

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Baromfi reovírusok genetikai diverzitása Kelet-Közép
Európában**

PhD értekezés

Dr. Gál Bence

2025

Témavezetők:

.....
Dr. Farkas Szilvia
Állatorvostudományi Egyetem
Szülészeti Tanszék és Haszonállatgyógyászati Klinika

.....
Bányai Krisztián
Pécsi Tudományegyetem

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

.....
Dr. Gál Bence

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Összefoglalás.....	7
3. Summary.....	9
4. Bevezetés	10
5. Irodalmi áttekintés	12
5.1. Az orthoreovírusok rendszertana	12
5.2. Az orthoreovírusok szerkezete, genetikai jellemzése	13
5.3. Az orthoreovírusok multiplikációja	17
5.4. Klinikai megjelenés és járványtan	19
5.5. Védekezési lehetőségek, immunológia, vakcinázás	23
6. Munkám célkitűzései	29
7. Anyag és módszer.....	30
7.1. Mintagyűjtés és mintafeldolgozás	30
7.2. Vírusizolálás	30
7.3. A virális nukleinsav kivonása.....	31
7.4. A σ C gén amplifikálása és szekvenciájának meghatározása	32
7.5. A teljes genom amplifikálása.....	35
7.6. Újgenerációs szekvenálás Illumina platformon.....	36
7.7. Adatelemzés	36
8. Eredmények.....	38
8.1. Reovírusok előfordulása pulykában	38
8.1.1. A σ C alapú klasszifikáció.....	38
8.1.2. Genom és génszintű elemzés.....	40
8.2. Reovírusok előfordulása házityúkban.....	46
8.2.1. Az izolált vírustörzsek klasszifikációja, patológiája, molekuláris járványtana.....	50
9. Megbeszélés	56
9.1. Pulyka eredetű reovírusok	56
9.2. Csirke eredetű reovírusok	58
10. Hipotézisvizsgálat.....	62
11. Új tudományos eredmények	63
12. Köszönetnyilvánítás.....	64
13. Irodalomjegyzék	65
14. Közlemények listája.....	76

15. Ábrák és táblázatok jegyzéke	77
15.1. Ábrák	77
15.2. Táblázatok	78

1. Rövidítések jegyzéke

ARV: madár orthoreovírus (Avian orthoreovirus)

aa: aminosav

bp: bázispár

BLASTn: biológiai szekvenciák illeszkedését vizsgáló szoftver – nukleotid adatbázisban keres (Basic Local Alignment Search Tool)

BLASTx: biológiai szekvenciák illeszkedését vizsgáló szoftver – peptid adatbázisban keres (Basic Local Alignment Search Tool)

CPE: sejtkárosító hatás (cytopathogen effect)

DNS: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxinukleotid-trifoszfát

dsRNS: duplaszálú ribonukleinsav (double stranded RNA)

GDP: nemzeti össztermék (gross domestic product)

ICTV: Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)

IgA: Immunglobulin A

L1-L3: az orthoreovírusok nagyméretű szegmensei (Large)

LMH: csirke májsejtes carcinoma sejtvonal (LMH = leghorn male hepatome)

M1-M3: az orthoreovírusok közepes méretű szegmensei (Medium)

MOI: a fertőzés multiplicitása (multiplicity of infection)

m/V%: vegyesszázalék, 100 cm³ oldatban lévő oldott anyag tömege gramm mértékegységre megadva

nm: nanométer

nt: nukleotid

PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PEMS: pulykák bélgyulladásal és elhullással járó tünetegyüttese (poult enteritis and mortality syndrome)

RdRp: RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)

RNS: ribonukleinsav

RT: reverz transzkripció

S1-S4: az orthoreovírusok kisméretű szegmensei (small)

SNV: single nucleotide variation

ssRNS: szimpla szálú ribonukleinsav (single stranded RNA)

TARV: pulyka arthritis reovírusa (turkey arthritis reovirus)

ORF: nyitott leolvasási keret (open reading frame)

UTR: nem-átírózó szakasz (untranslated region)

V/V%: térfogatszázalék, 100 cm³ oldatban lévő oldott anyag térfogata

2. Összefoglalás

A madár orthoreovírusok okozta vírusos enteritis betegséget és a vírusos tenosynovitist már az 1960-as évek óta ismerjük és védekezünk ellene. Mégis a 2010-es években egyre gyakoribbá váltak a tenosynovitis-esetek immunizált baromfiállományokban. A beteg állatokból új, variáns reovírusokat izoláltak, amelyek vélhetően áttörték az aktuális vakcinás védettséget. A madarak reovírusainak szigma C ($=\sigma C$) fehérjéje kulcsfontosságú a védekezésben, ezért a kutatók világszerte az új vírustörzsek σC fehérjét kezdték elemezni. Eleinte öt genocsoportot (klasztert) azonosítottak és megállapították, hogy az újonnan felbukkanó reovírusok σC fehérjéje nagyban különbözik a vakcinavírusokétól. Ez magyarázhatja, hogy az új vírusvariánsok ellen miért nem nyújt elegendő védettséget az aktuális vakcinázás. Ilyen esetekben a telepspecifikus autovakcinák használatával specifikusabb immunitást alakíthatunk ki az új reovírusokkal szemben. Újabb vakcinák fejlesztése és komplex védekezési stratégiák kidolgozása mutathat irányt a reovírusok elleni küzdelemben.

Tudományos kutatómunkám során a baromfi reovírusainak regionális előfordulását, klinikai jelentőségét, genetikai változatosságát igyekeztem feltérképezni, és megérteni ezek összefüggéseit, így segítve megoldást találni a védekezési lehetőségekben. Célul tűztem ki, hogy egy év alatt minél több mintát gyűjtök pulyka és házityúk állományokból. Egészséges és beteg állatokból egyaránt gyűjtöttem különféle szervmintákat. Ezen felül, ha lehetséges volt, igyekeztem minél többet megtudni ezen állományok állategészségügyi helyzetéről. A laboratóriumban klasszikus vírusizolálást végeztem, hogy az így kapott izolátumokon további molekuláris feltáró vizsgálatokat végezzek. RT-PCR tesztel megerősítettem a reovírus jelenlétét. Sanger-féle szekvenálással határoztam meg a σC fehérjét kódoló gén nukleotid ($=nt$) sorrendjét. Egyes esetekben teljes genom szekvenálást végeztünk, hogy pontosabb és részletesebb információkat kapjunk az izolátumok genetikai szerveződését illetően.

Az általunk gyűjtött mintákból származó reovírusok nagy genetikai változékonyságot mutattak és öt leírt genotípust reprezentálnak. Várakozásunk ellenére nem találtunk összefüggéseket baromfiban a reovírus patológiája és a σC alapú filogenetika között. Így juthatunk arra a következtetésre, hogy a σC genotípusa nem, vagy nem kizárólag határozza meg az ARV okozta betegségek megjelenését. Valószínűsíthető, hogy egyéb genetikai faktorok, beleértve egyes mutációkat a meghatározó géneken, vagy a különböző ARV gének variánsainak meghatározott kombinációi játszanak közre a patogenitásban. Ezen felül a vírus felületén található epitópok vizsgálata mutathat új irányt a kutatásban.

Eredményeink közül kiemelendő, hogy jelen munka az első átfogó kutatás magyarországi és Kelet-Közép Európai baromfiállományok reovírus fertőzöttségének felmérésében,

kiterjesztve a reovírusok klinikumára, genetikai diverzitására, valamint ezek összefüggésének vizsgálatára. Továbbá szinte azonos σC genetikával rendelkező reovírust mutattunk ki ugyanarról a brojler telepről hat év különbséggel, mely felveti a lehetőségét annak, hogy a reovírus képes egy baromfitelepen hosszú időn keresztül életben maradni az immunitásért felelős σC fehérje lényeges változása nélkül.

Eredményeink szerint a magyarországi pulyka eredetű reovírusok genetikailag azonosnak mutatkoztak, függetlenül a földrajzi eredetüktől. Rámutattunk továbbá arra, hogy a Magyarországon cirkuláló pulyka reovírusok közös forrásból származhatnak. Ugyanakkor eredményeink korlátozott számú mintán alapulnak és további szélesebb körű, nagyobb mintaszámú vizsgálatokra lenne szükség, hogy pontosabb képet kapjunk a magyarországi pulyka reovírusok leszármazási kapcsolatairól.

Először izoláltunk és írtunk le III.-as genetikai klaszterbe sorolható pulyka eredetű reovírust. Eddig ebbe a klaszterbe csak csirke eredetű reovírusokat soroltak. Valószínűleg ez fajok közötti átugrás eredménye.

A III.-as genetikai klaszterbe tartozó csirke reovírust csak a mirigyes gyomorban találtunk, pedig több száz bél mintát vizsgáltunk. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a σC fehérje hatással lehet a reovírus szervtropizmusára.

3. Summary

Avian orthoreoviruses (ARVs) have been recognized since the 1960s as causative agents of viral enteritis and tenosynovitis in poultry. Despite ongoing preventive efforts, a notable increase in tenosynovitis cases was observed in the 2010s, prompting the isolation of novel ARV variants from affected domestic birds. These emerging strains may evade immunity conferred by conventional vaccines, likely due to genetic divergence in the σ C (sigma C) protein, a key antigen involved in host immune recognition. Comparative analyses have revealed that σ C sequences of field strains differ significantly from those of vaccine strains, potentially explaining reduced vaccine efficacy. Consequently, autogenous vaccines tailored to local variants may offer improved protection.

This study aimed to assess the regional distribution, clinical relevance, and genetic diversity of ARVs, with the goal of informing novel preventive strategies. Over a one-year period, samples were collected from both healthy and diseased chicken and turkey flocks. Organ samples were subjected to classical virus isolation, RT-PCR for ARV detection, and Sanger sequencing of the σ C gene. Whole-genome sequencing was also performed to obtain comprehensive genetic profiles.

ARVs were successfully isolated from intestinal samples of broiler and breeder flocks in Hungary and neighboring countries. However, virus isolation from tendon tissues proved challenging, particularly in chronic cases, underscoring the importance of timely sampling. Isolates exhibited high genetic variability and represented all five known σ C genogroups. No clear correlation was found between σ C phylogeny and clinical manifestations, suggesting that other genomic factors or gene constellations may influence pathogenicity.

A key finding was the simultaneous presence of genetically distinct ARV strains within single flocks, as well as the re-isolation of genetically identical strains from the same operation six years apart. These observations raise concerns regarding biosecurity and disinfection efficacy. In contrast, turkey ARV isolates from Hungary displayed low genetic diversity, indicating a likely common origin. Further large-scale studies are warranted to elucidate the evolutionary relationships and epidemiological dynamics of ARVs in regional poultry populations.

4. Bevezetés

A magyar baromfiágazat – azzal együtt is, hogy 2021–2023 folyamán az eredményessége csökkent – az állattenyésztési ágazatok közül a legnagyobb mértékben járul hozzá a bruttó hazai termék (GDP) előállításához (Jung/Magyarmezogazdasag.hu, 2023). Éves szinten mintegy hétszázezer tonna vágóbaromfi termelésével mintegy 500-550 milliárd forint értéket állít elő. Kétségtelen, hogy az ágazatot az elmúlt időszakban számos negatív hatás érte, ehelyütt csak utalunk a madárinfluenza káros hatásaira, vagy arra, hogy harmadik országok – így Brazília, Thaiföld, illetve Ukrajna – számottevő mértékben növelték az Európai Unióba szállított baromfihús mennyiségét (Agrárszektor, 2023). Az OECD és a FAO prognózisai szerint azonban mindez hosszú távon nem érinti a szektor növekedési lehetőségeit, óvatos becslések szerint 2031-re világszerte a baromfihús fogyasztása 154 millió tonnára, globális exportja 16 millió tonnára nő, nem függetlenül attól a tényről, hogy élelmezési szempontból jó minőségű és viszonylag olcsó fehérjeforrásról van szó, mely már most is jelentős szerepet tölt be a fejlődő országok (köztük a nagy felvevőpiacot jelentő Kína, India, Indonézia) élelmezésében. Stratégiai fontosságú kérdés tehát mind az Európai Unió, mind Magyarország szempontjából, hogy baromfiállományaink egészségesek és ellenállóak legyenek, valamint baromfitermelésünk teljes vertikuma megfeleljen az állategészségügyi és közegészségügyi előírásoknak (Agrotrend/Magyar Állattenyésztők Szövetsége, 2024).

A baromfiállományokat veszélyeztető reovírusok területén ezzel szemben aggasztó tendenciáknak lehetünk tanúi. A 2010-es évektől kezdve világszerte megnövekedett a tenosynovitis-esetek száma immunizált baromfiállományokban (Sellers és mtsai, 2017). A beteg állatokból új, variáns reovírusokat izoláltak, melyek feltehetően áttörték a jelenlegi vakcinák nyújtotta védettséget. Ezt tisztázandó, kutatók több új vírustörzs σC fehérjét elemeztek, és a nukleotidszekvenciák összehasonlítását követően általában hat különböző genocsoportot azonosítottak (Ayalew és mtsai, 2017; Lu és mtsai, 2015; Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Yamaguchi és mtsai, 2022). A legújabb kutatások már hét genetikai klasztert azonosítanak (Nour és mtsai, 2024). Az újonnan felbukkanó reovírusok σC fehérjeje számottevően eltér a vakcinavírusokétól (Sellers és mtsai, 2017). Ez magyarázatul szolgálhat az alacsonyabb szintű védettségre. A megoldást újabb kereskedelmi vakcinák kifejlesztése mellett a telepspecifikus autovakcinák jelenthetik, melyek használatával adekvát, az adott állomány viszonyaihoz igazodó immunitás alakítható ki az új reovírusokkal szemben. Újabb eredmények szerint bizonyos genotípusba tartozó reovírusokat nem sikerült visszaszorítani a specifikus antigént tartalmazó telepspecifikus autovakcinákkal sem (Sellers és mtsai, 2023). Meggyőződésem, hogy a reovírusok elleni hatékony fellépéshez az újabb vakcinák kifejlesztése önmagában nem elégséges. Szükség van komplex védekezési stratégiák

kidolgozására, és azok következetes gyakorlati megvalósítására (Sellers és mtsai, 2017). Megfigyelésünk szerint az utóbbi években Magyarországon a kereskedelmi vakcinák használata mellett a reovírusos betegségek jól kontrollálható szinten maradtak a 2010-es évekhez képest. Véleményünk szerint ez elsősorban annak köszönhető, hogy ez idő alatt a járványvédelem, telepi higiénia és az állatorvosi ellátás területén sokat fejlődött a baromfiipar. A fentieket számos külföldi kutató munkája is alátámasztja (Grafl és mtsai, 2019; Sellers és mtsai, 2017). Gallardo és munkatársai rámutattak arra, hogy minden erőfeszítésünk ellenére és az autovakcinák használatával sem sikerült a revírusok okozta betegséget eliminálni, így az továbbra is velünk marad a baromfi termelésben (Gallardo és mtsai, 2023).

A reovírusok okozta bántalmak fontos kutatási terület marad a jövőben is, tekintettel a vírus nagyfokú változékonyságára és a patogentitási összefüggések tisztázatlan állapotára.

5. Irodalmi áttekintés

A reovírusok – miként arra a család Albert Sabintól származó elnevezése (respiratory enteric orphan viruses) is utal – főként emésztőrendszeri vagy légzőszervi fertőzéseket okoznak gerinces állatfajokban. Ugyanakkor a távolabbi rokonsági körbe tartozó reovírusszerű ágensek előfordulnak gerinctelen állatokban, gombákban, növényekben és egysejtű eukariótákban is (Sabin, 1959; Joklik, 1981; Medveczky és mtsai., 1998; Mertens és mtsai., 2000; Schiff és mtsai., 2007; Matthijnssens és mtsai, 2022). A továbbiakban a baromfi fajokat fertőző orthoreovírusokat tárgyaljuk részletesen.

5.1. Az orthoreovírusok rendszertana

A *Reovirales* rendbe összesen 15 vírusnemzetség tartozik, melyek a felszínükön elhelyezkedő tüskék alapján két családba sorolhatók. A *Spinareoviridae* család az *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Oryzavirus* és *Orthoreovirus* nemzetségeket foglalja magába. Tagjainak mindegyikénél viszonylag nagy, tüskeszerű képletek találhatók a virion felszínén. A *Sedoreoviridae* család tagjainál nincsenek tüskeszerű képletek, a virion felszíne gyakorlatilag teljesen sima. Ebbe az alcsaládba sorolandók a *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* és *Seadornavirus* nemzetségek tagjai. Az egyes nemzetségek a genomszegmenszek száma, a gazdaspektrum, a vírus által okozott klinikai tünetek, a kapszidszerkezet, a nukleotid, illetőleg a származtatott aminosav szekvenciák tekintetében mutatnak hasonlóságot (Matthijnssens és mtsai, 2022).

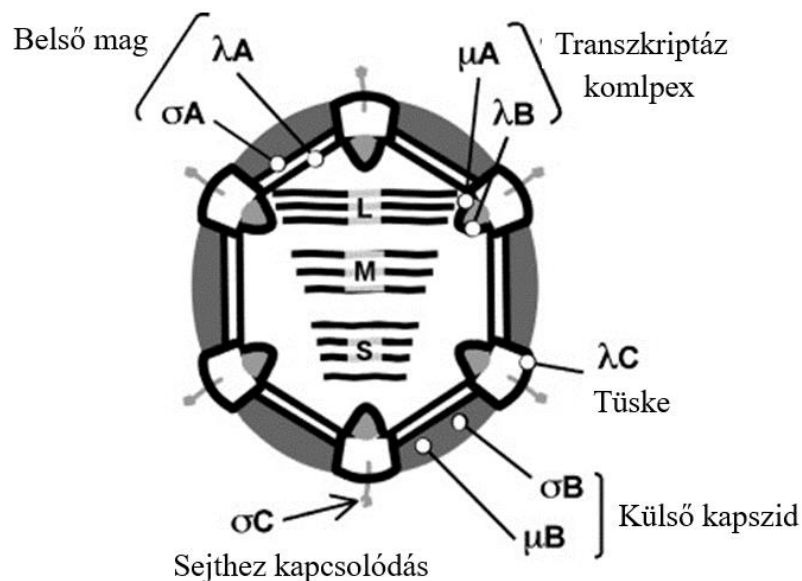
Az *Orthoreovirus* nemzetségen belül – a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, a továbbiakban: ICTV) tipológiája alapján – a következő fajok különböztethetők meg: madár orthoreovírus (*Orthoreovirus avis*, ARV), Broome orthoreovírus (*Orthoreovirus broomense*, BrRV), Mahlapitsi orthoreovírus (*Orthoreovirus mahlapitsiense*, MAHLV), emlős orthoreovírus (*Orthoreovirus mammalis*, MRV), denevér orthoreovírus (*Orthoreovirus nelsonense*, NBV), vadmadár orthoreovírus (*Orthoreovirus neoavis*, NeARV), pávián orthoreovírus (*Orthoreovirus papionis*, BRV), hal orthoreovírus (*Orthoreovirus piscis*, PRV), hüllő orthoreovírus (*Orthoreovirus reptilis*, RRV), valamint teknős orthoreovírus (*Orthoreovirus testidunis*, TRV).

Az ICTV ajánlásai szerint a nemzetségen belül az egyes fajok meghatározása különféle biológiai és molekuláris jellemzők alapján lehetséges. Faji besorolásnál figyelembe veendő a vírus gazdafaja, a tünetek, melyeket a vírus idéz elő a gazdafajban, az RNS genom agaróz gélelektroforézissel nyert elektroforetogramja, továbbá az, hogy van-e lehetőség az egyes

vírustörzsek közötti reasszortációra vagy sem. Mindezeken túlmenően az ICTV gén- és fehérjeszekvencia azonossági határértékeket is meghatároz. Ennek megfelelően egy fajba tartozóknak tekintjük azokat a reovírustörzseket, melyek homológ génjeinek nukleotid szekvenciája 75%-nál nagyobb azonosságot, core (mag) fehérjéinek aminosav szekvenciája 85%-nál, kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája 55%-nál nagyobb azonosságot mutat. Külön fajba soroljuk azon orthoreovírusokat, melyeknek nukleotid szekvenciája kevesebb, mint 60%-ban, mag fehérjéinek aminosav szekvenciája 65%-ban, kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája legfeljebb 35%-ban hasonlít egy már ismert és jól körülírt vírusfajba tartozó törzs homológ proteinjeihez (Duncan és mtsai, 2004; Matthijnssens és mtsai, 2022). A határértékek ilyen tág meghatározása (nukleotid 60–75%, core fehérje aminosav 65–85%, külső kapszid fehérje aminosav szekvencia azonosság 35–55%) meglehetősen nagy bizonytalanságot eredményez új vírustörzsek esetében a faji besorolás megállapításánál (Varga-Kugler és mtsai, 2021). Az *Orthoreovirus* nemzetség tagjai kizárólag gerinceseket fertőznek a légutakon keresztül vagy szájon át. Az *Orthoreovirus* nemzetségbe tartozó ARV évtizedek óta ismert, ám az utóbbi tizenöt évben újabb genetikai variánsai növekvő esetszámokat idéznek elő világszerte. Ez a jelenség számos kutató figyelmét a reovírusokra terelte és első lépésben igyekeztek az újabb reovírus variánsokat genotípusokba illetve genetikai klaszterekbe soroló klasszifikációs rendszert létrehozni. Mára kiderült, hogy az egységes álláspont kialakítása ezen a téren nem egyértelmű. Ez a kérdés bővebben a 8.2.1 Az izolált vírustörzsek klasszifikációja, patológiája, molekuláris járványtana című fejezetben kerül tárgyalásra.

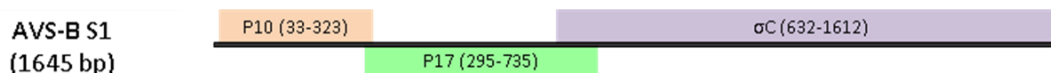
5.2. Az orthoreovírusok szerkezete, genetikai jellemzése

Az orthoreovírusok burokkal nem, viszont jól meghatározott ikozahedrális kétrétegű fehérjekapszid struktúrával rendelkeznek, felületükön 12 tüskével. A külső kapszid 85 nm átmérőjű. Virionjuk tíz lineáris dupla szálú RNS molekulából áll, melyek közül három hosszú (L1-L3), három közepes hosszúságú (M1-M3), míg négy rövid (S1-S4) (1. ábra).



1. ábra. Egy madár reovirion sematikus felépítése. (A kép forrása: Benavente és Martínez-Costas, 2007)

Ezeket hívjuk genomsegmenseknek, melyek általában egyetlen fehérje felépítéséhez szükséges információt hordoznak (monocisztronosak). Esetenként több fehérjét meghatározó genomsegmensek is felépülhetnek (policisztronos genomsegmens) (2. ábra).



2. ábra. Az S1 policisztronos genomsegmens felépítése az AVS-B jelű madár reovírus törzs példáján bemutatva

A genomsegmensek egyes részei nem kódolnak információt, nem képződik róluk fehérje. Ezeket UTR-nek hívjuk (UTR= untranslated region, nem-átírózó szakasz).

Ezekről a genomsegmensekről képződnek a viriont alkotó különböző fehérjék, melyek fontosabb tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze. A fehérjék nomenklatúrájában eltérések lehetnek, a jelen munkában a madarakra vonatkozó nevezéktant használjuk.

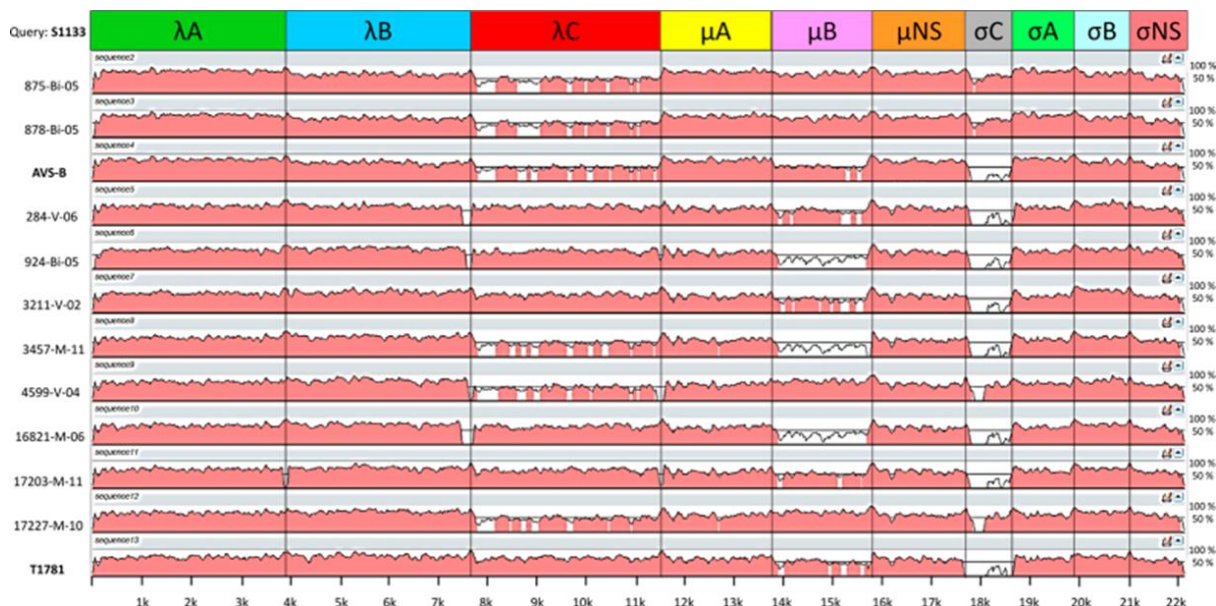
1. táblázat. A reovírus virionját alkotó főbb fehérjék és azok elhelyezkedése, valamint funkciói

Genom szegmens	fehérje	Lokáció	Funkció
L1	λA	mag	belső kapszid szerkezeti fehérje, NTPáz, helikáz aktivitással
L2	λC	Mag	mag nyúlvány, capping enzim, metiltranszferáz és guanililtranszferáz aktivitással
L3	λB	Mag	RNS-függő RNS-polimeráz
M1	μA	Mag	NTPáz
M2	μB	külső kapszid	külső kapszid fő szerkezeti fehérje
M3	μNS	nem strukturális	ssRNS és a citoszkeleton kötődése
S1	σC	külső kapszid	külső kapszid fiber, vírus-sejt kapcsolódása
S2	σA	mag kapszid	belső kapszid szerkezeti fehérje
S3	σB	külső kapszid	külső kapszid minor szerkezeti fehérje
S4	σNS	nem strukturális	ssRNS-kötő funkció

A vírus szegmentált RNS-genomja és a virális RNS-függő RNS-polimeráz enzim hibajavító mechanizmusának elégtelen működése nagyobb lehetőséget biztosít a különböző genetikai átalakulásokra. Ezek a változások lehetnek szegmensben belüli rekombinációk vagy pontmutációk, de szegmensek közötti újrendeződést (reasszortáció) is megfigyeltek (Farkas és mtsai, 2016). A reovírusok S1 szegmense meglehetősen nagy változékonyságot mutat a különböző vírustörzsek között (3. ábra). Mivel az S1 szegmensről átíródó σC fehérje határozza meg a vírus sejthez történő kapcsolódását és vírusneutralizációs tulajdonságát, nem meglepő, hogy az itt bekövetkező változások jelentős hatással vannak a vírus elleni védekezés hatékonyságára (De Carli és mtsai, 2020). Érthető tehát, hogy a molekuláris kutatások során kiemelkedő jelentőségű a σC fehérje bioinformatikai elemzése.

