

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar  
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Vadon élő rágcsálókban és a sertésekben előforduló kettes típusú  
circovírusok változékonysága**

**Készítette:** Bedi Dóra

**Témavezető:** dr. Lőrincz Márta  
SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest, 2015

# Tartalom

|   |    |
|---|----|
| 1. Rövidítések jegyzéke .....   | 4  |
| 2. Bevezetés.....   | 5  |
| 3. Irodalmi áttekintés .....  | 6  |
| 3.1. A <i>Circoviridae</i> család.....  | 6  |
| 3.2. Sertés circovírus .....  | 6  |
| 3.2.1. Egyes típusú sertés circovírus.....  | 6  |
| 3.2.2. Kettes típusú sertés circovírus.....   | 7  |
| 3.2.2.1. Genomszerkeze .....  | 7  |
| 3.3. A kettes típusú sertés circovírus genetikai változékonysága .....                  | 8  |
| 3.3.1. Felfedezés és előfordulás .....  | 8  |
| 3.3.2. Sertés circovírus 2 csoportosítása.....  | 8  |
| 3.3.3. A kettes típusú sertés circovírus helyzete Közép-Európában.....                  | 11 |
| 3.3.4. A kettes típusú sertés circovírus helyzetének alakulása a vakcinázás hatására .. | 13 |
| 3.3.5. Sertés circovírusok más állatfajokban.....                                       | 13 |
| 4. Anyag és módszer .....   | 15 |
| 4.1. A vizsgálati minták származása .....   | 15 |
| 4.2. Vírus nukleinsav kivonása patkány szervmintákból .....                             | 15 |
| 4.3. Vírus nukleinsav amplifikálás.....   | 16 |
| 4.4. A PCR termékek ellenőrzése, elő-amplifikálása, DNS tisztítása.....                 | 18 |
| 4.4.1. Termékek agarózgél elektroforézise .....   | 18 |
| 4.4.2. Elő- amplifikáció.....   | 18 |
| 4.4.3. Fragmentek tisztítása .....  | 19 |
| 4.5. A szekvenciák elemzése.....  | 20 |
| 5. Eredmények .....   | 21 |
| 5.1. PCV2 genetikai változásai .....  | 21 |
| 5.1.1. PCR eredmények .....   | 21 |
| 5.1.2. A szekvenálás eredménye.....   | 21 |
| 5.1.3. Közép-Európát érintő filogenetikai vizsgálat.....                                | 21 |
| 5.2. Sertés circovírusok kapcsolata befogott rágcsálókkal .....                         | 25 |
| 5.2.1. PCR eredmények befogott rágcsálók esetében .....                                 | 25 |
| 6. Megbeszélés .....  | 27 |
| 7. Összefoglalás .....  | 30 |
| 8. Summary .....  | 31 |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>9. Irodalomjegyzék .....</b>     | <b>32</b> |
| <b>10. Köszönetnyilvánítás.....</b> | <b>40</b> |

# 1. Rövidítések jegyzéke

|                      |  |
|----------------------|--|
| A:                   | adenin   |
| as:                  | aminosav   |
| C:                   | citozin  |
| Cap:                 | kapszid  |
| DNS:                 | dezinukleinsav   |
| dNTP:                | dezinukleotid-trifoszfát   |
| dsDNS:               | duplaszálú dezinukleinsav  |
| G:                   | guanin   |
| IR:                  | intergénikus szakasz   |
| kb:                  | kilobázis (ezer bázis)   |
| kDa:                 | kiloDalton (ezer Dalton)   |
| mtsai.:              | munkatársai  |
| mRNS:                | messenger (hírvivő) ribonukleinsav   |
| NJ:                  | Neighbor-Joining analízis  |
| nt:                  | nukleotid  |
| ORF:                 | open reading frame (nyílt leolvasási keret)                                      |
| PASC:                | pairwise sequence comparison (páronkénti szekvencia összehasonlítás)             |
| PCR:                 | polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)                                |
| PCV:                 | porcine circovirus (sertés circovírus)   |
| PMWS:                | postweaning multisystemic wasting syndrome (malacok circovírus okozta sorvadása) |
| Rep:                 | replikáz   |
| ssDNS:               | szimplaszálú dezinukleinsav  |
| ssRNS:               | szimplaszálú ribonukleinsav  |
| sz:                  | számú  |
| TCID <sub>50</sub> : | Tissue Culture Infective Dose 50 (szövettenyészet 50 %-át fertőző dózis)         |

## 2. Bevezetés

A kettes típusú sertés circovírust (PCV2) Kanadában azonosították. Ezután a vírus gyorsan elterjedt, ma már az egész világon megtalálható. Súlyos gazdasági károkat okoznak a sertéstelepeken, elsősorban választási malacokban. Legjelentősebb kórkép a választott malacok circovírus okozta sorvadása (PMWS).

Egy rendkívül heterogén vírusfajról van szó, amelynek mutációs rátája igen magas, hasonló az RNS (azaz ribonukleinsav) vírusokéhoz. Ennek ellenére az utóbbi évtizedben kezdett beszűkülni a vírus genomjának változékonysága. A jelenség arra enged következtetni, hogy a sertéshez való adaptáció nemsokára lezárul. Ugyanakkor a vakcinázások más irányba terelhetik a vírus evolúcióját. A mutációk irányát befolyásolhatja továbbá a közvetett vagy közvetlen járványtani kapcsolat a házi sertés és vaddisznók között.

Munkánk célja az volt, hogy a circovírus evolúciójával kapcsolatos alapvető kérdésekre adjunk válaszokat.

Vizsgáltuk sertésben, hogy a vírusgenom változékonysága ténylegesen beszűkülést mutat-e, valamint a vakcinázások milyen hatással lehetnek erre.

Megkíséreltük megállapítani a rágcsálók szerepét a vírus evolúciójában, fenntartásában. Sertéstelepekről és azok közeléből begyűjtött patkányokból mutattunk ki sertés circovírust.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A *Circoviridae* család

A *Circoviridae* család tagjai az állati eredetű vírusok közt a legkisebbek (17-26 nm) közé tartoznak. Két elfogadott és egy elfogadásra váró genust sorolnak ide: a circovírus és gyrovírusok mellé a *Cyclovirus* nemzetség vár besorolásra. A víruscsalád elnevezése genomjára utal, amely szimpla szálú, körkörös dezoxinukleinsav (DNS). A vírus burok nélküli.

A *Circovirus* genus tagjai három nagyobb csoportba oszthatók: sertésvírusok (PCV1, PCV2), lúdalkatúak vírusai és más madarakéi.

A *Gyrovirus* genusba a csirkék fertőző anémiájának vírusa, humán és csirke gyrovírusok tartoznak. Jelenleg a genus áthelyezését fontolgatják (Biagini 2012; Rosario és mtsai., 2012b), mivel igen különbözik a család többi tagjától.

Még nem került elfogadásra a *Circoviridae* család új tagja, *Cyclovirus* genus néven. Ezen vírusok genomja rövidebb, mint a *Circovirus*oké, átlagosan körülbelül 1770 nukleotid (nt) (Li L. és mtsai., 2010). Az első cyclovírusokat húsokból, emberekből, főemlősökből mutatták ki.

*Circoviridae* családba tartozó vírusokat mutattak ki szennyvízben, tengervízben, tisztított vízben is. Ezek a vírusok egyik nemzetséghez sem tartoztak (Rosario és mtsai., 2009; Blinkova és mtsai., 2009; Djinkeng és mtsai., 2009).

#### 3.2. Sertés circovírus

##### 3.2.1. Egyes típusú sertés circovírus

A vírus e típusának genomja 1758-1760 bázis hosszúságú. Két csoportba osztható filogenetikai szempontból (Cságola és mtsai., 2008b).

A PCV1 természetes körülmények között is megtalálható sertésekben (Ellis és mtsai., 2000; Calsamiglia és mtsai., 2002; Magar és mtsai., 2000; Labarque és mtsai., 2000), és az élővírusos oltóanyagok gyártása folyamán a PCV1 bekerült a fertőzött sejttenyészetből a vakciánákba (Quintana és mtsai., 2006) is. Korábban úgy gondolták, hogy apathogén (Tischer és mtsai., 1986; Allan és mtsai., 1995, Puvanendiran és mtsai., 2011), viszont a

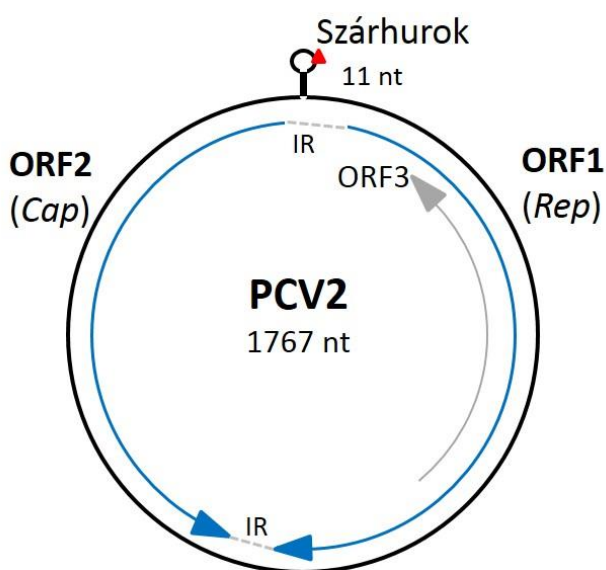
legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a sertés magzatait károsíthatja (Saha és mtsai., 2011).

### 3.2.2. Kettes típusú sertés circovírus

A *Circovirus* genuson belül a PCV2-nek van a legnagyobb gazdasági kártétele. Dolgozatom ezzel a vírussal foglalkozik, tehát a PCV2 tulajdonságainak részletesebb ismertetése elengedhetetlen.

#### 3.2.2.1. Genomszerkezet

A *Circovirus* genus tagjainál a genomban ellentétes irányú nyílt leolvasási kereteket (ORF) tartalmaz. Erre a szakirodalomban az „ambisense” elnevezést használják. A PCV2 genomja (1766-1768 nt) három fő ORF-et tartalmaz. Egy (ORF1) a pozitív szálon, kettő (ORF2 és 3) a negatív szálon foglal helyet. A vírus genomszerkezete az 1. ábrán látható.



1. Ábra. PCV2 genomorganizációja. ORF: nyílt leolvasási keret, IR: intergénikus régió. A nyilak a 3 ORF irányát és megközelítő elhelyeződését jelölik. A ▲ az 1. nukleotidot jelöli.

