

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Emlősök és madarak rotavírusainak összehasonlító
filogenetikai vizsgálata**

PhD Értekezés

Harami-Papp Hajnalka

2017

Témavezető:

.....

Dr. Bányai Krisztián
Magyar Tudományos Akadémia,
Agrártudományi Kutatóközpont,
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

Készült 9 példányban. Ez a n.sz. példány.

.....

Harami-Papp Hajnalka

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Ábrajegyzék	6
Táblázatjegyzék	7
I. Összefoglalás.....	8
II. Summary.....	10
III. Bevezetés	12
IV. Jelen PhD munka célkitűzései	13
V. Irodalmi áttekintés	14
V.1. A rotavírusok felfedezése.....	14
V.2. A rotavírus virion morfológiája és genomszerkezete.....	15
V.3. A rotavírusok klasszifikációja	18
V.4. A rotavírusok terjedése.....	21
V.5. A rotavírusok fertőzése, patogenezise, klinikuma	21
V.6. A rotavírusok diagnosztikája	22
V.7. A rotavírusok evolúciós stratégiái.....	23
V.8. A rotavírusok diverzitása.....	24
V.8.1. A csoportú emlős rotavírusok	27
V.8.2. A csoportú madár rotavírusok.....	31
VI. Anyagok és módszerek	33
VI.1. A vizsgált minták	33
VI.2. A rotavírus pozitív minták feldolgozásának folyamata	34
VI.3. A virális nukleinsav tisztítása.....	35
VI.4. A virális nukleinsav ligálása	36
VI.5. Multiplex polimeráz láncreakció.....	36
VI.5.1. Primer tervezés	36
VI.5.2. Egy-lépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)	37
VI.5.3. Két-lépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)	38
VI.5.4. Genom szegmensvégek meghatározása.....	38
VI.6. PCR termékek tisztítása.....	39
VI.7. DNS szekvenálás.....	39

VI.7.1. Sanger szekvenálás	39
VI.7.2. IonTorrent szekvenálás	39
VI.8. Komputeres szekvencia elemzés.....	41
VII. Eredmények	43
VII.1. A csoportú emlős rotavírusok	43
VII.1.1. Ló rotavírusok.....	43
VII.1.2. Teve rotavírus	49
VII.1.3. Kutya rotavírus	53
VII.2. A csoportú madár rotavírusok	56
VII.2.1. Tyúk rotavírus.....	58
VII.2.2. Fácán rotavírusok.....	62
VII.2.3. Pulyka rotavírusok	69
VIII. Megbeszélés	71
VIII.1. Gyakorlati hasznosulás.....	71
VIII.2. Emlős rotavírusok.....	72
VIII.3. Madár rotavírusok.....	77
IX. Új tudományos eredmények	79
X. Hivatkozások jegyzéke	80
XI. Tudományos publikációk	93
XI.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent közlemények	93
XI.2. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztraktok	94
XI.3. Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	95
XII. Függelék	97
XIII. Köszönetnyilvánítás.....	127

Rövidítések jegyzéke

as		aminosav
bp		bázispár
DLP	double-layered particles	két-rétegű partikulumok
dNTP		dezoxiribonukleotid-trifoszfátok keveréke
dsRNS	double-stranded RNA	dupla-szálú ribonukleinsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálat
EM		elektronmikroszkóp
kbp		1000 bázispár
M		mólos
ml		milliliter
ML		maximum likelihood
μl		mikroliter
mM		millimólos
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PAGE		poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	phosphate buffered saline	foszfát pufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
RT-PCR		reverz-transzkripció PCR
RVA	Group A rotavirus	A csoportú rotavírus
nt		nukleotid
NSP	non-structural protein	nem-strukturális fehérje
ssRNS	single-strand RNA	egyszálú ribonukleinsav
SLP	single-layered rotavirus-like particles	egyrétegű partikulumok (nukleokapsid/core)
TLP	triple-layered rotavirus-like particles	háromrétegű partikulumok
UTR	untranslated region	át nem íródó génszakasz
VP	viral protein	virális szerkezeti fehérje

Ábrajegyzék

1. ábra. Humán rotavírus partikulumok elektronmikroszkópos képe.	14
2. ábra. Rotavírus összetétele.	15
3. ábra. Rotavírus genom sematikus ábrázolása.	17
4. ábra. Rotavírusok filogenetikai helyzete.	19
5. ábra. Reasszortáció sematikus ábrázolása.	24
6. ábra. G és P genotípusok előfordulása különböző gazdafajokban.	26
7. ábra. A rotavírus pozitív minták feldolgozásának folyamatábrája.	35
8. ábra. Ló RVA VP7 filogenetikai fa.	45
9. ábra. Ló RVA VP6 filogenetikai fa.	46
10. ábra. Ló RVA VP4 filogenetikai fa.	47
11. ábra. Teve RVA részleges genom alapú filogenetikai fa.	50
12. ábra. Teve RVA NSP4 filogenetikai fa.	52
13. ábra. RVA/Dog/135 kutya RVA törzs teljes genom összehasonlítása.	54
14. ábra. Madár RVA VP7 filogenetikai fa.	60
15. ábra. Madár RVA VP4 filogenetikai fa.	61
16. ábra. Madár RVA törzsek teljes genom összehasonlítása.	64
17. ábra. Gyakori és ritka ló RVA törzsek eloszlása világszerte.	73
18. ábra. Gyakori és ritka ló RVA törzsek időbeli eloszlása.	74
19. ábra. Hipotetikus reasszortáció sematikus ábrája.	78
1. Függelék ábra. Ló RVA gén alapú filogenetikai fák.	97
2. Függelék ábra. Teve RVA gén alapú filogenetikai fák.	102

3. Függelék ábra. Kutya RVA gén alapú filogenetikai fák.	106
4. Függelék ábra. Madár RVA gén alapú filogenetikai fák.	112

Táblázatjegyzék

1. Táblázat. Az A csoportú rotavírusra jellemző fehérjék és tulajdonságaik.	18
2. Táblázat. Új rotavírus nevezéktan alapjai	20
3. Táblázat. A vizsgálatok során felhasznált emlős és madár rotavírus törzsek minta eredete.	34
4. Táblázat. Teljes hosszában meghatározott ló RVA genomok genotípus összetétele.....	43
5. Táblázat. Az RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15] törzs genomjának szekvenálásával nyert adatok összefoglalója.	49
6. Táblázat. Az RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3] törzs genom genotípus konstellációja és nukleinsav szekvencia hasonlósága a genotípus referencia törzséhez.	53
7. Táblázat. Madár RVA törzsek genom összetétele.	57
1. Függelék táblázat. Az RT-PCR során alkalmazott madár és emlős RVA saját tervezésű primerek.	116
2. Függelék táblázat. A polimeráz láncreakciók során alkalmazott hőprofilok.	122
3. Függelék táblázat. Kutya RVA törzs genomjának nukleinsav hasonlósága.	123
4. Függelék táblázat. Tyúk RVA törzs genom szekvenálás eredménye.	123
5. Függelék táblázat. Házityúk RVA törzs genomjának nukleinsav hasonlósága.	124
6. Függelék táblázat. Fácán RVA törzsek genomjának nukleinsav hasonlósága.	125
7. Függelék táblázat. Pulyka RVA törzsek genomjának nukleinsav hasonlósága.	126

I. Összefoglalás

A rotavírusok a *Reoviridae* család magas köz-, és állategészségügyi jelentőségű nemzetsége. Hasmenéses megbetegedésben kóroki szerepének köszönhetően emberben széleskörűen vizsgált vírus csoport, ugyanakkor bizonyos állati gazdafajok esetében nagyon kevés adattal rendelkezünk. Munkánk fő célja ezért különböző, kevésbé vizsgált emlős és madár gazdafajokból származó A csoportú rotavírus (RVA) törzsek genom szekvenciájának meghatározása és filogenetikai elemzése volt.

A vizsgálataink során tanulmányozott rotavírus tartalmú minták Írországból, Kuvaitból és Magyarországról származtak. Emlősök közül ló, kutya és teve gazdafaj eredetű vírus törzseket, míg madarak közül házityúk, fácán és pulyka gazdafaj eredetű rotavírus törzseket elemeztünk. Összesen kilenc teljes RVA genomot és három részleges RVA genomot határoztunk meg. A vírustörzsek genomjának nukleotid szekvenciáját reverz transzkripcióspolimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével erősítettük fel, majd klasszikus Sanger-féle, valamint új generációs (IonTorrent) szekvenálás segítségével határoztuk meg. A törzsek leszármazási kapcsolatait filogenetikai elemzésekkel tártuk fel.

Nemzetközi együttműködésben először határoztunk meg teljes hosszúságában két ló RVA genomot. Mindkét törzs Írországból, közel azonos időből, azonos gyűjtésből származott, és hasonló genom összetétellel rendelkezett, ennek ellenére jelentős filogenetikai eltérést mutatott. Az egyik ló RVA törzs nagyfokú szekvenciális hasonlóságot mutatott egy Dél-Afrikából származó ló RVA törzssel. A másik írországi ló RVA törzs kisebb mértékben, de számottevően eltért az együttműködés által feldolgozott, illetve számos azóta publikált további ló RVA törzstől. A ló RVA-k epidemiológiájának jobb megismerése érdekében irodalmi összehasonlító vizsgálatot is végeztünk.

Meghatároztuk egy kuvaiti teve eredetű RVA törzs részleges genomját, melynek bizonyos génjeiről elsőként szereztünk szekvencia információt. A teve RVA törzs nagyfokú hasonlóságot mutatott kérődző, és humán RVA törzsekkel. Ugyanakkor egyedülálló NSP4 genotípussal rendelkezett, melyet új genotípusként (E15) fogadott el a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport.

Új generációs szekvenálás segítségével meghatároztuk egy magyarországi kutya eredetű RVA törzs teljes genomját, mely szignifikáns hasonlóságot mutatott egy korábban Olaszországban izolált humán RVA törzssel. Ez a szoros leszármazási kapcsolat további igazolása a rotavírus törzsek zoonotikus képességének.

Meghatároztuk továbbá hét, magyarországi eredetű madár RVA törzs teljes, illetve részleges genomját fácán és pulyka gazdafajokból, valamint egy laboratóriumi kontrollként alkalmazott, házityúk eredetű rotavírus izolátum teljes genomját. A házityúk RVA törzs genom összetétele eltért a korábban az irodalomban leírt házityúk RVA törzsek genom

összetételétől, és inkább pulyka RVA törzsekre jellemző genotípus konstellációval rendelkezett. A fácán eredetű RVA törzsek (n=5) meglehetősen változékonyságot mutattak, egy törzs nagymértékben hasonlított már korábban meghatározott németországi, illetve magyarországi fácán RVA törzsekre. Két fácán RVA törzs magas fokú hasonlóságot mutatott pulyka RVA törzsekkel. Két fácán RVA törzs tyúk eredetű RVA törzsekkel mutatott leszármazási kapcsolatot. Feltételezésünk szerint a fácán RVA törzsek könnyen vesznek részt reasszortációs eseményekben más madarak rotavírusaival. A két meghatározott magyarországi pulyka törzs között nagyfokú nukleinsav szekvencia hasonlóság állt fenn, valamint további pulyka RVA törzsekkel mutattak szoros leszármazási kapcsolatot. A hazai madár RVA törzsek teljes vagy részleges genom meghatározására részben klasszikus molekuláris módszereket, részben új generációs szekvenálás módszert alkalmaztunk.

Eredményeink hozzájárultak az emlős és madár rotavírusok diverzitásának és evolúciós mechanizmusainak jobb megismeréséhez, valamint módszertani fejlesztést végeztünk a rotavírusok teljes genom meghatározásának területén.

II. Summary

The *Rotavirus* genus –member of the *Reoviridae* family– has great importance in public and animal health. Human rotaviruses are extensively investigated due to their major involvement in enteric diseases, however, only limited data about rotaviruses of animal hosts is available. During the PhD period, my main goal was to determine and phylogenetically investigate rotavirus group A (RVA) genome sequences from various, rarely investigated mammalian and avian hosts.

Examined RVA positive samples were obtained from Ireland, Kuwait and Hungary. Equine, canine, camel, chicken, pheasant and turkey RVA strains were investigated. Altogether nine whole and three partial RVA genomes were determined. Segmented RNA genomes of RVA strains were reverse-transcribed into DNA sequences and amplified by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Amplification products were sequenced by the classical Sanger-reaction or by a next generation sequencing method (IonTorrent). The heredity relationship of examined strains was revealed by phylogenetic analyses of the novel and previously described genome sequences.

We have determined whole genome sequences of equine RVAs for the first time in the frame of an international research collaboration. Both investigated equine RVA strains originated from Ireland, from the same collection, with nearly the same collection date. In the main, similar genome constellation was determined for the two strains, however, they belonged to distinct phylogenetic lineages. One of the equine RVA strains showed high sequence similarity to an equine RVA strain from South-Africa, whereas the other equine RVA strain slightly, but significantly differed from other equine RVA strains determined by the collaboration or others. In addition, we have synthesised our data with previously published results in a systematic review about equine RVA global distribution to clarify equine RVA epidemiology.

We have also determined the partial genome sequence of a camel RVA strain originated from Kuwait. We have obtained the sequence information of a set of camel RVA genes that have not been investigated yet. Analyses revealed that this RVA strain is of high similarity to small ruminant and human RVA strains, however, it has a novel, unique NSP4 genotype, which was designated as a novel genotype (E15) by the Rotavirus Classification Working Group.

We have determined the complete genome sequence of a Hungarian canine RVA strain, which showed high similarity to an already specified human RVA strain from Italy. This close genealogical relationship further supports the high zoonotic potential of rotaviruses.

In addition to the investigation of mammalian RVA strains, we have determined the genomes of eight Hungarian avian RVA strains. The complete genome sequence of a

laboratory control chicken RVA strain and complete or partial genomes of RVA strains from pheasant and turkey hosts were determined. The genotype constellation of the chicken RVA strain was divergent from other chicken RVA strains published previously; interestingly it was more similar to RVA strains previously found in turkeys. The five examined pheasant RVA strains had variations in genotype constellation. One of the strains was highly similar to previously published pheasant RVA strains from Germany and Hungary, two strains were highly similar to turkey RVA strains, and two other strains showed a close phylogenetic relationship with chicken RVA strains. Our results suggest that reassortment between pheasant and other RVA strains can effectively and frequently occur. In addition, we have determined the complete genome sequence of two turkey RVA strains, that showed close relation with other turkey and Hungarian pheasant RVA strains. For the determination of complete or partial genome of domestic bird RVA strains, we partially used classical molecular methods and a new generation sequencing method.

In summary, we have successfully explored the genetic information of numerous rarely investigated RVA strains from mammalian and avian hosts and have developed a novel rotavirus complete genome determination methodology. With our results we would like to contribute to the better understanding of mammalian and avian RVA diversity and mechanisms of RVA evolution. Furthermore, we hope that our work will help in the development of animal vaccination projects by contributing to the identification of major RVA strains that cause serious health problems in domestic and wild animal populations and economical stress in animal husbandry.

III. Bevezetés

A rotavírus nemzetség a *Reoviridae* család köz-, és állategészségügyi szempontból jelentős csoportja. A súlyos lefolyású gyomor-bélhurut (gastroenteritis) eseteknek emberekben és állatokban egyaránt az egyik leggyakoribb kórokozója.

Világszerte az 5 éves kor alatti gyermekek közel 95%-a legalább egyszer átesik rotavírus fertőzésen. Évente közel kétmillió gyermek szorul kórházi ellátásra és félmillió hal meg a fertőzés következtében (WHO 2005; Bányai, K. 2011).

A gazdasági haszonállatok állományaikban számottevő károkat okoznak a rotavírus fertőzést kísérő tünetek, úgymint a testsúlycsökkenés, fejlődésbeli visszamaradás, végül a súlyos folyadékvesztés nyomán bekövetkező elhullás.

Egészségügyi jelentőségük miatt mind a humán, mind az emlős rotavírusok széleskörű kutatások tárgyát képezik. Ugyanakkor a házi- és vadmadarak rotavírusairól meglehetősen kevés információval rendelkezünk, bár gazdasági jelentőségük ugyancsak nem elhanyagolandó.

A fentiekből következően munkacsoportunk (MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet, Új kórokozók felfedezése Témacsoport) Dr. Bányai Krisztián vezetésével, különféle gazdafajokból nagyszámú rotavírus genom szekvencia adat gyűjtését és feldolgozását tűzte ki elsődleges céljává. Az azonosított vírustörzsek genomjának összehasonlításával szeretnénk még több ismeretre szert tenni az egyes evolúciós mechanizmusok jelentőségéről. A nyert adatok segítségével jellemezhetővé válik a rotavírusok országokon és tájegységeken átívelő eloszlása, és könnyen követhetővé a különböző járványos megbetegedést okozó törzsek migrációja. E járványtani megfigyelések a jövőben lehetőséget adhatnak a hatékonyabb védekezés kidolgozására.

A széleskörű adatgyűjtés érdekében a korábban alkalmazott hagyományos laboratóriumi technikák mellett bevezettünk csoportunkban egy következő generációs molekuláris biológiai módszert is. Eredményeink tudományos bemutatására az így nyert adataink felhasználásával filogenetikai és összehasonlító vizsgálatokat végzünk.

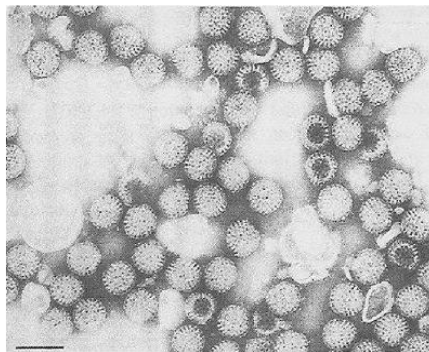
IV. Jelen PhD munka célkitűzései

1. Hazai eredetű, valamint nemzetközi együttműködésben kutatócsoportunkhoz eljuttatott ritka vagy nehezen azonosítható A csoportú rotavírus törzsek genomjának meghatározása klasszikus molekuláris módszerek adaptálásával.
2. Új generációs szekvenálás (IonTorrent szemikonduktív szekvenálás) módszerének bevezetése a klasszikus molekuláris módszerekkel nehezen vagy nem jellemezhető A csoportú rotavírusok teljes genomjának meghatározására.
3. Irodalmi összefoglalók alapján az egyes gazdafajokból származó A csoportú rotavírus törzsek genetikai diverzitásának feltérképezése, majd az általunk feldolgozott minták összehasonlítása a nemzetközi adatokkal.

V. Irodalmi áttekintés

V.1.A rotavírusok felfedezése

A fertőző hasmenés kórokozóját hosszú ideig nem sikerült azonosítani, az 1950-60-as években a humán enterális vírusok esetében többnyire sikeresen alkalmazott szövetkultúrákon alapuló tenyésztő technikák ellenére sem. A megoldást végül az elektronmikroszkópos (EM) történő vizsgálatok hozták meg (1. ábra). Ezzel a módszerrel Ruth Bishop 1973-ban súlyos hasmenésben szenvedő csecsemők és kisgyermek vékonybél nyálkahártya kenetében és székletében a reovírusokhoz hasonló morfológiájú partikulumokat figyelt meg, melyeket utóbb rotavírusként azonosítottak (Bishop, R. et al. 1973a; Bishop, R. et al. 1973b).



1. ábra. Humán rotavírus partikulumok elektronmikroszkópos képe.

Forrás (Kapikian, A.Z. et al. 1974)

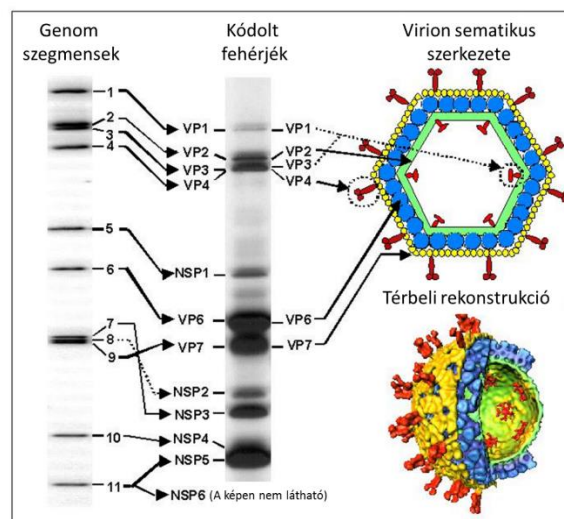
Bishop vizsgálatait korábbi leírások alapján végezte, melyekben hasmenéses állatok, elsősorban egerek, majmok és szarvasmarhák bélszövetét és bélsárát tanulmányozva azonosítottak kóroki szerepű vírusokat EM használatával. A legkorábban beazonosított rotavírus törzsek: a SA11 (simian agent 11), amelyet vervet majomtól származó széklet mintából mutatták ki; és az ún. O (offal) ágens, melyet szarvasmarha és juh bélsár keverékkel kezelt vervet majom vese sejt kultúrából izoláltak (Adams, W.R. et al. 1963; Malherbe, H. et al. 1963; Malherbe, H. et al. 1967). Később egér, majom és szarvasmarha bélsár mintákból is sikeresen izoláltak rotavírusokra jellemző morfológiát mutató fertőző ágenseket (Kapikian, A.Z. et al. 1974; Estes, M.K. et al. 2007).

Az EM módszer fejlődésével a madár vírusokkal foglalkozó szakemberek is egyre szélesebb körben kezdték el alkalmazni ezt a módszert a szövettenyésztésen nem szaporodó enterális vírusok vizsgálatára. Az első madár rotavírust az Egyesült Államokban mutatták ki 1977-ben enteritisben szenvedő pulykák bélsár mintájából (Bergeland, M. et al. 1977), később az Egyesült Királyságban az 1970-es évek végétől számos esetben sikeresen mutattak ki rotavírust, illetve rotavírus-szerű partikulumokat pulyka és tyúk bélsárból (McNulty, M. et al. 1978; McNulty, M. et al. 1979a; McNulty, M. et al. 1979b).

V.2.A rotavírus virion morfológiája és genomszerkezete

A teljes rotavírus virionok megközelítőleg 100 nm átmérőjű kapsziddal rendelkeznek, melyek három fehérje rétegből állnak, amelyet további lipid burok nem borít. A rotavírus elnevezést az EM-el készített felvételeken jól kivehető, küllős kerékre emlékeztető morfológia alapján kapták a (*rota* = lat. kerék), amely a fehérjerétegek ikozaéderezs szimmetriájának és a külső réteget alkotó fehérjéknek köszönhető (1. ábra) (Woode, G. et al. 1976). A vírus fehérjei két csoportba tartoznak. Ennek megfelelően, elkülönítünk hat szerkezeti vírus-fehérjét (VP), valamint a hat nem-strukturális fehérjét (NSP).

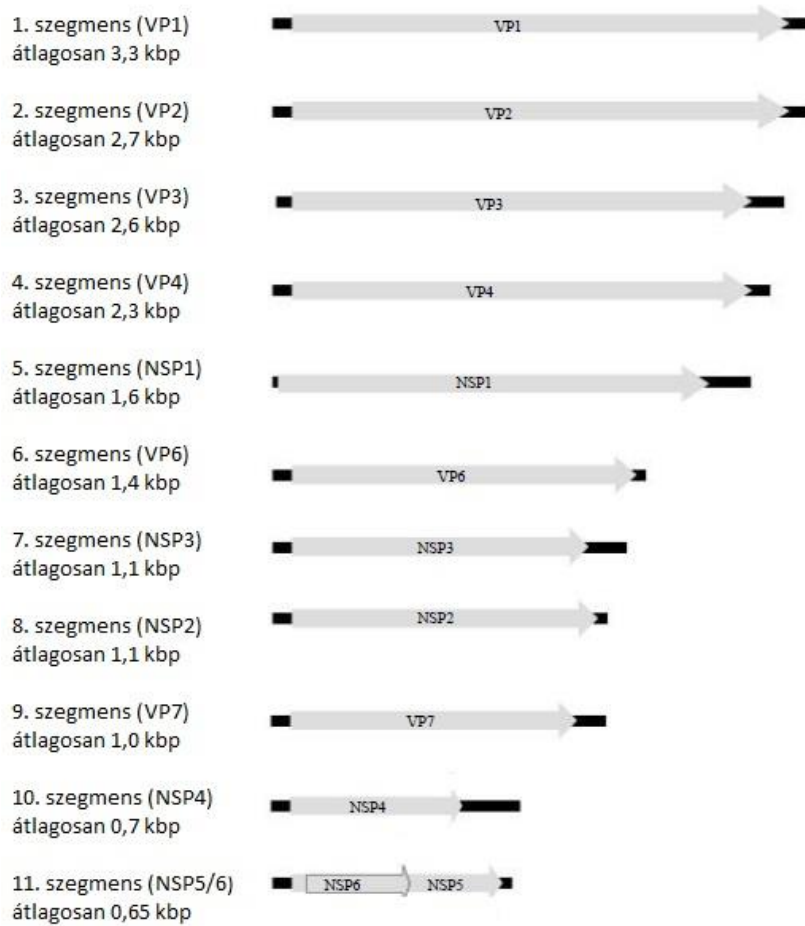
A rotavírus virion sematikus felépítését a 2. ábra mutatja. A VP2 fehérje alkotja a belső kapszid réteget, létrehozva az ún. nukleokapszidot, mely a következőket tartalmazza: a VP1 fehérjéket, amely a vírus saját RNS-függő RNS-polimeráz enzime; a VP3 proteineket, mely a vírus guanilil-transzferáza, és genom transzkripciójáért felelős; valamint a vírus genomiális, kettős szálú (ds) RNS-ét. A belső réteget az egykomponensű, VP6 fehérjemolekulákból álló középső réteg veszi körbe. A VP6 fehérjék kapcsolódnak mind a VP2, mind a külső réteget alkotó két fehérjéhez (Bican, P. et al. 1982; Patton, J.T. 1995; Estes, M.K. et al. 2007). A külső réteg alapvető alkotóeleme a glikoprotein típusú fehérje (VP7), valamint a VP4 fehérje (Patton, J.T. 1995).



2. ábra. Rotavírus összetétele. A rotavírus genom (dsRNS szegmensek elektroforetogramja) összetétele, a kódolt fehérjék elektroforetikus mobilitása (SDS poliakrilamid gélen), a vírus partikulum sematikus morfológiája, valamint 3D modellje. Az eredeti ábra innen: <http://www.reoviridae.org>, módosítva (Mossel, E. et al.).

A nukleokapszid tartalmazza a 11 lineáris szegmensből álló dsRNS vírus genomot, amely önmagában, a megfelelő virális fehérjék hiányában nem fertőző. A teljes rotavírus genom általában 18500-19000 bp méretű, ugyanakkor törzsenként nagy változékonyságot mutat. Például a majom eredetű SA11 törzs genomja 18556 bp, míg a tyúk eredetű 02V0002G3 törzs genomja 19064 bp hosszú (Trojnar, E. et al. 2009; Mlera, L. et al. 2013). A genom szegmensek eltérő molekulaméretükből adódóan poliakrilamid gélen (PAGE) jellegzetes elektroforetikus migrációs mintázatot mutatnak (2. és 3. ábra). A mintázatban a szegmensek molekulásúlya alapján különböző kategóriákat különítenek el, leíráskor a kategóriákba tartozó szegmensek számát tüntetik fel. Például az A csoportú madár rotavírusoknál öt nehéz molekulásúly szegmens (1-5.), egy közepes (6.), három önállóan elkülönülő (7-9.) és két kis molekulásúly szegmens (10-11.) található, így migrációs mintázata összegezve: 5-1-3-2. Az emlős A csoportú rotavírusok genomjának migrációs mintázatára 4-2-3-2 eloszlás jellemző (2. ábra). A teljes genom PAGE vizsgálata gyors, egyszerű és népszerű módszer a vírus kimutatására és esetleges járványok monitorozására, azonban a módszer nem alkalmas a vírus osztályozására (Patton, J.T. et al. 1996; Estes, M.K. et al. 2007; Trojnar, E. et al. 2013). A rotavírus genom szegmensek közül az 1. szegmens, a VP1 fehérjét kódoló a leghosszabb (3300-3600bp), míg a 11. szegmens, az NSP5/6-t kódoló a legrövidebb (670-690bp) (4. ábra).

Minden dsRNS genom szegmens 5' vége egy guanin bázissal kezdődik, majd az ún. 5' végi át nem íródó régióval (UTR) folytatódik. A nyitott leolvasási keret (ORF) kódolja a fehérje terméket, amely START kodonnal indul, és STOP kodonnal végződik. A STOP kodont az ún. 3' végi UTR követi, majd két 3' végi citozin zárja le a szegmenseket (kivéve C csoportú rotavírusok). Az egyes genom szegmenseken az 5' és 3' végi UTR szekvenciák eltérő hosszúságúak lehetnek, de a különböző törzsek között a homológ szegmensek végei konzerváltak (3. ábra). A 3' végen nincsen poliadenilációs szignál (Estes, M.K. et al. 1989; Patton, J.T. et al. 1996).



3. ábra. Rotavírus genom sematikus ábrázolása. A rotavírus genom szerveződés bemutatása az A csoportú rotavírus SA11 törzs példáján (Mitchell, D. et al. 1990). A szürke nyilak a szegmensen a fehérjét kódoló szekvenciák, míg a fekete vonalak a szegmensvégi nem-kódoló szekvenciát jelölik (forrás (Trojnar, E. 2013); módosított ábra).

A genomi szegmensek nagy része monocisztronos, vagyis egy fehérjekódoló régiót hordoz. Az A csoportú rotavírusoknál a 11. szegmens kivétel, mivel bicisztronos, két átfedő ORF található (NSP5 + NSP6) rajta. Más rotavírus csoportokra további bicisztronos szegmensek is jellemzőek (Patton, J.T. 1995; Estes, M.K. et al. 2007). A 1. Táblázat összefoglalja az A csoportú rotavírus genom génjeit és a kódolt fehérjék jellemző tulajdonságait.

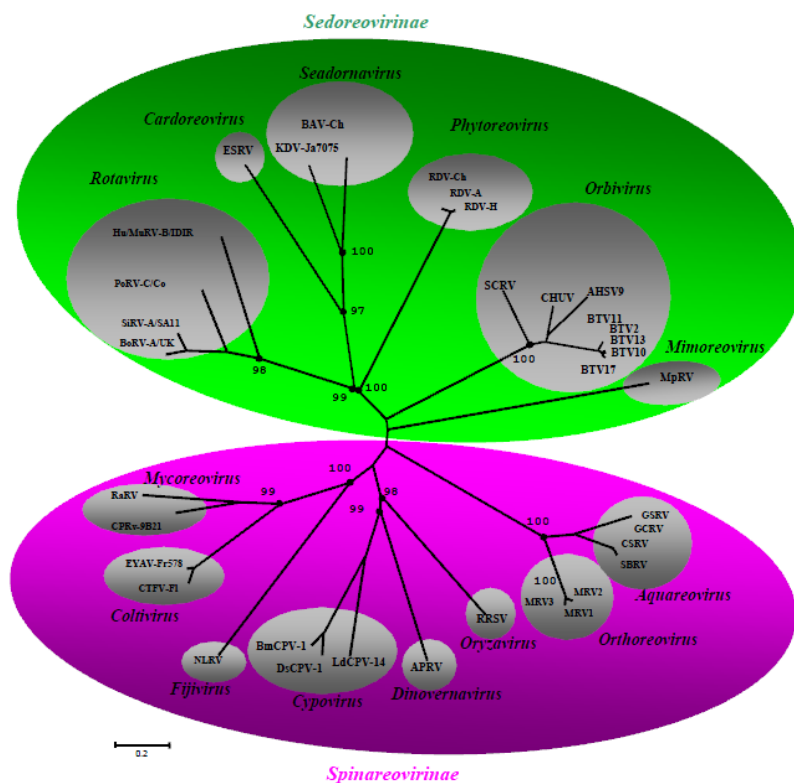
1. Táblázat. Az A csoportú rotavírusra jellemző fehérjék és tulajdonságaik.

Szegmens	Szegmens méret (nukleotid/aminosav)	Fehérje termék	Lokalizációja a sejtben	Funkció	Helye a virionban
1	3302 / 1088	VP1	Viroplazma	RNS-függő RNS polimeráz	Nukleokapszid
2	2738 / 897	VP2	Viroplazma	Nukleokapszid alkotója, genom rögzítése	Nukleokapszid Belső kapszid réteg
3	2583 / 829	VP3	Viroplazma	Guanilil-transzferáz (mRNS capping enzim)	Nukleokapszid
4	2349 / 770	VP4	Citoplazma	Tüske fehérje, adszorpciós szerep, neutralizációs antigén	Külső kapszid réteg
5	1870 / 576	NSP1	Citoszkeleton	RNS-kötő fehérje, interferon antagonista	-
6	1348 / 397	VP6	Viroplazma	Csoportdetermináns antigén	Középső kapszid réteg
7	1092 / 306	NSP3	Citoplazma, citoszkeleton	Virális mRNS aktiváló, gazda transzláció gátló	-
8	1042 / 315	NSP2	Viroplazma	NTPáz, RNS csomagolásban szerepel	-
9	1065 / 329	VP7	ER	Neutralizációs antigén	Külső kapszid réteg
10	727 / 169	NSP4	ER, citoplazma	Enterotoxin, DLP receptor	-
11	729 / 218, 96	NSP5, NSP6	Viroplazma	ssRNS- és dsRNS-kötő modulátor	-

V.3.A rotavírusok klasszifikációja

A rotavírusok a *Reoviridae* családon belül a *Sedoreovirinae* alcsaládba tartoznak (4. ábra). A reovírusok két csoportra történő osztásáról 2007-ben döntött a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) a nukleokapszid struktúra és a genetikai kapcsolatok alapján. A *Sedoreovirinae* alcsalád foglalja magába azokat a reovírusokat, melyek virion felszínén nem található kiemelkedő képletek („nem-tornyos”), míg a *Spinareovirinae* alcsaládba tartozó reovírusok virion felszínén toronyszerű kiemelkedések találhatóak („tornyos”). A külön alcsaládokra való

felosztás a morfológiai különbségek mellett az RNS-függő RNS polimeráz gén szekvenciájában mutatkozó eltérések is támogatják (Attoui, H. et al. 2007).



4. ábra. Rotavírusok filogenetikai helyzete. Radiális neighbour-joining módszerrel készített filogenetikai fa, amely a *Reoviridae* család felosztását mutatja. A szürke mezők az alcsaládokon belüli genuszokat jelölik néhány reprezentatív törzzsel. Az elágazások mentén a bootstrap elemzés értékeit tüntették fel (Attoui, H. et al. 2012).

Az ICTV jelenleg kilenc csoportot (speciest) különít el a *Rotavirus* genuson belül; ezeket A-tól I-ig jelölik (pl. *Rotavirus A* (RVA)), és további egy csoportjelölt is ismert (RVJ) (Attoui, H. et al. 2012; Mihalov-Kovács, E. et al. 2015; Bányai, K. et al. 2017). A rotavírus csoportok elkülönítése hosszú ideig szerológiai vizsgálatokon (pl. ELISA) alapult. Az így elkülöníthető rotavírusok alkotta csoportokat nevezték szerocsoportnak, melyek különbözősége a VP6 fehérje antigenitásbeli különbségeinek tudható be. Az immunológiai vizsgálatok szerepét mára teljes egészében a genotipizáló vizsgálatok vették át, melyek az antigenitásban szerepet játszó fehérjék génszekvenciáinak összehasonlításán alapulnak (Estes, M.K. et al. 2007). A szerocsoportok helyét felváltották a VP6 gén szekvenciális különbségei alapján elkülönített rotavírus csoportok (speciesek) (Matthijssens, J. et al. 2012b). A korábbi szerocsoportok és a ma használatos csoportok megfeleltethetők egymásnak (Estes, M.K. et al. 2007). Az A, B, C és H csoport megtalálható mind az emberekben, mind állatokban, míg a D, E, F, G, I és J csoportot eddig csak állatokból mutatták ki (Pedley, S. et al. 1986; Estes, M.K. et al. 2007; Mihalov-Kovács, E. et al. 2015; Bányai, K. et al. 2017).

A rotavírus törzseket alapvetően az ún. duális klasszifikációval jellemzik, amely a két külsőréteg fehérje a VP7 glikoprotein (Gx), és a VP4 proteáz érzékeny fehérje (Px) különböző genotípusain (x) alapuló elnevezés, melyet a leginkább tanulmányozott RVA csoportra dolgoztak ki, de átvezették a többi rotavírus speciesre is. Az egyes genotípusok mind nukleinsav szinten, mind szerológiai szinten különböztek egymástól. Mai napig folyamatosan mutatnak ki újabb genotípusokat, jelenleg 50 féle P típus és 35 féle G típust ismerünk. A P-típus esetében szögletes zárójelben ([x]) jelzik a genotípust, míg a szögletes zárójel előtt számmal és betűvel a szerotípust. Erre azért van szükség, mert egyes esetekben a szerotípus nem egyezik a genotípussal (Matthijnssens, J. et al. 2011a).

Új kezdeményezésként 2008-ban javaslatot tettek a rotavírusok duális klasszifikációs rendszerének megreformálására, amit azóta a tudományos közvélemény széles körben elfogadott (Matthijnssens, J. et al. 2008a). Az új rendszerben mind a 11 genomszegmens saját genotípus jelölést kapott, valamely jellemző tulajdonsága alapján. A genotípusok elkülönítéséhez a továbbiakban az egyes gének nukleinsav szekvenciájának százalékos hasonlósági értékeit használták fel. Az elkülönítési határértékeket tapasztalati úton állapították meg (2. Táblázat.).

2. Táblázat. Új rotavírus nevezéktan alapjai

Gén termék	Genotípus elnevezés	Leírt genotípusok száma	Százalékos hasonlósági határérték	Genotípus elnevezés eredete (angol eredeti)
VP7	Gx	35	80	G likolizált (G lycolylated)
VP4	P[x]	50	80	P roteáz-érzékeny (P rotease sensitive)
VP6	Ix	26	85	Középső kapszid réteg (Intermediate capsid shell)
VP1	Rx	21	83	R NS-függő R NS polimeráz (R NA-dependent R NA polymerase)
VP2	Cx	19	84	Mag fehérje (C ore protein)
VP3	Mx	19	81	M etiltranszferáz (Methyltransferase)
NSP1	Ax	30	79	Interferon A ntagonista (Interferon a ntagonist)
NSP2	Nx	21	85	N TPáz (NTPase)
NSP3	Tx	21	85	T ranslációs enhanszer (T ranslation enhancer)
NSP4	Ex	27	85	E nterotoxin (E nterotoxin)
NSP5/6	Hx	21	91	Foszfoprotein (P hosphoprotein)

Bár a teljes genomszekvencián alapuló klasszifikáció rendszerét az A csoportú rotavírusokhoz dolgozták ki, a rendszer alkalmas a többi rotavírus faj (csoport) klasszifikációjára is, megfelelő paraméterekkel (Martella, V. et al. 2007). Annak érdekében, hogy elkerülhető legyen azonos genotípusok többszöri, különböző névvel ellátott megjelenése az irodalomban, illetve azonos számmal különböző genotípusok megjelenése, megalakult a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport (RCWG), molekuláris virológusok, infektológusok, és epidemiológusok részvételével (Matthijssens, J. et al. 2008a).

V.4.A rotavírusok terjedése

A rotavírus fertőzés általában feko-orális úton terjed, közvetlenül egyedről egyedre. Indirekt terjedés jellemzően vírus partikulumokkal fertőzött víz, vagy fertőzött környezet közvetítésével alakul ki. Az indirekt terjedéshez hozzájárul, hogy a rotavírus partikulum viszonylag ellenálló a környezeti behatásokkal szemben, tág hőmérséklet és pH tartományban megtartja fertőzőképességét. Mérsékelt égövi populációkban jellemzően a hidegebb hónapokban hatékony a terjedése, gyakran okoz súlyos járványokat ezen időszakban. Trópusi égövi területeken a rotavírus fertőzések egész évben előfordulnak (Dennehy, P.H. 2000; Estes, M.K. et al. 2007). Fokozott odafigyeléssel, a higiéniai szabályok betartásával a járványok megelőzhetők, ugyanakkor a járványkitörést követően azok gyors terjedését már nem képes mérsékelni. Ennek oka, hogy a rotavírus partikulumok nagy koncentrációban ürülnek a széklettel, míg a fertőzéshez igen kis mennyiségű (nagyságrendileg 100 vírus részecske) vírus partikulum elegendő (Grimwood, K. et al. 2009).

Számos bizonyíték támasztja alá a rotavírusok állatról emberre való terjedési képességét; több esetben mutattak ki teljes vagy részlegesen állati rotavírus genommal rendelkező törzseket emberben (Matthijssens, J. et al. 2006a; Matthijssens, J. et al. 2008a; Matthijssens, J. et al. 2008b; Matthijssens, J. et al. 2009b). Ugyanakkor a madár rotavírusok fertőzési spektrumáról kevesebb adattal rendelkezünk. Annak ellenére, hogy a baromfiállományokban gyakori a rotavírus fertőzés, ritkán végeznek molekuláris genetikai vizsgálatokat.

V.5.A rotavírusok fertőzése, patogenezise, klinikuma

A szervezetbe kerülve a rotavírus a vékonybél differenciált enterocytáit támadja meg. A bélhámsejtek felszínéhez való kötődés és a vírus sejtbe jutása összetett folyamat, amelyben mindkét felszíni fehérje (VP7 és VP4) elengedhetetlen szerepet játszik, és amely során a virion elveszíti külső fehérje rétegét. A citoplazmába már csak a két rétegű partikulum kerül, amelyben a vírus saját enzimeit végzik a vírusgenom transzkripcióját (VP1 és VP3 fehérjék). Az újonnan elkészült mRNS-ek kikerülnek a gazdasejt citoplazmájába, melyekről a gazdasejt

enzimkészletével készülnek az új vírus partikulumokat alkotó fehérjék, és a nem-strukturális fehérjék. A vírus genom replikációja és a vírusfehérjék szintézise az ún. viroplazmában játszódik le, mely egy jól elhatárolódó, elektrodenz terület a citoplazmában. A replikációban a vírus egyes nem-strukturális fehérjéi szabályzó szerepet töltenek be (NSP1-3, és NSP5). Az érett virionok az enterocyták lízisével jutnak a bél lumenébe, ahol megfertőzik a vékonybél további szakaszait. A rotavírussal fertőzött bélhámsejtekben citopatogén hatások figyelhetők meg, mint például vakuolizáció és a mikrovillusok elvesztése. A rotavírusok a fertőzött sejtek működésének megváltoztatását eredményezik, többek között gátolják a sejt saját génjeinek kifejeződését mRNS és fehérje szinten egyaránt. A vírus továbbá hatással van a citoskeletális rendszerre is, ami részben megmagyarázza a mikrovillusok elvesztését, mely folyamatban az NSP4 enterotoxin fehérjének tulajdonítanak számottevő szerepet. A sejten belüli változások kihatnak enterális idegrendszerre is, fokozva ezzel a folyadék- és elektrolit-kiválasztást (Jourdan, N. et al. 1998; Nilsson, M. et al. 1998; Ruiz, M. et al. 2000; Estes, M.K. et al. 2007; Lorrot, M. et al. 2007).

Emberben a fertőzést követő 48-72 órán belül jelentkeznek a hasmenéssel, hányással és lázzal járó tünetek, melyek 5-7 napig tartanak. A székletürítések száma elérheti a 7-10 alkalmat/nap, valamint további 3-4 alkalommal hányás is jelentkezhet. A folyadékvesztés gyors és súlyos dehidrációhoz vezethet. Számos klinikai megfigyelés társít a rotavírus fertőzéshez emésztőszervrendszeren kívüli tüneteket (pl. légúti- és idegrendszeri tünetekkel, esetenként emelkedett májenzimszinttel), melyek kialakulásában szerepet játszhat a fertőzés akut szakaszában a vírus vérben való megjelenése (virémia) (Bányai, K. 2011; Antalné László, B. 2013). A virémiát számos állatfajban megfigyelték, azonban a vírus betegségkókozó szerepe nem minden esetben igazolt (Thouless, M. et al. 1988; Guy, J.S. 1998).

V.6.A rotavírusok diagnosztikája

Klinikai tünetek alapján a rotavírus fertőzést más vírus eredetű gasztroenterális fertőzéstől nem lehet elkülöníteni. A végső diagnózis egyértelműen csak laboratóriumi vizsgálatot követően állítható fel. Ez korábban a székletpreparátum EM képe alapján történt (Bishop, R. et al. 1973b; Flewett, T. et al. 1973), később a vírus genomszegmensek gélelektroforetikus elválasztásán alapuló laboratóriumi diagnosztika (PAGE; poliakrilamid gélelektroforézis) terjedt el (Ramig, R. et al. 1983). Ám egyik módszer sem alkalmas a vírus törzsek genotípus szintű elkülönítésére.

Manapság leginkább az antigén-antitest kapcsolódáson alapuló, kereskedelmi forgalomban kapható, kis eszközigényű, antigén kimutatásra kifejlesztett tesztek használata terjedt el, melyek elsősorban a csoportspecifikus VP6 antigén elleni monoklonális és poliklonális antitestekre épülnek. Ezek egy része mind a humán, mind az állatgyógyászat

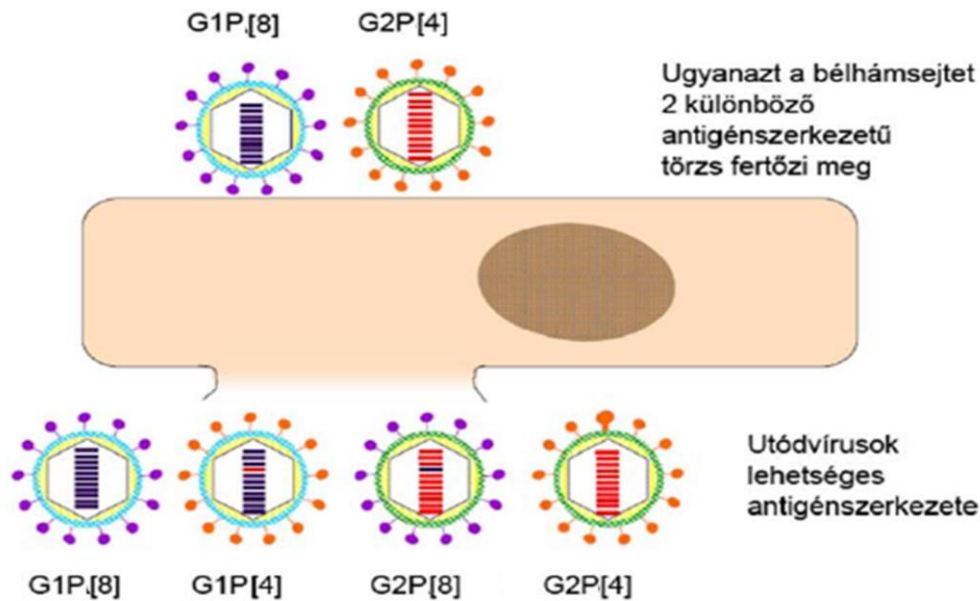
számára elérhető (Bányai, K. 2011). Ugyanakkor a közel rokon rotavírus törzsek között gyakori keresztreakciók folytán a szerológiai vizsgálatok pontatlanok lehetnek. Ennek kiküszöbölésére terjedtek el a korszerűbb, specifikusabb és érzékenyebb genomi nukleinsav-meghatározáson alapuló molekuláris biológiai módszerek. A rutindiagnosztikában a vírus valamely génjének kimutatása a reverz-transzkripció polimeráz láncreakció módszere (RT-PCR) használatos.

Az azonosítást követheti a vírusgenom részletes- vagy teljes szekvenálása is, amely segítséget nyújt a törzsek közötti leszármazási kapcsolatok feltárásában, és a ritka, vagy gazdafajváltó törzsek eredetének azonosításában, hozzájárulva ezzel a rotavírusok genetikai változatosságának és evolúciós mechanizmusainak jobb megismeréséhez (Matthijssens, J. et al. 2008a; Antalné László, B. 2013).

V.7.A rotavírusok evolúciós stratégiái

A rotavírusok sokféleségüket különféle evolúciós mechanizmusaiknak köszönhetik (Estes, M.K. et al. 2007; Matthijssens, J. et al. 2010c). A vírusgenom replikációja során, az RNS-függő RNS polimeráz pontatlanságából adódóan pontmutációk halmozódnak fel, amelyek megváltozott antigenitású törzseket eredményezhetnek. A humorális immunválasz célpontjai a vírus partikulum külső rétegét adó VP4 és VP7 fehérjék antigénjei. Amennyiben a pontmutációk ezen gének antigéndetermináns génszakaszait érintik, olyan vírusváltozatok alakulhatnak ki, amelyek ellen a korábban kialakul ellenanyagválasz már hatástalan. Ezt a folyamatot **antigén sodródásnak** nevezzük (Desselberger, U. 1996).

A szegmentált genomú vírusokra egy sajátos evolúciós mechanizmus is jellemző. Ha ugyanazt a sejtet azonos időben két különböző vírus törzs fertőzi meg, akkor a vírusreplikáció során a szegmentált genomból adódóan megvan a lehetőség nyílik az egyes genomi szegmensek kicserélődésére. Ezt a folyamatot **reasszortációnak** nevezzük (Desselberger, U. 1996; Gentsch, J.R. et al. 2005). A génszegmens cserék olyan új antigénkombinációjú törzseket eredményezhetnek, amelyek képesek elkerülni a gazdaszervezet immunválaszát (5. ábra) (Bányai, K. 2011).



5. ábra. Reasszortáció sematikus ábrázolása. Két, eltérő genetikai állományú rotavírus törzsből elvileg $2^{11}-2$ (2046) eltérő allélkombináció jöhet létre. Az ábrán az a két egyszerű eset látható, ahol a szülői rotavírus törzsek genetikai anyagának keveredéséből a fő felszíni antigént (VP7) érintő monoreasszortáns törzsek (plusz maguk a szülői törzsek) jöttek létre (forrás: (Bányai, K. 2011) módosítva).

Amellett, hogy a rotavírus okozta megbetegedés gazdasági károkat okoz a fiatal állatok állományaikban, a haszonállatok rezervoárjai is a rotavírusnak. A **gazdafaj-váltást** példázzák a nyúlról, szarvasmarháról, sertésről, kutyáról és macskáról emberre történő átfertőzések éppúgy (Martella, V. et al. 2010), mint sertésről szarvasmarhára (Ha, T.P.M. et al. 2009), illetve szélsőséges példaként madárról emlősállatra történő átvitel (Kool, D.A. et al. 1992; Rohwedder, A. et al. 1997). Így, bár a legtöbb eddig vizsgált fajnak megvan a saját, jól körülhatárolható genotípus-állománnyal és -kombinációval rendelkező rotavírus populációja, a reasszortációra való hajlam és a fajidegen rotavírus törzsek akvirálásának lehetősége igen jelentős törzs diverzitást eredményez a különböző gazdafajokban (Martella, V. et al. 2006). A replikáció során az RNS szegmensben belül létrejövő duplikációk, deléciók és inverziók, valamint a különböző rotavírus törzsek közötti rekombináció ritkán dokumentált események, azonban szerepük vitathatatlan a sokféleség kialakításában (Estes, M.K. et al. 2007).

V.8.A rotavírusok diverzitása

A rotavírus világszerte ubiquiter előfordulású. Fertőzése gastroenteritist okoz számos állatfajban, mind az emlősök, mind a madarak körében. Közegészségügyi jelentősége is számottevő, mivel 5 éves koráig szinte minden gyermek átesik a fertőzésen, és évente több mint fél millió gyermek szorul kórházi kezelésre. Mérsékelt égövben a téli, kora tavaszi

járványcsúcsok idején az akut, kisgyermekkor, kórházi ápolást igénylő gastroenteritisek 70-80%-ának kóroki hátterében a rotavírusok állnak. Egy adott területen több különböző rotavírus törzs együttes előfordulása jellemző (Bányai, K. 2011).

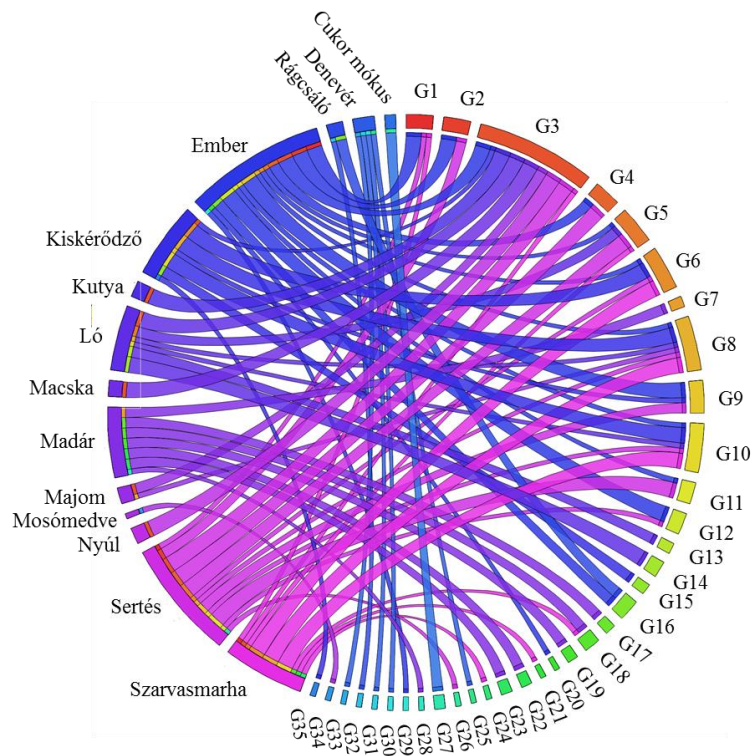
A molekuláris biológiai vizsgálatok és főként a genom szekvenálás fejlődésével számos rotavírus törzs genetikai meghatározása vált lehetővé az utóbbi évtizedekben. A jellemzett rotavírus genotípusok alapján nagy általánosságban elmondható, hogy a legtöbb gazdafajnak megvan a saját, jól behatárolt genotípus összetétellel rendelkező rotavírus populációja. A humán RVA törzsekre a G1-4, G9, G12 VP7 genotípusok jellemzőek, P[4], P[6], és P[8] VP4 genotípus kombinációkkal. A sertés RVA törzsekre a G3-5, G9, G11, míg szarvasmarha RVA törzsekre a G6, G8, és G10 genotípusok jellemzőek. Lovakban megjelenő rotavírusokra a G3, G14 genotípusok a jellemzőek, és szinte kizárólag P[12] VP4 genotípussal való kombinációban. Madarak körében a G7, G17, G22, G23 genotípusok jelennek meg, P[17], P[30], P[31], P[38] VP4 genotípusokkal kombinációban. A 6. ábra az egyes G és P típusok különböző gazdafajokban való előfordulását szemlélteti.