Számos kutatócsoport a σC fehérje vizsgálatán keresztül igyekezett megérteni a vírus genetikai változékonyságából eredő különböző tulajdonságokat (Farkas és mtsai, 2016; Egaña-Labrin és mtsai, 2019; De Carli és mtsai, 2020; Ayalew és mtsai, 2020; Kovács és mtsai, 2023; Mirbagheri és mtsai, 2020). Egyes esetekben azonban a teljes genom

szekvenálással átfogóbb és részletesebb képet kaphatunk a genom szerveződéséről és az esetlegesen bekövetkezett reasszortációs jelenségekről. A fentiek kutatásának egyébként járványtani nyomozás szempontjából is van jelentősége (Farkas és mtsai, 2016; Troxler és mtsai, 2013; Tang és mtsai, 2015; Zhong és mtsai, 2016). A 3. ábra jól ábrázolja néhány reovírus genomszegmenseinek változatosságát.



3. ábra. Tíz vizsgált magyarországi, a T1781, valamint az S1133-as és AVS-B referenciatörzsek genomszekvenciáinak bioinformatikai elemzéseinek eredményei: A magyarországi törzsek szekvencia-összehasonlítása 71,1–100% közötti nukleotid-azonosságot és 83,0–100% közötti aminosavszekvencia hasonlóságot mutatott, kivéve a μB és σC géneket, ahol nagyobb genetikai variabilitást figyeltek meg. Ezeknél a géneknél a nukleotid-azonosság 62,7–99,8% (μB) és 52,9–100% (σC), míg az aminosav-azonosság 71,3–99,7% (μB) és 46,2–100% (σC) közötti értékeket adott. (A kép Farkas és mtsai, 2016-os közleményéből származik)

A Génbankba feltöltött madár eredetű reovírus-törzsek σC kódoló gén szekvenciaadatai alapján Kant és munkatársai megalkották a mai napig referenciaként használatos filogenetikai besorolást. Kant és munkatársai öt különböző genotípusba (klaszterbe) sorolták a reovírusokat: 1-es, 2-es, 3-as, 4-es és 5-ös klaszterek (Kant és mtsai, 2003). Az újabban izolált vírustörzsek közül némelyeket nem tudnak besorolni a meglévő klasszifikációs rendszerbe, továbbá egyes ARV-eket a különböző szerzők más-más klaszterbe sorolnak a saját filogenetikai elemzéseik során. Ezenfelül több kutató is felvetette, hogy szükség van egy hatodik genotípus létrehozására, azonban a tudományos álláspont ezen a téren nem egységes. (Ayalew és mtsai, 2020). De Carli és munkatársai például úgy ítélték meg, hogy további alcsoportok

létrehozásával előnyösebb filogenetikai rendszert kaphatunk: I-vakcina, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc és IVa, IVb (De Carli és mtsai, 2020).

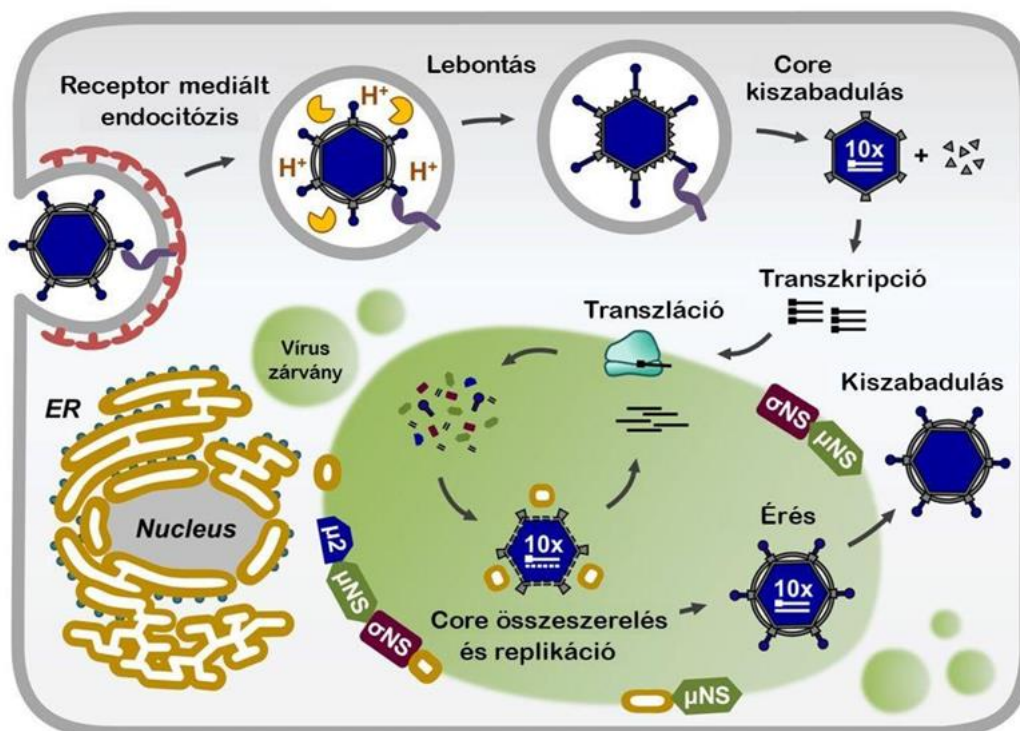
A következőketes kutatómunka és az újabb labormódszerek elterjedésének eredményeképpen gyorsan bővülő reovírus szekvencia adatbázis láttán, a kutatók egyre gyakrabban érzik szükségét a filogenetikai klasszifikációs rendszer újragondolásának (Palomino-Tapia és mtsai, 2018).

A gyorsan bővülő σC kódoló gén szekvenciaadatok és ezek elemzései ellenére a kutatók nem találtak összefüggéseket a genetikai tulajdonságok és a patogenitás, illetve a betegség klinikai megjelenése között. Korábban nem találtak összefüggéseket a különböző klaszterek földrajzi előfordulásában (Ayalew és mtsai, 2017; Kant és mtsai, 2003; Yamaguchi és mtsai, 2022). Újabb kutatások azonban rávilágítottak arra, hogy a különböző kontinenseken eltérő genetikai klaszterek tekinthetők dominánsnak. Például az Amerikai Egyesült Államokban mind a hét genetikai klasztert leírták és az ízületgyulladásos betegségek hátterében elsősorban az I.-es klaszter dominál. Ausztráliában ezzel ellentétben mindössze két genocsoportot írtak le; a IV.-es és V.-ös klasztereket (Kovács és mtsai, 2023; Nour és mtsai, 2024). A kérdés bővebb megvitatására a 9. Megbeszélés című fejezetben kerül sor.

5.3. Az orthoreovírusok multiplikációja

A reovírusok változékonyságának meghatározó mozzanata a vírus sokszorozódása és genetikai információinak átíródása, amely a gazdasejt citoplazmájában zajlik. Első lépésben a vírus a σC fehérje segítségével kapcsolódik a gazdasejt sejtfelszíni receptoraihoz, majd receptor mediált endocitózissal bejut a sejtbe (Benavente és Martínez-Costas, 2007).

A duplaszálú RNS genommal rendelkező vírusok esetében a replikáció nehézségekbe ütközik, mert a gazdasejtben az intracelluláris duplaszálú RNS jelenléte védelmi mechanizmusként interferon termelést és géncsendesítést indukál. Ez különböző kaszkád folyamatokon keresztül a sejt széteséséhez vagy apoptózisához vezet (Mertens és mtsai, 2000). Ezt elkerülendő az orthoreovírusok genomja a belső kapszidból nem jut a citoplazmába. Csak a külső kapszid válik le a virionról, így a vírusgenom rejtve marad a gazdasejt védekező mechanizmusai elől. Majd később a gazdasejtben, a virion az endolizoszómák savassá váló közegében elveszíti külső kapszidját, és átalakul egy fertőző vírusrészecskévé (infectious subvirion particle, ISVP) (4. ábra) (Tenorio és mtsai, 2019; Guglielmi és mtsai, 2006). Az ISVP további fehérjemódosulások után lép keresztül az endolizoszómák membránján és az így szabaddá váló, a belső kapszid és az általa körülzárt genomszegmensek és fehérjék alkotta, transzkripció szempontjából aktív core részecske jut a citoplazmába (Guglielmi és mtsai, 2006; Tenorio és mtsai, 2019).



4. ábra. Sematikus ábra a reovírusok sejtbe jutása és sejtben belüli replikációjáról

(A kép forrása: Tenorio és mtsai, 2019)

A transzkripció során a virális magon belül található RNS-dependens RNS polimeráz (RdRp) enzim a genomi dsRNS molekulákat templátként használva produkál, a dsRNS genom pozitív szálával megegyező messenger RNS (mRNS) molekulákat. Majd a transzláció során a kész mRNS molekula belép a gazdasejt citoplazmájába, és a riboszómák elkészítik a virális fehérjéket az mRNS-en tárolt információ alapján. A továbbiakban a sejtek citoplazmájában található vírus zárványokban történik a vírusreplikáció és összeszerelődés. Ezek kialakításában elsődlegesen a μ NS és σ NS fehérjék vesznek részt. Ezen zárványok a citoplazmában keletkezett, majd onnan a viroplazmába szállított vírusfehérjéket, virális RNS-t és részben vagy egészen összeszerelt vírusrészecskéket tartalmaznak. Itt történik meg elsőként a core részecskék összeszerelődése, melyen belül a virális transzkriptáz komplex az mRNS-t templátként használva szintetizálja a negatív RNS szálakat, így állítva elő újra a dsRNS genom szegmenseit. Egy jól kontrollált folyamat biztosítja, hogy minden szegmensből egy darab jusson az utódvírusba. A kialakult core részecskék ezután vagy visszalépnek a vírusreplikációs ciklusba, és új mRNS-eket kezdenek gyártani, vagy a külső kapszidburok felépülésével kész utódvírus keletkezik belőlük (Tenorio és mtsai, 2019) (4. ábra).

5.4. Klinikai megjelenés és járványtan

A madár orthoreovírusok (ARV, avian reoviruses) világszerte elterjedtek a baromfiállományokban, és változatos megbetegedéseket okoznak.

Elsőként – 1954-ben – Fahey és Crawley izolálták házityúkok (*Gallus gallus domesticus*) enyhe lefolyású légzőszervi megbetegedéseinek vizsgálatakor azt a vírustörzset (Fahey–Crawley, 1954; Petek és mtsai, 1967), melyet 1972-ben reovírusként azonosítottak (Olson–Kerr, 1966; Walker és mtsai, 1972). A vírust a későbbiekben más madárfajok megbetegedéseivel is kapcsolatba hozták (Jones, 2020). Számos ARV-változatot izoláltak világszerte főként házityúkok és pulykák, illetve egyéb tyúkalkatú madarak különböző klinikai kórképekben jelentkező megbetegedéseiből. Az ARV-fertőzések egy része tünetmentesen zajlik le. Az a körülmény, hogy a vírus kimutatható egészséges egyedek emésztőrendszeréből és légutaiból, megnehezíti a betegségekben betöltött szerepének a tisztázását (Day és mtsai, 2009; Jones, 2008b).

Az orthoreovírusok szerepet játszanak házi pulykákban (*Meleagris gallopavo*) a vírusos ízületi- és ínhüvelygyulladás kialakulásában és a bélgyulladásos komplex (PEC, poult enteritis complex) kialakulásában, valamint egyéb bélgyulladással és elhullással járó tünetegyüttes kialakulásában (PEMS, poult enteritis and mortality syndrome) (Heggen-Peay és mtsai, 2002; Jones 2008; Sellers és mtsai, 2023; Spackman és mtsai, 2005). Ezeken felül a reovírusok előidézhethetnek myocarditist is (França és mtsai, 2010; Shivaprasad és mtsai, 2009).

Gyöngytyúkokban (*Numida meleagris*) igazolást nyert az orthoreovírus és a hasnyálmirigygyulladással járó megbetegedések közötti kapcsolat (Tanyi és mtsai, 1994). Kacsákban (*Anatidae* család) és libákban (*Anatidae* család) az orthoreovírus hasmenés, epicarditis, hepatitis, splenitis és tenosynovitis kialakulását eredményezheti (Malkinson és mtsai, 1981; Jones, 2000; Palya és mtsai, 2003; Jones, 2008; Wang és mtsai, 2013).

Több vadon élő, illetve házasított madárfajból is sikerült kimutatni orthoreovírusokat. Például fácánokban (*Phasianus colchicus*) hasmenéssel, míg amerikai szalonkában (*Scolopax minor*) kóros lesoványodással hozták kapcsolatba (Mutlu és mtsai, 1998; Docherty és mtsai, 1994). Továbbá virginiai fogasfürejekben (*Colinus virginianus*) elhullással járó enterális tüneteket, foglyokban (*Perdix perdix*) pedig felsőlégtüti megbetegedést okozott a reovírus (Ritter és mtsai, 1986; Kugler és mtsai, 2016). Nagy lilikben (*Anser albifrons*), vetési ludakban (*Anser fabalis*) és telepen nevelt struccokban látens ARV fertőzést írtak le, melynek során az igazolt fertőződés nem járt klinikai tünetek megjelenésével (Cadman és mtsai, 1994; Hlinak és mtsai, 1998).

Több kutató szerint a fiatal brojlercsirkék vannak leginkább kitéve a fertőzésnek (Rosenberger és mtsai, 1989; Jones, 2000; Davis és mtsai, 2012).

A házityúk reovírus-fertőzéseinek két fő megjelenési formáját azonosították. Az ARV fiatal brojlercsirkében sántasággal járó tenosynovitist, más néven vírusos arthritist okoz, egyértelmű klinikai és kórbonctani képpel (Sellers és mtsai, 2023). A másik fő megjelenési formájában hozzájárulhat a hasmenéssel, szétnövés, szórtsággal, helikopter tollazattal járó vírusos enteritis kialakulásához, melyet leggyakrabban satnyaság és törpenövés szindrómaként vagy tünetegyüttesként említene. Jellemzően a 4-16 hetes korú egyedek betegednek meg, de hét hetes korban is gyakran találkoznak a szakemberek a betegséggel (Gouvea–Schnitzer, 1982; Lee és mtsai, 1992; Liu és mtsai, 2003).

A tenosynovitis hústípusú szülőpár-, illetve fiatal brojlerállományokban jelentkezik és okoz jelentős károkat. Azonosították ugyan étkezési tojást termelő tyúkokban is a reovírust, ám jelentősége mérsékeltebb és oktani szerepe is tisztázásra vár (Tang és mtsai, 2016).

A tenosynovitis kórfejlődése során a reovírus behatol a csánkízületbe, ahol elszaporodva az ízületi porcok, ínhüvelyek és inak gyulladását idézi elő. Duzzanat alakul ki a csánk felett, mely az ujjhajlító inak és a gastrocnemius ín heveny savós gyulladásának következménye. Idültebb esetben vérzéses-fibrines gyulladás kialakulásával, súlyos esetben a gastrocnemius inak teljes szakadásával kell számolni (1. kép). A tenosynovitisben szenvedő madarak nem tudnak állni és járni, emiatt képtelenné válnak a megfelelő táplálkozásra, nem jutnak vízhez, növekedésük szükségképpen lelassul (Gouvea–Schnitzer, 1982; Lee és mtsai, 1992; Liu és mtsai, 2003).



1. kép. A bal oldalon egy fiatal brojlercsirke csánkízületének duzzanata. A jobb oldalon fibrines-vérzéses íngyulladás látható a csánkízület felett (saját fotó)

Az állomány szintű tünetekhez ilyenkor a szétnövés, szórtság jelensége társul. Brojlercsirkékben jellemzően a harmadik-negyedik élethéten jelentkeznek az első tünetek, míg szülőállományoknál az intenzív testtömeg-gyarapodás időszakában (5–12. héten) vagy a tojástermelés beindulásakor. Annak ellenére, hogy egyes esetekben a kakasok nagyobb érintettségét figyelték meg (Sellers és mtsai, 2023), egyértelmű ivari predispozíciót a reovírusos tenosynovitis-szel összefüggésben mindeztáig nem igazoltak. A vírusfertőzés súlyossága több tényezőtől is függ, így leginkább a gazdaállat korától, immunstátuszától, a vírustörzs patogenitásától és a fertőzés módjától (Sellers és mtsai, 2023).

Súlyos ARV-fertőzés esetén akár elhullás is előfordulhat, de ha meg is gyógyul az egyed, az állomány szintű eltérő fejlettség, szórtság végigkíséri a fertőzésen átesett állományokat. A vágás során így számítani kell visszaminősítésre, mely további károkat okoz a baromfitartónak (Attoui és mtsai, 2011; Jones, 2000). A mortalitás 10% körül alakul, míg a moribitás 20-40% közé esik (Ayalew és mtsai, 2017). A baromfi ágazatban ezek közepes szintű kiesésnek számítanak, ám a csökkent súlygyarapodás, a már említett egyenetlen növekedési ütem és a másodlagos vírusos vagy bakteriális fertőzések következtében az összesített anyagi kár számottevő lehet (Van der Heide és mtsai, 2000).

A madarak reovírus-fertőzéseinek másik kórformáját több névvel is illetik; vírusos enteritis, satnyaság és törpenövés tünetegyüttes, (RSS, runting-stunting syndrome), malabszorpcios szindróma (MAS) (van Loon és mtsai, 2001). Ezen kórforma kóroktanában a reovírus szerepe ugyanakkor még tisztázásra vár (Jones, 2000; Bányaí és mtsai, 2011). A vírusos enteritis kórforma esetén a vírus elszaporodik a vékonybélben, és károsítja a bélhámsejteket, így felszívódási zavarokat és következményes hasmenést okoz. Szövettanilag jellemző a bélboholyatrófia. A boncoláskor feltárt béltartalom híg, habos állagú, benne emésztetlen takarmányalkotókkal (Dobos-Kovács, 2016). Az enterális tünetek – melyek rendszerint 3–5 hetes brojlekben figyelhetők meg – legtöbbször a következők: hasmenés, csökkent testtömeggyarapodás, tollasodási problémák („helikopter” tollazat), léziók a májban, a lépben és a Fabricius-féle tömlőben (Davis és mtsai, 2012).

A vírusos enteritis kórforma kevert oktanú betegség, mely esetében a leírt tünetek és elváltozások hátterében jellemzően több vírus is szerephez juthat a reovírustól kívül. Parvovírus, rotavírus, astrovírus, coronavírus, adenovírus a leggyakoribb társfertőzők és ezek mennyisége, aránya széles skálán változhat (Dobos-Kovács, 2016). A vírusfertőzés bélkárosító hatásából adódóan felszívódási zavar (malabsorpció) és elégtelen emésztés (maldigestio) alakul ki. Valószínűsíthető ugyanakkor az is, hogy a vírusos oktan mellett, az ARV okozta tüneteket felerősítve másodlagos károsító hatások – például diszbakteriózis, kokcidiózis, takarmányozási hibák, mikotoxikózis – is társulhatnak (Dobos-Kovács, 2016).

Nem zárható ki a két kórforma együttes megjelenése sem, mely tovább színesíti a szakemberek diagnosztikai munkáját.

Az említetteken felül egyéb, változatos kórképek hátterében is leírták a reovírusokat pl. hasnyálmirigygyulladás vagy szívizomgyulladás esetén (Tanyi és mtsai, 1994; Davis és mtsai, 2012). Mindezeken túlmenően az orthoreovírus feltehetően szerepet játszik májgyulladás, immunszuppresszió, szívburokgyulladás, bélgyulladás, tüdőgyulladás, agyvelőgyulladás (Goodwin és mtsai, 1993; Robertson, 1986; Van der Heide, 2000) kialakulásában.

A fertőzéssel szemben legfogékonyabb a napos csirke, és a fogékonyság az életkor előrehaladásával csökken (Davis és mtsai, 2012; Troxler és mtsai, 2013). A reovírus feko-orális úton, táplálkozás vagy levegővétele során, illetve a talppárna repedésein keresztül juthat az állat szervezetébe. A környezetből fertőződött madarak a vírusokat horizontálisan is tovább terjesztik az állományon belül. Fiatal brojlerek vertikálisan, szülőállománytól is fertőződhetnek. A kikelt naposcsibéket akár több ezer kilométerre is szállítják a hízalótelepekre, így a reovírust nagyobb távolságba is eljuttathatják, megfertőzve más állományokat (Sakai és mtsai., 2009; Perelman és mtsai., 2019). Növendék korban (6-10. hét), illetve felnőtt korú brojler szülőpárállományoknál szubklinikai megjelenéssel is számolni kell (Davis és mtsai, 2012; Troxler és mtsai, 2013; Perelman és mtsai, 2019). Grafl és munkatársai szerint a vertikális terjedést igazolja az ARV okozta esetek előfordulási gyakoriságának emelkedése 0-14 napos csirkékben. Megállapították továbbá, hogy a telepi fertőtlenítési gyakorlat minősége nem játszik meghatározó szerepet a fertőzési lánc megszakításában (Grafl és mtsai, 2019). Ezek alapján még napjainkban is helytálló lehet Jones (1984) következtetése, mely szerint az ARV elleni védekezés során az elsődleges cél az, hogy megelőzzük a csibék fertőződését életük első két hetében. Mindez nem jelenti azt, hogy idősebb egyedek nem fertőződhetnének meg, esetükben azonban a betegség lefolyása enyhébb lehet (Jones, 2008a; Lu és mtsai, 2015; Troxler és mtsai, 2013).

A csirkék reovírus-fertőzései, illetve az azok által okozott betegségek az 1960-as évek óta ismertek a baromfival foglalkozó szakemberek számára. Az 1970-es, 1980-as években az Amerikai Egyesült Államokban (USA) izolált S1133, 1733 és 2408 jelzésű törzsekből készült oltóanyagokkal világszerte sikereket értek el a megbetegedések visszaszorításában. A 2010-es évek legelején azonban több országban, köztük Franciaországban, Lengyelországban, az Amerikai Egyesült Államokban, Brazíliában, Izraelben, Kanadában, Iránban és a Dél-Afrikai Köztársaságban a vakcinázott csirke- és pulykaállományokban egyre gyakrabban diagnosztizáltak tenosynovitis eseteket (Sellers és mtsai, 2017; Czekaj és mtsai., 2018; Reck és mtsai, 2019; Mirbagheri és mtsai, 2020; Bokaie, 2008, Ayalew és mtsai, 2017). A kutatók arra a megállapításra jutottak, hogy az ínhüvelyekből, ízületekből izolált reovírusok genetikai összetétele az addig ismertektől eltérő volt, új variánsok alakultak ki (Ayalew és mtsai., 2017).

Az új változatok akut tenosynovitist és szívburokgyulladást okoztak még az ARV ellen vakcinázott brojlercsirkékben és szülőpárokban is (Van der Heide, 2000; Davis és mtsai, 2012). A reovírusok igen ellenállóak fertőtlenítőszerrel, proteolitikus enzimekkel

(gyomorban) és hővel szemben, ezért a környezetben sokáig életképesek és fertőzőek maradnak. Következésképpen a vírusváltozatok sokáig cirkulálhatnak az állományokban, és az élő állatokkal vagy tojással könnyen terjeszthetők akár országokon, kontinenseken át (Jones, 2000; Ayalew és mtsai, 2020).

Az Észak-Amerikában izolált vírusok túlnyomó része a 4-es és 5-ös klaszter valamelyikébe tartozik (Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Sellers és mtsai, 2017; Sellers és mtsai, 2023). A Dél-Amerikai kontinensen az 1-es klaszter a domináns, az izolált vírustörzsek 48,2%-a tartozik ide (De Carli és mtsai, 2020). Teheránban és Iránban, az utóbbi években megbetegedést okozó reovírusok javarészt szintén az 1-es genotípusba tartoznak (Mirbagheri és mtsai, 2020). Megemlítendő, hogy a fenti kutatásokban szereplő reovírusok mindegyike tenosynovitis esetekből származnak. A földrajzi vagy időbeli előfordulást tekintve Brazíliában figyelték meg, hogy a 2010 óta egyre gyarapodó tenosynovitis esetekben az 1b alcsoportba tartozó vírustörzsek szerepeltek túlnyomó részben (De Carli és mtsai, 2020).

Az újonnan izolált variáns vírustörzsek genetikai összetételét és antigenitását tekintve is eltérnek a kereskedelmi vakcinákban felhasznált reovírustörzsektől (Bokaie és mtsai., 2018; Bányai, 2011; Lu és mtsai, 2015; Noh és mtsai, 2014; Troxler és mtsai, 2013; Ayalew és mtsai, 2017; Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Mirbagheri és mtsai, 2020). Az újabb variáns vírusok ellen a kereskedelmi vakcinák által kialakított védettség már nem megfelelő (Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Mirbagheri és mtsai, 2020).

5.5. Védekezési lehetőségek, immunológia, vakcinázás

A modern baromfitartás ma már elképzelhetetlen magas szintű járványvédelmi gyakorlat nélkül. Ennek kiemelkedő elemei a takarítási, fertőtlenítési és higiéniai megoldások következetes használata, mely hozzájárulhat a sikeres védekezéshez. Grafl és munkatársai szerint azonban mindezek szükséges, de nem elégséges részei a hatékony védekezési programnak (Grafl és mtsai, 2019).

A járványvédelem kiegészítéseképpen az állatorvosi gyakorlatban különböző vakcinák alkalmazásával megelőzhető a reovírus kártétele. A vakcinák részletes tárgyalása előtt egy rövid immunológiai kitekintést tartunk szükségesnek a jobb megértés érdekében.