Az ORF1-et *Replikáz-génnek* (Rep) is nevezik, mivel a replikációért felelős fehérjét kódolja. Az 51-995 nt közötti szakaszcól íródik át az úgynevezett hírvivő RNS (Cheung, 2003). Az ORF2 a *kapszid-gén* (Cap), kapszid fehérje kódolásáért felelős. Az 1735-1034 nt között található (Nawagitgul és mtsai., 2000). Az ORF3 valószínűleg a sejtek

apoptózisát okozó (Liu és mtsai., 2005) fehérjét kódolja. A 671-357 nt között foglal helyet. Legújabb kutatások szerint létezik egy negyedik (ORF4) gén is, átfedésben az ORF3-mal (He és mtsai., 2013). Valószínűleg szerepe az immunszuppresszióval van összefüggésben.

Két intergénikus régió (IR) található az ORF1 és ORF2 között. A két gén 5' végénél van a hosszabbik IR. Itt található a circovírusokra jellemző szárhurok rész. A hurok PCV2-nél 10 nt hosszú, szekvenciája TAAGTATTAC, ahol a T: timin, A: adenin, G: guanin és C: citozin. A szár rész 11 nt hosszú, egymással komplementer szálakból áll (Mankertz és mtsai., 2003). A vírus replikációja szempontjából nélkülözhetetlenek.

### **3.3. A kettes típusú sertés circovírus genetikai változékonysága**

#### **3.3.1. Felfedezés és előfordulás**

A PMWS-t a házi sertésekben 1991-ben írták le először, Kanadában (Harding és Clark, 1996). A PCV2-nek tulajdonított kórképek közül ez fordul elő a leggyakrabban (Allan és mtsai., 1998). Felismerése óta a betegséget szinte mindenhol leírták: az USA-ban (Kiupele és mtsai., 1998), Európában először Franciaországban (Allan és mtsai., 1998), majd később a többi európai országban és Ázsiában is (Japánban, Onuki és mtsai., 1999). Közép- és Dél-Amerikában is felbukkant a betegség (Trujano és mtsai., 2001; Sarradell és mtsai., 2002). Afrikai adatok korlátozott mértékben állnak ugyan rendelkezésre, de valószínűsíthetően ott is széles körben elterjedt. Új-Zélandon és Ausztráliában 2005 táján detektálták a vírust (Raye és mtsai., 2005 és Garkavenko és mtsai., 2005). Retrospektív vizsgálatok alapján az első pozitív minta 1962-ből származik (Jacobsen és mtsai., 2009).

Magyarországon először, az akkori nevén Debreceni Állategészségügyi Intézet munkatársai mutatták ki a vírust (Kiss és mtsai., 2000). Gyorsan elterjedt az országban, nem volt olyan telep a vakcinázásokat megelőző időszakban, amely negatív eredményt mutatott volna.

#### **3.3.2. Sertés circovírus 2 csoportosítása**

A PCV2-nek három genotípusát ismerjük (kínai kutatók szerint öt létezik). Egy európai és amerikai circovírus kutató konzorcium ([www.pcvd.org](http://www.pcvd.org)) adatai szerint, hivatalosan az elfogadott nevezéktan alapján PCV2a, PCV2b, PCV2c genotípusok léteznek



(Segalés és mtsai., 2008; Cortey és mtsai., 2011). A PCV2a genom 1768 nt, a PCV2b és PCV2c 1767 nt hosszúságú.

Észak-Amerikában egészen 2004-ig főként a PCV2a genotípus fordult elő, majd 2004-től elterjedt a PCV2b is (Carman és mtsai., 2006; Gagnon és mtsai., 2007; Cheung és mtsai., 2007). A 2005-ös év óta több esetben mutatják ki ezt a genotípust, mint a PCV2a-t (Carman és mtsai., 2006; Gagnon és mtsai., 2007).

Mára egész Európában megtalálható a vírus. Az 1998-as évben tudósítottak róla először (Franciaország, Írország), majd gyorsan terjedt az egész kontinensen. Az amerikaitól eltérően, először PCV2b típus volt jellemző (Meehan és mtsai., 1998), habár a PCV2a is jelen van a kezdetektől (Mankertz és mtsai., 2000; Dupont és mtsai., 2008) egészen máig (Toplak és mtsai., 2012; Fabisiak és mtsai., 2012). Magyarországon kezdetben a PCV2a elterjedtebb volt, viszont mindkét genotípust megtalálták (Dán és mtsai., 2003). Cságola (2009) 2008-ig számolt be a hazai és Közép-európai PCV2 helyzetről. Megállapította, hogy a fertőzöttség a vaddisznó állományban növekedést mutat és a PCV2a és PCV2b aránya megfordult a vaddisznók és a házi sertések esetében is. Vagyis a PCV2b elterjedtebb. Kínában is ugyanígy alakult, a PCV2b vált dominánssá (Wang és mtsai., 2009). Még nem tudjuk, miért a PCV2b terjedt el jobban és, hogy miért csak az utóbbi években láthatóak a tünetek. Bár Jacobsen és mtsai (2009) alapján kórszövettani metszetekben korábban is megtalálhatóak a PMWS-re jellemző elváltozások. Egyesek úgy gondolják, hogy a vírusfertőzés az állandóan változó sertéstartással, új sertésfajták kitenyésztésével együttesen okozza a súlyosbodó klinikai tüneteket. Az epidemiológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy ez a genotípus tűnik patogénebbnek (Allan és mtsai., 2012; Li L. és mtsai., 2010). Az előbbi megállapítást azonban kísérletekkel nem sikerült bizonyítani (Opriessnig és mtsai., 2008). Allan és mtsai. (2012) szerint lehetséges, hogy a PCV2 együtt terjed egy ismeretlen ágenssel a '90-es évek óta, amely a megbetegedésekért felelős. Mások úgy gondolják, hogy a vírus még nem teljesen adaptálódott a sertéshez, ezért nagyobb a pathogenitása (Hughes és Piontkivska, 2008). Több vizsgálat szerint a PCV2 mutációs rátája a legmagasabb (Firth és mtsai., 2009; Pérez és mtsai., 2010) a DNS vírusok közt, megegyező egy RNS (ribonukleinsav) víruséval (Duffy és mtsai., 2008). A vírus eredeti gazdafaja még nem ismert, valószínűleg gazdaváltással került a sertésekbe. A mutációkat vizsgálván felmerült a gyanú, hogy a PCV2-re ma már a genetikai beszűkülés jellemző (Trible és Rowland, 2012). Ezt alátámasztani látszik a tény, hogy a járvány elején inkább előforduló PCV2a genotípus genetikailag heterogénebb volt, mint a b genotípus (Cságola, 2009; Olvera és mtsai., 2007).

A PCV2c elfogadását dán vizsgálatok indokolják (Dupont és mtsai., 2008). A c-típus másutt nem fordult elő. Ezeket a törzseket 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó sertés szérum minták tartalmazták.

Kínaiak még két genotípust (PCV2d és PCV2e) írtak le. A PCV2e szekvenciák főként 2006-ból származtak. Genomjuk 1768 nt méretű (Wang és mtsai., 2009). A PCV2d létezését Kínában többször megerősítették, a 2e genotípus előfordulását egyes kínai vizsgálatok megerősítik (Zhai és mtsai., 2011), mások nem (Guo és mtsai., 2010). A PCV2d genotípusról megállapították, hogy van köztük olyan vírus, amely a Cap-fehérje elleni neutralizáló monoklonális ellenanyagokkal nem reagál. Ezt a *Cap*-génen történt mutáció miatti (az 1042/1043 nukleotid kiesése miatt a stopkodon eggyel eltolódott) egy plusz aminosav (as) beépülésével magyarázzák (Guo és mtsai., 2010). A kapszidfehérje itt 234 as-ból áll, míg más PCV2 vírusokban 233 aminosav méretű (Chen és mtsai., 2012). A PCV2d-t Európában és Amerikában is azonosították (Toplak és mtsai., 2012; Xiao és mtsai., 2012; Opriessnig és mtsai., 2013).

A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottságnak nincs ajánlása arra, hogy mikor tartozik egy vírus új genotípusba. A nemzetközi szakértői konzorcium ([www.pcvd.org](http://www.pcvd.org)) elfogadta a PCV2 genotípusba sorolásának definícióit, amelyet Grau-Roma és mtsai. (2008) írtak le. Ezek szerint páronkénti szekvencia-összehasonlítással (pairwise sequence comparisons, PASC) a genotípusok között a teljes genomot tekintve a genetikai távolság legkevesebb 2,0 % ( $p=0,02$ ), vagy az ORF2-n (amely igen változatos) a genetikai távolság nagyobb, mint 3,5 % ( $p=0,035$ ). Az ajánlás alapján a PCV2 három genotípusra osztható, a PCV2d és PCV2e nem tartozik külön genotípusba a PASC analízis hiánya miatt.

A genotípusokon belül is léteznek csoportok, így a PCV2a és PCV2b esetében is. Olvera és mtsai. (2007) csoportosítása a legelfogadottabb besorolás. A PCV2b genotípust három alcsoportba (1A, 1B, 1C), a PCV2a genotípust 5 szubtípusba (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) osztották. Mivel a PCV2e genotípus esetében a különbség csak akkora, mint az előzőekben említett genotípuson belüli csoportosításnál, erre is a szubtípus elnevezést javasolják genotípus helyett (Cortey és mtsai., 2011). A PCV2a és PCV2b egy állatot együtt is megfertőzhet. Több alkalommal megfigyelték a genotípusok közti rekombinációt, így a PCV2a és 2b közti különbségek elmosódhatnak (Trible és Rowland, 2012). A vírus igen jó rekombinációs aktivitással rendelkezik. Ezt bizonyítja, hogy PCV1 és PCV2a kimérát is azonosítottak (Trible és Rowland, 2012).

Világszerte a PCV2b genotípus azon vírusai terjedtek el a 2007/2008-as felmérések alapján, melyek 2003-ban Euráziában jelentek meg. Ezek az 1A szubtypusba tartoznak (PCV2b 1A) Olvera és mtsai. (2007) besorolása alapján. Európában, beleértve a közép-kelet-európai régiót (Szerbia: Savic és mtsai., 2012; Toplak és mtsai., 2012; Lengyelország: Fabisiak és mtsai., 2012; Románia: Turcitu és mtsai., 2011), az amerikai kontinensen és Ázsiában is főként ez a víruscsoport terjedt el. A PCV2a genotípust egyre kevesebb alkalommal lehet kimutatni.

