

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Hüllők és madarak reovírusainak genetikai
diverzitása**

Varga-Kugler Renáta

Témavezető: Dr. Farkas Szilvia



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2021.

Témavezető:

.....

Dr. Farkas Szilvia

Állatorvostudományi Egyetem

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika

.....

Varga-Kugler Renáta

Tartalomjegyzék

1. Előzmények.....	3
2. Célkitűzések.....	6
3. Anyagok és módszerek	7
4. Eredmények és megbeszélés	12
5. Új tudományos eredmények.....	23
6. Az értekezés témájában született közlemények ...	25

1. Előzmények

A jelenleg ismert, duplaszálú RNS genommal rendelkező víruscsaládok között a *Reoviridae* család képviselteti magát a legtöbb fajjal. Az *Orthoreovirus* nemzetség a *Reoviridae* család állategészségügyi szempontból jelentős csoportja, mely munkánk kezdetekor hét vírushajt foglalt magába. A hullókból izolált reovírusokat a hulló orthoreovírus (RRV) fajba sorolták, míg a madarakból izolált reovírusok a madár orthoreovírus (ARV) fajba tartoztak.

A hullók reovírusait számos esetben kimutatták már különböző pikkelyes és páncélos hullófajokból, 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 állományában okozhatnak nagymértékű kártétellel járó megbetegedéseket. Ilyen például a házityúk és pulykák vírusos ízület- és ínhüvelygyulladás, valamint a kacsák és ludak ízületgyulladással, illetve a májban és lépben megfigyelhető elhalásos góccal járó tünetegyüttese.

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.

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 jelenlegi rendszertan szerint a reovírusok fajmeghatározásánál a következő szekvenciaazonossági értékeket kell figyelembe venni: egy fajhoz tartozik két vírustörzs, ha köztük az azonosság nukleotid (nt) szekvencia esetében >75%, core fehérje aminosav (as) szekvencia esetében >85%, illetve külső kapszid fehérje as szekvencia esetében >55%. Külön fajhoz tartozónak tekintünk két törzset, ha köztük az azonosság nt szinten <60%, core fehérje as szekvencia szintjén <65%, illetve külső kapszid fehérje as szekvencia szintjén <35%.

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.

2. Célkitűzések

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

1. újgenerációs szekvenálás segítségével genomszekvencia adatok gyűjtése, lehetőség szerint a teljes genomok nukleotid sorrendjének meghatározása.
2. a kapott szekvenciaadatok elemzése, vírustörzsek genomszerveződésének, genetikai diverzitásának és filogenetikai kapcsolatainak feltérképezése. 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.

3. Anyagok és módszerek

Felhasznált vírustörzsek és sejtvonalak

Vizsgálatainkhoz négy madár eredetű reovírus izolátumot hazai együttműködő partnereink bocsátották rendelkezésünkre. A D2533/4/1-10 és D2533/6/1-10 jelű vírustörzseket házikacsák (*Anas platyrhynchos domestica*) bursájából izolálták, németországi állományokból 2014-ben. A Reo/HUN/DuckDV/2019 jelzésű törzset magyarországi házikacsa állományból izolálták 2019-ben. A D1996/2/1 azonosítójú törzset fácán (*Phasianus colchicus*) zúzógyomrából és bursájából izolálták 2012-ben magyarországi állományból.

A Reo/HUN/Pheasant/216/2015 jelzésű törzset magyarországi fácánállományból származó kevert bélsármintákból izoláltuk laboratóriumunkban 2015-ben.

A hüllő reovírusokkal végzett vizsgálatainkhoz németországi együttműködő partnerünk három törzset bocsátott rendelkezésünkre. Az IBD26/00 jelzésű törzset óriáskígyóból (*Boa constrictor*), az 55/02 jelzésűt pedig szőnyegmintás pítontól (*Morelia spilota*) izolálták Németországban, míg a Svájcban izolált CH1197/96 törzs mór teknősből (*Testudo graeca*) származott.

Ezekén felül vizsgálatainkba bevontunk kutatócsoportunk által korábban izolált hüllő reovírus törzseket is: a KP3 királypítóból (*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.

A madár eredetű vírustörzseket LMH (ATCC CRL-2117), a hüllő eredetű vírusizolátumokat VH-2 (ATCC CCL-140), IgH-2 (ATCC CCL-108) és TH-1 (ATCC CCL-50) sejtvonalakon tartottuk fent és szaporítottuk. A hüllő vírusokkal végzett koinfekciós kísérlethez a VH-2 sejtvonalat használtuk.

