHMITT C., FINSTERBUSCH T.: New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus type 1 and 2. *J. Virol.* 2003. 77(18), p.: 9885-9893.
- MANKERTZ A., PERSSON F., MANKERTZ J., BLAESS G., BULK H.J.: Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* 1997. 71(3), p.: 2562-2566.
- MATEUSEN B., MAES D.G., VAN SOOM A., LEFEBVRE D., NAUWYNCK H.J.: Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology* 2007. 68(6), p.: 896-901.
- MATEUSEN B., SANCHEZ R.E., Van SOOM A., MEERTS P., MAES D.G., NAUWYNCK H.J.: Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection *Theriogenology* 2004. 61(1), p.: 91-101.
- McCULLOUGH K.: Immunology of PCVD Porcine Circovirus Disease (PCVD): Towards improved food quality and safety within EU New Member States and Associated Candidate

Countries, Brno, NMSACC - PCVD WORKSHOP 22-24 MARC, 2006.

- McNEILLY F., KENNEDY S., MOFFETT D., MECHAN B.M., FOSTER J.C., CLARK E.G., ELLIS J.A., HAINES D.M., ADAIR B.M., ALLAN G.M.: A comparison of in situ hybridisation and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods* 1999. 80(2), p.: 123-128.
- MEEHAN B.M., CREELAN J.L., McNULTY M.S., TODD D.: Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 1997. 78(1), p.: 221-227.
- MEEHAN B.M., McNEILLY F., TODD D., KENNEDY S., JEWHRST V.A., ELLIS J.A., HASSARD L.E., CLARK E.G., HAINES D.M., ALLAN G.M.: Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 1998. 79(9), p.: 2171-9.
- MOLNÁR T., GLÁVITS R., SZEREDI L., DÁN Á.: Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 2002. 50(1), p.: 5-16.
- MORALES G., GUZMAN V.: *Proceedings of the 4th International Pig Veterinary Congress.* 1976. June 22-24, Ames, Iowa. p.: 121.
- MOROZOV I., SIRINARUMITR T., SORDEN S.D., HALBUR P.G., MORGAN M.K., YOON K.J., PAUL P.S.: Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1998. 36(9), p.: 2535-41.
- MOTOVSKI A., SEGALES J.: First report of PCV2 associated diseases in Bulgaria. In: *Vet Rec.* 2004. 154(10), p.: 311-2.
- MURESAN E., GABOREANU M., BOGDAN A.T., BABA A.I.: *Tehnici de histologie normala si patologica*, Editura Ceres, Bucuresti, 1974. p.: 232-234.
- MUHLING J.E., RAYE W.S., BUDDLE R.J., WILCOX G.E.: Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. *Aust. Vet. J.* 2006. Dec;84(12):421-5
- NAYAR G.P.S., HAMEL A.L., LIN L.H., SACHVIE C., GRUDESKI E., SPEARMAN G.: Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can. Vet. J.* 1999. 40(4), p.: 277-278.
- NIAGRO F.D., FORSTHOEFEL A.N., LAWTHOR R.P., KAMALANATHAN L., RITCHIE B.W., LATIMER K.S., LUKERT,P.D.: Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 1998. 143 (9), p.: 1723-1744.
- O'CONNOR B., GAUVREAU H., WEST K., BOGDAN J., AYROUD M., CLARK, E.G., KONOBY C., ALLAN G., ELLIS J.A.: Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.* 2001. 42 (7), p.:

551-553.

- OLVERA A., CORTEY M., SEGALÉS J.: Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 2007. 357(2), p.: 175-185.
- ONUKE A., ABE K., TOGASHI K., KAWASHIMA K., TANEICHI A., TSUNEMITSU H.: Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 1999. 61(10), p.: 1119-23.
- OPRIESSNIG T., FENAUX M., YU S., EVANS R.B., CAVANAUGH D., GALLUP J.M., PALLARES F.J., THACKER E.L., LAGER K.M., MENG X.J., HALBUR P.G.: Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 2004b. 98(3-4), p.: 209-220.
- OPRIESSNIG T., MCKEOWN N.E., ZHOU E.M., MENG X.J., HALBUR P.G.: Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J. Gen. Virol.* 2006. 87(10), p.: 2923-32.
- OPRIESSNIG T., THACKER E.L., YU S., FENAUX M., MENG X.J., HALBUR P.G.: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 2004a. 41(6), p.: 624-40.
- OPRIESSNIG T., YU S., GALLUP J.M., EVANS R.B., FENAUX M., PALLARES F.J., THACKER E.L., BROCKUS C.W., ACKERMANN M.R., THOMAS P., MENG X.J., HALBUR P.G.: Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet. Pathol.* 2003. 40(5), p.: 521-9.
- OSTANELLO F., CAPRIOLI A., Di FRANCESCO A., BATTILANI M., SALA G., SARLI G., MANDRIOLI L., McNEILLY F., ALLAN G.M., PROSPERI S.: Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 2005. 108(3-4), p.: 179-86.
- OUARDANI M., WILSON L., JETTE R., MONTPETIT C., DEAS, S.: Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37(12), p.: 3917-3924.
- PARK J.S., KIM J., HA Y., JUNG K., CHOI C., LIM J.K., KIM S.H., CHAE C.: Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J. Comp. Pathol.* 2005. 132(2-3), p.: 139-144.
- PENSAERT M.B., SANCHEZ R.E., LADEKJAER-MIKKELSEN A.S., ALLAN G.M., NAUWYNCK H. J.: Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special

- reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol.* 2004. 98(2), p.: 175-83.
- PESCH S., SCHMIDT U., OHLINGER V.F.: Proliferative necrotizing pneumonia: a result of co-infection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Pig Progress*, Sept 2000. p.: 28-29.
- PLANA-DURAN J., BALASCH M., SEGALES J., ROSELL C., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., DOMINGO M., FOLCH J.M., SANCHEZ A., MANKERTZ A.: Post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 1999. 145(3), p.: 87-8.
- POGRANICHNIY R.M., YOON K.J., HARMS P.A., SORDEN S.D., DANIELS M.: Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002. 14, p.: 449-456.
- QUINTANA J., BALASCH M., SEGALES J., CALSAMIGLIA M., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., PLANA-DURAN J., DOMINGO M.: Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet. Res.* 2002. 33(3), p.: 229-37.
- QUINTANA J., SEGALES J., CALSAMIGLIA M., DOMINGO M.: Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *The Veterinary Journal*, 2006. 171(3), p.: 570-3.
- RAMOS-VARA J.A., DURAN O., RENDER J.A., CRAFT D.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet. Rec.* 1997. 141(18), p.: 479-480.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., SEGALES J., ROSELL C., ROVIRA A., PUJOLS J., PLANA-DURAN J., DOMINGO M.: Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2003. 50(2), p.: 99-101.
- ROSELL C., SEGALES J., DOMINGO M.: Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol* 2000c. 37(6), p.: 687-692.
- ROSELL C., SEGALES J., PLANA-DURAN J., BALASCH M., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., KENNEDY S., ALLAN G.M., McNEILLY F., LATIMER K.S., DOMINGO M.: Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridisation studies of natural cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 1999. 120(1), p.: 59-78.
- ROSELL C., SEGALES J., ROVIRA A., DOMINGO M.: Porcine circovirus in Spain. *Vet. Rec.* 2000b. 146(20), p.: 591-2.
- ROSELL C., SEGALES J., RAMOS-VARTA J.A., FOLCH J.M., RODRIGUEZ-ARRIOJA G.M., DURAN O., BALASCH M., PLANA-DURAN J., DOMINGO M.: Identification of porcine

- circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 2000a. 146(2), p.: 40-43.
- ROVIRA A., BALASCH M., SEGALES J., GARCIA L., PLANA-DURAN J., ROSELL C., ELLERBROK H., MANKERTZ A., DOMINGO M.: Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 2002. 76(7), p.: 3232-3239.
- ROYER R.L., NAWAGITGUL P., HALBUR P.G., PAUL P.S.: Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Swine Health Prod.* 2001. 9, p.: 281-4.
- SAIKUMAR G., SHARMA R., SINGH V.K., PALIWAL O.P.: Nem publikált. PubMed: DQ158863, 2005.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 1989. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- SANCHEZ Jr R.E., MEERTS P., NAUWYNCK H.J., PENSAERT M.B.: Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.* 2003. 95(1-2), p.: 15-25.
- SANCHEZ Jr. R.E., NAUWYNCK H.J., McNEILLY F., ALLAN G.M., PENSAERT M.B.: Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 2001b. 83(2), p.: 169-176.
- SANCHEZ Jr. R.E., NAUWYNCK H.J., PENSAERT M.B.: Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium. *Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. European Society of Veterinary Virology* 2001a., 122.
- SAOULIDIS K., KYRIAKIS S.C., KENNEDY S., LEKKAS S., MILIOTIS ChC., ALLAN G., BALKAMOS G.C., PAPOUTSIS P.A.: First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2002. 49(4), p.: 202-5.
- SARRADELL J., PEREZ A.M., ANDRADA M., RODRIGUEZ F., FERNANDEZ A., SEGALES J.: PMWS in Argentina. *Vet. Rec.* 2002. 150(10), p.: 323.
- SARLI G., MANDRIOLI L., LAURENTI M., SIDOLI L., CERATI C., ROLLA G., MARCATO P.S.: Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001. 83(1-2), p.: 53-67.
- SATO K., SHIBAHARA T., ISHIKAWA Y., KONDO H., KUBO M., KADOTA K.: Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in