A reovírusfertőzés hatására a bélben lokális IgA-típusú ellenanyagok képződnek, amelyek képesek csökkenteni a vírus terjedését a bélből más szervek irányába. A lokális védelem korlátja, hogy a tripszin-érzékeny reovírus nem képes kimutatható IgA-termelés kiváltására. Kísérleti eredmények alapján a vírushatás elleni immunitás mind a B-sejteket, mind a T-sejteket magában foglalja. A B-sejtes immunválasz azonban nagyobb mértékben járul hozzá a betegség súlyosságának csökkentéséhez, mint a T-sejtes immunválasz (Sellers

és mtsai, 2017, Jones, 2013). A humorális immunitás kialakulása során a vírusfertőzés hatására szerotípus-specifikus neutralizáló ellenanyagok termelődnek és a vérben keringve védekezést biztosítanak a szervezetbe jutó újabb reovírusokkal szemben. Megjelenésükhöz 7–10 napra van szükség. Az ellenanyagok a virion σC fehérje szerkezete alapján képződnek, amelyek a vírushoz kapcsolódva megakadályozzák annak célsejtbe történő kötődését. Más esetben a komplementrendszer aktiválódásának hatására a fertőzött sejt szétesését idézik elő. A vérben keringő ellenanyagok képesek csökkenteni vagy blokkolni az ízületekbe terjedő fertőzést. A humorális immunitást nagyjából meghatározza a fertőző vadvírus szerotípusa és virulenciája, valamint a gazdaszervezet kora és az ellenanyagok mennyisége.

A vakcinázás védekezés során elsődleges célunk, hogy megfelelő szikimmunitással lássuk el a kikelő napos állatokat, így védekezést biztosítva az életük első két hetében. Ezen korai életszakaszban a fiatal állatok ki vannak téve a vertikális fertőzésnek és a környezetből érkező új fertőző ágenseknek (Rau és mtsai, 1980). A szülőállományok gondosan kialakított vakcinázásával érhető el a megfelelő szikimmunitás az utódokban (Sellers és mtsai, 2017). A nagy mennyiségben készített „kereskedelmi” vakcinákat jellemzően csirkében használják, míg pulykában és víziszárnyasban telepspecifikus autovakcinák elérhetőek (Behr és mtsai, 2015; Porter és mtsai, 2018).

Csirkék esetében az élő, attenuált és inaktivált kereskedelmi vakcinákat évtizedek óta sikerrel használják széles körben. Eltérő immunizálási programokat alkalmaznak világszerte, de jellemzően a növendék tenyészállományokat vakcinázzák a szakemberek. Egy vagy több élő vakcinázást (priming) egy vagy több intramuscularis oltás követ inaktivált oltóanyaggal (boosting). Az élő vakcina előnye a gyorsan kialakuló sejtes immunitás és a lokális IgA típusú immunválasz. Ez után a booster oltás hatására magasabb szintű humorális immunitásra, a vérben keringő ellenanyagok mennyiségének emelkedésére számíthatunk. Így a vérből a szikbe kerülő magas szintű ellenanyagokkal ellátva kel ki az utód.

Számos vírustörzset alkalmaznak a kereskedelmi oltóanyagokban (pl. S1133, 1733, 2408), és ezek mindegyike az 1-es klaszterbe tartozik, továbbá ezek σC fehérjéje jelentős hasonlóságot mutat egymással (96–99,7% aminosavsorrend azonosság) (Sellers és mtsai, 2017).

Általánosságban kijelenthető, hogy a σC fehérje szekvenciáját elemezve, minél szorosabb genetikai egyezés van az állományunkat fertőző vadvírus és a vakcinavírus között, annál jobb védekezésre számíthatunk.

Az utóbbi években a kutatók felfigyeltek arra, hogy a vírusos arthritisben megbetegedett, vakcinázott szülőpár állományokból vagy ezek utódaiként felnevelt brojlerekből izolált új reovírus törzsek genetikailag egyre változatosabbak (Sellers és mtsai, 2017). Ezen új törzsek változó mértékben térnek el a vakcina vírusoktól. A σC fehérjét kódoló gén nukleotid sorrendjét elemezve újabb és újabb genetikai csoportokat lehetett elkülöníteni

(Troxler és mtsai, 2013). A σC fehérje aminosavszekvenciáját meghatározó genetikai változások ráadásul aránylag gyakran következnek be, ezért viszonylag gyorsan tudnak kialakulni újabb és újabb vírusvariánsok (Farkas és mtsai, 2016). Az aminosavsorrendben bekövetkező minimális változások is kialakíthatnak antigénszerkezeti változásokat. Egy elmélet alapján 5% eltérés a σC szekvenciában már gyengébb hatásfokú keresztvédettséggel járhat (Palomino-Tapia és mtsai, 2018). Ez a jelenség tovább nehezítheti a vakcinás védekezés tervezését.

Az újabban izolált variáns vírustörzsekkel homológ kereskedelmi vakcinák hiányában reális igény támadt az inaktivált telepspecifikus autovakcinák kipróbálására. Ilyen vakcinákban az adott farmon betegséget okozó vírust izolálják és használják fel a vakcina készítésekor. Amerikában és Kanadában jó védettségi eredményekről számoltak be reovírus autovakcinák használata nyomán (Sellers és mtsai, 2017). Európában jelenleg pulykában terjedt el a reovírust tartalmazó autovakcina használata (Behr és mtsai, 2015). Hazánkban telepspecifikus autovakcinák a magyarországi szabályokat (vidékfejlesztési miniszter 94/2012. (VIII. 30.) VM rendelete) figyelembe véve alkalmazhatóak. Nem szükséges hivatalos regisztrációs folyamatot végigvinni, de a hatóság engedélye szükséges a felhasználáshoz. Azokban az esetekben engedélyezett autovakcina felhasználása Magyarországon, ha nincsen regisztrált oltóanyag a betegség ellen, vagy ez aktuálisan nem elérhető. Továbbá telepspecifikus vakcina használatához igazolni kell a jelenleg alkalmazott vakcina hatáselmaradását (farmakovigilancia bejelentés) és azt, hogy a betegséget okozó vírustörzs jelentősen eltér a jelenleg alkalmazott vakcinában használt törzs(ek)től (Kulcsár, 2016). Tekintettel arra, hogy pulyka és víziszárnyas részére nem elérhető törzskönyvezett reovírus vakcina, ezeknél az állatoknál könnyebben igazolható a telepspecifikus vakcinák igénye. A hosszabb távú használat során tapasztalt változó sikeresség mutatta meg, hogy nagy körültekintéssel kell eljárni az autovakcinákban felhasználni kívánt vírus törzsek kiválasztásánál (Sellers és mtsai, 2017). Erre adhat magyarázatot az a vélemény is, miszerint csak akkor várhatunk megfelelő védelmet ugyanazon klaszterbe tartozó vakcinavírust tartalmazó autovakcina esetében, ha nagymértékű egyezés ($> 95\%$) van a σC fehérje aminosavsorrendjében (Palomino-Tapia és mtsai, 2018).

Az immunitás kialakulásának jobb megértéséhez kutatók számos epitópot azonosítottak, melyek fontos szerepet játszanak az ARV fertőzések diagnosztizálásában és potenciális epitóp-alapú marker vakcinák kifejlesztésében. Yin és munkatársai két epitópot azonosítottak a σB fehérjén: $^{21}KTPACW^{26}$ (epitóp A) és $^{32}WDTVTFH^{38}$ (epitóp B). Ezekről kimutatták, hogy ARV fertőzött csirkék ellenanyagok felismerik és kapcsolódnak ezekhez az epitópokhoz. Azonban kacska vagy pulyka ellenanyagokkal nem reagálnak, ezért megerősítést nyert, hogy ezen epitópok ARV-specifikusak, így alkalmasak differenciáló szerológiai

vizsgálatok kifejlesztésére (Yin és mtsai, 2013). További kutatások szükségesek a epitópok immunológiai szerepének tisztázására.

Mirbagheri és mtsai megfigyelése szerint számos tenosynovitis betegséget okozó reovírus törzs tartozik a vakcinatörzsekkel azonos I-es klaszterbe, mégis a σ C fehérjében 80% alatti aminosavszekvencia azonosság van (Mirbagheri és mtsai, 2020). A releváns vírustörzs vagy vírustörzsek kiválasztásához a telepi körülményekhez igazodóan megfelelő minőségű, mennyiségű és megfelelően hosszú időn keresztül gyűjtött mintakollekció szükséges. A kiválasztást nem segíti elő a már említett tisztázatlan klasszifikációs rendszer. A továbbiakban célállaton végzett kísérletben meg kell győződni arról, hogy a kiválasztott törzs valóban patogén és szerepet játszik azon tünetek kialakításában, amelyekkel a telepen találkoztunk. Mivel a megfelelő izolátum azonosítása és kezelése összetett feladat, egy telepspecifikus vakcina kifejlesztése általában 6-8 hetet vesz igénybe, de akár 18 hónapig is elhúzódhat, amennyiben további tipizálási folyamatok vagy patogenitási vizsgálatok válnak szükségessé. Érdeemes továbbá figyelembe venni és nyomon követni az adott régióban betegséget okozó törzsek előfordulási gyakoriságát is. Elképzelhető, hogy a telep életében a következő megbetegedést egy újonnan behurcolt törzs fogja okozni, amelyik a telepen korábban nem, de a régióban előfordul (Mirbagheri, 2020). A különböző genotípusok előfordulásának elemzése alapján sajnos nem tudok megállapítani geográfiai jellemzőket. Egy adott területen pl. Kanadában minden ismert klaszterbe tartozó variáns vírus kimutatható volt (Palomino-Tapia, 2018). Hasonló tapasztalatokat gyűjtöttek De Carli és munkatársai Brazíliában (De Carli és mtsai., 2020). A genetikai változatosságot korábbi, hazánkban végzett vizsgálatokban Farkas és munkatársai is észlelték (Farkas és mtsai., 2016). A reovírusok genetikai változatosságának utókövetése fontos része a védekezési stratégiának, mert így ellenőrizhető a vakcinázás szelekciós hatása a baromfiállományokban megtelepedő reovírusokra. Az egységes vakcinák elterjedt használatával szelekciós nyomást váltunk ki a vad vírusokra és antigén sodródás (drift), esetleg antigén csuszamlás (shift) történhetnek az adott régió reovirusaiban (Palomino-Tapia, 2018).

Megjegyezendő, hogy az autovakcinák alkalmazása akkor optimális, ha homológ élővírusos priming előzi meg. Az élő, attenuált vakcinák által kiváltott B-sejtes és T-sejtes immunválasz, a lokális védettséget adó nyálkahártya immunitás és a hosszabb immuntartósság nagyban hozzájárul a fertőzés leküzdéséhez. Élő, attenuált oltóanyagot használnak az USA egyes részein a brojlerek keltetői vakcinázásához, amely az apatogén 2177 jelzésű törzsből készül (Sellers, 2017). Az élő, attenuált telepspecifikus vakcinák használata az Európai Unió országaiban nem engedélyezett (Kulcsár, 2016). Egyébként ilyen vakcina előállítása nem reális cél, hiszen a sorozatos passzázsok embrión vagy szövettenyészetben, majd az *in vivo* tesztelés rengeteg munkát és éveket emészthetnek fel. Hasonló probléma merül fel az új élő „kereskedelmi” vakcinák fejlesztésénél is, hiszen ebben

az esetben is sok évbe telik mire az aktuálisan legalkalmasabbnak tűnő variáns vírustörzset attenuálják és a regisztrációhoz szükséges összes hatékonysági és ártalmatlansági vizsgálatot elvégzik. Látna az utóbbi idők vírusgenetikai kutatásainak eredményeit, az ARV sokat változhat akár évek alatt is; mutálódik, reasszortálódik, rekombinálódik (Farkas és mtsai., 2016). Mindezek ellenére széleskörű előfordulási felmérések eredményeire támaszkodva, gondosan kiválasztott vírustörzsekből előállított telepspecifikus autovakcinák fontos részét képezhetik egy eredményes védekezési stratégiának az újabb reovírusok ellen.

Folyamatosan zajlanak kutatások új vakcinák kifejlesztésére. Az újabban izolált reovírus variánsok változatos genetikája alapján szélesebb körű védekezést feltételezhetünk, ha minél több eltérő genotípusba tartozó variáns törzset alkalmazunk a vakcinában. Ennek nyomán fejlesztések indultak multivalens, inaktivált vakcinák irányába, ahol több, különböző genotípusba sorolt vírustörzset használnak fel. Lublin és munkatársai egy új kvadrivalens inaktivált kísérleti vakcinát teszteltek négy különböző ismert genotípusba tartozó vírussal szemben. A talppárnafertőzéses vizsgálatok során a vakcina képes volt csökkenteni a tünetek súlyosságát mind a négy ráfertőző vírussal szemben (Lublin, 2011).

A rekombináns vektorvakcinák fejlesztése során egy ártalmatlan vírus genomjába másik vírus(ok)ból származó génszakaszt építenek génszabási módszerekkel. Jellemzően a protektív fehérjét expresszázó génszakaszt inzerálják. A vektorvírus a gazdaszervezet sejtjeiben elszaporodik és az ártalmatlan vírusra jellemző fehérje mellett a beépített génszakaszból is kifejeződik a protektív fehérje. Majd ez a fehérje specifikus immunválaszt vált ki a gazdaszervezetben. Saikia és munkatársai ilyen rekombináns vakcinákkal folytattak kísérleteket. A baromfipestis mezogén R2B vírustörzsének genomjába épített ARV S1 génszakasz a vírus szaporodása során a baromfipestis protektív antigénje mellett ARV σ C fehérjét is expresszá. A kísérleti rNDV-R2B- σ C vakcinával többször immunizált csirkékben sikerült humorális és sejtes immunitást kiváltani. Fertőzéses kísérletben a vakcinázott SPF-csirkékben sikerült minimálisra csökkenteni a virulens AV-1 jelzésű reovírus által okozott tipikus makroszkópos és szövettani elváltozásokat (Saikia és mtsai., 2019). Lin és munkatársai apatogén baktériumokat használnak vektorként. Az *Enterococcus faecium* baktériumban genetikai manipulációval képesek az ARV σ C fehérjét expresszálni. Így ez az ártalmatlan lactobacillus vektorként funkcionálhat az antigén célbajuttatásában. Ezzel a rendszerrel sikerült egerekben mérhető nyálkahártya immunitást kialakítani. Egyelőre csirkében nem próbálták ki, de ígéretesnek mutatkozik az eddigi eredmények alapján (Lin és mtsai., 2012). Wan és munkatársai csirkékben végzett kísérlete során *Salmonella typhimurium* vektorra támaszkodó σ C fehérjét kódoló DNS-vakcinát adtak szájon át. Az eredmények alapján sikerült mérhető immunválaszt indukálni. Az ARV S1133-as törzsével végzett talppárnafertőzéssel szemben azonban nem bizonyult elegendőnek a védekezés (Wan és mtsai., 2011).

Alegységvakcináknak nevezzük az olyan vakcinákat, ahol a teljes vírus helyett, pusztán az immunválasz kiváltásáért felelős fehérjét juttatják a szervezetbe. Az említett immunogén fehérjéket a laboratóriumokban gyakran *E. coli* baktériumokkal „termeltetik”. Az ilyen módon termeltetett fehérjéket tisztítás után nagy mennyiségben szükséges alkalmazni a vakcinákban. Goldenberg és munkatársai által fejlesztett alegységvakcina egy kísérletesen előállított *E. coli* rendszerrel expresszált σ C fehérjét tartalmaz. Eredményeik alapján képes volt olyan mennyiségű vírusneutralizációs ellenanyag kiváltására SPF csirkében, mint a teljes víruspartikulát tartalmazó kontroll vakcina. Az alegységvakcinák fejlesztése és gyártása során viszonylag gyorsan képesek előállítani és beépíteni a vakcinába az újabban izolált vírusvariánsok immunogén fehérjéit (Goldenberg és mtsai, 2016). Tekintve a reovírusok relatíve gyors genetikai változásait, ez utóbbi lehetőség nagy előnye az ilyen vakcináknak.

A σ C fehérje nagyfokú változékonysága megnehezíti a vírus elleni védekezést. Ennek oka, hogy a kifejlesztett vakcinák korlátozott védettséget nyújtanak az újonnan felbukkanó vírusvariánsokkal szemben (Sellers és mtsai, 2017).

6. Munkám célkitűzései

Kutatásom során célul tűztem ki, hogy átfogó képet kapjak a baromfi reovírusainak Kelet-Közép Európai előfordulásáról és genetikai jellemzőiről. Az alábbi hipotézisek vizsgálata köré építettem fel kutatómunkámat:

1. Kelet-Közép Európai baromfi állományok esetében a reovírusok szignifikánsan nagyobb arányban izolálhatóak reovírusra jellemző tüneteket állatokból, mint tünetmentes állatokból.
2. Kelet-Közép Európában előforduló csirke reovírusok σ C génje alapján az I. -től V.-ig genetikai klaszterekbe sorolhatóak.
3. Kelet-Közép Európai baromfiállományokból izolált reovírus törzsek σ C proteint kódoló S1 génszakaszának nukleotid összetétele jelentősen különbözik egymástól.
4. Kelet-Közép Európában csirkéből és pulykából izolált reovírus törzsek σ C proteint kódoló S1 génszakaszának nukleotid összetétele meghatározza a reovírus okozta betegség klinikai megjelenését.

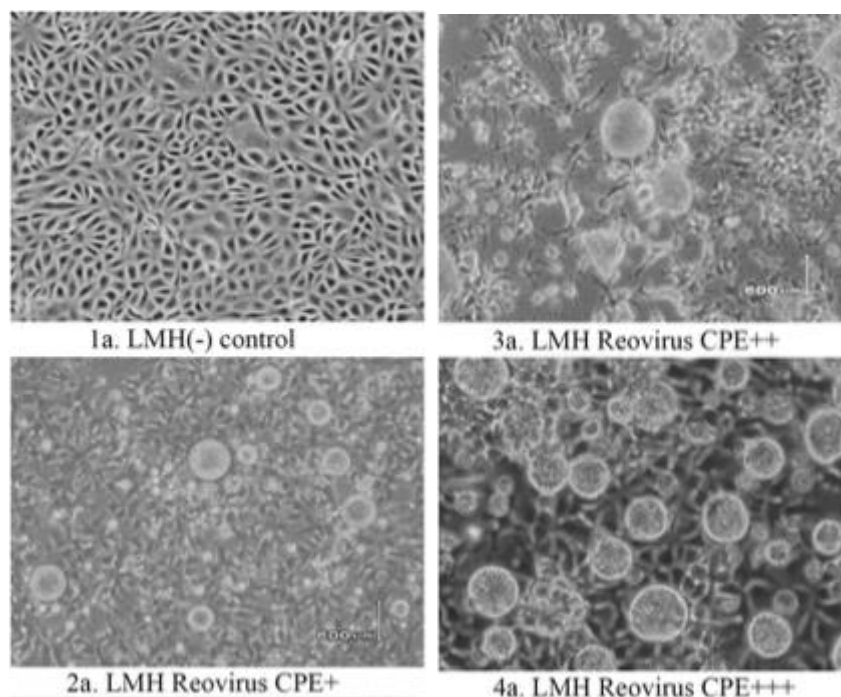
7. Anyag és módszer

7.1. Mintagyűjtés és mintafeldolgozás

A mintagyűjtési időszak egy naptári évben került meghatározásra. Vékonybél és vakbél nyirokcsomó minták, illetve ín, ínhüvely és szinóvia minták kerültek begyűjtésre. Kisebb számban mirigyes gyomor, máj, légcső, vese, sziktömlő (napos állatból) minták is kerültek a mintagyűjteménybe. Nem volt cél diagnosztikai megállapításokat tenni, ezért elkülönítő kórjelzésre alkalmas széleskörű laborvizsgálatokat nem történtek. A minták felét magam gyűjtöttem baromfitelepeken kórboncolás során. A szélesebb körű mintagyűjtéshez állatorvos kollégák járultak hozzá a beküldött mintáik segítségével. Így sikerült Magyarországon kívül Románia, Oroszország és Ukrajna területéről származó mintákat is a vizsgálatba vonni. További célként került meghatározásra, hogy adatokat gyűjtsünk a mintázott baromfiállományokról és a betegség klinikumáról. A következő információk kerültek rögzítésre: mintázott szerv, állatfaj, hasznosítás irány, életkor, állategészségügyi státusz, kórelőzmény, kórbonctani kép, vakcinázási háttér, származási ország, település. A minták hűtve érkeztek a laboratóriumba. A minták beazonosítást követően kerültek feldolgozásra vagy -70 °C -os hűtőtárolóba kerültek további feldolgozásig.

7.2. Vírusizolálás

A minták steril foszfát puffer (PBS) és steril fémgolyó hozzáadásával egyedileg kerültek homogenizálásra Qiagen TissueLyser II-es berendezést használatával 50 Hz frekvencián 3-5 perc időtartammal. Ezt követte a centrifugálás (3000 x g, 2 perc, 4 °C), majd a felülúszó 0.45 µm pórusméretű poliéter-szulfon (PES) szűrőn került átszűrésre. Az így keletkezett szűrlet inokulumként került felhasználásra a továbbiakban. A vírusizolálás házityúk eredetű hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon (LMH = leghorn male hepatome, ATCC CRL-2117) került elvégzésre. A sejteket 10 V/V% borjú savó (foetal bovine serum, FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific), és 100 U/ml/100 µg/ml penicillin/sztreptomicin (Lonza) tartalmú DMEM tápfolyadékban (Lonza) került tenyésztésre, 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú környezeti levegőt biztosító termosztátban. Az inokulum négylépcsős, 10-es alapú hígítási sorával fertőztük a sejteket, majd naponta, mikroszkóp alatt került elbírálásra az ARV-re jellemző sejtkárosító hatás megjelenése (CPE = cytopathogenic effect). Az óriássejt képződés jellemzően az ötödik, hatodik nap környékén válik láthatóvá (2. kép).



2. kép. Avian Reovirus (ARV) kimutatása reovírus fertőzött sejtvonalon látható citopatogén hatással (CPE). (1a) Negatív kontrol: LMH normális sejtenyészet; (2a), (3a) és (4a) ARV fertőzés hatására kialakuló óriássejt képződés, mint CPE (Lu és mtsai 2015).

Negatív eredmény esetén a mikroszkópos bírálat legfeljebb a hetedik inkubációs napig folytatódott. Óriássejt képződés esetén a mintákat CPE+-ként került feltüntetésre és előkészítésre került nukleinsav kivonáshoz. Amennyiben sejtkárosító hatás hét nap elteltével sem volt tapasztalható, úgy vak passzázsok elvégzésére került sor. Három negatív eredményű vakpasszázs után a mintánkat ARV negatívnak értékeltük és megsemmisítésre kerültek.

7.3. A virális nukleinsav kivonása

A vírusizolálás során pozitívnak minősült minták három fagyasztás-felolvasztás ciklus alkalmazásával kerültek a szövettenyésztő edény falától elválasztásra a letapadó sejtek, majd a sejtek szétesésre kerültek. Az így nyert sejtuszuszenzió 1 ml-ét 0,5 ml 20 m/V%-os NaCl és 0,5 ml 29 m/V%-os PEG600 oldattal kiegészítve egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubálásra került. Az inkubációs idő lejártá után centrifugálás következett 3000 g fordulatszámmal, 4 °C-on, 30 percig, a felülúszó eltávolításra került, végül a nyert pellet 250 µl foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS, Thermo Fisher Scientific) került felvételre. Az így nyert szuszpenzióból a virális RNS kivonására került sor Direkt-zol RNA Miniprep (Zymo Research) használatával, a gyártói előírásoknak megfelelően:

Az RNS kivonás során minden lépés szobahőmérsékleten történt és minden centrifugálás 10.000-16.000 x g fordulaton és 30 másodpercig történtek.

1. Tri Reagens-ben felvett mintához (400 µl) további 400 µl 96% -os ethanol került hozzáadásra
2. A keverék Zymo-Spin IICR Column oszlopra került, ami egy gyűjtőcsőbe került
3. Centrifugálást követően az oszlop új gyűjtőcsőbe került.
4. Dnase I kezelés:
 - a. az oszlopra 400 µl RNA Wash Buffer került, majd centrifugálás következett
 - b. egy külön RNáz-mentes csőbe 5 µl Dnase I oldat és 75 µl DNA digestion Buffer került hozzáadásra
 - c. 15 perc inkubálás
5. 400 µl Direct-zol RNA PreWash került az oszlopra, centrifugálás. Gyűjtőcső eldobása és a lépés ismétlése.
6. 700 µl RNA Wash Buffer került az oszlopra. Centrifugálás egy percig. Az oszlop áthelyezése egy rnáz-mentes új csőbe.
7. Az RNS eluációjához 50 µl Dnase/Rnase-Free Water került közvetlenül az oszlop mátrix-ára. Centrifugálás.

A kivont RNS-t -65 °C-os fagyasztóba került további felhasználásig.

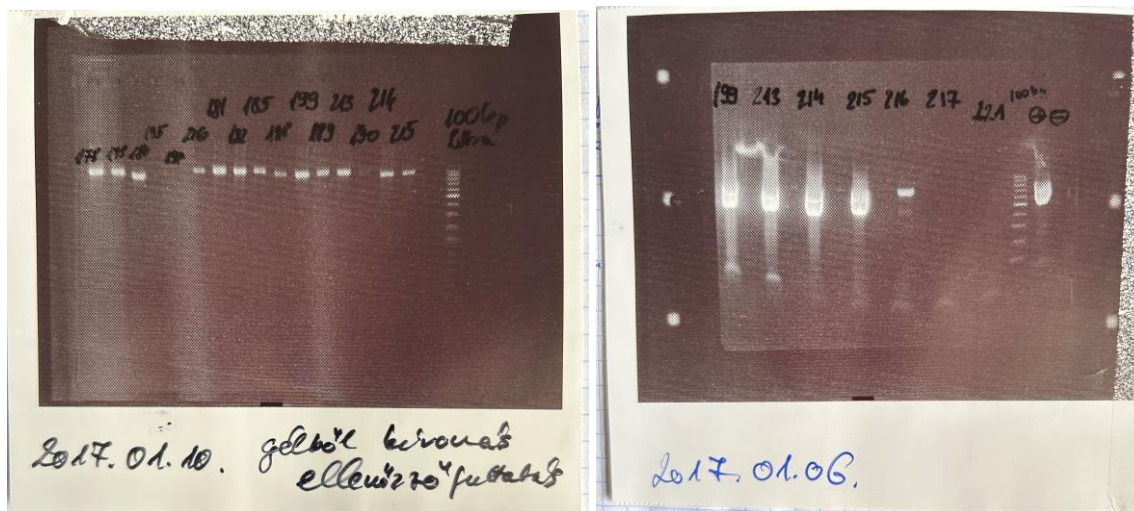
7.4. A σ C gén amplifikálása és szekvenciájának meghatározása

Csirke reovírus σ C gén-specifikus PCR teszt elvégzése QIAGEN One-Step RT-PCR Kit segítségével történt, a reakció összetevőit a gyártó javaslata alapján került összemérésre (5. ábra). Az amplifikációhoz tervezett primer párok: S1_all_F3 (Fw) 5'-GATACTSTCNTTGACTTCGA-3' és S1_all_R2 (Rev) 5'-TCGATGCCSGTACGCACGGT-3 az S1133 vakcinavírus S1 szegmensének ~900 nukleotid (nt) hosszúságú (nt 674 és 1603 közötti pozíció) genom régiójához illeszkedően. A használt S1133 vakcinavírus KF741762 génbanki azonosítóval szerepel.

