

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Hüllők és madarak reovírusainak genetikai diverzitása**  
PhD értekezés

Varga-Kugler Renáta

2021

Témavezető:

.....

Dr. Farkas Szilvia

Állatorvostudományi Egyetem

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika

Készült 8 példányban. Ez a n. .... sz. példány

.....

Varga-Kugler Renáta

## Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	6
2.	Összefoglalás.....	8
2.1.	Summary.....	9
3.	Bevezetés.....	10
4.	Irodalmi áttekintés.....	11
4.1.	Az orthoreovírusok rendszertana.....	11
4.2.	Az orthoreovírusok morfológiája, genomszerveződése és fehérjéi.....	12
4.3.	Az orthoreovírusok replikációja.....	17
4.4.	Madarak orthoreovírusai.....	19
4.4.1.	Tyúkfélék reovírusai.....	20
4.4.2.	Víziszárnyasok reovírusai.....	23
4.4.3.	Tyúkfélék és víziszárnyasok reovírusainak filogenetikai kapcsolatai.....	26
4.5.	Hüllők orthoreovírusai.....	28
4.6.	Célkitűzések.....	30
5.	Anyagok és módszerek.....	31
5.1.	Felhasznált vírustörzsek.....	31
5.2.	Felhasznált sejtvonalak.....	33
5.3.	Minták előkészítése teljes genom szekvenálásra.....	33
5.3.1.	Virális nukleinsav kivonása.....	33
5.3.2.	Kétlépéses reverz transzkripció polimeráz láncreakció.....	34
5.3.3.	PCR termékek ellenőrzése és tisztítása.....	34
5.4.	Újgenerációs szekvenálás.....	34
5.4.1.	IonTorrent szekvenálás.....	34
5.4.2.	Illumina szekvenálás.....	35
5.5.	RNS genom szegmensvégeinek meghatározása.....	36
5.5.1.	Virális RNS ligálása.....	36
5.5.2.	Kétlépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció.....	36
5.5.3.	Sanger szekvenálás.....	37

5.6.	Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek .....	37
5.7.	Reasszortációs kísérlet.....	38
5.7.1.	Koinfekció .....	38
5.7.2.	Plakktisztítás, nukleinsav kivonás .....	38
5.7.3.	Nagy felbontású olvadáspont analízis .....	39
6.	Eredmények .....	41
6.1.	Víziszárnyas reovírus törzsek.....	41
6.1.1.	A D2533/4/1-10 törzs genomszerveződése.....	41
6.1.2.	A D2533/4/1-10 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai.....	42
6.1.3.	A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomszerveződése .....	46
6.1.4.	A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai .....	47
6.2.	Fácán reovírus törzsek .....	48
6.2.1.	A fácán reovírus törzsek genomszerveződése .....	48
6.2.2.	A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai .....	50
6.2.3.	A D1996/2/1 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai.....	54
6.3.	Hüllő reovírus törzsek.....	55
6.3.1.	A hüllő reovírus törzsek genomszerveződése .....	55
6.3.2.	A hüllő reovírus törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai más reovírus fajokkal .....	57
6.3.3.	A hüllő reovírus törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai fajon belül.....	60
6.3.4.	A reasszortációs kísérlet eredménye.....	63
7.	Megbeszélés .....	64
7.1.	Madár reovírus törzsek általános genomszerveződése .....	64
7.2.	Víziszárnyas reovírusok – új klád felbukkanása és a reasszortáció jelentősége .....	64
7.3.	Fácán reovírusok – reasszortáció és nagyfokú genetikai változatosság .....	67

7.4.	Hüllő reovírusok – több leszármazási vonal és lehetséges új faj.....	69
8.	Új tudományos eredmények .....	72
9.	Irodalomjegyzék .....	73
10.	Közlemények listája .....	85
10.1.	A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	85
10.2.	A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk .....	85
11.	Ábrák és táblázatok jegyzéke .....	87
11.1.	Ábrák.....	87
11.2.	Táblázatok.....	88
12.	Mellékletek .....	89
1.	melléklet. Génbanki azonosítók .....	89
2.	melléklet. Víziszárnyas reovírus törzsek .....	99
3.	melléklet. Hüllő reovírus törzsek .....	101
4.	melléklet. Orthoreovírus törzsfák .....	104
13.	Köszönetnyilvánítás.....	106

## 1. Rövidítések jegyzéke

ARV	madár orthoreovírus ( <i>Avian orthoreovirus</i> )
as	aminosav
BRV	pávián orthoreovírus ( <i>Baboon orthoreovirus</i> )
bp	bázispár
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav (complementary DNA)
DMEM	Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő tápfolyadék (Dulbecco's modified eagle medium)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát
dsRNS	duplaszálú ribonukleinsav (double stranded RNA)
FAST	fúzió-asszociált kis transzmembrán (fusion associated small transmembrane)
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
ICTV	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
kbp	kilobázispár
L1-L3	az orthoreovírusok nagyméretű szegmensei (large)
M1-M3	az orthoreovírusok közepes méretű szegmensei (medium)
MAHLV	Mahlapitsi orthoreovírus ( <i>Mahlapitsi orthoreovirus</i> )
MOI	a fertőzés multiplicitása (multiplicity of infection)
MRV	emlős orthoreovírus ( <i>Mammalian orthoreovirus</i> )
m/V%	vegyesszázalék, 100 cm <sup>3</sup> oldatban lévő oldott anyag tömege gramm mértékegységre megadva
NBV	denevér orthoreovírus ( <i>Nelson Bay orthoreovirus</i> )
NeARV	vadmadár orthoreovírus ( <i>Neoavian orthoreovirus</i> )
nm	nanométer
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)

PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PRV	hal orthoreovírus ( <i>Piscine orthoreovirus</i> )
RdRp	RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
RNS	ribonukleinsav
RRV	hüllő orthoreovírus ( <i>Reptilian orthoreovirus</i> )
RT	reverz transzkripció
S1-S4	az orthoreovírusok kisméretű szegmensei (small)
ssRNS	szimpla szálú ribonukleinsav (single stranded RNA)
UTR	nem-átírózó szakasz (untranslated region)
VH-2	vipera szív sejtvonal (Russell's viper heart, ATCC CCL-140)
V/V%	térfogatszázalék, 100 cm <sup>3</sup> oldatban lévő oldott anyag térfogata
WRV	víziszárnyas reovírus (waterfowl orthoreovirus)

## 2. Összefoglalás

Az *Orthoreovirus* nemzetség tagjai a *Reoviridae* családon belül a *Spinareovirinae* alcsaládba tartoznak, mely munkánk kezdetekor hét vírushajt foglalt magába. A hullókból izolált reovírusokat a hulló orthoreovírus fajba sorolták, míg a madaraktól izolált reovírusok a madár orthoreovírus fajba tartoztak. Az orthoreovírusok különféle, már korábban is ismert evolúciós mechanizmussal bírnak: i) a pontmutációkat elsősorban az RNS-függő RNS polimeráz generálja; ii) a szegmenseken belül inzerciók, deléciók és duplikációk is szerepet játszhatnak az új változatok kialakulásában; iii) illetve több vírus egyidejű fertőzése esetén a homológ szegmensek reasszortálódhatnak. Madaraktól és hullókból is gyakran kimutattak orthoreovírusokat különféle megbetegedések során, baromfifélékből elsősorban multifaktoriális kórképekkel kapcsolatban, melyek jelentős gazdasági károkat okozhatnak az ágazat számára.

Kutatómunkánk során összesen öt madár eredetű reovírus törzset vizsgáltunk. Négy vírustörzs esetében sikerült meghatározni a teljes genom nukleotidsorrendjét, míg egy törzs esetében a szegmensek kódoló régióinak szekvenciáját határoztuk meg. Két házikacsából származó törzs kódoló szekvenciái nagymértékben eltértek a génbankban megtalálható, más európai és ázsiai eredetű víziszárnyas reovírusok genomszekvenciájától, így ezen két vírustörzs egy új klád képviselőinek tekinthető a víziszárnyas reovírusokon belül. Egy fácán eredetű törzs csak közepes mértékű hasonlóságot mutatott más madár reovírusokkal, illetve az újonnan elfogadott vadmadár orthoreovírus faj ismert képviselőivel. Ugyanakkor utóbbiakkal a filogenetikai fákban monofiletikusan helyezkedett el, mely a törzsek közös evolúciós eredetét feltételezi. Egy házikacsa és egy fácán eredetű törzs jellemzésekor feltárult azok genomjának mozaikos szerkezete, további bizonyítékul szolgálva a reasszortáció jelentőségére a madár reovírusok evolúciójában.

Munkánk során további hét hulló eredetű reovírus törzs teljes genomszekvenciáját sikerült meghatározni. Az általunk vizsgált, pikkelyes hullókból származó törzsek mind a hulló reovírus fajba sorolhatóak, és a fajon belül két genetikai kládot különíthetünk el. Ezeket a kládokon belül magas, míg a kládok között közepes mértékű hasonlóságok jellemzik. Az egyetlen, páncélos hullókból származó vírustörzs csak mérsékelt hasonlóságot mutatott a pikkelyes hullókból származó hulló reovírusokkal. Eredményeink alapján javaslatot tettünk a teknős eredetű reovírus törzs különálló vírushajtba történő besorolására, mely teknős orthoreovírus néven elfogadásra is került.

Vizsgálataink során felhalmozott adatok további információval szolgáltak a hullókban, víziszárnyasokban és fácánokban szaporodni képes reovírusok genetikai változatosságával, evolúciós folyamataival kapcsolatban, valamint hozzájárultak a vizsgált reovírusok rokonsági viszonyainak jobb megértéséhez.



## 2.1. Summary

The genus *Orthoreovirus* belonging to the family *Reoviridae*, subfamily *Spinareovirinae* was classified into seven species at the time we started our work. Reoviruses isolated from reptiles were considered as members of the species *Reptilian orthoreovirus*, while reoviruses with bird origin were classified into the species *Avian orthoreovirus*. Major evolutionary mechanisms of orthoreoviruses are i) point mutation generated by the viral RNA-dependent RNA polymerase lacking proofreading activity, ii) intrasegmental insertions, deletions and duplications, iii) reassortment of cognate genome segments between members of an *Orthoreovirus* species. Reoviruses of birds and reptiles are frequently detected and isolated in association with different symptoms, in poultry they can cause significant economic losses due to multifactorial diseases.

We analysed five orthoreovirus strains derived from different avian species. We determined the complete genome sequence of four strains and the complete coding sequence of one strain using next generation and Sanger sequencing methods. Two strains isolated from Pekin ducklings proved to be only distantly related to previously described European and Asian waterfowl origin orthoreoviruses. Thus these might be the first representatives of a new genogroup within the waterfowl orthoreoviruses. One pheasant origin strain showed moderate similarity with members of the species *Avian orthoreovirus* and the newly accepted species, *Neoavian orthoreovirus*, but on the phylogenetic trees appeared in a common branch with the latter suggesting the common origin of these reoviruses. The characterization of two strains (one Pekin duck and one pheasant origin) revealed mosaic-like genomic composition confirming the significance of reassortment in the evolution of avian reoviruses.

We determined the complete genome sequence of seven reovirus strains isolated from different exotic reptilian species. The squamata origin strains were all classified into *Reptilian orthoreovirus* species and could be separated into two major genogroups, whose members are characterized by high similarities within genogroups and moderate similarities between genogroups. One chelonian origin strain proved to be distantly related to squamata origin reptilian reoviruses thus our group suggested its classification as a separate species. The chelonian reovirus strain were accepted as the first representative of the novel *Testudine orthoreovirus* species.

Our data and findings provided further information on the genetic diversity and evolutionary mechanisms of orthoreoviruses of reptiles, waterfowls and pheasants, and give the opportunity for the better understanding of their genetic relationships.

### 3. Bevezetés

A jelenleg ismert, duplaszálú ribonukleinsav (dsRNS) genommal rendelkező víruscsaládok közt a *Reoviridae* család képviselteti magát a legtöbb fajjal, köztük számos jelentős humán és állati megbetegedést okozó vírusnemzetség tagjait is megtaláljuk (Mertens, 2004). Az *Orthoreovirus* nemzetség a *Reoviridae* család állategészségügyi szempontból jelentős csoportja, melyben gerinces és gerinctelen állatok kórokozói egyaránt előfordulnak. A nemzetség referencia fajtát, az emlős orthoreovírust elsőként az Egyesült Államokban és Mexikóban előforduló, légző- és emésztőszervi, humán megbetegedések kapcsán izolálták az 1950-es években (Sabin, 1959). Mivel tünetmentes emberekből is kimutatták a vírust, kóroki szerepét kezdetben nem sikerült tisztázni, elnevezése is erre utal: „respiratory and enteric orphan” vírus.

A madarak és hüllők reovírusai az *Orthoreovirus* nemzetségbe sorolhatóak. A hüllők reovírusait számos esetben kimutatták már különböző pikkelyes és páncélos hüllőfajokból, főleg légzőszervi és központi idegrendszeri tünetekkel kapcsolatosan, bár szerepük a kórfejlődésben nem teljesen tisztázott. A madarak reovírusai között ugyanakkor gazdaságilag jelentős kórokozókat találunk, melyek házityúk, pulykák és vízibarmfi-félék állományaiiban okozhatnak nagymértékű kártétellel járó megbetegedéseket. Ilyen például a házityúk és pulykák vírusos ízületi és ínhüvelygyulladás, valamint a kacsákban és ludakban a máj és a lép, illetve az ízületek érintettségével járó tünetegyüttes (Day, 2009).

A vírusok faji hovatartozásának megállapításánál egyre inkább a molekuláris módszerek és a vírusok genetikai jellemzői veszik át a szerepet a klasszikus virológiai módszerekkel szemben. A különböző újgenerációs szekvenálási technikák térnyerése lehetőséget teremt az egyes vírustörzsek teljes genomszekvencia adatainak megismerésére, melynek segítségével a fertőzéseket okozó vírusok genetikai változatossága és leszármazási kapcsolatai is feltárhatóak. E módszerek széleskörű alkalmazása végső soron segítséget nyújthat egyre hatékonyabb diagnosztikai módszerek és a megelőzésben használható vakcinák fejlesztésében is.

Mindezekkel összefüggésben vizsgálataink fő célja a különböző gazdafajokból származó reovírusok genomszekvencia adatainak gyűjtése és jellemzése volt. A vírustörzsek genomjának összehasonlításával szeretnénk több ismeretre szert tenni a reovírusok genetikai diverzitásáról, az egyes evolúciós mechanizmusok jelentőségéről, és a vizsgált törzsek rokonsági kapcsolatairól.

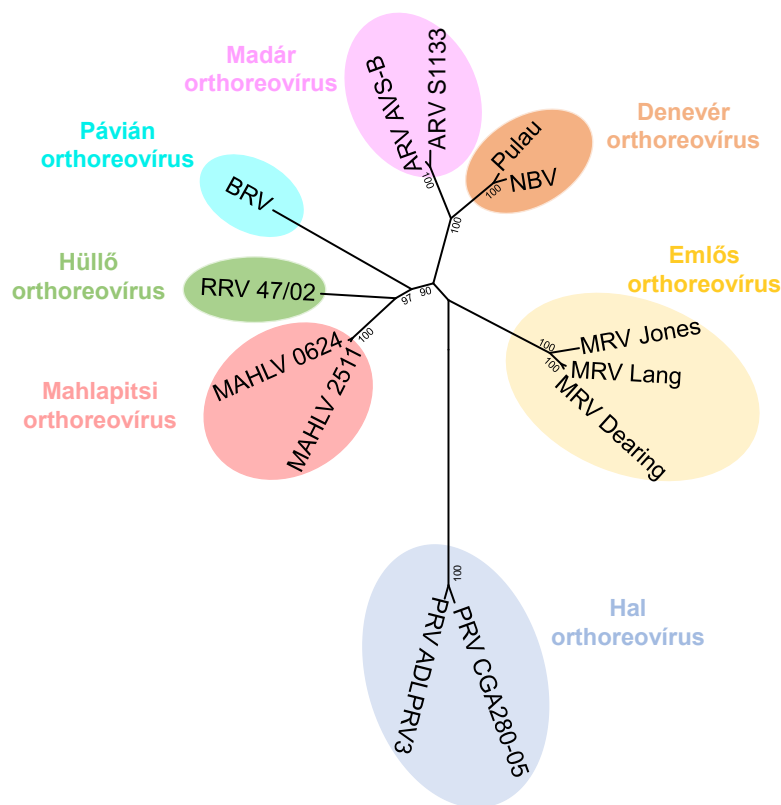
## 4. Irodalmi áttekintés

### 4.1. Az orthoreovírusok rendszertana

A *Reoviridae* család tagjai duplaszálú, szegmentált RNS genommal rendelkező vírusok, melyek széles körben elterjedtek, kimutatták őket növényekben, gerinces és gerinctelen állatokban, gombákban, illetve egysejtű eukariótákban is. Virionjuk burok nélküli, 60-80 nanométer (nm) átmérőjű, egy-három koncentrikus fehérjerétegből áll és ikozaéderez szimmetriát mutat. A család összesen 15 nemzetségből áll, melyek két alcsaládba sorolhatóak. A *Spinareovirinae* alcsalád az *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Oryzavirus* és *Orthoreovirus* nemzetségeket foglalja magába, tagjainak közös jellemzője a virion felszínén található, viszonylag nagy, tűskeszerű képletek. A *Sedoreovirinae* alcsalád tagjainál ezek a tűskeszerű képletek hiányoznak, a virion felszíne szinte teljesen sima, gömb alakú. Ebbe az alcsaládba tartoznak a *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* és *Seadornavirus* nemzetségek tagjai. A nemzetségek elkülönítése a genomszegmensek száma, a gazdaspektrum, a vírus által okozott klinikai tünetek, a kapszidszerkezet, illetve a nukleotid és a származtatott aminosav szekvenciák – különösen a nagyobb mértékben megőrzött genomszegmensek szekvenciáinak – hasonlósága alapján történik (Attoui és mtsai, 2011).

Munkánk kezdetekor az *Orthoreovirus* nemzetségen belül, a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) online felületén elérhető rendszertan alapján (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) hét fajt különíthettünk el: madár orthoreovírus (*Avian orthoreovirus*, ARV), pávián orthoreovírus (*Baboon orthoreovirus*, BRV), emlős orthoreovírus (*Mammalian orthoreovirus*, MRV), denevér orthoreovírus (*Nelson Bay orthoreovirus*, NBV), hüllő orthoreovírus (*Reptilian orthoreovirus*, RRV), Mahlapitsi orthoreovírus (*Mahlapitsi orthoreovirus*, MAHLV) és hal orthoreovírus (*Piscine orthoreovirus*, PRV) (Attoui és mtsai, 2011; Jansen van Vuren és mtsai, 2016; Markussen és mtsai, 2013) (**1. ábra**). A nemzetség, részben a jelen dolgozatban bemutatott eredmények alapján, három új fajjal bővült nemrég: Broome orthoreovírus (*Broome orthoreovirus*, BrRV), vadmadár orthoreovírus (*Neoavian orthoreovirus*, NeARV) és teknős orthoreovírus (*Testudine orthoreovirus*, TRV) (Dandár és mtsai, 2014b; Kloet, 2008; Ogasawara és mtsai, 2015; Thalmann és mtsai, 2010). Az ICTV a nemzetségen belül a fajok meghatározására különböző biológiai és molekuláris jellemzők alapján ad ajánlást. Faji besorolásnál figyelembe kell venni a vírus gazdafaját, illetve a gazdafajban a vírus által okozott tüneteket, az RNS genom agaróz gélelektroforézissel nyert elektroforetogramját, illetve az egyes vírustörzsek közötti reasszortáció lehetőségét, illetve hiányát. Ezekon a jellemzőkön felül gén- és fehérjeszekvencia azonossági határértékeket is megad az ICTV. Nukleinsav

szinten azonos fajba tartozónak tekinthetünk két vírustörzset, amennyiben a szekvencia azonosság köztük magasabb, mint 75%, és külön fajba tartozónak, ha alacsonyabb, mint 60%. Aminosav szekvenciák esetében különbséget kell tenni a megőrzöttebb core (mag), illetve a külső kapszidot alkotó, változékonyabb fehérjék közt. A core fehérjék esetében 85%-os, a külső kapszid fehérjei esetében már 55%-os azonosság fölött is egyazon fajba tartozónak tekintünk két vírustörzset, míg a core fehérjék 65%-os és a külső kapszid fehérjék 35%-os azonossága alatt külön fajba soroljuk őket (Attoui és mtsai, 2011). Ez a besorolási rendszer az azonos, illetve külön fajba sorolás eldöntésére szolgáló határértékek között egy igen széles „szürke zónát” hagy (60-75% nukleotid, 65-85% core fehérje aminosav, 35-55% külső kapszid fehérje aminosav szekvencia azonosság), ami új vírustörzsek leírásánál sokszor problémát okoz a faji besorolás megállapításánál.

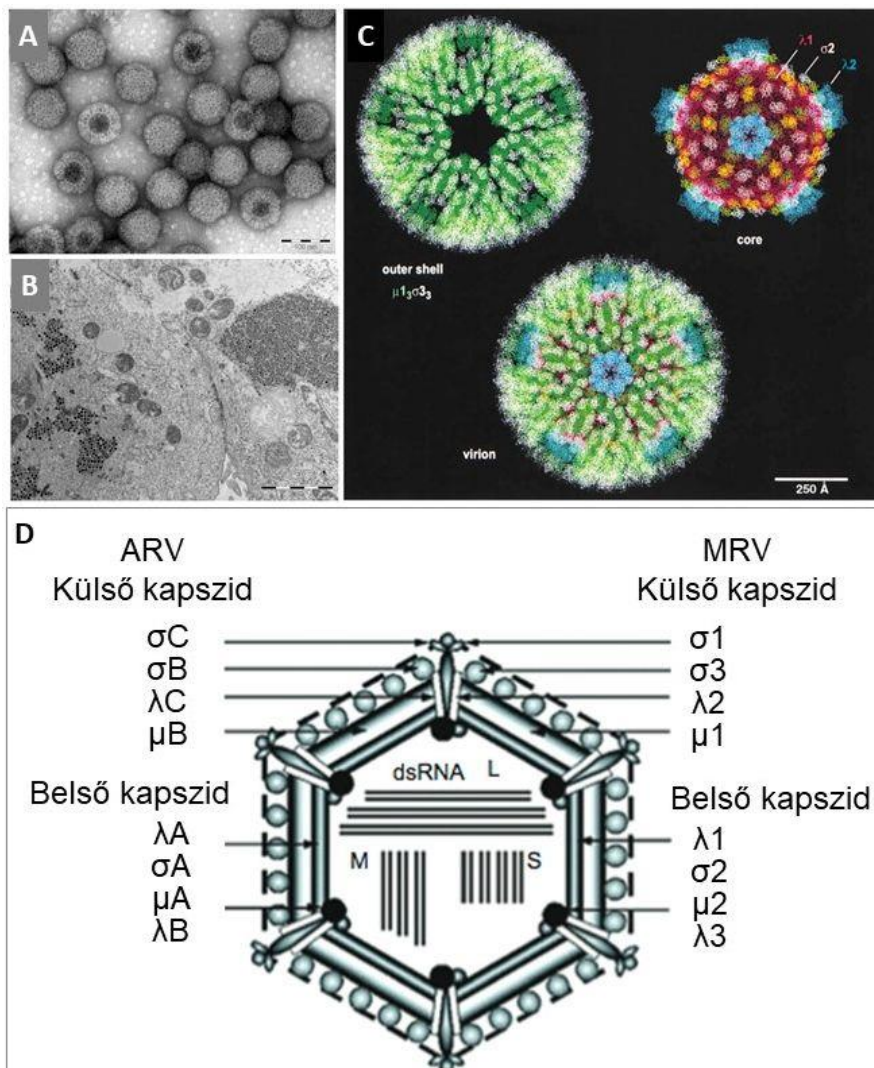


**1. ábra** Orthoreovírusok filogenetikai törzsfája (az RNS-függő RNS polimeráz core fehérjét kódoló nukleotid szekvencia alapján)

#### 4.2. Az orthoreovírusok morfológiája, genomszerveződése és fehérjei

Az orthoreovírusok virionja két koncentrikus fehérjerétegből áll, a belső kapszid nagyjából 60 nm, a külső kapszid pedig nagyjából 85 nm átmérőjű. A virion felszínén – a *Spinareovirinae* alcsalád tagjaira jellemzően – számos nyúlvány található, ezek veszik körbe a külső kapszid rétegbe benyúló csatornákat. A belső kapszid fogja körül a nagyjából

23,5 kilobázispár (kbp) hosszúságú, szegmentált, dsRNS genomot. A genomsegmentumok agaróz gélelektroforézissel jól elválaszthatók, jellegzetes futási mintázatot adnak, és méretük alapján három osztályba csoportosíthatók: nagy (large, L1-L3, méretük kb. 3,9-3,8 kbp), közepes (medium, M1-M3, méretük kb. 2,3-2,2 kbp) és kis méretű (small, S1-S4, méretük kb. 1,6-0,9 kbp) (**2. ábra**). A virionon belül minden szegmens egy példányban fordul elő (Day, 2009).



**2. ábra** Az orthoreovírusok virionjának felépítése.

(A) A virionok elektronmikroszkópos képe: nagyjából 80 nm átmérőjű, kétrétegű kapszidstruktúrát mutató virion

(B) Kristályszerkezetbe tömörült virionok a gazdasejt citoplazmájában

(C) A virion mesterségesen generált atomi modellje. Balra fent a külső kapszid látható, a  $\mu_1$  fehérje zöld, a  $\sigma_3$  fehér színrel jelölve. Jobbra fent a core, a  $\lambda_1$  fehérje piros, a  $\lambda_2$  fehérje kék és a  $\sigma_2$  fehérje rózsaszín és sárga színnel jelölve.

Alul a két modell egymásra vetítése látható.

(D) Az orthoreovírusok virionjának sematikus ábrája (ARV - madár reovírus, MRV - emlős reovírus).

(A képek forrása: Attoui és mtsai, 2011; Kohl és mtsai, 2012; Liemann és mtsai, 2002)

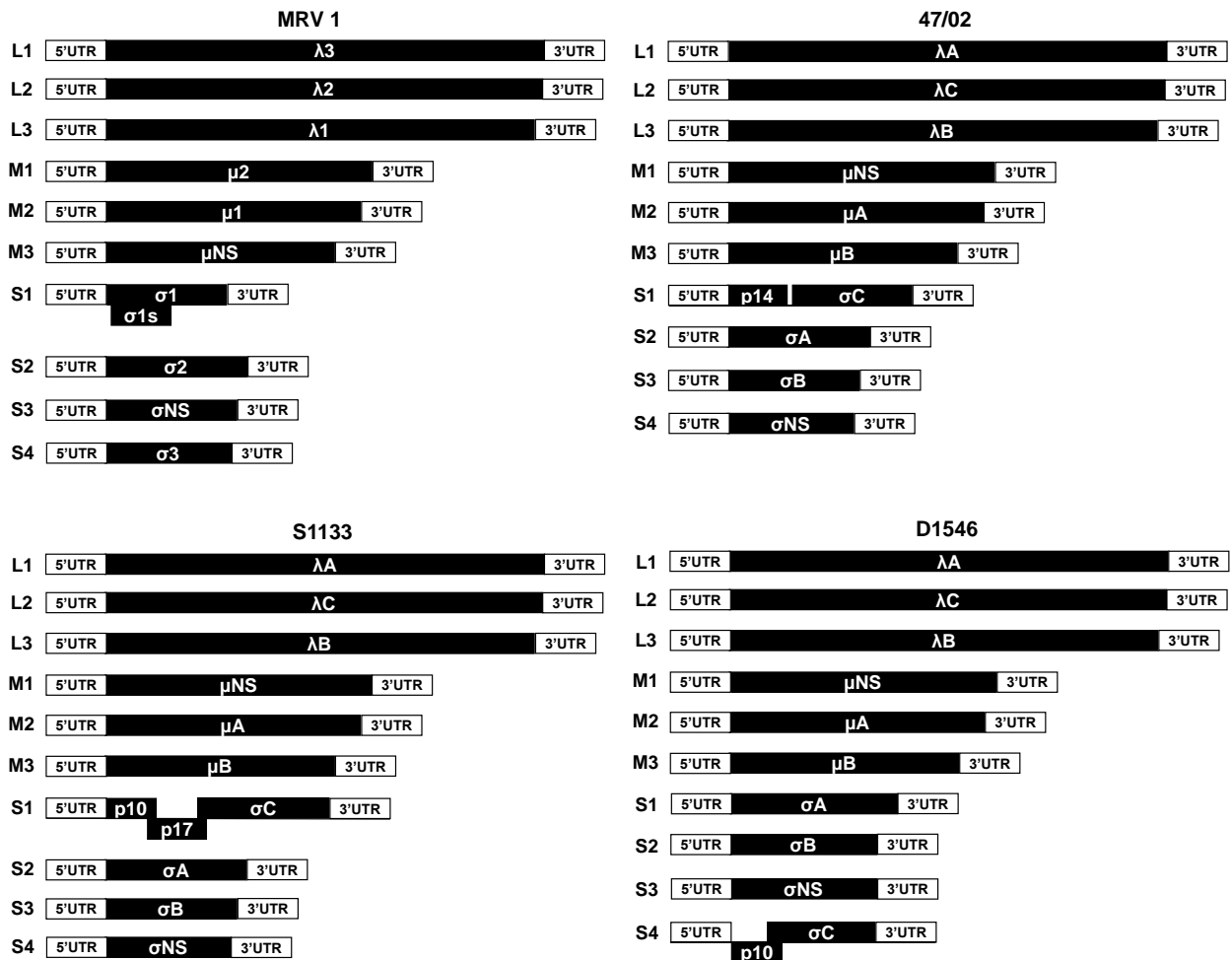
Az egyes RNS szegmensek molekuláris felépítése viszonylag konzervatív szerkezetet mutat. A szegmensek pozitív irányultságú RNS szálainak 5' végén egy dimetilált „cap” szekvencia található, 3' végük nem poliadenilált, és nincsenek kovalensen kötődő fehérjék sem. Mindkét szegmensvégen konszenzus szekvenciák találhatóak: az 5' terminális szekvencia fajra jellemző (**3. ábra**), míg a 3' terminális szekvencia az *Orthoreovirus* nemzetségen belül konzervált UCAUC nukleotidsorból áll.

ARV	G	C	U	U	U	U
BRV	G	U	A	A	A	U
MAHLV	G	G	U	C	A	
MRV	G	C	U	A		
NBV	G	C	U	U		
PRV	G	A	U	A	A	
RRV	G	U	U	C	U	U

**3. ábra** Az orthoreovírus fajok 5' terminális konszenzus szekvenciái

Ezeket a konszenzus szekvenciákat az 5' végén rövidebb, a 3' végén hosszabb nemkódoló régió (untranslated region, UTR) követ, illetve előz meg. Egyetlen S osztályú szegmens kivételével, amely lehet bi- vagy tricisztronos, minden szegmensen egy önálló fehérje génje található meg. A genom összesen nyolc strukturális fehérjét kódol, ezeket az emlős és hal reovírusok esetében a megfelelő méretű szegmensek alapján  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$  és  $\sigma 3$ , illetve madár, pávián, denevér, hüllő és Mahlapitsi reovírusok esetében  $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$ ,  $\mu B$ ,  $\sigma A$ ,  $\sigma B$  és  $\sigma C$  fehérjéknek nevezik (**4. ábra**). További három vagy négy nemstrukturális fehérje is átíródik a genomról, ezek közé tartoznak a  $\mu NS$  és  $\sigma NS$  fehérjék, illetve egyéb, kisméretű géntermékek, amelyeket a policisztronos szegmensek kódolnak, és amelyek fajoként változó méretűek (Attoui és mtsai, 2011; Benavente and Martínez-Costas, 2007). Az emlős és a hüllő reovírusok S1 szegmense bicisztronos. Az MRV esetében a sejtkapcsolódásért felelős  $\sigma 1$  fehérjét kódolja, illetve a  $\sigma 1s$  proteint, az RRV esetében pedig a  $\sigma 1$  homológját, a  $\sigma C$  fehérjét, és a sejtfúzióért felelős p14 fehérjét (Attoui és mtsai, 2011). A hal reovírusoknak szintén az S1 szegmense bicisztronos, azonban ez a  $\sigma 3$  (külső kapszid minor szerkezeti fehérje) és a p13 fehérjéket kódolja, a sejtkapcsolódásért felelős  $\sigma 1$  fehérje az S4 szegmensen kódolt (Markussen és mtsai, 2013). A pávián és a Mahlapitsi reovírusok esetében az S4 szegmens bicisztronos, viszont ezek genomja  $\sigma C$  fehérjét nem kódol, mindössze két kisméretű fehérje génje található meg a szegmensen (Day, 2009; Jansen van Vuren és mtsai, 2016). A denevér reovírusoknak az S1 szegmense tricisztronos, a sejtkapcsolódásért felelős  $\sigma C$  fehérjén kívül a p10 és p17 kisméretű fehérjék génje található

meg rajta. A madár reovírusok vagy a denevér reovírusokéhoz hasonló tricisztronos S1, vagy bizonyos víziszárnyasfélékből izolált ARV-k esetében bicisztronos S4 szegmenssel rendelkeznek, ez utóbbi a  $\sigma C$  és p10 fehérjéket kódolja (**4. ábra**) (Day, 2009).



**4. ábra** Az emlős (MRV 1), hüllő (47/02) és madár (S1133, D1546) orthoreovírusok genomszerveződésének sematikus ábrája

Az orthoreovírusok fehérjéi közül a  $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$  és  $\sigma A$  a virion core részét, míg a  $\mu B$ ,  $\sigma B$  és  $\sigma C$  fehérjék a külső kapszidot alkotják. A  $\lambda A$  és  $\sigma A$  fehérjék a belső kapszid fő szerkezeti fehérjéi, a belső kapszidból kiemelkedő és a külső kapszid rétegébe átnyúló nyúlványokat a  $\lambda C$  fehérje alkotja (**2. ábra**). A  $\lambda B$  és a  $\mu A$  a belső kapszidon belül helyezkedik el, előbbi a vírus RNS-függő RNS polimeráza (RdRp), utóbbi pedig NTPáz aktivitással rendelkezik; mindkét fehérjének a vírusreplikációban van szerepe. A külső kapszid fő szerkezetét a  $\mu B$  és  $\sigma B$  fehérjék alkotják, valamint a külső kapszidon helyezkedik még el a sejtkapcsolódásért felelős  $\sigma C$  fiber fehérje is. A fehérjék funkcióit az **1. táblázat** foglalja össze (Attoui és mtsai, 2011).