- Hokkaido, Japan. In: *J Vet Med Sci.* 2000. 62(6), p.: 627-33.
- SCHULZE C., NEUMANN G., GRÜTZE I., ENGELHARDT A., MIRLE C., EHLERT F., HLINAK A.: Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2003. 110(10), p.:426-8.
- SCHULZE C., SEGALÉS J., NEUMANN G., HLINAK A., CALSAMIGLIA M., DOMINGO M.: Identification of postweaning multisystemic wasting syndrome in European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* 2004. 154(22), p.: 694-696.
- SEDLAK K, BARTOVA E, MACHOVA J.: Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J. Wildl Dis.* 2008. 44(3) p.: 777-80.
- SEGALÉS J.: PCVD Diagnosis. Porcine Circovirus Disease (PCVD): Towards improved food quality and safety within EU New Member States and Associated Candidate Countries, Brno, NMSACC - PCVD WORKSHOP 22-24 MARC, 2006.
- SEGALÉS J., MATEU E.: Immunosuppression as a feature of postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal* 2006. 171(3), p.: 396-397.
- SEGALÉS J., DOMINGO M.: Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. *Vet. Q.* 2002. 24(3), p.: 109-124.
- SEGALÉS J., PIELLA J., MARCO E., MATEU-DE-ANTONIO E.M., ESPUMA E., DOMINGO M.: Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 1998. 142(18), p.: 483-486.
- SHCHERBAKOV A.V., KUKUSHKIN S.A., TIMINA A.M., BAIBIKOV T.Z., KOVALISHIN V.F., KANSHINA A.V., BIADOVSKAIA O.P., PROKHVATILOVA L.B., RUCHNOVA O.I., BAKUNOV I.N., BABKIN M.V.: Monitoring of infectious diseases among wild boars. *Vopr. Virusol.* 2007. 52(3), p.:29-33.
- SHIBAHARA T., SATO K., ISHIKAWA Y., KADOTA K.: Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J. Vet. Med. Sci.* 2000. 62(11), p.: 1125-1131.
- SHIBATA I., OKUDA Y., YAZAWA S., ONO M., SASAKI T., ITAGAKI M., NAKAJIMA N., OKABE Y., HIDEJAMA I.: PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.* 2003. 65(3), p.: 405-408.
- SHUAI J., WEI W., LI X., CHEN N., ZHANG Z., CHEN X., FANG W.: Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in high-seroprevalence areas in southeastern China. *Virus Genes.* 2007. 35(3), p.: 619-27.
- SHUAI J., WEI W., JIANG L., LI X., CHEN N., FANG W.: Mapping of the nuclear localization

- signals in open reading frame 2 protein from porcine circovirus type 1. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2008. 40(1), p.: 71-77.
- SIERRA M.A., MULAD J.M., MOLENBEEK R.F., MAAREN VAN C., VOS J.H., QUEZADA M., GRUYS E.: Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Eur. J. Vet. Pathol.* 1997. 3, p.: 63-70.
- SIRINARUMITR T., MOROZOV I., NAWAGITGUL P., SORDEN S.D., HARMS P.A., PAUL P.S.: Utilization of a rate enhancement hybridisation buffer system for rapid in situ hybridisation for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Diagn. Invest.* 2000. 12(6), p.: 562-565.
- SMITH W.J., THOMSON J.R., DONE S.: Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet. Rec.* 1993. 132(2), p.: 47.
- SORDEN S.D.: Update on porcine circovirus and post-weaning multisystemic wastingsyndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 2000. 8, p.: 133-136.
- SPILLANE P., KENNEDY S., MEEHAN B., ALLAN G.: Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 1998. 143(18), p.: 511-2.
- STAEBLER S., SYDLER T., BUERGI E., McCULLOUGH K., McNEILLY F., ALLAN G., POSPISCHIL A.: PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *The Veterinary Journal* 2005. 170(1), p.: 132-4.
- STEINFELDT T., FINSTERBUSCH T., MANKERTZ A.: Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 2001. 291(1), p.: 152-160.
- STEVENSON G.W., KIUPEL M., MITTAL S.K., CHOI J., LATIMER K.S., KANITZ C.L.: Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001. 13(1), p.: 57-62.
- TAKAHAGI Y., NISHIYAMA Y., TOKI S., YONEKITA T., MORIMATSU F., MURAKAMI H.: Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 2008. 70(6), p.: 603-6.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007. 24, p.: 1596-1599.
- TERREGINO C., MONTESI F., MUTINELLI F., CAPUA I., PANDOLFO A.: Detection of a circovirus-like agent from farmed pheasants in Italy. *Vet. Rec.* 2001. 149(11), p.: 340.
- THACKER E.L.: Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal* 2001. 48, p.: 66-70.
- THIBAUT S., DROLET R., GERMAIN M.C., D'ALLAIRE S., LAROCHELLE R., MAGAR

- R.: Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet. Pathol.* 1998. 35(2), p.:108-116.
- THOMSON J., MACLNTYRE N., HENDERSON L., MEIKLE C.: Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy. *Vet. Rec.* 2001. 149(14), p.: 412-417.
- THOMSON J., SMITH B., ALLAN G., McNEILLY F., McVICAR C.: PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 2000. 146(22), p.: 651-2.
- TIMMUSK S., WALLGREN P., BRUNBORG I.M., WIKSTRÖM F.H., ALLAN G., MEEHAN B., MCMENAMY M., MCNEILLY F., FUXLER L., BELÁK K., PÖDERSOO D., SAAR T., BERG M., FOSSUM C.: Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes.* 2008. 36(3), p.: 509-520.
- TISCHER I., GELDERBLOM H., VETTERMAN W., KOCH M.A.: A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 1982. 295, p.: 64-66.
- TISCHER I., BODE L., PETERS D., POCIULI S., GERMANN B.: Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 1995. 140(4), p.: 737-43.
- TISCHER I., MIELDS W., WOLFF D., VAGT M., GRIEM W.: Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 1986. 91(3-4), p.: 271-6.
- TISCHER I., RASCH R., TOCHTERMANN G.: Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zbl. Bakteriol. A*, 1974. 226, p.: 153-167
- TOPLAK I., GRO J., HOSTNIK P., BARLIC-MAGANJA D.: Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet. Rec.* 2004. 155(6), p.: 178-80.
- TRUJANO M., IGLESIAS G., SEGALES J., PALACIOS J.M.: PCV2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet. Rec.* 2001. 148(25), p.: 792.
- TRUONG C., MAHE D., BLANCHARD P., Le DIMNA M., MADEC F., JESTIN A., ALBINA E.: Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch. Virol.* 2001. 146(6), p.: 1197-1211.
- VICENTE J., SEGALÉS J., HOFLE U., BALASCH M., PLANA-DURAN J., DOMINGO M., GORTAZAR C.: Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 2004. 35(2), p.: 243-253.
- VIGRE H., BAEKBO P., JORSAL S.E., BILLE-HANSEN V., HASSING A.G., ENØE C.,

- BOTNER A.: Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2005. 110(1-2), p.:17-26.
- WALLGREN P., BELÁK K., EHLORSSON C.J., BERGSTRÖM G., LINDBERG M., FOSSUM C., ALLAN G.M., ROBERTSSON J.A.: Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Sweden from an exotic to an endemic disease. *Vet. Q.* 2007. 29(4), p.: 122-137.
- WALLGREN P., HASSLUNG F., BERGSTROM G., LINDER A., BELÁK K., HARD A.F., SEGERSTAD C., STAMPE M., MOLANDER B., BJORNBERG KALLAY T., NORREGARD E., EHLORSSON C.J., TORNQUIST M., FOSSUM C., ALLAN G.M., ROBERTSSON J.A.: Postweaning multisystemic wasting syndrome--PMWS. The first year with the disease in Sweden. *Vet. Q.* 2004. 26(4), p: 170-87.
- WANG C., HUANG T.S., HUANG C.C., TU C., JONG M.H., LIN S.Y., LAI S.S.: Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 2004. 66(5), p. : 469-75.
- WATTRANG E., McNEILLY F., ALLAN G.M., GREKO C., FOSSUM C., WALLGREN P.: Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Vet. Microbiol.* 2002. 86(4), p.: 281-293.
- WELLENBERG G.J., PESCH S., BERNDSEN F.W., STEVERINK P.J., HUNNEMAN W., VAN der VORST T.J., PEPPERKAMP N.H., OHLINGER V.F., SCHIPPERS R., VAN OIRSCHOT J.T., de JONG M.F.: Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Vet. Q.* 2000. 22(3), p.: 167-72.
- WELLENBERG G.J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., De JONG M.F., BOERAMA W.J.A., ELBERS A.R.W.: Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet. Microbiol.* 2004. 99(3-4), p.: 203-214.
- WEN L., GUO X., YANG H.: Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet. Microbiol.* 2005. 110(1-2), p.: 141-6.
- WEST K.H., BYSTROM J.M., WOJNAROWICZ C., SHANTZ N., JACOBSON M., ALLAN G.M., HAINES D.M., CLARK E.G., KEAKOWKA S., McNEILLY F., KONOBY C., MARTIN K., ELLIS J.A.: Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999. 11(6), p.: 530-532.
- WOODBINE K.A., MEDLEY G.F., SLEVIN J., KILBRIDE A.L., NOVELL E.J., TURNER M.J., KEELING M.J., GREEN L.E.: Spatiotemporal patterns and risks of herd breakdowns in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.* 2007. 160(22), p.:

751-62.

- YANG Z.Z., SHUAI J.B., DAI X.J., FANG W.H.: A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2008. 9(2), p.:148-53.
- YANG K.H., LEE Y.F., CHAO D.S., SHIEH Y.C., LAI S.S.: Complete nucleotide sequences of porcine circovirus Tainan strand outbreak in Taiwan. *Nem publikált. PubMed: AF166528*, 1999.
- YOON K.J., JEPSEN R.J., POGRANICHNIY R.M., SORDEN S., STAMMER R., EVANS L.E.: A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Theriogenology.* 2004. 61(6), p.: 1025-37.
- YU S., OPRIESSNIG T., KITIKOON P., NILUBOL D., HALBUR P.G., THACKER E.: Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007b. 115(3-4), p: 261-72.
- YU S., VINCENT A., OPRIESSNIG T., CARPENTER S., KITIKOON P., HALBUR P.G., THACKER E.: Quantification of PCV2 kapszid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet. Microbiol.* 2007a. 123(1-3), p.: 34-42.
- ZHOU J.Y., CHEN Q.X., YE J.X., SHEN H.G., CHEN T.F., SHANG S.B.: Serological investigation and genomic characterization of PCV2 isolates from different geographic regions of Zhejiang province in China. *Vet. Res. Commun.* 2006. 30(2), p.: 205-20.