One-Step RT-PCR protokoll σC génre			
			8 minta esetén 10x
RNS	3 μl	Mix I.	30
H2O	3 μl		30
Primer_F3_híg	0,5 μl		5
Primer_R2_híg	0,5 μl		5
> Denaturálás 95 °C 5 perc			
H2O	11 μl	Mix II.	110
Puffer (5x)	5 μl		50
dNTP	1 μl		10
Enzim mix	1 μl		10
42°C	30 p	1 x	
95°C	15 p		
95°C	30 mp	40 x	
45°C	30 mp		
72 °C	1 p		
72 °C	5 p	1 x	
4 °C	∞		

5. ábra. QIAGEN One-Step RT-PCR protokoll σ C génre. Gyártói utasítás.

A PCR termékek agaróz gél elektroforézissel kerültek ellenőrzésre. Az elektroforézishez 50 ml-es futtatókádak és 16 fogas fésűk kerültek felhasználásra. Első lépésben 1 m/V%-os agarózgélt (Lonza) készült, melyhez 50 ml 0,5 m/V%-os trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav (TBE, Lonza) puffer + 5 g Agaróz került feloldásra majd egy percig hevítés következett 800 V-os mikrohullámú sütőben. A DNS láthatóvá tételéhez 2,5 μ l GelRed (Biotium) festék került hozzáadásra 0,5 V/V%-os koncentrációban. A meleg oldatot a formákba töltöttük, ráhelyeztük a fésűket és kihűtésre kerültek. A megszilárdult géltömböket futtatókádba helyeztük és molekulatömeg markerként O'Gene Ruler DNS létra (Thermo Fisher Scientific) került alkalmazásra. A mintákhoz 3 μ l 6x loading dye került hozzámérésre, mellyel a minta lesüllyed a gél megfelelő lyukaiba. Az elektroforézis 90 -on 30 percig történt. Ezt követően a gél áteső UV fényben került vizsgálatra, az eredmények pedig CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Cleaver Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) került rögzítésre (3. kép. Példák az elektroforézis eredményeire. A PCR termékek erős fénnel világítanak UV-fényben. Negatív minták esetében nem látunk fényjelenséget. A szerző saját felvétele.3. kép).



3. kép. Példák az elektroforézis eredményeire. A PCR termékek erős fénnel világítanak UV-fényben. Negatív minták esetében nem látunk fényjelenséget. A szerző saját felvétele.

A gélből a σ C esetében egy megfelelő méretű, körülbelül 900bp hosszúságú PCR termék került kimetszésre, majd a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) gélkivonásos módszerével a gyártói utasítások alapján került kitisztításra:

1. 300 mg kimetszett gél került egy 1.5 ml-es centrifugacsőbe, majd 500 μ l DF Buffer oldat került hozzá. Vortex keverés.
2. 55-60 °C-on 10-15 perc inkubáció. (2-3 percenként a cső átfordítása biztosítja a gél megfelelő oldódását). Szobahőmérsékletre hűtés.
3. A DF Column kerül egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe (Collection tube) és a DF Column-ra kerül 800 μ l a mintaoldatból.
4. Centrifugálás 14.000-16.000 x g, 30 másodpercig. Szűrlet elöntése.
5. Wash Bufferhez ethanol adása. Ebből 600 μ l kerül a DF column-ra és egy percig áll.
6. Centrifugálás 14.000-16.000 x g, 30 másodpercig. Szűrlet elöntése.
7. Centrifugálás 14.000-16.000 x g, 3 percig, hogy a DF Column mátrixa kiszáradjon
8. A kiszáritott DF Column-ot áthelyezése egy új 1.5 ml-es gyűjtőcsőbe.
9. A column mátrixának közepére 20-50 μ l Elution Buffer mérése.
10. 2 percig állni hagyni, hogy az Elution Buffer teljesen felszívódjon a mátrixba.
11. Centrifugálás 2 percig, 14.000-16.000 x g.

A tisztított DNS-fragmensek további felhasználásig -20 °C-on kerültek tárolásra.

A PCR termékeken mindkét irányból közvetlen szekvencia meghatározás történt, mely a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) alkalmazásával, a PCR során is használt oligonukleotidokkal került végrehajtásra (6. ábra).

A szekvenálási termékek kapilláris gélelektroforézise ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) készülékek használatával történt együttműködő

partnereinknél. Az új szekvencia adatok feltöltésre kerültek a Génbankba (OP816667–OP816738).

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)		
H2O	6,5 µl	Végtérfogat 10 µl
BigDye 1.1 mix	2 µl	
Primer (10µM)	0,5 µl	
Minta (PCR termék)	1 µl	
96 °C	1 p	1 x (denaturáció)
95 °C	20 mp	30 x
50 °C	5 mp	
60 °C	4 p	
Kicsapás :		
Na-acetát 3M pH 4,6	1,5 µl	Végtérfogat 50 µl
Etanol 60% (VWR)	31 µl	
Nukleázmentes víz	7,5 µl	
Szekvenálási reakcióelegy	10 µl	
Centrifugálás 4400 G, 4 °C	15 p	
Szárítás sötétben, szobahőmérsékleten		

6. ábra. A PCR termék szekvenciameghatározása BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosciences) alkalmazásával. Gyártói utasítás.

7.5. A teljes genom amplifikálása

A kétlépéses reverz transzkripció polimeráz láncreakció az FR26RV-N random primerrel került elvégzésre, melynek 3' végéhez általános oligonukleotid illeszkedik (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN-3') (Djikeng és mtsai., 2008). A reakció végtérfogata 25 µl volt, és a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl kivont RNS, 1 µM FR26RV-N primer, 400 µM dezinukleotid-trifoszfát (dNTP) keverék (Thermo Fisher Scientific), 1x AMV puffer és 10 egység (unit, U) AMV reverz transzkriptáz (Promega). Első lépésben az RNS és a random oligonukleotid keveréke került denaturálásra 95 °C-on 5 percre, majd jégen került lehűtésre. Ezt követően a reakció többi összetevője került a keverékhez, és a reakcióelegy először 25 °C-on 10 percre, majd 42 °C-on 60 percre, végül 70 °C-on 15 percre inkubálásra került. Az így keletkezett komplementer dezinukleotid (cDNS) felszorzása PCR-rel történt. A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3 µl-t az RT során keletkezett cDNS-ből,

1 μM FR20RV primert (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC-3') (Djikeng és mtsai., 2008), 400 μM dNTP keveréket (Thermo Fisher Scientific), 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific). A kezdeti 3 perc hosszú, 95 °C-on történő denaturációt egy 40 ismétlődő ciklusból (95 °C 30 mp, 48 °C 30 mp, 72 °C 2 perc) álló amplifikáció követte, majd a folyamatot egy 8 perces, 72 °C-on történő elongációs lépés zárta.

7.6. Újgenerációs szekvenálás Illumina platformon

A DNS könyvtárak készítése az Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) használatával történt, a DNS fragmensek jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina) indexek kerültek felhasználásra. Első lépésben az amplifikált cDNS minták kerültek kihígításra 2,5 μl végtérfogatban 0,2 ng/ μl koncentrációra. Ezt követően a tagmentáló reakcióhoz került 5 μl Tagment DNA puffer, valamint 2,5 μl AmpliconTagment Mix reagens. A reakcióelegy 55 °C-on 6 percig inkubálásra került GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) készülékben, majd lehűtés következett 10 °C-ra. Lehűtés után azonnal hozzákerült a 2,5 μl Neutralize Tagment puffer és 5 percig szobahőmérsékleten inkubálás történt. A DNS könyvtár készítéséhez 7,5 μl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5-2,5 μl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikálásra került. A PCR 95 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 12 ciklusból állt (95 °C 10 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 30 mp), amit egy 72 °C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a minták 10 °C-ra lehűtésre kerültek. Az így keletkezett indexált DNS könyvtár Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid) tisztításra került, az oszlopos tisztítási protokollt követve, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific) fluorometriás mennyiségi meghatározásra került sor. A könyvtár DNS-ek poolozás után denaturálásra kerültek, majd ez a denaturált könyvtár feltöltötésre került NextSeq 500/550 Mid Output flowcell-re (Illumina) 1,5 pM végső koncentrációban. A szekvenálás Illumina® NextSeq 500 (Illumina) készüléken került elvégzésre.

7.7. Adatelemzés

A kapott szekvencia adatok ellenőrzésre kerültek, a rossz minőségű vagy túl rövid nukleotid szakaszok (read) kiszűrésével, valamint az adapter régiókat levágásával. A vágás után a readok egy, a génbankból származó referencia törzs szekvenciájához került illesztésre. Ezzel a módszerrel a vírustörzsek teljes, vagy közel teljes genomja meghatározásra került.

A Sanger szekvenálásból származó elektroferogramok beolvasására és szerkesztésére a BioEdit, illetve a Geneious Prime szoftverek kerültek felhasználásra (Hall és mtsai., 1999;

Kearse és mtsai., 2012). A kapott szekvenciák összeillesztése az újgenerációs szekvenálás eredményével a Geneious Prime mellett az AliView szoftver segítségével történt (Larsson, 2014), így sikerült a vírustörzsek teljes, illetve majdnem teljes genomszekvenciáit meghatározni. A homológ gének keresése a génbank adatbázisában BLASTN vagy BLASTX algoritmussal történt (Altschul és mtsai., 1990). A kodon alapú többszörös szekvencia illesztések a Geneious Prime szoftver 2023.1.1. (Biomatters Ltd.) online illesztőprogram Muscle algoritmusát használva került elvégzésre (Abascal és mtsai., 2010). A filogenetikai elemzéseket, illetve a szekvencia illeszkedési számításokat a MEGAX szoftvercsomag segítségével készítettük el (Tamura és mtsai., 2013). A génspecifikus helyettesítő modell vizsgálata elvégzésre került és a legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell került kiválasztásra a Bayesi kritériumrendszer alapján. A törzsfák készítése maximum-likelihood módszerrel történt, az elkészült fák megbízhatóságát bootstrap elemzéssel (100) ellenőriztük a MEGAX-ben. A szekvenciák közti átlagos nukleinsav és aminosav távolságokat SDTv1.2 szoftver segítségével állapítottuk meg. Az újonnan izolált vírustörzsek szekvencia adatai feltöltésre kerültek a génbankba (OP816667-OP816738, valamint OQ731506-OQ731576).

8. Eredmények

A pulyka reovírusok újabban külön kutatási ágát képezi a baromfi reovírusoknak, ezért a pulyka eredetű minták eredményeit külön tárgyaljuk a házityúk eredetű minták eredményeitől. Számos kutató külön névvel illeti a pulyka reovírusait, TARV (turkey arthritis reovirus), míg az egyéb madár eredetű reovírusokat továbbra is ARV-ként (avian reovirus) tárgyalják (Jones, 2013; Spackman, 2005). Véleményünk szerint ez segíti az áttekinthetőséget, mely állatorvosi gyakorlati szempontból is előnyös.

8.1. Reovírusok előfordulása pulykában

Három esetben gyűjtöttünk pulykákból vizsgálati mintákat Magyarországon 2016-ban Békés, Vas és Veszprém vármegyékből. A mintagyűjtemény összesen 32 db mintát tartalmazott.

Vas vármegyéből származó 20 élethetes korú pulykákból a vágóhídon gyűjtöttünk bél mintákat (n=7), melyek közül egy bél mintából sikerült reovírust izolálni. Teljes mértékben nem tudjuk kizárni a vágóhídon gyűjtött minták kontaminációját, ezért az itt talált izolátumot kizártuk a további vizsgálatokból és nem elemeztük.

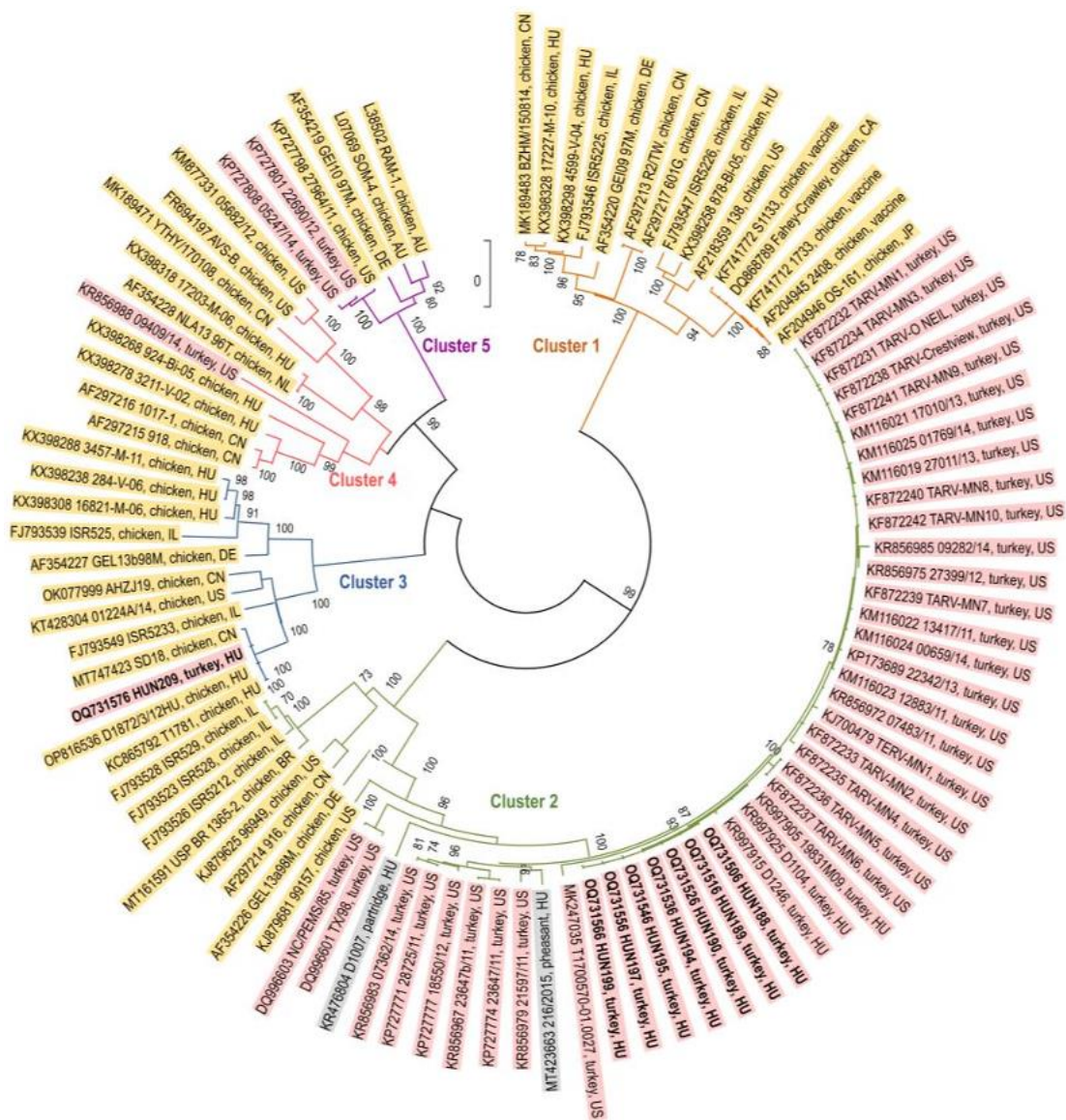
A második esetben egy Veszprém vármegyei pulyka telepen gyűjtöttünk ín mintákat (n=10) 14 napos növendék bak állományból. Az állomány 10%-ában észleltünk sántaságot és szétnövést, míg az elhullás normális szinten maradt. Boncolás során a csánk savós-fibrines-vérzéses gyulladása volt látható, egyéb elváltozást nem jegyeztünk fel. Az ín minták közül 6 esetben (60 %) sikerült reovírust izolálnunk.

A harmadik esetben, egy Békés vármegyei nyolchetes hízópulyka állományban tapasztaltak sántaságot és szórtságot. A tünetek az állomány 20%-át érintették, mindkét ivarban egyenlő mértékben. A csánkizület gyulladása mellett egyéb elváltozást nem sikerült feltárni. Az elhullott állatokból ín (n=10) és bél (n=5) mintákat gyűjtöttünk, melyek közül egy darab ín és egy darab bél minta bizonyult pozitívnak.

A második és harmadik esetekből származó nyolc izolátumon további RT-PCR vizsgálatokat végeztünk és az így kapott amplikonokat elemeztük és klasszifikáltuk.

8.1.1. A σ C alapú klasszifikáció

A genetikai elemzés eredményeként hét izolátum a 2-es klaszterhez sorolható be (hat minta a veszprémi második esetből származik, egy pedig Békésből), miközben egy izolátum Békésből a 3-as klaszterbe tartozik (7. ábra).



7. ábra. Baromfi eredetű reovírusok σC fehérje szekvenciáján alapuló filogenetikai törzsfája. A dolgozatban vizsgált vírustörzsek nevét vastagon szedtük. A rózsaszínnel jelölt törzsek pulyka eredetűek, a sárga színnel jelöltek csirke eredetűek, a szürke színnel jelöltek pedig fácán és fogoly eredetűek. A genotípusok klaszterbe sorolva és színkódokkal ellátva láthatóak Kant és mtsai klasszifikációja alapján (Kant és mtsai., 2003).

Érdekes eredmény, hogy az általunk vizsgált törzsek közül az összes ínból származó vírustörzs ($n=7$) a 2-es klaszterbe került, míg az egyetlen belből származó izolátum ($n=1$) a 3-as klaszterhez tartozott. Továbbá a 2-es klaszterbe tartozó vírustörzsek nukleotid alapú összehasonlításban 100%-os azonosságot mutatnak egymással, >99% azonosságot mutatnak egy 2009-ben Magyarországon izolált TARV-val (2-es klaszter), 95,8 – 97,2% azonosságot mutatnak az Amerikai Egyesült Államokban izolált TARV-val (2-es klaszter), valamint 84% azonosságot mutatnak magyar fogoly eredetű reovírusokkal és 93,5%-ban azonosak magyar fácán eredetű reovírusokkal (2-es klaszter). A 2-es klaszterbe tartozó csirke

eredetű ARV-kkel 65,6% - 78,76% azonosságot mutatnak vírustörzseink. Leolvasható az 7. ábra. ról továbbá, hogy néhány az USA-ból származó TARV a 4-es, illetve 5-ös klaszterbe tartozik, ahová jellemzően csirke eredetű ARV-ket sorolnak a kutatók.

8.1.2. Genom és génszintű elemzés

A munkánk során vizsgált vírustörzsek genom szerveződése hasonló és megfelel az egyéb magyarországi és amerikai referencia TARV-oknak (Mor, 2015; Dandár, 2015; Tang, 2015). Hét vizsgált vírustörzs esetében a teljes genom 23,498 bázispár hosszúságú, míg egy vírustörzs teljes genomja 23,494 bázispár hosszúságú. Az utóbbi esetében az eltérést a p17 jelű fehérjét kódoló génen, illetve néhány UTR 5' végén (UTR= untranslated region, nem-átíródó szakasz) találtuk. Ezen eltéréstől eltekintve minden vizsgált TARV genomszerveződése egyformának bizonyult, 12 db fehérjét kódoló gént tartalmaz. Ezek: λA, 1293 aminosav (aa) hosszúságú; λB, 1259 aa; λC, 1285 aa; μA, 732 aa; μB, 676 aa; μNS, 635 aa; σA, 416 aa; σB, 367 aa; σC, 326 aa; σNS, 367 aa; p10, 99 aa; és a p17, 150 aa -hat törzsben, valamint 146 aa hosszúságú egy törzsben.

A hét vírustörzs (hat Veszprémből, és egy Békésből származó) teljes genom szekvenciája szinte teljes azonosságot mutatott egymással. A pontmutációk száma törzsenként és génenként eltérően alakult. A λA, σA and σC esetében nem volt eltérés, míg a többi gén esetében akár négy pontmutációt is azonosítottunk (

2. táblázat). A vizsgált hét vírustörzs génkészlete nagyfokú hasonlóságot mutatott 2009-ben leírt magyar és minden elérhető 2010 és 2017 között az USA-ban leírt TARV-okkal (7. ábra.).

2. táblázat. A vizsgált vírustörzsek genomszekvenciájában megfigyelt pontmutációinak listája és a következményes aminosav eltérések (D=aszparaginsav, Y=tirozin, L=leucin, P=prolin, G=glicin, S=szerin, A=alanin, I=izoleucin)

Gén	Minta azonosító	Pozíció (nt)	Aminosav változás
λB	195	1176	-
λC	188	1513	D > Y
	189	2964	-
	190	3473	L > P
	189	3488	D > G
μA	188	1554	-
μB	188	1522	S > A
	188	1626	-
	188	1896	-
μNS	188	602	L > S
	188	748	L > I
σB	188	825	-

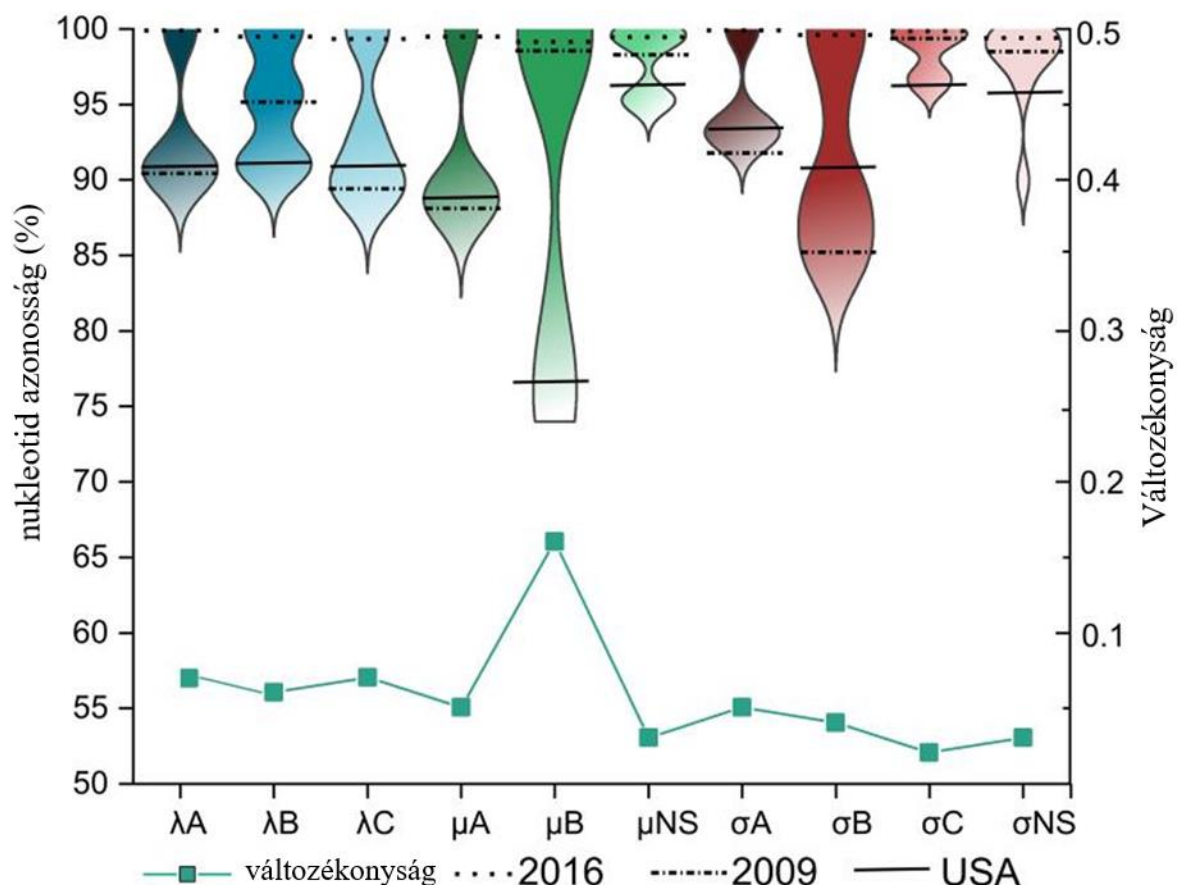
σ NS	194	180	-
-------------	-----	-----	---

Az általunk, 2016-ban izolált törzseket összehasonlítva 2009-es magyarországi törzsekkel, a nukleotid szekvencia azonosság az egyes géneket vizsgálva 84,7% és 99,4% közötti. A μ B, μ NS, σ C és σ NS gének a legnagyobb mértékben azonosak (konzervatív, megőrzött gének), míg a σ B mutatta a legnagyobb eltérést (legkevésbé konzervatív gén szekvencia). Hasonló adatokat kaptunk a 2016-os magyar és az Amerikai Egyesült Államok-beli TARV-ok esetében (74,7% a μ B esetében és 97,2% a σ C esetében).

A 2-es klaszter teljes adatbázisát vizsgálva, a legalacsonyabb szekvencia változatosságot a vírusneutralizáló antigén fehérje kódolásáért felelős σ C gén esetében tapasztaltuk, a μ NS és σ NS géneket megelőzve. Ez nem is meglepő, hiszen a σ C gén alapján osztjuk klaszterekbe a törzseket. Ehhez csatlakozik a reasszortáció jelensége, ahol előfordulhat, hogy két törzsnek csak a σ C génje hasonlít, míg a többi génjében jelentős eltérések mutatkoznak, mégis ugyanazon klaszterbe tartoznak.