Egyes genotípusok, például a G3 genotípus, több gazdafaj csoportban, úgymint ember, szarvasmarha, kiskérődző, kutya, macska, ló is megjelenhetnek.

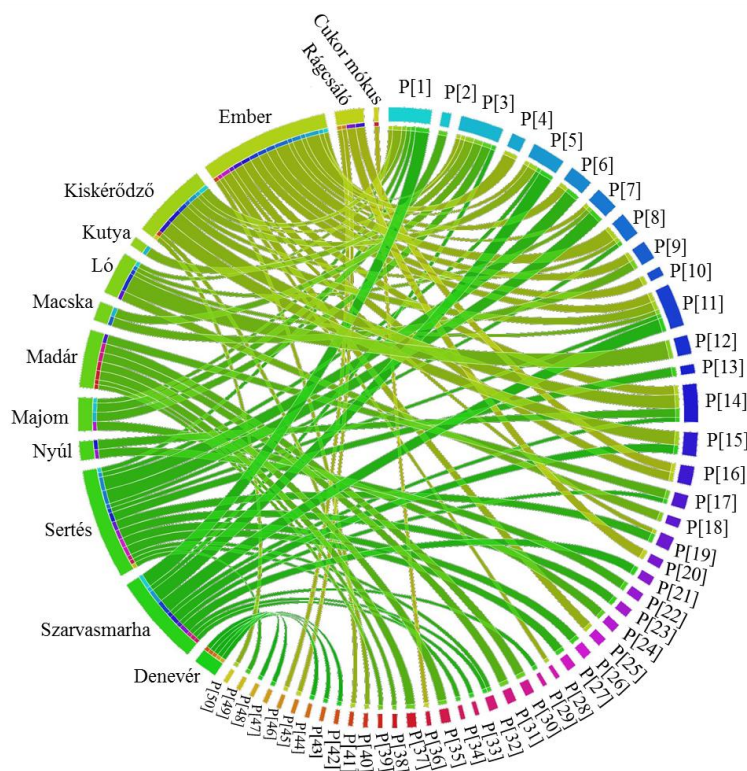
Bizonyos G típusok, melyek jellemzőek a szarvasmarha rotavírusokra, kiskérődzőkben is jelen lehetnek, ami feltételezi a két gazdafaj csoport közötti vírus átadás gyakoriságát. Számos, inkább emberben gyakori G típusú rotavírus kimutatásra került sertésekben, mely a humán és sertés rotavírusok közeli genetikai kapcsolatát feltételezi. A 6. ábra A részében ugyanazon G genotípus kapcsolata több különböző gazdafajjal jól nyomon követhető.

A G típusokhoz képest a VP4 genotípusok sokkal specifikusabbak, jellemzően egy-két gazdafaj RVA törzseiben fordulnak elő (6. ábra B rész). Kivétel a P[1] és P[3] genotípus mely számos gazdafaj rotavírusára jellemző, ugyanakkor a P[4] és P[8] genotípusokat ez idáig ritkán mutatták ki nem emberi rotavírusokból (Kobayashi, N. et al. 2007).

A



B



6. ábra. G és P genotípusok előfordulása különböző gazdafajokban. A: G genotípusok megoszlása gazdafajonként. B: P genotípusok megoszlása gazdafajonként. A színek a különböző genotípusokat jelölik, míg a vonalak vastagsága az előfordulás gyakoriságát hivatott szemléltetni. Az ábrákat a Circos online genom összehasonlító programmal (Krzywinski, M. et al. 2009) készítettem.

Habár a G és P típust meghatározó gén szegmensek egymástól függetlenül kombinálódhatnak (V.7. *Rotavírusok evolúciós stratégiái*), így elvileg nagyszámú antigén kombináció megjelenésére van mód a természetben, ennek ellenére azt tapasztaljuk, hogy a lehetséges kombinációknak csak kis hányada fordul elő. Heiman et al. (2008) megfigyelései szerint a VP7 és VP4 genotípusok között bizonyos kapcsolttság áll fenn, mely gyakrabban megjelenő kombinációkat eredményez (Heiman, E.M. et al. 2008). Így például, a humán RVA G1-4 genotípusok kombinációja P[8] genotípussal gyakori, amit Wa genocsoportnak szokás nevezni, míg a G2 genotípus kombinációja P[4] genotípussal szintén jellemző (DS-1 genocsoport) (Matthijssens, J. et al. 2008a; Matthijssens, J. et al. 2012c).

Néhány emlős csoport, továbbá a madarak főbb rotavírusait a következő két alfejezetben részletezem.

V.8.1.A csoportú emlős rotavírusok

Szarvasmarha rotavírusok A borjak rotavírus okozta hasmenéses megbetegedése általában 3 hónapos kor alatt jelentkezik. A járványokra az 5-20% közötti mortalitás jellemző, de esetenként elérheti a 80%-t is (Chauhan, R. et al. 1996). A fertőzés az egy hetesnél fiatalabb állatoknál másodlagos fertőzésekkel (*E. coli*, koronavírus) kiegészülve súlyos megbetegedést okozhat. Kifejlett egyedeknél korrall összefüggő védettség alakulhat ki, ugyanakkor egyes, erősen virulens törzsek képesek megbetegedést okozni felnőtt marhákban is. Az állategészségügyi, járványvédelmi és állathigiéniás rendszabályok megfelelő betartásával csökkenteni lehet a fertőzés gyakoriságát és terjedését az állattartó telepeken (Holland, R.E. 1990). Folyadékpótlás biztosításával és a másodlagos fertőzések elleni antibiotikumos kezeléssel csökkenthető a mortalitás a borjak között (Dhama, K. et al. 2009). Bár szarvasmarhákban a leggyakrabban előforduló rotavírusok a G6, G8 és G10 VP7 genotípus, a P[1], P[5], P[33] VP4 genotípussal kombinációban, emellett több mint 12 féle VP7 és 11 féle P genotípus is kimutatásra került (G1–G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21, G24; P[1], P[3], P[5–7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29], P[33]). Szarvasmarha-állományok gyakori rezervoárjai az egyéb gazdafajok vírustörzseinek, így olykor humán, madár, ritkán sertés eredetű RVA törzsek egyaránt izolálhatóak belőlük (Papp, H. et al. 2013a). Újszülött borjak hasmenéses megbetegedésének megelőzésére élő és inaktivált állatorvosi vakcinák is elérhetőek, ezek általában többféle szarvasmarha RVA törzset tartalmaznak, valamint hordozhatnak sejtmentes *E. coli* extraktumot, inaktivált koronavírusot és a *C. perfringens* többféle toxidját is (Saif, L.J. et al. 1996).

Sertés rotavírusok A szopósmalacok a legfogékonyabbak a rotavírus fertőzés okozta hasmenéses megbetegedésre. Leggyakrabban az A csoportú rotavírus okoz a fertőzést bennük, de B, C és E csoportú RV is előfordulnak köztük. Idősebb, tünetmentes RV-hordozó

egyedeknél is kialakulhat a megbetegedés másodlagos fertőzések (*E. coli*, *C. perferingens*, kalícivírus, koronavírus, asztrovírus) hatására. A körültekintő állathigiéniai gyakorlat, illetve a kocák vakcinázása hatékony védekezést jelenthet a betegség ellen. Sertésben az RVA VP7 genotípusok a G3, G4, G5, G9 és G11, melyek P[6] és P[7] VP4 genotípusokkal kombinációban kerültek legtöbbször kimutatásra. Kisebb prevalenciával összesen 12 féle G-típust (G1, G2, G6, G8, G10, G12, és G26) és 13 féle VP4-típust (P[5], P[8], P[11], P[13], P[14], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32], P[34]) sikerült ezen gazdafajból kimutatni (Papp, H. et al. 2013a).

Szopósmalacok immunizálására elérhető orális vakcinák közül kapható olyan típus, amely két-három sertés RVA törzset, *E. coli* pilus antigént, és *C. perferingens* C típus baktérium toxidot is tartalmaz (Saif, L.J. et al. 1996).

Ló rotavírusok A 3 hónapnál idősebb lovaknál a hasmenéses megbetegedések 50-90%-ért rotavírus fertőzés tehető felelőssé, szerte a világon (Imagawa, H. et al. 1991; Browning, G.F. et al. 1996; Frederick, J. et al. 2009). Az A csoportú rotavírus fertőzés hatására csökken a bél felszívó képessége, amely a folyamatos vízszerű hasmenés következtében súlyos dehidrációhoz vezet. A fiatal csikók különösen érzékenyek a rotavírus fertőzésre, a folyamatos hasmenés nyomán kialakuló kiszáradás pedig elhulláshoz is vezethet. A fertőzés tovaterjedésének elkerülése érdekében a fertőzött egyedek elkülönítése szükséges, mely sokszor jelentős terheket ró az állattartókra (Dhama, K. et al. 2009). Az epidemiológiai vizsgálatok két fő genotípust elterjedtségét mutatják a lovakban: G3P[12] és G14P[12] (Iša, P. et al. 1996; Elschner, M. et al. 2005; Collins, P.J. et al. 2008; Garaicoechea, L. et al. 2011). A G3 genotípus számos kérődző, kutya, macska rotavírusra is jellemző, ugyanakkor a ló-típusú G3 filogenetikailag jól elkülönül ezektől. A G3P[12] és G14P[12] genotípus kombinációkat eddig más gazdafajból nem is sikerült kimutatni. Izoláltak azonban néhány olyan ló RVA-t melyek nagymértékben eltérnek a szokásos genotípusoktól, így például az egyedi L338 törzs (G13P[18]), a sertés-jellegű H-1 (G5P[7]), egyéb szarvasmarha-jellegű törzsek (G8P[1]), valamint macska-jellegű G3P[3] törzsek (Flewett, T. et al. 1973; Browning, G. et al. 1991; Imagawa, H. et al. 1991; Iša, P. et al. 1996; Garaicoechea, L. et al. 2011). A lótenyésztő-telepeken kialakuló járványveszély csökkentésére a körültekintő állathigiéniai gyakorlat mellett a vakcinázás ad lehetőséget. Vemhes kancák oltása az RVA ellenanyagok megjelenését eredményezte a kolosztrumban, mely kimutathatóan csökkentette a rotavírus okozta hasmenéses megbetegedések számát és intenzitását a fiatal állatokban. Angolszász területeken a H-2 ló RVA törzs alapú inaktivált vakcinát, Argentínában H-2 és szarvasmarha eredetű, NCDV törzssel kombinált vakcinát, míg Japánban HO-5 ló RVA törzs alapú, inaktivált vakcinát részesítik előnyben (Dhama, K. et al. 2009).

Kiskérődző rotavírusok A kiskérődzők nem hivatalos rendszertani csoportjába önkényesen a juh, kecske, továbbá ó-, és új-világi tevéket soroltuk, melyek rotavírusai között leszármazási kapcsolat fedezhető fel. A juhállományokban akár a mortalitás 46%-áért is lehet felelős valamely hasmenéses megbetegedés, melynek hátterében jellemzően négy fertőző ágens: *E. coli*, rotavírus, *Cryptosporidium sp.* és *Salmonella sp.* állhat (Schoenian, S. 2007). A rotavírusok A és B csoportját egyaránt kimutatták már juhokból hasmenéses tünetekkel járó járványokkal összefüggésben, jellemzően az újszülött vagy fiatal egyedek körében (Theil, K. et al. 1996; Wani, S. et al. 2004). Ugyanakkor meglehetősen kevés adattal rendelkezünk a juh RVA törzsek genetikai diverzitásáról. A legtöbb genotípusított juh RVA törzs Indiából került meghatározásra, ezek több mint 81%-a G6 vagy G10 VP7 genotípusúnak bizonyult, nagyrészt P[11] VP4 genotípussal kombinációban (Gazal, S. et al. 2012). Ezzel ellentétben, Kínából a G10P[15] genotípus kombináció került kimutatásra, míg Európában a G3, G6, G8, G9, G10 VP7 genotípusok, és a P[1], P[8], P[11], P[14] VP4 genotípusok fordulnak elő (Papp, H. et al. 2014a).

Az újszülött kecskékből jelentkező hasmenéses járványok nagyban hasonlítanak a juhok járványaihoz. A leggyakrabban kimutatott kórokozók ezekben az esetekben is az *E. coli*, *Cryptosporidium sp.*, *Salmonella sp.* és a rotavírus A, B és C csoportok. Különböző rotavírus csoportok egymás mellett is kimutathatók voltak, hasmenéses és tünetmentes egyedekből egyaránt. Az egyes állományok RV pozitivitása elérheti a 60%-t is (Legrottaglie, R. et al. 1993; Munoz, M. et al. 1996). A kecske RVA törzsekről kevés genetikai adattal rendelkezünk; a törzsek többsége jellemzően G3, G6, G8 és G10 VP7 genotípusú, leginkább a P[1] VP4 genotípussal kombinációban, illetve egy-egy esetben P[3], P[14], P[15] VP4 genotípusok is előfordultak (Papp, H. et al. 2014a).

Az új-világi tevé csoportba négy fajt sorolunk: a házasított lámát és az alpakkát, valamint a vadon élő a guanakót és a vikunyat. Dél-amerikai kutatások lényeges jelentőséget tulajdonítottak hasmenéses megbetegedéseknek az újszülött lámák, alpakkák és guanakók körében, melyek hátterében leggyakrabban koronavírus, RVA, *E. coli*, *Cryptosporidium sp.*, *Giardia sp.* és kokciidium fertőzés áll. A savó minták neutralizációs teszttel végzett vizsgálatával számos esetben sikerült kimutatni rotavírus fertőzések nyomát a láma, guanakó és vikunya állományokban, a szerológiai pozitívitás értéke akár a 95%-ot is elérhette (Parreno, V. et al. 2004; Papp, H. et al. 2014a). Genotípus adatokkal azonban csak néhány esetben rendelkezünk, két guanakó RVA törzs teljes genomja került meghatározásra, ezek G8P[1] és G8P[14] genotípus kombinációt hordoztak. Továbbá egy G8P[14] vikunya RVA törzs genomja került részleges meghatározásra (Parreno, V. et al. 2004; Badaracco, A. et al. 2013).

Az ó-világi tevék között előforduló alacsony szaporodási ráta és a neonatális mortalitás hátterében gyakran hasmenéses megbetegedés áll, melynek jellemző kiváltó ágensei,

többek között, az *E. coli*, *Coccidium sp.*, *Salmonella sp.*, korona- és a rotavírusok (Tibary, A. et al. 2006). A mai napig kevés esetben sikerült kimutatni rotavírus fertőzést ó-világi tevékben, a legtöbb tanulmány Szudán területéről származik. Az 1990-es éveket követően végzett felmérő vizsgálatok 9-14%-os rotavírus pozitivitást mutattak hasmenéses tüneteket mutató tevé csikókban (Mohamed, M. et al. 1998; Ali, Y.H. et al. 2005; Ali, Y.H. 2011). Jelenleg két RVA törzsről rendelkezünk genetikai adatokkal, ezek egy dél-afrikai tevé rotavírus teljes genomja és egy szudáni tevé RVA részleges genom szekvenciája (Hatab, E.A. et al. 2009; Jere, K.C. et al. 2014).

A kiskérődzőkben fellelhető rotavírusok genetikai mintázata a szarvasmarha RVA törzsek genetikai összetételére hasonlít leginkább. A G8/10-P[11]/[15]-I2/I10-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2/E12-H3 (a genotípusok a következő sorrendben jelölik a géneket: VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5) genotípusok megjelenése a leginkább jellemző. Jelentős genetikai változatosság a felszíni antigéneket kódoló gének (VP7, VP4), a VP6, valamint az NSP4 gének esetében tapasztalható, a további gének konzerváltabbnak tekinthetők. Ugyanakkor ismeretes néhány, csak kiskérődzőkből kimutatott genotípus, például a P[15] VP4, E15 (NSP4), és az A18 (NSP1) genotípusok (Liu F, X.J., Liu CG, Wang KG, Zhou BJ, Wen M. 2012; Papp, H. et al. 2012; Jere, K.C. et al. 2014).

Kutya rotavírusok A gazdasági haszonállatokhoz hasonlóan társállatainkra is jellemző a rotavírus fertőzés okozta hasmenéses megbetegedés (Dhama, K. et al. 2009). Idősebb egyedeknél gyakori a tünetmentes vírushordozás. A fertőzés 3 hónaposnál fiatalabb kölyökkutyáknál többnyire hasmenéses bélgyulladást idéz elő, ami a fellépő étvágytalanság következtében súlybeli és fejlődésbeli elmaradáshoz vezethet (Martella, V. et al. 2001; Kang, B.K. et al. 2007). A kutyák RVA-k többsége jelentős hasonlóságot mutat egymáshoz mind genom hibridizációs, mind filogenetikai vizsgálatokban, jól elkülöníthető genocsoportot alkotnak, ami közös eredetre utal (Nakagomi, T. et al. 1989; Martella, V. et al. 2001). Az ilyen típusú kutya RVA-k a VP7 felszíni antigén alapján a G3 genotípusba tartoznak, P[5] vagy P[3] VP4 genotípus kombinációkkal. Ugyanakkor a kutya RVA-k egy része humán rotavírus törzsekkel mutat nagyfokú hasonlóságot. Időközönként kórházi kezelésre szoruló humán betegekből mutatnak ki kutya RVA-khoz hasonló G3P[3] humán RVA törzseket, melyek hátterében zoonótikus fertőzések állhatnak (Khamrin, P. et al. 2006; De Grazia, S. 2007).

Humán rotavírus A humán rotavírus fertőzések komoly közegészségügyi jelentősége miatt korán megkezdődött a kórházi kezelésre szoruló betegek mintáiból izolált törzsek azonosítása és molekuláris epidemiológiai nyomon követése. Az 1980-as években a súlyos esetek jelentős részéért a G1, G2, G3 és G4 genotípusú törzseket tették felelőssé, melyek közül a G1 volt a leggyakrabban előforduló VP7 genotípus. Ezek a törzsek főként P[4] és

P[8] VP4 genotípusokat hordoztak (Gentsch, J.R. et al. 1996; Parashar, U.D. et al. 1998). Az 1990-es években jelent meg, és világszerte gyors terjedésnek indult a G9 VP7 genotípus, főként P[8] és P[6] VP4 genotípussal kombinációban (Adams, W.R. et al. 1963; Rahman, M. et al. 2005; Matthijssens, J. et al. 2010a). Az ezredforduló óta a G12 genotípus, szintén P[8] és P[6] VP4 genotípussal kombinációban történő gyors terjedését észlelték (Santos, N. et al. 2005; Rahman, M. et al. 2007). Különböző területeken végzett epidemiológiai vizsgálatok, melyek a cirkuláló és járványt okozó törzseknek nyomon követését célozták, rávilágítottak, hogy a jellemző törzsek földrajzi területenként és időben egyaránt változnak. Ugyanakkor kontinentális szinten egyes antigén kombinációk előfordulása fajlagosan jellemző. Például Magyarországon a G6P[9], G3P[9] és a G4P[6] genotípus kombinációk időközönként ismételt felbukkannak és megbetegedéseket okoznak (Antalné László, B. 2013).

V.8.2.A csoportú madár rotavírusok

Az emlősökhöz hasonlóan a madarakban is a rotavírusokat tartják az egyik legjelentősebb hasmenéses és bélgyulladásos megbetegedés okozó ágensnek (McNulty, M. 2003). A különböző baromfiállományokban a rotavírus fertőzés hatására a beteg egyedekben hasmenés, dehidráció, anorexia, testsúlycsökkenés és tápanyag felszívási zavarok alakulhatnak ki (Dhama, K. et al. 2009). Madár rotavírusok ugyanakkor szerepet játszhatnak házityúk állományokban a „malabszorpció tünetegyüttes” (malabsorption syndrome, MS) (Yason, C.V. et al. 1986), pulykában pedig a kispulykák bélgyulladással járó kórképcsoportjának (poult enteritis complex, PEC) kialakulásában (Jindal, N. et al. 2010), mely különböző klinikai formákban jelentkezhet, mint a „satnyaság és törpenövés tünetegyüttes” (runting and stunting syndrome), illetve a kispulykák bélgyulladással és jelentős elhullással járó tünetegyüttese (poult enteritis and mortality syndrome, PEMS) (Yu, M. et al. 2000; Otto, P. et al. 2006). A megbetegedésből fakadó anyagi veszteségek jelentős gazdasági terhet rónak a baromfiágazatra. Rotavírusok kimutathatók tyúk és pulyka állományokból, de számos egyéb madárfajban (galamb, fácán, különböző vadmadarak) is megtalálhatók. A rotavírus fertőzést követően gyakoriak az enterovírusok, reovírusok, paramyxovírusok, *Salmonella sp.*, *E. coli sp.*, és *Cryptosporidium* okozta másodlagos fertőzések (Reynolds, D. et al. 1987). Az emlős gazdafajoknál tapasztaltakkal ellentétben, a madarakban nem csak a fiatal, hanem a felnőtt egyedekben is kialakulhat súlyos megbetegedés, továbbá a pulykák a házityúkokkal összevetve fokozottan érzékenyek a heveny lefolyású fertőzésre (Yason, C.V. et al. 1985). Madaraktól leggyakrabban A csoportú rotavírusokat mutatnak ki (McNulty, M. et al. 1979a; McNulty, M. et al. 1979b; McNulty, M. et al. 1979c; Yason, C.V. et al. 1985). A gyakori fertőzés ellenére azonban kevés nt szekvencia adat került publikálásra. Hosszú ideig csupán két teljes madár RVA genom volt elérhető a

GeneBank-ban: egy Japánból származó galamb eredetű rotavírus (RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17]) és egy németországi tyúk eredetű rotavírus (RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30]) (Ito, H. et al. 2001; Trojnar, E. et al. 2009). Bár a részleges génszekvenciák száma meghaladja a kétszázat, ezek több mint fele rutin diagnosztikai vizsgálatból származik, és csupán néhány génről ad felvilágosítást, melyek főként az antigenitásban (VP4, VP7, VP6) vagy patomechanizmusban (NSP4) játszanak szerepet. 2013-ban két további madár RVA törzs teljes genom szekvenciája került nyilvánosságra: egy fácán rotavírus (RVA/Pheasant-tc/DEU/10V0112H5/2010/G23P[37]) és egy pulyka rotavírus (RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35]) (Trojnar, E. et al. 2013). A GenBank-ban a fentiek mellett megtalálható egy sarkvidéki réce és egy közönséges sirály RVA teljes genomja is (GenBank-i szám: LC088096-LC088106; LC088218-LC088228). A legújabb teljes madár RVA genomokat 2016-ban publikálta Fujii és kutatócsoportja, melyek két 1979-ben izolált pulyka RVA-ból származnak (Fujii, Y. et al. 2016), továbbá egy a kutatócsoportunk részvételével meghatározott fácán RVA törzs teljes genomja is benyújtásra került (Gál, J. et al. 2016). A kevés nt szekvencia adat ellenére az eddig ismert madár rotavírusok jelentős genetikai változatosságot mutatnak. A jelenleg ismeretes összes RVA G és P-genotípusból (35 féle G, 50 féle P) 7 G-típust és 7 P-típust mutattak ki madaraktól (Matthijnssens, J. et al. 2011a; Trojnar, E. et al. 2013; Fujii, Y. et al. 2016).

VI. Anyagok és módszerek

VI.1.A vizsgált minták

Az emlős rotavírusokat tartalmazó minták részben hazai, részben nemzetközi közreműködések során kerültek be vizsgálatainkba.

A két ló RVA törzs egy írországi retrospektív mintagyűjtésből származott a 2000-es évekből, és nemzetközi együttműködés keretein belül került kutatócsoportunkhoz (Collins, P.J. et al. 2008).

A kutya rotavírus tartalmazó minta egy 2012-ben végzett magyarországi gyűjtésből származik, mely menhelyi kutyák enterális vírus fertőzöttségét vizsgálta. A mintagyűjtést dr. Mihalov-Kovács Eszter végezte (Papp, H. et al. 2014b; Mihalov-Kovács, E. et al. 2015).

A teve rotavírust tartalmazó minta egy Kuvaitban, 2008-2010 között végzett felmérő vizsgálatból származik (Al-Mutairi, D. 2011; Papp, H. et al. 2012).

A madár rotavírusok a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) munkatársai által, a rendelkezésünkre bocsájtott elhullott állati bélszövetmintából, béltartalomból vagy bursa Fabricii szervmintából lettek meghatározva. A fácán minták 2008-2014 között kerültek begyűjtésre, 1-4 hetes fácán csibéktől, *post mortem*, amelyek bélgyulladás és ún. satnyaság és törpenövés szindrómában szenvedtek. A pulyka eredetű minták esetében csak a magyarországi eredet információval rendelkezünk. További egy törzset a CEVA Phylaxia Zrt. munkatársaitól kaptunk szövetfelülűszó formájában.

A bélszövet mintákból PBS-es (phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) mosással, a bélsár mintákhoz közvetlenül adott PBS-el készítettem szuszpenziót (~10-20 v/v %). A mintákat feldolgozásig -80°C-on hűtve tároltuk. A minták részletes származási adatait az 3. Táblázat tartalmazza.

3. Táblázat. A vizsgálatok során felhasznált emlős és madár rotavírus törzsek minta eredete.

Iktató szám	Állatfaj	Származási ország	Gyűjtés éve	Minta	Állatok kora	Tünetek	Diag-nosztika	Genom	
								szekvenálás típusa	GenBank szám
s21	Teve	Kuvait	2010	bélsár	4h	hasm.	RT-PCR	Sanger	JX968468- JX968472
153	Kutya	Magyaró.	2012	bélsár	3h	tünetm.	RT-PCR	Ion Torrent	KJ875791- KJ875801
04V2024	Ló	Írország	2004	bélsár	-	hasm.	RT-PCR	Sanger	JN903508-
03V04954	Ló	Írország	2003	bélsár	-	hasm.	RT-PCR	Sanger	JN903527
BRS/115	Tyúk	-	-	izolátum	-	-	RT-PCR	Ion Torrent	KJ725017- KJ725027
14246	Fácán	Magyaró.	2008	bélsár	-	bélg.	RT-PCR	Sanger	
18769	Fácán	Magyaró.	2011	bélsár	-	RSS	RT-PCR	Sanger	
17655	Fácán	Magyaró.	2008	bélsár	-	bélg.	RT-PCR	Sanger	
19109	Fácán	Magyaró.	-	bélsár	-	bélg.	RT-PCR	Sanger	
14958	Fácán	Magyaró.	2005	bélsár	-	bélg.	RT-PCR	Sanger	
39	Pulyka	Magyaró.	-	bélsár	-	-	RT-PCR	Ion Torrent	
40	Pulyka	Magyaró.	-	bélsár	-	-	RT-PCR	Ion Torrent	

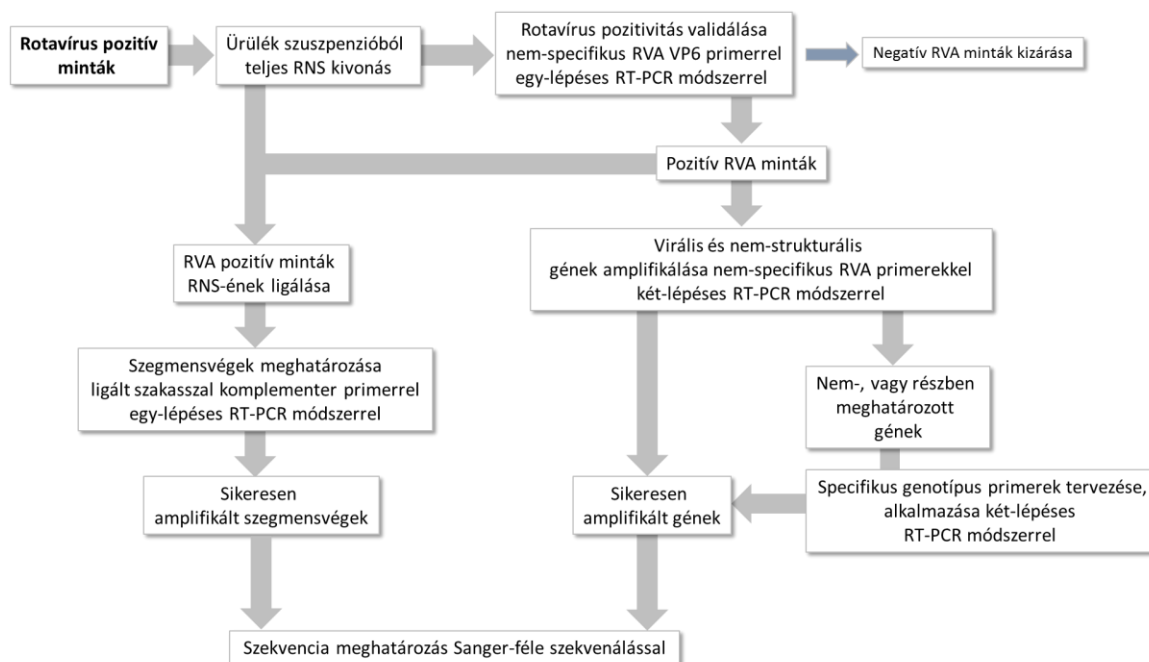
Rövidítések: hasm.: hasmenéses; bélg.: bélgulladás; RSS: „satnyaság és törpenövés tünetegyüttes” (runting and stunting syndrome).

VI.2.A rotavírus pozitív minták feldolgozásának folyamata

Munkám kezdetén a klasszikus molekuláris módszerek álltak rendelkezésemre az emlős és madár eredetű mintákban megtalálható A csoportú rotavírus teljes genomok meghatározására.

A kapott minták RVA pozitivitását minden esetben saját vizsgálattal is igazoltam, egy lépéses RT-PCR módszerrel az irodalomból ismert nem-specifikus primerekkel.

Egyes minták esetében a teljes genom meghatározását is klasszikus molekuláris módszerrel végeztem, mely során a virális dsRNS-ről random primer segítségével cDNS átíratot képzünk, majd ezen cDNS darabokra tervezett általános, majd specifikus primerekkel további amplifikációt hajtunk végre („primer walking”). A specifikus primerek listáját az 1. Függelék táblázat tartalmazza. Az így kapott DNS fragmentek nukleinsav sorrendjét a klasszikus, Sanger-féle szekvenálási módszerrel határoztuk meg (Sanger, F. et al. 1977). A genom szegmensvégek meghatározását RNS ligálásos módszerrel végeztük (lásd VII.4. fejezet). A teljes genom meghatározás folyamatának lépéseit az 7. ábra foglalja össze.



7. ábra. A rotavírus pozitív minták feldolgozásának folyamatábrája.

Később kutatócsoportunk eszköztára kiegészült egy új generációs szekvenáló készülékkel. Így más minták esetében a teljes genom meghatározását a következő módszerrel végeztük el: a random PCR-t követően az Ion Torrent szemikonduktor szekvenáló készülék felhasználásával (Ion Personal Genome Machine®, Life Technologies), Djikeng és mtsai (Djikeng, A. et al. 2008) által kidolgozott, majd laborunk által módosított módszert alkalmaztuk (lásd a VII.7.2 Ion Torrent szekvenálás fejezet alatt). A 3. Táblázat foglalja össze mely minta melyik módszerrel készült.

VI.3.A virális nukleinsav tisztítása

A bélsár szuszpenziókból történő össz-RNS kivonásra több módszert is alkalmaztam, melyek között azonban nem tapasztaltam a későbbi RNS felhasználhatóságára vonatkozóan jelentős különbséget.

A össz-RNS mennyiség kivonása egyes esetekben a fenol-kloroform-os kicsapás módszerével történt (Chomczynski, P. et al. 1987). Ennek során a bélsár szuszpenziót (~10-20 v/v %) 5 percig 6000 g gyorsulással centrifugáltam, a felülúszó 100 µl-éhez háromszoros térfogatnyi TRIzol reagenst adtam hozzá (Invitrogen, Life Technologies). Az elegyhez a 20 perces szobahőmérsékletű inkubációt követően egy térfogategységnyi kloroformot adtam. Az újabb 5 perc inkubálást 20 000 g-n történő 15 perc centrifugálás követett 4°C-on. A fázis szétválást követően, az RNS tartalmú felső vizes fázist használtam fel a továbbiakban. Ehhez azonos térfogatú (~500 µl) izopropanolt adtam, majd keverést követően 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Szükség esetén az elegy egy éjszakán át -20°C-on

tárolható volt. Ezt 15 perces centrifugálás követte 20 000 g gyorsuláson, 4°C-on. Az izopropanol hatására kicsapódott RNS-t 1 ml etanollal mostam (75 v/v %), amelyet újabb 15 perces centrifugálás követett 20 000 g gyorsuláson, 4°C-on. Az így keletkezett RNS üledék szobahőmérsékleten beszárításra került, majd 25 µl DEPC (diethyl-pirokarbonát) kezelt, nukleáz-mentes vízbe került visszaoldásra. A mintákat felhasználásig -80°C-on fagyasztva tároltuk.

Az RNS kivonását más esetekben a vírustartalmú bélsár PBS szuszpenzió 6000 g, 5 perces centrifugálása során keletkező felülúszójából közvetlenül a QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) segítségével végeztem, a gyártó utasításai szerint. Ebben az esetben a virális RNS-t tartalmazó bélsár felülúszó 140 µl-je került tisztításra. Az elegyben található RNS szilika membránra történő adszorpciója után két etanolos mosási lépés következik, végül az adszorbeált RNS-t 50 µl nukleáz-mentes vízzel oldottam vissza. Az így nyert RNS mintákat -80°C-on fagyasztva tároltuk a további felhasználásig.

VI.4.A virális nukleinsav ligálása

A virális dsRNS szegmensek végszekvenciáinak meghatározásához alkalmazott módszer első lépése (további lépéseket lásd. VII.5.4. Genom szegmensvégek meghatározása fejezet). Az RNS ligálás során Lambden et al. (1992) módszere alapján egy 5' végén foszforilált, 3' végén amino- csoporttal lezárt primert kötöttem minden szabad 3' RNS véghez (primer szekvenciája: PC3: 5'- CCCGTCGACGAATTCTTT-NH₂ -3') (Lambden, P.R. et al. 1992). A reakció során 5 µl össz-RNS-hez 1 µl PC3 primert (10 µM), 7,5 µl nukleáz-mentes vizet, 12,5 µl 34 w/v %-os PEG 8000-et, 3 µl 10x RNS ligáz puffert, valamint 20 unit (U) T4 RNS ligázt (New England Biolabs) adtam. Az elegy inkubációja 17°C-on egész éjszakát tartott (~17h). Ezt követően a ligált RNS-t a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk a gyártó utasítása szerint (Potgieter, A.C. et al. 2002; Potgieter, A.C. et al. 2009).

VI.5.Multiplex polimeráz láncreakció

VI.5.1.Primer tervezés

A „*primer walking*” módszer alkalmazásához vizsgálataink során számos RVA specifikus primert terveztem, melyek adatait a 1. Függelék táblázat foglalja össze.

Általános emlős és madár RVA primerek A különböző gazdafaj eredetű RVA törzsekre specifikus, de genotípus független primerek tervezése során felhasználtam számos a GenBank-ban megtalálható azonos gazdafajú RVA törzs nukleinsav szekvenciát referenciaként (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Gazdafajonként vagy gazdafaj csoportonként (pl. madarak szekvenciái együtt) és génenként homológ nukleinsav illesztéseket végeztem a

MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) szekvencia illesztő programmal (Corpet, F. 1988). Az így létrehozott szekvencia illesztések alapján a megőrzött (konzerválódott) régiókra terveztem a 15-25bp hosszú primereket. A tervezett primerek fizikokémiai elemzésére az Integrated DNA Technologies honlapján található OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) programot használtam fel. A primerek tulajdonságainál törekedtem az 50%-os G/C tartalom, valamint az 50-65°C közötti olvadási hőmérséklet elérésére, valamint kerültem a hajtú-szerű másodlagos szerkezetek kialakulását.

Specifikus emlős és madár RVA primerek A későbbiekben ugyanezen elveket követve terveztem a genotípusokra specifikus primereket, ahol a felhasznált nt szekvencia illesztések már csak adott genotípusú rotavírus géneket tartalmazták.

A primereket az Integrated DNA Technologies céggel szintetizáltattuk. A cég által küldött liofilizált primereket nukleáz-mentes vízben oldottam vissza úgy, hogy 100 µM koncentrációjú törzsoldatokat kapjunk, majd ezekből a törzsoldatokból a későbbiekben 20 µM koncentrációjú hígítást alkalmaztam.

VI.5.2.Egy-lépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RVA pozitív emlős és madár minták validálása során az egylépéses RT-PCR-t alkalmaztam. Az emlős minták kimutatása Iturriza Gómara M. és mtsai által kidolgozott VP6 gén-specifikus primerekkel: VP6-F (sense) (5' GACGGVGCRACTACATGGT 3') (747 - 766 nt) és VP6-R (antisense) (5' GTCCAATTCATNCCTGGTGG 3') (1126 - 1106 nt) történt (Iturriza Gómara, M. et al. 2002).

A madár minták validálásához az Ursu et al. által publikált VP6 génre specifikus Rot VP6 F (5'-GAA CACTCG GAA CGA CCT TA-3') és Rot VP6 R (5'-CCA CGT ATT CAA GCC ATC AG-3') primereket használtam (Ursu, K. et al. 2009).

A reakcióelegy 3 µl össz-RNS-t, 2 µl nukleáz-mentes vizet és 1- 1 µl (20 µM) Rot VP6 F és R primert tartalmazott. A reakcióelegyet 97°C-on 5 percig denaturáltam. Ezt követően adtam hozzá az RT-PCR elegyet, amely 2 µl nukleáz-mentes vizet, 2,5 µl 5x OneStep RT-PCR puffert, 0,5 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl OneStep RT-PCR enzimet (QIAGEN) tartalmazott. A reakció végtérfogata 12,5 µl volt. A reakció hőmérsékleti profilját a 2. Függelék táblázat A. része tartalmazza.

Egyes esetekben az egy-lépéses RT-PCR módszert alkalmaztam az RVA törzsek génjeinek amplifikálására is. Ebben az esetben a diagnosztikai primer párt gén-specifikus primer párral helyettesítettem. Erre bizonyos minták esetében az alacsony virális RNS tartalom adott okot, ugyanis tapasztalataim szerint az egy-lépéses RT-PCR során alkalmazott enzim komplex (reverz transzkriptáz és polimeráz elegy) alacsony RNS

koncentráció mellett is sikeres amplifikációt eredményezett. Egy-lépéses RT-PCR módszert használtam a fácán RVA törzsek közül az RVA/Phe/17655 és az RVA/Phe/19109 esetében. Az egy-, és két-lépéses RT-PCR módszer hatékonyságára abszolút összehasonlító vizsgálatot nem végeztem.

VI.5.3.Két-lépéses reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A legtöbb minta esetében a kivont össz-RNS-ről random-hexamer oligonukleotidok segítségével cDNS átíratot készítettem a következő protokoll szerint. Első lépésként 5 µl össz-RNS-t és 1 µl (50 µM) random hexamer (Invitrogen) oligonukleotidok elegyét 97°C-on 5 percig denaturáltam, utána minták jégre kerültek. A reverz transzkripció reakció keverék tartalma a következő volt: 11,5 µl nukleáz-mentes víz, 5 µl M-MLV RT 5x puffer, 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl MMLV Reverse transcriptase (200 U/µl), és 0,5 µl nukleáz inhibitor (40 U/µl) (Thermo Fisher Scientific). Az RT reakcióelegyet és a denaturált RNS-t vegyítve 5 percig 25°C, majd 30 percig 42°C, végül 10 percig 70°C-on inkubáltam.

Az így létrehozott cDNS-t használtam fel a továbbiakban a specifikus PCR-k során. A specifikus PCR-ekhez a 1. Függelék táblázatban felsorolt rotavírus primerekből választottam forward és revers primer párosításokat a hiányzó génszakaszok felszaporítására, figyelembe véve az alkalmazott polimeráz lánchosszabbítási sebességét és processzivitását. A saját tervezésű primerek mellett számos, irodalomból ismert primert is alkalmaztam (Gentsch, J.R. et al. 1992; DiStefano, D.J. et al. 2005; Matthijnssens, J. et al. 2006b). A PCR elegy a következő komponenseket tartalmazta: 3 µl cDNS, 0,5 µl Dream Taq polimeráz (5 U/µl; Thermo Scientific), 5 µl 5x Taq puffer (MgCl₂ tartalmú), 1 µl dNTP (10 mM), 1-1 µl forward és reverse primer (20-20 µM), majd az elegyet kiegészítettem nukleáz-mentes vízzel 50 µl végtérfogatra. A reakció hő profilja a 2. Függelék táblázat B. részében található.

VI.5.4.Genom szegmensvégek meghatározása

A szegmentált genom végein található nukleinsav szekvenciák meghatározásához első lépésben a mintából kivont össz-RNS minden szabad 3' végéhez PC3 primer ligáltam (lásd. V.4. *A virális nukleinsav ligálása*). Az így kapott ligált RNS-t használtam fel a VII.5.3. fejezetben kifejtett két-lépéses RT-PCR során, ahol is az első reverz transzkripció során alkalmazott random hexamer oligonukleotid helyett a ligált PC3 szakasszal komplementer PC2 primert alkalmaztam (PC2 primer szekvenciája: 5' – AAAGAATTCGTCGACGGG – 3'). A második lépésként végrehajtott PCR során a PC2 primert szekvencia-specifikus emlős vagy madár rotavírus primerekkel párosításban erősítettem fel a cDNS-t (Potgieter, A.C. et al. 2002; Potgieter, A.C. et al. 2009).

VI.6.PCR termékek tisztítása

A PCR termékek kimutatására agaróz gélelektroforézis használtam. Az 1 w/v %-os agaróz gélben (Lonza), a DNS láthatóvá tételéhez GelRed (Biotium) interkaláló festéket alkalmaztam a gyártó által javasolt koncentrációban. Molekula súly kontrollként GeneRuler™ (Fermentas) markert használtam. Az elektroforézis 90 V-on 25 percig tartott, 0,5 v/w %-os pH=8,3 TBE pufferben (tris-borát-etilén-diamin-tetraacetát, 89 mM Trisz-HCl, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA pH=7,6). A géleket transzparens UV fényben CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Cleaver Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) fotodokumentáltam.

A PCR termékek méret szerinti elválasztását követően a várt méretnek megfelelő PCR terméket a hordozó géllal együtt kimetszettem, majd Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (GeneAid) segítségével tisztítottam ki a gélből, és 50 µl végtérfogatban leoldottam az elválasztó membrán felületéről, a gyártó utasítása szerint. A tisztított DNS-fragmenseket -20°C-on tároltam a további felhasználásig.

VI.7.DNS szekvenálás

VI.7.1.Sanger szekvenálás

A tisztított PCR termékek szekvenálásához szükséges reakciót BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Life Technologies) végeztem el. A reakcióelegy 2 µl nukleáz-mentes vizet, 2 µl BigDye reakcióelegyet, 1 µl (20 µM) primert és 5 µl tisztított PCR terméket tartalmazott. A reakció során a PCR-rel megegyező primereket alkalmaztam. A szekvenálási reakció hőprofilja a 2. Függelék táblázat C. részében megtalálható.

A szekvenálási reakció után a termék nukleáz-mentes víz, etanol és nátrium-acetát elegyének segítségével került kicsapásra (31 µl 96 v/v% etanol, 1,5 µl 3 M, pH 4,6 Na-acetát, 7,5 µl nukleáz mentes víz). Ezt centrifugálás követte, 16000 g, 30 perc, 4 °C-on. Ezt követően 70 v/v% etanollal mostuk, majd újabb centrifugálást követően (16000 g, 30 perc, 4°C) az üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk. A szekvenálási reakció termékének elektroforézisét automata DNS szekvenátoron (ABI Prism® 3100) végezte el dr. Lengyel György, a Magyar Honvédség Egészségügyi Központjában.

VI.7.2.IonTorrent szekvenálás

Ennél a megközelítésnél a vírusgenom amplifikációját az un. SISPA (sequence independent single primer amplification) módszerrel végeztük, mely egy szekvencia független, random hexamer alapú PCR módszer, amelynek egyik változatát Djinkeng és mtsai dolgozták ki (Djikeng, A. et al. 2008), melyet kutatócsoportunk is bevezetett a rotavírusok kimutatására. Az említett cikkből származó primereket alkalmaztuk, de a vírus

genom amplifikációt és szekvenálást módosított eljárással végeztük el. A szekvenálást kutatócsoportunkból dr. Marton Szilvia és dr. Bányai Krisztián végezte.

Ennek első lépése a random primerekkel elvégzett RT-PCR alapú vírusgenom amplifikáció. Összefoglalva a reakció lépései és profilja: 6 µl RNS-t és 1 µl FR26RV-N (5' – GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN – 3') primer denaturációjá 95°C-n 5 percig (a primer 3' végén lévő N-ek random nukleotidok). A reverz transzkripció keverék összetétele: 1 µl AMV (Avian myeloblastosis virus) reverz transzkriptáz (10 U/µl, Promega), 5 µl 5x AMV puffer, 1 µl dNTP (10 mM) és 11 µl nukleáz-mentes víz. A cDNS szintetizáló program: kezdeti denaturálás 95°C 5 perc, 25°C 10 perc, 42°C 1 óra, 72°C 10 perc. Az így átírássra került cDNS 3 µl-je került az RT-PCR elegybe 2 µl FR20RV-T (5' – GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC – 3') primer (20 µM), 10 µl 5x puffer, 0,25 µl DreamTaq polimeráz (5 U/µl), 1 µl dNTP (10-10 mM) és 33,75 µl nukleáz-mentes víz mellett. A PCR hőprofilja kezdeti denaturációt (95°C, 3 perc) követő 40 amplifikációs ciklussal (95°C 30 másodperc; 55°C 30 másodperc; 72°C 2 perc).

A random RT-PCR termékek elválasztására 1 w/v %-os agaróz gélt alkalmaztunk. A gélből a 200-2000 bp hosszúságú terméket tartalmazó sáv került kivágásra, majd a PCR termékek tisztítása Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit-tel történt. A szekvenáláshoz szükséges DNS-fragmens könyvtárak a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set-tel (New England Biolabs) készültek, IonTorrent Xpress vonalkód DNS-adapterek (Life Technologies) felhasználásával. A vonalkódot tartalmazó könyvtár DNS tisztítása Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit-tel történt, majd a visszaoldott DNS-t 2 w/v %-os agaróz gélen futtatták meg. A termékek 180-200 bp közötti szakasza ezután a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set PCR-rel került felszorzósításra. A könyvtár DNS amplifikációja GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) készüléken történt, kezdeti denaturációt (95°C, 30 másodperc) követő 12 amplifikációs ciklussal (98°C 10 másodperc; 58°C 30 másodperc; 72°C 2 perc), majd lezárásként 72°C 5 perc inkubációval. Az így keletkezett termékek Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit-tel lettek tisztítva. A visszaoldott DNS koncentrációja ellenőrzésre került Qubit® 2.0 készülékkel (Invitrogen). A vonalkódolt DNS termékek klonális amplifikációja egymást követő emulziós PCR-ekkel történt, paramágneses gyöngyök felszínén. Az emulziós PCR OneTouch v1 készüléken, Ion OneTouch™ Template Kit-el (Life Technologies) készült. A templátokat tartalmazó gyöngy az Ion OneTouch™ ES pipettázó robotjának segítségével került szétosztásra, majd az így előkészített minták szekvenálását az Ion Torrent szemikonduktor készülékkel végezték (Ion Personal Genome Machine®), 316-os illetve 318-as típusú chipen.

VI.8.Komputeres szekvencia elemzés

A Sanger-féle szekvenálás eredményeként visszkapott elektroforetogramokat BioEdit programmal olvastam be és ellenőriztem (Hall, T.A. 1999). A kapott szekvenciák génekké való összeállítását, és homológ referenciákkal való egymáshoz illesztését GeneDoc programmal, valamint MULTALIN online szekvencia illesztő felhasználásával végeztem (Corpet, F. 1988; Nicholas, K.B. et al. 1997).

Az Ion Torrent szekvenáló készülék adta eredményeket a CLC Bio programmal (<http://www.clcbio.com/>) dolgozták fel. A kapott szekvencia darabokat („read”) vágás után egy GenBank-ból származó referencia törzs szekvenciájához illesztették, az illesztés kritériuma szerint a nt szekvencia átfedésnek a referencia törzzsel 20 nukleotidnál nagyobbnak, a hasonlóságnak pedig 80%-nál nagyobbak kellett lennie. A feldolgozás eredménye minden gén szegmens esetében egy összefüggő nt szekvencia lett. Az adatfeldolgozást Dr. Bányai Krisztián készítette.

A törzsek gényeinek genotipizálása a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport ajánlása alapján a RotaC v2.0 programmal készült (<http://rotac.regatools.be/>) (Maes, P. et al. 2009). A filogenetikai elemzésekhez a referencia törzsekkel való illesztést GeneDoc programmal készítettem, majd az elemzést MEGA5 programmal végeztem (Tamura, K. et al. 2011). A szekvenciák kézzel történő illesztése során törekedtem a leginkább hasonló -homológ-pozíciók összerendezésére a szekvenciákba szűrt rések (gap) segítségével. Az illesztés során figyelembe vettem a nukleinsav szekvenciák leolvasási keretét, vagyis a kódoló cDNS szakaszokat a róluk átíródo fehérjék aminosav sorrendje alapján illesztettem.

A filogenetikai fa rekonstrukcióhoz alkalmazott szubsztitúciós modell kiválasztását a MEGA5 programcsomag *Find best DNA models* elemzőjével választottam ki, mely Bayesian információs kritérium módszerén alapszik (Tamura, K. et al. 2011). Ennek során az elemző program kiszámolja az összes felhasználható szubsztitúciós modellel a szekvencia likelihoodját (valószínűsége), melyek közül azt a modellt választjuk, amelynél, ha több paraméteres modellt használunk, az már szignifikánsan nem növeli a likelihood értékét. Sokparaméteres nukleotid szubsztitúciós modelleket alkalmaztunk, mivel a nukleotidok aránya a szekvenciákon belül és a törzsek között nem egyforma, ugyanis kicserélődésük nem azonos valószínűséggel történik. Minden törzsfa esetében megkerestem a legoptimálisabb szubsztitúciós modellt, ezért az alkalmazott modellek eltérnek az egyes fák esetében (Ari, E. 2012; Yang, Z. et al. 2012). Az alkalmazott modellek a HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter voltak. A nukleotidcserék sebessége nem azonos minden szekvencia pozícióban, ezért ezek eloszlását gamma-eloszlással közelíthetjük. A fa rekonstrukciós modell jelölésnél ezt jelenti a

+G. Amennyiben a változatlan (invariáns) nukleotid pozíciók arányának becslése is megtörtént az +I jelöléssel tüntettem fel.

A törzsfa készítés során a Maximum Likelihood (ML) módszert alkalmaztuk, mely egy karakter alapú törzsfakészítő módszer. Az eljárás számos különböző topológiájú fát elkészítve és összehasonlítva keresi az alkalmazott kritériumok szerinti optimálisat. A modell paraméterei a fa topológiája, ághosszai és a szubsztitúciós modell paraméterei. A likelihood a szekvenciák megjelenésének valószínűsége feltéve, hogy az adott szubsztitúciós modellt alkalmazzuk, adott paraméterekkel (nukleotid helyettesítési ráták, nukleotid típusok gyakorisága stb.). A módszer során a program véletlenszerű kezdeti paraméter-értékekkel számol likelihood értéket, ezt követően kismértékben változtat a paramétereken és újra számolja a likelihood értéket. Ha már nincs szignifikáns növekedés a likelihood értékben, akkor megkaptuk a szekvenciák alapján Maximális Likelihood értékű fát (Ari, E. 2012; Yang, Z. et al. 2012).

A karakter alapú filogenetikai módszereket előszeretettel alkalmazzák a RNS vírusok vizsgálatára (Jenkins, G.M. et al. 2002), mivel az megbízhatóbbnak bizonyult a távolság alapú filogenetikai módszereknél (pl. neighbour-joining módszer), mert azokban a szekvencia adatok távolságokká alakítása információ veszteséggel járhat. A karakter alapú filogenetikai módszerek közül a Maximum Likelihood módszer alkalmaztuk, mivel feltételeztük a nukleotid szubsztitúciók sebességének változatosságát (ellenben a Maximális Parszimónia módszerrel), ugyanakkor kisebb számítás igényű módszer, mint például a Bayes statisztikai eljárás (Ari, E. 2012; Yang, Z. et al. 2012).