**1. táblázat.** Az orthoreovírusok fehérjéi

Fehérje		Elhelyezkedés	Funkció
MRV/ PRV	ARV/BRV/MAHLV/ NBV/RRV		
$\lambda 1$	$\lambda A$	core	belső kapszid szerkezeti fehérje, NTPáz, helikáz aktivitással
$\lambda 2$	$\lambda C$	core	core nyúlvány, capping enzim, metiltranszferáz és guanililtranszferáz aktivitással
$\lambda 3$	$\lambda B$	core	RNS-függő RNS polimeráz
$\mu 1$	$\mu B$	külső kapszid	külső kapszid fő szerkezeti fehérje
$\mu 2$	$\mu A$	core	NTPáz
$\mu NS$	$\mu NS$		ssRNS** kötő funkció
$\sigma 1$	$\sigma C^*$	külső kapszid	külső kapszid fiber, sejtkapcsolódásért felelős fehérje
$\sigma 2$	$\sigma A$	core	belső kapszid szerkezeti fehérje
$\sigma 3$	$\sigma B$	külső kapszid	külső kapszid minor szerkezeti fehérje
$\sigma NS$	$\sigma NS$		ssRNS kötő funkció

\* BRV és MAHLV esetében hiányzik a  $\sigma C$  protein

\*\* ssRNS: szimpla szálú RNS

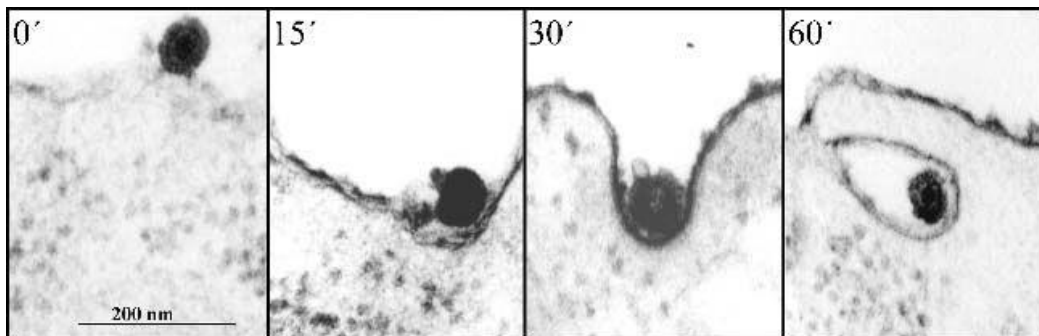
Az *Orthoreovirus* nemzetségen belül a vírusokat feloszthatjuk óriássejt képzésre képes és nem képes csoportokra is. Ez a tulajdonság az úgynevezett fúzió-asszociált kis transzmembrán (FAST) fehérjék családjába tartozó protein meglétével, illetve hiányával hozható összefüggésbe. Az ARV és NBV esetében ezt a funkciót a p10 fehérje tölti be, a BRV esetében a p15 fehérje, míg a MAHLV és RRV esetében a p14 (Corcoran and Duncan, 2004; Dawe and Duncan, 2002; Jansen van Vuren és mtsai, 2016; Shmulevitz and Duncan, 2000). A FAST fehérjével rendelkező vírusok sejtenyészeten jellegzetes, óriássejt képződéssel járó elváltozást okoznak, melynek a vírus terjedése és fertőzése szempontjából lehet fontos szerepe (Day, 2009). Az ARV és NBV p10 fehérjéinek aminosav szekvenciái nagyfokú hasonlóságot mutatnak egymással, és ugyanez megállapítható a MAHLV és az RRV p14 fehérjék esetében is. Ugyanakkor a különböző méretű, p10, p15 és p14 fehérjék aminosav szekvenciái között csak kismértékű a hasonlóság. A burokkal rendelkező vírusok nagyméretű, komplex membránfúziós proteinjeivel ellentétben, a reovírusok FAST fehérjéi nem vesznek részt a kapszidstruktúra kialakításában, így a vírus sejtbe történő bejutásában sem. Ezen



fehérjék a vírussal fertőzött gazdasejtben fejeződnek ki, és az endoplazmatikus retikulum - Golgi útvonalon keresztül jutnak el a sejtmembránhoz. A fúziós fehérjék felhalmozódása vezet azután a gazdasejt, és a szomszédos, nem fertőzött sejtek fúziójához, ami a fertőzött állatokban és sejtenyészetben is megfigyelhető. A FAST fehérjék által kiváltott óriássejtképzés apoptotikus választ indukál a gazdasejtben, és az így megváltozott membrán permeabilitás végül a sejt pusztulását okozza (Salsman és mtsai, 2005).

### 4.3. Az orthoreovírusok replikációja

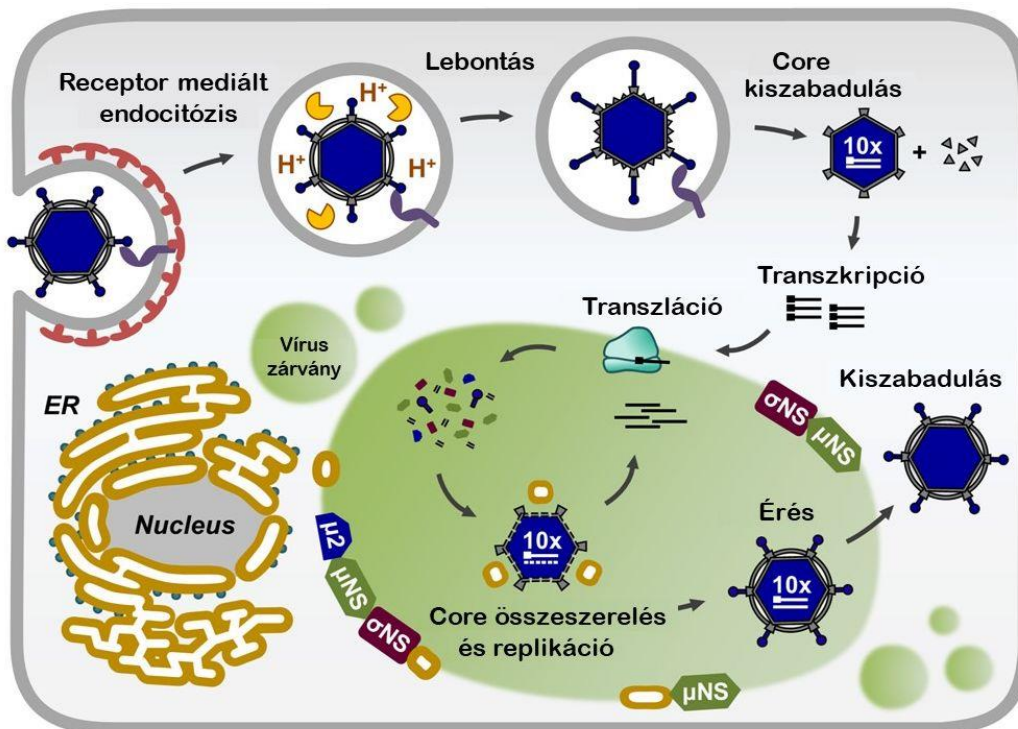
Az orthoreovírusok replikációja a gazdasejt citoplazmájában zajlik. A vírus első lépésben a  $\sigma C$  fehérje segítségével kötődik a gazdasejt sejt felszíni receptoraihoz, majd receptor mediált endocitózissal jut be a sejtbe (**5. ábra**) (Benavente and Martínez-Costas, 2006).



**5. ábra** Reovírus bejutása gazdasejtbe endocitózis segítségével, elektronmikroszkópos kép  
(A kép forrása: Benavente and Martínez-Costas, 2006)

Az orthoreovírusok, illetve más, dsRNS genommal rendelkező vírusok esetében is problémát jelent a szaporodásban, hogy a gazdasejtben az intracelluláris dsRNS jelenléte védelmi mechanizmusként interferon termelést és géncsendesítést indukál, ami különböző kaszkádokon keresztül végül a sejt apoptózisához vezet (Mertens, 2004). Ennek elkerülése érdekében az orthoreovírusok genomja a belső kapszidból sosem kerül be a citoplazmába, a virionról csak a külső kapszid válik le, és a vírusgenom így rejtve marad a gazdasejt védekező mechanizmusai elől. Az endocitózissal gazdasejtbe bekerült virion a késői endolizoszómák savassá váló közegében veszíti el külső kapszidját, és alakul át úgynevezett fertőző vírusrészecskévé (infectious subvirion particle, ISVP) (**6. ábra**) (Guglielmi és mtsai, 2006).

Az ISVP további fehérjemódosulások után lép keresztül az endolizoszómák membránján és az így szabaddá váló, a belső kapszid és az általa körülzárt genomszegmensek és fehérjék alkotta, transzkripció szempontjából aktív core részecske jut a citoplazmába (Guglielmi és mtsai, 2006; Tenorio és mtsai, 2019).



**6. ábra** A reovírusok replikációjának sematikus ábrája  
(A kép forrása: Tenorio és mtsai, 2019)

A transzkripció során a virális magon belül található RdRp a genomi dsRNS molekulákat templátként használva generál a dsRNS genom pozitív szálával megegyező messenger RNS (mRNS) molekulákat. A keletkezett mRNS ezután belép a gazdasejt citoplazmájába, és a riboszómákon megtörténik róla a virális fehérjék szintézise. A vírusreplikáció és összeszerelődés ezután a sejt citoplazmájában található nagy denzitású zárványokban, úgynevezett viroplazmában történik, mely kialakításában elsődlegesen a  $\mu$ NS és  $\sigma$ NS fehérjék vesznek részt. Ezen zárványok a citoplazmában keletkezett, majd onnan a viroplazmába szállított vírusfehérjéket, virális RNS-t és részben vagy egészben összeszerelt vírusrészecskéket tartalmaznak. Itt történik meg elsőként a core részecskék összeszerelődése, melyen belül a virális transzkriptáz komplex az mRNS-t templátként használva szintetizálja a negatív RNS szálakat, így állítva elő újra a dsRNS genom szegmenseit. Különböző felismerő szignálok biztosítják, hogy minden szegmensből egy darab jusson az utóvírusba. A kialakult core részecskék ezután vagy visszalépnek a vírusreplikációs ciklusba, és új mRNS-eket kezdenek gyártani, vagy a külső kapszidburok felépülésével kész utóvírus keletkezik belőlük. **(6. ábra)** (Benavente and Martinez-Costas, 2006; Tenorio és mtsai, 2019).

#### 4.4. Madarak orthoreovírusai

A madár orthoreovírusok általánosan elterjedtek, és különböző kórképek kialakításában van szerepük. A vírust elsőként házityúkokból (*Gallus gallus domesticus*) izolálták, de azóta kapcsolatba hozták más madárfajok, köztük pulykák (*Meleagris gallopavo domesticus*), vízibarmfi-félék, valamint különböző vadmadarak betegségeivel is (Jones, 2000).

Bár a baromfifélék reovírusainak jelentős része nem okoz tüneteket, és egészséges egyedekből is kimutatható a jelenlétük, gazdasági jelentőségük mégsem elhanyagolható. A patogén törzsekkel fertőzött állományokban megfigyelhető megnövekedett mortalitás, illetve a beteg egyedek növekedésének elmaradása miatt a fertőzés nagymértékű károkat képes okozni. Reovírusok okozta kórképek közül a házityúkokban és pulykákban is előforduló vírusos ízületi és ínhüvelygyulladás bír a legnagyobb jelentőséggel. Szintén fontos még a vízibarmfi-félék reovírusos megbetegedése, mely ugyancsak ízületi gyulladással, valamint a májban és a lépben megfigyelhető elhalásos góccok kialakulásával jár együtt (Day, 2009; Jones, 2000). Gyöngytyúkokban (*Numida meleagris*) a hasnyálmirigy savós-fibrines gyulladását és elhalásos gócait figyelték meg reovírus fertőzéssel kapcsolatban. Fertőzéses kísérletekben sikerült reprodukálni a természetes úton fertőzött egyedek tüneteit, ezzel igazolva a vírus és a betegség közötti ok-okozati kapcsolatot (Tanyi és mtsai, 1994).

A fentiekén kívül számos vadon élő, telepen nevelt, illetve kedvtelésből tartott madárfaj megbetegedéseivel hozták kapcsolatba reovírusok jelenlétét. Telepen nevelt állatok közül fácánok (*Phasianus colchicus*) hasmenéses (Mutlu és mtsai, 1998), és foglyok (*Perdix perdix*) felsőlégúti megbetegedéséből (Kugler és mtsai, 2016), valamint virginiai fogasfűrjek (*Colinus virginianus*) elhullással járó, hasmenéses megbetegedéséből izoláltak reovírusokat, ez utóbbi esetben cryptosporidiumokkal együtt (Ritter és mtsai, 1986). Tenyésztett struccok (*Struthio camelus*) bélsár mintáiból szintén kimutatták reovírusok jelenlétét, azonban az állatok a vizsgálatok idején egészségesek voltak (Sakai és mtsai, 2009). Vadmadarak különböző megbetegedéseiben is leírták a reovírusok lehetséges kóroki szerepét. Finnországban pehelyréce (*Somateria mollissima*) fiókák nagymértékű elhullásával kísért járványos megbetegedése során (Hollmén és mtsai, 2002), illetve idegrendszeri tüneteket mutató dolmányos varjúból (*Corvus corone cornix*) izoláltak reovírust (Huhtamo és mtsai, 2007). Amerikai szalonkák (*Scolopax minor*) és kanadai cinegék (*Poecile atricapillus*) kóros lesoványodását és elhullását szintén kapcsolatba hozták reovírusok jelenlétével (Docherty és mtsai, 1994; Mor és mtsai, 2014). Ezek mellett számos esetben igazolták reovírusok elleni antitestek előfordulását szerológiai vizsgálatokkal, például nagy lilikek (*Anser albifrons*), vetési ludak (*Anser fabalis*) és telepen nevelt struccok egészséges állományaiban is (Cadman és mtsai, 1994; Hlinak és mtsai, 1998).

Kedvtelésből tartott madarak közül a papagájfélék reovírusos megbetegedéseiről található szélesebb körű irodalmat. Számos papagájfajban leírták már reovírusok jelenlétét, sok esetben egyéb, másodlagos fertőzésekkel együttesen. A klinikai és kóronctani tünetek az egyes fajokban eltérő képet mutattak, jellemzőek a levertség, kóros soványság, az emésztőrendszeri, légzőszervi és idegrendszeri tünetek, kórszövettani képen a máj és a lép érintettsége (Conzo és mtsai, 2001; Kloet, 2008; Perpiñán és mtsai, 2010; Sánchez-Cordon és mtsai, 2002).

#### **4.4.1. Tyúkfélék reovirusai**

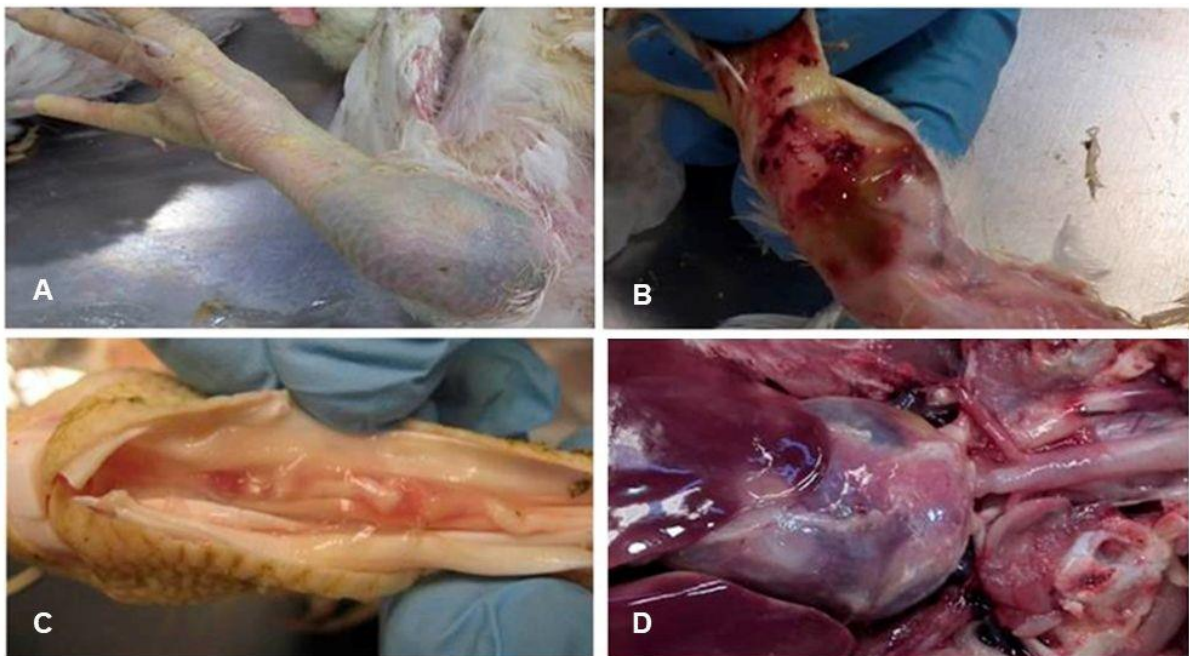
Jelenlegi ismereteink szerint a házityúkokat és pulykákat fertőző reovírusokat mind az *Orthoreovirus* nemzetségbe, azon belül pedig a madár orthoreovírus (*Avian orthoreovirus*) fajba sorolhatjuk. A tyúkalakúakhoz tartozó fácán- és fogolyfélékből izolált reovírusok ezidáig szintén a ARV-khez tartoztak (Farkas és mtsai, 2016; Kugler és mtsai, 2016). 1954-ben az USA-ban Fahey és Crawley (1954) krónikus légzőszervi betegségben szenvedő házityúkokból izoláltak egy vírustörzset, amelyről azonban csak később nyert bizonyítást, hogy a reovírusok közé sorolható (Petek és mtsai, 1967). Reovírusoknak az ízületi gyulladással járó betegségekben betöltött lehetséges kóros szerepét először 1972-ben bizonyították, amikor arthritisszel érintett házityúkok ízületi folyadékából izolált vírustörzset biológiai tulajdonságai, valamint elektronmikroszkópos képe alapján reovírusként azonosítottak (Olson and Kerr, 1966; Walker és mtsai, 1972). Azóta világszerte nagy számban izoláltak reovírusokat házityúkok és pulykák, illetve egyéb tyúkalakú madarak különböző klinikai kórképekben jelentkező megbetegedéseiből. Ugyanakkor számos esetben kimutathatóak egészséges egyedek légútjából és emésztőrendszeréből is, így a betegségekben betöltött szerepük nem minden esetben tisztázott (Day, 2009; Jones, 2008a).

A vírus horizontális és vertikális terjedésre egyaránt képes. Irodalmi adatok alapján a kontaktfertőzés elsődlegesen fekális-orális úton történik, ugyanakkor a légzőszervrendszeren, valamint a talp bőrének repedésein keresztül szintén képes bejutni a szervezetbe a vírus. Kísérletes körülmények között a vertikális terjedést is bizonyították, azonban hatékonysága alacsonynak bizonyult, így jelentősége természetes fertőződésben kevéssé tisztázott (Jones, 2008a).

Reovírus fertőzés okozta tünetek elsősorban a fiatal egyedekben jelentkeznek, és bár az idősebb egyedek is megfertőződhetnek, esetükben jóval enyhébb a betegség lefolyása. A mortalitás általában alacsony, 10% alatti, azonban a betegség miatt bekövetkező növekedésmaradás komoly gazdasági kártétellel jár az állományokban (Jones, 2008a; Lu és mtsai, 2015; Troxler és mtsai, 2013). A házityúkok reovírus fertőzését számos klinikai kórképpel kapcsolatba hozták már, ezek a csirkék vírusos ízületi és ínhüvelygyulladása (tenosynovitis), a satnyaság és törpenövés tünetegyüttes, növekedésmaradás,

szívurokgyulladás, szívizomgyulladás, hydropericardium, bélgyulladás, májgyulladás, a bursa Fabricii és a tímusz sorvadása, akut és krónikus légzőszervi betegségek. Ok-okozati összefüggést az előbb felsorolt tünetek és a reovírus fertőzés között mindeddig csak a tenosynovitis esetében sikerült egyértelműen kimutatni, a többi kórkép kialakításában azonban nem teljesen tisztázott ezen vírusok szerepe (Jones, 2008a, 2000).

A tenosynovitis leginkább a fiatal, 2-4 hetes csirkéket érinti (Davis és mtsai, 2013; Jones, 2008a; Lu és mtsai, 2015; Souza és mtsai, 2018). Az akut fertőzés általános gyengeséggel, csökkent táplálékfelvétellel, valamint a lábak gyengeségével, nehezített mozgással jár. Krónikus esetekben a fertőzött állatok súlygyarapodása jelentősen elmarad az egészséges egyedekéhez képest, súlyos esetben a mozgásgyengeség kifejezett, akár a láb teljes mozgásképtelensége is előfordulhat. A térd, a lábközép és a lábujjak ízületei, a gastrocnemius ín, valamint a lábujjakat hajlító és feszítő ínak és ínhüvelyük a gyulladásos reakciók miatt duzzadtak, a láb meleg tapintatú. Az ínhüvely, az ízületi tokok, és az ízületeket körülvevő szövetek ödémásak, bevérzések láthatóak rajtuk, valamint összenövések alakulhatnak ki bennük (**7. ábra**). Az érintett ízületekben és környékükön limfocitás-plazmasejtes beszűrődés figyelhető meg, ritkábban heterofil sejtek kíséretében. Az ínhüvely a fibrines felrakódás miatt megvastagszik, rugalmatlanná válik, ami végül az ín szakadásához is vezethet (**7. ábra**) (Ayalew és mtsai, 2017; Jones, 2008a; Lu és mtsai, 2015; Souza és mtsai, 2018; Troxler és mtsai, 2013).



**7. ábra** Reovírus fertőzés tünetei és makroszkópos elváltozások házityúkban:  
(A) tenosynovitis tyúk lábában, duzzadt ízület, a bőr alatti bevérzések miatt kékes- zöldes szín; (B) duzzanatot, ödémát és bevérzéseket az ínak és ínhüvely területén;  
(C) ín szakadása; (D) szívurokgyulladás.  
(A képek forrása: Lu és mtsai, 2015)

Az ízületek gyulladós reakciója mellett más szervekben is megfigyeltek reovírus fertőzéssel összefüggésbe hozható elváltozásokat: a bélbolyhok sorvadását, a hasnyálmirigyben megfigyelhető léziókat (Davis és mtsai, 2013), szívburokgyulladást (**7. ábra**) (Lu és mtsai, 2015), a máj gyulladós reakcióját, valamint a lépben a limfociták számának csökkenését (Zhang és mtsai, 2019).

Pulykákban szintén számos kórképpel kapcsolatba hozták a reovírusok lehetséges szerepét, azonban többnyire nem bizonyított az ok-okozati összefüggés a betegségek és a vírus jelenléte között. Legjelentősebbek ezek közül – a házityúk reovírusok okozta betegségéhez hasonlóan – a tenosynovitis, valamint a pulykák bélgyulladással és elhullással járó tünetegyüttese (poult enteritis and mortality syndrome, PEMS) (Jones, 2008b). A pulykák tenosynovitis-e hasonló tünetekkel jár, mint a házityúkoké: az érintett ízületek a gyulladós reakciók miatt ödémásak, bőr alatti bevérzések figyelhetők meg rajtuk. Leginkább a gastrocnemius és a lábujjak hajlító injai érintettek, jellemző a savós-fibrines váladék felgyülemelése, melyet limfocitász- plazmasejtes beszűrődés kísér. Súlyos esetben a fibrózis az ízület környékén kifejezett, mely az inak szakadásához is vezethet (Mor és mtsai, 2015, 2013). A bélgyulladással járó kórképben jellemző klinikai tünet a hasmenés, valamint a csökkent táplálékfelvétel és -hasznosulás, ami miatt az állatok növekedése elmarad az egészséges egyedekéhez képest. Mikroszkóposan szöveti léziók láthatóak a bélbolyhokban, a májban, a lépben és a bursa Fabricii-ben, az érintett szervekben gyulladós sejtes beszűrődés figyelhető meg (Jones, 2008b; Spackman és mtsai, 2005). Ugyanakkor a különböző, ínhüvely- vagy bélgyulladással érintett pulykákból izolált reovírusokkal kísérleti körülmények között fertőzve csirkéket, pulykákat, csak enyhe klinikai tüneteket és kórszövettani elváltozásokat lehetett megfigyelni, így valószínű, hogy ezen betegségek multifaktoriálisak (Jones, 2008b; Sharafeldin és mtsai, 2015, 2014; Spackman és mtsai, 2005).

A különböző fácánfélék vadászati célú tartásának Magyarországon évszázados hagyománya van. Ezeket a szárnyasvadakat extenzív, illetve félintenzív tartásrendszerben nevelik, majd a megfelelő kor elérésekor kiengedik a természetbe. Annak ellenére, hogy a különböző enterális betegségek ezekben a fajokban is jelentős elhullásokat okozhatnak, keveset tudunk a kórképek virális hátteréről. Fácánok hasmenéses betegségeiben többnyire rotavírusokat mutattak ki (Gál és mtsai, 2016; Ursu és mtsai, 2011; Legrottaglie és mtsai, 1997; Trojnar és mtsai, 2013; Ursu és mtsai, 2009). Reovírusok jelenlétét eddig mindössze egy esetben igazolták, törökországi fácán állományokban megfigyelt bélgyulladás esetében (Mutlu és mtsai, 1998).

Jelenleg az ARV-k elleni védekezésre csak házityúk esetében érhető el kereskedelmi forgalomban lévő vakcina, ezek élő vagy inaktivált vírustörzseket tartalmaznak. Az élő, attenuált kórokozó felhasználásával készült vakcinák többnyire az S1133 jelzésű mérsékelt patogenitású törzset tartalmazzák, ezeket az ivóvízbe keverve, illetve bőr alá vagy

izomba oltva kell beadni. Inaktivált formában több különböző reovírus törzs is használatban van, ezeket más betegségek, például baromfipestis (Newcastle disease, ND), fertőző légcsőgyulladás (infectious bronchitis, IB), fertőző bursitis (infectious bursal disease, IBD) elleni védekezéssel kombinálva alkalmazzák (<https://www.merck-animal-health-usa.com/>, <http://www.biovac.co.il/>, <https://www.ceva.com/>). Ugyanakkor a különböző szerotípusok a vakcinázás ellenére is megbetegedést okozhatnak, ilyen esetekben autovakcinákkal próbálnak védekezni az állományokban (Jones, 2008a; Lu és mtsai, 2015; Troxler és mtsai, 2013).

#### **4.4.2. Víziszárnyasok reovírusai**

A víziszárnyasokból kimutatott reovírusok eddigi ismereteink alapján mind az *Orthoreovirus* nemzetségbe, azon belül pedig a madár orthoreovírus (*Avian orthoreovirus*) fajba tartoztak. Reovírus fertőzéssel összefüggésbe hozható megbetegedéseket vízibaromfi-félékben elsőként pézsmakacsa (*Cairina moschata*) állományokban írtak le 1950-ben Dél-Afrikában (Kaschula, 1950). Később a betegség kórokozóját szintén pézsmakacsákat érintő fertőzésekből izolálták Izraelben, illetve Franciaországban. A kórokozó azonosítása biológiai tulajdonságai és elektronmikroszkópos képen megjelenő jellegzetes virionszerkezete alapján történt (Malkinson és mtsai, 1981).

A víziszárnyasok reovírusait (WRV) biológiai és genetikai tulajdonságaik alapján két csoportra oszthattuk, a klasszikus és új típusú WRV-kre (Chen és mtsai, 2012; Farkas és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2014). Klasszikus WRV-k okozta fertőzést eddig kizárólag pézsmakacsákból és háziludakból mutattak ki, a betegség többnyire a fiatal állatokat érintette, a mortalitás viszonylag alacsony maradt. A kórképben jellemző a szívburok és az ízületek gyulladása, valamint a májban és a lépben megfigyelhető elhalásos gócok (Palya és mtsai, 2003). A 2000-es években Kínában írták le először az új típusú WRV-k okozta megbetegedést, amely magasabb mortalitással és súlyosabb klinikai képpel jár együtt, emellett a gazdaspektruma is szélesebb: a betegséget és kórokozóját kimutatták pézsmakacsákban, házikacsában, tőkésrécékben (*Anas platyrhynchos*) és ludakban is (Chen és mtsai, 2012; Yang és mtsai, 2018; Yu és mtsai, 2014; Yun és mtsai, 2012).

A klasszikus és új típusú WRV-eket a genomszerveződésükben megfigyelhető eltérések is megkülönböztetik egymástól. Az új típusú WRV-kben a sejt receptoraihoz való kapcsolódásért felelős  $\sigma C$  fehérje a legnagyobb S osztályú szegmensben, az S1-en kódolt, míg a klasszikus WRV-k esetében a legkisebb S osztályú szegmensben, az S4-en. Az új típusú WRV-k S1 szegmense tricisztronos, a  $\sigma C$  mellett további két, részben átfedő nyílt leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz: ezek a p17 és p10 fehérjék génjei. A p17 fehérje egyes, a citoplazmában és a sejtmagban zajló folyamatok szabályozásában vesz részt, míg a p10 a FAST fehérjék családjába tartozik (Day, 2009; Huang és mtsai, 2015). Ezen

tulajdonságuk alapján az új típusú WRV-k házityúk és pulyka eredetű ARV-kkel mutatnak rokonságot, melyeknél az S1 szegmens felépítése és az általa kódolt fehérjék hasonlóak. A klasszikus víziszárnyas reovírusok S4 szegmense ezzel szemben bicisztronos, csak egy további ORF-et tartalmaz, a p10 fehérje génjét, ami azonban nem homológ az új típusú WRV-k és ARV-k p10 proteinjével. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, mely szerint a klasszikus WRV-k nem képesek sejtenyészeten szincíciumképzésre, szemben az új típusú WRV-kkel, melyek esetében megfigyelhető az óriássejtképzés (Chen és mtsai, 2012; Liu és mtsai, 2011; Palya és mtsai, 2003; Yang és mtsai, 2018).

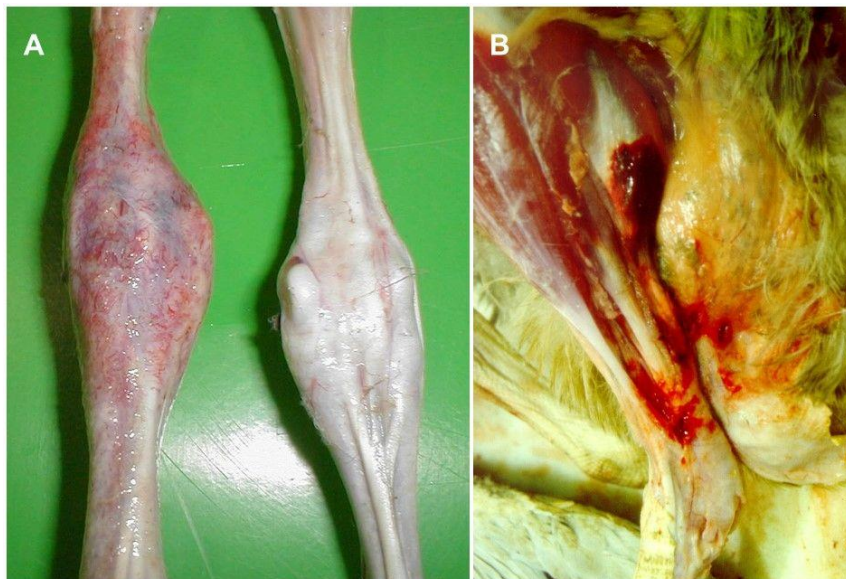
A vízibarmfi-félék reovírus fertőzése jellemzően a fiatal egyedekben okoz tüneteket, és az elhullás is ebben a csoportban a legmagasabb. A klasszikus WRV-k esetében a mortalitás alacsony, maximum 20% körüli értéket mutat, míg az új típusú WRV-k esetében ennél jóval magasabb, akár az 50%-ot is elérheti. A betegség általános gyengeséggel, étvágytalansággal és hasmenéssel jár. Jellemző tünetek közé tartozik a lábak gyengesége, bizonytalan járás, mozgási nehézségek, ritkább esetben akár mozgásképtelenség is (Chen és mtsai, 2012; Heffels-Redmann és mtsai, 1992; Malkinson és mtsai, 1981; Palya és mtsai, 2003; Woźniakowski és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2006). Az akut fertőzést túlélő egyedek rendszerint visszamaradnak a fejlődésben, súlygyarapodásuk elmarad az egészséges egyedekéhez képest, illetve néhány esetben tartós mozgászavar és sántaság figyelhető meg (Heffels-Redmann és mtsai, 1992; Palya és mtsai, 2003). A reovírus fertőzés víziszárnyasokban jellegzetes szövettani képet mutat, ami a klasszikus WRV-vel való fertőzöttség esetében enyhébb, míg az új típusú WRV esetében súlyosabb formában jelenik meg. A máj és a lép megnagyobbodik, és számos szürkésfehér elhalásos góc figyelhető meg állományukban. (**8. ábra**)



**8. ábra** Reovírus fertőzés okozta elhalásos gócok házilúd májában, szívburok- és légzsákgyulladás  
(A képet készítette dr. Palya Vilmos)



A májban plazmasejtes, limfocitás és makrofág sejtjes beszűrődés jellemzi a szövettani képet. A vese megnagyobbodott, számos bevérzés figyelhető meg rajta. Jellemző még a szívburokgyulladás, apró bevérzések jelentkeznek a szívburok fali és zsigeri lemezén. Szövettani képen mononukleáris gyulladással sejtjes, főként limfocitás és plazmasejtes beszűrődés kíséri (Chen és mtsai, 2012; Heffels-Redmann és mtsai, 1992; Kaschula, 1950; Liu és mtsai, 2011; Malkinson és mtsai, 1981; Palya és mtsai, 2003; Woźniakowski és mtsai, 2014; Yang és mtsai, 2018). A láb ízületeinek, az ízületi toknak, az ínknak, valamint az ínhüvelynek a gyulladása szintén jellegzetes tünet, az érintett ízületekben limfocitás-plazmasejtes beszűrődés figyelhető meg, valamint az ízület és az azt körülvevő szövetek duzzanata, az ízületi résben savós-fibrines váladék felgyülemzése is gyakori. Ezen váladékból kiváló fibrines felrakódás az ízületek savós hártáinak megvastagodását, ezáltal rugalmasságának elvesztését okozza, mely akár az inak szakadásához is vezethet (Liu és mtsai, 2011; Palya és mtsai, 2003; Yang és mtsai, 2018) (**9. ábra**). A gyulladással, szövetelhalással párhuzamosan a bursa Fabricii-ben limfocitaszám csökkenés kíséri a fertőzést (Li és mtsai, 2016; Liu és mtsai, 2011).



**9. ábra** Reovírus fertőzés okozta elváltozások házilúd lábában.  
 (A) Ízületi gyulladás, duzzanat és bevérzések az ízületek területén (bal), kontroll (jobb)  
 (B) Gastrocnemius ín szakadása miatti bevérzés házilúd lábában  
 (A képeket készítette dr. Palya Vilmos)

Vadon élő víziszárnyasok megbetegedésével kapcsolatban szintén felmerült a reovírusok lehetséges kóroki szerepe. Finnországban megbetegedett pehelyécéből (*Somateria mollissima*) izoláltak reovírust. A járvány során a fiókák túlélési aránya mindössze 1-5% volt, az elpusztult állatok maximum 3 hetesek voltak. A boncolás során feltárultak a reovírus fertőzéssel kapcsolatba hozható jellegzetes szervi és szövettani elváltozások:

bevérzések és elhalásos góccok a májban, a lépben és a bursa Fabricii-ben. Az elhullott állatok szövetmintáiból izolált reovírussal tőkésrécében végzett kísérletes fertőzés során nem dokumentáltak elhullást, a szövettani kép azonban hasonló volt a természetes úton fertőződött állatokban megfigyeltékhez (Hollmén és mtsai, 2002).