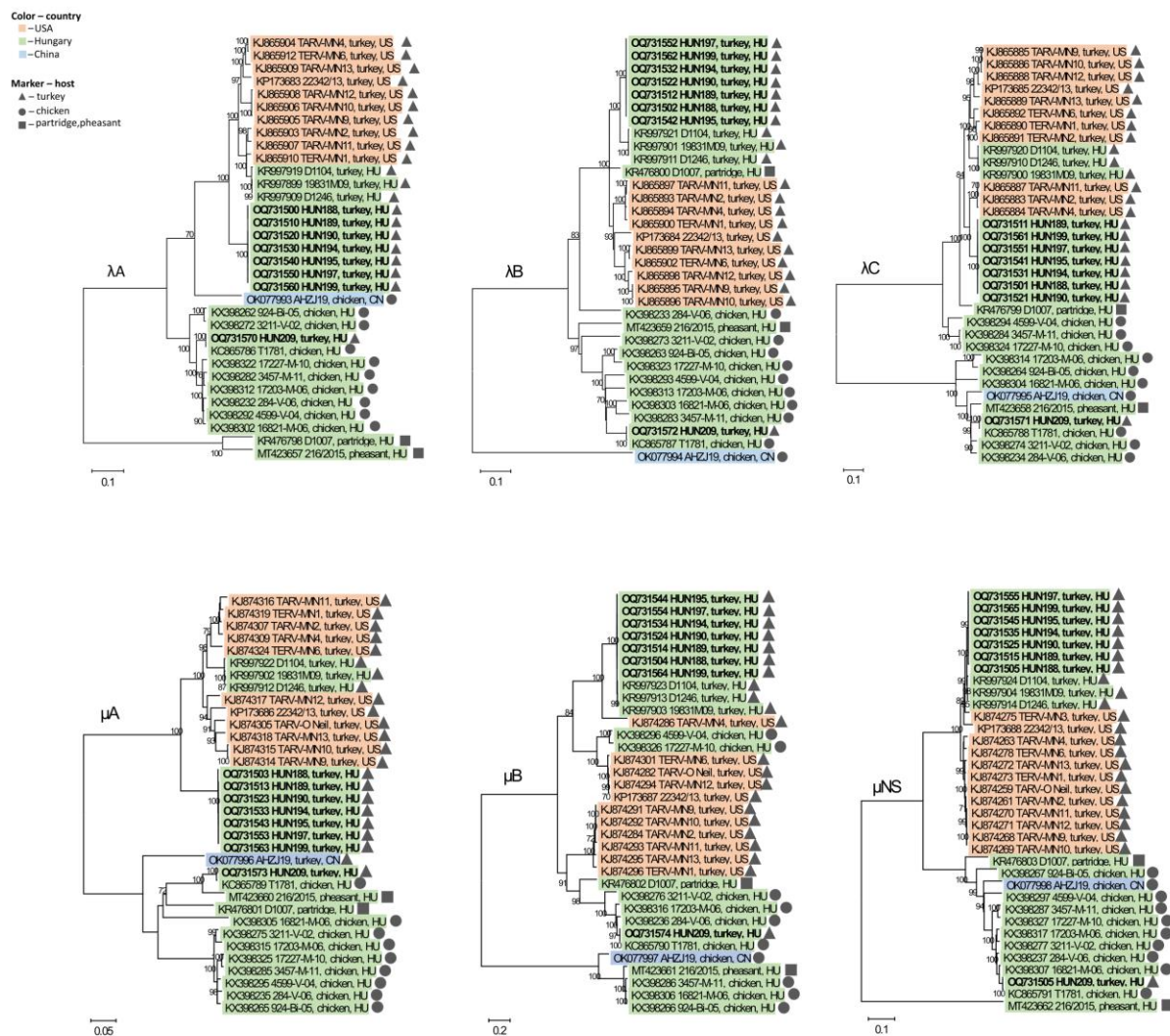
A HUN209-es jelzésű vírustörzs a harmadik békési eset bélmintáiból, szoros genetikai rokonságot mutatott a T1781 jelzésű, 2012-ben izolált magyarországi csirke eredetű reovírussal. Ez a pulyka vírustörzs legfeljebb 83,1% és 83,7% közötti azonosságot mutatott a jellemző magyar és amerikai TARV-kkal (λ A gén esetében). Ebben az összevetésben a legalacsonyabb szekvencia egyezést a σ C gén esetében figyeltük meg (50,6% – 54,3% értékek között).

A filogenetikai elemzés során, a 2016-os és a 2009-es magyar TARV-okat összehasonlítva, a fentebb leírt eredményekkel összeecsengő képet kaptunk, mely rámutat a több-génes reasszortációs eseményekre. (8. ábra)



8. ábra. Szekvencia hasonlóságok és evolúciós különbségek a 2-es klaszterbe tartozó TARV-ok között. A hegedű alakok a nukleotid azonosságok mértékét mutatják. A hegedű alakban látható vízszintes vonalak az átlagos szekvencia hasonlóságot mutatják a 2016-os magyar TARV-ok (pontozott vonal), az átlagos szekvenciahasonlóságot a 2016-os magyar és 2009 -es magyar TARV-ok között (pontozott-szaggatott vonal), valamint az átlagos szekvencia hasonlóságot a 2016-os magyar és az Egyesült Államok-beli TARV-ok között (folytonos vonal). Az értékek százalékban kifejezve a bal oldali y-tengelyen olvashatók le (nukleotid azonosság %). A türkiz színű pontozott vonal az ábra alsó részén mutatja a becsült átlagos evolúciós távolságot a teljes vizsgált populációban.

Az L-osztályú gének közül az λA gén törzsfája alapján a 2016-os magyar törzsek külön klasztert alkotnak a 2009-es magyar és az összes ismert amerikai TARV-okhoz képest (9. ábraError! Reference source not found.).



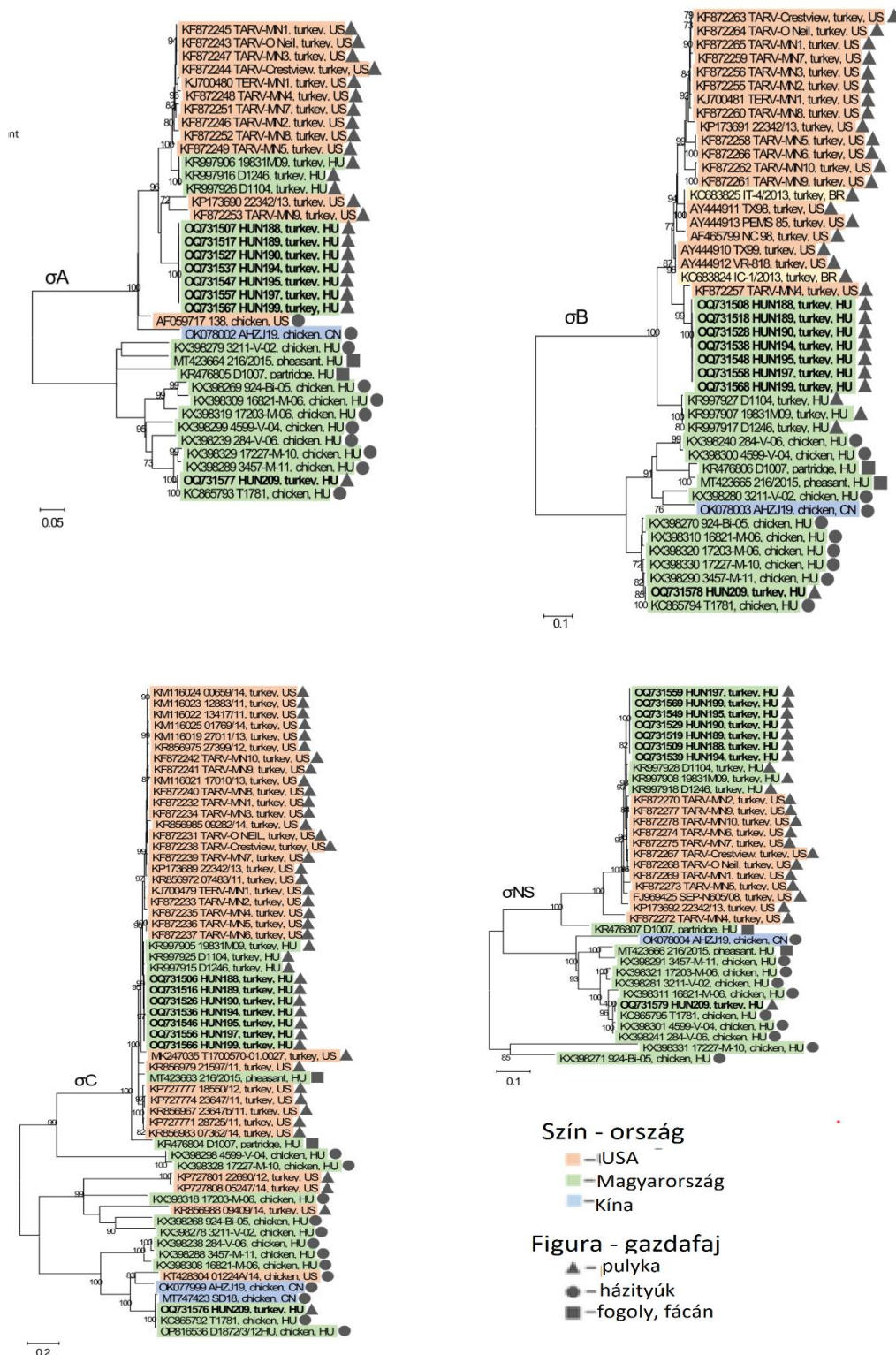
9. ábra Különböző ARV-k L-, és M-osztályú génjeinek nukleotid alapú filogenetikai génfája. A jelölések a gazdafaj specifikusságot jelölik; háromszög: pulyka, kör: csirke, négyzet: fogoly, fácán. Az egyes „bootstrap”-ek hossza a hozzá tartozó értékekkel a genetikai rokonságot vagy másképpen evolúciós távolságot reprezentálják.

Ezzel ellentétben, a λB gén esetében közeli rokonsági kapcsolatot fedeztünk fel a 2016-os magyar és 2009-es magyar törzsek között, melyek egyértelműen külön klaszterbe tartoznak az amerikai TARV-okhoz képest. Érdekeség, hogy a magyar fogoly reovírusok szintén egy klaszterbe tartoznak, ha a λB filogenetikáját tekintjük. A λC fehérjét kódoló gén elemzése során azt találtuk, hogy a 2016-os magyar törzsek azonos klaszterbe sorolhatóak néhány amerikai törzssel (MN2, MN4 és MN11), viszont mindegyik 2009-es magyar TARV közös klaszterbe tartozik az többi amerikai törzssel. Az M-osztályú géneket tekintve, a μA

fehérjét kódoló gén szekvenciája alapján készült filogenetikai fa topológiája azonos a λ A topológiájával, TARV esetében (**Error! Reference source not found.**9. ábra). A μ B gén esetében az összes magyar törzs azonos klaszterbe került az MN4-es jelzésű amerikai TARV-val. Az összes többi amerikai TARV közelebbi rokonságban áll a csirke eredetű törzsekkel. Mindezek alátámasztják a többszörös reasszortációs eseményeket a pulyka és heterológ reovírustörzsek között. A μ NS gén meglehetősen konzervatívnak bizonyult, ám a 2016-os és 2009-es magyar TARV törzsek egymással és két amerikai törzsszel (MN3 és 22342/13) formáltak egy klasztert. Az összes többi amerikai törzs egy másik klaszterbe sorolódott a μ NS filogenetikai fáját tekintve.

A σ A gén filogenetikai fája hasonló topológiát mutatott az λ A és μ A géneknél leírtakkal. A σ B gént tekintve minden 2016-os magyar TARV közös klaszterbe tartozik az amerikai és brazil reovírus törzsekkel és különálló a 2009-es magyar TARV-októl. Végül mind a σ C és σ NS meglehetősen konzervatívnak és egységesnek bizonyult. Az összes ismert adatbázisban található TARV-ok a genomszekvencia adatok alapján jellemzően szoros rokonságot mutatnak egymással és azonos monofiletikus csoportba tartoznak(10. ábra).

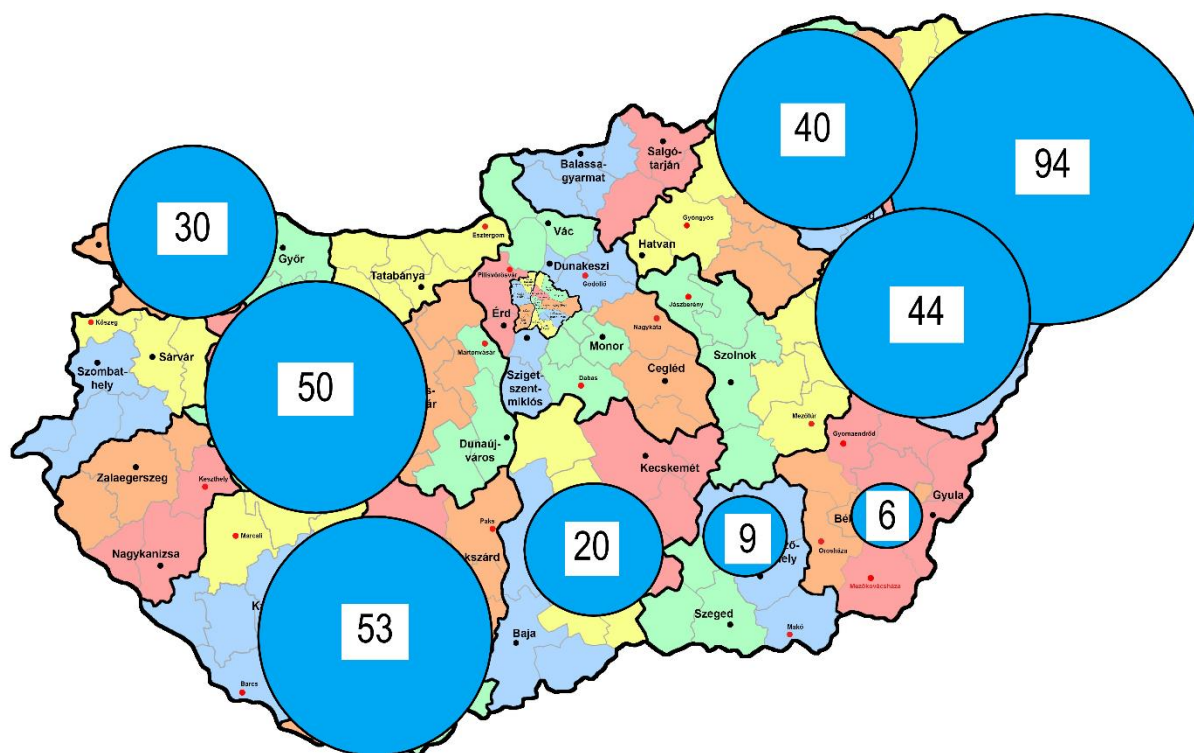
Érdekesség, hogy a HUN209-es jelzésű TARV izolátum és a 2012-ben Magyarországon izolált T1781-es jelzésű csirke eredetű reovírus következetesen, minden gén esetében egymáshoz szoros közelségben helyezkednek (10. ábra**Error! Reference source not found.**).



10. ábra Különböző ARV-k S-osztályú génjeinek nukleotid alapú filogenetikai génfája. A jelölések a gazdafaj specifikusságot jelölik; háromszög: pulyka, kör: házityúk, négyzet: fogoly, fácán. Az egyes „bootstrap”-ek hossza a hozzá tartozó értékekkel a genetikai rokonságot vagy másképpen evolúciós távolságot reprezentálják.

8.2. Reovírusok előfordulása házityúkban

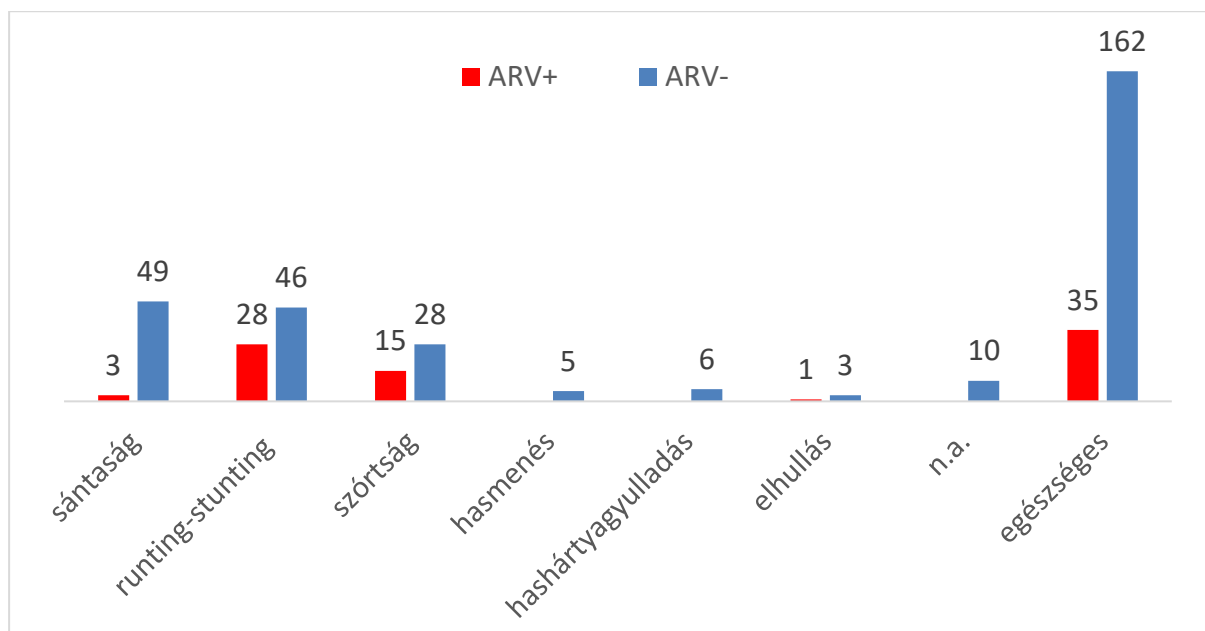
Mintagyűjtésünk egy éven át zajlott 2016-ban, telepellátó állatorvosok, illetve szaktanácsadó állatorvosok segítségével. Összesen 391 db mintát sikerült gyűjtenünk 38 állattartó telepről Magyarországon (n=346, 31 telep), Romániában (n=36, négy telep), Ukrajnában (n=6, kettő telep) és Oroszországban (n=3, egy telep). Hazánkban Bács-Kiskun (n=20), Baranya (n=53), Békés (n=6), Borsod-Abaúj-Zemplén (n=40), Csongrád (n=9), Győr-Moson-Sopron (n=30), Hajdú-Bihar (n=44), Szabolcs-Szatmár-Bereg (n=94), és Veszprém (n=50) vármegyékből származó minták bevonásával megállapíthatjuk, hogy mintagyűjtésünk szinte a teljes országot reprezentálja (11. ábra).



11. ábra Magyarországon gyűjtött minták földrajzi eloszlása. A minták darabszáma vármegyénként az egyes körökben látható.

Mintáink brojlercsirke állományokból (n=248), hústípusú tenyészttyúk (=brojler szülőpár) állományokból (n=137) és árutojást termelő tyúkállományokból (n=6) származnak. A klinikai hátteret tekintve az együttműködő állatorvosok beszámolóira hagyatkoztunk és ezek alapján a következő kategóriákba osztottuk mintáinkat: sántaság, runting-stunting szindróma, szórtság (=eltérő fejlettségű egyedek alkotta állomány), hasmenés, hashártyagyulladás, elhullás (=elhullott állatok számának emelkedése), valamint egészséges (=ARV-specifikus tüneteket nem mutató állomány). A gyűjtött minták nagyjából fele egészséges állatokból származik (n=197), míg a minták másik felét változatos tüneteket mutató állományokból nyertük (n=194).

A legjellemzőbb állományszintű tünetek változatos megjelenésűek és eloszlásúak voltak; sántaság (n=52), runting-stunting szindróma (n=74), szórtság (n=43), hasmenés (n=5), hashártyagyulladás (n=6), emelkedett elhullás (n=4). Tíz minta esetében nem tudtuk felmérni az állomány klinikai státuszát. (12. ábra).



12. ábra Az ARV-pozitív (RT-PCR-rel megerősítve) és ARV-negatív minták aránya a klinikai tünet függvényében.

Magas arányban mutattunk ki ARV-t runting-stunting tünetegyüttesben szenvedő (28/74 = 38%), szórt fejlettségű (15/43 = 35%) és emelkedett elhullással küzdő állományokból (1/4 = 25%). Kisebb arányban találtunk ARV-t sántaságot mutató (3/49 = 6%) állományokban. Az egészséges állományok mintáinak 18%-ában találtunk fertőzőképes reovírust (35/197) (**Error! Reference source not found.**12. ábra).

Az ARV+ minták aránya magasabb a tipikus reovírusos tüneteket mutató állományokban; (47/184 minta, 26%), mint az egészséges, ARV-re jellemző tünetektől mentes állományokban (35/197 minta, 18%) (12. ábra). A különbség azonban nem szignifikáns (khí-négyzet próba, $p = 0,06489022$). Ezzel az első hipotézisünket cáfoltuk, miszerint „Kelet-Közép Európai baromfi állományok esetében a reovírusok szignifikánsan nagyobb arányban izolálhatóak reovírusra jellemző tüneteket állatokból, mint tünetmentes állatokból”.

Mind az ARV tüneteket mutató, mind az ARV specifikus tünetektől mentes állományokból származó vírustörzsek hasonló módon oszlanak meg a II., III., IV. és V.-ös genetikai klaszterben (15. ábra).

A két jellemző kórformának (runting-stunting szindróma és tenosynovitis) megfelelően zömében bélből (n=318) és ínból (n=57) származó mintákat gyűjtöttünk. Egyes esetekben más

szervekből (mirigyes gyomor (n=6), sziktömlő (n=5), légcső (n=2), vese (n=2) és máj (n=1)) származó mintákat is megvizsgáltunk.

A különböző brojler szervekből végzett vírusizolálások eredményeit a

3. táblázatban gyűjtöttem össze. Az LMH szövettényészen tapasztalt óriássejt képződés, mint az ARV fertőzésre jellemző tünet, 106 mintában volt észlelhető. Nagyobb részben azonban negatív eredményt kaptunk (n=285). Minden országból sikerült legalább egy reovírust izolálnunk. Magyarországon 346-ból 87 pozitív, Romániában 36 mintából 17 pozitív, Ukrajnában 6 mintából egy pozitív, végül Oroszországból származó három mintánkból egy bizonyult pozitívnak.

3. táblázat. Mintáink vírusizolálási eredményei a mintázott szerveknek megfelelően.

Szervminta	Mintaszáma		Összesen
	CPE-	CPE+	
bél	215	103	318
ín	57		57
légcső	2		2
máj	1		1
mirigyes gyomor	3	3	6
sziktömlő	5		5
Vese	2		2
Összesen	285	106	391

CPE-pozitív mintáink bél (n=103) illetve mirigyes gyomor (n=3) mintáink közül kerültek ki (

3. táblázat). Nem tapasztaltunk CPE-t amikor ín, légcső, sziktömlő, vese vagy máj minták inokulumaival fertőztük az egyrétegű LMH sejteket. A reovírus σ C kódoló génjére specifikus RT-PCR vizsgálatokat végeztünk a CPE-pozitív esetek egy részéből, hogy megerősítsük a kapott eredményünket. A CPE-pozitív minták 77,4 %-ából nem végeztünk ellenőrző RT-PCR vizsgálatot, különösen, ha azt az adott állományból már korábban elvégeztük.

A mintázott baromfiállományok életkora tág értékek között mozgott. A napos állattól az 51 hetes korú madarakig bezárólag szinte minden életkort lefednek mintáink. Az állományok jelentős része (277/391, 71%) hat hetes vagy fiatalabb volt a mintavételkor. Ebben a korosztályban 68 esetben tudtunk izolálni ARV-t, ami a minták 83%-ának felel meg. Tíz napnál fiatalabb állatból viszont nem sikerült reovírust izolálni.

4. táblázat. A vírusizolálás eredménye a minta származásának és állományszintű tünetek függvényében.

hasznosítás	tünet	szervminta	mintaszám	
			ARV-	ARV+
árutojó tyúk				
brojler	hashártyagyulladás	bél	6	
	egészséges	bél	91	31
		ín	3	
		mirigyes	1	1
	runting-stunting tünetegyüttes	bél	31	22
		máj	1	
		mirigyes	2	1
	szórtság	bél	23	15
		ín	1	
		légcső	2	
		vese	2	
	hasmenés	bél	5	
	elhullás	mirigyes		1
		bél	3	
	sántaság	ín	2	
	n.a.	bél	10	
	brojler szülőpár			
	egészséges	bél	44	3
		ín	18	
		sziktömlő	5	
	sántaság	bél	21	3
		ín	26	
	runting-stunting tünetegyüttes	bél	5	5
		ín	7	
Összesen			309	82

A 5. táblázatból az is látható, hogy a brojler szülőpár állományok átlagos életkora eltér az egészséges és a tüneteket mutató állományok esetében. Egyes esetekben ugyanazon állományokból eltérő időben többször is vettünk mintákat, így kaptuk a következő eredményeket. ARV-t mutattunk ki 4-6 hetes állományokból, miközben az 5-12 napos mintázott állományok negatívnak bizonyultak. Továbbá, a brojler szülőpár állományok és ezek fiatal brojler utódállományai negatívak voltak, azonban négy hetes korban már ezek az utódállományok pozitívvá váltak ARV-re. Ez a jelenség rámutat a horizontális fertőződés kockázatára.

5. táblázat A különböző egészségügyi státuszú, ARV-pozitív állományok átlagos életkora.
(n/a= adat nem elérhető)

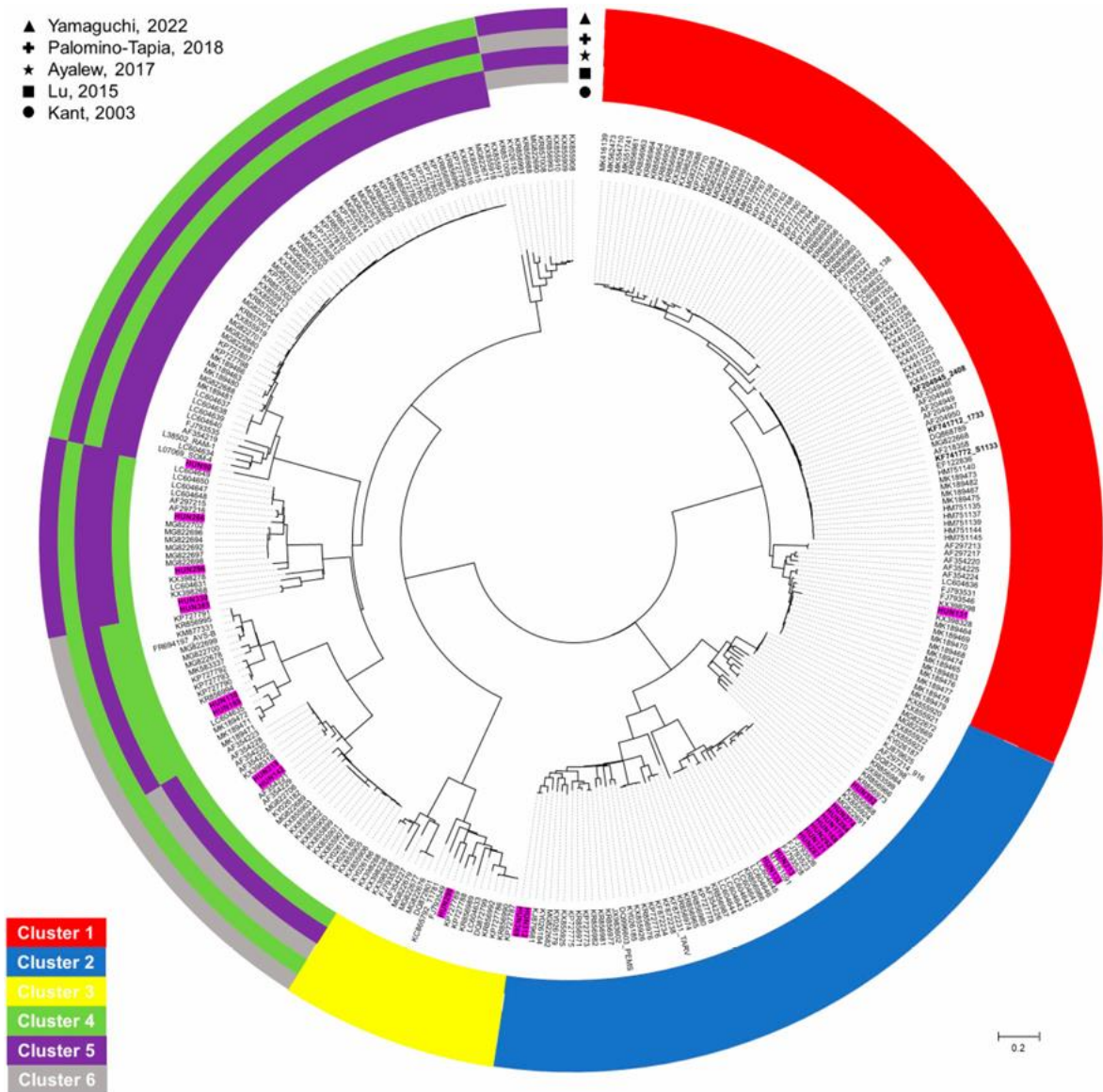
klinikai tünet	állomány átlagos életkora (hét)	
	brojler	brojler szülőpár
egészséges	4	18
elhullás	4	n/a
runting-stunting tünetegyüttes	3	5
sántaság	n/a	5
szórtság	4	n/a

Egy 53 hetes korú árutojó állományból származó bél minták negatív eredményt mutattak a vírusizolálás során (n=6).