Az elkészült filogenetikai fák megbízhatóságát Bootstrap elemzéssel ellenőriztük. A módszer visszatevéses, véletlen mintavételekkel bootstrap szekvenciákat állít elő a vizsgált szekvencia készletből, majd ezekre a bootstrap szekvenciákra ugyanazzal a módszerrel (ML) és szubsztitúciós modellel fákat tervez (bootstrap fák), kellő nagy számban, esetünkben 500-szor. Ezután statisztikát készít, hogy a végleges fa topológia milyen százalékban egyezik meg a bootstrap fákkal, ebből következtethetünk a fa egyes ágainak megbízhatóságára (Efron, B. 1992).

Az általunk teljes hosszában meghatározott RVA genomok referencia törzsek genomjával történő összehasonlítására és annak vizualizálására az online elérhető mVISTA programot alkalmaztam (Mayor, C. et al. 2000; Frazer, K.A. et al. 2004). A program számára a szegmentált genomú RVA törzsek genomját egyetlen konkatenált szekvenciává fűztem össze. A vizsgálathoz a LAGAN algoritmust alkalmaztam (Brudno, M. et al. 2003). Az mVISTA megjelenítő modulja meghatározza a szekvencia párok közötti százalékos azonosságot egy előre meghatározott hosszúságú csúszó-ablak használatával, és folyamatos görbeként jeleníti meg. A program azonosítja és szürkére színezi a megőrződött régiókat, amennyiben a szekvencia hasonlósága 75%-os felett van.

VII. Eredmények

VII.1.A csoportú emlős rotavírusok

VII.1.1. Ló rotavírusok

Kutatócsoportunk 2011-ben részt vett egy nemzetközi kooperációban, amelynek célja ló RVA törzsek teljes genom meghatározása volt. E gazdafaj A csoportú rotavírusának teljes genom szekvenciája akkor még nem állt rendelkezésünkre (Matthijnsens, J. et al. 2012a). Végül hét ló RVA törzs teljes genomja került meghatározásra, melyből két törzs az RVA/Horse-wt/IRL/04V2024/2004/G14P[12] és az RVA/Horse-wt/IRL/03V04954/2003/G3P[12] meghatározását végeztem el (4. Táblázat). Azóta számos ló RVA teljes genomot megszekvenáltak (Ma, Y. et al. 2015; Nemoto, M. et al. 2015), melyek közül néhányat jelen elemzésbe is bevontam ezért a filogenetikai leszármazási fák egy részét frissítettem a 2012-ben publikált cikkünkhöz képest.

4. Táblázat. Teljes hosszában meghatározott ló RVA genomok genotípus összetétele. Az általunk meghatározott törzsek félkövérrel kiemelve. A különböző háttérszínek a jellemző genotípusokat jelölik.

RVA törzs neve	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	Referencia
RVA/Horse-wt/IRL/04V2024/2004/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-wt/IRL/03V04954/2003/G3P[12]	G3	P[12]	I6	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-wt/ARG/E30/1993/G3P[12]	G3	P[12]	I6	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E12	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-wt/ARG/E403/2006/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E12	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-wt/ARG/E4040/2008/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E12	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-wt/ZAF/EqRV-SA1/2006/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Matthijnsens, J. et al. 2012)
RVA/Horse-tc/USA/FI23/1981/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Ma, Y. et al. 2015)
RVA/Horse-tc/USA/FI-14/1981/G3P[12]	G3	P[12]	I6	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Ma, Y. et al. 2015)
RVA/Horse-tc/GBR/H-2/1976/G3P[12]	G3	P[12]	I6	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E2	H7	(Ma, Y. et al. 2015)
RVA/Horse-tc/GBR/L338/1991/G13P[18]	G13	P[18]	I6	R9	C9	M6	A6	N9	T12	E14	H11	(Matthijnsens, J. et al. 2012)

A kooperáció által feldolgozott ló RVA törzsek, illetve néhány további ló RVA teljes genom összehasonlítása alapján elmondható, hogy közös jellemzőjük a P[12]-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E7 genom összetétel (amely VP4-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP5 gének genotípusát jelöli), míg a VP7, VP6 és NSP4 gének esetében két-két féle genotípus fordul elő: G3/G14, I2/I6 és E2/E12. Ez alól kivételt képez az angol L338 ló RVA törzs,

melynek minden génje egyedi genotípust hordoz, kivéve a VP6 gént (I6). Megjegyzendő egyezés továbbá, hogy a G3 törzsek VP6 genotípusa I2, míg a G14 törzsek VP6 genotípusa I6. Az angol H-2 törzs VP6 génje korábban I2-ként került genotipizálásra (Ghosh, S. et al. 2012; Matthijnssens, J. et al. 2012a), ugyanakkor a legújabb elemzés szerint inkább I6 genotípusú (Ma, Y. et al. 2015).

A két általam vizsgált törzs hasmenéses ló egyedeken végzett passzív mintagyűjtésből származott a 2000-es évekből (Collins, P.J. et al. 2008). Genom konstellációjuk a következő volt:

RVA/Horse-wt/IRL/04V2024/2004/G14P[12] (továbbiakban **RVA/Horse/04V2024**)

G14-P[12]-I2-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2-H7,

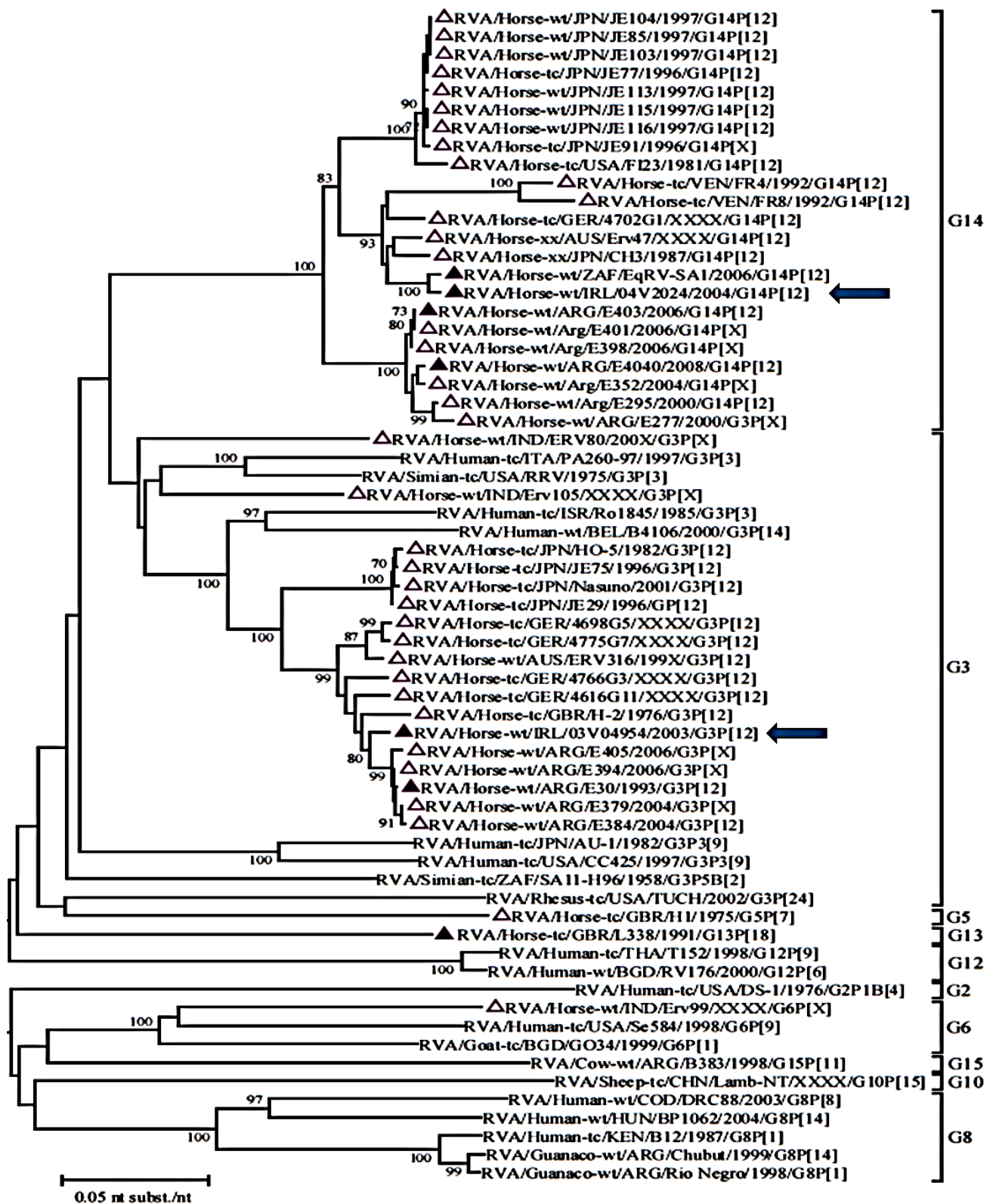
RVA/Horse-wt/IRL/03V04954/2003/G3P[12], (továbbiakban **RVA/Horse/03V04954**)

G3-P[12]-I6-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2-H7.

Annak ellenére, hogy mindkét törzset Írországból gyűjtötték, közel azonos időben meglehetősen különböztek egymástól. Eltérő genotípussal rendelkeztek a VP7 és VP6 génjeikben.

Az **RVA/Horse/04V2024** törzs G14 genotípusú volt, mely egy monofiletikus csoport a VP7 genotípusok között és csak ló RVA törzsekben fordul elő (8. ábra). A legközelebbi leszármazási kapcsolatot egy Dél-Afrikában gyűjtött ló RVA törzssel mutatott (RVA/Horse-wt/ZAF/EqRV-SA1/2006/G14P[12]), a két gén között a nt szekvencia hasonlóság 99,9% volt. A törzs e gén szekvenciája alapján Japánból, Ausztráliából, és Németországból származó ló RVA törzsekkel került egy leszármazási ágra, határozottan elkülönülve más, Japánból származó RVA törzsektől (8. ábra).

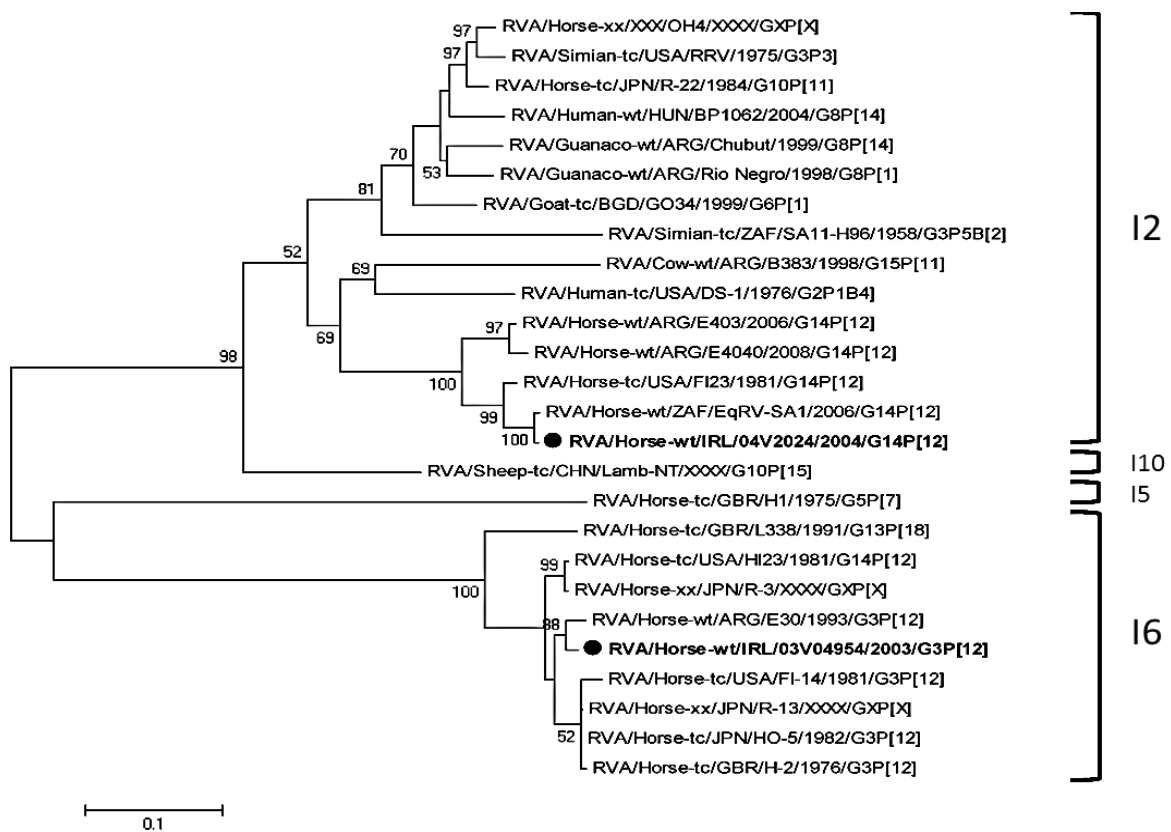
Az **RVA/Horse/03V04954** törzs VP7 génje G3 genotípusú, mely genotípus ló RVA törzsek mellett majom, kerdő és humán RVA törzsekben is előfordul, ugyanakkor a legtöbb ló RVA törzs egy különálló, monofiletikus ágat alkot e genotípuson belül (8. ábra). Az **RVA/Horse/03V04954** törzs Argentínából származó törzsekkel mutatta a legközelebbi leszármazási kapcsolatot, melyekkel 99,8%-os szekvenciális hasonlóságot mutatott (E30 99,8%, E405 99,8%, E394 99,8%, E379 99,8%, E384 99,8%) (8. ábra). A törzs e gén szekvenciája alapján nagy-britanniai, ausztrál, és németországi ló RVA törzsekkel került egy leszármazási ágra, határozottan elkülönülve a Japánból származó RVA törzsektől (8. ábra).



8. ábra. Ló RVA VP7 filogenetikai fa. Válogatott RVA törzsek VP7 génjének ORF nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. A genotípusok jelölése a jobb oldalon található.

Az eredeti ábra Matthijssens et al., 2012 cikkéből, melyen kék nyilak jelölik az általunk feldolgozott ló RVA törzseket (Matthijssens, J. et al. 2012a). A teli háromszögek a cikkben feldolgozott törzseket, míg az üres háromszögek a további ló RVA törzseket jelölik.

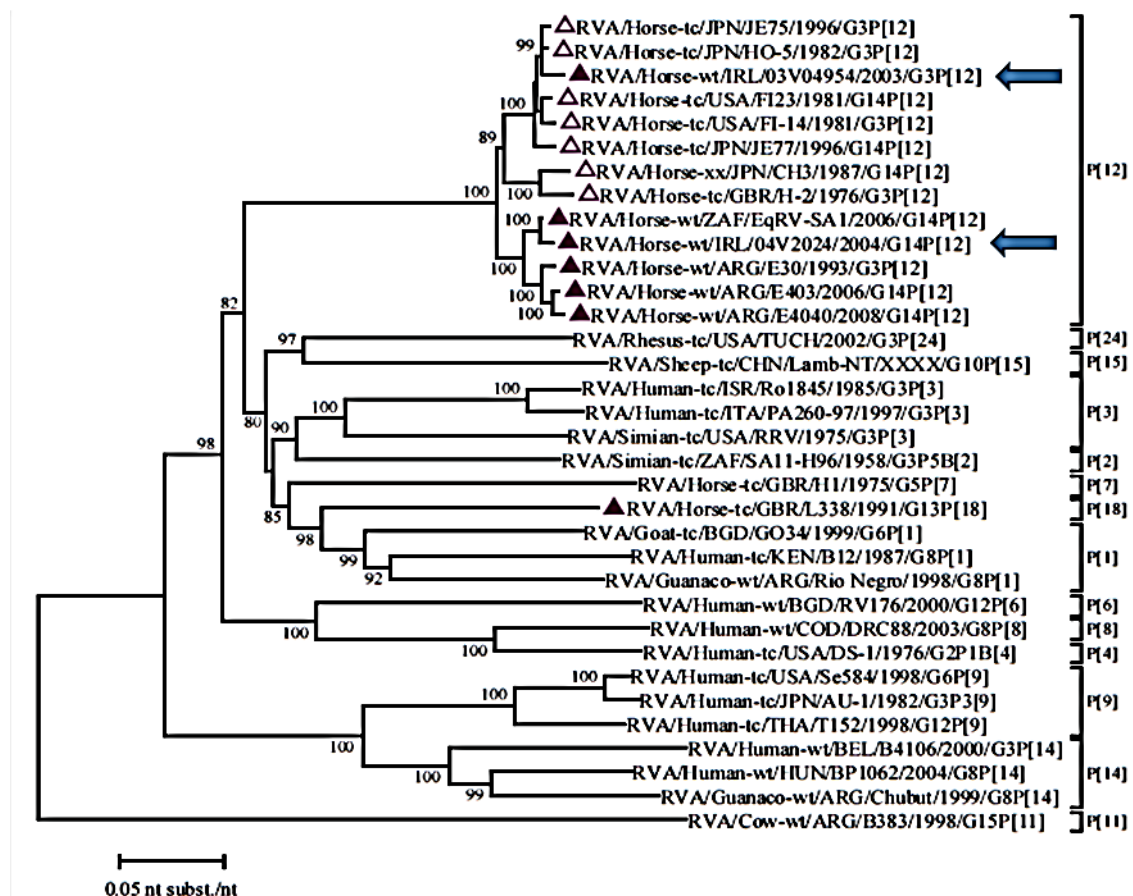
A VP6 génjeik esetében az **RVA/Horse/04V2024** törzs, a többi G14 ló RVA törzsre jellemzően 12 genotípusú, mely genotípus több más gazdafaj RVA törzsére is jellemző, például humán, kerdődző, sertés stb. Az 12 genotípuson belül a legtöbb ló RVA önálló, monofiletikus ágat alkot, ezen belül az **RVA/Horse/04V2024** törzs a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel alkot közös leszármazási ágat (RVA/Horse-wt/ZAF/EqRV-SA1/2006/G14P[12]), a szekvenciális hasonlóság a két törzs között 99,9%. Genotípuson belül különálló ágat alkotnak, elkülönülve az Argentínából származó ló RVA törzsektől (9. ábra). Az **RVA/Horse/03V04954** törzs, a többi G3 törzshöz hasonlóan 16 genotípusú, közös leszármazási vonalat alkot az Argentínából származó E30 törzssel (RVA/Horse-wt/ARG/E30/1993/G3P[12]), mellyel a nt szekvencia hasonlósága 99,9%. Továbbá közös ágon szerepel további Argentínából, Japánból, USA-ból származó törzsekkel, mely ág teljesen elkülönül az L338 törzs alkotta ágtól (9. ábra).



9. ábra. Ló RVA VP6 filogenetikai fa. Válogatott RVA törzsek VP6 génjének ORF nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fa rekonstrukció, mely maximum likelihood módszerrel készült, Tamura-Nei szubsztitúciós modellel (TN93+G), 500-szoros bootstrap lefedettséggel. A referencia törzsek Ma és mtsai, 2015 munkája alapján kerültek beválogatásra (Ma, Y. et al. 2015).

Az azonos genotípusú gének esetében is megfigyelhető, hogy a két írországi törzs eltérő leszármazási ágakra helyeződött. A VP4 gén esetében mindkét törzs P[12]

genotípusú, mely egy eddig kizárólag ló RVA törzsekben előforduló genotípus. A monofiletikus ágon belül a két írországi törzs két külön leszármazási vonalon helyezkedik el, az **RVA/Horse/03V04954** törzs Japán és észak amerikai eredetű törzsekkel klasztereződött, míg az **RVA/Horse/04V2024** törzs Argentínából származó törzsekkel alkot monofiletikus leszármazási ágat, és a legnagyobb hasonlóságot a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel mutat (10. ábra).



10. ábra. Ló RVA VP4 filogenetikai fa. Válogatott RVA törzsek VP4 génjének ORF nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fa. A genotípusok jelölése a jobb oldalon található. Az eredeti ábra Matthijssens és mtsai, 2012-es cikkéből származik, melyen kék nyilak jelölik az általunk feldolgozott ló RVA törzseket (Matthijssens, J. et al. 2012a). A teli háromszögek a cikkben feldolgozott törzseket, míg az üres háromszögek további ló RVA törzseket jelölnek.

A VP1-, VP2-, VP3 kódoló gének esetében mindkét törzs az R2, C2 és M3 genotípusba tartozott, és a VP4 génhez hasonlóan az **RVA/Horse/04V2024** törzs a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel alkot közös leszármazási ágat, míg az **RVA/Horse/03V04954** törzs mindhárom esetben egyedülálló leszármazási ágon szerepel. Ezen génekre adott genotípus más

gazdafaj eredetű RVA törzsekre is fellelhető, ugyanakkor a ló RVA törzsek mindig gén esetében monofiletikusan elkülönülő ágat alkotnak (1. Függelék ábra A-C).

Az NSP1-, NSP2-, NSP3-, NSP4- és NSP5-gént kódoló szegmensek esetében a két törzs az A10, N2, T3, E2 és H7 genotípusba tartozott. Az A10 genotípus eddig csak ló RVA törzsekben fordult elő, köztük az **RVA/Horse/04V2024** törzs a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel alkot közös leszármazási ágat, míg az **RVA/Horse/03V04954** törzs különálló leszármazási ágon szerepel (1. Függelék ábra D). Az N2 és T3 genotípusú NSP2 és NSP3 gének leszármazási fáján az **RVA/Horse/04V2024** törzs a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel alkot közös, elkülönülő leszármazási vonalat, míg az **RVA/Horse/03V04954** törzs különálló leszármazási ágon szerepel egy Japánban (HO-5), egy Nagy-Britanniában (H2) és egy USA-ban izolált törzssel (FI-14) (1. Függelék ábra E, F). Az NSP4 gén filogenetikai fáján a két törzs az E2 genotípusban közös monofiletikus ágat alkot, melyen csak a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzs szerepel még, a három törzs közötti szekvenciális hasonlóság 99,9%. Az NSP4 gén esetében kétféle genotípus ismert a ló RVA törzsek közt, az E2 és az ez idáig csak Argentínából származó RVA törzsekből kimutatott E12 genotípus (1. Függelék ábra G). Az NSP5 gén filogenetikai fáján a H7 genotípust eddig csak lovak rotavírusaiban találták meg, a genotípuson belül az **RVA/Horse/04V2024** törzs a dél-afrikai Eq-RV-SA1 törzssel alkot közös leszármazási ágat, míg az **RVA/Horse/03V04954** törzs különálló leszármazási ágon szerepel (1. Függelék ábra H).

A filogenetikai elemzés alapján megállapítható, hogy a két, Írországból származó ló RVA törzs külön leszármazási vonalat képvisel. Az **RVA/Horse/04V2024** törzs egy Dél-Afrikából származó ló RVA törzssel (RVA/Horse-wt/ZAF/EqRV-SA1/2006/G14P[12]) alkotja az egyik leszármazási vonalat. A két törzs közötti magas nt szekvencia hasonlóság alapján (99,2-99,8%) feltételezhető a közös eredet, a nagy földrajzi távolság ellenére. Az **RVA/Horse/03V04954** törzs NSP4 génje jelentős hasonlóságot mutat ezzel a leszármazási vonallal, így a közös eredet, vagy reasszortáció itt is feltételezhető. A további génjeit tekintve az **RVA/Horse/03V04954** törzs egyedi leszármazási vonalat alkot, legközelebbi közös eredetet a G3 és I6 genotípusok esetében az Argentínából származó E30 törzssel, míg P[12], N2 és T3 genotípusok esetében egy Japánban (HO-5), egy Nagy-Britanniában (H2) és egy USA-ban izolált törzssel (FI-14) mutatott (Matthijnssens, J. et al. 2012a; Ma, Y. et al. 2015).

VII.1.2. Teve rotavírus

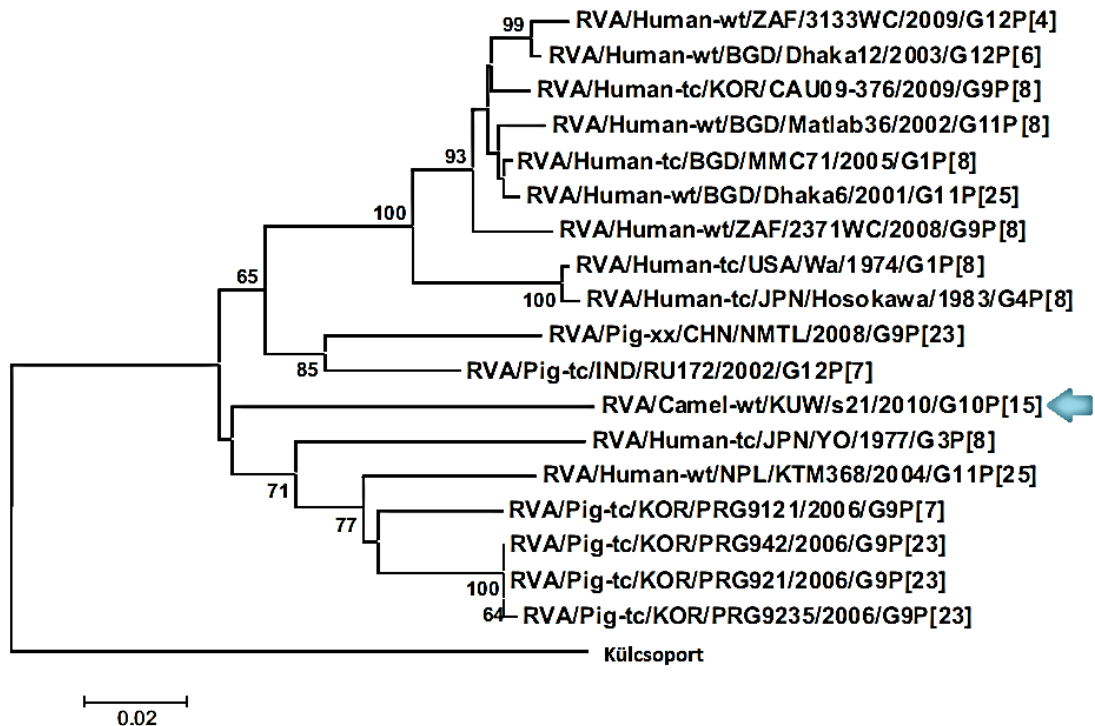
Kuvaitban, 2010-ben végzett felmérő vizsgálat a tevék 7,3%-os rotavírus pozitivitását mutatta ki (109 mintából 8 RVA pozitív). A nyolc mintából öt minta hasmenéses, 4 hónaposnál fiatalabb teve csikókból, míg három minta tünetmentes, 3 éves tevékből származott, mely mintákból RT-PCR módszerrel mutatták ki az RVA pozitivitást. Az öt hasmenéses tevéből származó bélsár minta közül egy minta vizsgálatát végezte el laborunk. A mintából az RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15] A típusú rotavírus törzs került kimutatásra (GenBank-i szám: JX968468-JX968472), továbbiakban **RVA/Camel/s21**. A genom meghatározáshoz tervezett primerek listáját a 1. Függelék táblázat tartalmazza. A genomszekvenálás során öt strukturális gén (VP1, VP2, VP4, VP6, VP7) és négy nem-strukturális gén (NSP2, NSP3, NSP4, NSP5) részleges szekvenciája került meghatározásra. A bélsár minta kis mennyisége nem tette lehetővé további genomiális dsRNS kivonását és további vizsgálatát. Ennek ellenére a kapott részleges szekvenciák, korábbi irodalmi adatokra alapozva elegendő hosszúságúnak bizonyultak a genotípus megbízható meghatározásához, többek között, a RotaC program segítségével (Esona, M.D. et al. 2009; Esona, M.D. et al. 2010). A 5. Táblázat tartalmazza a meghatározott génszakaszok főbb jellemzőit.

5. Táblázat. Az RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15] törzs genomjának szekvenálásával nyert adatok összefoglalója.

RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15]				
Gén	Hossz	Genotípus	Hasonlóság	Referencia törzs
VP1	401bp	R1	89%	RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]
VP2	199bp	C2	96%	RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]
VP4	800bp	P[15]	87%	RVA/Sheep-tc/CHN/Lamb-NT/XXX/G10P[15]
VP6	382bp	I1	81%	RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]
VP7	981bp	G10	82%	RVA/Human-tc/GBR/A64/1987/G10P11[14]
NSP2	990bp	N2	97%	RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]
NSP3	402bp	T6	94%	RVA/Cow-tc/USAWC3/1980/G6P[5]
NSP4	710bp	E1-14	44,2-71,9%	ref. törzsek innen (Matthijnssens, J. et al. 2011a)
NSP5	510bp	H3	97%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P[3]

Vizsgálataink idején (2010-2012) még csupán egy teve rotavírus törzs részleges genom szekvenciája állt rendelkezésünkre, egy egyiptomi teve eredetű RVA felszíni VP7 génjének részleges szekvenciája, így az összehasonlító elemzéseinkhez sertés és humán rotavírus

törzseket alkalmaztunk referenciaként (11. ábra) (Papp, H. et al. 2012). 2014-ben K. C. Jere és mtsai. sikeresen meghatározták egy dél-afrikai teve eredetű rotavírus törzs részleges genomját (RVA/Camel-wt/SDN/MRC-DPRU447/2002/G8P[11]) (Jere, K.C. et al. 2014), így dolgozatomban már módomban állt az új teve RVA törzzsel való összehasonlító leszármazási kapcsolat vizsgálta is.



11. ábra. Teve RVA részleges genom alapú filogenetikai fa. Filogenetikai elemzése az RVA/Camel/s21 törzs 5 strukturális és a 4 nem-strukturális génjének részleteiből összeillesztett szekvenciának. Az RVA/Camel/s21 törzset kék nyíl jelöli. Eredeti ábra (Papp, H. et al. 2012), módosítva.

A filogenetikai elemzés során a strukturális gének főként juh, szarvasmarha, sertés és humán eredetű törzsekkel alkottak egy leszármazási csoportot (2. Függelék ábra). A G10P[15] felszíni antigén kombinációt korábban is kimutatták török, indiai szarvasmarha és kínai juh rotavírus törzsek esetében, ám az **RVA/Camel/s21** törzs genetikailag különbözőnek bizonyult ezektől a törzsektől. Sőt az Egyiptomból és Kuvaitból származó G10 genotípusú teve törzsekkel sem mutatott különösebben szoros filogenetikai kapcsolatot (2. Függelék ábra A). A P[15] genotípust ez idáig csak kiskérődzőkből, juh, és kecske RVA törzsekből került kimutatásra, melyektől az **RVA/Camel/s21** törzs elkülönülő ágon helyezkedik el (2. Függelék ábra B) (Papp, H. et al. 2014a).

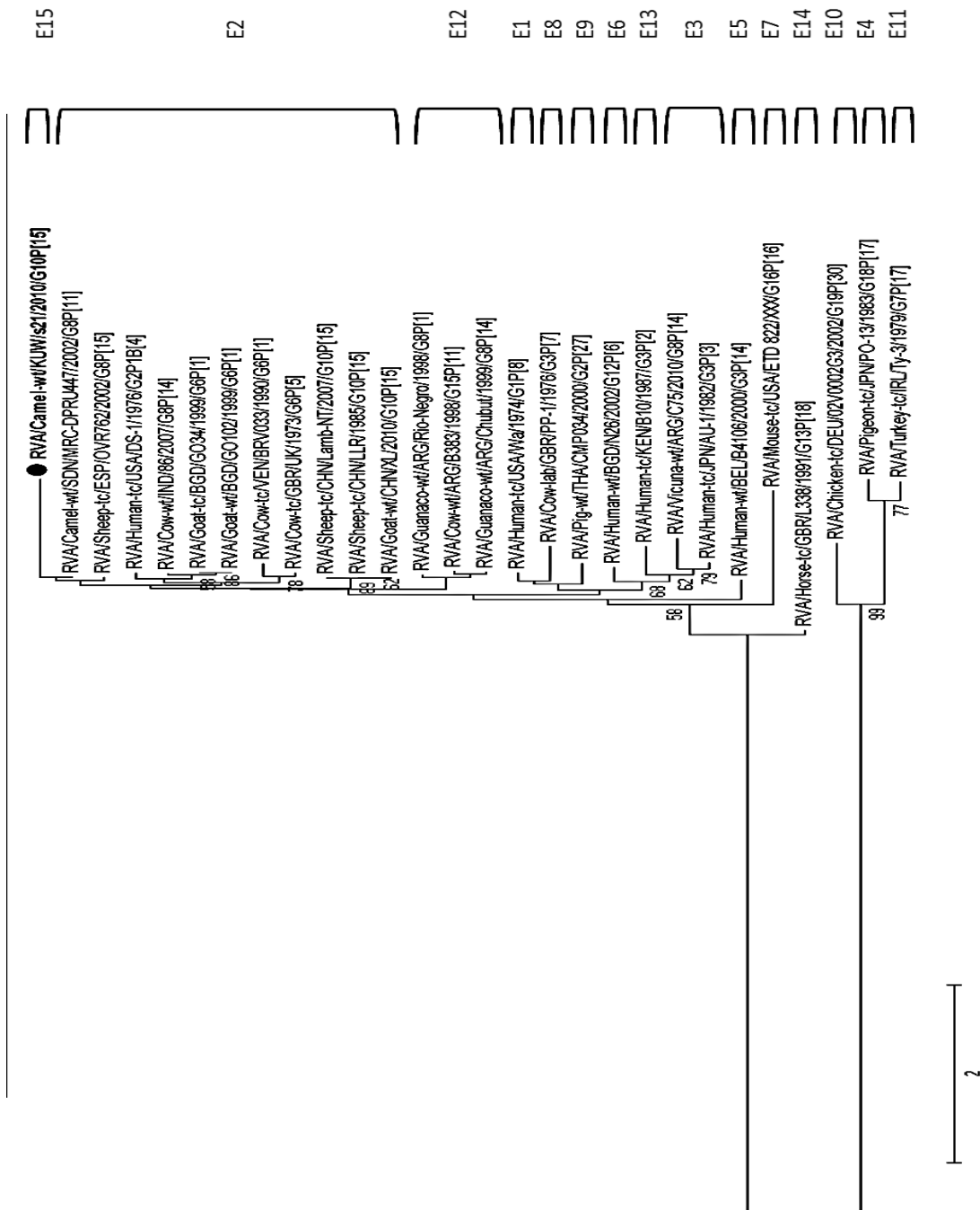
A strukturális gének egy részében az **RVA/Camel/s21** törzs különböző genotípusának bizonyult az RVA/Camel-wt/SDN/MRC-DPRU447/2002/G8P[11] törzshöz képest, a filogenetikai fákban a két törzs elkülönülő kládba tagozódott.

A VP1 gén R1 genotípus csoportba tartozott, melyben humán, és sertés eredetű törzsek is megtalálhatók. Ugyanakkor az **RVA/Camel/s21** törzs a genotípuson belül egyedi, hosszú leszármazási ággal élesen elkülönült a többi törzstől (2. Függelék ábra C). A VP6 gén genotípusát tekintve I1-es típus, ami figyelemre méltó, ugyanis szinte csak humán eredetű RVA törzsekre jellemző, míg a kérődző RVA törzsekben inkább az I2-es genotípus fordul elő (2. Függelék ábra E).

A VP2 gén, ellentétben a többi génnel, mindkét teve RVA törzsnél azonos, R2-es genotípusú volt, de a filogenetikai elemzés alapján e gének nem alkottak közös kládot (2. Függelék ábra D.). Az **RVA/Camel/s21** törzs főként humán és kérődző törzsekkel szerepel közös ágon, míg a dél-afrikai teve törzs ló törzsekkel mutat közelebbi leszármazást (2. Függelék ábra D.).

A nem-strukturális gének filogenetikai vizsgálata során az **RVA/Camel/s21** törzs génjei különböző kérődző eredetű és humán rotavírus törzsekkel alkottak közös leszármazási ágat (2. Függelék ábra. F-H.). Ezen gének esetében az általunk vizsgált teve RVA törzs az RVA/Camel-wt/SDN/MRC-DPRU447/2002/G8P[11] törzssel azonos genotípusokkal rendelkezett, ugyanakkor egyik gén elemzése során sem alkotott a két törzs közös leszármazási ágat (2. Függelék ábra. F-H.).

Az általunk tanulmányozott teve RVA törzs esetében az NSP4 gén szekvenciája további érdekességet tartogatott, mivel nukleinsav hasonlósága az eddig már meghatározott 14 féle E genotípus bármelyikéhez viszonyítva alatta maradt a 80 %-os genotípus besorolási határértéknek (44,2-71,9%). Így a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport hozzájárulásával egy új, E15 elnevezésű genotípus került bevezetésre, melynek az **RVA/Camel/s21** törzs lett a referencia törzse (Papp, H. et al. 2012). A filogenetikai elemzés során az **RVA/Camel/s21** törzs NSP4 génje más emlős rotavírusok NSP4 génjével tűnt közös eredetűnek, ugyanakkor nagymértékben eltért tőlük, ezt mutatja többi emlős RVA NSP4 géntől hosszú leszármazási ággal való elkülönülés is a filogenetikai fán (12. ábra).



12. ábra. Teve RVA NSP4 filogenetikai fa. Az RVA/Camel/s21 törzs (félkörvélrel kiemelve) NSP4 génjének filogenetikai összehasonlítása a már ismert NSP4 genotípusokkal (E1-E15), és néhány kérdőző eredetű RVA törzsszel. A filogenetikai fa maximum likelihood módszerrel készült, Hasegawa-Kishino-Yano szubsztitúciós modellel (HKY+GI), 500-szoros bootstrap lefedettséggel.

VII.1.3. Kutya rotavírus

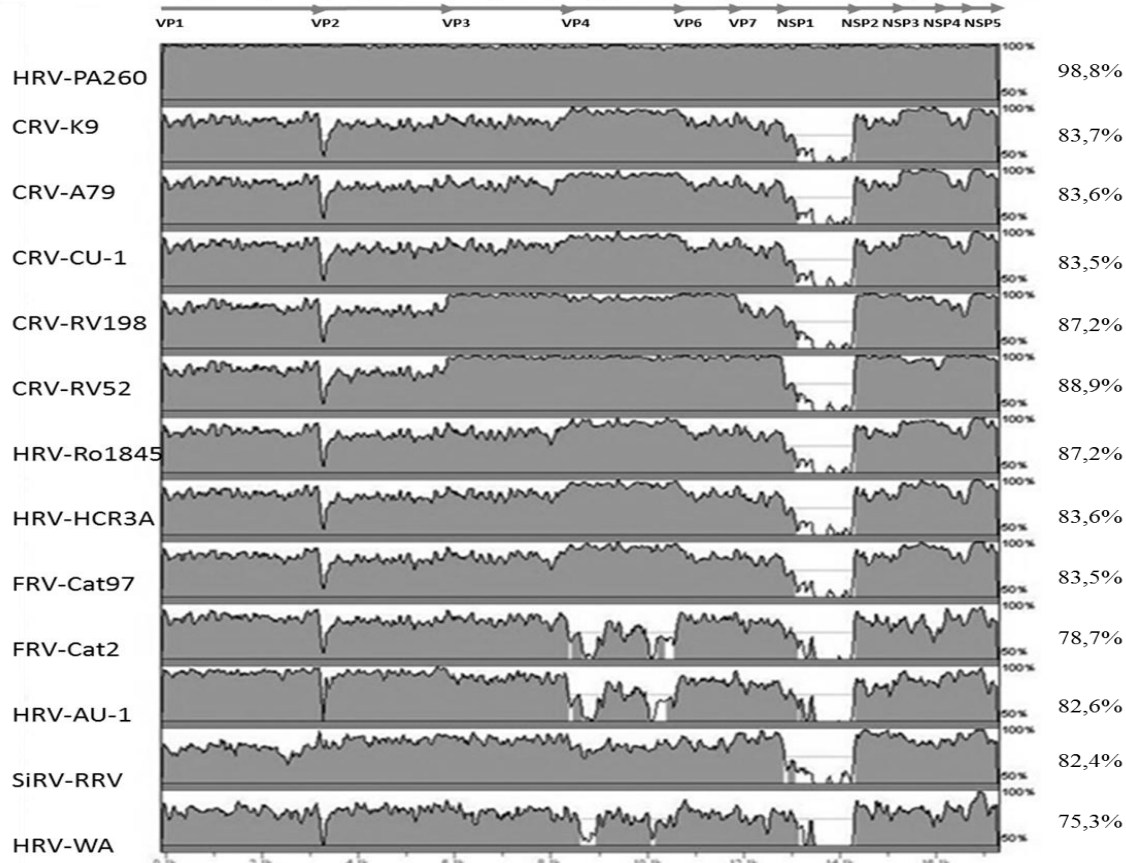
Kutatócsoportunk 2012-ben menhelyi kutyák körében végzett enterális vírusok kimutatását célzó vizsgálatot, melynek során került begyűjtésre többek között egy klinikailag tünetmentes, három hetes kutyakölyök bélsár mintája. A mintában a metagenomikai vizsgálat során RVA típusú szekvenciák kerültek kimutatásra, majd a hiányzó genom szekvenciák további új generációs és klasszikus szekvenálási módszerekkel kerültek meghatározásra (Papp, H. et al. 2015). Az RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3] törzs teljes genomja 18,524 bp hosszúságú (GenBank-i azonosító száma: KJ875791-KJ875801), a vizsgált gének főbb tulajdonságait az alábbi táblázat foglalja össze (6. Táblázat.). A törzs nevét a továbbiakban **RVA/Dog/135** rövidítéssel alkalmazom.

6. Táblázat. Az RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3] törzs genom genotípus konstellációja és nukleinsav szekvencia hasonlósága a genotípus referencia törzséhez.

RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3]				
Gén	Hossz	Genotípus	Hasonlóság	Referencia törzs
VP1	3302bp	R3	93,9%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
VP2	2078bp	C3	92,7%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
VP3	2591bp	M3	88,4%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
VP4	2362bp	P[3]	85,3%	RVA/Dog-tc/AUS/K9/1981/G3P[3]
VP6	1356bp	I3	85,9%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
VP7	1062bp	G3	81,5%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
NSP1	1599bp	A15	98,8%	RVA/Human-tc/ITA/PA260-97/1997/G3P3[3]
NSP2	1059bp	N2	84,3%	RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]
NSP3	1068bp	T3	81,8%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
NSP4	750bp	E3	92,8%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]
NSP5	667bp	H3	81,8%	RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]

Az **RVA/Dog/135** törzs teljes genomjának összehasonlítását kilenc G3P[3] RVA törzssel az mVISTA program segítségével végeztük el, melyhez négy kutya RVA (CRV-K9, CRV-CU-1, CRV-RV198, és CRV-RV52), három atípusos humán (HRV-PA260-97, HRV-Ro1845, és HRV-HVR3A), két tipikus humán referencia törzs (HRV-Wa, HRV-AU-1), két macska (FRV-Cat2, FRV-Cat97), valamint egy majom törzs (SRV-RRV) konkatenált (összefűzött) szekvenciáját állítottuk össze (13. ábra).

Összehasonlítás alap genomja: RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3]



Törzs	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Dog-tc/HUN/135/201x/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C3	M3	A15	N2	T3	E3	H6
RVA/Human-tc/ITA/PA260-97/1997/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C3	M3	A15	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-ct/AUS/K9/1981/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/USA/A79-10/1979/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/USA/CU-1/1982/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/ITA/RV198-95/1995/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/ITA/RV52-96/1996/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Human-tc/ISR/Ro1845/1985/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Human-tc/USA/HCR3A/1984/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Cat-tc/AUS/Cat97/1984/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Cat-tc/AUS/Cat2/1984/G3P[9]	G3	P[9]	I3	R3	C2	M3	A3	N1	T6	E3	H3
RVA/Human-tc/JPN/AU-I/1982/G3P3[9]	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]	G3	P[3]	I2	R2	C3	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A15	N1	T1	E1	H1

13. ábra. RVA/Dog/135 kutya RVA törzs teljes genom összehasonlítása. A törzs teljes, összeillesztett genom összehasonlítása azonos, részlegesen azonos, illetve eltérő genom összetételű referencia RVA törzsekkel kutya (CRV), macska (FRV), humán (HRV), majom (SiRV) gazdafajokból, mely mVISTA programmal készült. A törzsnevek rövidítése a bal oldalon található. A nt szekvencia hasonlóságot az y-tengely mutatja, a szürke árnyékolás a szekvencia konzerváltságát jelöli. A szürke nyilak a gének határait jelölik az összefűzött genomban. A százalékos értékek a jobb oldalon a teljes genomok nt szekvencia hasonlóságát mutatja a referencia törzsek és az RVA/Dog/135 törzs között. A táblázat a referencia törzsek genom konstellációját mutatja.

Az mVISTA programmal generált összehasonlító ábrán jól látszik, hogy a kutya **RVA/Dog/135** törzs, a teljes genomot tekintve a legnagyobb hasonlóságot egy olaszországi humán RVA törzssel mutatta (RVA/Human-tc/ITA/PA260-97/1997/G3P[3]9), a két genom nt szekvencia hasonlósága 98,9%. A két törzs génenkénti összehasonlításakor a nt szekvencia hasonlóság minden gén esetében 98%-nál nagyobbak bizonyult (98,3-99,2%nt és 98,1-100% as szinten) (3. Függelék táblázat). Az azonos genotípusú gének összehasonlítása során a vizsgált törzs az egyéb kutya, macska illetve humán törzsekkel csak korlátozott mértékű hasonlóságot mutatott, a VP2 és NSP1 gén esetében pedig tőlük eltérő genotípusúnak bizonyult.

A 11 gén különálló filogenetikai elemzése hasonló tendenciát mutatott (3. Függelék ábra). Az antigenitásban szerepet játszó gének (VP4, VP6 és VP7) esetében az **RVA/Dog/135** törzs az olasz RVA/Human/PA260-97 törzssel (nt hasonlóság 98,5-98,8%), valamint két olaszországi kutya törzssel (RV198, RV52) alkotott egy leszármazási vonalat (nt hasonlóság 93,1-98,7% és 94,6-99,1%) (Függelék ábra. D-F és 3. Függelék táblázat). A többi strukturális gén (VP1, VP2, VP3) esetében a RVA/Human/PA260-97 törzs mellett (nt hasonlóság 99,1-99,5%), a 3-as genotípus referencia törzsnek számító RVA/Human/AU-1, valamint majom eredetű RVA törzsekkel (TUCH, RRV) alkotott közös leszármazási ágat (3. Függelék ábra A-C és 3. Függelék táblázat).

Az **RVA/Dog/135** törzs nem-strukturális génjeinek filogenetikai elemzése tovább erősítette az olasz RVA/Human/PA260-97 törzssel való szoros genetikai kapcsolat (nt hasonlóság 98,3-99,0%). Külön kiemelendő, hogy az NSP1 gén, mely mindkét törzsben A15 genotípusúnak bizonyult. Ezen genotípus referencia törzse az RVA/Human/PA260-97, esetünkben, az **RVA/Dog/135** törzsben, második alkalommal került kimutatásra (nt hasonlóság 98,8%) (3. Függelék ábra G és 3. Függelék táblázat). A magyarországi kutya RVA törzs további nem-strukturális génjeinek leszármazási kapcsolatai között olaszországi kutya, macska, humán és majom RVA törzsek is szerepelnek (Függelék ábra H-K).

VII.2.A csoportú madár rotavírusok

A madár rotavírusokról számottevően kevesebb epidemiológiai és genetikai adattal rendelkezünk, mint az emlős rotavírusokról. A dolgozat elkészültéig tíz teljes madár RVA genom volt érhető el a GenBank-ban, melyek galamb, fácán, házityúk, pulyka és sarkvidéki réce gazdafajokból származtak. A teljes genomok mellett a főbb antigének (VP7, VP4, VP6) és egy kóroki szerepűnek tekintett gén (NSP4) esetében érhetőek még el további szekvenciák. A kisszámú nt szekvencia adat ellenére az eddig ismert madár rotavírusok jelentős genetikai változatosságot mutatnak. A jelenleg ismert összes RVA G és P-genotípusból (35 féle G, 50 féle P) 8 G-típust (G7, G17, G18, G19, G22, G23, G28) és 7 P-típust (P[17], P[30], P[31], P[35], P[37], P[38]; P[39]) madaraktól írtak le. A genom egyéb génei esetében a tapasztalt változatosság számottevően kisebb. Genom összetétel alapján két fő konstelláció állapítható meg: az RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30] törzsé, a másik összetétel típust fácán, pulyka törzsek, valamint egy galamb törzs képviseli (7. Táblázat.).

7. Táblázat. Madár RVA törzsek genom összetétele. A felső sorokban a Magyarországon gyűjtött és általam feldolgozott törzsek találhatóak, míg a vonal alatt a GenBank-ban elérhető válogatott referencia törzsek kerültek felsorolásra. A színek a madár RVA között fellelhető egyes gazdafajokra jellemző genotípusokat jelölik: Kék: jellemzően galamb, pulyka, és fácán RVA genotípusok; Zöld: tyúk RVA genotípusok; Piros: pulyka jellegzetes genotípusok; Narancssárga: fácán RVA jellemző genotípusok.

RVA törzsek	Gének											
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
RVA/Pheasant-wt/HUN/18769/2011	G22	P[35]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E4	H4	
RVA/Pheasant-wt/HUN/14246/2008	G23	P[37]	I4	R4	C4	M4	A16	N10	T4	E4	H4	
RVA/Pheasant-wt/HUN/17655/2008	G23	P[30]/[37]	I4	R4	C4	M4	A16	N10	T4	E4	H4	
RVA/Pheasant-wt/HUN/14958/2005	G19	P[31]	I4	-	C4	-	-	-	-	-	H4	
RVA/Pheasant-wt/HUN/19109/xxx	G22	-	I4	-	C4	-	-	-	-	-	H4	
RVA/Chicken-tc/xxx/BRS/115/xxx	G7	P[35]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E11	H4	
RVA/Turkey-wt/HUN/40/xxx	G22	P[31]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E4	H4	
RVA/Turkey-wt/HUN/39/xxx	G22	P[35]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E4	H4	
RVA/Pheasant-tc/DEU/10V0112H5/2010	G23	P[37]	I4	R4	C4	M4	A16	N10	T4	E4	H4	
RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015	G23	P[37]	I4	R4	C4	M4	A16	N10	T4	E4	H4	
RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003	G22	P[35]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E11	H4	
RVA/Turkey-tc/DEU/03V0001E10/2003	G22	P[17]	I4	-	-	-	-	-	-	-	H4	
RVA/Turkey-tc/TUR/Ty-1/1979	G17	P[38]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E4	H4	
RVA/Turkey-tc/TUR/Ty-3/1979	G7	P[35]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E11	H4	
RVA/Chicken-tc/IRL/Ch2/xxx	G7	P[35]	I4	-	-	M4	-	-	-	-	H4	
RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983	G18	P[17]	I4	R4	C4	M4	A4	N4	T4	E4	H4	
RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002	G19	P[30]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8	
RVA/Chicken-tc/DEU/03V0158G3/2003	G19	P[30]	I11	-	-	-	-	-	-	-	H8	
RVA/Chicken-tc/DEU/03V0358F3/2003	G19	P[30]	I11	-	-	-	-	-	-	-	H8	
RVA/Chicken-tc/DEU/04V0027G6/2004	G19	P[30]	I11	-	-	-	-	-	-	-	H8	
RVA/Chicken-tc/DEU/06V0661G1/2006	G19	P[31]	I11	-	-	-	-	-	-	-	H8	
RVA/Chicken-xx/IRL/Ch-1/1979	G19	P[x]	I11	-	-	-	-	-	-	E10	-	
RVA/Chicken-tc/KOR/AvRV-2/2011	G19	P[30]	I11	-	-	-	-	-	-	-	-	
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	

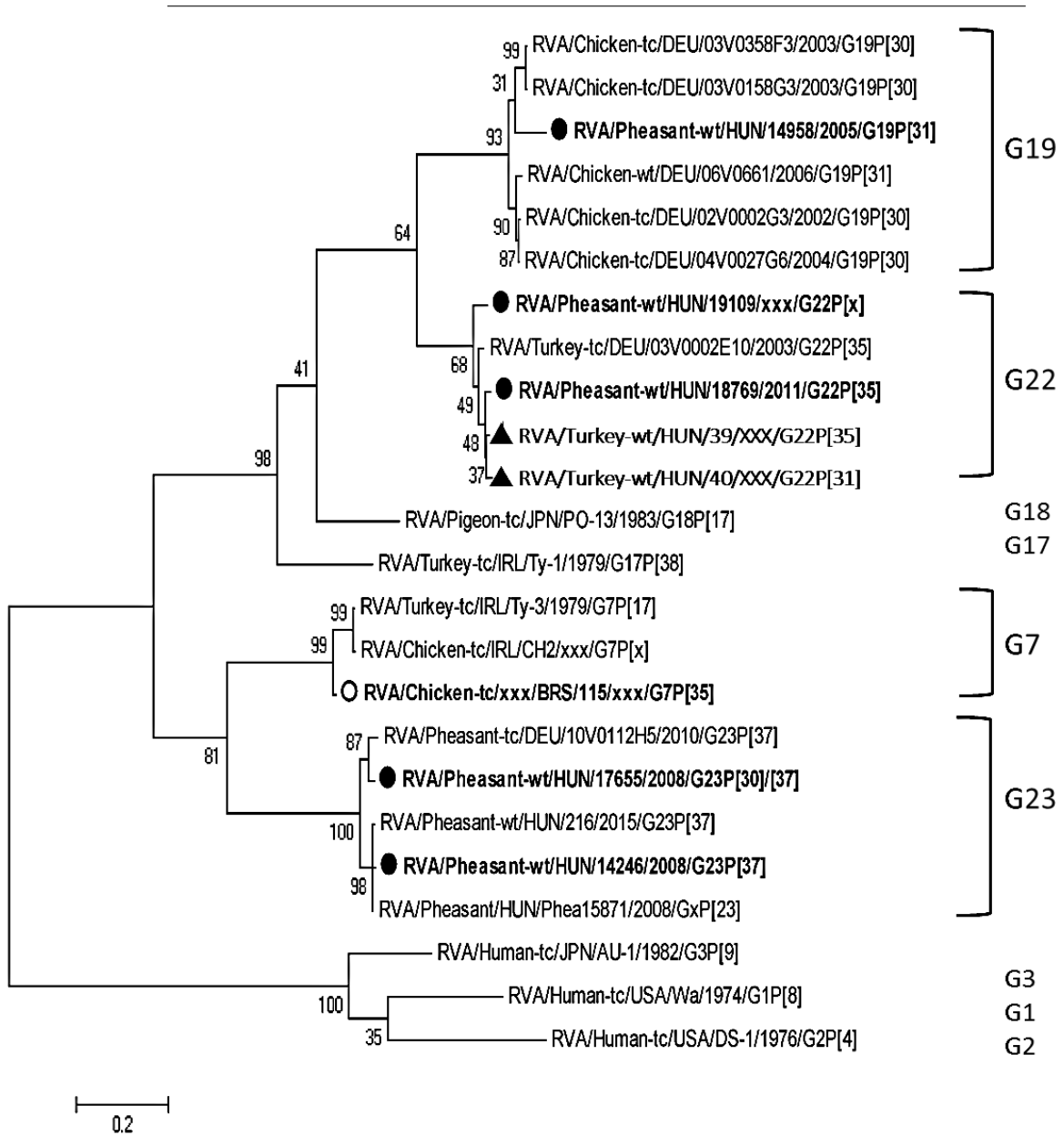
Ebben a fejezetben a kutatócsoportunk által meghatározott madár RVA genomok filogenetikai elemzését taglalom. Egy, 2014-ben megjelent tanulmányunkban egy házityúk eredetű RVA törzs teljes genomját határoztuk meg új generációs nukleinsav szekvenálás módszerével (Papp, H. et al. 2014b). Majd egy fácán RVA törzs teljes genomját publikáltuk 2016-ban, melyet referencia törzsként használok fel a későbbiekben bemutatott filogenetikai összehasonlításokban (Gál, J. et al. 2016). További három teljes és két részleges fácán RVA genomot is sikerült meghatároznom, melyek szekvenciái és filogenetikai elemzéseinek eredményei részben publikálásra kerültek, illetve jelenleg is publikálásra készítünk elő (Papp, H. et al. 2014c). Ezen kívül két pulyka RVA törzs meghatározásra is sor került új generációs szekvenálás módszerével. A 7. Táblázat foglalja össze a törzsek genetikai összetételét, és néhány a GenBank-ban fellelhető referencia madár RVA törzs genom konstellációját.