### **3.3.3. A kettős típusú sertés circovírus helyzete Közép-Európában**

Cságota (2009) áttekintést készített a PCV közép-kelet-európai előfordulásával kapcsolatban. A régió egyes országaiban megjelent publikációkat, illetve az addig elérhető szekvenciákról szóló ismeretanyagot foglalta össze. Ezt a munkát alapul véve dolgoztuk fel az azóta napvilágot látott eredményeket.

A PCV2 előfordulása egy romániai vaddisznópopulációt érintő felmérés szerint ott 50 % alatti (Turcitu és mtsai., 2011). Találtak olyan vírusokat, melyekben a Guo és mtsai. (2010) által leírt deléción is bekövetkezett a *Cap*-génen (1042/1043). Huszonhárom ORF2 szekvenciát vizsgálván a circovírusok kétharmada PCV2b genotípusba, egyharmaduk pedig a PCV2a genotípusba sorolható. A PCV2b genotípusúak az Európában leggyakoribb genetikai csoportba tartoztak, 93,7-100% hasonlósággal. Mivel ezen a területen a sertésstartás erőteljesen extenzív, így az állatok közvetlenül is érintkezhetnek. Feltételezik, hogy a házi sertés állományban is hasonló vírusok találhatóak meg. Erdélyben -ahol a sertésstartás intenzív- a házi sertések prevalenciája 73,4–100%, míg a vaddisznók esetében ez a szám 8,3%. 36 pozitív minta (28 vaddisznó és 8 házi sertés) között PCV1 is kimutatásra került, de mind a 36 esetben PCV2-t is sikerült detektálni. 4 vaddisznóból származó szekvencia PCV2a 2D szubtypusú vírusnak bizonyult, a többi PCV2b genotípusba sorolódott (1A szubtypusba 12 vaddisznó-, 4 házi sertés, 1B-be 5/3, még 1C esetében 7/1 az arány) (Cadar és mtsai., 2010).

Az orosz és ukrán vaddisznó-állományokban is megtalálható a PCV2 (Shcherbakov és mtsai., 2007).

Lengyelországban 2007/2008-ban a vaddisznók több, mint 90 %-a fertőzött volt (Fabisiak és mtsai., 2012). A PCV2b genotípus fordul elő nagyobb arányban és nagyfokú

hasonlóságot mutat a házi sertések vírusaival. PCV2a típust is azonosítottak, mely Lengyelországban egészen addig nem volt ismeretes.

Szlovákiában 2007-ben írták le először a vírust (Pistl és mtsai., 2009). A 2005-ös és 2009-es év között huszonnégy részleges ORF2 szekvencia alapján huszonnégy minta tartozott PCV2b 1A vagy 1B szubtípusba, a maradék két minta PCV2a 2D típusba volt besorolható (Vlasakova és mtsai., 2011). Szerológiai felméréseket is végeztek Szlovákiában (Csank és mtsai., 2011). A választási malacokban a szeropozitivitás elérte a 80 %-ot, bár az életkortól független átlag az európai átlag alatt maradt (54%). Csehországban a vizsgált vadak majdnem 45 %-ában lehetett kimutatni az ellenanyagot (Sedlak és mtsai., 2008).

A kanok 18,2 %-a Ausztriában ondóval üríti a vírust. A szekvenciák 67,86 %-a PCV2a genotípusú volt, a maradék PCV2b 1A/B szubtípusához tartozik (Schmoll és mtsai., 2008). Egyéb ausztriai vizsgálat alkalmával 100 ondómintából 1-ben mutatták ki a PCV2-t (Lang és mtsai., 2011). Szerbiában 28 PCV2b pozitív (30-ból) mintát találtak, míg Szlovéniában 10/17 volt az arány (Toplak és mtsai., 2012). Egy esetben a PCV2d típus jelenlétét is megállapították, mely a Cságola és mtsai. (2006) által leírt magyarországi vaddisznóból származó vírushoz hasonlított. Szerbiában, a házi sertésekben a PCV2a 2D altípus mellett a PCV2b 1A/B és az 1C is kimutatható volt. Utóbbi PCV2d-vel közeli rokonnak tűnik a Nguyen és mtsai., (2012) által készített filogenetikai vizsgálatok szerint. Úgy gondolják, a PCV2a és PCV2b között genetikai csuszamlás (drift) alakította ki az új vírust. Ezek alapján a szerbiai PCV2b 1C egy fiatal, patogén törzs, mely hasonló egy, az USA-ban azonosított szekvenciájú vírushoz (Xiao és mtsai. 2012).

Horvátországban főleg a PCV2b genotípust lehet kimutatni, sokkal kevesebbszer a PCV2a -t. A horvátországi minták egymásra, illetve a GenBank-ban található adatokra is nagymértékben hasonlítanak (genbanki számok: HQ591365-HQ591381). Ezt alátámasztani látszik Novosel és mtsai.; (2014) leírása, miszerint az általuk vizsgált 17 vírusszekvenciából mindössze 2 tartozott a PCV2a genotípushoz, 14 a PCV2b-hez, egy pedig egyikbe sem volt besorolható. Tehát, ahogyan a világ más pontjain, Horvátországban is a PCV2b genotípus a fordul elő leggyakrabban. Feltételezéseik szerint a PCV2b-t a nemzetközi kereskedelemmel hurcolták be, míg a PCV2a genotípusú vírusok inkább helyi endémiás törzsek, mintsem „új jövevények”.

### **3.3.4. A kettős típusú sertés circovírus helyzetének alakulása a vakcinázás hatására**

Európában 2007-től elérhető a PCV2 elleni specifikus vakcina, mely megakadályozza a kórformák kialakulását. A vakcinás védelem hatására csökkent a vírusürítés (bélsárral), a szérumban lévő vírusrészecske mennyiség, az elhullások, megbetegedések, társfertőzések száma (Kixmüller és mtsai., 2008), valamint a súlygyarapodás javult (Fraile és mtsai., 2012).

A vakcinázás jelentősen lecsökkenti a PCV2a prevalenciáját, a klinikai tünetek kialakulását, viszont a PCV2b előfordulása nem változik (Opriessnig és mtsai. 2013). A PCV2b-t tartalmazó vakcina a vegyes (PCV2a és PCV2b) fertőzések ellen is jobb védelmet biztosít (Opriessnig és mtsai., 2013).

A vakcinázás várhatóan befolyásolni fogja a vírus evolúcióját. Feltételezhető, hogy a genetikai változékonyság fokozódása fog bekövetkezni. Valószínűsíthető, hogy az új, PCV2d-ként Kínában leírt, plusz aminosavat tartalmazó vírus is a vakcinázás miatt alakult ki (Opriessnig és mtsai., 2013). Ehhez hasonló, vakcinás védelmet áttörő mutánsok jelentek meg Amerikában (Xiao és mtsai., 2012; Opriessnig és mtsai., 2013). Az Európában megjelent vírust a vakcinázással még nem hozták összefüggésbe.

### **3.3.5. Sertés circovírusok más állatfajokban**

Már a kilencvenes évektől vizsgálták, hogy más emlősökből ki tudják-e mutatni a circovírust. Ellentmondásos eredmények születtek. Jelen munkával a vadon élő rágcsálókban kimutatott circovírusok kutatását folytattuk.

Egereket a PCV kutatásban a vakcinák hatékonyságának és a vírus betegségekben való szerepének tisztázása céljából használtak. További cél annak a vizsgálata, hogy fennmarad-e a vírus az egerekben. Az a gondolat, hogy a PCV lehetséges őse esetleg rágcsálókban fordul elő eddig nem bizonyított. Azonban az, hogy a vadon élő egerek és patkányok is hordozzák a vírust (Lőrincz és mtsai., 2010), érdekes információ lehet. Korábban megállapították, hogy a vírus DNS kimutatható kísérleti oltást követően. Azzal kapcsolatban, hogy ellenanyag kimutatható-e, az eredmények ellentmondásosak (Rodríguez-Arrijoja és mtsai., 2003a; Kiupel és mtsai., 2001; Quintana és mtsai., 2002), akárcsak a vírus által okozott elváltozások. Mikroszkópikus eltéréseket többen leírtak (Kiupel és mtsai., 2005; Li-J. és mtsai., 2010) (mások nem láttak változást -Kiupel és mtsai.,

2005; Li–J. és mtsai., 2010; Opriessnig és mtsai., 2004; Li-J. és mtsai., 2010), míg szabad szemmel látható intersticiális tüdőgyulladást csak Deng és mtsai (2011) figyeltek meg. Az egerekbe bevitt vírus mennyiségének növekedése azt valószínűsíti, hogy a PCV replikálódik az egerekben (Opriessnig és mtsai., 2004). A mesterségesen fertőzött állatok képesek üríteni a vírust, mivel a kontaktusban lévő nem fertőzött egerekben is kimutatták a vírus nukleinsavat (Cságola és mtsai., 2008; Li-J. és mtsai., 2010). A vertikális transzmisszió jelensége nem egyértelmű (Kiupel és mtsai. 2001).

Circovírussal fertőzött sertéstelepekről befogott állatokban a PCV2 detektálható (Lőrincz és mtsai., 2010). A rágcsálókban a vírus úgy tűnik, hogy változik. Erre azonban nincs bizonyíték.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. A vizsgálati minták származása

Közép-Európában előforduló circovírus törzseket vizsgáltunk. Sertés mintáink 20 különböző magyarországi, 13 romániai, 7 szerbiai, 28 horvátországi PCV2-vel fertőzött telepről származó szervek voltak. A szervminták tüdőből, májból, lépből, veséből, nyirokcsomókból álltak. A mintákat 2012-2013-ban gyűjtötték, kivéve a horvátországiakat, melyekből 11 db 2008-2009-ből származott. Lengyelországból tisztított DNS-t kaptunk 14 telepről. Mivel Csehországból és Szlovákiából nem sikerült mintát szerezni, a GenBankban található friss (2007 utáni) szekvenciákat használtuk.

Magyarországi mintáink közt betegségben elhullott sertések szerveit vizsgáltuk, mely betegség nem feltétlenül a PCV2 volt. A telepeken a sertéseket circovírus ellen vakcinázták, egyéb állategészségügyi információt nem kaptunk.

Vándorpatkányaink (*Rattus norvegicus*) a Szentimrei Mezőgazdasági Kft. Kölesházi hízlaldájából és a mellette lévő istállóból (nem sertést tartó) származnak. Összesen 7 darabot kaptunk.

Az állatok mindannyian a METATOX (bromadiolon hatóanyag) nevű rodenticid hatására pusztultak el. Életkoruk ismeretlen, viszont mindannyian kifejlett egyedek voltak. Súlyukat, ivarukat feljegyeztük. Magzatokat nem vizsgáltunk, mert korábbi tapasztalataink alapján (Lőrincz és mtsai, 2010) a magzatokban természetes körülmények között a vírus detektálható mennyiségben nem fordult elő.