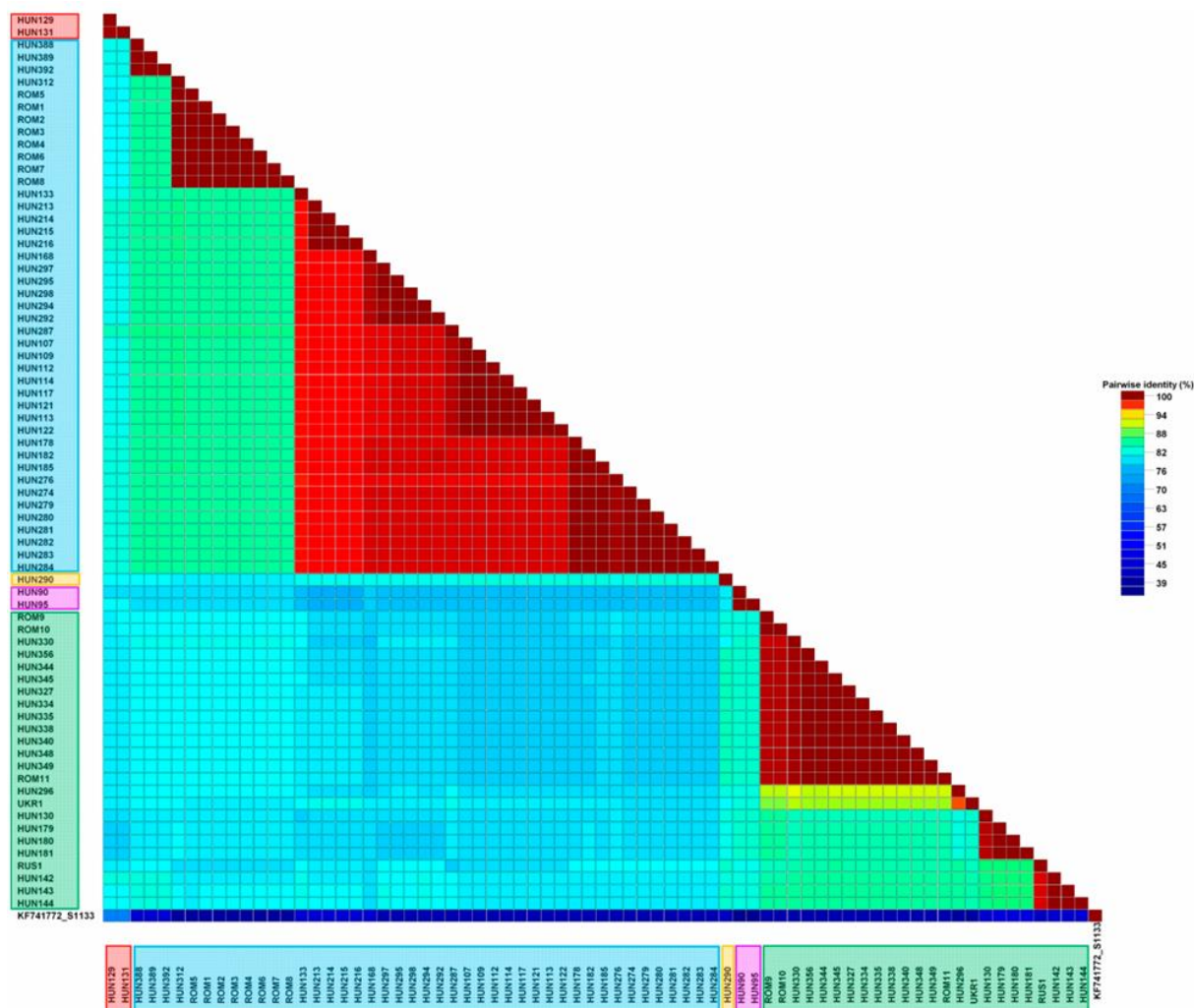
8.2.1. Az izolált vírustörzsek klasszifikációja, patológiája, molekuláris járványtana

A σ C kódoló gén 768 nukleotid hosszúságú szakaszának vizsgálatát végeztük el a 72 db CPE-pozitív vírustörzs szekvenálási eredménye alapján. Miután a közelebbi rokonságot mutató izolátumokat azonosítottuk a Génbankban BLAST rendszer segítségével, páros azonossági és filogenetikai elemzéseket végeztünk a genetikai kapcsolatok feltárásához. A σ C kódoló gén szekvenciájának azonossági és filogenetikai elemzések eredményei szerint a 72 db izolátum öt genetikai klaszterbe sorolható (I.-es klasztertől az V.-ös klaszterig). Az S1133, 1733 és 2408 vakcinatörzsek az I.-es klaszterbe tartoznak, melyekkel az általunk vizsgált izolátumok mérsékelt szekvencia azonosságot mutattak (nt: 49,7-74,5%; aa: 44,3-74,6%) (14. ábra).

Látva a reovírus klasszifikációban tapasztalható bizonytalanságokat, úgy döntöttünk, hogy az eredeti Kant és munkatársai által leírt sémát alkalmazzuk az elemzések során (13. ábra) (Kant és mtsai, 2003).

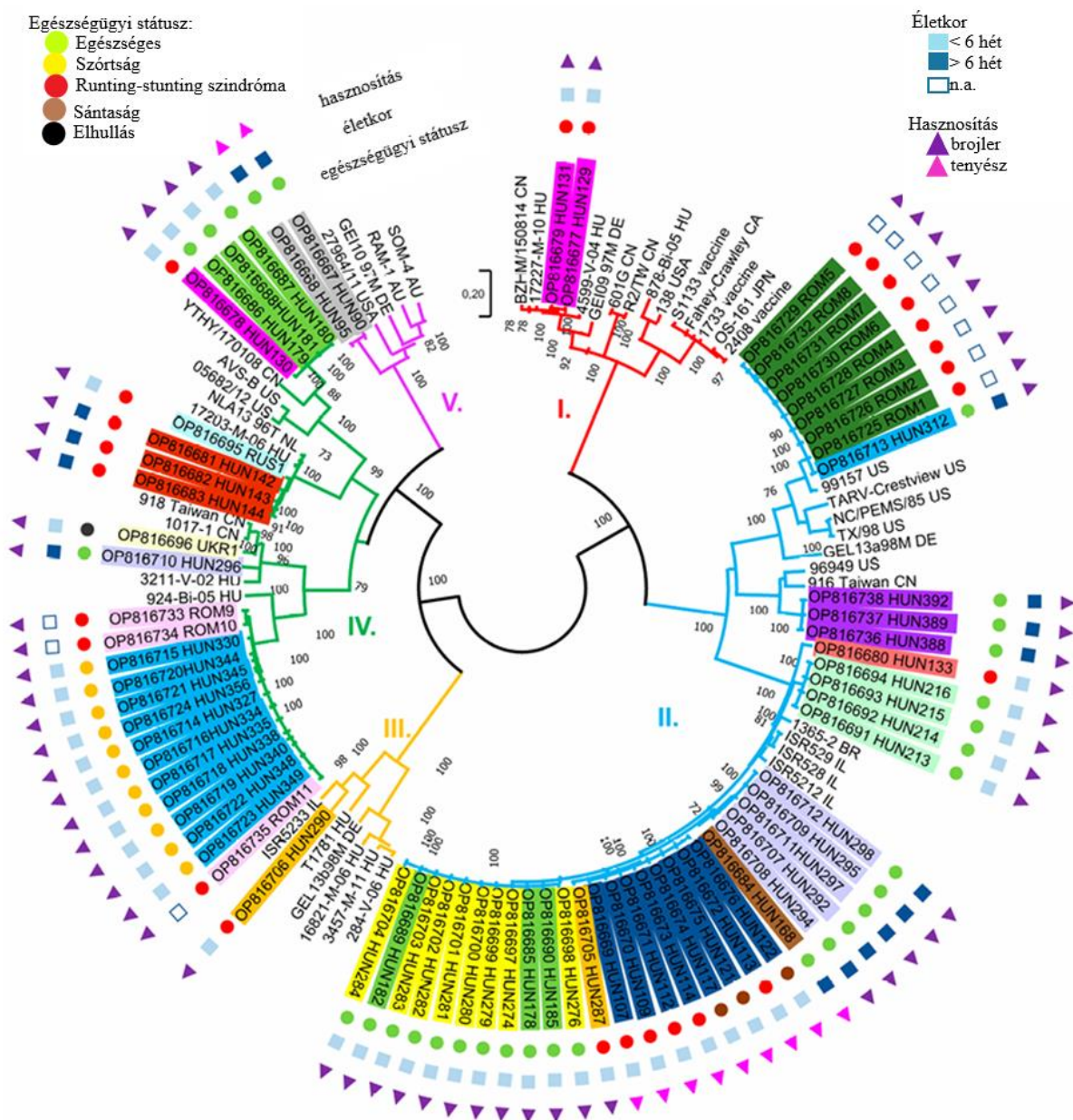


13. ábra. A σC gén 768 bázispár hosszúságú nukleotid szekvenciájú részének filogenetikai fája csirke és pulyka eredetű törzsekkel. Rózsaszínnel jelölve a vizsgálatunkban elemzett néhány törzset. A különböző klasszifikációs sémák által meghatározott klasztereket különböző színekkel jelöltük (Ayalew, 2017; Lu, 2015; Kant, 2003; Palomino-Tapia 2018; Yamaguchi, 2022).



14. ábra. A vizsgált vírustörzsek σC kódoló génjének 768 nukleotid hosszúságú ORF szakaszának páros azonosságai. Az izolátumok neveinek színekódjai a genetikai klasztert mutatják: I.-es klaszter – piros; II.-es klaszter – kék; III.-as klaszter – sárga; IV.-es klaszter – zöld; V.-ös klaszter – rózsaszín.

Klasztereken belüli izolátumok legalább 60,7% nt és 60,1% aa azonosságot mutatnak egymással és a referencia törzsekkel (I.-es klaszter nt 71.7–99.8%, aa 71.5–100%; II.-es klaszter, nt 64.1–100%, aa 65.8–100%; III.-as klaszter, nt 66.7–97.8%, aa 69.3–97.4%; IV.-es klaszter, nt 60.7–100%, aa 60.1–100%; V.-ös klaszter, nt 75.2–99.9%, aa 77.6–99.6%).



15. ábra. Az általunk izolált ARV-k σ C fehérjét kódoló génjének 768bp hosszúsági szakasza alapján készült nukleotid alapú filogenetikai fája. Azonos farmról származó izolátumokat azonos színnel jelöltük. Az egyes klasztereket a fa ágainak színezése jelzi (Kant, 2003). A filogenetikai fa a maximum likelihood módszer szerint készült. A 70 alatti bootstrap értéket nem tüntettük fel az ábrán. Az ábra forrása: Gál és mtsai, 2023; *Animals* 2023, 13, 2137.

<https://doi.org/10.3390/ani13132137>

A betegség klinikai megjelenésével kapcsolatos összefüggések elemzésében segítséget nyújtott a 15. ábra. A specifikus tüneteket mutató 41 tipizált ARV 15 állományból és 10 farmról származott, míg 31 tipizált ARV törzs tíz egészséges állományból és 8 farmról származott. Kettő izolátum klinikai háttérben runting-stunting tünetegyüttest találtunk, melyek ugyanarról a farmról származnak és mindkettő az I.-es klaszterhez tartozik. A II.-es klaszterbe

tartozó izolátumok nagyobb részben egészséges állományból származnak (n=25) és kisebb részben runting-stunting szindrómát és sántaságot mutató állományokból származnak (n=18). Mindössze egyetlen III.-as klaszterbe tartozó izolátumról állapítottuk meg, hogy runting-stunting szindrómában szenvedő állományból származik. A IV.-es klaszterbe tartozó izolátumok kettő egészséges állományból (n=4) és hat farm 11 állományából származnak (n=20), melyeknél runting-stunting szindrómát, szórtságot és emelkedett elhullást találtunk. Kettő izolátum az V.-ös klaszterben egészséges, magyar brojler szülőpár állományból származik. (15. ábra) Az I.-es, III.-as és V.-ös klaszterbe tartozó ARV-ket csak magyarországi mintákból tudtunk kimutatni, míg a II.-es klaszterbe tartozó ARV-k Magyarország mellett Romániában is előfordulnak. A III.-as klaszterbe tartozó vírust mindössze egyetlen esetben tudtunk izolálni, egy runting-stunting szindrómában szenvedő 24 napos Hajdú-Bihar vármegyei brojler állomány mirigyes gyomor mintájából (HUN290). Ugyanezen állomány ín mintájából nem, míg bél mintájából sikerült a II.-es klaszterhez tartozó reovírust izolálni (HUN287). A IV.-es klaszterbe tartozó ARV-ket mind a négy országból származó mintákban találtunk. Öt esetben különböző klaszterbe tartozó ARV-ket mutattunk ki ugyanazon időben és telepről gyűjtött különböző mintákból. (15. ábra).

Különböző országokból származó vírustörzsek esetenként nagyfokú egyezést mutatnak. A II.-es klaszterben nyolc romániai, runting-stunting szindrómát mutató brojler állományból származó izolátum (ROM1-től ROM8-ig) és egy magyar egészséges brojler állományból származó izolátum (HUN312) magas, 99,59-99,73% nt és 99,56% aa egyezést mutatnak egymással. A IV.-es klaszterben 11 magyar törzs (HUN327, 330, 334, 335, 338, 340, 344, 345, 348, 349 és 356), melyeket egy brojler telepről gyűjtöttünk, 99,46-100% nt és 99,12-100% aa egyezést mutatott három Romániából származó brojler állományból származó izolátummal (ROM9, ROM10 és ROM11). Itt a magyar brojler állományban szórtságot, míg a román brojler állományban runting-stunting tünetegyüttest tapasztaltunk. A IV.-es klaszterben egy ukrán brojler állományból izolált vírustörzs (UKR1) 98,78% nt és 99,12% aa egyezést mutatott egy magyar brojler törzsszel (HUN296). Ugyanitt egy orosz brojler törzs (RUS1) 86,86% nt és 90,35% aa egyezést mutatott három magyar brojler törzsszel (HUN142, HUN143, HUN144). A 15. ábra jól mutatja, hogy egyes esetekben az általunk jellemzett izolátumok egy másik kontinensről származó ARV-vel mutattak szorosabb rokonságot.

Egy öt hetes vakcinázatlan brojler szülőpár állomány ARV-re jellemző klinikai tüneteket mutatott: szórtság, hasmenés, runting-stunting szindróma és a kakasok 10%-ában sántaság. Kórboncolás során a duzzadt csánk ízület felett az ín savós-fibrines gyulladását tapasztaltuk. Minden törekvésünk ellenére nem tudtunk reovírust izolálni az ín mintákból, viszont ugyanazon állatok bélmintáiból sikerült izolálni ARV-ket. Az izolátumok (HUN107, HUN109, HUN112, HUN113, HUN114, HUN117, HUN121, HUN122) szoros rokonságot (91,3-93,2% nt és 90,8-91,7% aa szintű egyezés) mutattak három Izraelben 2005-ben tenosynovitisben szenvedő

állományból izolált reovírussal (ISR528, ISR529 és ISR5212), valamint ugyancsak nagyfokú egyezést (91,3% nt és 90,8% aa) mutattak az USP_BR_1365-2 vírustörzzsel. Ez utóbbit egy runting-stunting szindrómát mutató brazil brojler állományból izolálták 2019-ben (Goldberg és mtsai, 2010; De la Torre és mtsai, 2021). Számos egyéb, egészséges brojler állományból (például HUN178, HUN182), valamint egészséges brojler szülőpár állományból (HUN168) izolált törzsek is szoros rokonságban állnak a fent hivatkozott ISR528, ISR529, ISR 5212 és USP_BR_1365-2 törzsekkel.

Egy malabszorpciós szindrómát mutató 15 napos brojler állományból származó két minta (HUN129 és HUN131) nagymértékben azonos (96,5-96,7% nt és 94,3-94,7% aa) a 17227-M-10 jelzésű törzzsel, melyet ugyanarról a magyarországi farmról izoláltak 2010-ben. A hat évvel korábbi, 2010-es esetben az érintett brojler állományban elhalásos bélgyulladást, szívburokgyulladást és veseelfajulást írtak le a kutatók (Farkas és mtsai, 2016).

Hasonlóképpen három szinte azonos vírustörzset (HUN142, HUN143 és HUN144) izoláltunk egy 42 napos tünetmentes brojler állományból, mely törzsek szoros rokonságot (95,3% nt és 95,2% aa azonosság) mutatnak egy másik, 17203-M-06 jelzésű, Magyarországon 2006-ban tüneteket mutató brojler állományból izolált törzzsel. Ez utóbbi esetben a tünetek között légzsákgyulladás, elhalásos bélgyulladás és szívburokgyulladás került leírásra (Farkas és mtsai, 2016).

Tenyésztjük állományok elérhető vakcinázási előzményei alapján jellemzően minden állatot öt és kilenc hetes kora között egy élő S1133-as jelzésű vírustörzset tartalmazó oltóanyaggal immunizálnak. Ezt követi az inaktivált oltóanyaggal történő booster vakcinázás 12-14 élethetek között. Ez a 1733-as és 2408-as jelzésű vírustörzseket tartalmazza. Esetenként a booster vakcinázást legalább három-négy héttel később ismétlik a baromfitartók. Brojler utódállományok nem részesülnek vakcinázásban, itt a minél magasabb anyai ellenanyagok nyújtanak védeltséget az élet első heteiben. Mindhárom említett vakcinatörzs az I.-es klaszterbe tartozik.

Egy vakcinázott állományból sikerült egyetlen IV.-es klaszterbe tartozó és kettő I.-es klaszterbe tartozó vírustörzset kimutatni. Az utóbbi azonos genotípusba tartozik a vakcinatörzsekkel, ám mindössze 73-74% nt és aa azonosságot mutat azokkal. Vakcinázott állományokból 11 esetben sikerült reovírussal izolálnunk, ezek a II.-es és V.-ös klaszterbe tartoznak, ezzel szemben vakcinázatlan brojler állományokból 61 törzset izoláltunk, melyek az I.-es, II.-es, III.-as és IV.-es klaszterbe tartoznak.

9. Megbeszélés

9.1. Pulyka eredetű reovírusok

Pulyka reovírusairól (TARV) az első adatok az 1980-as évek elején érkeztek a tudományos közönség elé (Levisohn és mtsai, 1980; van der Heide és mtsai, 1980). Hamarosan egyértelművé vált, hogy a pulyka állományokban gyakran előfordul a reovírus (Pitcovski és mtsai, 2020; Nersessian és mtsai, 1985). Általában alacsony morbiditás és mortalitás jellemző a TARV-val fertőzött pulyka állományokra mindaddig, amíg egyéb másodlagos kórokozó nem társul az eseményhez (Pitcovski és mtsai, 2020; Heggen-Peay és mtsai, 2002; Guy és mtsai, 1997; Edens és mtsai, 1997). Ugyanakkor a 2010-es években a TARV fertőzések emelkedő számát jelentették az Egyesült Államokban, az érintett farmokon a morbiditás 10-20%, a mortalitás pedig 10% körüli értéket is elért. Ezekből az esetekből új TARV törzseket izoláltak, melyek szokatlan σ C genotípussal rendelkeznek (Tang és mtsai, 2015; Mor és mtsai, 2014). Az új törzsek klinikai jelentősége és farmok közötti terjedési képessége egyelőre nem ismert.

Jelen vizsgálatunkban a 2016-ban Magyarországon izolált vírusok genetikai tulajdonságait vetettük össze egymással, valamint más TARV törzsekkel, hogy több információt kapjunk a fertőzés forrásairól, országon belüli terjedéséről és a vad vírusok genetikai diverzitásáról vakcinázás hiányában. A szekvencia adatok gyűjtése során arra jutottunk, hogy a TARV nyilvános szekvencia adatbázisa lassan gyarapodik. Az elérhető genom adatok zöme az Amerikai Egyesült Államokból származik, amelyek néhány magyar teljes genom adattal, valamint brazil és horvát származású részleges genom szekvencia adattal egészülnek ki (Lu és mtsai, 2015; Dandár és mtsai, 2015; Rosa és mtsai, 2014). Az újgenerációs szekvenálás elterjedése ellenére mindössze egy tucat TARV teljes genom szekvencia érhető el a génbankban. Számos közlemény alapján tudjuk, hogy a pulyka reovírusok elkülönülnek a víziszárnyas eredetű reovírusoktól és egységes különálló kládokat alkotnak, szintén elkülönülve más csirke eredetű reovírusoktól (Mor és mtsai, 2015; Mor és mtsai, 2014; Mor és mtsai, 2014, Mor és mtsai, 2013). Érdekesség, hogy korábbi kutatások közös géneket találtak pulyka eredetű, valamint fogoly és fácán eredetű reovírus törzsek között (Kugler és mtsai, 2016; Farkas és mtsai, 2021).

A reovírusokat jellemzően a σ C fehérjét kódoló gén tulajdonságai alapján genotipizálják (Kant és mtsai, 2003). Hagyományosan öt genetikai klasztert állapítottak meg, míg újabb közleményekben ezeket újracsoportosították, vagy teljesen új klasztereket javasoltak a kutatók (Lu és mtsai, 2015; Kant és mtsai, 2003; Ayalew és mtsai, 2017; Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Yamaguchi és mtsai, 2022). Az eredeti közleményekben a TARV-okat a II.-es

klaszterbe sorolták. Újabb eredmények szerint egyéb klaszterbe sorolható TARV-ok is okoznak veszteségeket pulyka állományokban, ahogyan azt a munkánk is alátámasztja. Vizsgálataink során III.-as klaszterbe sorolható TARV-ot is izoláltunk és leírtunk. Korábban bizonyítást nyert, hogy a különböző genetikai klaszterbe tartozó reovírusok különböző antigenitásbeli tulajdonságokkal rendelkeznek (Ayalew és mtsai, 2017). A II.-es klaszteren belül, mely a pulyka eredetű reovírusok fő genetikai klasztere, az amerikai eredetű TARV-ok a csirke eredetű ARV-ktől jól elkülönülő csoportot alkotnak (Lu és mtsai, 2015). Miután a magyar vírustörzseink σ C kódoló génjén alacsony variabilitást találtunk, feltételezzük, hogy ez egységes antigenitásbeli tulajdonságokat eredményez. Figyelembe véve a csirke eredetű reovírusok ugyanezen génjének (σ C) jól leírt magas fokú variabilitását (De Carli és mtsai, 2020; Sellers és mtsai, 2023), úgy gondoljuk, hogy a pulyka reovírusok esetében tapasztalt alacsonyabb variabilitás a relatíve kis mintaszámmal és szűk földrajzi eredettel magyarázható. Felveti továbbá a kérdést, hogy a σ C kódoló gén evolúciója mennyire különült el a két, szoros rokonságban álló baromfi faj, a csirke és a pulyka esetében. Feltételezhető, hogy a vakcinázás jelentős hatással bír az evolúciós jelenségekre, hiszen a vakcinát következetesen és kiterjedten jellemzően a házityúk fajban használják a tenosynovitis megelőzésére és éppen itt tapasztalunk nagyobb változékonyságot. Ráadásul évtizedekkel ezelőtt kezdtek csirkében vakcinát alkalmazni, míg pulyka esetében elszórtan veszik igénybe a telepspecifikus autovakcinát. Miután a σ C fehérje a sejthez kötődésért és szerv tropizmusért is felelős, az itt tapasztalt alacsony változékonyság feltételezi, hogy az antigénkötő receptor struktúrájában sem tapasztalhatunk jelentős változékonyságot. Feltételezve továbbá, hogy a változékonyság ellen ható evolúciós korlátok a σ C esetén fontosak, talán e két említett folyamat egy irányba hat. Kíváncsian figyelnénk a TARV evolúcióját, ha a pulyka ágazat széleskörűen elkezdene használni olyan vakcinát, mely egy genotípust tartalmaz. Feltételezésünk szerint rövid időn belül itt is emelkedő genetikai variabilitásról számolhatnánk be a σ C fehérjét illetően. Véleményünk szerint érdemes kitágítani a TARV-ok vizsgálatára szánt kutatásokat, hogy az itt felvázolt esetleges ellentmondások tisztázásra kerülhessenek a jövőben.