VII.2.1. Tyúk rotavírus

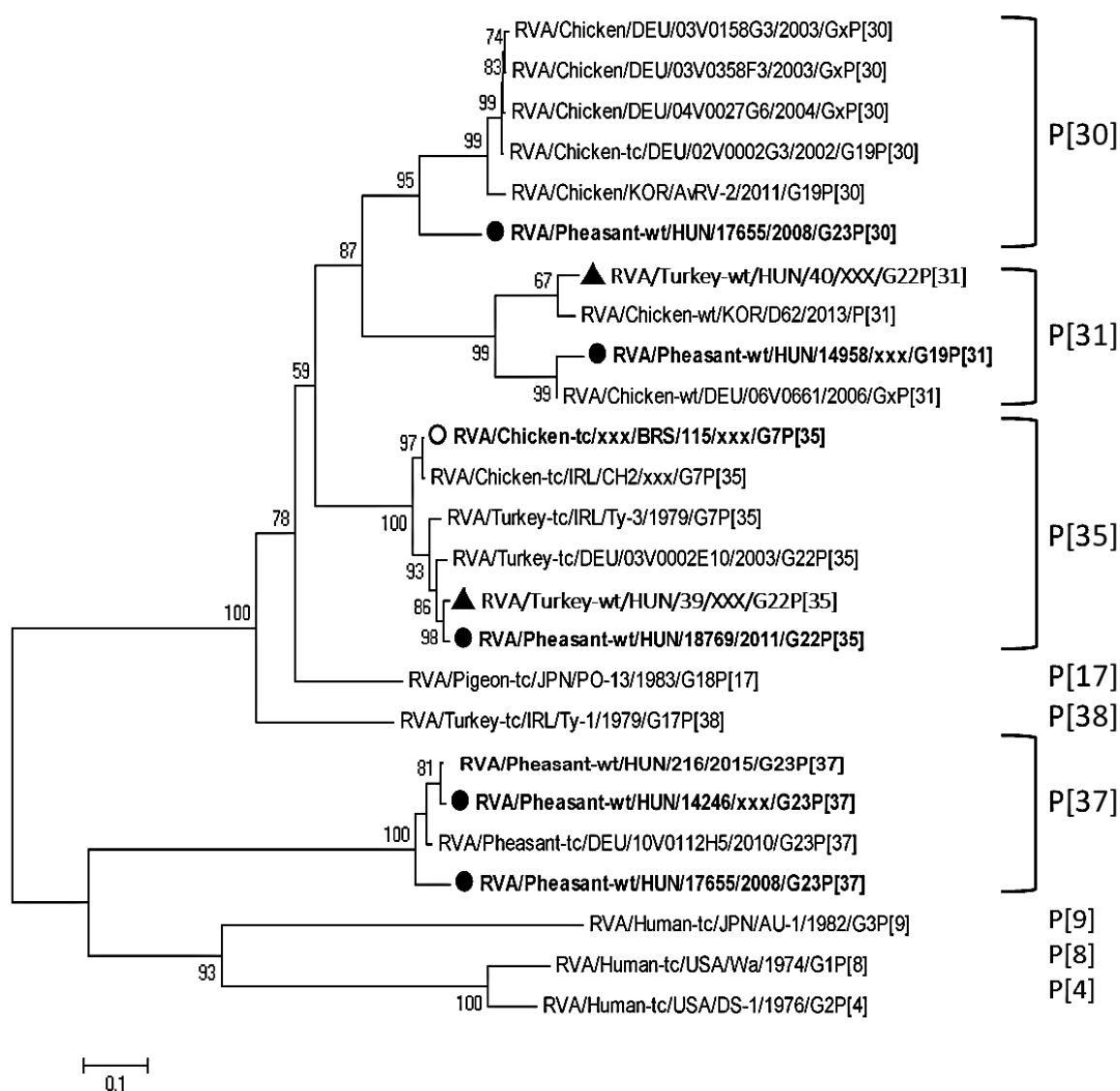
Az RVA/Chicken-tc/xxx/BRS/115/xxx/G7P[35], a továbbiakban csak **RVA/Chicken/BRS/115** törzs a Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.. laborjából került hozzánk, ahol kontroll vírusként alkalmazták SPF házityúk szérumon végzett rotavírus szerológiai diagnosztikai tesztekben. Sajnálatos módon, a vírus eredetéről nem rendelkezünk pontos információval. A vírust a laborban, MA104 (afrikai zöldmajom vese sejtvonala) sejtvonalon tartották fenn, vizsgálatainkhoz alacsony passzázsszámú vírusizolátumot bocsájtottak rendelkezésünkre. A teljes genom meghatározása új generációs szekvenálással történt, melynek részleteit a VI.7.2. *IonTorrent szekvenálás* fejezetben ismertettem, és melynek eredményeként visszakapott 64.462 rövidített leolvasást a GenBank-ból letöltött referencia szekvenciához illesztettük, a fennmaradó szekvenciák (~15000) vélhetően a fenntartó sejtvonalból kerültek az izolátumba, egyéb vírus szekvenciát nem tudtunk kimutatni. A vizsgált szekvenciák jelentős számú lefedettséget mutattak a genom teljes hosszán (legkisebb lefedettség 66x az NSP1 esetében, legnagyobb 507x az NSP3 esetében) (4. Függelék táblázat.). Az IonTorrent új generációs szekvenálás módszerével a teljes genom szekvenciáját, beleértve az 5' és 3' végeken található nem-kódoló régiókat is sikerült meghatároznunk. Ez a reverz transzkriptáz enzimnek köszönhető, mely terminális nukleotid-transzferáz aktivitása révén rövid túlnyúló oligonukleotid szekvenciákat hoz létre az újonnan szintetizált cDNS szakaszok 3' végén, melyek templátként szolgálnak a komplementer szál szintézisekor.

Elemzéseim alapján az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs genom összetétele G7-P[35]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E11-H4. A neutralizáló antigének esetében a VP7 G7 és VP4 P[35] genotípusok korábban már házityúk és pulyka RVA törzsekből kimutatásra kerültek (Nishikawa, K. et al. 1991; Mori, Y. et al. 2003). A G7 genotípust ez idáig mindössze két RVA törzsből sikerült kimutatni, előbb egy pulyka törzsből (RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-3/1979/G7P[35]), majd egy házityúk törzsből (RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x]). A P[35] genotípust főként pulyka törzsekben van jelen, ugyanakkor az RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x] törzs, eddig beazonosítatlan, VP4 génje is P[35] genotípusának bizonyult elemzéseink során. A kevés nt szekvencia adat miatt nem dönthető el, hogy a fenti genotípusok gazdafaj specifikusak-e, vagy reasszortáció útján kerültek különböző gazdafajok RVA törzseibe. Az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs genomjának egyéb régiói tipikus madár RVA jegyeket hordoznak (7. Táblázat.). Főként pulyka/fácán/galamb törzsekkel mutatnak hasonlóságot, ugyanakkor egyezés tapasztalható a RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x] törzs részleges genom szekvenciáival, ám eltérnek a tipikus tyúk RVA-nak tekintett RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30] törzs összetételétől.

A 11 gén egyenkénti nt szekvencia és filogenetikai elemzése alapján az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs közelebbi rokonsági kapcsolatban van pulyka törzsekkel (pl. 03V002E10 és Ty-3), mint a házityúk referencia törzssel (RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30]) (14. és 15. Ábra; 4. Függelék ábra). Ugyanakkor a törzs a legnagyobb hasonlóságot a részlegesen meghatározott genomú RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x] törzssel mutatta, amellyel négy gén esetében (VP4, VP6, VP7, NSP5) a nt szekvencia egyezése elérte a 96-99% (5. Függelék táblázat.). Vizsgálataink kezdetén az RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-3/1979/G7P[35] pulyka referencia törzsnek csak részleges genom szekvenciája volt elérhető a GenBankban, később azonban a teljes genom meghatározásra került (Fujii, Y. et al. 2016), így a korábbi összehasonlítást frissítettem és kibővítettem. Az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs a fennmaradó hét génje (VP1-3, és NSP1-4) az utóbbi RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-3/1979/G7P[35] pulyka törzssel mutatott szignifikáns nukleinsav hasonlóságot (96-97%). A VP4, VP7, VP6 és NSP5 gének szekvenciája alapján készült filogenetikai fák az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs a RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x] házityúk referencia törzssel alkotott közös leszármazási ágat (15. és 14. ábra; 4. Függelék ábra D. és I), míg a VP1, VP2, és NSP1-3 gének esetében a pulya RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-3/1979/G7P[35] törzssel (4. Függelék ábra A, B, E-G). A VP3 és VP7 gének alapján készült filogenetikai fák pedig az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs az RVA/Chicken-tc/IRL/CH2/xxx/G7P[x] és az RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-3/1979/G7P[35] törzsekkel közös leszármazási ágat alkot (4. Függelék ábra C és 14. ábra;). Az NSP4 gén esetében az **RVA/Chicken/BRS/115** törzs elkülönül a többi referencia törzstől, közelebbi rokonságot a különböző pulyka RVA törzsekkel mutatott (4. Függelék ábra H).



14. ábra. Madár RVA VP7 filogenetikai fa. Magyarországi madár RVA törzsek VP7 génszekvenciája alapján készült filogenetikai fa. A farekonstrukció ML módszerrel, TN93+G1 szubsztitúciós modellel készült, 500-szoros bootstrap ellenőrzés mellett (szám értékek a faágakon). Az általunk feldolgozott, magyarországi madár RVA törzsek félkövérrel kiemelték, a házityúk RVA törzset üres kör (○), a fácán RVA törzsetek teli kör (●), a pulyka RVA törzsetek teli háromszög (▲) jelöli. A jobb oldali felirat a genotípusokat jelöli.



15. ábra. Madár RVA VP4 filogenetikai fa. Magyarországi madár RVA törzsek VP4 génszekvenciája alapján készült filogenetikai fa. A farekonstrukció ML módszerrel, TN93+G1 szubsztitúciós modellel készült, 500-szoros bootstrap ellenőrzés mellett (számértékek a faágakon). Az általunk feldolgozott, magyarországi madár RVA törzsek félkövérrel kiemelték, a házityúk RVA törzset üres kör (○), a fácán RVA törzsetet teli kör (●), a pulyka RVA törzsetet teli háromszög (▲) jelöli. A jobb oldali felirat a genotípusokat jelöli.

A pulyka referencia törzsekkel is magas nt szekvencia hasonlóságok arra utalhatnak, hogy a házityúk eredetű RVA törzsek változatos genom összetétellel rendelkezhetnek, feltételezhető, hogy az **RVA/Chicken/BRS/115** és a CH2 törzs különböző evolúciós nyomásnak volt kitéve természetes körülmények között.

VII.2.2.Fácán rotavírusok

Munkám során hat fácán rotavírus teljes vagy részleges genom szekvenciájának meghatározásában vettem részt, melyek 2008 és 2014 között kerültek beküldésre a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának budapesti telephelyére (Budapest) az ország különböző pontjairól. A virológiai vizsgálaton kívül elvégzett bakteriológiai vizsgálat másodlagos *E. coli* fertőzést mutatott ki néhány esetben.

Az öt fácán eredetű bélsármintából négy esetben csak egy RVA törzs volt kimutatható, míg egy bélsárminta esetében törzskeveréket találtunk. Vizsgálataink során közülük összesen három teljes genom:

RVA/Pheasant-wt/HUN/14246/2008/G23P[37];

RVA/Pheasant-wt/HUN/18769/2011/G22P[35];

RVA/Pheasant-wt/HUN/17655/2008/G23P[37]/[30],

és további két törzs részleges genom:

RVA/Pheasant-wt/HUN/14958/2005/G19P[31];

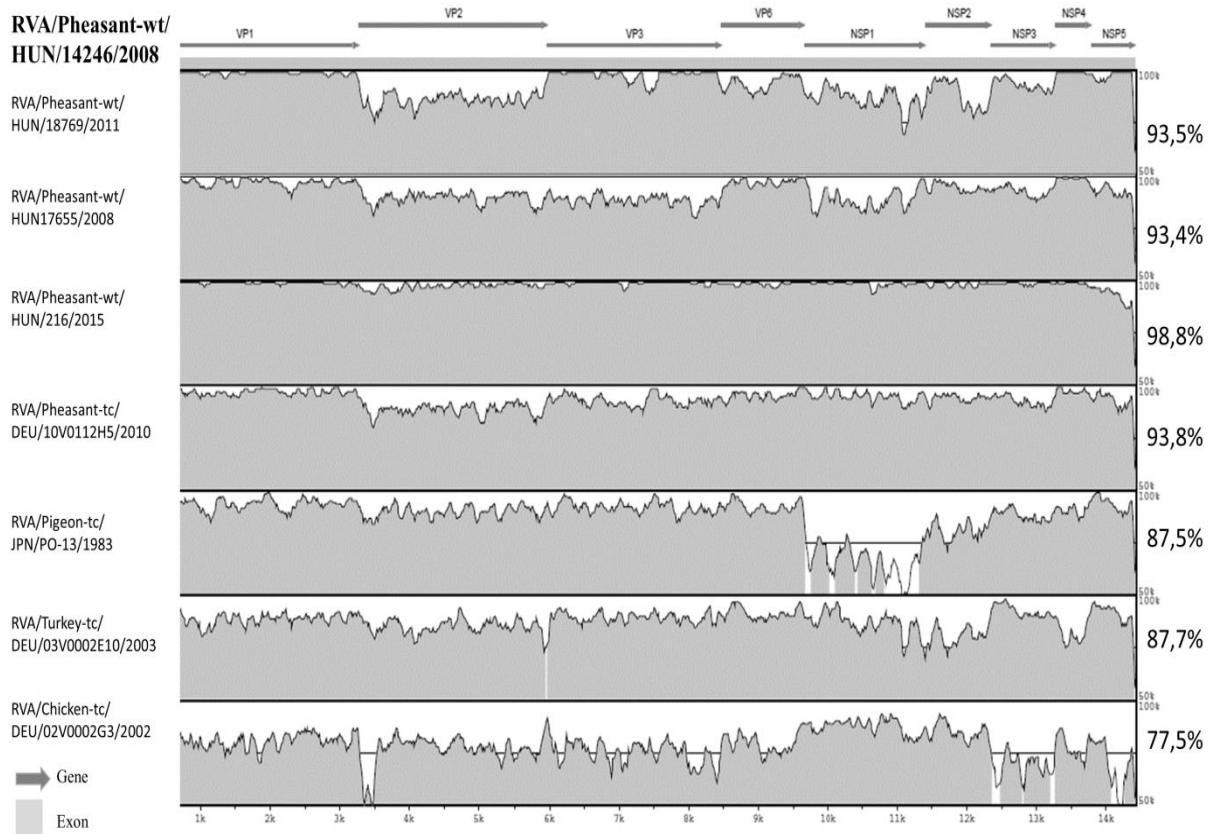
RVA/Pheasant-wt/HUN/19109/xxx/G22P[x]

került meghatározásra.

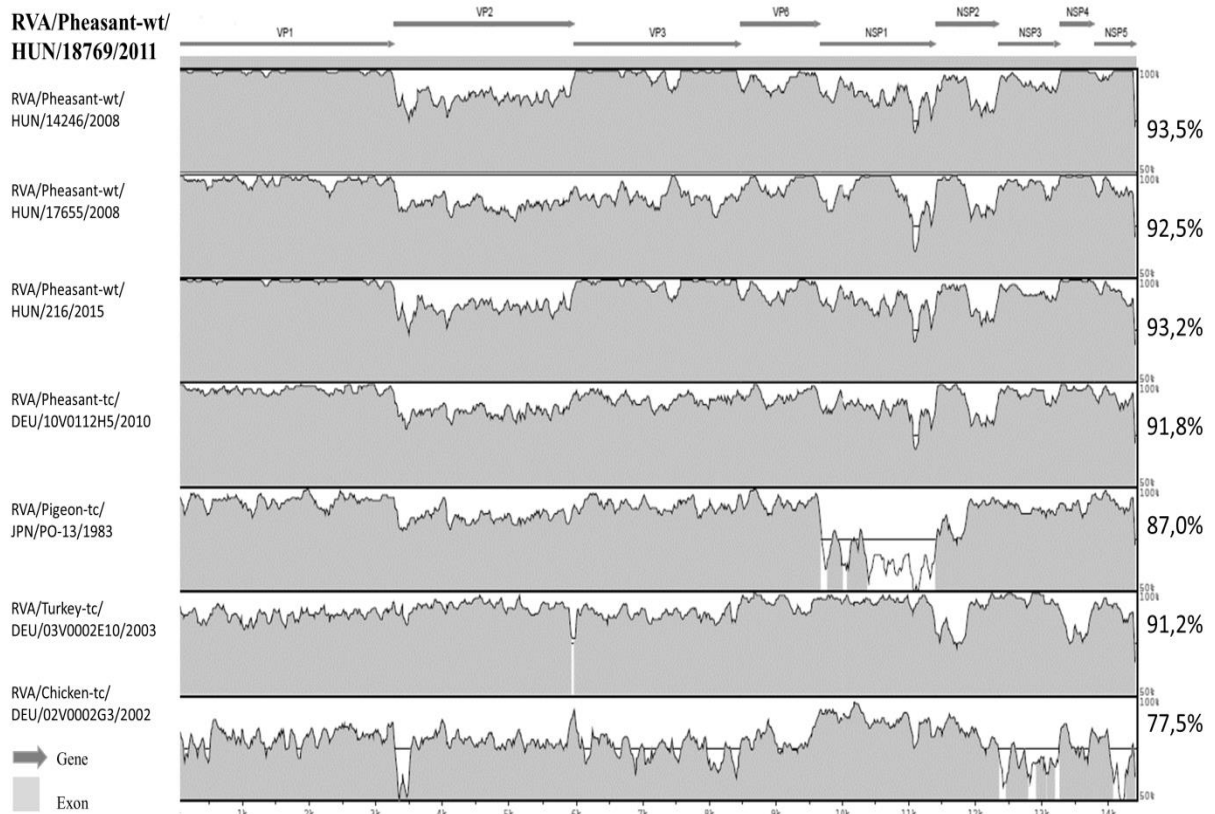
A továbbiakban a törzsek nevét rövidítve fogom alkalmazni: **RVA/Phe/14246; RVA/Phe/18769; RVA/Phe/17655; RVA/Phe/14958; RVA/Phe/19109.** A törzsek genotípus készletét a 7. Táblázat foglalja össze.

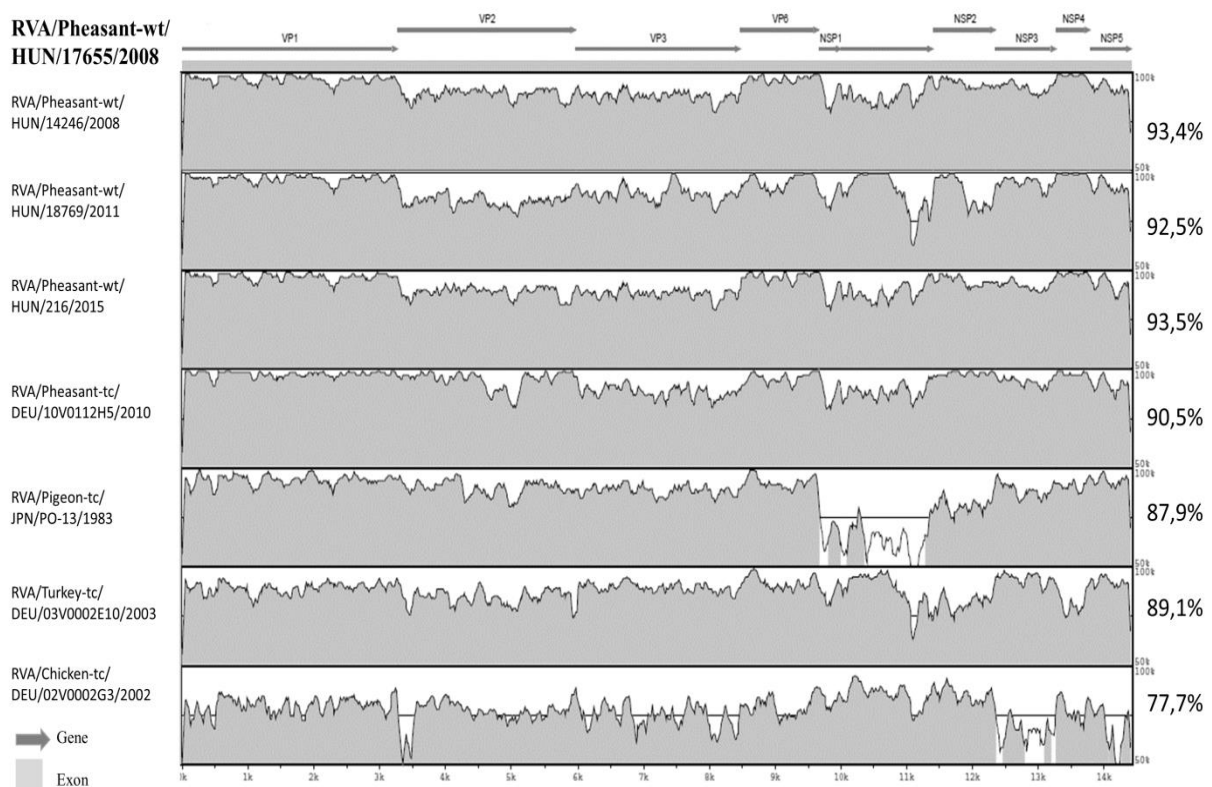
A teljes egészében meghatározott genomú **RVA/Phe/14246, RVA/Phe/18769** és **RVA/Phe/17655** törzsek genotípus összetétele nagyrészt a korábban meghatározott németországi és magyarországi fácán RVA konstellációját követi: I4-R4-C4-M4-A16-T4-E4-H4, számottevő különbségek csak a felszíni antigének (VP4 és VP7), valamint az NSP2 gén esetében mutathatók ki. (7. Táblázat.). Az ún. gerinc gének (VP1-3, VP6, NSP1-5) referencia törzsekkel való összehasonlítására az mVISTA programot alkalmaztam (16. ábra A-C). Ennek eredményeként elmondható, hogy a fenti géneken, azonos genotípusú madár RVA törzsek között magas fokú nt szekvencia megőrzöttség figyelhető meg az adott gének teljes hosszában. Az eltérő genotípusok esetében a nt szekvencia hasonlóság az elvártaknak megfelelően átlagosan alacsony, eltekintve néhány megőrzött régiótól, melyek feltehetően a fehérje funkciójának ellátásában kulcsszereppel bíró fehérjerészeket kódoló nukleinsav szakaszok (16. ábra A-C). A gerinc gének összefűzése által képzett konkatenált nt szekvencia összehasonlításakor a magyarországi fácán RVA törzsek között jelentős homológiát állapíthattunk meg (93,4-98,8%), beleértve a RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] referencia törzset, míg a németországi referencia fácán RVA törzssel, vagy más gazdafajú RVA törzsek közötti hasonlóság nem volt ilyen számottevő (77,5-93,8%). A páronkénti értékeket az 16. ábra jobb oldalán tüntettem fel.

A



B



C

16. ábra. Madár RVA törzsek teljes genom összehasonlítása. mVISTA programmal készített teljes, összeillesztett genom összehasonlítása a madár RVA törzseknek azonos, részlegesen azonos illetve eltérő genom összetételű referencia RVA törzsekkel, fácán (Pheasant), galamb (Pigeon), pulyka (Turkey), és tyúk (Chicken) gazdafajokból. A törzsnevek a bal oldalon találhatóak. A nt szekvencia hasonlóságot az y-tengely mutatja, a szürke árnyékolás a szekvencia konzerváltságát jelöli. A szürke nyilak a gének határait jelölik az összeillesztett genomban. A százalékos értékek a jobboldalon a teljes genomok nt szekvencia hasonlóságát mutatják a referencia törzsek és a (A) RVA/Phe/14246; (B) RVA/Phe/18769; (C) RVA/Phe/17655 törzsek között.

A részlegesen meghatározott genomú két fácán RVA törzset kizártam az mVISTA elemzésből a hiányos genomi információ miatt, ugyanakkor a génenkénti filogenetikai elemzésbe azok is szerepelnek. A gerinc génekkel ellentétben a felszíni antigének esetében az öt törzs meglehetősen változatosságot mutatott, három VP7 genotípus és négy féle VP4 genotípus volt jellemző rájuk (7. Táblázat.). Az **RVA/Phe/14246** törzs VP7 génje munkacsoportunk által már korábban meghatározásra került (Ursu, K. et al. 2009), és új genotípusnak bizonyult. A Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport hozzájárulásával a G23 genotípus jelölést kapta, referencia törzse pedig maga a **RVA/Phe/14246** törzs lett. Később egy Németországban meghatározott fácán RVA törzs VP7 génje szintén G23 genotípusúnak bizonyult (RVA/Pheasant-tc/DEU/10V0112H5/2010/G23P[37]). Az általunk újonnan meghatározott törzsek közül a **RVA/Phe/17655** törzs keverék egyik tagjának VP7 génje is G23 genotípusúnak bizonyult. Munkacsoportunk további két fácán törzs teljes genom

meghatározásakor is ezt a G23 genotípust állapította meg (RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37]; RVA/Pheasant/HUN/Phea15871/2008/G23P[x]) (Ursu, K. et al. 2009; Gál, J. et al. 2016). A négy G23 törzs között a nt szekvencia azonosság 91,1-96,8% közötti. A filogenetikai fán az **RVA/Phe/17655** törzs a németországi fácán törzssel alkotott közös leszármazási ágat (szekvenciális hasonlóság 92,8%) (14. ábra). Az **RVA/Phe/14246** törzs viszont a két magyarországi fácán törzssel (RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] és RVA/Pheasant/HUN/Phea15871/2008/G23P[x]) került egy ágra (szekvenciális hasonlóság 99,1% és 99,4%) (14. ábra). Az **RVA/Phe/18769** és **RVA/Phe/19109** törzsek G22 genotípusúnak bizonyultak, a genotípus referencia törzsével a szekvenciális hasonlóság 96,2% és 95,0% volt. A filogenetikai fán közös ágon szerepelnek, a genotípus referencia törzs mellett (RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10), a két, magyarországi pulyka RVA törzssel együtt, melyek a dolgozat következő fejezetében kerülnek elemzésre (*VII.2.3. Pulyka rotavírusok*). (14. ábra). A legnagyobb szekvenciális hasonlóságot egymással illetve az RVA/Turkey-wt/HUN/39/xxx/G22P[35] törzssel mutatták (95,6% és 97,9%) (6. Függelék táblázat.). Az RVA/Phe/14958 VP7 gén szekvenciája rövidsége ellenére elegendőnek bizonyult a genotípus meghatározáshoz, az elemzés alapján a G19 genotípushoz tartozik. Ezt a genotípust már több ízben kimutatták házityúk rotavírusokból. Az **RVA/Phe/14958** törzs VP7 génje 91–93% közötti nt szekvencia azonosságot mutatott más országokban azonosított házityúk rotavírus törzsekkel is. A VP7 filogenetikai fán azonban az **RVA/Phe/14958** rotavírus külön ágon foglalt helyet, elkülönülve a Németországban, Brazíliában, Dél-Koreában és Írországban azonosított G19 genotípusú törzsektől (Papp, H. et al. 2014c) (14. ábra).

A magyarországi fácán RVA törzsek VP4 gének genotípus meghatározása során négy féle genotípust találtunk. Az **RVA/Phe/14246** törzs, és az **RVA/Phe/17655** törzskeverék egyik tagja P[37] genotípusúnak bizonyult, 95,8% és 91,1%-os nt szekvencia azonosságot mutatva a genotípus referencia törzssel, azonban mindkét törzs a magyarországi RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] törzshöz hasonlított leginkább (nt hasonlóság 91,7%; 98,4%). A filogenetikai fán ez a négy törzs jól elkülönülő, közös leszármazási ágat alkot, mely közelebb áll a referencia emlős RVA törzsek alkotta külcsoporthoz, mint a többi genotípus alkotta madár RVA ághoz (15. ábra). Az **RVA/Phe/17655** törzskeverék másik tagja P[30] genotípusúnak bizonyult, mely genotípust eddig tyúk RVA törzsekből mutatták ki szerte a világon (Németország, Dél-Korea). A magyarországi törzs a filogenetikai fán a házityúk törzsekkel egy ágon, de azoktól élesen elkülönülve (15. ábra), mérsékelt szekvenciális hasonlóságot mutatva (nt hasonlóság 83,1-83,6%), szerepel. Az **RVA/Phe/18769** törzs VP4 génje P[35] genotípusúnak volt beazonosítható, mely genotípus ez idáig inkább pulyka RVA törzsekre volt jellemző, kivétel két házityúk RVA törzset (CH2 és BRS/115). A magyarországi fácán RVA törzs egy szintén magyarországi, de pulya RVA

törzzsel (RVA/Turkey-wt/HUN/39/xxx/G22P[35]) alkotott közös leszármazási ágat, elkülönülve a többi P[35] törzstől (nt hasonlóság 98,4%) (14. ábra). A **RVA/Phe/14958** törzs rövid génszakasza megfelelő hosszúságú volt a genotipizáláshoz, így azt P[31] genotípusúként azonosítottuk. Ez a genotípus egy németországi házityúk RVA törzsben került először leírásra (06V0061G1), mellyel a saját törzsünk 96%-os, míg brazil házityúk RVA törzsekkel 85-86%-os nt szekvencia hasonlóságot mutatott (adatok a (Papp, H. et al. 2014c) cikkből) és ennek megfelelően a 06V0061G1 referencia törzzsel alkotott közös ágat (15. ábra).

A gerinc gének VP1-3 és VP6 filogenetikai elemzése alapján elmondható, hogy a magyarországi fácán törzsek az R4, C4, M4 és I4 genotípusokon belül egymáshoz közeli leszármazási ágat alkotnak, mely gyakran elkülönül a németországi fácán RVA törzstől, illetve a R4, C4, M4 és I4 genotípusokon belüli más madár RVA törzsektől (4. Függelék ábra A-D). Ez alól kivétel az **RVA/Phe/18769** törzs, mely VP2 és VP6 génje alapján a pulyka RVA törzsekkel rendeződött közös ágra, és a legmagasabb nt azonosságot a magyarországi RVA/Turkey-wt/HUN/40/xxx/G22P[31] és németországi pulyka RVA törzzsel mutatta (nt hasonlóság 96,7% és 97,2%) (4. Függelék ábra B és D, 6. Függelék táblázat.).

Az **RVA/Phe/14246** törzs mind a négy gén esetében a magyarországi RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] törzzsel mutatta a legmagasabb nt szekvencia hasonlóságot (nt hasonlóság 99,1-99,6%), ennek megfelelően közös ágon szerepeltek (4. Függelék ábra A-D). Az **RVA/Phe/17655** törzs VP1 génje alapján a németországi fácán RVA törzzsel került közös csoportba (nt hasonlóság 99,6%); a VP2 és VP6 gének esetében azonban a részlegesen meghatározott két törzzsel (**RVA/Phe/19109**; **RVA/Phe/14958**) alkotott közös leszármazási ágakat (4. Függelék ábra A-B). Végül, a VP3 a gén esetében, mérsékelt nt szekvencia hasonlóság mellett (881,-89,7%), teljesen elkülönült a genotípus többi tagjától, (6. Függelék táblázat és 4. Függelék ábra C).

Az NSP1, NSP3 gének esetében az A16, és T4 genotípust határoztuk meg. Filogenetikai elemzésükről elmondható, hogy az **RVA/Phe/18769** törzs pulyka RVA törzsekkel rendeződött közös ágra, a legnagyobb szekvenciális hasonlóságot a magyarországi pulyka RVA/Turkey-wt/HUN/40/xxx/G22P[31] törzzsel mutatta (nt hasonlóság 99,1-99,4%). (4. Függelék ábra E és G. és 6. Függelék táblázat.). E gének tekintetében az **RVA/Phe/14246** törzs a magyarországi RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37], és németországi fácán törzsekkel alkotott közös ágat, 94,9-98,9% közötti nt szekvencia hasonlósággal (4. Függelék ábra E és G. és 6. Függelék táblázat). Ugyanakkor az **RVA/Phe/17655** törzs e gének esetében általában elkülönülten helyezkedett el a genotípus többi tagjától, mérsékelt nt szekvencia hasonlóságot mutatva (nt hasonlóság NSP1: 90,3-94,1%; NSP3: 90,4-95,5%). (4. Függelék ábra E-G. és 6. Függelék táblázat.).

Az NSP2 gén tekintetében az **RVA/Phe/14246** és az **RVA/Phe/17655** fácán törzsek egyedülállóak, mivel N10 genotípusú fordul elő bennük, mely ez idáig csak két fácán törzsből került kimutatásra: a referencia németországi RVA törzsből (RVA/Pheasant-tc/DEU/10V0112H5/2010/G23/P[37] illetve kutatócsoportunk által egy további magyarországi fácán törzsből (RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37]) (Gál, J. et al. 2016). Így az általunk vizsgált két fácán RVA törzs a fenti két referencia törzssel alkotott elkülönülő leszármazási ágat, közöttük a nt szekvencia hasonlóság 91,8-98,5% között változott (4. Függelék ábra F. és 6. Függelék táblázat). A harmadik fácán törzs, z **RVA/Phe/18769** NSP2 génje N4 genotípusúnak bizonyult, mérsékelt hasonlóságot mutatva a genotípus további tagjaival, a legnagyobb nt szekvencia hasonlóságot a magyarországi pulyka RVA/Turkey-wt/HUN/40/xxx/G22P[31] törzssel mutatta (nt hasonlóság 90,1%) (6. Függelék táblázat). A filogenetikai fán elkülönül a genotípus többi tagjától, és a fácán RVA törzsekre jellemző N10 genotípus mellett helyezkedett el (4. Függelék ábra F.).

Az NSP4 gén esetében a magyarországi fácán törzsek az E4 genotípusba tartoztak, mely genotípuson belül a németországi fácán törzssel, továbbá a magyarországi RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] törzssel közös ágat alkottak, elkülönülve a genotípus további tagjaitól (4. Függelék ábra H.). A magyarországi fácán RVA törzsek NSP4 génjei között 97,5-99,6%-os nt szekvencia hasonlóságot állapítottunk meg (6. Függelék táblázat).

Az NSP5 gén esetében H4 genotípuson belül az **RVA/Phe/18769** törzs az **RVA/Phe/14246** törzssel és a két részlegesen meghatározott szekvenciájú törzssel (**RVA/Phe/14958**; **RVA/Phe/19109**) alkot közös leszármazási ágat, közöttük a nt szekvencia azonosság 95,6-100%. Ez az ág élesen elkülönül a genotípus többi tagja által alkotott kládtól (4. Függelék ábra I.). Az **RVA/Phe/17655** törzs külön ágat alkot a genotípuson belül, elkülönülve a többi magyarországi törzstől, a különálló RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] és németországi fácán RVA törzsektől, legmagasabb nt szekvencia azonosságot (94,2%) a genotípus referencia törzsével mutatta (RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17]) (4. Függelék ábra I.).

A hozzáférhető, a genom teljes hosszán megszekvenált madár A csoportú rotavírusok limitáltsága ellenére megállapítható, hogy nagyfokú variabilitást tapasztalható a felszíni antigének esetében, míg az ún. gerincgének viszonylag megőrzöttek. Két fő genotípus összetétel választható el, a főként házityúk RVA-kra jellemző (zöld jelölés a 7. Táblázatban) és a pulyka, galamb, és fácán törzseke jellemző (kék jelölés a 7. Táblázatban). De számos bizonyíték fellelhető az irodalomban a rotavírus gazdafajok közötti átmenetelére (Matthijnssens, J. et al. 2006b; Nguyen, T.A. et al. 2007; Steyer, A. et al. 2008; Ha, T.P.M. et al. 2009; Esona, M.D. et al. 2010; Matthijnssens, J. et al. 2010b; Matthijnssens, J. et al.

2011b; Ghosh, S. et al. 2013) és a reasszortációra madár RVA törzsek között (Schumann, T. et al. 2009).

A Magyarországon gyűjtött fácán RVA törzsek meglehetősen változatosságot mutatnak. Az **RVA/Phe/14246** törzs leginkább a RVA/Pheasant-wt/HUN/216/2015/G23P[37] törzshöz és németországi fácán RVA törzshöz hasonlatos. E genomokat egyedi konstelláció jellemez ahol, a felszíni antigének genotípusa (G23P[37]) és az NSP2 egyedi genotípusa (N10). Kiterjedt nt szekvencia azonosságuk, egyedi genom összetételük, mely eltérő időbeli és földrajzi származásuk ellenére egységes, arra enged következtetni, hogy ez a genom konstelláció nagymértékben adaptálódott a fácán gazdafajhoz.

Az **RVA/Phe/17655** törzskeverék két RVA törzset tartalmazott, melyek csak a VP4 felszíni antigénjeikben tértek el (P[37] és P[30]), a többi génjük esetében a genotípusok egyeztek, csupán néhány bázispár eltérést tudunk kimutatni (az adatokat nem tüntettem fel). A két törzs elválasztása meghaladta kutatólaborunk lehetőségeit. Genom összetételét tekintve a fácán-pulyka-galamb RVA ágba tartozik, ugyanakkor több gén esetében is (VP3, NSP1, NSP3, NSP5) egyedülálló leszármazási ágat képvisel. A G23P[37] tipikus fácán RVA genotípus kombináció, míg a P[30] házityúk RVA-kat jellemző genotípus. E két törzs együttes kimutatása azonos mintából felfogható a párhuzamos fertőződés bizonyítékaként, ami lehetőséget teremt a reasszortációs jelenségek bekövetkezésére.

Az **RVA/Phe/18769** törzs filogenetikai elemzése összetett származást mutatott, melyet többszörös reasszortáció eredményezhetett. A felszíni antigének G22P[35] kombinációja és az N4 genotípusú NSP2 gének korábban pulyka törzsekben kerültek kimutatásra (pl. RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35]) (Trojnar, E. et al. 2013). Továbbá, a VP2, VP6, NSP1-3 gének esetében is az **RVA/Phe/18769** törzs a pulyka RVA törzsekkel alkotott monofiletikus leszármazási ágakat, elkülönülve mind a magyarországi, mind a németországi fácán RVA törzsektől. Ennek a törzsnek a G22-P[35]-I4-R4-C4-M4-A16-N10-T4-E4-H4 genom összetétele legalább hat olyan gént tartalmaz (aláhúzva), melyek a (magyarországi) pulyka RVA törzsekhez közelebbi leszármazást mutatnak, mint azonos időben és területen gyűjtött fácán RVA törzsekhez viszonyítva (4. Függelék ábra).

A részlegesen meghatározott fácán RVA törzsek elemzése további reasszortációs eseményeket feltételez. Az **RVA/Phe/14958** törzs G19P[31] genotípus kombinációja feltételezhetően a házityúk-szerű RVA és a fácán-szerű RVA törzsek reasszortációjának az eredménye. Míg az **RVA/Phe/19109** törzs G22 genotípusú VP7 génje egy pulyka-szerű RVA törzs és egy fácán-szerű RVA törzs reasszortációjából eredhet. Ugyanakkor a teljes genomok meghatározása nélkül egyértelmű eredetük megállapítása nem lehetséges.

VII.2.3. Pulyka rotavírusok

Két pulyka RVA törzs teljes genomját határoztuk meg új generációs szekvenálás segítségével, melynek részleteit a VI.7.2. *IonTorrent szekvenálás* fejezet írja le. A törzseket a NÉBIH bocsájtotta rendelkezésünkre, magyarországi mintagyűjtésből származnak, ugyanakkor a mintagyűjtés idejéről nem rendelkezünk információval.

A két törzs: RVA/Turkey-wt/HUN/39/xxx/G22P[35] és RVA/Turkey-wt/HUN/40/xxx/G22P[31], (továbbiakban **RVA/Tur/39** és **RVA/Tur/40**) teljes genom genotípus konstellációja csak a VP4 felszíni antigén genotípusban tér el: G22-P[35]/[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4. A gerinc gének esetében tipikus pulyka RVA genotípusok kerültek kimutatásra. Az **RVA/Tur/39** felszíni antigén jellemző kombinációt (G22P[35]) eredetileg is pulyka RVA törzsből mutatták ki (Schumann, T. et al. 2009) (7. Táblázat.), ugyanakkor az **RVA/Tur/40** törzs G22P[31] antigén kombinációja szokatlan, mivel a P[31] genotípust korábban főként házityúk RVA törzsekben, illetve kutatócsoportunk által vizsgált RVA/Phe/14958 fácán RVA törzsből fordult eddig elő (Schumann, T. et al. 2009; Papp, H. et al. 2014c). A felszíni antigének, referencia törzsekhez való hasonlítása során a következő eredményeket kaptuk: a két törzs VP7 génje egymással mutatta a legmagasabb nt szekvencia azonosságot (nt 97,9%), valamint a szintén G22 genotípusú RVA/Phe/18769 fácán RVA törzssel (nt 91,8-97,9%). A filogenetikai fán a két magyarországi pulyka törzs közös ágat alkotott az említett fácán RVA törzssel, elkülönülve a G22 genotípus referencia törzstől (RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35]), és a másik magyarországi G22 fácán RVA törzstől (RVA/Phe/19109) (14. ábra). A VP4 gén esetében a P[35] **RVA/Tur/39** törzs legnagyobb nt szekvencia hasonlóságot a fácán RVA/Phe/18769 törzssel mutatta (nt 98,4%), a filogenetikai fán közös ágat alkottak és elkülönültek a többi pulyka, és házityúk P[35] törzstől (15. ábra). A P[31] **RVA/Tur/40** törzs legmagasabb nt szekvencia azonosságot a RVA/Chicken-wt/KOR/D62/2013/P[31] törzssel mutatta (nt 94,8%). Ez az érték magasabb volt, mint a P[31] genotípus referencia törzssel mutatott hasonlóság (nt 84,8%). Ennek megfelelően a RVA/Chicken-wt/KOR/D62/2013/P[31] törzssel alkotott közös ágat, elkülönülve genotípus referencia törzstől és a szintén P[31] genotípusú magyarországi fácán RVA/Phe/14958 törzstől (15. ábra).

A filogenetikai elemzés minden gén esetében hasonló eredményt adott, a két magyarországi pulyka törzs közös ágon, egymás mellett helyezkedett el, a legtöbb esetben a pulyka referencia törzsnek számító RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35] törzssel illetve az RVA/Turkey-tc/TUR/Ty-1/1979/G17P[38], és RVA/Turkey-tc/TUR/Ty-3/1979/G7P[35] pulyka törzsekkel egyetemben. (4. Függelék ábra). A két magyarországi pulyka RVA törzs közötti nt szekvencia hasonlóság az azonos genotípusú gének esetében 96,7-99,4% között adódott, míg ezen gének nt szekvencia egyezése a referencia

RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35] törzssel összevetve 90,0-97,9% (**RVA/Tur/39**) és 90,1-97,5% (**RVA/Tur/40**) között változott (7. Függelék táblázat.). A VP2, VP6, NSP1, NSP3 gének tekintetében a két magyarországi pulyka törzs közös ágon helyezkedett el a magyarországi fácán RVA/Phe/18769 törzssel (4. Függelék ábra B, D, E, G.). A nt szekvencia azonosság e gének esetében az **RVA/Tur/39** és RVA/Phe/18769 törzs között: VP2: 95,9%; VP6: 92,5%; NSP1: 97,8% NSP3: 98,9% ; míg az **RVA/Tur/40** és RVA/Phe/18769 törzs között: VP2: 96,7%; VP6: 91,8%; NSP1: 99,1% NSP3: 99,4% (7. Függelék táblázat.).

A nt szekvencia összehasonlító elemzés, és a filogenetikai vizsgálat alapján elmondható, hogy míg az **RVA/Tur/39** magyarországi pulyka törzs megfelelt a pulykákban előforduló tipikus A csoportú rotavírus törzsnek, (nt szekvencia azonossága a referencia törzsnek számító RVA/Turkey-tc/DEU/03V0002E10/2003/G22P[35] németországi pulyka törzssel >90% volt) addig az **RVA/Tur/40** törzs vélhetően egy házityúk RVA törzssel való reasszortáció révén tehetett szert a gazdafajban szokatlan P[31] VP4 felszíni antigénjére.

VIII. Megbeszélés

VIII.1. Gyakorlati hasznosulás

A rotavírusok meglehetősen nagy genetikai variabilitása szükségessé tette az osztályozási rendszer megújítását. Korábban a rotavírus csoportokat szerotipizálás alapján osztották csoportokra, illetve a vírusgenom poliakrilamid gélen történő elválasztásával kapott mintázat alapján. Ez a két módszer eléggé megbízhatatlannak bizonyult a keresztreakciók, a hiányos antiszérumok, illetve az elektroforetikus migrációs mintázat pontatlan összehasonlíthatósága miatt. Ma már a csoportokba sorolás genetikai alapon történik, a VP6 gént kódoló genom szegmens szekvenciája alapján. A közelmúltban pedig bevezetésre került az új klasszifikációs rendszer melynek alapja a teljes genom nukleinsav szekvenciájának összehasonlítása (Matthijnssens, J. et al. 2011a). Vizsgálataink kezdetén még számos gazdafaj rotavírusáról nem rendelkezünk teljes genetikai információval, ezért célul tűztük ki a ritka, vagy nehezen meghatározható rotavírus törzsek teljes genom szekvenálását klasszikus molekuláris módszerekkel. Doktori munkám kezdetén kutatócsoportunk infrastrukturális háttere a klasszikus molekuláris módszerek, mint vírus RNS izolálás, PCR, reverz transzkripció, nukleinsav szekvenálás alkalmazását tette lehetővé. Ezen módszereket felhasználva és finomítva sikeresen határoztam meg két ló, és három fácán RVA törzs teljes genomját, valamint két fácán és egy teve RVA törzs részleges genomját. E genomok meghatározásához több ponton módosítottam a klasszikus RT-PCR protokollt, valamint számos primert terveztem, melyek a későbbiekben publikálásra kerülhetnek, és elősegítik a fentebb említett gazdafajok vírustörzseinek azonosítását, illetve genotipizálását.

Bár a klasszikus molekuláris módszerek közé tartozó „primer walking” technika jól alkalmazhatónak bizonyult munkám során, rendkívül idő- és munkaigényes, főként az új genotípusok meghatározása esetén. Ezzel szemben az új generációs szemikonduktív szekvenálás lehetővé teszi a szekvenálás megbízható, viszonylag gyors, és kevésbé munkaigényes elvégzését. E technika egyre elterjedtebb a rotavírus kutatásban is, lehetővé téve a szekvencia-független amplifikáció segítségével az új genotípusok, sőt eddig ismeretlen új rotavírus csoportok genomjának meghatározását (Mlera, L. et al. 2011; Minami-Fukuda, F. et al. 2013; Masuda, T. et al. 2014; Mihalov-Kovács, E. et al. 2015; Bányai, K. et al. 2017).

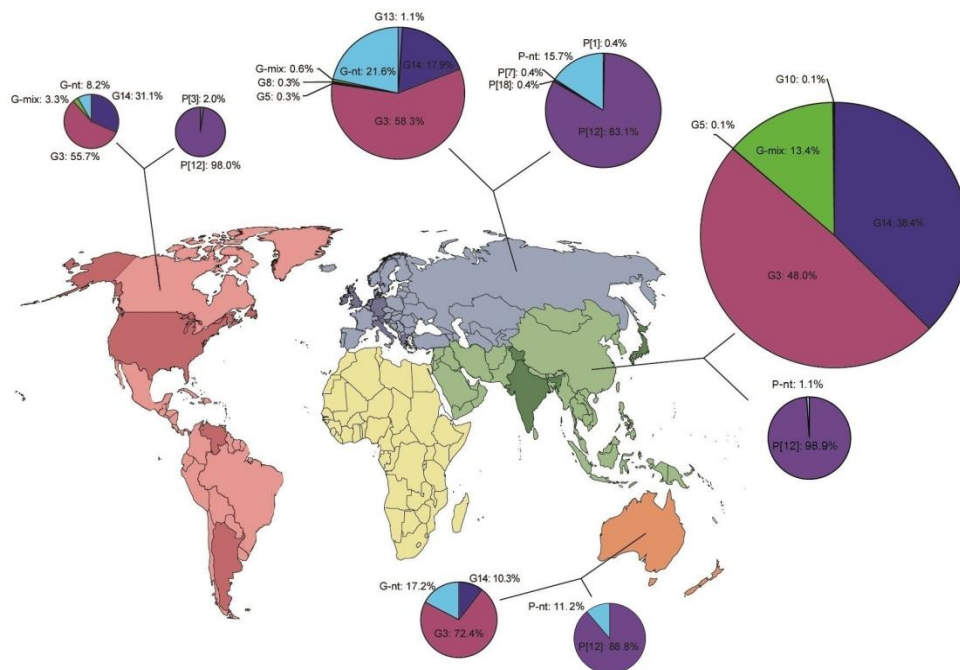
A módszer hátránya, hogy a költségigénye jelenleg még magas, valamint hogy a genom egyes részein, pl. a repetitív régiókban, nehézkes a kapott szekvencia sorozatok megbízható illesztése. Kifejezetten a rotavírusok vizsgálatához, valamint a hatékonyság javítása és a költségek csökkentése érdekében a teljes vírusgenom meghatározó protokollok finomhangolására volt szükséges. Ehhez járult hozzá kutatócsoportunk is két már megjelent,

és ebben a dolgozatban is részletezett, teljes RVA genom meghatározásának leírásával (Papp, H. et al. 2014b; Papp, H. et al. 2015); illetve további, a dolgozatnak részét nem képező A csoportú, és nem-A csoportú rotavírus genom meghatározásának leírásával (Mihalov-Kovács, E. et al. 2015; Gál, J. et al. 2016; Bányai, K. et al. 2017).

VIII.2.Emlős rotavírusok

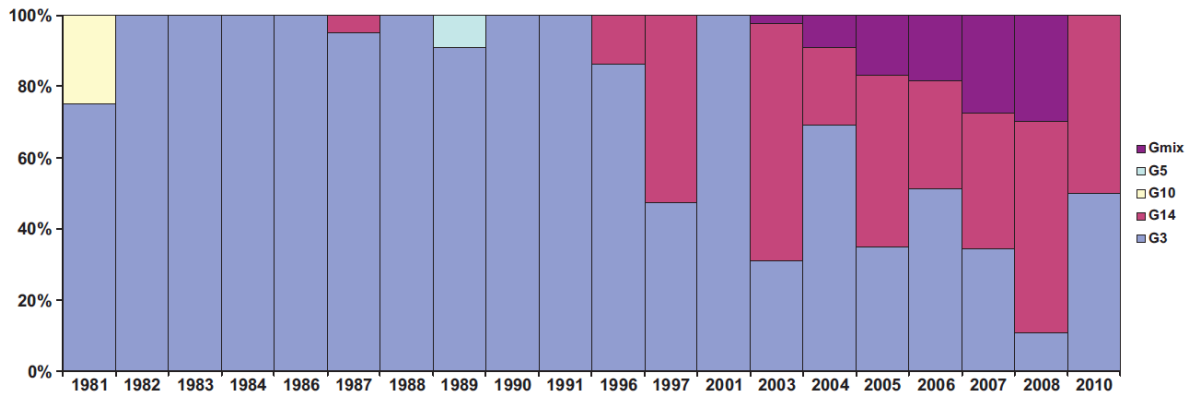
Számos vizsgálat igazolta, hogy az RVA okozta gasztroenteritisszel szemben a leghatékonyabb védekezés az újszülöttek vagy a várandós anyák oltása, az emberekben, és a különböző állatfajokban egyaránt (Dhama, K. et al. 2009). Vizsgálatainkkal hozzá kívántunk járulni az emlős rotavírusok epidemiológiájának behatóbb ismeretéhez, mely elengedhetetlen a hatékony vakcinációs programok kialakításához. Az epidemiológiai vizsgálatok szerves része a ritka vagy nehezen tipizálható RVA törzsek meghatározása. Vizsgálatainkkal pontosabb képet kaphatunk a cirkuláló nem-tipikus, a vakcinázás által kiváltott védelem áttörésével betegséget kiváltó RVA törzsek genotípus összetételéről és azok arányáról a vizsgált populációkban. Mivel a rotavírusok zoonotikus tulajdonsága ismert (Martella, V. et al. 2010), így az állati rotavírusokkal kapcsolatos ismeretek bővítése hasznos adatokat szolgáltat a humán RVA törzsek elleni védekezésben.

