

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

A sertés circovírusok evolúciója

PhD értekezés

dr. Lőrincz Márta

2014

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Tuboly Tamás, egyetemi tanár
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

.....
Dr. Kiss István, PhD
CEVA-Phylaxia ZRT.
témabizottság tagja

.....
Dr. Biksi Imre, docens
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Nagyállatklinika, Diagnosztikai Központ
témabizottság tagja

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

.....
dr. Lőrincz Márta

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK	2.
2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4.
3.	ÖSSZEFOGLALÁS	6.
4.	SUMMARY	8.
5.	BEVEZETÉS	10.
6.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12.
6.1.	A <i>Circoviridae</i> család	12.
6.1.1.	Gyrovirus nemzetség	12.
6.1.2.	Circovirus nemzetség	13.
6.1.3.	Cyclovirus nemzetség	15.
6.2.	Sertés circovírus	16.
6.2.1.	Egyes típusú sertés circovírus	16.
6.2.2.	Kettes típusú sertés circovírus	17.
6.3.	A circovírusok eredete	23.
6.3.1.	Circovírusokkal közeli rokonságban álló más vírusok	23.
6.3.2.	A circovírusok létrejöttével kapcsolatos elméletek	23.
6.4.	A kettes típusú sertés circovírus genetikai változékonysága	25.
6.4.1.	Felfedezés és előfordulás	25.
6.4.2.	Sertés circovírus 2 csoportosítása	26.
6.4.3.	A kettes típusú sertés circovírus helyzete Közép-Európában	29.
6.4.4.	A kettes típusú sertés circovírus helyzetének alakulása a vakcinázás hatására	31.
6.4.5.	Sertés circovírusok más állatfajokban	32.
6.5.	Sertés circovírus okozta kártételek	34.
6.5.1.	Sertés circovírussal összefüggésbe hozható kórképek	34.
6.5.2.	Sertés circovírus és az immunszuppresszió	37.
7.	ANYAG ÉS MÓDSZER	39.
7.1.	A vizsgálati minták származása	39.
7.1.1.	Közép-európai PCV felméréshez gyűjtött minták	39.
7.1.2.	Rágcsálók	39.
7.1.3.	Circovírus kimutatása más állatfajokból	41.
7.2.	Vírus nukleinsav kivonása szervmintákból	42.
7.2.1.	Mikrogyantás DNS kivonás	42.
7.2.2.	DNS kivonás Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit segítségével	43.
7.2.3.	DNS kivonás InnuPREP Virus DNA/RNA Kit segítségével	43.

7.2.4.	A kivont DNS-ként kapott minták	44.
7.3.	Vírus nukleinsav amplifikálás	44.
7.3.1	Konvencionális PCR	45.
7.3.2.	Valós idejű PCR	50.
7.3.3.	Fézszes PCR	51.
7.4.	A PCR termékek vizualizálása, szekvenálása	52.
7.5.	Klónozás	53.
7.6.	A szekvenciák elemzése	55.
7.7.	Immunfluoreszcenciás és immunhisztokémiai vizsgálat	56.
7.7.1.	Metszetek készítése	56.
7.7.2.	Indirekt immunfluoreszcenciás (iIF) teszt	57.
7.7.3.	Immunhisztokémiai (IHK) teszt	58.
8.	EREDMÉNYEK	59.
8.1.	PCV2 genetikai változásai	59.
8.1.1.	Közép-Európa	59.
8.1.2.	Erdélyből származó PCV vizsgálata	71.
8.2.	Sertés vírusok kapcsolata más állatfajokkal	73.
8.2.1.	Befogott rágcsálók	73.
8.2.1.3.	<i>IIF</i> és <i>IHK</i>	77.
8.2.2.	Egérkísérlet eredménye	77.
8.2.3.	Szarvasmarha vérsavó vizsgálati eredmények	77.
8.2.4.	Halak, hüllők, kétéltűek vizsgálati eredményei	77.
9.	MEGBESZÉLÉS	79.
9.1.	A PCV2 genetikai változásai	79.
9.2.	Lehetséges PCV2 ősök keresése	85.
10.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	95.
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96.
12.	IRODALOMJEGYZÉK	97.
13.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK	115.
13.1.	A dolgozat során felhasznált cikkek	115.
13.2.	A dolgozat anyagát közvetlenül nem képező cikkek	115.
13.3.	Előadások	116.
13.4.	Poszterek	117.
14.	FÜGGELÉK	119.

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A:	adenin
as:	aminosav
AGV:	avian gyrovirus (madár gyrovírus)
ÁDI:	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
ÁOTKI:	Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvostudományi Intézet
BaCV:	barbel circovirus (márna cicovírus)
BBTV:	banana bunchy top virus (banán csúkcsofrosodás vírus)
C:	citozin
CAV:	csirkék fertőző anémiájának vírusa
Cap:	kapszid
CfCV:	catfish circovirus (lesőharcsa circovírus)
DNS:	dezoxinukleinsav
dNTP:	dezoxinukleotid-trifoszfát
E. coli:	<i>Escherichia coli</i>
FITC:	fluoreszcein-izotiocianát
G:	guanin
GyV:	gyrovírus
HGyV:	humán gyrovírus
HIV:	humán immundeficiencia vírus
ICTV:	International Committee on Taxonomy of Viruses (Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság)
IHK:	immunhisztokémiai vizsgálat
iIF:	indirect immuno-fluorescence (indirekt immunfluoreszcens) vizsgálat
IR:	intergénikus szakasz
ISH:	<i>in situ</i> DNS hibridizáció
kb:	kilobázis (ezer bázis)
kDa:	kiloDalton (ezer Dalton)
LB:	Luria Broth
ML:	Maximum Likelihood analízis
mtsai.:	munkatársai
mRNS:	messenger (hírvivő) ribonukleinsav
NG13:	nigériai gyermek székletéből kimutatott vírus
NJ:	Neighbor-Joining analízis

NLS:	nuclear localisation signal (nukleáris lokalizációs szignál)
NS:	nem strukturális fehérje
nt:	nukleotid
ORF:	open reading frame (nyílt leolvasási keret)
Ori:	origin of replication (replikáció kiindulási pontja)
PASC:	pairwise sequence comparison (páronkénti szekvencia összehasonlítás)
PBS:	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)
PCR:	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PCV:	porcine circovirus (sertés circovírus)
PDNS:	porcine dermatitis nephropathy syndrome (sertések dermatitisz nefropátia tünetegyüttese)
PK-15:	porcine kidney cell line (sertés vese sejtenyészet)
PMWS:	postweaning multisystemic wasting syndrome (malacok circovírus okozta sorvadása)
PRRSV:	porcine reproductive and respiratory syndrome virus (sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómáját okozó vírus)
qPCR:	quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)
RCA:	rolling circle amplification (gördülő-kör alapú amplifikáció)
RCR:	rolling circle replication (gördülő-kör alapú replikáció)
Rep:	replikáz
ssDNS:	egyszálú dezoxiribonukleinsav
SIV:	swine influenza virus (sertések influenza vírusa)
STC:	swine testicular cell (sertés here sejt)
sz.:	számú
T:	timin
TCID ₅₀ :	Tissue Culture Infective Dose 50 (szövettenyészet 50 %-át fertőző dózis)
TN:	Tamura Analízis
TTV:	Torque Teno vírus
VP:	vírus fehérje

3. ÖSSZEFOGLALÁS

A circovírusok kisméretű (17—26 nm), ikozahedrális vírusok, amelyek egyszálú (~2 kilobázis nagyságú) DNS genommal rendelkeznek. A *Circoviridae* víruscsalád két elfogadott nemzetsége a *Circovirus* és a *Gyrovirus* genus, míg egy harmadik nemzetség, a *Cyclovirus*, elfogadás előtt áll. A *Circovirus* genusba a madarak vírusai mellett a sertés circovírusok tartoznak. Utóbbiaknak két faja ismeretes: a korábban apatogénnek gondolt egyes típusú sertés circovírus (PCV1), és az elmúlt évtizedekben súlyos gazdasági károkat okozó PCV2. Ez utóbbit először Kanadában írták le, és mára már az egész világon elterjedt. A PCV2 főként a választási kor környékén okoz jelentős károkat, és jelenlétét számos betegség hátterében igazolták.

A PCV2-nek három (más kutatások alapján öt) genotípusa ismeretes. A jelenlegi nevezéktan szerint a PCV2a, PCV2b és PCV2c genotípus elfogadott. Az észak-amerikai kontinensen elsőként kimutatott vírus a PCV2a genotípusba tartozott, majd 2004-ben megjelent a PCV2b, amit rövidebb idővel az első leírása után mind nagyobb számban találtak meg világszerte. Az Európában azonosított első sertés circovírus genomszekvencia PCV2b volt, de ugyanitt fellelhető a PCV2a genotípus is. PCV2c genotípusú vírust eddig mindössze egyszer, Dániában írták le. A már ismert genotípusok közül ma világszerte a PCV2b tekinthető dominánsnak. A PCV2 genomok mutációinak vizsgálata során felmerül a gyanú, hogy a vírusra a genetikai beszűkülés jellemző, és a PCV2b genetikailag homogénebb, mint a PCV2a genotípus. Emellett egyes epidemiológiai vizsgálatok alapján a PCV2b genotípus tűnik patogénebbnek. Más elképzelések szerint viszont a vírusfertőzés, a folyamatosan változó sertéstartás, valamint az új sertésfajok megjelenése együttesen felelős a világszerte megfigyelhető súlyosbodó klinikai tünetekért. A vírus patogenitásának változékonyságára számos elmélet született, amelyek szerint nem kizárható, hogy a kilencvenes évektől megfigyelhető globális PCV2 terjedésért egy mindeddig ismeretlen ágens a felelős, más elképzelések szerint viszont oka lehet az is, hogy a vírus adaptációja a sertéshez még nem egy lezárult folyamat. A vírus genetikai sokszínűsége az elmúlt évek adatai alapján szűkülni látszik, ezért elképzelhető, hogy az adaptáció a befejező szakaszához érkezett. Az egyre elterjedtebbé vált vakcinázás azonban megváltoztathatja ezt a folyamatot, és új menekülési irány felé terelheti a vírus evolúcióját. A feltevések tisztázása céljából felmérést készítettünk Közép-Európából származó sertésminták körében. A korábban megjósolt genetikai beszűkülés ezen a területen megfigyelhető, azonban munkánk során a vakcinás védelmet áttörni látszó, a PCV2b egyik alcsoportjához tartozó olyan vírust is kimutattunk, amelynek terjedése világszerte megfigyelhető.

A PCV-ok evolúciója eddigi ismereteink szerint rendkívül összetett folyamat. A velük egy családba tartozó *Gyrovirus* genusnál közelebbi rokonuknak tűnnek a növényeket megfertőző *Nanoviridae* család egyes tagjai. Evolúciós vizsgálatok szerint ezekkel egy őstől származnak, de feltételezik, hogy a PCV-ok calicivírusoktól is kaptak genetikai anyagot. Arra vonatkozóan vannak elméletek, hogy hogyan került a vírus emlősökbe, de arról, hogy a sertések és madarak között mi lehetett az evolúciós út, nincsenek elfogadható ismereteink. Feltételezésünk szerint a lehetséges ősi vírus gazdafajaként szóba jöhetnek a rágcsálók. Azonban a természetes élőhelyekről befogott rágcsálók vizsgálata során a sertés circovírusok feltételezhető őseit nem sikerült megtalálnunk. Ugyanakkor a sertéstelepek környékéről befogott állatokból PCV2-t mutattunk ki, ami a korábbi vizsgálatokkal együtt a rágcsálók lehetséges rezervoár szerepére utal. Ezekhez a megfigyelésekhez kapcsolódóan egerekben vizsgáltuk a vírus szaporodását, terjesztését, és azt, hogy a terjedés közben milyen mértékű genetikai változáson mennek keresztül. Kísérleteink során a fertőzött egerek vírusmentes társaikat nem fertőzték meg, így a vírus változékonyságára vonatkozóan ezekben az állatokban nem jutottunk értékelhető eredményre. Mivel a közös genetikai őstől a rágcsálók vizsgálatával nem lehetett közelebb jutni, halakat, kételtűeket és hüllőket vizsgáltunk circovírusok jelenlétére. A feltételezett genetikai őst helyett azonban két halfajból két-két circovírust sikerült kimutatnunk és genetikailag jellemeznünk. További felmérő vizsgálatok során szarvasmarha vérsavóból sikerült PCV2 DNS-t kimutatni. Miután a teljes genom szekvencia analízisével két, az irodalomban korábban már sertésekből leírt circovírust is találtunk, megállapítottuk, hogy szarvasmarhákban a vírus valóban képes reprodukcióra.

4. SUMMARY

Circoviruses are small (17—26 nm) viruses with icosahedral symmetry and single stranded DNA genomes of ~2 kilobases in length. The family *Circoviridae* consists of the genera *Circovirus*, *Gyrovirus*, and a tentative *Cyclovirus* genus. The genus *Circovirus* contains avian and porcine circoviruses. Two types of porcine circoviruses are recognized to date: porcine circovirus type 1 (PCV1), which has been considered apathogenic, and porcine circovirus type 2 (PCV2), which has been responsible for significant economic losses in the past decades. PCV2, now present worldwide, was first described in Canada. This virus causes severe damages mostly in weaning piglets, and its presence was shown in the background of multiple diseases.

PCV2 has three (or according to some authors, five) known genotypes. Based on current nomenclature, PCV2a, PCV2b and PCV2c genotypes are recognized. In North-America, the very first described virus was of genotype PCV2a. In 2004, viruses of genotype PCV2b appeared which were shortly detected in increasing numbers worldwide. The first PCV2 genome sequence identified in Europe belonged to genotype PCV2b, but PCV2a could also be found. Today, of all described genotypes, PCV2b is considered predominant all over the world. Assessments of mutation rates in PCV2 genomes suggest that the genetic diversity of the virus is decreasing, since genotype PCV2b is more homogenic, than genotype PCV2a. Furthermore, according to epidemiologic examinations, PCV2b is apparently more pathogenic. Other theories suggest that together with the virus infection the constantly changing methods of pig farming and introduction of new breeds are responsible for the more severe clinical disease observed worldwide. A hypothesis to explain the variability in PCV2 pathogenicity is that the global spreading of the virus, starting in the nineties, was facilitated by a yet unknown agent. Others speculate that the high variability is due to the fact that the adaptation of the virus to the pig, as a recent host species, is at an early stage. The apparent decrease in genetic diversity in the latter years could indicate that this adaptation had advanced to a level where high genetic variability is no longer needed. However, recent introduction of vaccinations could possibly interfere with this process, directing PCV2 evolution in new escape directions. To clarify these speculations, we performed a genetic evaluation of PCV2 present in Central Europe. The suggested decrease in genetic diversity could be observed in this region, and as a result of our work, we also found viruses in a cluster of PCV2b, which seem to escape vaccine protection and already started to spread worldwide.

According to current knowledge, PCV evolution is a very complicated process. Some members of the plant pathogen virus family *Nanoviridae* are more closely related to

circoviruses than their fellow family members in the genus *Gyrovirus*. Evolutionary studies suggest that nano- and circoviruses are originating from a common ancestor, and it is also possible that PCVs acquired genetic material from caliciviruses. There are multiple hypotheses concerning the ways of virus transmission from plants to mammals, but there are no acceptable suggestions regarding the evolutionary pathways between birds and swine. Our theory was that rodents could play a role as hosts of a common ancestor, but we couldn't detect any such virus in rodents collected from their natural habitats. However, we were able to find PCV2 in rodents caught in areas surrounding pig farms, suggesting that these animals might act as reservoirs for the virus. In connection to these observations, we assessed virus multiplication and transmission in mice, and also genetic changes occurring during these processes. In our experiments, infected mice were not able to infect their naive cagemates, thus we could not evaluate genetic variability. Since the common ancestor virus could not be identified by examinations of rodents, we started to investigate fish, amphibian and reptile species for circoviruses. Instead of the supposed ancestor virus, we found and described two new circoviruses in two fishes. In additional research, we detected circovirus DNA in bovine sera. After sequence analysis, they turned out to be PCV2 strains already described in pigs, and we determined that PCV2 is able to replicate in cattle.

5. BEVEZETÉS

A kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2, PCV2) által kiváltott megbetegedések az elmúlt húsz évben súlyos gazdasági károkat okoztak a nagyüzemi sertéstelepeken. Ezek közül a betegségek közül a választott malacok circovírus okozta sorvadása a legjelentősebb, de a vírust több más tünetegyüttes háttérében is kimutatták. A PCV2-t elsőként Kanadában azonosították (Harding és Clark, 1996) és a vírus ezt követően gyorsan elterjedt, mára az egész világon jelen van.

A vírus a dezoxiribonukleinsav (DNS) tartalmú vírusoktól nem megszokott, igen magas mutációs rátával rendelkezik, ami a genetikai sokszínűségében mutatkozik meg. Egy igen heterogén vírusfajról van szó, amely az utóbbi hét-nyolc évben a kezdetben jellemző nagyfokú változékonyság után egyre inkább a genetikai beszűkülés jeleit mutatja. Ez a jelenség arra enged következtetni, hogy a PCV az új fajhoz, vagyis a sertéshez történő adaptációjának befejezéséhez közeledik. Ezt a természetes folyamatot azonban a néhány éve indult vakcinázások megváltoztathatják, és új menekülési irányba terelhetik a PCV2 evolúcióját. A vírus egyik rezervoár fajának tekinthető vaddisznó fertőzöttsége is befolyásolhatja ezt, főként olyan helyeken, ahol a nagyüzemi sertéstartás nem a szigorú szabályok betartásával működik (Turcitu és mtsai., 2011), azaz közvetlen vagy közvetett járványtani kapcsolat alakulhat ki a házi és a vadon élő sertések között.

A circovírusokat a növényi nanovírusokkal közös őstől származtatják (Meehan és mtsai., 1997; Gibbs és Weiller, 1999), de ismert, hogy egy olyan fehérje szakaszt is hordoznak, ami az állati eredetű calicivírusok egyik fehérje részletével mutat erős homológiát. Erre alapozva azt feltételezik, hogy az utóbbi vírusok is szerepet kaphattak a circovírusok létrejöttében (Gibbs és Weiller, 1999). Annak magyarázatára, hogy hogyan került a vírus a növényekből az állatokba, illetve a calicivírus szakasz hogyan épülhetett be a genomba, számos elmélet létezik. Azokra a kérdésekre azonban, hogy az állatokban hogyan változott a circovírus, hogyan jutott el a sertésbe, —ami hosszú ideig az egyetlen circovírussal rendelkező nem madárfajként volt ismeretes— és mely állatfaj lehetett a híd a madarak és sertések között, a válasz még ismeretlen. Munkánk célja az volt, hogy válaszokat találjunk a sertés circovírus evolúciójával kapcsolatos egyes alapvető kérdésekre.

A feltett kérdéseinket három nagy egységbe foglalva mutatom be:

- *Közép-Európából származó sertésminták circovírusainak genetikai vizsgálata*

A térségből gyűjtött circovírusok genetikai vizsgálata és összehasonlítása az ugyanebből a földrajzi régióból származó, 2007 előtti szekvenciákkal, illetve a világ más térségeiben megtalálható vírusokkal. A vizsgálat célja az, hogy megállapítsuk, a vírus genetikai

állománya milyen változásokat mutat, valóban genetikai beszűkülés tapasztalható-e, és a bevezetett vakcinázások milyen hatással vannak a vírus változékonyságára.

- *Rágcsálók szerepe a circovírusok fenntartásában és evolúciójában*

a) Természetes élőhelyekről befogott rágcsálók vizsgálata circovírus kimutatása céljából. A sertéstelepekről gyűjtött egerek és patkányok vizsgálatától azt vártuk, hogy bennük sertés circovírust sikerül kimutatni, illetve találunk a rágcsálókra jellemző „saját” circovírust, ami átmenetet képez a PCV-ok irányába. A feltételezett ősz keresése miatt vizsgáltunk olyan rágcsálókat is, amelyek sertésektől független helyről származtak.

b) Laboratóriumi kísérlet egerekkel a vírus terjedésére és változására nézve. A kísérletek során az egerekben a vírus megtelepedése mellett a vírusszaporodást és a sertésektől független vírusterjedés lehetőségét vizsgáltuk, azzal a szándékkal, hogy az állatról—állatra terjedő vírusokban esetleg fellépő genetikai változásokat is mérjük.

- *Circovírusok kimutatása eddig nem vizsgált fajokban*

A közös, akár hipotetikus genetikai ősz megtalálása fontos célkitűzésünk volt, ehhez más fajokban esetlegesen megtalálható circovírusok teljes genom-szekvenciáját igyekeztünk meghatározni. Tekintettel arra, hogy korábban már írtak le circovírusszerű szekvenciákat vízmintákból és arra, hogy a sertéstakarmányok halakból származó fehérjekiegészítőket tartalmazhatnak, kézenfekvő volt, hogy halakat, kételtűeket és hüllőket vizsgáljunk.

6. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

6.1. A *Circoviridae* család

Jelen ismereteink szerint az állati eredetű vírusok között a legkisebbek közé tartoznak (17—26 nm) a *Circoviridae* család tagjai. A víruscsalád elnevezése az egyszálú dezoxiribonukleinsav (ssDNS) genom körkörös mivoltára utal. Jelenleg két, a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV; www.ictvdb.org/) által elfogadott és egy elfogadásra váró, harmadik genust foglal magába a család.

A *Circovirus* genusba számos madárfajból (papagáj, kanári, galamb, sirály, holló, hattyú, lúd, kacs, pinty, stb.) és sertésből kimutatott vírusok tartoznak. Ezek a circovírusok három nagy csoportba sorolhatóak, amelyek filogenetikailag is elkülönülnek: a sertés vírusai (porcine circovirus 1 és 2, PCV1 és PCV2), a lúdalakúak vírusai és az egyéb madárvírusok. A másik, *Gyrovirus* nembe a csirkék fertőző anémiájának vírusát (chicken anaemia virus, CAV) sorolják. A molekuláris biológia fejlődésének eredményeképpen számos olyan circovírusszerű szekvenciát fedeztek fel, amelyek a genetikai jellemzőik alapján tagjai lehetnek a *Circoviridae* családnak. Így kialakult egy harmadik nemzetség is, ami a *Cyclovirus* genus (LiL és mtsai., 2010a) előzetes elnevezést kapta, de a név hivatalos (ICTV) elfogadása még nem történt meg.

6.1.1. Gyrovirus nemzetség

A *Gyrovirus* nem legismertebb és sokáig egyedülnek tartott képviselője a CAV. A virionja 19—26 nm méretű és negatív irányú, körkörös (2,3 kilobázis —kb—) ssDNS genomot tartalmaz. A genom organizációjában, a nyílt leolvasási keretek (open reading frame, ORF) helyeződésében és a replikáció mechanizmusában eltér a *Circoviridae* család többi tagjától és az *Anelloviridae* család tagjaihoz hasonlít jobban (Meehan és mtsai., 1997). Az *Anelloviridae* családot a circovírusok közé sorolták néhányan, azonban jelenleg a gyrovírusok áthelyezését fontolgatják (Biagini, 2012; Rosario és mtsai., 2012b).

A genom három fő fehérjét kódol, közülük a vírus protein 1 (VP1) jelű struktúrfehérje alkotja a kapszidot. Ez a fehérje kb. 50 kiloDalton (kDa) tömegű. A VP1 karboxi-terminális részén a megsokszorozódással kapcsolatos aminosavak (as) helyezkednek el, így ez a fehérje feltehetően funkcionális feladatokat is ellát. Hordoz továbbá egy rövid hipervariábilis régiót is (Renshaw és mtsai., 1996), ami feltételezhetően a patogenitással hozható összefüggésbe (Simionatto és mtsai., 2006). A VP2 fehérje 24 kDa tömegű, foszfatáz aktivitással bír. Ez a fehérje szintén a vírusreplikációban vesz részt. A VP3 fehérjét

apoptinnak is nevezik, hiszen a fertőzött csirkesejtek (és humán daganatos sejtvonal sejteinek) apoptózisáért felelős, bár ebben részt vesz a VP2 is. A vírus replikációja az *Anelloviridae* családba tartozó Torque teno víruséra (TTV) hasonlít (Bendinelli és mtsai., 2001), a vírus örökítőanyaga egy közelítőleg 2 kb nagyságú hírvivő ribonukleinsavvá (mRNS) íródik át, melyen a 3 fehérje egymással átfedésben található (Noteborn és mtsai., 1991). Azonban a CAV esetében olyan mRNS-ek is átíródnak, amelyek csak egy fehérjét kódolnak.

A CAV a fiatal állatokat betegíti meg, ami 2 hetes korig a fogékony állományokban magas mortalitással jár. A vírus főképp a csontvelő hemopoetikus sejteit, illetve a csecsemőmirigy T-össejteit támadja meg. Vérfogyottság mellett thrombocytopenia, intramuscularis vérzések jelentkeznek. A CAV képes a daganatos sejtek apoptózisát foszforilálással indukálni, míg az egészséges sejtekét nem (Los és mtsai., 2009; Bullenkamp és mtsai., 2012). Emberi székletből is kimutattak CAV-ot (genbanki azonosító: JQ690762).

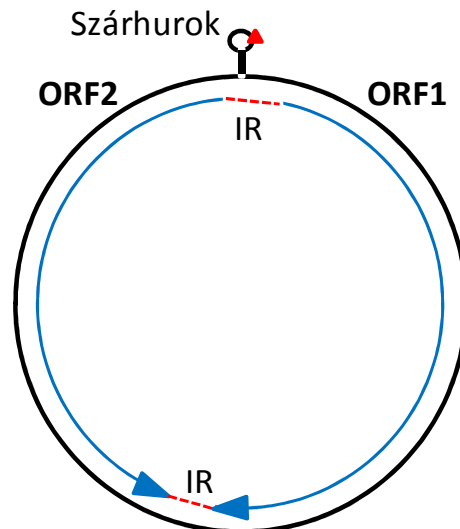
A közelmúltban újabb gyrovírusokat (GyV) írtak le. Az első humán gyrovírust (HGyV) egészséges felnőttek bőréről mutatták ki (Sauvage és mtsai., 2011). Olaszországban azonban beteg emberek vérében találták meg ezt a vírust (3 vesetranszplantált és 1 humán immundeficiencia vírus —HIV— pozitív páciens esetében (Maggi és mtsai., 2012). Egy harmadik vizsgálat során 5 hasonló vírust mutattak ki emberi székletminták metagenomikai vizsgálata során. Az öt vírus közül csak egy egyezett meg a korábban leírttal, kettő a CAV-ra hasonlított jobban, másik kettőt pedig GyV3 néven, új vírusként írták le (Phan és mtsai., 2012). Később egy újabb, GyV4-et is leírtak humán és csirke eredetű mintákból (Chu és mtsai., 2012). A CAV és HGyV között a genetikai hasonlóság alacsony fokú (Sauvage és mtsai., 2011).

Az emberekből kimutatott új vírusok mellett Brazíliában is azonosítottak egy vírust csirke vérsavómintában, ezt madár gyrovírus 2-nek (avian gyrovirus 2, AGV2) nevezték el (Rijsewijk és mtsai., 2011). Ez a vírus genetikailag a HGyV3-hoz hasonlít. Azóta kimutatták Brazílián kívül Hollandiából származó baromfiban is (dos Santos és mtsai., 2012). A VP2 és VP3 fehérjék vizsgálata jelentős vírustörzsek közötti eltéréseket mutatott, aminek hátterében feltehetően a nagy földrajzi távolság áll és gyaníthatóan összefügg a virulenciabeli különbségekkel is.

6.1.2. *Circovirus* nemzetség

A genushoz olyan vírusok tartoznak, melyek körkörös genomján a két fő ORF ellentétes irányú (1. ábra). A két gén között két intergénikus szakasz (IR) van, amelyek közül a hosszabb a két ORF 5' végénél található, és egy szárhurok (stem-loop) struktúrát alkot, ami a vírus replikációjában kulcsfontosságú. Ez a rész igen konzervatív, a szár a 8. és a 20. nukleotid (nt) között található (általában 10—11 nt méretű). Ezt a hurok rész követi, amely

konzervatív, 9 nt-ből álló szakasz és hajtúszerűen visszahajlik. A szakaszon belül, ami általában TAGTATTAC, ahol a T: timint, A: adenint, G: guanint, C: citozint jelöl, az első és a harmadik nt változhat. A hurkot a másik szár rész követi, amely a hurok előtti szár résszel komplementer, így kettős hélixet képesek kialakítani.



1. Ábra. Circovírus genom jellegzetességei. ORF: nyílt leolvasási keret, IR: intergénikus szakasz, a ▲ az első nt helyét jelöli.

Madarakban széles körben fordulnak elő circovírusok. Ezeket két csoportba lehet sorolni: az Anseriformes csoportba tartozó circovírusok a lúdalakúakban találhatók meg, és sajátosságuk, hogy a szárhurok szakaszuk hurok részének harmadik nukleotidja mindig T (ellentétben a többi madár circovírusával, amelyeknél ebben a pozícióban G foglal helyet), illetve, hogy a szár rész 10 nt-ből áll. Ebbe a csoportba tartoznak a lúd (*Anser*) circovírusai (Todd és mtsai., 2001; Chen és mtsai., 2003; Yu-X és mtsai., 2007), a bütykös hattyúk (*Cygnus olor*) circovírusa (Halami és mtsai., 2008), és több, kacsaféléből leírt vírus, pl. a házi kacsából (*Anas platyrhynchos domestica*, Zhang és mtsai., 2009), a pézsmakacsából (*Cairina moschata*, Hattermann és mtsai., 2003), és a mulard kacsából (Soike és mtsai., 2004).

A többi madár circovírusai egy csoportot alkotnak. Az ide tartozó vírusokat galamb (*Columbidae*) és házityúk (*Gallus gallus domesticus*, Li-L és mtsai., 2011) mellett papagájokból (*Psittacidae*, Bassami és mtsai., 1998; Niagro és mtsai., 1998), pintyfélékből (*Fringillidae*, Todd és mtsai., 2007; Shivaprasad és mtsai., 2004), seregélyből (*Sturnus vulgaris*, Johné és mtsai., 2006), kanáriból (*Serinus*, Phenix és mtsai., 2001), sirályból (*Larus*, Smyth és mtsai., 2006) és hollóból (*Corvus corax*, Stewart és mtsai., 2006) is kimutatták. A madár circovírusok a legsúlyosabb gazdasági károkat a galamb állományokban okozzák, különösen a fiatal korosztálynál, ahol felelősek az ún. fiatal galamb betegség szindróma kialakulásáért. A betegség jelentős veszteségeket okoz a

versenyeztetés céljából tartott postagalambok esetében. Az állatok teljesítménye romlik, a madarak a másodlagos fertőzésekre fogékonyabbá válnak, étvágytalanok lesznek, lesoványodnak, légzőszervi tünetek, illetve hasmenés jelentkezhetnek bennük (Cságola és mtsai., 2012). A papagájok esetében a circovírus fertőzés látványos, hiszen különféle tollasodási zavar és csőrelváltozások mutatkoznak. Hasonló betegségek a kakaduk körében is előfordulhatnak (Ha és mtsai., 2007; Parrish, 2011). Tollasodási zavarok a többi madár circovírus fertőzés esetében is jelentkezhetnek az immunszuppresszió mellett (Todd, 2004). Mint a circovírusoknál általában, kórszövettani vizsgálattal a nyirokszervekben limfocita depléciót lehet megfigyelni. A vírus a tolltüszők, a csőr és a karmok epithel sejtjeiben is szaporodik (Parrish, 2011).

Szúnyogokból írtak le olyan további circovírusokat, amelyek leginkább a madarak circovírusaihoz hasonlítanak (Ng és mtsai., 2011).

Tisztított víz, tengervíz és szennyvíz mintákban olyan, körkörös ssDNS-sel rendelkező vírusokat mutattak ki, amelyek a *Circoviridae* családba tartoznak, nagyon hasonlítanak a *Rep*-család (a circovírusok replikáz génjéhez hasonló génnel rendelkezők családja) tagjaihoz, és a circovírusokban is fellelhető RNS-helikáz elemet is tartalmazzák (Rosario és mtsai., 2009; Blinkova és mtsai., 2009; Djinkeng és mtsai., 2009). A vírusok e csoportja a circovírusokéhoz hasonló genomorganizációt mutat, és genetikailag is rokon a circovírusokkal.

6.1.3. Cyclovirus nemzetség

A *Cyclovirus* genusba sorolható vírusok genomja rövidebb, mint a *Circovirus*oké, átlagosan 1770 nt körüli (Li-L és mtsai., 2010a). Akárcsak a circovírusok, ezek is 2 fő ORF-et tartalmaznak, az ORF1 a replikációért felelős fehérjét kódolja pozitív irányban, míg a kapszidfehérje kódolásáért felelős ORF2 negatív irányultságú. A 3' végek között az IR lényegesen rövidebb, mint a circovírusok esetében, előfordul, hogy teljesen hiányzik. Az 5' végek között azonban hosszabb, mint a circovírusoknál. A szárhurok hurok része a circovírusokéhoz hasonlóan 9 nt hosszúságú, állandó, TAATACTAT szekvenciával. A *Circovirus* genus tagjainál megtalálható, a replikáció szempontjából fontos konzervatív fehérje-motívumok jelen vannak a cyclovírusokban is.

Először emberben találtak olyan cirkuláris ssDNS vírusokat, amelyek a PCV-re hasonlítottak leginkább (Victoria és mtsai., 2009). Ezt követően kezdték keresni a cyclovírusokat (Li-L és mtsai., 2010a; 2011). A vizsgálatok során kimutatták emberi székletben, csimpánz bélsárban, denevérekben, illetve emberi fogyasztásra szánt húsokban (csirke, szarvasmarha, kecske) és húskészítményekben (csirke, szarvasmarha, kecske, teve, sertés és juh), valamint szúnyogokban (Ng és mtsai., 2011), szitakötőkben (Rosario és mtsai., 2011; 2012a) és csótányokban (Padilla-Rodriguez és mtsai., 2013).

Az első megismert cyclovírus szekvenciák emberekből illetve csimpánzból, valamint húsból, húskészítményekből származtak (Li-L és mtsai., 2010a). Ezek alapján felmerülhet a gyanú, hogy zoonotikus vírusokról van szó, azonban egyezést nem találtak az emberekből és az étkezési célokra szánt állati termékekből kimutatott vírusok között. A sertésből származó mintákból PCV2 és PCV1 mellett néhány cyclovírus kimutatására is sor került (Li-L és mtsai., 2011).

A denevérek az új vírusok keresésének kedvelt alanyai, hiszen korábban keveset vizsgált állatfajokról van szó, miközben egyre több, eddig ismeretlen kórokozót azonosítanak bennük. A denevérekben először guanóban mutatták ki az új vírusokat (Li-L és mtsai., 2010b), majd több denevérfajból is leírásra kerültek tipikus cyclovírusok (Li-L és mtsai., 2011; Ge és mtsai., 2011; Wu és mtsai., 2012). Három esetben nem a „klasszikus” (Li-L és mtsai., 2010a; 2011) genomszerveződésű cyclovírust találtak.

A víruscsaládban ez az első genus, amely nem-gerincesekből származó vírust is tartalmaz. Ezek a vírusok számos, a korábbiakhoz képest eltérő jellegzetességet hordoznak. Szitakötőkben leírtak egy olyan vírust, amelynek a replikációs fehérjét kódoló génje (rolling circle replication initiator, *Rep*) a *Circoviridae* családban egyedülálló módon egy 147 nt hosszú intront hordoz (Rosario és mtsai., 2012a). Egy csótány eredetű vírussal a *Rep*-génből kettő található a komplementer szálon, míg a kapszidfehérjét kódoló gén (*Cap*) a pozitív irányban található, akárcsak a növényeket fertőző geminivírusok esetében (Padilla-Rodriguez és mtsai., 2013).

6.2. Sertés circovírus

6.2.1. Egyes típusú sertés circovírus

1974-ben PK-15 sejtenyészetből (pig kidney cell line, sertés vese sejtenyészet) mutatták ki az első circovírust, a PCV1-et (Tischer és mtsai., 1974; 1982). Később a vírust sertésállományokban is detektálták és vírus specifikus ellenanyagokat is kimutattak (Tischer és mtsai., 1986; 1995b; Dulac és Afshar, 1989; Edwards és Sands, 1994; Labarque és mtsai., 2000; Magar és mtsai., 2000). A PCV1 a szövetenyésztesnél általánosan elterjedt, sertés eredetű, pepszint tartalmazó készítményekben (Fenaux és mtsai., 2004), továbbá fertőzött szövetek és enzimek felhasználásával készített vakcinákban (Quintana és mtsai., 2006; Victoria és mtsai., 2010; Baylis és mtsai., 2011; Ma és mtsai., 2011; Gilliland és mtsai., 2012) is fellelhető. A vírus ssDNS genomja 1758-1760 bázis hosszú. Filogenetikailag 2 csoportba osztható (Cságola és mtsai., 2008b).

A PCV1 természetes körülmények között is előfordul sertésekben (Ellis és mtsai., 2000; Calsamiglia és mtsai., 2002; Magar és mtsai., 2000; Labarque és mtsai., 2000). Ez, arra vonatkozóan, hogy a vírus képes-e önálló terjedésre a sertésekben, nem informatív,

hiszen az élővírusos vakcinák gyártása során fertőzött sejtenyészetből (Quintana és mtsai., 2006) a PCV1 a vakcinába, majd a vakcinázás során az állatokba kerülhetett. Tischer és mtsai. (1986; 1995b) azonban vaddisznókban is kimutattak PCV1 specifikus ellenanyagokat, majd hazai kutatók magát a PCV1-et is azonosították (Cságola és mtsai., 2008b). Ez alapján a vírusról beigazolódott, hogy képes állatról állatra terjedni, hiszen a vaddisznók fertőzöttsége semmiképpen nem tekinthető vakcina eredetűnek. Sokáig a vírus megbetegítőképességével kapcsolatosan úgy vélekedtek, hogy apatogén (Tischer és mtsai., 1986, Allan és mtsai., 1995, Puvanendiran és mtsai., 2011), de a legújabb vizsgálatok alapján a PCV1 a sertés magzatokat károsíthatja (Saha és mtsai., 2011).

Az utóbbi években a vírus a vakcina kontaminációk miatt került a figyelem középpontjába, ugyanis mind sertés, mind humán oltóanyagokból kimutatták (Quintana és mtsai., 2006; Victoria és mtsai., 2010; Baylis és mtsai., 2011; Ma és mtsai., 2011; Gilliland és mtsai., 2012). A legnagyobb hírverést akkor kapta, amikor kisgyermekeknek szánt orális rotavírus vakcinában azonosították (Baylis és mtsai., 2011; Gilliland és mtsai., 2012). A xenotranszplantáció lehetősége a zoonotikus kórokozók lehetséges körét szélesíti, több olyan sertés-patogén mikroorganizmus (köztük a circovírus) jöhet szóba ebből a szempontból, aminek embert megbetegítő képességéről eddig nincs adatunk.

6.2.2. Kettes típusú sertés circovírus

A *Circovirus* genuson belül a legnagyobb gazdasági jelentőséggel a PCV2 bír. A galambok circovírus fertőzéseinek is lehetnek ugyan súlyos gazdasági vonzatai, de közel sem olyan mértékben, mint a kettes típusú sertés circovírus előfordulásának. A dolgozat elsősorban ezzel a vírussal foglalkozik, így a PCV2 tulajdonságait részletesebben ismertetem.

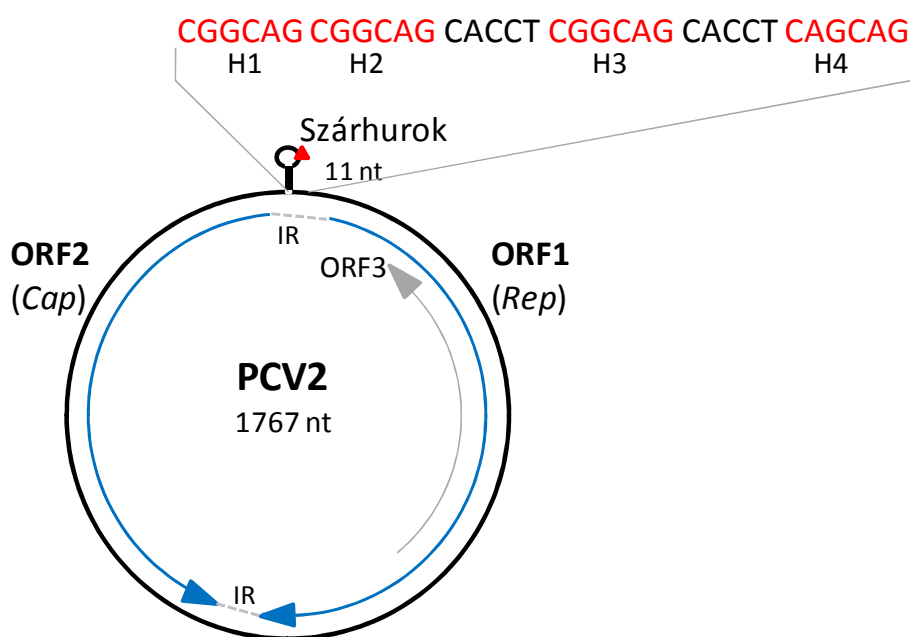
6.2.2.1. A virion szerkezete, ellenállóképessége

A PCV2 17 nm átmérőjű, burok nélküli vírus. A kapszidja 12 pentamerből épül fel, és pentamerenként 5, összesen 60 fehérje alegységből áll (Crowther és mtsai., 2003).

A virion igen ellenálló, a 75 °C-os hőmérsékletet 15 perc alatt sem veszíti el fertőzőképességét, de 80 °C-on ennyi idő alatt inaktiválódik. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a sertéshús készítményekben is elveszíti fertőzőképességét (O'Dea és mtsai., 2008). Mivel a virion nem rendelkezik burokkal, a zsírolószerek hatástalanok, és a savas kémhatást is jól tűri (pH 3-ig, Allan és mtsai., 1994), azonban lúgokkal és oxidálószerekkel szemben kevésbé ellenállóak laboratóriumi körülmények között (Royer és mtsai., 2001).

6.2.2.2. Genomszerkezet

A *Circovirus* genus tagjainál a genomszerveződés ellentétes irányú ORF-eket tartalmaz, ezért az ambisense elnevezés használatos a szakirodalomban. A PCV2 1766—1768 nt hosszúságú genomja három ORF-et tartalmaz: egyet (ORF1) a pozitív szálon, míg kettőt (ORF2 és 3) a negatív szálon. A vírus genomszerveződését az 2. ábra mutatja be.