A jelen dolgozatban jellemzett törzseket vizsgálva, a σ C-hez hasonlóan, a gének többségénél alacsony változékonyságot tapasztaltunk. **A fentiek szerint pulyka esetében cáfoltuk a harmadik hipotézisünket, miszerint „Kelet-Közép Európai baromfiállományokból izolált reovírus törzsek σ C génjének aminosav és nukleotid összetétele jelentősen különbözik egymástól.”** Az egyes szegmensek kódoló szakaszaiból készült filogenetikai fák arra utalnak, hogy a TARV-ok reasszortációs eseményeken mentek át. Érdekesség, hogy ezen reasszortációk egy genetikailag stabil génkészletből történtek. Egyetlen kivétel a μ B esetében figyelhető meg, ahol bizonyítást nyert a csirke és pulyka eredetű gének találkozása. Felmerülhet a kérdés, hogy a két gazdafaj reovírusai közötti reasszortáció csak erre a génre korlátozódik-e. Fontosnak tartjuk jobban megérteni a pulyka

termelési folyamatok során a különböző reovírusok genetikai kapcsolódási lehetőségeinek módját, helyét és gyakoriságát. Mivel a μ B a reovírus külső kapszidjában foglal helyet (Benavente és mtsai, 2007), joggal feltételezhetjük, hogy befolyásolhatja az antigenitási tulajdonságokat vagy vírusneutralizációs képességeket vagy egyéb módon kapcsolódik a TARV biológiájához (pl. sejtbe jutás, transzkriptáz aktivitás). Elméletileg ezek a tulajdonságok segíthetnének a TARV-nak sikeresen túlélni a gazdaszervezetben.

A 2009-es és 2016-os magyar TARV-okat molekuláris járványtani szempontból elemezve egységes képet mutatnak, míg a két időpontban izolált vírusok eltérőek filogenetikailag. Jelen tudásunk szerint a fenti jelenség inkább sporadikus terjedés eredménye Magyarországon. Különböző madárfajok reovírusai esetén egyes gének azonosak, ami feltételezi, hogy bizonyos mértékű génkicserélődés előfordulhat idegen madárfajból származó reovírusok között. Azonban nem találtunk bizonyítékot arra, hogy ezek a pulyka reovírusok cirkulálnának vagy gyakran találkoznának más fajból származó reovírusokkal Magyarországon. Amennyiben helytállóak az eddigi feltételezéseink, akkor a megfigyelt reasszortációs események az összes vizsgálatba vont TARV-ok esetében a pulykák tartási helye és a mintagyűjtés helyétől távol történhettek.

A magyarországi pulyka állományokból származó TARV-ok genetikailag azonosnak mutatkoztak. Az eredményeinkből úgy tűnik, hogy a hazánkban cirkuláló pulyka reovírusok közös eredetűek. Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk a törzseink leszármazási kapcsolatairól, további széleskörű vizsgálatok szükségesek még több vírustörzs bevonásával. Jelenleg mindössze néhány forrásból szerezhető be tenyészpulyka a világon, ám ezek a farmok jól szervezett járványvédelmi rendszerekkel rendelkeznek. A pulyka reovírusok járványtanának és a máig tisztázatlan patogenomikai és transzmissziós képességek szélesebb körű megértéséhez segítséget jelentene a kiterjedt pulykatartással foglalkozó országokból gyűjtött mintákból elvégzett genomikai elemzések ösztönzése.

9.2. Csirke eredetű reovírusok

Egy évet átölelő mintagyűjtésünk eredményeként nemcsak Magyarországról, hanem a Kelet-Közép Európai régió több országából is sikerült ARV-ket kimutatnunk és elemeznünk. Annak ellenére, hogy a rutin felmérő vizsgálatot terveztünk, számos esetben helyi boncolásokat és az eseteket részleteiben feltáró információkat is sikerült begyűjtenünk. A külföldi minták esetében a begyűjtés és mintaszállítás során közreműködő szakember segítette munkánkat. Diagnosztikai munkánk vírusizolálásra és RT-PCR vizsgálatra támaszkodott, egyéb differenciáló laborvizsgálatot nem végeztünk. Talán a diagnosztikai protokollunk magában hordoz némi korlátot, hiszen a rendszerünk a sejtvonalakon

könnyebben fejlődő reovírusokat preferálja. Diagnosztikai megközelítésünkkel talán nem minden potenciálisan ARV-pozitív mintából sikerült vírust izolálnunk, ám miután nem korlátoztuk magunkat betegség specifikus esetekre, jobban megérthettük az egészséges állományokban cirkuláló reovírusokat is. Az általunk leírt jelenség, melyben az egészséges állományokból izolált reovírusok szoros rokonságban állnak beteg állományokból izolált más reovírusokkal, felhívja figyelmünket a veszélyforrásra, miszerint ezek a vírusok betegségeket okozhatnak, amikor később az állatokban vagy környezetükben negatív, hajlamosító hatások következnek be.

Minden izolátumunk az emésztőrendszer valamely pontjából származik (mirigyes gyomor, vékonybél és vakbél) függetlenül a leírt tünetektől. Sánta egyedek esetén ARV-t sikerült kimutatnunk a bélből, de az ínből nem. A bélből nagy számban kimutatható reovírus törzsek előfordulására számítottunk. A jelenség, hogy a tenosynovitis tünetet mutató csirke ínmintájából nem sikerült izolálni ARV-t viszont meglepetést okozott és ellentétes más kutatók eredményeivel is (Sellers és mtsai, 2017; Sellers és mtsai, 2023; Souza és mtsai, 2018; Croville és mtsai, 2019). Lehetséges, hogy az ínből történő mintavétel időpontja már a betegség előrehaladott stádiumába csúszott, amikor izolálható reovírus jelentősen kisebb számban van jelen az elváltozást mutató területeken. Egyéb tényezők is gátolhatták a sikeres laboratóriumi izolálást, úgy, mint a nem megfelelő mintaszállítási vagy tárolási körülmények. Szóbeli közlés által Kovács E. is megerősítette számunkra, hogy az ínből történő vírusizolálás pontos időzítést és gondos mintakezelést igényel. Itt megjegyzendő, hogy reovírus specifikus tüneteket mutató pulykák ínmintáiból sikerült reovírust izolálnunk (Lásd még: 8.1. Reovírusok előfordulása pulykában).

Fontosnak látjuk, hogy megállapításokat tegyünk a talált vírustörzsek genetikai diverzitásával kapcsolatban, hiszen az utóbbi idők közleményei világszerte egybehangzóan felvetik, hogy a rendszeres vakcinázás által kialakított védettség alól kibújó és betegséget okozó ARV-kben jelentős genetikai eltéréseket tapasztalnak a vakcinatörzsek genetikai összetételéhez képest (Sellers és mtsai, 2017). A viszonylag rövid mintagyűjtési periódus ellenére a hazánkban izolált ARV-k jelentős genetikai diverzitást mutattak, ami azt jelenti, hogy napjainkban is több genotípus kering Magyarországon. **Ilyen módon csirke esetében igazolást nyert harmadik hipotézisünk, mely szerint „Kelet-Közép Európai baromfi állományokból izolált reovírus törzsek σ C génjének aminosav és nukleotid összetétele jelentősen különbözik egymástól”.** Vizsgálatunk során mintáinkat öt genotípusba soroltuk, melyek megegyeztek a Kant és mtsai által javasolt genotípusokkal és amelyek globálisan is meghatározó genotípusok (Kovács és mtsai, 2023, Sellers és mtsai, 2023). **Ezzel igazoltuk kutatásunk második hipotézisét, miszerint „Kelet-Közép Európában előforduló csirke reovírusok σ C génje alapján az I-V. genetikai klaszterekbe sorolhatóak”.** Természetesen nem hagyjuk figyelmen kívül más kutatók javaslatait, melyek egy hatodik klaszter

meghatározását javasolják (Ayalew és mtsai, 2017; Lu és mtsai, 2015; Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Yamaguchi és mtsai, 2022), ám ezen javaslatok ellentmondásosak, és néhány esetben a hatodik klaszterként leírt törzsek egyértelműen egy már korábban meglévő klaszteren belüli leágazást képviselnek (13. ábra). Az elemző munkánk során ezért tartottuk meg a 2000-es években elfogadott, Kant és munkatársai által javasolt eredeti klasszifikációt (Kant és mtsai, 2003). Nem utolsó sorban a jelen vizsgálatban bemutatott törzsek tökéletesen illeszkednek az eredetileg leírt öt klaszterbe.

Az izolátumok nagy része a II.-es klaszterbe tartozik (n=43), melyet a IV.-es klaszter követ (n=24), majd az I.-es klaszter (n=2) és V.-ös klaszter (n=2), végül a III.-as klaszter (n=1).

A törzsek eredetének vizsgálatakor kiderült, hogy a II.-es és IV.-es klaszterbe tartozó magyarországi és külföldi (Románia, Ukrajna, Oroszország) törzsek szoros rokonságot mutatnak. Ezen országok közötti szoros kereskedelmi kapcsolatok a baromfiipar területén hozzájárulhattak a hasonló σ C génnel rendelkező vírustörzsek terjedéséhez. Mindazonáltal, feltételezve a reasszortációs folyamatokat ezen vírusok esetében, az egyéb génekre is kiterjedő teljes genom elemzésére lenne szükség az összefüggések jobb megértéséhez. Reovírusok teljes genom meghatározására egyszerű módszerek is rendelkezésre állnak, melyeknek sok hasznát vehetné a szakma további tudományos viták eldöntésében vagy akár jogi viták eldöntése során (Farkas és mtsai, 2016; Chrastek és mtsai, 2022).

Irodalmi adatok szerint az I.-es klaszter a világon mindenhol gyakran előfordul (De Carli és mtsai, 2020; Kovács és mtsai, 2023). Saját vizsgálatunk során 72 izolátumból mindössze kettő (3%) esett az I.-es klaszterbe, melyek egyébként távol esnek az S1133-as vakcinatörzstől. A kiterjedt vakcinázottság ellenére nem izoláltunk S1133 vakcinatörzs derivátumot sem, aminek oka lehet, hogy a mintavételek időpontjai nem esnek egybe a vakcina vírus ürítésének normál időablakaival ezekben az állományokban. Érdekes, hogy az I.-es klaszterbe tartozó reovírusokat viszonylag gyakran izolálunk vad madarakból és ezek közeli rokonságot mutatnak az S1133-as jelű vakcinavírussal (Choi és mtsai, 2022; Kim és mtsai, 2022). Izolátumaink szélesebb földrajzi területről származnak, hasonlóan más kutatókhoz, akik mind az öt kontinensen mutattak ki reovírusokat (Kovács és mtsai, 2023). Az Amerikában betegségeket okozó törzsek jellemzően az I.-es, II.-es és V.-ös klaszterbe tartoznak. Érdekes, hogy mindössze néhány IV.-es klaszterbe tartozó törzset találtak Dél-Amerikában, míg Észak-Amerikában sokkal nagyobb arányban mutatták ki, még akkor is, ha nem ez a domináns genotípus (Ayalew és mtsai, 2017; De Carli és mtsai, 2020; Lu és mtsai, 2015; Kant és mtsai, 2003; Palomino-Tapia és mtsai, 2018; Sellers és mtsai, 2023). Európai országokban (Magyarország, Németország, Görögország, Lengyelország, Románia, Oroszország, Spanyolország, Ukrajna és Hollandia) főképp a IV.-es klaszterbe tartozó törzseket mutattak ki. Ázsiában és a Közel-Keleten a IV.-es és II.-es klaszter képviselői dominálnak (Goldberg és

mtsai, 2010; Dandár és mtsai, 2013; Kant és mtsai, 2003; Farkas és mtsai, 2016; Kovács és mtsai, 2023).

A Hajdú-Bihar vármegyei 24 napos brojler állományban egyidőben két külön klaszterbe tartozó reovírust is találtunk. A mirigyes gyomorban III.-as klaszterbe tartozó ARV-t, míg a vékonybélben II.-es klaszterhez tartozó reovírust mutattunk ki runting-stunting szindrómával összefüggésben. Érdekes lenne további fertőzőses vizsgálatba vonni ezen törzseket, hogy egyenként milyen klinikai tüneteket okoznának, esetleg felerősítik-e egymás hatását. Érdekes volna továbbá igazolni a feltevésünket, hogy a III.-as klaszterbe tartozó ARV-nek nagyobb affinitása van megtelepedni a mirigyes gyomorban, mint egyéb szervekben. Ez igazolhatná saját eredményeinket, miszerint a III.-as klaszterbe tartozó reovírust csak a mirigyes gyomorban találtunk, pedig több száz bél mintát vizsgáltunk. Illetve igazolná, hogy σ C-ben tapasztalt jelentősebb eltérés a reovírus szervtropizmusára is jelentős hatással van.

Vizsgálatunkban ARV-ket tudtunk kimutatni runting-stunting tünetegyüttes, szétnövés/szórtság, emelkedett elhullás és sántaság tüneteit mutató állatokból. Nem találtunk összefüggést a klinikai tünetek és a genetikai klasszifikáció között, talán a viszonylag alacsony mintaszám miatt. **Ezzel a negyedik hipotézisünket cáfoltuk, miszerint „Kelet-Közép Európában csirkéből és pulykából izolált reovírus törzsek σ C proteint kódoló S1 génszakaszának nukleotid összetétele meghatározza a reovírus okozta betegség klinikai megjelenését”.** Hasonlóról számolnak be Kant és munkatársai és más kutatók sem tudtak eddig összefüggést találni baromfiban a reovírus patológiája és a σ C alapú filogenetika között (Ayalew és mtsai, 2017; Goldberg és mtsai, 2010; Kant és mtsai, 2003; Yamaguchi és mtsai, 2022; Kovács és mtsai, 2023). Így juthatunk arra következtetésre, hogy a σ C alapú genotípus-specifitás nem, vagy nem kizárólag határozza meg az ARV okozta betegségek megjelenését. Valószínűsíthető, hogy egyéb genetikai jelenségek, beleértve a mutációkat a meghatározó géneken, vagy ARV variánsok meghatározott gén konstellációban játszanak közre a patogenitásban. Vitán felül áll, hogy további kutatások szükségesek a reovírus patogenitási tulajdonságainak megértéséhez. A reovírusok biológiájának mélyebb megértéséhez és fejlettebb vakcinák kifejlesztéséhez a jövőben érdemes lesz új technológiákat, mint például a plazmid alapú reverz genetikai rendszereket készség szinten elsajátítani. Brojler állományok vesztségeit jelentősen csökkenthetjük a megfelelő maternális ellenanyagok biztosításával, mely a megfelelő szülőpár vakcinázással érhető el. Az akutális szakmai álláspont szerint rövidebb távon a multivalens vakcinák jelentik a legígéretesebb megközelítést az ARV visszaszorítására (Ayalew és mtsai, 2023). Érdekes felvetés a régió-specifikus vakcina tervezés, ám figyelembe véve a globális áru- és élőállatkereskedelmet, talán rövidebb távú eredményekkel számolhatunk ezekkel.

10. Hipotézisvizsgálat

1. Kelet-Közép Európai baromfi állományok esetében a reovírusok szignifikánsan nagyobb arányban izolálhatóak beteg állatokból, mint egészséges állatokból.
> Nem Igazolt
2. Kelet-Közép Európában előforduló csirke reovírusok σC génje alapján az I-V. genetikai klaszterekbe sorolhatóak.
> Igazolt
3. Kelet-Közép Európai baromfiállományokból izolált reovírus törzsek σC génjének aminosav és nukleotid összetétele jelentősen különbözik egymástól.
> Igazolt csirke esetében és nem igazolt pulyka esetében
4. A Kelet-Közép Európai csirke és pulyka állományokból izolált reovírus törzsek σC génjének aminosav és nukleotid összetétele meghatározza a reovírus okozta betegség klinikai megjelenését.
> Nem igazolt

11. Új tudományos eredmények

Ez az első átfogó kutatás magyarországi és Kelet-Közép-Európai baromfiállományok reovírus fertőzöttségének felmérésében, kiterjesztve a reovírusok klinikumára, genetikai diverzitására, valamint ezek összefüggésének vizsgálatára.

Szinte azonos σC genetikával rendelkező reovírust mutattunk ki ugyanarról a brojler telepről hat év különbséggel, mely felveti a lehetőségét annak, hogy a reovírus képes egy farmon hosszú időn keresztül életben maradni az immunitásért felelős σC fehérje lényeges változása nélkül.

Csirkék esetében a III.-as genetikai klaszterbe mindössze mirigyesgyomor-mintából származó izolátum került, annak ellenére, hogy több száz bélmintát vizsgáltunk meg. Hasonló eredményről eddig nem számoltak be. További kutatást igényel annak tisztázása, hogy vajon a III.-as klaszterbe sorolható ARV-k esetében szervtropizmusról van-e szó.

Eredményeink szerint a magyarországi pulyka eredetű reovírusok genetikailag azonosnak mutatkoztak, függetlenül a földrajzi eredetüktől. Rámutattunk továbbá arra, hogy a Magyarországon cirkuláló pulyka reovírusok közös forrásból származnak.

Először izoláltunk és írtunk le III.-as klaszterbe sorolható pulyka eredetű TARV-ot. Eddig ebbe a klaszterbe csak csirke eredetű reovírusokat soroltak. Valószínűleg ez fajok közötti átugrás eredménye.

A pulyka reovírusok μB fehérjéje esetében először figyeltük meg a csirke és pulyka eredetű gének transzferét.

A vakcinázatlan brojler állományokból származó vírustörzsek nagyobb változékonyságot mutattak a vakcinázott állományokból származó rokonaikhoz képest. További vizsgálatokat igényel annak megértése, hogy a különböző vakcinázási sémák alkalmazásának milyen hatása van az új vírustörzsek kisselektálódására.

12. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni mindkét témavezetőmnek, Dr. Farkas Szilviának és Bányai Krisztiánnak, hogy lehetőséget teremtett a doktori munkám végzéséhez. Bizalmukkal, tanácsaikkal, véleményükkel végig támogattak ebben a hosszúra nyúlt munkában. Köszönöm Dr. Horváth-Papp Imrének az átadott mintákat, valamint az összes közreműködő állatorvos kolléga segítségét, akik mintáikkal segítettek elkészíteni ezt a széleskörű felmérést.

Köszönöm az Új kórokozók témacsoport minden egykori és jelenlegi munkatársának, különösképpen Varga-Kugler Renátának és Fehér Enikőnek, hogy rengeteg türelemmel és kitartással fordultak felém. Ösztönzésük és segítőkészségük nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a munkám elkészült. Ihász Katalinnak külön köszönöm a mintáim rendszerezésében és nyilvántartásában nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm a családomnak, hogy nyugodt és kiegyensúlyozott háttérrel biztosítanak számomra. Köszönöm a feleségemnek, Boglárkának, hogy mindig képes volt lelket önteni belém és lehetővé tette, hogy időm legyen a munkámra. És végül, de nem utolsósorban köszönöm kislányomnak és kisfiamnak, hogy egy kis időt azért mindig hagytak nekem munkára.

Munkámat a Magyar Nemzeti Tudományos Kutatási Alap [K120201] támogatta. A munka további pályázati forrása a következő volt: Fertőző állatbetegségek, antimikrobiális rezisztencia, állatorvosi közegészségügy és élelmiszerlánc-biztonság Nemzeti Laboratóriuma (ikt.sz.: RRF-2.3.1-21-2022-00001).

13. Irodalomjegyzék

- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M.J., **(2010)** TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38, W7–W13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>
- Agrárszektor **(2023)**. Továbbra is a baromfihúst favorizáljuk - messze a csirke a legnépszerűbb (agranszektor.hu). 2023. <https://www.agranszektor.hu/elelmiszer/20231006/tovabbra-is-a-baromfihus-t-favorizaljuk-messze-a-csirke-a-legnepszerubb-45490#>
- Agrotrend/Magyar Állattenyésztők Szövetsége **(2024)**. A takarmány- és baromfiágazat értékelése és kilátásai magyarországon – Agrotrend. 2024. <https://agrotrend.hu/hirek/a-takarmany-es-baromfiagazat-ertekelese-es-kilatasai-magyarorszagon/>
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. **(1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215, 403–410.
- Ayalew L, Gupta A, Fricke J, Ahmed KA, Popowich S, Lockerbie B, Tikoo SK, Ojkic D, Gomis S **(2017)**. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. *Sci Rep* 7:3565:1–13
- Ayalew, L. E., Ahmed, K. A., Mekuria, Z. H., Lockerbie, B., Popowich, S., Tikoo, S. K., et al. **(2020)**. The dynamics of molecular evolution of emerging avian reoviruses through accumulation of point mutations and genetic re-assortment. *Virus Evol.* 6, veaa025. doi: 10.1093/ve/veaa025
- Ayalew, L. E., Popowich, S., Chow-Lockerbie, B., Gautam, H., Subhasinghe, I., Ahmed, K. A., Tikoo, S. K., Ojkic, D., Gomis, S. **(2023)**. Development of a multivalent adjuvanted inactivated vaccine against variant arthrotropic avian reoviruses. *Frontiers in Veterinary Science*. Volume 10 – 2023. DOI=10.3389/fvets.2023.1209597, ISSN=2297-1769
- Bányai K, Dandár E, Dorsey K, Mató T, Palya V **(2011)** The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers. *Virus Genes* 42:82–89.
- Behr, K.P., Rönchen, S., Bajnok, L. **(2015)**. Telepszefikus vakcinák alkalmazása baromfiállományokban. *Derzsy napok 2015, Zalakaros*.
- Benavente, J., Martínez-Costas, J. **(2007)** Avian Reovirus: Structure and Biology. *Virus Res.* 2007, 123, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.09.005>.
- Bokaie, S., Shoojadost, B., Pourbakhsh, Pourseyed S.M., Sharifi, L. **(2008)** Seroprevalence survey on Reovirus infection of broiler chickens in Tehran province. *Iran J Vet Res* 9:181–183.

- Cadman, H.F., Kelly, P.J., Zhou, R., Davelaar, F., Mason, P.R. **(1994)**. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe, *Avian. Dis.*, 38. 621-625, 1994.
- Czekaj, H., Kozdruń, N., Stys-Fijol, N., Niczyporuk, J.S., Piekarska, K. **(2018)** Occurrence of reovirus (ARV) infections in poultry flocks in Poland in 2010-2017. *J Vet Res* 62:421–426
- Choi, Y.-R., Kim, S.-W., Shang, K., Park, J.-Y., Zhang, J.-F., Jang, H.-K., Wei, B., Cha, S.-Y., Kang, M. **(2022)** Avian Reoviruses from Wild Birds Exhibit Pathogenicity to Specific Pathogen Free Chickens by Footpad Route. *Front. Vet. Sci.* 2022, 9, 844903.
- Chrzastek, K., Sellers, H.S., Kapczynski, D.R. **(2022)** A Universal, Single-Primer Amplification Protocol to Perform Whole-Genome Sequencing of Segmented dsRNA Avian Orthoreoviruses. *Avian Dis.* 2022, 66, 479–485.
- Croville, G., Delpont, M., Genin, J., Robertet, L., Delverdier, M., Lucas, M.N., Guerin, J.L. **(2019)** Avian reovirus outbreak associated with tenosynovitis in the French label certified poultry production. In *Proceedings of the 13èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, Tours, France, 20–21 March 2019; pp. 228–233.
- Dandár, E., Huhtamo, E., Farkas, S.L., Oldal, M., Jakab, F., Vapalahti, O., Bányai, K. **(2014)**. Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus Orthoreovirus. *J Gen Virol.* 95, 898–904. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060699-0>.
- Dandár E, Fehér E, Bálint Á, Kisfali P, Melegh B, Mató T, Kecskeméti S, Palya V, Bányai K, Farkas SL **(2015)** Genome Sequences of Three Turkey Orthoreovirus Strains Isolated in Hungary. *Genome Announc* 3(6):e01333-15.
- Day, J.M., **(2009)**. The diversity of the orthoreoviruses: Molecular taxonomy and phylogentic divides. *Infect Genet Evol.* 9, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.011>
- Davis, J. F., Kulkarni, A., and Fletcher, O. **(2012)**. Myocarditis in 9-and 11-day-old broiler breeder chicks associated with a reovirus infection. *Avian Dis.* 56, 786–790. doi: 10.1637/10267-060712-Case.1
- De Carli, S., Wolf, J., Gräf, T., Lehmann, FKM., Fonseca, ASK., Canal, CW., Lunge, VR., Ikuta, N. **(2020)** Genotypic characterization and molecular evolution of avian reovirus in poultry flocks from Brazil. *Avian Pathology* 49(6):611-620.
- De la Torre, D., Astolfi-Ferreira, C.S., Chacón, R.D., Puga, B., Piantino Ferreira, A.J. **(2021)** Emerging new avian reovirus variants from cases of enteric disorders and arthritis/tenosynovitis in Brazilian poultry flocks. *Br. Poult. Sci.* 2021, 62, 361–372.
- Dobos-Kovács M. **(2016)** Vírus okozta hasmenés általános patogenezise. *Állatorvosi patológiai képes album II. Házimadarak patológiája* pp 141–143.

- Dijkeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J., **(2008)**. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*. 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>.
- Docherty, D.E., Converse, K.A., Hansen, W.R., Norman, G.W. **(1994)**. American woodcock (*Scolopax minor*) mortality associated with a reovirus, *Avian. Dis.*, 38. 899-904, 1994.
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., Stoltz, D. **(2004)**. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology* 319, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.025>
- Edens, F., Parkhurst, C., Qureshi, M., Casas, I., Havenstein, G. **(1997)** Atypical *Escherichia Coli* Strains and Their Association with Poult Enteritis and Mortality Syndrome. *Poult. Sci.* 1997, 76, 952–960. <https://doi.org/10.1093/ps/76.7.952>.
- Egaña-Labrin, S., Hauck, R., Figueroa, A., Stoute, S., Shivaprasad, H., Crispo, M., et al. **(2019)**. Genotypic characterization of emerging avian reovirus genetic variants in California. *Sci. Rep.* 9, 1–10. doi: 10.1038/s41598-019-45494-4.
- Fahey, J., Crawley, J. **(1954)**. Studies on chronic respiratory disease of chickens II. Isolation of a virus. *Canad. J. Compar. Med. Veter. Sci.* 18, 13.
- Farkas, S.L., Marton, S., Dandár, E., Kugler, R., Gál, B., Jakab, F., Bálint, Á., Kecskeméti, S., Bányai, K. **(2016)**. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *Sci Rep* 6:36960.
- Farkas, S.L., Varga-Kugler, R., Ihász, K., Marton, S., Gál, J., Palya, V., Bányai, K. **(2021)** Genomic Characterization of Avian and Neoavian Orthoreoviruses Detected in Pheasants. *Virus Res.* 2021, 297, 198349. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198349>.
- França, M., Crespo, R., Chin, R., Woolcock, P., Shivaprasad, H.L. **(2010)**. Retrospective study of myocarditis associated with reovirus in turkeys, *Avian Dis.*, 54. 1026-1031, 2010.
- Gallardo, R. A. **(2017)**. “Molecular epidemiology of reoviruses in California,” in Proceedings of the 66th of the Western Poultry Disease Conference (Sacramento, California) 54–5.
- Gallardo, R. A. **(2023)**. Oral presentation, XXIIInd Congress of World Veterinary Poultry Association, 07th September 2023, Verona, Italy.
- Goldenberg, D., Lublin, E., Rosenbluth, E. **(2016)**. Optimized polypeptide for a subunit vaccine against avian reovirus. *Vaccine* 34(27):3178–3183
- Goldenberg, D., Pasmanik-Chor, M., Pirak, M., Kass, N., Lublin, A., Yeheskel, A., Heller, D., Pitcovski, J. **(2010)** Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. *Avian Pathol.* 2010, 39, 189–199.
- Goodwin, M.A., Davis, J.F., Player, E.C. **(1993)**. Reovirus-associated enteritis in Georgia broiler chicks, *Avian. Dis.*, 37. 229-233, 1993.