A ló A csoportú rotavírusok epidemiológiájának jobb megismerése érdekében összehasonlító vizsgálatot végeztünk 1975-2013 között megjelent, ló RVA VP7 és VP4 genotípus adatokat tartalmazó szakirodalmi cikkek felhasználásával (Papp, H. et al. 2013b). A feldolgozott 36 tanulmányban az összesen vizsgált minták >50%-a mutatott RVA pozitivitást, ezek >80%-át sikeresen genotipizálták. Bár a törzsekben hat féle G genotípust és hat féle P genotípust mutattak ki, 99,2%-uk a G3P[12] vagy G14P[12] genotípusba tartozott, a G3P[12] kombináció több mint kétszeres gyakoriságúnak bizonyult a G14P[12]-hoz képest (61,7% és 31,5%) (Papp, H. et al. 2013b). A vizsgálatok négy kontinens, 12 országból származtak (17. ábra), a genotípusok eloszlása egyes országoként is a G3 dominanciáját mutatta (G3: 48-72%), amelyet a G14 követ (G14: 10-38%), míg a P[12] az abszolút uralkodó VP4 genotípus volt.



17. ábra. Gyakori és ritka ló RVA törzsek eloszlása világszerte. A földrajzi régióként sötéttel kiemelt országokból rendelkezünk adatokkal. Rövidítések: mix: kevert genotípus, nt: genotipizálás sikertelen volt. A kördiagramok mérete arányos az adott területről származó adatok mennyiségével. Eredeti ábra (Papp, H. et al. 2013b).

Időben elhúzódó genotípus eloszlás vizsgálatához a Japánból származó adatokat használtuk fel. A közel három évtized (1981-2010) alatt megjelent tanulmányokban a G3 genotípus mutatkozott uralkodónak. A G14 genotípus megjelenését Japánban egy retrospektív vizsgálat már 1987-re datálta, kimutatása azonban csak a '90-es évek óta vált rutinszerűvé. Az elmúlt 15 évben jelentősen megnövekedett a G14 genotípus aránya a vizsgált törzsekben, és egyes években meghaladta a G3 genotípus gyakoriságát (18. ábra). A meglátásunk szerint a G14 genotípus gyakoriságának megnövekedése a '90-es évekre tehető, amely egybevág néhány, a 2000-es években készült hosszú távú vizsgálat eredményeivel Argentínából és Írországból (Barrandeguy, M. et al. 1997; Collins, P.J. et al. 2008).



18. ábra. Gyakori és ritka ló RVA törzsek időbeli eloszlása. A relatív előfordulása az egyes G genotípusoknak a Japánból származó vizsgálatokban közel 3 évtized alatt. Eredeti ábra (Papp, H. et al. 2013b) .

A feldolgozott adatok alapján megállapítható, hogy szinte kizárólagosan két fő antigén kombináció G3P[12] és a G14P[12] jellemzi a ló RVA törzseket a világ különböző területein. Ez az epidemiológiai tulajdonság nem jellemző egyéb gazdafajok RVA fertőzéseire, ahol is a domináns genotípus kombinációk mellett nagy arányban megtalálhatóak nem-specifikus genotípus kombinációk is. Például több alkalommal is mutattak ki szarvasmarha eredetű törzseket sertés vagy humán mintákban és *vica versa*, ugyanakkor a ló-specifikus RVA genotípus kombinációt eddig semmilyen más gazdafajból nem került kimutatásra (Matthijnsens, J. et al. 2009a; Martella, V. et al. 2010; Bányai, K. et al. 2012; Papp, H. et al. 2013b). A ló, mint gazdafaj mérsékelten fogékonyak bizonyult más gazdafaj RVA törzseivel szemben, erre utal a szórványosan kimutatott eltérő genotípus kombinációjú ló RVA törzsek léte. Ez az egyirányú gazdafajok közötti átmenet további analízisre érdemes. Számos vizsgálat alapján feltételezik, hogy a két uralkodó VP7 genotípus, a G3 és G14 között magas fokú antigenitásbeli hasonlóság áll fent, ami hozzájárul a kereszt védelem kialakulásához (Imagawa, H. et al. 2002; Imagawa, H. et al. 2005; Nemoto, M. et al. 2015). Egy korábbi vizsgálat kimutatta, hogy a G14 típusú RVA okozta hasmenéses megbetegedés enyhébb lefolyású formában jelentkezett olyan lovak csoportjában, amelyeket inaktivált G3 RVA vakcinával immunizáltak, a vakcinával nem kezelt lovakhoz képest (Imagawa, H. et al. 2005). Ugyanakkor a G14 genotípus fokozott elterjedésének oka lehet a G3 típusú vakcinák használatából adódó evolúciós nyomás (Matthijnsens, J. et al. 2015).

Kutatócsoportunk egy nemzetközi kooperáció aktív részvevőjeként, elsőként a világon, több teljes ló RVA genomot határozott meg. Elmondható, hogy e gazdafaj törzsei erősen konzervatív genom konstellációval rendelkeznek, melyben az egyes gének genetikai változatossága is alacsony. A jellemző genom összetétel a G3/G14-P[12]-I2/I6-R2-C2-M3-A10-N2-T3-E2-H7 genotípusokat tartalmazza. E genotípusok közül néhány ez idáig kizárólag

ló RVA törzsek közül volt kimutatható (aláhúzott), de a többi genotípusokon belül is a ló RVA törzsek jellemzően önálló leszármazási ágat alkotnak. Ez a magas genetikai konzerváltság lassú molekuláris evolúcióra utalhat, amely meglepő az A csoportú rotavírusok eddigi evolúciós tulajdonságai alapján, melyben szerepet játszik a reasszortáció növelve a genetikai változatossághoz. Ez a konzervált genom a ló RVA-k esetében szilárd bázisként szolgálhat további, még hatásosabb vakcinák fejlesztéséhez az epidemiológiailag legfontosabb RVA törzsek ellen (Matthijssens, J. et al. 2012a). A nemzetközi együttműködésben végzett ló RVA teljes genom meghatározással, valamint az általunk elkészített irodalmi összehasonlító munkával hozzájárultunk ennek a kevésbé ismert RVA típusnak a jobb megismeréséhez.

Feldolgoztunk továbbá olyan emlős RVA törzseket, melyek gazdafaji populációiban kevésbé tanulmányozott a rotavírus fertőzöttség aránya és a cirkuláló genotípusok megoszlása. Ilyen mellőzött csoportot képeznek például a kiskérődzők és tevéfélék rotavírusait. Ezen gazdafaj eredetű RVA törzsek közös genetikai jellemzője a szarvasmarha RVA törzsekhez hasonló genom összetétel, mely a VP1-VP2-VP3-VP6-NSP1-NSP2-NSP3-NSP5 gének esetében jellemzően az R2/R5-C2-M2-I2/I10-A11-N2-T6-H3 genotípusokat hordozza. Az egyéb gének esetében nagyobb diverzitást tapasztalható: az NSP4 gént néhány, míg a naturalizációs antigéneket kódoló géneket (VP7 és VP4) számos genotípus jellemzi. A tipikus VP7 genotípusok (G8 és G10) nagyszámú további állatfaj, mint sertés, szarvasmarha, humán és néhány majom, rotavírusaiból is kimutatásra kerültek. Ugyanakkor bizonyos genotípusok ez idáig kizárólag kiskérődző eredetű RVA törzsekben fordultak elő. Ilyen például a P[15] genotípus, mely csak juh, kecske és az általunk vizsgált tevé RVA törzsekben volt jelen, az I10 VP6 genotípus, mely kínai juh és kecske RVA-kra jellemző, vagy az A18 NSP1 és az E15 NSP4 genotípus, melyek ó-világi tevék RVA törzseiben kerültek meghatározásra (Chen, Y. et al. 2009; Jere, K.C. et al. 2014; Papp, H. et al. 2014a).

Saját vizsgálataink alapján megállapítható, hogy az ó-világi tevétől származó RVA törzs emlősökre jellemző, de azoktól szignifikánsan eltérő NSP4 génnel rendelkezik (E15 genotípusú), míg az egyéb géneiről nyert részleges szekvencia adatok alapján a kérődzők RVA törzseivel közös leszármazási útvonalból származhat. A kis kérődzők és tevék rotavírusainak gazdafajváltását és reasszortációját nagyban segíti a jellemzően közös tartás, átfedő legeltetés. Ugyanakkor érdekesség, hogy a tevékben újonnan megjelenő fertőző betegségek jellemzően a lovakkal közös tartásból erednek, például a tevék *Rhodococcus equi* fertőzései (Khalafalla, A.I. et al. 2012). A vizsgált törzs számos eltérést mutatott az eddig ismert tevé RVA törzsektől, mely a gazdafaj rotavírusainak változatos genetikai állományra utal. Ugyanakkor ezen tevé RVA genom szokatlan hasonlósága egyes ismert humán RVA törzsekhez feltételezi, hogy az humán és állati RVA törzsek reasszortációja

során keletkezett, mint például az RVA/Human-wt/HUN/Hun5/1997/G6P[7] törzs, mely vélhetően sertés RVA eredetű (Bányai, K. et al. 2003).

Az epidemiológiai adatok hiányossága a kiskérődzők RVA-al kapcsolatosan talán annak tudható be, hogy más, nagy morbiditású patogén mikroorganizmusok már leírásra kerültek akut, dehidratációhoz vezető, gastroenteritis megbetegedésekből, ugyanakkor rotavírusok tünetmentes egyedekben is fellelhetők, ami inkább csak másodlagos szerepükre utal e kórképekben. Bár, megjegyezendő, hogy visszatérő, nagy morbiditással és mortalitással járó járványokat is leírtak e gazdafajok körében, melyek háttérében rotavírusok álltak. Így felmerül a rutin diagnosztika fejlesztésének, valamint a vakcinázás elterjesztésének szükségessége, melyhez bizonyosan hozzájárul minden újabb kiskérődző eredetű RVA törzs meghatározása (Papp, H. et al. 2014a).

Egy másik, kevésbé tanulmányozott gazdafaj a kutya, melyben nem az RVA bizonyult gastroenteritis esetek fő kórokozójának, habár az *in vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy a fiatal egyedekben jelentős megbetegítő képességgel rendelkezik (Johnson, C. et al. 1986). Ez idáig csupán hat kutya RVA teljes genom került meghatározásra, melyek nagyon hasonló genom konstellációval rendelkeztek: G3-P[3]-I3-R3-C3/2-M3-A15/A9-N2-T3-E3-H6. Ezt a G3P[3] felszíni antigén kombinációval rendelkező, többféle eredetű RVA törzsekre jellemző genomösszetételt mutató törzseket Cat-97-szerű genotípus csoportként különítették el (a Cat97 macska eredetű RVA törzs után) (Matthijnssens, J. et al. 2011b), mely főként macska, kutya és ritkán előforduló humán G3P[3] törzseket is tartalmaz. Ám a fenti genotípus összetétel kimutatásra került ló, majom és denevér RVA törzsekben is. Utóbbiak alapján feltehető a különböző gazdafajok közötti aktív vírus átvitel lehetősége (Matthijnssens, J. et al. 2010b; He, B. et al. 2013; Miño, S. et al. 2013). Az összehasonlító vizsgálatok rendkívül alacsony prevalenciát mutattak humán RVA törzsek között a G3P[3] genotípus kombinációra, így feltehetőleg e sajátság főként állati RVA törzsekre jellemző.

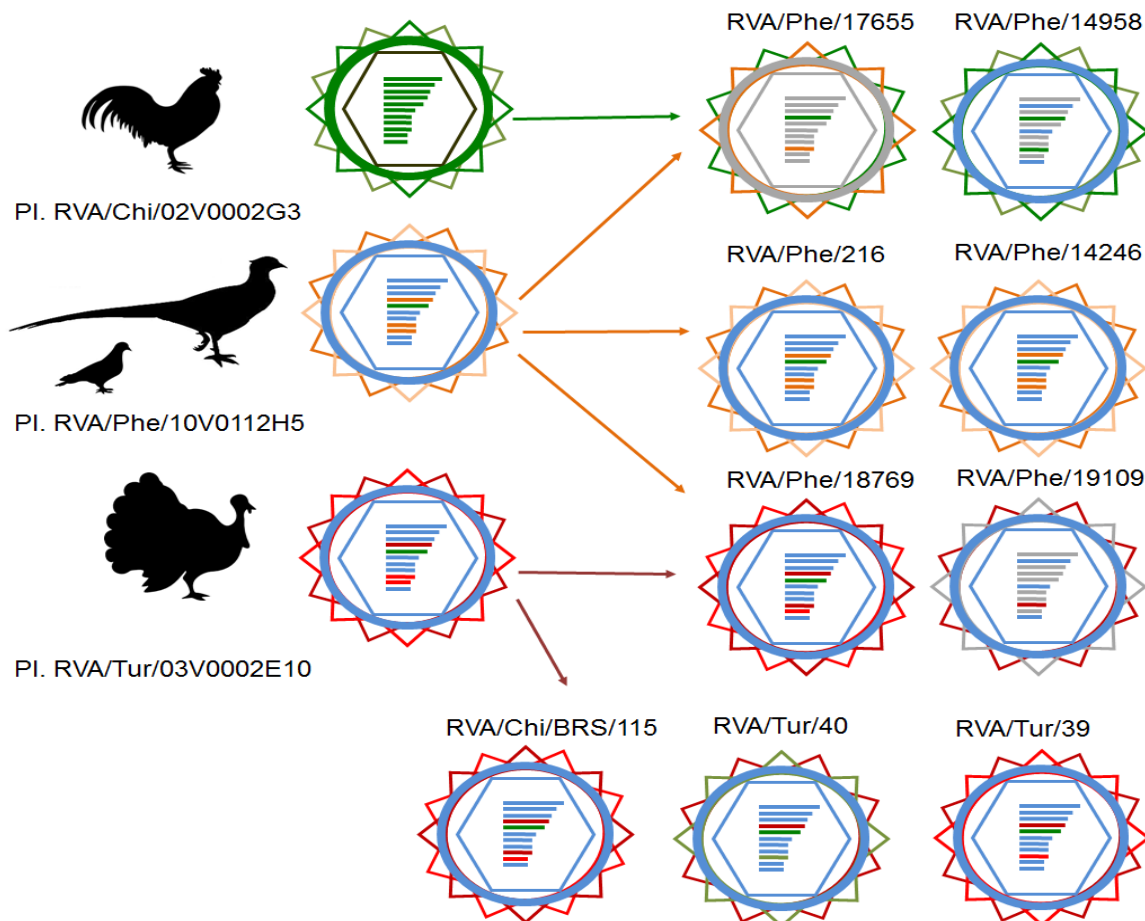
A magyarországi RVA/Dog/135 törzssel szoros leszármazási kapcsolatot mutató olaszországi RVA/Human/PA260-97 törzs 1997-ben heveny bélgyulladásos kórházba szállított kisgyermekből került kimutatásra. A törzs Cat97-szerű genotípus összetétele feltételezi, hogy kutya/macska gazdafajról kerülhetett át az emberre. Ez a törzs új NSP1 genotípussal rendelkezett (A15), melynek eredeti gazdafaja nem ismeretes (Matthijnssens, J. et al. 2011b). Ám saját vizsgálataink valószínűsítik a kutya RVA eredetét. Azonban e feltevésünk csupán két törzs vizsgálatán alapszik, így nem zárható ki, hogy az A15 genotípus egy más gazdafajú RVA-ból reasszortáció útján került bele egy Cat97-szerű genotípus összetételű RVA törzsbe. A két szignifikánsan hasonló RVA törzs (RVA/Dog/135 és RVA/Human/PA260-97) meghatározása között eltelt hosszú idő (15 év), a különböző földrajzi eredet és a stabil genom összetételük közötti nagyon alacsony genetikai variancia, valamint genetikai hasonlóságuk további kutya/macska RVA törzsekhez feltételezi ennek az

RVA genom összetételnek a nagyfokú adaptációját a kutyafélék gazdafaj populációjához (Papp, H. et al. 2015).

VIII.3. Madár rotavírusok

Doktori munkám kezdetén még csupán két madár A csoportú rotavírus törzs teljes genom szekvenciája állt a rendelkezésünkre (Ito, H. et al. 2001; Schumann, T. et al. 2009), míg emlős rotavírusokról nagyságrendekkel több adattal rendelkezett az irodalom. Ezért célul tűztük ki további madár RVA törzsek teljes genomjának meghatározását a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának budapesti telephelyére beküldésre került minták alapján. Tanulmányunk nem tért ki funkcionális vizsgálatokra, genom szekvenálási kísérleteink eredményeit bioinformatikai módszerekkel elemeztük. Kezdetben klasszikus molekuláris módszereket alkalmaztam, majd bevezetésre került egy új generációs szekvenálási módszer is a minták feldolgozására. Ez a sikeresen alkalmazott módszer megfelelően bizonyult rotavírus törzsek sokféleségének leírására függetlenül a gazdafajtól. Összesen nyolc teljes és két részleges madár RVA genomot határoztunk meg, fácán, pulyka, és a házityúk gazdafajokból, melyek 2005 és 2011 között kerültek begyűjtésre. A meghatározott törzsek nagy genetikai variabilitást mutattak. Felsővízi antigénjeik tekintetében négy féle VP7 és négy féle VP4 genotípust határoztunk meg, melyek hét féle GP kombinációban jelentek meg a vizsgált törzsekben. A gerinc gének tekintetében, nagy részében a klasszikus fácán- pulyka- galamb RVA leszármazási vonalra jellemzői genotípus összetételt találtuk minden törzsben: I4-R4-C4-M4-A16-N4/11-T4-E4/11-H4. Ezzel a genom konstellációval rendelkezett az általunk vizsgált házityúk RVA/Chicken/BRS/115 törzs is, ellentétben a referenciának számító németországi házityúk RVA törzssel (RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30]).

Filogenetikai elemzéssel további leszármazási kapcsolatokat sikerült feltárnunk. Az RVA/Chicken/BRS/115 tyúk RVA törzs minden génje leginkább pulyka RVA törzsekkel mutatott genetikai hasonlóságot, ugyanis a CH2 írországi házityúk RVA törzssel alkotott közös leszármazási ágai is minden esetben pulyka RVA törzsekkel egy kládban szerepelt. A fácán RVA törzsek közül az RVA/Pheasant/18769 és az RVA/Pheasant/19109 törzsek ugyancsak pulyka RVA törzsekkel mutattak szoros leszármazási kapcsolatot, míg az RVA/Pheasant/17655 és RVA/Pheasant/14958 törzsek egy-egy génje inkább házityúk RVA törzsekkel mutatott genetikai rokonságot. Ugyanakkor a RVA/Pheasant/14246 törzs kizárólag más fácán törzsekkel mutatott genetikai azonosságot. Míg a meghatározásra került RVA/Turkey/40 pulyka törzs házityúk RVA törzsekkel is mutatott genetikai azonosságot, az RVA/Turkey/39 csak pulyka RVA törzsekkel mutatott leszármazási kapcsolatot.



19. ábra. Hipotetikus reasszortáció sematikus ábrája. A madár rotavírusok között lejátszódó feltételezett reasszortációs események sematikus ábrája, mely a magyarországi madár RVA törzsek jellemző genom összetételét eredményezte. A bal oldali sziluett jelzi a feltételezett ős RVA törzs gazdafaját, a színek ennek megfelelően jelzik az eredetet (zöld: házityúk-szerű; kék: galamb/pulyka/fácán-szerű; piros: pulyka-specifikus; narancs: fácán-specifikus; szürke: nincs adat). A stilizált vírus kapszidon belül található szegmentált genom génsorrendje a következő: VP1, VP2, VP3, VP4, NSP1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 NSP5/6.

A filogenetikai elemzésekkel feltárt leszármazási kapcsolatok alapján feltételezzük, hogy a múltban fácán-házityúk RVA, és fácán-pulyka RVA reasszortációs események játszódhattak le, amelyek az általunk is vizsgált törzseket eredményezhették (19. ábra). A fácán, pulyka és a házityúk gazdafajok rendszertanilag a tyúkalkatúak rendjén belül (*Galliformes*) a fácánfélék családjába (*Phasianidae*) tartoznak (ITIS 2017). A taxonómiai rokonság közeli evolúciós leszármazást, és morfológiai hasonlóságot feltételez ezen gazdafajok között, amely hozzájárulhatott a rotavírusok gazdafajok közti átjárásához valamint reasszortációjához, melyet a magyarországi madár RVA törzseknél tapasztaltunk. Emellett a Madár rotavírusok közötti gazdafaj váltásra és reasszortációra korábban Schumann és mtsai németországi házityúk rotavírusokkal végzett vizsgálatok során találtak példát (Ch-06V0661, CH2) (Schumann, T. et al. 2009).

IX. Új tudományos eredmények

1. Részvételünkkel elsőként került meghatározásra ló eredetű A csoportú rotavírusok teljes genomszekvenciája. A filogenetikai elemzés a ló RVA-kra jellemző erősen konzervált genom konstellációt tárt fel.
2. Elsőként határoztunk meg teve eredetű A csoportú rotavírus részleges nukleinsav szekvenciáját VP7, VP4, VP1, VP2, NSP2, NSP3, NSP4, és NSP5 génekből. A filogenetikai elemzés után javaslatot tettünk új NSP4 genotípus bevezetésére (E15), melyet a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport elfogadott.
3. Elsőként határoztuk meg egy hazai eredetű kutya A csoportú rotavírus teljes genomszekvenciáját. A filogenetikai elemzés eredménye bizonyítékul szolgált a szokatlan NSP1 A15 genotípus kutya RVA eredetére, mely alátámasztja a direkt kutyáról emberre fajok közti átmenet elméletét.
4. Elsőként határoztuk meg magyarországi eredetű, madár gazdafajokból (házityúk, fácán, pulyka) származó nyolc RVA törzs teljes vagy részleges genomját. Megállapítottuk, hogy ezen madár RVA törzsek genom összetételére a különböző gazdafaj eredetű gének alkotta mozaikosság jellemző, melynek hátterében a reasszortáció állhat, hozzájárulva a madár rotavírusok genetikai állományának változékonyságához.

X. Hivatkozások jegyzéke

Adams, W.R. and L.M. Kraft. **Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent**, Science 141(3578): 359-360.1963

Al-Mutairi, D. **Detection and genotyping camel rotaviruses in Kuwait**, Kuwait University.2011

Ali, Y.H., A.I. Khalafalla, M.E. Gaffar, I. Peenze and A.D. Steele. **Rotavirus-associated camel calf diarrhoea in Sudan**, Journal of Animal and Veterinary Advances.2005

Ali, Y.H. **Rotavirus infection in Human and Domestic Animals in Sudan**, Journal of Science and Technology 12(4): 58-63.2011

Antalné László, B. **Posztvakcinációs rotavírus surveillance Magyarországon, 2007-2011**. Gyógyszerész Tudományok Doktori Iskola, Debreceni Egyetem.2013

Ari, E. **Molekuláris filogenetikai elemzések egy diszkrét matematikai módszer, a Boole analízis segítségével**. Biológia Doktori Iskola, Eötvös Lóránd Tudományegyetem.2012

Attoui, H. and P. Mertens. **Template for Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee To create a new SubFamily in an existing Family**, ICTV. 127-129.v2.: 1-9.2007

Attoui, H., P. Mertens, J. Becnel, S. Belaganahalli, M. Bergoin and C. Brussaard. **Family Reoviridae**. Virus Taxonomy. Ninth Report of the ICTV. King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens and E.J. Lefkowitz. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 541-637.2012

Badaracco, A., J. Matthijnsens, S. Romero, E. Heylen, M. Zeller, L. Garaicoechea, M. Van Ranst and V. Parreño. **Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuña (Vicugna vicugna)**, Veterinary Microbiology 161(3): 247-254.2013

Bányai, K., J.R. Gentsch, D.D. Griffin, J.L. Holmes, R.I. Glass and G. Szucs. **Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary**, Journal of Medical Virology 71(1): 124-134.2003

Bányai, K. **Reoviridae**. Klinikai és Járványügyi Virologia. Takács, M., Vox Medica Kiadó Kft: 467-473.2011

Bányai, K., B. László, J. Duque, A.D. Steele, E.A.S. Nelson, J.R. Gentsch and U.D. Parashar. **Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs**, Vaccine 30, Supplement 1: A122-A130.2012

Bányai, K., G. Kemenesi, I. Budinski, F. Foldes, B. Zana, S. Marton, R. Varga-Kugler, M. Oldal, K. Kurucz and F. Jakab. **Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia**, Infection, Genetics and Evolution 48: 19-26.2017

- Barrandeguy, M., V. Parreno, M.M. Lagos, L.F. Pont, C. Rivas, C. Valle and F. Fernandez. **Prevention of rotavirus diarrhoea in foals by parenteral vaccination of the mares: field trial**, *Developments in Biological Standardization* 92: 253-257.1997
- Bergeland, M., J. McAdaragh and S. I. **Rotaviral enteritis in turkey poult**s. 26th Western Poultry Diseases Conference, Davis, California, University of California.1977
- Bican, P., J. Cohen, A. Charpilienne and R. Scherrer. **Purification and characterization of bovine rotavirus cores**, *Journal of Virology* 43(3): 1113-1117.1982
- Bishop, R., G. Davidson, I. Holmes and B. Ruck. **Letter: Evidence for viral gastroenteritis**, *The New England Journal of Medicine* 289(20): 1096.1973a
- Bishop, R., G. Davidson, I. Holmes and B. Ruck. **Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis**, *The Lancet* 302(7841): 1281-1283.1973b
- Browning, G., R. Chalmers, T. Fitzgerald and D. Snodgrass. **Serological and genomic characterization of L338, a novel equine group A rotavirus G serotype**, *Journal of General Virology* 72(5): 1059-1064.1991
- Browning, G.F. and A.P. Begg. **Prevalence of G and P serotypes among equine rotaviruses in the faeces of diarrhoeic foals**, *Archives of Virology* 141(6): 1077-1089.1996
- Brudno, M., C.B. Do, G.M. Cooper, M.F. Kim, E. Davydov, N.C.S. Program, E.D. Green, A. Sidow and S. Batzoglou. **LAGAN and Multi-LAGAN: Efficient Tools for Large-Scale Multiple Alignment of Genomic DNA**, *Genome Research* 13(4): 721-731.2003
- Chauhan, R. and N. Singh. **Epidemiology of rotavirus infection in calves in India**, *International Journal of Animal Sciences* 11: 221-223.1996
- Chen, Y., W. Zhu, S. Sui, Y. Yin, S. Hu and X. Zhang. **Whole genome sequencing of lamb rotavirus and comparative analysis with other mammalian rotaviruses**, *Virus Genes* 38(2): 302-310.2009
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**, *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159.1987
- Collins, P.J., A. Cullinane, V. Martella and H. O'Shea. **Molecular Characterization of Equine Rotavirus in Ireland**, *Journal of Clinical Microbiology* 46(10): 3346-3354.2008
- Corpet, F. **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, *Nucleic Acids Research* 16(22): 10881-10890.1988
- De Grazia, S. **Canine-Origin G3P [3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis-Volume 13, Number 7—July 2007-Emerging Infectious Disease Journal-CDC**.2007
- Dennehy, P.H. **Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home**, *The Pediatric Infectious Disease Journal* 19(10): S103-S105.2000

- Desselberger, U. **Genome rearrangements of rotaviruses**, *Archives of Virology Supplement* 12: 37-51.1996
- Dhama, K., R. Chauhan, M. Mahendran and S. Malik. **Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals**, *Veterinary Research Communications* 33(1): 1-23.2009
- DiStefano, D.J., N. Kraiouchkine, L. Mallette, M. Maliga, G. Kulnis, P.M. Keller, H.F. Clark and A.R. Shaw. **Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup analysis**, *Journal of Clinical Microbiology* 43(12): 5876-5880.2005
- Djikeng, A., R. Halpin, R. Kuzmickas, J. Depasse, J. Feldblyum, N. Sengamalay, C. Afonso, X. Zhang, N.G. Anderson, E. Ghedin and D.J. Spiro. **Viral genome sequencing by random priming methods**, *BMC Genomics* 9: 5.2008
- Efron, B. **Bootstrap methods: another look at the jackknife**. *Breakthroughs in Statistics*, Springer: 569-593.1992
- Elschner, M., C. Schrader, H. Hotzel, J. Prudlo, K. Sachse, W. Eichhorn, W. Herbst and P. Otto. **Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany**, *Veterinary Microbiology* 105(2): 123-129.2005
- Esona, M.D., A. Geyer, K. Bányai, N. Page, M. Aminu, G.E. Armah, J. Hull, D.A. Steele, R.I. Glass and J.R. Gentsch. **Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon**, *Emerging Infectious Diseases* 15(1): 83-86.2009
- Esona, M.D., S. Mijatovic-Rustempasic, C. Conrardy, S. Tong, I.V. Kuzmin, B. Agwanda, R.F. Breiman, K. Bányai, M. Niezgoda, C.E. Rupprecht, J.R. Gentsch and M.D. Bowen. **Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*)**, *Emerging Infectious Diseases* 16(12): 1844-1852.2010
- Estes, M.K. and J. Cohen. **Rotavirus gene structure and function**, *Microbiological Reviews* 53(4): 410-449.1989
- Estes, M.K. and A.Z. Kapikian. **Rotaviruses**. *Fields Virology* (Fifth Edition). Knipe, D.M., P.M. Howley, D. Griffin et al. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 1917-1974.2007
- Flewett, T., A. Bryden and H. Davies. **Virus particles in gastroenteritis**, *The Lancet*.1973
- Frazer, K.A., L. Pachter, A. Poliakov, E.M. Rubin and I. Dubchak. **VISTA: computational tools for comparative genomics**, *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue): W273-279.2004
- Frederick, J., S. Giguère and L.C. Sanchez. **Infectious Agents Detected in the Feces of Diarrheic Foals: A Retrospective Study of 233 Cases (2003–2008)**, *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23(6): 1254-1260.2009
- Fujii, Y., H. Mitake, D. Yamada, M. Nagai, K. Okadera, N. Ito, K. Okada, K. Nakagawa, T. Mizutani and M. Sugiyama. **Genome Sequences of Rotavirus A Strains Ty-1 and Ty-3, Isolated from Turkeys in Ireland in 1979**, *Genome Announcements* 4(1).2016

- Gál, J., S. Marton, K. Ihász, H. Papp, F. Jakab, Y.S. Malik, K. Bányai and S.L. Farkas. **Complete Genome Sequence of a Genotype G23P[37] Pheasant Rotavirus Strain Identified in Hungary**, *Genome Announcements* 4(2).2016
- Garaicoechea, L., S. Miño, M. Ciarlet, F. Fernández, M. Barrandeguy and V. Parreño. **Molecular characterization of equine rotaviruses circulating in Argentinean foals during a 17-year surveillance period (1992–2008)**, *Veterinary Microbiology* 148(2–4): 150-160.2011
- Gazal, S., A. Taku and B. Kumar. **Predominance of rotavirus genotype G6P [11] in diarrhoeic lambs**, *The Veterinary Journal* 193(1): 299-300.2012
- Gentsch, J.R., R.I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K. Das and M.K. Bhan. **Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction**, *Journal of Clinical Microbiology* 30(6): 1365-1373.1992
- Gentsch, J.R., P.A. Woods, M. Ramachandran, B.K. Das, J.P. Leite, A. Alfieri, R. Kumar, M.K. Bhan and R.I. Glass. **Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development**, *Journal of Infectious Diseases* 174 Supplement 1: S30-36.1996
- Gentsch, J.R., A.R. Laird, B. Bielfelt, D.D. Griffin, K. Bányai, M. Ramachandran, V. Jain, N.A. Cunliffe, O. Nakagomi, C.D. Kirkwood, T.K. Fischer, U.D. Parashar, J.S. Bresee, B. Jiang and R.I. Glass. **Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs**, *Journal of Infectious Diseases* 192 Supplement 1: S146-159.2005
- Ghosh, S., T. Shintani and N. Kobayashi. **Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1**, *Veterinary Microbiology* 158(3-4): 410-414.2012
- Ghosh, S., K. Taniguchi, S. Aida, B. Ganesh and N. Kobayashi. **Whole genomic analyses of equine group A rotaviruses from Japan: evidence for bovine-to-equine interspecies transmission and reassortment events**, *Veterinary Microbiol* 166(3-4): 474-485.2013
- Grimwood, K. and S.B. Lambert. **Rotavirus vaccines: opportunities and challenges**, *Human Vaccines* 5(2): 57-69.2009
- Guy, J.S. **Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry**, *Poultry Science* 77(8): 1166-1175.1998
- Ha, T.P.M., H.-J. Kim, L.J. Saif, Y.-J. Jeong, H.-H. Kim, H.-J. Kwon, S.-J. Park and K.-O. Cho. **Sequence analysis of unusual P [7] G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission**, *Journal of Clinical Microbiology* 47(10): 3329-3332.2009
- Hall, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symposium Series*, [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.1999
- Hatab, E.A., H. Hussein, I. El-Sabagh and M. Saber. **Isolation and antigenic and molecular characterization of G10 of group A rotavirus in camel**, *International Journal of Virology* 5(1): 18-27.2009

- He, B., F. Yang, W. Yang, Y. Zhang, Y. Feng, J. Zhou, J. Xie, Y. Feng, X. Bao and H. Guo. **Characterization of a novel G3P [3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses**, Journal of Virology 87(22): 12357-12366.2013
- Heiman, E.M., S.M. McDonald, M. Barro, Z.F. Taraporewala, T. Bar-Magen and J.T. Patton. **Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions**, Journal of Virology 82(22): 11106-11116.2008
- Holland, R.E. **Some infectious causes of diarrhea in young farm animals**, Clinical Microbiology Reviews 3(4): 345-375.1990
- Imagawa, H., K. Sekiguchi, T. Anzai, Y. Fukunaga, T. Kanemaru, H. Ohishi, T. Higuchi and M. Kamada. **Epidemiology of Equine Rotavirus Infection among Foals in the Breeding Region**, Journal of Veterinary Medical Science 53(6): 1079-1080.1991
- Imagawa, H., H. Tsunemitsu, R. Wada and Y. Fukunaga. **Sero-epidemiological survey of equine rotavirus infections in 1-year-old thoroughbred horses in the Hidaka region of Hokkaido**, Journal of Equine Science 13(2): 71-74.2002
- Imagawa, H., T. Kato, H. Tsunemitsu, H. Tanaka, S. Sato and T. Higuchi. **Field Study of Inactivated Equine Rotavirus Vaccine**, Journal of Equine Science 16(2): 35-44.2005
- Iša, P., A.R. Wood, T. Netherwood, M. Ciarlet, H. Imagawa and D.R. Snodgrass. **Survey of equine rotaviruses shows conservation of one P genotype in background of two G genotypes**, Archives of Virology 141(9): 1601-1612.1996
- ITIS. **Taxonomic Hierarchy**. <http://www.itis.gov>, Integrated Taxonomic Information System.2017
- Ito, H., M. Sugiyama, K. Masubuchi, Y. Mori and N. Minamoto. **Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses**, Virus Research 75(2): 123-138.2001
- Iturriza Gómara, M., C. Wong, S. Blome, U. Desselberger and J. Gray. **Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation**, Journal of Virology 76(13): 6596-6601.2002
- Jenkins, G.M., A. Rambaut, O.G. Pybus and E.C. Holmes. **Rates of Molecular Evolution in RNA Viruses: A Quantitative Phylogenetic Analysis**, Journal of Molecular Evolution 54(2): 156-165.2002
- Jere, K.C., M.D. Esona, Y.H. Ali, I. Peenze, S. Roy, M.D. Bowen, I.K. Saeed, A.I. Khalafalla, M.M. Nyaga and J. Mphahlele. **Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P [11] rotavirus strain**, Infection, Genetics and Evolution 21: 58-66.2014
- Jindal, N., D.P. Patnayak, Y. Chander, A.F. Ziegler and S.M. Goyal. **Detection and molecular characterization of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys**, Poultry Sciences 89(2): 217-226.2010

- Johnson, C., T. Snider III, W. Henk and R. Fulton. **A scanning and transmission electron microscopic study of rotavirus-induced intestinal lesions in neonatal gnotobiotic dogs**, *Veterinary Pathology* 23(4): 443-453.1986
- Jourdan, N., J.P. Brunet, C. Sapin, A. Blais, J. Cotte-Laffitte, F. Forestier, A.-M. Quero, G. Trugnan and A.L. Servin. **Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton**, *Journal of Virology* 72(9): 7228-7236.1998
- Kang, B.K., D.S. Song, K.I. Jung, C.S. Lee, S.J. Park, J.S. Oh, D.J. An, J.S. Yang, H.J. Moon and S.S. Lee. **Genetic characterization of canine rotavirus isolated from a puppy in Korea and experimental reproduction of disease**, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(1): 78-83.2007
- Kapikian, A.Z., H.W. Kim, R.G. Wyatt, W.J. Rodriguez, S. Ross, W.L. Cline, R.H. Parrott and R.M. Chanock. **Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests**, *Science* 185(4156): 1049-1053.1974
- Khalafalla, A.I. and S. Bronstein. **Emerging Infectious Diseases in camelids**. 3rd Conference of the International Society of Camelid Research and Development. Johnson, E.H. Muscat, Sultanate of Oman, Sultan Qaboos University: 65-74.2012
- Khamrin, P., N. Maneekarn, S. Peerakome, F. Yagyu, S. Okitsu and H. Ushijima. **Molecular characterization of a rare G3P [3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions**, *Journal of Medical Virology* 78(7): 986-994.2006
- Kobayashi, N., M. Ishino, Y.-H. Wang, M. Chawla-Sarkar, T. Krishnan and T. Naik. **Diversity of G-type and P-type of human and animal rotaviruses and its genetic background**. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Méndet-Vilas, A., Formatex: 847-858.2007
- Kool, D.A., S.M. Matsui, H.B. Greenberg and I. Holmes. **Isolation and characterization of a novel reassortant between avian Ty-1 and simian RRV rotaviruses**, *Journal of Virology* 66(11): 6836-6839.1992
- Krzywinski, M., J. Schein, I. Birol, J. Connors, R. Gascoyne, D. Horsman, S.J. Jones and M.A. Marra. **Circos: an information aesthetic for comparative genomics**, *Genome Research* 19(9): 1639-1645.2009
- Lambden, P.R., S.J. Cooke, E.O. Caul and I.N. Clarke. **Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification**, *Journal of Virology* 66(3): 1817-1822.1992
- Legrottaglie, R., A. Volpe, V. Rizzi and P. Agrimi. **Isolation and identification of rotaviruses as aetiological agents of neonatal diarrhoea in kids. Electrophoretical characterization by PAGE**, *The New Microbiologica* 16(3): 227-235.1993
- Liu F, X.J., Liu CG, Wang KG, Zhou BJ, Wen M. **Full genomic sequence and phylogenetic analyses of a caprine G10P[15] rotavirus A strain XL detected in 2010**, GenBank record.2012

- Lorrot, M. and M. Vasseur. **How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea?**, *Virology Journal* 4(1): 1.2007
- Ma, Y., X. Wen, Y. Hoshino and L. Yuan. **Cloning and nucleotide sequence analyses of 11 genome segments of two American and one British equine rotavirus strains**, *Veterinary Microbiology* 176(1-2): 172-178.2015
- Maes, P., J. Matthijnsens, M. Rahman and M. Van Ranst. **RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses**, *BMC Microbiology* 9: 238.2009
- Malherbe, H. and R. Harwin. **The cytopathic effects of vervet monkey viruses**, *South African Medical Journal* 37(16): 407-411.1963
- Malherbe, H. and M. Strickland-Cholmley. **Simian virus SA11 and the related 0 agent**, *Archiv für die Gesamte Virusforschung* 22(1-2): 235-245.1967
- Martella, V., A. Pratelli, G. Greco, M. Gentile, P. Fiorente, M. Tempesta and C. Buonavoglia. **Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-type rotaviruses isolated from dogs**, *Virus Research* 74(1): 17-25.2001
- Martella, V., K. Bányai, M. Ciarlet, M. Iturriza-Gómara, E. Lorusso, S. De Grazia, S. Arista, N. Decaro, G. Elia and A. Cavalli. **Relationships among porcine and human P [6] rotaviruses: evidence that the different human P [6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events**, *Virology* 344(2): 509-519.2006
- Martella, V., K. Bányai, E. Lorusso, N. Decaro, A. Bellacicco, C. Desario, M. Corrente, G. Greco, P. Moschidou, M. Tempesta, S. Arista, M. Ciarlet, A. Lavazza and C. Buonavoglia. **Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses**, *Virology* 367(2): 358-366.2007
- Martella, V., K. Bányai, J. Matthijnsens, C. Buonavoglia and M. Ciarlet. **Zoonotic aspects of rotaviruses**, *Veterinary Microbiology* 140(3): 246-255.2010
- Masuda, T., M. Nagai, H. Yamasato, S. Tsuchiaka, S. Okazaki, Y. Katayama, M. Oba, N. Nishiura, Y. Sassa, T. Omatsu, T. Furuya, S. Koyama, J. Shirai, K. Taniguchi, Y. Fujii, R. Todaka, K. Katayama and T. Mizutani. **Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer**, *Veterinary Microbiology* 171(1-2): 66-73.2014
- Matthijnsens, J., M. Rahman, V. Martella, Y. Xuelei, S. De Vos, K. De Leener, M. Ciarlet, C. Buonavoglia and M. Van Ranst. **Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission**, *Journal of Virology* 80(8): 3801-3810.2006a
- Matthijnsens, J., M. Rahman, V. Martella, Y. Xuelei, S. De Vos, K. De Leener, M. Ciarlet, C. Buonavoglia and M. Van Ranst. **Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission**, *J Virol* 80(8): 3801-3810.2006b
- Matthijnsens, J., M. Ciarlet, E. Heiman, I. Arijs, T. Delbeke, S.M. McDonald, E.A. Palombo, M. Iturriza-Gómara, P. Maes and J.T. Patton. **Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus**

strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains, Journal of Virology 82(7): 3204-3219.2008a

Matthijnssens, J., M. Rahman and M. Van Ranst. **Two out of the 11 genes of an unusual human G6P [6] rotavirus isolate are of bovine origin**, Journal of General Virology 89(10): 2630-2635.2008b

Matthijnssens, J., J. Bilcke, M. Ciarlet, V. Martella, K. Bányai, M. Rahman, M. Zeller, P. Beutels, P. Van Damme and M. Van Ranst. **Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity**, Future Microbiology 4(10): 1303-1316.2009a

Matthijnssens, J., C.A. Potgieter, M. Ciarlet, V. Parreno, V. Martella, K. Bányai, L. Garaicoechea, E.A. Palombo, L. Novo and M. Zeller. **Are human P [14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla?**, Journal of Virology 83(7): 2917-2929.2009b

Matthijnssens, J., E. Heylen, M. Zeller, M. Rahman, P. Lemey and M. Van Ranst. **Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread**, Molecular Biology and Evolution 27(10): 2431-2436.2010a

Matthijnssens, J., Z.F. Taraporewala, H. Yang, S. Rao, L. Yuan, D. Cao, Y. Hoshino, P.P. Mertens, G.R. Carner and M. McNeal. **Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment**, Journal of Virology 84(4): 2013-2026.2010b

Matthijnssens, J., Z.F. Taraporewala, H. Yang, S. Rao, L. Yuan, D. Cao, Y. Hoshino, P.P. Mertens, G.R. Carner, M. McNeal, K. Sestak, M. Van Ranst and J.T. Patton. **Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment**, J Virol 84(4): 2013-2026.2010c

Matthijnssens, J., M. Ciarlet, S.M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J.R. Brister, J. Buesa, M.D. Esona, M.K. Estes, J.R. Gentsch, M. Iturriza-Gomara, R. Johne, C.D. Kirkwood, V. Martella, P.P. Mertens, O. Nakagomi, V. Parreno, M. Rahman, F.M. Ruggeri, L.J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, J.T. Patton, U. Desselberger and M. Van Ranst. **Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)**, Archives of Virology 156(8): 1397-1413.2011a

Matthijnssens, J., S. De Grazia, J. Piessens, E. Heylen, M. Zeller, G.M. Giammanco, K. Bányai, C. Buonavoglia, M. Ciarlet and V. Martella. **Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains**, Infection, Genetics and Evolution 11(6): 1396-1406.2011b

Matthijnssens, J., S. Mino, H. Papp, C. Potgieter, L. Novo, E. Heylen, M. Zeller, L. Garaicoechea, A. Badaracco, G. Lengyel, P. Kisfali, A. Cullinane, P.J. Collins, M. Ciarlet, H. O'Shea, V. Parreno, K. Bányai, M. Barrandeguy and M. Van Ranst. **Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation**, Journal of Genetic Virology 93(Pt 4): 866-875.2012a

- Matthijnssens, J., P.H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. Van Ranst and R. Johne. **VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation**, *Archives of Virology* 157(6): 1177-1182.2012b
- Matthijnssens, J. and M. Van Ranst. **Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans**, *Current Opinion in Virology* 2(4): 426-433.2012c
- Matthijnssens, J., E. Ons, S. De Coster, N. Conceição-Neto, A. Gryspeerdt, M. Van Ranst and R. Raue. **Molecular characterization of equine rotaviruses isolated in Europe in 2013: Implications for vaccination**, *Veterinary Microbiology* 176(1): 179-185.2015
- Mayor, C., M. Brudno, J.R. Schwartz, A. Poliakov, E.M. Rubin, K.A. Frazer, L.S. Pachter and I. Dubchak. **VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length**, *Bioinformatics* 16(11): 1046-1047.2000
- McNulty, M., G. Allan and J. Stuart. **Rotavirus infection in avian species**, *Veterinary Record* 103(14): 319-320.1978
- McNulty, M., G. Allan and J. McFerran. **Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys**, *Avian Pathology* 8(3): 205-212.1979a
- McNulty, M., G. Allan, D. Todd and J. McFerran. **Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens**, *Archives of Virology* 61(1-2): 13-21.1979b
- McNulty, M., W. Curran, D. Todd and J. McFerran. **Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy**, *Avian Pathology* 8(3): 239-247.1979c
- McNulty, M. **Rotavirus infection**. *Diseases of Poultry*, 9th BW, C. Ames, Iowa, Iowa University Press: 628-635.2003
- Mihalov-Kovács, E., A. Gellért, S. Marton, S.L. Farkas, E. Fehér, M. Oldal, F. Jakab, V. Martella and K. Bányai. **Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary**, *Emerging Infectious Diseases* 21(4): 660-663.2015
- Minami-Fukuda, F., M. Nagai, H. Takai, T. Murakami, T. Ozawa, S. Tsuchiaka, S. Okazaki, Y. Katayama, M. Oba, N. Nishiura, Y. Sassa, T. Omatsu, T. Furuya, S. Koyama, J. Shirai, H. Tsunemitsu, Y. Fujii, K. Katayama and T. Mizutani. **Detection of bovine group a rotavirus using rapid antigen detection kits, rt-PCR and next-generation DNA sequencing**, *Journal of Veterinary Medical Sciences* 75(12): 1651-1655.2013
- Miño, S., J. Matthijnssens, A. Badaracco, L. Garaicoechea, M. Zeller, E. Heylen, M. Van Ranst, M. Barrandeguy and V. Parreno. **Equine G3P [3] rotavirus strain E3198 related to simian RRV and feline/canine-like rotaviruses based on complete genome analyses**, *Veterinary Microbiology* 161(3): 239-246.2013
- Mitchell, D. and G.W. Both. **Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3**, *Virology* 177(1): 324-331.1990
- Mlera, L., K.C. Jere, A.A. van Dijk and H.G. O'Neill. **Determination of the whole-genome consensus sequence of the prototype DS-1 rotavirus using sequence-independent genome amplification and 454(R) pyrosequencing**, *Journal of Virology Methods* 175(2): 266-271.2011

- Mlera, L., H.G. O'Neill, K.C. Jere and A.A. van Dijk. **Whole-genome consensus sequence analysis of a South African rotavirus SA11 sample reveals a mixed infection with two close derivatives of the SA11-H96 strain**, *Archives of Virology* 158(5): 1021-1030.2013
- Mohamed, M., C. Hart and O. Kaaden. **Agents associated with neonatal camel calf diarrhoea in Eastern Suda**. International Meeting on Camel Production and Future Perspective, Al Ain-United Arab Emirates.1998
- Mori, Y., M.A. Borgan, M. Takayama, N. Ito, M. Sugiyama and N. Minamoto. **Roles of outer capsid proteins as determinants of pathogenicity and host range restriction of avian rotaviruses in a suckling mouse model**, *Virology* 316(1): 126-134.2003
- Mossel, E., M. Estes and F. Ramig. **Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins and 3D structure of the rotavirus particle**. <http://www.reoviridae.org>
- Munoz, M., M. Alvarez, I. Lanza and P. Carmenes. **Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain**, *Epidemiology and Infection* 117(01): 203-211.1996
- Nakagomi, T., Y. Matsuda, A. Ohshima, M. Mochizuki and O. Nakagomi. **Characterization of a canine rotavirus strain by neutralization and molecular hybridization assays**, *Archives of Virology* 106(1-2): 145-150.1989
- Nemoto, M., M. Nagai, H. Tsunemitsu, T. Omatsu, T. Furuya, J. Shirai, T. Kondo, Y. Fujii, R. Todaka, K. Katayama and T. Mizutani. **Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010**, *Archives of Virology* 160(5): 1171-1179.2015
- Nguyen, T.A., P. Khamrin, Q.D. Trinh, T.G. Phan, L.D. Pham, L.P. Hoang, K.T. Hoang, F. Yagyu, S. Okitsu and H. Ushijima. **Sequence analysis of Vietnamese P [6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission**, *Journal of Medical Virology* 79(12): 1959-1965.2007
- Nicholas, K.B., H.B.J. Nicholas and D.W. Deerfield. **GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation**, *Embnew. News* 4.1997
- Nilsson, M., C.-H. von Bonsdorff, K. Weclawicz, J. Cohen and L. Svensson. **Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon**, *Virology* 242(2): 255-265.1998
- Nishikawa, K., Y. Hoshino and M. Gorziglia. **Sequence of the VP7 gene of chicken rotavirus Ch2 strain of serotype 7 rotavirus**, *Virology* 185(2): 853-856.1991
- Otto, P., E.M. Liebler-Tenorio, M. Elschner, J. Reetz, U. Löhren and R. Diller. **Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS)**, *Avian Diseases* 50(3): 411-418.2006
- Papp, H., L.Z. Al-Mutairi, W. Chehadeh, S.L. Farkas, G. Lengyel, F. Jakab, V. Martella, G. Szűcs and K. Bányai. **Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain**, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 59(3): 411-421.2012

- Papp, H., B. László, F. Jakab, B. Ganesh, S. De Grazia, J. Matthijssens, M. Ciarlet, V. Martella and K. Bányai. **Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle**, *Veterinary Microbiology* 165(3): 190-199.2013a
- Papp, H., J. Matthijssens, V. Martella, M. Ciarlet and K. Bányai. **Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review**, *Vaccine* 31(48): 5627-5633.2013b
- Papp, H., Y.S. Malik, S.L. Farkas, F. Jakab, V. Martella and K. Bányai. **Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids**, *Virusdisease* 25(2): 215-222.2014a
- Papp, H., S. Marton, S.L. Farkas, F. Jakab, V. Martella, Y.S. Malik, V. Palya and K. Bányai. **Classification and characterization of a laboratory chicken rotavirus strain carrying G7P [35] neutralization antigens on the genotype 4 backbone gene configuration**, *Biologicals* 42(6): 299-304.2014b
- Papp, H., D. Rigó, Á. Dán, S. Farkas, M. Oldal, F. Jakab and K. Bányai. **Szokatlan rotavírus antigén kombináció azonosítása fiatal fécánban**, *Magyar Állatorvosok Lapja* 136: 729-735.2014c
- Papp, H., E. Mihalov-Kovacs, R. Dóró, S. Marton, S.L. Farkas, G.M. Giammanco, S. De Grazia, V. Martella and K. Bányai. **Full-genome sequencing of a Hungarian canine G3P[3] Rotavirus A strain reveals high genetic relatedness with a historic Italian human strain**, *Virus Genes* 50(2): 310-315.2015
- Parashar, U.D., J.S. Bresee, J.R. Gentsch and R.I. Glass. **Rotavirus**, *Emerging Infectious Diseases* 4(4): 561-570.1998
- Parreno, V., K. Bok, F. Fernandez and J. Gomez. **Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*)**, *Archives of Virology* 149(12): 2465-2471.2004
- Patton, J.T. **Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins**, *Journal of General Virology* 76(11): 2633-2644.1995
- Patton, J.T., M. Wentz, J. Xiaobo and R.F. Ramig. **cis-Acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA**, *Journal of Virology* 70(6): 3961-3971.1996
- Pedley, S., J. Bridger, D. Chasey and M. McCrae. **Definition of two new groups of atypical rotaviruses**, *Journal of General Virology* 67(1): 131-137.1986
- Potgieter, A.C., A.D. Steele and A.A. Van Dijk. **Cloning of complete genome sets of six dsRNA viruses using an improved cloning method for large dsRNA genes**, *Journal of General Virology* 83(9): 2215-2223.2002
- Potgieter, A.C., N.A. Page, J. Liebenberg, I.M. Wright, O. Landt and A.A. van Dijk. **Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes**, *Journal of General Virology* 90(Pt 6): 1423-1432.2009
- Rahman, M., J. Matthijssens, T. Goegebuer, K. De Leener, L. Vanderwegen, I. van der Donck, L. Van Hoovels, S. De Vos, T. Azim and M. Van Ranst. **Predominance of rotavirus**