9. Publikációk

CIKKEK:

- CSÁGOLA A.**, KECSKEMÉTI S., KARDOS G., KISS I., TUBOLY T.: Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol.*, 2006. 151(3) p: 495-507. (IF:1,850, Cit.: 5.)
- CADAR D., **CSÁGOLA A.**, DÁN Á., DEIM Z., SPÎNU M., MICLĂUȘ V., KÖBÖLKUTI L., CZIRJÁK G., TUBOLY T.: Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2007. 55(1) p.:151-156. (IF:0,474, Cit.: 0.)
- CSÁGOLA A.**, KISS I., TUBOLY T.: Detection and analysis of porcine circovirus type 1 in wild boars. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008. 56(1) p.:139-144. (IF:0,474, Cit.: 0.)
- CSÁGOLA A.**, CADAR D., TUBOLY T.: Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in experimentally inoculated mice. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008. 56(3) p.: 421-427. (IF:0,474, Cit.: 0.)
- BÁLINT Á., TENK M., DEIM Z., RASMUSSEN T.B., UTTENTHAL Å., **CSÁGOLA A.**, TUBOLY T., FARSANG A., BERG M., BELÁK S.: Development of Primer-Probe Energy Transfer real-time PCR for the detection and quantification of porcine circovirus type 2. *Acta Veterinaria Hungarica*, közlésre elfogadva. (IF:0,474, Cit.: 0.)
- IVANICS R., **CSÁGOLA A.**, TUBOLY T.: DNS vakcinák, egy újabb lehetőség a fertőző betegségek megelőzésére. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2004. 126. 617-625. (IF:0,108, Cit.: 0.)

SZABADALOM:

- CSÁGOLA A.**, PÉNZES Z., TUBOLY T.: Novel porcine circovirus type 2B isolate and uses thereof. US Serial No. 61/118,505, the filing date of November 28, 2008.

ELŐADÁSOK:

- CSÁGOLA A.**, CADAR D., TUBOLY T.: Viral replication and transmission in NMRI mice experimentally inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2). 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 24-27. June 2007. Krakow, Poland.

- CADAR D., **CSÁGOLA A.**, DÁN Á., DEIM Z., SPÎNUM., MICLĂUȘ V., KÖBÖLKUTI L., CZIRJÁK G., TUBOLY T.: Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania. EUROPEAN SOCIETY FOR VETERINARY VIROLOGY 7th International Congress of Veterinary Virology, 24th-27th September 2006. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.
- CSÁGOLA A.**, KECSKEMÉTI S., KISS I., TUBOLY T.: Sertés circovírusok előfordulása a hazai vadon élő sertésállományokban. Magyar Mikrobiológiai Társaság, 2004. Keszthely.
- CSÁGOLA A.**, KECSKEMÉTI S., KISS I., TUBOLY T.: Házi sertésekből és a hazai vadon élő sertés állományokból származó sertés circovírusok összehasonlító vizsgálata. Akadémiai beszámoló, 2005. január, Budapest.
- CSÁGOLA A.**: Sertés circovírusok által okozott kórképek. Magyar Állatorvosok Világszövetsége 2005. Szabadka.
- CSÁGOLA A.**, TOMBÁ CZ K., TUBOLY T.: Sertés circovírus fertőzöttség a Közép-Európai régióban. Akadémiai beszámoló, 2008. január, Budapest.

10. Mellékletek

1. melléklet. A teljes PCV2 genomok filogenetikai összehasonlításához használt szekvenciák. A szekvenciák a program által alkotott sorrendben vannak feltüntetve.

	Csop.	Kód	Ország	Év
1	B/1	EU136717	Den	2007
2	B/1	EU136720	Den	2007
3	B/1	EU136712	Den	2007
4	B/1	DQ017036	Chi	2005
5	B/1	DQ478947	Chi	2006
6	B/1	EF565368	Den	2004
7	B/1	EF565354	Den	2004
8	B/1	EF565347	Den	2004
9	B/1	EF56534	Den	2004
10	B/1	AY686762	Chi	2004
11	B/1	AY424405	Aut	2003
12	B/1	EF565349	Den	2004
13	B/1	EF565358	Den	2004
14	B/1	AY484414	Ned	2003
15	B/1	EU136715	Den	2007
16	B/1	EU136714	Den	2007
17	B/1	EU136719	Den	2007
18	B/1	AY849938	Chi	2004
19	B/1	EU266596	Chi	2007
20	B/1	EF565363	Den	2004
21	B/1	EF565344	Den	2007
22	B/1	AY291316	Chi	2003
23	B/1	EF565356	Den	2004
24	B/1	DQ104420	Chi	2005
25	B/1	SLO1	Slo	2007
26	B/1	CHE8	Che	2007
27	B/1	CHE5	Che	2007
28	B/1	CHE6	Che	2007
29	B/1	EF565346	Den	2004
30	B/1	EF565361	Den	2004
31	B/1	EU136713	Den	2007
32	B/1	CRO4	Cro	2007
33	B/1	Hun17	Hun	2007
34	B/1	EU266593	Chi	2007
35	B/1	CHE1	Che	2007
36	B/1	CHE3	Che	2007
37	B/1	CHE2	Che	2007
38	B/1	CHE4	Che	2007
39	B/1	EF565342	Den	2004
40	B/1	EU136718	Den	2007
41	B/1	EF565362	Den	2004
42	B/1	EU136716	Den	2007
43	B/1	EF565351	Den	2004
44	B/1	EF565343	Den	2004
45	B/1	EF565353	Den	2004
46	B/1	EF565348	Den	2004
47	B/1	EF565352	Den	2004
48	B/1	EF565355	Den	2004
49	B/1	EF565359	Den	2004
50	B/1	DQ201641	Chi	2005
51	B/1	DQ141322	Chi	2005
52	B/1	DQ201639	Chi	2005
53	B/1	DQ201642	Chi	2005

	Csop.	Kód	Ország	Év
54	B/1	AY3219873	Fra	2003
55	B/1	EF421969	Chi	2007
56	B/1	AJ293869	UK	1999
57	B/1	AY424404	Aut	2003
58	B/1	DQ364650	Bra	2006
59	B/1	EF565345	Den	2004
60	B/1	EU266598	Chi	2007
61	B/1	AY596822	Chi	2004
62	B/1	AY596823	Chi	2004
63	B/1	AY391729	Chi	2003
64	B/1	EF515839	Chi	2007
65	B/1	AY484409	Ned	2003
66	B/1	AY969004	Chi	2005
67	B/1	CRO7	Cro	2007
68	B/1	EF524529	Chi	2007
69	B/1	DQ923524	Bra	2006
70	B/1	DQ923523	Bra	2006
71	B/1	HUN15	Hun	2007
72	B/1	AY484415	Ned	2003
73	B/1	AY321990	Fra	2003
74	B/1	AY321991	Fra	2003
75	B/1	EF524528	Chi	2007
76	B/1	EU266595	Chi	2007
77	B/1	DQ910866	Chi	2006
78	B/1	EU266594	Chi	2007
79	B/1	EF524516	Chi	2007
80	B/1	AY291318	Chi	2003
81	B/1	AY578327	Chi	2004
82	B/1	AY604430	Chi	2004
83	B/1	EU266597	Chi	2007
84	B/1	AY651850	Chi	2004
85	B/1	EU266599	Chi	2007
86	B/1	AY682993	Chi	2004
87	B/1	AY686764	Chi	2004
88	B/1	CRO1	Cro	2007
89	B/1	AY579893	Chi	2004
90	B/1	SLO8	Slo	2006
91	B/1	EF524521	Chi	2007
92	B/1	EF524519	Chi	2007
93	B/1	AY641542	Chi	2004
94	B/1	EF524520	Chi	2007
95	B/1	AY322000	Fra	2003
96	B/1	SLO7	Slo	2006
97	B/1	DQ648031	Hun	2003
98	B/1	AY321995	Fra	2003
99	B/1	AY321996	Fra	2003
100	B/1	EF565350	Den	2004
101	B/1	EF565364	Den	2004
102	B/1	AY321999	Fra	2003
103	B/1	AY321994	Fra	2003
104	B/1	AY322000	Fra	2003
105	B/1	EF565360	Den	2004
106	B/1	EF675234	Chi	2007

	Csop.	Kód	Ország	Év
107	B/1	EF675235	Chi	2007
108	B/1	AY322002	Fra	2003
109	B/1	AY682990	Chi	2004
110	B/1	AY484416	Ned	2003
111	B/1	AY682997	Chi	2004
112	B/1	AY181945	Chi	2002
113	B/1	AY321997	Fra	2003
114	B/1	AY321998	Fra	2003
115	B/1	ROM1	Rom	2003
116	B/1	ROM4	Rom	2007
117	B/1	AY256457	Hun	2003
118	B/1	SLO5	Slo	2007
119	B/1	SLO6	Slo	2006
120	B/1	SLO4	Slo	2006
121	B/1	SLO2	Slo	2007
122	B/1	SLO3	Slo	2006
123	B/1	AY188355	Chi	2002
124	B/1	AY536755	Chi	2004
125	B/1	AY217743	Chi	2003
126	B/1	EF524522	Chi	2007
127	B/1	HUN16	Hun	2007
128	B/1	AM086384	Chi	2005
129	B/1	AY536756	Chi	2004
130	B/1	AY321992	Fra	2003
131	B/1	AY321993	Fra	2003
132	B/1	AY288134	Chi	2003
133	B/1	CHE7	Che	2007
134	B/1	AY691679	Chi	2004
135	B/1	ROM2	Rom	2007
136	B/1	AY732494	Chi	2004
137	B/1	HUN14	Hun	2007
138	B/1	CRO3	Cro	2007
139	B/1	ROM3	Rom	2007
140	B/1	POL2	Pol	2007
141	B/1	WB-H1	Hun	2003
142	B/1	POL4	Pol	2007
143	B/1	HUN12	Hun	2007
144	B/1	EF421973	Chi	2007
145	B/1	WB-H6	Hun	2003
146	B/1	AY288133	Chi	2003
147	B/1	AY294310	Chi	2003
148	B/1	EF592575	Chi	2007
149	B/1	EF592576	Chi	2007
150	B/1	EF619037	Chi	2007
151	B/2	EF493840	Chi	2007
152	B/2	EF493841	Chi	2007
153	B/2	EF493842	Chi	2007
154	B/2	EF421968	Chi	2007
155	B/2	AY916791	Chi	2005
156	B/2	EF493838	Chi	2007
157	B/2	EU283329	Chi	2007
158	B/2	EF493839	Chi	2007
159	B/2	EF675236	Chi	2007
160	B/2	EF675242	Chi	2007
161	B/2	EF675237	Chi	2007
162	B/2	EF675239	Chi	2007
163	B/2	AF055394	Fra	1998
164	B/2	CQ768114	IRL2	2004
165	B/2	EF524515	Chi	2007