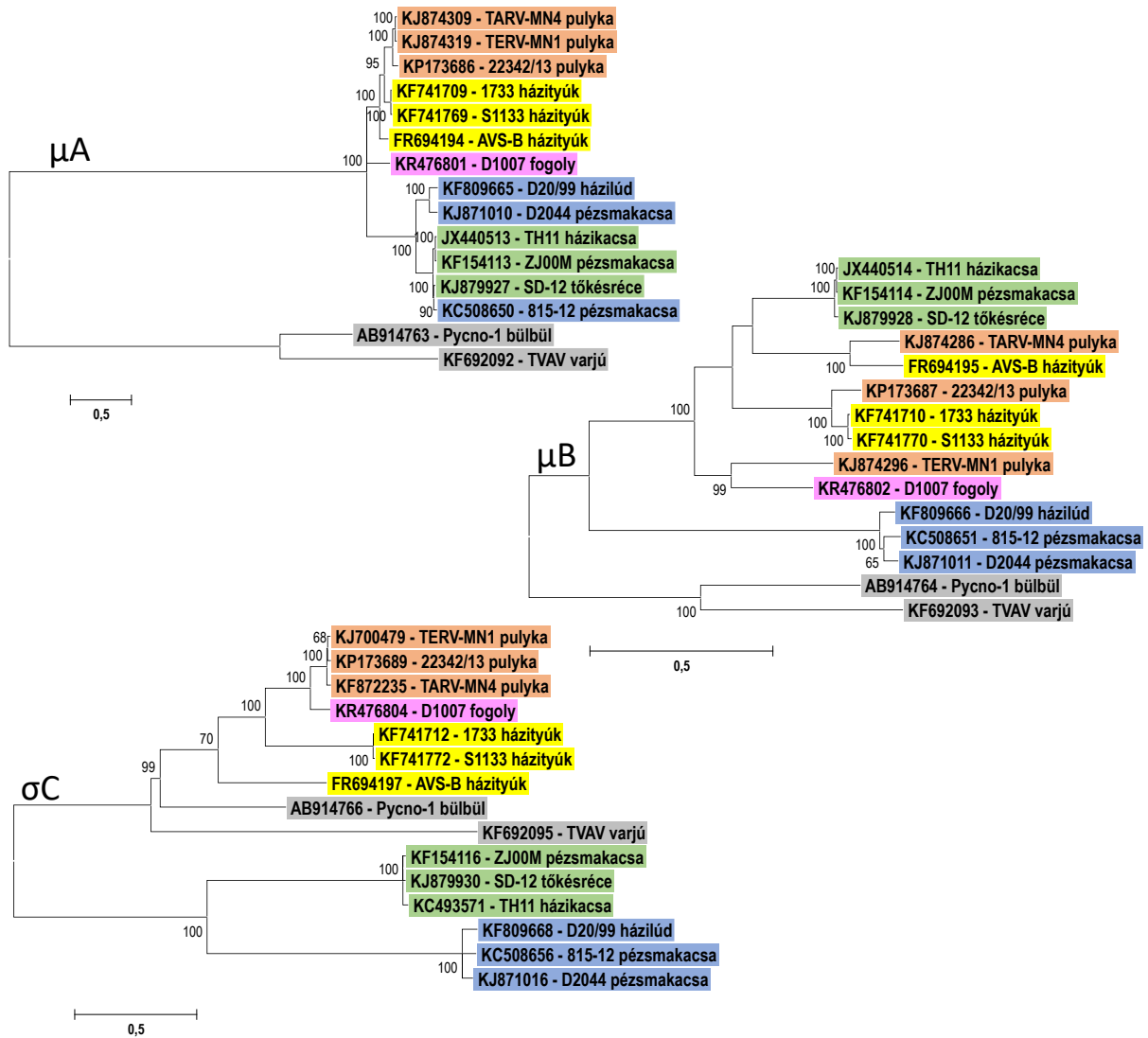
A vízibaromfi-félék nevelése félintenzív tartásrendszerben történik, szabadtéri kifutókkal és úszatókkal, így az állatok nagy valószínűséggel kapcsolatba kerülhetnek vadmadarakkal, akár nagy távolságokat repülő vonulómadarakkal is. Az ilyen rendszer kedvez a különböző kórokozók átadásának, terjedésének, emiatt különösen fontos lenne megfelelő járványvédelem kialakítása. Jelenleg nincs a kereskedelmi forgalomban olyan vakcina, melyet felhasználhatnánk a víziszárnyasok reovírus fertőzése elleni védekezésben. Történtek kísérletek inaktivált vakcinával, valamint az S1133, házityúk reovírus vakcinatörzsszel is, ezek azonban nem hozták meg a várt eredményt (Le Gall-Reculé és mtsai, 1999). A rekombináns  $\sigma B$  és  $\sigma C$  fehérjén alapuló vakcinafejlesztési kísérleteknek voltak sikerei, azonban ezek esetében sincsenek publikált adatok állatállományokban végzett tömeges vakcinázás eredményeiről, így megbízhatóságuk és hatásosságuk még bizonyításra vár (Bi és mtsai, 2016; Kuntz-Simon és mtsai, 2002; Zhu és mtsai, 2015).

#### **4.4.3. Tyúkfélék és víziszárnyasok reovirusainak filogenetikai kapcsolatai**

Az orthoreovírusok evolúciójában három folyamat bír alapvető fontossággal: i) a virális RdRp hibajavító mechanizmusának hiánya miatt bekövetkező pontmutációk felhalmozódása növeli az egyes törzsek genetikai változatosságát; ii) a szegmenseken belüli rekombinációs eseményekre is találhatunk bizonyítékokat, ami szintén elősegíti új változatok kialakulását (Farkas és mtsai, 2016; Noh és mtsai, 2018); iii) általánosságban elmondható, hogy a szegmentált RNS genommal rendelkező vírusok evolúciójában kiemelkedő szerepe van az új genomi konstellációk megjelenésén keresztül a reasszortációnak is (McDonald és mtsai, 2016). A teljes genomszekvenálások során feltárt reasszortációs események meglátja azt mutatja, hogy ez a fajta genom-újraszerveződés szintén jelentős szerepet játszhat a reovírusok evolúciójában (Dandár és mtsai, 2014a; Farkas és mtsai, 2016, 2014).

A különböző madárfajokból származó ARV-k egyes szegmenseinek filogenetikai vizsgálatakor gazdaspecifikus evolúciót figyelhetünk meg, a tyúkfélékből, valamint a víziszárnyasokból izolált reovírus törzsek egymástól elkülönülten csoportosulnak a törzsfákon (**10. ábra**,  $\sigma C$  fehérje génjére vonatkozó törzsfá). Ez alól kivételt jelent a  $\mu B$  fehérjét kódoló gén, ebben az esetben ugyanis az új típusú WRV-k a házityúk eredetű törzsekkel állnak közelebbi rokonságban, ami egy, a múltban lejátszódott reasszortációs eseményt jelezhet (**10. ábra**,  $\mu B$  fehérje génjére vonatkozó törzsfá). Szintén ilyen múltbeli reasszortációra utal az új típusú WRV-k S1 szegmensének felépítése, mely a tyúkfélék reovirusaihoz hasonlóan,

trisztronos, azaz 3 fehérjét kódol. Mindezek mellett számos egyedi reasszortációs esemény valószínűsíthető a klasszikus és az új típusú víziszárnyas reovírusok között (**10. ábra**,  $\mu A$  fehérje génjére vonatkozó törzsfák), valamint a WRV-k és más gazdafajból izolált ARV-k között is (Dandár és mtsai, 2014a; Farkas és mtsai, 2014; Yang és mtsai, 2018).



**10. ábra** Különböző madár eredetű reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciái alapján készített nukleinsav alapú filogenetikai fák. A pulyka eredetű ARV törzsek narancssárga, a házi tyúk eredetűek citromsárga, a fogoly eredetű rózsaszín, a klasszikus WRV kék, az új típusú WRV zöld, valamint a vadmadár reovírus törzsek szürke színnel jelölve. Különböző evolúciós folyamatokra láthatunk bizonyítékokat: gazdaspecifikus evolúció ( $\sigma C$ ), klasszikus és új típusú WRV-k közti reasszortáció ( $\mu A$ ), illetve más gazdafajból származó törzsek közti reasszortáció ( $\mu B$ ).

Ezen jelenségek a tyúkfélék reovírusaira szintén igazak: számos reasszortációs, illetve rekombinációs eseményt figyelhetünk meg a különböző leszármazási vonalakhoz tartozó

reovírusok között, házityúk és pulykák reovírusai esetében is (Dandár és mtsai, 2013; Farkas és mtsai, 2016; Noh és mtsai, 2018; Tang és mtsai, 2015; Tang and Lu, 2015). Fácánból izolált reovírus törzs teljes genom szekvenciája mindössze egy esetben volt elérhető a génbankban, ez alapvetően házityúk eredetű törzsekkel mutatott rokonságot (Tang and Lu, 2016). Az S szegmenseken kódolt gének filogenetikai vizsgálata alapján korábban felmerült, hogy a házityúk és a pulyka eredetű törzsek külön reovírus fajokat alkothatnak (Kapczynski és mtsai, 2002; Sellers és mtsai, 2004). Nemrég azonban egy fogolyból származó törzs teljes genom vizsgálata során feltárult annak mozaikos szerkezete, melyben a házityúk és pulyka reovírus eredetű szegmensek vegyesen fordultak elő. Bizonyítva ezzel, hogy a két gazdafajból származó reovírusok, valamint a fogoly reovírus is egyazon fajhoz, a madár orthoreovírusokhoz sorolható (Kugler és mtsai, 2016).

#### 4.5. Hüllők orthoreovírusai

A különböző hüllőkből a munkánk kezdetéig kimutatott és jellemzett reovírusok mindegyikét az *Orthoreovirus* nemzetségbe, azon belül pedig a hüllő orthoreovírus (*Reptilian orthoreovirus*) fajba sorolhattuk.

Teknősfélékből ezidáig mindössze két esetben sikerült reovírus jelenlétét kimutatni, elektronmikroszkópos vizsgálattal leopárdteknős (*Geochelone pardalis*) bélszövetéből (Drury és mtsai, 2002), illetve vírusizolálással mór teknős (*Testudo graeca*) különböző szerveinek (tüdő, máj, vese, nyelőcső, nyelv) homogenizátumából (Marschang, 2011).

Gyíkfélék közül számos fajban leírtak reovírus fertőzést. Elsőként zöld gyíkok (*Lacerta viridis*) papillomáiból mutattak ki elektronmikroszkópos vizsgálattal reovírus-szerű részecskéket, herpesz- és papovavírusokkal együtt (Raynaud and Adrian, 1976). Sikeresen izoláltak reovírusokat étvágytalanságot és aspecifikus klinikai tüneteket mutató zöld leguánokból (*Iguana iguana*) (Blahak és mtsai, 1995), és fiatal tuskésfarkú gyíkok (*Uromastix hardwickii*) lép-, máj- és bélhomogenizátumából *Salmonella* baktériumokkal együtt (Drury és mtsai, 2002). Szintén izoláltak reovírusokat zöld leguánból, és két, ismeretlen fajú kaméleonból. A leguán boncolásakor a tüdőn, vesén és lépen apró, fehér léziókat figyeltek meg, míg a kaméleonokban belső szervi elváltozást nem tapasztaltak, az egyik állatnak azonban metabolikus csontbetegsége volt. Ezeket az elváltozásokat és az állatok elhullását nem hozták egyértelműen összefüggésbe a reovírus fertőzöttséggel, azonban feltételezhető, hogy immunrendszerük gyengesége szerepet játszhatott a reovírusok elszaporodásában (Marschang and Papp, 2009). Szerológiai vizsgálattal többféle, vadon élő gyíkfajból mutatták ki reovírus specifikus antitestek jelenlétét, köztük Honduras szigetein befogott zöld leguánokból (*Iguana iguana rhinolopha*), tuskésfarkú leguánokból (*Ctenosaura bakeri* és *Ctenosaura similis*) (Gravendyck és mtsai, 1998), és Mexikóban gyűjtött bütykösgyíkokból

(*Xenosaurus grandis*) (Marschang és mtsai, 2002), ugyanakkor az állatokból vett kloáka- és légcsőtamponokból nem sikerült reovírust izolálni.

Kígyókból elsőként 1987-ben, egy elhullott királypítóból (*Python regius*) sikerült reovírust izolálni. Az állat veséjén vérvéseket figyeltek meg, a vírust végül elektronmikroszkópos képe, sejtenyészetben kifejtett sejtfúziós hatása, szerológiai tulajdonságai, valamint a dsRNS genom szerveződése alapján azonosították reovírusként (Ahne és mtsai, 1987). Kimutatták reovírusok jelenlétét központi idegrendszeri tüneteket mutató zöld csörgőkígyó (*Crotalus viridis*) agyszövetéből (Vieler és mtsai, 1994), valamint kutyafejű boából (*Corallus caninus*) és erdei siklóból (*Elaphe longissima*), utóbbi elhullása paramyxovírus okozta járvánnyal hozható összefüggésbe (Blahak és mtsai, 1995). Szintén paramyxovírus-, illetve adenovírussal társfertőzésben izoláltak reovírusokat vörös gabonasiklókból (*Pantherophis guttatus*) (Abbas és mtsai, 2011). Zöld fűsiklóban (*Opheodrys aestivus*) cryptosporidiumokkal együtt mutattak ki reovírusokat polimeráz láncreakció (PCR) segítségével, utóbbi esetben az állatok boncolásakor a máj elhalásos gyulladását lehetett megfigyelni (Landolfi és mtsai, 2010). Különböző siklófélekből (*Elaphe moellendorffi*, *Orthriophis taeniurus*) álló gyűjteményből, légzőszervi megbetegedésben elpusztult állatokból izoláltak reovírust, majd az izolátummal fertőztek fekete patkánysiklót (*Pantheropsis obsoletus*). A mesterségesen fertőzött állat klinikai tüneteket elpusztulásakor nem mutatott, azonban a boncolás tüdőgyulladást tárt fel (Lamirande és mtsai, 1999). Szintén végeztek fertőzéses kísérleteket óriáskígyókból (*Boa constrictor*) izolált reovírusokkal, ugyanazon faj fiatal egyedeit fertőzve. A fiatal állatok nem mutattak semmilyen specifikus klinikai tünetet és szövettani elváltozás sem volt megfigyelhető, azonban a vírus izolálható volt belőlük (Darke és mtsai, 2014).

Ahogy a fenti példákból is látszik, számos esetben mutattak ki, illetve izoláltak reovírusokat különböző hüllőfajokból, többnyire központi idegrendszeri és légzőszervi megbetegedésekkel kapcsolatban. Ugyanakkor sok esetben az állatok nem mutattak semmilyen klinikai tünetet sem elpusztulásukat megelőzően, sem fertőzéses kísérletben, így a reovírusoknak a különböző kórképekben betöltött szerepe kérdéses. Hüllő reovírusok diagnosztikai célú kimutatására Wellehan és mtsai (2009) fejlesztettek ki kétkörös PCR-t, mely a hüllő orthoreovírusok RdRp génjének egy nagyjából 200 bázispár (bp) hosszú, konzervatív szakaszát sokszorozza fel.

Annak ellenére, hogy számos különböző hüllőfajból izoláltak reovírusokat, szekvenciaadatok csak korlátozott számban álltak rendelkezésre a génbankban. Munkánk kezdetekor mindössze egyetlen, laborunkban jellemzett, bozótvipérából (*Atheris squamigera*) izolált RRV törzs teljes genomszekvenciája (Bányai és mtsai, 2014), illetve számos, az RdRp génből származó rövid szakasz szekvenciái voltak elérhetőek, így a hüllő reovírusok genetika változatosságáról és evolúciós kapcsolatairól kevés információval rendelkezünk.

#### 4.6. Célkitűzések

Munkánk célja a különböző hullókból, fácánokból, illetve vízibarmfi-félékből izolált reovírusok genetikai változatosságának megismerése:

1. újgenerációs szekvenálás segítségével genomszekvencia adatok gyűjtése, lehetőség szerint a teljes genomok nukleotidsorrendjének meghatározásával.
2. a kapott szekvenciaadatok elemzése, az egyes vírustörzsek genomszerveződésének, genetikai diverzitásának és filogenetikai kapcsolatainak feltérképezése és modellezése különböző programok segítségével. Ilyen módon információt gyűjthetünk az orthoreovírusok evolúciós mechanizmusairól, amit „*in vitro*” sejtenyészeteken végzett kísérletek során vizsgálhatunk.
3. a vizsgált reovírus csoportok leszármazási kapcsolatainak alaposabb megismerése. A víziszárnyas eredetű törzsek esetében a különböző európai és ázsiai eredetű, klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírus törzsekkel, fácánok reovírusai esetében a baromfifélékből izolált reovírusokkal történő összehasonlításban.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Felhasznált vírustörzsek

A felhasznált vírustörzseket kutatócsoportunk izolálta, illetve hazai vagy nemzetközi együttműködő partnereinktől kaptuk.

Vizsgálatainkhoz használt három víziszárnyas reovírus izolátumot hazai együttműködő partnereink bocsátották rendelkezésünkre szövetfelülűszó formájában. Ezek közül kettőt, a D2533/4/1-10 és D2533/6/1-10 jelű vírustörzseket házikacsák (*Anas platyrhynchos domestica*) bursájából izolálták, németországi állományokból. Az állatok mozgási nehézségeket mutattak, boncolásukkor enyhe ín- és ízületi gyulladás, lábdeformitás, légzsákgyulladás, illetve a bursa Fabricii-ben a limfociták számának csökkenése volt megfigyelhető. A Reo/HUN/DuckDV/2019 jelzésű törzset magyarországi házikacsa állományból izolálták, 2019-ben.

Szintén hazai együttműködő partnerünktől származik a D1996/2/1 azonosítójú törzs, melyet egy magyar fácánállományból mutattak ki. Az állományban megnövekedett elhullás, az állatok boncolásakor a zúzógyomor elváltozásai és belső vérzések voltak megfigyelhetőek. A zúzógyomorból és a bursa Fabricii-ből készült homogenizátum felülűszójából sikerült izolálni a D1996/2/1 reovírus törzset (dr. Palya Vilmos személyes közlése alapján).

Egy korábbi vizsgálat során kutatócsoportunk 7 hetes korban elhullott fácánok bélsármintáiból metagenomikai vizsgálatok során rotavírust mutatott ki (Gál és mtsai, 2016). A fácán állományban a megbetegedés során borzolt tollazatot, étvágytalanságot, megnövekedett folyadékfelvételt és hasmenést lehetett megfigyelni, valamint az állományban megnövekedett a mortalitás. Az érintett állományból származó kevert bélsármintákból vírusizolálás során reovírust sikerült kimutatni (Reo/HUN/Pheasant/216/2015), melyet szintén bevontunk vizsgálatainkba.

A vizsgált madár reovírus törzsek adatait a **2. táblázat** tartalmazza.

**2. táblázat.** A vizsgált madár reovírus törzsek jellemzői

Minta	Faj		Szövet	Izolálás	
	magyar	latin		helye	ideje
<b>D2533/4/1-10</b>	házikacsa	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>	bursa Fabricii	Németország	2014
<b>D2533/6/1-10</b>	házikacsa	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>	bursa Fabricii	Németország	2014
<b>DuckDV/2019</b>	házikacsa	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>	na	Magyarország	2019
<b>D1996/2/1</b>	fácán	<i>Phasianus colchicus</i>	bursa Fabricii, zúzógyomor	Magyarország	2012
<b>216/2015</b>	fácán	<i>Phasianus colchicus</i>	bélsár	Magyarország	2015

A hulló reovírusokkal végzett vizsgálatainkhoz németországi együttműködő partnerünk három törzset bocsátott rendelkezésünkre szövetfelülúszó formájában: az IBD26/00 jelű törzs óriáskígyóból (*Boa constrictor*), az 55/02 szőnyegmintás pítontól (*Morelia spilota*), a CH1197/96 mór teknősből (*Testudo graeca*) származott (Wellehan és mtsai, 2009).

Ezeket felül vizsgálatainkba bevontunk kutatócsoportunk által korábban izolált hulló reovírus törzseket is: a KP3 királpítontól (*Python regius*), a 2013/12 Schneider szkinkből (*Eumeces schneideri*), a 2013/54 zöld leguánból (*Iguana iguana*) és a 2013/47 egy ismeretlen fajú kígyóból származott (Ihász és mtsai, 2014).

A vizsgálatokba bevont hulló reovírus törzsek adatait a **3. táblázat** tartalmazza.

**3. táblázat.** A vizsgált hulló reovírus törzsek jellemzői

Minta	Faj		Szövet	Izolálás	
	magyar	latin		Helye	Ideje
<b>CH1197/96</b>	mór teknős	<i>Testudo graeca</i>	tüdő, máj, vese, nyelőcső, nyelv	Svájc	1996
<b>IBD26/00</b>	óriáskígyó	<i>Boa constrictor</i>	máj	Németország	2000
<b>55/02</b>	szőnyegpítont	<i>Morelia spilota</i>	nyelőcső	Németország	2002
<b>KP3</b>	királpítont	<i>Python regius</i>	szerv mix*	Magyarország	2013
<b>2013/12</b>	Schneider szkink	<i>Eumeces schneideri</i>	szerv mix	Magyarország	2013
<b>2013/54</b>	zöld leguán	<i>Iguana iguana</i>	szerv mix	Magyarország	2013
<b>2013/47</b>	ismeretlen kígyófaj		szerv mix	Magyarország	2013

\*szerv mix – tüdő, máj, vese, gyomor, bél, szív, légcső, nyelőcső, nyelv



A CH1197/96-os törzssel végzett reasszortációs kísérletekben a kutatócsoportunk által korábban jellemzett 47/02 jelű, bozótvipérából (*Atheris squamigera*) származó törzs volt a koinfekciós partner (Bányai és mtsai, 2014; Wellehan és mtsai, 2009).

A hasonlósági és leszármazási vizsgálatokba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítószámait az **1. melléklet** tartalmazza.

## **5.2. Felhasznált sejtvonalak**

A madár eredetű vírustörzsek fenntartását és szaporítását házityúk eredetű hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon (LMH, Leghorn male hepatoma ATCC CRL-2117) végeztük. A sejteket 7 V/V% magzati szarvasmarha szérum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific), illetve 100 U/ml/100 µg/ml penicillin/sztreptomycin (Lonza) tartalmú Dulbecco-féle módosított sejtenyésző tápfolyadékban (DMEM, Lonza) tenyésztettük, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú környezeti levegőt biztosító termosztátban.

A hulló eredetű vírusizolátumokat vipera szív (VH-2, Russel's viper heart, ATCC CCL-140), leguán szív (IgH-2, iguana heart, ATCC CCL-108) és teknős szív (TH-1, terrapin heart, ATCC CCL-50) sejtvonalakon tartottuk fent és szaporítottuk, a hulló vírusokkal végzett koinfekciós kísérlethez a VH-2 sejtvonalat használtuk. A sejteket 10 V/V% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml/100 µg/ml penicillin/sztreptomycin (Lonza) és 1 V/V% nem-esszenciális aminosav (NEAA, non-essential amino acid, Lonza) tartalmú DMEM tápfolyadékban (Lonza) tenyésztettük, 28 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú környezeti levegőt biztosító termosztátban.

## **5.3. Minták előkészítése teljes genom szekvenálásra**

### **5.3.1. Virális nukleinsav kivonása**

A vírust tartalmazó sejtenyészetet három fagyasztás-olvasztási ciklusnak vetettük alá, hogy a letapadó sejteket elválasszuk a szövetenyésző edény felszínétől és a sejtek széteessenek. Az így nyert sejtszuspenzió 1 ml-ét 0,5 ml 20 m/V%-os NaCl és 0,5 ml 29 m/V%-os PEG6000 oldattal kiegészítve egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő lejárta után 3000 g fordulatszámmal, 4 °C-on, 30 percig centrifugáltuk a mintákat, a felülúszót eltávolítottuk, és a nyert pelletet 250 µl foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS, Thermo Fisher Scientific) vettük fel. Az így nyert szuszpenzióból a virális RNS kivonását TRI Reagent (Molecular Research Center) használatával végeztük a gyártói előírásoknak megfelelően. A kivont RNS-t -65 °C-os fagyasztóban tároltuk további felhasználásig.

### **5.3.2. Kétlépéses reverz transzkripció polimeráz lánreakció**

Az RNS átírását reverz transzkripció (RT) reakcióban az FR26RV-N random primerrel végeztük, melynek 3' végéhez általános oligonukleotid illeszkedik (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN-3') (Djikeng és mtsai, 2008). A reakció végtérfogata 25 µl volt, és a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl kivont RNS, 1 µM FR26RV-N primer, 400 µM dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) keverék (Thermo Fisher Scientific), 1x AMV puffer és 10 egység (unit, U) AMV reverz transzkriptáz (Promega). Első lépésben az RNS és a random oligonukleotid keverékét 95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd lehűtöttük jégen. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét a keverékhez, és a reakcióelegyet először 25 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 60 percig, végül 70 °C-on 15 percig inkubáltuk. Az így keletkezett komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) felsokszorozása PCR-rel történt. A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3 µl-t az RT során keletkezett cDNS-ből, 1 µM FR20RV primert (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC-3') (Djikeng és mtsai, 2008), 400 µM dNTP keveréket (Thermo Fisher Scientific), 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific). A kezdeti 3 perc hosszú, 95 °C-on történő denaturációt egy 40 ismétlődő ciklusból (95 °C 30 mp, 48 °C 30 mp, 72 °C 2 perc) álló amplifikáció követte, majd a folyamatot egy 8 perces, 72 °C-on történő elongációs lépés zárta.

### **5.3.3. PCR termékek ellenőrzése és tisztítása**

A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük. Az elektroforézist 1 m/V%-os agaróz (Lonza) gélen végeztük, 0,5 m/V% trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav (TBE, Lonza) pufferben, 90 V-on, 25 percig. A DNS láthatóvá tételéhez GelRed (Biotium) festéket alkalmaztunk 0,5 V/V%-os koncentrációban, molekulatömeg markerként pedig O'Gene Ruler DNS létrát (Thermo Fisher Scientific). Az elektroforézis után a gél átéső UV fényben vizsgáltuk, az eredményeket CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Clever Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) rögzítettük.

A gélből a 200 és 2000 bp közötti sávban lévő termékeket kimetszettük, majd a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) gélikivonásos módszerével tisztítottuk ki, a gyártói utasítások alapján. A tisztított DNS-fragmenseket további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

## **5.4. Újgenerációs szekvenálás**

### **5.4.1. IonTorrent szekvenálás**

100 ng amplifikált cDNS-ből enzimes fragmentációt végeztünk a NEB-Next® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs) segítségével a gyártó utasításai alapján. Ugyanezen kit használatával a fragmensekhez adaptereket

kötöttünk, a könyvtárakhoz a kódokat az IonXpress™ Barcode adapterek (Thermo Fisher Scientific) közül választottuk. Az egyedi kódot tartalmazó könyvtár DNS tisztítása a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) oszlopos módszerével történt, a tisztított mintákat 2 m/V%-os, előre gyártott géleken (Thermo Fisher Scientific) elektroforetizáltuk. A 300 és 350 bp közötti termékeket PCR módszerrel amplifikáltuk a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs) használatával. Az amplifikáció a következő hőprofilal zajlott: i) kezdeti, 98 °C-on történő 30 mp-es denaturáció; ii) 12 amplifikációs ciklus (98 °C 10 mp, 58 °C 30 mp, 72 °C 30 mp); iii) végső elongációs lépés, 72 °C-on 5 percig. Az így keletkezett könyvtárat ismét tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid), majd Qubit® dsDNA BR Assay kittel (Thermo Fisher Scientific) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. Az egyedi kóddal ellátott DNS termékeket összekevertük, majd klonális amplifikációjuk egymást követő emulziós PCR-ekkel történt, IonSphere™ paramágneses gyöngyök felszínén. Az emulziós PCR-t Ion OneTouch™ Template Kit használatával, OneTouch v2 készüléken végeztük, gyártói utasítások alapján. Ezt követően az amplifikált könyvtár DNS-t tartalmazó részecskék dúsítását az Ion OneTouch™ ES robottal hajtottuk végre. A szekvenálást Ion Torrent Personal Genome Machine® készüléken végeztük, 316 ill. 318 típusú chipeken, az Ion PGM™ Sequencing kithoz ajánlott szekvenálási protokollt követve. A külön meg nem nevezett műszerek és kitek a Thermo Fisher Scientific cég gyártmányai.

#### **5.4.2. Illumina szekvenálás**

A DNS könyvtárak készítése az Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) használatával történt, a DNS fragmensek jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina) indexeket használtuk. Első lépésben az amplifikált cDNS mintákat kihígítottuk 2,5 µl végtérfogatban 0,2 ng/µl koncentrációra, majd a tagmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl Tagment DNA pufferrel, valamint 2,5 µl AmpliconTagment Mix reagenssel. A reakcióelegyet 55 °C-on 6 percig inkubáltuk GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) készülékben, majd lehűtöttük 10 °C-ra. Lehűtés után azonnal hozzáadtunk 2,5 µl Neutralize Tagment puffert és 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A DNS könyvtár készítéséhez 7,5 µl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. A PCR 95 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 12 cikusból állt (95 °C 10 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 30 mp), amit egy 72 °C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10 °C-ra. Az így keletkezett indexált DNS könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid) tisztítottuk, az oszlopos tisztítási protokollt követve, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. A könyvtár DNS-eket poolozás után denaturáltuk, majd ezt a denaturált könyvtárat töltöttük

NextSeq 500/550 Mid Output flowcell-re (Illumina) 1,5 pM végső koncentrációban. A szekvenálást Illumina® NextSeq 500 (Illumina) készüléken végeztük.

## **5.5. RNS genom szegmensvégeinek meghatározása**

### **5.5.1. Virális RNS ligálása**

A genomszegmensek nemkódoló végszekvenciáinak meghatározásához első lépésben az 5' végén foszforilált, 3' végén pedig didezoxi-citozinnal lezárt PC3 primert (5'-GGATCCCGGGAATTCGG-(ddC)-3') ligáltunk a virális dsRNS 3' végeihez (Vreede és mtsai, 1998). A ligálási reakció 30 µl végtérfogatban zajlott, és a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl kitisztított virális RNS, 1,3 µM PC3 primer, 15 m/V% PEG8000 (Merck), 1x T4 RNA Ligase puffer, 1 mM ATP és 10 U T4 RNS ligáz (New England Biolabs). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül (16-18 óra) inkubáltuk 17 °C-on, majd a QIAQuick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével vontuk ki a ligált kettősszálú RNS-t. A mintához első lépésben 150 µl QG puffert és 150 µl izopropanolt adtunk, majd a kitben található szilika membrán oszlopon tisztítottuk a gyártói utasításokat követve. A ligált RNS-t további felhasználásig -65 °C-os fagyasztóban tároltuk.

### **5.5.2. Kétlépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció**

A ligált RNS átírását RT reakcióban a PC3 primerrel komplementer PC2 primerrel végeztük (5'- CCG AAT TCC CGG GAT CC-3') (Vreede és mtsai, 1998). A reakció 25 µl végtérfogatban zajlott, és a következő reagenseket adtuk hozzá: 5 µl ligált RNS, 400 nM PC2 primer, 400 µM dNTP (Thermo Fisher Scientific), 4 µM DTT, 1x First-Strand puffer, 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) és 200 U SuperScriptIII reverz transzkriptáz (Thermo Fisher Scientific). Első lépésben az RNS és a PC2 oligonukleotid keverékét 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen lehűtöttük. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét, és a reakcióelegyet először 25 °C-on 5 percig, majd 50 °C-on 60 percig, végül 70 °C-on 15 percig inkubáltuk.

Az így keletkezett cDNS-ről a szegmensvégi szekvenciák felsokszorozása PCR-rel történt, 25 µl végtérfogatban. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 2 µl cDNS, 400-400 nM mindkét primerből, 400 µM dNTP keverék (Thermo Fisher Scientific), 1x DreamTaq Green puffer és 1 U DreamTaq DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific). A PCR során alkalmazott oligonukleotidok egyike a PC2, míg a másik egy génspecifikus primer volt, melyeket az előzőleg nyert szekvenciaadatok alapján magunk terveztünk az AliView program használatával (Larsson, 2014). A reakcióelegyet először 95 °C-on 3 percig denaturáltuk, majd ezt egy 40 ciklusból álló felsokszorozás követte (95 °C 30 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), végül a reakciót egy 72 °C-on történő 8 perc hosszú végső elongációs lépés zárta.

A nyert PCR termékek méret szerinti elválasztását agaróz gélelektroforézissel végeztük, az 5.3.3. pontban leírtak szerint. A megfelelő méretű termékeket kimetszettük a gélből, és Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) gélkivonásos módszerével tisztítottuk ki, a gyártói utasítások alapján. A tisztított DNS-fragmenseket további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

### **5.5.3. Sanger szekvenálás**

A szegmensvégekről amplifikált PCR termékeken mindkét irányból közvetlen szekvencia meghatározást végeztünk, ezt a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) alkalmazásával, a PCR során is használt oligonukleotidokkal hajtottuk végre. A reakcióelegy 10 µl végtérfogatban tartalmazott 2 µl BigDye reakció mixet, 500nM primert és 1-2 µl tisztított PCR terméket. A szekvenálási reakcióban a 96 °C-on végzett, 1 perc hosszú kezdeti denaturációt 30 ciklus (95 °C 20 mp, 50 °C 5 mp, 60 °C 4perc) követte.

A szekvenálási terméket etanol és nátrium-acetát elegyével tisztítottuk ki. Az ehhez szükséges elegy 50 µl végtérfogatban tartalmazta a 10 µl szekvenálási reakcióelegyet, 60 V/V% etanolt (VWR), illetve 90 µM pH 4,6 nátrium-acetátot (Merck). Ezt az elegyet centrifugáltuk 4400 g fordulatszámon, 4 °C-on 45 percig, majd az üledéket 70 V/V% etanollal mostuk. Újabb centrifugálást követően (4400 g, 4 °C, 15 perc) az üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk. A szekvenálási termékek kapilláris gélelektroforézise ABI PRISM 310, illetve ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) készülékek használatával történt együttműködő partnereinknél (dr. Jakab Ferenc, Pécsi Tudományegyetem; dr. Lengyel György, Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Honvédkórház).

## **5.6. Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek**

Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatokat a CLC Genomics Workbench v7 szoftver segítségével (<https://digitalinsights.qiagen.com/>) dolgoztuk fel. A kapott szekvencia adatokat ellenőriztük, a rossz minőségű vagy túl rövid nukleotid szakaszokat (read) kiszűrtük, valamint levágtuk az adapter régiókat. A vágás után a readeket egy, a génbankból származó referencia törzs szekvenciájához illesztettük; ezzel a módszerrel a vírustörzsek teljes, vagy közel teljes genomját sikerült meghatározni.

A Sanger szekvenálásból származó elektroferogramok beolvasására és szerkesztésére a BioEdit, illetve a Geneious Prime szoftvereket használtuk (Hall és mtsai, 1999; Kearse és mtsai, 2012). A kapott szekvenciák összeillesztése az újgenerációs szekvenálás eredményével a Geneious Prime mellett az AliView szoftver segítségével történt (Larsson, 2014), így sikerült a vírustörzsek teljes, illetve majdnem teljes genomszekvenciáit

meghatározni. A homológ gének keresése a génbank adatbázisában BLASTN vagy BLASTX algoritmussal történt (Altschul és mtsai, 1990).

A kodon alapú többszörös szekvencia illesztéseket Geneious Prime szoftverrel és a TranslatorX (<http://translatorx.co.uk/>) online illesztőprogrammal végeztük el, a Muscle algoritmust használva (Abascal és mtsai, 2010). A filogenetikai elemzéseket, illetve a szekvencia azonossági számításokat a MEGA6 szoftvercsomag segítségével készítettük el (Tamura és mtsai, 2013). A filogenetikai fák rekonstrukciójához alkalmazott, legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztása a Bayesi kritériumrendszer alapján történt. A törzsfák készítése maximum-likelihood módszerrel történt, az elkészült fák megbízhatóságát bootstrap elemzéssel (100) ellenőriztük. A szekvenciák közti átlagos nukleinsav és aminosav távolságokat a *p*-distance módszerrel számoltuk ki.

## **5.7. Reasszortációs kísérlet**

### **5.7.1. Koinfekció**

Reasszortációs vizsgálatainkhoz koinfekciós kísérleti rendszert állítottunk össze. VH-2 sejteket növesztettünk hatlyukú szövettenyésztő lemezen, majd a 47/02 és CH1197/96 jelű törzsekkel egyidejűleg fertőztük őket különböző fertőzési multiplicitással (multiplicity of infection, MOI). Elsőként MOI 1 értékű vírusrátaival koinfektáltunk, ebben a vizsgálatban a két vírus aránya a sejtszámhoz viszonyítva azonos volt. Előzetes megfigyeléseinkre alapozva, miszerint a CH1197/96 jelű törzs gyorsabb szaporodási képességet mutatott VH-2 sejteken, mint a 47/02, végeztünk olyan kísérletet is, amelynél az előbbi törzs mennyisége a fertőzésben alacsonyabb volt: MOI 1 a 47/02, és MOI 0,5 valamint MOI 0,2 a CH1197/96 vírustörzs esetében.

A vírusszuspenziókat 2 órán keresztül hagytuk adszorbálódni, majd PBS-sel történő mosás után 2 ml friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez, és 28 °C hőmérsékleten, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú környezeti levegőt biztosító termosztátban inkubáltuk. Miután megjelentek a hüllő reovírus fertőzésre jellemző óriássejtek (4-5 nappal a fertőzés után), a sejtenyészet 12,5 µl-ével fertőztünk friss, 6-lyukú szövettenyésztő lemezen növesztett VH-2 sejteket, összesen 4 passzási lépést végezve. A negyedik passzálást követően a sejtszuspenziók 1-1 ml-ét lefagyasztottuk és -65 °C-on tároltuk későbbi vizsgálatainkhoz.

### **5.7.2. Plakktisztítás, nukleinsav kivonás**

A koinfekciós fertőzés során nyert szuszpenziókból plakktisztítós módszerrel nyertünk egyedi vírusokat. Először a sejtszuspenziókból ötlépeses, tízes alapú hígítási sor készítettünk, 5 V/V% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban. A hígítási sor egyes tagjainak 100-100 µl-ével fertőztünk friss, 12-lyukú szövettenyésztő lemezen növesztett VH-2 sejteket, majd

28 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett 24 órán keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a sejtenyészeteket 2 ml térfogatú, 5 V/V% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban feloldott, 1 m/V%-os SeaPlaque (Lonza) alacsony olvadási hőmérsékletű (low melting) agaróz géllal fedtük, és 28 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett inkubáltuk, naponta ellenőrizve a citopatogén hatás megjelenését. A fertőzés utáni 4.-5. napon, amikor az óriássejtek jelenléte kifejezetté vált, megfestettük a sejteket 1 ml 0,01 m/V% semleges vörös festékkel. A festéket az agar bevonat tetejére mértük és egy órán keresztül, szobahőmérsékleten hagytuk adszorbálódni, majd a fölösleget eltávolítottuk, és az ilyen módon szabad szemmel is láthatóvá tett plakkokat pipettával leszívtuk. A leszívott plakkokat 50 µl PBS oldatban vettük fel, és ezzel fertőztünk friss, 24-lyukú lemezen növesztett VH-2 sejteket, majd 28 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett inkubáltuk.

