

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**A fertőző bronchitis molekuláris epidemiológiai  
vizsgálata**  
PhD értekezés

dr. Hoitsyné Bali Krisztina

2023

Témavezetők:

.....

Dr. Bányai Krisztián

Állatorvostudományi Kutatóintézet

.....

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Készült 4 példányban. Ez a n. .... sz. példány

.....

dr. Hoitsyné Bali Krisztina

## Tartalomjegyzék

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Rövidítések jegyzéke.....   | 6  |
| 2     | Ábrák és táblázatok jegyzéke .....  | 7  |
| 2.1   | Ábrák.....  | 7  |
| 2.2   | Táblázatok.....   | 9  |
| 3     | Összefoglalás .....   | 10 |
| 4     | Summary .....   | 11 |
| 5     | Bevezetés.....  | 12 |
| 6     | Irodalmi áttekintés.....  | 14 |
| 6.1   | A coronavírusok rendszertana .....  | 14 |
| 6.2   | A coronavírusok morfológiája és szerkezete.....   | 17 |
| 6.3   | A coronavírusok és az <i>Avian coronavirus</i> replikációja.....                          | 22 |
| 6.4   | Az <i>Avian coronavirus</i> által okozott kórfolyamatok .....                             | 25 |
| 6.4.1 | Légzőszervrendszert érintő fertőzés.....  | 26 |
| 6.4.2 | A szaporítószerveket érintő fertőzés .....  | 27 |
| 6.4.3 | A kiválasztó- szervrendszert érintő fertőzés (nephropatogén törzsek) ...                  | 29 |
| 6.4.4 | A gyomor- és bélrendszert érintő fertőzés (mirigyesgyomor-gyulladást okozó törzsek) ..... | 30 |
| 6.5   | Az <i>Avian coronavirus</i> genetikai jellemzői .....                                     | 31 |
| 6.6   | A coronavírusok és az <i>Avian coronavirus</i> evolúciója.....                            | 33 |
| 6.7   | A fertőző bronchitis elleni védekezés.....  | 36 |
| 6.7.1 | Élő attenuált vakcinák .....  | 39 |
| 6.7.2 | Inaktivált vakcinák .....   | 40 |
| 6.7.3 | Rekombináns vektor-, DNS- és alegységvakcinák .....                                       | 40 |
| 7     | Célkitűzések .....  | 42 |
| 8     | Anyagok és módszerek .....  | 43 |
| 8.1   | A felhasznált vírustörzsek.....   | 43 |
| 8.2   | Minták előkészítése teljes genom szekvenálásra.....                                       | 43 |
| 8.2.1 | Virális nukleinsav kivonása .....   | 43 |
| 8.2.2 | Kétlépéses reverz transzkripció polimeráz láncreakció.....                                | 44 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 8.2.3  | PCR termékek ellenőrzése és tisztítása .....                            | 44 |
| 8.3    | Újgenerációs szekvenálás .....  | 45 |
| 8.3.1  | IonTorrent szekvenálás .....  | 45 |
| 8.3.2  | Illumina szekvenálás .....  | 45 |
| 8.4    | Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek ..... | 46 |
| 8.4.1  | Szekvenciaillesztés és annotálás .....                                  | 46 |
| 8.4.2  | Evolúciós és filogenetikai elemzések .....                              | 47 |
| 8.5    | Adatbázis és adatelemzés .....  | 48 |
| 9      | Eredmények .....  | 48 |
| 9.1    | Az IBV genomszerveződésének vizsgálata .....                            | 49 |
| 9.1.1  | Heterogenitás az IBV genomban.....                                      | 50 |
| 9.1.2  | Teljes genom alapú rekombinációelemzés .....                            | 51 |
| 9.1.3  | Hasonlósági mintázatok a teljes genom alapján.....                      | 54 |
| 9.2    | Az IBV S génjének vizsgálata .....                                      | 60 |
| 9.2.1  | Hasonlósági és leszármazási kapcsolatok az S1 gén alapján .....         | 60 |
| 9.2.2  | S1 gén alapú rekombinációelemzés.....                                   | 63 |
| 9.2.3  | Az S1/S2 fehérje vágási helyek elemzése.....                            | 67 |
| 9.2.4  | Az S gén aminosav szintű összehasonlító elemzése .....                  | 68 |
| 9.3    | Az IBV genetikai vonalainak földrajzi elterjedése .....                 | 75 |
| 10     | Megbeszélés .....   | 78 |
| 10.1   | Teljes genom alapú elemzések .....                                      | 78 |
| 10.1.1 | Fertőző bronchitis vírus törzsek általános genomszerveződése .....      | 78 |
| 10.1.2 | A rekombináció jelentősége a teljes genomban .....                      | 78 |
| 10.2   | S gén alapú elemzések .....   | 82 |
| 10.2.1 | S1 gén alapú rekombinációelemzés.....                                   | 82 |
| 10.2.2 | Az S fehérje aminosav szintű elemzése .....                             | 82 |
| 10.2.3 | Hasonlósági és leszármazási kapcsolatok az S1 gén alapján .....         | 87 |
| 10.3   | Az IBV genetikai vonalainak földrajzi elterjedése .....                 | 90 |
| 10.3.1 | Széles körben elterjedt genetikai vonalak.....                          | 90 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 10.3.2 | Egyéb, több kontinensen is előforduló genetikai vonalak.....  | 94  |
| 10.3.3 | Regionálisan elterjedt őshonos genetikai vonalak .....  | 95  |
| 11     | Új tudományos eredmények .....  | 98  |
| 12     | Irodalomjegyzék .....   | 99  |
| 13     | Közlemények listája .....   | 119 |
| 13.1   | A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk .....        | 119 |
| 13.2   | A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk .....   | 119 |
| 14     | Mellékletek .....   | 122 |
| 14.1   | melléklet. A vizsgált fertőző bronchitis törzsek jellemzői .....  | 122 |
| 14.2   | melléklet. A dolgozatban vizsgált törzsek genomszerveződése .....   | 127 |
| 14.3   | melléklet. A teljes genom alapú rekombinációelemzéshez használt GenBank adatbázisban elérhető vakcina törzsek GenBank azonosítói..... | 131 |
| 14.4   | melléklet. A dolgozatban vizsgált 102 törzs S fehérje S1/S2 vágási hely motívumai .....   | 132 |
| 15     | Köszönetnyilvánítás.....  | 134 |

# 1 Rövidítések jegyzéke

|           |   |
|-----------|---|
| APN       | aminopeptidáz-N   |
| as        | aminosav  |
| bp        | bázispár  |
| CDC       | Amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (Centers for Disease Control and Prevention) |
| cDNS      | komplementer dezoxiribonukleinsav (complementary DNA)   |
| COVID-19  | coronavírus-betegség-2019 (coronavirus disease 2019)  |
| DNS       | dezoxiribonukleinsav  |
| dNTP      | dezoxinukleotid-trifoszfát  |
| E         | burok fehérje (envelope protein)  |
| HVR       | hipervariábilis régió (hypervariable region)  |
| IB        | fertőző bronchitis (infectious bronchitis)  |
| IBV       | fertőző bronchitis vírus (infectious bronchitis virus)  |
| ICTV      | Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)         |
| kb        | kilobázis   |
| M         | membrán fehérje (membrane protein)  |
| MERS-CoV  | közeli-keleti légúti szindróma-coronavírus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus)       |
| Mpro      | fő proteáz (main protease)  |
| N         | nukleokapszid fehérje (nucleocapsid protein)  |
| nm        | nanométer   |
| NÉBIH ÁDI | Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság           |
| nsp       | nem szerkezeti fehérje (non-structural protein)   |
| nt        | nukleotid   |
| ORF       | nyitott leolvasási keret (open reading frame)   |
| PBS       | foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate-buffered saline)  |
| PCR       | polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)   |
| PLP       | papain-szerű proteáz (papain-like protease)   |
| RBD       | receptor-kötő domén (receptor binding domain)   |
| RdRp      | RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)  |
| RNS       | ribonukleinsav  |
| RT        | reverz transzkripció  |
| S         | tűskefehérje (spike protein)  |
| SARS-CoV  | súlyos akut légzőszervi szindróma-coronavírus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)   |
| ssRNS     | szimpla szálú ribonukleinsav (single stranded RNA)  |
| UTR       | nem-átíródozó szakasz (untranslated region)   |

## 2 Ábrák és táblázatok jegyzéke

### 2.1 Ábrák

1. **ábra** A SARS-CoV elektronmikroszkópos képe.
2. **ábra** A coronavírusokat ábrázoló törzsfa
3. **ábra** Az *Avian coronavirus* genom sematikus felépítése és szerkezete
4. **ábra** A coronavírusok replikációjának sematikus illusztrációja
5. **ábra** Fertőző bronchitis és *Escherichia coli* társfertőzés
6. **ábra** A fertőző bronchitis által okozott petevezető gyulladás miatt a betegségen a tojásrakási időszakban átesett tojótyúkok által termelt gyűrt héjú tojás
7. **ábra** A nephropatogén QX-szerű IBV törzs kártétele a vesében
8. **ábra** Az átlagos lefedettség az illesztett readok függvényében
9. **ábra** Az illesztett readok mennyisége a teljes adatkihozatal függvényében
10. **ábra** A D2022/2/3/12/RO törzs egyes vakcina törzsekkel rekombináldott genomi régióira kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva.
11. **ábra** A D4000/3/17/RO és D1944/1/3/12/RO törzsek egyes vakcina törzsekkel rekombináldott genomi régióira kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva.
12. **ábra** A vad típusú és vakcina eredetű IBV törzsekben tapasztalt rekombinációs események összefoglalása.
13. **ábra** Töréspont eloszlási ábra
14. **ábra** A D2334/11/2/13/CI variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőtérkép
15. **ábra** A D2804/3/3/13/ID variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőtérkép.
16. **ábra** A D2586/4/6/13/PH variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőtérkép.
17. **ábra** A D3276/4/2/16/PH variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőtérkép
18. **ábra** Az *Avian coronavirus* genotípusait és genetikai vonalait bemutató teljes S1 szekvenciák alapján készült nukleinsav alapú filogenetikai fa
19. **ábra** A D1623/1/1/HU és D3385/1/2/SA törzsek az egyes szülői törzsekkel rekombináldott genomi régióira kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva.

- 20. ábra** A D1818/3/12/11/SA és D2584/12/1/13/PH törzsek az egyes szülői törzsekkel rekombináldott genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva.
- 21. ábra** A D1794/4/4/11/EG és D2828/3/13/TR törzsek az intra-genotipikus rekombináció során az egyes szülői törzsekkel kicserélődött genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva.
- 22. ábra** A vizsgálatban izolált IBV törzsek S1/S2 hasítási helyeinek aminosav szekvenciája.
- 23. ábra** A légzőszervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva.
- 24. ábra** A bélrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva
- 25. ábra** A kiválasztószervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva
- 26. ábra** A kiválasztószervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (9-180 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva.
- 27. ábra** Az S fehérje APN motívumaiban található aminosavak és szubsztitúciók
- 28. ábra** Az *Avian coronavirus* genotípusait és genetikai vonalait bemutató teljes S1 szekvenciák alapján készült nukleinsav alapú filogenetikai fa
- 29. ábra** Az *Avian coronavirus* egyes genetikai vonalainak eloszlása földrajzi régiók szerint a GenBank adatbázisban található S1 szekvenciák alapján
- 30. ábra** Az *Avian coronavirus* nyolc genotípus 39 genetikai vonalába tartozó referenciatörzsek és a saját 102 törzs S1 nukleotid szekvenciái alapján készült filogenetikai fa
- 31. ábra** Az *Avian coronavirus* egyes genetikai vonalainak százalékos eloszlása földrajzi régiók szerint a GenBank adatbázisban található S1 szekvenciák alapján



## 2.2 Táblázatok

- 1. táblázat** A coronavirusok ORF1ab-ról átíródó nem szerkezeti fehérjéi
- 2. táblázat** Az *Avian coronavirus* egyes genotípusainak megfelelő, korábban használatos szerotípus elnevezések és az egyes genotípusok földrajzi elterjedése
- 3. táblázat** A dolgozatban vizsgált saját törzsek GenBank azonosítói
- 4. táblázat** Intra-lineage teljes genom nukleotid azonossági értékek
- 5 táblázat** Intra-lineage teljes S1 gén nukleotid azonossági értékek
- 6. táblázat** Az IBV törzsekben azonosított rekombinációs töréspontokat és a rekombinációban résztvevő feltételezett major és minor szülői törzseket összefoglaló táblázat
- 7 táblázat** A különböző tünetegyütteseket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 RBD szekvenciájának kiemelt pozícióiban található aminosav szekvenciák a referencia M41 törzshöz viszonyítva.
- 8. táblázat** Az egyes IBV törzsek S1 RBD szekvenciájának kiemelt pozícióiban található aminosav szekvenciák a referencia M41 törzshöz viszonyítva

### 3 Összefoglalás

A csirkék fertőző bronchitisét okozó *Avian coronavirus* (IBV) a *Coronaviridae* családon belül az *Orthocoronavirinae* alcsaládba, a *Gammacoronavirus* nemzetségbe és az *Igacovirus* alnemzetségbe tartozik.

PhD ösztöndíjas éveim alatt egy 102 törzsből álló *Avian coronavirus* gyűjteményt vizsgáltunk vírusgenomikai megközelítéssel. Munkánk során újgenerációs szekvenáló készülékeket használtunk és változatos bioinformatikai szoftvereket alkalmaztunk.

A jelenlegi IBV genotipizálás alapját képező S1 szekvenciák elemzése rendkívül hasznos az IBV genotípusok és leszármazási vonalak azonosítására. Azonban a teljes genomszekvenciák vizsgálata lehetőséget ad a genom teljes szerkezetének és működésének feltárására, valamint a vírus evolúciójáról is átfogóbb képet ad. Ezenkívül további információt nyújt a vírus terjedésének nyomkövetéséhez, átfogó rekombinációs elemzések végzéséhez, valamint a patogenitással és a vakcinatervezéssel kapcsolatos genetikai markerek azonosításához. A molekuláris epidemiológiai felmérések egyre fontosabbá válnak annak meghatározásában, hogy a genetikai variáció hogyan befolyásolja a coronavirusok biológiai tulajdonságait.

A törzsek jellemzésekor feltárult azok genomjának mozaikos szerkezete, további bizonyítékul szolgálva a rekombináció jelentőségére a coronavirusok evolúciójában. Elemzéseink kimutatták, hogy négy törzs S1 génjének szekvenciája nagymértékben eltért a génbankban megtalálható, más *Avian coronavirus* törzsek homológ szakaszainak szekvenciájától, így ezek a vírustörzsek egyedi variánsoknak, a későbbiekben esetleg új genetikai vonalak képviselőinek tekinthetők az I-es genotípuson (GI) belül.

Az IBV-re jellemző a nagy genetikai változékonyság és a különböző variánsok egyidejű cirkulációja egy adott földrajzi régióban. A világszerte felbukkanó nagyszámú variáns közül néhány szinte az egész világon előfordul, míg számos típus elterjedése meghatározott földrajzi régiókra korlátozódik. A dolgozatban áttekintettük az *Avian coronavirus* genetikai csoportjairól és azok földrajzi elterjedéséről elérhető legfontosabb és legfrissebb ismereteket.

Vizsgálataink során felhalmozott adatok további információval szolgáltak az IBV genetikai változatosságával, epidemiológiai tulajdonságaival kapcsolatban, nagy hangsúlyt fektetve a vírusgenom variabilitására és az egyes törzsek közötti rekombinációra.

Ezen eredmények hozzájárultak a vizsgált genetikai vonalak rokonsági viszonyainak jobb megértéséhez és hasznosak lehetnek majd a diagnosztikai vizsgálatok és új vakcinajelöltek fejlesztéséhez, a fertőző bronchitis hatékonyabb leküzdése érdekében.

## 4 Summary

*Avian coronavirus* (Infectious bronchitis virus, IBV) is a member of the family *Coronaviridae*, *Orthocoronavirinae* subfamily, *Gammacoronavirus* genus and *Igacovirus* subgenus.

In this study, the complete genome sequences of 102 IBV strains were generated by using next-generation sequencing methods and the data were analysed by various bioinformatic tools.

S1 gene sequencing is the most widely used method for classifying IBV isolates into genotypes, therefore analysing complete S1 sequences is extremely useful for identifying IBV genotypes and lineages. However, examining whole genome sequences provides an opportunity to explore the entire structure and function of the genome and provides a more comprehensive picture of viral evolution. It may also provide additional information concerning the epidemiologic monitoring of circulating strains, performing comprehensive recombination analyses, and identifying genetic markers related to pathogenicity and vaccine design. Molecular epidemiological surveys are becoming increasingly important in determining to what extent genetic variation affects the biological properties of coronaviruses. Characterising the strains revealed the mosaic structure of their genomes, serving as further evidence that recombination plays an important role in the evolution of coronaviruses.

Analysing the complete genomes, the coding sequence of four strains differed greatly from the genome sequence of other *Avian coronavirus* strains available in GenBank database. Thus these strains may be considered unique variants, possibly representatives of new genetic lineages within the GI genotype.

IBV is characterised by high genetic variability and the simultaneous circulation of different variants in a given geographic region. A huge number of variants are emerging worldwide, some are widely distributed, while the distribution of most variants is confined to specific geographic regions. In this thesis, the most recent knowledge about the distribution of the genetic groups of *Avian coronavirus* is reviewed.

Our data and findings provided further information on the genetic diversity and epidemiological properties of IBV, with a strong emphasis on the variability of the viral genome and recombination between individual strains.

These results contributed to a better understanding of the genetic relationship among genetic lineages and will be useful for the development of diagnostic tests and new vaccine candidates, in order to combat infectious bronchitis more effectively.

## 5 Bevezetés

A jelenleg ismert, szimplaszálú ribonukleinsav (RNS) genommal rendelkező víruscsaládok között a *Coronaviridae* család képviselteti magát a legtöbb fajjal, köztük számos humán- és állategészségügyi szempontból jelentős vírusnemzetség tagjait is megtaláljuk.

A *Gammacoronavirus* nemzetség tagjai főként madarakat fertőznek. A nemzetség legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró faja az *Avian coronavirus*, mely csirkékben kortól és patogenitástól függően légzőszervi (légcsőgyulladás), kiválasztó-szervrendszeri (vesegyulladás), gyomor- bélrendszeri (proventriculitis; mirigyes gyomor gyulladás) és ivarszervi megbetegedést, felnőtt tyúkokban tojáshozam csökkenést, tojáshéj- és tojásmínőség romlást (tojásképződési zavarokat) idéz elő (Cavanagh, 2007).

A csirkék fertőző bronchitisét okozó *Avian coronavirus* (Infectious bronchitis virus, IBV) az 1930-as években az Amerikai Egyesült Államokban történt első leírása óta világszerte komoly problémákat okoz a baromfiágazatban, és napjaink egyik legjelentősebb baromfi kórokozójaként tartják számon (Schalk és Hawn, 1931; Beach és Schalm, 1936, Bhuiyan et al., 2021). Gazdasági jelentősége miatt a fertőző bronchitisről nagy ismeretanyag áll rendelkezésre. Hazánkban elsőként Derzsy és Lomniczi számolt be a fertőzés előfordulásáról (Derzsy és Lomniczi, 1966; Lomniczi, 1966). Az első hazai vírusizolátum leírása Lomniczi és Stipkovits nevéhez fűződik, azóta a vírus számos variánsát azonosították már magyarországi állományokban is (Lomniczi és Stipkovits, 1968; Benyeda et al., 2009; Kiss et al., 2015).

Az IB a csirkék heveny légzőszervi tünetekkel járó, vírusos eredetű fertőző betegsége. A fertőzés a nagyüzemi baromfitartással foglalkozó országokban általánossá vált és a megbetegedésekből, elhullásokból, valamint a közvetett kiesésekből eredő gazdasági kár komoly terhet jelent a baromfiágazat számára.

Az IBV különböző genotípusait és genetikai vonalait (lineage) a tüskefehérjén (S) belül az S1 alegységet kódoló genomi régió szekvenciájának elemzésével különítik el egymástól (Valastro et al., 2016). Az egyes törzsek előfordulása földrajzi területenként különbözik, a megbetegítő képességük, valamint a kiváltott klinikai tünetek is nagy eltérést mutatnak. Ez jelentősen megnehezíti a betegség diagnosztikáját és így az ellene való védekezést.

Az IBV környezeti hatásokra (hőmérséklet, detergens) való érzékenységének ellenére továbbra is az egyik legelterjedtebb betegség a modern baromfitartó rendszerekben. Magas morbiditás, de a legtöbb esetben alacsony mortalitás jellemzi. Mindazonáltal másodlagos kórokozók jelenlétében, vagy nefropatogén IBV törzsszel történő fertőződés esetén feljegyeztek elhullást (Cook és Huggins, 1986; Raj és Jones, 1997). A baromfiállományokban tapasztalt gyakori előfordulása részben a légúti váladékkal, bélsárral és ragályfogó tárgyakkal történő könnyű terjedésének köszönhető (Ignjatović és Sapats, 2000). A magas prevalenciához hozzájárul az is, hogy a magas mutációs ráta és a különböző

törzsek közötti rekombináció miatt kialakult rendkívüli variabilitása megnehezíti az ellene való védekezést, beleértve a betegség kontrollját és a megelőző intézkedéseket is.