	Csop.	Kód	Ország	Év
166	B/2	EF524536	Chi	2007
167	B/2	AY484412	Ned	2003
168	B/2	AY484408	Ned	2003
169	B/2	DQ220738	Can	2005
170	B/2	EF452351	Usa	2007
171	B/2	EF452350	Usa	2007
172	B/2	AY321988	Fra	2003
173	B/2	AY321989	Fra	2003
174	B/2	AY256460	Hun	2003
175	B/2	AY484411	Ned	2003
176	B/2	DQ220737	Can	2005
177	B/2	AY484413	Ned	2003
178	B/2	AF201897	Ned	1999
179	B/2	AY613854	Chi	2004
180	B/3	EF565357	Den	2004
181	B/3	SLO9	Slo	2006
182	B/3	AY321986	Fra	2003
183	B/3	AY321984	Fra	2003
184	B/3	AF055393	Fra	1998
185	B/3	AY321985	Fra	2003
186	B/3	AF201311	Fra	1999
187	B/3	AY122275	Chi	2002
188	B/3	AX003274	Fra	1999
189	B/3	AX003275	Fra	1999
190	B/3	EF458306	Arg	2007
191	B/4	DQ220728	Can	2005
192	B/4	DQ220735	Can	2005
193	B/4	DQ220727	Can	2005
194	B/4	DQ220733	Can	2005
195	B/4	EF394778	Can	2007
196	B/4	DQ220732	Can	2005
197	B/4	EF394779	Can	2007
198	B/4	DQ629115	USA	2005
199	B/4	DQ629116	USA	2005
200	B/4	EF394777	Can	2007
201	B/4	DQ629117	USA	2005
202	B/4	DQ629118	USA	2005
203	B/4	DQ220731	Can	2005
204	B/4	DQ629119	USA	2005
205	B/4	DQ220736	Can	2005
206	B/4	DQ220734	Can	2005
207	B/4	DQ220739	Can	2005
208	B/4	DQ220729	Can	2005
209	B/4	DQ220730	Can	2005
210	B/5	DQ180392	Chi	2005
211	B/5	POL1	Pol	2007
212	B/5	SLO10	Slo	2006
213	B/5	AF538325	Chi	2002
214	B/5	AY177626	Chi	2002
215	B/5	AY321982	Fra	2003
216	B/5	AY321983	Fra	2003
217	B/5	AY322003	Fra	2003
218	B/6	POL3	Pol	2007
219	B/6	EF675238	Chi	2007
220	B/6	EF675243	Chi	2007
221	B/6	EU366325	Chi	2007
222	B/6	EU366324	Chi	2007
223	B/6	EU366326	Chi	2007
224	B/6	EF675231	Chi	2007

	Csop.	Kód	Ország	Év
225	B/6	AY678532	Chi	2004
226	B/6	EF675244	Chi	2007
227	B/6	DQ910865	Chi	2006
228	B/6	AY682995	Chi	2004
229	B/6	EF524530	Chi	2007
230	B/6	EF524527	Chi	2007
231	B/6	EF524524	Chi	2007
232	B/6	EF524525	Chi	2007
233	B/6	AY847748	Chi	2004
234	B/6	DQ355153	Chi	2006
235	B/6	AY556475	Chi	2004
236	B/6	DQ180393	Chi	2005
237	B/6	DQ195679	Chi	2005
238	B/6	EF524535	Chi	2007
239	B/6	EU266592	Chi	2007
240	B/6	EF421972	Chi	2007
241	B/6	AY691169	Chi	2004
242	B/6	EF493837	Chi	2007
243	B/6	DQ997816	Chi	2006
244	B/6	DQ997817	Chi	2006
245	B/6	DQ346683	Chi	2005
246	B/6	EU366323	Chi	2007
247	B/6	EF675232	Chi	2007
248	B/6	EF675240	Chi	2007
249	B/6	EU095020	Chi	2007
250	B/6	DQ997815	Chi	2006
251	B/6	EF421967	Chi	2007
252	B/6	EF524534	Chi	2007
253	B/6	EF421970	Chi	2007
254	B/6	EF421971	Chi	2007
255	B/7	AY484407	Ned	2003
256	B/7	AY682992	Chi	2004
257	B/7	EF210106	Chi	2007
258	B/7	DQ218420	Chi	2005
259	B/7	DQ218421	Chi	2005
260	B/7	DQ218419	Chi	2005
261	B/7	DQ201640	Chi	2005
262	B/7	DQ206444	Chi	2005
263	B/7	EU148503	Den	1980
264	B/7	EU148504	Den	1987
265	B/7	EU148505	Den	1990
266	B/7	WB-H5	Hun	2003
267	B/7	AY556477	Chi	2004
268	B/7	EU274310	Chi	2007
269	B/7	EU274312	Chi	2007
270	B/7	EF989713	Chi	2007
271	B/7	EU274309	Chi	2007
272	B/7	EU274311	Chi	2007
273	B/7	EF524517	Chi	2007
274	B/7	DQ151643	Chi	2005
275	B/7	DQ363860	Chi	2006
276	B/7	AY713470	Ger	2004
277	B/7	AY181946	Chi	2002
278	B/7	AY686763	Chi	2004
279	B/7	AY686765	Chi	2004
280	B/7	AY556476	Chi	2004
281	B/7	AY181947	Chi	2002
282	B/7	AY510375	Chi	2003
283	B/7	AY484410	Ned	2003

	Csop.	Kód	Ország	Év
284	B/7	EF675230	Chi	2007
285	B/7	AY556473	Chi	2004
286	B/7	EF675241	Chi	2007
287	B/7	AY943819	Chi	2005
288	B/7	EF524539	Chi	2007
289	B/7	AY291317	Chi	2003
290	B/7	AY682991	Chi	2004
291	B/7	AY682994	Chi	2004
292	B/7	AY682996	Chi	2004
293	B	EF524523	Chi	2007
294	A	EF524518	Chi	2007
295	A	CRO2	Cro	2007
296	A/1	EF524532	Chi	2007
297	A/1	EF524541	Chi	2007
298	A/1	EF524537	Chi	2007
299	A/1	EF524526	Chi	2007
300	A/1	EF524531	Chi	2007
301	A/1	EF524533	Chi	2007
302	A/1	AY556474	Chi	2004
303	A/1	EF675229	Chi	2007
304	A/2	AB072302	Jap	2001
305	A/2	AY754018	Aus	2004
306	A/2	AY754016	Aus	2004
307	A/2	EU148506	Den	1993
308	A/2	AY754017	Aus	2004
309	A/2	AF117753	Can	1998
310	A/2	AY754019	Aus	2004
311	A/2	AY754020	Aus	2004
312	A/2	AY754021	Aus	2004
313	A/2	AF109398	Can	1998
314	A/2	WB-H2	Hun	2003
315	A/2	WB-H7	Hun	2003
316	A/2	AY146992	Chi	2002
317	A/2	EU148507	Den	1996
318	A/2	EU136711	Den	2007
319	A/2	AF201307	Ger	1999
320	A/3	AF154679	Tai	1999
321	A/3	AF166528	Tai	1999
322	A/3	AY146991	Chi	2002
323	A/3	AY146993	Chi	2002
324	A/3	AF364094	Tai	2001
325	A/3	AY180396	Chi	2002
326	A/3	AY180397	Chi	2002
327	A/3	AF305532	Tai	2001
328	A/3	AF305533	Tai	2001
329	A/3	AY256459	Hun	2003
330	A/3	HUN13	Hun	2007
331	A/3	AF201309	Spa	1999
332	A/3	AF201308	Spa	1999
333	A/3	AF201310	Spa	1999
334	A/3	AY256455	Hun	2003
335	A/4	AF201305	Ger	1999
336	A/4	AF201306	Ger	1999
337	A/4	WB-H3	Hun	2003
338	A/4	AY322004	Fra	2003
339	A/4	AY256458	Hun	2003
340	A/4	AF109399	Can	1998
341	A/4	DQ870484	USA	2005
342	A/4	AY256456	Hun	2003

	Csop.	Kód	Ország	Év
343	A/4	WB-H4	Hun	2003
344	A/4	HUN11	Hun	2007
345	A/4	AF264043	USA	2000
346	A/4	AF381176	Chi	2001
347	A/4	AY288135	Chi	2003
348	A/4	AY424401	Aut	2003
349	A/4	NC005148	USA	2004
350	A/4	AY424402	Aut	2003
351	A/4	AY424403	Aut	2003
352	A/5	DQ104421	Chi	2005
353	A/5	DQ104422	Chi	2005
354	A/5	DQ104419	Chi	2005
355	A/5	AF465211	Tai	2001
356	A/5	AF112862	Can	1998
357	A/5	AF055392	Can	1998
358	A/5	AX379563	USA	2001
359	A/5	AY099499	USA	2002
360	A/5	AX379561	USA	2001
361	A/5	AY099495	USA	2002
362	A/5	AF264041	USA	2000
363	A/5	AF454546	Kor	2001
364	A/5	AF118097	Can	1998
365	A/5	EF394774	Can	2007
366	A/5	EF394775	Can	2007
367	A/5	EF394776	Can	2007
368	A/5	AY094619	USA	2002
369	A/5	DQ629113	USA	2005
370	A/5	DQ629114	USA	2005
371	A/5	AF264038	USA	2000
372	A/5	AF264039	USA	2000
373	A/5	AY325495	?SUA	2003
374	A/5	DQ397521	USA	1998
375	A/5	AJ293867	Can	1999
376	A/5	AJ293868	Can	1999
377	A/5	AX379564	USA	2001
378	A/5	AY099500	USA	2002

	Csop.	Kód	Ország	Év
379	A/5	AF520783	Kor	2002
380	A/5	AF544024	Kor	2002
381	A/5	AX379560	USA	2001
382	A/5	AY099496	USA	2002
383	A/5	AF085695	Can	1998
384	A/5	BD087175	Can	1997
385	A/5	AF086836	Can	1998
386	A/5	AF086835	Can	1998
387	A/5	BD087177	Can	1997
388	A/5	AF086834	Can	1998
389	A/5	AX685842	Can	2003
390	A/5	AF381177	Chi	2001
391	A/5	EF524538	Chi	2007
392	A/5	EF524542	Chi	2007
393	A/5	EF524540	Chi	2007
394	A/5	AB072303	ap	2001
395	A/5	AF381175	Chi	2001
396	A/5	AY699793	USA	2004
397	A/5	AY754022	Aus	2004
398	A/5	AF027217	Can	1997
399	A/5	AY181948	Chi	2002
400	A/5	AF055391	USA	1998
401	A/5	CQ768115	Can	2004
402	A/5	AF147751	USA	1999
403	A/5	EF452353	USA	2007
404	A/5	AF118095	Can	1998
405	A/5	AF264042	USA	2000
406	A/5	AX379562	USA	2001
407	A/5	AY099498	USA	2002
408	A/5	AB072301	Jap	2001
409	A/5	AF408635	Can	2001
410	A/5	AF264040	USA	2000
411	A/5	AJ223185	USA	1997

2. melléklet. A kapszid fehérjék aminosav sorrendjének filogenetikai összehasonlításához használt szekvenciák. A szekvenciák a program által alkotott sorrendben vannak feltüntetve.