Azokból a sejtenyészetekből, amelyeken megjelent a citopatogén hatás, RNS kivonást végeztünk. Első lépésben a lemezek felszínéről a letapadt sejteket három fagyasztás-olvasztási ciklussal elválasztottuk, majd az így nyert sejtuszuspenzió 100 µl-éből RNS kivonást végeztünk, Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo Research) segítségével, a gyártói utasításoknak megfelelően, DNáz kezeléssel kiegészítve. Az izolált RNS-t további felhasználásig -65 °C-os fagyasztóban tároltuk.

### **5.7.3. Nagy felbontású olvadáspont analízis**

A lehetséges reasszortációs események feltérképezéséhez egylépéses RT-PCR rendszert állítottunk össze, melyben az egyes szegmensek eredetét az adott szegmensről felsokszorozott PCR termék olvadási hőmérséklete alapján határoztuk meg. A primertervezéshez az AliView programot használtuk (Larsson, 2014). A két szülő törzs, a CH1197/96 és a 47/02 genomszekvenciáit egymáshoz illesztettük, majd ezekben az alignmentekben kerestünk szegmensenként olyan változékony nukleotidszakaszokat, melyeket konzervált szakaszok vesznek körül. Az oligonukleotidokat ezekre a konzervált szegmensrészekre terveztük, úgy, hogy az általuk felsokszorozott, különböző szülő törzsekből származó termékek olvadási hőmérséklete közt legalább 2 °C különbség legyen. A felhasznált primerek listáját a **4. táblázat** tartalmazza.

Az RT-PCR-t, és a hozzá kapcsolódó nagy felbontású olvadáspont analízist (high resolution melt, HRM analysis) StepOne Plus Real-Time PCR készüléken (Applied Biosystems) végeztük, SensiFAST SYBR Hi-ROX One-Step Kit (Bioline) használatával. A reakcióelegy összemérése a gyártói utasításoknak megfelelően történt, a reakció hőprofilját szintén a gyártói leírás háromlépéses protokollja alapján állítottuk be, annyi változtatással, hogy a primertapadási hőmérsékletet 55 °C-ra módosítottuk. A PCR ciklusok végén beiktattunk egy olvadási görbe analízist, a StepOne Plus készüléken elérhető folyamatos fluoreszcencia monitorozással: ebben az üzemmódban a készülék a hőmérsékletet

fokozatmentesen emeli, és a fluoreszcens jel intenzitásának változásait folyamatosan méri. Az eredmények kiértékelése a StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems), illetve a High Resolution Melt (HRM) Software v2.0 (Applied Biosystems) segítségével történt.

**4. táblázat.** A nagy felbontású olvadáspont analízis során felhasznált oligonukleotidok

Szegmens (kódolt fehérje)	Primer	
	azonosító	szekvencia (5' - 3')
<b>L1 (IambdaA)</b>	Rep_L1_2131F	TGG GCG GMW ACT ATT CAT CG
	Rep_L1_2299R	GCA TTR CGC CAR TTA CAC AT
<b>L2 (IambdaC)</b>	Rep_L2_569F	GAY CCS TGT CTS TTT GGS AA
	Rep_L2_721R	CMA YAC CAG CGC TAG GWA TC
<b>L3 (IambdaB)</b>	Rep_L3_2684F	GGT GAT ATG GGA ATG TAC GC
	Rep_L3_2780R	ACR TGR TCC ACS WTA CCR AA
<b>M1 (muNS)</b>	Rep_M1_246F	GCG GCY RSY TTY YTK AAA TAT CA
	Rep_M1_483R	ATC TCS TCC ART KGC ATG TY
<b>M2 (muA)</b>	Rep_M2_216F	AYT RTG GCA ACA TCA RWG CG
	Rep_M2_328R	CGS TCA CTC TTC ARW GGW SC
<b>M3 (muB)</b>	Rep_M3_939F	GAT CGA CCA ATM TCM AGT ACR GT
	Rep_M3_1128R	CCM GTY TGC TCC AAG TTW AT
<b>S1 (sigmaC)</b>	Rep_S1_824F	ACR CTR GTG GTR WCW GAG AAG
	Rep_S1_1006R	TCG TYT CYA GRA ACC AYG GA
<b>S2 (sigmaA)</b>	Rep_S2_592F	AAT CMA CWG TRA AYA TGC CYT TYG
	Rep_S2_723R	GTY CCT CTC TCY TTG GTG GC
<b>S3 (sigmaB)</b>	Rep_S3_770F	GGC GWG GWG GMT TCR TWT TC
	Rep_S3_883R	ATS ACT CCW SCK GGC ATT GG
<b>S4 (sigmaNS)</b>	Rep_S4_898F	CAR YTA YTA AAG CAA GCG GG
	Rep_S4_1091R	GCC ASG CMC CAT TAS WMA



## 6. Eredmények

### 6.1. Víziszárnyas reovírus törzsek

Vizsgálataink során három vízibaromfi eredetű reovírus törzs teljes genomszekvenciáját határoztuk meg IonTorrent és Illumina újgenerációs, valamint Sanger szekvenálás segítségével. A törzseket házikacsából (D2533/4/1-10, D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019) izolálták 2014-2019 között német-, illetve magyarországi víziszárnyas telepeken elhullott állatokból.

#### 6.1.1. A D2533/4/1-10 törzs genomszerveződése

A D2533/4/1-10 törzs teljes genomja 23418 bp-ból áll, az egyes genomsegmentek hossza pedig 1191 bp-tól (S4) 3958 bp-ig (L1) terjed (**5. táblázat**). A vírustörzs genomjának G+C aránya 50,78%. A genom felépítése más, madár eredetű reovírus törzsekéhez hasonló. Az S1 szegmens kivételével, amely három fehérjét kódol, a többi genomsegmenten egyetlen ORF található. ORF predikció és a BLASTX algoritmussal végzett hasonlósági vizsgálatok segítségével a következő orthoreovírus fehérjéket kódoló géneket sikerült azonosítanunk:  $\lambda$ A (belső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\lambda$ B (core RdRp),  $\lambda$ C (core nyúlvány),  $\mu$ A (core NTPáz),  $\mu$ B (külső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\mu$ NS (nem-strukturális fehérje),  $\sigma$ A (belső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ B (külső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ NS (nem-strukturális fehérje, RNS-kötő funkcióval),  $\sigma$ C (külső fiber), p10 (FAST fehérje) és p17 (nem-strukturális fehérje).

5. táblázat. A D2533/4/1-10 törzs genomjának általános jellemzői

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)*	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)*
		5' UTR	ORF	3' UTR		
L1 / $\lambda$ A	3958	20	3882	56		1293
L2 / $\lambda$ C	3907	12	3858	37		1285
L3 / $\lambda$ B	3829	13	3780	36		1259
M1 / $\mu$ A	2284	13	2199	72		732
M2 / $\mu$ B	2158	29	2031	98		676
M3 / $\mu$ NS	1997	25	1908	64		635
S1 / p10	1568	19	294	32	GCUUUU/UUCAUC	97
/ p17			489			162
/ $\sigma$ C			969			322
S2 / $\sigma$ A	1324	15	1251	58		416
S3 / $\sigma$ B	1202	30	1104	68		367
S4 / $\sigma$ NS	1191	23	1104	64		367

\*nt = nukleotid, as = aminosav

Az egyes genomszegmensek 3' UTR szakaszainak hossza 32-98 bp, és mindegyik szegmensvégen megtalálható az orthoreovírus fajokra jellemző UCAUC 3' terminális konszenzus szekvencia. A genomszegmensek 5' UTR szakaszainak hossza 12-30 bp közötti, és mindegyik 5' terminális vége egy, a madár reovírus fajokra jellemző, erősen megőrzött szekvenciát tartalmaz: GCUUUU.

A D2533/4/1-10 víziszárnyas reovírus törzs genomszekvenciáit a MH520075-MH520084 azonosítószámokkal helyeztük el a génbankban.

### **6.1.2. A D2533/4/1-10 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai**

A hasonlósági és filogenetikai elemzések során egyenként vizsgáltuk a genomszegmensek kódoló szakaszait, összehasonlítva más víziszárnyas, illetve egyéb madárfajból származó madár reovírusok homológ génjeivel (a vizsgálatba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítóit az **1. melléklet** tartalmazza).

A D2533/4/1-10 jelzésű törzs genomja a különböző európai és kínai eredetű, klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírus törzsek genomjával mutatta a legnagyobb hasonlóságot (**6. táblázat**). Az egyes szegmensek kódoló szekvenciáinak elemzésekor kapott azonossági értékek a más víziszárnyas reovírusokkal történő összehasonlításban viszonylag széles határok között mozogtak: nukleotid (nt) szekvenciák esetében 45,91-94,27%, aminosav (as) szekvenciák esetében pedig 42,21-98,69% között. Más, nem víziszárnyas gazdafajokból származó ARV-kkel összehasonlítva kissé alacsonyabb, 40,90-78,56% nt, illetve 31,16-94,65% as szekvencia azonossági értékeket kaptunk. A  $\sigma C$  gén esetében magas, 75,46-76,46% nt, illetve 83,42-84,92% as, azonossági értékeket csak az új típusú WRV-kkel összehasonlítva láttunk. A klasszikus WRV-kkel már jóval alacsonyabb, 45,91-46,74% nt, illetve 42,21-43,22% as azonossági értéket kaptunk. Előbbi alatta marad az ICTV által meghatározott, külön fajba sorolás kritériumát jelentő alsó határértéknek (<60% nt, <65% core fehérje as, <35% külső kapszid fehérje as), utóbbi pedig a fajbesorolás szempontjából a szürke zónába eső érték (60-75% nt, 65-85% core fehérje as, 35-55% külső kapszid fehérje as). Más ARV-kkel történő összehasonlításban pedig a  $\sigma C$  esetében 40,90-45,24% volt a nt, illetve 31,16-34,67% az as azonosság, mely értékek szintén a külön fajba sorolás kritériumát jelentő alsó határérték alatt vannak. További szürke zónás értékeket csupán néhány esetben, az ARV-kkel való összehasonlítás során ( $\lambda C$  nt és as,  $\mu A$  nt,  $\mu NS$  nt,  $\sigma A$  nt és a  $\sigma B$  nt) láthattunk, illetve a klasszikus WRV-kkel való összehasonlításban a  $\mu B$  nt és a  $\sigma B$  nt azonosságoknál, azonban ezeken kívül az egy fajhoz sorolhatóságot jelentő határ feletti az azonossági értékek.

**6. táblázat.** A D2533/4/1-10 törzs azonossági adatai más víziszárnyas (WRV), illetve madár (ARV) reovírus törzsekkel.

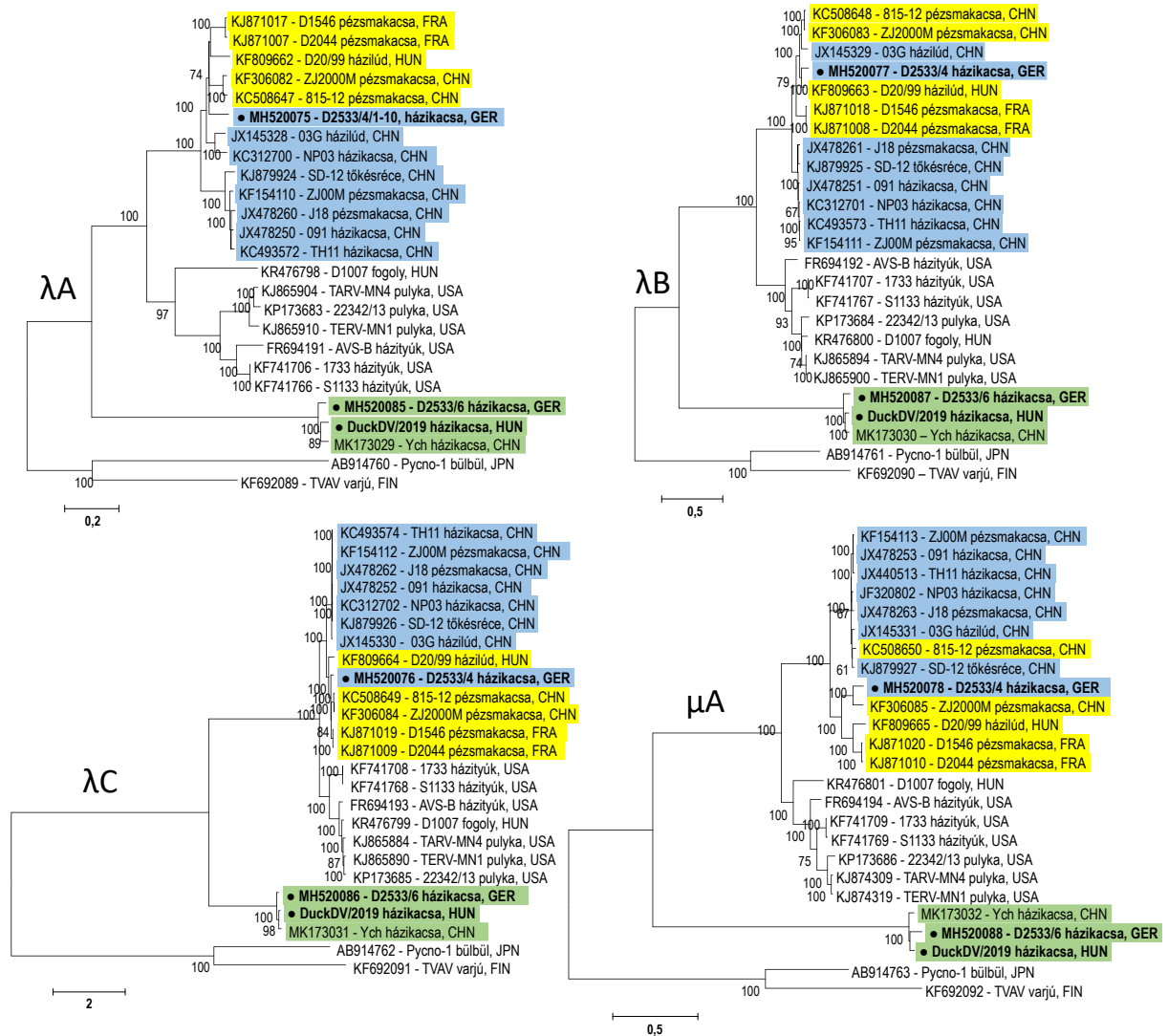
A sötét narancs, illetve sötét zöld színnel jelzett értékek a különböző fajhoz sorolás határértéke alatti értékek (<60% nt; <65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje as). A világos narancs és világos zöld háttérű értékek pedig a szürke zónába eső értékek (60-75% nt; 65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje as). Az NS fehérjék esetében nincs határérték megállapítva, ezeket dőlttel jelöltük.

		WRV klasszikus		WRV új típusú		ARV		
		min	max	min	max	min	max	
D2533/4/1-10	$\lambda$ A	nt	89,80%	89,95%	86,21%	89,46%	77,73%	78,56%
		as	97,05%	97,60%	97,21%	98,22%	94,10%	94,65%
	$\lambda$ B	nt	87,76%	93,06%	86,49%	89,62%	75,19%	75,95%
		as	97,30%	98,17%	97,30%	98,01%	90,78%	91,73%
	$\lambda$ C	nt	82,77%	90,02%	80,56%	81,00%	69,69%	70,65%
		as	93,12%	96,33%	93,59%	93,90%	77,64%	79,12%
	$\mu$ A	nt	81,42%	90,09%	81,42%	81,88%	72,98%	74,77%
		as	92,70%	95,18%	93,94%	95,18%	85,67%	86,50%
	$\mu$ B	nt	67,44%	68,54%	88,72%	89,71%	75,36%	77,23%
		as	76,40%	77,06%	96,86%	97,69%	88,45%	93,23%
	$\mu$ NS	nt	78,95%	89,74%	87,10%	88,36%	70,60%	72,30%
		as	92,03%	95,22%	93,78%	94,58%	80,70%	81,98%
	$\sigma$ A	nt	84,33%	87,38%	85,90%	87,29%	74,50%	76,07%
		as	96,06%	98,69%	97,64%	98,16%	90,55%	91,08%
	$\sigma$ B	nt	67,71%	68,04%	81,12%	82,68%	65,03%	67,82%
		as	73,06%	73,74%	92,59%	94,61%	70,71%	74,41%
	$\sigma$ C	nt	45,91%	46,74%	75,46%	76,46%	40,90%	45,24%
		as	42,21%	43,22%	83,42%	84,92%	31,16%	34,67%
	$\sigma$ NS	nt	82,47%	94,27%	82,02%	82,81%	76,74%	77,98%
		as	96,28%	98,65%	95,95%	96,28%	88,85%	91,55%

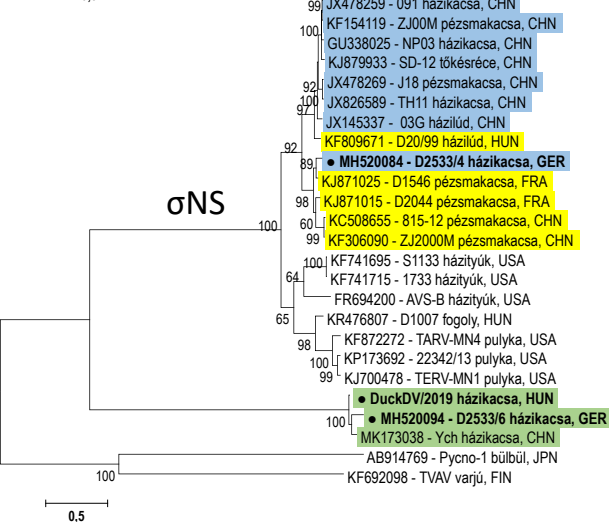
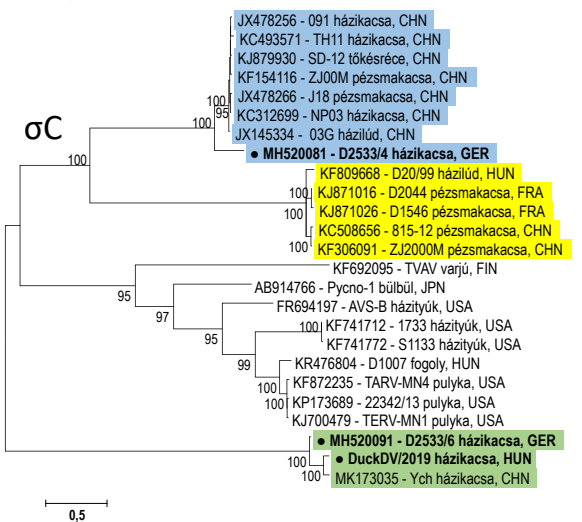
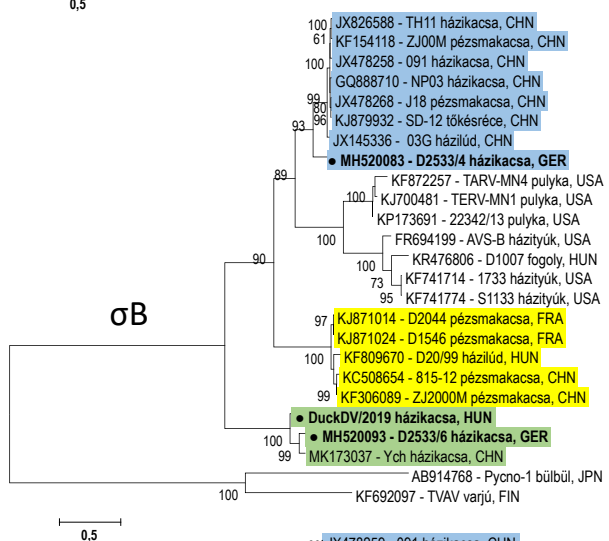
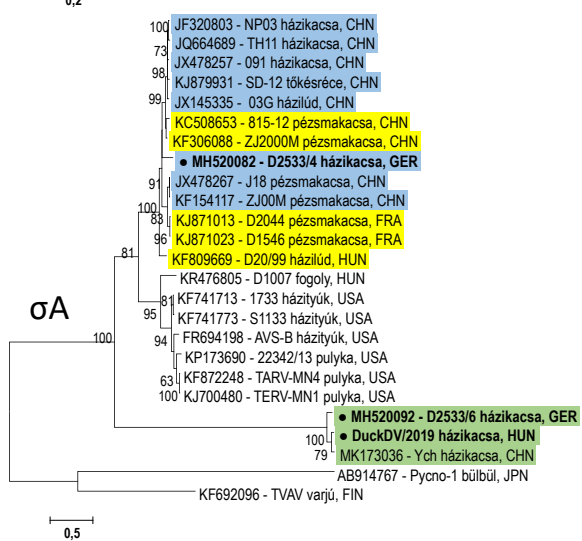
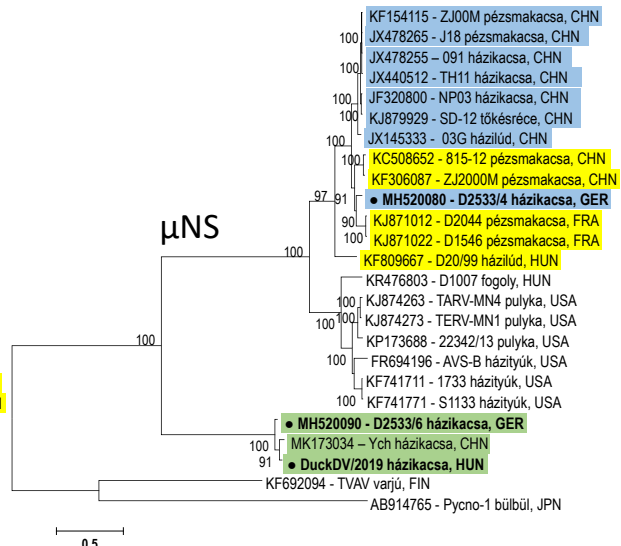
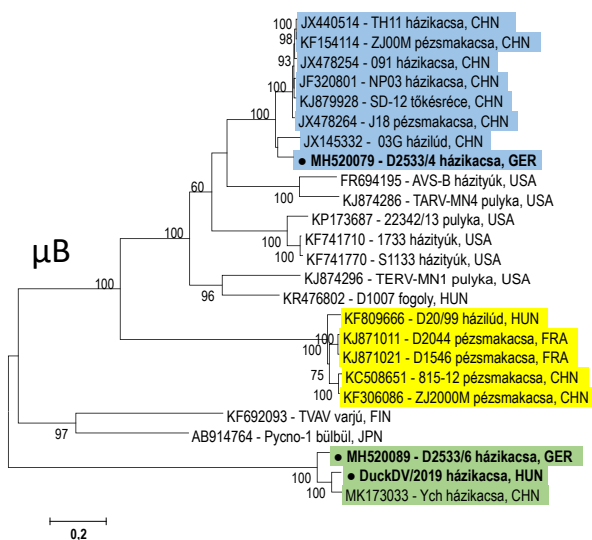
Míg a D2533/4/1-10 törzs  $\lambda$ A,  $\lambda$ B,  $\lambda$ C,  $\mu$ A,  $\mu$ NS és  $\sigma$ NS fehérjéket kódoló génszakaszainak nukleotidszekvencia szintjén történő összehasonlítása során inkább a klasszikus WRV-kkel kaptunk magasabb értékeket, addig a  $\mu$ B,  $\sigma$ B és  $\sigma$ C esetében az új típusú WRV-kkel. Ugyanezt figyelhettük meg a törzsfákon is, ahol a D2533/4/1-10 törzs az előbbi 6 gén esetében a klasszikus WRV-kkel csoportosult, míg az utóbbi 3 esetében az új típusú WRV-kkel (11. ábra).

A  $\sigma$ A vizsgálatoknál nem láttunk különbséget a klasszikus és új típusú WRV-kkel való azonossági értékek közt, és a filogenetikai fán sem figyelhettük meg a kétféle típus különválását, ami korábbi reasszortációs eseményeket feltételez a két csoport képviselői

között. A  $\sigma C$  esetében az azonossági értékek, illetve a törzsfa alapján is az új típusú WRV-kkel áll közelebbi rokonságban a D2533/4/1-10 törzs, és bár a filogenetikai fán szintén együtt csoportosult azokkal, különálló ágat alkotva a csoporton belül.



**11. ábra** Víziszárnyas és egyéb madárfajokból származó reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból készített nukleinsav alapú filogenetikai fák. A klasszikus WRV-k citromsárga, az új típusúak kék, a legújabb, besorolatlan WRV-k zöld színnel vannak jelölve. A jelen dolgozat témáját képező WRV-k félkövér betűvel szedve láthatóak. Az ábra a következő oldalon folytatódik.



11. ábra folytatás

### 6.1.3. A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomszerveződése

A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomszerveződése, nukleotidsorrendje, valamint hasonlóságuk és filogenetikai kapcsolatuk egyéb reovírusokkal nagymértékben megegyezett, így a két törzset együtt jellemezzük. A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzs teljes genom mérete 23427, illetve 23433 bp, az egyes genomszegmensek mérete pedig 1190 bp-tól (S4) 3998 bp-ig (L1) terjed (7. táblázat, az 2. mellékletben megtalálható törzsenkénti bontásban). A vírustörzsek genomjának G+C aránya 50,92, illetve 51,53%. A genom felépítése más madár reovírus törzsekéhez hasonló. Az S1 szegmens kivételével, amely három fehérjét kódol, a többi genomszegmensen egyetlen ORF található. ORF predikció és a BLASTX algoritmussal végzett hasonlósági vizsgálatok segítségével a következő orthoreovírus fehérjéket kódoló géneket sikerült azonosítanunk:  $\lambda$ A (belső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\lambda$ B (core RdRp),  $\lambda$ C (core nyúlvány),  $\mu$ A (core NTPáz),  $\mu$ B (külső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\mu$ NS (nem-strukturális fehérje),  $\sigma$ A (belső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ B (külső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ NS (nem-strukturális fehérje, RNS-kötő funkcióval),  $\sigma$ C (külső fiber) és p10 (FAST fehérje). A fent említetteken kívül ORF predikció segítségével azonosítottunk az S1 szegmensen egy 122 as-ból álló lehetséges fehérjét, amellyel funkcionális vizsgálat nem készült, azonban a szegmensen való elhelyezkedése alapján feltételezhető, hogy a más ARV-okra jellemző p17 nem-strukturális fehérje homológja lehet.

7. táblázat. A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomjának általános jellemzői.

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)
		5' UTR	ORF	3' UTR		
L1 / $\lambda$ A	3998	20	3921	57		1306
L2 / $\lambda$ C	3896/3899	12	3852/3855	32		1283/1284
L3 / $\lambda$ B	3825	13	3780	32		1259
M1 / $\mu$ A	2279/2282	12	2196/2199	71		731/732
M2 / $\mu$ B	2150	30	2022	98		673
M3 / $\mu$ NS	1990	21	1908	61	GCUUUU/UUCAUC	635
S1 / p10	1573	22	282	34		93
/ p17?			369			122
/ $\sigma$ C			1014			337
S2 / $\sigma$ A	1325	15	1251	59		416
S3 / $\sigma$ B	1201	30	1104	67		367
S4 / $\sigma$ NS	1190	23	1104	63		367

Az egyes genomszegmensek 3' UTR szakaszainak hossza 32-98 bp, és mindegyik szegmensvégen megtalálható az orthoreovírus fajokra jellemző UCAUC 3' terminális

konszenzus szekvencia. A genomsegmentek 5' UTR szakaszainak hossza 12-30 bp közötti, és mindegyik a madár reovírusokra jellemző, erősen konzervált GCUUUU 5' terminális szekvenciát tartalmazza.

A két törzs közül ezidáig a D2533/6/1-10 genomsekvenciáját helyeztük el a génbankban, MH520085-MH520094 azonosítószámokon.

#### **6.1.4. A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai**

A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomsegmentjeinek kódoló szakaszait egyenként hasonlítottuk más ARV, WRV törzsek homológ génszakaszaihoz (a vizsgálatba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítóit az **1. melléklet** tartalmazza). Továbbá bevettük még vizsgálatainkba a Ych törzset is, melyet Kínában izoláltak házikacsából, és amely az általunk korábban publikált D2533/6/1-10 törzssel nagyfokú hasonlóságot mutatott (Cao és mtsai, 2019). Ezt a nagyfokú hasonlóságot mostani vizsgálataink is megerősítették mind a D2533/6/1-10, mind a Reo/HUN/DuckDV/2019 törzs vonatkozásában.

Az nt és as azonossági értékek csupán a Ych törzssel történő összehasonlításban voltak olyan magasak (86,42-95,01% nt, 94,08-99,21% as azonosság), hogy minden szegmens esetében elérjék az egy fajhoz soroláshoz szükséges határértéket (>75% nt, >85% core fehérje as, >55% külső kapszid fehérje as) (**8. táblázat**). Más, különböző madárfajokból származó reovírusokkal összehasonlítva azonban csak közepes vagy alacsony azonossági értékeket kaptunk mind nukleotid, mind aminosav szinten.

Víziszárnyas, illetve más, nem víziszárnyas eredetű madár reovírusokkal összehasonlítva egy esetben sem érték el a nukleotid azonosságok az egyazon fajba sorolhatósághoz szükséges minimum értéket (>75%). Számos esetben ráadásul a külön fajhoz sorolást jelentő, 60%-os határ alatt maradtak: a  $\lambda$ C (54,60-57,10%),  $\mu$ A (57,06-59,82%),  $\mu$ NS (57,26-59,06%),  $\sigma$ B (56,98-63,24%),  $\sigma$ C (38,06-41,90%), és  $\sigma$ NS (59,78-63,03%). Az as szekvenciák vizsgálatakor is mindössze két génnél tapasztaltuk, hogy az azonossági értékek elérik az egy fajba sorolás kritériumát jelentő határt (>85% core fehérje, >55% külső kapszid fehérje): i) a  $\mu$ B gén esetében (65,35-70,96%), illetve ii) a  $\sigma$ B esetében, azonban ez utóbbinál csak a WRV-okkal történő összehasonlításban (57,24-60,94%). A  $\lambda$ A,  $\lambda$ B,  $\sigma$ A és  $\sigma$ B gének as szekvencia azonosságai esetében a szürke zónába (65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje) eső továbbá a  $\lambda$ C,  $\mu$ A, és  $\sigma$ C géneknél a külön fajhoz sorolást jelentő (<65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje) értékeket kaptunk.

A szegmens kódoló szakaszaiból készített filogenetikai fák is megerősítették az azonossági adatok alapján látható kapcsolatokat (**11. ábra**, 44-45. o.). A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek minden szegmens esetében távoli rokonságot mutattak csak

a többi madár eredetű reovírussal, ugyanakkor minden esetben együtt csoportosultak a kínai, házikacsából származó Ych törzssel.

**8. táblázat.** A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek azonossági adatai más víziszárnyas (WRV) és madár reovírus (ARV) törzsekkel, valamint az Ych törzssel. A sötét narancs, illetve sötét zöld színnel jelzett értékek a különböző fajhoz sorolás határértéke alatti értékek (<60% nt; <65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje as). A világos narancs és világos zöld háttérű értékek pedig a szürke zónába eső értékek (60-75% nt; 65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje as). Az NS fehérjék esetében nincs határérték megállapítva, ezeket dőlttel jelöltük.

		WRV		ARV		Ych		
		min	max	min	max	min	max	
D2533/6/1-10, Reo/HUN/DuckDV/2019	λA	nt	70,63%	72,10%	70,96%	72,38%	94,29%	95,01%
		as	83,17%	84,17%	83,55%	84,79%	98,37%	99,07%
	λB	nt	65,63%	66,66%	66,08%	67,32%	91,74%	94,47%
		as	74,64%	75,83%	74,72%	75,68%	97,38%	98,25%
	λC	nt	55,49%	57,10%	54,60%	55,82%	87,54%	91,30%
		as	55,59%	56,61%	53,79%	55,43%	94,92%	96,79%
	μA	nt	57,06%	59,50%	58,62%	59,82%	91,42%	94,45%
		as	58,82%	61,43%	59,92%	61,98%	94,08%	98,21%
	μB	nt	60,67%	64,91%	63,64%	65,35%	89,33%	94,00%
		as	65,35%	70,13%	68,48%	70,96%	98,18%	98,51%
	μNS	nt	57,26%	58,48%	57,63%	59,06%	92,13%	94,84%
		as	55,66%	57,42%	55,66%	58,05%	96,65%	97,61%
	σA	nt	62,23%	64,32%	61,97%	63,71%	89,03%	94,60%
		as	65,35%	66,40%	65,62%	66,40%	96,33%	99,21%
	σB	nt	59,44%	63,24%	56,98%	60,89%	88,72%	91,15%
		as	57,24%	60,94%	54,88%	59,93%	97,98%	98,32%
	σC	nt	38,06%	41,90%	39,57%	41,74%	86,48%	92,32%
		as	29,65%	31,66%	25,63%	28,64%	94,97%	97,99%
	σNS	nt	60,45%	63,03%	59,78%	61,91%	89,66%	93,93%
		as	61,49%	62,50%	60,81%	63,51%	96,28%	98,31%

## 6.2. Fácán reovírus törzsek

### 6.2.1. A fácán reovírus törzsek genomszerveződése

Vizsgálataink során két fácán eredetű reovírus törzs genomszekvenciáját határoztuk meg IonTorrent újgenerációs, valamint Sanger szekvenálás segítségével. A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzset laboratóriumunkban izoláltuk 2015-ben, fácán



bélsármintából, a D1996/2/1 törzset 2012-ben izolálta együttműködő partnerünk fácán zúzógyomor és bursa homogenizátumából.

A D1996/2/1 törzs teljes genomszekvenciáját sikerült meghatározni, míg a Reo/HUN/Pheasant/216/2015-as törzs L2 és S1 szegmensének 5' végi nem-kódoló szakasza hiányos maradt, azonban a kódoló szakaszokat, illetve a többi szegmens szekvenciáit teljes hosszukban meghatároztuk. A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs genomja így 23446 bp hosszú, G+C aránya 49,1%, míg a D1996/2/1 törzsé 23512 bp, G+C aránya 47,6%. Az egyes genomszegmensek mérete 1192 bp-tól (S4) 3958 bp-ig (L1) terjed (**9. táblázat**). Az ismert 5' UTR szakaszok hossza 12-32 bp közötti, és egy kivétellel, mindegyik terminálisan tartalmazza a GCUUUU konzervált szekvenciát, mely általánosan jellemző a madár reovírusokra. A kivétel a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs M1 szegmense, melynél a 6. pozícióban U helyett A található. Az ismert 3' UTR szakaszok hossza 33-99 bp közötti, és mind tartalmazza a reovírusokra jellemző UCAUC terminális konszenzus szekvenciát.

**9. táblázat.** A D1996/2/1 és 216/2015 törzsek genomjának általános jellemzői.

Törzs	Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)
			5' UTR	ORF	3' UTR		
D1996/2/1	L1 / λA	3924	24	3822	78		1273
	L2 / λC	3903	12	3855	36		1284
	L3 / λB	3828	13	3780	35		1259
	M1 / μA	2287	12	2214	61		737
	M2 / μB	2156	29	2028	99		675
	M3 / μNS	2036	29	1926	81		641
	S1 / p10	1651	32	291	33	GCUUUU/UUCAUC	96
	/ p17			414			137
	/ σC			984			327
	S2 / σA	1325	14	1251	60		416
	S3 / σB	1204	24	1110	70		369
	S4 / σNS	1198	29	1098	71		365
Reo/HUN/Pheasant/216/2015	L1 / λA	3958	20	3882	56	GCUUUU/UUCAUC	1293
	L2 / λC	3876+n	12	3858	6+n	GCUUUU/?	1285
	L3 / λB	3829	13	3780	36	GCUUUU/CUCAUC	1259
	M1 / μA	2283	12	2199	72	GCUUUA/CUCAUC	732
	M2 / μB	2143	17	2031	95	GCUUUU/UUCAUC	676
	M3 / μNS	1996	24	1908	64	GCUUUU/UUCAUC	635
	S1 / p10	1643+n	24	300	30+n	GCUUUU/?	99
	/ p17			453			150
	/ σC			981			326
	S2 / σA	1324	15	1251	58	GCUUUU/UUCAUC	416
	S3 / σB	1202	30	1104	68	GCUUUU/UUCAUC	367
	S4 / σNS	1192	23	1104	65	GCUUUU/UUCAUC	367

A genomok felépítése más, madár eredetű reovírus törzsekéhez hasonló. Az S1 szegmens kivételével, amely három fehérjét kódol, a többi genomszegmensen egyetlen ORF található. ORF predikció és a BLASTX algoritmussal végzett hasonlósági vizsgálatok segítségével a következő orthoreovírus fehérjéket kódoló géneket sikerült azonosítanunk:  $\lambda$ A (belső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\lambda$ B (core RdRp),  $\lambda$ C (core nyúlvány),  $\mu$ A (core NTPáz),  $\mu$ B (külső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\mu$ NS (nem-strukturális fehérje),  $\sigma$ A (belső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ B (külső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ NS (nem-strukturális fehérje, RNS-kötő funkcióval),  $\sigma$ C (külső fiber), p10 (FAST fehérje) és p17 (nem-strukturális fehérje).