A vírusok jellemzésénél egyre inkább a molekuláris módszerek és a vírusok genetikai jellemzői veszik át a szerepet a klasszikus virológiai módszerekkel szemben. A különböző újgenerációs szekvenálási technikák térnyerése lehetőséget teremt az egyes vírustörzsek teljes genom szekvencia adatainak megismerésére, melynek segítségével a fertőzéseket okozó vírusok genetikai változatossága és leszármazási kapcsolatai is feltárhatóak. E módszerek széleskörű alkalmazása végső soron segítséget nyújthat egyre hatékonyabb diagnosztikai módszerek és a megelőzésben használható vakcinák fejlesztésében is.

Mindezekkel összefüggésben vizsgálataink fő célja a különböző *Avian coronavirus* törzsek teljes genom szekvencia adatainak gyűjtése és jellemzése volt. A vírustörzsek genomjának összehasonlításával szeretnénk több ismeretre szert tenni a fertőző bronchitis vírus genetikai diverzitásáról, az egyes evolúciós mechanizmusok, például a rekombináció jelentőségéről, és a vizsgált törzsek rokonsági kapcsolatairól.

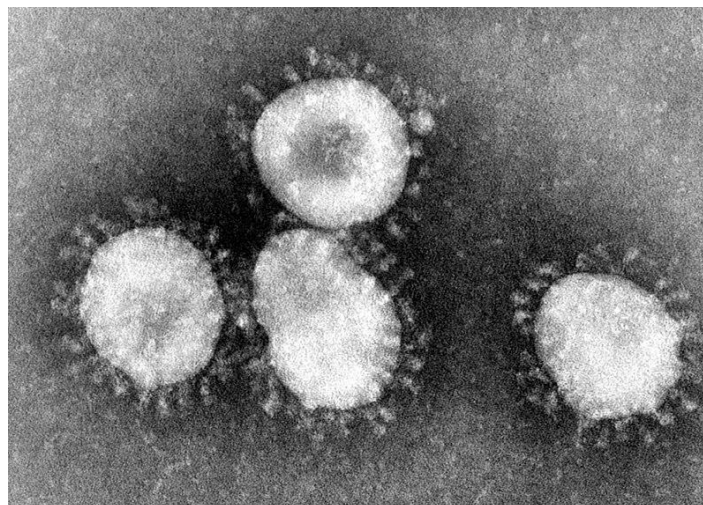
## 6 Irodalmi áttekintés

### 6.1 A koronavírusrak rendszertana

A *Coronaviridae* család tagjai a gerincesek között széles körben elterjedt szimpla szálú RNS vírusok, melyek emlősöket és madarakat fertőznek. A koronavírusrak által okozott betegségek lefolyása legtöbbször enyhe, de egyes fajok komoly humán- és állategészségügyi kockázatot is jelenthetnek. A háziállatok körében légúti és bélrendszeri megbetegedéseket, agyvelőgyulladást és májgyulladást okozhatnak (Weiss és Leibowitz, 2011).

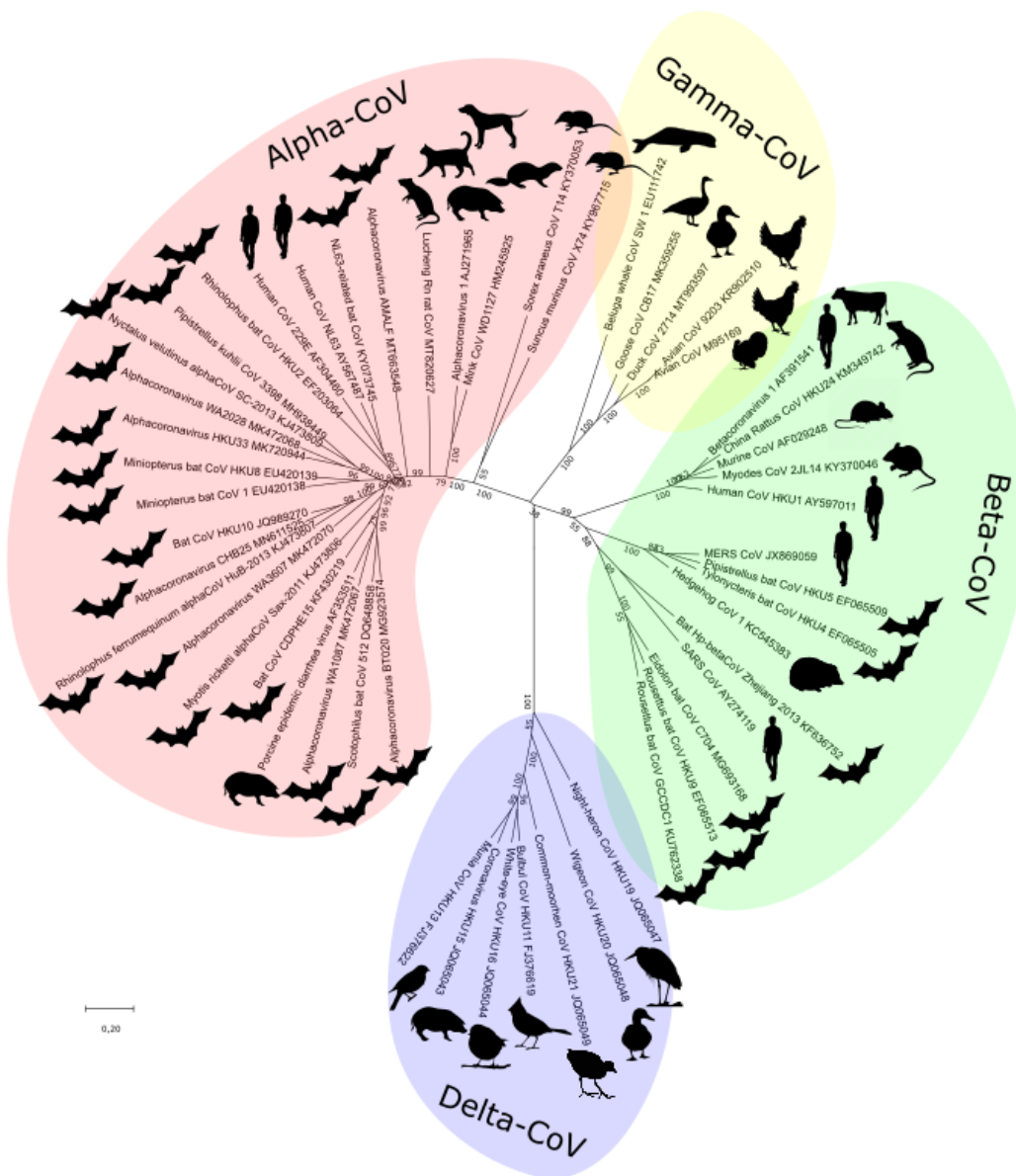
Emberben a koronavírusrak általában a légzőszervrendszert érintő megbetegedésekért felelősek, melyek súlyossága több tényezőtől függ (Burrell et al., 2017). A súlyos, gyakran halálos kimenetelű megbetegedéseket okozó koronavírusrak mindegyikét a XXI. században azonosították; ezek a súlyos akut légzőszervi szindróma-coronavírusrak (SARS-CoV), a közelkeleti légúti szindróma-coronavírusrak (MERS-CoV) és a súlyos akut légzőszervi szindróma-coronavírusrak 2 (SARS-CoV-2), mely utóbbi 2019 óta napjainkig minden bizonnyal a legnagyobb gazdasági, egészségügyi és szociális hatású vírus világszerte (Peiris et al., 2003; Zaki et al., 2012; Zhu et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Az első koronavírusrak légúti megbetegedésben szenvedő baromfiból izolálták az 1930-as években (Schalk és Hawn, 1931; Beaudette és Hudson, 1937). A csirkék fertőző bronchitise azóta is jelen van az intenzív baromfitartással rendelkező országokban, ezzel folyamatos problémát és jelenős gazdasági kárt okozva a vakcinázatlan és megfelelően immunizált állományokban egyaránt (Cavanagh és Naqi, 2003). A koronavírusrak a nevüket elektronmikroszkópos képük alapján kapták, melyen a burokba ágyazott tűskefehérjék által alkotott „bunkósbot” alakú nyúlványok a felszínből kitüremkedve napkoronaszerű megjelenést kölcsönöznek a virionoknak (**1. ábra**) (Wickramasinghe et al., 2014).



**1. ábra:** A SARS-CoV elektronmikroszkópos képe. (Dr. Fred Murphy; Az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) képtárából (<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=15523>).

A coronavírusok a *Nidovirales* renden belül található legnagyobb, *Coronaviridae* víruscsaládba tartoznak, melyet a korábbi taxonómiai felosztás szerint két alcsaládra, a *Coronavirinae* és *Torovirinae* alcsaládokra tagoltak (Masters és Perlman, 2013). A *Nidovirales* rendbe tartozó vírusok, így a coronavírusok rendszertani besorolása a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) döntése alapján jelentős átalakításon esett át 2018-ban. Ennek megfelelően ezek a vírusok a Riboviria birodalom *Nidovirales* rendjének *Cornidovirineae* alrendjébe tartozó *Coronaviridae* család *Orthocoronavirinae* alcsaládjába kerültek, mely az *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* és *Deltacoronavirus* nemzetségeket foglalja magába (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) (2. ábra).



**2. ábra** A coronavírusokat ábrázoló törzsfa

A filogenetikai fa az RNS-dependens RNS-polimeráz (RdRp) nukleotid szekvenciájának (2800 nt) felhasználásával készült. A négy fő klaszter az *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* és *Deltacoronavirus* nemzetségeknek felel meg.

Az *Alphacoronavirus* és *Betacoronavirus* nemzetség tagjainak elsődleges gazdaállatai az emlősök. A gamma- és delta-coronavírusok a madarakban fejlődtek ki, természetes rezervoárjaik napjainkban is a vadmadarak, bár a gamma-coronavírusok képviselőit cetfélékben (beluga bálna és palackorrú delfin) is azonosították már (Woo et al., 2012; King et al., 2018; L. Wang et al., 2020).

A házi és vadon élő állatok vírusai közül jó néhány, köztük a coronavírusok is képesek átlépni a fajok közötti határokat és humán megbetegedéseket okozni (Woo et al., 2009; Ye et al., 2020). Többek között a *Betacoronavirus* nemzetségbe tartozó SARS-CoV a 2000-es évek elején, a MERS-CoV 2012-ben, és a COVID-19 megbetegedést okozó SARS-CoV-2 2019-ben jelent meg, súlyos járványok okozójaként (Peiris et al., 2003; Zaki et al., 2012; Coleman és Frieman, 2013; Lai et al., 2020).

A jelenleg 26 fajt magába foglaló *Alphacoronavirus* nemzetségbe főként a humán coronavírusok (HCoV-229E és HCoV-NL63), valamint emlősöket – pl. denevéreket és sertéseket (pl. TGEV) – fertőző vírusok sorolhatóak. A *Betacoronavirus* nemzetségbe 14 faj tartozik, tagjai embereket (SARS-CoV, MERS-CoV, és SARS-CoV-2), denevéreket, és más emlősöket fertőző vírusok.

A *Gammacoronavirus* nemzetségbe korábban csak a madarak coronavírusai tartoztak, azonban a nemrégiben lezajlott taxonómiai revíziót követően ez módosult. A jelenlegi rendszertani besorolás alapján a *Gammacoronavirus* nemzetség három alnemzetséget foglal magába, ezek a *Brangacovirus*, a *Cegacovirus* és az *Igacovirus* subgenus. A *Cegacovirus* alnemzetségébe a beluga bálna coronavírusa (*Beluga whale coronavirus SW1*) tartozik, az *Igacovirus* és *Brangacovirus* alnemzetségekbe pedig a madarakat fertőző coronavírus fajok. Ezen felül, a főként verébalakúak rendjébe (*Passeriformes*) tartozó énekesmadarakat (pintyek, rigófélék és fülemülék) fertőző coronavírus fajokat a *Deltacoronavirus* nemzetségbe sorolják. A *Gammacoronavirus* nemzetségbe jelenleg öt, a *Deltacoronavirus* nemzetségbe pedig hét faj tartozik. A vadmadarakat fertőző coronavírusok genetikailag is eltérnek a *Gammacoronavirus* nemzetségbe tartozó domesztikált madarak coronavírusaitól, többek között a 3CL-proteáz, az RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp), valamint a tüske (spike, S) és nukleokapszid (N) gének csupán 56,6 és 57,1% közötti aminosav azonosságot mutatnak (Woo et al., 2012; de Wit és Cook, 2019; Mihindikulasuriya et al., 2008).

A madarakat fertőző *Igacovirus* alnemzetségbe tartozó legismertebb gammacoronavírus a csirkék fertőző bronchitisét (infectious bronchitis, IB) okozó *Avian coronavirus* (infectious bronchitis virus, IBV). Az IB rendkívül ragályos megbetegedés, amelyre az érintett madarak életkorától, immunstátuszától és egyéb másodlagos kórokozók megjelenésétől függően 0-82% közötti morbiditás jellemző (Ramakrishnan és Kappala, 2019).

Az IB dokumentált történetének 100 éve alatt mit sem veszített jelentőségéből. Kezdetben az egyre változatosabb kórformák kialakulása, napjainkban pedig a vakcinás



védelmet megkerülő számtalan új genotípus, variáns és a rekombinánsok megjelenése jelenti a legnagyobb kihívást a baromfiágazat számára (Bhuiyan et al., 2021).

Az IB-t elsőként kifejezett légzőszervi tüneteket mutató fiatal brojlerállományokban írták le, később hasonló tüneteket idősebb korú állatoknál és tojóállományokban is megfigyeltek (Beach és Schalm, 1936; Schalk és Hawn, 1931). A bántalom vírusos eredetét 1936-ban Beach és Schalm igazolta, majd 1937-ben Beaudette-nek és Hudsonnak sikerült embrionált tyúktojásban izolálnia a kórokozót (Schalk és Hawn, 1931; Beaudette és Hudson, 1937). A légzőszervi forma megjelenését további IBV-hez köthető kórképek követték. Tojóállományokban súlyos termeléseszkökenésről és a tojáshéj minőségének romlásáról számoltak be. A vesekárosító törzsek megjelenése mellett napjainkban az emésztőtraktus különböző szakaszainak károsodásával összefüggésbe hozható törzsek kártétele jellemző világszerte (Wang et al., 1998; Li Yu et al., 2001; Ziegler et al., 2002; Benyeda et al., 2010; Jackwood és de Wit, 2013; Cook et al., 2012).

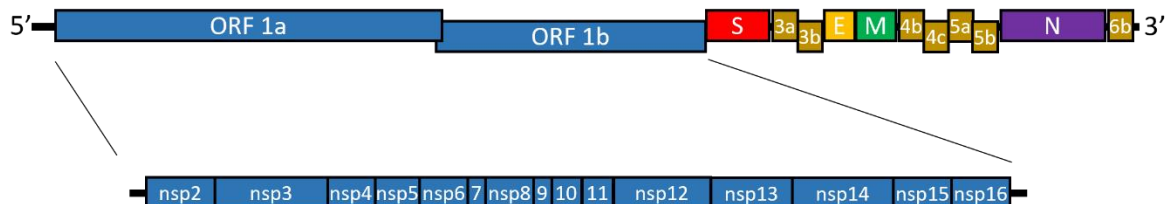
Magyarországon Derzsy és Lomniczi számolt be a fertőzés 1962-63-as előfordulásáról, mely fiatal jérceállományokban légzőszervi tüneteket, tojóban pedig tojástermelés-csökkenést okozott (Derzsy és Lomniczi, 1966; Lomniczi, 1966). Az első hazai vírustörzs izolálása Lomniczi és Stipkovits nevéhez fűződik, azóta a vírus számos variánsát azonosították már magyarországi állományokban is (Benyeda, 2009; Kiss et al., 2015; Lomniczi és Stipkovits, 1968). A 90-es évekig csak a különböző Massachusetts (Mass és H120) szerotípusú törzsek jelenlétét igazolták, majd a 793/B és az Italy02 szerotípusú törzsek terjedtek el immunizált és vakcinázatlan állományokban egyaránt (Worthington et al., 2008). A 2000-es évek óta Ázsiából terjedő QX-szerű törzseket 2006-ban azonosították először hazánkban (Mató et al., 2007). A megbetegedések főként brojlerállományokat érintettek, ahol kifejezett vesekárosodást okoztak. A fiatal korban fertőzött tojóállományok egyedeinél irreverzibilis tojócső-károsodást észleltek (Mató et al., 2007). A QX törzsekkel kapcsolatban a légzőszervi tüneteken túl súlyos vesekárosodásról, mirigyegyomor-gyulladásról és „áltojó-szindróma” kialakulásáról számoltak be (Landman et al., 2005; Monne et al., 2008). Az utóbbi években viszont a GI-23 genotípusba tartozó közel-keleti eredetű törzsek (Variant-2) térhódítása zajlik, számos európai országban igazolták jelenlétét már, Magyarországról azonban nincsenek elérhető friss járványügyi adatok (Franzo et al., 2017a; Lisowska et al., 2017; Fischer et al., 2020).

## **6.2 A koronavírusok morfológiája és szerkezete**

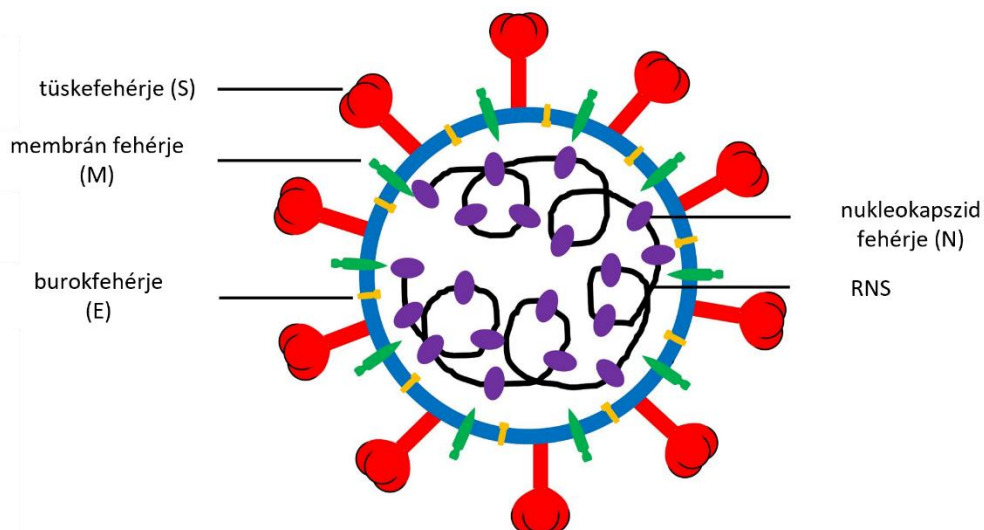
A koronavírusok 120-160 nm átmérőjű, burkos, pleomorf virionnal rendelkeznek. Legfőbb jellemzőjük a tüske-alakú felületi nyúlványok jelenléte, amelyek az elektronmikroszkópos felvételen napkoronára emlékeztető képet mutatnak (Tyrell, 1968).

Szimplaszálú, pozitív irányultságú, 26-37 kilobázis (kb) méretű RNS genomjukkal a leghosszabb lineáris genommal rendelkező RNS vírusok (Lai et al., 1994) (**3. ábra**). A genom 5' végén guanozin sapkával, a 3' végén poliadenin (poli-A) farokkal rendelkeznek (Boursonnell et al., 1987; Gorbalenya et al., 1989). A nem transzlálódó régiók (untranslated region, UTR) kulcsszerepet játszanak a vírus RNS transzkripciójában és replikációjában (Sawicki, 2009).

**A**



**B**



**3. ábra** Az *Avian coronavirus* genom sematikus felépítése és szerkezete

**A** Strukturális fehérjék a tüske (S), burok (E), membrán (M) és nukleokapszid (N), valamint az ORF1ab által kódolt nem strukturális fehérjék (nsp2-16) és a járulékos fehérjék, köztük a 3a, 3b, 4b, 4c, 5a, 5b és 6b. A nem strukturális fehérjéket kódoló szakaszok kézzel, a strukturális fehérjéket kódoló gének pirossal, sárgával, zölddel és lilával, a feltételezett járulékos gének barnával vannak jelölve. **B** Az *Avian coronavirus* négy szerkezeti fehérjéje a tüske (S), burok (E), membrán (M) és nukleokapszid (N) fehérjék.

A genom 5' végénél található a nem-szerkezeti fehérjéket (non-structural proteins, nsp) kódoló nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF), az ORF1ab, mely a teljes genom közel kétharmadát teszi ki, és két poliprotein aminosav sorrendjét határozza meg. Erről a vírus replikációjához szükséges fehérjék riboszomális kereteltolódás miatt poliproteinként íródnak át. A poszttranszlációs folyamatok során a vírus eredetű proteázok (papainszerű proteáz – PLP – és a fő proteáz – Mpro – vagy 3C-szerű proteáz) gammacoronavírusok esetében 15 különböző fragmensre hasítják a poliproteint, az így keletkező fehérjék közül jórészt a virális RNS-ek éréséhez és replikációjához szükséges enzimaktivitással rendelkeznek (Ayres és

Brandão, 2016; Snijder et al., 2016). Az IBV esetében az nsp1 fehérje hiányzik; ezt a fehérjét az *Alpha*-, és *Betacoronavirus* genusba tartozó vírusok általánosan kódolják. Az ORF1ab-ról átíródó fehérjék funkcióit az **1. táblázat** foglalja össze.