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
1	B/1	B/1	EF184228	Swe	2005
2	B/1	-	EF371540	Swe	2004
3	B/1	-	EF371534	Swe	2004
4	B/1	B/6	EF524524	Chi	2007
5	B/1	-	EF371535	Swe	2007?
6	B/1	-	EF371531	Swe	2007?
7	B/1	-	EF371530	Swe	2004
8	B/1	-	EF371532	Swe	2007?
9	B/1	B/1	AY596822	Chi	2004
10	B/1	B/6	POL3	Pol	2007
11	B/1	B/1	DQ364650	Bra	2006
12	B/1	B/1	AY682997	Chi	2004
13	B/1	-	EF371543	Swe	2007?
14	B/1	-	EF371545	Swe	2007?
15	B/1	B/6	DQ355153	Chi	2006
16	B/1	-	DQ629130	USA	2005
17	B/1	B/6	AY682995	Chi	2004
18	B/1	B/1	DQ478947	Chi	2006

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
19	B/1	-	EF560608	Chi	2007
20	B/1	-	EU186062	Chile	2007
21	B/1	B/1	AY288134	Chi	2003
22	B/1	B/1	EU136712	Den	2007
23	B/1	B/1	EF565359	Den	2004
24	B/1	-	DQ856563	Bra	2006
25	B/1	-	DQ856579	Bra	2006
26	B/1	-	DQ856575	Bra	2006
27	B/1	B/1	AY849938	Chi	2004
28	B/1	-	DQ231518	Chi	2005
29	B/1	B/1	AY188355	Chi	2002
30	B/1	B/6	EF675244	Chi	2007
31	B/1	B/1	ROM1	Rom	2003
32	B/1	-	CRO4	Cro	2007
33	B/1	-	EF184226	Swe	2006?
34	B/1	-	EF371539	Swe	2007?
35	B/1	-	EF371537	Swe	2007?
36	B/1	-	EF371536	Swe	2007?

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
37	B/1	-	EF371538	Swe	2007?
38	B/1	-	DQ235696	Chi	2005
39	B/1	-	EF190932	Chi	2005
40	B/1	B/1	AY291316	Chi	2003
41	B/1	-	EF190925	Chi	2004
42	B/1	-	EF190938	Chi	2006
43	B/1	B/6	DQ195679	Chi	2005
44	B/1	-	AY735451	Chi	2004
45	B/1	B/1	AY321996	Fra	2003
46	B/1	B/1	DQ201639	Chi	2005
47	B/1	B/1	CHE6	Che	2007
48	B/1	B/1	AY321997	Fra	2003
49	B/1	B/1	AY321998	Fra	2003
50	B/1	B/1	SLO1	Slo	2007
51	B/1	B/6	DQ910865	Chi	2006
52	B/1	B/1	EU136720	Den	2007
53	B/1	B/1	EF565351	Den	2004
54	B/1	B/1	EF565344	Den	2004
55	B/1	B/1	AY321994	Fra	2003
56	B/1	B/1	AY322002	Fra	2003
57	B/1	B/1	EU266595	Chi	2007
58	B/1	-	DQ534442	Chi	2006
59	B/1	B/1	AJ293869	UK	1999
60	B/1	-	EF371547	Ita	2006?
61	B/1	-	EF371550	Ita	2006?
62	B/1	-	EF371548	Ita	2006?
63	B/1	-	EF371549	Ita	2006?
64	B/1	B/1	AY424404	Aut	2003
65	B/1	B/6	AY847748	Chi	2004
66	B/1	-	EF064149	Chi	2006
67	B/1	B/1	EF592575	Chi	2007
68	B/1	B/1	EF592576	Chi	2007
69	B/1	-	EF619037	Chi	2007
70	B/1	B/1	AY691679	Chi	2004
71	B/1	-	EF371529	Swe	2004
72	B/1	B/1	AY321993	Fra	2003
73	B/1	B/1	EF524528	Chi	2007
74	B/1	B/1	AY536755	Chi	2004
75	B/1	B/1	EF675234	Chi	2007
76	B/1	-	DQ231512	Chi	2005
77	B/1	B/6	DQ180393	Chi	2005
78	B/1	B/1	CHE8	Che	2007
79	B/1	B/1	WB-H1	Hun	2003
80	B/1	B/1	AY484414	Ned	2003
81	B/1	-	EF190933	Chi	2005
82	B/1	-	EF371541	Swe	2007?
83	B/1	B/1	EU266594	Chi	2007
84	B/1	B/2	EF493839	Chi	2007
85	B/1	B/1	ROM2	Rom	2007
86	B/1	B/1	EF565358	Den	2004
87	B/1	B/6	EF524535	Chi	2007
88	B/1	-	EF190926	Chi	2004
89	B/1	B/1	AY578327	Chi	2004
90	B/1	B/7	EF210106	Chi	2007
91	B/1	B/1	CHE2	Che	2007
92	B/1	B/1	CHE3	Che	2007
93	B/1	-	EF371542	Swe	2007?
94	B/1	B/1	AY484415	Ned	2003
95	B/1	B/1	SLO3	Slo	2006

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
96	B/1	-	EF371533	Swe	2007?
97	B/1	B/1	EF675235	Chi	2007
98	B/1	B/1	AY536756	Chi	2004
99	B/1	-	DQ231519	Chi	2005
100	B/1	B/1	AY321992	Fra	2003
101	B/1	B/1	EU136717	Den	2007
102	B/1	B/1	EF524519	Chi	2007
103	B/1	-	AY539828	Chi	2004
104	B/1	-	DQ856565	Bra	2006
105	B/1	-	EF184227	Swe	2006?
106	B/1	B/1	EU136713	Den	2007
107	B/1	B/1	EF565364	Den	2004
108	B/1	-	EF190931	Chi	2005
109	B/1	-	DQ856567	Bra	2006
110	B/1	-	EF190942	Chi	2006
111	B/1	-	EF190936	Chi	2006
112	B/1	-	AY322000	Fra	2003
113	B/1	B/1	EF565356	Den	2004
114	B/1	B/1	EF565352	Den	2004
115	B/1	B/1	AY181945	Chi	2002
116	B/1	-	AY885225	Tai	2007
117	B/1	B/6	AY691169	Chi	2004
118	B/1	B/1	DQ201642	Chi	2005
119	B/1	B/1	WB-H6	Hun	2003
120	B/1	-	EF190923	Chi	2004
121	B/1	B/1	AY682990	Chi	2004
122	B/1	B/1	HUN15	Hun	2007
123	B/1	-	DQ629129	USA	2005
124	B/1	B/1	AY321991	Fra	2003
125	B/1	B/1	DQ201641	Chi	2005
126	B/1	B/1	AY686762	Chi	2004
127	B/1	B/1	EF565354	Den	2004
128	B/1	B/1	AY321999	Fra	2003
129	B/1	B/1	EU136718	Den	2007
130	B/1	B/1	DQ910866	Chi	2006
131	B/1	B/1	EF524520	Chi	2007
132	B/1	B/1	SLO2	Slo	2007
133	B/1	-	EF197987	Chi	2005
134	B/1	-	EF190928	Chi	2004
135	B/1	B/1	AY217743	Chi	2003
136	B/1	B/1	AY579893	Chi	2004
137	B/1	B/1	SLO4	Slo	2006
138	B/1	B/1	AY321995	Fra	2003
139	B/1	B/1	EF565362	Den	2004
140	B/1	B/6	EF493837	Chi	2007
141	B/1	B/1	EU266599	Chi	2007
142	B/1	-	EF560610	Chi	2007
143	B/1	B/6	EU366326	Chi	2007
144	B/1	B/1	ROM4	Rom	2007
145	B/1	B/1	CHE7	Che	2007
146	B/1	B/1	HUN16	Hun	2007
147	B/1	-	EF190943	Chi	2006
148	B/1	B/1	POL4	Pol	2007
149	B/1	B/6	EF524530	Chi	2007
150	B/1	B/1	EF524527	Chi	2007
151	B/1	B/1	EF524521	Chi	2007
152	B/1	B/6	EF524525	Chi	2007
153	B/1	B/1	HUN17	Hun	2007
154	B/1	-	EF371528	Swe	2007?