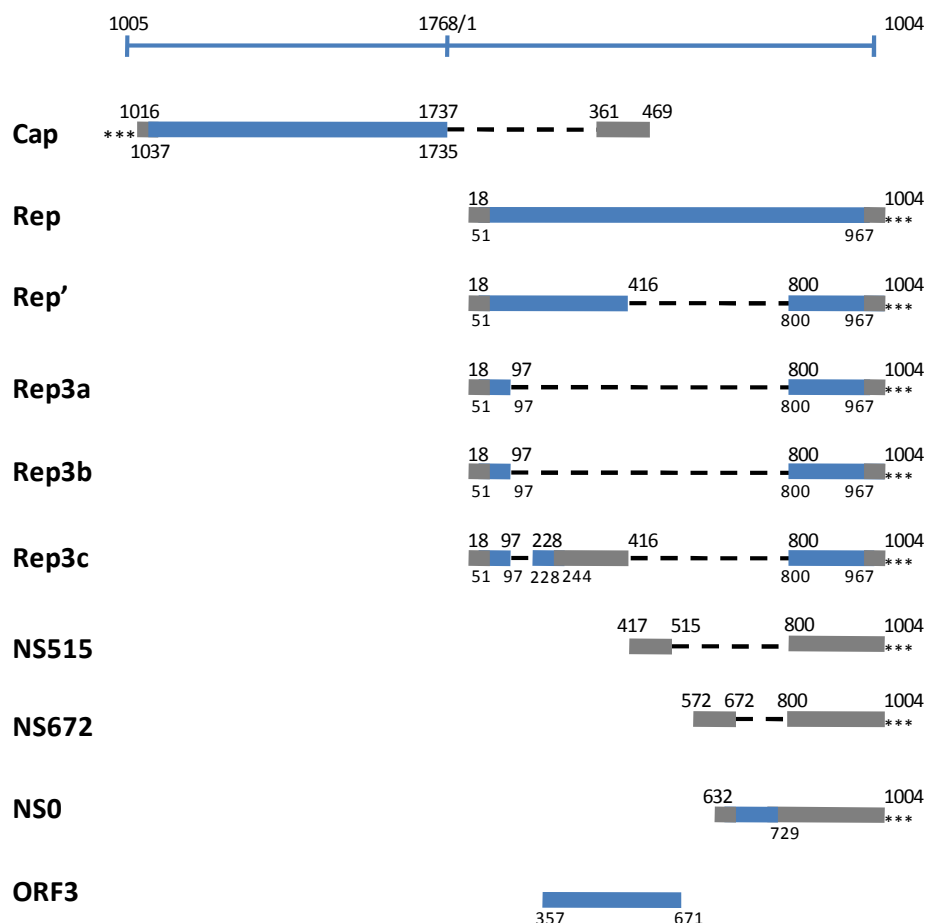
2. Ábra. PCV2 genomorganizáció. H1-H4 hexamerek (piros színnel), köztük a pentamerek. IR: intergénikus régió. A nyilak a 3 ORF irányát és megközelítő elhelyeződését jelölik. A ▲ az 1767. és az 1. nukleotid között a hurok felhasadási pontja.

Az ORF1 a replikációért felelős fehérjét kódolja, ezért *Rep*-génnek is nevezik. A mRNS az 51. és 995. nt közötti szakaszból íródik át (Cheung, 2003). Az ORF2 a *Cap*-gén, 1735—1034 nt között található és a kapszid fehérje kódolásáért felelős (Nawagitgul és mtsai., 2000). Az ORF3 a 671—357 nt között foglal helyet és olyan fehérjét kódol, amely *in vitro* tanulmányok szerint a sejtek apoptózisáért lehet felelős (Liu és mtsai., 2005).

Az ORF1 és ORF2 között két IR található, közülük a hosszabbik a két gén 5' végénél. Ez a szakasz a replikáció szempontjából fontos, ez ugyanis a replikáció kiindulási pontja (origin of replication, Ori), ahol a vírus sokszorozódásában fontos szerepet játszó szárhurok rész is megtalálható. A PCV2 esetében a hurok rész 10 nt hosszú (a szekvenciája: **TAAGTATTAC**, ahol a félkövér betűk a circovírusokra jellemző konzervatív 9 nt-ot jelölik). A szár rész a hurok mellett mindkét irányban egymással komplementer szekvenciákból áll, a hossza 11 nt pár. A szártól jobbra és balra is 5 nt-ből álló pentamerek és 6 nt-ből álló hexamerek tandem ismétlődéseit lehet találni. A szár rész szekvenciája pozitív irányban CAGCGCACTTC, ahol az utolsó C az első hexamer első eleme, míg az előtte elhelyezkedő

öt nt a pentamer harmadik ismétlődése (a negyedik helyen C helyett T van). Összesen négy hexamert találunk, amelyeknek a szekvenciája: CGGCAG, kivéve a negyedik hexamert, ahol CAGCAG. A második és harmadik, valamint a harmadik és negyedik hexamer között egy—egy pentamer (CACCT) található. Az utolsó hexamer után négy nt-dal kezdődik az ORF1. A szár szekvencia bal oldalán 14 nt foglal helyet az ORF2 start kodonjáig (Mankertz és mtsai., 2003).

A PCV2 esetében a replikáció során képződő mRNS-ek száma 10: az ORF3-, a Cap-, a Rep-, a Rep'-, a Rep3a-, Rep3b-, Rep3c-, az NS515- (NS: nem strukturális fehérjét kódoló), az NS672- és az NS0 RNS-ek (Cheung, 2012), míg a PCV1 esetében ez a szám 13 (Cheung, 2012). A replikációban a *Rep*-géneen kódolt Rep és Rep' fehérjéknek van szerepe. A Rep' és a Rep3 fehérjék splicing útján keletkeznek, esetükben az RNS-ek 5' és 3' végi szekvenciái változatlanok. A kisméretű NS fehérjékkel összefüggő RNS-ek 3' vége megegyezik a Rep RNS-ével, azonban más promotert használnak (az ORF1-en belül, Cheung, 2012). A vírusról átírt mRNS-eket és fehérjéket a 3. ábra foglalja össze.



3. Ábra. PCV2 genomszerkezete (Cheung, 2012). A felül látható egyenes vonal a PCV2a genom linearizált változatát reprezentálja, alatta a replikáció során képződő mRNS-ek láthatóak. A szalagok az átírt mRNS-eket (szalag feletti szám jelöli az mRNS kezdő és végpontját) mutatják, amelyeken belül a kékkel jelölt részek fordítódnak át fehérje szekvenciákra (a szalag alatt látható számok jelölik). A szaggatott vonalak a splicing során kieső részek. A *** a polyA farkat jelenti. A Cap a kapszidfehérjét, a Rep a replikációs fehérjéket, az NS pedig a nem-struktúr fehérjéket jelöli. Az ORF3 a feltehetően apoptotikus hatást kiváltó fehérjét kódolja.

6.2.2.3. A vírusfehérjék és szerepük

Az **ORF1**-ről átíródó mRNS-ek termékei közül a Rep és Rep' fehérjék vesznek részt a replikációban. A Rep az ORF1 teljes hosszáról másolódik és 314 as hosszúságú, 37,5 kDa tömegű. A DNS megsokszorozódásával összefüggő konzervatív as motívumokat hordozza, akárcsak más olyan prokarióták és eukarióták, amelyek a gördülő körös replikáció (rolling circle replication, RCR) mechanizmusával sokszorozódnak (Mankertz és mtsai., 1998). A konzervatív elemek azok, amelyeknek az RCR során fontos szerepük van, az I. FTLNN (az as-ak teljes neve az 1. mellékletben olvasható) sorrendű (funkciója nem ismeretes), a II. a hurok hasítása során nélkülözhetetlen fémionok —Mg²⁺— kötésében játszik szerepet, as sorrendje: TPHLQG, míg a III. a hurok felhasadásának bevezetéséért felelős és a hasadást

katalizálja (as sorrend: YCSK, Delwart és Li, 2012). Emellett a 163. as-tól a Rep-fehérje végéig tartó szakasz, a P hurok (phosphate-binding loop, P-loop), feltételezhetően helikáz aktivitással rendelkezik, amely Mg^{2+} jelenlétében az adenzin-trifoszfátot hidrolizálja (Cheung, 2012; Faurez és mtsai., 2009), azaz a dezoxinukleotid trifoszfát (dNTP) kötése a szerepe.

A Rep' fehérje 178 as hosszúságú (20,2 kDa tömegű), és az ORF1-ről átíródott RNS egy szakaszának deléciójával képződik (a 416—800 nt közötti rész esik ki). A Rep' N-terminális része megegyezik a Rep-pel, azaz tartalmazza a három, az Ori felszakadásért és DNS replikációért felelős régiót (a fentebb említett I., II., III. konzervatív elemeket), de a DNS replikációért felelős P hurkot nem (Cheung, 2012). Az RCR csak akkor történik meg, ha a Rep és a Rep' fehérjék komplexet alkotnak. A termelődő fehérjék sejtmagba jutásáért felelős jelet (nuclear localisation signal, NLS) az N-terminálison lévő bázikus aminosavak biztosítják (Finsterbusch és mtsai., 2005).

A Rep-fehérjének a replikáció szabályozásában is szerepe van, ugyanis negatív visszacsatolás révén a promoter aktivitását csökkenti (a II. konzervatív elem és a P hurok). A többi fehérjének ilyen szerepe nincs (Cheung, 2012). Az átírás szabályozásában a celluláris fehérjékkel való interakciója miatt mind a Rep C-terminálisa, mind a Rep' részt vesz (Faurez és mtsai., 2009).

A kapszid RNS az **ORF2**-ről íródik át a komplementer szálról. A fehérje 233 as-ból áll, a PCV2b esetében az 1734—1036 nt, míg a PCV2a esetében az 1735—1037 nt közötti szakaszból képződik úgy, hogy a mRNS a 469. bázistól indul és az 1016.-ig tart, de az 1737—361 nt közötti szakasz kivágódik (Cheung, 2012). A PCV1 és PCV2 között a hasonlóság az ORF2-t illetően 65 % (Morozov és mtsai., 1998).

A Cap fehérje N terminális vége tartalmazza az NLS-t, amit —akár a Rep-nél— a bázikus aminosavakban való gazdagság jellemez (Liu és mtsai., 2001). Ezen belül is, a kutatások alapján két szakasz kiemelkedően fontos a teljes ORF2 sejtmagba jutása során: 12—18 és 34—41 as, RHRPRSH és HRWRWRRK (aláhúzva a bázikus as-ak).

A PCV2 kapszidnak négy, immunológiai szempontból domináns szakasza van, beleértve a PCV1-gyel közös régiót is (Mahé és mtsai., 2000) és legalább öt átfedő konformációs epitópját. A két vírus nukleinsavainak hasonlósága feltételezi, hogy keresztvédelem van a két vírus között (Mahé és mtsai., 2000), ám a legtöbb ismert monoklonális ellenanyag nem képes a keresztneutralizációra (Shang és mtsai., 2009).

A legújabb eredményeknek megfelelően a PCV2 antigéndeterminánsait az ABC betűivel A—D-ig jelöljük. Az A epitópon a 70., 71., 77., 78., míg a B és D epitópokon a 113., 115., 127., 203., 206. és 207. as nélkülözhetetlen az ellenanyag kötődéséhez (Khayat és mtsai., 2011). A PCV2a esetében azt találták, hogy az 59. as-nak a neutralizációban van

fontos szerepe (Huang és mtsai., 2011). Jelenleg már több antigéndetermináns szerkezete is ismert, meghatározták a csak a PCV2-re vagy kizárólag a PCV1-re, illetve a mindkét vírusra jellemző epitópokat is (Shang és mtsai., 2009).

Az **ORF3** a 671.—357. nt között található, az általa kódolt fehérje *in vitro* tanulmányok szerint a sejtek apoptózisáért felelős a kaspáz 8—3 útvonalon keresztül (Liu és mtsai., 2005). Az ORF3 fehérje nélkül a vírus képes szaporodni (Liu és mtsai., 2005), azonban a titeremelkedésében és a szervezeten belüli terjedésében szerepe lehet (Karuppanan és Kwang, 2011), mivel az apoptotikus sejtek számának növekedésével a makrofágok vírustartalma is megnövekszik. Az ORF3 a PCV1 genomon is megtalálható, hossza azonban a kétszerese a PCV2 ORF3 génjének (Chaiyakul és mtsai., 2010), és apoptózist nem képes kiváltani (Karuppanan és Kwang, 2011).

Legújabb vizsgálatok egy negyedik (**ORF4**) génről is beszámolnak, amely fehérjét kódol, a 180 nt-nyi gén az ORF3-mal átfedésben található (He és mtsai., 2013). Valószínűsített szerepe a kaspáz rendszer működésének csökkentése, és a CD4+ és CD8+ T-limfociták szabályozása a vírusfertőzés alatt.

6.2.2.4. Replikáció

A PCV1 esetében a szövettényészetben történő vizsgálat során először a sejtmagvacskából mutatható ki a vírus, majd a citoplazmába kerül és a sejtmagvacskából eltűnik. A citoplazmából a kapszid és a replikációs fehérjék is a sejtmagba jutnak és ott felhalmozódnak, majd ugyanitt a DNS megsokszorozódása után felépül a virion. A sejtmagból végül az érett virion kerül ki (Finsterebusch és mtsai., 2005). Feltételezik, hogy mindez a PCV2 replikáció során is hasonló módon történik.

Az RNS-szintézist és a ssDNS duplaszálúvá alakítását a gazdaszervezet celluláris enzimeik végzik, mivel a vírus szerkezete és mérete nem alkalmas arra, hogy az ehhez szükséges fehérjéket magába építse. A sejtenzimeket azonban csak olyankor tudja hasznosítani a vírus, amikor a sejt a szaporodási ciklusának az S fázisában van (Tischer és mtsai., 1987). A sejtben a virion dekapzidálódik és a ssDNS bejut a sejtmagba, majd dupla szálú lesz. Ennek során úgynevezett túlcsvarodó (szupercoiled) replikációs forma jön létre, amely úgy alakul ki, hogy a szárhurok részen a DNS önmagával dupla szálú DNS-t alkot. Ezután az RCR-t bevezető fehérje-komplex (Rep-Rep') kötődik a szár jobb oldalán elhelyezkedő első és második hexamerhez. Ez konformációváltást okoz, ami destabilizálja az Orit, és az felhasad (az 2. ábrán a hurok részen a háromszöggel jelölt nt előtt a szekvencia a következő: xAxT_xT_xT↓AC, ahol az x tetszőleges nt, Cheung, 2012). A felhasadt DNS szál és a palindrom szár rész ún. hairpin-triplexet (hajtűt alkotó tripla hélix) alakít ki. A felhasadás után szabad OH⁻ gyök keletkezik a 3' végen, ahonnan kiindulva a sejt eredetű DNS-polimeráz enzim megkezd a DNS-replikációt (Faurez és mtsai., 2009). Ezzel a

replikációs formával egyszerre csak egy szál keletkezhet, amíg az be nem fejeződik, addig új szál nem replikálódhat (Cheung, 2012). Ha az új szál eléri a bal szárat, és így négyszálúvá válik a hairpin-triplex, a Rep komplex zárja a hurkot és elválnak a két szál. Utóbbi esemény pontos mechanizmusa még nem ismeretes.

6.3. A circovírusok eredete

6.3.1. Circovírusokkal közeli rokonságban álló más vírusok

A körkörös, ssDNS genommal rendelkező vírusok között állati és növényi vírusokat (valamint bakteriofágokat) is találhatunk. Az *Anelloviridae* és *Circoviridae* családba állatokban előforduló vírusok tartoznak, míg a növények vírusai a *Geminiviridae* és *Nanoviridae* családok tagjai. Ezek a vírusok is az RCR modellt követik a megsokszorozódásuk során és az ebben fontos Rep-fehérjéjük struktúrája is meglepően konzervatív (Gronenborn, 2004).

A nanovírusok 18–20 nm közötti ikozahedrális növényvírusok. Minden vírus 6–8, egyenként megközelítőleg 1 kb méretű körkörös, ssDNS-t tartalmaz. A *Geminiviridae* család tagjainak örökítőanyaga általában 6 fehérjét kódol, pozitív és negatív irányban is. A legtöbb ide tartozó vírus egy darab ssDNS genomot tartalmaz. Az *Anelloviridae* család tagjai a TTV-ok, amelyek genomja 2–4 kb negatív irányultságú ssDNS. A vírusok a CAV-sal mutatnak rokonságot.

A metagenomika elterjedésével a circovírusokra emlékeztető szekvenciák száma is jelentősen megnőtt. A kimutatott új genomok többsége azonban filogenetikailag nem illik sem a *Circoviridae* családba, sem a fent említett családokba, bár közeli rokonaik. Valamennyi genom tartalmaz *Rep*-gént, amely az RCR-hez szükséges konzervatív motívumokat hordozza. Azonosítottak ilyen vírusgenomokat az állatok közül gerincesekben és ízeltlábúakban, de közelebből meg nem határozható környezeti mintákban is.

6.3.2. A circovírusok létrejöttével kapcsolatos elméletek

A *Circovirus* genus, valamint a *Geminiviridae* és *Nanoviridae* család tagjai olyan replikációs fehérjét használnak, amely szerkezetében hasonlít néhány baktériumban (*Bifidobacterium*) és algában fellelhető plazmid replikációs fehérjére (*Rep*-gén szupercsalád), ezért feltételezhető az evolúciós rokonság a plazmidok és a vírusok között (Rosario és mtsai., 2012b). Felmerült, hogy ez a kapcsolat akár szorosabb is lehet, mint a circovírus—gyrovírus kapcsolat. A nanovírusokat több körkörös DNS-t tartalmazó növényi circovírusnak tartották (Lukert és mtsai., 1995), de a DNS kópiák száma (Burns és mtsai., 1995) és a filogenetikai analízis (Niagro és mtsai., 1998; Katul és mtsai., 1998) alapján külön családba kerültek, a közeli rokonság megkérdőjelezése nélkül.

A szárhurok szekvencia, a hurok kilenc konzervatív nukleotidjával, valamint a hexamerek és a rep konzervatív szakasza (II. konzervatív elem) is arra engednek következtetni, hogy a geminivírusoktól származnak a circovírusok és nanovírusok is (Meehan és mtsai., 1997; Mankertz és mtsai., 1997; Londoño és mtsai., 2010). A banán csúkcsonkosodás vírus (BBTV) és a PCV ORF1 fehérjéinek hasonlóságára alapozva feltételezik, hogy a nanovírusok és circovírusok között szoros evolúciós rokonság áll fent, vagyis az ősök közös, vagy a nanovírus a circovírus őse (Meehan és mtsai., 1997; Gibbs és Weiller, 1999).

A circovírusok Rep-fehérjéinek C-terminális részén található, dNTP megkötésére alkalmas, helikáz aktivitással bíró P hurok a calicivírusokra jellemző RNS-kötő 2C fehérjéhez hasonlít (Gibbs és Weiller, 1999). Filogenetikailag is valószínűsíthető, hogy a calicivírusok és a circovírusok ezen fehérjerészének közös őse lehet.

A nanovírusok és a circovírusok között feltehetően rekombináció történt. A calicivírus—circovírus esetben valószínűsíthető retrovírus vagy retrotranszpozon közvetítő szerepe, hiszen a calicivírus a replikációja során DNS-szakasszal, a circovírus pedig RNS-szakasszal nem rendelkezik. A feltételezés szerint mindez a legnagyobb valószínűséggel egy gerinces gazdafajban történhetett, hiszen az állati retrovírusok gyakoriak, a növényekben pedig relatíve ritkák. A feltételezés szerint a calicivírus 2C génje komplementer DNS formájában jutott a circovírusba, és épült be annak genomjába, miközben a Rep-fehérjéből kiesett egy rész (Gibbs és Weiller, 1999). Arra vonatkozólag, hogy a növényekből hogyan került a vírus a gerincesekbe, az elmélet szintén érdekes: növényevő ízeltlábú továbbító szerepét feltételezik (Gibbs és Weiller 1999). Hasonló feltételezést írtak le Rosario és mtsai. (2012a) is, miszerint a denevérek cyclovírusai az ízeltlábúak cyclovirusaiból erednek. A párhuzam logikus, de több ponton is elgondolkodtató. A nanovírusokat levéltetvek viszik át az egyik növényből a másikba, ezek az ízeltlábúak viszont a növényvel együtt kerülnek be a sertésekbe. Így akár közvetlenül is származhatna a PCV növényekből, más kérdés, hogy a legközelebbi rokonként ismert BBTV a banánt fertőzi, ami nem tartozik a sertés legfőbb táplálékai közé. Miután a circovírus kialakult, a gerincesekkel fejlődött együtt, de a mostani állapotig vezető evolúciós út nem tisztázott (Rosario és mtsai., 2012b). Cheung (2006) szerint a circovírusok, nanovírusok és geminivírusok a prokarióta epizómális replikációval együtt evolválódtak. Mások szerint a gazdafajjal közösen történt az evolúció (az állatok citokróm b génje alapján, Johné és mtsai., 2006), bár helyenként ez a koevolúciós fa nem tökéletes (Firth és mtsai., 2009). Az integrálódott circovírus-genom részletek alapján is a koevolúció elmélete tűnik valószínűbbnek, ami alapján a circovírusok akár 50 millió évesek is lehetnek (Belyi és mtsai., 2010). Más szerzők csak 500 éves múltat feltételeznek (Firth és mtsai., 2009), ami megkérdőjelezi a koevolúció tényét.

A *Circoviridae* családban három olyan faj is létezik, amelynek több gazdafaja is lehet: a galamb circovírus (galamb és csirke), a sertés circovírus 2 (sertés, szarvasmarha, egér, patkány) és egy cyclovírus (szarvasmarha és kecske, Delwart és Li, 2012). A gazdafaj szerep megállapításának legfőbb kritériuma, hogy az adott fajból természetes fertőzést követően szövetekből is ki lehessen mutatni a vírus DNS-t, és a különböző gazdafajokból származó vírusok egy fajba tartozzanak (teljes genom szekvencia 75 %-nál nagyobb, a Cap-fehérje as sorrendje pedig 70 %-nál nagyobb egyezést mutasson). Ezek az eredmények előrevetítik azt, hogy ezeknek a vírusoknak az esetében is lehetséges a fajok közötti gazdaváltás, illetve a cyclovírusok esetében a hordozó fajokat ismerve felmerülhet a zoonózis lehetősége (Delwart és Li, 2012). A zoonózis a PCV-ok esetében azonban nagyon kis valószínűségű (Garkavenko és mtsai., 2004).

6.4. A kettes típusú sertés circovírus genetikai változékonysága

6.4.1. Felfedezés és előfordulás

A házi sertésekben 1991-ben írták le először a választott malacok circovírus okozta sorvadását (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) Kanadában (Harding és Clark, 1996). Ez a leggyakoribb kórkép, amit a PCV2-nek (Allan és mtsai., 1998) tulajdonítanak. A betegséget az első felismerése óta az egész világon leírták: az USA-ban (Kiupel és mtsai., 1998), Európában először Franciaországban (Allan és mtsai., 1998), majd Észak-Írországban (Kennedy és mtsai., 1998) és Írországban (Spillane és mtsai., 1998), később pedig Ázsiában is (Japánban, Onuki és mtsai., 1999). Közép- és Dél-Amerikában is megjelent a betegség (Trujano és mtsai., 2001; Sarradell és mtsai., 2002). Az afrikai országok közül, bár feltételezhetően ott is széles körben elterjedt, csak a Dél-Afrikai Köztársaság területéről áll rendelkezésre szakirodalmi adat (Drew és mtsai., 2004). Ausztráliában és Új-Zélandon csak 2005 táján detektálták a vírust (Raye és mtsai., 2005 és Garkavenko és mtsai., 2005). Retrospektív vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a vírus már valamivel korábban is megtalálható volt a sertésállományokban, így kimutatták Kanadában, 1985-ös mintákban (Magar és mtsai., 2000), különféle időpontból származó mintákban Spanyolországban (Rodríguez-Arriola és mtsai., 2003b), Belgiumban (Sanchez és mtsai., 2001), Írországban (Walker és mtsai., 2000), Angliában (Grierson és mtsai., 2004) és Németországban (Jacobsen és mtsai., 2009.) is. A kanadai vizsgálat az 1985-ből származó sertés vérsavókból csak néhány százalékban tudott kimutatni ellenanyagot a PCV1-re illetve a PCV2-re (Magar és mtsai., 2000). A későbbi mintákban a vírusellenes ellenanyag nagyobb százalékban volt jelen és a PCV2 gyakorisága nagyobbak bizonyult, mint a PCV1-é. Hasonlót tapasztaltak Észak-Írországból származó szérumok vizsgálata során is, miszerint a nyolcvanas évek végétől a minták jelentős része pozitív volt PCV2-re

(Walker és mtsai., 2000). A legrégebbi eset egy 1962-ből származó, paraffinba ágyazott sertés szövetminta, amelyből *in situ* DNS hibridizációval (ISH) lehetett a vírust kimutatni, és ezt polimeráz láncreakcióval (PCR) is megerősítettek (Jacobsen és mtsai., 2009). Sajnálatos módon az ebből a mintából származó, GenBankban elérhető szekvencia a *Rep*-gén egy kis szakaszára korlátozódik, ami alapján a vírus pontos hovatartozása nem állapítható meg.

Hazánkban először az akkori Debreceni Állategészségügyi Intézet munkatársai mutatták ki a vírust (Kiss és mtsai., 2000), akik korábban is keresték, de eredménytelenül (Kecskeméti és mtsai., 1999). A vírus rövid időn belül elterjedt az országban, és a vakcinás védelmet megelőző időben nem volt olyan sertéstelep, amelynek vizsgálata negatív eredményt mutatott volna.

6.4.2. Sertés circovírus 2 csoportosítása

A vírusnak három (kínai kutatók szerint öt) genotípusa ismert. A jelenleg is elfogadott nevezéktan alapján PCV2a, PCV2b és PCV2c genotípusok léteznek, egy európai és amerikai circovírus kutató konzorcium adatai (www.pcvd.org) alapján (Segalés és mtsai., 2008; Cortey és mtsai., 2011). A PCV2a és 2b létezése szakmai körökben hamar elfogadottá vált, bár a nevezéktan egységesítésére csak később került sor. Ez az oka annak, hogy a szakirodalomban PCV2-1 és -2 néven (Olvera és mtsai., 2007; Grau-Roma és mtsai., 2008), -321 és -422 néven (Carman és mtsai., 2006), -I. illetve -II. (Shuai és mtsai., 2007; Timmusk és mtsai., 2008) vagy SG1, SG2, SG3 (Cheung és mtsai., 2007) néven is lehet róluk olvasni. A PCV2a genom 1768 nt, a PCV2b 1767 nt és a PCV2c is 1767 nt hosszúságú az egyes csoportokban elsőként meghatározott szekvenciák alapján.

Az észak-amerikai régióban először azonosított sertés circovírus a PCV2a genotípusba tartozott. Ezen a kontinensen egészen 2004-ig a PCV2a genotípus fordult elsősorban elő, majd 2004-ben elterjedt a PCV2b is (Carman és mtsai., 2006; Gagnon és mtsai., 2007; Cheung és mtsai., 2007) és 2005 óta már nagyobb számban mutatják ki ezt a genotípust, mint a PCV2a-t (Carman és mtsai., 2006; Gagnon és mtsai., 2007).

Európában a vírusról 1998-ban tudósítottak először. Franciaországi és írországi megjelenését követően a vírus gyorsan terjedt és mára az egész kontinensen megtalálható. Az első megismert európai genom-szekvencia (Meehan és mtsai., 1998) a PCV2b genotípusba tartozik, bár a PCV2a genotípus ezen a kontinensen is jelen van a kezdetektől (Mankertz és mtsai., 2000; Dupont és mtsai., 2008) a mai napig (Toplak és mtsai., 2012; Fabisiak és mtsai., 2012). Hazánkban az első felmérés szerint mindkét genotípus megjelent, az elterjedtebb a PCV2a (Dán és mtsai., 2003) volt. 2008-ban számolt be Cságola (2009) a hazai és Közép-Európát érintő PCV2 helyzetről, megállapítva, hogy a vaddisznó állományban a pozitivitás egyértelmű növekedést mutat, és ekkorra a PCV2a és PCV2b aránya megfordult, mind a vaddisznók, mind a házi sertések esetében. Kínában is

egyértelműen a PCV2b vette át a domináns szerepet (Wang és mtsai., 2009). Annak az okát, hogy vajon miért a PCV2b terjedt el, és miért csak az utóbbi időben láthatók a tünetek (bár Jacobsen és mtsai., 2009, alapján kórszövettani metszetekben korábban is tetten érhetőek a PMWS-re jellemző elváltozások) pontosan nem tudjuk. Egyes elképzelések szerint a vírusfertőzés az állandóan változó sertéstartással, új sertésfajták megjelenésével együttesen okozza a súlyosbodó klinikai tüneteket. Epidemiológiai vizsgálatok alapján ez a genotípus tűnik patogénebbnek (Allan és mtsai., 2012; Li-WL és mtsai., 2010), amit azonban kísérletes körülmények között nem sikerült bizonyítani (Opriessnig és mtsai., 2008). Az sem kizárható, hogy a kilencvenes évektől a PCV2 globális terjedése egy mindeddig ismeretlen ágenssel közösen történik, és ez utóbbi felelős a megbetegedésekért (Allan és mtsai., 2012). Más feltételezések szerint a megnövekedett patogenitás oka lehet, hogy a vírus adaptációja a sertéshez még nem lezárult folyamat (Hughes és Piontkivska, 2008). A sertés circovírusa valamely más fajból gazdaváltással kerülhetett a sertésekbe, de az eredeti faj identitása még kérdéses. Az sem elhanyagolandó, amit több vizsgálat is megerősít, hogy a PCV2 mutációs rátája igen magas, 10^{-3} szubsztitúció/hely/év (Firth és mtsai., 2009; Pérez és mtsai., 2010), ami a legmagasabb a DNS vírusok között, az RNS vírusokra jellemző érték (Duffy és mtsai., 2008). A mutációk folyamatos vizsgálata során felmerült annak a gyanúja, hogy a vírusra ma már a genetikai beszűkülés jellemző (Trible és Rowland, 2012). A járvány elején jellemzően előforduló PCV2a genotípus genetikailag heterogénebb volt, mint az azt ma már többnyire kiszorító b genotípus (Cságola, 2009; Olvera és mtsai., 2007).

A PCV2c genotípus elfogadását egy Dániában végzett, részben archiv mintákat feldolgozó vizsgálat javasolta (Dupont és mtsai., 2008). Ezeket az újabb genotípusba tartozó vírustörzseket 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó sertés szérum minták tartalmazták. Az első kimutatása óta irodalmi adatok szerint ez a genotípus másutt nem fordult elő.

Kínában végzett vizsgálatok megállapították további két PCV2 csoport létezését is. A feltételezett PCV2e csoportba olyan vírusokat soroltak, amelyek főként 2006-ból származnak. Az ide tartozó vírusok genomja 1768 nt méretű. A PCV2e genotípusként leírt csoportba tartozó szekvenciák között nincs olyan, amely a 2006 utáni évekből származik. A vizsgálat alapján 2007 óta csak a PCV2b genotípus fordul elő (Wang és mtsai., 2009). A PCV2d létezését Kínában többször megerősítették, a 2e genotípus előfordulását egyes kínai felmérések megerősítik (Zhai és mtsai., 2011), mások viszont nem (Guo és mtsai., 2010). A PCV2d genotípusba olyan vírus szekvenciák tartoznak, amelyeket korábban nem publikáltak, de a GenBankból elérhetőek (Guo és mtsai., 2010). Megállapították a csoportról, hogy a Cap-fehérje elleni neutralizáló monoklonális ellenanyagok nem reagálnak ezen vírusok mindegyikével, amit a Cap-géneen történt mutáció miatt egy plusz as beépülésével magyaráznak (Guo és mtsai., 2010). A mutációnak köszönhetően a más PCV2 vírusokban

233 as méretű kapszidfehérje itt 234 as-at tartalmaz (Chen és mtsai., 2012). A PCV2d típust Kínán kívül Európában és Amerikában is azonosították (Toplak és mtsai., 2012; Xiao és mtsai., 2012; Opriessnig és mtsai., 2013b). Toplak és munkatársai (2012) egy magyar vaddisznóból származó vírust (Cságola és mtsai., 2006) is ide soroltak, de ennek a vírusnak a kapszidja a szokásos 233 as méretű, és eredeti leírója a PCV2b genotípusba csoportosította. A szlovén és szerb kutatókból álló csoport a PCV2d genotípusba sorolt egy É-Amerikában 2011 és 2012 között megjelent új vírust (Opriessnig és mtsai., 2013b). Az új mutáns vírust 2011-et megelőző időszakból nem sikerült kimutatni (Shen és mtsai., 2012).

Arra vonatkozólag, hogy mikor tekintünk egy vírust új genotípusba tartozónak, az ICTV-nek nincs ajánlása. A circovírusok esetében a már fentebb említett nemzetközi szakértői konzorcium (www.pcvd.org) elfogadta a PCV2 genotípusokra vonatkozó definíciót, amelyet Grau-Roma és mtsai. (2008) írtak le. Ezek alapján a genotípusok között a teljes genom tekintetében a genetikai távolság minimum 2,0 % ($p=0,02$), vagy az ORF2-n (amely igen változatos) a genetikai távolság nagyobb, mint 3,5 % ($p=0,035$) páronkénti szekvencia-összehasonlítással (pairwise sequence comparisons, PASC). Ezen ajánlás szerint a PCV2 három genotípusra osztható, a PCV2d és PCV2e külön genotípust nem képvisel.

A PCV2a és PCV2b esetében is a genotípuson belül több csoport is létezik. Erre vonatkozóan a legelfogadottabb az Olvera és mtsai. (2007) által elvégzett csoportosítás, amit teljes genomszekvenciákból és az ORF2 szakaszból, több módszerrel is felépített filogenetikai fák alapján készítettek. Így a PCV2b genotípust három alcsoportba vagy szubtípusba (1A, 1B, 1C), míg a PCV2a genotípust 5 alcsoportba (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) osztották. A besorolás alapján egyértelmű, hogy a PCV2a genotípus jóval változékonyabb, mint a PCV2b. A PCV2d és PCV2e genotípus elnevezéseket jelenleg is használják ugyan, ezek önálló genotípusba csoportosítása azonban megkérdőjelezhető, mert a PASC analízist sem a teljes genomra, sem az ORF2-re vonatkozóan nem készítették el. Mivel a különbségek csak akkorák, mint amelyet korábban a genotípuson belüli csoportosításnál használtak, ezekre a szubtípus elnevezést javasolják (Cortey és mtsai., 2011). Azaz három genotípus van, melyek referencia törzsei: PCV2a esetében egy USA izolátum, genbanki száma: AF055391 (Meehan és mtsai., 1998), PCV2b esetén a Franciaországból származó, AF055392 genbanki számú vírustörzs (Meehan és mtsai., 1998). A PCV2c referencia szekvenciája Dániából származik, és a GenBankban az EU148503 hivatkozási számon érhető el (Dupont és mtsai., 2008). A PCV2a és 2b között a különbség azonban még így sem egyértelmű, hiszen nem egy alkalommal meg lehetett figyelni genotípusok közötti rekombinációt, illetve a PCV2a és PCV2b együtt is fertőzhet egy állatot (Trible és Rowland, 2012). Kísérletes *in vivo* körülmények között a PCV2a/2b rekombináns vírus szaporodási intenzitása növekedést mutat, amit azzal magyaráznak, hogy a sertés által termelt

ellenanyagok nem neutralizálják megfelelően az így keletkezett vírusokat (Guo és mtsai., 2011). Kínában több olyan mintát szekvenáltak, amelyben a PCV2a—PCV2b genotípus kombinációja mellett más genotípus kombinációkat is találtak, így PCV2a—PCV2d és PCV2d—PCV2e kimérékat (Zhai és mtsai., 2011). A vírus rekombinációs aktivitását jól jellemzi, hogy PCV1 és PCV2a kimérékat is azonosítottak (Trible és Rowland, 2012).

Több vizsgálat alapján a PCV2b genotípus azon vírusai, amelyek 2003-ban jelentek meg Eurázsiaiban, világszerte terjedőben vannak. Ezek Olvera és mtsai. (2007) besorolása alapján az 1A szubtypusba tartoznak (PCV2b 1A) (B/1, B/3 csoport, Cságola, 2009). Európában, beleértve a közép-kelet-európai régiót (Szerbia: Savic és mtsai., 2012; Toplak és mtsai., 2012; Lengyelország: Fabisiak és mtsai., 2012; Románia: Turcitu és mtsai., 2011), Ázsiában és az amerikai kontinensen is főként ez a víruscsoport terjedt el. Egyre kevesebb esetben lehet PCV2a genotípust kimutatni.

6.4.3. A kettős típusú sertés circovírus helyzete Közép-Európában

A PCV közép-kelet-európai előfordulásával kapcsolatosan Cságola (2009) készített áttekintést, összefoglalva az addig elérhető szekvenciákról szerzett ismereteket, valamint a régió egyes országaiban megjelent publikációkat. Ezért ezt a munkát alapul véve a 2008 óta fellelhető irodalom alapján dolgoztuk fel az azóta napvilágot látott eredményeket.

Egy romániai vaddisznópopulációt érintő felmérés szerint a PCV2 előfordulása ott 50 % alatti (Turcitu és mtsai., 2011). Az azonosított vírusok között találtak olyanokat, amelyekben deléción következett be a *Cap*-génen (1042/1043), hasonlóan ahhoz, amiről korábban Guo és mtsai. (2010) is beszámoltak PCV2d néven. Huszonhárom részleges szekvencia alapján a circovírusok egyharmada PCV2a genotípusba tartozott, míg a kétharmaduk a PCV2b genotípusba sorolható. Ez utóbbiak az Európában leggyakoribb genetikai csoportba tartoznak, 93,7—100 % hasonlósággal. A szerzők közleményükben feltételezik, hogy a házi sertés állományban is hasonló vírusok fordulnak elő, hiszen ezen a területen a sertésstartás külterjes, így az állatok közötti kontaktus nem ritka.

Egy 2002—2005 között lezajlott felmérés szerint az ukrán és orosz vaddisznó-állományokban is megtalálható a PCV2 (Shcherbakov és mtsai., 2007).

Lengyelországi vizsgálatok azt mutatják, hogy ott jóval magasabb arányban fordul elő a PCV2 a vaddisznóállományokban, míg a 2006/2007-es vadászati idényben az előfordulás 60 % volt, addig 2007/2008-ra ez elérte, sőt meghaladta a 90 %-ot (Fabisiak és mtsai., 2012). A nukleinsav szekvenciák alapján a PCV2b típus fordul elő nagyobb arányban, és nagyfokú hasonlóságot mutat a házi sertések vírusaival, igaz a tanulmány szerint PCV2a típust is azonosítottak, ami Lengyelországban addig nem volt ismeretes.

Szlovákiában 2007-ben detektálták először a vírust (Pistl és mtsai., 2009). Az azóta történt felmérés alapján egyértelmű, hogy a vírus genetikailag itt is stabil. Egy 2005 és 2009

között végzett felmérés szerint a vizsgált sertések 64,2 %-a bizonyult PCV2 pozitívnak. Huszonnégy részleges ORF2 szekvencia alapján két minta a PCV2a 2D szubtypusba tartozott, míg a többi a PCV2b 1A vagy 1B szubtypusba (Vlasakova és mtsai., 2011). Mivel a részleges szekvenálás alapján az egyértelmű szubtypus besorolás (A vagy B) nem tehető meg, ezért a szerzők ezeket a vírusokat 1A/B szubtypusként szokták megjelölni. A régió más országaiban a GenBank adatai alapján a szlovákiai mintákhoz genetikailag hasonló vírusokat lehetett kimutatni, és jelentősebb mutációt nem lehetett találni e vírusok és Európa más részein megtalálható szekvenciák között sem. A közvetlen víruskimutatás mellett szerológiai felmérések is készültek az utóbbi években Szlovákiában (Csank és mtsai., 2011). Megállapították, hogy választáskor az ellenanyag szint alacsony, míg 2—4 hónapos kor között az állatok szeropozitivitásának aránya meghaladja a 80 %-ot, függetlenül attól, hogy betegség tünetei jelentkeznek-e vagy sem. Az azonban elmondható, hogy IgM típusú ellenanyagot nem találtak egészséges állatokban, míg a PMWS-tüneteit mutatókban a vírus DNS mellett mind IgG, mind pedig IgM típusú ellenanyag kimutatható volt (Csank és mtsai., 2011). Átlagosan, életkortól függetlenül Szlovákiában PCV2-specifikus ellenanyagot az állatok 54 %-ában lehet kimutatni, ami európai viszonylatban alacsony szintet jelent. Csehországban a vaddisznókat indirekt immunfluoreszcens módszer (iIF) segítségével vizsgálták, a vizsgált vadak közel 45 %-ában lehetett ellenanyagot kimutatni (Sedlak és mtsai., 2008).

Ausztriában ondót vizsgálva állapították meg, hogy a vizsgált állatok 18,2 %-a üríti a vírust. A minták egy része genetikailag nagyon hasonló, míg más részük eltérő, ami jelzi a vírusok genetikai variabilitását. A szekvenciák egy jelentős része (67,86 %) PCV2a genotípusúnak bizonyult, más részük a PCV2b 1A/B szubtypusához tartozik (Schmoll és mtsai., 2008). Ugyanakkor egy másik ausztriai vizsgálat során 100 vizsgált ondómintából csak 1-ben sikerült a PCV2 kimutatása (Lang és mtsai., 2011). IgG ellenanyagot is kimutattak az állatok 60 %-ában, ami azt jelenti, hogy az állatok korábban fertőződtek, mert a fertőződés kezdetén az IgM jelenik meg (amit nem sikerült detektálni), majd később az IgG (Schmoll és mtsai., 2008). Szerbiában és Szlovéniában 2001 és 2010 között gyűjtött minták alapján Szerbiában 30 pozitív sertésből 28-ban, Szlovéniában 17 pozitív állatból 10 esetben a PCV2b mutatható ki (Toplak és mtsai., 2012). Ugyanitt a PCV2a mellett egy—egy esetben a PCV2d genotípus jelenléte is megállapítást nyert, amelyek egy magyarországi vaddisznóból származó vírussal (Cságola és mtsai., 2006) mutattak nagyfokú hasonlóságot. Egy másik vizsgálat során Szerbiában 2009—2010-es házi sertés mintákban a PCV2a genotípusból a 2D szubtypust, a PCV2b esetében az 1A/B mellett az 1C szubtypust is kimutatták (ez tűnik a PCV2d-vel szoros rokonnak a Nguyen és mtsai., 2012, által készített filogenetikai vizsgálat alapján). Utóbbit Európában mindaddig kizárólag egészséges

állatokban mutatták ki, míg ebben a vizsgálatban PMWS tüneteit mutató állatokban. Megállapították, hogy a vírus szoros genetikai rokonságban áll ázsiai vírustörzsekkel. Járványtani kapcsolatot az ázsiai vírusokkal nem lehetett igazolni, így feltételezik, hogy a PCV2a és PCV2b közötti genetikai csuszamlás (shift) áll a vírus megjelenésének háttérében, ami alapján a szerbiai PCV2b 1C szubtypus egy fiatal, patogén törzsnek tekinthető, hasonlóan egy, az USA-ban azonosított szekvenciájú vírushoz, amit Xiao és mtsai. (2012) írtak le. Ezen vizsgálatok eredményei a homogenitás kialakulása helyett inkább a heterogenitás fokozódása felé mutatnak (Savic és mtsai., 2012; Toplak és mtsai., 2012), bár egyes esetekben a vírus nagyon konzervatívnek bizonyult az egyébként variábilisnak tartott ORF2 génen, az elsőként leírt szlovák PCV2-höz képest (Toplak és mtsai., 2004).

A hazánkkal szomszédos Horvátországban főként a PCV2b genotípust lehet kimutatni, lényegesen kisebb arányban van jelen a PCV2a genotípus. Egyértelműen nagyfokú egyezést írtak le genotípuson belül a horvátországi szekvenciák között, illetve a genbanki adatokkal összehasonlításban is (genbanki számok: HQ591365—HQ591381).