A minták feldolgozásához használt molekuláris biológiai módszerek

A rendelkezésre álló mintákból nukleinsav kivonást végeztünk TRI reagens segítségével. A kinyert virális RNS-ről reverz transzkripció (RT) reakcióban, a 3' végén randomizált szakaszt tartalmazó FR26RV-N oligonukleotid használatával készítettünk komplementer DNS (cDNS) másolatot. A cDNS-t ezután polimeráz láncreakció (PCR) segítségével sokszoroztuk fel, melyhez az FR26RV-N primerhez illeszkedő FR20RV primert használtuk. A PCR termékeket agaróz

gélelektroforézissel ellenőriztük, a 200-2000 bázispár (bp) közötti sávban lévő termékeket gélkivonásos módszerrel tisztítottuk. Az így amplifikált és tisztított cDNS-ből könyvtárkészítés után teljes genom szekvenálást végeztünk IonTorrent, illetve Illumina újgenerációs szekvenáló platformokon. A jellemzően alacsonyabb lefedettségű szegmensvégi szekvenciák megerősítése RNS ligálással kombinált módosított 5' és 3' RACE módszer segítségével történt.

Reassortációs vizsgálatainkhoz koinfekciós kísérleti rendszert állítottunk össze. VH-2 sejteket egyidejűleg fertőztünk a 47/02 és CH1197/96 jelzésű törzsekkel. A hulló reovírus fertőzésre jellemző óriássejtek megjelenése után a sejtenyészetet passzáltuk, összesen 4 passzálási lépést végezve. Az így nyert szuszpenziókból plakktisztítással módszerrel nyertünk egyedi vírusokat, melyekből elvégeztük a virális RNS kivonását. A lehetséges reassortációs események feltérképezéséhez egylépéses RT-PCR rendszert állítottunk össze. Az egyes szegmensek eredetét az adott szegmensről felsokszorozott PCR termék olvadási hőmérséklete alapján nagyfelbontású olvadáspont analízissel határoztuk meg. Ezt StepOne Plus Real-Time PCR készüléken végeztük, az adatok kiértékelése pedig

a StepOne Software v2.3, illetve a High Resolution Melt (HRM) Software v2.0 segítségével történt.

Bioinformatikai módszerek

Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatokat a CLC Genomics Workbench szoftver segítségével dolgoztuk fel. A Sanger szekvenálásból származó elektroferogramok beolvasására és szerkesztésére a BioEdit, illetve a Geneious Prime szoftvereket használtuk. A kapott szekvenciák összeillesztése az újgenerációs szekvenálás eredményével a Geneious Prime mellett az AliView szoftver segítségével történt. A homológ gének keresését a génbank adatbázisában BLASTN vagy BLASTX algoritmussal végeztük.

A kodon alapú többszörös szekvencia illesztéseket Geneious Prime szoftverrel és a TranslatorX online illesztőprogrammal végeztük el. A filogenetikai elemzéseket, illetve a szekvencia azonossági számításokat a MEGA6 szoftvercsomag segítségével készítettük el. 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.

4. Eredmények és megbeszélés

Vizsgálataink során meghatároztuk három házikacsa és egy fácán eredetű, illetve hét különböző hullőfajokból származó orthoreovírus törzs teljes genomjának a nukleotid sorrendjét. További egy fácán eredetű törzs összes szegmensének fehérjekódoló szekvenciáit is meghatároztuk. A vizsgált vírustörzsek genomjának, valamint genomszegmenseinek felépítése nem tért el jelentősen az irodalomban eddig leírtaktól. Az egyes genomok mérete ~23-24 kbp volt, 10 szegmensre tagolódott, mely a madár reovírusok esetében 12, a hullő reovírusok esetében 11 fehérjét kódolt.

Víziszárnyas reovírusok

A víziszárnyas reovírusokat (WRV) genomszerveződésükben megfigyelhető különbségek alapján két csoportba sorolhatjuk, a klasszikus és az új típusú WRV-k közé. Az új típusú WRV-k a tyúkfélék reovírusaihoz hasonló, tricisztronos S1 szegmessel rendelkeznek, rajta a gazdasejthez való kapcsolódásért felelős σ C fehérje, a sejtmagban és citoplazmában zajló folyamatokat szabályozó p17, valamint a sejtfúzió hatásért felelős, a fúzió asszociált kis transzmembrán