### **6.2.2. A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai**

A hasonlósági és filogenetikai elemzések során egyenként vizsgáltuk a genomszegmensek kódoló szakaszait, összehasonlítva más madár reovírusok homológ génszekvenciáival (a vizsgálatba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítóit az **1. melléklet** tartalmazza).

A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 jelzésű törzs genomja különböző, házityúkból, pulykából, fácánból és fogolyból izolált madár reovírus törzsekével mutatta a legnagyobb hasonlóságot (**10. táblázat**). Az azonossági értékek a tyúkfélékből származó törzsekkel összehasonlítva a legtöbb esetben megfeleltek az egyazon fajba sorolhatósághoz szükséges kritériumnak (>75% nt, >85% core fehérje as, >55% külső kapszid fehérje as). Mindössze néhány kivétel van, ahol a fajbesorolási kritériumok szürke zónájába eső értékeket kaptunk (60-75% nt, 65-85% core fehérje as, 35-55% külső kapszid fehérje as):  $\lambda$ C nt és as,  $\mu$ B nt,  $\mu$ NS nt és  $\sigma$ C nt. Két, Magyarországon izolált törzssel, a fogoly eredetű D1007 és a házityúk eredetű T1781 törzsekkel (Dandár és mtsai, 2013; Kugler és mtsai, 2016) valamivel magasabb azonossági értékeket kaptunk az összehasonlítás során (D1007 65,67-95,51% nt, 82,56-98,71% as; T1781 62,25-94,00% nt, 59,60-99,22% as), így ezen reovírusokat tekinthetjük a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 jelenleg ismert legközelebbi rokonainak. Ugyanakkor a  $\sigma$ C gén nukleotid- és fehérjeszekvencia szinten történő összehasonlításában egyértelműen a pulyka eredetű reovírusok szekvenciáival kaptunk a legmagasabb azonossági értékeket, míg a  $\mu$ B gén nukleotidszekvencia összehasonlításában az összes madár reovírussal szemben viszonylag alacsony, a szürke zónába eső azonossági értékeket mutatott a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs. Az egyéb, víziszárnyas eredetű törzsekkel összehasonlítva alacsonyabb azonossági értékeket láttunk, melyek több esetben a fajbesorolási kritériumok szürke zónájába estek ( $\lambda$ B nt,  $\lambda$ C nt és as,  $\mu$ A nt és as,  $\mu$ B nt,  $\mu$ NS nt,  $\sigma$ B nt), illetve a  $\sigma$ C gén esetében nt és as szinten is a külön fajba sorolás határértéke alatt maradtak.

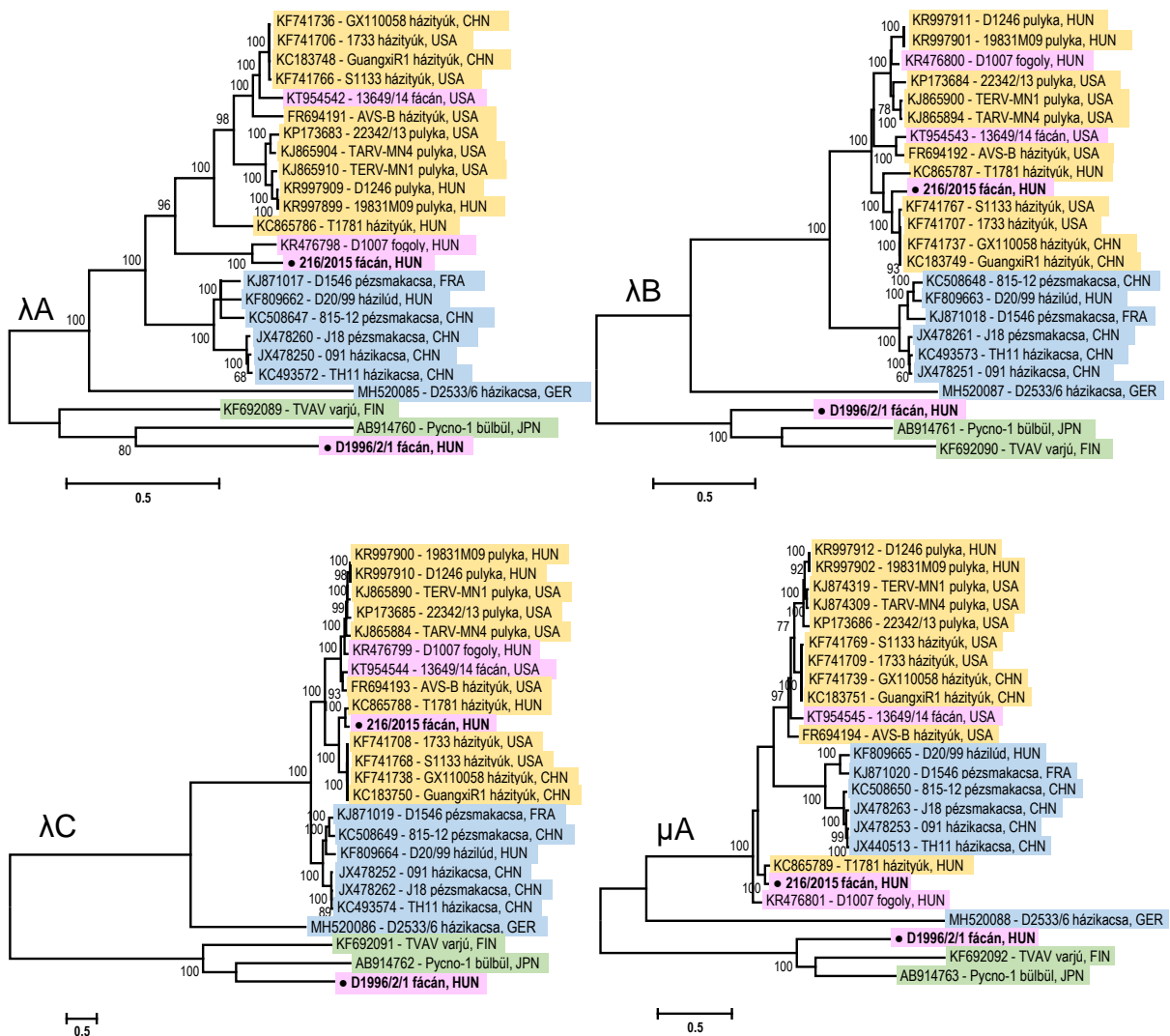
**10. táblázat.** A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs azonossági adatai más madár reovírus (ARV) törzsekkel.

A sötét narancs, illetve sötét zöld színnel jelzett értékek a különböző fajhoz sorolás határértéke alatti értékek (<60% nt; <65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje as). A világos narancs és világos zöld háttérű értékek pedig a szürke zónába eső értékek (60-75% nt; 65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje as). Az NS fehérjék esetében nincs határérték megállapítva, ezeket dőlttel jelöltük.

		ARV házityúk		ARV pulyka		D1007 fogoly	T1781 házityúk	WRV		
		min	max	min	max			min	max	
Reo/HUN/Pheasant/216/2015	$\lambda A$	nt	79,05%	79,39%	78,39%	78,71%	87,84%	78,87%	77,05%	77,53%
		as	96,29%	96,76%	96,13%	96,53%	98,11%	96,61%	94,87%	95,90%
	$\lambda B$	nt	83,02%	90,49%	82,38%	83,50%	83,81%	85,06%	74,78%	75,63%
		as	96,10%	97,22%	95,31%	95,47%	95,31%	96,02%	90,61%	91,33%
	$\lambda C$	nt	73,06%	81,04%	71,99%	72,48%	71,78%	92,07%	69,68%	70,57%
		as	84,13%	92,62%	82,09%	82,40%	82,56%	96,86%	78,32%	79,81%
	$\mu A$	nt	80,27%	80,63%	79,12%	79,62%	86,77%	94,00%	73,12%	74,18%
		as	92,86%	93,27%	91,35%	92,45%	94,37%	96,70%	84,34%	85,85%
	$\mu B$	nt	65,11%	65,83%	65,61%	66,33%	65,67%	66,11%	62,67%	64,61%
		as	70,40%	71,40%	69,57%	71,40%	70,74%	71,74%	67,89%	70,07%
	$\mu NS$	nt	74,84%	75,48%	74,26%	75,37%	74,04%	74,26%	70,00%	71,65%
		as	86,26%	86,90%	85,78%	86,26%	85,46%	86,58%	79,87%	81,63%
	$\sigma A$	nt	80,07%	81,19%	80,24%	81,62%	86,60%	87,63%	76,03%	76,72%
		as	97,16%	97,67%	97,42%	97,67%	98,71%	99,22%	90,44%	92,25%
	$\sigma B$	nt	82,92%	85,06%	68,99%	70,34%	95,51%	81,91%	61,24%	65,17%
		as	90,48%	90,82%	77,21%	77,89%	95,92%	89,80%	62,24%	69,39%
	$\sigma C$	nt	60,74%	63,76%	93,46%	94,46%	86,74%	62,25%	39,43%	45,13%
		as	59,09%	60,10%	91,92%	92,93%	87,88%	59,60%	29,80%	33,84%
	$\sigma NS$	nt	77,53%	77,75%	77,87%	78,43%	78,76%	87,42%	76,40%	77,19%
		as	90,54%	93,92%	89,86%	90,54%	92,23%	96,96%	89,19%	90,88%

Az egyes szegmensek filogenetikai vizsgálata sajátos rokonsági mintázatot mutatott a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs és a különböző házityúk, pulyka és fogoly eredetű törzsek között (**12. ábra**), mely egybecseng az azonossági adatok alapján megfigyeltekkel. A  $\lambda B$ ,  $\lambda C$  és  $\sigma B$  gének alapján készült filogenetikai fák a házityúk eredetű reovírus törzsekkel csoportosult, míg a  $\sigma C$  és  $\sigma NS$  gének összehasonlításában a pulyka eredetű törzsekkel alkotott monofiletikus csoportot. A  $\lambda A$  gén esetében a D1007, a  $\sigma A$  gén esetében pedig a T1781 reovírus a legközelebbi rokona, és monofiletikusan helyezkedtek el a házityúk és pulyka eredetű törzsekkel, ugyanakkor a csoporton belül külön ágat alkotva. A  $\mu A$  gén esetében szintén szoros rokonság figyelhető meg a T1781 vírustörzsszel, együtt alkottak egy külön ágat a madár reovírusokon belül, elkülönülve a tyúkfélék és víziszárnyasok reovírusaitól. A  $\mu NS$  gén alapján készült törzsfán szintén monofiletikusan csoportosult a

Reo/HUN/Pheasant/216/2015 a többi tyúkféléből származó reovírussal, azonban önálló ágat alkotott a csoporton belül. A  $\mu$ B gén esetében egyik törzzsel sem mutatott szoros rokonságot, önálló ágat alkotott a madár reovírusok monofiletikus csoportján belül, elkülönülve mind a tyúkfélék, mind a víziszárnyasok reovírusaitól. Ugyanakkor az elemzésekbe csak olyan törzseket vontunk be, melyek teljes genomszekvenciája megtalálható a génbankban. Amikor azonban BLAST keresést végeztünk a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs  $\mu$ B génszekvenciájával, három magyarországi házityúk eredetű reovírus törzset találtunk (16821-M-06, 924-Bi-05, 3457-M-11, Farkas és mtsai, 2016) melyek  $\mu$ B génszekvenciáival nagyfokú hasonlóságot (94,84-95,51%) mutatott.



**12. ábra** Különböző madárfajokból származó reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból készített nukleinsav alapú filogenetikai fák. A házityúk és pulyka eredetű törzsek sárga, a fácán és fogoly eredetű törzsek rózsaszín, a víziszárnyas eredetű törzsek kék és a vadmadár törzsek zöld színnel jelölve. A jelen dolgozat témáját képező fácán eredetű reovírusok félkövér betűvel szedve láthatóak. Az ábra a következő oldalon folytatódik.



### 6.2.3. A D1996/2/1 törzs hasonlósági és leszármazási kapcsolatai

A D1996/2/1 törzs esetében szintén egyenként vizsgáltuk a genomszegmensek kódoló szakaszait a filogenetikai és hasonlósági vizsgálatok során, összehasonlítva más, különböző madárfajokból származó ARV és NeARV törzsek homológ génjeivel (a vizsgálatba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítóit az **1. melléklet** tartalmazza).

A D1996/2/1 törzs genomja a legnagyobb hasonlóságot a Japánban, Orfeusz-bülbülből (*Hypsipetes amaurotis*) izolált, Pycno-1 jelzésű törzs (Ogasawara és mtsai, 2015), illetve a Finnországban, dolmányos varjúból (*Corvus corone cornix*) izolált, laborunkban korábban jellemzett, TVAV jelzésű törzs (Dandár és mtsai, 2014b) genomjával mutatta.

A tyúkféléből és víziszárnyasokból származó reovírus törzsekkel összehasonlítva alacsony és közepes azonossági értékeket kaptunk: nt 38,09-71,04%, as 30,30-80,82% (**11. táblázat**). Ezek az értékek a  $\mu$ B as kivételével (71,74-75,42%) sehol sem érték el az egy fajhoz sorolhatósághoz szükséges határértéket (>75% nt, >85% core fehérje as, >55% külső kapszid fehérje as). Ritkábban a fajbesorolási kritériumok szürke zónájába estek az azonossági értékek (60-75% nt, 55-85% core fehérje as, 35-55% külső kapszid fehérje as):  $\lambda$ A nt és as,  $\lambda$ B nt és as,  $\mu$ B nt és  $\sigma$ B as esetében, illetve a  $\sigma$ C as összehasonlításokban is néhány esetben. Azonban legtöbbször a külön fajhoz sorolást jelentő alsó határérték alatt maradtak (<60% nt, <55% core fehérje as, <35% külső kapszid fehérje as):  $\lambda$ C nt és as,  $\mu$ A nt és as,  $\mu$ NS nt,  $\sigma$ A nt és as,  $\sigma$ B nt,  $\sigma$ C nt és  $\sigma$ NS nt azonosságoknál, valamint a  $\sigma$ C as összehasonlításban is néhány esetben.

Az újonnan, NeARV fajba sorolt Pycno-1 és TVAV törzsekkel összehasonlítva kissé magasabb értékeket kaptunk, azonban ezek is csupán a  $\mu$ B gén as azonosság esetében (80,94-88,46%) érték el az egy fajhoz soroláshoz szükséges határértéket. Többnyire szürke zónába eső értékeket adott az összehasonlítás, mint a  $\lambda$ A nt és as,  $\lambda$ B nt és as,  $\mu$ A nt és as,  $\mu$ B nt,  $\sigma$ A nt,  $\sigma$ B as,  $\sigma$ C as és a  $\sigma$ NS nt azonosságok esetében, valamint a  $\sigma$ A as-nál néhány esetben. Illetve ritkábban a külön fajba sorolási határ alatti értékeket: a  $\lambda$ C nt és as,  $\mu$ NS nt,  $\sigma$ A as néhány esetben,  $\sigma$ B nt valamint a  $\sigma$ C nt azonosságok esetében.

A törzsfákon szintén azt láthattuk, hogy a D1996/2/1 törzs a  $\lambda$  és  $\mu$ , valamint a  $\sigma$ A és  $\sigma$ NS fehérjéket kódoló gének esetében a Pycno-1 és a TVAV törzsekkel alkotott monofiletikus csoportot, a többi madár eredetű törzstől elkülönülve (**12. ábra**, 52-53. o.). A  $\sigma$ C gén esetében a Pycno-1 a legközelebbi rokona, azonban nem váltak el teljesen az ARV-ktől, hanem a házityúk és pulyka eredetű törzsekkel csoportosultak együtt. A  $\sigma$ B gén alapján készült filogenetikai fán viszont a D1996/2/1 törzs teljesen különálló ágat alkotott, nem mutatott egyetlen eddig ismert madár reovírussal sem közvetlen rokonsági kapcsolatot.

**11. táblázat.** A D1996/2/1 törzs azonossági adatai más madár reovírus (ARV), illetve vadmadár reovírus (NeARV) törzsekkel.

A sötét narancs, illetve sötét zöld színnel jelzett értékek a különböző fajhoz sorolás határértéke alatti értékek (<60% nt; <65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje as). A világos narancs és világos zöld háttérű értékek pedig a szürke zónába eső értékek (60-75% nt; 65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje as). Az NS fehérjék esetében nincs határérték megállapítva, ezeket dőlttel jelöltük.

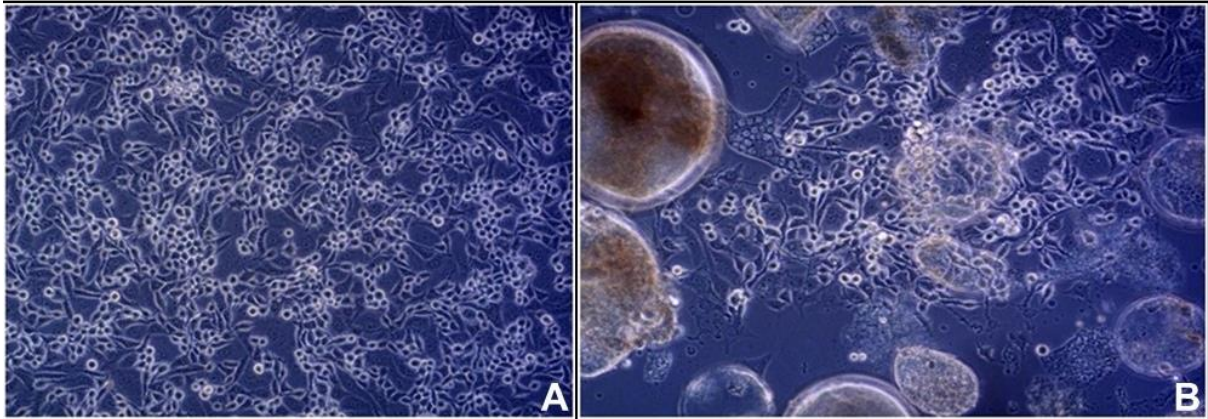
		ARV		NeARV		
		min	max	min	max	
D1996/2/1	$\lambda$ A	nt	68,21%	71,04%	71,72%	71,72%
		as	76,24%	80,82%	83,50%	84,21%
	$\lambda$ B	nt	63,95%	65,25%	70,30%	71,31%
		as	70,72%	73,43%	82,74%	82,82%
	$\lambda$ C	nt	46,74%	48,03%	54,49%	56,89%
		as	39,75%	41,24%	53,65%	57,03%
	$\mu$ A	nt	54,35%	57,19%	63,28%	66,07%
		as	52,34%	56,73%	70,19%	72,80%
	$\mu$ B	nt	64,78%	68,11%	69,89%	72,72%
		as	71,74%	75,42%	80,94%	88,46%
	$\mu$ NS	nt	47,50%	49,68%	55,69%	59,52%
		as	38,98%	42,17%	54,47%	56,71%
	$\sigma$ A	nt	56,27%	58,16%	60,22%	70,27%
		as	54,52%	59,69%	63,31%	77,26%
	$\sigma$ B	nt	48,65%	55,17%	47,08%	48,31%
		as	44,90%	48,64%	37,76%	40,48%
	$\sigma$ C	nt	38,09%	56,04%	45,64%	53,86%
		as	30,30%	51,52%	37,37%	48,48%
$\sigma$ NS	nt	55,06%	57,08%	60,67%	64,38%	
	as	52,03%	56,76%	67,57%	68,24%	

### 6.3. Hüllő reovírus törzsek

#### 6.3.1. A hüllő reovírus törzsek genomszerveződése

Vizsgálataink során hét hüllő reovírus törzs teljes genomszekvenciáját határoztuk meg IonTorrent újgenerációs és Sanger szekvenálás segítségével. A törzsek mór teknősből (CH1197/96, *Testudo graeca*), Schneider szinkből (2013/12, *Eumeces schneideri*), zöld leguánból (2013/54, *Iguana iguana*), óriáskígyóból (IBD26/00, *Boa constrictor*), szőnyegpítónból (55/02, *Morelia spilota*), királpítónból (KP3, *Python regius*) és egy ismeretlen fajú kígyóból (2013/47) származtak. A törzsek mindegyikét elhullott, kedvtelésből tartott

hüllőből izolálták a 2000-es évek elején Németországban (CH1197/96, IBD26/00, 55/02, Wellehan és mtsai, 2009), illetve nagyjából egy évtizeddel később Magyarországon (2013/12, 2013/54, 2013/47, KP3, Ihász és mtsai, 2014). Sejtenyészeten szaporítva az összes vizsgált vírus kifejtette a hüllő reovírusokra jellemző, óriássejt képződéssel járó citopatogén hatást (**13. ábra**) (Duncan és mtsai, 2004; Latney and Wellehan, 2013).



**13. ábra** VH-2 sejtek sejtenyészeten: (A) kontroll sejtek; (B) 2013/KP3 vírustörzssel fertőzött sejtek, megfigyelhetők a vírustörzssel fertőzés hatására kialakult jellegzetes óriássejtek. (A képeket készítette: Ihász Katalin)

A törzsek teljes genommérete 23957 és 24033 bp közötti, az egyes szegmensek mérete pedig 1207 bp-tól (S4 szegmens) 3970 bp-ig (L1 szegmens) terjed. A vírustörzsek genomjának G+C aránya 45,9-48,7% közötti értéket mutat. A genomok felépítése hasonló a már korábban leírt, bozótviperaéból származó hüllő reovírushoz (Bányai és mtsai, 2014). Az S1 szegmens kivételével, amely bicisztronosnak bizonyult, az összes szegmens egy gént kódol. ORF predikció és a BLASTX algoritmussal végzett hasonlósági vizsgálatok segítségével a következő orthoreovírus fehérjéket kódoló géneket sikerült azonosítanunk:  $\lambda$ A (belső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\lambda$ B (core RdRp),  $\lambda$ C (core nyúlvány),  $\mu$ A (core NTPáz),  $\mu$ B (külső kapszid fő szerkezeti fehérje),  $\mu$ NS (nem-strukturális fehérje),  $\sigma$ A (belső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ B (külső kapszid minor szerkezeti fehérje),  $\sigma$ NS (nem-strukturális fehérje, RNS-kötő funkcióval),  $\sigma$ C (külső fiber) és p14 (FAST) (Bányai és mtsai, 2014; Coombs, 2009).

Az egyes genomszegmensek 3' UTR szakaszainak hossza 41-104 bp, és mindegyik szegmensvégen megtalálható az orthoreovírus fajokra jellemző UCAUC 3' terminális konszenzus szekvencia. A genomszegmensek 5' UTR szakaszainak hossza 12-31 bp között terjed, és egy nagyrészt konzervált 5' terminális szekvenciát tartalmaznak: GUU(C/A)(U/A)UU, ahol a negyedik pozícióban citozin vagy adenin található, valamint két esetben (CH1197/96, S1 és S4 szegmens), az ötödik pozícióban az uracil adeninre cserélődött. A vizsgált hüllő reovírus törzsek genomfelépítésének összefoglaló adatait az **12. táblázat** tartalmazza,



valamint az **3. melléklet**ben megtalálhatóak a genomszerkezeti adatok törzsenkénti bontásban is.

**12. táblázat.** A vizsgált hulló reovírus törzsek genomszekvenciáinak általános jellemzői

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)
		5' UTR	ORF	3' UTR		
<b>L1 / λA</b>	3967-3970	13	3870-3873	84-87	GUUCUU/UUCAUC	1289-1290
<b>L2 / λC</b>	3901-3933	14	3846-3870	41-49	GUUCUU/UUCAUC	1281-1289
<b>L3 / λB</b>	3847-3852	14-16	3786	47-52	GUUCUU/UUCAUC <sup>#</sup>	1261
<b>M1 / μNS</b>	2435-2488	27	2334-2382	74-81	GUUAUU/UUCAUC <sup>*</sup>	777-793
<b>M2 / μA</b>	2339-2349	13-14	2232-2283	51-104	GUUCUU/UUCAUC <sup>‡</sup>	743-760
<b>M3 / μB</b>	2120-2134	26-27	2022-2034	71-74	GUUAUU/UUCAUC <sup>*</sup>	673-677
<b>S1 / p14</b>	1499-1509	22-23	360-408	66-70	GUUAUU/UUCAUC <sup>**</sup>	119-135
<b>/ σC</b>			1050-1053			349-350
<b>S2 / σA</b>	1314-1315	12	1251	51-52	GUUAUU/UUCAUC <sup>*</sup>	416
<b>S3 / σB</b>	1274-1288	31	1161-1176	67-87	GUUAUU/UUCAUC <sup>*</sup>	386-391
<b>S4 / σNS</b>	1207-1212	24-25	1110-1113	69-74	GUUAUU/UUCAUC <sup>**</sup>	369-370

<sup>#</sup> kivétel: IDB 26/00 GUUAUU

<sup>‡</sup> kivétel: 2013/54, 55/02 GUUAUU

<sup>\*</sup> kivétel: CH1197/96 GUUCUU

<sup>\*\*</sup> kivétel: CH1197/96 GUUCAU

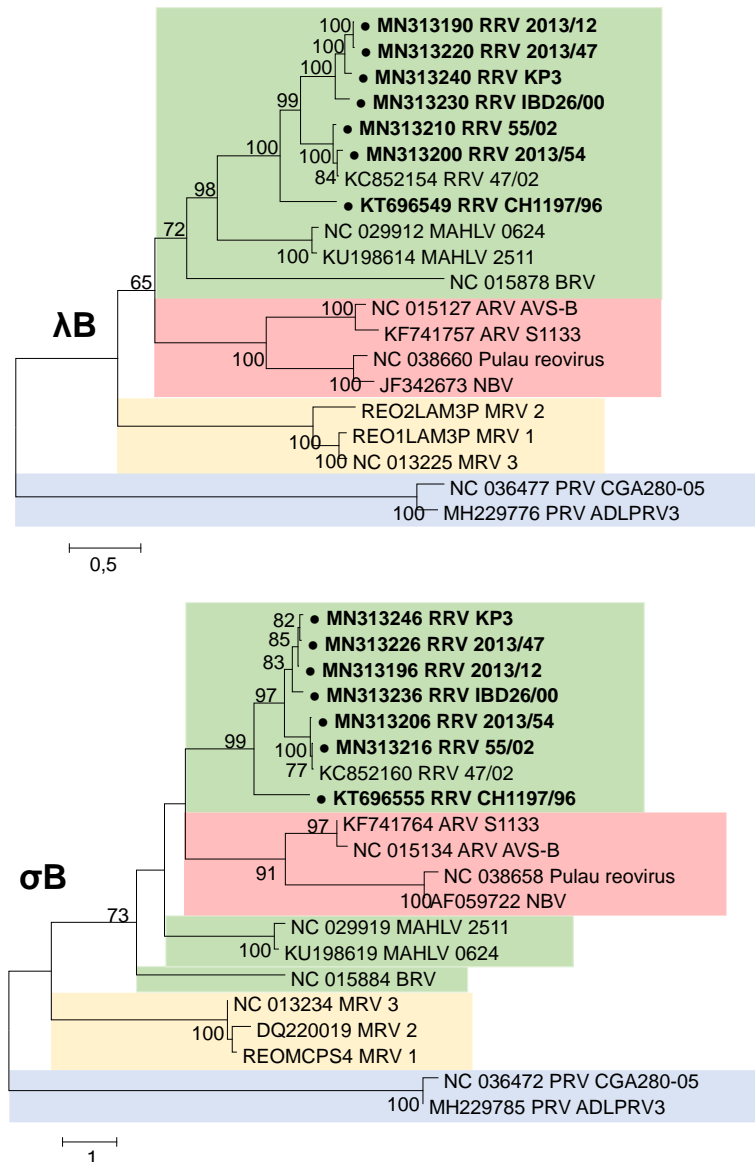
A hulló reovírus törzsek genomszekvenciáit a következő azonosítókkal helyeztük el a génbankban: CH1197/96, KT696547-KT696556; 2013/12, MN313188-MN313197; 2013/54, MN313198-MN313207; 55/02, MN313208-MN313217; 2013/47, MN313218-MN313227; IBD26/00, MN313228-MN313237 és KP3 MN313238-MN313247.

### **6.3.2. A hulló reovírus törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai más reovírus fajokkal**

A vizsgált hulló reovírus törzsek egyes szegmenseinek fehérjekódoló nukleotid szekvenciáit egyenként elemeztük. A hasonlósági és filogenetikai elemzésekbe az általunk vizsgált 7 hulló reovírus törzs mellett az *Orthoreovirus* nemzetség hét fajának reprezentatív képviselőit vontuk be: MRV Lang, Dearing és Jones szerotípusok, ARV AVS-B és S1133 törzsek, BRV referencia törzs, NBV referencia és Pulau törzs, MAHLV 2511 és 0624 törzsek, PRV CGA280-05 és ADLPRV3 törzsek, RRV 47/02 törzs (a vizsgálatba bevont, génbankban elérhető szekvenciák azonosítóit az **1. melléklet** tartalmazza).

A filogenetikai fákon négy, jól elkülönülő leszármazási vonalat lehet megfigyelni az *Orthoreovirus* nemzetségen belül (a **14. ábrán** reprezentatív törzsfák láthatóak, a tíz szegmens kódoló szekvenciáiból készített törzsfák a **4. melléklet**ben találhatóak meg). Ezek

a leszármazási vonalak a következő reovírus fajokat tartalmazzák: i) a három különböző szerotípusú MRV (Jones, Lang, Dearing); ii) az ARV-k a denevér-eredetű Pulau és Nelson Bay reovírusokkal együtt; iii) a RRV-k a pávián és az afrikai gyümölcssevő denevéreken élősködő kullancslegyekből kimutatott MAHLV-kkel közösen, illetve (iv) a PRV-k külön ágon. Kivételt jelentenek ez alól a  $\sigma$ -osztályú fehérjéket kódoló gének, melyek esetében a BRV, illetve a  $\sigma$ B esetében a MAHLV is külön csoportosult a hullő reovírusoktól (**14. ábra**).



**14. ábra** Különböző orthoreovírus fajok megfelelő genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból, maximum-likelihood módszerrel készített törzsfák. A  $\lambda$ B fehérjét kódoló nukleotid szekvenciák alapján készített törzsfán megfigyelhető a négy jól elkülönülő leszármazási vonal, különböző színekkel jelölve. A  $\sigma$ B fehérjét kódoló génszekvenciák alapján készített törzsfán ezek a leszármazási vonalak szétbomlanak.

A korábban leírt, bozótvipérából származó és a jelen dolgozatban vizsgált hulló reovírusokat összehasonlítva más reovírus fajokkal a homológ gének és az általuk kódolt fehérjék a szekvencia azonossági adatai 28,72-64,12%, illetve 11,72-66,88% közötti értéket mutattak (**13. és 14. táblázat**). Ezek az értékek többnyire megfeleltek a külön fajba sorolás kritériumának (<60% nt, <65% core fehérje as, <35% külső kapszid fehérje as), azonban található köztük a fajbesorolás szempontjából szürke zónába eső érték is (60-75% nt, 65-85% core fehérje as, 35-55% külső kapszid fehérje as). A  $\mu$ B fehérje as szekvencia azonossági értékei csak a PRV-kkel való összehasonlítás esetében voltak 35% alattiak (25,63-26,73%), az MRV, ARV, BRV, NBV és MAHLV-kkel történő összehasonlításban minden esetben a szürke zónába estek (39,94-56,29%). További szürke zónába eső értékeket a MAHLV törzsekkel való összehasonlításnál találtunk:  $\lambda$ B (core RdRp) 61,61-64,12% nt és 66,00-66,88% as; illetve  $\lambda$ A (belső kapszid) 60,74-62,40% nt azonosság, megerősítve a filogenetikai fákön megfigyelteket, ami szerint a MAHLV-k bizonyultak az RRV-k legközelebbi rokonainak.

**13. táblázat.** Hulló reovírusok kódoló szekvenciáinak más reovírus fajok homológ génszekvenciáival történő összehasonlításának nukleotid azonossági értékei. A szürke zónába (60-75%) eső értékek színes háttérrel jelölve.

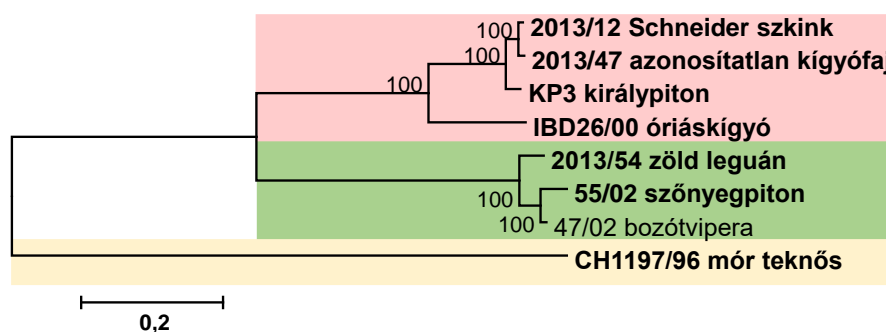
	MRV	ARV	BRV	NBV	MAHLV	PRV
$\lambda$ A	48,36-50,19%	53,66-55,91%	56,55-58,07%	53,36-55,05%	60,74-62,40%	42,34-43,56%
$\lambda$ B	53,30-55,52%	55,06-56,35%	54,61-56,69%	55,92-57,20%	61,61-64,12%	49,16-50,44%
$\lambda$ C	42,71-44,50%	38,90-40,98%	43,04-44,07%	40,61-42,28%	48,96-50,28%	37,25-36,69%
$\mu$ A	39,66-41,67%	45,35-47,08%	44,64-45,50%	46,12-53,30%	45,93-52,49%	35,49-36,64%
$\mu$ B	48,56-51,80%	54,31-56,03%	48,51-51,23%	53,37-58,33%	53,94-58,07%	39,84-41,72%
$\mu$ NS	36,47-40,24%	38,83-41,32%	40,51-44,41%	40,92-47,91%	40,17-48,12%	32,50-35,46%
$\sigma$ A	36,00-39,92%	44,08-46,00%	42,42-45,17%	43,17-54,08%	43,92-54,25%	34,00-36,17%
$\sigma$ B	30,68-35,99%	37,60-39,68%	38,29-39,91%	34,14-41,52%	34,95-42,21%	28,72-33,22%
$\sigma$ C	32,85-36,25%	32,73-36,62%	-	30,41-34,79%	-	29,08-34,06%
$\sigma$ NS	36,80-38,38%	42,78-45,57%	42,06-46,39%	41,96-55,26%	42,58-54,74%	32,58-35,88%

**14. táblázat.** Hüllő reovírusok kódoló szekvenciáinak más reovírus fajok homológ génszekvenciáival történő összehasonlításának aminosav azonossági értékei. A szürke zónába (35-55% külső kapszid fehérje, 65-85% core fehérje) eső értékek színes háttérrel jelölve.