**1. táblázat** A coronavírusok ORF1ab-ról átíródó nem szerkezeti fehérjéi

| Fehérje | Funkció   |
|---------|---|
| nsp1    | gazda és vírus génexpresszió szabályozása (IBV esetében hiányzik)                                       |
| nsp2    | ismeretlen  |
| nsp3    | papain-szerű proteázdomén, N-terminális régió vágása nsp2-nsp3-nsp4 között                              |
| nsp4    | transzmembrán domén, nsp3-mal és nsp6-tal komplex képzése   |
| nsp5    | 3C(cisztein)-szerű proteínázdomén   |
| nsp6    | transzmembrán domén, nsp3-mal és nsp4-gyel komplexet képez  |
| nsp7    | nsp8-cal és nsp12-vel komplexet képez   |
| nsp8    | primáz aktivitás, nsp7-tel és nsp12-vel komplexet képez   |
| nsp9    | szimpla-szálú RNS-kötő aktivitás  |
| nsp10   | nsp14-gyel komplexet képez, nsp14 és 16 aktivitásának stimulálása                                       |
| nsp11   | ismeretlen  |
| nsp12   | RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp)  |
| nsp13   | RNS helikáz   |
| nsp14   | 3'-5' exoribonukleáz és N7-metiltranszferáz, replikációs hűség, RNS hibajavító aktivitás (proofreading) |
| nsp15   | poly(U)-specifikus endoribonukleáz  |
| nsp16   | 2'-O-ribóz metiltranszferáz, mRNS sapka képzés, I-es típusú interferon antagonist                       |

A coronavírusok genomja négy (egyres betacoronavírusok esetében öt) szerkezeti fehérjét kódol, melyek sorrendben a túske (spike, S), a membrán (M), a burok (envelope, E), és a nukleokapszid (N) fehérjék (**3. ábra**). A struktúrfehérjék közül patogenitás és gazdaspecificitás szempontjából kulcsfontosságú az S fehérje, mely a vírus felszínén felületi nyúlványokat képező, trimerként megjelenő membrán-glükoprotein (Delmas és Laude, 1990). A coronavírusok az S fehérje segítségével kapcsolódnak a gazdasejt receptoraihoz, és jutnak be a sejtekbe. Mivel az S fehérje egy I-es osztályú fúziós fehérje, a membránfúzióhoz szükséges, hogy a gazdasejt proteázai hasítsák azt. Fertőzéskor a sejt-fúzió során a furin és furin-szerű enzimek hatására egy meghatározott hasítóhely-motívumnál (cleavage site motif) S1 és S2 alegységre hasad. Az S1 alegységen található a receptorkötő domén, így a célsejthez való kötődésért felelős, miközben a transzmembrán domént tartalmazó S2 alegység a vírusburok és a sejtmembrán fúzióját biztosítja (Cavanagh, 2007). Ezen felül a neutralizáló antitestek is az S1 alegységen található epitópokhoz kötődnek, melyek elhelyezkedésüket tekintve szoros összefüggésben vannak az S1 alegység három hipervariábilis régiójának

(HVR) szekvenciájával (Cavanagh et al., 1988; Kant et al., 1992; Koch et al., 1990). Az S1 fehérje, főként annak hipervariábilis régiói határozzák meg a patogenitást, a sejtropizmust és a gazdaspektrumot, így ezekben a régiókban történő változásokkal hozható összefüggésbe, hogy a vírus tud-e multiplikálódni bizonyos sejt típusokban (Casais et al., 2003; Shan et al., 2018).

Az *Avian coronavirus* sejtreceptorát még nem sikerült pontosan meghatározni, azonban az  $\alpha$ -2, 3-kötésű szialinsav nélkülözhetetlennek bizonyult a tüskefehérjék rögzítéséhez (Abd El Rahman et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2011). A vírus és sejtmembrán közötti szorosabb kötődéshez és fúzióhoz azonban valószínűleg szükséges egy második receptorral történő kölcsönhatás is (Winter et al., 2006). Újabb kutatások alapján az aminosav-aminopeptidáz-N (APN) az IBV egyik funkcionális receptora lehet. Az aminosav-aminopeptidáz-N, más néven CD13, egy M1 típusú cink-függő metalloproteináz, melynek virális receptorként való működése számos fajban ismert. Például a humán coronavirus 229E (HCoV-229E), a sertések járványos hasmenését (PEDV) okozó coronavirus, valamint a macskákat, kutyákat és sertéseket fertőző *Alphacoronavirus 1* receptora (Li et al., 2007; Li, 2016; Zhu et al., 2018). Miguel és mtsai. heterológ gazda-vírus modellben kimutatták, hogy macska APN-t (*felis catus* APN, fAPN) tartalmazó plazmiddal történő transzfekeciót követően a hörcsög eredetű BHK-21 sejtek megfertőződhetnek IBV-vel, ami a fAPN szerepét mutatja az IBV gazdasejtbe való bejutásában (Miguel et al., 2002). További, az M41 IBV törzs és a csirke APN (*Gallus gallus* APN, gAPN) kapcsolatát célzó vizsgálatok során azonosították nagy affinitású peptid motívumait is az IBV S génjében. Az azonosított három motívum közül kettő – „YxYY” és „FxPPxxWxLH” – az S1 N-terminális domén régióban, míg egy másik – „YxFxGN” – az S2 régióban található. Így a gAPN nagy affinitású peptidjei alternatív megközelítést kínálhatnak az IB megelőzésében vagy kezelésében is (Sun et al., 2021).

Promkuntod és mtsai. az M41 IBV törzssel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok során arra az eredményre jutottak, hogy a tüskefehérje receptor-kötő doménje az S1 N-terminális 253 (19-272) aminosavához kapcsolódik, valamint, hogy az N38, H43, P63 és T69 aminosavak létfontosságúak az M41 törzs tüskefehérjéinek kötődésében. Ezen felül az eredmények azt mutatták, hogy az N38S, H43Q, P63S és T69I S1 mutációk elvesztették a légcső sejteihez való kötődési képességüket. Az M41 törzs ezen aminosavainak a Beaudette törzs S1 génjébe történő bejuttatása azonban nem eredményezett kötődést. Ezek szerint, bár ez a négy aminosav a vírus-gazda kapcsolódási ponton helyezkedik el, a korábban azonosított A19, S56 és I66 és a régióban található egyéb aminosavak nagy valószínűséggel szintén hozzájárulnak a tüskefehérje kötődéséhez (Promkuntod et al., 2014).

Bouwman és mtsai. vizsgálták az egyes IBV törzsek vesetropizmusáért felelős tényezőket. Két eltérő szövettropizmusú, a nefropatogén QX és a nem nefropatogén M41 IBV törzseket használták, és a tüskefehérjék receptor-kötő domén (RBD) és a célsejtek közötti

kölcsönhatásokat tanulmányozták. Kiméra RBD fehérjék segítségével végzett kísérletek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a QX-RBD 99.-159. aminosavait magában foglaló régió szükséges a vese fogékony sejtjeihez való kötődéshez. A QX-RBD 110.-112. pozícióig terjedő KIP aminosavai elegendőek voltak ahhoz, hogy az IBV-M41 a vese sejtjeihez kötődjön, míg az IBV-QX reciprok mutációi teljesen megszüntették a vese sejtjeihez való kötődés képességét (Bouwman et al., 2020).

Mindezeken felül az S fehérje erős interleukin (IL-6, IL-8), és tumor nekrozis faktor alfa (TNF $\alpha$ ) aktivátor, ebből eredően a vakcinafejlesztések fő célpontja (Wang et al., 2007). A tüskefehérje a koronavírusok legváltozékonyabb fehérjéje, immunogenitása és specificitása miatt számos szerológiai próba az ellene, vagy valamelyik alegysége ellen termelődött ellenanyag kimutatásán alapszik önállóan, vagy az N fehérjével kombinációban (Enjuanes et al., 2016; Okba et al., 2020).

Az M és E struktúrfehérjéknek a virionok felépítésében és kiszabadulásában van szerepük. A burokból dimereket képző M fehérje stabilizálja a virionok alakját és rögzíti az N fehérjéket a virion belsejében, emellett interferon-béta (IFN- $\beta$ ) gátló szerepe is van (Snijder et al., 2016). A 3c génről átíródó E protein, a legkisebb méretű struktúrfehérje, fontos szerepet tölt be a virionok összeépülésében és a sejtől való kijutásában, valamint transzmembrán fehérjeként kalciumion-csatorna funkcióval is rendelkezik (Liu et al., 1991; Nieto-Torres et al., 2014).

Az N fehérje a virális nukleinsavhoz szorosan kötődő helikális szerkezetű nukleokapszidot alkotja, melynek az RNS-genom rögzítése mellett a genomszintézis szabályozásában is szerepe van (Lai és Cavanagh, 1997). A vírusszerkezet felépítésében betöltött szerepe mellett I-es típusú IFN-antagonistaként is funkcionál és erősen immunogén (Oh és Shin, 2021). Az N fehérje mind nukleinsav-, mind fehérjeszinten rendkívül konzervatív, ezért a különböző diagnosztikai módszerek gyakran az N fehérje ellen termelt ellenanyagok, vagy az N fehérjét kódoló gén kimutatásán alapulnak (Masters és Sturman, 1990; Chang et al., 2014).

A koronavírusok genomja a szerkezeti fehérjéken kívül számos nem strukturális, ún. járulékos fehérjét is kódol, melyek fajra jellemzőek és kevésbé konzerváltak és egy részük nem esszenciális a vírus életciklusához. Az *Avian coronavirus* genomja általában hét, többnyire ismeretlen funkciójú járulékos fehérjét kódol, melyek sorrendben a 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b és 6b fehérjék (15. oldalon található **3. ábra**). A járulékos fehérjéket kódoló ORF3, ORF4 és ORF5 géneket a strukturális fehérjéket kódoló gének közé ékelődve találjuk, míg a 6b gén a genom 3' végén helyezkedik el. Ezek a járulékos fehérjék tipikusan a vírusreplikáció szabályozásában vagy a gazdaszervezet immunreakciójának elkerülésében vesznek részt (Lin és Chen, 2017). Mindazonáltal számos járulékos fehérje funkciói más koronavírusok

járulékos fehérjével vagy más ismert fehérjékkel való homológia hiányában nagyrészt máig ismeretlenek (Liu et al., 2014).

Shen és mtsai. illetve Hodgson és mtsai. bebizonyították, hogy a 3a és 3b nem szükséges az IBV replikációjához, ami arra enged következtetni, hogy a 3a és 3b nem vesz részt közvetlenül az IBV RNS szintézisében vagy fehérjék képződésében (Shen et al., 2003; Hodgson et al., 2006). Nemrégiben igazolták, hogy a 3a vagy 3b deléciója az IBV-ben rontotta a replikációs képességet csirkeembriókon valamint *in vivo* és *in vitro* attenuálódást indukálhat (Liu et al., 2008; Laconi et al., 2018). A közelmúltban *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a 3a és 3b járulékos fehérjék gátolhatják a gazdaszervezet IBV által kiváltott veleszületett immunválaszát. A fertőzést követően a 3a és 3b fehérjék késleltetik az I-es típusú IFN és IFN-stimuláló faktorok aktiválódását (Kint et al., 2014).

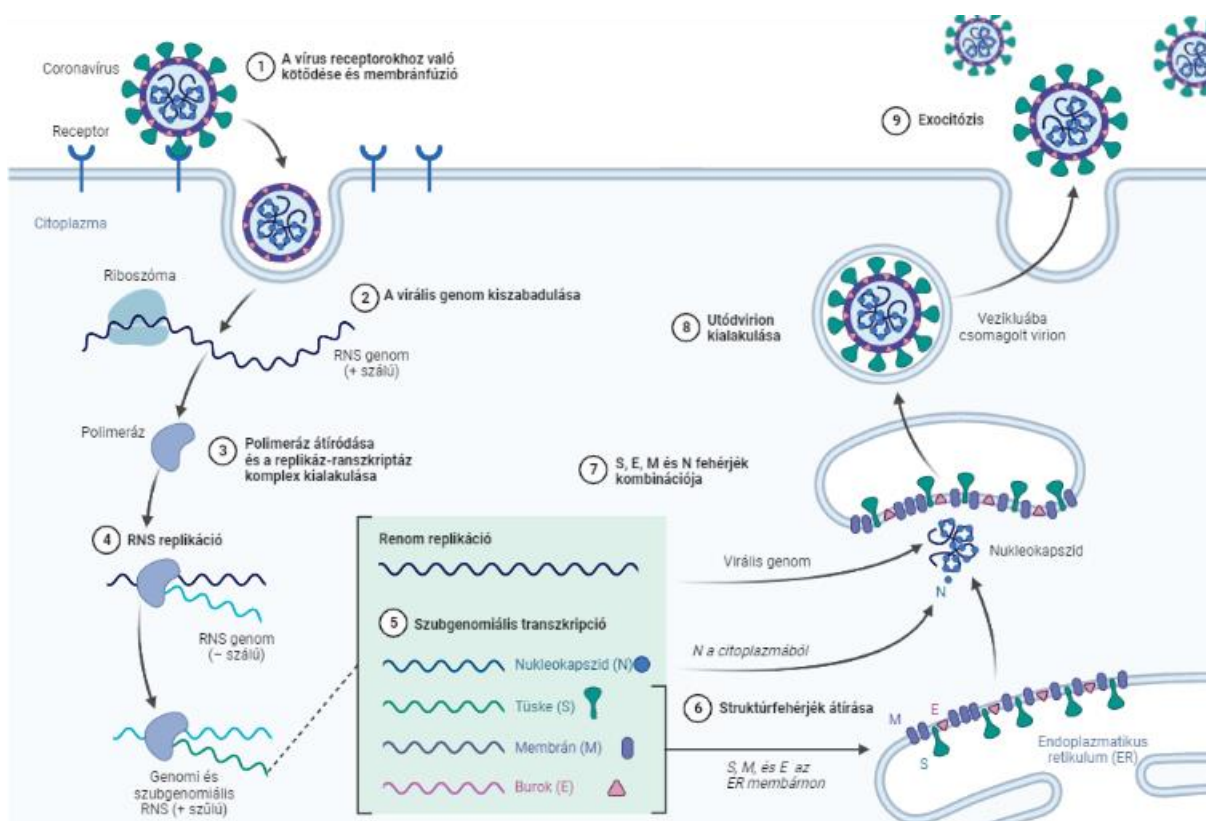
Hasonlóképpen az 5a és 5b járulékos fehérjékről is bebizonyították, hogy nem vesznek részt közvetlenül az IBV replikációs folyamatában (Casais et al., 2005; Youn et al., 2005). Azonban az 5a vagy 5b deléciója olyan utódvirionokat indukált, amelyek legyengített/attenuált fenotípust mutattak *in vitro*, *in ovo* és *in vivo* vizsgálatokban egyaránt (Zhao et al., 2019). Egy másik *in vivo* vizsgálatban az 5b fehérjében deletált IBV törzs a vad típusú törzssel összehasonlítva nem tudta késleltetni az IFN aktiválódását (Laconi et al., 2018). Feltételezhetően az 5b fehérje fontos szerepet játszhat a gazdaszervezetben az interferon-termelés modulálásában (Kint et al., 2016). Kint és mtsai. megerősítették, hogy az 5b fehérje képes a veleszületett immunválasz gátlására, mégpedig úgy, hogy leállítja a gazdaszövet fehérjeszintézisét, ami hasonló az alfa- és betacoronavírusok által kódolt nsp1 funkciójához (Kamitani et al., 2009; Kint et al., 2016; Nakagawa és Makino, 2021). Ily módon az IBV 5b fehérjeje kompenzálhatja az nsp1 fehérje deléciójának az IBV virulenciára gyakorolt hatását (Peng et al., 2022).

### **6.3 A coronavírusok és az *Avian coronavirus* replikációja**

A coronavírusok replikációja a sejtek citoplazmájában zajlik, melynek első lépése a virionoknak a célsejtek plazmamembránjához történő kötődése. Az *Avian coronavirus* sejtreceptorát még nem sikerült pontosan meghatározni, azonban az  $\alpha$ -2, 3-kötésű szialsav nélkülözhetetlennek tűnik a tüskefehérjék rögzítésében (Abd El Rahman et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2011). A virionok az IBV-re fogékony sejtekbe, egy specifikus receptorhoz való kötődést követően, a vírusburok és a plazmamembrán fúziójával hatolnak be. A vírus kötődése a receptorhoz az S fehérje konformációs változását idézi elő, ami aktiválja annak membránfúziós funkcióját (Belouzard et al., 2012). A vírus-sejtmembrán fúzió után a vírus nukleokapszidja kiszabadul a citoplazmába, és a kicsomagolt RNS hozzáférhetővé válik a primer transzláció és transzkripció számára (Sawicki, 2009).

A virális RNS citoplazmába való kiszabadulását követően a virális RNS-ről közvetlenül íródik át az ORF 1a és 1b. Az így létrejövő 1a és 1ab poliproteinek poszttranszlációs folyamatok során a replikációs és transzkripciós komplexet alkotó funkcionális, nem-strukturális fehérjékké (nsps) alakulnak át. Ez a replikációs komplex egy teljes genom hosszúságú negatív szálú RNS másolatot szintetizál, mely a szakaszos transzkripció során templátként szolgál a szubgenomiális mRNS molekulák átírásához (Sawicki és Sawicki, 1995). A transzkripció során teljes genom hosszúságú negatív szálú másolatok készülnek, majd ezekről történik a virális genom sokszorozódása. A róluk átíródó pozitív szálú teljes genom hosszúságú másolatok az összeépülő virionok genomjai lesznek (V'kovski et al., 2021). A *Coronaviridae* család tagjainak sajátossága, hogy a pozitív irányultságú genomról a negatív templátszálak szegmentáltan is átíródhatnak. Az átíródó szegmensek határait a transzkripciós regulátor szekvenciák (TRS) jelölik, jellemzően minden leolvasási keret után (V'kovski et al., 2021). Ezen szekvenciák bármelyike után az RNS-dependens RNS-polimeráznak (RdRp) lehetősége van a templát szál 3' végén elhelyezkedő 'leader' TRS-re ugrani és ezzel befejezni az adott mRNS-szál szintézisét. Így különböző hosszúságú mRNS-ek keletkeznek. Az azonos 3'-végekkel és 5' leader (vezető) szekvenciával rendelkező, de különböző hosszúságú mRNS-ek halmazát szubgenomiális RNS-szettnek nevezzük (Sethna et al., 1989). A koronavírusok általános replikációját a **4. ábra** mutatja be.

A koronavírusokban az RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkező nsp12, az nsp7 és nsp8 fehérjével együtt alkotja a replikációs-transzkripciós komplex magját (Q. Wang et al., 2020). Ez az alacsony pontosságú RNS-polimeráz komplex (nsp12:nsp7:nsp8; 1:2:1) a magas genom-szintű diverzitás biztosításával teszi lehetővé a koronavírusok számára, hogy hatékonyan és dinamikusan alkalmazkodjanak a környezet változásaihoz és a változatos szelekciós nyomáshoz. Mivel az RdRp önmagában hibajavító aktivitással nem rendelkezik, az nsp12-nsp7-nsp8 komplex magas hibaarányának kompenzálására a koronavírusok egyedi/különleges hibajavító funkcióval rendelkeznek, amit a replikációs komplex más elemei, nevezetesen az nsp14-nsp10 komplex biztosít (O'Sullivan et al., 2019). A koronavírusok között erősen konzervált nsp14 3'-5' exonukleáz (ExoN) és guanin-N7-metiltranszferáz domént tartalmaz (Ma et al., 2015). Mindezek ellenére a koronavírusok jellemzően magas hibaarányal replikálódnak (lásd 6.6. fejezet).



4. ábra A coronavírusrak replikációjának sematikus illusztrációja. Az ábra a BioRender sablonjának felhasználásával készült.

A genom közel kétharmadát teszi ki az 5' végén található 1a és 1b prekursor poliproteint kódoló ORF1ab, mely riboszómális kereteltolódással egy nagy poliproteinné (1ab) majd 15, a vírus replikációjában fontos szerepet játszó, nem szerkezeti fehérjévé (nsp2-nsp16) íródik át (16. oldalon található **1. táblázat**) (Brierley et al., 1989). Az 1ab replikáz gén által kódolt legfontosabb enzimek közé tartozik a papain-szerű proteáz (PLpro), a fő proteáz (Mpro) vagy a 3C-szerű proteáz (3CLpro), az adenzin-difoszfát-ribóz-1-foszfátáz (nsp3), az RdRp (nsp12), az RNS-helikáz (nsp13), az exonukleáz (nsp14), az endoribonukleáz (nsp15) és a 2-O-metiltransferáz (nsp16) (Fang et al., 2010). A genom fennmaradó része a strukturális géneken kívül a járulékos géneket kódolja. Minden vírus eredetű szubgenomiális mRNS-ről egyetlen vírusfehérje transzlációja történik. A négy szerkezeti fehérje, a tüske (S), a nukleokapszid (N), a membrán (M) és a burok (E) fehérje transzlációja különálló mRNS-ekről történik. A járulékos gének olyan géntermékeket kódolnak, melyek nem nélkülözhetetlenek a vírus replikációjához, de deléciójuk gyakran a virulencia csökkenésével jár (de Haan et al., 2002). A virális RNS replikációjához a replikáz gén mellett szükség van a specifikus másodlagos szerkezettel rendelkező 5' és 3' végi UTR szekvenciákra és a nukleokapszid fehérjére is (Zúñiga et al., 2010).