6.4.4. A kettes típusú sertés circovírus helyzetének alakulása a vakcinázás hatására

A PCV2 kártétele elleni védekezés javarészt a megszokott járványvédelmi intézkedésekkel zajlott, mígnem 2007-től Európában elérhetővé vált az első specifikus vakcina. Ettől kezdve az állományok számára a vakcinás védelem is lehetőséggé vált. Megjelentek újabb vakcinák is, amelyekkel a vírus kártételét csökkenteni próbálták, és tudományos közleményekben a PCV2 vakcinák pozitív és negatív hatásairól is érkeztek beszámolók. A vakcinázott állatok súlygyarapodása javult, a bélsárban és a szérumban lévő vírusedényiség csökkent (Fraile és mtsai., 2012), az elhullások száma, a circovírussal összefüggésbe hozható megbetegedések száma és a társfertőzések előfordulása (sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindróma vírusa —PRRSV—, *Mycoplasma hyorhinis*) is csökkent (Kixmüller és mtsai., 2008).

A vakcinázás hatására a genotípusok egymáshoz viszonyított aránya is megváltozott. Ennek alakulását egy az USA-ban elvégzett tanulmány vizsgálta (Shen és mtsai., 2012). A vizsgálat idején háromféle vakcina volt elérhető: két PCV2a Cap-proteinjét tartalmazó, baculovírusban előállított aegységvakcina, és egy inaktivált PCV1—PCV2a kiméra vakcina. A vakcinázott sertések egyikében sem volt PCV2a kimutatható, míg PCV2b közel 10 %-os pozitivitást mutatott. A nem vakcinázott egyedek harmada pozitív volt PCV2a-ra, ami ugyan igen jelentős csökkenés a 2006-ban mért 82 %-hoz képest, viszont a PCV2b-hez képest igen magas arány (PCV2b: 4,2 %). A PCV1 vizsgálata is megtörtént, ugyanis egy korábban használt hasonló szerkezetű PCV1—PCV2 inaktivált kiméra vakcina az első oltások után feléledt, vélhetően a nem megfelelő inaktiválási eljárásnak köszönhetően. Ugyan előfordult a

vizsgált állatokban ez a vírus is, de kiméra törzset ebben a vizsgálatban nem találtak (Shen és mtsai., 2012).

Megállapították, hogy a vakcinázás visszaszorítja a PCV2a előfordulását, a klinikai tünetek kialakulását, de a PCV2b prevalenciája nem változik (Opriessnig és mtsai. 2013b). A PCV2b-t tartalmazó vakcina mind a PCV2b, mind a vegyes (PCV2a és PCV2b) fertőzések ellen is jobb védettséget biztosítana (Opriessnig és mtsai., 2013a).

A vakcinázás, illetve az általa kiváltott szelekciós nyomás hatására várható, hogy a beszűkülést a genetikai változékonyság fokozódása követi. Azon vírusok terjedése várható, amelyeknek a kapszidja nemcsak a kódoló nukleinsav-sorrendben, de az szinten is eltérést mutat, ezzel valószínűsítve a fehérje szerkezet változását is. Hogy az új vírus (PCV2d) kialakulása véletlenszerű, esetleg a virulencia növekedése vagy a vakcinázás miatt alakult ki, nem ismeretes (Opriessnig és mtsai., 2013b). Ami biztos, hogy a vakcinás védelmet áttörve megjelentek a kínai mutánshoz (PCV2d-ként leírt, plusz as-at tartalmazó) hasonló vírusok is (Xiao és mtsai., 2012; Opriessnig és mtsai., 2013b), Amerikában. Európában a vakcinációval nem hozták összefüggésbe ennek a vírusnak a megjelenését. A kimutatott vírusok között találtak olyanokat, amelyek rekombinációval jöhettek létre, hiszen a vírus *Cap*-génje a PCV2b-re hasonlít, de a *Rep*-gén inkább a PCV2a-ra, míg maga a vírus a PCV2d-ként leírt szekvenciák közé sorolható (Xiao és mtsai., 2012). Emellett leírtak az eredeti kínai PCV2d szekvenciához hasonlító vírust is (Opriessnig és mtsai., 2013b), olyan fertőzött állatokban, amik megbetegedtek: levertek, étvágytalanok voltak, kórbonctanilag a lymphoid szövetekben jelentkeztek elváltozások (lymphoid depléció, granulomatosus lymphadenitis). Az egyik érintett telepen kimutatták a PRRSV-t és a sertés influenza vírust (swine influenza virus, SIV) is, ám a másik telep ezektől mentes volt.

6.4.5. Sertés circovírusok más állatfajokban

Már a kilencvenes években vizsgálták mind az embereket, mind a sertésekkel közelebbi kapcsolatban élő emlősöket, hogy a fajra jellemző, vagy sertés circovírust ki tudnak-e mutatni belőlük. Az eredmények ellentmondásosak.

A nyulakat, mint kísérleti állatokat vizsgálták. Kísérleti fertőzés során egyértelműen negatívak maradtak, akár PCV1, akár PCV2 ellenes ellenanyag vagy vírus kimutatását célozta a vizsgálat (Quintana és mtsai., 2002; Rodríguez-Arrijoja és mtsai., 2003a; Allan és mtsai., 1994). Hasonlóan tengerimalacokban sem lehetett PCV2 elleni ellenanyagot kimutatni (Rodríguez-Arrijoja és mtsai., 2003a).

Embereknek szánt vakcinákkal kapcsolatban a circovírus fertőzés többször felmerült. Humán circovírusról egyelőre nincs tudomásunk (Hattermann és mtsai., 2004). A cyclovírusok közül többet is emberi székletből mutattak ki (Li-L és mtsai., 2010a és 2011),

bár ezeket nem tudták állatokban talált vírusokkal összefüggésbe hozni. Egy felmérésben PCV1-re nézve gyenge ellenanyag pozitivitást észleltek (Tischer és mtsai., 1995a), míg más vizsgálatok sem PCV1, sem PCV2 elleni ellenanyagot vagy vírust nem találtak (Allan és mtsai., 1994).

Lovakat is vizsgáltak mind PCV1, mind PCV2 elleni ellenanyag jelenlétére. Pozitívítást egy esetben sem mutattak ki (Ellis és mtsai., 2001; Rodríguez-Arriola és mtsai., 2003a). Kuttyákból és macskákból sem lehetett ellenanyagot kimutatni (Rodríguez-Arriola és mtsai., 2003a), bár találtak kuttyában olyan vírust, amely a *Circovirus* genushoz sorolható. Ez a vírus egy, a nyuszt TTV-hez nagyon hasonló genomszakaszt is hordoz (Kapoor és mtsai., 2012), ami alapján felmerülhet az evolúciós rokonság. Azóta újabb kutya circovírust is leírtak nekrotizáló vasculitis és granulomatosis lymphadenitis hátterében (Li-L és mtsai., 2013).

A rágcsálók közül az egereket, mint kísérleti állatokat a PCV kutatásban is többször használták. Velük kapcsolatban az elsődleges cél, hogy a vírus betegségekben való szerepét, a vakcinák hatékonyságát vizsgálják kísérleti állatokon. Másodlagos célnak lehet tekinteni annak vizsgálatát, hogy a vírus egerekben fentmarad-e, lehet-e szerepe a kórokozó fenntartásában.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a vírus DNS egéroltas után kimutatható az állatokban. A vizsgálatok egyéb eredményei ellentmondásosak. PCV1 ellenanyag tekintetében pozitívítást (Tischer és mtsai., 1995a) és negatívítást (Allan és mtsai., 1994; Quintana és mtsai., 2002) is észleltek. PCV2 ellenanyagok tekintetében is hasonló volt a helyzet (Rodríguez-Arriola és mtsai., 2003a; Kiupel és mtsai., 2001; Quintana és mtsai., 2002).

PCV2 fertőzés után a fertőzésre jellemző mikroszkópos elváltozásokat a legtöbb esetben kimutatták, ezek hasonlóak voltak a sertésekben tapasztalhatókhöz: apoptózis, limfocita depléción, hisztiociták beszűródés volt megfigyelhető a lymphoid szervekben (Kiupel és mtsai., 2005; Li-J. és mtsai., 2010). Ugyanakkor egy tanulmány szerint (Quintana és mtsai., 2002) a PCV2 egerekben nem okoz mikroszkópos léziókat. Makroszkópos elváltozásokat egy esetet leszámítva nem találtak (Kiupel és mtsai., 2005; Opriessnig és mtsai., 2004; Li-J. és mtsai., 2010). Ebben az egy esetben (Deng és mtsai., 2011) a korábban megállapított kórszövettani elváltozások mellett intersticiális tüdőgyulladást, gliaproliferációt és a májban limfocita proliferációt mutattak ki. A vírus immunszuppresszív hatására utalhat, hogy abban az esetben, ha *Haemophilus parasuis* és *Streptococcus zooepidemicus* is fertőzték az egereket, akkor a morbiditás és mortalitás emelkedését tapasztalták (Deng és mtsai., 2011) a PCV-vel nem fertőzött egerekhez képest.

A vírus feltételezhetően replikálódik az egerekben, a bevitt vírus mennyisége növekszik (Opriessnig és mtsai., 2004), bár az oltást követően átmeneti titercsökkenés is

megfigyelhető (Cságola és mtsai., 2008a). Kísérletek során a mesterségesen fertőzött egerekkel kontaktusban lévő nem fertőzött egerekben is kimutatták a vírus nukleinsavat (Cságola és mtsai., 2008a; Li-J. és mtsai., 2010), vagyis a fertőzött állatok képesek a vírus ürítésére. Bár a vertikális transzmisszió jelensége nem egyértelmű, Kiupel és mtsai. (2001) kísérleti körülmények között fertőzött vemhes egerek magzataiban alacsony szintű vírusjelenlétet tudtak detektálni.

A kérődzők fogékonysága tekintetében az eredmények rendkívül ellentmondásosak. Szerológiai vizsgálatok alapján mind a PCV1, mind a PCV2 esetében negatív (Allan és mtsai., 1994; 2000; Ellis és mtsai., 2001) és pozitív (Tischer és mtsai., 1995a) eredményekről is beszámoltak.

Légzőszervi tüneteket mutató borjakból és vetélt szarvasmarha magzatokból sikerült circovírust kimutatni. A szekvencia elemzés alapján a vírus a PCV2-vel 99 %-nál nagyobb egyezést mutatott (Nayar és mtsai., 1999). Kísérletes állatfertőzések során (Allan és mtsai., 2000; Ellis és mtsai., 2001) és más természetes esetekben a víruskimutatás (Rodriguez-Arrijo és mtsai., 2003a) negatív eredménnyel zárult.

A legújabb kutatások a PCV2b patogenitását valószínűsítik olyan 1 hónapnál fiatalabb borjakban, ahol bőrvérzéseket és emésztőszervekben vérzéseket találtak. Szövetteni vizsgálatokkal minden esetben a csontvelői sejtek deplécióját mutatták ki, az esetek jelentős részében megfigyelhető volt limfocita depléció illetve gyulladás. Néhány esetben vérvizsgálat is történt, ami alapján aplasztikus pancitopéniát állapítottak meg, így a betegséget vérzéses betegség szindrómának (haemorrhagic disease syndrome) nevezték el (Kappe és mtsai., 2010). A háttérből sem baktériumot, sem toxint, sem más vírust nem mutattak ki, de PCV2b-hez hasonló vírust igen. Más kutatók szarvasmarha eredetű húsban szintén kimutatták a PCV2b jelenlétét (Li-L és mtsai., 2011), illetve korábban már cyclovírusokat is azonosítottak ilyen mintákban (Li-L és mtsai., 2010a). Mindezek megerősíthetik azt a feltételezést (Kappe és mtsai., 2010), hogy a PCV2b esetleg szélesebb körben is elterjedt a szarvasmarhákban és kórokozó szerepe is lehetséges.

6.5. Sertés circovírus okozta kártételek

6.5.1. Sertés circovírussal összefüggésbe hozható kórképek

A PCV2-vel összefüggésbe hozható kórképek korábban elterjedt és elfogadott elnevezését a következő kifejezésekre módosították (Segalés, 2012): szubklinikai PCV2 fertőzés (PCV2 subclinical infection), PCV2 okozta szisztémás megbetegedés (PCV2 systemic disease, PCV2-SD), PCV2 légzőszervi megbetegedés (PCV2 lung disease, PCV2-LD), PCV2 okozta emésztőszervi betegség (PCV2 enteric disease, PCV2-ED) és PCV2 okozta reprodukciós zavar (PCV2 reproductive disease, PCV2-RD). Dolgozatomban az új,

elfogadott elnevezést követem, ami a korábbi betegségeket is magába foglalja, így ebben a fejezetben elsősorban ennek az összefoglalása található.

Szerológiai felmérések bizonyítják, hogy a vírus világszerte jelen van, de klinikai tüneteket nem minden esetben okoz. Ez a **szubklinikai fertőzés** (Segalés, 2012) a vírus közvetett kártételei miatt jelentős. Tapasztalatok szerint hatékony vakcinázásra még szubklinikai fertőzésnél is szükség van, mivel javíthatja a termelési mutatókat (Young és mtsai., 2011). PCV-2 elleni vakcinázás hiányában szubklinikai fertőzés esetén más vakcinázások hatékonyságának csökkenése figyelhető meg (Opriessnig és mtsai., 2006). Szubklinikai fertőzés során a vírus kimutatható a szérumból (pl. kvalitatív valós idejű PCR-rel —qPCR—) 10^5 mennyiségnél kevesebb nukleinsav), kórszövettanilag enyhe limfocita depléción látható, ami miatt a fakultatív patogén mikroorganizmusok által okozott fertőzések esélye megnövekedhet.

Számos klinikai tünet háttérében feltételezik a PCV2 jelenlétét. Ezen betegségek közül a legjelentősebb a PMWS. Emellett a sertések dermatitis nephropathia tünetegyüttese (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS), reprodukciós elégtelenség, proliferatív—nekrotizáló tüdőgyulladás, más légzőszervi betegségek és bélgyulladás háttérben is megtalálták a vírust. A betegségeket egységesen a sertések circovírussal összefüggésbe hozható betegsége névvel (porcine circovirus-associated disease, PCVAD) jelölték (<http://www.aasv.org/>).

A korábban PMWS-nek nevezett kórkép új elnevezése **PCV2 okozta szisztémás megbetegedés**. Ebben az esetben az elsődleges tünetek nem specifikusak. Általánosságban láz, levertség, étvágytalanság mellett az állomány termelési mutatóinak romlása figyelhető meg: az állomány szétnő, a takarmányhasznosulás romlik, súlyvesztés figyelhető meg, az állatok bőre halványabb, illetve helyenként cianotikus. Légzőszervi (neheztett, szapora légzés, köhögés) és emésztőszervi (hasmenés) tünetek mellett sárgaság is megfigyelhető egyes esetekben. A kórkép előrehaladtával a betegségre nagyon jellemző, ún. csökkent (fejlődésben visszamaradt, fénytelen, durva szőrű) malacokat lehet látni. A nyirokcsomók (pl. a Inn. inguinales superficiales) testszerte megnagyobbodnak. Az állomány 4—30 %-a betegszik meg, a mortalitás 4—20 % közötti. Az elhullott egyedekben kórbonctanilag a megnagyobbodott, helyenként véresen beivódott illetve elhalásokat tartalmazó nyirokcsomók mellett a veseelváltozások szembetűnőek, itt interstitialis nephritisre jellemző szürkésfehér tarkázottságot lehet megfigyelni, elsősorban a kéregállományban. A máj rendszerint megkisebbedett, sárgásan elszíneződött, a lépben diffúz megnagyobbodás mellett infarktuszok is előfordulhatnak. A tüdő nem esik össze, elszórtan sötétvörös lebenyek láthatók az állományában, a sövények savós beszűrődéstől megszélesbedettek. A savós testüregekben alvadásra hajlamos, szalmasárga savó

halmozódik fel. A gyakori másodlagos bakteriális fertőzések részben elfedhetik a fenti az elváltozásokat. Kórszövettanilag a legjellemzőbb elváltozások a nyirokszervekben láthatók, ahol a lymphoid sejtalakok pusztulása és hisztiocita-proliferáció figyelhető meg. Gyakori a többmagvú óriássejtek sarjadzása, a hisztiociták citoplazmájában esetenként basophil, szőlőfürtszerű (botryoid) zárványok figyelhető meg. A vesében interstitialis nephritis figyelhető meg, a májban atrophia és nem-gennyes hepatitis jelentkezik, a májlebenyékben apoptózissal, illetve perilobuláris fibrózissal. A tüdőben az interstitialis ödémán túl jellemzően proliferatív típusú peribronchiolaris–peribronchialis interstitialis pneumonia figyelhető meg, de elhalásos bronchiolitis, illetve proliferatív—nekrotizáló pneumónia is előfordulhat. A belekben elsősorban a nyirokképletekben granulomatosus gyulladás figyelhető meg. A lymphoid szövetekben általában nagy, más szövetekben változó mennyiségben vírus mutatható ki.

A **PCV2 okozta légzőszervi megbetegedés** esetében vezető tünetként súlyos fokú nehezített légzés, köhögés figyelhető meg. A tüdőben a PCV2 mennyisége megnő, míg a lymphoid szervekben nem feltétlenül van elváltozás, a vírust sem lehet minden esetben kimutatni. A tüdőbeli elváltozások a fentiekben leírtak szerint alakulnak, így megfigyelhető proliferatív jellegű interstitialis pneumonia fibrosissal vagy anélkül, bronchiolitis, proliferatív-elhalásos pneumonia. A PCV2 mellett más kórokozók is szerepet kapnak, így módosítva a kórbonctani-kórszövettani képet. A PCV2 leggyakrabban PRRSV-vel, SIV-vel, illetve baktériumokkal (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycolasma hyopneumoniae*) együtt fordul elő (Thacker, 2001; Kim és mtsai., 2003).

A **PCV2 okozta emésztőszervi betegség** hasmenéssel illetve bélgyulladással, a bélfal nyirokszöveteiben lymphoid deplécióval jár. A kórbonctani makroszkópos lelet nem specifikus, a bélfodri nyirokcsomók megnagyobbodása mellett hurutos bélgyulladást lehet megfigyelni, esetenként előfordulhat elhalásos colitis is. A tüdőbeli elváltozásokhoz hasonlóan ennél a kórképnél is a vírus elsősorban a bél nyirokképleteiből mutatható ki.. A bélbeli PCV2 fertőzéshez gyakran társul *Salmonella enterocolitis*, illetve *Balantidium coli* jelenléte is sok esetben kimutatható a vastagbél kórszövettani vizsgálatával (Biksi, 2014; személyes közlés).

A **PCV2 okozta reprodukciós zavar** esetében a magzatokban figyelhető meg elváltozás a vemhesség késői szakaszában, míg a kocákban a fertőzés tünetmentes. A magzatokban limfo-hisztiocitás szívizomgyulladást, következményes szívmeagnagyobbodást lehet megfigyelni. Az elváltozásokból a vírust nagy mennyiségben ki lehet mutatni (ez itt kórjelző értékű). A szívbeli elváltozások miatt kialakuló vérkeringési zavar jelei a bőr alatti kötőszövet diffúz vizenyője (anasarca), a testüregekbeli folyadék felhalmozódása, a máj pangásos bővérősége. A termékenyítés során bekövetkező fertőződést ciklusban történő visszaivarzás kísérheti. A PCV-2 fertőzés fogékony süldőkben okozhat reprodukciós zavart,

ma már a fertőzöttség és a vakcinázás elterjedésével jelentősége minimális. Kísérletes fertőzések során azt állapították meg, hogy a kanok ürítik a circovírust az ondóval és a vírustól mentes kocák és malacik az ondó vírustartalmától függően betegednek meg, vagy maradnak tünetmentesek (Grasland és mtsai., 2013).

A **PDNS** (porcine dermatitis nephropathia syndrome) elnevezés az új nevezéktan szerint sem változott meg. Ez a betegség tulajdonképpen egy III. típusú túlérzékenységi reakció (Sierra és mtsai., 1997; Wellenberg és mtsai., 2004). A károsító hatásban a vírus közvetetten vesz részt, úgy, hogy a kiemelkedően magas ellenanyagszint jelenlétében immunkomplexek alakulnak ki, melyek a kapillárisok alaphártyáján, így a vese glomerulusaiban, illetve a bőr ereiben lerakódnak, ami a komplement rendszer következményes aktiválódása miatt helyi gyulladásos reakciót, vérérfal-károsodást, thrombost idéz elő. Emellett a celluláris immunválasznak is szerepe lehet, mivel a citotoxikus sejtek számának emelkedése is megfigyelhető a vesében (Wellenberg és mtsai., 2004). A kórképhez köthető leglátványosabb elváltozás a bőrön figyelhető meg, ahol szabálytalan vöröses, olykor lilás, kiemelkedő foltok jelennek meg, elsősorban a hátulsó végtagokon, a végbél környékén, sok esetben a has, mellkas bőrén és a füleken is. Az elváltozások hámszövetet ellátó vérerekben kialakult fibrinoid necrózisnak, és vérerek thrombotizálásának köszönhető. Emellett étvágytalanság, láz, levertség jelentkezik, hasmenéssel, nehezített légzéssel. A tünetegyüttes bármely korcsoportban előfordulhat, de idősebb állatokban (hízókban) gyakrabban figyelték meg. A nyirokcsomók megnagyobbodása (főképp a felületes lágyéki nyirokcsomóké) itt is megfigyelhető. Az immunkomplex lerakódás a vesékben is kifejezett: a megnagyobbodott, halvány, bőnedvű vesék kéregállományában szabad szemmel petechiális vérzések láthatók. Mikroszkóposan exudatív glomerulonephritis, nem-gennyes intersticiális nephritis látható, kitágult tubulusokkal. Időnként lépinfarktust is lehet tapasztalni, szintén a trombotizált erek miatt. Limfocita depléció nem minden esetben figyelhető meg, a vírus mennyisége a lymphoid szövetekben alacsony.

6.5.2. Sertés circovírus és az immunszuppresszió

A vírus a legjelentősebb károkat az immunrendszerben okozza, aminek a következménye a változó súlyosságú, de minden fertőzött állatban megjelenő immunszuppresszió. Az immunszuppresszió jelei a limfocita depléció és a nyirokszervek proliferatív-granulomatosis gyulladása. (Júnior és mtsai., 2012). A limfociták depléciója a fenti kórformák mindegyikében kialakul, így ezt az elváltozást részletesen is érdemes bemutatni. A vírusreplikáció a fertőzési kapuhoz tartozó nyirokcsomók (leggyakrabban a hörgők körüli nyirokcsomók) limfocitáiban zajlik a fertőződés korai szakaszában (Yu-S és mtsai., 2007). A nyirokszervek perifollicularis zónájában először a B-limfociták érintettek,

majd a folliculusokra kiterjedve a T-sejtek is, így általános limfocitaszám-csökkenés alakul ki (Sarli és mtsai., 2001; Shibahara és mtsai., 2000), amit a nyirokszövetekben történő vírusreplikáció vagy a vírus indukálta apoptózis vált ki (Júnior és mtsai., 2012). Ezeket az elváltozásokat kíséri a makrofágok (hisztiociták) és óriássejtek megszaporodása, amelyek citoplazma-zárvaiból a vírus kimutatható (Sarli és mtsai., 2001; Shibahara és mtsai., 2000). A vírusakkumuláció a zárvaokban a fagocitózis fokozott aktivitását eredményezheti (Todd, 2004), de ezekben a sejtekben a virion emésztése nem megy végbe, ugyanis a fagoszóma a lizoszómával nem képes egyesülni.

A perifériás vér mononukleáris sejtjeiben szaporodó vírusnak inkább a perzisztens fertőzések során van jelentősége (Yu-S és mtsai., 2007). A vírus nem mutat direkt citotoxicitást, a PCV2 megakadályozza a citokinek oxigén-függő hatásait (a fertőzött makrofágok O_2 és H_2O_2 termelése elégtelen), ami a másodlagos fertőzések számára kedvezőbb utat biztosít (Júnior és mtsai., 2012). A citokinek, legfőképp az interleukinek képződésének csökkenése (Sipos és mtsai., 2004) is jelzi, hogy az immunrendszer működése csökkent, ami nemcsak másodlagos fertőzéseknek nyithat utat, hanem a vakcinázások hatékonyságát is csökkentheti (Opriessnig és mtsai., 2006). Számos olyan kórokozót ismerünk, amelyek gyakrabban okoznak betegséget a PCV2 által immunszuppresszált sertésekben, ilyenek a PRRSV, a SIV, a TTV, az *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a *Pasteurella multocida*, a *Mycolasma hyopneumoniae*, a *Streptococcus* és *Staphylococcus* fajok (Thacker, 2001; Kim és mtsai., 2003).

7. ANYAG ÉS MÓDSZER

7.1. A vizsgálati minták származása

7.1.1. Közép-európai PCV felméréshez gyűjtött minták

A mintagyűjtés során Magyarország 20, Románia 13, Szerbia 7 és Horvátország 28 telepéről érkeztek sertés szervek, Lengyelországból pedig összesen 14 telepről kaptunk tisztított DNS-t. Sajnos sem Csehországból, sem Szlovákiából nem sikerült mintához jutnunk, és a GenBankban sem találtunk elérhető, friss (2007 utáni) szekvencia adatokat. A szervminták elsősorban tüdőből, májból, lépéből, veséből és nyirokcsomóból származtak, azonban volt közöttük néhány magzat illetve magzati szerv is. 2012-ben és 2013-ban gyűjtött mintákat használtunk fel, kivételt képeztek a horvátországi minták, amelyek közül a későbbiekben genbanki számukon említett (11 db) szekvenciák 2008-ból és 2009-ből származtak.

A magyarországi minták mindegyike PCV2 pozitív telepről származott, ezek betegségben (nem feltétlenül PCV2-vel összefüggésben) elhullott állatok szervei voltak. A romániai minták olyan telepekről származtak, ahol az állatok a PMWS klinikai tüneteit mutatták. A többi mintával kapcsolatban nem állt rendelkezésünkre ilyen információ, illetve más állategészségügyi háttéradatot sem kaptunk. A vakcinázási protokollokat nem ismerjük, az elkészült 5 magyar PCV2 DNS szekvencia esetében tudjuk, hogy a származási helyükön, a telepeken, circovírus elleni vakcinázást folytatnak.

Erdélyből a házi sertések mellett vaddisznó mintákat is kaptunk. Minden állatból érkezett nyirokcsomó, tüdő, vese, lép és máj. A vaddisznó eredetű minták (összesen 842) három különböző vadászidényben kerültek begyűjtésre (2006/2007, 2007/2008 és 2010/2011) Erdély megyéiből, kivétel Krassó-Szörény területét.

7.1.2. Rágcsálók

7.1.2.1. Természetes élőhelyről származó rágcsálók

Két, egymástól megközelítőleg 40 km távolságra lévő, de egymástól független, magyarországi, PCV2-vel fertőzött sertéstelepről származott 19 egér (*Mus musculus* és *Mus agrarius*) és 21 vándorpatkány (*Rattus norvegicus*) fagyasztott teteme. A rágcsálók kártevőirtás keretein belül, bromadiolon hatóanyagú rágcsálóirtó szer használatával lettek exterminálva. Egy háziegeret élve fogó csapdával fogtak, ezt a laboratóriumban az állatvédelmi szabályoknak megfelelően extermináltuk. A rágcsálók életkora ismeretlen, de méretük alapján kivétel nélkül felnőtt egyedek voltak.

Összesen 16, sertésteleppel illetve PCV2-vel összefüggésbe nem hozható területről származó sárganyakú erdei egérből (*Apodemus flavicollis*), háziegérből (*Mus musculus*) és 9

mezei pocokból (*Microtus arvalis*) származó DNS mintát is vizsgáltunk, amelyeket dr.Gyuranecz Miklós bocsátott rendelkezésünkre.

Az egerekben lévő vírusok összehasonlítása céljából az egyik sertéstelepről származó 10 sertés hörgőkörüli nyirokcsomó és tüdő mintáit (vágóhídról származó) is analizáltuk.

Az állatok súlyát és ivarát feljegyeztük, továbbá a vemhes anyáknál a magzatok számát meghatároztuk. Vizsgálatainkhoz a szervminták a következők voltak: tüdő, szív, máj, vesék, lép, nyirokcsomók (térdfajlati, belfodri és hörgő körüli), izmok. Abban az esetben, ha az állatot vemhesnek találtuk (összesen 3 egér és 9 patkány esetében), akkor egy anya magzatait egy mintaként kezeltük függetlenül a magzatok számától, korától.

A jobb átláthatóság kedvéért a sertéstelepi egereket és patkányokat csoportosítottuk a gyűjtési idő és hely szerint (1. táblázat). A patkányok esetében csak a hely alapján csoportosítottunk, mert „A” telepről 3 időpontban érkeztek patkányok, és a kis létszámú csoportok esetében nem lett volna értelme külön csoportosítani. Az egereket és patkányokat a csoportosításuk alapján számoztuk be.

1. Táblázat. A sertéstelepekről (A és B) befogott rágcsálók csoportosítása.

Csoport	1	2	3	4	5	6	7	8
állatfaj	egér	egér	egér	egér	egér	patkány	patkány	sertés
telep	A/a	A/b	B	A/a	A/b	A/b	B	A/b
szám	4	5	1	4	6	9	12	10

Az A telepen belül 2, egymástól 6 km-re lévő telephely található: A/a tenyész-, míg A/b hízótelep. A sertés eredetű minták egészséges sertések vágóhídról származó tüdő és nyirokcsomó-mintái.

7.1.2.2. Kísérleti állatok és a kísérleti elrendezés

A kísérlet során összesen harminc, egyenként 21—24 g-os CRL: NMRI BR, 6 hetes nőtény fehér egeret használtunk, amelyeket a TOXI-COOP ZRT KKT-től (Budapest) vásároltunk három alkalommal (két szállítás között 8 hét telt el), turnusonként 10 egeret.

Az első csoportból 5 egeret az érkezést követő napon (2012. 07. 20.) egyedenként 0,5 ml (minimum 5×10^3 TCID₅₀), szövettenyészetben elszaporított PCV2-vel fertőztünk intraperitoneálisan. Ezen a napon az egereket összeengedtük nem oltott (jelölt) társaikkal. A 0. passzázs állatait a 27. napon (2012. 08. 16.) extermináltuk. Az állatok életének az állatvédelmi szabályoknak megfelelő módon történt kioltása után a csecsemőmirigyből, lépből, veséből, májból, tüdőből és szívből mintát vettünk. A szervmintákat eldörzsöltük, majd a dörzsölék egy részéből DNS-t vontunk ki (I. később) nukleinsav amplifikációs célokra, másik részét tovább oltottuk fogékony egerekbe (a beoltáskor a szervdörzsölék szívet és

tüdőt nem tartalmazott, azok alacsony vírustartalma miatt). Felhasználásig a szervdörzsöléseket -20 °C-on tároltuk.

A legmagasabb titert mutató állatból származó szervdörzsöléket felolvasztottuk, majd kétszeri fagyasztás/olvasztás-t követően 5 percig centrifugáltuk (3500 xg), ezt követően a felülúszót 10000 xg-n 2 percig ismételtén centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk és azonos térfogatú antibiotikum (milliliterenként: 10000 egység penicillin és 100 mg sztreptomycin) tartalmú PBS-sel (foszfáttal pufferolt sóoldat) kevertük, majd a következő 5 állat hasüregébe oltottunk belőle 0,5—0,5 ml-t. Az állatkísérleteket úgy időzítettük, hogy a fertőzést követő 28. napon érkezzen a következő 10 egér, amelyeket két csoportba osztottunk. A 27. napon az első passzázs állatait extermináltuk és a fent leírtakhoz hasonlóan beoltottuk a 3. csoportot. Összesen 5 egér passzázszt végeztünk. A 0. passzázs egereiből vettünk szív és tüdőmintát is a csecsemőmirigy-, lép-, vese-, májminták mellé. Ebben az egy esetben külön, szervenként is kivontuk a nukleinsavat. A többi esetben a különféle szerveket összekeverve egy mintaként kezeltük. A külön kivont DNS minták esetében is elvégeztük a PCR reakciót, hogy megnézzük, mely szerveket érdemes a további víruspasszáláshoz felhasználni. A szív és tüdőmintákból nyert DNS-ből azonban kis mennyiségű vírust mutattunk ki, ezért ezeket a szerveket kihagytuk a passzálásból.

7.1.3. Circovírus kimutatása más állatfajokból

7.1.3.1. A vizsgálati minták származása

Először 138, különböző helyről és időből származó mintát vizsgáltunk meg circovírusok jelenlétére, amelyek között 74 db hulló és kételtű, valamint 63 hal és egy halliszt minta volt. A minták jelentős része fagyasztva, más részük alkoholban fixálva került a laboratóriumba a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékéről boncolás után, illetve kisállatkereskedésekből, valamint az Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézet (ÁOTKI) halkórtani csoportjától egész hullaként. A boncolást ebben az esetben a laboratóriumban végeztük el, fényképes dokumentációval kiegészítve.

A vizsgált minták közül márnaivadékokból (*Barbus barbus*) sikerült (nem PCV2) circovírus DNS-t kimutatnunk. Az ivadékok egy magyarországi halkeltetőből származtak. A keltetőben a Dunából fogott (nem mesterségesen szaporított) halak adták a tenyészállatokat. A kikelt ivadékokat a többi halnál bevált módszerrel nevelték, azonban a vártnál nagyobb mértékű pusztulást figyeltek meg. A diagnosztikával foglalkozó szakemberek nem találtak okot a nagymérvű elhullásra (szinte a teljes állomány elpusztult), így a keltetőben technikai problémára gyanakodtak, és felhagytak a későbbiekben a halak mesterséges szaporításával. Ezért a mintagyűjtés második körében a mintagyűjtést kiterjesztettük a Dunában fellelhető márnákra. Így további 18 ismeretlen korú, de mérete alapján felnőtt

márnát vizsgáltunk. A márnákat helyi horgászoktól és halászoktól kaptuk. A halakból származó vizsgálati minták máj, szív, bél, vese, lép, vér, kopolyú, izom és ikra voltak.

A 2011-es év során a balatoni lesőharcsák (*Silurus glanis*) szokottnál nagyobb mértékű pusztulására figyeltek fel az ívási időszakban. A kórbonctani vizsgálatok során jellegtelen elváltozásokat tapasztaltak, és a parazitológiai, bakteriológiai és virológiai vizsgálat negatív eredményt mutatott. Kórszövettan alapján toxikózis gyanúja merült fel, ám megerősíteni nem lehetett. Végül a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságán (ÁDI) három lesőharcsa vizsgált mintáiban circovírust mutattak ki és ezeket a pozitív mintákat Dr. Dán Ádám rendelkezésünkre bocsátotta további vizsgálatok céljára. A három esetből kettőnél az amplifikált rövid szakasz szekvenenciaanalízisét is elvégezték, ennek eredményét szintén rendelkezésünkre bocsátották.

7.1.3.2. Szarvasmarha vérsavók származása

Egy olyan állattartó telepről, ahol egy másik kutatásunk keretében új típusú sertés parvovírusok és PCV2 jelenlétét vizsgáltuk, 3 db növendék szarvasmarha vérsavó mintát kaptunk. Ezen a telepen hízósertésekkel közös istállóban tartanak teheneket borjaikkal és növendék szarvasmarhákat is. A két faj egy légtérben található, de az állatok között közvetlen kapcsolat nincs. A növendék állatoknál nyálkás-véres hasmenés volt megfigyelhető. Az ÁDI vizsgálata alapján a szarvasmarhák vírusos hasmenését okozó vírust nem sikerült kimutatni az állatokból. Korábbi vizsgálataink alapján tudtuk azt, hogy a sertések PCV2 pozitívak a telepen. A szakirodalom (Kappe és mtsai., 2010) alapján felmerült a gyanú, hogy az állatok PCV2 fertőzöttek lehetnek. A többi korosztály állatai tünetmentesnek bizonyultak, így csak a növendékekből kaptunk mintákat. Az állatok tartási körülményei (kötetlen tartás) miatt a bélsár vételét a gondozók nem vállalták, így csak vérminta vételére került sor. Mindhárom vérsavót -80 °C-on tároltuk további felhasználásig. A későbbiekben az állatok tünetmentessé váltak, így több minta már nem érkezett.

7.2. Vírus nukleinsav kivonása szervmintákból

7.2.1. Mikrogyantás DNS kivonás

A sertéslepepekről érkező egerek és patkányok szerveiből való DNS tisztításhoz a Chelex[®] 100 Molecular Biology Grade Resin (Biorad, USA) gyantát használtuk, a gyártó leírásának megfelelően. A kivonás a következő lépéseket tartalmazta: kiindulásként a szervekből lehetőség szerint borsónyit vágunk ki, az egy állatból származó nyirokcsomókat összevontuk. Szervenként külön Petri-csészében egy fecskendő végének segítségével eldörzsöltük a mintát, majd ehhez 1—1 ml, kétszer desztillált vizet mértünk. Az így nyert

szuszpenzióhoz tettük hozzá a kb. borsnyi mennyiségű mikrogyantát és kémcsőkeverő (Vortex) segítségével összekevertük. Ezek után 20 percig 65 °C -on tartottuk, majd 10 percig forraltuk, végül felhasználás előtt legalább 5 percig -20 °C -ra lefagyasztottuk, illetve így tároltuk. A tisztított DNS-t rövid centrifugálást (10000 xg) követően használtuk PCR reakcióhoz. Mivel az így nyert DNS nem bizonyult kellően tisztának, ezért az előzőekben leírt módszerrel kinyert nukleinsavat a QIAGEN QIAamp® DNA Blood Mini kittel (Qiagene, Németország) a gyártó ajánlása szerint még egyszer kitisztítottuk, ha a PCR terméket szekvenálni akartuk. Ebben az esetben kiindulási anyagként 200 µl gyantával tisztított, centrifugált DNS kivonatot használtunk, amit 5 µl Proteinase K (Fermentas, Litvánia) és 200 µl lízis puffer hozzáadása után 10 percig 56 °C -on inkubáltunk. Ezt követően 200 µl mennyiségű, 96 %-os töménységű alkoholt adtunk a lizátumhoz, majd DNS megkötésére alkalmas szűrőt tartalmazó oszlopon centrifugáltuk át, 6000 xg sebességgel. Az oszlopra kötődött DNS mosása ezután 500—500 µl 54,5 %, illetve 67 % etanol tartalmú mosófolyadékkal történt 10000 xg centrifugálással, majd a maradék alkohol eltávolítása is ilyen gyorsulás mellett történt. A szűrőről a DNS-t 37 °C -os steril, kétszer desztillált vízzel oldottuk le, az eljárás végeredményeként mintánként 50 µl tisztított DNS-t kaptunk.

7.2.2. DNS kivonás Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit segítségével

A halakból érkezett szervmintákból a DNS-t a Viral Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Korea) segítségével vontuk ki, a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden a következő lépéseket követtük: minden szervből kb. borsónyi nagyságú darabot vágunk ki, majd a fentebb leírt módon homogenizáltuk 250 µl steril, kétszer desztillált vízben. Ennek a folyadék részéből 150 µl-nyit összekevertünk 250 µl lízis pufferrel. Tíz percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, ezután a nukleinsav megkötését biztosító pufferrel (350 µl) összekeverve, a DNS-kötő filtert tartalmazó oszlopon átcentrifugáltuk az oldatot. Ezt követően kétszer mostuk mosófolyadékkal (500—500 µl „A” majd „B” mosófolyadék, a „B” puffer esetében a koncentrált folyadékhoz előzetesen négyszeres mennyiségű 96 %-os etanolt kevertünk), a maradék alkohol eltávolítására az üres csöveket ismételtén centrifugáltuk, majd 50 µl 37 °C-os, kétszer desztillált vízzel leoldottuk a szűrőkre kötődött DNS-t. A centrifugálások 10000 xg gyorsuláson történtek 1 percig. A leoldott DNS-t további felhasználásig -20 °C -on tároltuk.

7.2.3. DNS kivonás InnuPREP Virus DNA/RNA Kit segítségével

A Közép-Európában előforduló circovírusok genetikai változásainak a felméréséhez és az egér fertőzési kísérlet során is az InnuPREP Virus DNA/RNA Kitet (Analytik Jena AG, Németország) használtuk, a gyártó szervmintákból történő DNS tisztításra vonatkozó ajánlásainak megfelelően. Az egérikísérlethez valamennyi egérből a következő

szervhomogenizátumot készítettük el: 0,5 g lép, 0,5 g máj, 0,5 g vese és 0,1 g csecsemőmirigy 3—3 ml kétszer desztillált vízben. (Ebben az esetben a mintákat pontosan lemértük, hogy a kísérlet reprodukálható legyen.) Ennek a folyadék részéből 150 µl-nyit összekevertünk 450 µl lízis pufferrel. A sertésmintáknál a leírásnak megfelelően a borsónyi szervdarabot szikepengével apróra vágtuk, majd ehhez mértük hozzá a lízis puffert. Harmincpercnyi szobahőmérsékletű inkubáció után a 450 µl lizátumot olyan azonos térfogatú pufferrel kevertük össze, ami a DNS-t a tisztító oszlopban található filter membránjához köti. Ezt két adagban centrifugáltuk át a filtert tartalmazó csöveken 10000 xg-n 1 percig. Ezután kétszer mostuk mosófolyadékkal (először 500 µl 48 % etanolt tartalmazó pufferrel, majd 650 µl 19,2 % etanolt tartalmazó folyadékkal) 10000 xg-n 1 percig, a maradék alkoholt az üres csövekből 10000 xg centrifugálással távolítottuk el 2 perc alatt. Végül 50 µl 37 °C-os, kétszer desztillált vízzel leoldottuk a szűrőre kötött DNS-t. A vírus DNS-t felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A beérkezett szarvasmarha vérsavókból a DNS-t (150—150 µl) az Analytik Jena innuPREP Virus DNA/RNA Kit szérum és plazma minták feldolgozására ajánlott protokolljának megfelelően tisztítottuk ki, ami megfelel az előbb leírtaknak, azzal a kivétellel, hogy az emésztéshez szükséges inkubációs idő ez esetben 15 perc volt. A kapott nukleinsav kivonat 5 µl-ét használtuk RNS-ről történő DNS átírásra a Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas, Litvánia) segítségével a gyártónak a szarvasmarhák vírusos hasmenése vírusának detektálására ajánlott előírásainak megfelelően eljárva (nem mutatott adat). A megmaradt DNS/RNS-t 4 °C-on tároltuk.

7.2.4. A kivont DNS-ként kapott minták

Az Erdélyből érkezett vaddisznómintákat az ÁDI Molekuláris Biológiai Osztályán dolgozták fel a Qiagen Tissue-Lyser homogenizátor (Németország), az X-tractor Gene nukleinsav tisztító automa robot (Corbett Robotics Pty. Ltd., Ausztrália) és a Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel, Németország) segítségével a leírásoknak megfelelően, a DNS emésztési lépés kihagyásával.

A horvátországi PCV2 minták evolúciós vizsgálataihoz a DNS feltárása a QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Németország) segítségével történt Horvátországban.

7.3. Vírus nukleinsav amplifikálás

A nukleinsav felsokszorozáshoz leggyakrabban konvencionális PCR-t használtunk. Ezen kívül mennyiségi meghatározásra qPCR-t és kevés templát esetében, illetve a circovírusok szélesebb körének kimutatására fészkes (nested) rendszereket is alkalmaztunk. Ebben a részben a három módszert a szakirodalomban leírt primerek használata esetén általánosságban mutatom be, majd a saját fejlesztésű rendszereket részleteiben ismertetem.

7.3.1. Konvencionális PCR

A tisztított DNS mintákat PCR segítségével vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas, Litvánia) enzimet használtuk. Az enzimhez javasolt puffer zöld festéket tartalmazó loadoló puffert és $MgCl_2$ -ot tartalmazott. Az enzimhez szintelen, $MgCl_2$ -mentes puffer is forgalomban van. Ezutóbbi puffert használtuk a vadonból befogott rágcsálók konvencionális PCR vizsgálata során, amikor a zöld festéket tartalmazó PCR puffer még nem volt forgalomban. Ilyenkor mintánként 3 μ l 25 mM-os $MgCl_2$ -dal egészítettük ki a reakcióelegyet. Vizsgálataink megkezdésekor a primereket a BIOMI Kft-től (Gödöllő), később a Sigma-Aldrich-től (USA) rendeltük.