(FAST) fehérjék családjába tartozó p10 fehérje kódolt. A klasszikus WRV-knek az S4 szegmense bicisztronos, ez kódolja a σC , illetve a p10 proteint, utóbbi azonban nem hordozza a sejtfüzióért felelős proteinek tulajdonságait. Az általunk vizsgált házikacsa eredetű törzsek mindegyike tricisztronos S1 szegmensevel rendelkezett. Ez alapján az új típusú WRV-k közé sorolhatnánk őket, 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 genomösszehasonlítás csak alacsony, illetve közepes hasonlóságot mutatott. A nt és as szekvencia azonossági értékek 38,06-72,38%, illetve 25,63-84,79% közé estek. Ezek többnyire a faji besoroláshoz meghatározott, törzsek egyazon, illetve külön fajhoz sorolását jelentő két határérték közötti, ún. szürke zónába estek, vagy az alsó határérték alá. Ezzel ellentétesen, a Ych jelű, Kínában házikacsából izolált reovírussal történő összehasonlításban minden szegmens esetében elérték az azonossági értékek az egy fajba soroláshoz szükséges határértéket (86,48-95,01% nt, 94,08-99,21% as azonosság). A filogenetikai fák is megerősítették az azonossági adatok alapján látható kapcsolatokat. A

D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek minden szegmens esetében együtt csoportosultak az Ych törzssel, ami ezen vírusok közös evolúciós eredetét feltételezi. Ugyanakkor a többi víziszárnyas, házityúk és pulyka eredetű ARV-tól jól elkülönülő ágat alkottak.

A D2533/4/1-10 törzs különböző, nem víziszárnyas eredetű ARV-kkel közepes, illetve magas nukleotid és aminosav szekvencia hasonlóságot mutatott (40,09-78,56% nt, 31,16-94,65% as azonosság). Legközelebbi rokonainak különböző, Európában és Kínában izolált víziszárnyas eredetű törzsek bizonyultak (45,91-94,27% nt, 42,21-98,69% as azonosság). Az egyes szegmenseket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy amíg 6 gén (λ A, λ B, λ C, μ A, μ NS és σ NS) szekvenciái a klasszikus WRV-kkel adtak magasabb nukleotid azonossági értékeket, addig 3 gén (μ B, σ B és σ C) esetében az új típusú WRV-kkel mutatott magasabb rokonsági fokot. A σ A gén esetében közel egyforma hasonlóságot mutatott a két csoporttal. Ezeket a megfigyeléseket a filogenetikai fák topológiája is megerősítette. A σ C gén esetében bár az új típusú WRV-kkel alkot monofiletikus csoportot, külön ágon helyezkedik el tőlük. Ez annak lehet a jele, hogy ez a szegmens egy másik gazdafaj reovírusából kerülhetett át reasszortáció

során. A klasszikus és új típusú WRV-k a σC fehérjét kódoló génszekvenciák alapján készült törzsfán jól elkülönülnek, ugyanakkor közelebbi rokonsági kapcsolatban vannak egymással, mint a házityúk és pulyka eredetű törzsek homológ génjével. Valószínűbbnek tűnik, hogy a klasszikus WRV-k bicisztronos S4 szegmense az új típusú WRV-k tricisztronos S1 szegmenséből alakult ki, a FAST fehérje elvesztésével. Ezt az elképzelést 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 hármass reassortáns, melynek λA , λB , λC , μA , μNS és σNS fehérjét kódoló szegmensei klasszikus, μB , σA és σB fehérjét kódoló szegmensei pedig új típusú víziszárnyas reovírusokból származnak, illetve σC fehérjét kódoló szegmensének eredete egyelőre nem meghatározható. A D2533/6/1-10 és Reo/HUN/DuckDV/2019 törzsek nagy valószínűséggel valamilyen más (feltehetően nem háziásított) madár gazdafajból származnak, és onnan a vírus a faji határokat átlépve került át a vízibaromfi-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.

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.

Fácán reovírusok

A Reo/HUN/Pheasant/216/2015-as törzs a víziszárnyas eredetű reovírusokkal csak mérsékelt (39,43-77,53% nt, 29,80-95,90% as azonosság), viszont a tyúkfélékből, házityúkból, pulykából, fogolyból származó reovírusokkal nagymértékű hasonlóságot mutatott (65,11-94,46% nt, 59,09-99,22% as azonosság). Három gén esetében (λ B, λ C, σ B) egyértelműen házityúk eredetű, míg két gén esetében (σ C, σ NS) pulyka eredetű reovírus törzsekkel mutatta a nagyobb hasonlóságot. A többi gén esetében (λ A, μ A, μ B, μ NS, σ A) szintén monofiletikusan helyezkedett el a tyúkfélék reovirusaival, azonban külön ágat alkotott a csoporton belül. A μ B

fehérjét kódoló gén esetében pedig, nem csak a tyúkfélék, hanem az elemzésbe bevont összes madár reovírusról elkülönülve alkotott 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 genomszegmensei is vannak. A jelen vizsgálataink alapján tett megfigyeléseink alátámasztják azon korábbi eredményeket, melyek szerint a házityúk és pulyka eredetű reovírus törzsek képesek egymás közötti reasszortációra, alátámasztva ezzel egy fajhoz tartozásukat.