A replikációs ciklus egésze a citoplazmában megy végbe (**4. ábra**). A teljes genom méretű átíratok utódvirionokba csomagolódnak. A burok a gazdasejt transzmembrán



glikoproteineket tartalmazó membránjain, az endoplazmatikus retikulum ciszternáin és a Golgi-komplexen keresztül történő lefűződéssel képződik. A virionok a Golgi-membránról leválva keletkeznek, majd a sejten belüli vezikulumokban halmozódnak fel és a fertőzött sejtől exocitózissal ürülnek (Abdel-Moneim, 2017).

#### **6.4 Az *Avian coronavirus* által okozott kórfolyamatok**

A csirkék coronavírusa széles körben elterjedt és különböző kórképek kialakításában vesz részt. A vírust elsőként kifejezett légzőszervi tüneteket mutató brojlerállományokból mutatták ki (Beach és Schalm, 1936; Beaudette és Hudson, 1937).

A légzőszervi forma mellett megjelentek a tojóállományokban a tojástermelés csökkenést és a tojánhéj minőségének romlását okozó törzsek (Beach és Schalm, 1936). Ezt követően megjelentek a vesekárosító hatással rendelkező variánsok (Winterfield és Hitchner, 1962). Számos IBV bizonyítottan szerepet játszik a mirigygyulladás kialakulásában is. A betegség klinikai megjelenése napjainkban is változatos, a fertőzést okozó törzstől függően légzőszervrendszeri tünetekben, a szaporítószervrendszer, az emésztőszervrendszer vagy a vese megbetegedéseiben nyilvánul meg (Dobos-Kovács, 2014). Egy adott állományban kialakuló kórképek előfordulása és súlyossága a vírus szerotípusán és patogenitásán kívül számos egyéb tényező függvénye. Meghatározó szerepe van az állomány korának és hasznosítási irányának, a tartási és takarmányozási körülményeknek, vagy az egyidejűleg fennálló egyéb fertőzéseknek. A kórhatározás szempontjából a törzsek közötti antigénszerkezeti eltérések, valamint az alkalmazott vakcinák sokfélesége nehezítő körülmény (Hoerr, 2021).

A fertőzésre minden korosztály fogékony, de a legsúlyosabb tünetek a napos korú állatok fertőződése esetén alakulnak ki (Cavanagh és Naqi, 2003). Egy érintett állományon belül minden egyed fertőzötté válik. A mortalitás mértéke a vírus virulenciájának, valamint az állomány korának, immunállapotának és egyéb külső tényezőknek megfelelően igen tág határok között mozoghat (Cavanagh és Naqi, 2003).

A fiatal madarak esetében a betegség lefolyása a tünetek súlyosságától függően 7-21 nap. A fertőző bronchitisben elpusztult fiatal csibék boncolása során a melléküreges gyulladása, hurutos légcsőgyulladás, hörgőgyulladás, valamint a tüdőben pangás és vizenyő figyelhető meg. Esetenként savós váladék figyelhető meg a hörgőkben (Fenner et al., 1987). A csirkék fertőző bronchitisét okozó *Avian coronavirus* az állatok leginkább aerogén úton (cseppfertőzéssel vagy poros levegővel) esetleg szájon át (fertőzött takarmánnyal, ivóvízzel) fertőződnek (Dobos-Kovács, 2014). A vírusreplikáció elsődleges célpontja a légcső, de a tüdőben, a vesében, a petefészkekben, az emésztőtraktusban és a nyirokszövetekben is szaporodik. A fertőző bronchitis vírusa esetenként tartós fertőzést idézhet elő, melynek következtében a kezdeti expozíciót követően több hónapig a bélsárral ürül. A sikeres

fertőzéshez szükséges, hogy a tüskefehérje S1 alegysége a célsejt felszínén található receptorokhoz kötődjön és az S2 alegység közvetítésével a vírus-gazdasejt fúzió létrejöjjön (Wickramasinghe et al., 2011; Hulswit et al., 2016). Ezt követően a vírus gyorsan terjed a Harder-mirigy, a légcső, a hörgők és a légzsákok hámsejtjeiben (Jones és Jordan, 1972).

A törzsek eltérő virulenciájából és szervtropizmusából adódóan a fertőzött állatok korától és immunállapotától függően is különböző típusokat és klinikai formákat különíthetünk el. A betegség elnevezése nem tükrözi a sokféle klinikai és kórbonctani megjelenést, melynek hátterében részben a törzsek eltérő szöveti affinitása áll. A vírus a hámsejtekben szaporodik, léziókat okozva az orrkagylóban, légcsőben, vesében, ivarszervekben, petevezetékben, tüdőben és a légzsákokban. Ezenkívül a gyomor-bél traktusban, beleértve a bursa Fabricii-t és a vakbél nyiroktüszőit (caecal tonsils) is gyakran találhatóak elváltozások. Általánosságban a klinikai tünetek megnyilvánulásai alapján négy fő patotípust különböztetünk meg, ezek a légzőszervi, kiválasztószervi, nemi szervi és emésztőszervi tüneteket okozó törzsek (Schalk és Hawn, 1931; Broadfoot és Smith, 1954; Ignjatović és Sapats, 2000; Jackwood és de Wit, 2013).

#### **6.4.1 Légzőszervrendszert érintő fertőzés**

Az IBV aerogén fertőzés után elsősorban a felső légutak (főleg a légcső alsó harmadában, hörgőkben) csillós hámsejtjeinek és nyálkahártya sejtjeinek citoplazmájában sokszorozódik. A légutak egyéb szakaszaira és a kötőhártyára is áttérjed. Jellemző a fertőzés hatására kialakuló nyálkahártya károsodás. A légzőszervi tünetek jellegzetes formában fiatal állományokban alakulnak ki, míg hat hetes kor felett a tünetek sok esetben észrevétlenek maradnak. A betegségre általában jellemző a könnyezés, savós kötőhártya-gyulladás (Dobos-Kovács, 2014), szörtyögés, nehezített légzés, köhögés, tüszögés, mely néha orrfolyással társul, esetenként a szemgödör melléküreg duzzanata is megfigyelhető (Cavanagh, 2005). A légúti vírusreplikációt hamarosan virémia követi és a vírus a szervezet többi szervében is szétterjed (Hoerr, 2021). A virémia miatt az állatok bágyadtak, tolluk borzolt, takarmányfogyasztásuk jelentősen csökken.

Általában ez az IBV-hez köthető betegség legenyhébb lefolyású formája. A légzőszervi törzsek által okozott megbetegedés következtében a légutak helyi védekezőképessége is számottevően romlik, emiatt a madarak fogékonyá válnak a másodlagos bakteriális fertőzésekre (Fabricant és Levine, 1962; Ignjatović és Sapats, 2000). Másodlagos kórokozók, mint az madár mycoplasma fajok, *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* vagy a *Bordetella avium* megjelenése esetén tüdőgyulladás, légzsákgyulladás és hashártyagyulladás léphet fel. A morbiditás szinte mindig 100%, míg a mortalitás az érintett madarak életkorától, a vírustörzstől és a másodlagos kórokozók megjelenésétől függően igen változó lehet, 14%-tól akár 82%-ig terjedhet (Ramakrishnan és Kappala, 2019).

A főbb makroszkópos elváltozások közé tartozik, hogy a gyulladt nyálkahártya felületén megjelenő nyálkás vagy savós – hurutos később fibrinnel átszöttvéladék, mely teljesen elzárhatja a légutakat (Terregino et al., 2008; Cheng et al., 2018). A légcső és a gége halványsárga színezetű, nyálkával fedett, megvastagodott. Akut lefolyás során a tüdőben kifejezett bővérűség mutatkozik és az ödémásan megvastagodott légzsákok habos, savós váladékkal borítottak (Dobos-Kovács, 2014). A savós-fibrines izzadmánnyal telt tüdők és légzsákok a különböző baktériumokkal (pl. *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*) történő társfertőzésre utalnak (**5. ábra**) (van Empel et al., 1996; Dwars et al., 2009; Weerts et al., 2021; Nordin et al., 2021).



**5. ábra** Fertőző bronchitis és *Escherichia coli* társfertőzés. A makroszkópos vizsgálat során a fertőzött csirkékben tapasztalt patológias elváltozások: a) a légcsőben túlzott nyálkahártya-lerakódással járó vérzéses tracheitis (nyíl). b) a légzsákban megfigyelhető sárgás, savós-fibrines izzadmánnyal járó légzsákgyulladás (nyíl). c) a tüdőben pangásos bővérűség (nyíl). Az ábra forrása: (Nordin et al., 2021)

#### 6.4.2 A szaporítószerveket érintő fertőzés

A koronavírusok a virémia során jutnak a petevezetőbe, ahol a nyálkahártya csillós hámsejtjeiben replikálódnak. A multiplikálódás során a hámsejtek pusztulása miatt funkciócsökkenés és megváltozott funkció okozta elváltozások jelentkeznek. Ez főként „áltojás-szindrómát” és csökkent tojástermelést okoz, melyet a tojáshéj deformitásai és a tojás minőségének romlása kísér (Broadfoot et al., 1954; Duff et al., 1971; Jones és Jordan, 1972).

Az IBV a reproduktív szervrendszer számos részén okozhat elváltozásokat. Célsejtjei a nyálkahártya felső rétegeinek csillós sejtjei, valamint az infundibulumban és magnumban található tubulus mirigyek szekréción hámsejtjei. A vírus a tojócsőben a csillós hám károsodását, a propria gyulladással beszűrődését és a nyálkahártya mirigyek hipopláziáját, rendellenes fejlődését idézi elő (Crinion és Hofstad, 1972)

Az IBV fertőzésre fogékony, fiatal korú jércék esetében a légzőszervi megbetegedés mellett a petevezeték csillós hámsejtjeinek egyidejű fertőződése alakul ki (Crinion és Hofstad, 1972). Napos és 1-2 hetes korú állományok fertőződése a fejlődő tojócső nyálkahártyájának maradandó károsodását idézi elő az érintett egyedek egy részénél. Ebben az esetben a petevezeték hámja elhal, ami visszafordíthatatlan, és a tyúkok soha nem érik el teljes genetikai

potenciáljukat tojóként (Broadfoot et al., 1956; Crinion és Hofstad, 1972; Sevoian és Levine, 1957).

A növendékkorú egyedek nemi szerveiben hasonló elváltozások mutatkoznak, de az elváltozások száma és mértéke kisebb és enyhébb (Dobos-Kovács, 2014). A tojókorba kerülő, de tojásrakásra képtelen egyedek többsége klinikai tüneteket nem mutat. Ritkán előfordulhatnak kitelt, lógó hasú tojók az állományban. A szülőpár állományok vakcinázásának általánossá válásával, mely a fiatal egyedekben megfelelő szintű maternális ellenanyagot biztosít a virémia kialakulása ellen, a kórkép háttérbe szorult (Davelaar és Kouwenhoven, 1977).

Tojókorú állományok fertőződése esetén jellemző tünet az akár 70%-ot is elérő súlyos tojáshozam kiesés, a tojáshéj minőségének romlása. A kóros héjképződés tojásdeformitást okoz, amely a héj vastagságának és pigmentációjának csökkenésében és durva felszínében nyilvánul meg (Sevoian és Levine, 1957; Muneer et al., 1986; Samiullah et al., 2016; Sjaak de Wit et al., 2020) (**6. ábra**). A tojásfehérje híg, benne fibrincomók, vércsíkok láthatóak, a tojás rétegeinek határa elmosódik (Dobos-Kovács, 2014; Jackwood és de Wit, 2013). Kísérletes fertőzések során a lerakott tojások tömege is csökkent a nem fertőzött kontroll csoporthoz képest (Chousalkar és Roberts, 2007). A tojástermelés a fertőzést követő 2-3 hét múlva az elvárhatóhoz képest többnyire alacsonyabb szintre képes csak visszaállni. Kísérletes körülmények között a legtöbb IBV-vel fertőzött tojótyúk tojástermelése visszaesett, és körülbelül 70%-uk nem kezdett el tojást rakni 5 héttel a fertőzést követően sem (Sevoian és Levine, 1957). Az „áltojó szindróma” néven ismert kórkép esetén az érintett állatok az inaktív vagy alig működő petefészek miatt nem termelnek tojást, de folyamatosan ovulálnak, a tojássárgáját a hasüregbe engedve és ezzel következményes hashártyagyulladást okozva.



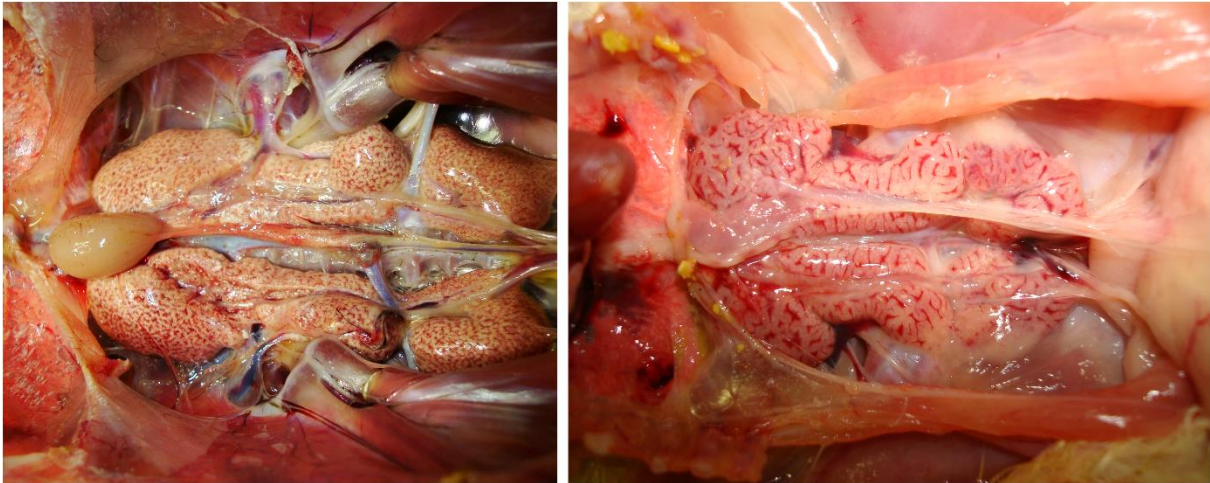
**6. ábra** A fertőző bronchitis által okozott petevezető gyulladás miatt a betegségen a tojásrakási időszakban átesett tojótyúkok által termelt gyűrt héjú tojás. (Dr. Thuma Ákos felvétele)

Kórbonctani vizsgálat során általában ép, funkcionáló petefészek mellett, eltérő mértékben fejlődött, sokszor cisztaszerűen kitágult szakaszokat tartalmazó tojócsövet láthatunk. Az érintett tyúkokra jellemző a petevezető súlyos, krónikus tágulata, amely szegmentális szűkületként és a petevezeték mentén elhelyezkedő cisztás területekben jelenik meg (Hoerr, 2021). A reproduktív traktusban megfigyelhető főbb makroszkópos elváltozások a fejletlen, zsugorodott és sötétvörös vagy barna elszíneződéseket mutató tüszők (Sevoian és Levine, 1957). A kórszövettani változások magukban foglalják a hámsejtek csillóvesztését és a szekréciós hámsejtek hipopláziáját (Chousalkar és Roberts, 2007). A fiatalokban fertőződött és később elhullott állatokban erőteljesen kitágult, vékony falú, savós folyadékkal telt tojócsövet figyelhetünk meg (Crinion és Hofstad, 1972).

Az IBV herére és mellékherére gyakorolt esetleges károsító hatása az elmúlt években vetődött fel (Gallardo et al., 2011). Többek között heregyulladást, a mellékherében fokozott kőképződést és következményes növekvő terméketlenséget figyeltek meg élő attenuált vakcinák használata ellenére vad vírussal való fertőzést követően is (Boltz et al., 2004; Villarreal et al., 2007). Boncoláskor esetenként vöröses elszíneződéssel járó heresorvadás tapasztalható (Gallardo et al., 2022).

#### **6.4.3 A kiválasztó- szervrendszert érintő fertőzés (nephropatogén törzsek)**

Az első vesekárosító hatással rendelkező IBV törzsekről az 1950-es évek végén számoltak be (Cosgrove, 1962; Winterfield és Hitchner, 1962). Az IBV magasabb patogenitással rendelkező törzsei vesegyulladást okoznak és lényegesen magasabb mortalitással járnak, mint a légzőszervrendszert vagy szaporító-szervrendszert fertőző törzsek. A nephropatogén törzsekkel történő fertőzés három lehetséges útvonalon történhet. Akut fertőzés során a vírus a légszövetben található makrofágokat és a vérben keringő monocitákat fertőzi, a kezdeti vírusreplikáció tehát a légutakban zajlik, majd a virionok a virémia során jutnak el a vese tubulushámsejtjeihez (Jackwood és de Wit, 2013). A vesében történő fertőzés kialakításában a kloakán át történő fertőződés jóval hatékonyabb a légúti útvonalnál, még egy nem nephropatogén IBV törzs esetében is (Uenaka et al., 1998). A petevezeték IBV-vel való kísérletes fertőzése veseelváltozások kialakulásához vezethet (Jones, 1974). A kloáka és a petevezeték felszálló utat biztosíthatnak az IBV fertőzés számára a vese irányába a kloáka középső kamrájában, az urodeumban lévő húgyvezeték- és a petevezetéknyílásokon keresztül (Uenaka et al., 1998). A vírusreplikáció a tubulus hámsejtek citoplazmájában zajlik, melynek következtében a hámsejt degeneráció, a szövetközi gyulladás és a heveny veseelégtelenség az állat elhullását okozza (Jones, 1974) (**7. ábra**). Tojóokban a fertőzés húgykőképződéshez és egyidejűleg hashártyagyulladás kialakulásához vezethet (Butcher et al., 1989).



**7.ábra** A nephropatogén QX-szerű IBV törzs kártétele a vesében.  
 IBV fertőzés következtében kialakult súlyos húgysavlerakódás. A vesék duzzadtak, az eltérő színű  
 vesecsatornácskák miatt a tubuláris rajzolat jól elkülöníthető az interstitiumtól. (Dr. Thuma Ákos felvétele)

Kóronctani vizsgálatok során jellemző elváltozások a vizelet pangás, duzzadt, halvány vesék, a húgysavval kitöltött tubulusok és elvezető húgyutak, valamint a generalizált köszvény (Dobos-Kovács, 2014). Krónikus aktív gyulladás esetén a perzisztens fertőzés sokáig kimutatható a vesékből. A korábban leírt légúti elváltozások mellett a nephropatogén IBV törzsekkel történő fertőzést a vesék szimmetrikus megnagyobbodása jellemzi. A vesék diffúz, a halványvöröstől halványszürkéig terjedő elszíneződése a jól láthatóan kidomborodó tubulusokkal finom márványozott mintázatot eredményez. A zsigeri köszvény gyakori végstádiumú szövödmény (Butcher et al., 1989; Ziegler et al., 2002).

#### **6.4.4 A gyomor- és bélrendszert érintő fertőzés (mirigyesgyomor-gyulladást okozó törzsek)**

Az enterális tüneteket okozó IBV fertőzésről a vesegyulladást okozó IBV törzsekkel egyidejűleg számoltak be (Winterfield és Hitchner, 1962). Azóta bebizonyosodott, hogy az IBV az egész emésztőrendszer területén képes a hámsejteket megfertőzni, melyet elhúzódó vírusürítés kísér (Chacón et al., 2014). Az IBV enterotróp tulajdonságáért feltételezhetően az S2 fehérjealegység szövetspecifikus proteáz aktivitása felelős, mely elősegíti a vírus bejutását a bélhámsejtekbe, és kompenzálja az S1 fehérje gyenge rögzítő képességét (Saiada et al., 2020).

A mirigyesgyomor-gyulladásban szenvedő madarak tollazata felborzolt, és légúti tünetek jelentkeznek, beleértve a légső szörtyögést, a köhögést, a tüsszögést és az orrfolyást. Ezen felül jellemző a hasmenéssel, bélhuruttal és más gyomor-bélrendszeri tünetekkel járó fehér vagy sárgás-krémes bélsár (YuDong et al., 1998; Benyeda et al., 2010).

Boncoláskor a proventriculus (mirigygyomor) megnagyobbodott és duzzadt, nyálkahártyája megvastagodott, összenyomásokor fehér mirigyváladék ürül. A betegség későbbi szakaszában a proventriculus papilláiban fekélyek és vérzések láthatóak (Cheng et al., 2018). Az emésztőrendszer más részein is észlelhetők elváltozások, beleértve a nyombélfal elvékonyodását és a vakbél nyirokcsomók vérzéseit (Yu et al., 2001).

## 6.5 Az *Avian coronavirus* genetikai jellemzői

Az IBV gyors evolúciójában több tényező is szerepet játszik, többek között a virális replikáció pontatlansága miatt keletkező mutációk, a vakcina és a vad törzsek közötti rekombináció, illetve a vakcinázással csak részleges védettséget szerző madarak következtében kialakult szelekciós nyomás (Kusters et al., 1990; Hanada et al., 2004). Új variáns törzsek megjelenése vakcinázott állományokban is bizonyított (Yu et al., 2001; Zhou et al., 2017).