A PCR reakcióelegy összetevőit az 2. táblázat tartalmazza:

2. Táblázat. A PCR reakcióelegy összetétele.

Térfogat v. mennyiség	Összetevő	Koncentráció	Gyártó
1 μ l	vizsgálandó DNS minta	nem ismeretes	-
5 μ l	10x Taq puffer	-	Fermentas, Litvánia
1 μ l	dNTP (dNTP Set, 100 mM Solutions) *	1 mM	
1—1 μ l	primerek	25 μ M	Sigma-Aldrich, USA
1—3 U	Taq DNS- polimeráz enzim **	1—5 U/ μ l	Fermentas, Litvánia
50 μ l-ig	steril, kétszer desztillált víz	-	-

Az U nemzetközi egységet jelent.

*: ha a várható termék 800 nt feletti, akkor kétszeres mennyiséget használtunk

** : a várható termék hosszától függően

Az amplifikációt TGradient Thermocycler (Biometra, Németország) géppel végeztük. A reakció során a következő kondíciókat alkalmaztuk: nukleinsav előmelegítése 95 °C-on 10 percig, majd 35—45 cikluson keresztül: 95 °C, 30 másodperc; 52—60 °C, 30 másodperc; 72 °C, 45—120 másodperc (a várható termék hosszától függően). Legvégül egy végső lánchosszabbítási szakasz következett 72 °C-on 7 percig. A ciklusok számát az általunk várt DNS mennyiségétől tettük függővé, sertéseknél 35, egereknél, szarvasmarhánál 45 ciklust alkalmaztunk. A vizsgálatokhoz használt primerek leírását a 3. táblázat tartalmazza, a hivatkozásokban a reakciók pontos menete is megtalálható.

3. Táblázat. A circovírus vizsgálatokhoz használt primerek adatai.

primer neve	szekvenciája	iránya	használat	referencia
MCV1	5'-GCTGAACTTTTGAAAGTGAGCGGG-3'	F	sertés, egér, szarvasmarha	Fenaux és mtsai., 2000
MCV2	5'-TCACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3'	R		
CVS	5'-AGAGGTGGGTCTTCACNHTBAAYAA-3'	F	sertés, egér, halak, szarvasmarha	Halami és mtsai., 2008
CVaS	5'-AAGGCAGCCACCCRTARAARTCRTC-3'	R		
CNS	5'-AGCAAGGAACCCCTCAYYTBARGG-3'	F		
CNaS	5'-ACGATGACTTCNGTCTTSMARTCACG-3'	R		
CBB1J	5'-GCTGCCACATCGAGAA-3'	F	sertés, egér, szarvasmarha	Cságola és mtsai., 2006
CBB2	5'-CGCACCTTCGGATATAC-3'	R		
CBB3	5'-GCTCTCCAACAAGGTACT-3'	R		
CSz2	5'-GGAGGAGTAGTTTACATAGGGG-3'	F		
CSz1	5'-ACTACTCCTCCCGCCATAC-3'	F		
Ci2SLF	5'-TAAGTATTACCAGCGCACTTCG-3'	F	Közép-Európa, sertés felmérés, egér	Meehan és mtsai., 2001
Ci2SLR	5'-AGCGCACTTCTTTTCGTTTTTC-3'	R		
PCII-F	5'-CTCGATCTCAAGGACAACG-3'	F	egér	Molnár és mtsai., 2002
PCII-R	5'-ACAGCAGTTGAGGAGTACC -3'	R		
PCII40F	5'-GACAGTATATCCGAAGGTGC-3'	F	Közép-Európa, sertés felmérés, egér	Dán és mtsai., 2003
PCII40R	5'-GTAGACAGGTCACTCCGTTG-3'	R		
Ci2EcoF	5'-AGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTC-3'	F		
Ci2EcoR	5'-TGAATTCTGGCCCTGCTCC-3'	R	egér	
CORF2F	5'-ACGTATCCAAGGAGGCGT-3'	F	Erdély, sertés felmérés, egér	Cadar és mtsai., 2012
CORF2R	5'-TACATACATGGTTACACGGATATT-3'	R		
MTL	5'-GTGATTACGCCAACGTGATG-3'	F	márna	Lőrincz és mtsai., 2011
MTR	5'-GCCCTTTGTGCAGTATTCGT-3'	R		
BaCVF	5'-AGGCGATAGACGTTGTGAAG-3'	F		
BaCVR	5'-CTTGTCCATCGTATCCATCC-3'	R		nem publikált
HTF	5'-CAGACCATGCTTCCGGTACT-3'	F		
HTR	5'-GGGCTTCTCGAAGGTTATC-3'	R	lesőharcsa	Lőrincz és mtsai., 2012

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

A PCV2 és a PCV1 kimutatására az MCV1—MCV2 primereket (Fenaux és mtsai., 2000) használtuk. A primer tapadásához 55 °C-on 30 másodperc, míg a lánchosszabításhoz 45 másodperc elegendőnek bizonyult. A Közép-Európát érintő felméréseknél és a szarvasmarha vérsavóknál a sertés circovírus kimutatása volt a cél, tekintet nélkül a PCV típusára.

A primerpár egy erősen konzervatív circovírus genomszakaszon kötődik, ezért feltételeztük, hogy egerekben is képes a sertés vírusokat, vagy egy esetleges PCV őst kimutatni. Mivel nem voltunk teljesen biztosak abban, hogy az egerekben sertés vírus van jelen, ezért a primer tapadási hőmérsékletét 55 °C-ról 53 °C-ra változtattuk, és a tapadási időt 45 másodpercre növeltük. Az így kapott amplikonok szekvenálását is elvégeztük a következő esetekben: 1 számú (sz.) és 2. sz. egér (az 1. csoportból), 5. sz. egér (2. csoportból), 10. sz. egér (3. csoportból), 2. sz. patkány (6. csoportból), 13. sz. és 17. sz. patkány (7. csoportból) és végül a 10. sz. sertés (a 8. csoportból).

A diagnosztikai célú vizsgálatok során gyakran használt primerpár a CBB2—CSz2 párosítás (Cságola és mtsai., 2006) is, amely a PCV2 típusra specifikus. Ezt használtuk a közép-európai vizsgálatok esetében is, hogy a PCV pozitív mintákból kiszűrjük az esetleges PCV1 vírusokat. A vadon élő rágcsálók esetében szekvencia elemzésre alkalmaztuk a 2. sz. egér (1. csoport), a 10. sz. egér (3. csoport), a 2. sz. és 5. sz. patkány (6. csoport) és a 10. sz. sertés esetében. A primerpárnál 55 °C-os primer tapadási hőmérséklet bizonyult az ideálisnak.

A teljes genom szekvenálásához majdnem minden esetben a CBB1J—CBB2 és CSz2—CBB3 primerpárokat használtuk (Cságola és mtsai., 2006). Ezek a párosok megbízhatóan működtek, így csak néhány esetben volt szükséges ezektől eltérni. A CBB1J—CBB2 52 °C-on, míg a CSz2—CBB3 55 °C-on működött leghatékonyabban. Mivel mindkét termék elég hosszú, így a lánchosszabítási időre 90 másodpercet hagytunk. A Közép-Európából érkező mintáknál, valamint egyes magyarországi és romániai minták esetében az előbbiektől eltérő primerpárosítást is alkalmaztunk. Ezek a Ci2SLF és Ci2SLR (Meehan és mtsai., 2001) primerpár volt, kiegészítve a PCII40F és a PCII40R (Dán és mtsai., 2003) primerpárral, valamint a CBB1J helyett a Ci2SLF primert használtuk a CBB2 reverz primerrel párban, az előbbieket 55 °C, az utóbbit 52 °C tapadási hőmérsékleten. A PCII40F és PCII40R pár rövid terméket adott, így abban az esetben 1 perces lánchosszabítási idő is elegendő volt, a többiek esetében 120 másodpercet alkalmaztunk ennél a lépésnél.

A 10. sz. egérnél (3. csoport) a teljes genom szekvencia kinyerésére törekedtünk, ezért a javasoltnál hosszabb lánchosszabítási időt alkalmazva, illetve a PCR ciklusszámot növelve (45 ciklus), több primert is igénybevéttünk különféle kombinációkban, azonban nem

jártunk sikerrel. Végül az alábbi primerpárok használatával végzett PCR adott értékelhető szekvenciát 90 másodperces lánchosszabbítási idő mellett: az MCV1—MCV2, a CBB1—CBB3, a CBB1—MCV2 és a Ci2EcoF—Ci2SLR.

A következőkben a saját fejlesztésű rendszerek szerepelnek részletesen.

7.3.1.1. Az erdélyi evolúciós vizsgálat során használt PCR

Az erdélyi evolúciós vizsgálatok esetében (vaddisznók és házi sertések) csak az ORF2 szakaszt vizsgáltuk egy saját tervezésű primerpárral (Primer Designer v. 2.0 program, Scientific & Educational Software). A két primer (CORF2F és CORF2R) adatai a 3. táblázatban láthatók. A primereket 35 cikluson keresztül használtuk a 4. táblázatban leírtak szerint.

4. Táblázat. Az erdélyi vaddisznókban előforduló PCV2 Cap-génjét felszorzosító PCR protokoll.

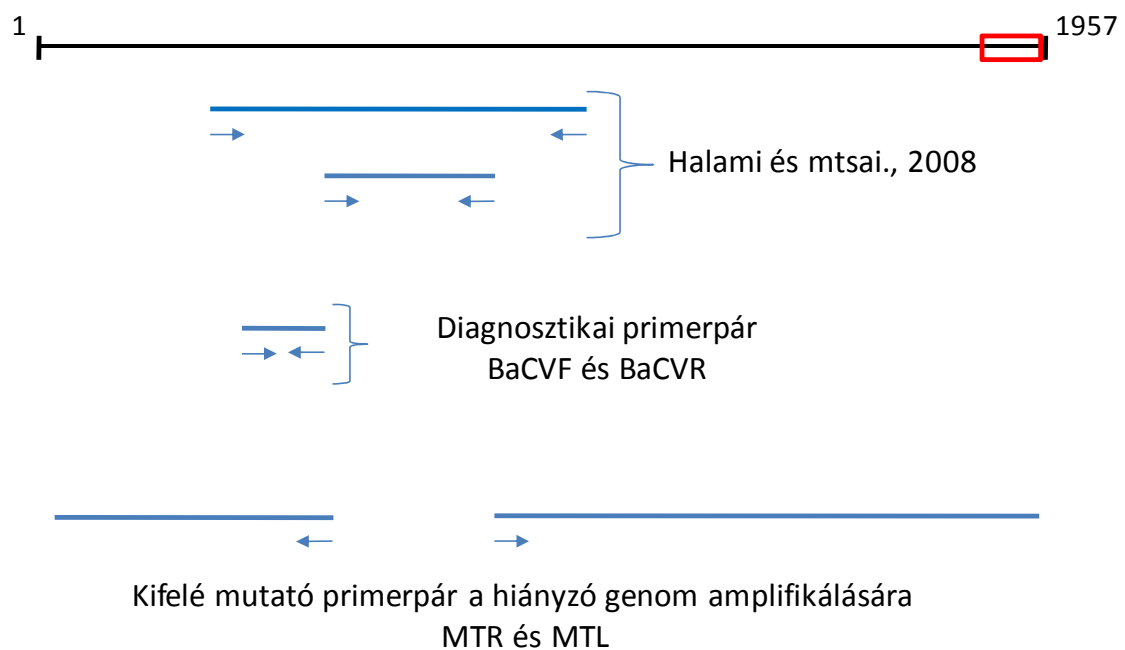
A lejátszódó folyamat	Hőmérséklet	Idő	Ciklus száma
nukleinsav előmelegítése	95 °C	10 perc	1
DNS lánc denaturáció	95 °C	30 másodperc	} 35 ciklus
primer tapadás	55 °C	30 másodperc	
lánchosszabbítás	72 °C	4 másodperc	
végző lánchosszabbítás	72 °C	7 perc	1
hűtés	4 °C	∞	1

7.3.1.2. A halakból kinyert DNS minták vizsgálata

A DNS-t Halami és munkatársai (2008) által leírt (a 7.3.3 fejezetben részleteiben bemutatott) circovírus kimutatására tervezett általános PCR rendszerrel vizsgáltuk. A pozitív eredményeket egy PCV specifikus PCR (Fenaux és mtsai., 2000) használatával ellenőriztük, hogy nem PCV kontaminációról van-e szó, majd a kontamináció kizárása után is pozitív esetek szekvenálását (Macrogen Inc., Korea) követően a Primer3 program (Rozen és Skaletsky, 2000) segítségével a körkörös genom adta lehetőségek kihasználásával a már ismert szakaszból kifelé mutató primerpárokat (MTL és MTR, 3. táblázat) terveztünk. A következő módon beállított kondíciókkal felerősítettük a hiányzó szakaszt: előmelegítés 95 °C-on 10 perc, majd 45 cikluson keresztül 95 °C 30 másodperc; 60 °C 60 másodperc; 72 °C 120 másodperc, és a végén a végző lánchosszabbítási szakasz 72 °C-on 7 perc. Az így kapott PCR terméket megszekvenálva a szár-hurok és az azelőtti szakasz (a 4. ábrán piros kerettel jelölve) nt sorrendjének megállapítása nem volt sikeres, ezért újabb primerpárt terveztünk. Mivel az újabb primerekkel történő szekvenálás is eredménytelen volt, az

amplikonokat klónoztuk (7.6 Fejezet) majd a klónok szekvenálásával sikerült a kritikus nukleotid sorrendet megállapítani.

Ezt követően a márnák circovírusainak kimutatása érdekében egy rövidebb diagnosztikai primerpárt is kifejlesztettünk (BaCVF és BaCVR, 3. táblázat). A 35 ciklusos reakció során az előmelegítés és a végső lánchosszabbítás az előzőekben leírt módon történt, míg a ciklus a következők szerint módosult: 95 °C, 30 másodperc; 55 °C, 30 másodperc; 72 °C, 30 másodperc.

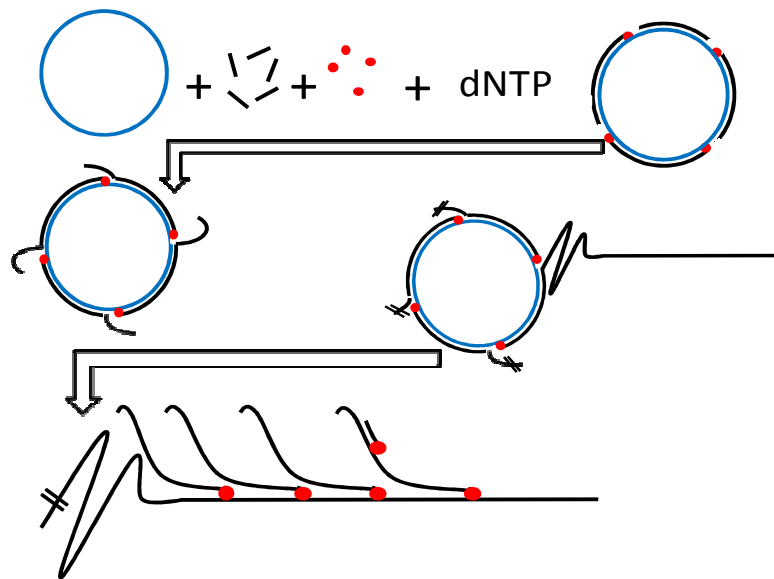


4. Ábra. A márna circovírusok teljes genomjának amplifikációs stratégiája. A fekete vonal a körkörös BaCV genom lineáris ábrázolása. A pirossal keretezett szakasz a szárhurok szerkezet azon része, amely szekvenálási problémákat okozott (l. szöveges rész). A kék vonalak az egyes PCR termékek megközelítő helyét és méretét mutatják. A nyilak az egyes primereket jelölik.

A lesőharcsa circovírusa esetében a Halami és mtsai. (2008) rendszerrel felerősített és megszekvenált DNS szakaszra a Primer3 program (Rozen és Skaletsky, 2000) segítségével a következő primereket terveztük: HT-F és HT-R (3. táblázat). Mivel a rendelkezésre álló vírus DNS nem bizonyult kellő mennyiségűnek, a TempliPhi™ 100 Amplification Kit (GE Healthcare, UK) felhasználásával, Exo-Resistant Random primerek (Fermentas, Litvánia) segítségével a teljes vírusgenomot nem specifikus módon felszorzósítottuk, majd a tervezett primerekkel elvégeztük a PCR reakciót a márna

MTL—MTR primerekkel végzett PCR-hez hasonlóan, ám a primerpár tapadásának hőmérsékleti optimuma 60 °C helyett 55 °C volt.

Mivel a lesőharcsa circovírusa a konvencionális PCR használatával nem volt felerősíthető olyan mennyiségben, hogy ezt később felhasználhassuk, ezért elő-amplifikálást végeztünk. Ehhez a TempliPhi™ 100 Amplification Kit (GE Healthcare, UK) segítségét vettük igénybe. A kit izotermikus (30 °C) körülmények között körkörös DNS megsokszorozítása specifikus primerek használata nélkül is megvalósítható (gördülő-körös amplifikáció —RCA—). A folyamat során a DNS-gyűrű megfelelő pontjaihoz random hexamer kötődik, ezt használja az enzim kiindulópontként és építi fel a DNS láncot (5. ábra). A reakció röviden a következő lépésekből állt: 1 µl körkörös DNS tartalmú mintát 5 µl mintapufferrel összekevertünk, majd 3 másodpercig 95 °C-on tartottuk (denaturálás), utána jégfürdőbe helyeztük. A reakciópuffert is jégen kevertük össze, ehhez mintánként 1 µl Exo-Resistant Random Primert (Fermentas, Litvánia), 5 µl reakciópuffert, 0,2 µl enzim-keveréket és 1 µl kétszer desztillált vizet kevertünk össze, és adtuk a denaturált mintához. 30 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk a keveréket, majd az enzimet 65 °C-on 10 percig inaktiváltuk. Az így keletkezett DNS-t aztán a PCR reakcióban templátként használtuk.



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

7.3.2. Valós idejű PCR

Az erdélyi 2006/2007-es és 2007/2008-as vadászati idény során vaddisznóból gyűjtött minták esetében qPCR technikához az MCV1—MCV2 primereket használtuk. A templát DNS-ből 2 µl-t amplifikáltunk 25 µl végtérfogatban. A reakcióelegy tartalmazott 12,5 µl iQ™ SYBR Green Supermixet (Bio-Rad Laboratories, USA) és 1—1 µl (20 µM) (Fenaux és mtsai., 2000) primert. Az amplifikációt a Rotor-Gene 6000 Thermocycler (Corbett Robotics Pty Ltd., Ausztrália) géppel végeztük. Két patkány és két egér esetében is sor került a kópiaszám meghatározására ezekkel a primerekkel, a fenti körülmények között. Mindkét esetben az ÁDI Molekuláris Biológiai Osztályán történt a vizsgálat, a reakciók összemérését az osztályon végezték. Standardként ismert mennyiségű baktériumba klónozott DNS-t használtak.

Az egérkísérletben a legmagasabb circovírus titerű állatok azonosítására is qPCR-t használtunk Eppendorf Realplex² Mastercycler ep gradientS gépben. A PCR-hez a CBB2—CSz2 primereket használtuk a fenti körülmények között 45 cikluson keresztül. A PCR mix: 1 µl DNS templátot, 5 µl DreamTaq DNA Polymerase puffert (Fermentas, Litvánia), 3 µl 25 mM MgCl₂-t (Fermentas, Litvánia), 1 µl 1 mM dNTP-t (Fermentas, Litvánia), 1—1 µl 25 µM primert (Sigma-Aldrich), 2,5 µl 20× EVA Green-t (Biotium, USA) és 1 µl Dream Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litvánia) enzimet tartalmazott. Az EVA Green festék a SYBR Green-nel megegyező elven működik, miszerint a duplaszálú DNS szálak közé épül be, detektálhatóvá téve a képződő amplikonokat. Mivel a kötődés nem specifikus, így olvadáspont analízisre és hagyományos agarózgél kimutatásra is szükség van. Standardként az egéroltáshoz használt minimum 5×10^3 TCID₅₀ szövettenyészetben elszaporított PCV2b-t használtunk.

A teljes körkörös genomok amplifikálása érdekében a mintákból kivont DNS-t a PCR reakciót megelőzően a TempliPhi™ 100 Amplification Kit (GE Healthcare, UK) segítségével Exo-Resistant Random Primers (Fermentas, Litvánia) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően, a 7.3.1.2 alapján az RCA módszerrel felszaporítottuk.

7.3.3. Fészkes PCR

A fészkes vagy ún. „nested” PCR rendszer két egymást követő PCR-ből áll. Az első kör egy nagyobb szakaszra tervezett primerekkel történik. Ezek a primerek az adott DNS-re tervezettek, azonban nem minden esetben csak a vizsgálandó nukleinsav-szakaszra specifikusak. A második rendszer primerei az első szakaszon belül tapadnak, így a reakció érzékenysége nagyban növelhető. Szakirodalmi leírás alapján egy általános, a *Circoviridae* családon belül több vírust is kimutató, fészkes PCR rendszert (Halami és mtsai., 2008) vettünk igénybe, több esetben is. A PCR mixhez a 7.3.1 fejezetben leírt DreamTaq DNA

Polymerase enzimet és puffert (Fermentas, Litvánia) használtuk. Az általános (circovírus kimutatásra alkalmas, degenerált) primerek a publikációban leírtakkal megegyező szekvenciájúak (3. táblázat) voltak, ám a koncentrációjuk az általunk meghatározottal (25 µM primerből 1—1 µl) egyezett meg. Az első PCR termékét használtuk templátként (1 µl) a második PCR-hez.

Az egerek esetében nem tudtunk PCV2-től eltérő vírust kimutatni az általánosan használt, PCV2 specifikus MCV1—MCV2 primerekkel, ezért tértünk át az univerzális rendszerre. A belső primerekkel az amplikonok nukleinsav szekvencia meghatározását is elvégeztük a következő esetben: 2. sz. egér (1. csoport), 10. sz. egér (3. csoport) és a 10. sz. sertés. Halak, hüllők és kételtűek vírusait is ezzel a módszerrel kerestük, továbbá a szarvasmarha vérsavók estében is elvégeztük ezt a vizsgálatot.

A circovírus negatív egerek esetében a PCV2 specifikus 289—1307 (CBB1J—CSz1) nukleotid közötti szakasz felerősítésére szolgáló PCR reakciót végeztük el, majd ezt követően alkalmaztuk a PCV specifikus primereket (MCV1—MCV2) egy fészkes PCR rendszert kialakítva.

7.4. A PCR termékek vizualizálása, szekvenálása

A kapott termékeket, a termék méretétől függően 1, illetve 2 %-os agaróz gélen futtattuk (ha 800 nt alatti terméket vártunk, akkor minden esetben 2, ha annál nagyobb termékre számítottunk, akkor 1 %-os gélt készítettünk). A DNS festésére kezdetben 0,4 µg/ml etídium-bromidot, később pedig GR Safe DNA Stain I (Life Science Technologies) festéket használtunk. A termékek méretét a DNA 1 kb ladder (Fermentas, Litvánia) molekulatömeg marker használatával állapítottuk meg. Az elektroforézis ún. TAE (40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM etilén-diamino-tetraecetsav) pufferben történt, 110 V feszültség alatt, a termékek és a gél hosszúságától függően 20—60 percig. A gélben a DNS ultraibolya fényben látszott etídium-bromidos festéskor (detektálás: Kodak Electrophoretic Documentation and Analysis —EDAS 290— System), míg a GR Safefestéket használva a láthatóvá tétel a Dark Reader™ system (Chemical Research Inc., USA) segítségével, 420—500 nm hullámhosszú fényben történt.

A fragmenteket az E.Z.N.A.™ Gel-Extracton Kit, vagy az E.Z.N.A.™ Cycle-Pure Kit (OMEGA Bio-tek, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. A két tisztítási eljárás a kiindulási anyagban különbözik egymástól. A Gel-Extracton Kit esetében az elektroforézis után a gélből szikepenge segítségével a tisztítandó templátot tartalmazó darabot kivágtuk, majd a kivágott gél 100 mg-onkénti súlyához 200 µl DNS-t szilika membránhoz kötő puffert (2 %-os gél esetén 500 µl) adtunk és 56 °C-on tartottuk, amíg a gél

fel nem oldódott. A Cycle-Pure Kit esetében a PCR után a fals termékektől mentes PCR terméket (a gélen a termék mellett maradék primerek látszanak, de egyéb termékek nem) tisztítottuk ki úgy, hogy a friss PCR terméket összekevertük négyszeres (200 bázispár alatti termék esetén hatszoros) térfogatú DNS-t a szilika membránhoz kötő pufferrel. Innen a két kit leírása megegyezik, nukleinsav kötő filteren (szilika membrán) átcentrifugáltuk (10000 \times g, 1 perc) a kapott oldatot etanol tartalmú mosófolyadékkal kétszer átmostuk (először 700 μ l, majd 500 μ l mosófolyadék, 10000 \times g centrifugálás). A filterről a maradék alkoholt centrifugálással (10000 \times g) távolítottuk el, majd 50 μ l 37 °C-os kétszer desztillált vízzel leoldottuk a DNS-t. A tisztított amplikonok szekvenálási reakcióját a BigDye Kit (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztük, majd a detektálást a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte ABI310 automata szekvenáló készülékkel. A szekvenálási reakció röviden: 2 μ l tisztított PCR termékhez 2 μ l BigDye puffert (Applied Biosystems, USA), összesen 4 pmol primert, 2 μ l BigDye enzimet és 10 μ l-ig kétszer desztillált vizet adtunk. A reakciót a TGradient Thermocycler (Biometra, Németország) gépben az alábbiak szerint végeztük: 96 °C 4 perc, majd 30 cikluson keresztül ismételve 96 °C 10 másodperc, 50 °C 5 másodperc, végül pedig 60 °C 4 percig. Az így elvégzett szekvenálási reakció termékét precipitáltuk nátrium-acetát (1 μ l, 3 M) és etanol (25 μ l, 100 %) hozzáadásával (15 perc szobahőmérsékleten), majd a DNS-t 1650 \times g-n 45 percig centrifugáltuk. Ezután 70 % etanollal (35 μ l) mostuk, majd ismételten centrifugáltuk 1650 \times g-n 15 percig, végül a DNS-t szárítottuk és így küldtük el szekvenálásra. Anyagi okok miatt később a Macrogen Inc. (Korea) cégnél végeztettük a szekvenálási reakciókat, ahova a PCR termékeket előzetes tisztítás nélkül küldtük.

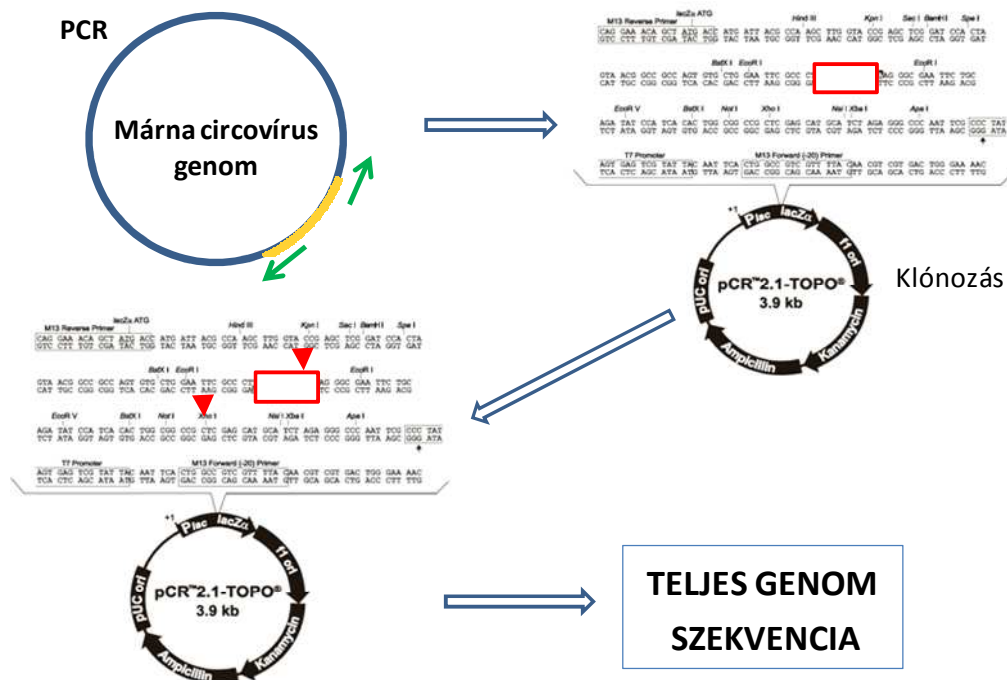
7.5. Klónozás

A halak esetében az amplikon mérete csak jóslható volt. A szekvenáláshoz a PCR termék klónozását vettük igénybe. A klónok hosszan eltarthatóak, bennük valószínűleg egy (illetve futtatás alapján kizárható, ha egynél több) amplikon van, így a méret és szekvenancia is egyértelmű. A PCR termék közvetlen klónozását lehetővé tevő Topo TA Cloning^(R) Kittet (Life Technologies Corp., USA) választottuk, és a termék leírásának megfelelően használtuk. Ebben az esetben 5 μ l friss PCR terméket 1 μ l kitben található, 1,2 M NaCl-ot és 0,06 M MgCl₂-ot tartalmazó oldattal és 0,5 μ l TOPO vektorral kevertünk össze. A plazmidba épüléshez 10–15 perces inkubációs időre van szükség szobahőmérsékleten. A plazmidokat vagy a kitben található kémiai úton transzformálható *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10F['] baktériumokban, vagy a rendelkezésünkre álló elektroporálható DH5 α (*E. coli*) baktériumokban szaporítottuk fel. A kémiai úton transzformálható baktériumokat használtuk

előtt közvetlenül jégre helyeztük, majd ehhez adtunk 2 µl-t a Topo ligálást követő elegyből és jégfürdőben óvatosan összekevertük. Ezután 30 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe tettük, majd visszatettük jégre. Az elektrokompetens baktériumot először Luria Broth (LB) tápfolyadékban 37 °C-on rázatva elszaporítottuk (kb. 6 óra), majd 4 °C-on 3500 ×g-n centrifugálva jéghideg, kétszer desztillált steril vízzel kétszer mostuk. 250 µl baktériumszuszpenziót 5 µl plazmiddal 2500 V-on elektroporáltunk. Mindkét esetben a jobb baktérium szaporodás érdekében 250 µl Super Optimal Broth (S.O.C.) mediummal 1 órán át 37 °C-on ráztuk, majd 50 µg/ml ampicillin tartalmú 1,5 % bakteriológiai agarból (Reanal, Magyarország) készült táptalajra szélesztettük a baktériumokat és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a kinőtt baktériumtelepeket egyesével 3 ml 50 µg/ml ampicillin tartalmú LB tápfolyadékba tettük, és ismételten 37 °C-on egy éjszakán keresztül ráztuk. Az eljárás végén a plazmidokat egy plazmid kivonására alkalmas kit (pl.EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPrep Kit —Bio Basic, Kanada—) segítségével tisztítottuk a baktériumokból. Ehhez 1,5 ml baktérium-szuszpenziót 5 percig 10000 ×g gyorsulással centrifugáltunk, majd a leülepedett baktériumokat pufferben (RNase tartalmú oldat) reszuszpendáltuk, és a fehérjéket valamint a genom méretű DNS-t kétlépésben precipitáltuk. A baktériumsejtek feloldását NaOH-ot és SDS-t (szódium-dodecil-szulfát) tartalmazó oldattal, a precipitációt kálium-acetáttal végeztük el. A folyadékrész tartalmazta a plazmidot, ezért azt DNS kötésére alkalmas szűrőn átcentrifugáltuk (10000 ×g), majd kétszer mostuk (alkoholos mosófolyadékkal), a megkötött DNS-t 50 µl TE (1 M TRISZ és 0,5 M EDTA) pufferrel leoldottuk. A klónok ellenőrzésére *EcoRI* restrikciós endonukleázzal (Fermentas, Litvánia) történő emésztést választottunk 20 µl végtérfogatban (5 µl plazmidot, 2 µl enzimhez tartozó 10× puffert és 1 µl *EcoRI* enzimet —Fermentas, Litvánia— tartalmazó oldat). Egy órás, 37 °C-os inkubációs idő után 1 %-os agarózgélen szeparáltuk és a már leírt módon detektáltuk a klónokat.

A márna vírusok esetében a klónokat is szekvenáltuk mindkét irányból a plazmidon található M13 reverz és forward primerekkel, illetve a MTL és MTR primerekkel is. Azonban a hiányzó szakasz szekvenciája így sem volt értékelhető. A Topo plazmidot így emésztettük egyszerre kétféle restrikciós endonukleázzal, az egyik a plazmidot vágja, a másik pedig a szekvencia alapján a beklónozott PCR terméket. A plazmidot vágó enzim *XhoI* és a *BamHI*, a PCR termékre pedig a *MluI* enzim volt megfelelő. Az emésztés 15 µl-ben történt, az alábbiak alapján: 5 µl plazmid + 1,5 µl Red puffer (Fermentas, Litvánia) + 1—1 µl restrikciós endonukleáz (*XhoI* és *MluI*, illetve *BamHI* és *MluI*; Fermentas, Litvánia) + 6,5 µl steril, kétszer desztillált víz. Így a plazmidból és a beklónozott halvírus szekvenciából is egy—egy rész kiesett (6. ábra). Mivel a *BamHI* és *MluI* majdnem a teljes beklónozott szekvenciát kivágta, így ezt elvetettük. A plazmid másik részét *EcoRI* restrikciós endonukleázzal kivágtuk

a fent leírt módon és 5 µl *EcoRI*-gyel és *XhoI*-gyel emésztett pGEM7 plazmidba (Promega, USA) ligáltuk. A ligálás 30 µl össztérfogatban történt, amihez 3 µl T4 puffert, 1,5 µl T4 DNS ligázt (Fermentas, Litvánia), 12,5 µl emésztett PGEM7 plazmidot és 13 µl TOPO plazmidból kivont terméket adtunk. Az így módosított PGEM7 plazmidot a már fent leírt módon elektrokompetens *E. coli*ba elektroporáltuk és elszaporítottuk. Az így manipulált plazmidot szekvenáltattuk, a szekvenálás ezúttal már megfelelő eredményt adott. A klónozás és szubklónozás menetét a 6. ábra szemlélteti.



Hasítás restriktív endonukleázokkal

6. Ábra. A márna circovírus genom klónozása. A sárga vonal a Halami és mtsai (2008) által tervezett primerpárral felerősített genomrészlet. A zöld nyilak az általunk tervezett MTL és MTR primerek. A piros négyzet a primerekkel felerősített genomrészlet a TOPO 2.1 plazmidban (www.edoc.hu-berlin.de). A piros háromszögek a szubklónozáshoz használt restriktív endonukleáz vágáshelyeket jelölik.

7.6. A szekvenciák elemzése

A kapott eredményeket egymással, illetve GenBankban elérhető adatokkal hasonlítottuk össze. A Lasergene MEGA 5 és MEGA 5.2 program (Tamura és mtsai., 2011) használatával készítettünk filogenetikai fát, neighbor-joining módszer (NJ) segítségével, 1000 bootstrap érték mellett. Mivel a módszer alapján a filogenetikailag legközelebbinek számolt rokon nem biztos, hogy genetikailag is az, ezért a pontosság érdekében a Közép-

Európát érintő vizsgálatnál maximum likelihood (ML) és Tamura analízist (TN) is végeztünk. A közép-európai vizsgálat esetében a GenBankból töltöttünk le teljes genom szekvenciákat (2. melléklet), illetve felhasználtuk Cságola Attila 2007-es vizsgálati adatait is (Cságola, 2009). A hal mintákból származó teljes vírusgenom szekvenciákat a CAP3 program (Huang és Madan, 1999), és a BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 verzió (Hall, 1999) segítségével készítettük el, míg a sertésekből származó vírusok esetén az ismert szekvenciák és az átfedő amplikonok segítségével a Lasergene MEGA 5 (Tamura és mtsai., 2011) programot használtuk. A származtatott aminosav sorrend meghatározásához is a Lasergene programcsomag (DNASTAR Inc., Madison, USA) és a GenBankban fellelhető adatok voltak segítségünkre. A szekvenciák összehasonlításánál a BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 verzió (Hall, 1999) pairwise alignment programját, a sequence identity matrix programot, valamint a távolsági analízishez a Lasergene MEGA 5.2 (Tamura és mtsai., 2011) distance matrix programját használtuk. A szekvenciák összehasonlításakor mind a BioEdit, mind a MEGA esetében a szubtipusok képviselőit véletlenszerűen választottuk ki.

Az erdélyi vaddisznók esetében a statisztikai elemzésekhez az R for Windows 2.12.0 programcsomagját használtuk, és ezen belül a Pearson's Chi-négyzet tesztet.

A rekombinációkat az RDP v.3.44. program (Martin és Rybicki, 2010) segítségével vizsgáltuk 6 különböző eljárással és az általános beállításokkal. Emellett szekvencia-illesztés után, program nélkül is próbáltunk lehetséges rekombinációkat találni.

7.7. Immunfluoreszcenciás és immunhisztokémiai vizsgálat

7.7.1. Metszetek készítése

Az előzetesen -20 °C-on tárolt rágcsálók szerveinek (5. sz., 10. sz. egér, 2. sz., 3. sz., 4. sz., 6. sz. patkány és 10. sz. sertés) 1,5x1,5 cm-es darabjaiból félvastag fagyasztott metszeteket készítettünk kriosztáttal (Cryotome Thermo Shandon A77210167, Thermo Fisher Scientific Inc., Németország), amit 80 %-os acetonnal rögzítettünk a lemezekre (Superfrost ultra plus, Thermo Fisher Scientific Inc., Németország). A tízes számú egérből formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (Williams és mtsai., 1997) vékony metszetet készítettünk Shandon Hypercenter XP géppel (Thermo Fisher Scientific Inc., Németország) Haines és Chelak (1991) módszere alapján, szintén Superfrost ultra plus lemezekre (Thermo Fisher Scientific Inc., Németország). A metszeteket felhasználásig szobahőmérsékleten illetve -20 °C-on tároltuk.

7.7.2. Indirekt immunfluoreszcenciás (iIF) teszt

Az egérkísérlethez a fertőzés során használt vírustörzs pontos titerének a meghatározására is szükségünk volt. PCV2-ROM törzsből (Cadar és mtsai., 2007) származó, R15 jelű vírus titerének meghatározása dr. Cságola Attila (2009) PhD dolgozatában került közlésre, detektálásra az ott leírt PCV2 specifikus hiperimmun sertés vérsavót használtuk. A vizsgálatot 96 lyukú szövettenyésztő-lemezen (VWR, USA) végeztük, iIF módszerrel. A lyukanként $5\text{--}6 \times 10^3$ circovírushoz adaptált sertés here sejtet (STC) fertőztünk a vírustól készített tízes alapú hígítási sorral (a törzsoldat $10 \times$ -es hígítású volt, ennek $1/10$ -e került az első sor lyukaira). A fertőzést követő negyedik napon a lemezt PBS oldattal háromszor mostuk, majd $1:1$ arányú 80% -os aceton: 96% -os etanol keverékével fixáltuk a sejteket, felhasználásig $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. Előzetes felolvasztás után a lyukakra $100\ \mu\text{l}$ $1:100$ arányban hígított PCV2 specifikus sertéssavót mértünk, majd 1 óra $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os nedves kamrában történő inkubálás után PBS oldattal való háromszori mosást követően fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt anti-sertés IgG konjugátumot mértünk a lyukakra ($100\ \mu\text{l}$ $400 \times$ -os hígítású). Egy óra inkubálás után ($37\text{ }^\circ\text{C}$ -on, nedves kamrában) három mosást követően $0,1\%$ Evans-kék (Reanal, Magyarország) oldattal kontrasztfestettük, majd fluoreszcens mikroszkóp (Nikon H550S) alatt bíráltuk.

A szarvasmarha vérsavókban PCV2 specifikus ellenanyagot kerestünk. Ehhez lyukanként megközelítőleg 10^3 , PCV-mentes STC sejtet tettünk 96 lyukú szövettenyésztő lemezre (VWR, USA). A tenyészetet $100\ \mu\text{l}$ (minimum 5×10^3 TCID₅₀) R15 vírussal fertőztük (kivételt képezett az utolsó két sor, ami negatív kontrollként szolgált). A fertőzés után a $4.$ napon a lemezeket PBS-sel mostuk, majd $1:1$ arányú aceton (80%): alkohol (96%) keverékkel fixáltuk.

Az így elkészült lemezre $8 \times 100\ \mu\text{l}$ felező hígítású vérsavót mértünk a három szarvasmarhából. Az első sor $1:5$ arányban hígított szarvasmarha vérsavót tartalmazott $0,5\%$ szarvasmarha szérum albuminos PBS oldatban. Pozitív kontrollként a laboratóriumban tartott sertéssavót is bemértünk a lemez 8 lyukába ($1:500$ hígításban a korábbi tapasztalatok alapján). A reakciót nedves kamrában $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on egy órán át inkubáltuk, majd a lemezt PBS-ben mostuk háromszor, és ezután $60\ \mu\text{l}$ FITC-cel jelölt konjugátumot ($1:500$ hígításban) (Sigma-Aldrich, USA) mértünk rá. Ismételt inkubálást követően (nedves kamrában $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on egy órán át) újabb háromszori PBS-es mosás következett, majd $0,1\%$ koncentrációjú Evans-kék (Reanal, Magyarország) oldattal festettük a hátteret. Az eredményt a Nikon H550S fluoreszcens mikroszkóp segítségével bíraltuk el.

Az egérszervekből közvetlenül a vírust is megpróbáltuk kimutatni iIF segítségével. A fagyasztott szervekből $1,5 \times 1,5$ cm-es darabokból félvastag fagyasztott metszeteket készítettünk kriosztáttal (Cryotome Thermo Shandon A77210167, Thermo Fisher Scientific

Inc., Németország), amit 80 %-os acetonnal rögzítettünk a lemezekre (Superfrost ultra plus, Thermo Fisher Scientific Inc., Németország). A reakcióhoz pozitív savóként a laboratóriumban tárolt poliklonális sertéssavó 1:100 arányban hígított oldatát használtuk (200 µl/lemez), az iIF elvégzéséhez pedig a fent leírt módszert választottuk, 100 µl helyett 200 µl-t használtunk a konjugátumból. Negatív szövetkontrollként nem fertőzött laboratóriumi egérből nyert szerveket használtunk.

7.7.3. Immunhisztokémiai (IHK) teszt

IHK eljárást a 10. sz. egér formalinnal fixált, paraffinba ágyazott vékony metszetéből (Shandon Hypercenter XP géppel —Thermo FisherScientific Inc., Németország— Superfrost ultra plus lemezekre —Thermo Fisher Scientific Inc., Németország—) deparaffinálást követően, illetve közvetlenül kriosztátos metszeteiből is készítettünk. A vizsgálatot Haines és Chelack (1991) leírása alapján végeztük el, konjugátumként Dako Envision terméket (Dako, Dánia) és az ahhoz forgalmazott kromogén (3-amino-9-ethylcarbazol) szubsztrátot használtunk.