A D1996/2/1 fácán reovírus törzs egyetlen, jelenleg ismert madár eredetű reovírus 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 azonossági értékeket kaptunk (38,09-71,04% nt, 30,30-80,82% as azonosság). Kissé magasabb hasonlóságot tapasztaltunk, amikor a nemrégiben elfogadott vadmadár reovírus (NeARV) fajba besorolt Pycno-1 és TVAV törzsek szekvenciáival vetettük össze a D1996/2/1 genomszekvenciáit (45,64-

72,72% nt, 37,37-88,46% as azonosság), azonban többnyire ezek az értékek sem érték el az egy fajba soroláshoz szükséges határértéket. Ugyanakkor a filogenetikai fákon 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. Mindemellett a NeARV fajba történő besorolása is kérdéses, mivel – bár a filogenetikai fákon monofiletikus ágat alkot az oda tartozó törzsekkel – a hasonlósági adatok nem elégítik 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 kis számban, vadmadaraktól izolálták, és valószínűleg azért nem kerültek eddig a látómezőbe, mert nem cirkulálnak háziszárnyasokban.

A különböző gazdafajokból származó madár reovírusok közötti reasszortáció – új variánsok

megjelenésén keresztül – jelentős szerepet játszik ezen vírusok evolúciójában. Az ilyen változatok esetleges bekerülése a baromfiállományokba 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.

Hüllő reovírusok

A hüllőkből származó reovírus törzsek genomja más orthoreovírus fajok genomjával összehasonlítva alacsony fokú hasonlóságot mutatott (28,72-64,12% nt, 11,72-66,88% as azonosság), egyedül a 47/02 hüllő orthoreovírus referencia törzs genomjával fedezhettünk fel közelebbi rokonságot. Az *Orthoreovirus* nemzetség tagjaival készített filogenetikai fákon négy jól elkülönülő klád figyelhető meg: i) a három különböző szerotípusú emlős reovírus (Jones, Lang, Dearing); ii) a madár

reovírusok a denevér-eredetű Pulau és Nelson Bay reovírusokkal együtt; iii) a hulló reovírusok a pávián és az afrikai gyümölcssevő denevéreken élősködő kullancslegyekből kimutatott Mahlapitsi reovírusokkal közösen; iv) a hal reovírusok külön ágon.

A vizsgált hulló orthoreovírusok fajon belüli összehasonlításában három 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. A vizsgált törzsek csoportosulását az azonossági adatok is alátámasztották. Az ugyanazon leszármazási vonalhoz tartozó törzsek páronkénti azonossági értékei többnyire elérték az egy fajba soroláshoz szükséges határértékeket. A pikkelyes hullókból származó, különböző leszármazási vonalokhoz tartozó törzsek összehasonlításában azonban számos, a fajbesorolás szempontjából szürke zónába eső azonossági értéket láttunk, valamint néhány esetben a külön fajhoz sorolást jelentő azonossági értékeket 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 CH1197/96 törzs, melyet már teknősből izoláltak, nagy genetikai távolságot mutatott más reovírus fajokhoz tartozó törzsekkel és az RRV referencia törzssel szemben is. Az azonossági értékek csupán néhány esetben érték el az egy fajhoz soroláshoz szükséges határértéket. Erre magyarázat lehet, hogy a legújabb, DNS alapú rendszerek alapján maguk a gazdafajok is viszonylag távoli rokonsági kapcsolatban vannak egymással, és vírustörzseik a gazdafajjal együtt fejlődtek. A CH1197/96 és 47/02 törzsekkel végzett koinfekciós kísérletekben összesen 70 vírusizolátumot sikerült elkülöníteni, azonban egynél sem sikerült a genomszegmensek reasszortációját kimutatnunk.

Vizsgálataink során tett megfigyeléseink a hulló reovírusok és gazdafajaik koevolúciójára utalnak, a különböző gazdafajok homológ vírusai korán szétváltak, és gazdafajjukkal együtt fejlődtek tovább. Eredményeink alapján javasolható a hulló reovírusok két genocsoportra történő felosztása, melyek tagjait csoporton belül magas,

csoportok között pedig közepes nukleotid és aminosav szekvencia hasonlóság jellemzi. 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.

5. 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 hüllőkből 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.

4. Az értekezés témájában született közlemények

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.