### 4.2. Vírus nukleinsav kivonása patkány szervmintákból

Először is ki kellett tisztítanunk a mintánkban lévő vírus DNS-t, az InnuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena) segítségével a gyártó előírásának megfelelően. Az InnuPREP Virus DNA/RNA Kit lehetővé teszi a vírus eredetű ssDNS, vagy dsDNS és ssRNS tisztítását, szérumból, plazmából vagy más sejten kívüli testfolyadékából, szövetből, paraffinos vagy tamponmintából, vagy sejtenyészetből. Elsőként a szervekből homogenizátumokat készítettünk. Dörzsmozsárban összezúrtuk a szervek borsónyi nagyságú darabjait. Egy mintába ugyanazon állat szervei kerültek. Összesen 7 patkány és 82 sertés mintánk volt. Mindnél a folyadék frakcióból 150 µl-t pipettáztunk 450µl lízis

pufferhez. Harminc percig inkubáltunk 25 °C-os (szobahőmérséklet) hőmérsékleten. Letelte után a 450 µl lizátumot pufferrel kevertük (azonos térfogatú), amely a DNS-t a tisztító oszlop filter membránjához köti. Ezt átcentrifugáltuk a filtert tartalmazó csöveken 10000 xg-n 1 percig, két adagban, majd kétszer mosófolyadékkal mostuk. Először 500 µl 48 % etanolos pufferrel, másodszer 650 µl 19,2 % etanoltartalmú folyadékkal. A maradék alkoholt az üres csövekből centrifugálással távolítottuk el (10000 xg), 2 perc alatt. A folyamat végén 50 µl meleg, kétszer desztillált vízzel oldottuk le a szűrőre kötött DNS-t. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk (RNS esetén ez -80 °C lenne).

### **4.3. Vírus nukleinsav amplifikálás**

Konvencionális polimeráz-lánreakciót (PCR) használtunk a vírus tisztított örökítőanyagának sokszorosításához. A DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas, Litvánia) enzimet, valamint a hozzá javasolt puffert választottuk. A puffer zöld loadoló festéket, glicerint és vizet is tartalmazott. A primereket a Sigma-Aldrich-től (USA) rendeltük. A reakcióelegy összetevőit az 1. táblázat tartalmazza:

A nukleinsavat 95 °C-on 10 percig előmelegítettük, majd 45 cikluson keresztül 95 °C-on 30 másodpercig, 52-60 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 45-120 másodpercig; végül 72 °C-on 7 percig egy végső lánchosszabítási szakasz erejéig kezeltük. TGradient Thermocycler (Biometra, Németország) géppel végeztük az amplifikációt. Az általunk használt primerek a 2. táblázatban láthatók.



## 1. Táblázat. A PCR reakcióelegy összetétele.

| Összetevő                         | Térfogat v. mennyiség | Koncentráció  | Gyártó                 |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| vizsgálandó DNS minta             | 1 µl                  | nem ismeretes | -                      |
| 10× Green Taq puffer              | 5 µl                  | -             | Fermentas,<br>Litvánia |
| dNTP (dNTP Set, 100 mM Solutions) | 1 µl                  | 1 mM          |                        |
| primerek                          | 1-1 µl                | 25 µM         | Sigma-<br>Aldrich, USA |
| Taq DNS- polimeráz enzim          | 1-3 U                 | 1-5 U/µl      | Fermentas,<br>Litvánia |
| steril, kétszer desztillált víz   | 50 µl-ig              | -             | -                      |

Az U nemzetközi egységet jelent.

Az MCV1-MCV2 (Fenaux és munkatársai, 2000) primereket használtuk általános PCV kimutatásra. Ez a párosítás a PCV1-et is kimutatja. A primerek a vírus egy konzervatív genomszakaszához kötődnek. Korábbi tapasztalataink alapján (Lőrincz és mtsai., 2010) patkányokban is képes a sertés vírust kimutatni. A primer tapadása 55 °C-on 30 másodpercig, a lánchosszabítás 72 °C-on 45 másodpercig tartott.

A CBB2-CSz2 primerpár (Cságola és munkatársai, 2006) specifikus PCV2-re. Ez egy gyakran használt párosítás a diagnosztikában. Arra használtuk, hogy a PCV pozitív mintákból kimutassuk a PCV2-t. A megfelelő tapadási hőmérséklet 55 °C volt.

A vírus teljes genomjának szekvenálásához a CBB1J-CBB2 (52 °C-on), illetve a CBB3-CSz2 (55 °C-on) párokat használtuk (Cságola és mtsai., 2006). A lánchosszabbítási idő 90 másodperc volt.

## 2. Táblázat. Vizsgálatokhoz használt primerek adatai.

| primer neve | szekvenciája                     | iránya | referencia              |
|-------------|----------------------------------|--------|-------------------------|
| MCV1        | 5'-GCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGG-3'   | F      | Fenaux és mtsai., 2000  |
| MCV2        | 5'-TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3' | R      |                         |
| CBB1J       | 5'-GCTGCCACATCGAGAA-3'           | F      | Cságola és mtsai., 2006 |
| CBB2        | 5'-CGCACCTTCGGATATAC-3'          | R      |                         |
| CBB3        | 5'-GCTCTCCAACAAGGTACT-3'         | R      |                         |
| CSz2        | 5'-GGAGGAGTAGTTTACATAGGGG-3'     | F      |                         |

Az F az előrefelé irányuló, az R a komplementer szálra tervezett primer.

### 4.4. A PCR termékek ellenőrzése, elő-amplifikálása, DNS tisztítása

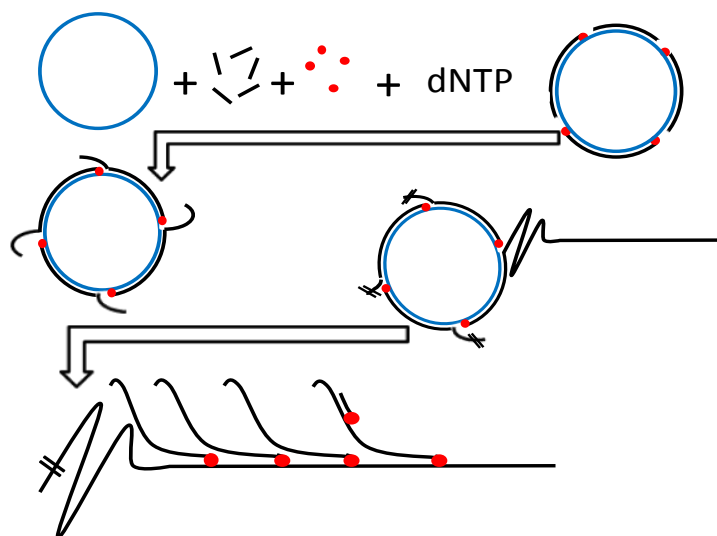
#### 4.4.1. Termékek agarózgél elektroforézise

Termékienket 2%-os agaróz gélen futtattuk és a GR Safe DNA Stain I (Life Science Technologies) festékekkel tettük láthatóvá. TAE pufferben végeztük az elektroforézist, 110 V feszültséggel, 60 percig. A puffer összetétele: 40 mM TRIS, 20 mM ecetsav, 1mM etiléndiamino-tetraecetsav. A DNS-t 420-500 nm hullámhosszúságú fényben, a Dark Reader™ system (Chemical Research Inc., USA) nevű rendszerrel tettük láthatóvá.

#### 4.4.2. Elő- amplifikáció

Elő-amplifikálást végeztünk a patkányokban előforduló vírusok kimutatásánál. Az integrálódott virális DNS-t zártuk ki így (Fehér és mtsai.; 2013 írtak le ilyen circovírust egy halfaj esetében). Ehhez a TempliPhi™ 100 Amplification Kit-et (GE Healthcare, UK) használtuk. A körkörös DNS-t tudtuk megsokszorozni ezzel a módszerrel, specifikus primerek nélkül, izotermikus körülmények között. Amint a lenti ábrán látható, a körkörös DNS megfelelő pontjaihoz hozzáköt egy random hexamer, amelyet az enzim kiindulópontként használ, és innen építi fel a DNS láncot (2. ábra). Az 1 µl körkörös DNS tartalmú mintát 5 µl mintapufferrel kevertük össze, majd 3 másodpercig 95 °C-on denaturáltuk, majd jégfürdőbe helyeztük. Jégágyon kevertük össze a mintánként 1 µl Exo-

Resistant Random Primert (Fermentas, Litvánia), 5  $\mu$ l reakciópuffert, 0,2  $\mu$ l enzimkeveréket és 1  $\mu$ l kétszer desztillált vizet és ezt adtuk a denaturált mintához. Egy éjszakára inkubáltuk a keveréket 30 °C-on, azután az enzimet 65 °C-on 10 percig inaktiváltuk. A kapott DNS-t templátként használtuk a PCR reakciókban.



**2. Ábra. Gördülő körös amplifikáció (RCA).** Random hexamerek (felső sor rövid pálcák) kötődnek a körkörös DNS-en, az így létrejövő duplaszálú szegmensek primerként szolgálnak a  $\Phi$ 29 polimeráz (fekete pontok) számára. A hosszabbodó DNS „letolja” a már elkészült komplementer szálat (második sor), a folyamat addig folytatódik, amíg a reakciót nem blokkoljuk, vagy amíg a dNTP és a random hexamer el nem fogy. Végül különböző hosszúságú, egy- és kétszálú DNS-láncok keletkeznek.

#### 4.4.3. Fragmentek tisztítása

A fragmenteket az EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit vagy az EZ-10 Spin Column PCR Products Purification (Bio Basic, Canada) segítségével, a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. Attól függően alkalmaztuk a két eljárás egyikét, hogy a kapott amplikonok mennyire lettek tiszták. A DNA Gel Extraction Kit-et a még tisztításra szoruló mintákhoz használtuk. Elektroforézis után szikepengével kivettük a gélből azt a darabot, amelyben lévő templátot tovább szeretnénk volna tisztítani. A kivágott gél 100 mg-jához 200  $\mu$ l puffert (DNS-t a szilika membránhoz kötő) adtunk és 56 °C-on tartottuk. A gél a folyamat végére feloldódott. A PCR Products Purification Kit-et akkor használtuk, mikor a PCR termékünk fals termékektől mentes volt. A friss PCR termékhez négyszeres térfogatú DNS-t a szilika gélhez kötő puffert adtunk. Innentől a két művelet útja megegyezik. A kapott

oldatot átcentrifugáltuk 1 percig 1000 xg-n, szilika gélen, majd etanos mosófolyadékkal kétszer átmostuk. Először 700 µl, majd 500 µl mosófolyadékkal, 10000 ×g-n centrifugálva. A maradék alkoholt szintén 10000 xg-s centrifugálással távolítottuk el. Végül kétszer desztillált, meleg vízzel (50 µl) leoldottuk a DNS-t.