A deparaffináláshoz xilolt (Reanal, Magyarország) és leszálló alkoholsort (100 %, 96 %, 70 %) majd desztillált vizet használtunk, minden oldatban 5 percig tartva a metszetet. A kriosztátos metszetet felhasználás előtt fixáltuk 80 %-os acetonban. Ezután 0,1 % Protease (Dako, Dánia) enzimés emésztés 10 percig 37 °C-on, majd 2×4 perces PBS-es mosás következett, ami után az endogén peroxidok gátlása jött 10 perces 3 %-os frissen készített H₂O₂ kezeléssel. Az újabb 2×4 perces mosás után 2 %-os sovány tejjel inkubáltuk a lemezen lévő sejteket 20 percig 37 °C-on. Ezt a vírus jelölése követte, amit 200 µl circovírus specifikus monoklonális ellenanyaggal (1:15000 hígított, Ingenasa, Spanyolország) vagy ugyanennyi poliklonális PCV2 specifikus sertéssavóval (1:5000) végeztünk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. A 4—5 percig tartó mosást ezt követően egyszer végeztük el, majd ráértük a konjugátumot. Konjugátumként használtuk a Dako Envision termékét, amelyet az ÁDI bocsájtott rendelkezésünkre, illetve peroxidáz enzimmel jelölt anti-sertés IgG-t is (Sigma-Aldrich, USA; ezerszeres hígításban) 30 percig. Ezután mosást követően a szubsztrát amino-etil-karbazol, vagy diamino-benzidin és H₂O₂ volt 10 percig. A magokat hematoxilinnel festettük 3 percig, amit 5 perces folyó csapvizet öblítés követett, hogy a sejtmagok kékre színeződjenek.

8. EREDMÉNYEK

8.1. PCV2 genetikai változásai

8.1.1. Közép-Európa

8.1.1.1. PCR eredmények

A vizsgált 20 magyarországi sertéstelepből 17 adott PCV pozitív eredményt. Azt a telepet tekintettük pozitívnak, ahol minimum egy pozitív állatot találtunk. Romániából a 13 vizsgált telepen 12 esetében mutattuk ki a PCV2 DNS-t, míg Szerbiában ez az arány 6/7, Horvátországban 25/29, Lengyelországban pedig 6/14 volt.

8.1.1.2. A szekvenálás eredménye

A pozitív minták egy részét szekvenáltattuk. Így 2 lengyelországi, 3 romániai, 5 hazai, 5 szerbiai és 22 horvátországi teljes PCV2 genomszekvenciát azonosítottunk. Sajnálatos módon, a magyarországi és az erdélyi minták egy részének a szekvenálása nem volt sikeres, több esetben nem kaptunk értékelhető eredményt, több primerpárral történt, gélelektroforézis alapján megfelelőnek tűnő PCR termék esetében sem. Az összehasonlító analízishez a GenBankból töltöttünk le további teljes genomszekvenciákat. Mivel a házi sertésekből származó, 2007 utáni PCV2-re vonatkozó genbanki adatok zömmel kínai eredetűek, így ezek közül leírásonként csak egyet-egyet választottunk ki. A 2008-ig megjelent valamennyi PCV2 szekvenciát tartalmazta saját adatbázisunk (Cságola, 2009).

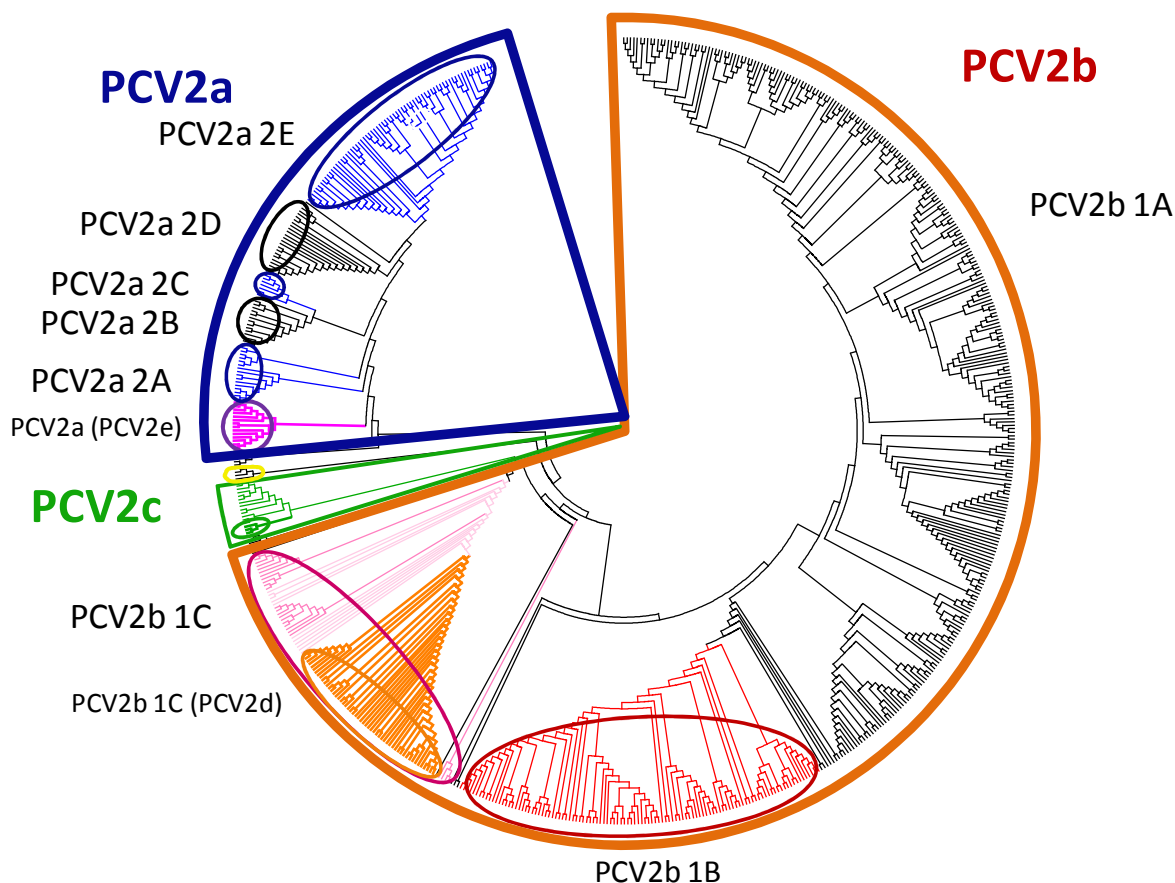
A magyarországi 5. sz. és 6. sz. minta, illetve a HQ591374 genbanki sz. horvátországi szekvencia 1768 nt méretűek, míg a többiek 1767 nt hosszúak voltak. Az általunk vizsgált 14. számú szerbiai PCV2 plusz egy aminosavat tartalmazott a Cap-fehérjén, ami a Cap-génen egy T deléciója (699. nt) miatt következett be. Így a stop kodon nem a 700—702. helyen található TAA, hanem a 703—705. nt helyen egy TGA triplet. A HQ591379 és egy további horvátországi (HQ591381) vírus esetében is egy as-val hosszabb a kapszid fehérje, itt a szekvencia eltér a megszokottól, a génen több pontmutáció is fellelhető (l. később, a Közép-Európát érintő filogenetikai vizsgálat fejezetben).

Egy—egy országon belül az új szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján a horvátországi teljes PCV2 genomok 95,36—100 %-ban, a lengyelországiak 98,81 %-ban, a szerbiaiak 96,09—100 %-ban, a romániaiak 95,31—97,96 %-ban, a magyarországi minták 97,12—98,42 %-ban voltak azonosak.

8.1.1.3. Közép-Európát érintő filogenetikai vizsgálat

Közép-Európában a sertés circovírusok felmérése és részbeni genetikai jellemzése 2007-ben (Cságola, 2009) már megtörtént. A felmérés során a vaddisznó állományban PCV1 vírus is kimutatásra került, ami igazolta, hogy a vírus természetes körülmények között is előfordul és terjed (Tischer és mtsai., 1986; 1995b, Cságola és mtsai, 2008b). A jelen dolgozatban leírt munka során újabb PCV1 szekvenciákkal nem találkoztunk. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy ez a vírus már nem fordulhat elő a régióban. A PCV specifikus primerek által felerősített DNS szakaszokat a továbbiakban PCV2 specifikus primerekkel vizsgáltuk, azaz lehetséges kevert fertőzés esetén is csak a PCV2-t mutattuk ki. Mivel a vizsgálataink célja a PCV2 jelenlétének és változékonyságának a felmérése volt, a PCV1 vírust nem is igyekeztünk kimutatni. Egy jelenleg is zajló, itt nem részletezett vizsgálat során azonban circovírusszerű vírust (Li-L és mtsai., 2011) is kimutattunk sertésben.

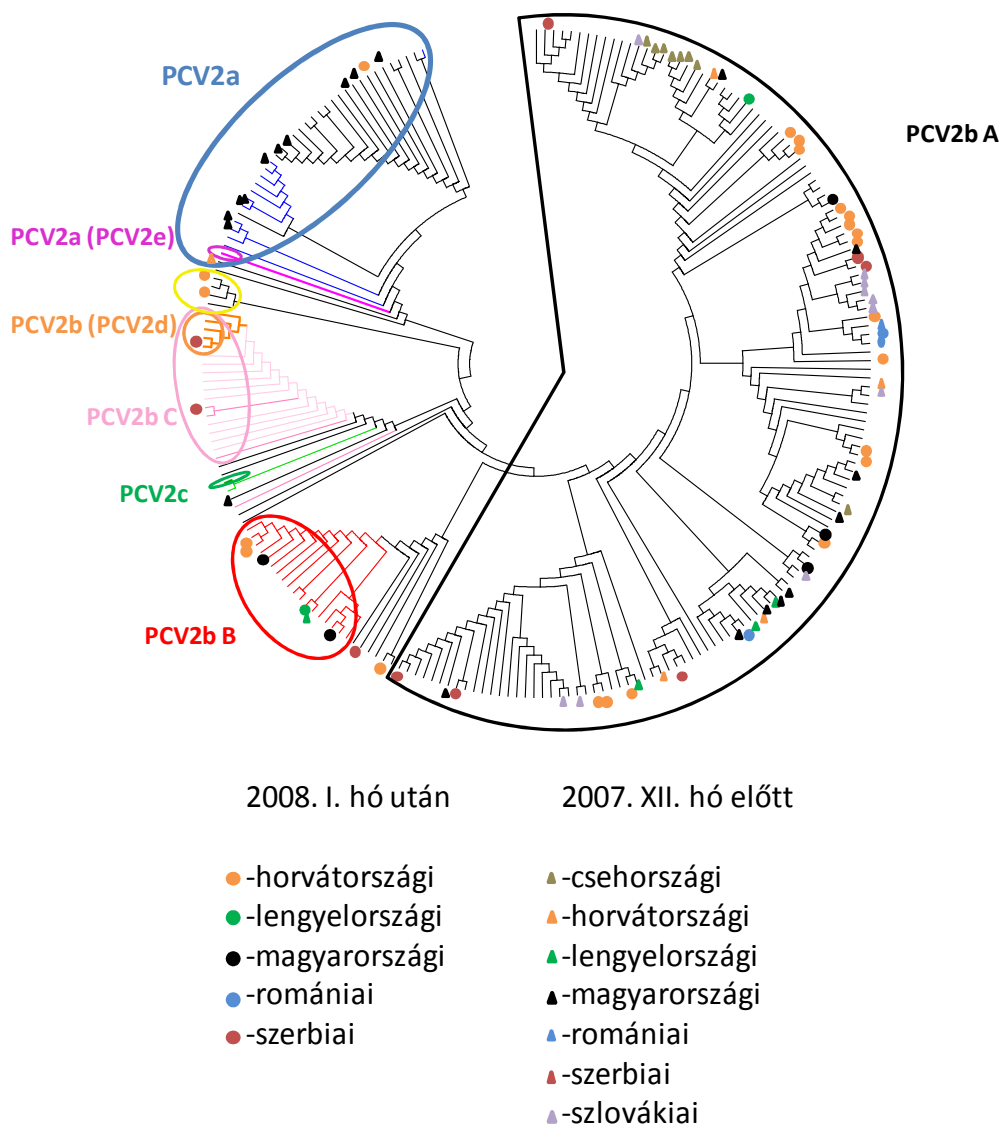
A PCV2 esetében a genotípusokra vonatkozó definíció alapján (Grau-Roma és mtsai., 2008) a vírus három genotípusra osztható: PCV2a, PCV2b és PCV2c. A PCV2a és PCV2b esetében is a genotípuson belül többen is alcsoportokat (szubtípusokat) hoztak létre. Ezek közül az Olvera és mtsai. (2007) által elvégzett csoportosítás tekinthető a legszélesebb körben elfogadottnak. Eszerint a PCV2b genotípust három alcsoportra (1A, 1B, 1C), míg a PCV2a genotípust 5 alcsoportra (2A, 2B, 2C, 2D, 2E) osztották. A kínai kutatók által javasolt PCV2d és PCV2e genotípusok esetében, azok helyett —a kisebb mértékű különbségek alapján— inkább csak a szubtípus megnevezés ajánlott (Cortey és mtsai., 2011). A dolgozatban ezeket PCV2b 1C (PCV2d) illetve PCV2a (PCV2e) néven jelöltem. A csoportosítás könnyebb megértését szolgálja a 7. ábra.



7. Ábra. A PCV2 rokonsági viszonyai a teljes PCV2 genom NJ vizsgálata alapján. A narancsszínű köröcikk a PCV2b genotípust, míg a kék a PCV2a genotípust mutatja. Ezeken belül a kisebb körök a szubtypusokat jelölik. A zöld köröcikk a PCV2c-ből és a hozzá hasonló vírusokból álló csoportot jelzi, ezen belül a zöld kör magát a PCV2c genotípust mutatja. Sárgával a csoportokon kívül eső szekvenciákat jelöltük.

A filogenetikai analízist három módszerrel (NJ, ML és TN) is elvégeztük, hogy az eredmények összevetésével a lehető legpontosabb elemzést tudjuk nyújtani. A fákban a csoportok jól elkülönültek egymástól, néhány esetben egy—egy szekvencia nem ugyanabba a csoportba sorolódott a három különböző módszer szerint, így ezeket tovább is vizsgáltuk. Hasonlóan, a különböző módszerekkel felállított csoportok kiindulási pontjai is eltéréseket mutattak.

A minták vizsgálata során PCV2c genotípust nem tudtunk kimutatni, az általunk vizsgált szekvenciák három kivételével a PCV2b genotípusba tartoztak. A 8. ábra tartalmazza a régióban fellelhető valamennyi teljes genomszekvencia helyét az általunk NJ módszerrel készített filogenetikai ábrán.



8. Ábra. Közép-Európából származó teljes genomszekvenciákból, NJ módszerrel készült filogenetikai ábrázolás. Azok az ágak, ahol régióbeli szekvenciák nincsenek, nem jelennek meg. A teljes filogenetikai fa a 4. sz. mellékletben található. Az egyes csoportokat azonos színű kör és felirat jelzi.

Az egyik kivétel, amely nem a PCV2b genotípusba tartozott, egy horvátországi eredetű vírus volt 2008-ból (HQ591374). Ez a szekvencia a PCV2a genotípusba tartozik, ezen belül is a 2D szubtypushoz. 98,98 %-ban azonos a hozzá a filogenetikai fán legközelebb álló, szintén a régióból származó, vaddisznóból kimutatott vírussal (genbanki azonosító sz.: AY874166). A másik két kivétel 2009-ből származó horvátországi PCV2 (HQ591379 és HQ591381), amelyek az 1767 bázist tartalmazó csoportba tartoznak, ám ezen belül sem a PCV2b, sem a PCV2c genotípusba nem sorolhatók. Az NJ analízis alapján a filogenetikai fa egyik ágán lévő csoportba sem voltak egyértelműen besorolhatóak (sárga kör jelzi a 8. ábrán). A TN analízis eredményeként a PCV2c genotípus tagjaihoz

hasonlítottak a legjobban ezek a vírusok, az ML vizsgálattal pedig egy olyan csoporthoz kerültek a legközelebb, amely a PCV2c genotípussal mutat rokonságot (később részletezem, a 8. ábrán a zöld körcikk PCV2c-n kívüli része). Az általunk megszekvenált két genom egy 2004-es Kínából származó 1768 nt hosszúságú vírussal (EF524523) és egy 2009-es mintából szekvenált, szintén kínai PCV2-vel (HM776452) alkot egy csoportot. A csoporton belül a páronkénti hasonlóság 96,83 és 99,83 % között van. Ez abból a szempontból érdekes, hogy a csoport összesen ezt a négy vírust tartalmazza, azonban a különbségek ehhez képest igen nagyok. A két horvátországi vírusgenom hasonlósága egymáshoz 98,07 %-os. Elvégeztünk egy távolsági (distance) mátrix vizsgálatot is (MEGA 5.2 program), amelynek eredménye szerint a HQ591381 vírus legközelebbi rokona a HM776452 (a BioEdit program szerinti páronkénti hasonlóság 99,83 %), míg a HQ591379 vírusé a PCV2b 1A szubtypusú 644. sz. horvátországi vírus (98,3 % a BioEdit PASC analízis szerint). Az eredmények tükrében az elmondható, hogy ezek a vírusok egymáshoz genetikailag rendkívül közel állnak.

A csoporton kívüli rokon keresése nem adott egyértelmű eredményt arra vonatkozóan, hogy ezek a vírusok honnan származhatnak. Az EF524523 azonosító sz. vírus közelebbi rokon csoportja a PCV2e genotípusnak mondott csoport, míg a másik három vírusnak a PCV2b 1A illetve 1B csoport. A vizsgálat eredményét részletesen a 3. melléklet mutatja. Az EF524523 a szakirodalom szerint egy rekombináns ORF2-vel rendelkező vírusgenom, amely a filogenetikai fán egy önálló ágat képez (Wang és mtsai., 2009), legközelebbi rokonaként pedig a PCV2e genotípusként leírt csoportot tartják. A vírus ORF2 fehérjéjének első fele a PCV2a genotípusé, míg a második fele a PCV2e genotípusnak leírt csoporté. A mi szekvenciáinkon ilyen változás nem igazolható. A rekombinációt elemző programok eredményei alapján PCV2b 1A szubtypusba tartozó és PCV2b 1B szubtypusú vírusok rekombinációjával jöttek létre. Ugyanakkor a HM776452 azonosító sz. és a mi vírusaink is a kapszidfehérjén egyedi végződést tartalmaznak, amelyet az 5. táblázat mutat. A fehérje a szokásos 233 as helyett 234 as méretű. Ez a PCV2b 1C (PCV2d)-re jellemző hosszúságú, ám ott az utolsó nukleinsavak a stop előtt nem egyeznek meg ezen vírusokkal. Minden tekintetben az EF524523 az, ami a legnagyobb mértékben különbözik a másik három vírustól, de a filogenetikai ábrákon ezek mindig egy csoportban találhatók.

5. Táblázat. Eltérő hosszúságú kapszid szekvenciák különbségei.

Név		Helyeződés (nt/as)							
		685/229	688/230	691/231	694/232	697/233	700/234	703/235	706
PCV2b	as	P	P	L	N	P	STOP	9.	10.
	nt	CCC	CCA	CTT	AAC	CCT	TAA	TGT	ATA
HQ591379	as	P	P	L	N	T	K	STOP	11.
	nt	CCC	CCT	CTT	AAC	ACA	(T)AAG	TGA	GAA
PCV2b 1C	as	P	P	L	N	P	K	STOP	12.
	nt	CCC	CCA	CTT	AAC	CCT	(T)AAG	TGA	ATA

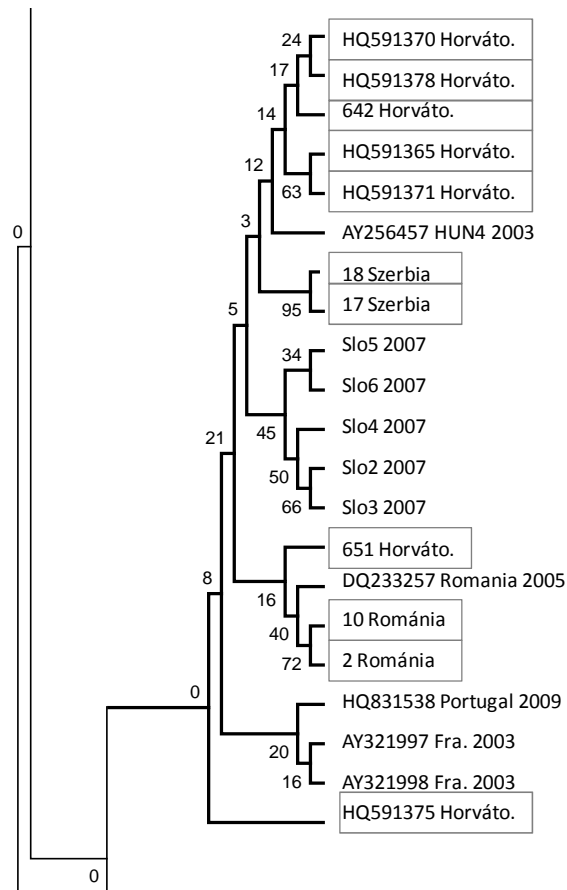
A felső sorban a PCV2b, alatta a PCV2b-től és PCV2a-tól egyaránt eltérő HQ591379 kapszid gén szekvencia 3' (karboxi-terminális) része. A szintén egy as-val hosszabb kapszidfehérjével rendelkező PCV2b 1C a táblázat alján szerepel. A félkövér betűk az eltéréseket jelzik, a deletálódott nt-ot pedig zárójel jelöli. Az aminosavak teljes nevét az 1. melléklet tartalmazza.

A vírusok döntő többsége az Olvera és mtsai. (2007) által elvégzett besorolás alapján a PCV2b 1A szubtypusba sorolható. Kivételt képez a fentebb említett vírusok mellett 8 másik szekvencia, melyek ugyan a PCV2b genotípusba, de nem az 1A szubtypusba tartoznak. Ezek közül a PCV2b 1B csoportba sorolt a program 1 lengyelországi, 2 hazai és 2 horvátországi genomot. Egy szerbiai sertés circovírus a PCV2b 1C (Wang és mtsai., 2009, szerinti PCV2d genotípus) szubtypusba sorolódott, illetve 2 szekvencia (a 703. sz. horvátországi és a 22. sz. szerbiai mintából készített szekvencia, l. később) a PCV2b genotípuson belül, de szubtypustól függetlenül helyeződik a filogenetikai fán. Az utóbbi két esetben a csoporton kívüli helyeződést egy—egy olyan pontmutáció okozza, ami as változással is jár. Ezekben az esetekben az as változás más szubtypusra/genotípusra jellemző.

A PCV2b 1A szubtypus vírusai a dominánsak Közép-Európában. Ide összesen 28 vírust soroltunk be: 3 magyarországi (3. sz., 5. sz., 6.sz.), 3 romániai (2. sz., 8. sz., 10. sz.), 3 szerbiai (1. sz., 17. sz., 18. sz.), 16 horvátországi (642. sz., 644. sz., 651. sz., 655. sz., 670. sz., 675. sz., 682. sz., 686. sz., HQ591365, HQ591370, HQ591371, HQ591375, HQ591376, HQ591377, HQ591378, HQ591380) és 1 lengyelországi (7. sz.) vírust. Van két olyan vírus, amely a filogenetikai fán nem sorolható ide, ám a rokonsági viszony tekintetében ide tartoznak (a 703. sz. horvátországi és 22. sz. szerbiai szekvenciák), ezért ide számoljuk ezeket is. Az 1. sz. szerbiai PCV2 a dániai 2003/2004 szekvenciákkal mutat szoros rokonságot (99,89 %), de Kínából származó vírusok is kerültek erre az ágra. A 7. sz. lengyelországi vírus portugáliai, kínai és koreai vírusokkal került egy csoportba. A legnagyobb hasonlóságot (99,77 %) a JF317579 genbanki azonosító sz.-ú koreai vírussal mérte a program. A 655. sz. horvátországi szekvencia a HQ591376 és HQ591377 horvátországi genomokkal mutatott szoros genetikai rokonságot. A 655. sz. vírus és a

HQ591377 szekvenciája 100 %-ban megegyezett és a HQ591376 sz. vírushoz képest is csak 2 nt eltérést mutatott. Hozzájuk legközelebb 2003-ban leírt, Dániából származó vírusok állnak (a hasonlóság 99,77 %).

Egy nagyobb közép-európai csoportot is azonosítani tudtunk, ide tartozik a 642. sz., 651. sz., HQ591365, HQ591370, HQ591371, HQ591375 és HQ591378 horvátországi, két szerbiai (17. sz. és 18. sz.), az AY256457 genbanki azonosító sz.-ú (HUN4) hazai, három romániai (DQ233257, 2 sz. és 10 sz.), öt 2007-es szlovákiai (Slo2, Slo3, Slo4, Slo5, Slo6) szekvencia, valamint 2009-es, Portugáliából származó és franciaországi vírusszekvenciák is. A 9. ábra ezt az európai csoportot mutatja be. A csoportban a legnagyobb egyezést a két azonos szekvenciájú szerbiai vírus mutatja, de további hét párnál is csak 1—1 nt különbséget találtunk. Ráadásul a leginkább eltérő két szekvencia (két romániai) is több, mint 99 %-ban hasonlított a többire. A 644. sz. horvátországi szekvencia és a HQ591380, szintén Horvátországból származó vírusgenom, valamint egy 2009-es kínai szekvencia 100 %-ban megegyeztek, és a 2003-ból származó franciaországi vírusgenomokkal kerültek egy csoportba (99 % feletti egyezés). A 686. sz. horvátországi vírus egy korábbi időből származó lengyelországi szekvenciával áll szorosabb genetikai rokonságban (99,49 %), de egy csoportba tartozik a 670. és 675. sz. horvátországi (ahol a szekvencia hasonlósága 99,89 %), valamint GenBankból származó szerbiai szekvenciákkal is. A 682. sz. horvátországi PCV2 az 5. sz. magyarországi szekvenciával található egy ágon (99,66 % egyezés), míg a 3. sz. hazai szekvencia három, 2007 előtti kínai genommal (99,15—99,21 % hasonlóság), a 6. sz. magyarországi pedig 2008-ból származó, szintén kínai szekvenciákkal van egy filogenetikai csoportban (a legnagyobb hasonlóság a filogenetikai fa alapján az FJ706703 genbanki sz.-ú vírussal 98,7 %). A romániai 8. sz. minta a magyarországi WB—H6 (AY874168) vaddisznó eredetű PCV2-vel áll szoros genetikai rokonságban a régió belül (97,11 %).



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

A 703. sz. horvátországi és a 22. sz. szerbiai vírus a PCV2b 1A és 1B szubtypus közötti területen foglal helyet, mindkét vírus inkább az 1B szubtypushoz áll közelebb az NJ módszerrel készült filogenetikai ábrán. A filogenetikai ábrától független összehasonlítást figyelembe véve mindkettő a PCV2b genotípus 1A szubtypusához tartozik (Pubmed nucleotide blast analízis, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Az ML módszerrel is mindkét vírus a PCV2b 1A szubtypushoz csoportosul. A TN analízis alapján a PCV2b 1A szubtypus legalább három részre bomlik. Ennek egyik ága a PCV2b 1B szubtypus, és így helyeződnek a kettő között a fenti szekvenciák. A két vírusgenom egymásra 99,32 %-ban hasonlít. A szekvenciák összehasonlítása során a replikáz génen két as változással járó nt-mutációt azonosítottunk. A 34. nt a szerbiai esetben a PCV2b 1B, míg a horvátországi mintánál a PCV2b 1A szubtypusra jellemző. A 105. nt a horvátországi vírus esetében változott meg úgy, hogy as változást is okozott, ami nem jellemző sem az 1A, sem az 1B szubtypusra. A kapszid esetében as változást nem találtunk.

A két genotípus egyikébe sem sorolt egyéb vírusokat is elemeztük. Két esetben az 1040. nt helyén egy T inzerciót lehet megállapítani (EU450592 és JF317571). Mindkét vírust Koreában azonosították, és az előbbit az 1A és 1B szubtípushoz, míg a másodikat egyértelműen az 1A csoportba sorolták (Nguyen és mtsai., 2012). A másik ide csoportosuló 3 kínai szekvenciáról (genbanki sz.: EU503039, GU083582, JQ002672) leírás nincs, a GenBankban egyedül a GU083582 sz. vírust csoportosítják a PCV2b 1A alcsoportba. A TN analízis alapján a két koreai szekvencia a PCV2b 1B alcsoportba került, míg a másik három a szerbiai és horvátországi vírussal együtt nem sorolódott be egyik szubtípusba sem. Az ML analízis alapján pedig a szerbiai és horvátországi szekvenciák a GU083582 és JQ002672 szekvenciákkal vannak egy csoportban, a PCV2b 1A-hoz sorolódva. Az EU503039 genbanki sz. vírus is a PCV2b 1A-ba sorolódott, azonban a másik négy szekvenciától külön. Az EU450592 és JF317571 genbanki sz. szekvenciákat a PCV2b 1B-vel közös ágra tette a program. A szekvenciáinkkal kapcsolatban úgy gondoltuk, hogy rekombinációval keletkeztek, ám ez nem igazolódott sem a program használatával, sem pedig az alignment alapján.

Az újonnan megvizsgált vírusok közül 1 lengyelországi (2. sz.), 2 magyarországi (4. sz., 1. sz.) és 2 horvátországi (662. sz., 671. sz.) szekvenciája tartozott a teljes genomok alapján a PCV2b 1B genotípusba. A lengyelországi PCV2 legközelebbi rokona egy Cságola (2009) korábbi felmérése során megszekvenált, szintén lengyelországi vírusgenom (az egyezés 99,15 %), míg a két horvátországi vírus egymással azonos (100 %). A 4. sz. magyarországi szekvenciához kínai szekvenciák állnak viszonylag közel a filogenetikai elemzés alapján (99 % feletti egyezéssel), míg az ML analízis alapján a két fentebb említett horvátországi vírussal vannak egy ágon (99,15 %). A magyarországi 1. sz. vírus található a legtávolabb mindezeketől. A fának azon ágán helyeződik, ahol főként 2009–2010-ből, a Távol-Keletről származó vírusok foglalnak helyet. Az ML alapján teljesen külön ágon található, míg a másik két filogenetikai fán a legközelebbi rokona egy koreai szekvencia (JF317573, 99,1 % az egyezés).

A PCV2b 1C (PCV2d) szubtípusú vírusokról feltételezik, hogy a patogenitásuk magasabb, mint a többi genotípusba tartozó vírusé. Az ide sorolt vírusok között van olyan, amelynek a kapszidgénjén az 1035. nt kiesett (Guo és mtsai., 2011), és emiatt az aminosavak száma eggyel megnőtt. Ilyen deléciós mutáns vírust már leírtak Közép-Európában is, és a mi vizsgálatunk is igazolta a jelenlétét. A HQ378158 azonosító sz. (Savic és mtsai., 2012) és a 14. sz. szerbiai szekvencia is ide tartozik. Toplak és munkatársai (2012) ide sorolták az AY874167 genbanki számú, hazánkban kimutatott vaddisznó eredetű vírust, valamint az egyik szerbiai (JF795337) és egy szlovéniai (DQ010548) vírust is. Utóbbi két vírusnak a teljes genomszekvenciája nem érhető el, így az általunk készített fákban nem

ábráztuk. Az általunk készített filogenetikai ábrákon egy általunk megszekvenált genom (14. sz., Szerbiából) sorolódott ide egyedülként a közép-európai minták közül, számos kínai szekvenciával rokonságban. Egy korábbi szerbiai szekvencia (HQ3778158) viszont a filogenetikai fa alapján a PCV2b 1C szubtypusba tartozik, és a két szekvencia között a hasonlóság 99,15 %. Két USA eredetű genomot is ide csoportosított a program, amiről rövid közleményben azt jelentették, hogy filogenetikailag ugyan valóban ide tartoznak, de PCV2a és PCV2b genotípusú vírusok rekombinációjával jöhettek létre (Xiao és mtsai., 2012). Az általunk elvégzett filogenetikai elemzések során a fent említett AY874167 azonosító sz. (WB—H5) magyarországi vaddisznó eredetű vírus egy esetben (TN) a PCV2b 1C szubtypusba, egy esetben (ML) a PCV2b 1B szubtypusba és egy esetben (NJ) a PCV2b genotípusba (de szubtypusokon kívül) helyeződött. Mivel az erdélyi vaddisznók esetében is találtunk ide tartozó vírusokat, ezért annak a vizsgálatnak az eredményét a könnyebb érthetőség szempontjából itt írom le. A fent említett szerbiai és szlovéniai szekvenciák hiányosak, a deléció szempontjából fontos szakaszt nem tartalmazzák. A korábban Romániában leírt JN006445, JN006446, JN006449 és JN006450 genbanki sz. vírusok (Turcitu és mtsai., 2011) is ide csoportosulnak az általunk megszekvenált JN382158, JN382160, JN382163, JN382170, JN382178, JN382179, JN382183 és JN382188 genbanki sz. vírusokkal együtt. A Cap-fehérje vizsgálata során az 1035. nt (A) deléciója a JN006445 és JN006446 vírusoknál jelen van, az 1035. nt C, így egy lizin beépülése is biztos, de az utána következők (feltételezhetően stop kodon) már nincsenek jelen. A JN006449 és JN006450 szekvenciák esetében a fehérje 233 as, ám a stop kodon a szokásos TAA helyett TAG triplet, azaz az 1033. nt T helyett C-t tartalmaz. Az erdélyi mintákban és a magyarországi vaddisznóban ilyen jellegű változást nem mutattunk ki. A BioEdit program alapján a közép-európai PCV2b 1C szekvenciák között a maximális hasonlóság 99,71 % (JN006449 és JN006451, illetve a JN006449 és LN382158 között), a legnagyobb különbség a 14. sz. szerbiai minta és a JN382160 jelű romániai vírus között van, 91,92 %. Ezt ugyan magyarázhatja, hogy a szerbiai vírust a PCV2b 1C (PCV2d) csoporthoz soroltuk, de a PCV2b 1C csoportba sorolt JN006445 és AY874167 genomok között is nagy a mérhető különbség (93,01 %). A PASC analízis alapján a JN006445 áll a legközelebb a PCV2b 1C (PCV2d) csoporthoz (98,72 % a hasonlóság a 14. sz. szerbiai vírussal).

Új csoportként szerepel a PCV2a genotípuson belül helyeződő PCV2a (PCV2e) (Wang és mtsai., 2009). A leírással (2006 előtről származó kínai szekvenciákat tartalmazó csoport) ellentétben 6 db 2009 utáni szekvencia is ide tartozik (mindhárom fán). Mindhárom fa alapján a PCV2a szubtypus ebből a csoportból ágazik el. A távolsági mátrix alapján is ez a csoport inkább a PCV2a genotípus tagja, mint önálló genotípus.

Említésre méltó egy további ág is, amely mindhárom analízis alapján azonos csoportnak tűnik. A csoport különálló, de a PCV2c-vel helyeződik egy ágon. Azonban a távolság analízis során nem tűnnek szoros rokonoknak. Ez a csoport főleg vietnámi, kínai szekvenciákból áll, bár Koreából és az egyik elemzés alapján Belgiumból származó szekvenciák is ide tartoznak. A vírusok többsége 2010-ből és 2011-ből származik. A hasonlóság azok között a vírusgenomok között, amelyek legalább kétféle módszerrel készült fán is ebbe a csoportba tartoznak 94,74–99,89 % közötti. A szekvenciákat tekintve ide három csoport vírusai tartoznak: az első csoportba olyan szekvenciák, amelyek az 1041. helyen egy T inzercióval rendelkeznek, ettől azonban a kapszidfehérje stop kodonjának helye nem változik, és a fehérje 233 as hosszúságú. Az eredeti leírás alapján (Nguyen és mtsai., 2012) ezeket a vírusokat a PCV2a 2E csoportba osztották, megállapítva, hogy azon belül egy önálló ágot képviselnek. A Cap-fehérjén a 86–91 as motívum nem a PCV2a-ra (S_NPR_SV) hasonlít, hanem a PCV2b-vel (T_NKI_SI) egyezik meg, akárcsak a másik két csoportban (az 1. melléklet tartalmazza az as teljes nevét). A távolsági mátrix eredménye alapján a rokonság nem tűnik nagyon szorosnak a másik két csoporttal, a páronkénti összehasonlítás sem ad 97 %-ot elérő eredményt. A másik csoport olyan vírusszekvenciákat tartalmaz, ahol a vírusok nt-jainak száma 1767, de a Cap-fehérje egy as-val hosszabb, mint az átlagos PCV2 esetében. Itt a szokásostól eltérően egy A kiesett (1035 nt helyéről), ám az 1033. nt helyére egy C inzertálódott, így eltolódik a stop kodon, és TAA helyett TGA-val záródik a leolvasási keret. Ez a variáció megegyezik a PCV2b 1C (PCV2d) szubtypussal, ahol ugyanilyen Cap-fehérje is lehetséges. A csoportról azt írják az irodalomban, hogy a PCV2a 2C (AY256459 magyarországi törzs) és a PCV2b 1C (FJ948168 kínai törzs, a mi fánkban a PCV2b 1C (PCV2d) csoportba sorolt vírus) rekombinációjából létrejött vírusok (Cai és mtsai., 2012). Ha ez így igaz, akkor a csoport többi tagja is ide tartozik. Megjegyezném, hogy a földrajzi távolság és az eltelt évek alapján ez a PCV2 esetében elég nehezen hihető: egy európai 2003-as vírus és egy kínai 2008-as vírus rekombinációjából származó vírusokat találtak Kínában 2010-ben és Vietnamban 2011-ben. Bár ez a csoport a távolsági mátrix alapján olyan messze áll az első csoporttól, mint a PCV2a 2E-től illetve PCV2b 1C-től. A harmadik csoportban a kapszid 233 as hosszú, és a genom is 1767 nt. Ez utóbbi csoport csak az NJ módszerrel készített fa alapján tartozik ide, míg a másik két módszer szerint a PCV2b genotípusba sorolódik. A TN analízis alapján a PCV2b 1B és PCV2b 1C szubtypusok között, csoporton kívülként, míg az ML analízis alapján a PCV2b 1B szubtypushoz tartozik. Az első csoporton belül a hasonlóság 94,74–98,87 %, a második csoporttal 95,53–97,17 %, a harmadikkal pedig 94,92–97,34 %. A második csoporton belül a hasonlóság 97,23–99,6 %, a harmadikon belül 99,15–99,66 %, míg a két csoport között

96,26—96,89 %. A PCV2c vírusaival és a HQ591379 és HQ591381 sz. horvátországi vírusokkal a legnagyobb hasonlóság nem haladja meg a 98 %-ot.

Az általunk szekvenált vírusgenomok esetében a rekombináció lehetőségét is vizsgáltuk. Ennek során egyértelmű, az alignmenteken jól látható rekombinációt nem találtunk. Rekombináció kereső programok segítségével azonban számos esetben lehetett ezeket megfigyelni. A számunkra rekombináns vírus érzetét keltő vírusokról sem látszott egyértelműen, hogy valóban azok lennének. A rekombinációs eseményeket elemző program eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

A Horvátországból származó HQ591379 és HQ591381 sz. mintákról úgy véltük, hogy két genotípus rekombinációjával keletkeztek (ahogy az EF524523 GenBankból származó vírus esetében is), ezt igazolni azonban nem tudtuk. A várt PCV2a és PCV2a (PCV2e) rekombinációval ellentétben a program szerint a 644 sz. horvátországi (PCV2b 1A szubtypusba tartozó) és az 1. sz. magyarországi (PCV2b 1B szubtypusú) vírusoknak megfelelő genomok rekombinációjával jöttek létre.

Az 1. sz. magyarországi minta, amely a többitől különbözőnek tűnt és a PCV2b 1B altípusba tartozik -az ORF2 részen inkább a PCV2a 2D szubtypussal mutat hasonlóságot-, az elemzések alapján egy rekombináns vírus. A nagyobbik „szülő” (major parent) a 662. sz. horvátországi szekvencia, míg a kisebb „szülő” (minor parent) a 2. sz. romániai szekvencia, illetve ezekhez nagyon hasonló ismeretlen szekvenciák. A 662. sz. szekvencia a PCV2b 1B altípusba tartozik, míg a minor parent PCV2b 1A szubtypusú szekvencia. Érdekesség, hogy a PCV2a egy másik rekombináns-vizsgálat alapján szintén lehet az egyik „szülő” (PCV2a 2D szubtypusba tartozó WB—H4 —AY874166), azonban ezen a szakaszon a PCV2a-val egyes PCV2b 1B és PCV2b 1C szekvenciák is egyeznek. A másik „szülő” PCV2b 1A alcsoportú 6. sz. magyar minta. A fentebb már említett 703. sz. horvátországi és 22. sz. szerbiai mintákból származó nukleinsav szekvenciákról a várakozásainkkal ellentétben a rekombinációkat azonosító programok a rekombináció tényét nem erősítették meg.

6. Táblázat. Rekombinációt elemző programok eredménye a saját szekvenciáinkon.

Szekvencia		Nagyobb szülő		Kisebb szülő	
<i>Név</i>	<i>Csoport</i>	<i>Név</i>	<i>Csoport</i>	<i>Név</i>	<i>Csoport</i>
8 sz. Ro	PCV2b 1A	AY874193*	PCV2b 1A	Cro 2	NB
1 sz. Mo	PCV2b 1B	662 sz. Ho	PCV2b 1B	2 sz. Ro	PCV2b 1A
1 sz. Mo	PCV2b 1B	AY874166	PCV2a 2D	6 sz. Mo	PCV2b 1A
HQ591374*	PCV2a 1D	662 sz. Ho	PCV2b 1B	2 sz. Ro	PCV2b 1A
HQ591379*	NB	644 sz. Ho	PCV2b 1A	1 sz. Mo	PCV2b 1B
HQ591381*	NB	1 sz. Mo	PCV2b 1B	644 sz. Ho	PCV2b 1A

*: genbanki azonosítószám, Ro: romániai, Mo: magyarországi, Ho: horvátországi, NB: nem besorolható a teljes genomszekvencia alapján.

8.1.2. Erdélyből származó PCV vizsgálata

Részt vettünk erdélyi minták circovírus tartalmának felmérésében és filogenetikai vizsgálatában is. A 2006/2007-es és 2007/2008-as vadászati idényben gyűjtött mintákban Szilágy és Temes megye kivételével a többi, összesen 13 megyéből (Krassó-Szörényből nem érkezett szervminta) sikerült PCV-t kimutatni. A vizsgált állatok 13,52 %-a bizonyult pozitívnak. A pozitív esetekben a minták 100 %-ában kimutatható volt a PCV2, míg a PCV1 csak 3 esetben. A 2010/2011-es vadászati idényből származó vaddisznókban a PCV2 8,3 %-ban fordul elő, míg házi sertéseknél a telepekre lebontott prevalencia 73,4—100 % között változott.

Összesen 28 vaddisznóból és 8 házi sertésből kimutatott PCV2 teljes ORF2 szekvenciája került meghatározásra, emellett a filogenetikai vizsgálatokhoz további 211, GenBankból származó PCV2 szekvenciát is felhasználtunk. Ezek alapján a vaddisznókban talált PCV2-ok közötti hasonlóság 89,6—100 %, ez az kompozíció alapján 87,5—100 %, a vaddisznókat a házi sertésekkel összehasonlítva 90—99,8 % (az alapján: 88,8—100 %), és a GenBank adataival összehasonlítva 86,3—100 % (az alapján: 86,3—100 %).