G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999–2003, Journal of Clinical Virology 33(1): 1-6.2005

Rahman, M., J. Matthijnssens, X. Yang, T. Delbeke, I. Arijs, K. Taniguchi, M. Iturriza-Gómara, N. Iftekharuddin, T. Azim and M. Van Ranst. **Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses**, Journal of Virology 81(5): 2382-2390.2007

Ramig, R. and B. Fields. **Genetics of reovirus**. The Reoviridae. Jolik, W. New York, Plenum: 197-228.1983

Reynolds, D., Y. Saif and K. Theil. **A survey of enteric viruses of turkey poults**, Avian Diseases: 89-98.1987

Rohwedder, A., H. Hotop, N. Minamoto, H. Ito, O. Nakagomi and H. Brussow. **Bovine rotavirus 993/83 shows a third subtype of avian VP7 protein**, Virus Genes 14(2): 147-151.1997

Ruiz, M., J. Cohen and F. Michelangeli. **Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections**, Cell Calcium 28(3): 137-149.2000

Saif, L.J. and F.M. Fernandez. **Group A rotavirus veterinary vaccines**, Journal of Infectious Diseases 174((Supplement 1)): S98-S106.1996

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12): 5463-5467.1977

Santos, N. and Y. Hoshino. **Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine**, Reviews in Medical Virology 15(1): 29-56.2005

Schoenian, S. **Diarrhea (scours) in small ruminants**, Comp. Ext. J. Maryland University. <http://www.sheepandgoat.com/articles/scours.html>.2007

Schumann, T., H. Hotzel, P. Otto and R. Johne. **Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses**, Virology 386(2): 334-343.2009

Steyer, A., M. Poljšak-Prijatelj, D. Barlič-Maganja and J. Marin. **Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment**, Journal of General Virology 89(7): 1690-1698.2008

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**, Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731-2739.2011

Theil, K., S. Lance and C. McCloskey. **Rotaviruses associated with neonatal lamb diarrhea in two Wyoming shed-lambing operations**, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 8(2): 245-248.1996

- Thouless, M., R. DiGiacomo, B. Deeb and H. Howard. **Pathogenicity of rotavirus in rabbits**, Journal of Clinical Microbiology 26(5): 943-947.1988
- Tibary, A., C. Fite, A. Anouassi and A. Sghiri. **Infectious causes of reproductive loss in camelids**, Theriogenology 66(3): 633-647.2006
- Trojnar, E., P. Otto and R. Johne. **The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains**, Virology 386(2): 325-333.2009
- Trojnar, E. **Charakterisierung aviärer Rotaviren und Untersuchungen zu ihrem zoonotischen Potential**. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freien Universität Berlin.2013
- Trojnar, E., J. Sachsenröder, S. Twardziok, J. Reetz, P.H. Otto and R. Johne. **Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses**, Journal of General Virology 94(1): 136-142.2013
- Ursu, K., P. Kisfali, D. Rigó, É. Ivanics, K. Erdélyi, Á. Dán, B. Melegh, V. Martella and K. Bányai. **Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23**, Archives of Virology 154(8): 1365-1369.2009
- Wani, S., M. Bhat, R. Nawchoo, Z. Munshi and A. Bach. **Evidence of rotavirus associated with neonatal lamb diarrhoea in India**, Tropical Animal Health and Production 36(1): 27-32.2004
- WHO. **External Review of Burden of Disease Attributable to Rotavirus**. Geneva Switzerland World Health Organization 2005
- Woode, G., J.C. Bridger, J.M. Jones, T. Flewett, H. Davies, H. Davis and G. White. **Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals**, Infection and Immunity 14(3): 804-810.1976
- Yang, Z. and B. Rannala. **Molecular phylogenetics: principles and practice**, Nature Reviews Genetics 13(5): 303-314.2012
- Yason, C.V. and K. Schat. **Isolation and characterization of avian rotaviruses**, Avian Diseases: 499-508.1985
- Yason, C.V. and K.A. Schat. **Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poults**, Avian Pathology 15(3): 421-435.1986
- Yu, M., M.M. Ismail, M.A. Qureshi, R.N. Dearth, H.J. Barnes and Y.M. Saif. **Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus**, Avian Diseases 44(2): 297-304.2000

XI. Tudományos publikációk

XI.1.Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Papp H., Mihalov-Kovács E., Dóró R., Marton S., Farkas S.L., Giammanco G.M., De Grazia S., Martella V., Bányai K. **Full-genome sequencing of a Hungarian canine G3P[3] Rotavirus A strain reveals high genetic relatedness with a historic Italian human strain** Virus Genes 50: pp. 310-315. (2015)

IF: 1,285

Papp H., Malik Y.S., Farkas S.L., Jakab F., Martella V., Bányai K. **Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids** Virusdisease 25: pp. 215-222. (2014)

IF: 0,364

Papp H., Marton S., Farkas S.L., Jakab F., Martella V., Malik Y.S., Palya V., Bányai K. **Classification and characterization of a laboratory chicken rotavirus strain carrying G7P[35] neutralization antigens on the genotype 4 backbone gene configuration** Biologicals 42: pp. 299-304. (2014)

IF: 1,209

Papp H., Rigó D., Dán Á., Farkas S.L., Oldal M., Jakab F., Bányai K. **Szokatlan rotavírus antigén kombináció azonosítása fiatal fécánban** Magyar Állatorvosok Lapja 136: pp. 729-735. (2014)

IF: 0,185

Papp H., Matthijnssens J., Martella V., Ciarlet M., Bányai K. **Global distribution of group A rotavirus strains in horses: A systematic review** Vaccine 31: pp. 5627-5633. (2013)

IF: 3,49

Matthijnssens J., Mino S., Papp H., Potgieter C., Novo L., Heylen E., Zeller M., Garaicoeachea L., Badaracco A., Lengyel G., Kisfali P., Cullinane A., Collins P., Ciarlet M., O'Shea H., Parreno V., Banyai K., Barrandeguy M., Van Ranst M. **Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several new genotypes and a largely conserved genotype constellation** Journal Of General Virology 93: pp. 866-875. (2012)

IF: 3,13

Papp H.*, Al-Mutairi L.Z.*, Chehadeh W., Farkas L.S., Lengyel Gy., Jakab F., Martella V., Szűcs Gy., Bányai K. **Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 59: pp. 411-421. (2012)

IF: 0,65

*megosztott első szerzőség

XI.2.Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Papp H., Borzák R., Farkas Sz., Kisfali P., Lengyel Gy., Molnár P., Melegh B., Matthijnssens J., Jakab F., Martella V., Bányai K. **Independent zoonotic transmission of porcine G4P[6] rotaviruses identified sporadically in hungarian pediatric patients over a 15 year period**; 5th European Rotavirus Meeting, 2013.10.6-9, Valencia, Spanyolország (2013)

Papp H., Dán Á., Ursu K., Bányai K. **Reassortant rotavirus strains identified in Hungarian pheasants**; FEMS 2013, 5th Congress of European Microbiologists, 2013.07.21-25. Leipzig, Németország, (2013)

Papp H., Al Muair L.Z., Lengyel G., Grósz G., El-Sayed F.H., Esam A.A., Szűcs G., Bányai K. **Molecular characterization of a Kuwaiti camel rotavirus strain**; 4th European Rotavirus Meeting, 2011.10.2-5, Altafiumara, Olaszország (2011)

László B., Papp H., Dandár E., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Lengyel Gy., Martella V., Mészáros J., Mészner Zs., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Tóth A., Tóth E., Szűcs G., Bányai K. **Prevalence of human rotavirus strains in Hungary, 2007-2011**; 4th European Rotavirus Meeting, 2011.10.2-5, Altafiumara, Olaszország (2011)

László B., Papp H., Dandár E., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Lengyel Gy., Martella V., Mészáros J., Mészner Zs., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Tóth A., Tóth E., Szűcs Gy., Bányai K. **Emerging human rotavirus strains, 2007-2010, Hungary**; International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2011.02.4-7 Bécs, Ausztria (2011)

XI.3.Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Pongor L., Harami-Papp H., Méhes E., Czirók A., Győrffy B. **Cell Dispersal Influences Tumor Heterogeneity and Introduces a Bias in NGS Data Interpretation.** Scientific Reports. 2017 Aug 4;7(1):7358.
IF: 4,259 (2016)

Menyhárt O., Harami-Papp H., Sukumar S., Schäfer R., Magnani L., de Barrios O., Győrffy B. **Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer.** Biochim Biophys Acta. 2016 Dec;1866(2):300-319.
IF: 5,083

Harami-Papp H., Pongor L.S., Munkácsy G., Horváth G., Nagy Á.M., Ambrus A., Hauser P., Szabó A., Tretter L., Győrffy B. **TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer.** Oncotarget. 2016 Oct 11;7(41):67183-67195.
IF: 5,008

Papp H., László B., Jakab F., Ganesh B., De Grazia S., Matthijnssens J., Ciarlet M., Martella V., Bányai K. **Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle** Veterinary Microbiology 165: pp. 190-199. (2013)
IF: 3,13

Ndze V.N., Achidi E.A., Papp H., Kovács E., Farkas S.L., Adiogo D., Kisfali P., Ngeng M.B., Abena M.T.O., Martella V., Esona M.D., Bányai K. **Shared G12 VP7 gene among human and bovine rotaviruses detected in Cameroonian villages** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60:(1) pp. 21-28. (2013)
IF: 0,65

Ndze V.N., Papp H., Akum A.E., Hortense G.K., László B., Farkas S., Kisfali P., Melegh B., Esona M.D., Bowen M.D., Bányai K., Gentsch J.R., Obama Abena M.T. **One Year Survey of Human Rotavirus Strains Suggests the Emergence of Genotype G12 in Cameroon** Journal of Medical Virology 85:(8) pp. 1485-1490. (2013)
IF: 2,37

Papp H., Borzák R., Farkas S., Kisfali P., Lengyel G., Molnár P., Melegh B., Matthijnssens J., Jakab F., Martella V., Bányai K. **Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6]**

rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period Infection, Genetics and Evolution 19: pp. 71-80. (2013)

IF: 2,77

László B., Kónya J., Dandár E., Deák J., Farkas Á., Gray J., Grósz G., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kisfali P., Kovács J., Lengyel Gy., Martella V., Melegh B., Mészáros J., Molnár P., Nyúl Z., Papp H., Pátri L., Puskás E., Sántha I., Schneider F., Szomor K., Tóth A., Tóth E., Szűcs Gy., Bányai K. **Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains** Journal of Clinical Virology 55:(2) pp. 140-146. (2012)

IF: 3,29

Mladenova Z., Papp H., Lengyel G., Kisfali P., Steyer A., Steyer A.F., Esona M.D., Iturriza-Gómara M., Bányai K. **Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria** Infection, Genetics and Evolution 12: pp. 1676-1684. (2012)

IF: 2,77

Ursu K., Papp H., Kisfali P., Rigó D., Melegh B., Martella V., Bányai K. **Monitoring of group A rotaviruses in wild-living birds in Hungary** Avian Diseases 55:(1) pp. 123-127. (2011)

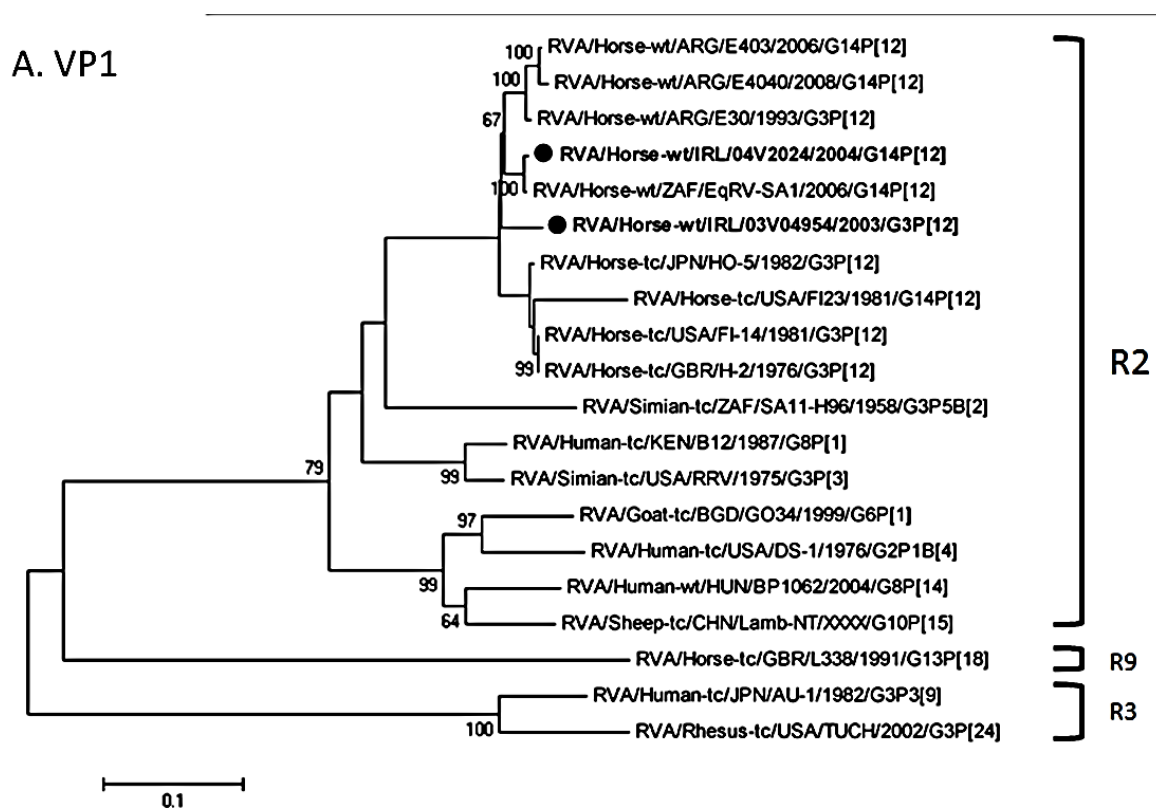
IF: 1,46

Bányai K., Papp H., Dandár E., Molnár P., Mihály I., Van Ranst M., Martella V., Matthijnssens J. **Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain** Infection, Genetics and Evolution 10: pp. 1140-1144. (2010)

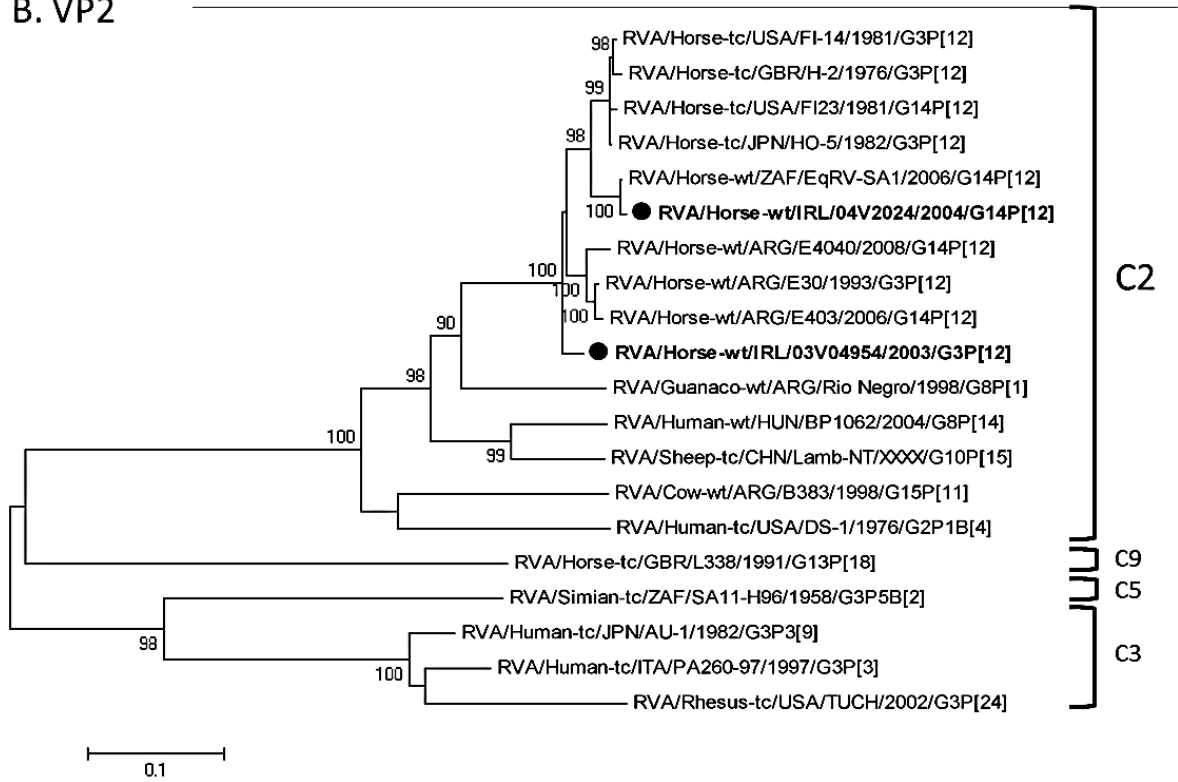
IF: 3,09

XII. Függelék

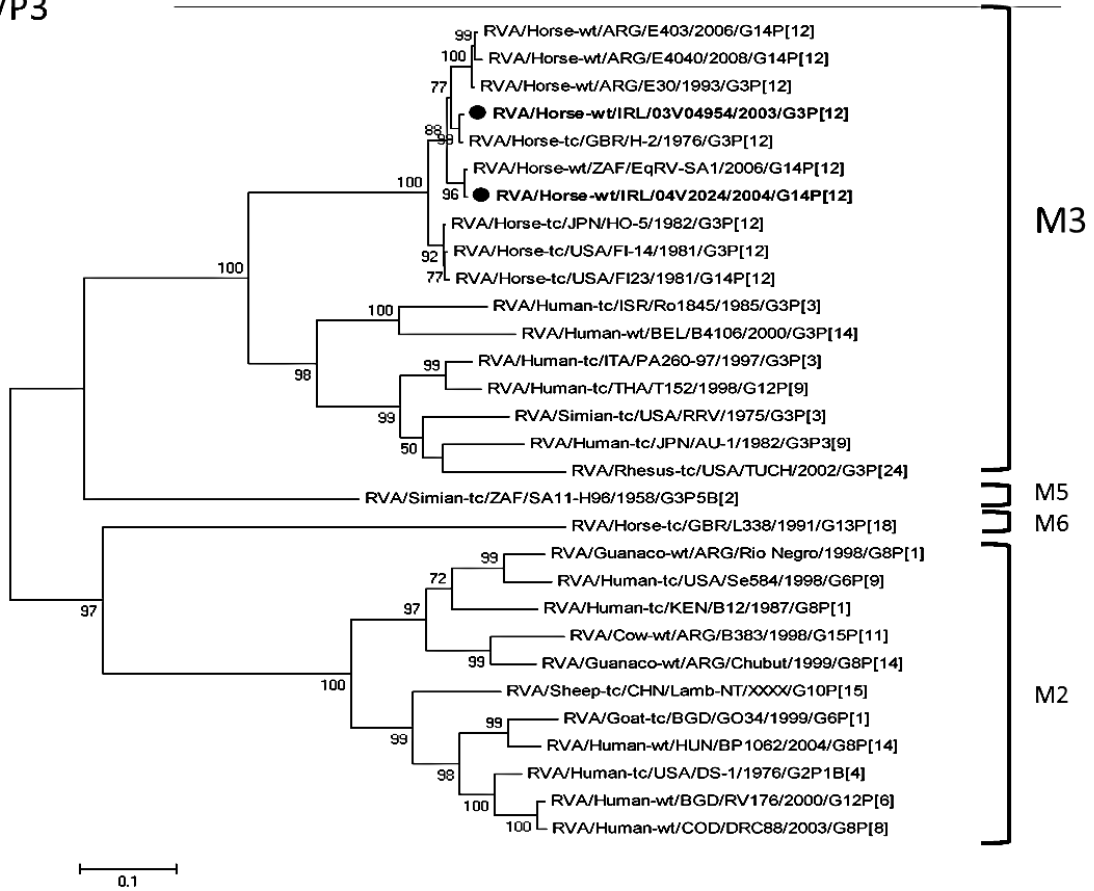
1. Függelék ábra. Ló RVA gén alapú filogenetikai fák. Válogatott emlős RVA törzsek génjeinek ORF nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fa rekonstrukció, mely maximum likelihood módszerrel készült, Tamura-Nei szubsztitúciós modellel (TN93+GI), 500-szoros bootstrap lefedettséggel (számértékek a faágak mellett). A referencia törzsek Matthijnsens és mtsai, 2012 munkája alapján kerültek beválogatásra (Matthijnsens, J. et al. 2012a), majd kiegészítésre az azóta meghatározott ló RVA törzsek egy részével. A két általam feldolgozott, írországi ló RVA törzseket félkörrel kiemeléssel és teli kör (●) jelzéssel jelöltem. A genotípusok a jobb oldalon kerültek feltüntetésre. A bal sarokban található skála arányos a genetikai távolsággal. G: Az eredeti ábra Matthijnsens, 2012 cikkéből (Matthijnsens, J. et al. 2012a), melyen kék nyilak jelölik az általunk feldolgozott ló RVA törzseket.



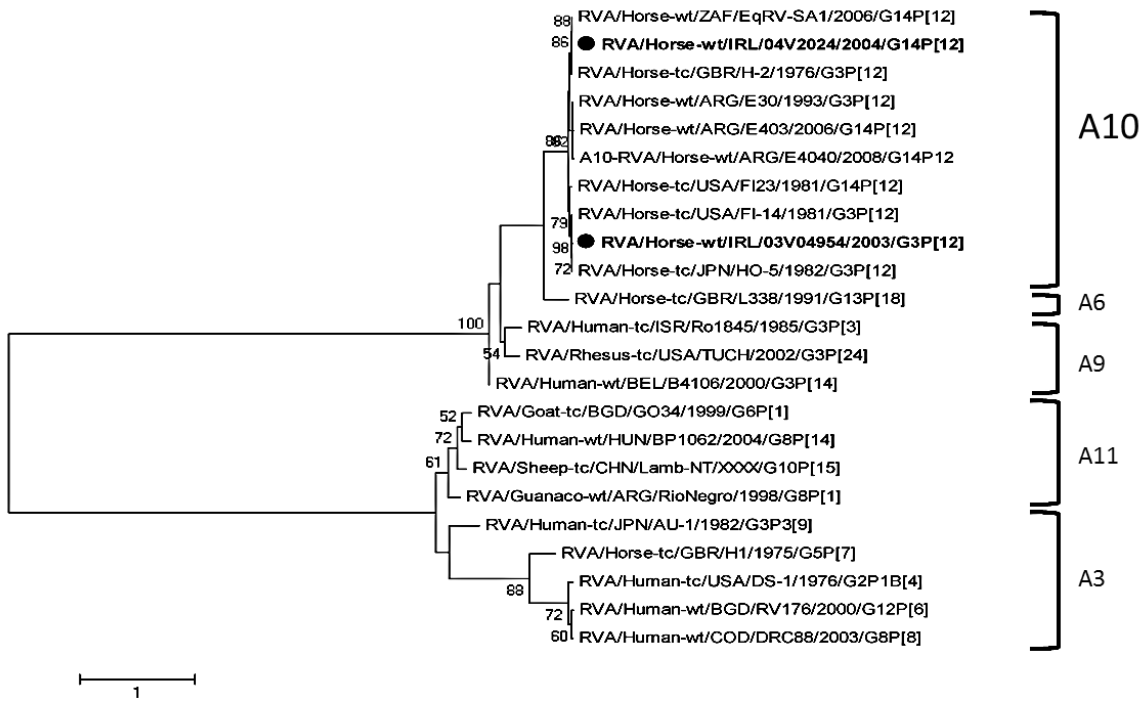
B. VP2



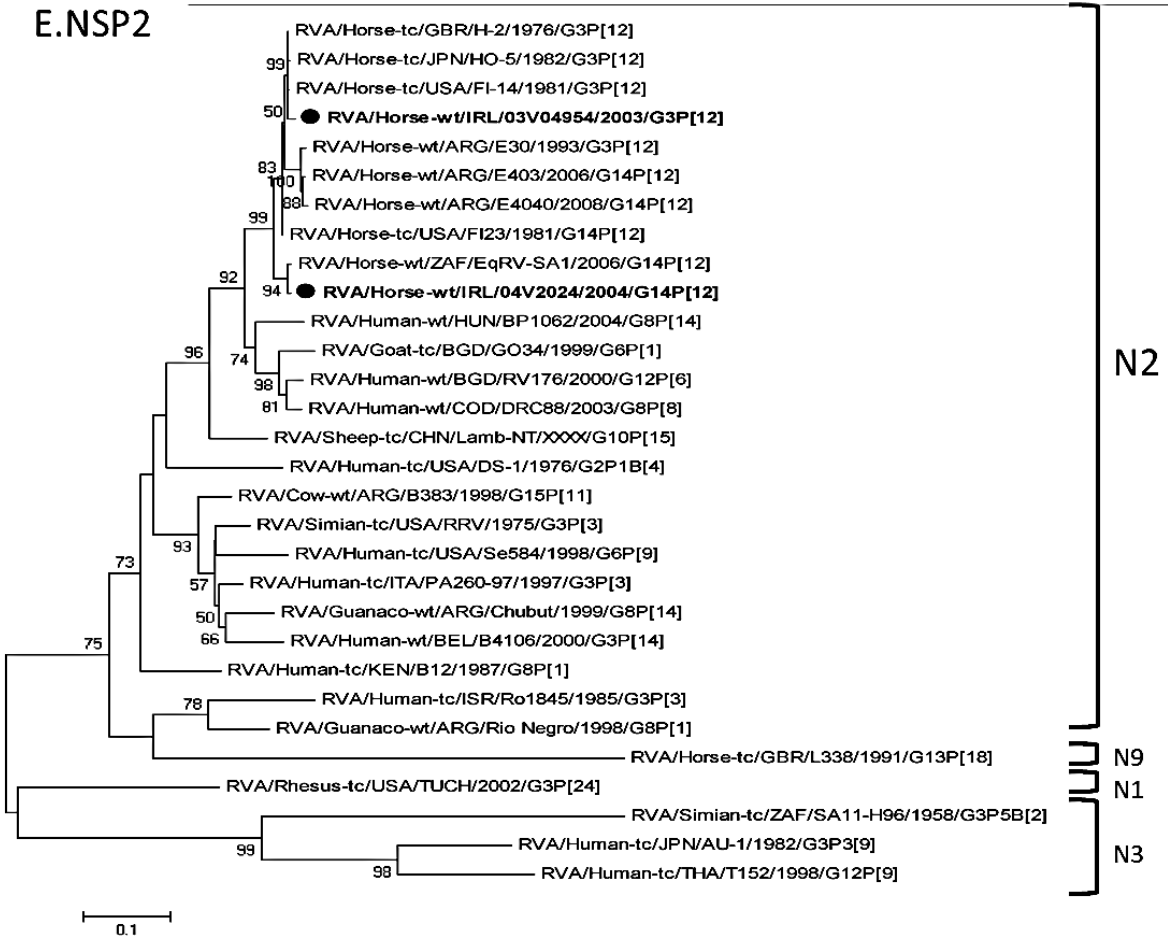
C. VP3



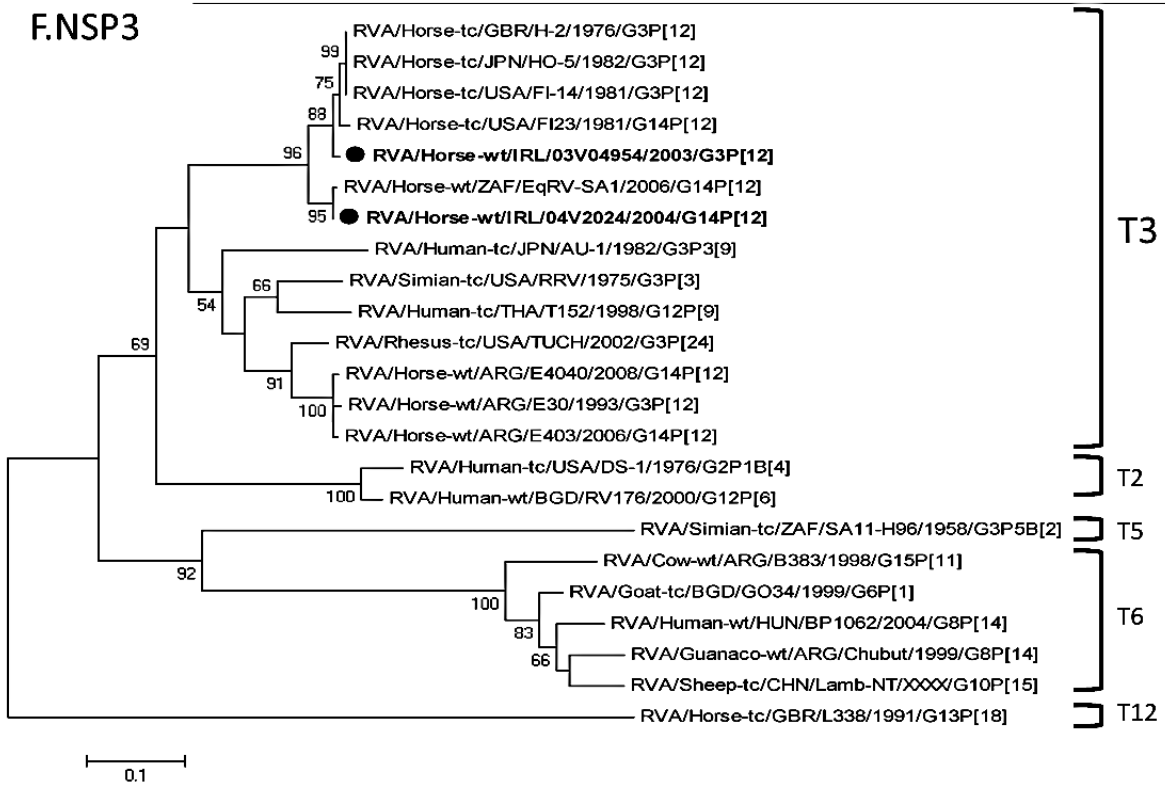
D. NSP1



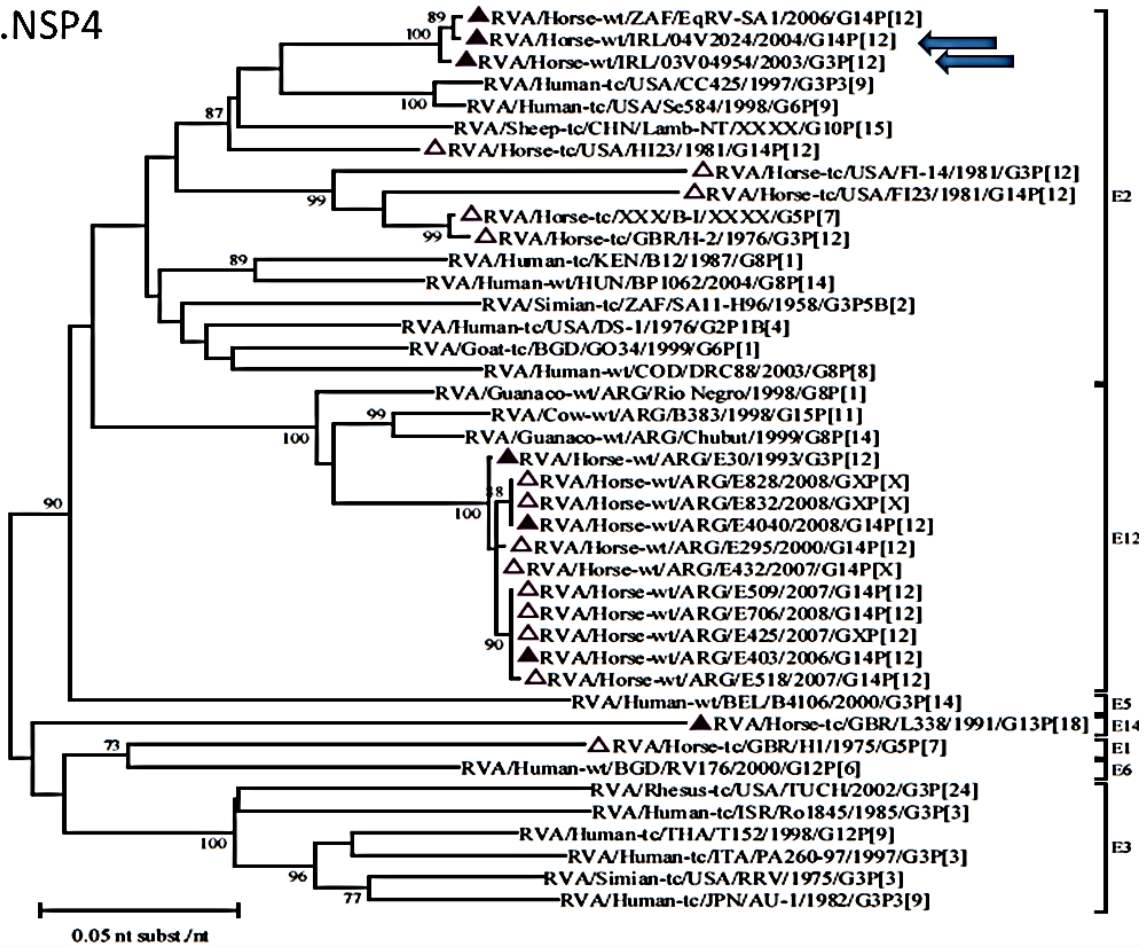
E. NSP2

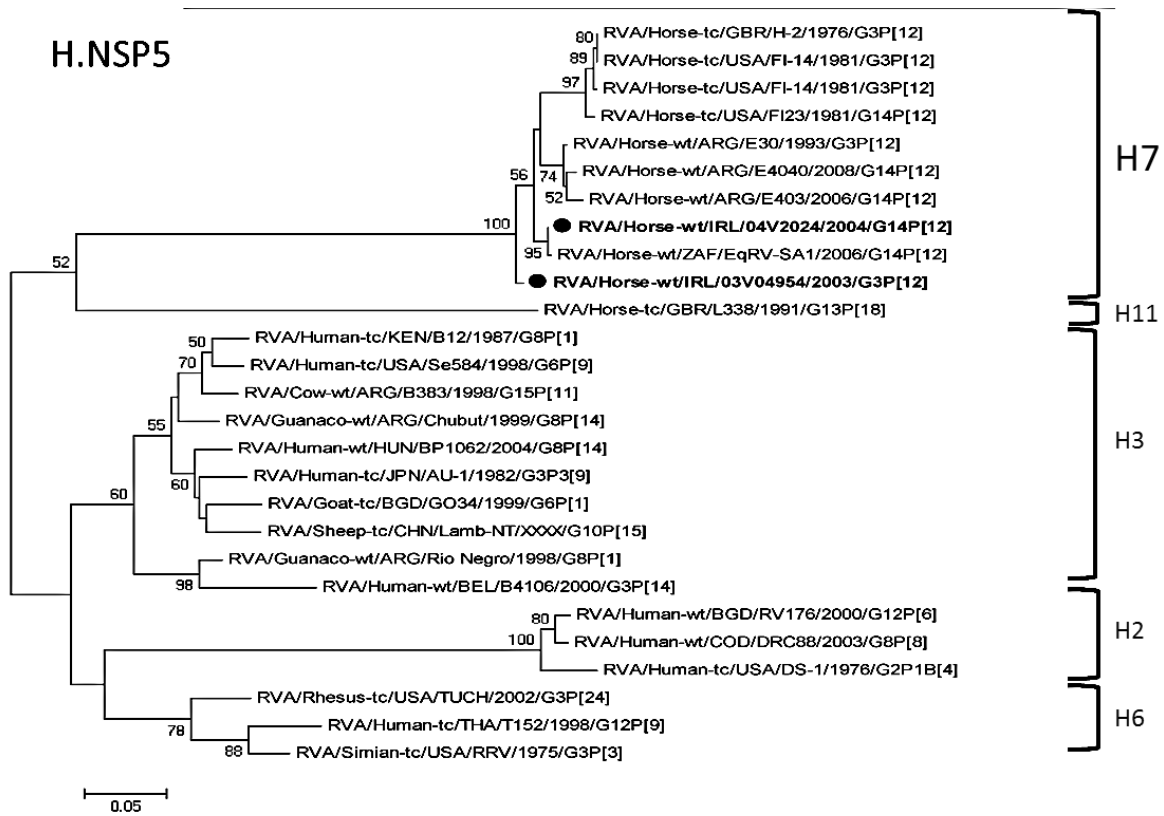


F.NSP3

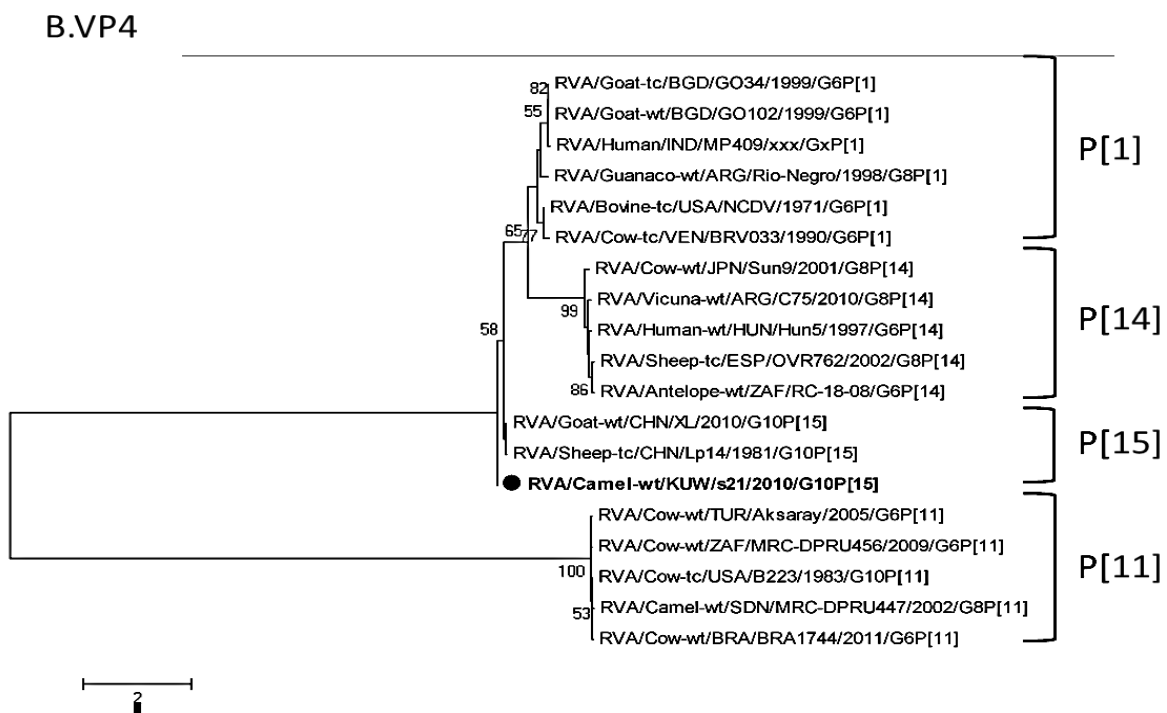
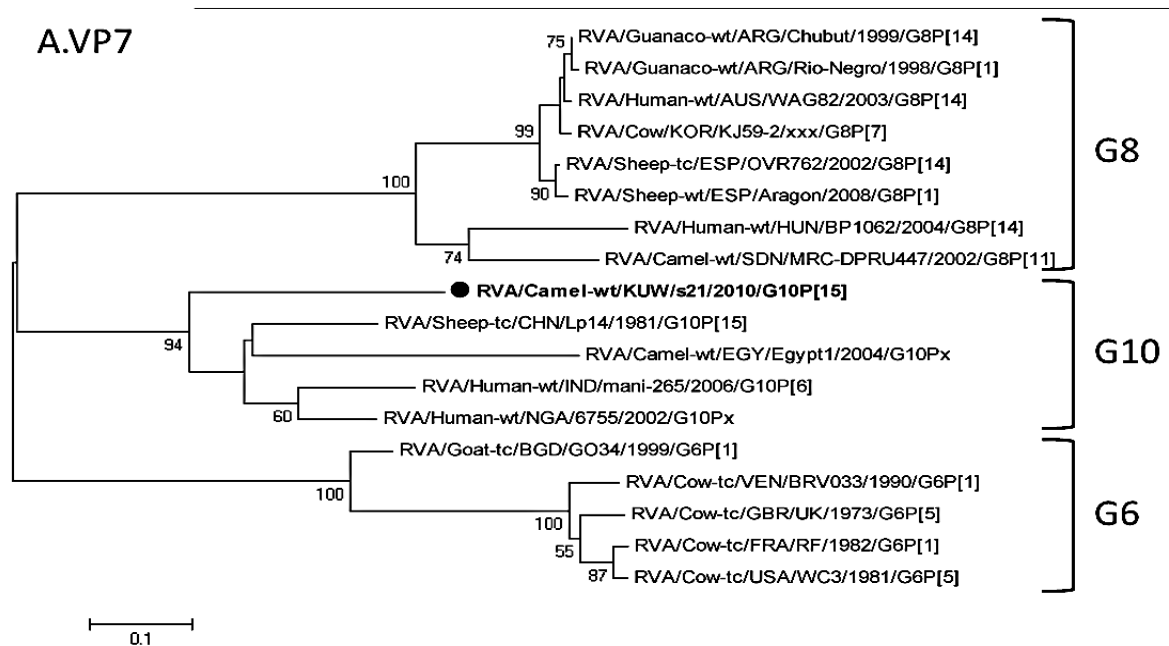


G.NSP4

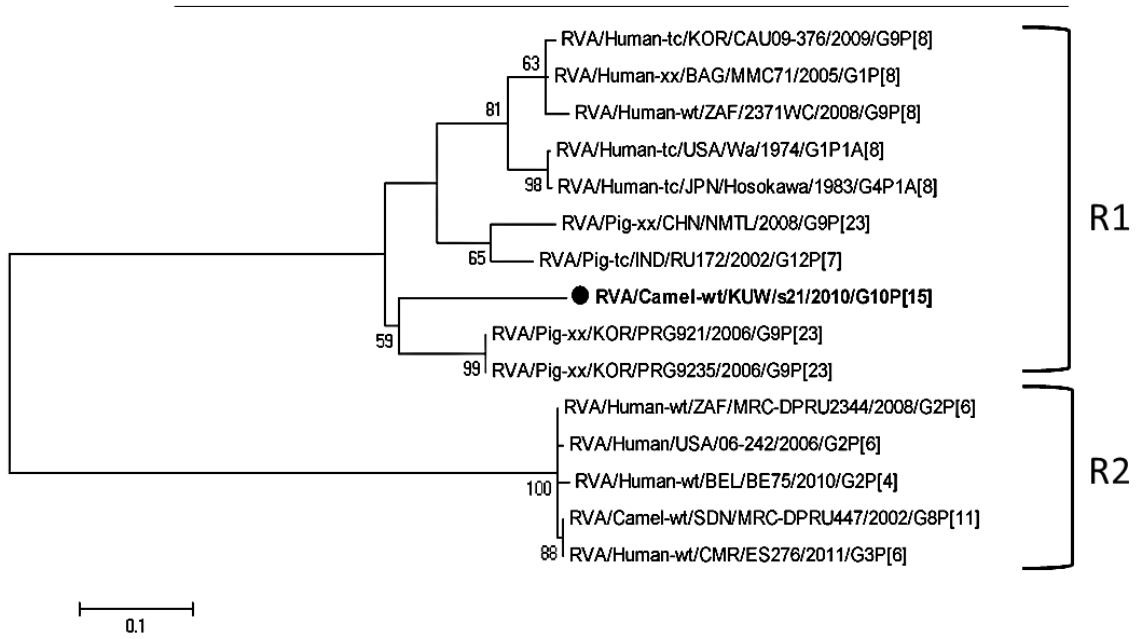




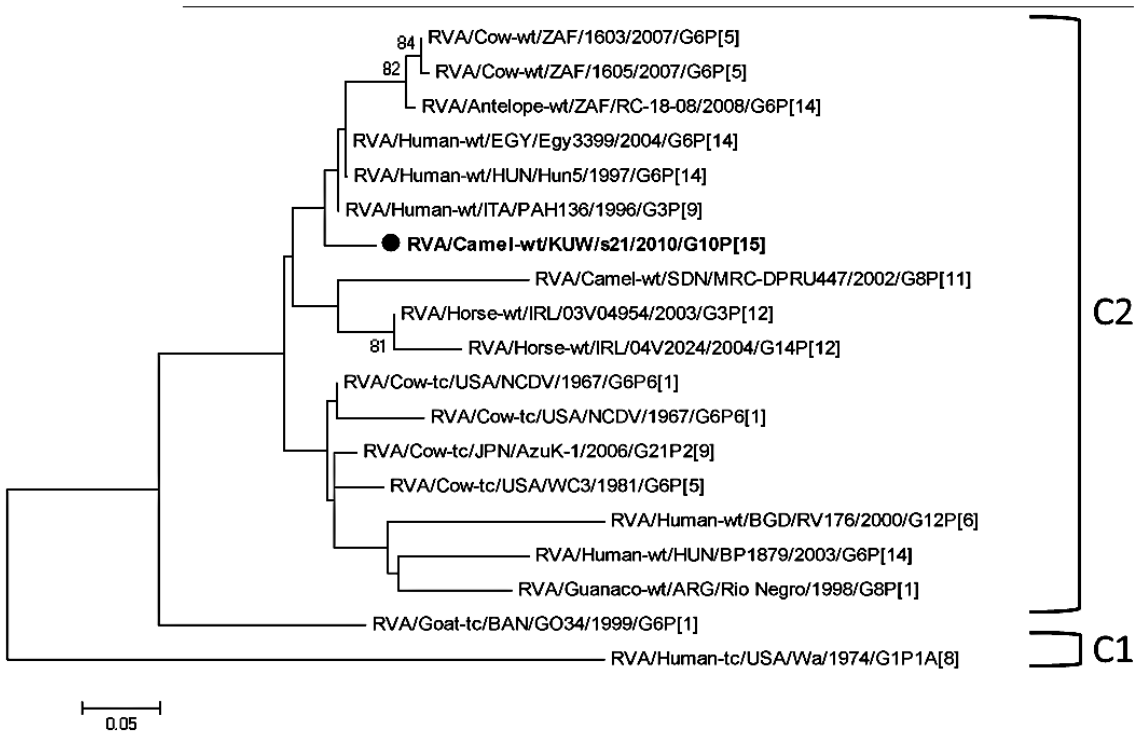
2. Függelék ábra. Teve RVA gén alapú filogenetikai fák. Az RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15] törzs génjeinek részleges szekvencia alapú összehasonlítása válogatott emlős RVA törzsek génjeivel, a filogenetikai fa rekonstrukció maximum likelihood módszerrel készült, Tamura-Nei, Tamura-3 és HKY: Hasegawa-Kishino-Yano szubsztitúciós modellekkel (TN93+GI; T92+GI, HKY+GI), 500-szoros bootstrap lefedettséggel (számértékek a faágak mellett). Az általunk feldolgozott teve RVA törzset félkövér kiemeléssel és teli kör (●) jelzéssel jelöltem. A genotípusok a jobb oldalon kerültek feltüntetésre. A bal sarokban található skála arányos a genetikai távolsággal