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
155	B/1	B/1	EF565346	Den	2004
156	B/1	-	EF190927	Chi	2006
157	B/1	B/6	EF421972	Chi	2007
158	B/1	-	EF190930	Chi	2004
159	B/1	B/6	CRO3	Cro	2007
160	B/1	-	EF371544	Swe	2007?
161	B/1	-	EF197986	Chi	2005
162	B/1	-	DQ629135	USA	2005
163	B/1	-	EF190934	Chi	2005
164	B/1	B/1	EU136719	Den	2007
165	B/1	B/1	AY424405	Aut	2003
166	B/1	B/1	EU266593	Chi	2007
167	B/1	-	DQ231517	Chi	2005
168	B/1	-	EF371546	Swe	2007?
169	B/1	B/6	EU366324	Chi	2007
170	B/1	B/6	AY678532	Chi	2004
171	B/1	-	EF190939	Chi	2007
172	B/1	B/1	EF421973	Chi	2007
173	B/1	B/1	EF565345	Den	2004
174	B/1	B/1	CHE4	Che	2007
175	B/1	B/6	AY682992	Chi	2004
176	B/1	B/1	EF565344	Den	2007
177	B/1	B/1	AY732494	Chi	2004
178	B/1	B/1	EU266598	Chi	2007
179	B/1	B/1	AM086384	Chi	2005
180	B/1	B/6	AY556475	Chi	2004
181	B/1	B/1	AY321990	Fra	2003
182	B/1	B/1	EU266596	Chi	2007
183	B/1	B/1	EF565361	Den	2004
184	B/1	B/6	EU266592	Chi	2007
185	B/1	B/1	AY686764	Chi	2004
186	B/1	-	EF190935	Chi	2005
187	B/1	B/1	EU136715	Den	2007
188	B/1	B/1	CHE5	Che	2007
189	B/1	B/1	EF565350	Den	2004
190	B/1	B/1	EU136714	Den	2007
191	B/1	B/1	AY641542	Chi	2004
192	B/1	-	EF190922	Chi	2004
193	B/1	B/1	AY651850	Chi	2004
194	B/1	B/1	HUN12	Hun	2007
195	B/1	B/1	SLO7	Slo	2006
196	B/1	B/1	DQ648031	Hun	2003
197	B/1	B/1	EU136716	Den	2007
198	B/1	B/6	EF524530	Chi	2007
199	B/1	B/1	SLO8	Slo	2006
200	B/1	B/1	EF565368	Den	2004
201	B/1	-	EF190937	Chi	2006
202	B/1	B/1	AY294310	Chi	2003
203	B/1	B/1	EF565360	Den	2004
204	B/1	B/1	EF565348	Den	2004
205	B/1	-	DQ231511	Chi	2005
206	B/1	-	EF190929	Chi	2004
207	B/1	-	DQ856564	Bra	2006
208	B/1	-	DQ856576	Bra	2006
209	B/1	B/1	AY604430	Chi	2004
210	B/1	B/1	EF524522	Chi	2007
211	B/1	B/1	AY596823	Chi	2004
212	B/1	B/1	EU266597	Chi	2007
213	B/1	-	DQ856581	Bra	2006

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
214	B/1	B/1	AY256457	Hun	2003
215	B/1	B/1	EF565355	Den	2004
216	B/1	B/1	EF565349	Den	2004
217	B/1	B/1	AY291318	Chi	2003
218	B/1	B/1	SLO5	Slo	2007
219	B/1	B/1	EF565347	Den	2004
220	B/1	B/1	EF565363	Den	2004
221	B/1	B/7	AY484407	Ned	2003
222	B/1	B/1	EF565342	Den	2004
223	B/1	B/1	SLO6	Slo	2006
224	B/1	B/1	DQ017036	Chi	2005
225	B/1	B/1	Che1	Che	2007
226	B/1	-	EF560609	Chi	2007
227	B/1	B/1	CRO1	Cro	2007
228	B/1	B/1	AY682993	Chi	2004
229	B/1	B/1	DQ104420	Chi	2005
230	B/1	-	EF067852	Chi	2006
231	B/2	B/2	EF190924	Chi	2004
232	B/2	B/1	ROM3	Rom	2007
233	B/2	B/1	EF565353	Den	2004
234	B/2	-	DQ231515	Chi	2005
235	B/2	-	EF190941	Chi	2006
236	B/2	-	DQ856566	Bra	2006
237	B/2	B/1	AY969004	Chi	2005
238	B/2	-	DQ231513	Chi	2005
239	B/2	-	DQ856574	Bra	2006
240	B/2	-	EF190940	Chi	2005
241	B/2	-	DQ856578	Bra	2006
242	B/2	B/1	AY391729	Chi	2003
243	B/2	-	DQ231514	Chi	2005
244	B/2	B/1	POL2	Pol	2004
245	B/2	-	DQ856577	Bra	2006
246	B/2	B/1	EF565343	Den	2004
247	B/2	B/1	EF524516	Chi	2007
248	B/2	B/1	DQ923524	Bra	2006
249	B/2	B/1	EF524529	Chi	2007
250	B/2	B/1	DQ923523	Bra	2006
251	B/2	B/1	AY484409	Ned	2003
252	B/2	-	DQ856580	Bra	2006
253	B/2	B/1	EF515839	Chi	2007
254	B/2	B/1	CRO7	Cro	2007
255	B/2	B/6	EF675231	Chi	2007
256	B/2	-	EU296794	Chi	2007
257	B/3	B/3	EF452362	USA	2007
258	B/3	B/6	DQ997816	Chi	2006
259	B/3	B/6	DQ346683	Chi	2005
260	B/3	-	EF452363	USA	2007
261	B/3	B/4	EF394778	Can	2007
262	B/3	B/4	DQ220734	Can	2005
263	B/3	B/4	DQ220728	Can	2005
264	B/3	B/5	DQ180392	Chi	2005
265	B/3	-	EF452359	USA	2007
266	B/3	-	DQ629126	USA	2005
267	B/3	B/6	EU095020	Chi	2007
268	B/3	B/4	DQ220735	Can	2005
269	B/3	B/4	DQ220727	Can	2005
270	B/3	-	EF452360	USA	2007
271	B/3	-	DQ629133	USA	2005
272	B/3	B/4	EF394779	Can	2007

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
273	B/3	B/4	DQ629115	USA	2005
274	B/3	B/4	DQ220729	Can	2005
275	B/3	B/6	EU366323	Chi	2007
276	B/3	B/6	EF675240	Chi	2007
277	B/3	-	DQ629132	USA	2005
278	B/3	B/6	DQ997817	Chi	2006
279	B/3	B/4	DQ220730	Can	2005
280	B/3	-	DQ629120	USA	2005
281	B/3	B/4	DQ629119	USA	2005
282	B/3	B/4	EF394777	Can	2007
283	B/3	B/4	DQ220739	Can	2005
284	B/3	-	EF619970	USA	2007
285	B/3	B/4	DQ220731	Can	2005
286	B/3	B/5	EF467928	Chi	2007
287	B/3	B/5	POL1	Pol	2007
288	B/3	B/5	AF538325	Chi	2002
289	B/3	B/4	DQ629125	USA	2005
290	B/3	-	DQ629116	USA	2005
291	B/3	-	DQ629134	USA	2005
292	B/3	B/5	SLO10	Slo	2006
293	B/3	B/5	AY177626	Chi	2002
294	B/3	B/4	DQ220732	Can	2005
295	B/3	B/4	DQ629117	USA	2005
296	B/3	-	DQ629122	USA	2005
297	B/3	-	DQ629121	USA	2005
298	B/3	-	DQ629124	USA	2005
299	B/3	B/4	DQ629118	USA	2005
300	B/3	-	DQ629123	USA	2005
301	B/3	B/3	EF458306	Arg	2007
302	B/3	B/6	EF675232	Chi	2007
303	B/3	B/1	HUN14	Hun	2007
304	B/3	-	EF452361	USA	2007
305	B/3	-	EF452357	USA	2007
306	B/3	-	DQ629128	USA	2005
307	B/3	B/4	DQ220736	Can	2005
308	B/3	-	DQ629127	USA	2005
309	B/3	-	DQ629131	USA	2005
310	B/4	B/4	EF675236	Chi	2007
311	B/4	B/2	EF675242	Chi	2007
312	B/4	B/2	EF675237	Chi	2007
313	B/4	B/2	EF675239	Chi	2007
314	B/4	B/1	AY321987	Fra	2003
315	B/4	B/1	EF421969	Chi	2007
316	B/4	B/2	EF524515	Chi	2007
317	B/4	B/2	EF524536	Chi	2007
318	B/4	B/2	AF055394	Fra	1998
319	B/4	B/2	CQ768114	Irl	2004
320	B/4	B/2	AY484412	Ned	2003
321	B/4	B/6	EF675238	Chi	2007
322	B/4	B/6	EF675243	Chi	2007
323	B/4	B/5	AY321982	Fra	2003
324	B/4	B/5	AY321983	Fra	2003
325	B/4	B/5	AY322003	Fra	2003
326	B/4	B/7	DQ218419	Chi	2005
327	B/4	B/7	DQ218420	Chi	2005
328	B/4	B/7	DQ218421	Chi	2005
329	B/4	B/6	EF524534	Chi	2007
330	B/4	B/2	EF493838	Chi	2007
331	B/4	B/2	EF493841	Chi	2007

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
332	B/4	B/2	EF493842	Chi	2007
333	B/4	B/2	EF493840	Chi	2007
334	B/4	B/1	AY288133	Chi	2003
335	B/4	B/2	EF421968	Chi	2007
336	B/4	B/2	AY916791	Chi	2005
337	B/4	B/2	AY256460	Hun	2003
338	B/4	B/3	AY321984	Fra	2003
339	B/4	B/2	EF452351	USA	2007
340	B/4	B/3	AY321985	Fra	2003
341	B/4	B/3	EF565357	Den	2004
342	B/4	-	EF452354	USA	2007
343	B/4	-	EF452356	USA	2007
344	B/4	B/3	SLO9	Slo	2006
345	B/4	B/2	AF201897	Ned	1999
346	B/4	B/3	AY321986	Fra	2003
347	B/4	B/2	EF452355	USA	2007
348	B/4	B/2	AY484411	Ned	2003
349	B/4	B/2	DQ220737	Can	2005
350	B/4	B/3	AF055393	Fra	1998
351	B/4	B/2	AY321988	Fra	2003
352	B/4	-	EF619971	USA	2007
353	B/4	B/2	AY484408	Ned	2003
354	B/4	-	EF452350	USA	2007
355	B/4	B/2	AY484413	Ned	2003
356	B/4	B/2	DQ220738	Can	2005
357	B/4	-	EF452358	USA	2007
358	B/4	B/6	EF421971	Chi	2007
359	B/4	B/4	DQ220733	Can	2005
360	B/4	B/2	AY321989	Fra	2003
361	B/4	B/6	EF421970	Chi	2007
362	B/4	B/2	EU283329	Chi	2007
363	B/4	B/6	EU366325	Chi	2007
364	B/4	B/2	AY613854	Chi	2004
365	B/4	B/6	DQ997815	Chi	2006
366	B/4	-	AY613906	Chi	2004
367	B/4	B/3	AX003274	Fra	1999
368	B/4	B/3	AX003275	Fra	1999
369	B/4	B/3	AF201311	Fra	1999
370	B/4	B/3	AY122275	Chi	2002
371	B/4	B/6	EF421967	Chi	2007
372	B/5	B/5	EF028202	Chi	2006
373	B/5	NB	EF524523	Chi	2007
374	B/5	-	DQ856573	Bra	2006
375	B/5	B/7	EU148503	Den	1980
376	B/5	B/7	EU148504	Den	1987
377	B/5	B/7	EU148505	Den	1990
378	B/5	-	AY864814	Tai	2004
379	B/5	B/7	DQ201640	Chi	2005
380	B/5	B/7	DQ206444	Chi	2005
381	B/5	B/7	WB-H5	Hun	2003
382	B/5	B/7	AY682994	Chi	2004
383	B/5	B/7	AY682996	Chi	2004
384	B/5	-	DQ231516	Chi	2005
385	B/5	B/7	AY556473	Chi	2004
386	B/5	B/7	AY682991	Chi	2004
387	B/5	B/7	EF524539	Chi	2007
388	B/5	B/7	EF675241	Chi	2007
389	B/5	B/7	AY943819	Chi	2005
390	B/5	B/7	AY291317	Chi	2003