A filogenetikai analízis alapján a vaddisznók circovírusainak 86 %-a a PCV2b genotípusba tartozik, míg a maradék 4 állat vírusa a PCV2a genotípusba. A házi sertések PCV2 vírusai közül a szekvenált 8 minta mindegyike a PCV2b genotípusba sorolható. A PCV2a genotípusú vírusok az Olvera és mtsai. (2007) által leírt 2D szubtípusba tartoznak, míg a PCV2b genotípuson belül az 1A, 1B és 1C szubtípus is megtalálható. A vaddisznók esetében az 1A szubtípusba 12, míg az 1B-be 5, az 1C-be pedig 7 szekvencia tartozott, a házi sertéseknél ezek száma rendre 4, 3 és 1.

A megszekvenált 36 ORF2 esetében 5 vírustörzs vizsgálata alapján tűnt úgy, hogy rekombináció eredményeként jöttek létre. Ebből 2 a PCV2b 1B szubtípusba, 3 az 1C szubtípusba tartozott. Négy vírus esetében is ugyanazon ős párokat lehetett azonosítani: az egyik ős egy korábbi, szintén Romániából, vaddisznóból származó PCV2b 1C szubtípusú vírus (PCV2d), (Turcitu és mtsai., 2011), a másik ős pedig egy ebből a felmérésből eredő, (genbanki azonosító: JN382177) PCV2a 2D szubtípusú vírus. Az ötödik esetben egy PCV2b 1C szubtípusú vírus PCV2b 1B szubtípusú vírussal rekombinálódott. A rekombináció helyét és a lehetséges donor vírusokat a 7. táblázat ismerteti.

7. Táblázat. Romániából származó, rekombináns ORF2-vel rendelkező PCV2.

Elnevezés	genbanki azonosító	Származás megye/év	Genotípus/ szubtípus	Nagyobb	Kisebb	Rekombináns szakasz (nukleotid)
				„Szülő”		
Ro—WB 541	JN382170	Bihar/2010	PCV2b C	PCV2b 1B JN382184	PCV2b 1C JN382183	493—558
Ro—WB 666	JN382175	Hargita/2010	PCV2b B	PCV2a 2D JN382177	PCV2b 1C JN006445	224—467
Ro—WB 754	JN382179	Arad/2010	PCV2b C	PCV2a 2D JN382177	PCV2b 1C JN006445	236—582
Ro—WB 794	JN382183	Beszterce/2010	PCV2b C	PCV2a 2D JN382177	PCV2b 1C JN006445	209—564
F1—21	JN382185	Szatmár/2011	PCV2b B	PCV2a 2D JN382177	PCV2b 1C JN006445	221—475

8.2. Sertés circovírusok kapcsolata más állatfajokkal

8.2.1. Befogott rágcsálók

8.2.1.1. PCR eredmények befogott rágcsálók esetében

A PCR eredmények alapján a sertésstelepektől függetlenül gyűjtött rágcsálók mintái negatívnak bizonyultak mind sertés, mind pedig eddig ismeretlen, más circovírusokra.

A sertésstelepekről gyűjtött rágcsálók között ugyanakkor számos mintában PCV2-t tudtunk kimutatni. Összesen 13 egérben és 5 patkányban találtunk circovírust, ez az egerek 65 %-a, a patkányok 23,8 %-a. A vágóhídról származó egészséges sertések 80 %-ában lehetett kimutatni a vírust. A vemhes állatok esetében vírus DNS-t a magzatokban nem találtunk (az anya szerveinek pozitivitása esetében sem). A lépből és nyirokcsomókból lehetett leggyakrabban a PCV2 nukleinsavat kimutatni: az összes pozitív állat 100 %-ából, míg a tüdők és vesék 22,2 %-ában, a májnak csak 5,56 %-ában találtunk PCV2 DNS-t. Az egyes csoportokra vonatkozó eredményeket a 8. táblázatban foglaltuk össze.

8. Táblázat. A rágcsálókra vonatkozó PCR vizsgálatok összesített eredménye.

Csoport	PCV2 pozitív / összes állat száma			
	Tüdő	Máj	Vese	Lép és nyirokcsomó
1 (egér)	1/4	0/4	1/4	4/4
2 (egér)	1/5	0/5	0/5	1/5
3 (egér)	0/1	0/1	0/1	1/1
4 (egér)	0/4	0/4	0/4	4/4
5 (egér)	0/6	0/6	0/6	3/6
6 (patkány)	1/9	1/9	1/9	3/9
7 (patkány)	1/12	1/12	2/12	2/12
8 (sertés)	8/10	0/10	0/10	8/10

A csoport besorolásokat az 1. táblázat tartalmazza.

Az MCV1—MCV2 (Fenaux és mtsai., 2000) primerpár sertés circovírus specifikus, korábbi tapasztalataink alapján egy érzékeny, jól működő rendszer része. A rágcsáló minták esetében azonban csak 6 esetben kaptunk egyértelmű és szekvenanciaanalízishez is megfelelő eredményt. Az fragmentek egyértelműen PCV2b genotípusba sorolható vírusgenomok darabjai voltak.

A negatív minták esetében elvégeztük a PCR reakciót a Halami és mtsai. (2008) által leírt circovírus specifikus primerekkel is, hogy az állatokban esetleg előforduló, PCV2-től különböző vírusokat is ki tudjuk mutatni. A rendszer érzékenységének tesztelésére kontrollként PCV2 pozitív egér mintákat is használtunk. További pozitív esetet nem

detektáltunk, illetve a pozitív minták között akadtak olyanok, amelyek az univerzális rendszerrel negatívnak bizonyultak.

A SYBR Green segítségével elvégzett kópiaszám meghatározás alapján az egerekben a kiindulási vírusszám magasabb volt, mint a patkányoknál. Az olvadáspont analízis alapján a patkányokban talált vírusok esetében az olvadáspont alacsonyabb volt, mint a pozitív kontroll vagy az egerek vírusai esetében. Ezért agarózgél-elektroforézissel is kiegészítettük a vizsgálatot, amellyel nem-specifikus termék keletkezését nem tudtunk detektálni, a patkányok pozitívak voltak PCV2-re.

Teljes PCV2 genomszekvenciát meghatározni egyik rágcsálóból származó mintából sem sikerült. A sertésnél kitűnően működő két átfedő szakasz felerősítésével (Cságola és mtsai., 2006) illetve kisebb szakaszokból sem tudtuk a teljes genomszekvenciát fölépíteni. Vizsgálataink során nem csak az egymáshoz ajánlott párokat használtuk, hanem a genom körkörös voltát kihasználva több primer kombinációt is teszteltünk. A laboratóriumunkban a PCV2 diagnosztikájában gyakran használt CBB2—CSz2 primerek párosításával két egérből és két patkányból is meghatározásra került a PCV2, a szekvencia analízis megerősítette a PCV2b genotípusba való tartozásukat.

Az elsőre negatívnak bizonyuló rágcsálókhoz egy PCV2 specifikus „nested” rendszert állítottunk össze, ez a CBB1—CSz1, mint külső és MCV1—MCV2, mint belső primerek felhasználásával történt. Így további minták adtak circovírus pozitív eredményt. Az eredményeket a 9. táblázat mutatja be.

9. Táblázat. A PCV pozitív rágcsálók és sertés vírus nukleinsav kimutatására használt rendszerek illetve a rendelkezésre álló szekvenciák.

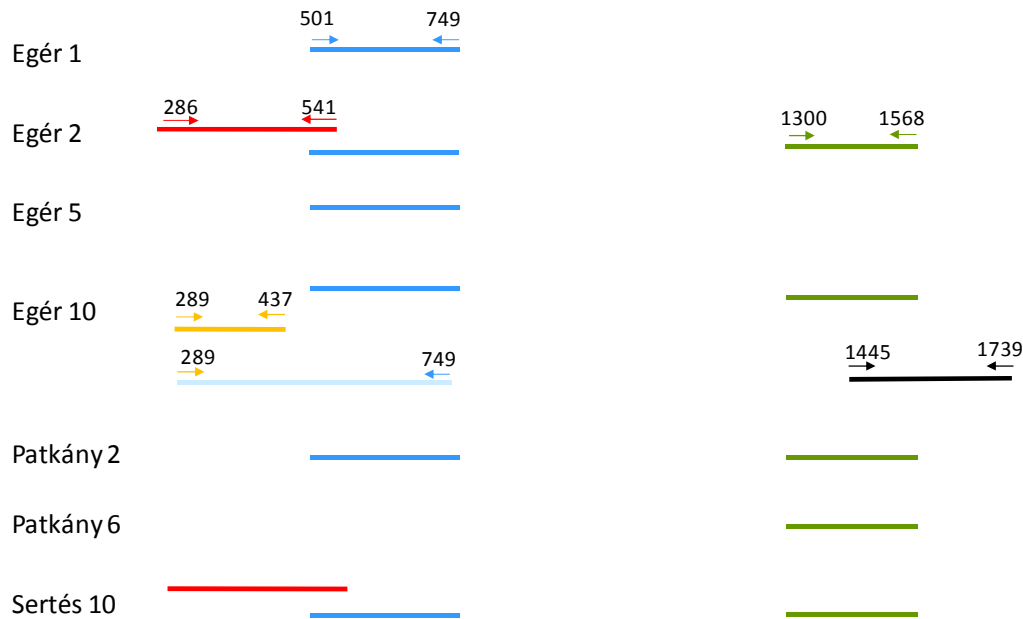
Csoport	Egyed	PCV spec.	PCV2 spec.	CV spec.	Fészkes PCR		Szekvencia
					CBB1, CSz1	MCV1, MCV2	
1.	1 sz. egér	+	?	-			+
1.	2 sz. egér	+	+	+			+
1.	3 sz. egér	?	-	-	+	-	+
1.	4 sz. egér	?	-	-	+	+	+
2.	5 sz. egér	+		-			+
3.	10 sz. egér	+	+				+
4.	11 sz. egér	-	-	-	+	+	
4.	12 sz. egér	-	-	-	+	+	
4.	13 sz. egér	-	-	-	+	+	
4.	14 sz. egér	-	-	-	+	-	
5.	16 sz. egér	-	-	-	-	+	
5.	19 sz. egér	-	-	-	+	-	
5.	20 sz. egér	-	-	-	+	-	
6.	2 sz. patkány	+	+				+
6.	6 sz. patkány	-	+				+
6.	8 sz. patkány	-	+				+
7.	13 sz. patkány	-			+	+	+
7.	17 sz. patkány	+			+	+	+
8.	10 sz. sertés	+	+	+			+

+: a pozitív reakciókat jelöli, -: a negatív reakciók jele, ?: kétes reakciók, az üres cellák azt jelzik, hogy ott nem végeztünk vizsgálatot. A CV circovírust jelöl. A csoport besorolásokat az 1. táblázat tartalmazza.

8.2.1.2. Szekvencaanalízis a befogott rágcsálók esetében

7 minta esetében készült szekvencaanalízis az MCV1—MCV2 szakaszcól: 5 esetben közvetlenül a mintából származott a termék, míg a 7. csoport 2 patkányából csak előzetes felerősítés után sikerült a megfelelő szakaszt kinyerni. Minden minta PCV2b-nek bizonyult, azonban ezen a konzervatív szakaszon is voltak eltérések.

CBB2—CSz2, illetve univerzális circovírus kimutató primerekkel további 4 rágcsálóból és sertésből más szakaszok nukleotid meghatározása is elkészült, amelyek szintén PCV2b-nek bizonyultak. A sikeresen amplifikált szakaszokat és genomon belüli elhelyezkedésüket a 10. ábra mutatja be.



10. Ábra. A sikeresen előállított, rágcsálókából származó PCR termékek PCV2b genomhoz viszonyított helyeződése. A fekete színű vonal a lineárisan ábrázolt PCV2b genom. A számok a primerek kötődési helyei. A kék nyilak a Fenaux és mtsai. (2000) által leírt primerek, a piros nyilak a Halami és mtsai. (2008) által leírt belső primerek, a zöld nyilak a CSz2—CBB2 primerek, a narancssárga nyilak a CBB1J—CBB3 (Cságola és mtsai., 2006), míg a fekete színnel jelölt primereket Dán és mtsai. (2003), valamint Meehan és mtsai. (2001) publikálták. A színes vonalak az egyes primer kombinációkkal nyert amplikonokat reprezentálják.

8.2.1.3. IIF és IHK

Az iIF vizsgálatot 3 PCV pozitív patkány (6. csoport 2. sz., 6. sz. és 8. sz.) esetében végeztük el kriosztátos metszetekből. Vizsgálatainkhoz a következő kontrollokat használtunk: pozitív kontrollként egy sertés (8. csoport 10. sz. állat) nyirokcsomóból készült metszetet, negatív kontrollként pedig egy PCR-rel negatív patkányból (6. csoport 4. sz. állat) készített metszetet. A rágcsálók közül a 6. sz. patkány májában találtunk pozitivitásra utaló elváltozást, míg a sertés esetében a pozitívitas nem volt egyértelmű. A többi állat esetében negatív reakciót állapítottunk meg.

A 6. sz. patkány (6. csoport) és egy sertés (8. csoport 10. sz.) kriosztátos metszetén illetve a 10. sz. egér (3. csoport) paraffinba ágyazott metszetén IHK-t is elvégeztünk. Az eredmények elbírálásához dr. Szeredi Levente segítségét kértük. Véleménye szerint a metszetek eredménye nem volt pozitív.

Klasszikus, szövettanyészetben történő vírusizolálással is próbálkoztunk, azonban ennek eredmény negatív lett (nem mutatott adatok).

8.2.2. Egérkísérlet eredménye

A nulladik passzázs egerei az exterminálás után PCV pozitívnak bizonyultak. A vizsgálatot szervenként is elvégeztük ezeknél az egereknél, és a qPCR eredményeként megállapítottuk, hogy a tüdő és a szív kisebb mennyiségben tartalmazott vírust (nem mutatott eredmény), mint a többi szerv, ezért később nem használtuk fel ezeket a szerveket.

Az egerekből már az első egér passzálás után sem sikerült vírust kimutatni qPCR segítségével. Igyekeztünk a mintákat RCA segítségével felsokszorozni, és azt vizsgálni PCR segítségével, azonban az MCV1—MCV2 illetve a CSz2—CBB2 primerpárokkal elvégzett reakció is negatív eredménnyel zárult.

8.2.3. Szarvasmarha vérsavó vizsgálati eredmények

8.2.3.1. PCR eredmények

Mindhárom szarvasmarha és a telepről érkezett sertések mintái is pozitívak voltak. A teljes genom PCR is sikeres volt a 2. sz. szarvasmarha vérsavó esetében. A víruson több olyan helyet is azonosítottunk, ahol a szekvencia nem egyértelmű. Itt a szekvenálás során két nt is körülbelül ugyanolyan gyakorisággal fordult elő. A két nt közül az egyik minden esetben az volt, amelyik a telepen a sertésekben jelen lévő vírusban is megtalálható. A változások as változást is okoznak, a Rep-fehérjén 1, a Cap-fehérjén pedig 4 as is változik. Az így megváltozott vírus megtalálható máshonnan származó sertések PCV2 vírusai között és PCV2b 1A típusú, akárcsak a sertéstelepi vírus.

8.2.3.2. Immunfluoreszcenciás vizsgálat

A vérsavók iIF vizsgálata során a három szarvasmarha vérsavóból nem sikerült PCV2 ellenanyagot kimutatni.

8.2.4. Halak, hüllők, kétéltűek vizsgálati eredményei

8.2.4.1. Halak, hüllők és kétéltűek PCR eredménye

A hüllők és kétéltűek vizsgálata negatív eredménnyel zárult. Circovírus DNS-t nem sikerült belőlük kimutatni.

A halak közül a márnákban 8 esetben találtunk circovírust az általános circovírus kimutatására (Halami és mtsai., 2008) használt PCR rendszerrel. Mind a 8 esetet meg tudtuk erősíteni az általunk tervezett diagnosztikai primerpárral is. A diagnosztikai primerpárt azért dolgoztuk ki, hogy a szövetenyésztés során könnyen ellenőrizhető legyen a vírus szaporodása. A pozitív szervekből a vírusizolálást egy külföldi laboratórium végezte (Queens University of Belfast), amely vizsgálat eredménye a jelen dolgozatnak nem tárgya. A vírus

PCR-rel történő kimutatása több szerv esetén is sikeres volt, főként májból és lépből, illetve, ha az ikrás hal valamely szerve pozitív volt, akkor a vírust az ikrából is ki tudtuk mutatni.

A hat lesőharcsából három esetében lehetett circovírust kimutatni. Itt a szervenkénti vizsgálatra nem volt lehetőség, mert az állatok előzetes feldolgozás után kerültek a laboratóriumba.

8.2.4.2. Halak circovírusainak szekvenálási eredménye

Márnák esetében a szekvenciameghatározás eredményeként két teljes, új vírusgenom nukleotid sorrendjét határoztuk meg, amelyek a GenBank adatbázisába is bekerültek BaCV1 (hivatkozási szám: GU799606) és BaCV2 (hivatkozási szám: JF279961) néven. A két vírus két állatból került meghatározásra. Mindkét vírusgenom 1957 bázis hosszú, egymással 94,7 %-ban azonosak.

Lesőharcsáknál is két esetben határoztuk meg a kimutatott vírus teljes nukleotid sorrendjét: CfCV1 (hivatkozási szám: JQ011377) és CfCV2 (hivatkozási szám: JQ011378). Mindkét genom 1966 nt hosszúságú, egymással 99,4 %-ban egyeznek meg.

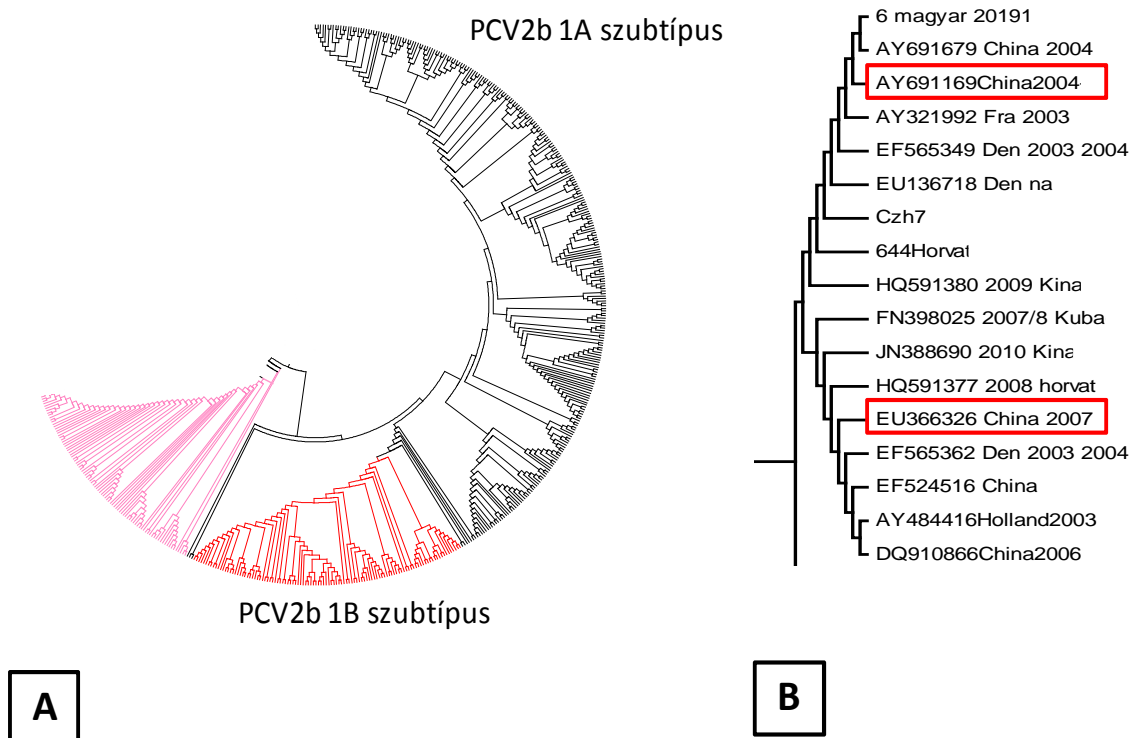
A filogenetikai analízis elvégzése során saját vírusszekvenciáinkat a GenBankban megtalálható reprezentatív circovírus és cyclovírus mintákkal hasonlítottuk össze, a gének as sorrendjét, illetve a teljes genomot is. A halak vírusai minden kétséget kizáróan circovírusok, de egyik eddig ismert circovírus csoporthoz sem tartoznak, önálló víruscsoportot alkotnak.

9. MEGBESZÉLÉS

9.1. A PCV2 genetikai változásai

A GenBankban ma már számos szekvencia rendelkezésünkre áll a közép-európai régióból is. Míg a 2003-ban leírt adatok elsősorban a PCV2a genotípusról tettek említést, addig 2007-ben túlnyomó részt PCV2b került azonosításra. Jelenlegi vizsgálataink során is ezt az eredményt kaptuk, PCV2c genotípust nem mutattunk ki és a referencia-szekvenciák kivételével a GenBankban sem találtunk ide tartozó vírusokat. Munkánk során egy PCV2a genotípusú vírust, két be nem sorolható PCV2 szekvenciát, illetve harmincnégy PCV2b genotípusba tartozó vírust azonosítottunk. Ez utóbbiak közül a legtöbb vírus az Olvera és mtsai. (2007) által létrehozott csoportok közül a PCV2b 1A szubtípus tagja volt.

A PCV2b 1A és 1B szubtípusok (Olvera és mtsai, 2007) nem alkotnak külön csoportot a kapszidfehérjék analízise alapján, így néhány 1A és 1B szekvencia is egy ágra került az általunk készített filogenetikai ábrákon, ami esetenként közelebbi rokonságot feltételez, mint két 1B alcsoportba tartozó vírus között. A két szubtípus elkülönülése a teljes szekvenciák alapján azonban szembetűnő (11. ábra), ezért csak a teljes genomokról készült fákat használtuk fel elemzéseink során. A két szubtípusra jellemző motívumok alapján az elkülönítés a kapszidfehérjék as sorrendje alapján is lehetséges lenne, ám ekkora mintaszámnál egyszerűbb, ha csak a teljes genom szekvenciákat használjuk. Természetesen szükség esetén a kapszidfehérjéket is megvizsgáltuk, mint ahogyan azt a HQ591379 és HQ591381 genomok esetén már bemutattuk.



11. Ábra. A teljes genomszekvencia alapján NJ módszerrel készített filogenetikai ábra (A), és a kapszidfehérje aminosav-kompozíciója alapján NJ módszerrel készített filogenetikai ábra (B). A teljes genomszekvenciák alapján a PCV2b 1A és 1B szubtypus elkülönülése egyértelmű, míg a kapszidfehérjék alapján a két szubtypus nem választható külön. Az „A” ábrán a PCV2b 1B szubtypus pirossal jelölt. A nem feliratozott rész a PCV2b 1C szubtypus, rózsaszínnel jelölve. A „B” ábrán a pirossal bekeretezett vírusok a PCV2b 1B szubtypusba, a külön nem jelöltek pedig a PCV2b 1A szubtypusba tartoznak.

Három különböző programmal készítettünk filogenetikai elemzést (NJ, ML és TN). A programok által generált ábrázolások egyike sem a várt eredményt adta. A felmerült ellentmondások tisztázására javasolt Bayesian analízist a szekvenciák nagy száma miatt nem tudtuk elvégezni, így a három filogenetikai fa alapján végeztünk analízist. A szekvenciák többsége egy csoportba sorolódik. Néhány olyan eset látható, ahol az eltérő matematikai modell más csoportba sorolja az érintett szekvenciákat. A különböző algoritmussal készített ábrákat a dolgozat 4. mellékletében tüntettük fel. Az alignmentek hasonlósági értékei is eltérő eredményt mutatnak a különböző programok használatával, mivel azok másképpen súlyozzák az alignmentek egyes pontjait, illetve sok esetben a pontmutációk nem járnak as változással, míg más esetben okozhatnak olyan as változást, ami a más szubtypusú vírusokra lehet jellemző. Mivel ezek a vírusok rendkívül kisméretű genommal rendelkeznek, ezért egy—két aminosavnyi változás is igen fontos lehet a vírus besorolásában. Ilyen esetben azonban a természetben lezajló lassú változási folyamatról van szó és nem rekombinációról.

A PCV2a genotípus teljes egészében visszaszorulni látszik, mind Közép-Európában, mind a világ más részein. A 2007 utáni időből származó 278 szekvencia közül mindösszesen

23+6 tartozott ide. A 6 vírus a PCV2a (PCV2e) csoporthoz tartozik, amely leírása alapján (Wang és mtsai., 2009) csak 2006 előtti Kínában leírt vírusok kerültek ide. Mindhárom analízis szerint ugyanaz a 14 kínai szekvencia került ebbe a csoportba, köztük 6 a 2009—2011 közötti időszakból. Mindhárom fa alapján a PCV2a szubtypus ebből a csoportból ágazik el. A távolsági mátrix alapján is ez a csoport inkább a PCV2a genotípus tagja, mint önálló genotípus. Cságola (2009) által végzett csoportosítás eredményét tükrözi az általunk készített filogenetikai ábra is, miszerint a PCV2a genotípuson belül öt csoportot lehet megkülönböztetni: PCV2a (PCV2e), PCV2a 2A, PCV2a 2D, PCV2a 2E, valamint a közös csoportot alkotó PCV2a 2B és PCV2a 2C. Az NJ elemzés alapján készült filogenetikai ábrán szembeűnik, hogy a PCV2a 2B és PCV2a 2C közelebbi rokonok, mint a szubtypusok általában, illetve a páronkénti összehasonlítás eredménye alapján az egyezés a két szubtypus között 97 % feletti, a távolsági mátrix alapján is a két szubtypus között a távolság átlagosan 0,02—0,03, míg más szubtypusoknál ez az érték magasabb. Az Olvera és mtsai. (2007) által készített csoportosítás idején a PCV2a (PCV2e) szekvenciáknak egy része már elérhető volt a GenBankban, azonban a vizsgálat során ezeket alcsoporton kívül, a PCV2a genotípushoz sorolták. Mindezek alapján azt javasoljuk, hogy a hagyományok megtartása miatt a PCV2a 2B és 2C maradjon önálló két szubtypus, azonban a PCV2a (PCV2e) helyett a PCV2a 2F lenne a helyesebb megnevezés.

A PCV2c genotípushoz sorolt 3 referencia adaton kívül más ide tartozó vírust nem sikerűlt azonosítani. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a csoport evolúciós zsákutca lehetett.

A legelterjedtebb genotípus minden kétséget kizáróan a PCV2b. Ezen belül hat (2. sz. lengyelországi, 1. és 4. sz. magyarországi, 662. sz. és 671. sz. horvátországi, 14. sz. szerbiai) szekvencia kivételével az általunk szekvenált vírusok a PCV2b 1A szubtypusba tartoztak, megerősítve azt a korábbi elgondolást, hogy a vírus genetikai anyagára a beszűkülés jellemző. Cságola (2009) ezt a csoportot tartotta a legesélyesebbnek a szélesebb körű elterjedésre, és Közép-Európa vonatkozásában ez beigazolódni látszik, hiszen a teljes szekvenciák jelentős többsége saját vizsgálataink, és korábbi vizsgálatok alapján is, ide tartozik. A teljes adatbázisunk alapján is a PCV2b 1A szubtypus a legelterjedtebb, bár a Közép-Európán kívülre eső területeken ez a dominancia felborulni látszik, és eltolódik a PCV2b 1C szubtypus felé. Az erdélyi evolúciós vizsgálatoknál is azt tapasztaltuk, hogy a vaddisznók esetében az 1A szubtypusba 12, míg az 1B-be 5, az 1C-be pedig 7 szekvencia tartozott, az erdélyi házi sertéseknél ez 4—3—1, ami viszont nem mutatja ezt a tendenciát. A genbanki adatok alapján azt lehet megfigyelni, hogy 2010 óta csak néhány szekvencia sorolódik a PCV2a 1A-ba. A PCV2b 1B szubtypusba tartozó vírusok száma 2008 és 2010 között növekedett (az összes PCV2b 1B szubtypus 45,87 %-át ilyen

évjáratú vírusszekvenciák adják, az ennél újabbak csak 13,76 %-ot). Feltételezésünk szerint a vakcinázások módosították a természetes evolúciós folyamatokat, valószínűleg a PCV2b 1C szubttípus is ezért kezdett erőteljesebben terjedni, könnyebben áttörve a vakcinák által kiváltott védelmet. A hipotézist alátámasztja, hogy az ebbe a csoportba tartozó szekvenciák 78,41 %-a 2008 óta eltelt időből származik, ekkor váltak a vakcinák széles körben elérhetővé. A dolgozatban szereplő 278 újonnan (2007 után) azonosított vírusból 227 tartozott a PCV2b genotípusba. A 227 vírus 37,44 %-a a PCV2b 1A szubttípusba sorolódott, a 32,16 %-a a PCV2b 1B-be és a 30,40 %-a a PCV2b 1C-be (ebből a PCV2d: 22,47 %).

Egyes felmérések alapján a PCV2b 1C (PCV2d) szubttípusú vírusok patogenitása magasabb, mint a többi genotípusba tartozó vírusé. Az ide sorolt vírusok között van olyan, amelynek a kapszidgénjén egy deléció következett be (Guo és mtsai., 2010), és emiatt az aminosavak száma eggyel nőtt, így feltételezik, hogy a vakcinák nem képesek hatékony keresztvédelmet biztosítani a vírus ellen. A deléció az 1035. nt-ot érinti, ám vannak a csoportban olyan vírusok is, amelyeken a deléció mellett az 1033. nt-on egy C inzerció is megfigyelhető a kapszidgénen, így a nt szám nem változik (1767 nt). Ismert azonban olyan PCV2 szekvencia is, ahol ez a beépülés nem történt meg, azaz a nt-ok száma 1766 a teljes genomot illetően. Az as szintjén itt eltérés a két típus között nem látható, ami valószínűsíti, hogy a vírus fennmaradása szempontjából nem lényeges a teljes genom hosszúsága. A korábban már leírt PCV2b 1C szubttípusba is tartoznak olyan vírusok, amelyek a fent leírt mutációval rendelkeznek, és már a vakcinák megjelenése előtt kimutatták őket. Így tehát azt nem lehet mondani, hogy ez a variáns a vakcinázás hatására alakult ki, bár kétség kívül a vakcinázás elterjedésével vált tömegessé. Egy különálló, a filogenetikai fán a PCV2c-hez közeli ágon helyeződő víruscsoport egyes tagjai is hordozzák ezt a típusú kapszidfehérjét. Ebbe a csoportba is elsősorban 2010 utáni szekvenciák tartoznak, ami megerősíti azt az elképzelést, hogy ez lehet az egyike a vakcinázás ellen kialakuló hatékony útnak a vírus evolúciójában. A két 2009-es horvátországi be nem sorolható vírus is erre az evolúciós menekülési útvonalra utal. Az említett vírusokban is megfigyelhető a kapszidfehérje változása, amely némileg eltérő, mint a PCV2b 1C esetében, de mindenképpen felhívja arra a figyelmet, hogy a hosszabb kapszidfehérje megjelenése és térnyerése lehet a vakcinázási hatások alóli kivezető egyik evolúciós út.

A PCV2b 1C (PCV2d genotípusnak mondott) vírusok önálló genotípusként való említése (Guo és mtsai., 2010; Chen és mtsai., 2012; Zhai és mtsai., 2011) vitákat keltett, sokak szerint ezek a vírusok is a PCV2b genotípus tagjai. Az általunk elvégzett vizsgálatok alapján sem igazolhatóan önálló genotípusok, hisz egy ágon helyeződnek a PCV2b 1C szubttípussal mindhárom analízis alapján. A távolsági mátrix alapján is kitűnik, hogy sokkal közelebbi rokonok, mint a többi genotípus egymással, vagy a genotípuson belül a

szubtypusok egymással (3. melléklet). Ennek az eredménynek az alapján a PCV2d genotípus megnevezés nem tűnik helytállóknak. Mások által, kevesebb mintaszám alapján készített elemzésben is egyértelmű, hogy az 1C szubtypus egyik leágazása a PCV2d genotípus (Nguyen és mtsai., 2012). A genetikai vizsgálatok alapján ugyan nem tűnik helyesnek a PCV2d önálló genotípusnak nevezése, azonban az biztos, hogy Kínában a PCV2b 1C szubtypus az utóbbi években elterjedtebbé vált (Cai és mtsai., 2012).

A mesterséges csoportosítás hátránya, hogy számos vírus nem oda csoportosul, ahová várni lehetne. A 703. sz. horvátországi és a 22. sz. szerbiai szekvenciák sem a PCV2a 1A, sem a PCV2a 1B alcsoportba nem tartoznak, és a két csoport közötti rekombinációra utaló bizonyítékot sem találtunk ezeknek a vírusoknak az esetében. Valószínűsíthető, hogy a két vírus a természetben véletlenszerű változások sorozata során alakult ki.

Két különálló csoport létezése is feltűnik a filogenetikai vizsgálatok alapján. Így a PCV2c-hez közeli ágon elhelyezkedő, elsősorban 2010 utáni távol-keleti szekvenciákból álló ág. A csoport 3 kisebb ágból tevődik össze, a genetikai rokonság köztük nem egyértelmű. Az egyik ágnál a rekombinációt is lehetségesnek tartják, ám a térbeli és időbeli távolság meglehetősen bizonytalanná teszi ezt a lehetőséget. A másik csoportosulás a PCV2b 1C-hez hasonló kapszidfehérjével rendelkező vírusokat foglalja magába, valamint harmadikként ide tartozhat a PCV2b egy kisebb, egyértelműen be nem sorolható vírusainak a csoportja is. Ez a heterogenitás is a filogenetikai elemzések mesterséges voltára hívja fel a figyelmet.

Összefoglalva a vizsgálatok alapján a PCV2b 1C (PCV2d) önálló genotípusként való megjelölése indokolatlan. Ezekre a vírusokra a PCV2b 1C szubtypuson belül, egy terjedőben lévő, feltehetőleg magasabb patogenitással rendelkező csoportként lehet tekinteni. A PCV2 vakcinázás térnyerésével párhuzamosan nem zárható ki, hogy ez a változat fog elterjedni a következő évek során, visszaszorítva a többi szubtypust, újabb kihívásokat jelentve a hatékony vakcinázási stratégiák kialakításában. Jelenleg a PCV2b 1A szubtypusba tartozik a legtöbb teljes genomsekvenciával leírt vírus, bár a legújabb szekvenciák ma már inkább a PCV2b 1C szubtypusba tartoznak. Az biztosnak tűnik, hogy a PCV2a jelentősen visszaszorult. Várhatóan a tendencia erősödni fog, hisz a jelenleg forgalomban lévő vakcinák ezt a genotípust tartalmazzák, és a PCV2b vírusok már a vakcinázás előtt is elterjedtebbek voltak.

Fontosnak gondoljuk elmondani azt is, hogy a számítógépes programok alapul szolgálhatnak az evolúciós vizsgálatokhoz, de kizárólag ezek használatával messzemenő következtetések levonása nem mindig lehetséges. A vírusok csoportosítása például nagyon sok szempontból hasznos lehet, de az adatok tükrében elmondható, hogy egy csoportba sorolt vírusok esetében is hatalmas különbségek lehetnek. Példaként, a 3. melléklet

távolsági mátrix táblázatban két azonos szubtypusba sorolt vírus —PCV2b 1A— távolabb helyezkedik egymástól, mint a másodikként szereplő PCV2b 1A és az utána lévő PCV2b 1B, és ugyanez mondható el a kapszidfehérjére alapozott filogenetikai vizsgálat alapján. A circovírusok mutációs rátája igen magas (Firth és mtsai., 2009; Pérez és mtsai., 2010), a genotípusba sorolás feltételei pedig ennek nem megfelelőek. Hiszen a teljes genomon 2 % különbség (Grau-Roma és mtsai., 2008) nagyon kevésnek tűnik (36 pontmutáció már elegendő).

Evolúciós vizsgálataink kiterjedtek Románia erdélyi területeiről gyűjtött vaddisznó és sertés eredetű minták vizsgálatára is. Romániában az első PMWS esetet 2002-ben figyelték meg (Cadar és mtsai., 2007). A sporadikus megbetegedések hamar általánossá váltak, és Románia egész területén elterjedt a PCV2 illetve a PMWS. Ma már a vaddisznó állományokban is jelen van a PCV2, akárcsak a környező országokban: Magyarországon (Cságola és mtsai., 2006), Szlovéniában (Toplak és mtsai., 2004), Horvátországban (Lipej és mtsai., 2007). A vírus előfordulási aránya alacsonyabbnak tűnik, mint az európai országokban, függetlenül attól, hogy igazán magas értékeket eddig csak szerológiai vizsgálattal találtak.

Meglepő módon három esetben is sikerült Romániában PCV1 vírust kimutatni vaddisznókból. Az ismert, hogy házi sertésekben és vakcinákban a PCV1 előfordul, ám ez megerősíteni látszik Cságola és mtsai. (2008b) azon feltételezését, hogy a vírus állatról állatra is képes terjedni.

A PCV2 esetében a 2002-es első megjelenése óta eltelt alig több mint 10 év alatt a vírus jelenléte a házi sertés állományokban a 65—100 %-ot is eléri. A vaddisznók körében azonban a két vizsgált vadászati idény között a vírus jelenlétének a csökkenését lehetett kimutatni, míg az első idényben 13,4 % volt az előfordulási gyakoriság, addig a második idényben 8,3 %. Ezek alapján az semmiképpen nem mondható el, hogy a vírus fertőzöttség az erdélyi területeken növekedne. Mindez ellentmond annak a Románia DK-i részét érintő vizsgálatnak, ahol a vaddisznók majdnem 50 %-a pozitívnak bizonyult (Turcitu és mtsai., 2011). Igaz, ez utóbbi vizsgálat mintaszáma negyede volt az Erdélyt érintőnek, illetve a házisertések tartási körülményei is mások, leginkább külterjes, ami lehetőséget nyújt a vírus házisertésről vaddisznóra terjedése számára. Vizsgálataink alapján az Erdélyből származó genom szekvenciák eltérnek a Románia DK-i régiójából származóktól és a házi sertésekben kimutatottaktól is, míg a másik vizsgálatban a vaddisznók vírusai a házi sertésekéhez hasonlítottak. A filogenetikai analízis szerint az erdélyi sertés circovírusok sokfélék, a vaddisznók esetében PCV2a és PCV2b genotípus is előfordul. A PCV2b 1C alcsoportja Közép-Európából főleg vaddisznó eredetűeket tartalmaz. Lehetségesnek tartjuk ezek alapján, hogy ez a vírus a vaddisznókban kering. A szubtypusba sorolást ennél a

vizsgálatnál páronkénti összehasonlításra és a szubtypusokra jellemző motívumok kimutatására alapoztuk.

A genotípuson belüli illetve azok közötti rekombinációra is található példa a vaddisznók esetében (4 esetben). Ez bizonyíthatja, hogy egyszerre több circovírus is megfertőzheti őket, a vírusok rekombinálódhatnak és cirkulálhatnak a vaddisznókban, akár csak a házi sertésekben (Trible és Rowland, 2012). A négy, vaddisznókban azonosított rekombinációs történés mellett, egy ötödik rekombinációs vírust házi sertéseknél mutattunk ki. Ebben az esetben az egyik ősvaddisznó vírus volt, illetve egy házi sertés PCV2 nagyfokú hasonlóságot mutatott a vaddisznóból származóval, ezek alapján lehet azt feltételezni, hogy valamiféle kapcsolat az állatok között létrejöhetett.

Megjegyezném, hogy a rekombináció kereső programok használatával kapcsolatban egy ilyen kisméretű és gyorsan mutálódó vírus esetében kellő óvatossággal kell bánni. A közép-európai felmérés során a program számára rekombináns vírusok (a vizsgálat során a teret leszűkítettük a közép-európai régióra) időben igen eltolódtak, hiszen a program az összes rekombinációs lehetőséget feltünteti, így lehetséges az, hogy egy 2003-as magyarországi házi sertésből leírt szekvencia őse horvátországi és romániai házi sertések 2012-ből. A program szerint a PCV2a 2D szubtypusú vírus őse pedig az általunk PCV2b-hez sorolt két vírus. Így pl. az AY256456 HUN2 vírus (2003-ból, PCV2a 2D szubtypushoz tartozik) „nagyobb” ősenek (98,3 %-os biztonsággal) a 662. sz. horvátországi szekvenciát tartja 2012-ből (PCV2b 1B szubtypusba sorolt) és a „kisebb” ősenek a 2. sz. romániai vírust (2012-ből, PCV2b 1A szubtypus), vagy egy ahhoz hasonló vírust feltételez a program. Az alignment alapú összehasonlításnál nem látszik egyértelműen ez. Ezért gondolom azt, hogy ezek véletlenszerű pontmutációk inkább, mintsem egy rekombináció eredményei.

9.2. Lehetséges PCV2 ősök keresése

Sokáig a sertés volt az egyetlen olyan emlős faj, amelyben ki tudtak mutatni a fajra jellemző circovírust, emellett egészen az utóbbi évekig kizárólag madár circovírusok voltak ismertek. Bár 2009 előtt is voltak próbálkozások arra, hogy más emlősökből is sikeresen lehessen circovírusokat kimutatni, azonban ezek a kísérletek igen ellentmondó eredményekkel zárultak. A *Circovirus* genuson belül jól elkülönülnek a sertésből és a madarakból kimutatott circovírusok, de a genetikai kapcsolat nem megkérdőjelezhető. Azonban azt, hogy ez a kapcsolat egy eddig nem ismert, közös genetikai ősből indult ki, vagy az egyik vírus fajváltás során alakult ki adaptációval az új fajban, nem tisztázott.

A rágcsálókról feltételeztük, hogy köztük lehet az egyik lehetséges ősvadgazdafaj. Munkánk során ezt bizonyítani nem tudtuk, de kizárni sem, hisz a minták viszonylag szűk

területről és kis mintaszámmal álltak rendelkezésre. A kimutatott vírusok esetében egyetlen esetben sem tudtuk megkérdőjelezni a sertés eredetet. A konzervatív genomszakaszra tervezett MCV1—MCV2 primerpárok segítségével a sertésekben előforduló circovírusokat ki lehetett mutatni, így feltételeztük, hogy ha a rágcsálók az ősi vírust is tartalmazzák, azt is ki tudjuk mutatni. A rágcsáló vírus keresésére a negatív mintákból, illetve néhány pozitív mintán is egy olyan degenerált rendszert (Halami és mtsai., 2008) kezdtünk el használni, ami a *Circovirus* genus ismert tagjait képes kimutatni. A vizsgálat nem járt sikerrel, a korábban negatívnak bizonyult mintákból így sem tudtunk circovírust kimutatni, míg a pozitív minták szekvenenciaanalízise során csak PCV2b-t találtunk. Végeredményül elmondhatjuk, hogy ha létezik a rágcsálóknak saját circovírusa, akkor azt nem sikerült kimutatnunk sem a sertéstelepeken, sem az azoktól függetlenül gyűjtött mintákból.

Ugyanakkor, mivel a sertéstelepekkel összefüggésbe hozható rágcsálókból a PCV2 kimutatása sikerrel járt, a világon elsőként sikerült laboratóriumi körülményektől függetlenül igazolni azt, hogy az egerek a természetben is fertőződhetnek circovírossal és a vírust hordozzák is. A fertőzés mikéntje nem ismeretes, de a fertőzött sertések testnedveikkel ürítik a vírust és a rágcsálók azt felvehetik. Laboratóriumi vizsgálatok alapján, szájon át illetve belélegzéssel is felvehetik a vírust (Kiupel és mtsai., 2001; Cságola és mtsai., 2008a; Opriessnig és mtsai., 2009). Az állatkísérletek azt is kimutatták, hogy az egerek ürítik is a vírust vizelettel és bélsárral is, és megfertőzik társaikat (Cságola és mtsai., 2008a). Így feltételezhető, hogy a telepeken is fenntarthatják a fertőzést, esetleg a sertéseket is fertőzhetik. Ez veszélyezteti a vakcinázási program sikerét, ha a telepen a rágcsálók jelen vannak.