	MRV	ARV	BRV	NBV	MAHLV	PRV
<b>λA</b>	42,12-43,54%	50,88-52,63%	55,46-57,05%	51,13-64,89%	50,96-64,80%	30,69-31,61%
<b>λB</b>	51,45-53,46%	55,23-56,99%	51,93-53,30%	56,59-57,80%	66,00-66,88%	42,93-44,21%
<b>λC</b>	32,76-33,74%	28,05-28,78%	30,98-32,20%	29,27-31,14%	42,28-43,58%	23,58-25,20%
<b>μA</b>	27,19-28,49%	37,70-39,28%	33,67-35,40%	36,55-37,70%	45,90-48,49%	20,58-22,30%
<b>μB</b>	41,51-43,55%	51,89-54,09%	39,94-41,51%	52,36-53,46%	54,72-56,29%	25,63-26,73%
<b>μNS</b>	22,11-25,56%	25,76-29,41%	28,19-32,66%	25,35-28,80%	32,45-37,12%	15,62-17,65%
<b>σA</b>	24,06-27,57%	35,59-38,85%	32,08-33,83%	37,34-39,35%	44,11-46,62%	17,54-19,55%
<b>σB</b>	11,81-16,67%	20,83-26,59%	23,26-26,04%	20,83-23,96%	22,92-25,35%	13,19-15,28%
<b>σC</b>	13,19-19,41%	15,02-23,81%	-	13,55-18,68%	-	11,72-15,02%
<b>σNS</b>	24,30-27,14%	30,53-33,64%	34,58-36,14%	30,22-32,71%	46,42-49,22%	17,13-19,94%

### 6.3.3. A hüllő reovírus törzsek hasonlósági és leszármazási kapcsolatai fajon belül

Az általunk vizsgált hüllő reovírusok mind egy monofiletikus kládba csoportosultak a már korábban leírt, bozótviperából izolált RRV-vel, ami közös evolúciós eredetet feltételez (14. ábra, 58. o.). Mindemellett az újonnan leírt RRV-ken belül három, jól elkülönülő leszármazási vonalat figyelhettünk meg: i) 2013/12 (Schneider szkink), 2013/47 (ismeretlen kígyófaj), KP3 (királypiton) és IBD26/00 (óriáskígyó); ii) 2013/54 (zöld leguán) és 55/02 (szőnyegpiton), melyek együtt csoportosultak a korábban leírt 47/02 törzssel (bozótvipera); iii) a CH1197/96 (mór teknős) törzs, mely minden filogenetikai fán külön csoportosult a többi RRV-től (15. ábra).



**15. ábra** Hüllő reovírus törzsek konkatenált genomjából, maximum-likelihood módszerrel készített törzsfá. Megfigyelhető a három, jól elkülönülő leszármazási vonal, különböző színekkel jelölve.

A szekvencia hasonlósági adatok is ezeket a megfigyeléseket támasztották alá (**16. ábra**). Az ugyanazon leszármazási vonalhoz tartozó törzsek páronkénti azonossági értékei, egy kivétellel, mind elérték az egyazon fajhoz soroláshoz szükséges határértékeket (>75% nt, >85% core fehérje as, >55% külső kapszid fehérje as). A kivétel a  $\sigma_C$ , külső kapszid fiber fehérjét kódoló nukleotid szekvencia, mely esetében az IBD26/00 törzset a vele egy leszármazási ágon található 2013/47, 2013/12 és KP3 törzsekkel összehasonlítva szürke zónába eső (69,45-69,84%) nt azonossági értékeket kaptunk.

A különböző leszármazási vonalokhoz tartozó törzsek összehasonlításában azonban már jóval változatosabb eredményeket láttunk. A mór teknősből származó CH1197/96 jelzésű törzs szekvenciaadatait összehasonlítva a pikkelyes hüllőkből származó törzsek szekvenciaadataival, az azonossági értékek csupán egyetlen esetben, a  $\mu_B$  as esetében (80,98-82,91%) érték el az egy fajba soroláshoz szükséges határértéket. A legtöbb esetben a faji besorolás szürke zónájába estek, továbbá a  $\mu_{NS}$  (48,49-51,69%),  $\sigma_B$  (50,09-51,30%) és  $\sigma_C$  (48,99-49,66%) nt, illetve a  $\lambda_C$  (61,75-62,76%) as azonossági értékek a külön fajba sorolást jelentő alsó határérték szintje alatt maradtak.

A különböző leszármazási ágon található, pikkelyes hüllőkből származó RRV-k összehasonlításában szintén számos esetben figyelhettünk meg szürke zónába eső azonossági értéket. A külső kapszid fehérjék esetében az as szekvencia azonossági értékek az egy fajba soroláshoz szükséges határérték fölött maradtak ( $\mu_B$  88,86-89,30%;  $\sigma_B$  69,43-70,73%,  $\sigma_C$  60,23-62,54%), akárcsak a  $\lambda_A$  (90,89-93,85%) és  $\lambda_B$  (88,98-90,17%) core fehérjék esetében. A többi core fehérje esetében az as azonossági értékek között azonban többnyire szürke zónába eső értékeket találtunk:  $\lambda_C$  (79,94-80,87%),  $\mu_A$  (79,92-82,77%) és  $\sigma_A$  (81,97-85,34%). A nukleotid szekvenciák összehasonlításában még inkább a szürke zónába eső értékek domináltak: mindössze a  $\lambda_A$  (75,36-76,42%) és a  $\sigma_{NS}$  (75,52-77,24%) génszekvenciák azonossági értékei érték el az egyazon fajba soroláshoz szükséges határértéket. A többi esetben szürke zónába eső értékeket találtunk:  $\lambda_B$  (74,20-75,13%),  $\lambda_C$  (70,00-70,83%),  $\mu_A$  (69,06-71,23%),  $\mu_B$  (74,05-76,13%),  $\sigma_A$  (73,32-75,00%),  $\sigma_B$  (63,82-66,15%). Továbbá a  $\mu_{NS}$  (56,59-57,56%) és a  $\sigma_C$  (58,50-60,52%) nukleotid szekvenciák esetében a külön fajhoz sorolás határértéke alá eső azonossági adatokat is találtunk.

2013/47		98.68%	98.91%	97.74%	90.89%	93.15%	92.92%	81.01%	2013/47		99.44%	98.49%	97.15%	88.98%	89.69%	89.77%	81.68%
2013/12	98.60%		99.69%	98.60%	91.60%	93.85%	93.54%	81.63%	2013/12	99.13%		98.89%	97.46%	89.21%	89.93%	90.01%	81.92%
KP3	97.61%	97.95%		98.75%	91.60%	93.85%	93.54%	81.56%	KP3	91.12%	91.38%		97.78%	89.45%	90.01%	90.09%	82.00%
IBD26/00	83.74%	83.99%	84.02%		91.36%	93.62%	93.31%	81.79%	IBD26/00	84.59%	84.83%	85.41%		89.45%	90.09%	90.17%	81.92%
55/02	75.36%	75.72%	75.46%	75.43%		95.88%	95.64%	81.71%	55/02	74.25%	74.41%	74.20%	74.36%		96.43%	96.91%	83.03%
2013/54	75.98%	76.42%	76.34%	76.19%	86.72%		98.83%	80.70%	2013/54	74.94%	75.13%	75.02%	75.05%	93.18%		99.29%	80.57%
47/02	75.56%	75.98%	76.01%	75.72%	92.35%	90.53%		80.47%	47/02	74.76%	74.94%	75.02%	75.05%	95.24%	95.69%		80.73%
CHI197/96	71.91%	72.09%	71.83%	71.52%	74.79%	70.71%	70.32%		CHI197/96	69.34%	69.36%	69.44%	69.10%	72.46%	69.02%	68.91%	

λA

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		99.30%	99.14%	95.63%	79.94%	80.48%	80.41%	62.45%							
2013/12	98.88%		98.67%	95.78%	80.25%	80.80%	80.72%	62.53%							
KP3	98.41%	98.10%		95.39%	80.09%	80.72%	80.64%	62.45%							
IBD26/00	83.45%	83.71%	83.50%		80.25%	80.87%	80.72%	62.76%							
55/02	70.21%	70.44%	70.62%	70.02%		98.99%	98.99%	61.75%							
2013/54	70.00%	70.34%	70.36%	70.73%	96.15%		99.53%	62.30%							
47/02	70.41%	70.63%	70.83%	70.31%	98.93%	96.23%		62.14%							
CHI197/96	60.32%	60.32%	60.37%	60.21%	60.24%	60.27%	60.63%								

λB

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		98.37%	95.93%	93.62%	79.92%	81.55%	80.87%	71.51%							
2013/12	98.15%		97.01%	94.57%	80.73%	82.36%	81.68%	71.91%							
KP3	92.40%	93.17%		94.57%	81.41%	82.77%	82.23%	71.78%							
IBD26/00	82.04%	82.32%	82.36%		80.05%	82.09%	81.55%	71.37%							
55/02	69.15%	69.52%	70.19%	69.06%		94.17%	95.93%	74.36%							
2013/54	70.19%	70.69%	71.23%	70.38%	88.24%		97.69%	72.46%							
47/02	69.79%	70.15%	70.65%	69.56%	95.30%	91.77%		72.32%							
CHI197/96	63.68%	63.73%	63.27%	63.82%	67.21%	64.27%	64.27%								

λC

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		99.41%	99.41%	97.18%	88.86%	89.00%	89.15%	82.47%							
2013/12	98.81%		99.70%	97.47%	89.00%	89.15%	89.30%	82.62%							
KP3	95.99%	96.33%		97.77%	89.00%	89.15%	89.30%	82.91%							
IBD26/00	82.27%	82.22%	82.71%		89.00%	89.15%	89.30%	82.17%							
55/02	74.99%	75.04%	75.48%	74.59%		96.73%	96.88%	82.62%							
2013/54	74.89%	75.09%	75.38%	74.05%	89.85%		99.85%	80.98%							
47/02	75.78%	75.73%	76.13%	74.94%	94.55%	92.82%		80.98%							
CHI197/96	72.71%	72.61%	72.46%	72.56%	73.85%	70.53%	70.48%								

μA

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		98.55%	98.03%	83.05%	53.35%	54.80%	54.53%	42.58%							
2013/12	98.90%		98.03%	83.18%	53.35%	54.93%	54.53%	42.44%							
KP3	97.15%	97.11%		83.57%	53.75%	55.32%	54.80%	42.71%							
IBD26/00	76.08%	76.13%	76.22%		54.53%	55.19%	55.72%	41.52%							
55/02	56.81%	56.72%	56.59%	56.94%		89.75%	96.06%	42.97%							
2013/54	57.51%	57.56%	57.21%	57.03%	85.68%		93.04%	41.13%							
47/02	56.90%	56.86%	56.64%	57.16%	96.06%	88.22%		40.87%							
CHI197/96	49.28%	49.19%	49.01%	48.71%	51.69%	48.49%	48.66%								

μB

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		99.28%	100.00%	96.39%	82.45%	85.10%	85.10%	69.47%							
2013/12	99.36%		99.28%	95.67%	81.97%	84.38%	84.38%	68.99%							
KP3	99.04%	98.72%		96.39%	82.45%	85.10%	85.10%	69.47%							
IBD26/00	84.62%	84.21%	84.05%		82.69%	85.34%	85.34%	69.23%							
55/02	73.56%	73.48%	73.40%	73.32%		96.15%	97.12%	68.75%							
2013/54	73.88%	73.64%	73.88%	74.60%	93.99%		99.04%	68.51%							
47/02	75.00%	74.76%	75.00%	74.12%	96.79%	96.07%		68.99%							
CHI197/96	63.06%	63.06%	63.22%	63.46%	64.74%	63.30%	62.74%								

μNS

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		94.30%	92.23%	87.56%	69.95%	70.21%	70.73%	44.30%							
2013/12	94.73%		92.23%	91.45%	69.69%	70.21%	70.47%	45.08%							
KP3	92.83%	91.97%		85.75%	69.43%	69.95%	70.21%	43.26%							
IBD26/00	76.25%	78.58%	75.47%		69.95%	70.47%	70.73%	45.08%							
55/02	65.80%	64.25%	64.94%	64.85%		98.19%	98.45%	44.82%							
2013/54	64.85%	63.99%	65.03%	63.82%	94.47%		97.67%	44.04%							
47/02	66.15%	64.59%	65.46%	65.20%	98.01%	93.18%		44.82%							
CHI197/96	51.30%	51.12%	51.04%	51.12%	50.09%	50.17%	50.17%								

σA

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		98.27%	97.12%	74.64%	61.38%	61.67%	61.67%	40.92%							
2013/12	98.27%		96.83%	74.64%	61.10%	61.38%	61.38%	41.21%							
KP3	96.54%	96.83%		75.50%	62.25%	62.54%	62.54%	41.50%							
IBD26/00	69.84%	69.45%	69.74%		60.23%	60.23%	60.23%	42.36%							
55/02	60.13%	59.85%	60.04%	58.50%		97.98%	99.14%	41.50%							
2013/54	60.42%	60.13%	60.33%	58.69%	98.37%		98.85%	41.21%							
47/02	60.52%	60.23%	60.42%	58.89%	99.04%	99.33%		41.50%							
CHI197/96	49.66%	49.38%	49.57%	48.99%	49.38%	49.09%	49.18%								

σB

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
2013/47		99.19%	99.46%	98.10%	86.72%	86.45%	86.72%	63.96%							
2013/12	98.92%		99.73%	98.37%	86.45%	86.72%	86.45%	64.23%							
KP3	98.01%	98.37%		98.64%	86.72%	86.99%	86.72%	64.23%							
IBD26/00	87.80%	87.80%	88.35%		85.91%	86.18%	85.91%	64.50%							
55/02	76.78%	76.33%	76.96%	76.78%		99.19%	99.46%	63.96%							
2013/54	75.52%	75.52%	75.97%	76.60%	97.47%		99.73%	63.69%							
47/02	76.69%	76.33%	77.06%	77.24%	96.93%	95.48%		63.41%							
CHI197/96	62.69%	63.14%	63.14%	63.60%	60.98%	61.16%	60.61%								

σC

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
--	---------	--	---------	--	-----	--	----------	--	-------	--	---------	--	-------	--	-----------

σNS

	2013/47		2013/12		KP3		IBD26/00		55/02		2013/54		47/02		CHI197/96
--	---------	--	---------	--	-----	--	----------	--	-------	--	---------	--	-------	--	-----------

**16. ábra** Hüllő reovírus gének nukleotid és aminosav szekvenciáinak azonossági értékei. A nt szekvencia adatok a bal alsó háromszögben, míg az as szekvencia adatok a jobb felső háromszögben találhatóak.

A sötét narancs, illetve sötét zöld színnel jelzett értékek a különböző fajhoz sorolás határértéke alatti értékek (<60% nt; <65% core fehérje, <35% külső kapszid fehérje as). A világos narancs és világos zöld háttérű értékek pedig a szürke zónába eső értékek (60-75% nt; 65-85% core fehérje, 35-55% külső kapszid fehérje as). Az NS fehérjék esetében nincs határérték megállapítva, ezeket dőlttel jelöltük.

#### **6.3.4. A reasszortációs kísérlet eredménye**

A CH1197/96 és 47/02 hüllő reovírus törzsekkel végzett reasszortációs vizsgálatban összesen négy koinfekciós kísérletet végeztünk. A kísérletekben a vírusok fertőzési multiciplítása különbözött: I. és II. MOI 1 47/02 + MOI 1 CH1197/96; III. MOI 1 47/02 + MOI 0,5 CH1197/96; IV. MOI 1 47/02 + MOI 0,2 CH1197/96. Az egyes fertőzésekből nyert szuszpenzióból viszonylag kisszámú vírusizolátumot sikerült kinyernünk a plakktisztítás során. Az I-II. kísérletből 48 db, a III. kísérletből 14 db, és a IV. kísérletből 8 db izolátumot különítettünk el és jellemeztünk. Az összesen vizsgált 70 vírusizolátumból azonban egynél sem sikerült a genomszegmensek reasszortációját kimutatnunk.

## 7. Megbeszélés

### 7.1. Madár reovírus törzsek általános genomszerveződése

Vizsgálataink során meghatároztuk három házikacsa és egy fácán eredetű reovírus törzs teljes genomjának nukleotid sorrendjét, illetve egy további fácán reovírus törzs összes szegmensének fehérjekódoló szekvenciáit. Összességében a vizsgált vírustörzsek genomjának, valamint genomszegmenseinek felépítése nem tért el jelentősen az irodalomban eddig leírtaktól. Az egyes genomok mérete ~23,5 kbp volt, mely 10 szegmensre tagolódott. A genomszegmensek felépítésében a kódoló régiók előtt és után nemtranszlálódó szakaszokat azonosítottunk. Az 5' nemtranszlálódó régió minden esetben hordozta a madár reovírusokra jellemző GCUUUU terminális szekvenciát, a 3' nemtranszlálódó régió pedig a reovírus fajokra általánosan jellemző UCAUC terminális konszenzus szekvenciát. A kódoló szakaszok az L, M, valamint az S2-S4 szegmensek esetében monocisztronosnak bizonyultak, az S1 szegmens esetében pedig három, részben átfedő leolvasási keretet azonosítottunk, így a vizsgált törzsek genomja minden esetben 12 fehérjét kódolt.

### 7.2. Víziszárnyas reovírusok – új klád felbukkanása és a reasszortáció jelentősége

A víziszárnyasok reovírusait egyéb biológiai tulajdonságaik mellett a genomszerveződésükben megfigyelhető különbségek alapján két csoportba soroljuk, melyekre klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírusokként hivatkozunk. Az új típusú WRV-k esetében az S1 szegmens tricisztronos, rajta a gazdasejthez való kapcsolódásért felelős  $\sigma$ C fehérje, a sejtmagi és citoplazmatikus folyamatokat szabályozó p17, valamint a sejtfúziós hatásért felelős, FAST proteinek családjába tartozó p10 fehérje kódolt. Ebben a tulajdonságukban egyéb, házityúk eredetű madár reovírus törzsekkel mutatnak rokonságot. A klasszikus WRV-k esetében az S4 szegmens bicisztronos, ez kódolja a  $\sigma$ C és a p10 proteint, amely azonban nem hordozza a sejtfúzióért felelős FAST proteinek tulajdonságait. Az S1 szegmens szerkezete alapján az általunk vizsgált víziszárnyas reovírus törzseket az új típusú WRV-k közé sorolhatnánk, ugyanakkor a teljes genomszekvenciákat vizsgálva már árnyaltabb képet kapunk.

A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek esetében a más madár reovírusokkal történő összehasonlítás csak alacsony, illetve közepes hasonlóságot mutatott. A nukleotid és aminosav szekvencia azonossági értékek két gén kivételével vagy az ICTV által meghatározott, törzsek egyazon, illetve külön fajba sorolását jelentő két határérték közötti, ún. szürke zónába estek, vagy az alsó határérték alá. A két kivételt a  $\mu$ B és a  $\sigma$ B gének aminosav szekvenciájának elemzése során figyelhettük meg, csupán ezek esetében kaptunk az egy



fajba sorolhatóságához szükséges határ feletti értékeket a D2533/6/1-10 és a Reo/HUN/DuckDV/2019, valamint más ARV-k és WRV-k páronkénti összehasonlítása során. Érdeemes még megjegyezni, hogy korábbi munkáink során is tapasztaltuk, hogy a  $\mu$ B fehérje aminosav szekvenciája nagyobb mértékű, inkább a core fehérjékre jellemző megőrzöttséget mutat, más külső kapszid fehérjékkel szemben. Az ARV-k és WRV-kkel történő hasonlóságokkal ellentétesen, a Ych jelű, Kínában, házikacsából izolált reovírussal mindkét törzs minden génje nagyfokú hasonlóságot mutatott (Cao és mtsai, 2019). A filogenetikai fákön a többi víziszárnyas, házityúk és pulyka eredetű ARV-től jól elkülönülő ágat alkotva, együtt csoportosult a három törzs, ami ezen vírusok közös evolúciós eredetét feltételezi. Nagy valószínűséggel a D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 valamilyen más (feltehetően nem házasított) madár gazdafajból származik, és onnan a vírus a faji határokat átlépve került át a vízibarmfi-félékbe. Eredményeink alapján felvetődik a D2533/6/1-10 és a Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek külön fajhoz sorolásának kérdése, mivel jóval nagyobb a genetikai távolságuk más ARV törzsektől, mint azt várnánk ugyanazon fajhoz tartozó reovírusok esetében. Am a genomszerveződés hasonlóságai, például az 5' nemkódoló régiók terminális konszenzus szekvenciája, valamint a vírustörzsek egyéb, nem molekuláris jellemzői, például a gazdafaj, és az abban okozott tünetek egyértelműen a madár reovírusokhoz sorolja őket. Ezen eredmények alapján esetleg a jelenleg használatos klasszifikációs rendszer szekvencia azonossági határértékeinek az újragondolása is indokolt lehet.

A szegmentált RNS genommal rendelkező vírusok evolúciójában, új genomi konstellációk megjelenésén keresztül, jelentős szerepet játszik a reasszortáció (McDonald és mtsai, 2016). Ez például az influenzavírusok esetében részletesen kutatott, és jól dokumentált terület (Dhingra és mtsai, 2018; Ramey és mtsai, 2017). Az orthoreovírusokkal kapcsolatosan ilyen források nem elérhetőek, így ezen vírusok diverzitásáról limitált ismeretekkel rendelkezünk. Ugyanakkor a teljes genomszekvenálások során feltárt reasszortációs események meglátja azt mutatja, hogy ez a fajta genom-újraszerveződés jelentős szerepet játszhat a reovírusok evolúciójában is (Farkas és mtsai, 2016, 2014). Az új típusú WRV-k Kínában jelentek meg a 2000-es évek elején, és képviselőiket ezidáig csak az ázsiai kontinensről izolálták (Chen és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2012; Yun és mtsai, 2012). Klasszikus WRV-ket azonban Ázsiában és Európában is izoláltak már, és részleges genomszekvenciák alapján készült filogenetikai elemzések során a két kontinens klasszikus WRV-i távoli csoportokat alkottak a törzsfán. Ezek alapján felmerült, hogy a klasszikus WRV-k egy közös ősből kiindulva, de elkülönülten evolválódtak a két kontinensen (Yun és mtsai, 2013). Ugyanakkor a teljes genom elemzések rávilágítottak, hogy a klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírusok között is megfigyelhető a reasszortáció előfordulása, ami alapján valószínűsíthető, hogy nem elkülönülten evolválódtak a két kontinensen, hanem hosszú ideje

keringenek együttesen (Farkas és mtsai, 2014). Ez utóbbi elméletet alátámasztja a D2533/4/1-10 törzs megjelenése is, mely az S1 szegmensének felépítése alapján az új típusú WVR-k közé sorolhatjuk, ugyanakkor európai izolálású, és genomösszetétele mozaikos szerkezetet mutat.

A D2533/4/1-10 törzs különböző ARV-kkel közepes, illetve magas nukleotid és aminosav szekvencia hasonlóságot mutatott, legközelebbi rokonainak különböző Európában és Kínában izolált víziszárnyas eredetű törzsek bizonyultak. Az azonossági értékek néhány esetben nem érték el az egyazon fajhoz történő besoroláshoz szükséges határt, összességében azonban egyértelmű a vírustörzs ARV-khez, azon belül pedig a WRV-khez történő besorolása. Az egyes szegmenseket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy amíg 6 gén ( $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$ ,  $\mu NS$  és  $\sigma NS$ ) szekvenciái a klasszikus WRV-kkel adtak magasabb nukleotid azonossági értékeket, addig 3 gén ( $\mu B$ ,  $\sigma B$  és  $\sigma C$ ) esetében az új típusú WRV-kkel mutatott magasabb rokonsági fokot. Ezeket a megfigyeléseket a filogenetikai fák topológiája is megerősítette. Külön figyelmet érdemelnek a  $\sigma A$  és  $\sigma C$  gének alapján készült törzsfák. Míg a többi gén esetében a klasszikus és új típusú WRV-k viszonylag jól elkülönülnek egymástól, addig a  $\sigma A$  esetében nem figyelhető meg a két csoport különválása, ezt a csoportok közötti, közel megegyező szekvencia azonossági értékek is alátámasztják. Ezek alapján feltételezhető, hogy a múltban egy vagy akár több reasszortációs esemény is végbemehetett a klasszikus és az új típusú WRV-k között. A  $\sigma C$  gén esetében pedig bár a D2533/4/1-10 az új típusú WRV-kkel csoportosul, külön ágon helyezkedik el, ami azt jelezheti, hogy ez a szegmens egy másik gazdafaj reovírusából kerülhetett át reasszortáció során. A két csoport (klasszikus és új típusú WRV) a  $\sigma C$  fehérjét kódoló génszekvenciák alapján készült törzsfán jól elkülönül, ugyanakkor közelebbi rokonsági kapcsolatban vannak egymással, mint a házityúk és pulyka eredetű törzsek homológ génjével. Valószínűsítjük, hogy a klasszikus WRV-k bicisztronos S4 szegmense az új típusú WRV-k tricisztronos S1 szegmenséből alakult ki, a FAST fehérje elvesztésével. Ezt az elképzelésünket támasztja alá, hogy az új típusú WRV-k p10 fehérjéje nem hordozza a FAST fehérjék tulajdonságait, hanem a p17 fehérje csonkolt változatának tekinthető.

Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a D2533/4/1-10 vírustörzs egy hármas reasszortáns, melynek  $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$ ,  $\mu NS$  és  $\sigma NS$  fehérjéket kódoló szegmensei klasszikus,  $\mu B$ ,  $\sigma A$  és  $\sigma B$  fehérjéket kódoló szegmensei pedig új típusú víziszárnyas reovírusokból származnak, illetve  $\sigma C$  fehérjét kódoló szegmensének eredete egyelőre nem meghatározható. Mindezek mellett a legújabb, D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019, valamint a kínai Ych törzsek által reprezentált csoport képviselőinek nagy földrajzi távolságokban történő megjelenése is azt valószínűsíti, hogy a víziszárnyas reovírus törzsek több változata cirkulálhat európai és ázsiai állományokban. A víziszárnyas reovírusok genetikai összetétele a különböző homológ és heterológ gazdafajok reovírusai közti reasszortáció következtében

nagyfokú diverzitást mutat, valamint az újabb változatok felbukkanása szintén jelzi a víruscsoportnak az eddig ismertnél is sokrétűbb genetikai változatosságát.

### **7.3. Fácán reovírusok – reasszortáció és nagyfokú genetikai változatosság**

A madarak reovirusaiban bekövetkezett reasszortációs események előfordulását több tanulmány is bizonyította már teljes genomsekvenciák elemzése alapján (Dandár és mtsai, 2014a; Farkas és mtsai, 2016, 2014). A vadmadaraknak a reovírusokkal kapcsolatos esetleges rezervoár funkciójáról, illetve ezen vírusok transzmissziójában játszott lehetséges szerepéről azonban egyelőre kevés adat áll rendelkezésre, annak ellenére, hogy számos esetben izoláltak vadmadarokból reovírusokat (Docherty és mtsai, 1994; Huhtamo és mtsai, 2007; Mor és mtsai, 2014; Mutlu és mtsai, 1998; Ogasawara és mtsai, 2015; Ritter és mtsai, 1986), illetve a különböző gazdafajokból származó reovírusok közötti reasszortáció jelensége is bizonyított (Kugler és mtsai, 2016; Noh és mtsai, 2018).

A Reo/HUN/Pheasant/216/2015-as törzs a víziszárnyas eredetű reovírusokkal csak mérsékelt, viszont a tyúkfélékből, házityúkból, pulykából, fogolyból származó reovírusokkal nagymértékű hasonlóságot mutatott. Néhány esetben a faji besorolás szempontjából szürke zónába eső azonossági értékeket kaptunk a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs és a többi madár reovírus páronkénti összehasonlításában, viszont ez nem kérdőjelezi meg a törzsnek a ARV-khez történő besorolását. A szegmenseket egyenként vizsgálva azt figyeltük meg, hogy szinte szegmensenként változó, hogy az adott szekvencia mely gazdafajból származó törzsek homológ szekvenciáival mutat közelebbi rokonságot. Három gén esetében ( $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\sigma B$ ) egyértelműen házityúk eredetű, míg két gén esetében ( $\sigma C$ ,  $\sigma NS$ ) pulyka eredetű reovírus törzsekkel mutatta a nagyobb hasonlóságot. A többi gén esetében ( $\lambda A$ ,  $\mu A$ ,  $\mu B$ ,  $\mu NS$ ,  $\sigma A$ ) szintén monofiletikus csoportot alkotott a tyúkfélék reovirusaival, azonban azoktól elkülönült ágat alkotott egyedül, vagy együtt a D1007 fogoly, illetve a T1781 házityúk eredetű törzssel. Különösen szembetűnő ez a  $\mu B$  fehérjét kódoló gén esetében, amelynél nem csak a tyúkfélék, hanem az elemzésbe bevont összes madár reovírusról elkülönülve alkotott teljesen önálló ágat.

Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs genomösszetétele számos homológ reasszortációs lépés során alakult ki, így fogoly, házityúk és pulyka reovírus eredetű genomsegmensei is vannak. A  $\mu B$  fehérjét kódoló szegmensének eredete egyelőre ismeretlen, azonban nagymértékű hasonlóságot mutatott három, 2005-2011 között Magyarországon izolált házityúk eredetű törzssel. Ezek esetében felmerült, hogy a  $\mu B$  szegmens akár egy orthoreovírus-fajok közötti, heterológ reasszortációs lépés következtében kerülhetett be a genomba (Farkas és mtsai, 2016). A jelen vizsgálataink alapján tett megfigyeléseink alátámasztják azon korábbi eredményeket, melyek szerint a házityúk és

pulyka eredetű reovírus törzsek képesek egymás közötti reasszortációra, ami megerősíti egy fajhoz tartozásukat (Farkas és mtsai, 2016; Kugler és mtsai, 2016).

A D1996/2/1 fácán reovírus törzs egyetlen jelenleg ismert ARV, illetve NeARV törzssel sem mutatott nagyfokú hasonlóságot. Mind a tyúkfélék, a fogoly, a víziszárnyasok, valamint a jelen dolgozatban vizsgált, szintén fácánból származó reovírus törzssel történő összehasonlításban alacsony, a fajbesorolás szempontjából sűrű zónába eső, vagy az alatti azonossági értékeket kaptunk. Itt is érvényesült a víziszárnyasok reovírusainál már leírt jelenség, hogy csupán a  $\mu$ B fehérje aminosav szekvenciáinak összehasonlításában láttunk olyan azonossági értékeket, melyek elérik az egyazon fajhoz soroláshoz szükséges határt. Kissé magasabb hasonlóságot tapasztaltunk, amikor a nemrégiben elfogadott NeARV fajba besorolt Pycno-1 és TVAV törzsek szekvenciáival vetettük össze a D1996/2/1 genomszekvenciáit, azonban az azonossági értékek ebben az összehasonlításban sem érték el az egy fajhoz soroláshoz szükséges minimum határt. Ugyanakkor a filogenetikai fákban a három törzs együtt csoportosult minden egyes szegmens esetében, jól elkülönülő ágon a többi ARV-hoz képest, ami közös eredetükre utal. Eredményeink alapján a D1996/2/1 törzs nem sorolható be a madár reovírus fajba, mivel jóval kisebb mértékű hasonlóságot mutat más madár reovírusokkal, mint azt egy fajhoz tartozó vírusok esetében várnánk. Mindemelllett a NeARV fajba történő besorolása is kérdéses, mivel – bár a filogenetikai fákban monofiletikus ágat alkot az oda tartozó törzsekkel – a hasonlósági adatok nem elégitik ki az egy fajhoz tartozás kritériumát. A jelenleg elérhető genomadatok alapján a D1996/2/1 törzs pontos eredete egyelőre ismeretlen, azonban az 5' UTR régióinak nagyfokú hasonlósága más ARV és NeARV törzsekével feltételezi a madár eredetet. A D1996/2/1 törzs és a vele monofiletikus eredetű NeARV törzsek képviselőit egyelőre kisszámban, vadmadaraktól izolálták, és valószínűleg azért nem kerültek eddig a látómezőbe, mert nem keringenek háziszárnyasokban.

Ahogy korábbi tanulmányokban is bizonyítást nyert, a különböző gazdafajokból származó madár reovírusok közötti genomszegmens kicserélődés jelentős szerepet játszik ezen vírusok evolúciójában. A homológ és heterológ reasszortáció újabb genetikai változatok megjelenését eredményezheti, mely variációk a vírus fertőző- és túlélőképességét is befolyásolhatják. Az ilyen változatok esetleges bekerülése a baromfiállományokba jelentősen megnehezítheti a reovírusok elleni védekezést, és akár a vakcinázás hatékonyságát is ronthatja. Az általunk jellemzett fácán reovírus törzsek különböző genocsoportokba tartoznak, jelezve az ezekben a madarakban szaporodni képes reovírusok nagyfokú genetikai változatosságát. Az extenzív és félintenzív tartásrendszerben történő szaporításuk során a fácánok számos, különböző gazdafajból származó kórokozóval kerülhetnek kapcsolatba, így a reovírusok, illetve más vírusfajok szempontjából is ideális rezervoár szerepet tölthetnek be. Az azonban egyelőre kérdéses, hogy ezeknek a vírustörzseknek a fácánok természetes

gazdái, vagy zsákutcát jelentenek a kórokozó további terjedése szempontjából. Ennek feltérképezésére a vadon élő, illetve vadászati célból szaporított szárnyasvadak széleskörű és folyamatos monitorozása jelenthetne megoldást.

#### 7.4. Hüllő reovírusok – több leszármazási vonal és lehetséges új faj

Vizsgálataink során megállapítottuk hét, különböző hüllőfajokból származó orthoreovírus teljes genomjának nukleotid sorrendjét. Bár a mintaszám viszonylag alacsonynak mondható, a gazdafajok változatossága miatt eredményeink jó betekintést nyújthatnak a hüllő reovírusok diverzitásába. A törzsek genomszerveződése nem tért el jelentősen a korábban leírt, bozótvipérából származó hüllő reovírustól, mely ezidáig az egyetlen, ismert teljes genomszekvenciájú hüllő reovírus törzs volt. Az egyes genomok mérete nagyjából 24 kbp, mely 10 szegmensre tagolódik. A genomszegmensek felépítésében a kódoló régiók előtt és után nemtranszlálódó szakaszokat azonosítottunk. Az 5' nemtranszlálódó régió a GUU(A/C)(A/U)U terminális szekvenciát tartalmazta, melynek 4. és 5. pozíciójában láthattunk nukleotidcseréket, a 3' nemtranszlálódó régió pedig a reovírus fajokra általánosan jellemző UCAUC terminális konszenzus szekvenciát hordozta. A kódoló szakaszok az L, M, valamint az S2-S4 szegmensek esetében monocisztronosnak bizonyultak, az S1 szegmens esetében pedig kettő leolvasási keretet azonosítottunk, így a vizsgált törzsek genomja minden esetben 11 fehérjét kódolt.

A hüllőkből származó reovírus törzsek genomja más orthoreovírus fajok genomjával összehasonlítva alacsony fokú hasonlóságot mutatott, egyedül a 47/02 hüllő orthoreovírus referencia törzs genomjával fedezhettünk fel közelebbi rokonságot. Kivétel ez alól a CH1197/96 törzs, mely a referencia RRV-vel is alacsonyabb azonossági értékeket mutatott, mint azt várnánk két, egyazon fajhoz tartozó reovírus esetében. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált, hüllőkből származó reovírusok, a CH1197/96 törzs kivételével – melynek besorolása nem egyértelmű – mind a hüllő reovírus fajba tartoznak. Az *Orthoreovirus* nemzetség tagjaival készített filogenetikai fákon négy jól elkülönülő klád figyelhető meg, mely eredmény egybecseng korábbi irodalmi adatokkal (Bányai és mtsai, 2014; Jansen van Vuren és mtsai, 2016; Palacios és mtsai, 2010). Az azonossági adatok alapján tett megfigyeléseinket megerősítette a törzsfák topológiája, az újonnan leírt törzsek minden egyes fehérjekódoló szekvencia esetében monofiletikus csoportot alkottak a referencia RRV törzsszel, ugyanakkor a CH1197/96 külön ágon helyezkedett el a kládon belül.