Valastro és mtsai. 2016-ban új, az S1 fehérjét kódoló genomi régió szekvenciájának elemzésén alapuló klasszifikációs rendszert javasoltak, amit a tudományos közösség hamar befogadott (Valastro et al., 2016) (**2. táblázat** a 29. oldalon). Az S1 a legvariábilisabb genomi régió, jelentőségénél fogva pedig az IBV genom leggyakrabban szekvenált szakasza. Valastroék összesen 1286 IBV törzs csaknem teljes S1 nukleotid szekvenciája (1456 nt) alapján hat genotípust és 32 leszármazási vonalat (lineage) határoztak meg, melyből 27 leszármazási vonal a GI genotípusba tartozik (GI-1 - GI-27). Az IBV-re jellemző magas mutációs rátának és a rekombinációs hajlamnak köszönhetően az S1-re nehezedő szelekciós nyomás folyamatosan új variánsok létrejöttét eredményezi.

Jelenleg a genetikai sodródással kialakult egyedi variánsokat, illetve az eltérő genetikai vonalakba sorolt törzsek rekombinációjával létrejött szekvenciavariánsokat ez a rendszer nem képes kezelni. Ennek ellenére az S1 alapú genetikai besorolás már ma is nyolc genotípust (GI-GVIII) és összesen 38 leszármazási vonalat ismer. Többek között a GI-28 és GI-29 vonalakat és a GVII genotípust a közelmúltban Kínában, a GI-30 vonalat Trinidad és Tobago területén, a GVIII genotípust Lengyelországban írták le, a GII-2 vonalat pedig nemrégiben Hollandiában azonosították (Brown Jordan et al., 2020; Chen et al., 2017; Domanska-Blicharz et al., 2020b; Jiang et al., 2017; Ma et al., 2019; Molenaar et al., 2020).

**2. táblázat.** Az *Avian coronavirus* egyes genotípusainak megfelelő, korábban használatos szerotípus elnevezések és az egyes genotípusok földrajzi elterjedése

| IBV törzsek elnevezése |                                    | Előfordulás            |
|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Genotípus              | Korábbi nevezéktan/típus           |                        |
| GI-1                   | H120, H52, Mass, M41, Ma5          | globális               |
| GI-2                   | Holte                              | Ázsia és Észak-Amerika |
| GI-3                   | JMK, Gray                          | Ázsia és Észak-Amerika |
| GI-4                   | Holte                              | Ázsia és Észak-Amerika |
| GI-5                   | N1/62                              | Ausztrália és Óceánia  |
| GI-6                   | Vic-S                              | Ausztrália és Óceánia  |
| GI-7                   | TWI, TWII                          | Ázsia                  |
| GI-8                   | SE-17                              | Észak-Amerika          |
| GI-9                   | Arkansas (Ark)                     | Észak-Amerika          |
| GI-10                  | A, B, C, D                         | Ausztrália és Óceánia  |
| GI-11                  | BR-I, SAI                          | Közép- és Dél-Amerika  |
| GI-12                  | D207, D274, UK/6/82                | Európa és Afrika       |
| GI-13                  | 793B, 4/91, CR88, Israel variant 1 | globális               |
| GI-14                  | B1648                              | Európa és Afrika       |
| GI-15                  | K-I                                | Ázsia                  |
| GI-16                  | J2, Q1                             | globális               |
| GI-17                  | CAV (California variants)          | Észak-Amerika          |
| GI-18                  | JP-1, LDT3                         | Ázsia                  |
| GI-19                  | QX                                 | globális               |
| GI-20                  | Qu_mv                              | Észak-Amerika          |
| GI-21                  | Italy02                            | Európa                 |
| GI-22                  | HN08, SAIBK                        | Ázsia                  |
| GI-23                  | Variant 2                          | Közép-Kelet            |
| GI-24                  | V13                                | Ázsia                  |
| GI-25                  | GA07                               | Észak-Amerika          |
| GI-26                  | IBADAN                             | Afrika                 |
| GI-27                  | GA08                               | Észak-Amerika          |
| GI-28                  | LDT3                               | Ázsia                  |
| GI-29                  | --                                 | Ázsia                  |
| GI-30                  | --                                 | Közép- és Dél-Amerika  |
| GII-1                  | D1466, D212, V1397                 | Európa                 |
| GII-2                  | D181                               | Európa                 |
| GIII-1                 | N1/8, N1/88                        | Ausztrália és Óceánia  |
| GIII-2                 | Q3/88                              | Ausztrália és Óceánia  |
| GIII-3                 | N18/91                             | Ausztrália és Óceánia  |
| GIV-1                  | DE072, GA98                        | Észak-Amerika          |
| GV-1                   | N4/02                              | Ausztrália és Óceánia  |
| GVI-1                  | TCO7-2                             | Ázsia                  |
| GVII-1                 | --                                 | Ázsia                  |
| GVIII-1                | IB 80                              | Európa                 |



Az IBV által okozott megbetegedések megelőzésére alkalmazott tömeges vakcinázás az újabb és újabb variánsok megjelenésének motorja, ezért a variánsok globális előfordulásának molekuláris genetikai módszerekkel történő nyomon követése fontos feladat (Jordan, 2017). A szerteágazó nemzetközi hús- és élőállat-kereskedelmi kapcsolatok miatt nemcsak a hazai, hanem a környező országokban, sőt a távolabbi régiókban cirkuláló IBV törzsek folyamatos monitorozása is szükséges. Ezt támasztja alá például a Kínából származó GI-19 (QX-szerű) és a közel-keleti eredetű GI-23 vonalba tartozó IBV törzsek gyors és széleskörű európai elterjedése is (Franzo et al., 2017a; Domanska-Blicharz et al., 2020a; Houta et al., 2021). Járványvédelmi szempontból az enzootikus törzsek folyamatos monitorozása és azok genomszintű vizsgálata is elengedhetetlen. Az elérhető teljes S1 és teljes genom szekvenciák korlátozott száma hátráltatja az egyes törzsek pontos összehasonlítását és az újonnan felbukkanó genotípusok felderítését. Ugyanakkor a részleges S1 szekvenciák használata az egyes törzsek leszármazási kapcsolatának vizsgálatára lényegesen befolyásolhatja és torzíthatja a filogenetikai elemzések eredményeit.

## **6.6 A koronavírussok és az *Avian coronavirus* evolúciója**

A koronavírussok evolúciójának fő hajtóereje a magas mutációs ráta mellett a rekombináció (De Wit et al., 2011; Jackwood, 2012; Lin és Chen, 2017). A koronavírussok gyors evolúciója nehezítheti járványtani sajátásaik pontos megismerését és megértését, befolyásolhatja a diagnosztikai vizsgálatok érzékenységét, korlátozhatja a vakcinák hatékonyságát, és kedvezhet az immunválasz-elkerülési eseményeknek, így jelentősen megnehezítve az amúgy jól ismert kórokozó elleni védekezést is (Jackwood, 2012).

Az RNS-vírussok replikációjára rendkívül magas hibaarány jellemző (körülbelül  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  hibás beépülés nukleotid pozícióként), mivel hiányzik az RdRp hibajavító aktivitása és az RNS-javító mechanizmusok (Duffy, 2018; Sniegowski et al., 2000). A körülbelül 26-37 kb hosszúságú genommal rendelkező koronavírussok, köztük az IBV, kivételnek tekinthetők az RNS víruscsoporton belül, mivel nagy replikáz génjük egy exonukleáz domént (ExoN) tartalmaz az nsp14 fehérjében, amely javító mechanizmusokban vesz részt. Mindazonáltal az IBV becsült szubsztitúciós rátája ( $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  szubsztitúció/pozíció/év) még mindig figyelemre méltó, és jelentős evolúciós potenciált biztosít (Franzo et al., 2017a). Ezt tükrözi a világszerte megjelenő variánsok változatossága (De Wit et al., 2011; Jackwood, 2012).

A javítómechanizmusok hiánya miatt jellemző magas mutációs rátájuknak köszönhetően az RNS-vírussok egymással rokon vírusrészekké genetikailag diverz populációját alkotják ugyanazon gazdán belül (Lai és Cavanagh, 1997). A genetikai változatosság, mint a genotípusok aránya (genetikai variáció), valamint egyes genotípusok gyakorisága a populációban, a vírusgenom replikációja során a mutációk, szubsztitúciók, deléciók, inszerciók és rekombinációs események által jön létre. A kvázispecies számos

különböző genotípusba tartozó vírus egy fertőzött sejten és gazdán belüli együttes előfordulását jelenti, melyek potenciálisan különböző mértékben alkalmazkodnak a gazdaszervezethez. A vírus kvázispecies egyik fő jelentősége, hogy alkalmazkodóképességet biztosít a vírus számára, hiszen a víruspopulációban jó eséllyel találhatóak olyan variánsok, amelyek a változó környezeti feltételeknek jobban megfelelnek (Domingo et al., 1985; Kiss et al., 2010).

A koronavírusok genomjára jellemző magas mutációs ráta (azaz szubsztitúciók, deléciók és inszerciók előfordulása) összefüggésbe hozható az nsp14 fehérje alacsony hatékonyságú hibajavító (proofreading) aktivitásával (Ma et al., 2015). Bár ez a mechanizmus elengedhetetlen a genetikai sokféleség növeléséhez és a szelektív nyomáshoz való alkalmazkodáshoz, feltételezhető, hogy a legtöbb mutáció, amely természetesen fordul elő, nem feltétlenül eredményezi a vírus fitnessének növekedését (Toro et al., 2012).

A koronavírusok genomjában megfigyelhető magas mutációs és rekombinációs ráták a vírus diverzitásáért felelős kulcsfontosságú evolúciós mechanizmusok (Hewson et al., 2011; Marandino et al., 2017). A mutációk elsősorban az IBV S fehérje kódoló régiójában halmozódnak, amelyek közül néhány akár csökkentheti is a virulenciát, és a legtöbb adaptív marker-mutáció az S1 alegységben fordul elő (Cavanagh et al., 1988). Ugyanakkor az S2 alegység mutációi megváltoztathatják a vírusrészecskék membránfúziós képességét, ami a madár gazdafajok mellett emlősök potenciális fertőzéséhez vezethet (Fang et al., 2005).

A mutációk által fenntartott kvázispecies jelleg mellett a koronavírusok genetikai változatosságának másik fontos forrása a rekombináció lehetősége az adott gazdasejtet egyszerre fertőző különböző vírustörzsek között. A rekombinációra való hajlamot a koronavírusok replikációjának sajátosságai (szubgenomiális mRNS-képzés, RdRp templát-váltó mechanizmusa) nagyban elősegítik. A szülői vírus RNS-ek homológ régiókban történő templát-váltás során az RdRp az egyik RNS-molekuláról (a donor templát) a másikra (az akceptor templátra) vált át a szintézis közben, mialatt a keletkező nukleinsavlánchoz kötődik, és kiméra RNS-molekulát hoz létre (Lai, 1992; Simon-Loriere és Holmes, 2011).

A koronavírusok genetikai sokfélesége a magas mutációs ráta és a rekombináció által vezérelt adaptív evolúció eredménye (Holmes, 2009), míg a magas mutációs ráta az RdRp minimális javító mechanizmusának, a rekombináció az RNS-replikáció során fellépő templát-váltó mechanizmusnak köszönhető (Lai, 1992; Legnardi et al., 2020; Simon-Loriere és Holmes, 2011). A fitness növelésének valószínűleg a rekombináció a leghatásosabb módja. Ellentétben a véletlenül fellépő mutációkkal, melyek lehetnek előnyösek, semlegesek vagy károsak is, a vírus rekombinációja az adott környezetben már sikeresnek bizonyult fenotípusokat expresszáló szekvenciák közötti átadást eredményezi (Worobey és Holmes, 1999). A rekombináció gyakran fordul elő szimultán fertőzéskor, számos esetben megfigyelték vadvírus izolátumoknál éppúgy, mint kísérletes körülmények között.

A rekombináció által egyik leggyakrabban érintett genom szakasz a tüskefehérjét kódoló gén S1 alegysége (Jia et al., 1995; Mo et al., 2013; Ovchinnikova et al., 2011). A vírus felszínén elhelyezkedő tüskefehérje a gazdasejt receptorokhoz való kötődésében, a membránfúzióban és a gazdasejtbe való bejutásban játszik szerepet, emellett konformációfüggő epitópjai a vírusneutralizáló antitestek indukálásáért felelősek (Moore et al., 1997). A rekombináció jelentős kihívást jelent az IBV klasszifikációja során is. A jelenleg alkalmazott osztályozás az S1 gén szekvenciáján alapul (Valastro et al., 2016). Azonban kevés ismerettel rendelkezünk az IBV genom fennmaradó régióit érintő rekombinációs eseményekről. Ezért előfordulhat, hogy az S1 alapú osztályozás gyengén reprezentálja az IBV tényleges evolúciós történetét, ami rekombinációra irányuló elemzés elvégzése nélkül a rekombináns törzsek új genotípusokként való téves besorolásának kockázatához vezet (Rohaim et al., 2020).

A tüskefehérje mellett az ORF1ab kódoló régiói is, különösen az nsp2, nsp3 és nsp16, számos mutációs és rekombinációs forrópontot tartalmaznak (Thor et al., 2011). A mutációkhoz hasonlóan a rekombinációs események is járhatnak a virulencia csökkenésével (Huang et al., 2020).

A coronavirusok közötti rekombináció fontos szerepet játszik a vírusok evolúciójában és akár közvetlenül is vezethet új coronavirus fajok és hozzájuk kapcsolódó betegségek megjelenéséhez (Jackwood et al., 2010). A rekombináció csökkenti a mutációs terhet, genetikai variációt teremt és új törzsek megjelenését eredményezheti (Worobey és Holmes, 1999).

Az *Avian coronavirus* törzsek közötti rekombinációt igazoló eredmények az 1990-es évek kezdete óta gyűlnek (Kusters et al., 1990; Wang et al., 1993; Jia et al., 1995; Cavanagh et al., 1992). Az IBV törzsek közötti rekombinációt telepi és kísérletes körülmények között is számos alkalommal megfigyelték (Estevez et al., 2003; Jia et al., 1995; Kusters et al., 1990; Lee és Jackwood, 2001, 2000; Mardani et al., 2010). Számos tanulmány számolt be vakcina és vad típusú IBV törzseket érintő, valamint az egyes vakcina törzsek között különösen magas gyakorisággal előforduló rekombinációs eseményekről (Lee és Jackwood, 2000; Mardani et al., 2010). Így tehát arra lehet következtetni, hogy az élő attenuált vakcinák kiterjedt használata meghatározó szerepet játszik a virális evolúcióban (Jackwood és Lee, 2017).

Számos, légúti tünetekkel járó járványos megbetegedés esetén igazolták, hogy a háttérben a világszerte használt H-120 vakcina (Mass-típusú) és vad IBV törzsek rekombinánsai állnak. Az újonnan felbukkanó IBV törzsek közül jó néhány származik vakcinavírusok és más vírusok közötti rekombinációs események eredményéből (Liu et al., 2014; Marandino et al., 2022; Quinteros et al., 2016). Beszámoltak például az LDT3-A attenuált vakcinatörzs és vad típusú QX vírusok közötti, valamint a 4/91 vakcina és a GI-19 vonalba tartozó vírusok közötti rekombinációról is (Xu et al., 2018; Lian et al., 2021). További

példa az adott régióban idegen, attenuált IBV vakcinák bekerülése által okozott károkra a Közel-Keleten bevezetett D274 és a 793B szerotípusokhoz tartozó vakcinatörzsekhez (4/91) kötődik. Ma már a régióban észlelt légúti megbetegedések során leggyakrabban ezek a vírustörzsek mutathatók ki és számos esetben számoltak be más törzsekkel való rekombinálódásukról (Ganapathy et al., 2015; Hosseini et al., 2015; Rohaim et al., 2020).

Megfigyelték, hogy vakcinázás mellett a tüskefehérjéj kódoló gén hipervariábilis régiójának 1,5-2%/év a mutációs rátája, míg vakcinák alkalmazása nélkül mindössze 0,3%/év (McKinley et al., 2008). Továbbá azt tapasztalták, hogy a vakcinában eredetileg kimutatható variánsok közül némelyek kiszelektálódnak az oltott állatokban és akár új, addig jelen nem lévő mutációk is megjelennek, amelyek idővel rögzülnek vagy eltűnnek. Addig is genetikai alapot kölcsönöznek az immunválasz elkerüléséhez, a sejtropizmus megváltozásához és újabb variánsok kialakulásához (Kiss et al., 2010).

A legtöbb tanulmány alapvetően az S fehérje vizsgálatán (vagy annak egy részén) alapul, amely az IBV genom alig több mint 10%-át reprezentálja, míg az IBV virulenciáját, patogenezisét és sejtropizmusát nyilvánvalóan nem csupán egy gén határozza meg (Züst et al., 2007; Laconi et al., 2018). Ezen felül a jelenleg rendelkezésre álló tanulmányok többsége Sanger-szekvenálás során kapott szekvenciákon alapul, ami csak a főbb alpopulációk vizsgálatát teszi lehetővé és nem veszi figyelembe az IBV kvázispecies természetét. Az újgenerációs szekvenálási (NGS) technológiák szélesebb körű alkalmazásával lehetőség nyílik ennek vizsgálatára is, amely a jövőben további részletek feltárását teszi majd lehetővé a vírus evolúciójával kapcsolatban.

## **6.7 A fertőző bronchitis elleni védekezés**

A fertőző bronchitis elleni folyamatos és extenzív védekezés ellenére egy 2016-ban végzett nemzetközi felmérés alapján az IB a baromfitermelést világszerte érintő legjelentősebb betegség (Zavala, 2016). A fertőzés terjedésének mérsékléséhez megfelelő járványügyi intézkedésekre van szükség, mint például a bélsár telephelyről történő rendszeres elszállítása, szigorú takarítás és fertőtlenítés, illetve csak az azonos korú és fejlettségű madarak együtt tartása (de Wit és Cook, 2019). Az intenzív baromfi telepek járványtani eszközökkel történő mentesen tartása azonban lehetetlen feladatnak tűnik, a vírus környezeti tényezőkkel szembeni jó ellenállóképessége miatt a védekezés a megfelelő biztonsági intézkedések mellett a rutinszerű vakcinázásra épül (De Wit et al., 2011). A veszteségek csökkentése és a megfelelő védelem kialakítása az állományok aktív immunizálásával valósítható meg, mely tipikusan élő attenuált vagy inaktivált vakcinákkal és gyakran ezek kombinációjával történik (Cavanagh és Naqi, 2003; Cavanagh, 2007).

Ezt a védekezési stratégiát nehezíti azonban a vírus nagyfokú genetikai változékonysága és a különböző variánsok egyidejű cirkulációja egy adott földrajzi régión

belül. A magas mutációs és rekombinációs rátának köszönhetően folyamatosan új, általánosan gyenge keresztvédelemmel rendelkező variánsok jelennek meg, ezért csupán egyetlen szerotípust tartalmazó vakcina alkalmazása nem nyújt megbízható védelmet (Bande et al., 2015; de Wit et al., 2016). Egy konkrét variáns elleni védelem elérhető akár az adott vírusnak megfelelő (homológ) törzssel végzett egyszeri vakcinázással vagy több különböző, az adott variánstól eltérő törzseket tartalmazó (heterológ) vakcinákkal. A keresztvédelem ily módon történő szélesítése az úgynevezett „protektotípus” elven alapul, azaz, hogy a különböző szerotípusú vakcinák kombinációja jó keresztvédelmet biztosít más variánsok ellen (Cook et al., 1999; Jordan, 2017; Karimi et al., 2019, 2018). A szerotípus specificitástól független keresztvédelem a megfelelő törzsek vakcinaként történő alkalmazásával érhető el. Például a Massachusetts és 793/B heterológ szerotípusú törzseket tartalmazó IBV vakcinák kombinációjával hatékony védelem érhető el a QX-szerű és az Israeli 2-es típusú variáns vad vírustörzsekkel szemben is (Habibi et al., 2017; Terregino et al., 2008). Kísérletes körülmények között a H120, a D274 és a QX-szerű vakcinák kombinációja széleskörű védelmet biztosít különböző, nem rokon virulens IBV törzsek, például a 793B ellen (Bru et al., 2017).

Azonban a keresztvédelem spektrumának szélesítése érdekében sem javasolt túl sok törzs vakcinaként történő egyidejű alkalmazása, hiszen ez növeli a törzsek közötti rekombináció esélyét (Song et al., 1998). A megfelelő vakcina kombinációk kiválasztása során figyelembe kell venni a telepen specifikusan előforduló vad vírustörzseket és elengedhetetlen az aktuális járványtani helyzet felmérése és a régióban cirkuláló variánsok ismerete (Jordan, 2017; Toro, 2021).

A vakcinázási stratégia eltér a különböző felhasználású baromfiállományokban. A növendék és brojler állományokban általában élő attenuált, míg tojó és tenyészállományokban attenuált és inaktivált vakcinák kombinációját alkalmazzák (Jackwood, 2012).