#### **4.5. A szekvenciák elemzése**

A PCR termékek szekvenálása után összehasonlítottuk őket egymással és a GenBankban található adatokkal. Használtuk a Lasergene MEGA 5.2 (Tamura és munkatársai, 2011) és a BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999) nevű programokat. Előbbivel a teljes genomszekvenciát készítettük el, illetve filogenetikai fát készítettünk (neighbor-joining, maximum likelihood és Tamura módszerrel) 1000 bootstrap érték mellett. A GenBankból letölthető teljes genomszekvenciákból választottuk a fa elkészítéséhez szükséges szekvenciákat.

A BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999) sequence identity matrix, illetve pairwise alignment programokat alkalmaztuk a szekvenciák összehasonlítására.

Mindkét program használatakor a különféle szubtypusokat random módon választottuk ki a GenBankból.

## 5. Eredmények

### 5.1. PCV2 genetikai változásai

#### 5.1.1. PCR eredmények

Amennyiben egy telepen egyetlen pozitív egyedet találtunk, azt a telepet pozitívnak tekintettük. Ezek alapján a magyarországi sertéstelepekről származó 20 mintánkból 17 adott pozitív PCV2 eredményt. A 13 vizsgált romániai telepből 12-nél mutattuk ki a vírus DNS-ét. Szerbiában 7 telepből 6, a 29 horvátországi telepből 25, Lengyelországban 14-ből 6 telep volt pozitív.

#### 5.1.2. A szekvenálás eredménye

A pozitív minták közül 5 hazai, 3 romániai, 5 szerbiai, 22 horvátországi, 2 lengyelországi teljes PCV2 genomszekvenciát azonosítottunk. Három 1768 nt hosszú szekvenciát kaptunk (HQ591374 genbanki számú (sz.) horvátországi szekvencia, magyarországi 5. sz. és 6. sz. minta), míg a többi 1767 nt hosszúságú volt. Három minta esetében a Cap-fehérje plusz egy aminosavat tartalmazott, amit a *Cap*-génen bekövetkező deléció okoz (szerbiai 14. számú minta, a horvátországi HQ591381 és a HQ591379 vírus).

Országoként az új szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján a magyarországi PCV2 minták 7,12–98,42 %-ban, a romániaiak 95,31–97,96 %-ban, a szerbiaiak 96,09–100 %-ban, a horvátországi teljes PCV2 genomok 95,36–100 %-ban, a lengyelországiak 98,81 %-ban egyeztek.

#### 5.1.3. Közép-Európát érintő filogenetikai vizsgálat

A PCV1 kimutatását nem tűztük ki célul. Bár az első körben PCV specifikus (PCV1 és PCV2 kimutatást szolgáló) primerekkel vizsgáltuk a mintákat, a felerősített DNS szakaszokat PCV2-re specifikus primerekkel néztük meg, vagyis egy kevert fertőzés esetén kizárólag a PCV2-t mutattuk ki.

A PCV2 (Grau-Roma és mtsai., 2008) három genotípusra osztható: PCV2a, PCV2b és PCV2c. Többen szubtypusokat hoztak létre a PCV2a és PCV2b esetében is. Olvera és mtsai. (2007) által készített csoportosítás a legszélesebb körben elfogadott, mely szerint a

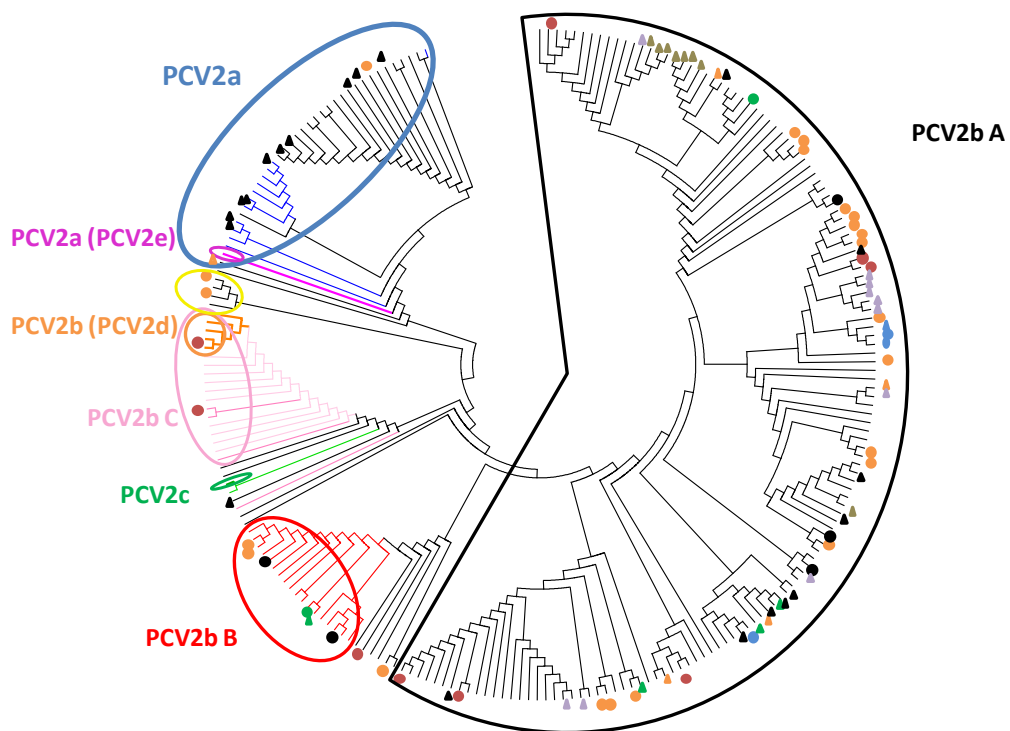
PCV2b típust három szubtypusra (1A, 1B, 1C), míg a PCV2a genotípust 5 szubtypusra (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) osztották. A kínai kutatók által leírt PCV2d és PCV2e nem bizonyított, hogy valóban genotípusok lennének, a filogenetikai fák alapján szerencsésebb a szubtypus kifejezést használni (Cortey és mtsai., 2011), a követhetőség érdekében a PCV2b 1C (PCV2d) illetve PCV2a (PCV2e) neveket használom az elkövetkezőkben.

Az általunk vizsgált minták három kivétellel a PCV2b genotípusba tartoztak. A 3. ábrán látható a régióban fellelhető összes teljes genom szekvencia helye az általunk Neighbor-Joining (NJ) analízissel készített filogenetikai ábrán.

Egy PCV2a genotípusú (2D szubtypusú) vírust találtunk, amely 2008-ból származó horvátországi eredetű vírus volt (HQ591374). Nagymértékű hasonlóságot (98,98 %) mutat a hozzá a filogenetikai fán legközelebb álló magyarországi vaddisznóból kimutatott vírussal (genbanki azonosító sz.: AY874166).

Két másik 2009-es horvátországi PCV2 minta (HQ591379 és HQ591381) nem tartozik a PCV2b genotípusba. Az NJ analízis alapján nem volt besorolható a filogenetikai fa egyik csoportjába sem (sárga kör jelzi a 3. ábrán). A vizsgálatok alapján a rekombináció lehetősége sincs kizárva, de egyértelműen nem lehet megmondani, hogy a PCV2b 1A, 1B vagy a PCV2e genotípusúnak mondott (Wang és mtsai., 2009) víruscsoportokból alakult-e ki ez a 4 vírus.

A PCV2b csoportba tartozó vírusok nagy része az Olvera és mtsai. (2007) általi besorolás szerint a PCV2b 1A altípusba tartozik. Az általunk megszekvenált teljes genomok közül 11 nem ide tartozik. A már fent említett három vírus mellett a PCV2b 1B szubtypusba tartozik 1 lengyelországi, 2 horvátországi és 2 hazai genom. Egy pedig a PCV2b 1C (Wang és mtsai., 2009, szerinti PCV2d genotípus) alcsoportba sorolódott. További két szekvencia (a 703. sz. horvátországi és a 22. sz. szerbiai mintából készített szekvencia) szintén a PCV2b genotípuson belül helyeződik a filogenetikai fán, de szubtypustól függetlenül. Ezen a két vírus csoporton kívüli helyeződését egy-egy pontmutáció okozza, amely aminosav változással is jár.



2008. I. hó után

2007. XII. hó előtt

- -horvátországi
- -lengyelországi
- -magyarországi
- -romániai
- -szerbiai

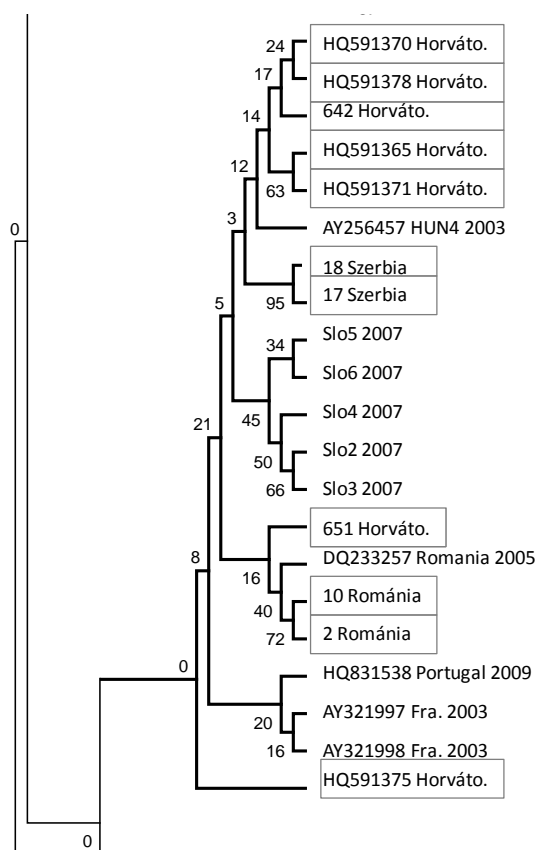
- ▲ -csehországi
- ▲ -horvátországi
- ▲ -lengyelországi
- ▲ -magyarországi
- ▲ -romániai
- ▲ -szerbiai
- ▲ -szlovákiai

**3. Ábra. Közép-Európából származó teljes genomszekvenciákból, NJ módszerrel készült filogenetikai ábrázolás.** Azok az ágak, ahol régióbeli szekvenciák nincsenek, nem jelennek meg a filogenetikai fán.