- Gouvea, V., Schnitzer, T. J. **(1982)**. Pathogenicity of avian reoviruses: examination of six isolates and a vaccine strain. *Infect. Immun.* 38, 731–738. doi: 10.1128/iai.38.2.731-738.1982
- Grafl, B., Gaußmann, B., Prokofieva, I, Hess, M. **(2019)** Impact of biosecurity on the introduction of Fowl Adenoviruses and Avian Orthoreoviruses in broiler flocks. *Proceeding WVPAC 2016*
- Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T., Dermody, T.S. **(2006)** Attachment and Cell Entry of Mammalian Orthoreovirus. In Roy, P. (editor), in: *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Springer, pp. 1–38.
- Guy, J.S., Barnes, H.J., Smith, L.G., Breslin, J. **(1997)** Antigenic Characterization of a Turkey Coronavirus Identified in Poult Enteritis- and Mortality Syndrome-Affected Turkeys. *Avian Dis.* 1997, 41, 583–590.
- Hall, T.A., **(1999)**. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Heggen-Peay, C.L., Qureshi, M.A., Edens, F.W., Sherry, B., Wakenell, P.S., O'Connell, P.H., Schat, K.A. **(2002)**. Isolation of a reovirus from poult enteritis and mortality syndrome and its pathogenicity in turkey poults, *Avian. Dis.*, 46. 32-47, 2002.
- Hlinak, A., Müller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, H., Ziedler, K. **(1998)**. Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany, *J. Wildl. Dis.*, 34. 479-486, 1998.
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P.A., Wallner-Pendelton, E.A., Lin, L., Knoll, E.A. **(2015)**. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Sci. Rep.* 5, 14727; doi: 10.1038/srep14727 (2015).
- Jansen van Vuren, P., Wiley, M., Palacios, G., Storm, N., McCulloch, S., Markotter, W., Birkhead, M., Kemp, A., Paweska, J.T. **(2016)**. Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* 8. <https://doi.org/10.3390/v8030065>.
- Joklik, W.K. **(1981)**. Structure and function of the reovirus genome, *Microbiol. Rev.*, 45. 483-501, 1981.
- Jones R. C, Georgiou K **(1984)** Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. *Avian Pathol* 13(3):441–457
- Jones, R. **(2000)**. Avian reovirus infections. *Rev. Scientif. Tech.* 19, 614–619. doi: 10.20506/rst.19.2.1237
- Jones, R. C.: *Reovirus Infections* **(2013)**. In: *Diseases of Poultry*. 13th Edition. Smerk.: Swayne D. E. Glisson, J. R, McDougald L. R, Nolan L. K, Suarez, D. L., Nair, V., Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2013. p. 351-373.

- Jones, R.C. **(2008)**. Viral Arthritis In: Saif, Y. M. (ed), in: Disease of Poultry. Blackwell Publishing, pp. 310–322.
- Jung I. **(2023)**. A baromfiágazat 2022-ben - Magyar Mezőgazdaság (magyarmezogazdasag.hu).2023.
<https://magyarmezogazdasag.hu/2023/03/19/baromfiagazat-2022-ben/>
- Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A., ter Huurne, A. **(2003)**. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigmaC protein. Vet. Res. 2003, 34, 203-212.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. **(2012)**. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012, 28, 1647–1649.
- Kim, S.-W., Choi, Y.-R., Park, J.-Y., Wei, B.; Shang, K., Zhang, J.-F., Jang, H.-K., Cha, S.-Y., Kang, M. **(2022)** Isolation and Genomic Characterization of Avian Reovirus from Wild Birds in South Korea. Front. Vet. Sci. 2022, 9, 794934.
- Kloet, S.R. **(2008)** Sequence Analysis of Four Double-Stranded RNA Genomic Segments Reveals an Orthoreovirus with a Unique Genotype Infecting Psittaciformes. Avian Dis. 52, 480–486. <https://doi.org/10.1637/8212-011908-Reg.1>
- Kovács, E., Varga-Kugler, R., Mató, T., Homonnay, Z., Tatár-Kis, T., Farkas, S., Kiss, I., Bányai, K., Palya, V. **(2023)** Identification of the main genetic clusters of avian reoviruses from a global strain collection. Front. Vet. Sci. 2023, 9, 1094761.
- 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>
- Kugler, R., Dandár, E., Fehér, E., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K., Farkas, S.L. **(2016)** Phylogenetic Analysis of a Novel Reassortant Orthoreovirus Strain Detected in Partridge (Perdix Perdix). Virus Res. 2016, 215, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.11.018>.
- Kulcsár, G. **(2016)**. Telepszefikus vakcinák engedélyezésének jogi és szakmai háttere. Derzsy napok 2016 Hajdúszoboszló.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. **(2018)**. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018, 35, 1547–1549.
- Larsson, A., Posada D. **(2014)**. Aliview: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, Bioinformatics, 30. 3276-3278, 2014.

- Lee, L., Wang, Y., and Shien, J. **(1992)**. Serological characterization of reoviruses isolated from avian species in Taiwan. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 18, 69–72.
- Levisohn, S., Gur-Lavie, A., Weisman, J. **(1980)** Infectious Synovitis in Turkeys: Isolation of Tenosynovitis Virus-like Agent. *Avian Pathol.* 1980, 9, 1–4. <https://doi.org/10.1080/03079458008418380>.
- Lin, K.H., Hsu, A.P., Shien, J.H., Chang, T.J., Liao, J.W., Chen, J.R., Lin, C.F., Hsu, W.L. **(2012)**. Avian reovirus sigma C enhances the mucosal and systemic immune responses elicited by antigen-conjugated lactic acid bacteria. *Vaccine* 30:5019–5029
- Liu, H. J., Lee, L. H., Hsu, H. W., Kuo, L. C., and Liao, M. H. **(2003)**. Molecular evolution of avian reovirus:: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Virology.* 314, 336–349. doi: 10.1016/S0042-6822(03)00415-X
- Lublin, A., Goldenberg, D., Rosenbluth, E., Heller, E.D., Pitcovski, J. **(2011)**. Wide-Range protection against avian reovirus conferred by vaccination with representatives of four defined genotypes. *Vaccine* 29: 8683–8688
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P. A., Wallner-Pendleton, E. A., Lin, L., Knoll, E. A., et al. **(2015)**. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Sci. Rep.* 5, 1–11. doi: 10.1038/srep14727
- Malkinson, M., Perk, K., Weisman, Y. **(1981)**. Reovirus infection of young Muscovy ducks (*Cairina moschata*), *Avian. Pathol.*, 10. 433-440, 1981.
- Markussen, T., Dahle, M.K., Tengs, T., Løvoll, M., Finstad, Ø.W., Wiik-Nielsen, C.R., Grove, S., Lauksund, S., Robertsen, B., Rimstad, E. **(2013)**. Sequence Analysis of the Genome of Piscine Orthoreovirus (PRV) Associated with Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS One* 8, e70075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070075>
- Matthijnssens, J., Attoui, H., Bányai, K., Brussaard, C.P.D., Danthi, P., del Vas, M., Dermody, T.S., Duncan, R., Fāng, Q., Johne, R., Mertens, P.P.C., Jaafar, F.M., Patton, J., Sasaya T., Suzuki, N., Wei, T. **(2022)** and ICTV Report Consortium. 2022, ICTV Virus Taxonomy Profile: Sedoreoviridae 2022, *Journal of General Virology* 103:001782
- Medveczky, I., Rusvai, M, Tuboly, S, Varga, J. **(1998)**. *Állatorvosi Járványtan* I. Szerk.: Tuboly, S. Szeged: Szegedi Kossuth Nyomda Kft., 1998. p. 372-375.

- Mertens, P.P.C., Duncan, R., Attoui, H., Dermody, T. S. **(2000)**. Family Reoviridae. In: Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Szerk.: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. San Diego: Academic Press, 2000. p. 447-454.
- Mirbagheri, S.A., Hosseini, H., Ghalyanchilangeroudi, A. **(2020)**. Molecular characterization of avian reovirus causing tenosynovitis outbreaks in broiler flocks, Iran. *Avian Pathol* 49(1):15–20.
- Mosad, S. M., Elmahallawy, E.K., Alghamdi, A. M., El-Khayat, F., El-Khadragy, M. F., Ali, L. A., Abdo, W. **(2023)**. Molecular and pathological investigation of avian reovirus (ARV) in Egypt with the assessment of the genetic variability of field strains compared to vaccine strains. *Frontiers in Microbiology*, 17 April 2023, Sec. Virology. Volume 14 – 2023. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1156251>
- Mor, S.K., Marthaler, D., Verma, H., Sharafeldin, T.A., Jindal, N., Porter, R.E., Goyal, S.M. **(2015)** Phylogenetic Analysis, Genomic Diversity and Classification of M Class Gene Segments of Turkey Reoviruses. *Vet. Microbiol.* 2015, 176, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.005>.
- Mor, S.K., Sharafeldin, T.A., Porter, R.E., Goyal, S.M. **(2014)** Molecular Characterization of L Class Genome Segments of a Newly Isolated Turkey Arthritis Reovirus. *Infect. Genet. Evol.* 2014, 27, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.012>.
- Mor, S.K., Verma, H., Sharafeldin, T.A., Porter, R.E., Jindal, N., Ziegler, A., Goyal, S.M. **(2014)** Characterization of S Class Gene Segments of a Newly Isolated Turkey Arthritis Reovirus. *Virology* 2014, 464–465, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.009>.
- Mor, S.K., Sharafeldin, T.A., Porter, R.E., Ziegler, A.; Patnayak, D.P., Goyal, S.M. **(2013)** Isolation and Characterization of a Turkey Arthritis Reovirus. *Avian Dis.* 2013, 57, 97–103. <https://doi.org/10.1637/10353-090712-Reg.1>.
- Muhire, B.M.; Varsani, A.; Martin, D.P. **(2014)**. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE* 2014, 9, e108277.
- Mutlu, O.F., Grund, C., Cöven, F. **(1998)**. Reovirus infection of pheasants (*Phasianus colchicus*), *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.*, 26. 104-107, 1998.
- Nersessian, B.N., Goodwin, M.A., Kleven, S.H., Pesti, D. **(1985)** Studies on Orthoreoviruses Isolated from Young Turkeys. I. Isolation and Characterization. *Avian Dis.* 1985, 29, 755–767.
- Noh JY, Lee DH, Lim TH, Lee JH, Day JM, Song CS **(2018)** Isolation and genomic characterization of a novel avian orthoreovirus strain in Korea, 2014. *Arch Virol* 163(5):1307–1316

- Nour, I.; Mohanty, S.K. Avian Reovirus: From Molecular Biology to Pathogenesis and Control. *Viruses* 2024, 16, 1966. <https://doi.org/10.3390/v16121966>
- Ogasawara, Y., Ueda, H., Kikuchi, N., Kirisawa, R. **(2015)**. Isolation and genomic characterization of a novel orthoreovirus from a brown-eared bulbul (*Hypsipetes amaurotis*) in Japan. *J Gen Virol.* 96, 1777–1786. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000110>
- Olson, N.O.; Weiss, R. **(1972)**. Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus, *Avian Dis.*, 16535-540, 1972.
- Palomino-Tapia V, Mitevski D, Inglis T, van der Meer F, Abdul-Careem MF **(2018)** Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012–2017 based on partial sigma (σ)C gene. *Virology* 522:138–146
- Palya, V., Glávits, R., Dobos-Kovács, M., Ivanics, E., Nagy, E., Bányai, K., Reuter, G., Szucs, G., Dán, A., Benko, M. **(2003)**. Reovirus identified as cause of disease in young geese, *Avian. Pathol.*, 32. 129-138, 2003.
- Perelman B, Krispin H, Farnoushi Y **(2019)** Use of Controlled Exposure as a Novel Method for Reovirus Arthritis/Tenosynovitis Prevention. A Preliminary Report. *Isr J Vet Med* 74(4):163–172.
- Petek, M., Felluga, B., Borghi, G., Baroni, A. **(1967)**. The Crawley agent: an avian reovirus, *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, 21. 413-424, 1967.
- Pitcovski, J., Goyal, S.M. **(2020)** Avian reovirus infections. In *Diseases of Poultry*, 14th ed.; Swayne, D.E., Ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2020; pp. 382–400.
- Rau, W.E., van der Heide, L., Kalbac, M., Girschick, T. **(1980)** Onset of progeny immunity against viral arthritis/tenosynovitis after experimental vaccination of parent breeder chickens and crossimmunity against six reovirus isolates . *Avian Dis* 24(3): 648-57
- Reck C, Menin Á, Canever MF, Pilati C, Miletto LC **(2019)** Molecular detection of *Mycoplasma synoviae* and avian reovirus infection in arthritis and tenosynovitis lesions of broiler and breeder chickens in Santa Catarina State, Brazil. *J S Afr Vet Assoc* 90:1019–91
- Ritter, G.D., Ley, D.H., Levy, M., Guy, J., Barnes, H.J. **(1986)**. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. *Avian Dis.* 30, 603–608.
- Robertson, M. D. **(1986)**. Avian reovirus. *Vet. Bull.* 56, 155–174.
- Rosa, A.C.G., Ferreira, H.L., Gomes, D.E., Táparo, C.V., Cardoso, T.C. **(2014)** Isolation and Molecular Characterization of Brazilian Turkey Reovirus from Immunosuppressed Young Poults. *Arch. Virol.* 2014, 159, 1453–1457. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1947-5>.
- Rosenberger, J., Sterner, F., Botts, S., Lee, K., and Margolin, A. **(1989)**. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Dis.* 33, 535–544. doi: 10.2307/1591118

- Sabin, A.B., **(1959)**. Reoviruses: A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 130, 1387–1389.
<https://doi.org/10.1126/science.130.3386.1387>
- Saikia, D.P., Yadav, K., Pathak, D.C., Ramamurthy, N., D'Silva, A.L., Marriappan, A.K., Ramakrishnan, S., Vakharia, V.N., Chellappa, M.M., Dey, S. **(2019)**. Recombinant newcastle disease virus (NDV) expressing sigma C protein of avian reovirus (ARV) protects against both ARV and NDV in chickens. *Pathogens* 8(145):1–21
- Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T **(2009)** Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Vet Microbiol* 134(3–4):227–232
- Schiff, L.A., Nibert M. L., Tyler K. L. **(2007)**. Orthoreoviruses and Their Replication. In: *Fields Virology*, Fifth edition. Szerk.: Knipe, D.M., Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, 2007. p. 1854-1915.
- Sellers, H.S., Linnemann, E.G., Pereira, L., Kapczynski, D.R. **(2004)**. Phylogenetic analysis of the sigma 2 protein gene of turkey reoviruses, *Avian. Dis.*, 48. 651-657, 2004.
- Sellers, H. S. **(2017)**. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. *Vet. Microbiol.* 206, 152–156. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.014
- Sellers, H.S. **(2023)** Avian Reoviruses from Clinical Cases of Tenosynovitis: An Overview of Diagnostic Approaches and 10-Year Review of Isolations and Genetic Characterization," *Avian Diseases* 66(4), 420-426, (11 January 2023)
- Shivaprasad, H.L., Franca, M., Woolcock, P.R., Nordhausen, R., Day, J.M., Pantin-Jackwood, M. **(2009)**. Myocarditis associated with reovirus in turkey poults, *Avian Dis.*, 53. 523-532, 2009.
- Spackman, E., Pantin-Jackwood, M., Day, J.M., Sellers, H. **(2005)**. The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens, *Avian Pathol.*, 34. 291-296, 2005.
- Souza, S.O., De Carli, S., Lunge, V.R., Ikuta, N., Canal, C.W., Pavarini, S.P., Driemeier, D. **(2018)** Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. *Poult. Sci.* 2018, 97, 3550–3555.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., **(2013)**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30, 2725–2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tang, Y., Lu, H., Sebastian, A., Yeh, Y.-T., Praul, C.A., Albert, I.U., Zheng, S.-Y. **(2015)**. Genomic Characterization of a Turkey Reovirus Field Strain by Next-Generation Sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 32, 313–321.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.029>.

- Tang Y, Lin L, Sebastian A, Lu H **(2016)**. Detection and characterization of two co-infection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS). *Sci Rep* 6:24519
- Tanyi J., Glávits R., Salyi G., Rudas P., Kosa E., Szabó J. **(1994)** Pancreatitis caused by reovirus in guinea-fowl. *Avian Pathol* 23:61–7
- Tenorio, R., Fernández de Castro, I., Knowlton, J.J., Zamora, P.F., Sutherland, D.M., Risco, C., Dermody, T.S. **(2019)** Function, Architecture, and Biogenesis of Reovirus Replication Neoorganelles. *Viruses*. 11, 288.
- Thalmann, C.M., Cummins, D.M., Yu, M., Lunt, R., Pritchard, L.I., Hansson, E., Crameri, S., Hyatt, A., Wang, L.F. **(2010)**. Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat. *Virology*. 402, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.048>
- Troxler S, Rigomier P, Bilic I, Liebhart D, Prokofieva I, Robineau B, Hess M **(2013)**. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. *Vet Rec* 172(21):556
- Van Loon, A.A., Koopman, H.C., Kosman, W., Mumczur, J., Szeleszczuk, O., Karpinska, E., Kosowska, G., Lütticken, D. **(2001)**. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens, *Vet. Q*, 23. 129-133, 2001.
- Van der Heide, L. **(2000)**. The history of avian reovirus. *Avian Dis*. 44, 638–641. doi: 10.2307/1593104
- van der Heide, L., Kalbac, M., Brustolon, M., Lawson, M.G. **(1980)** Pathogenicity for Chickens of a Reovirus Isolated from Turkeys. *Avian Dis*. 1980, 24, 989–997.
- Varga-Kugler R. **(2021)**. Hüllők és madarak reovírusainak genetikai diverzitása. PhD értekezés. Állatorvostudományi Egyetem Állatorvostudományi Doktori Iskola, 2021.
- Walker, E.R., Friedman, M.H., Olson, N.O. **(1972)**. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res*. 41, 67–79. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(72\)90039-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(72)90039-1)
- Wan, J., Wang, C., Wen, X., Huang, X., Ling, S.S., Huang, Y., Cao, S. **(2011)**. Immunogenicity of a DNA vaccine of Avian Reovirus orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Res Vet Sci* 91:382–383
- Wang, D., Shi, J., Yuan, Y., Zheng, L., Zhang, D. **(2013)**. Complete sequence of a reovirus associated with necrotic focus formation in the liver and spleen of Muscovy ducklings, *Vet. Microbiol.*, 166. 109-122, 2013.
- Yamaguchi, M.; Miyaoka, Y., Hasan, A., Kabir, H., Shoham, D., Murakami, H., Takehara, K. **(2022)** Isolation and Molecular Characterization of Fowl Adenovirus and Avian Reovirus from Breeder Chickens in Japan in 2019–2021. *J. Vet. Med. Sci.* 2022, 84, 238–243.

Yin, Ch-h., Qin, L-t., Sun, M-y., Gao, Y-l., Qi, X-l., Gao, H-l., Wang, Y-q., Wang, X-m. (2013) Antigenic Analysis of Monoclonal Antibodies against Different Epitopes of σ B Protein of Avian Reovirus. Journal Plos One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081533>

Zhong, L., Gao, L., Liu, Y., Li, K., Wang, M., Qi, X., et al. **(2016)**. Genetic and pathogenic characterisation of 11 avian reovirus isolates from northern China suggests continued evolution of virulence. Sci. Rep. 6, 1–10. doi: 10.1038/srep35271

14. Közlemények listája

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

Gál B., Farkas Sz., Bányai K. (2021). **Csirkék reovírus-fertőzései. Irodalmi összefoglaló.** Magyar Állatorvosok Lapja 143. évf. 2021. február. 95–106.

Gál B., Varga-Kugler R., Ihász K., Kaszab E., Domán M., Farkas S. L., Bányai K. (2023). **Marked Genotype Diversity among Reoviruses Isolated from Chicken in Selected East-Central European Countries.** Animals 2023, 13, 2137. <https://doi.org/10.3390/ani13132137>

Gál B., Varga-Kugler R., Ihász K., Kaszab E., Farkas S. L., Marton S., Martella V., Bányai K. (2023). **A Snapshot on the Genomic Epidemiology of Turkey Reovirus Infections, Hungary.** Animals 2023, 13, 3504. <https://doi.org/10.3390/ani13223504>

15. Ábrák és táblázatok jegyzéke

15.1. Ábrák

1. **ábra.** Egy madár reovirion sematikus felépítése. (A kép forrása: Benavente és Martínez-Costas, 2007)14
2. **ábra.** Az S1 policisztronos genomszegmens felépítése az AVS-B jelű madár reovírus törzs példáján bemutatva14
3. **ábra.** Tíz vizsgált magyarországi, a T1781, valamint az S1133-as és AVS-B referenciatörzsek genomszekvenciáinak bioinformatikai elemzéseinek eredményei: A magyarországi törzsek szekvencia-összehasonlítása 71,1–100% közötti nukleotid-azonosságot és 83,0–100% közötti aminosavszekvencia hasonlóságot mutatott, kivéve a μ B és σ C géneket, ahol nagyobb genetikai variabilitást figyeltek meg. Ezeknél a géneknél a nukleotid-azonosság 62,7–99,8% (μ B) és 52,9–100% (σ C), míg az aminosav-azonosság 71,3–99,7% (μ B) és 46,2–100% (σ C) közötti értékeket adott. (A kép Farkas és mtsai, 2016-os közleményéből származik).....16
4. **ábra.** Sematikus ábra a reovírusok sejtbe jutása és sejten belüli replikációjáról18
5. **ábra.** QIAGEN One-Step RT-PCR protokoll σ C génre. Gyártói utasítás.....33
6. **ábra.** A PCR termék szekvenciameghatározása BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosciences) alkalmazásával. Gyártói utasítás.35
7. **ábra.** Baromfi eredetű reovírusok σ C fehérje szekvenciáján alapuló filogenetikai törzsfája. A dolgozatban vizsgált vírustörzsek nevét vastagon szedtük. A rózsaszínnel jelölt törzsek pulyka eredetűek, a sárga színnel jelöltek csirke eredetűek, a szürke színnel jelöltek pedig fácán és fogoly eredetűek. A genotípusok klaszterbe sorolva és színkódokkal ellátva láthatóak Kant és mtsai klasszifikációja alapján (Kant és mtsai., 2003).39
8. **ábra.** Szekvencia hasonlóságok és evolúciós különbségek a 2-es klaszterbe tartozó TARV-ok között. A hegedű alakok a nukleotid azonosságok mértékét mutatják. A hegedű alakban látható vízszintes vonalak az átlagos szekvencia hasonlóságot mutatják a 2016-os magyar TARV-ok (pontosított vonal), az átlagos szekvenciahasonlóságot a 2016-os magyar és 2009 -es magyar TARV-ok között (pontosított-szagattott vonal), valamint az átlagos szekvencia hasonlóságot a 2016-os magyar és az Egyesült Államok-beli TARV-ok között (folytonos vonal). Az értékek százalékban kifejezve a bal oldali y-tengelyen olvashatók le (nukleotid azonoság %). A türkiz színű pontosított vonal az ábra alsó részén mutatja a becsült átlagos evolúciós távolságot a teljes vizsgált populációban.42

- 9. ábra.** Különböző ARV-k L-, és M-osztályú génjeinek nukleotid alapú filogenetikai génfája. A jelölések a gazdafaj specifikusságot jelölik; háromszög: pulyka, kör: csirke, négyzet: fogoly, fácán. Az egyes „bootstrap”-ek hossza a hozzá tartozó értékekkel a genetikai rokonságot vagy másképpen evolúciós távolságot reprezentálják.43
- 10. ábra.** Különböző ARV-k S-osztályú génjeinek nukleotid alapú filogenetikai génfája. A jelölések a gazdafaj specifikusságot jelölik; háromszög: pulyka, kör: házityúk, négyzet: fogoly, fácán. Az egyes „bootstrap”-ek hossza a hozzá tartozó értékekkel a genetikai rokonságot vagy másképpen evolúciós távolságot reprezentálják.45
- 11. ábra.** Magyarországon gyűjtött minták földrajzi eloszlása. A minták darabszáma vármegyénként az egyes körökben látható.46
- 12. ábra.** Az ARV-pozitív (RT-PCR-rel megerősítve) és ARV-negatív minták aránya a klinikai tünet függvényében.47
- 13. ábra.** A σC gén 768 bázispár hosszúságú nukleotid szekvenciájú részének filogenetikai fája csirke és pulyka eredetű törzsekkel. Rózsaszínnel jelölve a vizsgálatunkban elemzett néhány törzset. A különböző klasszifikációs sémák által meghatározott klasztereket különböző színekkel jelöltük (Ayalew, 2017; Lu, 2015; Kant, 2003; Palomino-Tapia 2018; Yamaguchi, 2022).51
- 14. ábra.** A vizsgált vírustörzsek σC kódoló génjének 768 nukleotid hosszúságú ORF szakaszának páros azonosságai. Az izolátumok neveinek színkódjai a genetikai klasztert mutatják: I.-es klaszter – piros; II.-es klaszter – kék; III.-as klaszter – sárga; IV.-es klaszter – zöld; V.-ös klaszter – rózsaszín.52
- 15. ábra.** Az általunk izolált ARV-k σC fehérjét kódoló génjének 768bp hosszúsági szakasza alapján készült nukleotid alapú filogenetikai fája. Azonos farmról származó izolátumokat azonos színnel jelöltük. Az egyes klasztereket a fa ágainak színezése jelzi (Kant, 2003). A filogenetikai fa a maximum likelihood módszer szerint készült. A 70 alatti bootstrap értéket nem tüntettük fel az ábrán. Az ábra forrása: Gál és mtsai, 2023; Animals 2023, 13, 2137. <https://doi.org/10.3390/ani13132137>53

15.2. Táblázatok

1. táblázat. A reovírus virionját alkotó főbb fehérjék és azok elhelyezkedése, valamint funkciói15
2. táblázat. A vizsgált vírustörzsek genomszekvenciájában megfigyelt pontmutációinak listája és a következményes aminosav eltérések (D=aszparaginsav, Y=tirozin, L=leucin, P=prolin, G=glicin, S=szerin, A=alanin, I=izoleucin)40

3. táblázat. Mintáink vírusizolálási eredményei a mintázott szerveknek megfelelően.....	48
4. táblázat. A vírusizolálás eredménye a minta származásának és állományszintű tünetek függvényében.....	49
5. táblázat A különböző egészségügyi státuszú, ARV-pozitív állományok átlagos életkora. .	50