A vizsgált hüllő orthoreovírusok fajon belüli összehasonlításában három leszármazási vonalat figyelhettünk meg: az egyik ágon a CH1197/96 jelzésű, mór teknősből származó reovírus helyezkedik el, a másik két ágat a pikkelyes hüllők reovírusai alkotják. A vizsgált törzsek ezen csoportosulását az azonossági adatok is alátámasztották. A CH1197/96 törzs, melyet mór teknősből izoláltak, nagy genetikai távolságot mutat a pikkelyes hüllőkből

származó reovírus törzsekkel szemben: mindössze egy esetben, a  $\mu$ B fehérje aminosav szekvencia azonossági értékeknél tapasztaltunk az egy fajhoz soroláshoz szükséges értékeket, minden más esetben szürke zónába vagy a külön fajhoz sorolást jelentő határ alá estek az azonossági értékek. Korábbi vizsgálatainkban is tapasztaltuk már, hogy a  $\mu$ B fehérje aminosav szekvenciája a core fehérjékre jellemző mértékben konzervált, így felmerül, hogy érdemesebb lenne a  $\mu$ B fehérje esetében a szigorúbb, core fehérje aminosavakra vonatkozó azonossági értékek használata a faji besorolás megállapításánál. Mindemellett a pikkelyes hüllőkből származó reovírusok két csoportja közti összehasonlításban is számos, a fajbesorolás szempontjából szürke zónába eső azonossági értéket láttunk, valamint néhány esetben a külön fajhoz sorolást jelentő azonossági értékeket is, főleg a nukleotid szekvencia összehasonlításokban, de ritkábban az aminosav szekvenciák vonatkozásában is. A bicisztronos S1 szegmens felépítése szintén eltér kissé a két leszármazási vonal közt: az egyik ágon elhelyezkedő vírustörzsek bicisztronos S1 szegmensének két ORF-e részben átfed egymással (2013/12, 2013/47, IBD26/00, KP3), míg a másik ágon található vírusok esetében nincs átfedés a két ORF között (47/02, 55/02, 2013/54). A leszármazási vonalakon belül ugyanakkor nagyfokú hasonlóságot tapasztaltunk, annak ellenére is, hogy a törzsek izolálási helye egymástól viszonylag távoli (Németország és Svájc, valamint Magyarország). Ennek magyarázata lehet, hogy a hüllők kereskedelmére szigorú szabályozás érvényes, viszonylag kevés forrásból szerezhetőek be ezek az állatok, így a köztük keringő vírusok változatossága is alacsonyabb lehet. Eredményeink alapján javasolható a hüllő reovírusok két genocsoportra történő felosztása, melyek tagjait csoporton belül magas, csoportok között pedig közepes nukleotid és aminosav szekvencia hasonlóság jellemzi. A teknősből származó reovírusnak a pikkelyes hüllőkből származó reovírusokkal szembeni nagymértékű diverzitására magyarázat lehet, hogy a legújabb, DNS alapú rendszerek alapján maguk a gazdafajok is viszonylag távoli rokonsági kapcsolatban vannak egymással. A páncélos hüllők a madarak és krokodilok által alkotott Archosauria csoport testvércsoportjának tekinthetők, míg a pikkelyes hüllők és a hidasgyíkok a jól elkülönülő Lepidosauria csoportot alkotják (Chiari és mtsai, 2012; Iwabe és mtsai, 2005). Hasonló divergens fejlődés a páncélos és pikkelyes hüllők vírusai között más víruscsaládok esetében is megfigyelhető. Kígyókból, gyíkokból és teknősből izolált paramyxovírusok részleges szekvenciaadatainak elemzése alapján a teknősből származó vírustörzs bár monofiletikus csoportot alkotott a pikkelyes hüllők vírusaival, a törzsfán külön ágon helyezkedett el (Marschang és mtsai, 2009). Adenovírusoknál még kifejezettebb ez a fajta szeparálódás: míg a pikkelyes hüllők adenovírusai az *Atadenovirus* nemzetségbe tartoznak, addig a teknősöké a *Siadenovirus* nemzetségbe, illetve egy jól elkülönülő, új, egyelőre nem elfogadott nemzetséget alkotnak (Dospoly és mtsai, 2013; Rivera és mtsai, 2009). Vizsgálataink során tett megfigyeléseink a hüllő reovírusok és gazdafajaik koevolúciójára utalnak, a különböző gazdafajok homológ vírusai korán szétváltak, és

gazdafajukkal együtt fejlődtek tovább. A teknős reovírus vonatkozásában az alacsony nukleotid és közepes aminosav szekvencia azonossági értékek, a különböző gazdafajok, illetve a sikertelen reasszortációs kísérlet mind azt támasztják alá, hogy az általunk vizsgált teknős reovírus az első képviselője egy új, hüllő eredetű fajnak az *Orthoreovirus* nemzetségen belül. Ezen megállapításunkat erősítette meg az a tény is, hogy 2019 tavaszán az ICTV elfogadta a teknős orthoreovírust (*Testudine orthoreovirus*) új fajként.

## 8. Új tudományos eredmények

1. Elsőként határoztuk meg és jellemeztük európai eredetű, házikacsából származó reovírus törzsek teljes genomszekvenciáját. Megállapítottuk, hogy az egyik törzs az új típusú víziszárnyas reovírusok közé tartozik, ezzel elsőként jellemeztük európai eredetű, új típusú víziszárnyas reovírus törzs teljes genomszekvenciáját. A genom összetételére a klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírus eredetű gének mozaikossága jellemző, újabb bizonyítékot nyújtva a két csoport közti reasszortáció lehetőségére. Megállapítottuk továbbá, hogy általunk vizsgált két törzs csupán alacsony hasonlóságot mutat a korábban ismert klasszikus és új típusú víziszárnyas reovírus törzsekkel, így a víziszárnyas reovírusokon belül egy új klád első képviselőinek tekinthetők. Eredményeink rávilágítottak ezen víruscsoport genetikai változatosságára és filogenetikai kapcsolatainak komplexitására.

2. Elsőként határoztuk meg és jellemeztük európai, fácán eredetű madár orthoreovírus törzsek teljes kódoló szekvenciáját. A vizsgálataink során jellemzett egyik törzs mozaikos genomszerveződése, melyben házityúk, pulyka és fogoly eredetű szegmensek vannak jelen, újabb bizonyítékot nyújtott a házityúk és pulyka reovírusok közti reasszortáció lehetőségére. Míg a másik törzs eddig leírt madár és vadmadár reovírusoktól nagymértékben eltérő genomszekvenciája alapján egy új faj első képviselője lehet. Eredményeink rávilágítottak a fácánokban szaporodni képes reovírus törzsek nagymértékű genetikai változatosságára, valamint felvetik a fácánok lehetséges rezervoár szerepét a tyúkfélék reovírusainak terjedésében és evolúciójában.

3. Elsőként jellemeztük a hüllők reovírusainak filogenetikai kapcsolatait különböző hüllőfajokból izolált reovírusok teljes genomszekvenciáinak elemzése alapján. Eredményeink alapján a pikkelyes hüllőkől származó orthoreovírusok két genocsoportra történő felosztását javasoltuk. Továbbá megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált, teknős eredetű orthoreovírus törzs egy új reovírus faj első képviselője, melyet azóta el is fogadtak új fajként teknős orthoreovírus (*Testudine orthoreovirus*) néven.



## 9. Irodalomjegyzék

- Attoui H, Mertens PPC, Becnel J, Belaganahalli S, Bergoin M, Brussaard CP, Chappell JD, Ciarlet M, del Vas M, Dermody TS, Dormitzer PR, Duncan R, Fang Q, Graham R, Guglielmi KM, Harding RM, Hillman B, Makkay A, Marzachi` C, Matthijssens J, Milne RG, Mohd Jaafar F, Mori H, Noordeloos AA, Omura T, Patton JT, Rao S, Maan M, Stoltz D, Suzuki N, Upadhyaya NM, Wei C, Zhou H (2011) Family Reoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, pp 541–554. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M.J., 2010. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38, W7–W13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>
- Abbas, M.D., Marschang, R.E., Schmidt, V., Kasper, A., Papp, T., 2011. A unique novel reptilian paramyxovirus, four adenovirus types and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany. *Vet Microbiol.* 150, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.010>
- Ahne, W., Thomsen, I., Winton, J., 1987. Isolation of a reovirus from the snake, *Python regius*. *Arch Virol.* 94, 135–139. <https://doi.org/10.1007/BF01313731>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ayalew, L.E., Gupta, A., Fricke, J., Ahmed, K.A., Popowich, S., Lockerbie, B., Tikoo, S.K., Ojkic, D., Gomis, S., 2017. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. *Sci Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02743-8>
- Bányai, K., Borzák, R., Ihász, K., Fehér, E., Dán, Á., Jakab, F., Papp, T., Hetzel, U., Marschang, R.E., Farkas, S.L., 2014. Whole-genome sequencing of a green bush viper reovirus reveals a shared evolutionary history between reptilian and unusual mammalian orthoreoviruses. *Arch Virol.* 159, 153–158. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1796-2>
- Benavente, J., Martínez-Costas, J., 2007. Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res.* 123, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.09.005>
- Benavente, J., Martínez-Costas, J., 2006. Early Steps in Avian Reovirus Morphogenesis. In Roy, P. (editor), in: *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Springer, pp. 68–85.

- Bi, Z., Zhu, Y., Chen, Z., Li, C., Wang, Y., Wang, G., Liu, G., 2016. Induction of a robust immunity response against novel duck reovirus in ducklings using a subunit vaccine of sigma C protein. *Sci Rep.* 6, 39092. <https://doi.org/10.1038/srep39092>
- Blahak, S., Ott, I., Vieler, E., 1995. Comparison of 6 different reoviruses of various reptiles. *Vet Res.* 26, 470–476.
- Cadman, H.F., Kelly, P.J., Zhou, R., Davelaar, F., Mason, P.R., 1994. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Dis.* 38, 621–625.
- Cao, Y., Sun, M., Wang, J., Hu, X., He, W., Su, J., 2019. Phenotypic and genetic characterisation of an emerging reovirus from Pekin ducks in China. *Sci Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44178-3>
- Chen, Z., Zhu, Y., Li, C., Liu, G., 2012. Outbreak-associated Novel Duck Reovirus, China, 2011. *Emerg Infect Dis.* 18, 1209–1211. <https://doi.org/10.3201/eid1807.120190>
- Chiari, Y., Cahais, V., Galtier, N., Delsuc, F., 2012. Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol.* 10, 65. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-65>
- Conzo, G., Magnino, S., Sironi, G., Lavazza, A., Vigo, P.G., Fioretti, A., Kaleta, E.F., 2001. Reovirus infection in two species of Psittaciformes recently imported into Italy. *Avian Pathol.* 30, 43–47. <https://doi.org/10.1080/03079450020023186>
- Coombs, K.M., 2009. Reoviruses: molecular biology, In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds), in: *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, New York, pp. 390–399.
- Corcoran, J.A., Duncan, R., 2004. Reptilian Reovirus Utilizes a Small Type III Protein with an External Myristylated Amino Terminus To Mediate Cell-Cell Fusion. *J Virol.* 78, 4342–4351. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4342-4351.2004>
- Dandár, E., Bálint, Á., Kecskeméti, S., Szentpáli-Gavallér, K., Kisfali, P., Meleg, B., Farkas, S.L., Bányai, K., 2013. Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease. *Arch Virol.* 158, 2583–2588. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1739-y>
- Dandár, E., Farkas, S.L., Marton, S., Oldal, M., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K., 2014a. The complete genome sequence of a European goose reovirus strain. *Arch Virol.* 159, 2165–2169. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2003-9>
- Dandár, E., Huhtamo, E., Farkas, S.L., Oldal, M., Jakab, F., Vapalahti, O., Bányai, K., 2014b. Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus Orthoreovirus. *J Gen Virol.* 95, 898–904. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060699-0>

- Darke, S., Marschang, R.E., Hetzel, U., Reinacher, M., 2014. Experimental infection of *Boa constrictor* with an orthoreovirus isolated from a snake with inclusion body disease. *J Zoo Wildl Med.* 45, 433–436. <https://doi.org/10.1638/2013-0194R.1>
- Davis, J.F., Kulkarni, A., Fletcher, O., 2013. Reovirus Infections in Young Broiler Chickens. *Avian Dis.* 57, 321–325. <https://doi.org/10.1637/10515-021313-Case.1>
- Dawe, S., Duncan, R., 2002. The S4 Genome Segment of Baboon Reovirus Is Bicistronic and Encodes a Novel Fusion-Associated Small Transmembrane Protein. *J Virol.* 76, 2131–2140. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.5.2131-2140.2002>
- Day, J.M., 2009. The diversity of the orthoreoviruses: Molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect Genet Evol.* 9, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.011>
- Dhingra, M.S., Artois, J., Dellicour, S., Lemey, P., Dauphin, G., Von Dobschuetz, S., Van Boeckel, T.P., Castellan, D.M., Morzaria, S., Gilbert, M., 2018. Geographical and Historical Patterns in the Emergences of Novel Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5 and H7 Viruses in Poultry. *Front Vet Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00084>
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J., 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics.* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>
- Docherty, D.E., Converse, K.A., Hansen, W.R., Norman, G.W., 1994. American woodcock (*Scolopax minor*) mortality associated with a reovirus. *Avian Dis.* 38, 899–904.
- Dospoly, A., Wellehan, J.F.X., Childress, A.L., Tarján, Z.L., Kovács, E.R., Harrach, B., Benkő, M., 2013. Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infect Genet Evol.* 17, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>
- Drury, S.E.N., Gough, R.E., Welchman, D. d. B., 2002. Isolation and identification of a reovirus from a lizard, *Uromastix hardwickii*, in the United Kingdom. *Vet Rec.* 151, 637–638. <https://doi.org/10.1136/vr.151.21.637>
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., Stoltz, D., 2004. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology* 319, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.025>
- Fahey, J.E., Crawley, J.F., 1954. Studies On Chronic Respiratory Disease Of Chickens II. Isolation of A Virus. *Can J Comp Met Vet Sci.* 18, 13–21.
- Farkas, S.L., Dandár, E., Marton, S., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K., 2014. Detection of shared genes among Asian and European waterfowl reoviruses in the whole genome constellations. *Infect Genet Evol.* 28, 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.029>

- Farkas, S.L., Marton, S., Dandár, E., Kugler, R., Gál, B., Jakab, F., Bálint, Á., Kecskeméti, S., Bányai, K., 2016. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *Sci Rep.* 6, 36960. <https://doi.org/10.1038/srep36960>
- Gál, J., Marton, S., Ihász, K., Papp, H., Jakab, F., Malik, Y.S., Bányai, K., Farkas, S.L., 2016. Complete Genome Sequence of a Genotype G23P[37] Pheasant Rotavirus Strain Identified in Hungary. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00119-16>
- Gravendyck, M., Ammermann, P., Marschang, R.E., Kaleta, E.F., 1998. Paramyxoviral and reoviral infections of iguanas on Honduran Islands. *J Wildl Dis.* 34, 33–38. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.1.33>
- Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T., Dermody, T.S., 2006. Attachment and Cell Entry of Mammalian Orthoreovirus. In Roy, P. (editor), in: *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Springer, pp. 1–38.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Heffels-Redmann, U., Müller, H., Kaleta, E.F., 1992. Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Avian Pathol.* 21, 481–491. <https://doi.org/10.1080/03079459208418866>
- Hlinak, A., Müller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, H., Ziedler, K., 1998. Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany. *J Wildl Dis.* 34, 479–486. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.479>
- Hollmén, T., Franson, J.C., Kilpi, M., Docherty, D.E., Hansen, W.R., Hario, M., 2002. Isolation and Characterization of a Reovirus from Common Eiders (*Somateria mollissima*) from Finland. *Avian Dis.* 46, 478–484. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0478:IACOAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0478:IACOAR]2.0.CO;2)
- Huang, W.R., Chiu, H.C., Liao, T.L., Chuang, K.P., Shih, W.L., Liu, H.J., 2015. Avian Reovirus Protein p17 Functions as a Nucleoporin Tpr Suppressor Leading to Activation of p53, p21 and PTEN and Inactivation of PI3K/AKT/mTOR and ERK Signaling Pathways. *PloS One* 10, e0133699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133699>
- Huhtamo, E., Uzcátegui, N.Y., Manni, T., Munsterhjelm, R., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2007. Novel Orthoreovirus from Diseased Crow, Finland. *Emerg Infect Dis.* 13, 1967–1969. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070394>
- Ihász, K., Farkas, S.L., Lengyel, G., Bányai, K., Gál, J., 2014. Occurrence and genetic diversity of orthoreoviruses in exotic reptile species in Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja.* 136, 247–252.

- Iwabe, N., Hara, Y., Kumazawa, Y., Shibamoto, K., Saito, Y., Miyata, T., Katoh, K., 2005. Sister Group Relationship of Turtles to the Bird-Crocodylian Clade Revealed by Nuclear DNA-Coded Proteins. *Mol Biol Evol.* 22, 810–813. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi075>
- Jansen van Vuren, P., Wiley, M., Palacios, G., Storm, N., McCulloch, S., Markotter, W., Birkhead, M., Kemp, A., Paweska, J.T., 2016. Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* 8. <https://doi.org/10.3390/v8030065>
- Jones, R.C., 2008a. Viral Arthritis In: Saif, Y. M. (ed), in: *Disease of Poultry*. Blackwell Publishing, pp. 310–322.
- Jones, R.C., 2008b. Other Reovirus Infections In: Saif, Y. M. (ed), in: *Disease of Poultry*. Blackwell Publishing, pp. 310–322.
- Jones, R.C., 2000. Avian reovirus infections. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 19, 614–625. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1237>
- Kapczynski, D., Sellers, H., Simmons, V., Schultz-Cherry, S., 2002. Sequence Analysis of the S3 Gene from a Turkey Reovirus. *Virus Genes* 25, 95–100. <https://doi.org/10.1023/A:1020130410601>
- Kaschula, V.R., 1950. A new virus disease of the muscovy-duck [*Cairina moschata* (linn)] present in Natal. *J S Afr Vet Assoc.* 21, 18–26.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kloet, S.R. de, 2008. Sequence Analysis of Four Double-Stranded RNA Genomic Segments Reveals an Orthoreovirus with a Unique Genotype Infecting Psittaciformes. *Avian Dis.* 52, 480–486. <https://doi.org/10.1637/8212-011908-Reg.1>
- Kugler, R., Dandár, E., Fehér, E., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K., Farkas, S.L., 2016. Phylogenetic analysis of a novel reassortant orthoreovirus strain detected in partridge (*Perdix perdix*). *Virus Res.* 215, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.11.018>
- Kuntz-Simon, G., Blanchard, P., Cherbonnel, M., Jestin, A., Jestin, V., 2002. Baculovirus-expressed muscovy duck reovirus  $\sigma$ C protein induces serum neutralizing antibodies and protection against challenge. *Vaccine* 20, 3113–3122. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00264-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00264-5)
- Lamirande, E.W., Nichols, D.K., Owens, J.W., Gaskin, J.M., Jacobson, E.R., 1999. Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (*Elaphe* species). *Virus Res.* 63, 135–141. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(99\)00067-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(99)00067-2)

- Landolfi, J.A., Terio, K.A., Kinsel, M.J., Langan, J., Zachariah, T.T., Childress, A.L., Wellehan, J.F.X., 2010. Orthoreovirus Infection and Concurrent Cryptosporidiosis in Rough Green Snakes (*Opheodrys Aestivus*): Pathology and Identification of a Novel Orthoreovirus Strain via Polymerase Chain Reaction and Sequencing. *J Vet Diagn Invest.* 22, 37–43. <https://doi.org/10.1177/104063871002200106>
- Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Latney, L.V., Wellehan, J., 2013. Selected Emerging Infectious Diseases of Squamata. *Veterinary Clin North Am Exot Anim Pract.* 16, 319–338. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.01.003>
- Le Gall-Reculé, G., Cherbonnel, M., Arnauld, C., Blanchard, P., Jestin, A., Jestin, V., 1999. Molecular characterization and expression of the S3 gene of muscovy duck reovirus strain 89026. *J Gen Virol.* 80, 195–203. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-195>
- Legrottaglie, R., Rizzi, V., Agrimi, P., 1997. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 20, 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(97\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(97)00005-2)
- Li, N., Hong, T., Wang, Yao, Wang, Youling, Yu, K., Cai, Y., Liu, S., Wei, L., Chai, T., 2016. The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. *Vet Microbiol.* 192, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.015>
- Liu, Q., Zhang, G., Huang, Y., Ren, G., Chen, L., Gao, J., Zhang, D., Han, B., Su, W., Zhao, J., Hu, X., Su, J., 2011. Isolation and characterization of a reovirus causing spleen necrosis in Pekin ducklings. *Vet Microbiol.* 148, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.016>
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P.A., Wallner-Pendleton, E.A., Lin, L., Knoll, E.A., 2015. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Sci Rep* 5, 14727. <https://doi.org/10.1038/srep14727>
- Malkinson, M., Perk, K., Weisman, Y., 1981. Reovirus infection of young muscovy ducks (*Cairina Moschata*). *Avian Pathol.* 10, 433–440. <https://doi.org/10.1080/03079458108418493>
- Markussen, T., Dahle, M.K., Tengs, T., Løvoll, M., Finstad, Ø.W., Wiik-Nielsen, C.R., Grove, S., Lauksund, S., Robertsen, B., Rimstad, E., 2013. Sequence Analysis of the Genome of Piscine Orthoreovirus (PRV) Associated with Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS One* 8, e70075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070075>
- Marschang, R.E., 2011. Viruses Infecting Reptiles. *Viruses* 3, 2087–2126. <https://doi.org/10.3390/v3112087>

- Marschang, R.E., Donahoe, S., Manvell, R., Lemos-Espinal, J., 2002. Paramyxovirus and reovirus infections in wild-caught mexican lizards (*Xenosaurus* and *Abronia* spp). *J Zoo Wildl Med.* 33, 317–321.  
[https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2002\)033\[0317:PARIIW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0317:PARIIW]2.0.CO;2)
- Marschang, R.E., Papp, T., 2009. Isolation and Partial Characterization of Three Reoviruses from Lizards. *J Herpetol Med Surg.* 19, 13–15. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.19.1.13>
- Marschang, R.E., Papp, T., Frost, J.W., 2009. Comparison of paramyxovirus isolates from snakes, lizards and a tortoise. *Virus Res.* 144, 272–279.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.011>
- McDonald, S.M., Nelson, M.I., Turner, P.E., Patton, J.T., 2016. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol.* 14, 448–460.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.46>
- Mertens, P., 2004. The dsRNA viruses. *Virus Res., Viral molecular machines: Replication systems within the inner cores of dsRNA viruses.* *Virus Res.* 101, 3–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.002>
- Mor, S.K., Armién, A.G., Reed, L., Schott, R., Goyal, S.M., 2014. Detection and Molecular Characterization of a Reovirus in Black-capped Chickadees (*Poecile atricapillus*) from Minnesota, USA. *J Wildl Dis.* 50, 928–932. <https://doi.org/10.7589/2014-02-045>
- Mor, S.K., Marthaler, D., Verma, H., Sharafeldin, T.A., Jindal, N., Porter, R.E., Goyal, S.M., 2015. Phylogenetic analysis, genomic diversity and classification of M class gene segments of turkey reoviruses. *Vet Microbiol.* 176, 70–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.005>
- Mor, S.K., Sharafeldin, T.A., Porter, R.E., Ziegler, A., Patnayak, D.P., Goyal, S.M., 2013. Isolation and Characterization of a Turkey Arthritis Reovirus. *Avian Dis.* 57, 97–103.  
<https://doi.org/10.1637/10353-090712-Reg.1>
- Mutlu, O.F., Grund, C., Cöven, F., 1998. Reovirus infection of pheasants (*Phasianus colchicus*). *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 26, 104–107.
- Noh, J.Y., Lee, D.H., Lim, T.H., Lee, J., Day, J.M., Song, C.S., 2018. Isolation and genomic characterization of a novel avian orthoreovirus strain in Korea, 2014. *Arch. Virol.* 163, 1307–1316. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3667-8>
- Ogasawara, Y., Ueda, H., Kikuchi, N., Kirisawa, R., 2015. Isolation and genomic characterization of a novel orthoreovirus from a brown-eared bulbul (*Hypsipetes amaurotis*) in Japan. *J Gen Virol.* 96, 1777–1786. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000110>
- Olson, N.O., Kerr, K.M., 1966. Some Characteristics of an Avian Arthritis Viral Agent. *Avian Dis.* 10, 470–476. <https://doi.org/10.2307/1588255>

- Palacios, G., Lovoll, M., Tengs, T., Hornig, M., Hutchison, S., Hui, J., Kongtorp, R.-T., Savji, N., Bussetti, A.V., Solovyov, A., Kristoffersen, A.B., Celone, C., Street, C., Trifonov, V., Hirschberg, D.L., Rabadan, R., Egholm, M., Rimstad, E., Lipkin, W.I., 2010. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus. *PLoS One* 5, e11487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011487>
- Palya, V., Glávits, R., Dobos-Kovács, M., Ivanics, É., Nagy, E., Bányai, K., Szücs, G., Dá, Á., Benkő, M., 2003. Reovirus identified as cause of disease in young geese. *Avian Pathol.* 32, 129–138. <https://doi.org/10.1080/030794502100007187>
- Perpiñán, D., Garner, M.M., Wellehan, J.F.X., Armstrong, D.L., 2010. Mixed Infection With Reovirus and Chlamydophila in a Flock of Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Avian Med Surg.* 24, 316–321. <https://doi.org/10.1647/2009-042.1>
- Petek, M., Felluga, B., Borghi, G., Baroni, A., 1967. The Crawley agent: An avian reovirus. *Arch Für Gesamte Virusforsch.* 21, 413–424. <https://doi.org/10.1007/BF01241740>
- Ramey, A.M., Hill, N.J., Cline, T., Plancarte, M., Cruz, S.D.L., Casazza, M.L., Ackerman, J.T., Fleskes, J.P., Vickers, T.W., Reeves, A.B., Gulland, F., Fontaine, C., Prosser, D.J., Runstadler, J.A., Boyce, W.M., 2017. Surveillance for highly pathogenic influenza A viruses in California during 2014–2015 provides insights into viral evolutionary pathways and the spatiotemporal extent of viruses in the Pacific Americas Flyway. *Emerg Microbes Infect.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.66>
- Raynaud, A., Adrian, M., 1976. Cutaneous lesions with papillomatous structure associated with viruses in the green lizard (*Lacerta viridis* Laur.). *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D.* 283, 845–847.
- Ritter, G.D., Ley, D.H., Levy, M., Guy, J., Barnes, H.J., 1986. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. *Avian Dis.* 30, 603–608.
- Rivera, S., Wellehan, J.F.X., McManamon, R., Innis, C.J., Garner, M.M., Raphael, B.L., Gregory, C.R., Latimer, K.S., Rodriguez, C.E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A.B., Nyaoke, A., Gates, A.E., Gilbert, K., Childress, A.L., Risatti, G.R., Salvatore Frasca, J., 2009. Systemic Adenovirus Infection in Sulawesi Tortoises (*Indotestudo Forsteni*) Caused by a Novel Siadenovirus. *J Vet Diagn Invest.* <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>
- Sabin, A.B., 1959. Reoviruses: A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 130, 1387–1389. <https://doi.org/10.1126/science.130.3386.1387>
- Sakai, K., Ueno, Y., Ueda, S., Yada, K., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Mutoh, K., Yoshioka, K., Nakamura, M., Takehara, K., Morikawa, S., Mizutani, T., 2009. Novel reovirus



- isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet Microbiol.* 134, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.022>
- Salsman, J., Top, D., Boutilier, J., Duncan, R., 2005. Extensive Syncytium Formation Mediated by the Reovirus FAST Proteins Triggers Apoptosis-Induced Membrane Instability. *J Virol.* 79, 8090–8100. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8090-8100.2005>
- Sánchez-Cordón, P.J., Hervás, J., Lara, F.C. de, Jahn, J., Salguero, F.J., Gómez-Villamandos, J.C., 2002. Reovirus Infection in Psittacine Birds (*Psittacus erithacus*): Morphologic and Immunohistochemical Study. *Avian Dis.* 46, 485–492. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0485:RIIPBP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0485:RIIPBP]2.0.CO;2)
- Sellers, H.S., Linnemann, E.G., Pereira, L., Kapczynski, D.R., 2004. Phylogenetic Analysis of the Sigma 2 Protein Gene of Turkey Reoviruses. *Avian Dis.* 48, 651–657.
- Sharafeldin, T.A., Mor, S.K., Bekele, A.Z., Verma, H., Goyal, S.M., Porter, R.E., 2014. The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthrititis. *Avian Pathol.* 43, 371–378. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.940496>
- Sharafeldin, T.A., Mor, S.K., Verma, H., Bekele, A.Z., Ismagilova, L., Goyal, S.M., Porter, R.E., 2015. Pathogenicity of newly emergent turkey arthritis reoviruses in chickens. *Poult Sci.* 94, 2369–2374. <https://doi.org/10.3382/ps/pev233>
- Shmulevitz, M., Duncan, R., 2000. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* 19, 902–912. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.902>
- Souza, S.O., De Carli, S., Lunge, V.R., Ikuta, N., Canal, C.W., Pavarini, S.P., Driemeier, D., 2018. Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. *Poult Sci.* 97, 3550–3555. <https://doi.org/10.3382/ps/pey239>
- Spackman, E., Pantin-Jackwood, M., Day, J.M., Sellers, H., 2005. The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens. *Avian Pathol.* 34, 291–296. <https://doi.org/10.1080/03079450500178501>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang, Y., Lu, H., 2016. Whole genome alignment based one-step real-time RT-PCR for universal detection of avian orthoreoviruses of chicken, pheasant and turkey origins. *Infect Genet Evol.* 39, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.018>
- Tang, Y., Lu, H., 2015. Genomic characterization of a broiler reovirus field strain detected in Pennsylvania. *Infect Genet Evol.* 31, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.029>

- Tang, Y., Lu, H., Sebastian, A., Yeh, Y.T., Praul, C.A., Albert, I.U., Zheng, S.Y., 2015. Genomic characterization of a turkey reovirus field strain by Next-Generation Sequencing. *Infect Genet Evol.* 32, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.029>
- Tanyi, J., Glávits, R., Sályi, G., Rudas, P., Kósa, E., Szabo, J., 1994. Pancreatitis caused by reovirus in guinea-fowl. *Avian Pathol.* 23, 61–77. <https://doi.org/10.1080/03079459408418975>
- Tenorio, R., Fernández de Castro, I., Knowlton, J.J., Zamora, P.F., Sutherland, D.M., Risco, C., Dermody, T.S., 2019. Function, Architecture, and Biogenesis of Reovirus Replication Neorganelles. *Viruses.* 11, 288. <https://doi.org/10.3390/v11030288>
- Thalmann, C.M., Cummins, D.M., Yu, M., Lunt, R., Pritchard, L.I., Hansson, E., Cramer, S., Hyatt, A., Wang, L.F., 2010. Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat. *Virology.* 402, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.048>
- Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 94, 136–142. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047381-0>
- Troxler, S., Rigomier, P., Bilic, I., Liebhart, D., Prokofieva, I., Robineau, B., Hess, M., 2013. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. *Vet Rec.* 172, 556–556. <https://doi.org/10.1136/vr.101262>
- Ursu, K., Papp, H., Kisfali, P., Rigó, D., Melegh, B., Martella, V., Bányai, K., 2011. Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. *Avian Dis.* 55, 123–127. <https://doi.org/10.1637/9428-061610-RESNOTE.1>
- Ursu, K., Kisfali, P., Rigó, D., Ivanics, É., Erdélyi, K., Dán, Á., Melegh, B., Martella, V., Bányai, K., 2009. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol.* 154, 1365–1369. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0439-0>
- Vieler, E., Baumgärtner, W., Herbst, W., Köhler, G., 1994. Characterization of a reovirus isolate from a rattle snake, *Crotalus viridis*, with neurological dysfunction. *Arch Virol.* 138, 341–344. <https://doi.org/10.1007/BF01379136>
- Vreede, F.T., Cloete, M., Napier, G.B., van Dijk, A.A., Viljoen, G.J., 1998. Sequence-independent amplification and cloning of large dsRNA virus genome segments by poly(dA)-oligonucleotide ligation. *J Virol Methods.* 72, 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00031-7)

- Walker, E.R., Friedman, M.H., Olson, N.O., 1972. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res.* 41, 67–79. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(72\)90039-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(72)90039-1)
- Wang, D., Xu, F., Ma, G., Zhang, C., Huang, Y., Li, H., Zhang, D., 2012. Complete Genomic Sequence of a New Muscovy Duck-Origin Reovirus from China. *J Virol.* 86, 12445–12445. <https://doi.org/10.1128/JVI.02230-12>
- Wang, S., Chen, S., Cheng, X., Chen, S., Lin, F., Jiang, B., Zhu, X., Li, Z., Wang, J., 2014. L2 segment-based phylogenetic relationships among duck reoviruses from China. *Acta Virol.* 58, 296–298. [https://doi.org/10.4149/av\\_2014\\_03\\_296](https://doi.org/10.4149/av_2014_03_296)
- Wellehan, J.F.X., Childress, A.L., Marschang, R.E., Johnson, A.J., Lamirande, E.W., Roberts, J.F., Vickers, M.L., Gaskin, J.M., Jacobson, E.R., 2009. Consensus nested PCR amplification and sequencing of diverse reptilian, avian, and mammalian orthoreoviruses. *Vet Microbiol.* 133, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.011>
- Woźniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., Gawęł, A., 2014. Occurrence of reovirus infection in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) in south western Poland. *Pol J Vet Sci.* 17, 299–305. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0041>
- Yang, J., Tian, J., Chen, L., Tang, Y., Diao, Y., 2018. Isolation and genomic characterization of a novel chicken-origin orthoreovirus causing goslings hepatitis. *Vet Microbiol.* 227, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.017>
- Yu, K., Li, Y., Han, H., Song, M., Ma, X., Liu, C., Huang, B., Li, F., 2014. Complete Genome Sequence of an Avian Reovirus Isolated from Wild Mallard Ducks in China. *Genome Announc.* 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00813-14>
- Yun, T., Ye, W., Ni, Z., Chen, L., Yu, B., Hua, J., Zhang, Y., Zhang, C., 2012. Complete Genomic Sequence of Goose-Origin Reovirus from China. *J Virol.* 86, 10257–10257. <https://doi.org/10.1128/JVI.01692-12>
- Yun, T., Yu, B., Ni, Z., Ye, W., Chen, L., Hua, J., Zhang, C., 2013. Isolation and genomic characterization of a classical Muscovy duck reovirus isolated in Zhejiang, China. *Infect Genet Evol.* 20, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.004>
- Zhang, X., Lei, X., Ma, L., Wu, J., Bao, E., 2019. Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China. *Poult Sci.* 98, 5321–5329. <https://doi.org/10.3382/ps/pez319>
- Zhang, Y., Liu, M., Hu, Q., Ouyang, S., Tong, G., 2006. Characterization of the  $\sigma$ C-encoding Gene from Muscovy Duck Reovirus. *Virus Genes* 32, 165–170. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-6872-6>
- Zhu, Y., Li, C., Bi, Z., Chen, Z., Meng, C., Wang, G.J., Ding, C., Liu, G., 2015. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of the sigma C gene

of novel duck reovirus. *Vet. Immunol Immunopathol* 165, 88–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.03.001>

## 10. Közlemények listája

### 10.1. A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Kugler, R., Marschang, R., Ihász, K., Lengyel, G., Jakab, F., Bányai, K., Farkas, S. (2016) **Whole genome characterization of a chelonian orthoreovirus strain identifies significant genetic diversity and may classify reptile orthoreoviruses into distinct species.** Virus Research. 215. 94–98. 2016. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.02.005>

Farkas, S., Varga-Kugler, R., Marton, S., Lengyel, G., Palya, V., Bányai, K.: **Genomic sequence and phylogenetic analyses of two novel orthoreovirus strains isolated from Pekin ducks in 2014 in Germany.** Virus Research. 257. 57–62. 2018. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.09.001>

Varga-Kugler, R., Palya, V., Farkas, S., Bányai, K.: **Víziszárnyasok reovírus-fertőzései.** Magyar Állatorvosok Lapja. 142. 387-396. 2020.