Közép-Európában a PCV2b 1A szubtypus vírusai a dominánsak. Ide 28 vírust soroltunk be: 3 magyarországi (3. sz., 5. sz., 6.sz. ), 3 romániai (2. sz., 8. sz., 10. sz.), 3 szerbiai (1. sz., 17. sz., 18. sz.), 1 lengyelországi (7. sz.) és 16 horvátországi (642. sz., 644. sz., 651. sz., 655. sz., 670. sz., 675. sz., 682. sz., 686. sz., HQ591365, HQ591370, HQ591371, HQ591375, HQ591376, HQ591377, HQ591378, HQ591380) vírust. Van két

olyan szekvencia, amely rokonsági viszony tekintetében ide tartozik (a 703. sz. horvátországi és 22. sz. szerbiai szekvenciák).

Azonosítottunk egy nagyobb közép-európai csoportot, ahová 11 2008 utáni, 7 2008 előtti Közép-Európából származó vírus tartozik. Emellett egy 2009-es portugáliai és két franciaországi vírusszekvencia alkotja a csoportot, amelyet a 4. ábra mutat be. A csoporton belül vannak azonos szekvenciájú vírusok is, azonban a legnagyobb mértékben eltérő szekvenciák is több, mint 99 %-ban hasonlítottak.



**4. Ábra. A teljes genomszekvenciákat tartalmazó, NJ módszerrel készült filogenetikai fán a PCV2b 1A szubtípuson belül az az ág, amely elsősorban Közép-Európából származó szekvenciákat tartalmaz. A szürke keretben a 2008 utáni, a régióból származó vírusok láthatóak.**

A NJ módszerrel a 703. sz. horvátországi és a 22. sz. szerbiai vírus a PCV2b 1B szubtípushoz áll közelebb filogenetikailag, viszont a filogenetikai ábrától független összehasonlítást végezve mindkettő a PCV2b genotípus 1A szubtípusához tartozik (Pubmed nucleotide blast analízis, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Egymásra 99,32 %-ban hasonlítanak. A szekvenciák összehasonlítása során a *Rep*-génen két as változással járó nt-mutációt azonosítottunk.



A PCV2b 1B genotípushoz tartozott a 2. sz. lengyelországi, az 1. és 4. sz. magyarországi és a 662. és 671. sz. horvátországi szekvencia. A 2. sz. lengyelországi minta legközelebbi rokona egy Cságola (2009) által korábban megszekvenált, szintén lengyelországi vírusgenom (az egyezés köztük 99,15 %). A hazai, 4. sz. szekvencia legközelebbi rokonai filogenetikai elemzés alapján kínai szekvenciák (90% felett egyezés). A két horvátországi vírus egymással azonos (100 %). A magyarországi 1. sz. távolabb áll mindezeketől és a fa azon ágán helyezkedik el, ahol főleg 2009-2010-es, Távol-Keletről származó vírusok vannak. A PCV2b 1C (PCV2d) szubtípusú vírusok között van olyan, amely as-ainak száma eggyel nőtt. Ezeket a deléciós mutánsokat már Közép-Európában is kimutatták. Ide sorolandók HQ378158 azonosítójú (Savic és mtsai., 2012) és a 14. sz. szerbiai szekvencia is. Filogenetikai ábránkon közép-európai minták közül egy megszekvenált genom (14. sz., Szerbiából) sorolódott ide, mely számos kínai szekvenciával áll rokonságban. Egy korábbi szerbiai szekvencia (HQ3778158) filogenetikai fa alapján a PCV2b 1C szubtípushoz tartozik (hasonlóság 99,15 %).

## **5.2. Sertés circovírusok kapcsolata befogott rágcsálókkal**

### **5.2.1. PCR eredmények befogott rágcsálók esetében**

Összesen 7 db patkány mintát vizsgáltunk, ezek közül 4 mutatott egyértelmű pozitivitást (2-es, 4-es, 6-os és 7-es számúak). A kimutatásra az MCV1-MCV2 primerpárt (Fenaux és mtsai., 2000) alkalmaztuk korábbi tapasztalatokra alapozva (Lőrincz és mtsai., 2010). A pozitív mintákat vizsgáltuk tovább PCV2 specifikus primerekkel (mivel ezen vírus változásának követése volt a célunk).

#### **5.2.1.1. Szekvenciaanalízis a befogott rágcsálók esetében**

CBB1J–CBB2, valamint CBB3–CSz2 primerpárokat használtunk a vírus teljes genomjának szekvenálásához. Ezen primerek PCV2-re specifikusak. Mindhárom esetben pozitív eredményt kaptunk mindkét primerpár esetében. A CBB1J–CBB2 esetében egy terméket kaptunk, míg a CBB3–CSz2 esetében 2 terméket kaptunk a hetes minta kivételével. Ezek közül az egyik a várható méretű volt, míg a másik kisebb (500 bp körüli). A hetes minta esetében csak a kisebb amplikon jelent meg. Szekvenciaanalízist a kettes és hetes mintákból végeztettük el. Az eredmény eddig nem ismert szekvenciákat adott, de nem volt tiszta a PCR termék. Sem DNS sem a fehérjére alapozott szekvenciák nem mutattak hasonlóságot.

Az gördülő-kör alapú amplifikáció (RCA) alapján nagy valószínűséggel körkörös DNS genomot mutattunk ki, amely a circovírusoknál korábban kimutatott integrált genom (Fehér és mtsai., 2013) előfordulását zárta ki.

## 6. Megbeszélés

Régióinkban a vírus követte a Cságola (2009) által előrevetített fejlődést. A PCV2a genotípusú vírus 2003-ban még igen elterjedt volt, de 2007-re csökkent az aránya a PCV2b-hez képest. A mostani vizsgálat során csak egy „a” genotípusú vírust találtunk. Ez egy 2008-as horvátországi szekvencia volt, amely a 2D szubtípusba sorolódott. Ugyanezen csoportba került Cadar és mtsai. (2010) által leírt vaddisznó vírus is. Ő is megerősítette azt, amit a világon mindenütt megfigyeltek, hogy a heterogén PCV2a kiszorul, helyét a PCV2b veszi át.

A PCV2c genotípust nem mutattuk ki, bár ezt csupán egyszer írták le (Dupont és mtsai., 2008), azóta nem. Ez a csoport úgy tűnik, hogy evolúciós zsákutca.

A PCV2b már elég hamar elterjedt Európában és Ázsiában, 2005 óta pedig az amerikai kontinensen is. Már 2007-ben sokkal elterjedtebb volt, mint a PCV2a, ráadásul a víruscsoport jóval egységesebb képet mutat. Cságola (2009) azt jósolta, hogy a víruscsoporton belül az Olvera és mtsai. (2007) által 1A szubtípusú vírus lesz az evolúció iránya, a többi szubtípust hátérbe szorítva. Térségünkben már többször végeztek vizsgálatokat az elterjedést illetően. A teljes genom szekvenálás azonban ritka. Mindenki inkább a *Cap*-gént szekvenálja. Mi azonban a teljes genomot választottuk, mivel a kapszidfehérje motívumainak vizsgálata nélkül nem állapítható meg egyértelműen, hogy az adott szekvencia az 1A vagy 1B szubtípusba tartozik. (A dolgozatom témája csak a térség PCV2 elemzése, amely egy, a teljes világot felölelő munka része, amelybe a GénBankból letöltött szekvenciák is tartoztak. Így nagyon nagy mennyiségű adat feldolgozása történt meg, amelyek egyenkénti vizsgálata lehetetlen feladatnak tűnik.) A régió más vizsgálatai alapján is úgy tűnik, hogy a PCV2b 1A a legelterjedtebb szubtípus (Cadar és mtsai., 2010; Turcitu és mtsai., 2011; Novosel és mtsai., 2014). Az általunk megvizsgált vírusok közül 26 tartozott az 1A szubtípusba, 5 az 1B-be és 1 pedig az 1C szubtípusba. Ez megfelel az erdélyi házisertésekben talált arányoknak (Cadar és mtsai., 2010). Két vírust találtunk, amely a filogenetikai analízis során egyik szubtípusba sem sorolódott be. Ezek a 703 sz. horvátországi és a 22 sz. szerbiai szekvenciák. A filogenetikai fán ugyan inkább a PCV2b 1B csoporthoz tartoznak, azonban ettől független összehasonlítással a PCV2b 1A szubtípusúnak tűntek. A vírusokban a rekombináció jeleit nem tudtuk felfedezni. Az ORF1-en olyan mutációk is vannak, amelyek alapján a két vírus más-más csoportba tartozik. A 34.

nt változása a 703 sz. horvátországi vírusnál a PCV2a 1A szubtypusú vírusokra jellemző, míg a 105. nt megváltozása egyik csoportra se.

Régióink nem mutatott változásokat a házi sertések esetében a 2007-ben megjósolthoz képest (Cságola, 2009). Azonban a PCV2b 1B és 1C is megjelent. A világ más részén az 1C már elterjedtebb. A kapszidon megjelent mutáció miatt feltételezhető, hogy az állományokban kialakult vakcinás védelem ebben az esetben nem elég. Azonban a mutáció már 2010 előtt is jelen volt, így biztos, hogy nem ezért jött létre. Ennek a csoportnak a terjedése jelenleg gyorsabb.

Két vírusról nem esett még szó. Ezek a 2009-ből származó horvátországi szekvenciák (HQ591379 és HQ591381). Méretüket tekintve 1767 nt, ami a PCV2b, illetve a PCV2c méretének felel meg, ám nem hasonlít egyik csoporthoz sem. Mindkét vírus és a velük egy ágon elhelyezkedő vírusok (EF524523 és HM776452) egymástól viszonylag messze állnak (a páronkénti hasonlóság 96,83-99,83%). A kapszidjuk 234 as-ból áll, ám ezen is változások következtek be, nem egyeznek meg a PCV2b 1C (PCV2d) esetében látottakkal. Azon vírusok, amelyek ilyen mutációkat tartalmaznak, sikeresek lehetnek a vakcináció okozta védelem kivédésében. Ez az út lehet az evolúció új vonala, amely a vírus szempontjából előnyös lehet.