Az embrionált tyúktojásban passzált élő, attenuált vírust tartalmazó vakcinákat már az 1950-es évektől kezdve használják az IBV elleni immunizálásra. Később megjelentek az inaktivált vakcinák, melyeket elsősorban az élő vírust tartalmazó oltóanyagok által kiváltott immunválasz fokozása (booster-hatás) érdekében alkalmaznak, mivel az inaktivált vakcinák önmagukban nem nyújtanak megfelelő védelmet (Cavanagh, 2003). A gyakorlatban a brojler és tojóállományok immunizálása napos korban történik élő, attenuált vírust tartalmazó vakcinákkal. A keltetőházi vakcinázás egységesíthető, szélesebb átoltottsági arány érhető el, ily módon csökkenthetők a költségek (Franzo et al., 2016). A tojó- és tenyészállományok esetében a vakcinás védelem fenntartása és meghosszabbítása érdekében többszöri, élő attenuált, majd később inaktivált vírussal való vakcinázást alkalmaznak, így a termelt ellenanyagok a maternális immunitás (szikimmunitás) révén egy rövid ideig védelmet nyújtanak a következő generáció számára is. Mivel az egyes szerotípusok közötti keresztvédelem elenyésző, a megfelelő immunitás elérésének érdekében gyakori az oltás 2-

3 hét elteltével történő ismétlése (azonos, vagy másik szerotípussal), és az egyidejűleg több antigén variánst tartalmazó vakcina alkalmazása. Az úgynevezett multivalens vakcinák két, vagy több antigén típust tartalmaznak és így szélesebb körű védelmet biztosítanak. Mivel folyamatosan jelennek meg új törzsek, ezért a minél gyorsabb reagálás érdekében a már meglévő vakcinák kombinációját gyakran tesztelik az esetleges keresztvédelem reményében (Smialek et al., 2017).

Annak ellenére, hogy a vakcinázás a betegség elleni védekezéshez nélkülözhetetlen és szükségessége megkérdőjelezhetetlen, a vakcinák széleskörű, nem megfelelően átgondolt alkalmazása számos hátránnyal járhat (Jordan, 2017).

Az IBV elleni oltás beadásának legoptimálisabb módja az *oculonasalis* út, ez azonban nem praktikus nagyszámú madár vakcinázásakor (Jackwood és de Wit, 2013). Emiatt a nagyüzemi állattartó telepeken az élő attenuált vakcinákat jellemzően ivóvízzel, permettel vagy aeroszollal juttatják be napos vagy egy hetes korban (Gough és Alexander, 1979; Matthijs et al., 2005). Az oltóanyag tömeges vakcinázás során történő nem egyenletes kijuttatása, más vakcinákkal történő egyidejű alkalmazása és heterológ IBV törzset tartalmazó oltóanyag használata mind negatívan befolyásolja az immunizálás sikerességét (de Wit és Cook, 2019). Napjainkban elterjedt az egy dózisban adott több variánst tartalmazó (multivalens) vakcinák alkalmazása, azonban a különböző időpontokban beadott két vagy több vakcina hagyományosan hatásosabbnak tekinthető a booster-hatás és a légzőhám epithéliának oltások közötti regenerálódása miatt (Cook et al., 1999; De Wit et al., 2010; Jordan, 2017).

A vakcinázási programok hatása nem elhanyagolható a cirkuláló vad, élő vakcina és vakcina eredetű törzsek szempontjából sem. A élő attenuált vakcina törzsek átterjedhetnek más, nem vakcinázott állományokra, és a cirkuláló vad vírusokkal rekombinálódva új, virulens variánsok alakulhatnak ki (Matthijs et al., 2008; Jackwood és Lee, 2017; Moreno et al., 2017). Ezen felül a vakcinák használata feltehetően növeli az IBV mutációs rátáját a vad törzsekre nehezedő immunológiai nyomás miatt (Jackwood et al., 2012). Szintén a vakcina és vad törzsek közötti kölcsönhatásokat jelzi, hogy beszámoltak néhány genetikai vonal eltűnéséről miután felhagytak a homológ vakcinák alkalmazásával (Franzo et al., 2014, 2016). Annak érdekében, hogy megfelelő képet kapjunk az egyes területekre jellemző IBV törzsekről, átlátható vakcinázási programokra van szükség, a vakcinázási stratégiát pedig folyton újra kell értékelni a járványtani felmérések eredményeinek függvényében (Jordan, 2017).

Annak ellenére, hogy a fentiek alapján az attenuált IBV vakcinák helyettesítése elengedhetetlen, innovatív IBV vakcina alternatívák nem kerültek piacra az elmúlt évtizedekben. Az IBV elleni hatékony védekezésre a nagyüzemi állattartásban is alkalmazható alternatív technológiák megtalálása jelentős kihívást jelent (Jordan, 2017).

### **6.7.1 Élő attenuált vakcinák**

Elsőként Brandt és mtsai. számoltak be 1952-ben arról a felfedezésről, hogy az IBV virulenciája csökkenthető embrionált tojásokon történő passzálással, az immunogenitás fennmaradása mellett (Brandt et al., 1952). Ezt követően fejlesztették ki a napjainkban is világszerte használatos Massachusetts (Mass) típusú vakcinákat (Ma5, H-52 és H120) (Bijlenga et al., 2004; Jackwood, 2012). Jungherr és mtsai. 1956-ban igazolták az egyes vírusizolátumok közötti antigenitásbeli különbségeket (Jungherr et al., 1956). Az 1960-as és 1980-as évek között világszerte számos tanulmány jelent meg, mely felhívta a figyelmet az IBV törzsek sokféleségére. A felfedezés, hogy az eltérő antigén szerkezettel rendelkező IBV törzsek a heterológ fertőzés ellen nem nyújtanak megfelelő védelmet, számos, típusspecifikus attenuált vakcinatörzs kifejlesztéséhez vezetett (Hofstad, 1958; Lukert, 1969; Cook, 1984). Európában a Mass típusú törzsek (H-52, H-120 és Ma5) a D274 és 793B (4/91) mellett a leggyakrabban használt attenuált IBV vakcinák közé tartoznak (de Wit et al., 2021). A Magyarországon alkalmazott élő attenuált törzseket tartalmazó vakcinákban a Mass szerotípusba tartozó H120 vagy Ma5 törzsek mellett az egyéb Európában gyakori törzseket (4/91, D274, 249G) tartalmazó vakcinákat használják (Benyeda et al., 2009).

Az 1950-es években az élő attenuált vakcinák kifejlesztése valószínűleg az IBV elleni hatékony védekezés legfontosabb kezdő lépése volt. Sajnos az elmúlt három évtizedben felhalmozódó adatok azt jelzik, hogy ez a stratégia jelentős mértékben hozzájárult a probléma fennállásához és súlyosbodásához (Jordan, 2017). Számos tanulmány támasztja alá, hogy a jövőben az IBV elleni hatékony kontrollhoz szükség lesz az élő attenuált vakcinák helyettesítésére alternatív technológiákkal készült oltóanyagok segítségével (Bhuiyan et al., 2021; Franzo et al., 2016; Jordan, 2017).

Az 1980-as évek óta számos tanulmány hívta fel a figyelmet az attenuált vakcinák IBV evolúciójában betöltött szerepére és a baromfiiparban való használatuk káros következményeire (Kusters et al., 1990; Wang et al., 1993; Jia et al., 1995; Lee és Jackwood, 2001; Jackwood és Lee, 2017). A jelenleg alkalmazott attenuált vakcinák csak bizonyos ideig nyújtanak hatékony védelmet, ám az új törzsek bevezetésével valójában hosszútávon súlyosbítják a problémát. Az élő attenuált vakcinák alkalmazásának komoly kockázata, hogy a bennük található vírustörzs az oltott populációkban könnyen rekombinálódhat, revertálódhat, és visszanyerheti patogenitását, ürülhet a közvetlen környezetbe és fertőzési kockázatot jelenthet a fogékony, nem vakcinázott egyedekre (Bande et al., 2015; McKinley et al., 2008; Meeusen et al., 2007). Továbbá az élő attenuált vakcinák klinikai tüneteket okozhatnak immunizált fiatal madarakban és alkalmazásuk esetén sem garantált a teljes védelem (de Wit és Cook, 2014; Wakenell et al., 1995).

Bár az élő attenuált IBV vakcinák alkalmazása a fentiek alapján számos hátránnyal jár, világszerte elterjedtek, mert: 1) erős szisztémás és nyálkahártyás B- és T-sejt-választ váltanak ki kiváló védelmet nyújtva a homológ fertőzés ellen, 2) hatékony nyálkahártya immunitást indukálnak (sterilizáló immunitás) a gazdapopuláció 90%-ában 3) embrionált tojásokban a vakcina előállításuk költséghatékony és 4) könnyen automatizálható tömeges alkalmazást tesznek lehetővé nyálkahártyán keresztül (Guzmán és Hidalgo, 2020).

### **6.7.2 Inaktivált vakcinák**

Az elölt kórokozót tartalmazó inaktivált vakcinák általában sokkal biztonságosabbak, ám kevésbé hatékonyak, mint az élő attenuált törzset tartalmazó oltóanyagok. Az inaktiválásnak köszönhetően azonban nem képesek revertálódni vagy rekombinálódni. Ezen biztonsági tényezők miatt preferálják gyakran az inaktivált vakcinák használatát. Az élő, attenuált vakcinákhoz képest alacsonyabb hatékonyságuk annak köszönhető, hogy az inaktivált vakcinák többsége nem képes a megfelelő erősségű nyálkahártya- és sejtes immunválasz kiváltására (Collisson et al., 2000; Ladman et al., 2002). Az inaktivált és az aleggység vakcinák esetében is a hatékonyabb immunválasz kiváltását különféle adjuvánsok hozzáadásával erősítik. Éppen ezért az IBV elleni védekezés során inaktivált vakcinatörzset tartalmazó oltóanyagot általában csak tojóállományok emlékeztető, ún. booster vakcinázására használják (de Wit et al., 2022). Az élő attenuált IBV vakcinákat a gazdaszervezet nyálkahártya immunitásának fontos részét képező lokális immunválasz kiváltására használják naposcsibékben majd néhány hetes korú állatok emlékeztető oltásakor (Chhabra et al., 2015; Guo et al., 2008; Okino et al., 2013). Tojóállományokban ezt követően a tojásrakás kezdete előtt 4-6 héttel minden madár inaktivált vakcinát is kap a humorális antitestszint növelésére (Bande et al., 2015; Box et al., 1980).

### **6.7.3 Rekombináns vektor-, DNS- és aleggységvakcinák**

Az IBV elleni védekezés leghatékonyabb módja a vakcinázás, mely jelenleg élő attenuált és inaktivált törzseket tartalmazó oltóanyagok alkalmazásával zajlik. Az inaktivált vakcinák azonban nem váltanak ki megfelelő erősségű nyálkahártya- és sejtes immunitást, valamint a gyártási költség és a kijuttatás módja tovább korlátozza széleskörű alkalmazhatóságukat (Bande et al., 2015; Collisson et al., 2000; Ladman et al., 2002; Meeusen et al., 2007). Ezért új, biztonságos, hatékony és megfizethető IBV elleni vakcinák kifejlesztésére van szükség. A nagyüzemi állattartó telepek számára tervezett új technológiákhoz olyan vakcinák szükségesek, amelyek lehetővé teszik az oltóanyag olcsó és hatékony tömeges kijuttatását. A DNS-vakcinák ígéretes eredményeket mutattak; azonban, *in ovo* úton alkalmazva csupán 80%-os védelmet indukáltak (Kapczynski et al., 2003).



A kísérleti S fehérje alegység vakcina jelöltek hatékony védelmet nyújtanak (Eldemery et al., 2017; Jordan, 2017; Yang et al., 2009). Ám esetükben az attenuált vakcinákhoz képest elérhető védelem kulcsfontosságú korlátja a replikáció hiánya, ezért alkalmazásuk során injektálható alapimmunizálási és booster vakcinázási stratégiára van szükség (Eldemery et al., 2017). Ez a tulajdonság leginkább tenyész- és tojóállományok számára teszi lehetővé alkalmazásukat. Mivel a megfelelő szerkezetű és mennyiségű S fehérje előállítása meglehetősen költséges, az S fehérje alapú alegységvakcinák fejlesztése komoly kihívást jelent (Balka et al., 2020). A hatékony vakcina előállítását az is nehezíti, hogy az S protein a koronavírusok legváltozékonyabb fehérjéje (Enjuanes et al., 2016).

Jelenleg úgy tűnik, hogy az IBV immundomináns fehérjéit expresszáló rekombináns vektorvakcinák jelentik a legmegfelelőbb alternatívát. Különböző replikálódó és nem replikálódó vírusvektor jelölteket fejlesztettek ki az IBV S génjének expresszáására. Például himlővírusok (Wang et al., 2009), a Marek-betegséget és a kacsapestist okozó herpeszvírusok (Li et al., 2016; Zhang et al., 2012), különböző adenovírusok (Johnson et al., 2003; Toro et al., 2014), és a paramyxovírusok mind lehetséges jelöltek (Abozeid et al., 2019; Khalid et al., 2021; Shirvani és Samal, 2020). Számos vakcinajelölt sikeresen expresszálja az IBV S génjét, azonban tömeges vakcinázásra jelenleg nem alkalmasak (Jordan, 2017). A vektorvakcinák nagy előnye, hogy regionálisan releváns IBV szerotípusok immundomináns epitópjainak kifejezésére szabhatóak (Hein et al., 2021). A humán egészségügyben a SARS-CoV-2 fertőzés megelőzésére alkalmazott mRNS technológiával készült vakcinák sikerét követően lehetséges, hogy alkalmazásuk a baromfitermelésben is elérhető lesz, amennyiben a tömeges kijuttatásuk lehetővé válik (Patel et al., 2022).

A vakcinák megfelelő alkalmazás esetén nagyon hatásosak, ám a hangsúly a helyes alkalmazáson van. A célzott vakcinázás érdekében fontos az adott régióban cirkuláló törzsek/genetikai vonalak pontos ismerete, az élő attenuált és inaktivált vakcinák megfelelő kombinációja, valamint, hogy minden madár teljes dózist kapjon. Ezen felül a jó menedzsment és tartástechnológia (hőmérséklet, szellőzés), a szigorú járványvédelem és a másodlagos fertőzések megelőzése vagy leküzdése is elengedhetetlen. Az IBV ellen nem lehet mentesíteni, de a fentiek betartásával hatékonyan lehet ellene védekezni.

## 7 Célkitűzések

Munkánk célja a fertőző bronchitist okozó *Avian coronavirus* genetikai változatosságának megismerése:

1. Újgenerációs szekvenálás segítségével nagyszámú törzs teljes genomjának meghatározása, amellyel jelentős mértékben hozzájárulhatunk a vonatkozó adatbázis bővítéséhez;
2. A kapott szekvenciaadatok elemzése, az egyes vírustörzsek genomszerveződésének, genetikai diverzitásának és filogenetikai kapcsolatainak feltérképezése és modellezése különböző bioinformatikai szoftverek segítségével. Ily módon információt gyűjthetünk az *Avian coronavirus* evolúciós mechanizmusairól;
3. Új variánsok és genetikai vonalak azonosítása és egyben a ma használatos S1 gén alapú genotipizálási rendszer kiterjesztése;
4. Továbbá, az egyes genotípusok földrajzi megoszlására vonatkozó ismeretek frissítése az újonnan generált adatok felhasználásával.

## 8 Anyagok és módszerek

### 8.1 A felhasznált vírustörzsek

A felhasznált vírustörzseket együttműködő partnereink, a CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt. és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (NÉBIH ÁDI) bocsátották rendelkezésünkre allantois folyadékban izolált formában. Ezek közül 100 db vírustörzset a CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt. osztott meg kutatócsoportunkkal egy nemzetközi törzsgyűjteményből. A fertőzött állatok változatos tüneteket mutattak, a légzőszervrendszeri tünetek mellett többek között növekedéskésébeli elmaradás/ az állomány szétnövése, borzolt tollazat, kötőhártyagyulladás, zöldes bélsár és hasmenés volt megfigyelhető. Boncoláskor bélgyulladás, vesegyulladás, májgyulladás, epehólyag-gyulladás és belső vérzések voltak megfigyelhetőek.

Hazai együttműködő partnerünktől, a NÉBIH ÁDI-tól származik két magyarországi brojler állományból izolált törzs. Az állományokban megnövekedett elhullás, az állatok boncolásakor vesegyulladás, valamint félheveny bélgyulladás volt megfigyelhető. A veséből készült homogenizátumok felülúszójából sikerült izolálni a 21776-os és 11518-as törzseket. A vizsgált fertőző bronchitis törzsek adatait az **1. melléklet** tartalmazza.

### 8.2 Minták előkészítése teljes genom szekvenálásra

#### 8.2.1 Virális nukleinsav kivonása

A mintákat a nukleinsav izolálás előtt laboratóriumi centrifuga segítségével 8 000 g fordulatszámmal 5 perc alatt üleptettük, majd a felülúszót 0,45 µm-es fecskendőszűrő (Nantong FilterBio Membrane Co., Ltd., Nantong, Kína) segítségével a bakteriális és az egyéb, sejtes törmeléktől megtisztítottuk. A virális részecskéket pedig ezáltal feldúsítottuk. A visszamaradt szennyező nukleinsav molekulák eltávolítása DNázt és RNázt tartalmazó keverékkel történt. A folyamat során 100 µl felülúszóhoz 38 µl végtérfogatban Turbo DNase puffer, Turbo DNase (Ambion/Thermo Scientific, Waltham, USA, 2 U/µL), RNase I (Thermo Scientific, Waltham, USA, 10 U/µL), Benzonase (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Németország, 25 U/µL) és nukleáz mentes víz keverékét adtuk. Ezt követően a mintákat 120 percig 37°C-on, majd 10 percig 75°C-on tartottuk. A szűrést és emésztést követően a nukleinsav izolálást az innuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Németország) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A kivont RNS-t -60°C-on tároltuk további felhasználásig.

### **8.2.2 Kétlépeses reverz transzkripció polimeráz lánreakció**

Az RNS átírását szekvencia-független reverz transzkripció (RT) reakcióban az FR26RV-N (Djikeng et al., 2008) random primerrel végeztük, melynek 3' vége random hexamerekből áll, 5' vége egy ismert szekvencia, amelyhez a következő PCR lépés során a komplementer primer (FR20RV) kapcsolódik (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN-3') (Djikeng et al., 2008). Az RT reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük, mely a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl RNS, 1 µM FR26RV-N primer (Djikeng et al., 2008), 400 µM dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) keverék (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1x AMV puffer és 10 egység (unit, U) AMV reverz transzkriptáz (Promega, Madison, USA). Első lépésben az RNS és a random oligonukleotid keverékét 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégkásán lehűtöttük. Ezt követően hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét a keverékhez, és a reakcióelegyet először 25°C-on 10 percig, majd 42°C-on 60 percig, végül 70°C-on 15 percig inkubáltuk. Az így keletkezett komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) felszorzása PCR-rel történt. A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3 µl-t a reverz transzkripció során keletkezett cDNS-ből, 1 µM FR20RV primert (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC-3') (Djikeng et al., 2008), 400 µM dNTP keveréket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz enzimet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

A kezdeti 3 perc hosszúságú, 95°C-on történő denaturációt 40 ismétlődő ciklusból (95°C 30 másodperc, 48°C 30 másodperc, 72°C 2 perc) álló amplifikáció követte, majd a folyamat utolsó lépése egy 10 perces, 72°C-on történő elongáció volt.

### **8.2.3 PCR termékek ellenőrzése és tisztítása**

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az elektroforézist 1 m/V%-os agaróz (Lonza, Bazel, Svájc) gélen végeztük, 0,5 m/V% trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav (TBE; Lonza, Bazel, Svájc) pufferben, 90 V-on, 25 percig. A DNS láthatóvá tételéhez GelRed (Biotium, Hayward, USA) festéket alkalmaztunk 0,5 V/V%-os koncentrációban, molekulatömeg markerként pedig O'Gene Ruler DNS létrát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Az elektroforézis után a gélt áteső UV fényben vizsgáltuk, az eredményeket CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Cleaver Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) rögzítettük.

A gélből a 200 és 2000 bp közötti sávban lévő termékeket kivágtuk, majd a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) segítségével tisztítottuk ki, a gyártó utasításai szerint. A tisztított DNS-fragmenseket további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

## **8.3 Újgenerációs szekvenálás**

### **8.3.1 IonTorrent szekvenálás**

Az Ion Torrent készüléken történő újgenerációs szekvenálás során 100 ng amplifikált cDNS-ből enzimes fragmentálást végeztünk a NEB-Next® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) segítségével a gyártó utasításai alapján. A fragmensekhez adaptereket kötöttünk, a könyvtárak egyedi jelöléséhez pedig az IonXpress™ Barcode adaptereket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtuk. Az egyedi adaptereket tartalmazó könyvtár DNS tisztítása a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) oszlopos módszerével történt, a tisztított mintákat 2 m/V%-os, előre gyártott géleken (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) elektroforetizáltuk. A 300 és 350 bp közötti termékeket PCR módszerrel amplifikáltuk a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs, Ipswich, USA) használatával. Az amplifikáció során a következő hőprofil alkalmaztuk: i) kezdeti, 98°C-on történő 30 mp-es denaturáció; ii) 12 amplifikációs ciklus (98°C 10 mp, 58°C 30 mp, 72°C 30 mp); iii) végső elongációs lépés, 72°C-on 5 percig. Az így keletkezett könyvtárat ismét tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan), majd Qubit® dsDNA BR Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. Az egyedi adapterekkel ellátott, 10 ng koncentrációjú DNS termékeket összekevertük, majd egymást követő emulziós PCR-ekkel klonális amplifikáció történt, IonSphere™ paramágneses gyöngyök felszínén. Az emulziós PCR-t Ion OneTouch™ Template Kit használatával, OneTouch v2 készüléken végeztük a gyártó utasításai alapján. Ezt követően az amplifikált könyvtár DNS-t tartalmazó részecskék dúsítását az Ion OneTouch™ ES robottal hajtottuk végre. A szekvenálást Ion Torrent Personal Genome Machine® készüléken végeztük, 316 ill. 318 típusú chipeken, az Ion PGM™ Sequencing kithoz ajánlott szekvenálási protokollt követve. A külön meg nem nevezett műszerek és kitek a Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) cég termékei.