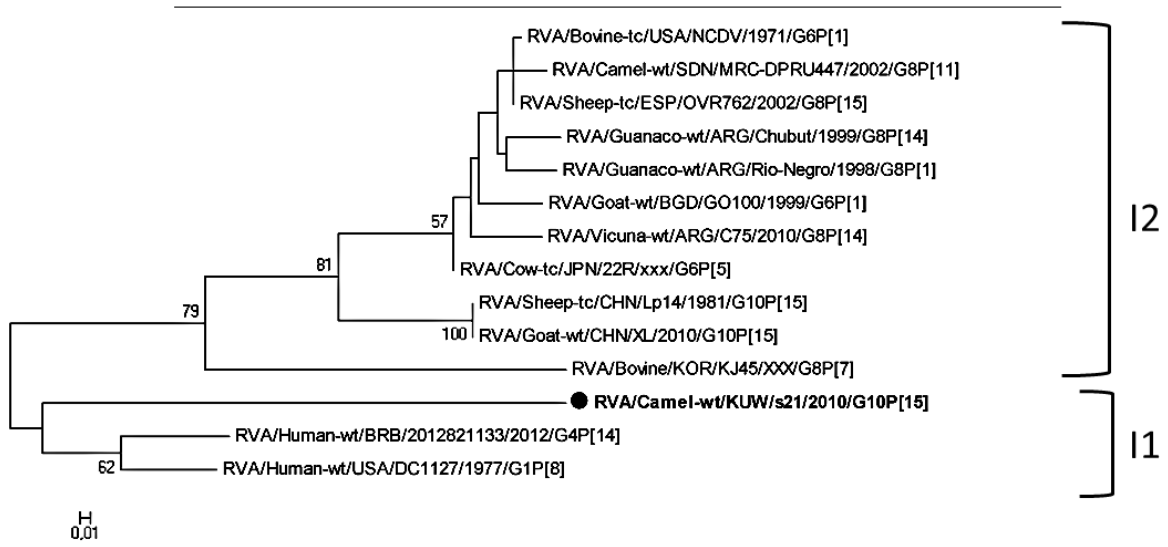
C.VP1



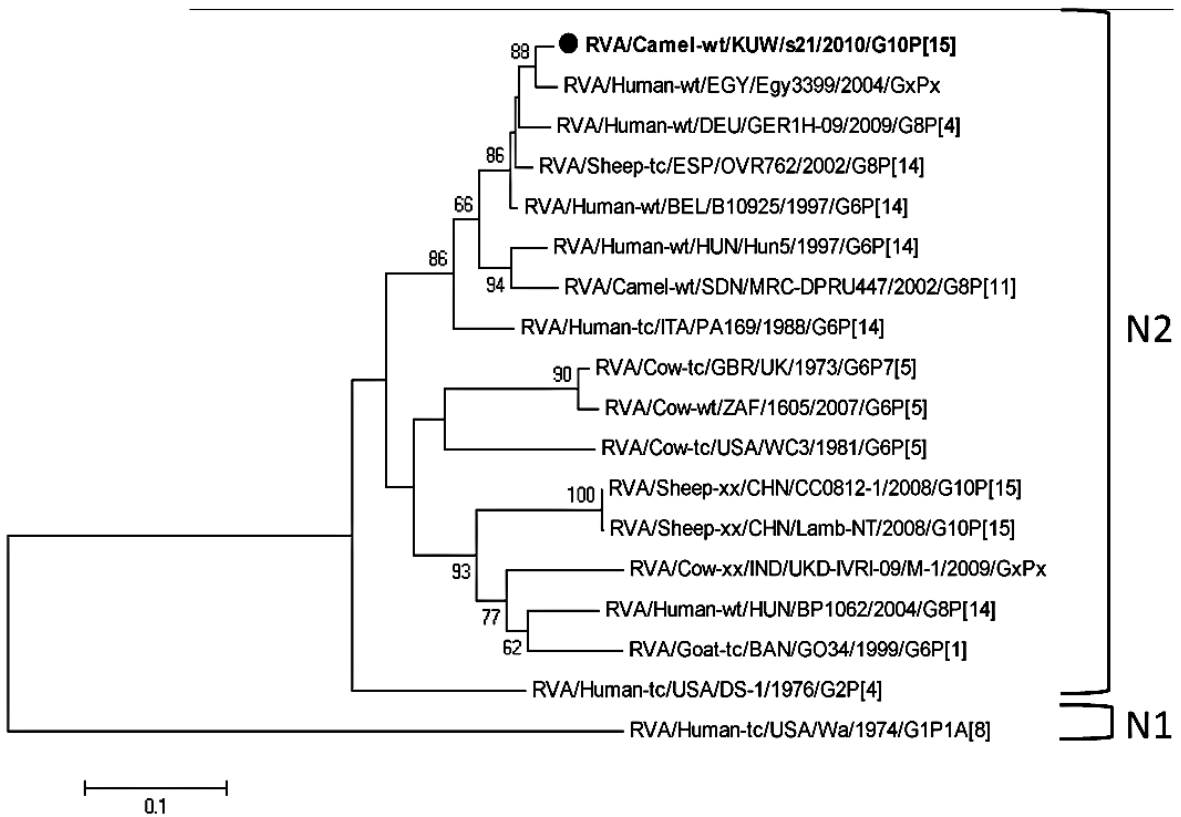
D.VP2



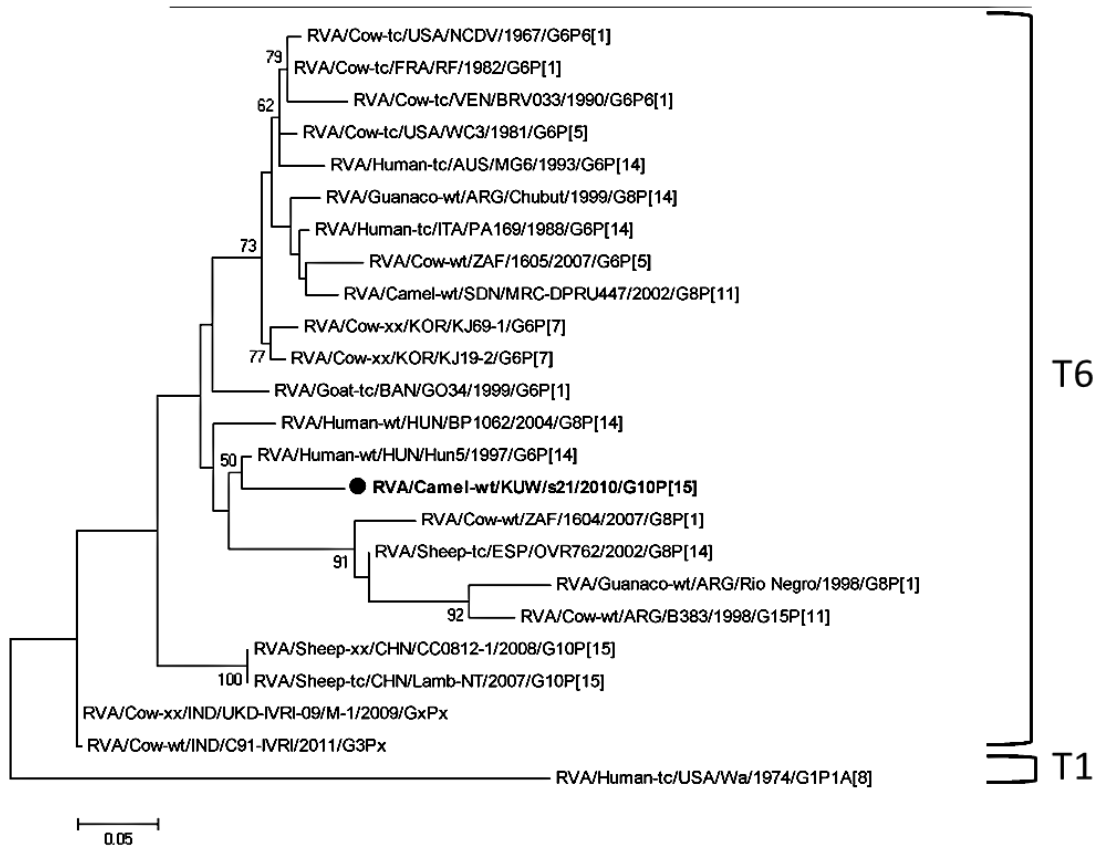
E.VP6



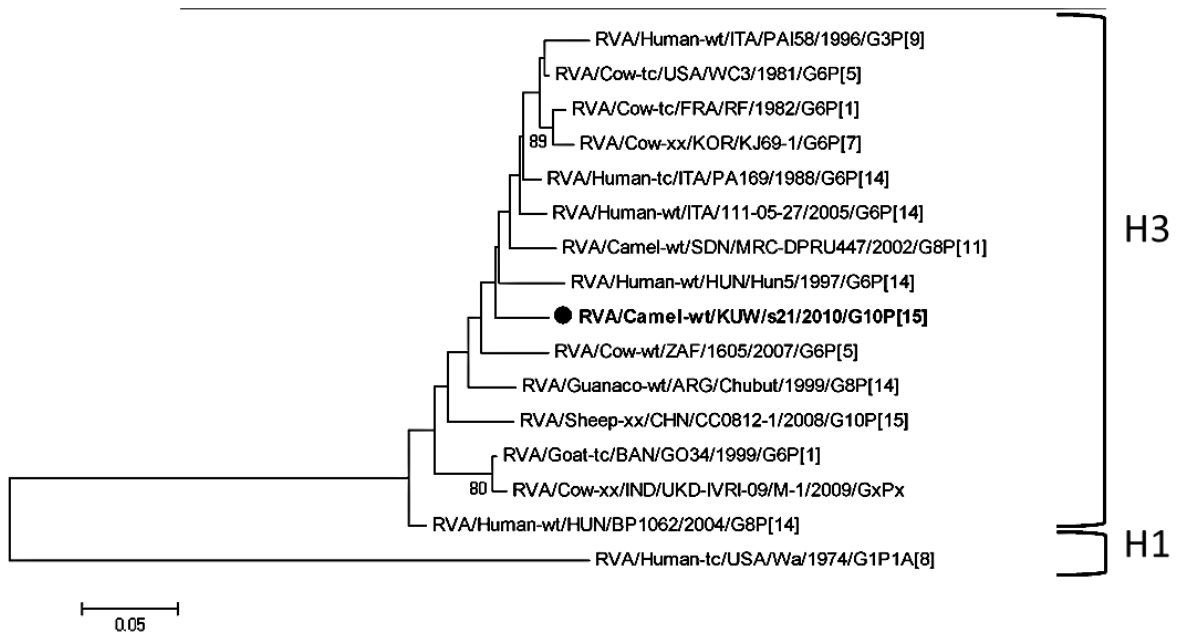
F.NSP2



G.NSP3

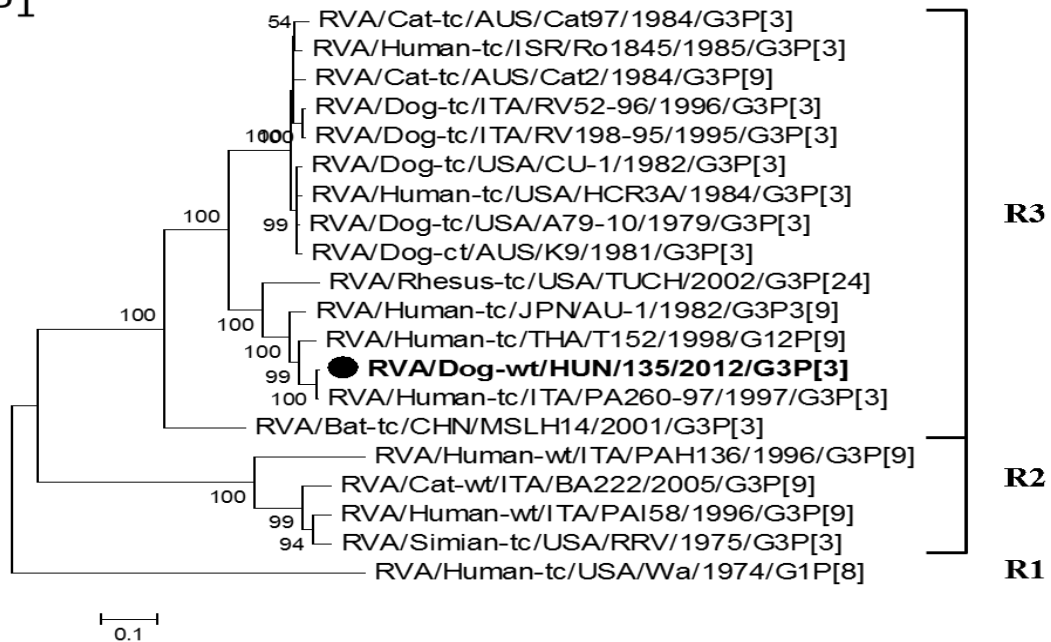


H.NSP5

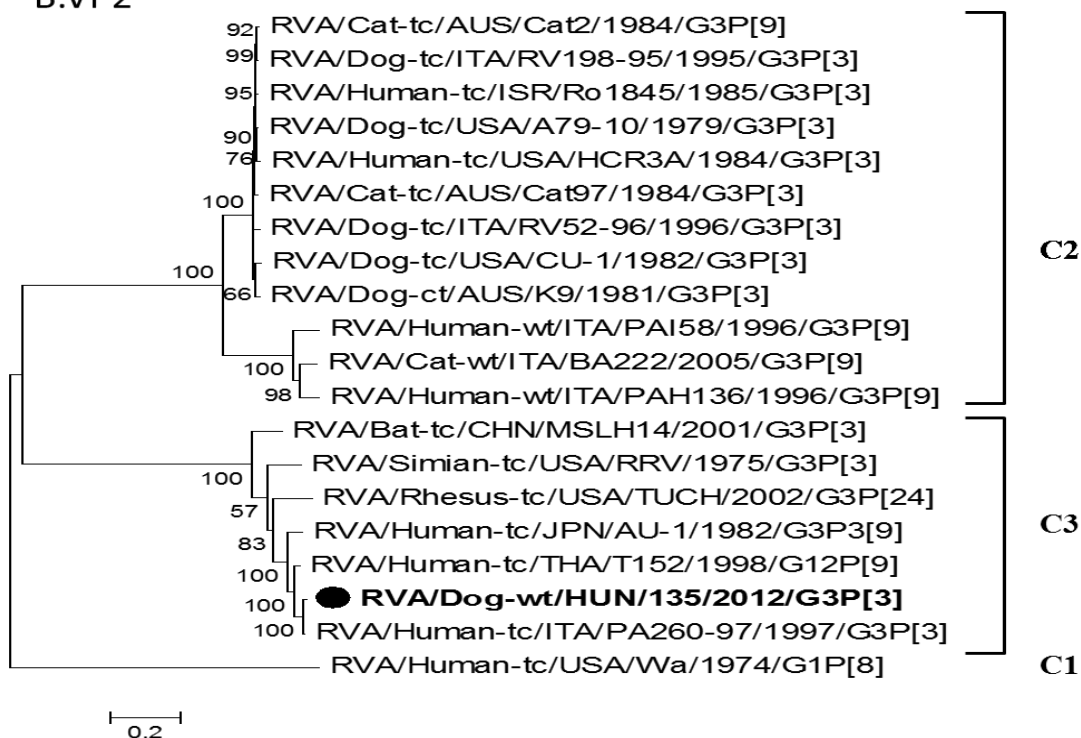


3. Függelék ábra. Kutya RVA gén alapú filogenetikai fák. Az RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3] törzs génjeinek összehasonlítása válogatott emlős RVA törzsek génjeinek teljes ORF nukleotid szekvenciájával, a filogenetikai fa rekonstrukció maximum likelihood módszerrel készült, Tamura-Nei és Kimura-2 szubsztitúciós modellekkel (TN93+G1; K2+G1), 500-szoros bootstrap lefedettséggel (számértékek a faágak mellett). Az általunk feldolgozott kutya RVA törzset félkövér kiemeléssel és teli kör (●) jelzéssel jelöltem. A genotípusok a jobb oldalon kerültek feltüntetésre. A bal sarokban található skála arányos a genetikai távolsággal. Az eredeti ábrák innen (Papp, H. et al. 2015).

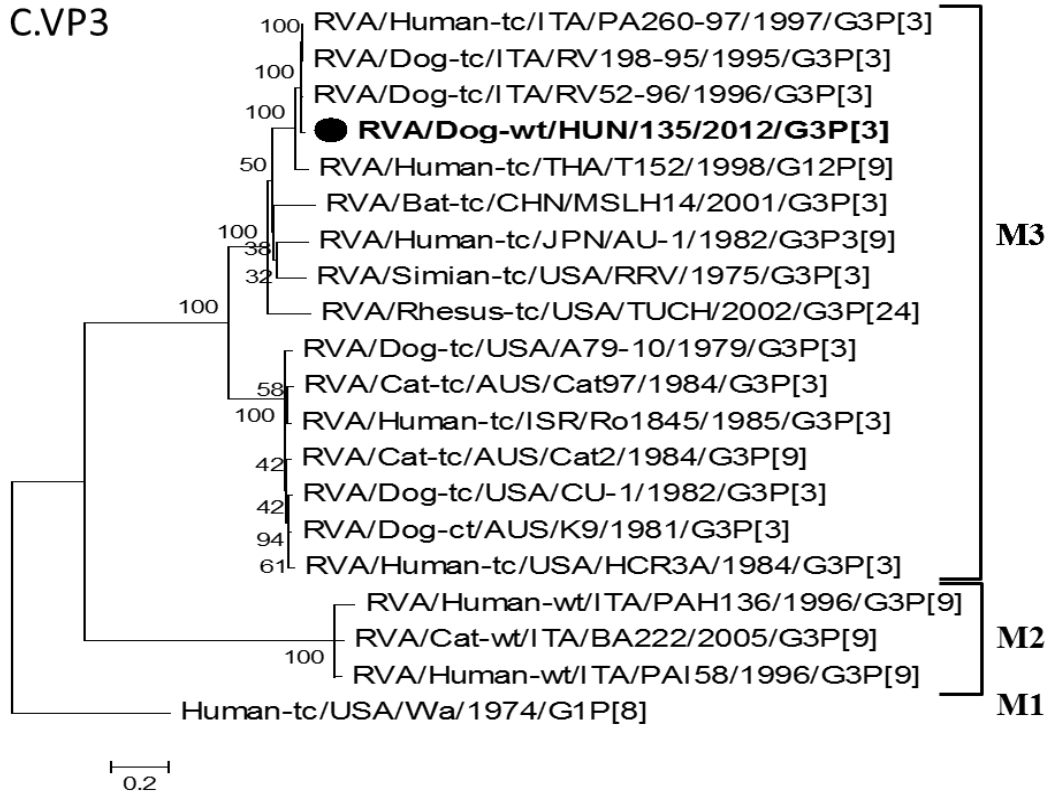
A.VP1



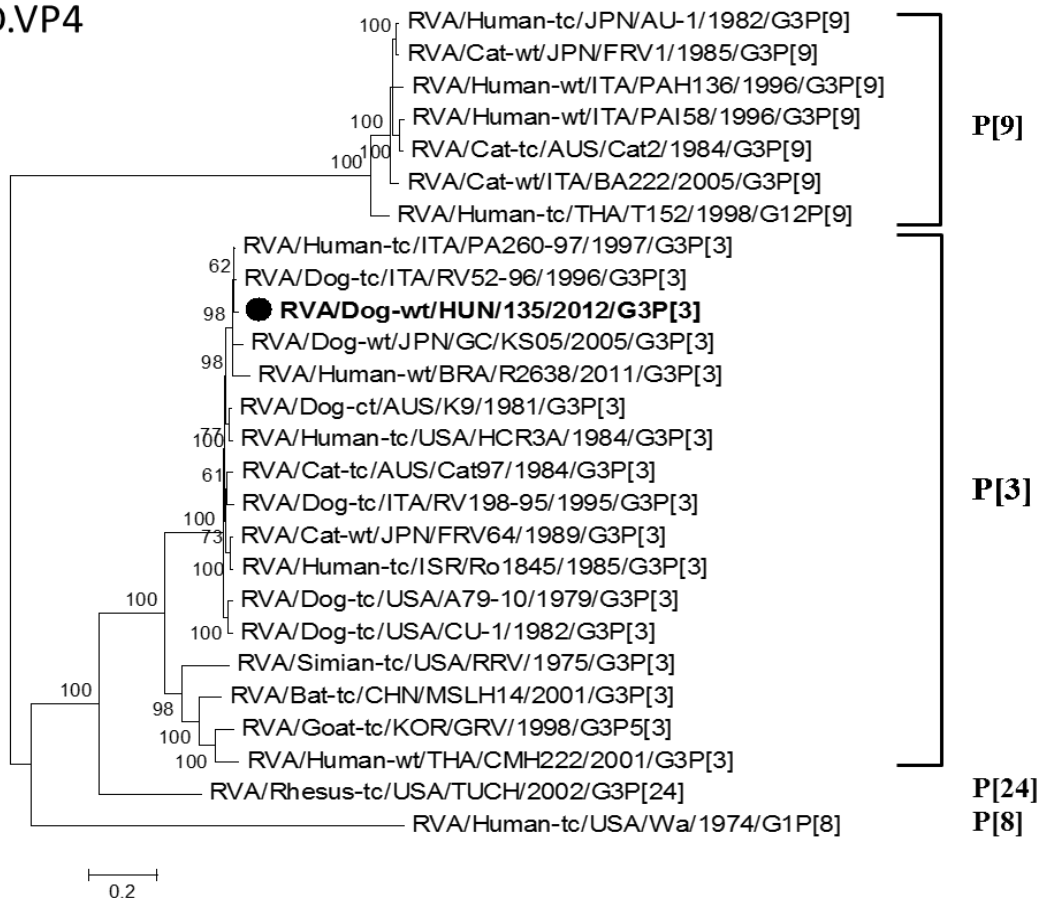
B.VP2



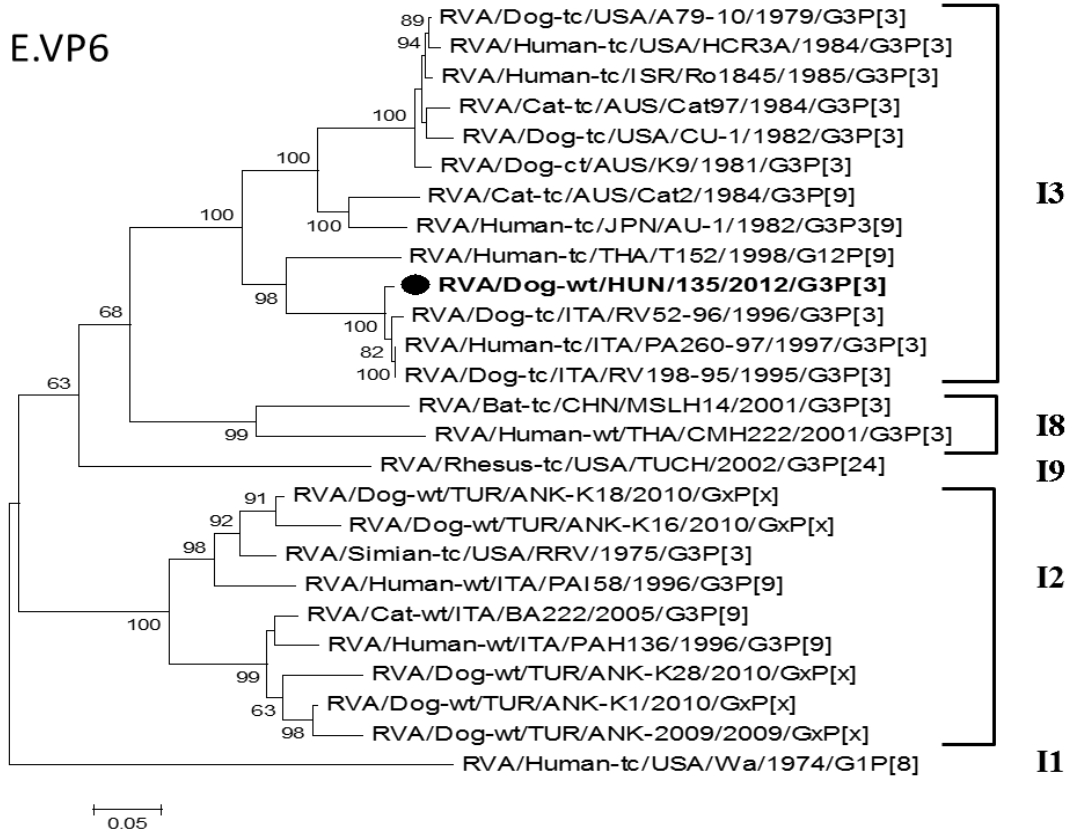
C.VP3



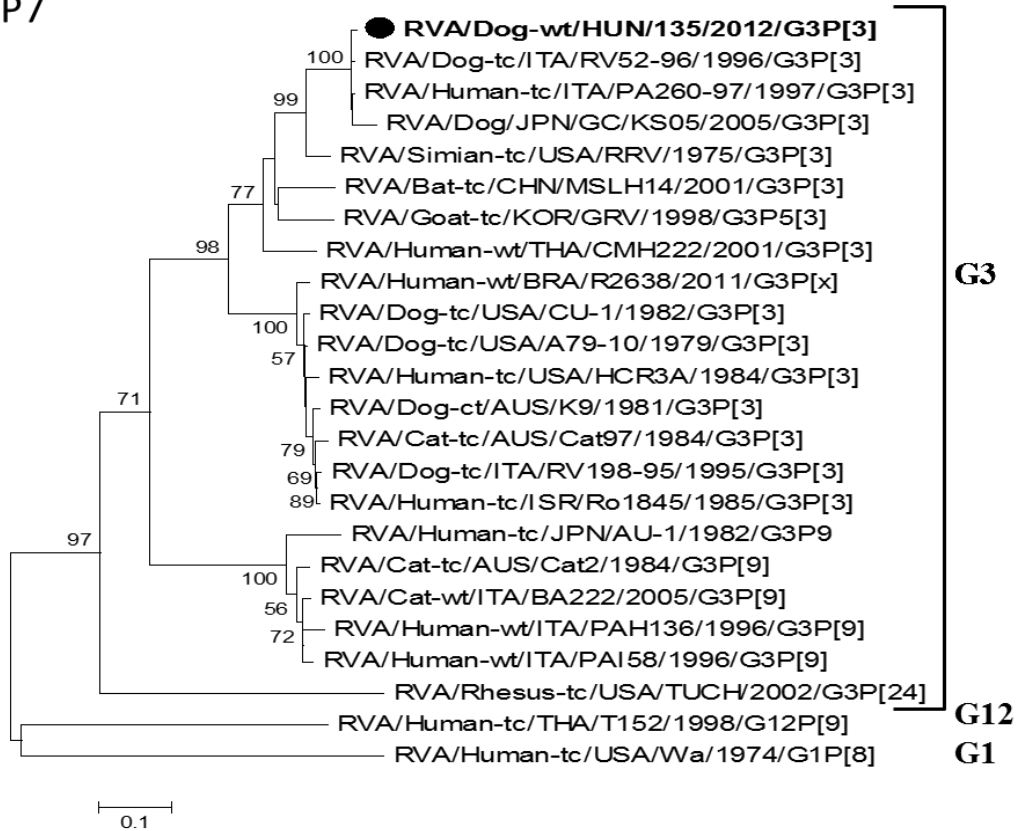
D.VP4

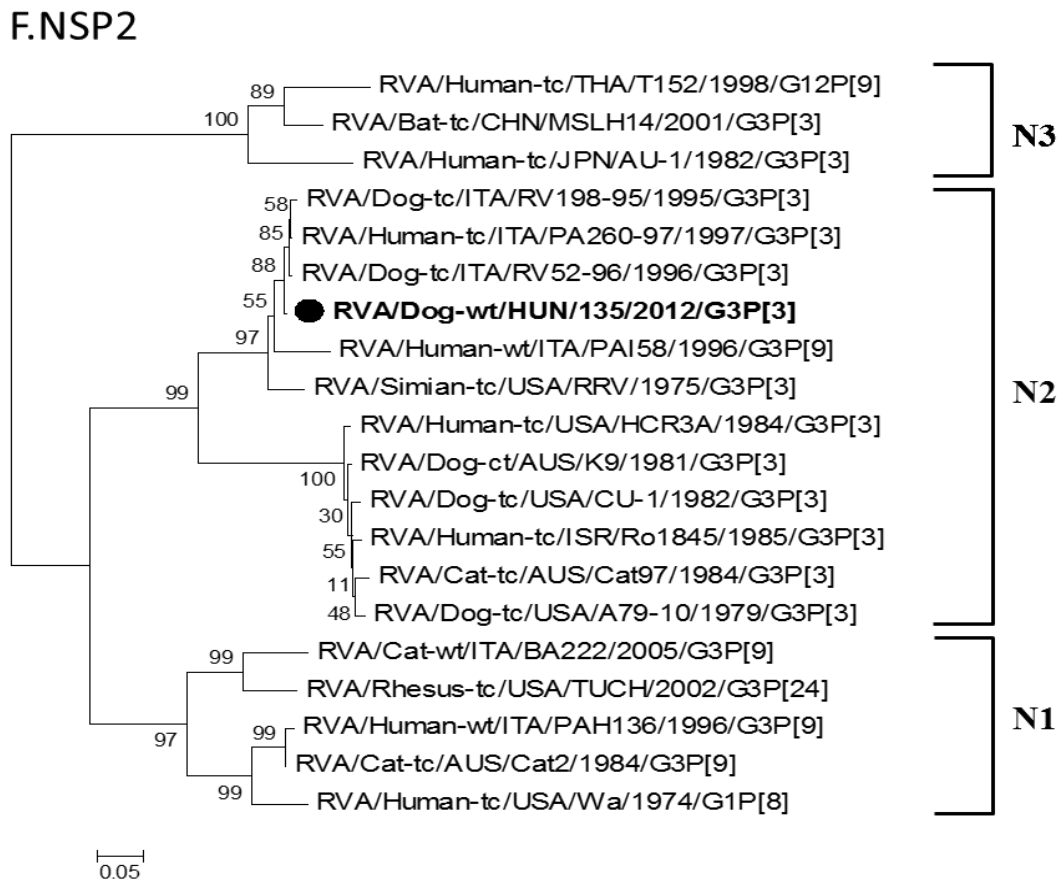
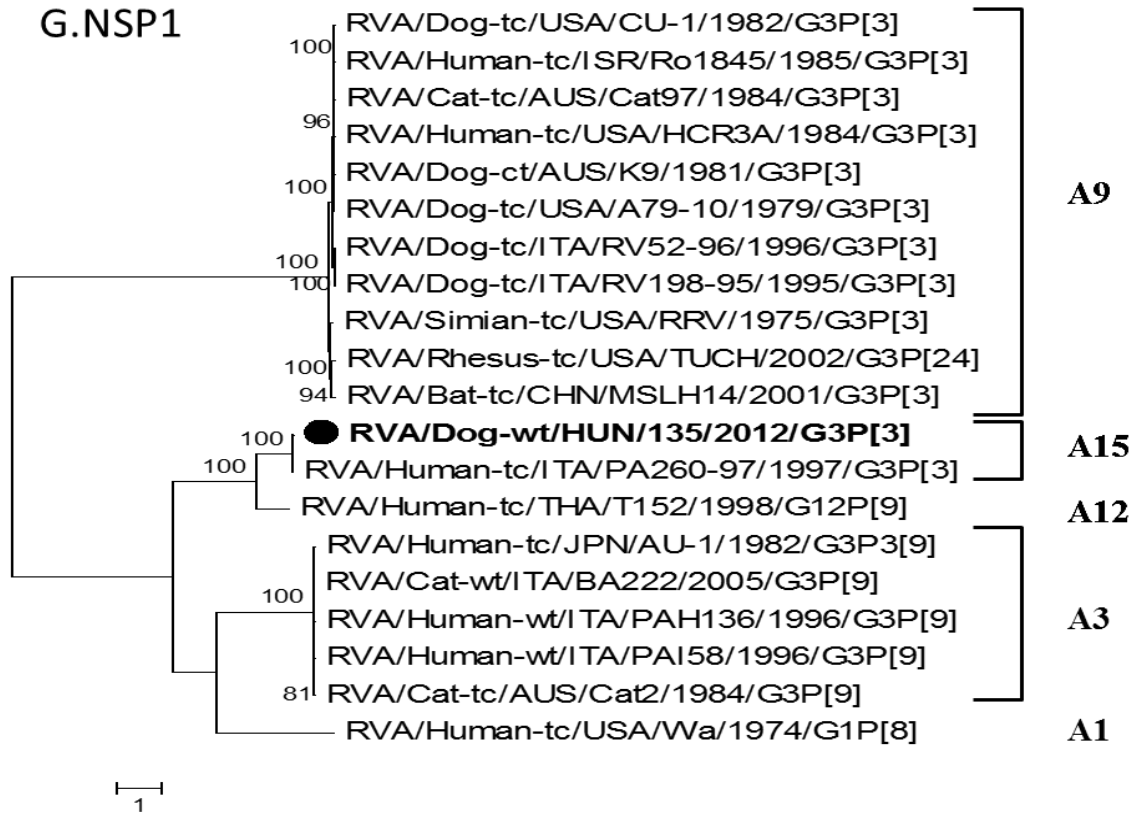


E.VP6

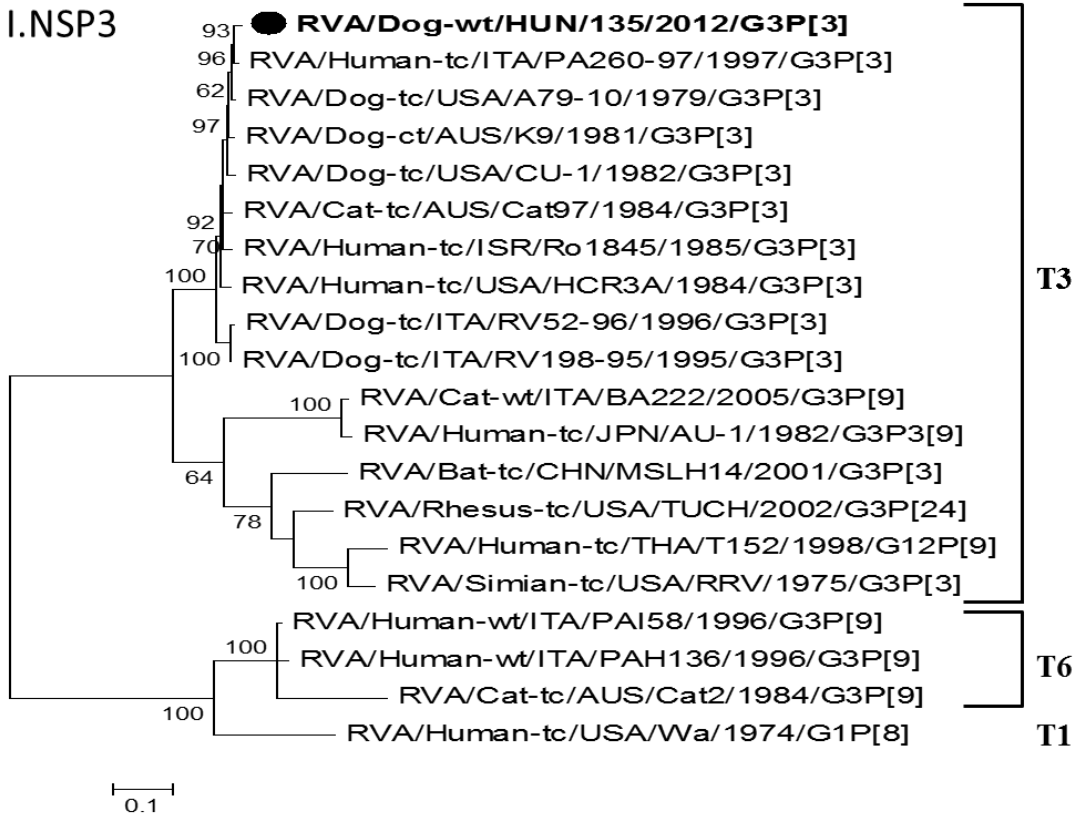


F.VP7

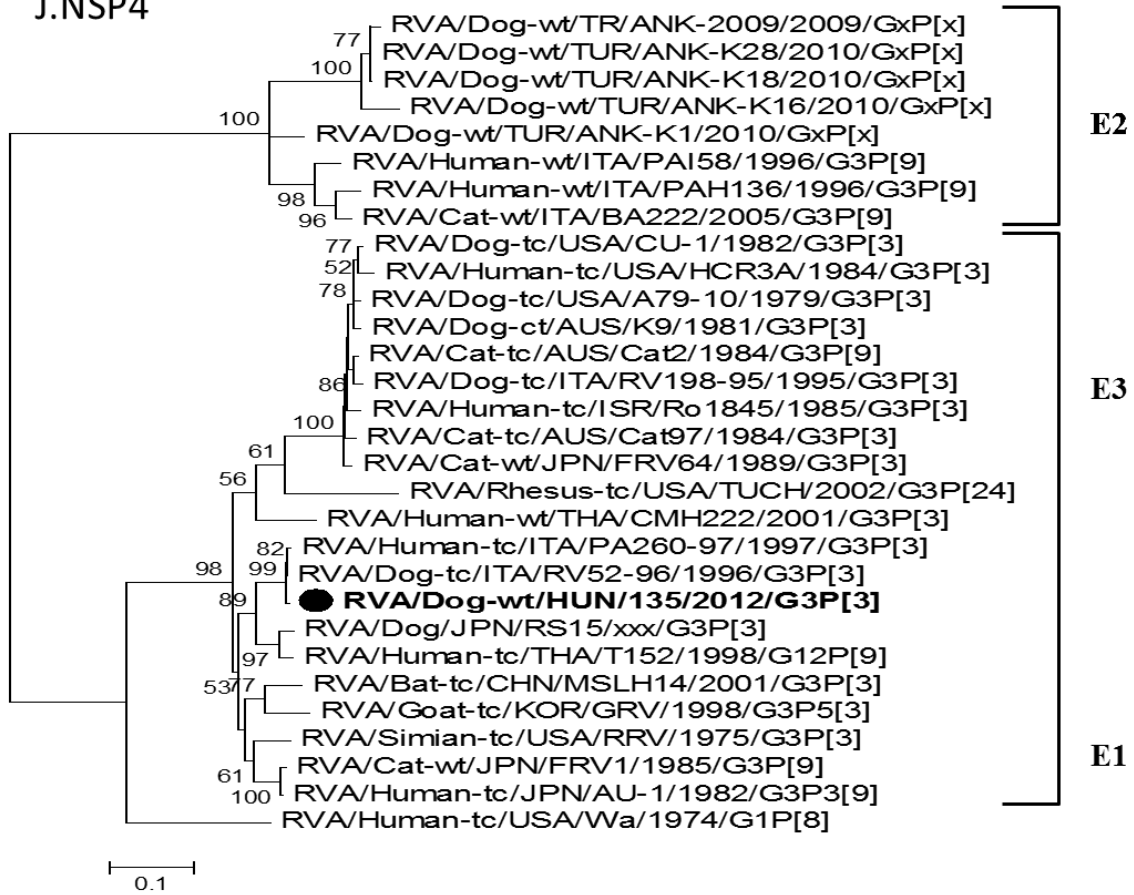




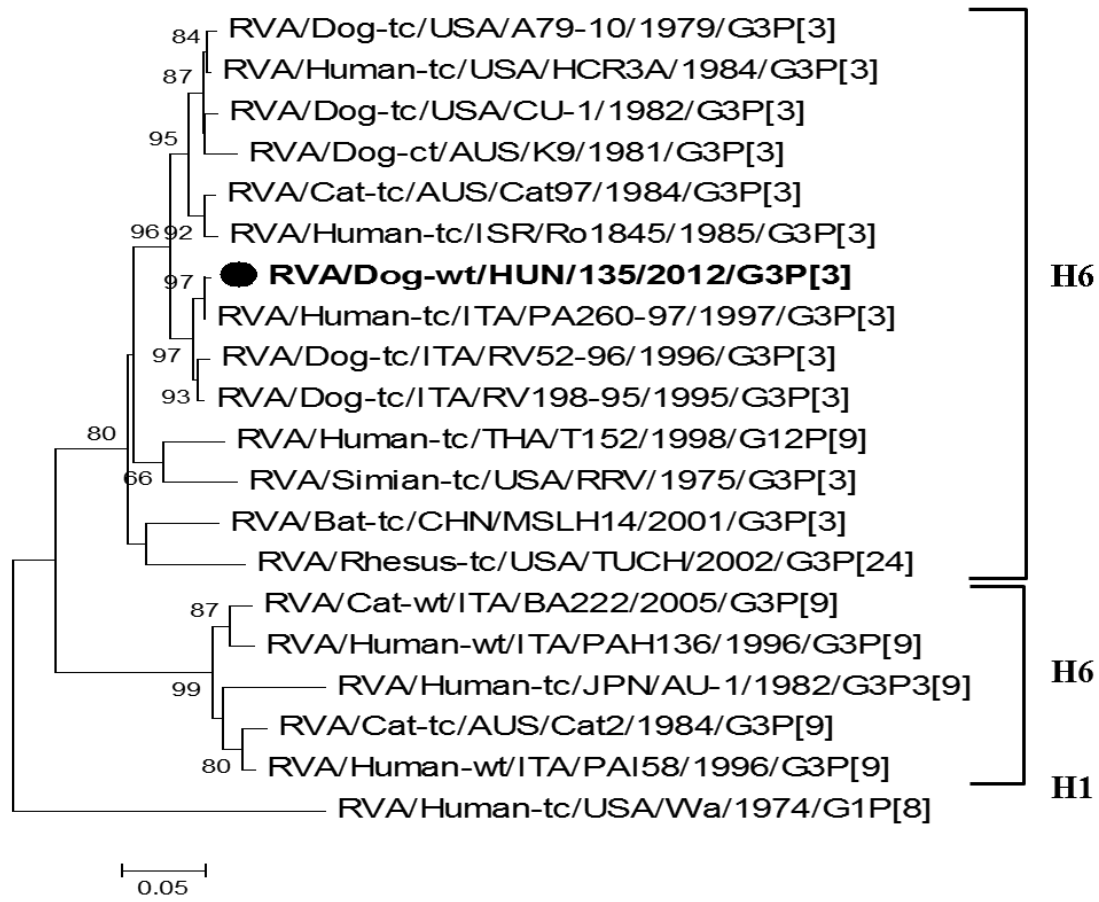
I.NSP3



J.NSP4

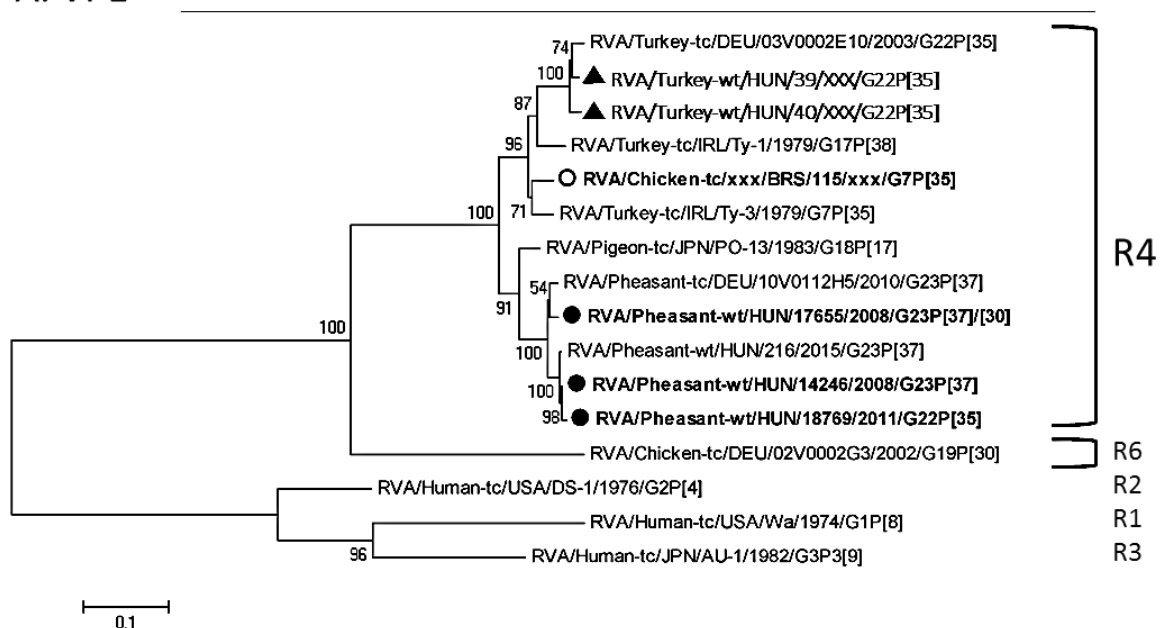


K.NSP5

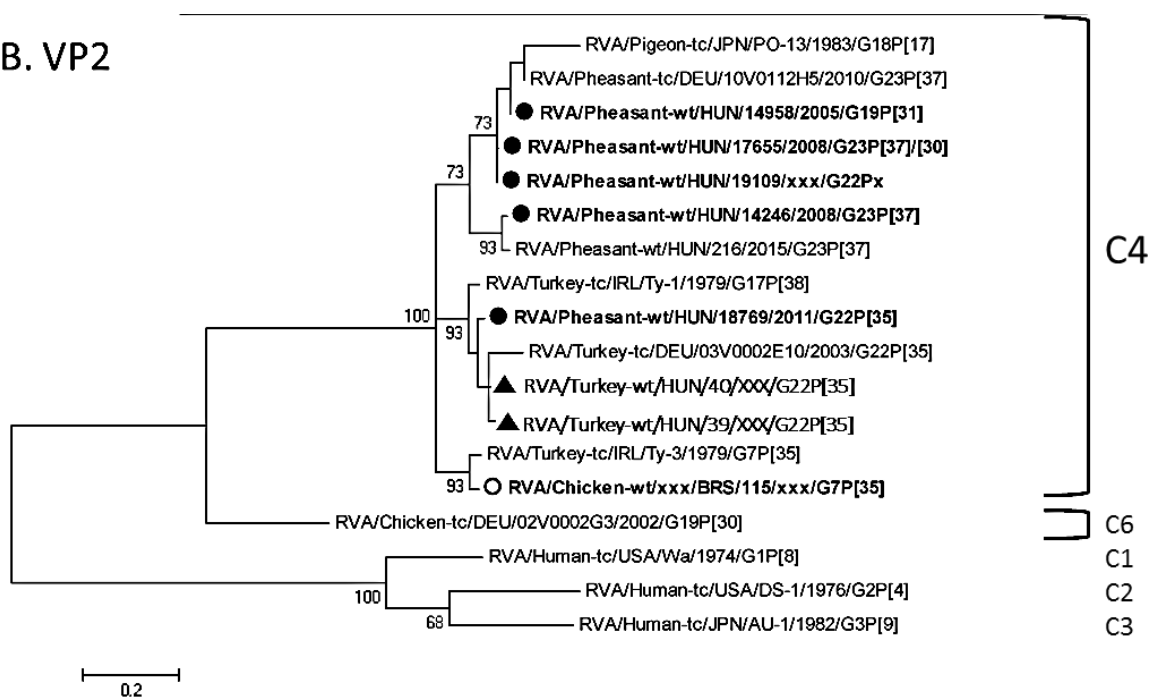


4. Függelék ábra. Madár RVA gén alapú filogenetikai fák. Magyarországi madár RVA törzsek génszekvenciái alapján készült filogenetikai fák. A farekonstrukció ML módszerrel, TN93+GI szubsztitúciós modellel készült, 500-szoros bootstrap ellenőrzés mellett (szám értékek a faágak mellett). Az általunk feldolgozott, magyar madár RVA törzsek félkövérrel kiemelték, a házityúk RVA törzset üres kör (○), a fácán RVA törzsetek teli kör (●), a pulyka RVA törzsetek teli háromszög (▲) jelöli. A jobb oldali a felirat a genotípusokat jelöli.

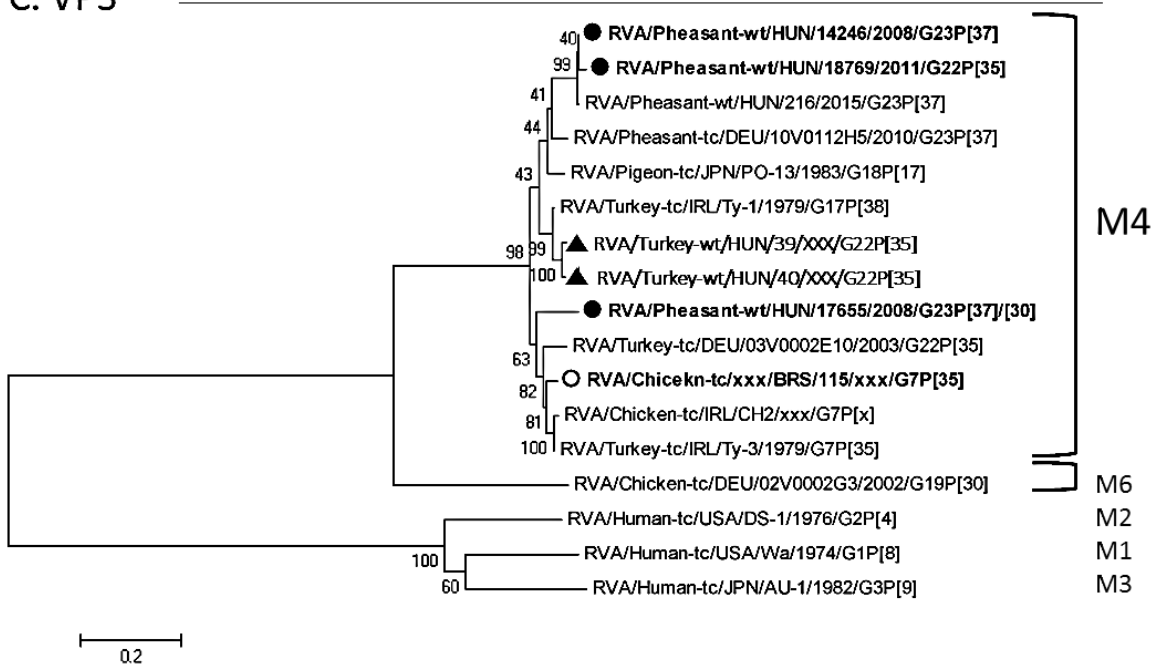
A. VP1



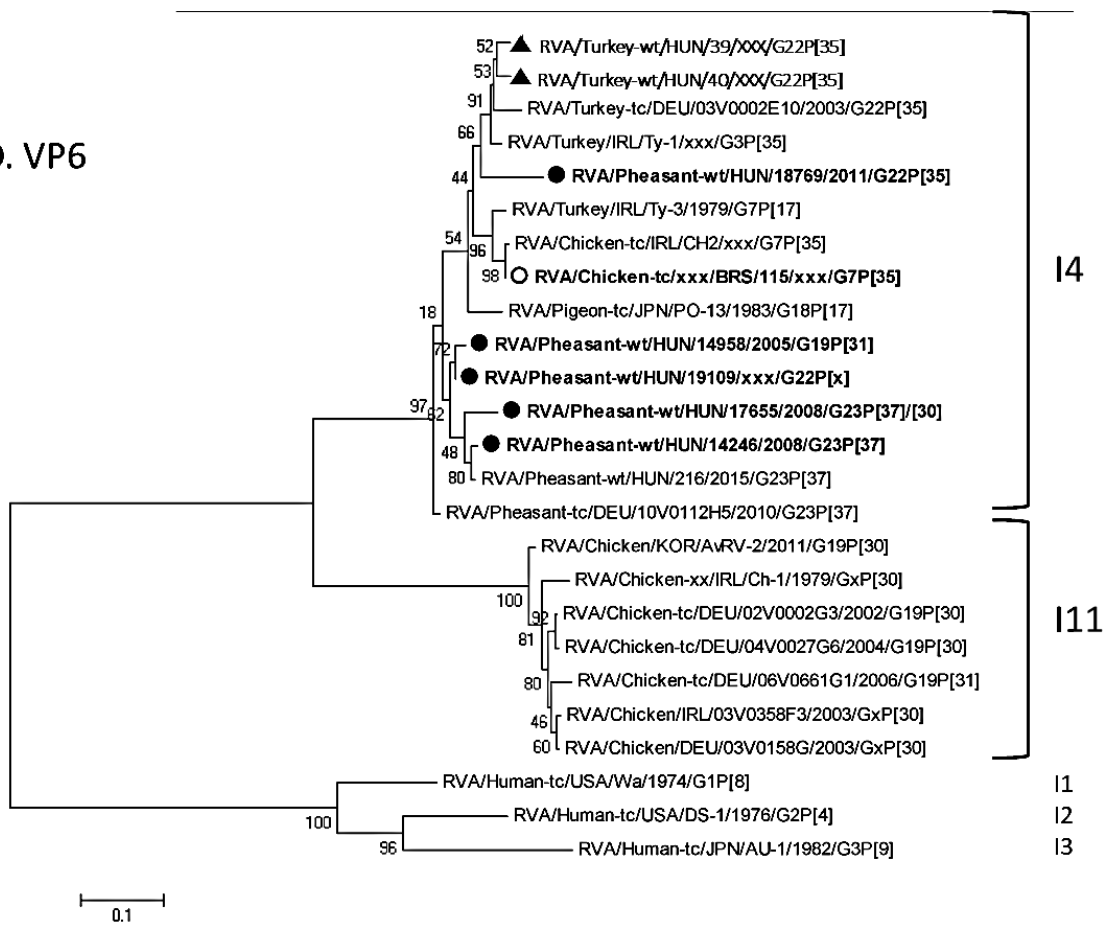
B. VP2



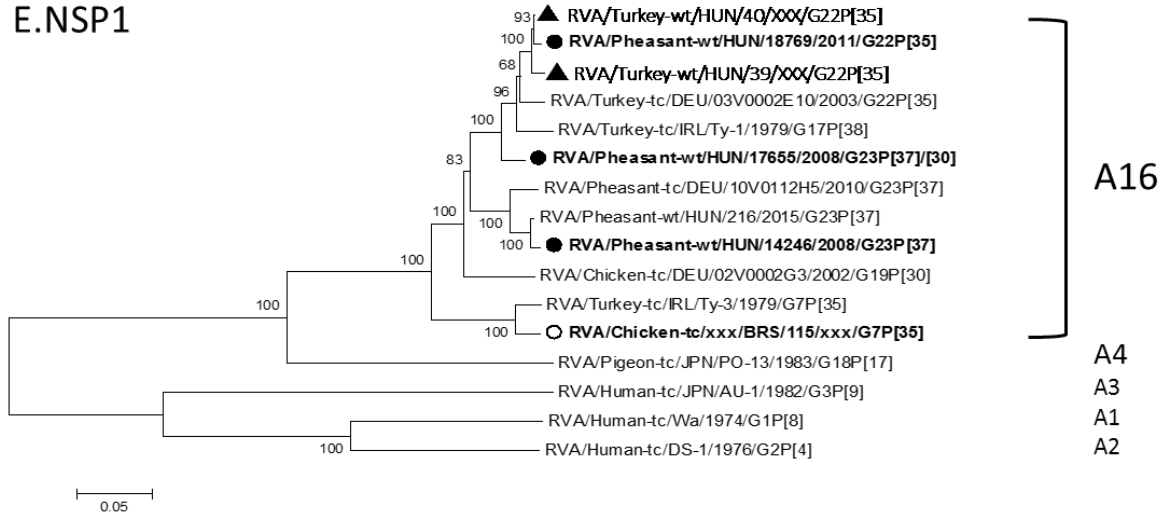
C. VP3



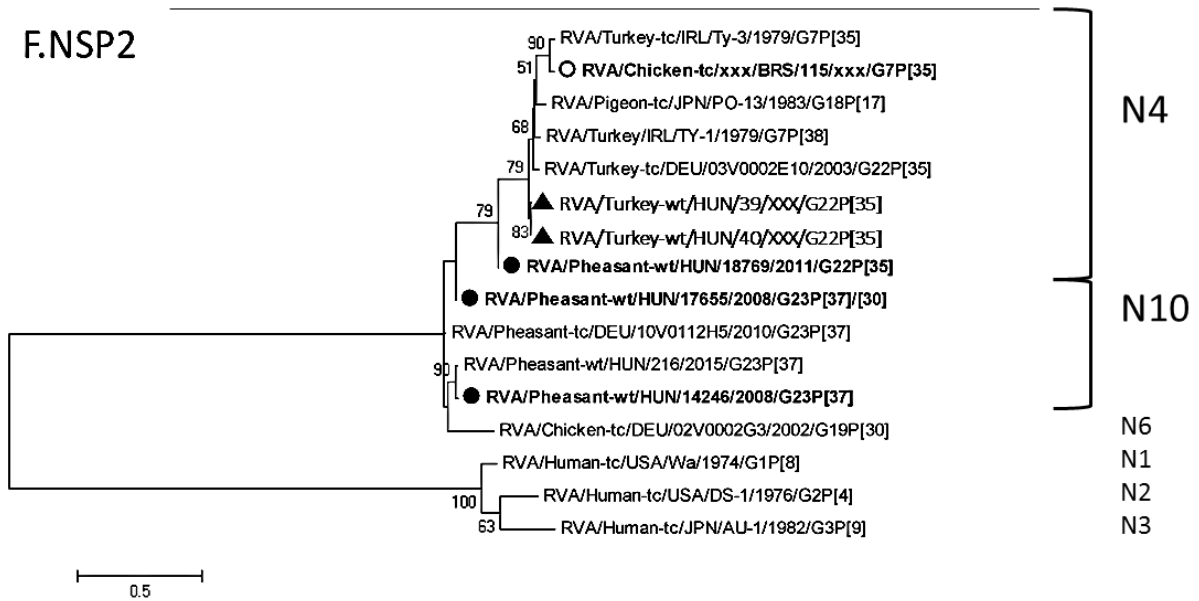
D. VP6



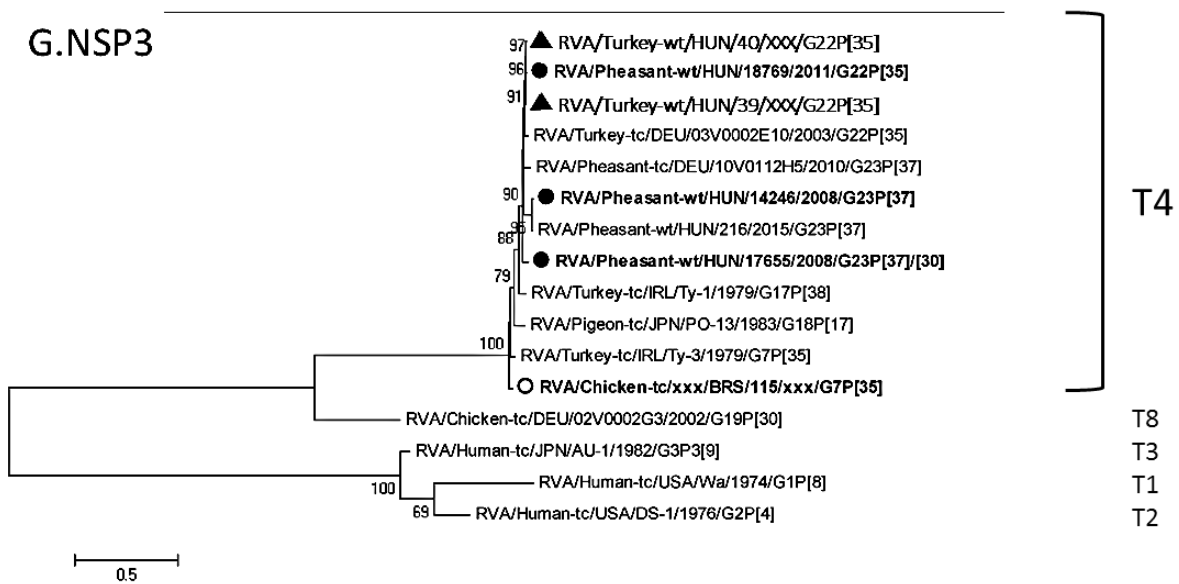
E.NSP1



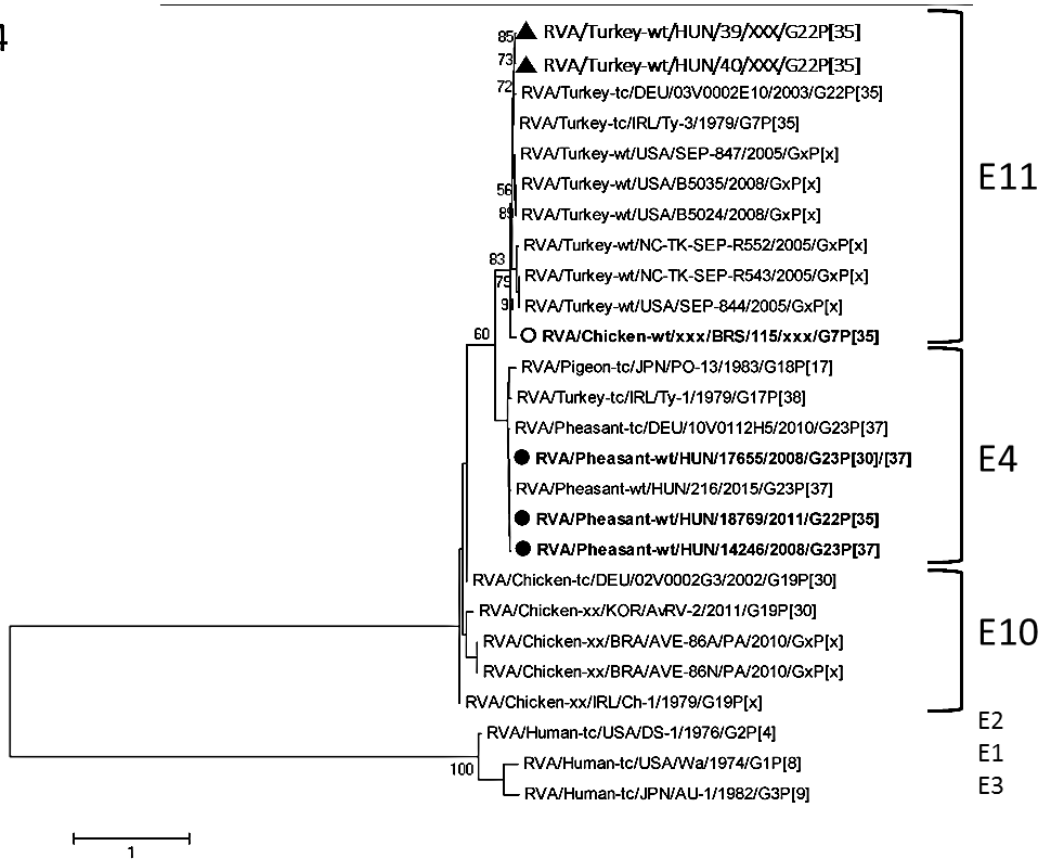
F.NSP2



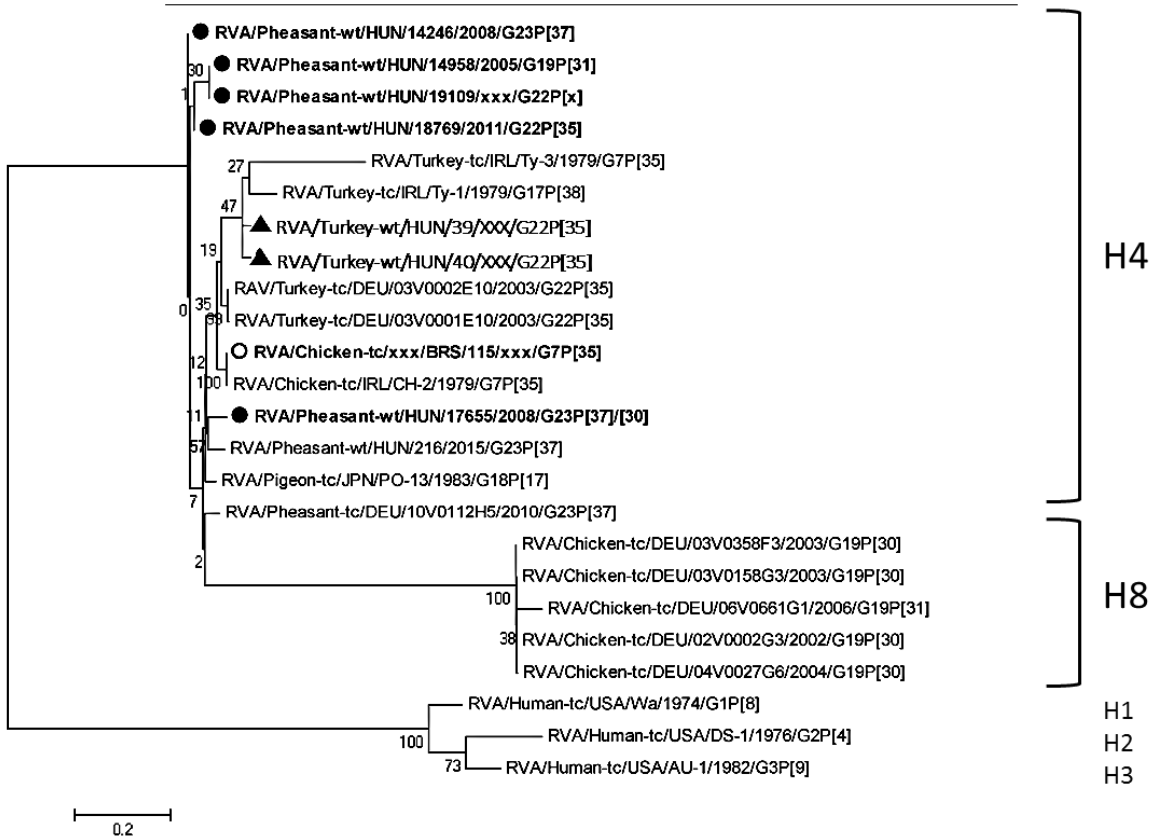
G.NSP3



H.NSP4



I.NSP5



1. Függelék táblázat. Az RT-PCR során alkalmazott madár és emlős RVA saját tervezésű primerek. A betűk a következő nukleotidok azonos arányú keverékét jelentik: R: A, G; Y: C, T; M: A, C; K: G, T; S: C, G; W: A, T; H: A, C, T; B: C, G, T; V: A, C, G; D: A, G, T; N: A, C, G, T.