A rágcsálók esetében a teljes genom szekvenálását tűztük ki célul. Ennek oka, hogy ezek az állatok rezervoár szerepet tölthetnek be (Lőrincz és mtsai., 2010), és a vizsgálatok során feltételezhető volt, hogy a vírusgenom változik a rágcsálókban. A vírust emellett rágcsálók egymásnak is átadhatják (Cságola és mtsai., 2008), így pedig a vakcinázástól függetlenül a vírus fennmarad a sertéstelepeken. Azt feltételeztük, hogy a rágcsálókban a természetes fertőzés esetén a vírus változni fog, hiszen igen nagy mutációs rátával rendelkezik (Firth és mtsai., 2009). A korábbi szekvenálás alapján a vírus változott a telepen előforduló sertés szekvenciákhoz képest. A GénBankban laboratóriumi egerekből származó circovírus szekvenciákat találtunk. Eltérő számú passzálás után lettek meghatározva, de nem lehetett két megegyező vírust találni (a 94,96-99,89% hasonlóság).

A PCR termékek nagyon biztatóak voltak, mert úgy tűnt, hogy az eredmény a korábban szarvasmarhák esetében látottakra hasonlít. Abban az esetben két eltérő vírust is azonosítani lehetett. Itt azonban annyira szennyezett volt a szekvencia, hogy nem lehetett kitisztítani. Így a teljes genom még mindig nem áll rendelkezésünkre, melyből adódóan nem

tudjuk, hogy egerekben vajon előfordulhat-e az, hogy a vírus képes megváltozni, amely akár a PCV2b 1C (PCv2d) kialakulásához is vezethet.

## 7. Összefoglalás

A *Circoviridae* víruscsaládba tartozó *Circovirus* nemzetség neve is utal arra, hogy körkörös, szimpla szálú DNS genommal rendelkeznek. Méretük 17-26 nm, köbös szimmetriájúak, burok nélküliek. További ismert circovírus nemzetség a *Gyrovirus* genus, mely jobban hasonlít az *Anelloviridae* család tagjaihoz, mint a *Circoviridae*-hez, ezért átsorolását fontolgatják. Továbbá egy új nemzetség létrehozásáról döntés várható, *Cyclovirus* genus néven, ennek rendszertani helyét azonban még nem tisztázták. A *Circovirus* genusba tartoznak az általunk vizsgált sertés circovírusok, valamint madarak circovírusai. Előbbieknek két faja ismert: az egyes típusú sertés circovírus (PCV1), melyet apathogénnek tartottak, bár újabban magzatkárosító hatását leírták és a kettes típusú (PCV2), mely a sertésstelepeken hatalmas gazdasági károkat okozott az elmúlt évtizedekben. A PCV2 az egész világon elterjedt. Először Kanadában írták le. Elsősorban a választási korban (Európában 28-30 naposan) okoz jelentős károkat, de számos megbetegedés hátterében is kimutatták.

A 2-es típusnak három genotípusát ismerjük: a PCV2a, PCV2b, PCV2c. A jelenleg domináns PCV2b mellett a PCV2a, ha kisebb mértékben is, de előfordul a sertésállományokban. PCV2c-t csak egy alkalommal írtak le, Dániában. Epidemiológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a legpathogénebb genotípus a PCV2b. Más elképzelések szerint inkább az új hibrid sertésfajták, a változékony tartástechnológia, az állatok lezsarolása együttesen felelős az egyre súlyosbodó klinikai tünetekért. Az elmúlt években a vírus genetikailag stabilnak tűnik, ami alapján lehetséges, hogy a sertéshez való adaptáció egy végéhez közeledő folyamat. Fontos viszont, hogy a vakcinázásokkal arra kényszeríthetjük, hogy evolúcióját más irányban folytassa. Olyan PCV2b-t is kimutattunk a környező országokban, amely képes a vakcinás védelmet áttörni és világszerte terjed, így elképzelhető, hogy nálunk is jelen van.

A PCV-ok ősének feltételezhető gazdájaként szóba jöhetnek rágcsálók. A sertésstelepek környékéről származó patkányokból és egerekből PCV2 volt kimutatható, mely utalhat arra, hogy a rágcsálók lehetséges rezervoárok. E megfigyelések miatt vizsgáltuk patkányokban a vírust, hogy milyen mértékű genetikai változásokon ment keresztül. A közös genetikai őst nem sikerült felfedni a vizsgálatokkal.

## 8. Summary

*Circovirus* genus belongs to the family *Circoviridae*. The family name refers to a circular, single-stranded DNA genome. Their size is 17-26nm, they have icosahedral symmetry and are non-enveloped. The family contains other genera such as *Gyrovirus*, which is more similar to the family *Anelloviridae* as *Circoviridae* and its reclassification is being considered. There is another tentative genus called *Cyclovirus*. Its taxonomic position hasn't been clarified yet. *Circovirus* genus includes porcine circovirus (the target of this study) and bird circoviruses. The former has two species: porcine circovirus type 1 (PCV1), considered to be non-pathogenic, although there is some experimental evidence that it might damage fetuses. Porcine circovirus type 2 (PCV2), however caused huge economic damage to pig farms in the recent decades. Type 2 is present all over the world. It has been described in Canada first. This virus causes significant damage mostly in weaning piglets (28-30 days old in Europe), and its presence was shown in the background of a variety of diseases.

The three known genotypes of type 2 are: PCV2a, PCV2b and PCV2c. Currently PCV2b is dominant but PCV2a is also present in pigs. PCV2c was described only once, in Denmark. Epidemiological studies show that the most pathogenic type is PCV2b. Others say the new hybrid breed of pigs, the variable technology, and the exploitation of animals are all together responsible for the worsening clinical signs. In the last few years the virus seemed to be genetically stable, so it is possible that the adaptation of the virus to pigs is approaching the end of the process. However, it's important, that the virus is forced to change into different directions due to the pressure of widespread vaccinations. In neighboring countries scientists detected PCV2b which was able to break through vaccine protection. It is spreading all over the world so it is likely that it will appear in Hungary, too.

Our theory was that rodents maybe one of the ancestor hosts of PCV viruses. We were able to find PCV2 in rodents caught in areas surrounding pig farms. This suggests that rats might act as reservoirs. Because of these observations we examined the genetic variability of the virus in rats. The common ancestor virus could not be identified by examinations of rodents.

## 9. Irodalomjegyzék

Allan G., Krakowka S., Ellis J., Charreyre C. (2012) Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Res.* 164. 4–9.

Allan G.M., McNeilly F., Cassidy J.P., Reilly G.A., Adair B., Ellis W.A., McNulty M.S. (1995) Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol.* 44. 49–64.

Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft B., Clark E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Meehan B.M., Adair B.M. (1998) Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest.* 10. 3–10.

Biagini P. (2012) Restructuring and expansion of the family *Anelloviridae*. Anelloviridae-Circoviridae Study Group. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV files and discussion; Available at: <http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy/proposals/vertebrate1/m/vert01/3911.aspx> (accessed February 2012).

Blinkova O., Rosario K., Li L., Kapoor A., Slikas B., Bernardin F., Breitbart M., Delwart E. (2009) Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *J Clin Microbiol.* 47. 3507–3513.

Cadar D., Cságola A., Spinu M., Dán A., Ursu K., Lőrincz M., Tuboly T. (2010) Prevalence of porcine circoviruses in Transylvanian wild boars, detected by real-time PCR--short communication. *Acta Vet Hung.* 58. 475–481. IF: 1,264

Cadar D., Cságola A., Dán A., Deim Z., Spînu M., Miclăuş V., Köbölkuti L., Czirják G., Tuboly T. (2007) Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania--short communication. *Acta Vet Hung.* 55. 151–156.

Calsamiglia M., Segalés J., Quintana J., Rosell C., Domingo M. (2002) Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 85. 574–579.

Carman S., McEwen B., DeLay J., van Dreumel T., Lulis P., Cai H., Fairles J. (2006) Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can Vet J.* 47. 761–762.

Chen F., Pan Y., Liao C., Zhou Q., Zhang X., Song Y., Bi Y. (2012) Complete genome sequence of porcine circovirus 2d strain GDYX. *J Virol.* 86. 12457–12458.



- Cheung A.K. (2003) The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*. *313*. 452–459.
- Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R., Dunham A.G. (2007) Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol*. *152*. 1035–1044.
- Cortey M., Olvera A., Grau-Roma L., Segalés J. (2011) Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol*. *149*. 522–523.
- Cságola A. (2009) Sertés circovírusok járványtani vizsgálata. In: PhD értekezés.
- Cságola A., Cadar D., Tuboly T. (2008a) Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Vet Hung*. *56*. 421–427.
- Cságola A., Kecskeméti S., Kardos G., Kiss I., Tuboly T. (2006) Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol*. *151*. 495–507.
- Cságola A., Kiss I., Tuboly T. (2008b) Detection and analysis of porcine circovirus type 1 in Hungarian wild boars: short communication. *Acta Vet Hung*. *56*. 139–144.
- Csank T., Pistl J., Polláková J., Holoda E., Harvan M. (2011) Prevalence of porcine circovirus 2 infection in pig population in Slovakia. *Acta Virol*. *55*. 267–271.
- Dán A., Molnár T., Biksi I., Glávits R., Shaheim M., Harrach B. (2003) Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet Hung*. *51*. 551–562.
- Deng Z.B., Wang N.D., Xu D.J., Yuan A.W., Ge M., Luo W., Xue L.Q., Yu X.L. (2011) Viral distribution and lesions in Kunming mice experimentally infected with porcine circovirus type 2b. *Vet Res Commun*. *35*. 181–192.
- Djinkeng A., Kuzmickas R., Anderson N.G., Spiro D.J. (2009) Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One*. *4*. e7264.
- Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. *9*. 267–276.
- Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. (2008) Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol*. *128*. 56–64.
- Ellis J.A., Bratanich A., Clark E.G., Allan G., Meehan B., Haines D.M., Harding J., West K. H., Krakovwka S., Konoby C., Hassard L., Martin K., McNeilly F. (2000)

Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 12. 21–27.

Fabisiak M., Szczotka A., Podgórska K., Stadejek T. (2012) Prevalence of infection and genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *J Wildl Dis.* 48. 612–618.

Fehér E., Székely C., Lőrincz M., Cech G., Tuboly T., Singh H.S., Bányai K., Farkas S.L. (2013) Integrated circoviral Rep-like sequences in the genome of cyprinid fish. *Virus Genes.* 47. 374–377. IF: 1,769

Fenaux M., Halbur P.G., Gill M., Toth T.E., Meng X.J. (2000) Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol.* 38. 2494–2503.

Firth C., Charleston M.A., Duffy S., Shapiro B., Holmes E.C. (2009) Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J Virol.* 83. 12813–12821.

Fraile L., Grau-Roma L., Sarasola P., Sinovas N., Nofrarias M., López-Jimenez R., López-Soria S., Sibila M., Segalés J. (2012) Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine.* 30. 1986–1992.