A sertések esetében a vírus magzatkárosító hatása ismert. A PCV2 a sertés placentán is átjut (Kim és mtsai., 2004; Pensaert és mtsai., 2004; Park és mtsai., 2005), és egyes feltételezések szerint magzatról magzatra is képes terjedni (Pensaert és mtsai., 2004). Laboratóriumi körülmények között a vemhes egerek magzataiból is lehetett kimutatni vírust (Kiupel és mtsai., 2001; Deng és mtsai., 2013). Kiupel és mtsai. (2001) szerint az újszülöttek mája kevés vírust tartalmazott, megbetegedést nem okozva bennük. Más magzati szervekből azonban a vírus kimutatása sikertelen volt. A természetes körülmények között fertőződött anyák magzataiból magunk sem tudtunk vírust kimutatni. Ennek több oka is lehet. Az egyik, hogy a magzatokat nem boncoltuk, és nem egy magzat alkotott egy mintát, ezért ha az irodalmi adatoknak megfelelően tartalmazott is vírust a máj, akkor az a mintánkban nagyon felhígult és nem érte el a detektálhatóság határát. Másrészt a laboratóriumi körülmények között az anyába bevitt vírus töredékét sikerült a magzatokból visszanyerni. Más adatok alapján is a PCV2 egerekben igen alacsony kópiaszámban mutatható ki. Az általunk elvégzett SYBR Green technikával történő kópiaszám mérés is alacsony

mennyiségben mutatta ki a vírust. Így előfordulhat, hogy a kimutatás szempontjából és a sikeres magzati fertőzést nézve a megfelelő vírusedmény ténylegesen nem jut be a magzatokba.

A szekvenenciaanalízissel új circovírus mellett PCV1-et sem találtunk. A rágcsálókban megsejtenített circovírus amplitonok mindegyike a PCV2b genotípusba tartozott, akárcsak a sertéslepen élő sertésekben. Az összehasonlítás során a vírus konzervatív részéről kapott szekvenciák alapján megállapítottuk, hogy az egér eredetű vírusok között eltérés mutatkozott. Egérből származó teljes vírusednom meghatározására tett kísérletünk nem járt sikerrel.

A vírusedhérjék kimutatása nem járt pozitív eredménnyel, bár az iIF eredmények alapján még azt sem lehet kizárni, hogy valóban van detektálható mennyiségben PCV2 antigén a rágcsálókban. Ennek magyarázata szintén lehet az alacsony mennyiségű vírus jelenléte. Az IF és IHK is érzékeny módszerek ugyan, de kevésbé, mint a DNS kimutatási technikák.

Egy laboratóriumi kísérlettel szeretnénk volna megerősíteni a rágcsálók rezervoár szerepét. Mivel a vadon befogott állatokban a vírus változékonyak tűnt, ezt folyamatos egérpaszálási kísérlettel szeretnénk volna minden kétséget kizáróan bizonyítani. A kísérlet negatív eredménye alapján ez a feltételezés nem igaz, az egerekben a vírus nem bizonyult átadhatónak. Az irodalmi adatokat (Kiupel és mtsai., 2001; Deng és mtsai., 2011; Cságola és mtsai., 2008a) megerősíti, hogy a nulladik passzázs egereiben a 27. napon a vírus kimutatható volt mind az öt állatból, a szervek közül pedig a lép, máj, vese és csecsemőmirigy is tartalmazott vírust. Azonban nem sikerült további fogékony egerekbe a vírust átadni. Ez alapján a Cságola és mtsai. (2008a) által kapott eredményt megerősíteni nem tudtuk, ahol a fertőzött egerek a vírust átadták a nem fertőzött társaiknak is, illetve a fertőzés minden esetben megered, amikor az állatokat hasüregbe oltották (Kiupel és mtsai., 2001; Deng és mtsai., 2011; Cságola és mtsai., 2008a). Ezek alapján feltételeztük, hogy a passzázs során a vírus fennmarad az állatokban.

Az RCA módszer alkalmazásával a mintákból már kis mennyiségű körkörös genom felerősíthető, így a PCV2 is. Azonban esetünkben az egérkísérletek során alkalmazott RCA felerősítés után alkalmazott PCR sem volt képes a circovírus detektálására. A sikertelenség okát megmagyarázni nem tudjuk. A nulladik passzázs egereit nagyobb dózissal fertőztük, mint Cságola és mtsai. (2008a), és a vírus ugyanaz a törzs volt. A korábbi kísérletben az egerek vizeletükkel és bélsarukkal is ürítették a vírust, kizárólag ezzel fertőzve meg társaikat. Ezért választottuk azt, hogy a kísérletben résztvevő egereket egy ketrecben tartottuk, amikor pedig csoportváltás volt, az új egerek alá kerülő tiszta alomba kevertük az előzőekben gyűjtött szennyezett alomanyagot. Így reméltük, hogy a hasüregbe oltás előtt kismennyiségű

vírussal már fertőződhetnek az állatok. Deng és mtsai. (2013) képesek voltak Kunming egereket fertőzni kontakt egerek útján úgy, hogy csak három napig tartották együtt a vírusürítő és a fertőzéstől mentes állatokat.

A kísérletünk sikertelenségét magunk magyarázni nem tudjuk, ezért olyan leírásokat kerestünk, amelyek magyarázatul szolgálhatnak. Ilyen, magyarázó publikációra nem bukkantunk, azonban leírás nélküli érdekes szekvenciaadatokat találtunk: kínai kutatók 2007-ből és 2008-ból származó szekvenciáit (genbanki azonosító: FJ667582—FJ667596 és FJ716703, FJ716704). Ezek eredménye szöges ellentétben áll a miénkkel, viszont teljes mértékben megerősítik az általunk bizonyítani kívánt elméletet. Az eltérő számú passzálás során kapott szekvenciák között olyanokat nem találtunk, amelyek 100 %-ban megegyeztek volna (a maximális egyezés 99,89 %, a legkisebb hasonlóság pedig 94,96 %). Érdekességként megjegyezném, hogy két esetben is a 2.—3. nt citozin helyett timinre cserélődött, ami azért furcsa, mert a 3. nt a szár rész első tagja. Feltételeztük, hogy az 1759. nt is módosult (mivel az áll vele szemben, így alakítva ki a duplikált részt), azonban ez a nt minden esetben guanin maradt. Sajnos erre vonatkozó publikációt nem találtunk, így sem a kísérleti elrendezést, sem a vizsgálatot nem ismerjük.

A szarvasmarhák esetében saját circovírus nem ismeretes. A kilencvenes évek közepétől folyó PCV kimutatására irányuló vizsgálatok eredményei sem egyértelműek. Két olyan közlemény jelent meg, amely szerint PCV2 (Kappe és mtsai., 2010), illetve ahhoz nagyon hasonló (Nayar és mtsai., 1999) vírus megtalálható a szarvasmarhákban. Ezekhez csatlakoznak a mi vizsgálati eredményeink is, miszerint sikeresen mutattunk ki PCV2-t növendék szarvasmarhák vérsavóiban. Az állatok PCV2-vel fertőzött sertéstelepen élnek. A szekvenciaanalízis során bizton állítható, hogy a szarvasmarhákból is kimutatott vírus PCV2b, ami a telepen élő sertésekben kimutatottal szinte teljes egészében megegyezik genetikailag. Ugyanakkor több ponton olyan nt mutációkat azonosítottunk, amelyek alapján felmerült a gyanú, hogy a vírusok szaporodnak a szarvasmarhában. Kappe és munkatársai (2010) olyan, 1 hónaposnál fiatalabb borjakból mutatták ki a vírust, amelyeknél bőrvérzés mellett az emésztőszervekben is vérzéseket találtak. Ezekből az állatokból más olyan kórokozót nem tudtak kimutatni, melyek a tünetekért felelősek lehetnek volna. Megállapították, hogy az elváltozások a csirke anémia vírus által okozott tünetekre emlékeztetnek és a háttéréből PCV2b-t mutattak ki. Az általunk vizsgált növendékeknek nyálkás-véres hasmenésük volt, ezért a szarvasmarhák vírusos hasmenésének kórokozójának (BVDV) a kimutatására törekedtünk. Miután ez nem sikerült, megpróbáltunk circovírust kimutatni. A *Rep*-gén nagyobb részét érintő szekvencia vizsgálat után a vírus második felét is analízisnek vetettük alá. Itt probléma merült fel a PCR során, mivel a vírusra specifikus primerpár a tisztított PCR termék esetében is dupla csíkot adott. A megfelelő

900 bázispár körüli termék mellett minden esetben egy 500 bázispárnyi termék is keletkezett. A szekvenálási hiba elkerülése végett próbálkoztunk a klónozással, de a klónozott termék amplifikálása során is, ha a circovírus primereit használtuk, megjelent az alacsonyabb termék is. A CBB1—CBB2 primerpárokkal végzett szekvenálás után úgy gondoltuk, hogy a vírus változik, valószínűleg ez okozza a hibát az egyébként jól működő rendszernél. Bár a szekvencia elemzése során erre utaló jelet nem találtunk.

Mindkét szarvasmarhában kimutatott vírus PCV2b 1A szubtypusúnak bizonyult. Az egyik az azonos telepen élő sertésekben azonosított vírussal megegyezett, és a HQ378160 genbanki számú szerbiai vírustörzsre hasonlított leginkább (három nt-ban tért el, de mindhárom eltérés a PCV2b 1A szubtypusú vírusokban fordul elő). A másik vírus a HQ591378 genbanki azonosítószámú horvátországi PCV2 törzsre hasonlított, azonban a nukleotidok, amelyek eltértek, jellegzetesen a PCV2a vírusokban találhatóak meg. Az egyik ilyen változás a rövidebb IR szakaszra esett. A hasonlóság véletlen, a horvátországi, szerbiai és magyarországi sertések között kapcsolat nem volt.

A korábbi szerológiai vizsgálatok során a vírusantigének kimutatása nem járt sikerrel kérődzők esetében. Összesen 755 szarvasmarha, 320 juh és 150 kecske vérsavót, 26 szarvasmarha, 24 juh és 8 kecskeszövetet és 100 tejmintát vizsgáltak PCV1 vagy PCV2 jelenlétére. Minden vizsgálat negatív eredményt adott (Allan és mtsai., 1994; 2000; Rodríguez-Arriola és mtsai., 2003a; és Ellis és mtsai., 2001). A rendelkezésünkre álló vérsavók iIF vizsgálati eredménye szintén negatívnak bizonyult.

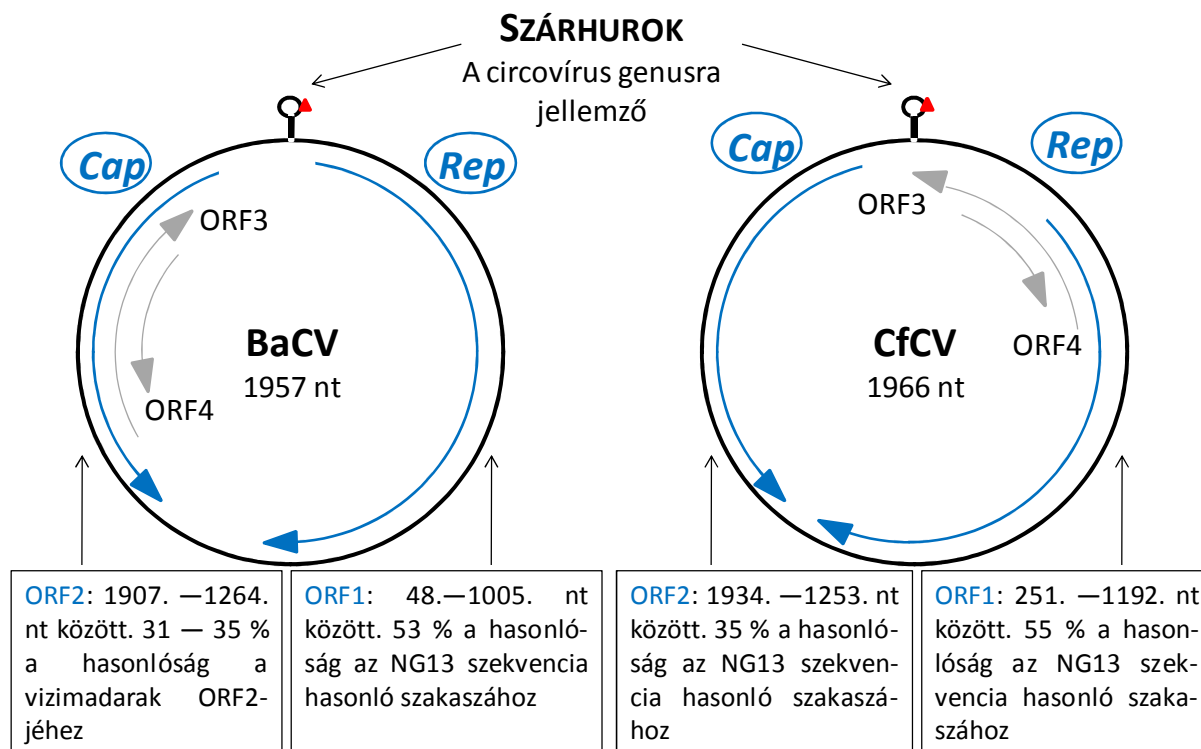
A feltételezhető őst keresését további gerinces fajokra is kiterjesztettük. Két halfajból (márna és lesőlesőharcsa) is sikeresen mutattunk ki circovírusokat, amelyek mind genetikai sajátosságaik, mind filogenetikai vonásaik alapján egyértelműen a *Circovirus* genusba sorolhatóak, és nem tartoznak az utóbbi időben nagyon széles körben kimutatott cyclovírusok vagy circo-like vírusok közé. A két CfCV és a két BaCV esetében is megtalálható a circovírusokra jellemző replikációs fehérjéket kódoló ORF1 gén. Ez a BaCV esetében a 48.—1005. nt között található, és 319 as méretű fehérjét kódol. Lehetséges azonban az is, hogy nem a klasszikus ATG kodonnal kezdődik, hanem alternatív kóddal (CTG) a 9. nt-től, így 332 as a várható fehérje hossza. A CfCV esetében a 251. nt a startkodon, és az 1193. nt-ig tart a fehérjét kódoló rész, így 314 as hosszú a várható fehérje.

Az ORF2 gén a kapszidfehérje kódolásáért felelős, a negatív szálon található. Ez a halak circovírusainál is így van, a márna vírusok esetében ugyan a start nem a standard ATG, hanem TTG, az 1907. nt-től az 1264. nt-ig tart, 214 as hosszúságú fehérjét kódolva. A két márnavírus esetében a kapszidfehérje hasonlósága 95,3 %. A lesőharcsa circovírusok esetében az ORF2 az 1934.—1253. nt szakaszon foglal helyet, a fehérje várható hossza

227 as. A lesőharcsa vírusok esetében mindkét gén a metionint kódoló klasszikus ATG-vel kezdődik. A két lesőharcsavírus egymástól 1 as-ban különbözik ezen a szakaszon.

Mindkét halfajból származó vírusról találtunk még két ORF-et is. Azt, hogy ezek fehérjét kódolnak-e, és ha igen, akkor a fehérjéknek mi a szerepe jelenleg nem ismeretes. Az általunk ORF3-nak elnevezett, vélhetően fehérje kódoló rész a márna vírusa esetében a pozitív szálon az 1363. és az 1698. nt közé esik, ez 112 as kódolására alkalmas. A lesőharcsa esetében a nagyobb, ORF3-nak elnevezett gén 157 as kódolására alkalmas, a negatív szálon a 471.-től az 1. nt-ig tart. A lesőharcsa vírusa esetében az ORF4 a pozitív szálon található, a 27. nt-től a 437. tart (136 as), míg márna vírus esetében akár az ORF3-at, az ORF2 régióban leltük meg az ORF4-et, ami az 1709. nt-től a 1416.-ig tart, és 98 as kódolására lehet alkalmas.

A hosszabb IR szakaszon lévő, a circovírusokra jellemző szárhurok szakaszt is elemzésnek vetettük alá. Mindkét fajból kimutatott vírus esetében a klasszikus TAGTATTC nukleotidokat tartalmazza a hurok rész. Ez megegyezik a legtöbb *Circovirus* genushoz tartozó vírussal. Az ismert, vízimadarakból származó circovírus szekvenciák harmadik nukleotidja konzekvensen T, ami azt sugallja, hogy a halakban talált vírus valószínűleg nem Anseriformes eredetű. A cyclovírusok esetében a hurok szekvenciája TAATACTAT. A szár rész különböző hosszúságú a már ismert vírusok között is. A márnából kimutatott vírusok esetében 15 bázis. Ez a *Circovirus* genuson belül közepes méretűnek számít, ám nagyobb, mint a cyclovírusoké. Ezzel szemben a lesőharcsa esetében csak 9, az NG13 elnevezésű (nigériai gyermek székletéből kimutatott) vírushoz hasonlóan (Li-L és mtsai., 2010a). Ez jóval rövidebb, mint a legtöbb ismert circovírusról. A két halvírus genomorganizációja a 12. ábrán látható.

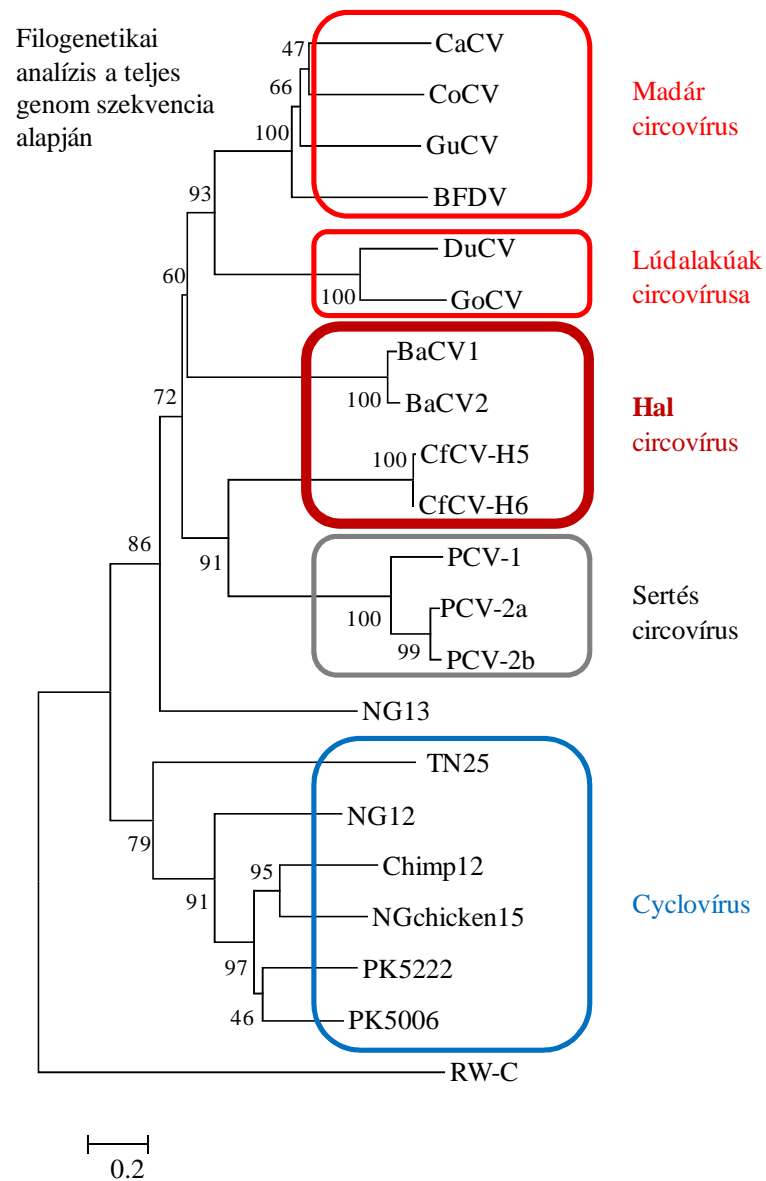


12. Ábra. A márna és lesőharcsa circovírus genomorganizációja. A ▲ az első nt helyét jelöli. A nyilak az ORF-ek irányát és megközelítő elhelyeződését jelölik.

A feltételezett ORF1 és ORF2 fehérjékre alapozott BLAST analízis (Altschul és mtsai., 1997) és a Pfam analízis (Finn és mtsai., 2008) során megállapítottuk, hogy a márnából és lesőharcsából kimutatott vírus is a *Circoviridae* család *Circovirus* genusának tagjai. Mindkét ORF1 a circovírusok replikációval összefüggésbe hozható fehérjéinek (Rep) családjába tartozik mind nt, mind as szinten. A CfCV leginkább a már említett NG13-hoz hasonlít 55 %-ban. A BaCV is ezekhez mutat leginkább hasonlóságot, bár itt csak 53 % a hasonlóság (a CfCV és BaCV között 52 %). A többi circovírushoz való hasonlóság ennél kisebb fokú.

A kapszidfehérjéket kódoló ORF2 (*Cap*) szakaszon a hasonlóság a CfCV és az NG13 között a legnagyobb (35 %). A lesőharcsa és a márna circovírusa valamint a hattyú circovírusa (Halami és mtsai., 2008) és a vízmintákból kimutatott RW-C jelű vírus (Rosario és mtsai., 2009) között a hasonlóság 27–28 %. A BaCV esetében a hasonlóság a többi vírushoz viszonyítva 31–35 %, a lúdalakúak vírusaival mutat kicsivel nagyobb hasonlóságot. A *Cap* régió 5' végére jellemző, argininben gazdag as-ak számának emelkedése mindkét vírusban megfigyelhető (a BaCV esetében az RRRARRRAGRRRRTRG WRRRKYVRRQRHRGR, míg a CfCV-nél: RRRTFRRPIRRRMHRRTRGRRMIRRRSRRSR, ahol az R az arginin. Az as-ak teljes nevét az 1. melléklet tartalmazza.). Ennek szerepe a vírus életében nagyon fontos, hiszen ezek a bázikus aminosavak felelősek a fehérje citoplazmából sejtmagba jutásáért.

A teljes genomszekvenciák alapján mind a BaCV, mind CfCV a *Circovirus* genushoz tartozik, akárcsak az NG13, jól elkülönülve a cyclovírusok csoportjától (13. ábra).

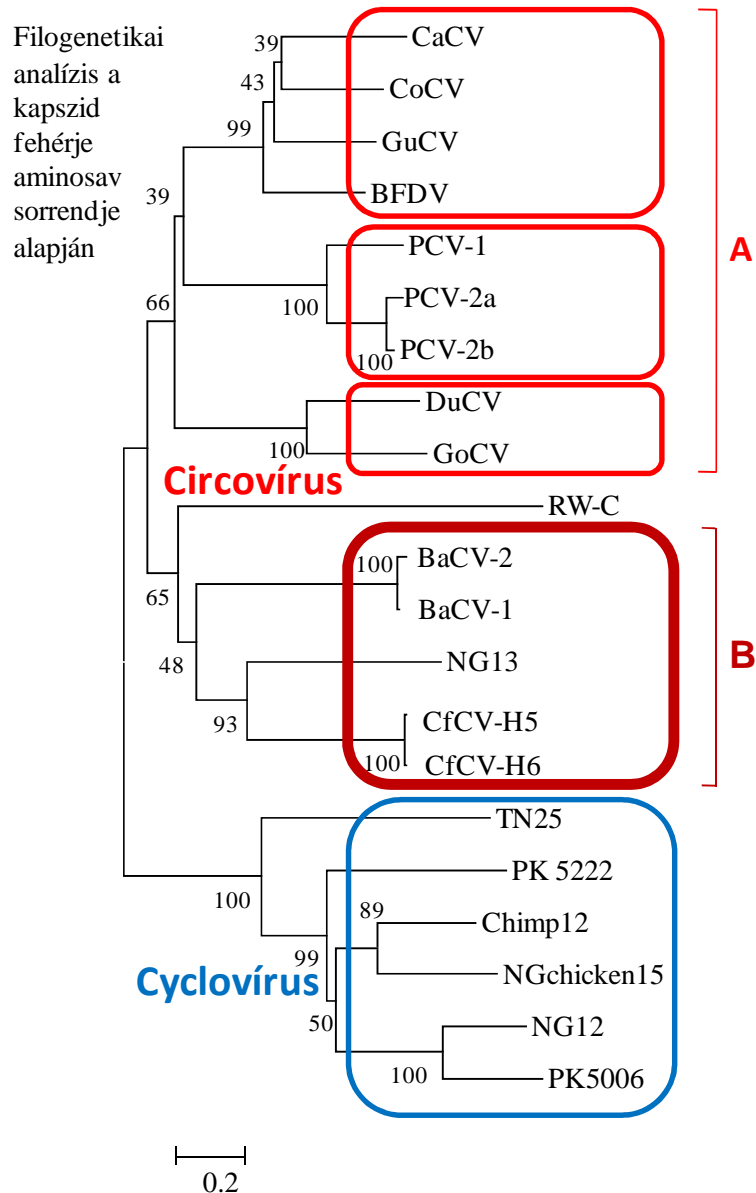


13. Ábra. A teljes genomszekvencia alapján NJ módszerrel elkészített filogenetikai ábra. Az ábrán a keretek a hasonló csoportokból kimutatott vírusokat jelzik, nem a filogenetikai fa által tartott rokonsági fokot jelölik. Pirossal keretezve a circovírusok, késsel a cyclovírusok látszanak. CaCV: kanári circovírus, CoCV: galamb circovírus, GuCV: sirály circovírus, BFDV: papagájok csőr és tollasodási zavarát okozó vírus, DuCV: kacsá circovírus, GoCV: lúd circovírus, BaCV: márna circovírus, CfCV: lesőharcsa circovírus, PCV: sertés circovírus, NG: nigériai humán eredetű vírustörzs, TN: Chimp: csimpánzból kimutatott vírus, NGchicken: nigériai csirkéből kimutatott vírus, PK: pakisztáni humán eredetű vírustörzs, RW-C: vízből kimutatott circovírusszerű vírus.

A filogenetikai fa itt sem a genbanki hasonlóság alapján várt eredményt hozta, hiszen egyetlen módszer használatával (NJ, 1000 bootstrap értékkel) a lesőharcsa és márna

circovírusok külön ágon helyeződnek. Azonban a hasonlóság alapján ezek a vírusok közeli rokonok. A teljes genom illetve a Rep-fehérje alapján készített filogenetikai ábrán jól elkülönülnek a madarak circovírusai (azon belül is két csoportot alkot a lúdalakúak és a többi madár vírusai), a sertések circovírusai, valamint a két halfaj vírusai.

A Cap-fehérje alapján elvégzett vizsgálatot a 14. ábra szemlélteti.



14. Ábra. A származtatott kapszidfehérje aminosav sorrendje alapján NJ módszerrel elkészített filogenetikai ábra. Pirossal keretezve a circovírusok, késsel a cyclovírusok láthatóak. Az ábrán a rövidítések megegyeznek a 13. ábránál leírtakkal. Az „A” jelzés a régóta ismert circovírusok, a „B” jelzés pedig az új circovírusok csoportját jelzi, amelyek jól elkülönülnek egymástól.

A Cap as analízis alapján a BaCV1, BaCV2, CfCV1 és CfCV2 is egy jól szeparált ágon található, ahová az NG13 mellé a legújabban leírt kutya circovírus (Li-L és mtsai., 2013) is csatlakozik (ez utóbbi az általunk készített filogenetikai ábrán nincs feltüntetve). Ez

az ág a korábban ismert circovírusoktól is elkülönülő csoportot alkot, bár kétség kívül a *Circovirus* genuson belül.

A márnából kimutatott vírus az első halból kimutatott circovírus. Bár járványtani szempontból fontosságát igazolni nem tudjuk ma még, de az először kimutatott szekvenciák olyan ivadékokból származtak, amelyek a keltetőben pusztultak el, és más kórokozót kimutatni nem tudtak belőlük. Sertések esetében igazolt, hogy a vírus az arra fogékony kocák magzatait károsíthatja (Segalés, 2012). Másrészt a circovírusokról ismert, hogy erősen immunszuppresszív (Todd, 2000; Ramamoorthy és mtsai., 2009), és számos, különféle klinikai képpel hozhatók összefüggésbe (Allan és mtsai., 1998; Allan és Ellis, 2000; Todd, 2004). A lesőharcsák esetében is hasonló lehet a helyzet, miszerint a megbetegedés háttéréből csak circovírust lehetett kimutatni, de nem bizonyított, hogy bármilyen problémát okozott a vírus. Egy immunszuppresszív vírus azonban főleg az ívási időszakban az egyébként is gyenge immunrendszerű állatok esetében szerepet játszhat a betegségek létrejöttében és lefolyásában.

A halakból kimutatott circovírusok szerepe, mint esetleges circovírus ősök, a PCV-ok evolúciós folyamataiban nem igazolható, de a velük kapcsolatos új adataink feltétlenül hozzájárulnak ahhoz, hogy ezeket a folyamatokat alaposabban megismerhessük.

10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Igazoltuk, hogy Közép-Európában a korábbi feltételezéseknek megfelelően a PCV2b 1A szubtypus terjedt el. A vakcinázás elterjedésével azonban más országokban, a vakcinás védelmet áttörő PCV2b 1C és az ezen belül található PCV2d csoport válhatnak a jövőben az evolúció fő irányává.

Vizsgálataink eredményeképpen megállapítható, hogy a PCV2e mint genotípus meghatározás nem megalapozott, helyette javasoljuk a PCV2a genotípuson belül egy új szubtypus (2F) létrehozását

Elsőként mutattunk ki vadon élő rágcsálókban sertés circovírust. Feltételezhető, hogy a sertéstelepeken élő rágcsálók a vírus rezervoár szerepét tölthetik be.

A szarvasmarhából kimutatott PCV2b az azonos telepen élő sertések circovírusaihoz képest változásokat mutat, ennek kimutatásával igazoltuk, hogy a vírus képes replikálódni ezekben az állatokban.

Madáron és sertésen kívül először mutattunk ki circovírust más fajokból, nevezetesen halakból.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Témavezetőmnek, Tuboly Tamásnak és a labor dolgozóinak: Cságola Attilának, Tombáczi Katának, Herbák Józsefnének és Cadar Dánielnek a rengeteg segítséget szeretném megköszönni.

A mintagyűjtésben nyújtott segítségért köszönettel tartozom: Kecskeméti Sándornak, Biksi Imrének, Kiss Istvánnak, Horváth Emőkének, Stanczel Attilának, Gyuranecz Miklósnak, a Szentimrei Mezőgazdasági KFT-nek és külön állatorvosainak: Balogh Mártának, Lőrincz Józsefnek, a Fiorács KFT-nek és Szentirmay Istvánnak, a Pigomix KFT-nek és állatorvosainak: Orosz Adélnak és Dániel Mihálynak. Külföldi mintákat Cadar Dánieltől, Dinko Novoseltől, Tomasz Stadejektől és Becskei Zsolttól kaptuk.

A minták feldolgozásában, előkészítésében nyújtott segítséget köszönöm Dán Ádámnak és az ÁDI Molekuláris Biológiai Osztályának (Tóth Ádámnak, Ottinger Ernőnének, Juhász Ágnesnek), Csaba Györgynek, Láng Máriának és Rónai Zsuzsannának, az ÁOTKI részéről Farkas Szilviának, Székely Csabának, Molnár Kálmánnak és asszisztensüknek Patakiné Ostoros Györgyinek.

Szeredi Leventének és Ráczné Mészáros Ágnesnek az IHK minták elkészítésének betanításáért és a bírálat kivitelezéséért vagyok hálás.

TDK-s hallgatóimnak: Simon Anderssonnak, Falus Adriennek, Petrilla Jankának, Julie Nielsennek a munkában való részvételt köszönöm.

12. IRODALOMJEGYZÉK

Allan G.M., Ellis J.A. (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Ve Diagn Investig.* 12. 3–14.

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

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

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

Allan G.M., McNeilly F., McNair I., Curran M.D., Walker I., Ellis J., Konoby C., Kennedy S., Meehan B. (2000) Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol.* 145. 853–857.

Allan G.M., Phenix K.V., Todd D., McNulty M.S. (1994) Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41. 17–26.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25. 3389–3402.

Bassami M.R., Berryman D., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1998) Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology.* 249. 453–459.

Baylis S.A., Finsterbusch T., Bannert N., Blumel J., Mankertz A. (2011) Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine.* 29. 690–697.

Belyi V.A., Levine A.J., Skalka A.M. (2010) Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: the parvoviridae and circoviridae are more than 40 to 50 million years old. *J Virol.* 84. 12458–12462.

Bendinelli M., Pistello M., Maggi F., Fornai C., Freer G., Vatteroni M.L. (2001) Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev.* 14. 98–113.

Biagini P. (2012) Restructuring and expansion of the family *Anelloviridae*. Anelloviridae-Circoviridae Study Group. International Committee on Taxonomy of Viruses.

ICTV files and discussion; Available at: <http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy/proposals/vertebrate1/m/vert01/3911.aspx> (accessed February 2012).

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

Bullenkamp J., Cole D., Malik F., Alkhatibi H., Kulasekararaj A., Odell E.W., Farzaneh F., Gäken J., Tavassoli M. (2012) Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/Apoptin. *Cell Death Dis.* 3. e296.

Burns T.M., Harding R.M., Dale J.L. (1995) The genome organization of banana bunchy top virus : analysis of six ssDNA components. *J Gen Virol.* 76. 1471–1482.

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

Cai L., Ni J., Xia Y., Zi Z., Ning K., Qiu P., Li X., Wang B., Liu Q., Hu D., Yu X., Zhou Z., Zhai X., Han X., Tian K. (2012) Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 165. 95–102.

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

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

Chaiyakul M., Hsu K., Dardari R., Marshall F., Czub M. (2010) Cytotoxicity of ORF3 proteins from a nonpathogenic and a pathogenic porcine circovirus. *J Virol.* 84. 11440–11447.

Chen C.L., Chang P.C., Lee M.S., Shien J.H., Ou S.J., Shieh H.K. (2003) Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathol.* 32. 165–171.

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

Cheung A.K. (2003) The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology.* 313. 452–459.

Cheung A.K. (2006) Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol.* 80. 8686–8694.

Cheung A.K. (2012) Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. *Virus Research*. 164. 46–53.

Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R., Dunham A.G. (2007) Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol*. 152. 1035–1044.

Chu D.K., Poon L.L., Chiu S.S., Chan K.H., Ng E.M., Bauer I., Cheung T.K., Ng I.H., Guan Y., Wang D., Peiris J.S. (2012) Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. *J Clin Virol*. 55. 209–213.

Cino-Ozuna A.G., Henry S., Hesse R., Nietfeld J.C., Bai J., Scott H.M., Rowland R.R. (2011) Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. *J Clin Microbiol*. 49. 2012–2016.

Cortey M., Olvera A., Grau-Roma L., Segalés J. (2011) Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol*. 149. 522–523.

Crowther R.A., Berriman J.A., Curran W.L., Allan G.M., Todd D. (2003) Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol*. 77. 13036–13041.

Cságola A. (2009) Sertés circovírusok járványtani vizsgálata. In: PhD értekezés.

Cságola A., Cadar D., Tuboly T. (2008a) Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Vet Hung*. 56. 421–427.

Cságola A., Kecskeméti S., Kardos G., Kiss I., Tuboly T. (2006) Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol*. 151. 495–507.

Cságola A., Kiss I., Tuboly T. (2008b) Detection and analysis of porcine circovirus type 1 in Hungarian wild boars: short communication. *Acta Vet Hung*. 56. 139–144.

Csank T., Pistl J., Polláková J., Holoda E., Harvan M. (2011) Prevalence of porcine circovirus 2 infection in pig population in Slovakia. *Acta Virol*. 55. 267–271.

Dán A., Molnár T., Biksi I., Glávits R., Shaheim M., Harrach B. (2003) Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet Hung*. 51. 551–562.

Delwart E., Li L. (2012) Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res*. 164. 114–121.

Deng Z.B., Wang N.D., Xu D.J., Yuan A.W., Ge M., Luo W., Xue L.Q., Yu X.L. (2011) Viral distribution and lesions in Kunming mice experimentally infected with porcine circovirus type 2b. *Vet Res Commun*. 35. 181–192.

Deng Z.B., Yuan A.W., Luo W., Wang N.D., Gong Q.D., Yu X.L., Xue L.Q. (2013) Transmission of porcine circovirus type 2b (PCV2b) in kunming mice. *Acta Vet Hung.* 61. 234–243.

Djinkeng A., Kuzmickas R., Anderson N.G., Spiro D.J. (2009) Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One.* 4. e7264.

dos Santos H.F., Knak M.B., de Castro F.L., Slongo J., Ritterbusch G.A., Klein T.A., Esteves P.A., Silva A.D., Trevisol I.M., Claassen E.A., Cornelissen L.A., Lovato M., Franco A.C., Roehe P.M., Rijsewijk F.A. (2012) Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. *Vet Microbiol.* 155. 230–236.

Drew T.W., Griesson S.S., King D.P., Hicks D., Done S., Naser J.A., Evans D.P., Grimbeek P., Banks M. (2004) Genetic similarity between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Vet Rec.* 155. 149–151.

Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet.* 9. 267–276.

Dulac G.C., Afshar A. (1989) Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res.* 53. 431–433.

Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E. (2008) Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol.* 128. 56–64.

Edwards S., Sands J.J. (1994) Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec.* 134. 680–681.

Ellis J.A., Bratanich A., Clark E.G., Allan G., Meehan B., Haines D.M., Harding J., West K. H., Krakowka S., Konoby C., Hassard L., Martin K., McNeilly F. (2000) Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 12. 21–27.

Ellis J.A., Konoby C., West K.H., Allan G.M., Krakowka S., McNeilly F., Meehan B., Walker I. (2001) Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. *Can Vet J.* 42. 461–464.

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

Faurez F., Dory D., Grasland B., Jestin A. (2009) Replication of porcine circoviruses. *Virology Journal.* 6. 60–68.

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

Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Xu Y., Potts B., Meng X.J. (2004) Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. *J Gen Virol.* 85. 3377–3382.

Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coggill P.C., Sammut S.J., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36. 281–288.

Finsterbusch T., Steinfeldt T., Caliskan R., Mankertz A. (2005) Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology.* 343. 36–46.

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

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

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

Garkavenko O., Croxson M.C., Irgang M., Karlas A., Denner J., Elliott R.B. (2004) Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation. *J Clin Microbiol.* 42. 5353–5356.

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

Ge X., Li J., Peng C., Wu L., Yang X., Wu Y., Zhang Y., Shi Z. (2011) Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *J Gen Virol.* 92. 2646–2653.

Gibbs M.J., Weiller G.F. (1999) Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96. 8022–8027.

Gilliland S.M., Forrest L., Carre H., Jenkins A., Berry N., Martin J., Minor P., Schepelmann S. (2012) Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals*. 40. 270–277.

Grasland B., Blanchard P., Kéranflec'h A., Bigault L., Oger A., Rose N., Madec F., Jestin A., Cariolet R. (2013) Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2) genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars. *Vet Microbiol*. 162. 381–387.

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

Grierson S.S., King D.P., Wellenberg G.J., Banks M. (2004) Genomesequencing analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res Vet Sci*. 77. 265–268.

Gronenborn B. (2004) Nanoviruses: genome organisation and protein function. –Review *Vet Microbiol*. 98. 103–109.

Guo L.J., Lu Y.H., Wei Y.W., Huang L.P., Liu C.M. (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology*. 407. 273–285.

Guo L., Lu Y., Wei Y., Huang L., Wu H., Liu C. (2011) Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology*. 419. 57–63.

Ha H.J., Anderson I.L., Alley M.R., Springett B.P., Gartrell B.D. (2007) The prevalence of beak and feather disease virus infection in wild populations of parrots and cockatoos in New Zealand. *N Z Vet J*. 55. 235–238.

Haines D.M., Chelack B.J. (1991) Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest*. 3. 101–112.

Halami M.Y., Nieper H., Müller H., Johne R. (2008) Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res*. 132. 208–212.

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

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

Hattermann K., Maerz A., Slanina H., Schmitt C., Mankertz A. (2004) Assessing the risk potential of porcine circoviruses for xenotransplantation: consensus primer-PCR-based search for a human circovirus. *Xenotransplantation*. 11. 547–550.

Hattermann K., Schmitt C., Soike D., Mankertz A. (2003) Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch Virol.* 148. 2471–2480.

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

Huang L.P., Lu Y.H., Wei Y.W., Guo L.J., Liu C.M. (2011) Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol.* 22. 188–198.

Huang X., Madan A. (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9. 868–877.

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

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

Johne R., Fernández-de-Luco D., Höfle U., Müller H. (2006) Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *J Gen Virol.* 87. 1189–1195.

Júnior A.S., de Carvalho O.V., Bulos L.H.S., Fietto J.L.R., Moraes M.P., de Almeida M.R. (2012) Porcine Circovirus 2: Immunopathogenesis and Recent Developments in Vaccines. *World Journal of Vaccines.* 2. 96–104.

Kapoor A., Dubovi E.J., Henriquez-Rivera J.A., Lipkin W.I. (2012) Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol.* 86. 7018.

Kappe E.C., Halami M.Y., Schade B., Alex M., Hoffmann D., Gangl A., Meyer K., Dekant W., Schwarz B.A. Johne R., Buitkamp J., Böttcher J., Müller H. (2010) Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 123. 31–41.

Karuppanan A.K., Kwang J. (2011) ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the of the virus. *Virology.* 410. 248–256.

Katul L., Timchenko T., Gronenborn B., Vetten H.J. (1998) Ten distinct circular ssDNA components, four of which encode putative replication-associated proteins, are associated with the faba bean necrotic yellows virus genome. *J Gen Virol.* 79. 3101–3109.

Kecskeméti S., Kiss I., Tuboly T. (1999) Sertéscircovirusok. *MÁL.* 11. 639–642.

Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A., Spillane P. (1998) Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec.* 142. 495–496.

Khayat R., Brunn N., Speir J.A., Hardham J.M., Ankenbauer R.G., Schneemann A., Johnson J.E. (2011) The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *J Virol.* *85.* 7856–7862.

Kim J., Chung H.K., Chae C. (2003) Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J.* *166.* 251–256.

Kim J., Jung K., Chae C. (2004) Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet Rec.* *155.* 489–492.

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

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

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

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

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

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

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

Li J., Yuan X., Zhang C., Miao L., Wu J., Shi J., Xu S., Cui S., Wang J., Ai . (2010) A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. *Virol J.* *7.*158–164.

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

Li L., McGraw S., Zhu K., Leutenegger C.M., Marks S.L., Kubiski S., Gaffney P., Dela Cruz F.N. Jr., Wang C., Delwart E., Pesavento P.A. (2013) Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 19. 534–541.

Li L., Shan T., Soji O.B., Alam M.M., Kunz T.H., Zaidi S.Z., Delwart E. (2011) Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J Gen Virol.* 92. 768–772.

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

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

Lipej Z., Segalés J., Jemersić L., Olvera A., Roić B., Novosel D., Mihaljević Z., Manojlović L. (2007) First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung.* 55. 389–404.

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

Liu Q., Tikoo S.K., Babiuk L.A. (2001) Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology.* 285. 91–99.

Londoño A., Riego-Ruiz L., Argüello-Astorga G.R. (2010) DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch Virol.* 155. 1033–1046.

Los M., Panigrahi S., Rashedi I., Mandal S., Stetefeld J., Essmann F., Schulze-Osthoff K. (2009) Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim Biophys Acta.* 1793. 1335–1342.