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
391	B/5	B/7	EF675230	Chi	2007
392	B/5	B/7	AY484410	Ned	2003
393	B/5	B/7	EF989713	Chi	2007
394	B/5	B/7	AY181947	Chi	2002
395	B/5	B/7	AY510375	Chin	2003
396	B/5	B/7	AY686763	Chi	2004
397	B/5	B/7	AY556476	Chi	2004
398	B/5	B/7	AY686765	Chi	2004
399	B/5	B/7	AY181946	Chi	2002
400	B/5	B/7	AY713470	Ger	2004
401	B/5	B/7	DQ363860	Chi	2006
402	B/5	B/7	DQ151643	Chi	2005
403	B/5	-	DQ017260	Chi	2005
404	B/5	B/7	EF524517	Chi	2007
405	B/5	B/7	EU274309	Chi	2007
406	B/5	B/7	AY556477	Chi	2004
407	B/5	B/7	EU274310	Chi	2007
408	B/5	B/7	EU274312	Chi	2007
409	B/5	B/7	EU274311	Chi	2007
410	A/1	A/2	AB072302	Jap	2001
411	A/1	A/2	AY754017	Aus	2004
412	A/1	A/2	AY754016	Aus	2004
413	A/1	A/2	AY754018	Aus	2004
414	A/1	A/2	EU148506	Den	1993
415	A/1	A/2	AF109398	Can	1998
416	A/1	A/2	AY754021	Aus	2004
417	A/1	-	EF371526	Nor	2003?
418	A/1	-	EF371527	Nor	2003?
419	A/1	A/2	AF117753	Can	1998
420	A/1	A/2	AY754019	Aus	2004
421	A/1	A/2	AY754020	Aus	2004
422	A/2	A/1	EF524533	Chi	2007
423	A/2	A/1	EF524541	Chi	2007
424	A/2	A/1	AY556474	Chi	2004
425	A/2	A/1	EF524526	Chi	2007
426	A/2	A/1	EF524537	Chi	2007
427	A/2	A/1	EF524532	Chi	2007
428	A/2	A/1	EF524531	Chi	2007
429	A/2	A/1	EF675229	Chi	2007
430	A/2	-	EF184225	Swe	2006?
431	A/3	-	EF371523	Swe	2007?
432	A/3	-	EF371525	Nor	2003?
433	A/3	-	EF184224	Swe	2006?
434	A/3	-	EF371524	Nor	2003?
435	A/3	A/4	AF109399	Can	1998
436	A/3	A/4	AF201306	Ger	1999
437	A/3	-	EF184223	Swe	2004
438	A/3	A/4	AY256458	Hun	2003
439	A/3	A/4	AY322004	Fra	2003
440	A/3	-	DQ856568	Bra	2006
441	A/3	-	EF067853	Chi	2006
442	A/3	-	EF371521	Swe	2007?
443	A/3	A/4	AY256456	Hun	2003
444	A/3	A/4	WB-H4	Hun	2003
445	A/3	A/4	AF201305	Ger	1999
446	A/3	A/4	WB-H3	Hun	2003
447	A/3	-	EF371522	Swe	2007?
448	A/3	-	EF371520	Swe	2007?
449	A/3	-	EF064150	Chi	2006

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
450	A/3	A/4	AY424403	Aut	2003
451	A/3	A/4	NC005148	USA	2004
452	A/3	A/4	AY424401	Aut	2003
453	A/3	A/4	AY424402	Aut	2003
454	A/3	A/4	DQ870484	USA	2005
455	A/3	A/4	HUN11	Hun	2007
456	A/3	A/4	AY288135	Chi	2003
457	A/3	A/4	AF264043	USA	2000
458	A/3	A/4	AF381176	Chi	2001
459	A/3	NB	CRO2	Cro	2007
460	A/3	A/2	AY146992	Chi	2002
461	A/3	A/2	EU148507	Den	1996
462	A/3	A/2	WB-H2	Hun	2003
463	A/3	A/2	WB-H7	Hun	2003
464	A/3	-	DQ856569	Bra	2006
465	A/3	-	DQ856571	Bra	2006
466	A/3	-	DQ856570	Bra	2006
467	A/3	-	DQ856572	Bra	2006
468	A/4	A/3	AF305532	Tai	2001
469	A/4	A/3	AF201308	Spa	1999
470	A/4	A/3	AF201310	Spa	1999
471	A/4	A/3	AY256455	Hun	2003
472	A/4	A/3	AY256459	Hun	2003
473	A/4	A/3	HUN13	Hun	2007
474	A/4	A/3	AF201309	Spa	1999
475	A/4	A/3	AF305533	Tai	2001
476	A/4	A/3	AF364094	Tai	2001
477	A/4	A/3	AY180396	Chi	2002
478	A/4	A/3	AF154679	Tai	1999
479	A/4	A/3	AF166528	Tai	1999
480	A/4	A/3	AY146991	Chi	2002
481	A/4	A/3	AY146993	Chi	2002
482	A/4	A/3	AY180397	Chi	2002
483	A/4	-	EF184222	Swe	2003
484	A/4	-	EF371519	Swe	2007?
485	A/4	-	EF184221	Swe	2003
486	A/4	-	EF184220	Swe	1993?
487	A/4	A/2	AF201307	Ger	1999
488	A/4	-	EF371551	Swe	1993?
489	A/4	A/2	EU136711	Den	2007
490	A/4	-	EF371518	Swe	2004
491	A/5	A/5	AF465211	Tai	2001
492	A/5	A/5	AF055392	Can	1998
493	A/5	A/5	AF086835	Can	1998
494	A/5	A/5	AF086836	Can	1998
495	A/5	A/5	BD087177	Can	1997
496	A/5	A/5	AF085695	Can	1998
497	A/5	A/5	BD087175	Can	1997
498	A/5	A/5	AF381177	Chi	2001
499	A/5	A/5	AF027217	Can	1997
500	A/5	A/5	AY181948	Chi	2002
501	A/5	A/5	AF147751	USA	1999
502	A/5	A/5	AF055391	USA	1998
503	A/5	A/5	AF264042	USA	2000
504	A/5	A/5	AF381175	Chi	2001
505	A/5	A/5	EF452353	USA	2007
506	A/5	-	EF452364	USA	2007
507	A/5	A/5	AF112862	Can	1998
508	A/5	A/5	EF524538	Chi	2007

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
509	A/5	A/5	EF524542	Chi	2007
510	A/5	NB	EF524518	Chi	2007
511	A/5	A/5	AB072303	Jap	2001
512	A/5	A/5	EF524540	Chi	2007
513	A/5	A/5	AY754022	Aus	2004
514	A/5	A/5	AY699793	USA	2004
515	A/5	A/5	AF086834	Can	1998
516	A/5	A/5	AF264040	USA	2000
517	A/5	A/5	AX685842	Can	2003
518	A/5	A/5	AF118095	Can	1998
519	A/5	A/5	AX379562	USA	2001
520	A/5	A/5	AY099498	USA	2002
521	A/5	A/5	AJ223185	USA	1997
522	A/5	A/5	AB072301	Jap	2001
523	A/5	A/5	AF408635	Can	2001
524	A/5	A/5	AX379560	USA	2001
525	A/5	A/5	AY099496	USA	2002
526	A/5	A/5	AF544024	Kor	2002
527	A/5	A/5	AF520783	Kor	2002
528	A/5	A/5	DQ629113	USA	2005
529	A/5	A/5	DQ629114	USA	2005
530	A/5	A/5	AJ293868	Can	1999
531	A/5	A/5	AJ293867	Can	1999
532	A/5	A/5	EF394776	Can	2007
533	A/5	-	EF452366	USA	2007
534	A/5	-	EF452367	USA	2007

	Csop.	Csop.*	Kód	Orsz.	Év
535	A/5	A/5	DQ104422	Chi	2005
536	A/5	A/5	AF264039	USA	2000
537	A/5	A/5	AY099500	USA	2002
538	A/5	A/5	AX379564	USA	2001
539	A/5	A/5	AY325495	SUA	2003
540	A/5	A/5	DQ104419	Chi	2005
541	A/5	A/5	DQ104421	Chi	2005
542	A/5	A/5	AY094619	USA	2002
543	A/5	A/5	AF264038	USA	2000
544	A/5	-	AY129154	USA	2002
545	A/5	A/5	DQ397521	USA	1998
546	A/5	A/5	EF394775	Can	2007
547	A/5	A/5	AX379561	USA	2001
548	A/5	A/5	CQ768115	Can	2004
549	A/5	A/5	AY099499	USA	2002
550	A/5	A/5	AX379563	USA	2001
551	A/5	A/5	AF118097	Can	1998
552	A/5	A/5	AY099495	USA	2002
553	A/5	A/5	EF452365	USA	2007
554	A/5	A/5	EF394774	Can	2007
555	A/5	A/5	AF264041	USA	2000
556	A/5	A/5	AF454546	Kor	2001
557	A/5	A/5	AY672601	Kor	2004
558	A/5	A/5	AY129155	USA	2002
559	A/5	A/5	AY672600	Kor	2004

*: az a csoport, amelybe a teljes genom alapján soroltuk a szekvenciát. -: csak az ORF2 szekvencia érhető el.