Gagnon C.A., Tremblay D., Tijssen P., Venne M.H., Houde A., Elahi S.M. (2007) The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J.* 48. 811–819.

Garkavenko O., Elliot R.B., Crosson M.C. (2005) Identification of pig circovirus type 2 in New Zealand pigs. *Transplant Proc.* 37. 506–509.

Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., López-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A., Segalés J. (2008) A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol.* 128. 23–35.

Guo L.J., Lu Y.H., Wei Y.W., Huang L.P., Liu C.M. (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J.* 7. 273–285.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41. 95–98.

Harding J.C.S., Clark E.G. (1996) Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5. 201–203.

He J., Cao J., Zhou N., Jin Y., Wu J., Zhou J. (2013) Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol.* 87. 1420–1429.

Hughes A.L., Piontkivska H. (2008) Nucleotide sequence polymorphism in circoviruses. *Infect Genet Evol.* 8. 130–138.

Jacobsen B., Krueger L., Seeliger F., Bruegmann M., Segalés J., Baumgaertner W. (2009) Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol.* 138. 27–33.

Kiss I., Kecskeméti S., Tuboly T., Bajmócy E., Tanyi J. (2000) New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Vet Hung.* 48. 469–475.

Kiupel M., Stevenson G.W., Choi J., Latimer K.S., Kanitz C.L., Mittal S.K. (2001) Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol.* 38. 74–82.

Kiupel M., Stevenson G.W., Galbreath E.J., North A., Hogenesch H., Mittal S.K. (2005) Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. *BMC Vet Res.* 1. 7–15.

Kiupel M., Stevenson G.W., Mittal S.K., Clark E.G., Haines D.M. (1998) Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol.* 35. 303–307.

Kixmüller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmüller A., Elbers K., Fachinger V. (2008) Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine.* 26. 3443–3451.

Labarque G.G., Nauwynck H.J., Mesu A.P., Pensaert M.B. (2000) Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Vet Q.* 22. 234–236.

Lang Ch., Griessler A., Pirker E., Söllner H., Segalés J., Kekarainen T., Ritzmann M. (2011) Detection of porcine Circovirus type 2 and Torque-Teno-Sus-virus 1 and 2 in semen samples of boars from an Austrian artificial insemination centre. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 39. 201–204. German.

Li J., Yuan X., Zhang C., Miao L., Wu J., Shi J., Xu S., Cui S., Wang J., Ai . (2010) A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. *Virol J.* 7.158–164.

Li L., Kapoor A., Slikas B., Bamidele O.S., Wang C., Shaukat S., Masroor M.A., Wilson M.L., Ndjango J.B., Peeters M., Gross-Camp N.D., Muller M.N., Hahn B.H., Wolfe N.D., Triki H., Bartkus J., Zaidi S.Z., Delwart E. (2010a) Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol.* *84.* 1674–1682.

Li L., Victoria J.G., Wang C., Jones M., Fellers G.M., Kunz T.H., Delwart E. (2010b) Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol.* *84.* 6955–6965.

Li W.L., Wang X.W., Ma T., Feng Z.X., Li Y.F., Jiang P. (2010) Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes.* *40.* 244–251.

Liu J., Chen I., Kwang J. (2005) Characterization of a previously unidentified viral protein in Porcine circovirus type 2- infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol.* *79.* 8262–8274.

Lőrincz M., Cságola A., Biksi I., Szeredi L., Dán A., Tuboly T. (2010) Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet Hung.* *58.* 265-268. IF: 1,264

Magar R., Muller P., Larochelle R. (2000) Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res.* *64.* 184–186.

Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann P., Jestin A., Segalés J., Chmielewicz B., Plana-Durán J., Soike D. (2000) Characterization of PCV2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* *66.* 65–77.

Mankertz A., Mueller B., Steinfeldt T., Schmitt C., Finsterbusch T. (2003) New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus type 1 and 2. *J Virol.* *77.* 9885–9893.

Meehan B.M., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V.A., Ellis J.A., Hassard L.E., Clark E.G., Haines D.M., Allan G.M. (1998) Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol.* *79.* 2171–2179.

Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S. (2000) Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol.* *81.* 2281–2287.

Nguyen V.G., Kim H.K., Moon H.J., Park S.J., Keum H.O., Rho S., Han J.Y., Park B.K. (2012) Population dynamics and ORF3 gene evolution of porcine circovirus type 2 circulating in Korea. *Arch Virol.* *157.* 799–810.

Novosel D., Tuboly T., Csagola A., *Lorincz M.*, Cubric-Curik V., Jungic A., Curik I., Segalés J., Cortey M., Lipej Z. (2014) Origin of porcine circovirus type 2 (PCV2) from swine affected by PCV2-associated diseases in Croatia. *Vet Rec.* 174. 431. DOI: 10.1136/vr.102064. IF: 1,803

Olvera A., Cortey M., Segalés J. (2007) Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology.* 357. 175–185.

Onuki A., Abe K., Togashi K., Kawashima K., Taneichi A., Tsunemitsu H. (1999) Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci.* 61. 1119–1123.

Opriessnig T., Jones D., McKeown N., Meng X.J., Halbur P.G. (2004) Development of a mouse model for PCV2-associated diseases. *Proc Con Res Work Animal Dis, Chicago, Illinois.* 85. 143.

Opriessnig T., O'Neill K., Gerber P.F., de Castro A.M., Giménez-Lirola L.G., Beach N.M., Zhou L., Meng X.J., Wang C., Halbur P.G. (2013a) A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine.* 31. 487–494.

Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J., Halbur P.G. (2008) Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol.* 89. 2482–2491.

Opriessnig T., Xiao C.T., Gerber P.F., Halbur P.G. (2013b) Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol.* 163. 177–183.

Pérez L.J., Díaz de Arce H., Frías M.T. (2010) Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 strains present in Cuban swine herds. *Res Vet Sci.* 89. 301–305.

Pistl J., Novackova M., Jackova A., Pollakova J., Levkut M., Vilcek S. (2009) First evidence of Porcine Circovirus 2 (PCV2) in Slovakia. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 116. 19–23.

Puvanendiran S., Stone S., Yu W., Johnson C.R., Abrahante J., Jimenez L.G., Griggs T., Haley C., Wagner .B, Murtaugh M.P. (2011) Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Res.* 157. 92–98.

Quintana J., Balasch M., Segalés J., Calsamiglia M., Rodríguez-Arrijoja G.M., Plana-Durán J., Domingo M. (2002) Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res.* 33. 229–237.

Quintana J., Segalés J., Calsamiglia M., Domingo M. (2006) Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *The Vet Journal.* 171. 570–573.

Raye W., Muhling J., Warfe L., Buddle J.R., Palmer C., Wilcox G.E. (2005) The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. *Aust Vet J.* 83. 300–304.

Rodríguez-Arrijoja G.M., Segalés J., Domingo M., Plana-Duran J. (2003a) Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. *Vet Rec.* 153. 371–372.

Rosario K., Duffy S., Breitbart M. (2009) Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *J Gen Virol.* 90. 2418–2424.

Rosario K., Duffy S., Breitbart M. (2012b) A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol.* 157. 1851–1871.

Saha D., Lefebvre D.J., Ducatelle R., Doorselaere J.V., Nauwynck H.J. (2011) Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine fetuses. *BMC Vet Res.* 7. 64–73.

Sarradell J., Perez A.M., Andrada M., Rodriguez F., Fernandez A., Segalés J. (2002) PMWS in Argentina. *Vet Rec.* 150. 323.

Savic B., Milicevic V., Jakic-Dimic D., Bojkovski J., Prodanovic R., Kureljusic B., Potkonjak A., Savic B. (2012) Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia. *Arch Virol.* 157. 21–28.

Schmoll F., Lang C., Steinrigl A.S., Schulze K., Kauffold J. (2008) Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology.* 69. 814–821.

Sedlak K., Bartova E., Machova J. (2008) Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J Wildl Dis.* 44. 777–780.

Segalés J., Olvera A., Grau-Roma L., Charreyre C., Nauwynck H., Larsen L., Dupont K., McCullough K., Ellis J., Krakowka S., Mankertz A., Fredholm M., Fossum C., Timmusk S., Stockhofe-Zurwieden N., Beattie V., Armstrong D., Grassland B., Baekbo P., Allan G. (2008) PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec.* 162. 867–868.

Shcherbakov A.V., Kukushkin S.A., Timina A.M., Baïbikov T.Z., Kovalishin V.F., Kanshina A.V., Biadovskaia O.P., Prokhvatilova L.B., Ruchnova O.I., Bakunov I.N.,

Babkin M.V. (2007) Monitoring of infectious diseases among wild boars. *Vopr Virusol.* 52. 29–33. Russian

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 28. 2731–2739.

Tischer I., Miels W., Wolff D., Vagt M., Griem W. (1986) Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol.* 91. 271–276.

Toplak I., Lazić S., Lupulović D., Prodanov-Radulović J., Becskei Z., Došen R., Petrović T. (2012) Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Vet Hung.* 60. 409–420.

Trible B.R., Rowland R.R. (2012) Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination., pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164. 68–77.

Trujano M., Iglesias G., Segalés J., Palacios J.M. (2001) PCV2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec.* 148. 792.

Turcitu M.A., Wellenberg G.J., Barboi G., Codreanu M.D., Vuta V.B., Nicolae S., Barbuceanu F., Coste H., Cioranu R. (2011) Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the Romanian wild boar population. *Res Vet Sci.* 91. 103–106.

Vlasakova M., Jackova A., Vilcek S. (2011) Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. *Res Vet Sci.* 90. 168–173.

Wang F., Guo X., Ge X., Wang Z., Chen Y., Cha Z., Yang H. (2009) Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145. 151–156.

Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T. (2012) Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J Virol.* 86. 12469.

Zhai S.L., Chen S.N., Wei Z.Z., Zhang J.W., Huang L., Lin T., Yue C., Ran D.L., Yuan S.S., Wei W.K., Long J.X. (2011) Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virol J.* 8. 517–522.

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Lőrincz Mártának a dolgozatomban szereplő ábrákat. Nagyon köszönöm továbbá türelmét és a lelkiismeretes együttműködést. Köszönöm dr. Tuboly Tamás segítségét.

A mintagyűjtésben nyújtott segítséget köszönöm: Kecskeméti Sándornak, Biksi Imrének, a Szentimrei Mezőgazdasági KFT-nek. Külföldi mintákat Cadar Dánieltől, Dinko Novoseltől, Tomasz Stadejektől és Becskei Zsolttól kaptunk.

Köszönöm családomnak: Bedi Gyulának, Bediné Szöbölődi Erikának, Bedi Dánielnek és páromnak, Márki Lászlónak a támogatást.