### **8.3.2 Illumina szekvenálás**

Az Illumina NextSeq 500 készülékkel történő újgenerációs szekvenálás során a DNS könyvtárak készítése az Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) használatával történt. A DNS fragmensek egyedi jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk. Első lépésben az amplifikált cDNS mintákat 2,5 µl végtérfogatban 0,2 ng/µl koncentrációra hígítottuk, majd a tagmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl Tagment DNA pufferrel, valamint 2,5 µl AmpliconTagment Mix reagenssel. A reakcióelegyet 55°C-on 6 percig inkubáltuk GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA) készülékben, majd lehűtöttük 10°C-

ra. Ezt követően azonnal hozzáadtunk 2,5 µl Neutralize Tagment puffert és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS könyvtár készítéséhez 7,5 µl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. A PCR 95°C 30 mp kezdeti denaturáció után 12 cikusból állt (95°C 10 mp, 55°C 30 mp, 72°C 30 mp), amit egy 72°C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10°C-ra. Az így keletkezett indexált DNS könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, az oszlopos tisztítási protokollt követve, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. A könyvtár DNS-eket a megfelelő koncentrációra történő hígítás és poolozás után denaturáltuk, majd a denaturált könyvtárat 1,5 pM végső koncentrációban NextSeq 500/550 Mid Output flowcell-re (Illumina, San Diego, USA) töltöttük. A szekvenálást Illumina® NextSeq 500 (Illumina, San Diego, USA) készüléken végeztük.

## **8.4 Szekvencaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek**

### **8.4.1 Szekvenciaillesztés és annotálás**

Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatok feldolgozása a Geneious Prime szoftver segítségével történt (Biomatters Ltd., Auckland, Új-Zéland) (Kearse et al., 2012). A readok gyors taxonómiai klasszifikációja Kaiju webszerver segítségével történt (Menzel et al., 2016). Minőségi ellenőrzés után (a rossz minőségű vagy túl rövid nukleotid szakaszokat kiszűrtük, valamint az adapter régiókat levágtuk) a readokat a konszenzus szekvenciák létrehozása érdekében egy, a GenBank-ból származó referencia törzs szekvenciájához illesztettük; így a vírustörzsek teljes, vagy közel teljes genomját sikerült meghatározni. A mappelés minden esetben a Geneious mapper segítségével közepes, esetenként magas érzékenységgel és a Geneious alapbeállításával történt. Mivel az Ion Torrent és az Illumina NextSeq 500 szekvenáló berendezések által generált szekvencia readok minősége és mennyisége eltért, ezért a Geneious javasolt beállításai esetenként eltértek.

A kapott konszenzus genomokat manuálisan javítottuk és annotáltuk. A referencia szekvenciák keresése a GenBank adatbázisában BLASTn algoritmussal történt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990). Amennyiben a BLASTn algoritmus által javasolt első referencia törzs szekvenciájához való illesztéssel nem sikerült a teljes genomot hiánytalanul meghatározni, a readokat további referencia szekvenciákhoz illesztettük.

A dolgozatban vizsgált 102 törzs közül a dolgozat benyújtásáig 25 teljes genom szekvenciáját helyeztük el a GenBank adatbázisában. A kérdéses törzsek azonosító számai a **3. táblázatban** találhatóak.

**3. táblázat** A dolgozatban vizsgált saját törzsek GenBank azonosítói

| <b>IBV törzs azonosítója</b> | <b>GenBank azonosító</b> |
|------------------------------|--------------------------|
| 11518/Kiskunmajsa/2010/HU    | MT984583                 |
| 211776/Imrehegy/2011/HU      | MT984584                 |
| D1478/2/2/2010/GR            | MT984585                 |
| D1530/2/3/2010/RO            | MT984586                 |
| D1530/4/1/2010/RO            | MT984587                 |
| D1561/8/2011/HU              | MT984588                 |
| D1617/3/2011/UA              | MT984589                 |
| D1623/1/1/2011/HU            | MT984590                 |
| D1654/1/4/2011/RO            | MT984591                 |
| D1656/2/2011/BY              | MT984592                 |
| D1719/1/2011/GR              | MT984593                 |
| D1760/2/2/2011/GR            | MT984594                 |
| D1783/2/3/2011/RO            | MT984595                 |
| D1871/1/1/2012/HU            | MT984596                 |
| D1944/1/3/2012/RO            | MT984597                 |
| D2002/2/2012/PT              | MT984598                 |
| D2220/2/2013/GR              | MT984599                 |
| D2353/2013/PL                | MT984600                 |
| D4000/3/2017/RO              | MT984601                 |
| D20222/2/3/2012/RO           | MT984602                 |
| D2326/3/13/CM                | MZ325296                 |
| D2326/4/13/CM                | MZ325297                 |
| D2328/15/3/13/GH             | MZ325298                 |
| D2334/11/2/13/CI             | MZ325299                 |
| D2334/12/2/13/CI             | MZ325300                 |

#### **8.4.2 Evolúciós és filogenetikai elemzések**

A kodon alapú többszörös szekvencia illesztéseket Geneious Prime szoftverrel végeztük el, a Muscle algoritmust használva. A szekvencia-azonosság számításokat és a filogenetikai elemzéseket a MEGA X szoftvercsomag segítségével végeztük el (Kumar et al., 2018). A filogenetikai fák rekonstrukciójához alkalmazott, legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztása a Bayes-i kritériumrendszer alapján történt. A törzsfák készítése maximum-likelihood módszerrel történt, az elkészült fák megbízhatóságát bootstrap elemzéssel (1000) ellenőriztük. A szekvenciák közti átlagos nukleinsav és aminosav távolságokat a *p*-distance módszerrel számoltuk ki. A rekombinációs eseményeket az RDP5 szoftver RDP (Martin és Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam et al., 1999), Bootscan (Martin

et al., 2005), MaxChi (Smith, 1992), Chimaera (Posada és Crandall, 2001), SiScan (Gibbs et al., 2000) és 3Seq (Boni et al., 2007) módszereinek segítségével azonosítottuk (legmagasabb elfogadott  $P$ -érték= $10^{-5}$  beállítással) (Martin et al., 2021). Elővigyázatosságból, a pontosabb becslés érdekében egy-egy rekombinációs esemény abban az esetben került elfogadásra, amennyiben azt minimum öt, az RDP5 programba beépített algoritmus kimutatta ( $P$ -érték $<10^{-5}$ ). Eredményeinket a SimPlot szoftver (3.5.1. verzió) használatával is megerősítettük (Lole et al., 1999), melynél a Kimura-2 parameter (K2P) modellt futtattuk alapértelmezett beállításokkal.

## 8.5 Adatbázis és adatelemzés

Az elemzéseket a GenBank adatbázisban található teljes genom szekvenciák és a teljes S1 szekvenciák (1620 nt) alapján végeztük. A korábbi kritériumrendszert követve az 1440 nt-nál rövidebb részleges S1 szekvenciák nem kerültek be az elemzésbe (Valastro et al., 2016). A szekvenciákhoz tartozó járványtani háttér adatok közül minimumként az izolálás helyét és időpontját is kigyűjtöttük. Amennyiben a GenBank-i adatokban nem volt elérhető, hogy pontosan melyik évben és mely országban került izolálásra az adott törzshöz tartozó szekvencia, akkor a szekvenciához tartozó publikációból nyertük ki az adatokat. Megfelelő adatok hiányában 46 db szekvenciát kizártunk az elemzésekből. Az elemzésbe a GenBank adatbázisába 2022. június 30-ig feltöltött szekvenciákat vontuk be. Végeredményben a vizsgált 3590 S1 gén szekvencia 43 országból 1937 és 2022 között izolált törzsektől származott.

A feltöltött szekvenciák filogenetikai besorolását a MEGA X program segítségével a Maximum Likelihood módszer (ML) segítségével, 1000 bootstrap ismétléssel végeztük (Kumar et al., 2018). A szekvencia adatok elemzése során a teljes S1 szekvenciákat rekombinációs elemzésnek vetettük alá, annak érdekében, hogy a genotípusokba és az azokon belül kijelölt leszármazási ágakba nem sorolható rekombináns törzseket kiszűrjük. Erre az RDP5 (5.05 verzió) programot használtuk (Martin et al., 2015). A kérdéses törzseket kizártuk az elemzésből.

## 9 Eredmények

Eredményeinket két nagyobb alfejezetben tárgyaljuk. Az egyik az IBV genomszintű elemzéseit veszi sorra, a másik az S génre fókuszál. Didaktikai szempontból a genomszintű elemzések eredményeit vettük előre, de ebben az alfejezetben már teszünk utalást az S gén alapú genotipizálási adatokra is. Ez valamelyest zavaró lehet, ugyanakkor néhány újszerű törzs genomszintű elemzését fontosnak tartottuk.

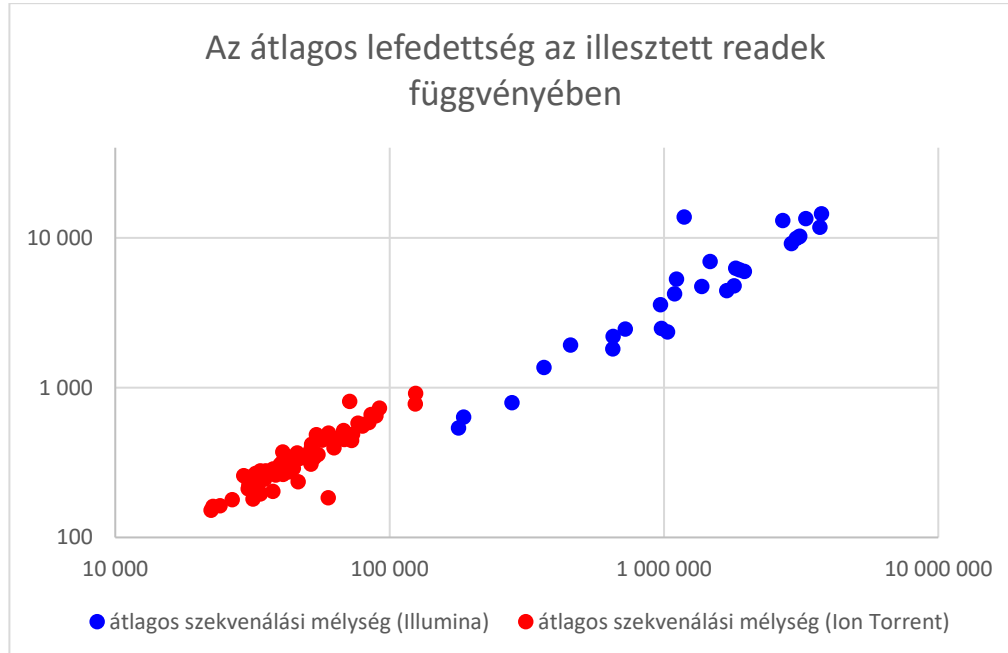


## 9.1 Az IBV genomszerveződésének vizsgálata

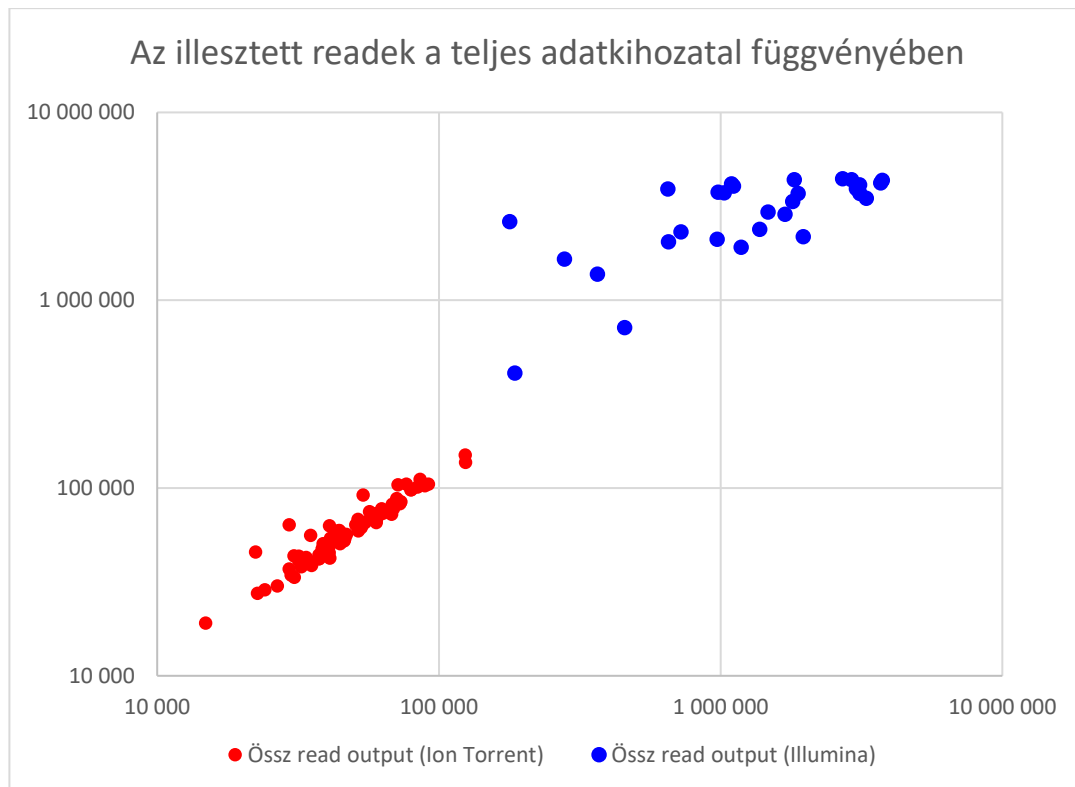
Vizsgálataink során 102 db, többségében brojlerállományokból származó IBV törzs teljes genom szekvenciáját határoztuk meg. A törzseket együttműködő kollégáink 2010-2017 között hazai és nemzetközi állományokból származó, IBV-re jellemző tünetegyüttest mutató házityúkokból izolálták. A vizsgálatban szereplő IBV törzsekről szóló további információkat (izolálás ideje, helye, tünetek, vakcinázás) az **1. melléklet** tartalmazza.

A dolgozatban elemzett törzsek teljes genom szekvenálását újgenerációs szekvenáló készülékek (Ion Torrent PGM és Illumina NextSeq 500) segítségével végeztük el. A referencia genomra illeszthető szekvencia-readek mennyisége Ion Torrent esetében átlagosan 50 573 (min. 14 865, max. 124 277), Illumina esetében átlagosan 1 639 237 (min- 178 419 max. 3 754 443) volt (**8. ábra**). A teljes genom mentén Ion Torrent esetében 362X (minimum 95, maximum 917), Illumina esetében pedig 6034X (minimum 537, maximum 14 453) volt a szekvenálás átlagos mélysége (**9. ábra**).

Átlagosan a generált szekvencia readek 79 %-a (minimum 27,4%, maximum 94,2%) volt az összeállított konszenzus genomokra illeszhető, ami arra utal, hogy az allantois folyadékból származó IBV-hez adaptált dúsítási protokoll (azaz a sejteredetű nukleinsav maradékok eltávolítása fizikai és biokémiai módszerek segítségével), megfelelt a várakozásainknak.



**8. ábra.** Az átlagos lefedettség az illesztett readek függvényében. Az x tengely az átlagos szekvenálási mélységet (lefedettség), az y tengely az illesztett readek mennyiségét (10-es alapú logaritmizált értékek) ábrázolja



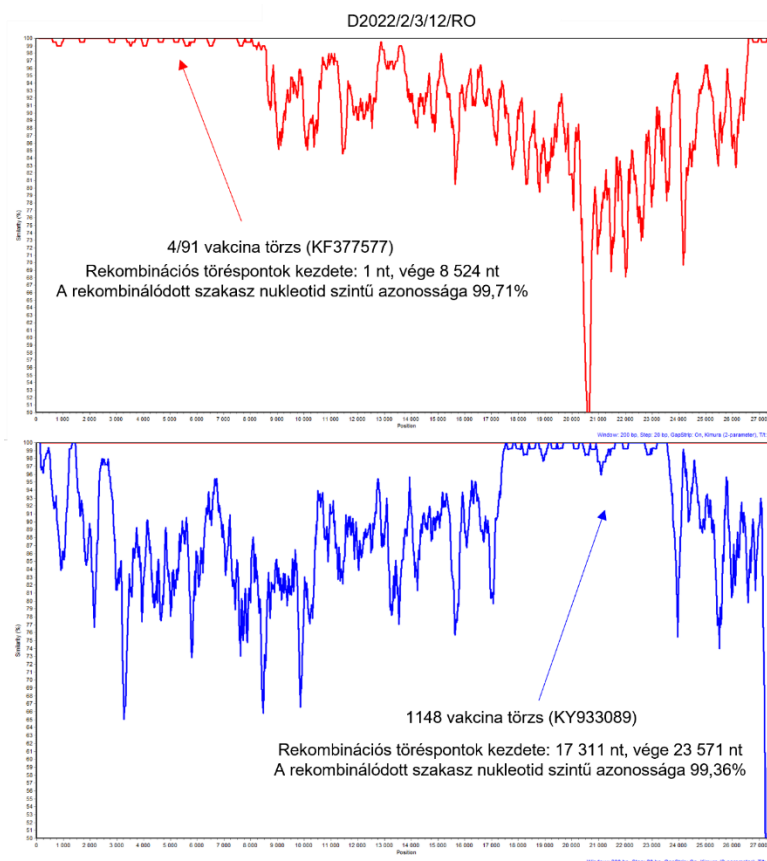
**9. ábra.** Az illesztett readok mennyisége a teljes adatkihozatal függvényében. Az x tengely az illesztett readok mennyiségét, az y tengely a teljes adatmennyiséget (10-es alapú logaritmizált értékek) ábrázolja

### 9.1.1 Heterogenitás az IBV genomban

A szekvencia-readok referencia genomokra illesztésével sikerült meghatározni minden egyes törzs teljes genom szekvenciáját. A 102 teljes genom hossza a poly-A farok nélkül 27 099 és 27 789 nukleotid (nt) között változott. A poly-A farok valós hosszát nem vizsgáltuk. Az 5' és 3' nem transzlálódó régiók (UTR-ek) között a 13 leolvasási keret (Open Reading Frame, ORF) sorrendje állandó (5'-UTR-1a-1ab-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-3' UTR). A két poliprotein, az 1a és 1ab, a transzlációt követő proteolitikus hasítása 15 funkcionális fehérjét (nsp2–nsp16) eredményez. Az egyes ORF-ek szekvenciájának hossza a következőképpen alakult a 102 törzs teljes genomjának vizsgálata során: ORF1a, 11 748 - 11 883 nt; ORF1ab, 19 725 - 19 917 nt, spike (S) gén, 3447 - 3510 nt, ORF 3a, 174 - 187 nt, ORF 3b, 177 - 213 nt, burok (E) és membrán (M) protein gének, 279 - 348 nt és 633 - 717 nt, ORF4b, 243 - 288 nt, ORF4c, 162 - 174 nt, ORF5a, 138 - 201 nt, és ORF5b, 249 - 273, nukleokapszid (N) gén, 1221 - 1236 nt és ORF6b, 183 - 231 nt. Az egyes törzsek genomszerveződését részletesen a **2. melléklet** mutatja be.