Cél szegmens, primer elhelyezkedése a szegmensben (nt)	Primer neve	Primer szekvenciája (5' irányultságban)
Általános madár RVA primerek		
Szegmens 1: 9-33	Avrota-VP1-9F	AGCTATACGATGGGGACGTATAATG
Szegmens 1: 570-595	Avrota-VP1-570F	AGACATGATCAAAARTATAGATACAR
Szegmens 1: 571-596	Avrota-VP1-596R	GTGTATCTATAYTTTTGATCATGTCA
Szegmens 1: 794-820	AV-VP1-820R	TTWGAGAATTCMARTTCMARTTCTTC
Szegmens 1: 1360-1384	Avrota-VP1-1360F	CCAATACCATTGGGTAGACGAGATG
Szegmens 1: 1360-1384	AV-VP1-1360R	CATCTCGTCTACCCAATGGTATTG
Szegmens 1: 1200-1220	Arota-VP1-1200F	CTGGCCTATTGTCAATGTCA
Szegmens 1: 1200-1221	PO-13-VP1-1220F	CGAATGGTGAGTCCAGACAA
Szegmens 1: 1361-1382	Avrota-VP1-1382R	ACATCTCGTCTACCCAATGGTA
Szegmens 1: 1630-1650	PO-13-VP1-1630R	ACCTTTTCTGAACGGTTCGG
Szegmens 1: 1990-2013	Arota-VP1-1990F	ATAAGAGACACATATCAAGAAT
Szegmens 1: 2052-2075	Avrota-VP1-2052F	GCTAAAAGATATATTGCMGGAGGM
Szegmens 1: 2060-2084	Avrota-VP1-2060F	ATWGCTAAAAGATATATTGCMGGA
Szegmens 1: 2051-2075	Avrota-VP1-2075R	CCTCCKGCAATATATCTTTTAGCSA
Szegmens 1: 2199-2225	AV-VP1-2225R	ACTGAAGTCATTTGCATTATYTRGT
Szegmens 1: 2240-2266	AV-VP1-2240F	AAGATAATGCAAATGACTTCAGTWGC
Szegmens 1: 2300-2321	Po-13-VP1-2300R	GTACTGACTACGAACCAACG
Szegmens 1: 2454-2466	Arota-VP1-2454F	GTTATGTGAATAAAGTGCAAA
Szegmens 1: 2895-2920	AV-VP1-2920R	GAGTCWATRYTGGTACWCCMYGTG
Szegmens 1: 3278-3302	Avrota-VP1-3302R	CCTCCKGCAATATATCTTTTAGCSA
Szegmens 1: 3' vég	AV-VP1end	GGTCAKTAGCGSCYTAMTCTTGA
Szegmens 1: 3' vég	AV-VP1END	GTTACATCKTAGCGSCYTAMTCTTG
Szegmens 2: 1-25	Avrota-VP2-1F	GGCTATWAAAGCTCAASATGGCYTA
Szegmens 2: 540-564	Avrota-VP2-540F	AATAGATGGTATTGGAAAAYTRAAG
Szegmens 2: 512-538	Avrota-VP2-538R	GTCATCTTTCTTYARTTTCCAATACCA
Szegmens 2: 520-544	AV-VP2-520F	AATAGATGGTATTGGAAACTGAAG
Szegmens 2: 756-776	PO-13-VP2-756R	GTCTCATGTCGGCAATGAATC
Szegmens 2: 1290-1310	Arota-VP2-1290F	GTATGTGGCTGATGTCTATA
Szegmens 2: 1312-1337	Avrota-VP2-1312F	TAGTACCTACWASYATGTTTCATTMGA
Szegmens 2: 1318-1340	Avrota-VP2-1340R	TCTCKAATGAACATRWTSGTAGG
Szegmens 2: 1540-1563	AV-VP2-1540F	ATTGATGGAGTKATTAATCARAC
Szegmens 2: 1760-1785	AV-VP2-1760R	GTCTGSACRTTTTGCATATTCATAG
Szegmens 2: 1836-1858	Avrota-VP2-1836F	ATTGGAAATACTACYGTMATTCC
Szegmens 2: 1831-1855	Avrota-VP2-1855R	TKACRGTAGTATTTCCAATYAAGA
Szegmens 2: 1850-1870	PO-13-VP2-1850F	CAGAGCCACGCACACTATTC
Szegmens 2: 2540-2563	Arota-VP2-2540F	CAAAAGTGTTTAAGCAAGTGCCA
Szegmens 2: 2715-2745	Avrota-VP2-2745R	GGTCATATCSCCATTACGGT

Szegmens 2: 3' vég	AV-VP2end	GGTCATATCWCCATTTACGGT
Szegmens 3: 1-24	AV-VP3-1F	GGCTATTAAGCTACAYGAGTAG
Szegmens 3: 25-46	Avrota-VP3-25F	CGTCTTACTCTTAGTGGTGTAG
Szegmens 3: 480-504	Arota-VP3-480F	ATGTCAAATACTGCTACTGATGAT
Szegmens 3: 723-743	Arota-VP3-723F	CGCAGCTAATGAATTTATGG
Szegmens 3: 607-634	Avrota-VP3-607F	TCAAATAGRTATTWAGAGAATWKTTGTA
Szegmens 3: 600-625	Avrota-VP3-625R	AATACAAMSATTCTCTSAATAYTGTA
Szegmens 3: 1082-1103	Arota-VP3-1082F	CTGATTGGAGAGAAATGGAGACA
Szegmens 3: 1190-1213	AV-VP3-1190R	GTAATYTTACARCAACARATTCT
Szegmens 3: 1551-1579	Avrota-VP3-1551F	RTATGATTATTTATATYTGCCAWCTGAWR
Szegmens 3: 1547-1573	Avrota-VP3-1573R	TCAGSTGGCARATATAAATAATCATA
Szegmens 3: 2000-2024	AV-VP3-2000F	CACCAGARTTRYTWTATGCMTGTC
Szegmens 3: 2137-2160	AV-VP3-2160R	CTTAWAWGGYAATCWACRAAMTC
Szegmens 3: 2160-1681	Arota-VP3-2160F	GCCATTTAAGCATACTATATC
Szegmens 3: 2540-2566	Avrota-VP3-2566R	TGTTARGTTTTTATCCTATCTCAYCTA
Szegmens 4: 9-31	Avrota-VP4-9F	ATGGCTTCWCTCGTATATAGACA
Szegmens 4: 10-33	Avrota-VP4-10F	ATGGCTTCNCTCGTATAYAGACA
Szegmens 4: 602-629	Avrota-VP4-602F	CATYTTTRTGAATTATTATATMGTRCCW
Szegmens 4: 607-636	Avrota-VP4-607F	TCAAATAGARTATTWAGAGAATWKTTGTA
Szegmens 4: 603-629	Avrota-VP4-629R	GGYACKATATAATAATTACAYTTRATG
Szegmens 4: 765-789	Arota-VP4-765F	TTCTAAGACATCCATGTGGAAGGA
Szegmens 4: 800-823	AV-VP4-800F	CCWGARAACATTGMAAACATATC
Szegmens 4: 874-900	AV-VP4-900R	CCATCNCKTTCATAYGTRTAYTCATA
Szegmens 4: 1031-1060	AV-VP4-1060R	AAYGCTTGARGARTCATCCARTAAATC
Szegmens 4: 1190-1212	Avrota-VP4-1190F	AGTTGGNCARTGGCCACAAATG
Szegmens 4: 1480-1503	Avrota-VP4-1480F	GCAGGATTTAGAACAACAGATAT
Szegmens 4: 1473-1500	Arota-VP4-1500R	TTCNGAYGAYAABTGATTAAYTCTTC
Szegmens 4: 1566-1591	Avrota-VP4-1566F	GGRCTYGATATGTTTTCAATGTTCTC
Szegmens 4: 1570-1593	Avrota-VP4-1570F	CCRCTNGATATGTTTKCAATGTT
Szegmens 4: 1557-1582	Avrota-VP4-1582R	GAGAACATTGAAAACATATCRAGYGG
Szegmens 4: 1580-1605	AV-VP4-1580F	CTCTATTATAYGYAYYTCYTTCCA
Szegmens 4: 1700-1726	AV-VP4-1700R	GATAATTCTTCNGTAATWGTWGATAC
Szegmens 4: 1669-1689	Arota-VP4-1669F	CATCGACGCTGGCGAAATCT
Szegmens 4: 2211-2240R	Avrota-VP4-2240R	TGATTTATRAATTCTTTAAGMACTCTTGG
Szegmens 4: 2322-2300	Avrota-VP4-2322R	ATGGCTTCWCTCGTATATAGACA
Szegmens 4: 2539-2566	Avrota-VP4-2539R	TGTTARGTTTTTATCCTATCTCAYCTA
Szegmens 4: 3' vég	AV-VP4end	GGTGCAMATCCTCAYAGAAC
Szegmens 6: 5' vég	Avrota-VP6-5'end	GGCTTTTAAACGAAGTCTTCA
Szegmens 6: 24-45	Avrota-VP6-24F	ATGGATGTGCTTTATTCACYGC
Szegmens 6: 570-592	Avrota-VP6-570F	TGAATAACGGATCTGAAAYGAAA
Szegmens 6: 569-592	Avrota-VP6-592R	ATTTCRATTTAGATCCGTTATTC
Szegmens 6: 1198-1217	Avrota-VP6-1217R	CTACTTAATCCYCATGCTCC
Szegmens 6: 3' vég	AV-VP6end	GGTCACATCCTCTCACTATACTG
Szegmens 6: 3' vég	AV-VP6-5'end	GGCTTTTAAACGAAGTCTTCA

Szegmens 9: 5' vég	AV-VP7-5'end	CGTYTCTCACCGCGRYTAGAC
Szegmens 9: 5' vég	AV-VP7-5'end2	TAAATGTATAGTACTGAATGTACTATCC
Szegmens 9: 5' vég	AV-VP7-5'end	GGCATTWAAATYAGWAATTTYCG
Szegmens 9: 49-62	Avrota-VP7-49F	ATGKATRGTACTGATGTACTATCC
Szegmens 9: 505-528	Avrota-VP7-505F	TTAGAYATKTCRGAAWTWGCTGA
Szegmens 9: 509-528	Avrota-VP7-528R	TCAGCSASTTCYGAMTCTAA
Szegmens 9: 1020-1039	Avrota-VP7-1039R	RTATAYYCTRAAGTARTASGC
Szegmens 9: 3' vég	AV-VP7end	GGTCACATCAATCCTYTCAATATGAG
Szegmens 9: 3' vég	AV-VP7end	CTMGMRTTWAGTGAYCGTGATCKYTT
Szegmens 5: 12-34	Avrota-NSP1-12F	GCTRAACAGTGGTGTGGTGAGA
Szegmens 5: 510-536	Av-NSP1-A16-510F	CGTCGTGGACAAAGAATGCATACTAC
Szegmens 5: 536-567	Avrota-NSP1-536F	GTTGAYTTTAAATGATTGTTTTCTACCAACGAA
Szegmens 5: 537-566	Avrota-NSP1-566R	CGTTGGTAGAAAACAATCATTAAAYTCAAC
Szegmens 5: 1100-1127	Av-NSP1-A16-1100R	GTATAACCATGACACATAAGTCCTCTC
Szegmens 5: 1140-1164	AV-NSP1-1140F	ATGATGTGYTGGACAATTTGSARG
Szegmens 5: 1190-1215	Av-NSP1-A16-1190F	GTGTACATGCTGCTAGACACGTAGG
Szegmens 5: 1350-1372	AV-NSP1-1350R	CGWMTGTRTTTCTYCTATGYGA
Szegmens 5: 1627-1648	Avrota-NSP1-1648R	AGAATYTCAAASACTTTGTAGTAA
Szegmens 5: 2120-2146	AV-NSP1-2120R	GGTCAYATAAAGCCWTTYTGGGCACT
Szegmens 5: 3' vég	Av-NSP1-A16end	GGTCATATAAAGCCTTTCTGGGC
Szegmens 8: 1-25	Avrota-NSP2-1F	GGCTTTTAAAGCGTCTCRGTCGCCG
Szegmens 8: 460-483	AV-NSP2-460F	AGCRATGGGAYTMATTAAGATC
Szegmens 8: 528-552	Avrota-NSP2-528F	GGATTTACWATGTGGAARCTTGA
Szegmens 8: 529-551	Avrota-NSP2-551R	TCAAGYTTCCACATSGTAAATCC
Szegmens 8: 1021-1042	Avrota-NSP2-1042R	GGTCACATAAAGSGCTTTCAA
Szegmens 8: 3' vég	AV-NSP2end	GGTCACATAAAGGGCTTTCAATTCC
Szegmens 7: 1-24	Avrota-NSP3-1F	GGCTTTTAAAGTCACATCGAGGCA
Szegmens 7: 500-521	Avrota-NSP3-500F	GAGAARYTSAAACGTGGRGAAG
Szegmens 7: 515-532	Avrota-NSP3-532R	ACTTCRATYACTTCYCCA
Szegmens 7: 789-814	Avrota-NSP3-789F	CGTTGGAATGGAAAATTGAACTCAA
Szegmens 7: 1065-1090	Avrota-NSP3-1090R	TGACATAAAGTCYCGTGCGTTATTCA
Szegmens 7: 3' vég	AV-NSP3end	GGTCACATAAAGTCYCGTGCG
Szegmens 10: 5' vég	AV-NSP4-5'end	GGCTTTAAAAACTCAATATCGAG
Szegmens 10: 58-84	Avrota-NSP4-58F	CCATCAATGAAACACTTGTGAGGAGG
Szegmens 10: 562-580	Avrota-NSP4-580R	ACCCGTCATTCTACGCCTC
Szegmens 10: 3' vég	AV-NSP4end	GGTCATATTAACCCAACACTATC
Szegmens 11: 5' vég	AV-NSP5-5'end	GGCTTTAAAAGCACTACCGTG
Szegmens 11: 22-42	Avrota-NSP5-22F	ATGTCTGCAATAACKATYGAC
Szegmens 11: 649-678	Avrota-NSP5-678R	TACATATCTTCAATTAARTGYATTGC
Szegmens 11: 3' vég	AV-NSP5end	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGATC
Specifikus fácán RVA primerek		
Szegmens 1: 1220-1240	18-VP1-1220F	ATGTCATCAGCATCGAATGGTG
Szegmens 1: 1460-1494	18-VP1-1460F	GAGAAAATGTTACAATATGCTAAGC

Szegmens 1: 2130-2154	F-VP1-2154R	TCCATTGCGTGTGTTTGACCTCTC
Szegmens 1: 2350-2380	18-VP1-2380R	GATAATGACATGAAAGCTCGTTG
Szegmens 1: 2490-2520	18-VP1-2520R	GCTTTTTTCAGTTTGTGCAATACC
Szegmens 1: 2418-2440	18-VP1-2440R	CATAACTTTTAAACACTTGAGA
Szegmens 1: 2564-2591	F-VP1-2591R	AGTTGCGCTCTTCTTTTTTCCAATGCA
Szegmens 1: 2920-2950	18-VP1-2920F	GTACCARAYATWGACTCRTCWGCWTATATA
Szegmens 1: 3080-3105	18-VP1-3080F	GAATACCRTTTTAAAGGHAARATACC
Szegmens 1: 3220-3245	18-VP1-3220F	GGAAGAARATGTGGAGTATWACTTC
Szegmens 1: 3' vég	18-VP1end	GGTCAYATCTTAGCGCCTTAATCTT
Szegmens 2: 1660-1691	18-VP2-1660F	GATCAGTGCARCGMGAATATTAC
Szegmens 2: 1700-1724	18-VP2-1700F	CTYGTGGACTTAACYCGYCTTATG
Szegmens 2: 1960-1986	F-VP2-1986R	TCATTTTCTTACGATACAGGTCCAGA
Szegmens 2: 2214-2240	18-VP2-2240R	CGTGCCAAGTTGACGAATCC
Szegmens 2: 2300-2330	18-VP2-2300F	CTGGAGACTACAACCAAATAACG
Szegmens 2: 2700-2729	18-VP2-2700F	GGTAATGGCTTACAGTTCTTGC
Szegmens 3: 760-784	F-VP3-784R	TCCAATCCACTTCTCTTGAGTCAG
Szegmens 3: 3' vég	F-VP3-1679R	GTGATTGTTCCCTGTAGCTTTACTTTCTA
Szegmens 3: 1650-1680	18-VP3-5'end	GGCTATTAAGCWRYAYKAG
Szegmens 4: 5' vég	81-P37-VP4-5'end	GGCAAAAAAATGGCTTCTCTATTG
Szegmens 4: 1-20	81-VP4-1F	GGCTATAAAAATGGCTTCAC
Szegmens 4: 310-335	Fá-VP4-310F	AAATATGCTTGTGTAATGTTACCAC
Szegmens 4: 340-358	81-VP4-340F	ACCAAATACGGCAGATGG
Szegmens 4: 340-374	81-VP4-420F	ATGTAYAAATTTTGTGAYTTRRYAG
Szegmens 4: 770-795	81-P30-VP4-770F	AARACGTCATTGTGGAARGAAGTAC
Szegmens 4: 839-860	Fá-VP4-860R	CCCAACCCACCCGATTTAATT
Szegmens 4: 833-860	81-VP4-860R	CCAYTTATAACCYAAYCCACC
Szegmens 4: 860-887	81-P30-VP4-860F	CAGGTGGATTAGGYTATAAATGGTCTG
Szegmens 4: 890-913	Fá-VP4-890F	RTGAACTATSAGTAYACKTATGA
Szegmens 4: 910-937	81-P30-VP4-910F	GAAYTATGAGTACACRTAYGAACGYGA
Szegmens 4: 930-954	81-P30-VP4-930F	ACAGTWGTAGCRCATACTACTCWG
Szegmens 4: 940-960	Fá-VP4-940F	GCACATACYACDTGTTCWGT
Szegmens 4: 940-966	81-VP4-940F	GCACATACTACDTGTTCCAG
Szegmens 4: 1010-1043	81-P37-VP4-1010F	GGAGGTTTCATTACCAACTGAYTTCCG
Szegmens 4: 1600-1629	18-VP4-1600F	CAACACTGGATGCTGTTAAATC
Szegmens 4: 1606-1630	Fá-VP4-1630R	CATYTTCTTCATAACTGARGTAGT
Szegmens 4: 1630-1663	18-VP4-1630F	GACAACGTCAGTTATGAAGAAAATG
Szegmens 4: 1640-1660	81-VP4-1660R	TTCATYTTCTTCATAACTGA
Szegmens 4: 1677-1700	81-P30-VP4-1700R	GTWGCYGCRTCTGAYAATTCTTC
Szegmens 4: 1701-1730	81-P30-VP4-1730R	CGAACGYAWTGATGATGATCKTGAAATTG
Szegmens 4: 1730-1753	F-VP4-1753R	TGCATTCGAACGTAATGATGATG
Szegmens 4: 1709-1740	81-VP4-1740R	CATTCGAACGTAWTGATGATGATC
Szegmens 4: 1860-1882	Fá-VP4-1860F	GCRACACARACWGAHGGAGGA
Szegmens 4: 1860-1885	18-VP4-1860F	CAACACAGACGGATGGTGG
Szegmens 4: 1954-1980	81-P37-VP4-1980R	GCTTCTGAAACTATCTCTGG

Szegmens 4: 1950-1982	81-P37-VP4-1950F	GTTCAAGTACAYTACCAGAGATAG
Szegmens 4: 2140-2169	81-P37-VP4-2140F	GATCTAGCATCCGATTCTCCCG
Szegmens 4: 2200-2228	81-VP4-2200F	GGAATAACTAGAGAGCAAGCG
Szegmens 4: 3' vég	81-VP4end	GGTCAAATCCTCATAGACAGC
Szegmens 4: 3' vég	18-VP4end	GGTCACATCCTCACAGACAAC
Szegmens 4: 3' vég	18-VP4end	GGTCACATCCTCACAGACAACCTTTTG
Szegmens 4: 3' vég	81-P37end	GGTCACATCCTATAACAGTTAC
Szegmens 6: 569-594	F-VP6-594R	AATCCAGCGATTTCAATTTCTGATC
Szegmens 6: 1198 -1223	F-VP6-1223R	ACGCCTAATCTCTACTTAATAACCA
Szegmens 9: 895-916	AV-rota-G23-895F	GTACCGAAAATGGCAAGAATG
Szegmens 9: 905-930	AV-rota-G23-905F	GGCAAGAATGACGAGAATAAATTGG
Szegmens 9: 3' vég	AV-rota-G23R	GGTCACATAAAACCTTTAACCTTGAG
Szegmens 5: 5' vég	81-N1-5'end	GGCTTTTAAAAGCTGAACAGC
Szegmens 5: 1-24	Fá-NSP1-1F	GGCTTTTAAAAGCTRAACAGTGG
Szegmens 5: 10-34	F-NSP1-10F	AAGCTRAACAGTGGTGTGGTGAG
Szegmens 5: 539-560	81-N1-560R	CGTTGGTARRAAACAATCATT
Szegmens 5: 1260-1284	18-N1-1260F	GGCTCGTAAAGTAAGCAAAATATG
Szegmens 5: 1260-1290	81-N1-1260F	GTTGAAATGGCTCGTAARGTMAG
Szegmens 5: 1320-1354	81-N1-1320F	GAYAMMCGCTGYGCTGAYATTACTAC
Szegmens 5: 1350-1367	81-N1-1350F	TCGCATAGGAGAAACCA
Szegmens 5: 3' vég	81-N1end	GGTCACATAAAGCCATTTTGGG
Szegmens 5: 3' vég	Fá-NSP1-3VÉG	GGTCAYATAAAGCCWTTYTGGGCA
Szegmens 5: 3' vég	Fá-NSP1-3VÉG-2	GCCWTTYTGGGCACTACTCCA
Szegmens 5: 3' vég	81-N1end	GGTCATATAAAGCCTTTYTGG
Szegmens 7: 5' vég	81-N3-5'end	GGCTTTTAAAAGTCACATCGAGG
Szegmens 7: 520-539	81-N3-520R	CTTCAATCACTTCCCCACG
Szegmens 7: 634-659	F-NSP3-659R	GCATGTTTTTAACCGAATCCGCTAC

Ló RVA specifikus primerek		
Szegmens 5: 123-160	L-NSP1-160R	CAATTCAGTAAGCTGACAACATTCAAC
Szegmens 5: 1400-1439	L-NSP1-1400F	GTGAATTACCTTTATGTATTGAATCAAC
Szegmens 8: 164-200	L-NSP2-200R	TTGTGGTGCGGCGCAATACCATAGA
Szegmens 8: 760-797	L-NSP2-760F	GCAGACCGAGTTTACGCTACTTTCAAG
Szegmens 7: 145-180	L-NSP3-180R	CACCGGAATCRTCCATDAAAAATC
Szegmens 7: 323-360	L-NSP3-360R	CATCTTTTGGTCAATTCCTTTTGTATGA
Szegmens 7: 765-800	L-NSP3-765F	GAGTGGTATCTACGATCTATGGAAC
Szegmens 10: 104-140	L-NSP4-140R	GATGCAATGTAAGGAAAATACGCCAT
Szegmens 10: 304-340	L-NSP4-340R	CTATCCATTTGTTTCTCTATCTCATC
Szegmens 10: 560-596	L-NSP4-560F	GCAGCAATGTAAGAGGTTGAGCTGCC
Szegmens 11: 250-285	L-NSP5-285R	CAGTATCTGCATTTGTCTTAACTGC
Szegmens 11: 470-509	L-NSP5-470F	CCTAAAATAGAAGCAGATTCGGATTGAG
Szegmens 3: 244-280	L-VP3-280R	CATCTAATTAAGTAAATAGCTCATC
Szegmens 3: 2360-2395	L-VP3-2360F	GTGGAGTTTTRTCAACATACTTTAA
Szegmens 9: 365-390	L-VP7-390R	GATCCAGTAGGCCATCCTTTAGTTA

Szegmens 9: 640-375	L-VP7-640F	GTCCACTTAATACACAAACTTTAGG
Szegmens 9: 910-943	L-VP7-910F	AATTGGAAAAAATGGTGCAAGTG
Teve RVA specifikus primerek		
Szegmens 10: 190-226	T-NSP4-190F	CATAAAGTAATAGTTCCAGTAACAAA
Szegmens 10: 343-380	T-NSP4-380R	GAGTTTATCAATCATTCTACTTGACG
Szegmens 10: 645-685	T-NSP4-685R	GCTGTGGCTTCTCAGCTAACCATCAGGTC
Szegmens 10: 400-436	T-NSP4-400F	GATAAACTCACAAACACGAGAAATTGA
Kutya RVA specifikus primerek		
Szegmens 1: 1-23	VP1-F-5'	GGCTATTAAGCTAGTAC
Szegmens 1: 750-779	VP1-1-755-F	CACCAATGTCAATTCTAGTTGC
Szegmens 1: 1786-1820	VP1-2-1786-F	GCATCAGGTGAAAAACAAACAAAAGC
Szegmens 1: 2120-2147	VP1-3-2120-F	GAGGACAAAGTACACAATGGG
Szegmens 1: 1150-1180	VP1-2-1180-R	CTTGAAGAAGATGATCATCATGC
Szegmens 1: 1878-1909	VP1-2-1909-R	CTCCATCAACTCGAATTATCTTAG
Szegmens 1: 2554-2585	VP1-3-2585-R	GCGGAAATTTGTGCGCGACGTTTC
Szegmens 1: 3280-3302	VP1-3302-R	GGTCACATCTAAGCGCT
Szegmens 2: 1-22	VP2-F-5'	GGCTATTAGAAGGTTTC
Szegmens 2: 692-726	VP2-1-692-F	GCAGAGATGAGACAACGTGTACAGGC
Szegmens 2: 1893-1928	VP2-3-1893-F	CCGCCCCAATAGATTGAATCTATATC
Szegmens 2: 1166-1199	VP2-1199-R	CTCAATAGACATAGTACGTTGAC
Szegmens 2: 2070-2100	VP2-2100-R	GCACGTTCAATTTGATTCCATG
Szegmens 3: 1-32	VP3-F-5'	GGCTATTTAAAGCAGTACCTAG
Szegmens 3: 323-354	VP3-323-F	CACGACTATTCATATTACACAAAC
Szegmens 3: 1415-1445	VP3-1415-F	GATTATATCGTAGCTTTATACGC
Szegmens 3: 787-821	VP3-821-R	GCCCAATGTCAAATTGAGATATTCTC
Szegmens 3: 1574-1608	VP3-1608-R	GCATCAGTTGTATCAAAATCAGTTGG
Szegmens 4: 1-32	VP4-1F	GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATT
Szegmens 4: 794-832	VP4-794-F	GGAAGAGAAATGCAATATCAATCAG
Szegmens 4: 1360-1400	VP4-1360-F	CCTGCAGCTAATCCAAATAACGGGAGAAG
Szegmens 4: 1054-1091	VP4-1091-R	GCTTGACGAATCATCCCAATAGATC
Szegmens 4: 1571-1607	VP4-1607-R	CCAGAGAACATCTGAGAACATGATC
Szegmens 4: 2333-2362	VP4-2362-R	GGTCACATCCTCTAGAAATTGC
Szegmens 4: 1360-1397	VP4-1360F-Cat2	CCAGCTGTAATCCAAATAATAACGCAG
Szegmens 4: 2330-2359	VP4-2359R-Cat2	GGTCACATCTTAAATAGACAG
Szegmens 5: 1-32	NSP1-F-5'	GGCTTTTTTTTGAAGAGTCTTTGTG
Szegmens 5: 1568-1599	NSP1-R	GGTTCACAGTTTTTGCTGGCTAGG
Szegmens 5: 1-35	NSP1-2F	GGCTTTTTTTTATGAAAGTCTTTGTG
Szegmens 5: 1565-1599	NSP1-2R	GGTCACATTTTATGCTGCCTAGGCGC
Szegmens 7: 853-882	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCTATAGC
Szegmens 10: 1-30	NSP4-1a-F	GGCTTTTAAAGTTCTGTTCCG
Szegmens 10: 719-750	NSP4-R	GGTCACATTAAGACCATTCTTCC

2. Függelék táblázat. A polimeráz láncreakciók során alkalmazott hőprofilok. A p rövidítés percet, az mp másodpercet jelent. * A primer annealációs lépés során alkalmazott hőmérséklet minden esetben a primerpár specifikus olvadási hőmérséklete alapján lett beállítva. ** A láncépítés során alkalmazott idő a PCR termék prediktált hossza alapján lett beállítva.

A.

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	
Egy-lépéses RT-PCR hőprofilja			
1. Reverz transzkripció	42°C	30 p	
2. PCR aktiváció	95°C	15 p	
3. Denaturáció	95°C	30 mp	ismétlés
4. Primer annealáció	49°C	30 mp	35
5. Láncépítés	72°C	2 p	ciklus
6. Végső felépítés	72°C	5 p	

B.

Két-lépéses RT-PCR hőprofilja			
1. PCR aktiváció	94°C	3 p	
2. Denaturáció	94°C	30 mp	ismétlés
3. Primer annealáció	42-55°C *	30 mp	35
4. Láncépítés	72°C	2-3 p**	ciklus
5. Végső felépítés	72°C	5 p	

C.

Szekvenálási reakció hőprofilja			
1. PCR aktiváció	96°C	1 p	
2. Denaturáció	95°C	20 mp	ismétlés
3. Primer annealáció	50°C	5 mp	35
4. Láncépítés	60°C	4 p	ciklus

3. Függelék táblázat. Kutya RVA törzs genomjának nukleinsav hasonlósága. Gén-specifikus nukleotid (nt) és aminosav (as) szekvencia hasonlóságok az RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3] törzs és referencia emlős törzsek között.

RVA törzs	RVA/Dog-wt/HUN/135/2012/G3P[3]										
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as
RVA/Human-tc/ITA/PA260-97/1997/G3P[3]	99,2/ 99,6	99,1/ 99,8	98,5/ 99,1	98,5/ 98,7	98,7/ 99,1	98,8/ 98,8	98,8/ 98,1	98,9/ 100,0	98,3/ 98,8	99,0/ 99,1	98,3/ 99,5
RVA/Dog-tc/USA/CU-1/1982/G3P[3]	86,8/ 96,7	81,5/ 95,1	85,4/ 91,6	85,4/ 97,3	85,6/ 94,5	83,7/ 94,6	49,1/ 38,4	85,3/ 93,2	96,5/ 98,5	87,4/ 93,4	96,5/ 96,6
RVA/Dog-tc/AUS/K9/1981/G3P[3]	86,6/ 96,4	81,6/ 95,4	85,3/ 92,0	85,3/ 97,6	85,6/ 94,9	83,3/ 94,3	50,0/ 39,0	85,7/ 92,9	97,3/ 99,4	87,5/ 93,0	97,3/ 95,7
RVA/Dog-tc/USA/A79-10/1979/G3P[3]	86,8/ 96,8	81,8/ 95,6	85,3/ 91,9	85,3/ 97,7	86,1/ 94,7	83,4/ 94,6	49,8/ 38,4	85,0/ 92,3	98,0/ 99,1	87,4/ 93,0	98,0/ 96,6
RVA/Dog-tc/ITA/RV198-95/1995/G3P[3]	86,9/ 96,1	81,7/ 95,5	98,5/ 99,1	98,5/ 97,3	98,7/ 99,1	83,1/ 94,6	50,2/ 38,8	98,3/ 99,1	94,2/ 97,6	87,6/ 93,0	94,2/ 97,1
RVA/Dog-tc/ITA/RV52-96/1996/G3P[3]	86,9/ 96,2	81,7/ 94,9	98,5/ 99,4	98,5/ 98,7	98,3/ 98,6	98,8/ 99,1	50,0/ 38,6	98,9/ 99,7	93,8/ 97,6	99,4/ 99,1	93,8/ 97,1
RVA/Human-tc/THA/T152/1998/G12P[9]	94,9/ 97,9	95,9/ 99,5	94,7/ 97,2	61,4/ 68,9	88,3/ 95,8	74,7/ 82,8	65,1/ 61,2	80,0/ 86,9	81,7/ 88,9	93,2/ 95,2	81,7/ 96,1
RVA/Human-tc/JPN/AU-I/1982/G3P[3]	93,9/ 98,2	92,7/ 98,6	88,4/ 94,3	59,4/ 68,8	85,9/ 95,6	81,5/ 90,1	59,0/ 52,6	79,9/ 86,1	81,8/ 88,0	92,8/ 95,6	81,8/ 89,9

4. Függelék táblázat. Tyúk RVA törzs genom szekvenálás eredménye. A RVA/Chicken-tc/xxx/BRS/115/xxx/G7P[35] törzs génjeinek szekvencia lefedettsége, melyet IonTorrent többszörös, párhuzamos szekvenálás eredményezett.

Gén	Teljes leolvasás szám a referencia szekvenciához társítva	Lefedtség (x)	Genom szegmens hossz (bp)
VP1	9991	243	3305
VP2	10925	319	2738
VP3	4744	147	2583
VP4	9216	311	2353
VP6	5404	320	1348
VP7	4670	353	1067
NSP1	1580	66	1910
NSP2	5140	468	1043
NSP3	6957	507	1092
NSP4	3896	423	727
NSP5	1938	213	729

5. Függelék táblázat. Házityúk RVA törzs genomjának nukleinsav hasonlósága. Gén-specifikus nukleotid (nt) és aminosav (as) szekvencia hasonlóságok a RVA/Chicken-tc/xxx/BRS/115/xxx/G7P[35] törzs és referencia madár törzsek között. Az összehasonlítás p-distance modellel készült.

	RVA/Chicken-tc/xxx/BRS/115/xxx/G7P[35]										
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA törzs	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as	nt/ as
RVA/Tur/03V0002E1 0	93/ 98	87/ 96	94/ 96	95/ 96	93/ 98	72/ 71	82/ 88	92/ 92	92/ 94	92/ 92	96/ 94
RVA/Chi/02V0002G3	79/ 91	76/ 90	74/ 76	77/ 84	79/ 87	69/ 67	84/ 90	78/ 87	70/ 66	79/ 76	72/ 67
RVA/Chi/CH2	-	-	96/ 94	99/ 99	99/ 99	95/ 95	-	-	-	-	99/ 100
RVA/Phe/10V0112H5	90/ 98	85/ 97	91/ 94	69/ 61	92/ 98	74/ 76	83/ 85	80/ 86	91/ 92	82/ 86	94/ 93
RVA/Pi/PO-13	92/ 98	86/ 97	91/ 95	79/ 91	93/ 98	74/ 70	69/ 61	91/ 96	92/ 94	81/ 86	94/ 93
RVA/Tur/Ty-1	94/ 98	89/ 96	92/ 94	73/ 83	94/ 96	73/ 74	86/ 74	92/ 85	92/ 90	79/ 77	98/ 100
RVA/Tur/Ty-3	96/ 98	96/ 98	97/ 92	94/ 87	97/ 93	95/ 87	97/ 91	97/ 91	96/ 93	90/ 86	93/ 100
RVA/Tur/39	93/ 98	86/ 94	91/ 94	93/ 92	94/ 96	69/ 65	80/ 73	91/ 91	96/ 91	90/ 78	93/ 89
RVA/Tur/40	93/ 98	86/ 95	91/ 93	74/ 80	93/ 96	69/ 65	80/ 73	91/ 91	96/ 89	89/ 73	92/ 86

6. Függelék táblázat. Fácán RVA törzsek genomjának nukleinsav hasonlósága. Gén-specifikus nukleotid szekvencia hasonlóságok a magyar fácán RVA törzsek között, és további referencia madár törzsek között. A legmagasabb hasonlósági százalék félkövérrel kiemelt, a genotípus referencia törzsével való hasonlósági százalék dőlttel jelölt.

		RVA/Phe/14246											
		VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
RVA törzs		R4	C4	M4	P[37]	I4	G23	A16	N10	T4	E4	H4	
RVA/Phe/18769		99,6	83,0	98,4	52,4	91,3	75,7	84,7	86,1	93,7	99,1	95,6	
RVA/Phe/216		99,6	96,6	99,5	98,4	99,1	99,1	99,0	98,5	98,9	98,7	96,5	
RVA/Phe/10V0112H5		97,4	86,9	92,3	95,3	95,8	93,3	94,9	94,2	92,7	97,5	94,3	
RVA/Pi/PO-13		93,3	88,3	91,3	48,7	91,9	72,8	63,9	79,3	88,5	91,2	96,5	
RVA/Tur/03V0002E10		87,3	84,2	88,2	52,5	90,9	75,1	85,4	78,9	93,0	80,9	94,7	
RVA/Tur/39		89,3	83,9	90,1	62,5	91,8	69,8	83,5	78,7	94,1	81,1	89,6	
RVA/Tur/40		89,3	84,0	90,2	63,0	91,4	70,1	84,1	78,8	94,0	81,3	89,1	
RVA/Chi/02V0002G3		71,7	63,2	57,3	52,0	78,2	74,3	88,1	84,7	61,9	78,2	81,6	
		RVA/Phe/18769											
		VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
RVA törzs		R4	C4	M4	P[35]	I4	G22	A16	N4	T4	E4	H4	
RVA/Phe/14246		99,6	83,0	98,4	52,5	91,3	75,7	84,7	86,1	93,7	99,1	95,6	
RVA/Phe/216		99,4	82,3	98,1	52,4	91,1	74,9	85,1	86,5	93,7	99,6	97,4	
RVA/Phe/10V0112H5		97,2	84,1	91,2	52,4	92,4	75,1	85,1	87,6	95,1	98,4	97,4	
RVA/Pi/PO-13		93,3	84,4	90,3	74,1	92,4	75,1	63,1	86,7	90,2	92,1	97,4	
RVA/Tur/03V0002E10		87,2	92,8	87,9	95,8	97,2	96,2	96,2	88,0	97,4	81,4	95,6	
RVA/Tur/39		89,0	95,9	89,4	98,4	92,5	97,9	97,8	89,8	98,9	81,1	88,5	
RVA/Tur/40		89,1	96,7	89,5	72,9	91,8	97,6	99,1	90,1	99,4	82,0	88,0	
RVA/Chi/02V0002G3		71,6	63,1	55,9	71,7	79,0	80,1	86,5	81,4	61,0	78,8	82,5	
		RVA/Phe/17655											
		VP1	VP2	VP3	VP4	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA törzs		R4	C4	M4	P[30]	P[37]	I4	G23	A16	N10	T4	E4	H4
RVA/Phe/18769		99,2	86,8	88,2	73,0	53,3	91,8	75,7	91,5	88,1	94,9	99,3	92,4
RVA/Phe/14246		99,6	91,4	87,9	52,5	90,6	96,1	93,6	90,7	93,6	92,7	98,7	92,9
RVA/Phe/216		97,4	91,1	88,1	62,6	91,7	95,4	94,5	94,1	91,8	93,2	99,0	93,6
RVA/Phe/10V0112H5		97,6	95,8	88,3	52,9	91,1	92,8	96,8	89,1	95,0	94,4	98,6	92,9
RVA/Pi/PO-13		93,8	90,7	88,6	73,9	50,4	90,1	73,1	63,6	80,5	90,4	92,8	94,2
RVA/Tur/03V0002E10		89,0	85,3	89,7	73,9	53,3	89,5	74,3	90,3	81,3	94,9	81,3	93,3
RVA/Tur/39		89,4	85,2	88,0	77,6	62,1	89,2	69,7	91,0	80,2	95,5	81,0	89,8
RVA/Tur/40		89,7	85,3	88,0	75,8	63,0	89,3	70,1	91,9	80,2	95,4	81,6	89,1
RVA/Chi/02V0002G3		79,2	76,2	73,5	81,0	53,8	76,2	74,3	85,7	82,9	60,7	79,9	71,7
		RVA/Phe/14958											
		VP2	VP4	VP6	VP7	NSP5							
RVA törzs		C4	P[31]	I4	G19	H4							
RVA/Phe/14246		96,9	51,1	96,4	75,1	94,7							
RVA/Phe/18769		89,7	67,6	91,5	78,7	99,1							
RVA/Phe/17655		98,2	71,0 (P[30]) 52,5 (P[37])	-	-	-							
RVA/Phe/19109		-	-	99,2	-	100,0							
RVA/Phe/10V0112H5		97,3	50,7	96,8	75,1	96,5							
RVA/Pi/PO-13		95,7	69,6	92,4	78,4	96,5							
RVA/Tur/03V0002E10		90,4	67,9	91,9	21,3	96,5							
RVA/Tur/39		86,6	67,4	90,9	77,8	94,1							
RVA/Tur/40		85,9	80,3	90,6	78,7	94,1							
RVA/Chi/02V0002G3		82,1	68,7	79,2	90,9	83,3							
RVA/Chi/06V0661		-	95,5	-	-	-							

	RVA/Phe19109			
	VP2	VP6	VP7	NSP5
RVA törzs	C4	I4	G22	H4
RVA/Phe/14246	87,4	97,2	75,4	94,7
RVA/Phe/18769	84,9	92,2	95,6	99,1
RVA/Phe/14958	-	99,2	79,8	100,0
RVA/Phe/17655	85,3	98,3	74,9	96,6
RVA/Phe/10V0112H5	97,6	97,5	75,7	96,5
RVA/Pi/PO-13	90,8	92,8	73,7	96,5
RVA/Tur/03V0002E10	85,1	92,6	95,0	96,5
RVA/Tur/39	84,7	92,0	93,3	95,7
RVA/Tur/40	85,4	91,7	94,2	95,7
RVA/Chi/02V0002G3	63,9	79,0	79,5	83,3

7. Függelék táblázat. Pulyka RVA törzsek genomjának nukleinsav hasonlósága. Gén-specifikus nukleotid szekvencia hasonlóságok a magyar pulyka RVA törzsek között, és további referencia madár törzsek között. A legmagasabb hasonlósági százalék félkövérrel kiemelt, a genotípus referencia törzsével való hasonlósági százalék dőlttel jelölt. Az összehasonlítás p-distance modellel készült.

	RVA/Tur/39										
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA törzs	R4	C4	M4	P[35]	I4	G22	A16	N4	T4	E4	H4
RVA/Tur/40	97,7	98,4	98,7	74,0	97,0	97,9	98,5	99,3	99,4	98,4	96,7
RVA/Tur/03V0002E10	97,9	93,1	90,0	96,8	95,1	96,8	96,4	95,4	97,6	96,7	93,6
RVA/Tur/Ty-1	93,5	93,7	97,2	76,2	96,7	74,4	91,9	95,0	94,0	82,1	92,4
RVA/Tur/Ty-3	93,2	85,2	91,4	95,9	93,8	67,8	91,9	91,3	92,2	97,8	83,3
RVA/Pi/PO-13	90,2	85,1	91,6	78,0	92,7	74,9	37,4	93,5	91,0	80,0	90,3
RVA/Phe/18769	89,0	95,9	89,4	98,4	92,5	97,9	97,8	89,8	98,9	81,1	88,5
RVA/Chi/02V0002G3	78,9	74,2	73,6	76,2	76,2	79,9	86,3	97,6	62,0	74,5	69,0
	RVA/Tur/40										
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA törzs	R4	C4	M4	P[31]	I4	G22	A16	N4	T4	E4	H4
RVA/Tur/39	97,7	98,4	98,7	74,0	97,0	97,9	98,5	99,3	99,4	98,4	96,7
RVA/Tur/03V0002E10	97,2	93,8	90,1	74,0	95,4	96,3	96,9	95,6	97,5	96,6	93,9
RVA/Tur/Ty-1	93,3	94,2	97,2	72,4	96,6	74,3	92,2	95,1	93,7	81,9	92,0
RVA/Tur/Ty-3	92,8	85,8	91,4	74,1	92,3	67,8	80,6	91,4	92,3	97,8	82,6
RVA/Pi/PO-13	90,4	85,3	91,7	73,7	92,7	74,7	62,4	93,6	90,9	80,4	89,9
RVA/Phe/18769	89,1	96,7	89,5	72,9	91,8	97,6	99,1	90,1	99,4	82,0	88,0
RVA/Chi/02V0002G3	78,7	74,1	73,6	75,4	76,9	80,0	86,3	76,1	61,9	75,3	32,3
RVA/Chi/06V00661				84,8							
RVA/Chi/D62				94,8							

XIII. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy kutatócsoportja tagja lehettem, megismertetett a molekuláris biológia alapjaival, és lehetőséget biztosított kutatómunkám elvégzésére. Elméleti és gyakorlati útmutatása, kritikus észrevételei hozzájárultak kutatómunkámhoz és e disszertáció elkészültéhez.

Kiemelt köszönet illeti Dr. Sellyei Boglárkát dolgozatom szakmai és nyelvtani javításáért.

Köszönöm az *Új Kórokozók felderítése kutatócsoport* jelenlegi és volt tagjainak, Antalné László Brigittának, Bartókné Horváth Anettnek, Borzák Rékának, Dr. Bayer-Dandár Eszternek, Dóró Renátának, Dr. Farkas Szilviának, Dr. Fehér Enikőnek, Dr. Mihalov-Kovács Eszternek, Ihász Katalinnak, Dr. Marton Szilviának, Varga-Kugler Renátának a mindennapok során tanúsított támogató és baráti légkör megteremtését.

Köszönettel tartozom Dr. Dán Ádámnak, Dr. Jakab Ferencnek, Dr. Jelle Matthijnssensnek, akiknek segítségével nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Köszönettel tartozom a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), a CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt., a kuvaiti Public Authority for Agriculture and Fish Resources, valamint az írországi Irish Equine Centre munkatársainak a minták rendelkezésünkre bocsájtásáért.

Köszönet illeti családomat, akik hittek bennem, biztattak és támogattak mind a kutatással töltött évek, mind a dolgozat elkészülte alatt. Továbbá barátaimat, akik értékes tanácsokkal láttak el, és támogatásuk mindig átlendített a nehézségeken.

Kiemelt köszönet illeti meg férjemet, Dr. Harami Gábort, aki mindvégig nagy türelemmel, megértéssel és szeretettel támogatott. Szakmai észrevételei, valamint fáradtságos javító munkája nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre. Továbbá köszönöm kislányomnak a megértést, amikor a kutatás elszóltott mellőle.

Az értekezés létrejöttét az OTKA (PD76364) és a Lendület program támogatta.