3. melléklet. A HUN15 vírus kapszid fehérjéjével azonos aminosav szekvenciák a B/1ORF2 csoportban.

	Csop.*	Kód	Ország	Év
1	B/1	HUN15	Hun	2007
2	B/1	HUN16	Hun	2007
3	B/1	HUN17	Hun	2007
4	B/1	SLO1	Slo	2007
5	B/1	SLO5	Slo	2007
6	B/1	SLO7	Slo	2006
7	B/1	SLO8	Slo	2006
8	B/1	ROM4	Rom	2007
9	B/1	CRO3	Cro	2007
10	B/1	POL4	Pol	2007
11	B/1	CZE2	Cze	2007
12	B/1	CZE3	Cze	2007
13	B/1	CZE4	Cze	2007
14	B/1	CZE5	Cze	2007
15	B/1	CZE6	Cze	2007
16	B/1	CZE7	Cze	2007
17	B/1	CZE8	Cze	2007
18	B/1	WB-H6	Hun	2003
19	B/1	WB-H1	Hun	2003
20	B/1	AY256457	Hun	2003
21	B/1	ROM	Rom	2003
22	B/1	AY424405	Aut	2003
23	B/1	AY321991	Fra	2003
24	B/1	AY321992	Fra	2003
25	B/1	AY321994	Fra	2003
26	B/1	AY321995	Fra	2003

	Csop.*	Kód	Ország	Év
27	B/1	AY321996	Fra	2003
28	B/1	AY321997	Fra	2003
29	B/1	AY321998	Fra	2003
30	B/1	AY322000	Fra	2003
31	B/1	AY322002	Fra	2003
32	B/1	AY484414	Ned	2003
33	B/1	AY484415	Ned	2003
34	B/1	AY484416	Ned	2003
35	B/7	AY484407	Ned	2003
36	B/1	EF565342	Den	2004
37	B/1	EF565344	Den	2004
38	B/1	EF565345	Den	2004
39	B/1	EF565346	Den	2004
40	B/1	EF565347	Den	2004
41	B/1	EF565349	Den	2004
42	B/1	EF565350	Den	2004
43	B/1	EF565351	Den	2004
44	B/1	EF565352	Den	2004
45	B/1	EF565354	Den	2004
46	B/1	EF565355	Den	2004
47	B/1	EF565356	Den	2004
48	B/1	EF565359	Den	2004
49	B/1	EF565361	Den	2004
50	B/1	EF565362	Den	2004
51	B/1	EF565363	Den	2004
52	B/1	EF565364	Den	2004

	Csop.*	Kód	Ország	Év
53	B/1	EF565368	Den	2004
54	B/1	EU136712	Den	2007
55	B/1	EU136713	Den	2007
56	B/1	EU136714	Den	2007
57	B/1	EU136715	Den	2007
58	B/1	EU136716	Den	2007
59	B/1	EU136717	Den	2007
60	B/1	EU136718	Den	2007
61	B/1	EU136719	Den	2007
62	B/1	EU136720	Den	2007
63	B/1	EF493837	Chi	2007
64	B/1	EF524516	Chi	2007
65	B/1	EF524520	Chi	2007
66	B/1	EF524521	Chi	2007
67	B/1	EF524522	Chi	2007
68	B/1	EF524525	Chi	2007
69	B/1	EF524528	Chi	2007
70	B/1	EF524530	Chi	2007
71	B/1	EF675234	Chi	2007
72	B/1	EF675235	Chi	2007
73	B/1	EF675244	Chi	2007
74	B/1	EU266593	Chi	2007
75	B/1	EU266595	Chi	2007
76	B/1	EU266596	Chi	2007
77	B/1	EU366324	Chi	2007
78	B/1	EU366326	Chi	2007
79	B/6	DQ910865	Chi	2006
80	B/1	AM086384	Chi	2005
81	B/1	AY682990	Chi	2004
82	B/7	AY682992	Chi	2004

	Csop.*	Kód	Ország	Év
83	B/6	AY691169	Chi	2004
84	B/1	AY732494	Chi	2004
85	B/1	AY536755	Chi	2004
86	B/1	AY536756	Chi	2004
87	B/1	AY579893	Chi	2004
88	B/1	AY291316	Chi	2003
89	B/1	AY288134	Chi	2003
90	B/1	AY217743	Chi	2003
91	B/1	AY188355	Chi	2002
92	-	EF190928	Chi	2007
93	-	EF190929	Chi	2007
94	-	EF190931	Chi	2007
95	-	EF190932	Chi	2007
96	-	EF190934	Chi	2007
97	-	EF371541	Swe	2007
98	-	EF371542	Swe	2007
99	-	EF371546	Swe	2007
100	-	AY735451	Chi	2004
101	-	DQ231512	Chi	2005
102	-	DQ231517	Chi	2005
103	-	DQ629129	USA	2006
104	-	DQ629130	USA	2006
105	-	DQ629135	USA	2006
106	-	DQ856563	Bra	2006
107	-	DQ856565	Bra	2006
108	-	DQ856564	Bra	2006
109	-	DQ856567	Bra	2006
110	-	DQ856579	Bra	2006
111	-	DQ856581	Bra	2006
112	-	DQ856575	Bra	2006

*: az a csoport, amelybe a teljes genom alapján soroltuk a szekvenciát. -: csak az ORF2 szekvencia érhető el.

4. melléklet. A POL2 vírus kapszid fehérjével azonos aminosav szekvenciák a B/1ORF2 csoportban.

	Csop.*	Kód	Ország	Év
1	B/1	POL2	Pol	2007
2	-	EF190940	Chi	2007
3	-	EF190941	Chi	2007
4	-	DQ231513	Chi	2005
5	-	DQ231514	Chi	2005
6	-	DQ231515	Chi	2005
7	-	DQ856566	Bra	2006
8	-	DQ856574	Bra	2006
9	-	DQ856576	Bra	2006

	Csop.*	Kód	Ország	Év
10	-	DQ856577	Bra	2006
11	-	DQ856578	Bra	2006
12	B/1	DQ856580	Bra	2006
13	B/1	DQ923524	Bra	2006
14	B/1	DQ923523	Bra	2006
15	B/1	AY484409	Ned	2003
16	B/1	EF565343	Den	2004
17	B/1	EF565353	Den	2004

*: az a csoport, amelybe a teljes genom alapján soroltuk a szekvenciát. -: csak az ORF2 szekvencia érhető el.

5. melléklet. A SLO10 vírus kapszid fehérjéjével azonos aminosav szekvenciák a B/3ORF2 csoportban.

	Csop.*	Kód	Ország	Év
1	B/5	SLO10	Slo	2006
2	B/5	POL1	Pol	2007
3	B/7	EF675232	Chi	2007
4	B/4	DQ629119	USA	2005
5	B/4	DQ629116	USA	2005
6	B/6	DQ997817	Chi	2006
7	B/4	EF394777	Can	2007
8	B/4	EF394778	Can	2007
9	B/4	EF394779	Can	2007
10	B/6	EU095020	Chi	2007
11	B/6	EU366323	Chi	2007
12	B/6	EF675240	Chi	2007
13	B/4	DQ220727	Can	2005
14	B/4	DQ220728	Can	2005
15	B/4	DQ220729	Can	2005
16	B/4	DQ220730	Can	2005
17	B/6	AF538325	Chi	2002
18	B/4	DQ220731	Can	2005
19	B/4	DQ220732	Can	2005

	Csop.*	Kód	Ország	Év
20	B/4	DQ220734	Can	2005
21	B/4	DQ220735	Can	2005
22	B/4	DQ220739	Can	2005
23	B/3	EF458306	Arg	2007
24	B/5	DQ180392	Chi	2005
25	B/7	DQ346683	Chi	2005
26	B/4	DQ629115	USA	2005
27	-	DQ629120	USA	2005
28	-	DQ629125	USA	2005
29	-	DQ629126	USA	2005
30	-	DQ629132	USA	2005
31	-	DQ629133	USA	2005
32	-	EF452357	USA	2007
33	-	EF452359	USA	2007
34	-	EF452360	USA	2007
35	-	EF452361	USA	2007
36	-	EF467928	Chi	2007
37	-	EF619970	USA	2007
38	-	EF452363	USA	2007

*: az a csoport, amelybe a teljes genom alapján soroltuk a szekvenciát. -: csak az ORF2 szekvencia érhető el.

6. melléklet. A SLO9 vírus kapszid fehérjéjével azonos aminosav szekvenciák a B/4ORF2 csoportban

	Csop.*	Kód	Ország	Év
1	B/2	SLO9	Slo	2006
2	B/2	AY484411	Ned	2003
3	B/2	AY484413	Ned	2003
4	B/2	AY321984	Fra	2003
5	B/3	AY321985	Fra	2003
6	B/3	AY321986	Fra	2003
7	B/2	AY321988	Fra	2003
8	B/2	AY321989	Fra	2003
9	B/2	AF201897	Ned	1999

	Csop.*	Kód	Ország	Év
10	B/3	AF055393	Fra	1998
11	B/6	DQ997815	Chi	2006
12	B/6	EF421971	Chi	2007
13	B/2	DQ220737	Can	2005
14	B/2	EF452350	USA	2007
15	B/2	EF4523514	USA	2007
16	B/2	DQ220738	Can	2005
17	B/3	EF565357	Den	2004
18	-	EF619971	USA	2007

*: az a csoport, amelybe a teljes genom alapján soroltuk a szekvenciát. -: csak az ORF2 szekvencia érhető el.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Tuboly Tamás egyetemi docensnek a témaválasztásban és a kutatási téma kidolgozásában nyújtott hasznos tanácsaiért.

Köszönettel tartozom Herbák Józsefnek a munka elvégzése során nyújtott technikai segítségért.

Továbbá köszönettel tartozom Balka Gyulának, Bálint Ádámnak, Biksi Imrének, Cseh Erikának, Dán Ádámnak, Daniel Cadarnak, Fodor Lászlónak, Kecskeméti Sándornak, Kiss Istvánnak, Lőrincz Mártának, Ursu Krisztinának a segítségükért.

A dolgozat anyagi háttérét a Széchenyi terv NKFP 04/040/2001-es számú Nemzeti Kutatásfejlesztési pályázata, valamint az „ALAPÍTVÁNY A SERTÉS ÁLLOMÁNY VÉDELME” biztosította.