### 10.2. A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

Marschang, R., Ihász, K., Kugler, R., Lengyel, G., Fehér, E., Marton, S., Bányai, K., Aqrawi, T., Farkas, S. (2016). **Development of a consensus reverse transcription polymerase chain reaction assay for the specific detection of tortoise picornaviruses.** J Vet Diagn Invest. 28. 309–314. <http://doi.org/10.1177/1040638716628584>

Kugler, R., Dandár, E., Fehér, E., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K., Farkas, S. (2016). **Phylogenetic analysis of a novel reassortant orthoreovirus strain detected in partridge (*Perdix perdix*).** Virus Res. 215. 99–103. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.11.018>

Farkas, S., Marton, S., Dandár, E., Kugler, R., Gál, B., Jakab, F., Bálint, A., Kecskeméti, S., Bányai, K. (2016). **Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses.** Sci Rep. 6. 36960 <http://doi.org/10.1038/srep36960>

Marton, S., Dóró, R., Fehér, E., Forró, B., Ihász, K., Varga-Kugler, R., Farkas, S., Bányai, K. (2017). **Whole genome sequencing of a rare rotavirus from archived stool sample demonstrates independent zoonotic origin of human G8P[14] strains in Hungary.** Virus Res. 227. 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.012>

Fehér, E., Kemenesi, G., Oldal, M., Kurucz, K., Kugler, R., Farkas, S., Marton, S., Horváth, G., Bányai, K., Jakab, F. (2017). **Isolation and complete genome characterization of novel reassortant orthoreovirus from common vole (*Microtus arvalis*)**. *Virus Genes*. 53(2). 307–311. <http://doi.org/10.1007/s11262-016-1411-1>

Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., Jakab, F. (2017). **Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia**. *Infect Genet Evol*. 48. 19–26. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>

Martella, V., Lanave, G., Mihalov-Kovács, E., Marton, S., Varga-Kugler, R., Kaszab, E., Di Martino, B., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia C., Bányai, K. (2018). **Novel parvovirus related to primate bufaviruses in dogs**. *Emerg Infect Dis*. 24(6), 1061–1068. <http://doi.org/10.3201/eid2406.171965>

## 11. Ábrák és táblázatok jegyzéke

### 11.1. Ábrák

1. <b>ábra</b> Orthoreovírusok filogenetikai törzsfája .....	12
2. <b>ábra</b> Az orthoreovírusok virionjának felépítése.....	13
3. <b>ábra</b> Az orthoreovírus fajok 5' terminális konszenzus szekvenciái .....	14
4. <b>ábra</b> Az emlős, hüllő és madár orthoreovírusok genomszerveződésének sematikus ábrája .....	15
5. <b>ábra</b> Reovírus bejutása gazdasejtbe endocitózis segítségével.....	17
6. <b>ábra</b> A reovírusok replikációjának sematikus ábrája.....	18
7. <b>ábra</b> Reovírus fertőzés tünetei és makroszkópos elváltozások háziatyúkban.....	21
8. <b>ábra</b> Reovírus fertőzés okozta elhalásos góccok házilúd májában, szívburok- és légzsákgyulladás .....	24
9. <b>ábra</b> Reovírus fertőzés okozta elváltozások házilúd lábában .....	25
10. <b>ábra</b> Különböző, madár eredetű reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciái alapján készített nukleinsav alapú filogenetikai fák.....	27
11. <b>ábra</b> Víziszárnyas és egyéb madárfajokból származó reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból készített nukleinsav alapú filogenetikai fák.....	44
12. <b>ábra</b> Különböző madárfajokból származó reovírusok genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból készített nukleinsav alapú filogenetikai fák. ....	52
13. <b>ábra</b> VH-2 sejtek sejtenyészetben.....	56
14. <b>ábra</b> Különböző orthoreovírus fajok megfelelő genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból, maximum-likelihood módszerrel készített törzsfák. ....	58
15. <b>ábra</b> Hüllő reovírus törzsek konkatenált genomjából, maximum-likelihood módszerrel készített törzsfák .....	60
16. <b>ábra</b> Hüllő reovírus gének nukleotid és aminosav szekvenciáinak azonossági értékei. ....	62

## 11.2. Táblázatok

<b>1. táblázat.</b> Az orthoreovírusok fehérjéi .....	16
<b>2. táblázat.</b> A vizsgált madár reovírus törzsek jellemzői .....	32
<b>3. táblázat.</b> A vizsgált hüllő reovírus törzsek jellemzői .....	32
<b>4. táblázat.</b> A nagy felbontású olvadáspont analízis során felhasznált oligonukleotidok .....	40
<b>5. táblázat.</b> A D2533/4/1-10 törzs genomjának általános jellemzői .....	41
<b>6. táblázat.</b> A D2533/4/1-10 törzs azonossági adatai más víziszárnyas (WRV), illetve madár (ARV) reovírus törzsekkel. ....	43
<b>7. táblázat.</b> A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek genomjának általános jellemzői.....	46
<b>8. táblázat.</b> A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek azonossági adatai más víziszárnyas (WRV) és madár reovírus (ARV) törzsekkel, valamint az Ych törzssel .....	48
<b>9. táblázat.</b> A D1996/2/1 és 216/2015 törzsek genomjának általános jellemzői.....	49
<b>10. táblázat.</b> A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 törzs azonossági adatai más madár reovírus (ARV) törzsekkel. ....	51
<b>11. táblázat.</b> A D1996/2/1 törzs azonossági adatai más madár reovírus (ARV), illetve vadmadár reovírus (NeARV) törzsekkel. ....	55
<b>12. táblázat.</b> A vizsgált hüllő reovírus törzsek genomszekvenciáinak általános jellemzői.....	57
<b>13. táblázat.</b> Hüllő reovírusok kódoló szekvenciáinak más reovírus fajok homológ génszekvenciáival történő összehasonlításának nukleotid azonossági értékei. ...	59
<b>14. táblázat.</b> Hüllő reovírusok kódoló szekvenciáinak más reovírus fajok homológ génszekvenciáival történő összehasonlításának aminosav azonossági értékei....	60



## 12. Mellékletek

### 1. melléklet. Génbanki azonosítók

A dolgozatban használt génbanki szekvenciák azonosítói.

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
091	házikacsa ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	Kína	λA	JX478250
			λB	JX478251
			λC	JX478252
			μA	JX478253
			μB	JX478254
			μNS	JX478255
			σA	JX478257
			σB	JX478258
			σC	JX478256
			σNS	JX478259
1733	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	USA	λA	KF741706
			λB	KF741707
			λC	KF741708
			μA	KF741709
			μB	KF741710
			μNS	KF741711
			σA	KF741713
			σB	KF741714
			σC	KF741712
			σNS	KF741715
03G	házilúd ( <i>Anser anser domestica</i> )	Kína	λA	JX145328
			λB	JX145329
			λC	JX145330
			μA	JX145331
			μB	JX145332
			μNS	JX145333
			σA	JX145335
			σB	JX145336
			σC	JX145334
			σNS	JX145337

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
13649/14	fácán ( <i>Phasianus colchicus</i> )	USA	λA	KT954542
			λB	KT954543
			λC	KT954544
			μA	KT954545
			μB	KT954546
			μNS	KT954547
			σA	KT954549
			σB	KT954550
			σC	KT954548
			σNS	KT954551
1981M09	pulyka ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	Magyar- ország	λA	KR997899
			λB	KR997901
			λC	KR997900
			μA	KR997902
			μB	KR997903
			μNS	KR997904
			σA	KR997906
			σB	KR997907
			σC	KR997905
			σNS	KR997908
22342/13	pulyka ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	USA	λA	KP173683
			λB	KP173684
			λC	KP173685
			μA	KP173686
			μB	KP173687
			μNS	KP173688
			σA	KP173690
			σB	KP173691
			σC	KP173689
			σNS	KP173692
815-12	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Kína	λA	KC508647
			λB	KC508648
			λC	KC508649
			μA	KC508650
			μB	KC508651
			μNS	KC508652
			σA	KC508653
			σB	KC508654
			σC	KC508656
σNS	KC508655			

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
<b>AVS-B</b>	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	USA	λA	FR694191
			λB	FR694192
			λC	FR694193
			μA	FR694194
			μB	FR694195
			μNS	FR694196
			σA	FR694198
			σB	FR694199
			σC	FR694197
			σNS	FR694200
<b>BRV</b>	sárgás pávián ( <i>Papio cynocephalus</i> )	USA	λA	NC_015879
			λB	NC_015878
			λC	NC_015877
			μA	NC_015880
			μB	NC_015881
			μNS	NC_015882
			σA	NC_015883
			σB	NC_015884
			σNS	NC_015886
			<b>D1007</b>	fogoly ( <i>Perdix perdix</i> )
λB	KR476800			
λC	KR476799			
μA	KR476801			
μB	KR476802			
μNS	KR476803			
σA	KR476805			
σB	KR476806			
σC	KR476804			
σNS	KR476807			
<b>D1246</b>	pulyka ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	Magyarország	λA	KR997909
			λB	KR997911
			λC	KR997910
			μA	KR997912
			μB	KR997913
			μNS	KR997914
			σA	KR997916
			σB	KR997917
			σC	KR997915
			σNS	KR997918

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
D1546	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Franciaország	λA	KJ871017
			λB	KJ871018
			λC	KJ871019
			μA	KJ871020
			μB	KJ871021
			μNS	KJ871022
			σA	KJ871023
			σB	KJ871024
			σC	KJ871026
			σNS	KJ871025
D20/99	házilúd ( <i>Anser anser domestica</i> )	Magyarország	λA	KF809662
			λB	KF809663
			λC	KF809664
			μA	KF809665
			μB	KF809666
			μNS	KF809667
			σA	KF809669
			σB	KF809670
			σC	KF809668
			σNS	KF809671
D2044	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Franciaország	λA	KJ871007
			λB	KJ871008
			λC	KJ871009
			μA	KJ871010
			μB	KJ871011
			μNS	KJ871012
			σA	KJ871013
			σB	KJ871014
			σC	KJ871016
			σNS	KJ871015
Guangxi R1	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Kína	λA	KC183748
			λB	KC183749
			λC	KC183750
			μA	KC183751
			μB	KC183752
			μNS	KC183743
			σA	KC183745
			σB	KC183746
			σC	KC183744
			σNS	KC183747

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
<b>GX110058</b>	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Kína	λA	KF741736
			λB	KF741737
			λC	KF741738
			μA	KF741739
			μB	KF741740
			μNS	KF741741
			σA	KF741743
			σB	KF741744
			σC	KF741742
			σNS	KF741745
<b>J18</b>	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Kína	λA	JX478260
			λB	JX478261
			λC	JX478262
			μA	JX478263
			μB	JX478264
			μNS	JX478265
			σA	JX478267
			σB	JX478268
			σC	JX478266
			σNS	JX478269
<b>MAHLV 0624</b>	<i>Eucampsipoda africana</i>	Dél-afrikai Köztársaság	λA	KU198612
			λB	KU198614
			λC	KU198613
			μA	KU198615
			μB	KU198616
			μNS	KU198617
			σA	KU198618
			σB	KU198619
			σNS	KU198620
			<b>MAHLV 2511</b>	<i>Eucampsipoda africana</i>
λB	NC_029912			
λC	NC_029911			
μA	NC_029913			
μB	NC_029918			
μNS	NC_029914			
σA	NC_029915			
σB	NC_029919			
σNS	NC_029916			

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
<b>MRV 1 Lang</b>	humán	USA	λA	AF129820
			λB	REO1LAM3P
			λC	AF378003
			μA	AF461682
			μB	REO1M2
			μNS	AF174382
			σA	REO1MCPS2A
			σB	REOMCPS4
			σC	REOS1A
			σNS	REONSS3
<b>MRV 2 Jones</b>	humán	USA	λA	AF129821
			λB	REO2LAM3P
			λC	AF378005
			μA	AY428874
			μB	REO2M2
			μNS	AF174383
			σA	REO2MCPS2A
			σB	DQ220019
			σC	REO2SIG1
			σNS	REOS3NSB
<b>MRV 3 Dearing</b>	humán	USA	λA	NC_013229
			λB	NC_013225
			λC	NC_013226
			μA	NC_013227
			μB	NC_013228
			μNS	NC_013230
			σA	NC_013232
			σB	NC_013234
			σC	NC_013231
			σNS	NC_013233
<b>NBV</b>	szürkefejű repülőkutya ( <i>Pteropus poliocephalus</i> )	Ausztrália	λA	JF342674
			λB	JF342673
			λC	JF342672
			μA	JF342675
			μB	JF342676
			μNS	JF342677
			σA	AF059718
			σB	AF059722
			σC	AF218360
			σNS	AF059726

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
NP03	házikacsa ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	Kína	λA	KC312700
			λB	KC312701
			λC	KC312702
			μA	JF320802
			μB	JF320801
			μNS	JF320800
			σA	JF320803
			σB	GQ888710
			σC	KC312699
			σNS	GU338025
PRV ADLPRV3	ezüstlazac ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	Chile	λA	MH229778
			λB	MH229776
			λC	MH229777
			μA	MH229779
			μB	MH229780
			μNS	MH229781
			σA	MH229783
			σB	MH229785
			σC	MH229782
			σNS	MH229784
PRV CGA280-05	atlanti lazac ( <i>Salmo salar</i> )	Chile	λA	NC_036476
			λB	NC_036477
			λC	NC_036468
			μA	NC_036469
			μB	NC_036470
			μNS	NC_036471
			σA	NC_036473
			σB	NC_036472
			σC	NC_036475
			σNS	NC_036474
Pulau	változékony repülőkutya ( <i>Pteropus hypomelanus</i> )	Malajzia	λA	NC_038662
			λB	NC_038660
			λC	NC_038665
			μA	NC_038661
			μB	NC_038664
			μNS	NC_038666
			σA	NC_038659
			σB	NC_038658
			σC	NC_038667
			σNS	NC_038663

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
<b>Pycno-1</b>	Orfeusz bülbül ( <i>Hypsipetes amaurotis</i> )	Japán	λA	AB914760
			λB	AB914761
			λC	AB914762
			μA	AB914763
			μB	AB914764
			μNS	AB914765
			σA	AB914767
			σB	AB914768
			σC	AB914766
			σNS	AB914769
<b>RRV 47/02</b>	bozótvipera ( <i>Atheris squamigera</i> )	Német-ország	λA	KC852153
			λB	KC852154
			λC	KC852155
			μA	KC852156
			μB	KC852157
			μNS	KC852158
			σA	KC852159
			σB	KC852160
			σC	KC852161
			σNS	KC852162
<b>S1133</b>	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	USA	λA	KF741766
			λB	KF741767
			λC	KF741768
			μA	KF741769
			μB	KF741770
			μNS	KF741771
			σA	KF741773
			σB	KF741774
			σC	KF741772
			σNS	KF741695
<b>SD12</b>	tőkés réce ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	Kína	λA	KJ879924
			λB	KJ879925
			λC	KJ879926
			μA	KJ879927
			μB	KJ879928
			μNS	KJ879929
			σA	KJ879931
			σB	KJ879932
			σC	KJ879930
			σNS	KJ879933



Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
T1781	házityúk ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Magyarország	λA	KC865786
			λB	KC865787
			λC	KC865788
			μA	KC865789
			μB	KC865790
			μNS	KC865791
			σA	KC865793
			σB	KC865794
			σC	KC865792
			σNS	KC865795
TARV-MN4	pulyka ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	USA	λA	KJ865904
			λB	KJ865894
			λC	KJ865884
			μA	KJ874309
			μB	KJ874286
			μNS	KJ874263
			σA	KF872248
			σB	KF872257
			σC	KF872235
			σNS	KF872272
TERV-MN1	pulyka ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	USA	λA	KJ865910
			λB	KJ865900
			λC	KJ865890
			μA	KJ874319
			μB	KJ874296
			μNS	KJ874273
			σA	KJ700480
			σB	KJ700481
			σC	KJ700479
			σNS	KJ700478
TH11	házikacsa ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	Kína	λA	KC493572
			λB	KC493573
			λC	KC493574
			μA	JX440513
			μB	JX440514
			μNS	JX440512
			σA	JQ664689
			σB	JX826588
			σC	KC493571
			σNS	JX826589

Törzs	Gazdafaj	Izolálás helye	Kódolt fehérje	Azonosító
TVAV	dolmányos varjú ( <i>Corvus corone cornix</i> )	Finnország	λA	KF692089
			λB	KF692090
			λC	KF692091
			μA	KF692092
			μB	KF692093
			μNS	KF692094
			σA	KF692096
			σB	KF692097
			σC	KF692095
			σNS	KF692098
Ych	házikacsa ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	Kína	λA	MK173029
			λB	MK173030
			λC	MK173031
			μA	MK173032
			μB	MK173033
			μNS	MK173034
			σA	MK173036
			σB	MK173037
			σC	MK173035
			σNS	MK173038
ZJ00M	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Kína	λA	KF154110
			λB	KF154111
			λC	KF154112
			μA	KF154113
			μB	KF154114
			μNS	KF154115
			σA	KF154117
			σB	KF154118
			σC	KF154116
			σNS	KF154119
ZJ2000M	pézsmakacsa ( <i>Cairina moschata</i> )	Kína	λA	KF306082
			λB	KF306083
			λC	KF306084
			μA	KF306085
			μB	KF306086
			μNS	KF306087
			σA	KF306088
			σB	KF306089
			σC	KF306091
			σNS	KF306090

## 2. melléklet. Víziszárnyas reovírus törzsek

A dolgozatban vizsgált víziszárnyas reovírus törzsek genomszekvenciáinak általános jellemzői törzsenkénti bontásban

### D2533/4/1-10

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)	Génbanki azonosító
		5' UTR	ORF	3' UTR			
L1 / λA	3958	20	3882	56	GCUUUU/UUCAUC	1293	MH520075
L2 / λC	3907	12	3858	37		1285	MH520076
L3 / λB	3829	13	3780	36		1259	MH520077
M1 / μA	2284	13	2199	72		732	MH520078
M2 / μB	2158	29	2031	98		676	MH520079
M3 / μNS	1997	25	1908	64		635	MH520080
S1 / p10	1568	19	294	32		97	MH520081
/ p17			489			162	
/ σC			969			322	
S2 / σA	1324	15	1251	58		416	MH520082
S3 / σB	1202	30	1104	68	367	MH520083	
S4 / σNS	1191	23	1104	64	367	MH520084	

### D2533/6/1-10

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)	Génbanki azonosító
		5' UTR	ORF	3' UTR			
L1 / λA	3998	20	3921	57	GCUUUU/UUCAUC	1306	MH520085
L2 / λC	3896	12	3852	32		1283	MH520086
L3 / λB	3825	13	3780	32		1259	MH520087
M1 / μA	2279	12	2196	71		731	MH520088
M2 / μB	2150	30	2022	98		673	MH520089
M3 / μNS	1990	21	1908	61		635	MH520090
S1 / p10	1573	22	282	34		93	MH520091
/ p17			369			122	
/ σC			1014			337	
S2 / σA	1325	15	1251	59		416	MH520092
S3 / σB	1201	30	1104	67	367	MH520093	
S4 / σNS	1190	23	1104	63	367	MH520094	

Reo/HUN/DuckDV/2019

Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)
		5' UTR	ORF	3' UTR		
<b>L1 / λA</b>	3998	20	3921	57		1306
<b>L2 / λC</b>	3899	12	3855	32		1284
<b>L3 / λB</b>	3825	13	3780	32		1259
<b>M1 / μA</b>	2282	12	2199	71		732
<b>M2 / μB</b>	2150	30	2022	98		673
<b>M3 / μNS</b>	1990	21	1908	61	GCUUUU/UUCAUC	635
<b>S1 / p10</b>	1573	22	282	34		93
/ p17			369			122
/ σC			1014			337
<b>S2 / σA</b>	1325	15	1251	59		416
<b>S3 / σB</b>	1201	30	1104	67		367
<b>S4 / σNS</b>	1190	23	1104	63		367

### 3. melléklet. Hüllő reovírus törzsek

A dolgozatban vizsgált hüllő reovírus törzsek genomszekvenciáinak általános jellemzői törzsenkénti bontásban

	Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)	Génbanki azonosító
			5' UTR	ORF	3' UTR			
CH1197/96	L1 / $\lambda$ A	3970	13	3870	87	GUUCUU/UUCAUC	1289	KT696547
	L2 / $\lambda$ C	3928	14	3870	44	GUUCUU/UUCAUC	1289	KT696548
	L3 / $\lambda$ B	3852	14	3786	52	GUUCUU/UUCAUC	1261	KT696549
	M1 / $\mu$ NS	2435	27	2334	74	GUUCUU/UUCAUC	777	KT696550
	M2 / $\mu$ A	2347	13	2283	51	GUUCUU/UUCAUC	760	KT696551
	M3 / $\mu$ B	2120	27	2022	71	GUUCUU/UUCAUC	673	KT696552
	S1 / p14 / $\sigma$ C	1509	23	408 1050	66	GUUCAU/UUCAUC	135 349	KT696553
	S2 / $\sigma$ A	1315	12	1251	52	GUUCUU/UUCAUC	416	KT696554
	S3 / $\sigma$ B	1274	31	1176	67	GUUCUU/UUCAUC	391	KT696555
	S4 / $\sigma$ NS	1207	25	1113	69	GUUCAU/UUCAUC	370	KT696556
	2013/12	L1 / $\lambda$ A	3970	13	3873	84	GUUCUU/UUCAUC	1290
L2 / $\lambda$ C		3933	14	3870	49	GUUCUU/UUCAUC	1289	MN313189
L3 / $\lambda$ B		3847	14	3786	47	GUUCUU/UUCAUC	1261	MN313190
M1 / $\mu$ NS		2486	27	2379	80	GUUAAU/UUCAUC	792	MN313191
M2 / $\mu$ A		2349	13	2232	104	GUUCUU/UUCAUC	743	MN313192
M3 / $\mu$ B		2134	26	2034	74	GUUAAU/UUCAUC	677	MN313193
S1 / p14 / $\sigma$ C		1499	22	378 1050	66	GUUAAU/UUCAUC	125 349	MN313194
S2 / $\sigma$ A		1314	12	1251	51	GUUAAU/UUCAUC	416	MN313195
S3 / $\sigma$ B		1282	31	1164	87	GUUAAU/UUCAUC	387	MN313196
S4 / $\sigma$ NS		1212	25	1113	74	GUUAAU/UUCAUC	370	MN313197
2013/54		L1 / $\lambda$ A	3970	13	3873	84	GUUCUU/UUCAUC	1290
	L2 / $\lambda$ C	3901	14	3846	41	GUUCUU/UUCAUC	1281	MN313199
	L3 / $\lambda$ B	3847	14	3786	47	GUUCUU/UUCAUC	1261	MN313200
	M1 / $\mu$ NS	2484	27	2379	78	GUUAAU/UUCAUC	792	MN313201
	M2 / $\mu$ A	2349	14	2277	58	GUUAAU/UUCAUC	758	MN313202
	M3 / $\mu$ B	2130	26	2031	73	GUUAAU/UUCAUC	676	MN313203
	S1 / p14 / $\sigma$ C	1503	22	360 1050	70	GUUAAU/UUCAUC	119 349	MN313204
	S2 / $\sigma$ A	1314	12	1251	51	GUUAAU/UUCAUC	416	MN313205
	S3 / $\sigma$ B	1281	31	1164	86	GUUAAU/UUCAUC	387	MN313206
	S4 / $\sigma$ NS	1211	24	1113	74	GUUAAU/UUCAUC	370	MN313207

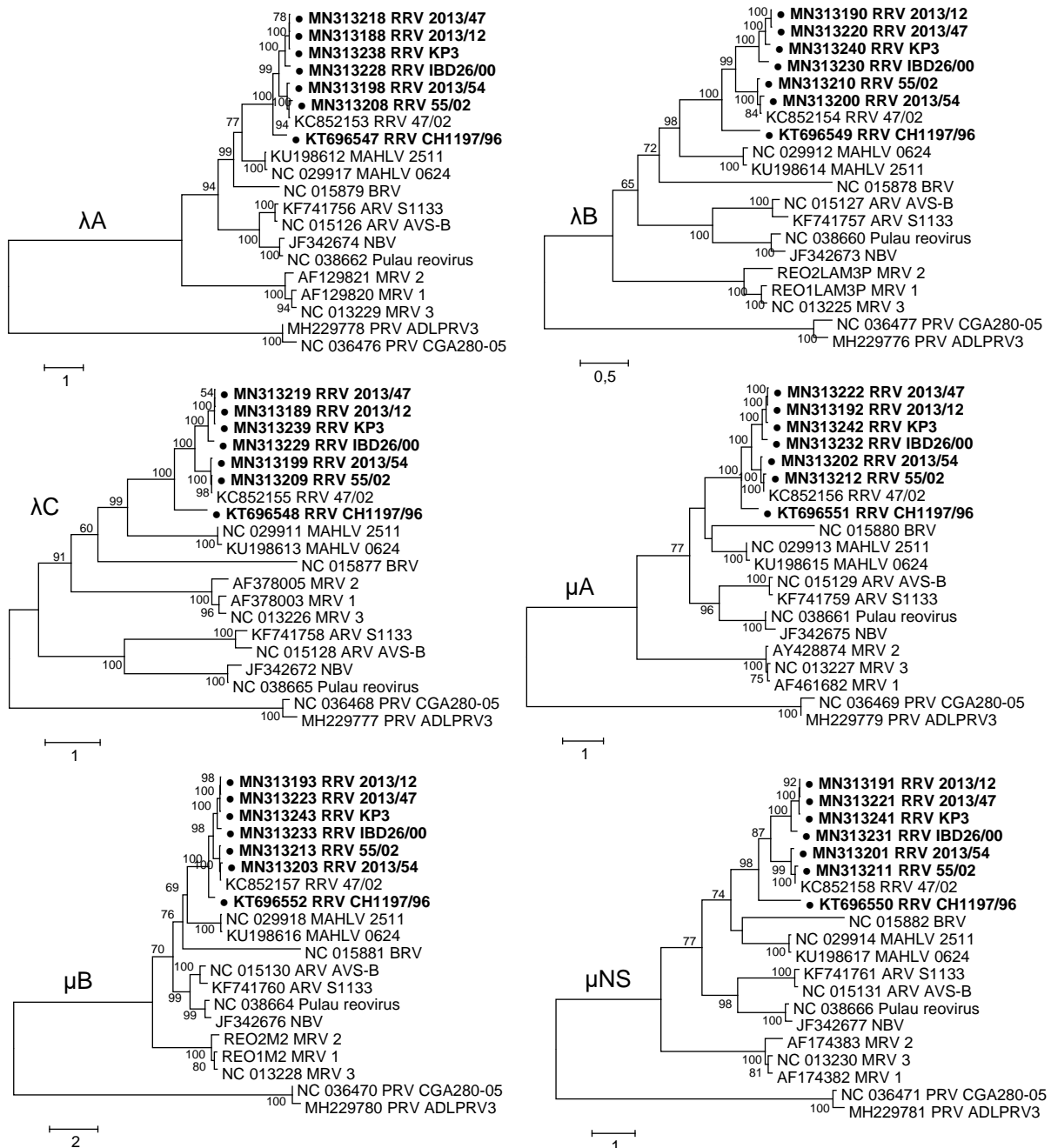
	Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)	Génbanki azonosító
			5' UTR	ORF	3' UTR			
55/02	L1 / λA	3970	13	3873	84	GUUCUU/UUCAUC	1290	MN313208
	L2 / λC	3901	14	3846	41	GUUCUU/UUCAUC	1281	MN313209
	L3 / λB	3847	14	3786	47	GUUCUU/UUCAUC	1261	MN313210
	M1 / μNS	2487	27	2379	81	GUUAUU/UUCAUC	792	MN313211
	M2 / μA	2347	13	2283	51	GUUAUU/UUCAUC	760	MN313212
	M3 / μB	2130	26	2031	73	GUUAUU/UUCAUC	676	MN313213
	S1 / p14 / σC	1502	22	360 1050	69	GUUAUU/UUCAUC	119 349	MN313214
	S2 / σA	1314	12	1251	51	GUUAUU/UUCAUC	416	MN313215
	S3 / σB	1281	31	1164	86	GUUAUU/UUCAUC	387	MN313216
	S4 / σNS	1211	24	1113	74	GUUAUU/UUCAUC	370	MN313217
2013/47	L1 / λA	3967	13	3870	84	GUUCUU/UUCAUC	1289	MN313218
	L2 / λC	3933	14	3870	49	GUUCUU/UUCAUC	1289	MN313219
	L3 / λB	3847	14	3786	47	GUUCUU/UUCAUC	1261	MN313220
	M1 / μNS	2480	27	2373	80	GUUAUU/UUCAUC	790	MN313221
	M2 / μA	2339	13	2268	58	GUUCUU/UUCAUC	755	MN313222
	M3 / μB	2134	26	2034	74	GUUAUU/UUCAUC	677	MN313223
	S1 / p14 / σC	1499	22	378 1050	66	GUUAUU/UUCAUC	125 349	MN313224
	S2 / σA	1314	12	1251	51	GUUAUU/UUCAUC	416	MN313225
	S3 / σB	1279	31	1161	87	GUUAUU/UUCAUC	386	MN313226
	S4 / σNS	1209	25	1110	74	GUUAUU/UUCAUC	369	MN313227
IBD26/00	L1 / λA	3970	13	3873	84	GUUCUU/UUCAUC	1290	MN313228
	L2 / λC	3933	14	3870	49	GUUCUU/UUCAUC	1289	MN313229
	L3 / λB	3849	16	3786	47	GUUAUU/UUCAUC	1261	MN313230
	M1 / μNS	2488	27	2382	79	GUUAUU/UUCAUC	793	MN313231
	M2 / μA	2345	13	2274	58	GUUCUU/UUCAUC	757	MN313232
	M3 / μB	2134	26	2034	74	GUUAUU/UUCAUC	677	MN313233
	S1 / p14 / σC	1500	23	381 1053	66	GUUAUU/UUCAUC	126 350	MN313234
	S2 / σA	1314	12	1251	51	GUUAUU/UUCAUC	416	MN313235
	S3 / σB	1288	31	1170	87	GUUAUU/UUCAUC	389	MN313236
	S4 / σNS	1212	25	1113	74	GUUAUU/UUCAUC	370	MN313237

	Szegmens/ fehérje	Méret (nt)	Hossz (nt)			5' és 3' végszekvenciák	Fehérje- méret (as)	Génbanki azonosító
			5' UTR	ORF	3' UTR			
	<b>L1 / λA</b>	3970	13	3873	84	GUUCUU/UUCAUC	1290	MN313238
	<b>L2 / λC</b>	3909	14	3846	49	GUUCUU/UUCAUC	1281	MN313239
	<b>L3 / λB</b>	3847	14	3786	47	GUUCUU/UUCAUC	1261	MN313240
	<b>M1 / μNS</b>	2486	27	2379	80	GUUAUU/UUCAUC	792	MN313241
<b>KP3</b>	<b>M2 / μA</b>	2348	13	2277	58	GUUCUU/UUCAUC	758	MN313242
	<b>M3 / μB</b>	2133	26	2034	73	GUUAUU/UUCAUC	677	MN313243
	<b>S1 / p14</b>	1499	22	378	66	GUUAUU/UUCAUC	125	MN313244
	<b>/ σC</b>			1050			349	
	<b>S2 / σA</b>	1314	12	1251	51	GUUAUU/UUCAUC	416	MN313245
	<b>S3 / σB</b>	1282	31	1164	87	GUUAUU/UUCAUC	387	MN313246
	<b>S4 / σNS</b>	1212	25	1113	74	GUUAUU/UUCAUC	370	MN313247

#### 4. melléklet. Orthoreovírus törzsfák

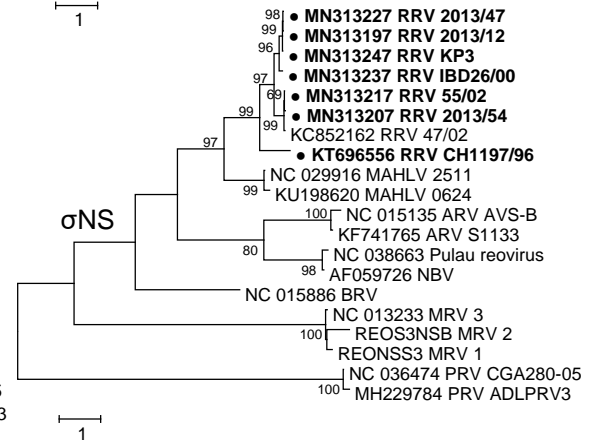
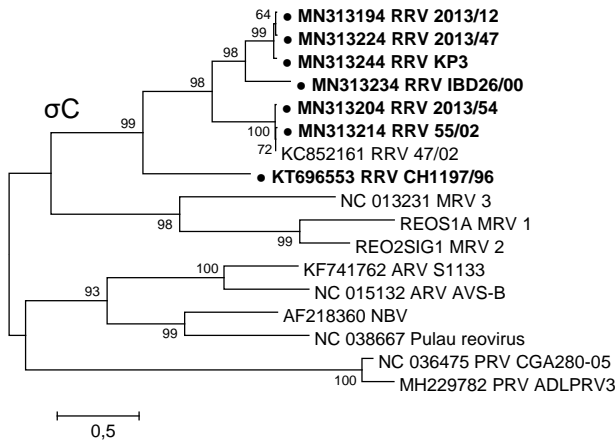
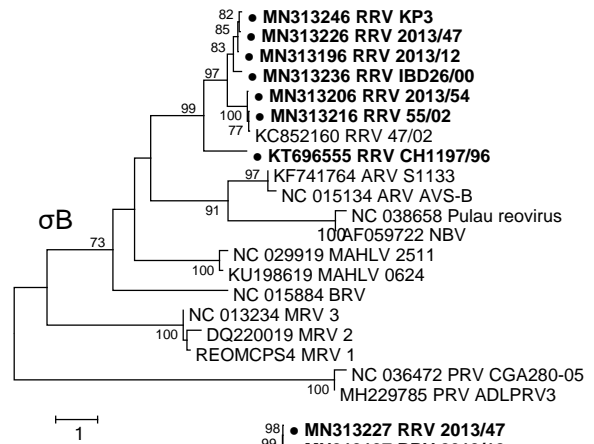
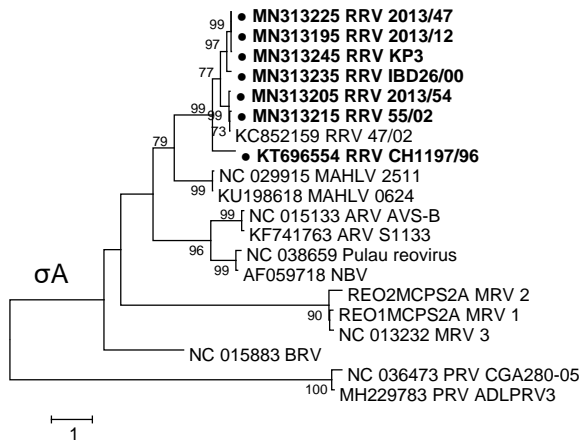
Különböző orthoreovírus fajok megfelelő genomszegmenseinek kódoló szekvenciáiból készített, gyökér nélküli törzsfák.

A filogenetikai fákat maximum-likelihood módszerrel generáltuk, az egyes génekre a Mega6 program által kiválasztott legjobban illeszkedő modell alapján. Megbízhatóságukat bootstrap analízissel ellenőriztük, 100 ismétléssel. Rövidítések: ARV - madár orthoreovírus, BRV - pávián orthoreovírus, MAHLV - Mahlapitsi orthoreovírus, MRV - emlős orthoreovírus, NBV - denevér orthoreovírus, PRV - hal orthoreovírus, RRV - hüllő orthoreovírus.





#### 4. melléklet folytatás



### 13. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Farkas Szilviának, hogy lehetőséget teremtett a doktori munkám végzéséhez, tanácsaival, véleményével végig segített ezen (a végül igencsak hosszúra nyúlt) időszak alatt. Külön köszönet illeti dr. Bányai Krisztiánt, hogy megtisztelt bizalmával, és helyet biztosított számomra témacsoportjában, megteremtve ezzel folyamatos szakmai fejlődésem lehetőségét.

Köszönöm dr. Rachel Marschangnak és dr. Palya Vilmosnak az átadott mintákat, valamint Borzák Rékának és Ihász Katának, hogy izolálták a hüllő reovírusokat. Dr. Palya Vilmosnak külön köszönöm a fényképeket, amelyekkel szemléletesebbé tudtam tenni a leírtakat.

Köszönöm az Új kórokozók témacsoport minden egykori és jelenlegi munkatársának, valamint Mónak és Kicsi Reninek, hogy örömmel mehettem/mehetek be minden nap dolgozni, hogy nincs hülye kérdés, és hogy mindig van segítség (különös tekintettel a számolásokra). Külön kiemelve Esztit, Katát és legfőképp a legcsodásabb szobatársat, Enit, akikre mindig mindenben számíthatok, nem csak a munkában.

Hálásan köszönöm a családomnak, hogy nyugodt és kiegyensúlyozott háttérrel biztosítanak számomra. Köszönöm a férjemnek, Janinak, hogy higgadt optimizmusával mindig átlendített a nehéz időszakokon, és már akkor is előre büszke volt rám, amikor én még nem láttam a doktori munka végét. Köszönöm édesanyámnak és férjem édesanyjának, hogy olyan sokat vigyáztak a gyerekekre, nélkülük tényleg nem született volna meg ez a dolgozat. És végül, de nem utolsósorban köszönöm kislányomnak és kisfiamnak, hogy egy kis időt azért mindig hagytak nekem munkára.