Lukert P., de Boer G.F., Dale J.L., Keese P., McNulty M.S., Randles J. W., Tischer I. (1995) The Circoviridae. In: *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 166–168. Edited by F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo M.D. Summers. Vienna and New York: Springer-Verlag.

Ma H., Shaheduzzaman S., Williams D.K., Gao Y., Khan A.S. (2011) Investigations of porcine circovirus type 1 (PCV1) in vaccine-related and other cell lines. *Vaccine.* 29. 8429–8437.

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

Maggi F., Macera L., Focosi D., Vatteroni M.L., Boggi U., Antonelli G., Eloit M., Pistello M. (2012) Human gyrovirus DNA in human blood, Italy. *Emerg Infect Dis.* 18. 956–959.

Mahé D., Blanchard P., Truong C., Arnaud C., Le Cann P., Cariolet R., Madec F., Albina E., Jestin A. (2000) Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol.* 1. 1815–1824.

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

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

Mankertz A., Persson F., Mankertz J., Blaess G., Buhk H.J. (1997) Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol.* 71. 562–566.

Mankertz J., Buhk H.J., Blaess G., Mankertz A. (1998) Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes.* 16. 267–276.

Martin D., Rybicki E. (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics.* 16. 562–563.

Meehan B.M., Creelan J.L., McNulty M.S., Todd D. (1997) Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol.* 78. 221–227.

Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J.A., Krakowka S., Allan G.M. (2001) Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol.* 146. 835–842.

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

Molnár T., Glávits R., Szeredi L., Dán Á. (2002) Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary. *Acta Vet Hung.* 50. 5–16.

Morozov I., Sirinarumitr T., Sorden S.D., Halbur P.G., Morgan M.K., Yoon K.J., Paul P.S. (1998) Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 36. 2535–2541.

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

Nayar G.P., Hamel A.L., Lin L., Sachvie C., Grudeski E., Spearman G. (1999) Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J.* *40.* 277–278.

Ng T.F., Willner D.L., Lim Y.W., Schmieder R., Chau B., Nilsson C., Anthony S., Ruan Y., Rohwer F., Breitbart M. (2011) Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. *PLoS One.* *6.* e20579.

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

Niagro F.D., Forsthoefel A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., Lukert P.D. (1998) Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol.* *143.* 1723–1744.

Noteborn M.H., de Boer G.F., van Roozelaar D.J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J.G., Jeurissen S.H., Hoeben R.C., Zantema A., Koch G. (1991) Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol.* *65.* 3131–3139.

O’Dea M.A., Hughes A.P., Davies L.J., Muhling J., Buddle R., Wilcox G.E. (2008) Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. *Journal of Virological Methods.* *147.* 61–66.

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

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

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

Opriessnig T., McKeown N.E., Harmon K.L., Meng X.J., Halbur P.G. (2006) Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* *13.* 923–929.

Opriessnig T., O’Neill K., Gerber P.F., de Castro A.M., Giménez-Lirola L.G., Beach N.M., Zhou L., Meng X.J., Wang C., Halbur P.G. (2013a) A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or

combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*. 31. 487–494.

Opriessnig T., Patterson A.R., Jones D.E., Juhan N.M., Meng X.J., Halbur P.G. (2009) Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to Porcine circovirus-2 infection and associated lesions. *Can J Vet Res*. 73. 81–86.

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

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

Padilla-Rodriguez M., Rosario K., Breitbart M. (2013) Novel cyclovirus discovered in the Florida woods cockroach *Eurycotis floridana* (Walker). *Arch Virol*. 158. 1389–1392.

Park J.S., Kim J., Ha Y., Jung K., Choi C., Lim J.K., Kim S.H., Chae C. (2005) Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol*. 132. 139–144.

Parrish C.R. (2011) Parvoviridae In: MacLachlan, N.J. Dubovi, E.J. (eds.): *Fenner's Veterinary Virology*, 4th edition. Elsevier Inc, Academic Press, London, U.K.

Pensaert M.B., Sanchez R.E. Jr, Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Allan G.M., Nauwynck H.J. (2004) Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Review Vet Microbiol*. 98. 175–183.

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

Phan T.G., Li L., O'Ryan M.G., Cortes H., Mamani N., Bonkougou I.J., Wang C., Leutenegger C.M., Delwart E. (2012) A third gyrovirus species in human faeces. *J Gen Virol*. 93. 1356–1361.

Phenix K.V., Weston J.H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J.A., Todd D., Wilcox G.E., Raidal S.R. (2001) Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol*. 82. 2805–2809.

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

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

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

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

Ramamoorthy S., Huang F.F., Huang Y.W., Meng X.J. (2009) Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res.* 145. 236–243.

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

Renshaw R.W., Soiné C., Weinkle T., O'Connell P.H., Ohashi K., Watson S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A. (1996) A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J Virol.* 70. 8872–8878.

Rijsewijk F.A., dos Santos H.F., Teixeira T.F., Cibulski S.P., Varela A.P., Dezen D., Franco A.C., Roehe P.M. (2011) Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. *Arch Virol.* 156. 1097–1100.

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

Rodríguez-Arrijoja G.M., Segalés J., Rosell C., Rovira A., Pujols J., Plana-Durán J., Domingo M. (2003b) Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50. 99–101.

Rosario K., Dayaram A., Marinov M., Ware J., Kraberger S., Stainton D., Breitbart M., Varsani A. (2012a) Diverse circular ssDNA viruses discovered in dragonflies (Odonata: Epiprocta). *J Gen Virol.* 93. 2668–2681.

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

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

Rosario K., Marinov M., Stainton D., Kraberger S., Wiltshire E.J., Collings D.A., Walters M., Martin D.P., Breitbart M., Varsani A. (2011) Dragonfly cyclovirus, a novel single-

stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). *J Gen Virol.* 92. 1302–1308.

Royer R.L., Nawagitgul P., Halbur P.G., Paul P.S. (2001) Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Swine Health Prod.* 9. 281–284.

Rozen S., Skaletsky H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365–386.

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

Sanchez Jr. R.E., Nauwynck H.J., Pensaert M.B. (2001) Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig population in Belgium. In: *Proceedings of the ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates*. European Society of Veterinary Virology. St Malo, France 122.

Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcato P.S. (2001) Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 83. 53–67.

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

Sauvage V., Cheval J., Foulongne V., Gouilh M.A., Pariente K., Manuguerra J.C., Richardson J., Dereure O., Lecuit M., Burguiere A., Caro V., Eloit M. (2011) Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. *J Virol.* 85. 7948–7950.

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

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

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

Segalés J. (2012) Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164. 10–19.

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

Shang S.B., Jin Y.L., Jiang X.T., Zhou J.Y., Zhang X., Xing G., He J.L., Yan Y. (2009) Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol Immunol.* 46. 327–334.

Shcherbakov A.V., Kukushkin S.A., Timina A.M., Baïbikov T.Z., Kovalishin V.F., Kanshina A.V., Biadovskaia O.P., Prokhvatilova L.B., Ruchnova O.I., Bakunov I.N., Babkin M.V. (2007) Monitoring of infectious diseases among wild boars. *Vopr Virusol.* 52. 29–33. Russian

Shen H.G., Halbur P.G., Opriessnig T. (2012) Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *J Gen Virol.* 93. 1345–1355.

Shibahara T., Sato K., Ishikawa Y., Kadota K. (2000) Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci.* 62. 1125–1131.

Shivaprasad H.L., Hill D., Todd D., Smyth J.A. (2004) Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathol.* 33. 525–529.

Shuai J., Wei W., Li X., Chen N., Zhang Z., Chen X., Fang W. (2007) Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in high-seroprevalence areas in southeastern China. *Virus Genes.* 35. 619–627.

Sierra M.A., Mulad J.M., Molenbeek R.F., Maaren van C., Vos J.H., Quezada M., Gruys E. (1997) Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Eur J Vet Pathol.* 3. 63–70.

Simionatto S., Lima-Rosa C.A., Binneck E., Ravazzolo A.P., Canal C.W. (2006) Characterization and Phylogenetic Analysis of Brazilian Chicken Anaemia Virus. *Virus Genes.* 33. 5–10.

Sipos W., Duvigneau J.C., Willheim M., Schilcher F., Hartl R.T., Hofbauer G., Exel B., Pietschmann P., Schmoll F. (2004) Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol.* 99. 63–71.

Smyth J.A., Todd D., Scott A., Beckett A., Twentyman C.M., Bröjer C., Uhlhorn H., Gavier-Widen D. (2006) Identification of circovirus infection in three species of gull. *Vet Rec.* 159. 212–214.

Soike D., Albrecht K., Hattermann K., Schmitt C., Mankertz A. (2004) Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *Vet Rec.* 154. 792–793.

Spillane P., Kennedy S., Meehan B., Allan G. (1998) Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec.* 143. 511–512.

Stewart M.E., Perry R., Raidal S.R. (2006) Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathol.* 35. 86–92.

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

Thacker E.L. (2001) Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17. 551–565.

Timmusk S., Wallgren P., Brunborg I.M., Wikström F.H., Allan G., Meehan B., McMenemy M., McNeilly F., Fuxler L., Belák K., Pödersoo D., Saar T., Berg M., Fossum C. (2008) Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes.* 36. 509–520.

Tischer I., Bode L., Apodaca J., Timm H., Peters D., Rasch R., Pociuli S., Gerike E. (1995a) Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol.* 140. 1427–1439.

Tischer I., Bode L., Peters D., Pociuli S., Germann B. (1995b) Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol.* 140. 737–743.

Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W., Koch M.A. (1982) A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature.* 295. 64–66.

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

Tischer I., Peters D., Rasch R., Pociuli S. (1987) Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol.* 96. 39–57.

Tischer I., Rasch R., Tochtermann G. (1974) Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A.* 226. 153–167. German

Todd D. (2000) Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol.* 29. 373–394.

Todd D. (2004) Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. –Review *Vet Microbiol.* 98. 169–174.

Todd D., Scott A.N., Frinquelli E., Shivaprasad H.L., Gavier-Widen D., Smyth J.A. (2007) Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol.* 36. 75–81.

Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. (2001) Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.* 286. 354–362.

- Toplak I., Grom J., Hostnik P., Barlic-Maganja D. (2004) Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. *Vet Rec.* 155. 178–180.
- Toplak I., Lazić S., Lupulović D., Prodanov-Radulović J., Becskei Z., Došen R., Petrović T. (2012) Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Vet Hung.* 60. 409–420.
- Trible B.R., Rowland R.R. (2012) Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164. 68–77.
- Trujano M., Iglesias G., Segalés J., Palacios J.M. (2001) PCV2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec.* 148. 792.
- Turcitu M.A., Wellenberg G.J., Barboi G., Codreanu M.D., Vuta V.B., Nicolae S., Barbuceanu F., Coste H., Cioranu R. (2011) Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the Romanian wild boar population. *Res Vet Sci.* 91. 103–106.
- Victoria J.G., Kapoor A., Li L., Blinkova O., Slikas B., Wang C., Naeem A., Zaidi S., Delwart E. (2009) Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol.* 83. 4642–4651.
- Victoria J.G., Wang C., Jones M.S., Jaing C., McLoughlin K., Gardner S., Delwart E.L. (2010) Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol.* 84. 6033–6040.
- Vlasakova M., Jackova A., Vilcek S. (2011) Genetic typing of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from Slovakia. *Res Vet Sci.* 90. 168–173.
- Walker I.W., Konoby C., Jewhurst V.A., McNair I., McNeilly F., Meehan B.M., Cottrell T.S., Ellis J.A., Allan G.M. (2000) Development and application of a competitive Elisa for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest.* 12. 400–405.
- Wang F., Guo X., Ge X., Wang Z., Chen Y., Cha Z., Yang H. (2009) Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145. 151–156.
- Wellenberg G.J., Stockhofe-Zurwieden N., de Jong M.F., Boersma W.J., Elbers A.R. (2004) Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol.* 99. 203–214.
- Williams J.H., Mephram B.L., Wright D.H. (1997) Tissue preparation for immunocytochemistry. *J Clin Pathol.* 50. 422–428.
- Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., Zhang J., Dong J., Sun L., Du J., Liu L., Xue Y., Wang J., Yang F., Zhang S., Jin Q. (2012) Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol.* 86. 10999–1012.

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

Young M.G., Cunningham G.L., Sanford S.E. (2011) Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J. Swine Health Prod.* 19. 175–180.

Yu S., Opriessnig T., Kitikoon P., Nilubol D., Halbur P.G., Thacker E. (2007) Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 115. 261–272.

Yu X., Zhu C., Zheng X., He S., Liu X. (2007) Genome analysis and epidemiological investigation of goose circovirus detected in eastern China. *Virus Genes.* 35. 605–609.

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

Zhang X., Jiang S., Wu J., Zhao Q., Sun Y., Kong Y., Li X., Yao M., Chai T. (2009) An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China. *Vet Microbiol.* 133. 252–256.

13. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

13.1. A dolgozat során felhasznált cikkek

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

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

Lőrincz M., Cságola A., Farkas S.L., Székely C., Tuboly T. (2011) First detection and analysis of a fish circovirus. *J Gen Virol.* 92. 1817—1821. IF: 3,363

Lőrincz M., Dán A., Láng M., Csaba G., Tóth A.G., Székely C., Cságola A., Tuboly T. (2012) Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*). *Arch Virol.* 157. 1173—1176. IF: 2,030

Cadar D., Cságola A., *Lőrincz M., Tombácz K., Spînu M., Tuboly T.* (2012) Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infect Genet Evol.* 12. 420—427. IF: 2,768

Lőrincz M., Tombácz K. (2014) Hal circovírusok. *MÁL.* 2014. 136. 123—127. IF: 0,146

13.2. A dolgozat anyagát közvetlenül nem képező cikkek

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

Cadar D., *Lőrincz M., Kiss T., Novosel D., Podgorska K., Becskei Z., Tuboly T., Cságola A.* (2013) Emerging novel porcine parvoviruses in Europe: origin, evolution, phylodynamics and phylogeography. *J Gen Virol.* 94. 2330—2337. IF: 3,127

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

Lőrincz M., Biksi I., Andersson S., Cságola A., Tuboly T. (2013) Sporadic re-emergence of enzootic porcine transmissible gastroenteritis in Hungary. *Acta Vet Hung.* DOI: 10.1556/AVet.2013.043. IF: 1,173

Cságola A., *Lőrincz M.*, Cadar D., Tombácz K., Biksi I., Tuboly T. (2012) Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch Virol.* 157. 1003—1010. IF: 2,030

Cadar D., Dán Á., Tombácz K., *Lőrincz M.*, Kiss T., Becskei Z., Spînu M., Tuboly T., Cságola A. (2012) Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infect Genet Evol.* 12. 1163—1171. IF: 2,768

Cságola A., *Lőrincz M.*, Tombácz K., Wladár Z., Kovács E., Tuboly T. (2012) Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes.* 44. 75—79. IF: 1,769

Cadar D., Cságola A., *Lőrincz M.*, Tombácz K., Kiss T., Spînu M., Tuboly T. (2011) Genetic detection and analysis of porcine bocavirus type 1 (PoBoV1) in European wild boar (*Sus scrofa*). *Virus Genes.* 43. 376—379. IF: 1,845

Cadar D., Cságola A., *Lőrincz M.*, Tombácz K., Spînu M., Tuboly T. (2011) Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Arch Virol.* 156. 2233—2239. IF: 2,111

Cságola A., Cadar D., *Lőrincz M.*, Tuboly T. (2010) Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. Short secondary communication. *MÁL.* 131. 456—458. IF: 0,300

Forgach P., Boncz A., Erdélyi K., *Lőrincz M.*, Molnár B., Zentai J., Szűcs Gy., Reuter G., Bakonyi T. (2010) Hepatitis E virus — literature review and situation in Hungary from veterinary point of view. *MÁL.* 132. 237—248. IF.: 0,300

Cságola A., *Lőrincz M.*, Tombácz K., Biksi I., Balka Gy., Tuboly T. (2009) Detection of human parvovirus 4 related porcine hokoviruses in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56.135.

Biksi I., *Lőrincz M.*, Molnár B., Kecskés T., Takács N., Mirt D., Cizek A., Pejsak Z., Martineau G.P., Sevin J.L., Szenci O. (2007) Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Vet Hung.* 55. 219—27. IF.: 0,474

13.3. Előadások

Lőrincz M., Cságola A., Biksi I., Szeredi L., Dán Á., Tuboly T.: Sertés circovírus rezervoárok feltérképezése. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (35.). *Virologia, Immunológia, Bakteriológia.* Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2009. 01. 27.

Cságola A., *Lőrincz M.*, Tombácz K., Biksi I., Balka Gy., Tuboly T.: Sertés hokovírussok Magyarországon. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai

Beszámoló (36.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2010. 01. 26.

Lőrincz M., Cságola A., Farkas L.Sz., Székely Cs. Cs, Tuboly T.: Egy márna (Barbus barbus) circovírus kimutatása és genetikai jellemzése. In: XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás. Absztrakt kötet. Szarvas, Magyarország, 2011.05.25-2011. 05. 26.

Cságola A., *Lőrincz M., Cadar D., Tombácz K., Biksi I., Tuboly T.:* Új típusú sertés parvovírus fertőzések kimutatása. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (38.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2012. 01. 17.

Lőrincz M., Dán Á., Woynárovichné Láng M., Csaba Gy., Tóth Á.G., Székely Cs., Cságola A., Tuboly T.: Lesőlesőharcsa (Silurus glanis) circovírus kimutatása és genetikai jellemzése. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (38.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2012. 01. 17.

Cságola A., *Lőrincz M., Cadar D., Tuboly T.:* Új típusú sertés parvovírus fertőzések kimutatása Közép-Kelet Európában. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (39.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2013. 01. 29.

Lőrincz M., Cságola A., Tuboly T.: Sertés circovírus detektálása szarvasmarha vérsavókban. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (39.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2013. 01. 29.

Lőrincz M., Tombácz K., Cságola A., Tuboly T.: Közép-Európából származó sertés circovírusok felmérése. In: MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló (40.). Viroológia, Immunológia, Bakteriológia. Előadás összefoglalók. Budapest, Magyarország, 2014. 01. 28.

13.4. Poszterek

Lőrincz M., Cságola A., Biksi I., Szeredi L., Dán Á., Tuboly T.: Detection of porcine circovirus in rodents. 8th International Congress of Veterinary Virology. Budapest, Magyarország, 2009. 08. 23-26.

Cadar D., Cságola A., *Lőrincz M., Tombácz K., Dán Á., Spînu M., Tuboly T.:* Porcine parvovirus infections in wild boar populations of Romania. 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. Barcelóna, Spanyolország, 2011. 06. 12-15.

Lőrincz M., Biksi I., Andersson S., Cságola A., Tuboly T.: Re-emerging transmissible gastroenteritis in pigs. 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. Barcelóna, Spanyolország, 2011. 06. 12-15.

Lőrincz M., Cságola A., Cadar D., Tombácz k., Tuboly T.: Prevalence of porcine parvoviruses in circovirus infected herds. 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. Barcelóna, Spanyolország, 2011. 06. 12-15.

Novosel D., Tuboly T., Lipej Z., Cságola A., *Lőrincz M.*, Jungic A.: Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates in Croatia - update. 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. Barcelóna, Spanyolország, 2011. 06. 12-15.

Lőrincz M., Cságola A., Farkas L.Sz., Székely Cs., Tuboly T.: Detection and analysis of a fish circovirus. EAFP 15th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Poster Section. Split, Horvátország, 2011.09.12-16.

14. FÜGGELÉK

1. Melléklet. Az aminosavak rövidítései és elnevezésük.

Rövidítés.	Teljes név
A	Alanin
C	Cisztein
D	Aszparaginsav
E	Glutaminsav
F	Fenil-alanin
G	Glicin
H	Hisztidin
I	Izoleucin
K	Lizin
L	Leucin
M	Metionin
N	Aszparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Szerin
T	Treonin
V	Valin
W	Triptofán
Y	Tirozin
U	Szelenocisztein
O	Pirrolizin

2. Melléklet. A filogenetikai elemzés során felhasznált, a GenBankból letölthető PCV2 szekvenciák.

A táblázat nem tartalmazza a 2007-ig gyűjtött magyarországi, lengyelországi, romániai, szerbiai és horvátországi vírusokat, amelyek GenBank kóddal nem rendelkeznek.

Kód	Származás	
	Éve	Helye
NC005148	2004	USA
AB072301	2001	Japán
AB072303	2001	Japán
AB426905	2008	Japán
AF055391	1998	USA
AF055392	1998	Kanada
AF085695	1998	Kanada
AF086834	1998	Kanada
AF086835	1998	Kanada
AF086836	1998	Kanada
AF112862	1998	Kanada
AF118095	1998	Kanada
AF118097	1998	Kanada
AF147751	1999	USA
AF264038	2000	USA
AF264039	2000	USA
AF264040	2000	USA
AF264041	2000	USA
AF264042	2000	USA
AF381175	2001	Kína
AF381177	2001	Kína
AF408635	2001	Kanada
AF454546	2001	Korea
AF465211	2001	Taiwan
AF520783	2002	Korea
AF544024	2002	Korea
AJ223185	1997	USA
AJ293867	1999	Kanada
AJ293868	1999	Kanada
AX379560	2001	USA
AX379561	2001	USA
AX379562	2001	USA
AX379563	2001	USA

AX379564	2001	USA
AX685842	2003	Kanada
AY094619	2002	USA
AY099495	2002	USA
AY099496	2002	USA
AY099498	2002	USA
AY099499	2002	USA
AY099500	2002	USA
AY181948	2002	Kína
AY256455	2003	Magyarország
AY256456	2003	Magyarország
AY256457	2003	Magyarország
AY256458	2003	Magyarország
AY256459	2003	Magyarország
AY256460	2003	Magyarország
AY325495	2003	D-Afrika
AY424402	2003	Ausztrália
AY699793	2004	USA
AY754022	2004	Ausztrália
AY874163	2002/2003	Magyarország
AY874164	2002/2003	Magyarország
AY874165	2002/2003	Magyarország
AY874166	2002/2003	Magyarország
AY874167	2002/2003	Magyarország
AY874168	2002/2003	Magyarország
AY874169	2002/2003	Magyarország
BD087175	1997	Kanada
BD087177	1997	Kanada
CQ768115	2004	Kanada
DQ104419	2005	Kína
DQ104421	2005	Kína
DQ104422	2005	Kína
DQ397521	1998	USA
DQ629113	2005	USA
DQ629114	2005	USA

EF394774	2007	Kanada
EF394775	2007	Kanada
EF394776	2007	Kanada
EF452353	2007	USA
EF524538	2007	Kína
EF524540	2007	Kína
EF524542	2007	Kína
EU391637	2008	Malaysia
EU450584	2008	Korea
EU450585	2008	Korea
EU450589	2008	Korea
EU450591	2008	Korea
EU450592	2008	Korea
EU503039	2008	Kína
EU555439	2008	Kína
EU589463	2008	USA
EU594437	2008	USA
EU594438	2008	USA
EU594439	2008	USA
EU594440	2008	USA
EU647557	2008	Kína
EU656143	2008	Kína
EU684164	2008	Ausztrália
EU727546	2008	Kína
EU747085	2008	Kanada
EU780073	2008	Kína
EU780074	2008	Kína
EU909686	2008	Belgium
EU909687	2008	Belgium
EU909688	2008	Belgium
EU921256	2008	Kína
FJ233905	2008	Kanada
FJ233906	2008	Kanada
FJ440338	2008	Kína
FJ447482	2008	Kína
FJ475129	2008	Kína
FJ598045	2008	Kína
FJ608539	2007	Kína

FJ608545	2008	Kína
FJ623185	2008	Kína
FJ644922	2008	Kína
FJ644929	2008	Kína
FJ644931	2008	Kína
FJ644932	2008	Kína
FJ716703	2008	Kína
FJ804417	2008	Németország
FJ870967	2008	Kína
FJ870968	2008	Kína
FJ870969	2008	Kína
FJ870970	2008	Kína
FJ870974	2008	Kína
FJ870975	2008	Kína
FJ870976	2008	Kína
FN398025	2007/2008	Kuba
FN398027	2007/2008	Kuba
FR823451	2010	Korea
GQ174519	2008	Kína
GQ359002	2008	Kína
GQ359003	2008	Kína
GQ359004	2008	Kína
GQ359006	2008	Kína
GQ359008	2008	Kína
GQ359010	2008	Kína
GQ359011	2008	Kína
GQ449669	2009	Kína
GQ449670	2009	Kína
GQ915289	2009	Kína
GQ996404	2009	Kína
GU001709	2009	Kína
GU001710	2009	Kína
GU083582	2009	Kína
GU124593	2008	Kína
GU244506	2009	Taiwan, Kína
GU244507	2009	Taiwan, Kína
GU252369	2009	Kína
GU325753	2008	Kína

GU325754	2008	Kína
GU325755	2008	Kína
GU325756	2009	Kína
GU325757	2009	Kína
GU325758	2009	Kína
GU325765	2009	Kína
GU370063	2009	Kína
GU370064	2009	Kína
GU371908	2009	Kína
GU450328	2009	Kína
GU450329	2009	Kína
GU799575	2008	USA
GU799576	2009	USA
GU938303	2009	Kína
GU938304	2009	Kína
HM000100	2010	Korea
HM027579	2010	Kína
HM038017	2008	Kína
HM038022	2008	Kína
HM038025	2008	Kína
HM038031	2007	Kína
HM038033	2007	Kína
HM142898	2010	Kína
HM161711	2010	Kína
HM623764	2010	Franciaország
HM776440	2008	Kína
HM776446	2008	Kína
HM776452	2009	Kína
HM776453	2008	Kína
HQ113119	2009	Kína
HQ113121	2009	Kína
HQ202944	2010	Taiwan
HQ202948	2010	Taiwan
HQ202949	2010	Taiwan
HQ202951	2010	Taiwan
HQ202963	2010	Taiwan
HQ202965	2010	Taiwan
HQ202967	2010	Taiwan

HQ202969	2010	Taiwan
HQ202971	2010	Taiwan
HQ202972	2010	Taiwan
HQ202973	2010	Taiwan
HQ231328	2009	Németország
HQ231329	2008	Németország
HQ378158	2010	Szerbia
HQ378159	2009	Szerbia
HQ378160	2009	Szerbia
HQ378161	2009	Szerbia
HQ395020	2010	Kína
HQ395041	2010	Kína
HQ395049	2010	Kína
HQ395058	2010	Kína
HQ402903	2008	Kína
HQ591365	2008	Horvátország
HQ591370	2008	Horvátország
HQ591371	2008	Horvátország
HQ591373	2008	Horvátország
HQ591374	2008	Horvátország
HQ591375	2008	Horvátország
HQ591376	2008	Horvátország
HQ591377	2008	Horvátország
HQ591378	2009	Horvátország
HQ591379	2009	Horvátország
HQ591380	2009	Horvátország
HQ591381	2009	Horvátország
HQ650833	2010	Kína
HQ693092	2009	Kína
HQ693093	2010	Kína
HQ738639	2010	USA (bovine)
HQ738640	2009	USA (bovine)
HQ738641	2010	USA (bovine)
HQ831519	2008	Portugália
HQ831520	2008	Portugália
HQ831522	2008	Portugália
HQ831534	2008	Portugália
HQ831536	2008	Portugália

HQ831537	2009	Portugália
HQ831538	2009	Portugália
HQ831539	2009	Portugália
HQ831540	2010	Portugália
JF272498	2009	Kína
JF272499	2010	Kína
JF317565	2009	Korea
JF317566	2009	Korea
JF317567	2009	Korea
JF317568	2009	Korea
JF317569	2009	Korea
JF317570	2009	Korea
JF317571	2009	Korea
JF317572	2009	Korea
JF317573	2009	Korea
JF317574	2009	Korea
JF317575	2009	Korea
JF317576	2009	Korea
JF317577	2009	Korea
JF317578	2009	Korea
JF317579	2009	Korea
JF317581	2009	Korea
JF317583	2009	Korea
JF317585	2010	Korea
JF317587	2010	Korea
JF317589	2010	Korea
JF682791	2010	Kína
JF682792	2010	Kína
JF682793	2010	Kína
JF718784	2010	Kína
JF827599	2010	Kína
JN176181	2010	Kína
JN388690	2010	Kína
JN615187	2011	Kína
JN639857	2011	Kína
JQ002672	2011	Kína
JQ181586	2011	Vietnám
JQ181595	2011	Vietnám

JQ181599	2011	Vietnám
JQ181601	2011	Vietnám
JQ181603	2011	Vietnám
JQ181604	2011	Vietnám
JQ181605	2011	Vietnám
JQ181607	2011	Vietnám
JQ413808	2011	Kína
JQ806749	2010	Kína
JQ809464	2012	Kína
JQ955679	2010	Kína
JX204386	2012	Kína
JX274295	2011	Kína
JX406423	2011	Kína
JX406425	2011	Kína
JX512858	2008	Svájc
JX519293	2012	Kína
JX534236	2012	Kína
JX534237	2012	Kína
JX535236	2012	USA
JX535237	2012	USA
JX678978	2010	Kína
JX682407	2011	Kína
JX912914	2011	Kína
JX912915	2011	Kína
JX945575	2011	Kína
JX945576	2011	Kína
JX945577	2011	Kína
JX948768	2011	Kína
JX948769	2010	Kína
JX948770	2011	Kína
JX948771	2011	Kína
JX948772	2011	Kína
JX948773	2011	Kína
JX948774	2011	Kína
JX948775	2011	Kína
JX948776	2011	Kína
JX948777	2011	Kína
JX948778	2011	Kína

JX948779	2011	Kína
JX948780	2011	Kína
JX948781	2010	Kína
JX948782	2011	Kína
JX948783	2011	Kína
JX948784	2011	Kína
JX948785	2011	Kína
JX948786	2011	Kína
JX982219	2011	Kína
JX982220	2011	Kína
JX982221	2011	Kína
JX982222	2011	Kína
JX982223	2011	Kína

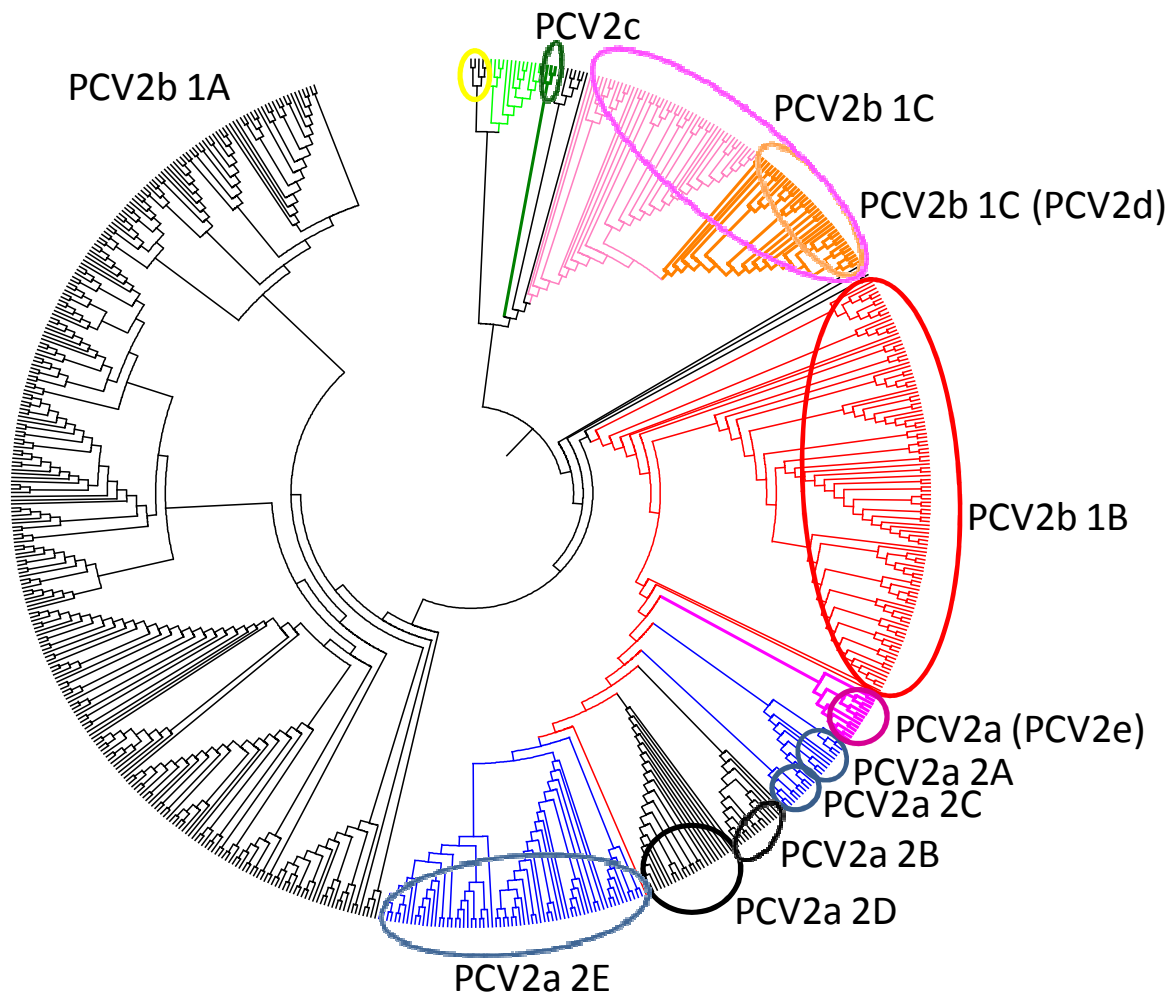
JX982224	2011	Kína
JX982225	2011	Kína
JX982226	2010	Kína
JX982227	2011	Kína
JX982228	2010	Kína
KC153106	2012	Kína
KC188796	2012	Korea
KC249977	2009	Kína
KC261600	2008	Brazília
KC261601	2008	Brazília
KC527542	2013	Kína
KC527543	2013	Kína
NC013774	2008	USA

3. Melléklet. PCV2 szekvenciák távolsági mátrix analízise (MEGA 5.2 programcsomag) .

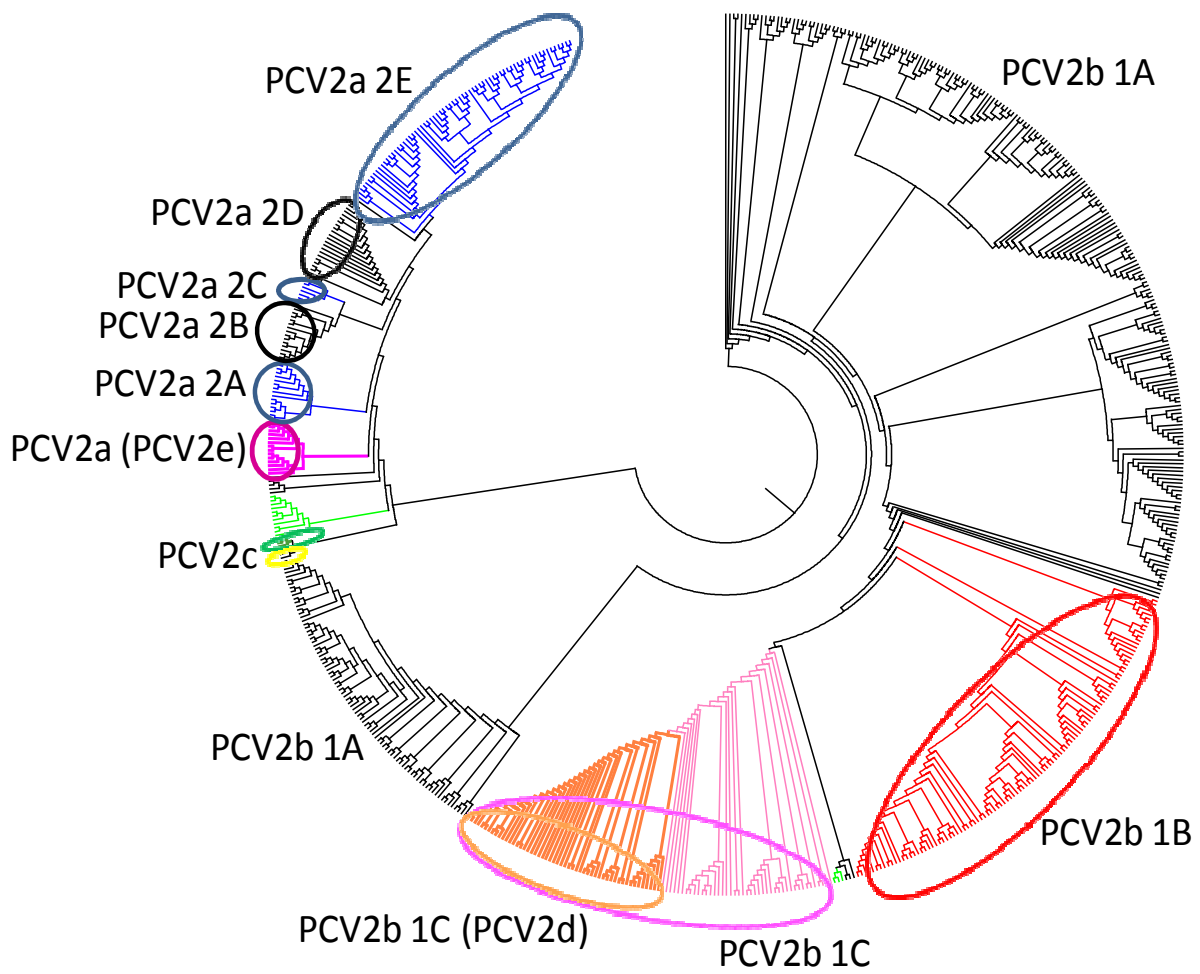
Distances in lower left	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. PCV2a_2A																		
2. PCV2a_2B	0.033																	
3. PCV2a_2C	0.029	0.028																
4. PCV2a_2D	0.031	0.032	0.033															
5. PCV2a_2E	0.035	0.042	0.032	0.036														
6. PCV2b_1A	0.063	0.063	0.062	0.061	0.066													
7. PCV2b_1A_	0.045	0.044	0.043	0.043	0.046	0.020												
8. PCV2b_1B	0.039	0.045	0.037	0.042	0.036	0.032	0.014											
9. PCV2b_1B_	0.034	0.034	0.033	0.027	0.035	0.042	0.023	0.024										
10. PCV2b_1C	0.044	0.045	0.046	0.048	0.038	0.055	0.038	0.036	0.041									
11. PCV2c	0.070	0.064	0.067	0.064	0.066	0.067	0.051	0.054	0.056	0.055								
12. PCV2d	0.048	0.047	0.048	0.053	0.042	0.057	0.039	0.037	0.041	0.009	0.057							
13. PCV2e	0.038	0.038	0.034	0.032	0.038	0.062	0.044	0.042	0.036	0.051	0.062	0.054						
14. PCV2c_kozeli	0.041	0.032	0.037	0.042	0.047	0.053	0.035	0.033	0.038	0.035	0.054	0.031	0.044					
15. HQ591379_2009_Horvat(2)	0.055	0.049	0.049	0.047	0.055	0.037	0.019	0.031	0.038	0.043	0.056	0.043	0.045	0.038				
16. HQ591381_2009_Horvat(2)	0.049	0.047	0.045	0.043	0.048	0.055	0.039	0.038	0.042	0.041	0.051	0.043	0.038	0.038	0.019			
17. EF524523_Kina_2004_SX04	0.050	0.047	0.043	0.043	0.050	0.040	0.022	0.033	0.040	0.047	0.059	0.049	0.023	0.040	0.024	0.038		
18. HM776452_2009_Kna	0.049	0.046	0.045	0.042	0.048	0.056	0.039	0.038	0.042	0.040	0.050	0.043	0.038	0.037	0.021	0.002	0.038	

A PCV2d a PCV2b 1C (PCV2d) csoportot jelöli, a PCV2e pedig a PCV2a (PCV2e). A PCV2b 1A és 1B két szekvenciát is tartalmaz, mivel ezek a csoportok nagyon elterjedtek.

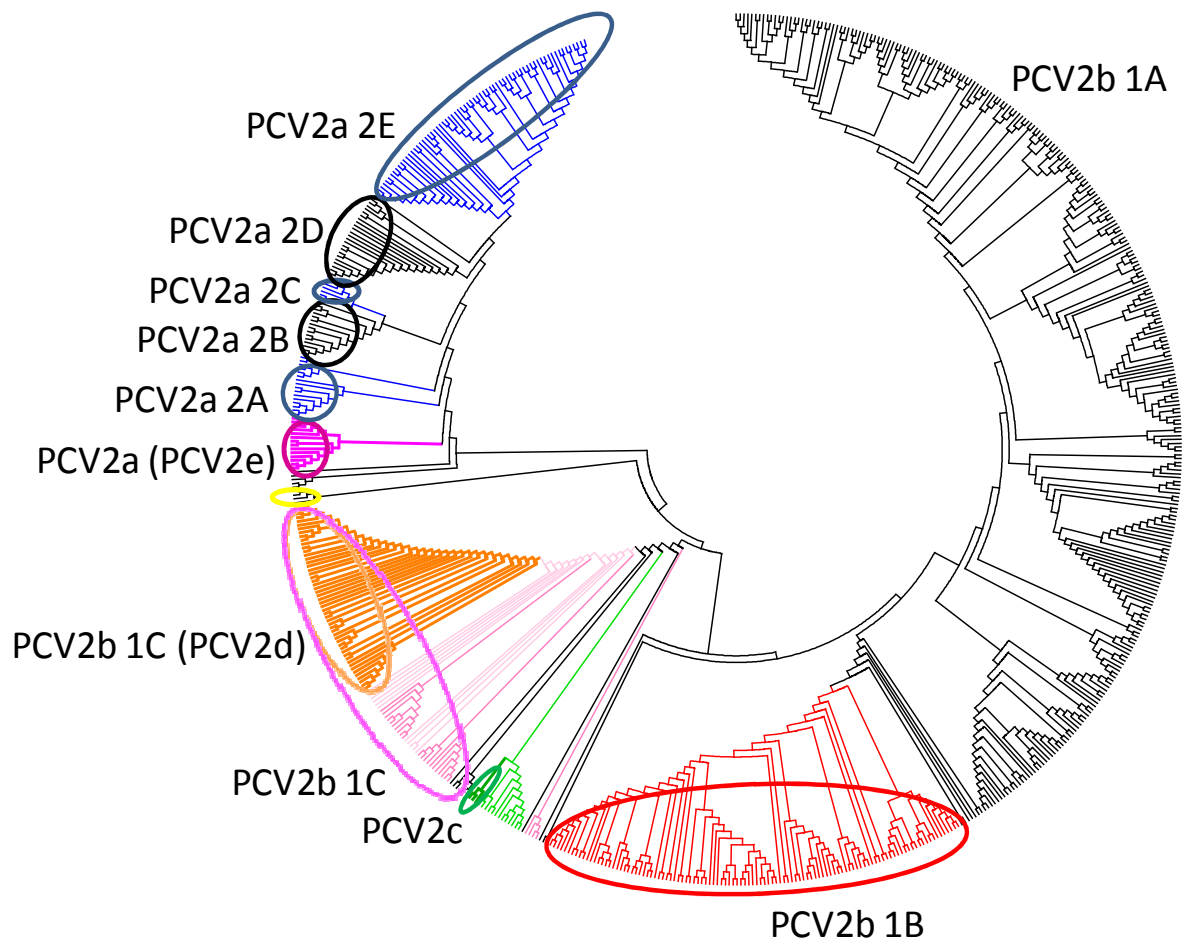
4. Melléklet. Három eltérő számítógépes elemzés alapján készített filogenetikai ábra.
Mindhárom ábra ugyanazokat a teljes genom szekvenciákat tartalmazza.



Maximum Likelihood analízis



Tamura análisis



Neighbor-Joining análisis