## 9.1.2 Teljes genom alapú rekombinációelemzés

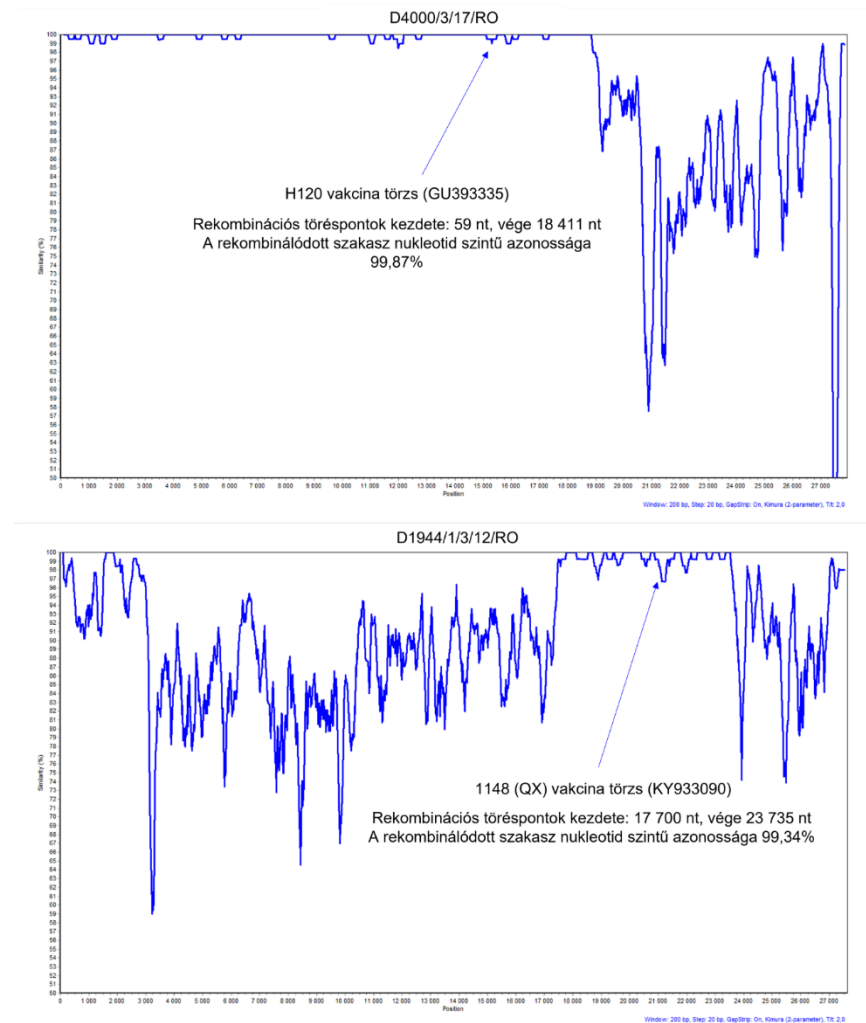
Szakirodalmi adatok szerint az IBV genom formálódásában a rekombinációnak jelentős szerepe van, de a genomon belüli rekombinációs forrópontok azonosításának tekintetében kevés adat áll rendelkezésre (Thor et al., 2011). Az eddig kialakult kép további finomításának érdekében teljes genom szekvencia adatok felhasználásával további elemzéseket végeztünk a lehetséges rekombinációs helyek gyakoriságának és elhelyezkedésének felmérésére az RDP5 és SimPlot programok segítségével. Ebben a vizsgálatban a rekombináció szempontjából kevésbé vizsgált európai törzsekre koncentráltunk. Az elemzésbe összesen 80 szekvenciát, a 23 saját, európai eredetű törzs mellett 24 GenBank-i vad típusú és 33 vakcina törzs szekvenciáját vontuk be. (A vizsgálat alapján kapott adatok reprezentálására szolgál a **10. ábra**.)



**10. ábra** A D2022/2/3/12/RO törzs egyes vakcina törzsekkel rekombinálódott genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva. Az y tengely a D2022/2/3/12/RO törzshöz való százalékos azonosságot, az x tengely pedig a teljes genom nukleotid pozícióit ábrázolja.

Az elemzések során a rekombinánsok feltételezett major és minor „szülői” szekvenciáit az algoritmusok által jelzett módon osztályoztuk. Ezekkel a tesztparaméterekkel összesen 215 rekombinációs eseményt azonosítottunk 51 törzsön belül (beleértve 18 saját, 13 GenBank-i vad típusú és 20 GenBank-i vakcina törzset). Vizsgálataink során a rekombinációs események

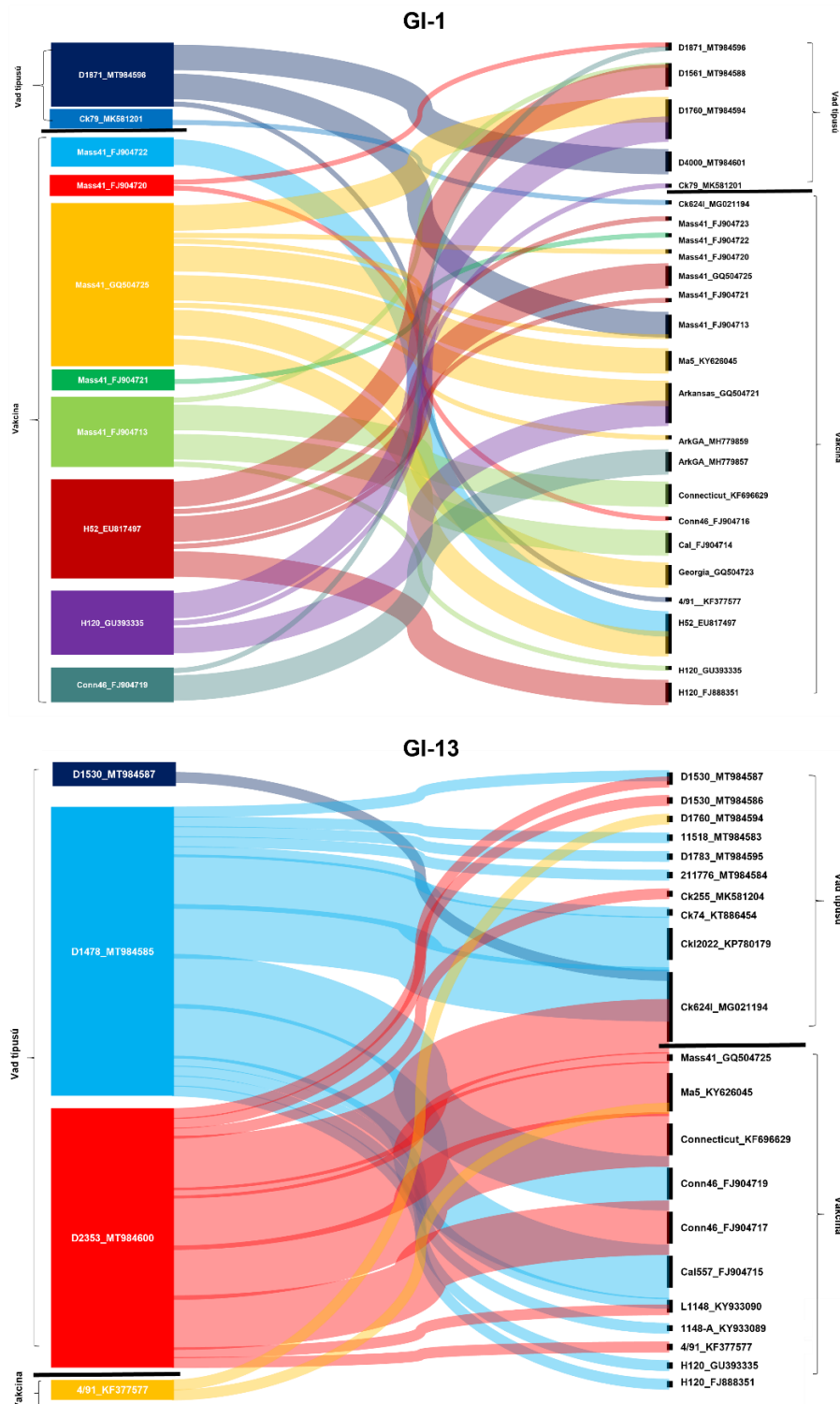
többségét a vad típusú törzsek között, valamint a vad és vakcinatörzsek között mutattuk ki. Minden alkalommal, amikor egy vakcinatörzs érintett volt egy prediktált rekombinációs eseményben, SimPlot analízist végeztünk a genomszintű hasonlóság megállapítására (**10-11. ábrák**). Az elemzés legalább 10 olyan eseményt azonosított, amikor az átadott fragmens több mint 99%-os hasonlóságot mutatott a feltételezett vakcinatörzssel, és 35 olyan eseményt, amikor a hasonlóság a feltételezett vakcinaeredetű szekvenciával 99% alá esett.



**11. ábra** A D4000/3/17/RO és D1944/1/3/12/RO törzsek egyes vakcina törzsekkel rekombinálódott genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva. Az y tengely a rekombináns törzsekhez való százalékos azonosságot, az x tengely pedig a teljes genom nukleotid pozíciót ábrázolja.

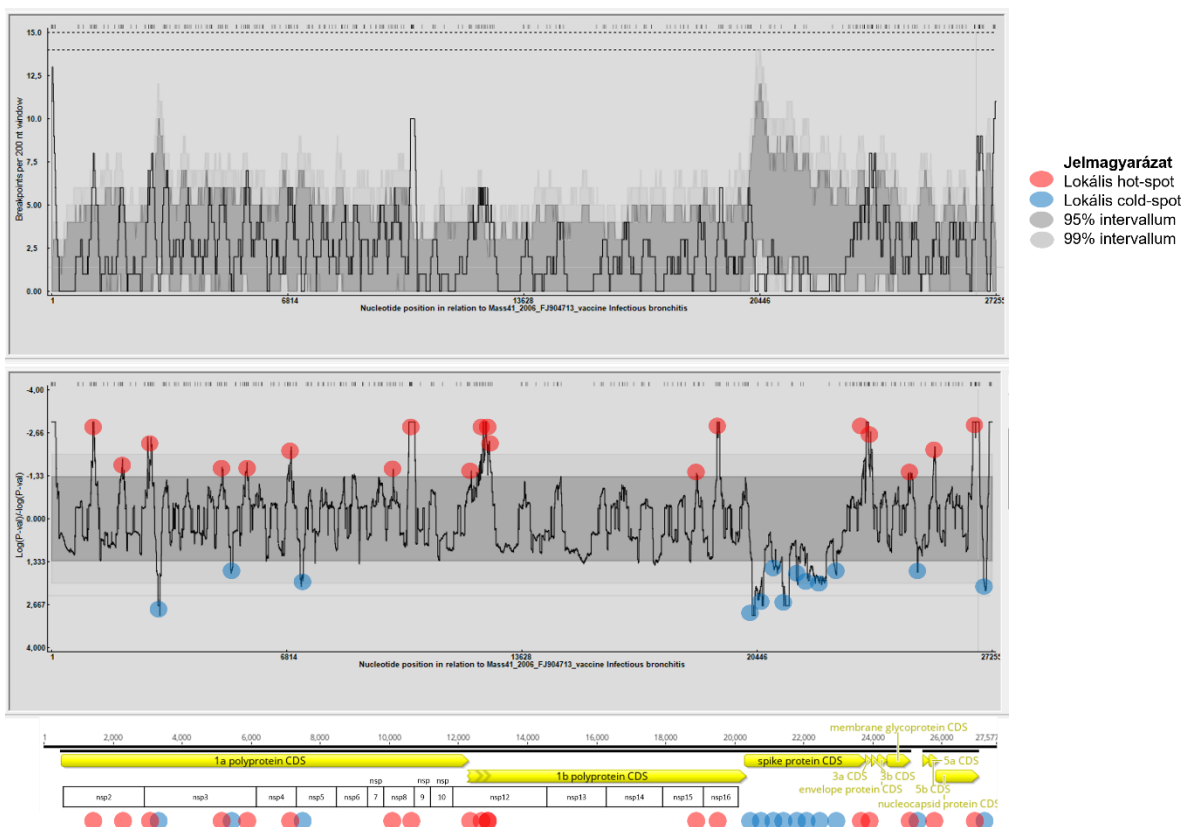
Számos esetben kimutatható volt akár többszörös rekombináció is, akár több különböző vakcina törzssel. Például a D2022/2/3/RO (GI-19) törzs esetében 99% feletti nukleotid szintű azonosságot tapasztaltunk a 4/91-es és a 1148-as (QX) vakcinatörzsekkel a genom különböző szakaszain (**11. ábra**). A SimPlot elemzés a rekombinálódott genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatokkal együtt segíthet megjósolni, hogy egy feltételezett rekombinációs esemény a közelmúltban vagy korábban történt-e. A

rekombinációs események komplex mintázatának szemléltetésére Sankey-diagramokat generáltunk (12. ábra). Ez az ábrázolásmód segíthet a feltételezett major és minor szülői szekvenciákat azonosítani.



**12. ábra.** A vad típusú és vakcina eredetű IBV törzsekben tapasztalt rekombinációs események összefoglalása. A rekombináns törzsek a bal oldalon, a (feltételezett) szülői törzsek a jobb oldalon találhatóak. A bal oldali törzseket a jobb oldali törzsekkel összekötő szalagok relatív vastagsága határozza meg a (feltételezett) major és minor szülői törzseket (major: vastag; minor: vékony), bár ez az összefüggés nem minden esetben volt előre jelezhető. Az egyszerűség kedvéért csak két reprezentatív Sankey diagramot mutatunk be.

A rekombinációs forró és hideg pontok meghatározásához rekombinációs töréspont-eloszlási grafikont készítettünk (13. ábra) (Heath et al., 2006). Egyes törzsek több rekombinációs törésponttal is rendelkeztek (nem ábrázolt adat). A detektálható rekombinációs töréspontok a genom teljes hosszán eloszlottak, különösen nagy számban közvetlenül az S gén előtt 5' irányban. Ebben a régióban volt a legmagasabb a töréspontok száma is a 99%-os konfidenciaintervallumon belül. Továbbá nagy számú töréspontot figyeltünk meg a genom ORF1ab régiójában; az nsp2, nsp3, nsp12, nsp16, valamint a burok- és membránfehérjéket kódoló génekben is. A legtöbb átvitt fragmens az nsp2, nsp3, nsp16 és S génekhez kapcsolódik. Rekombinációs hidegpontokat a genom 5' és 3' végének közelében és az S gén nagyobb szakaszán azonosítottunk. Elemzéseink során azt találtuk, hogy a rekombináció rendkívül gyakori és a genom szinte minden régióját érinti.



13. ábra Breakpoint Distribution Plot - Töréspont eloszlási ábra

A rekombinációs töréspontok átfogóbb ábrázolására készített töréspont eloszlási ábra. Rekombinációs forró pontok (piros pontok) leginkább a nem strukturális fehérjéket kódoló régiókban voltak azonosíthatók (többszörös rekombinációs forró pontok az nsp2, nsp3, nsp8, nsp12 és nsp16 kódoló régiókban). Sötét és világos szürke területek: a véletlenszerűen bekövetkező rekombináció 95 és 99%-os konfidencia intervallumai.

### 9.1.3 Hasonlósági mintázatok a teljes genom alapján

A vizsgált törzsek genotípusokba és genetikai vonalakba történő filogenetikai besorolása a tüskefehérje S1 alegységét kódoló genomi régió nukleotid szekvenciája alapján történt, melyet részletesen a 9.2.1 fejezetben taglalunk (Valastro et al., 2016).

A teljes genom alapú nukleotid szekvencia azonosságok a 102 törzs között 84,62% és 99,96% között alakultak. Az egyes genetikai vonalakon belüli (intra-lineage) nukleotid azonosságok között valamivel magasabb, minimum 86,06% azonosság értékeket tapasztaltunk, de e tekintetben voltak eltérések az egyes genetikai vonalak között (**4. táblázat**).

**4. táblázat.** Intra-lineage teljes genom nukleotid azonossági értékek

|              | nukleotid |        |
|--------------|-----------|--------|
|              | min       | max    |
| <b>GI-1</b>  | 99,57%    | 99,83% |
| <b>GI-9</b>  | 92,49%    |        |
| <b>G-13</b>  | 90,31%    | 99,07% |
| <b>G-14</b>  | 99,27%    |        |
| <b>GI-16</b> | 91,75%    | 99,96% |
| <b>GI-19</b> | 86,06%    | 99,82% |
| <b>GI-21</b> | 92,15%    | 96,11% |
| <b>GI-23</b> | 88,42%    | 98,86% |
| <b>GI-27</b> | 94,13%    | 99,01% |

Az S génben rekombináns törzsek törzsgyűjteményen belül történő összehasonlítása során a D3386/1/2/16/SA rekombináns törzs a legmagasabb teljes genom szintű nukleotid azonosságot (98,65%) a GI-19 vonalba tartozó szintén szaúd-arábiai eredetű D3079/1/2/15/SA törzssel mutatta. Míg a nemzetközi GenBank adatbázisban a BLAST segítségével végzett keresés eredményeként kapott azonossági érték a GI-19 vonalba tartozó ITA/90254/2005 (FN430414) olasz törzssel 92,14% volt. A magyarországi eredetű rekombináns törzsek közül a D1623/1/1/11/HU jelű a GI-19 vonalba tartozó hazai 11518/Kiskunmajsa/2010 93,79%-ban és az azonos vonalba tartozó D591/2/GR/05 (OM525804) görög törzssel 92,12%-ban egyezett meg nukleotid szinten. Az 211776/Imrehegy/2011 törzs esetében a saját gyűjteményből a GI-19 vonalba tartozó D3426/1/16/RO törzssel 93,78%, a GenBank adatbázisban található GI-13 vonalba tartozó IBVUkr27-11 (KJ135013) ukrán törzssel 91,56% nukleotid azonosságot figyeltünk meg. Az S génen belül rekombinációt mutató Fülöp-szk.-i D2584/12/1/13/PH törzs a legmagasabb teljes genom nukleotid azonosságot (95,67%) az azonos származású, egyedi variáns D2586/4/6/13/PH törzssel és a JP/Shimane/98 (LC716901) GenBank-i japán referencia szekvenciával (91,64%) mutatta.

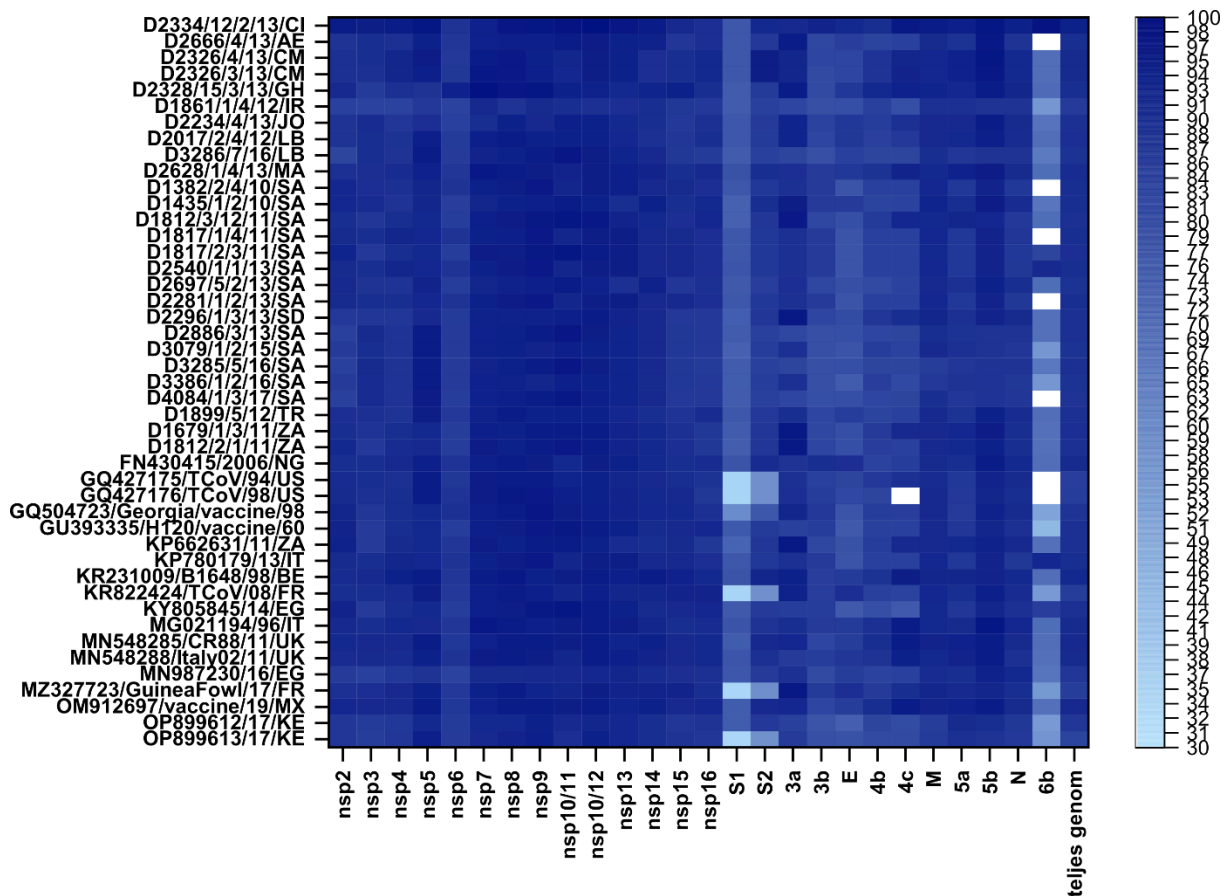
A két, általunk azonosított egyedi variáns D2586/4/6/13/PH és D3276/4/2/16/PH törzs teljes genom szekvenciája nukleotid szinten egymással 96,21%-ban, míg a D2804/3/3/13/ID

egyedi variáns a D2804/4/2/13/ID törzssel 95,61%-ban egyezett meg. A D2334/11/2/13/CI törzs a leginkább (94,57%) a D2334/12/2/13/CI törzshöz hasonlított nukleotid szinten.

A vizsgált törzsek közötti genetikai rokonság további vizsgálatához, különös tekintettel az új variánsokra összpontosítva, más genomi régiókat is elemeztünk. Az egyedi variáns törzsek 15 nsp, S1 és S2 alegység valamint 10 ORF és teljes genom páronkénti nukleotid azonosságainak összehasonlítása 45 saját és GenBank adatbázisból nyert referencia törzsekkel az **14-17. ábrán** látható.

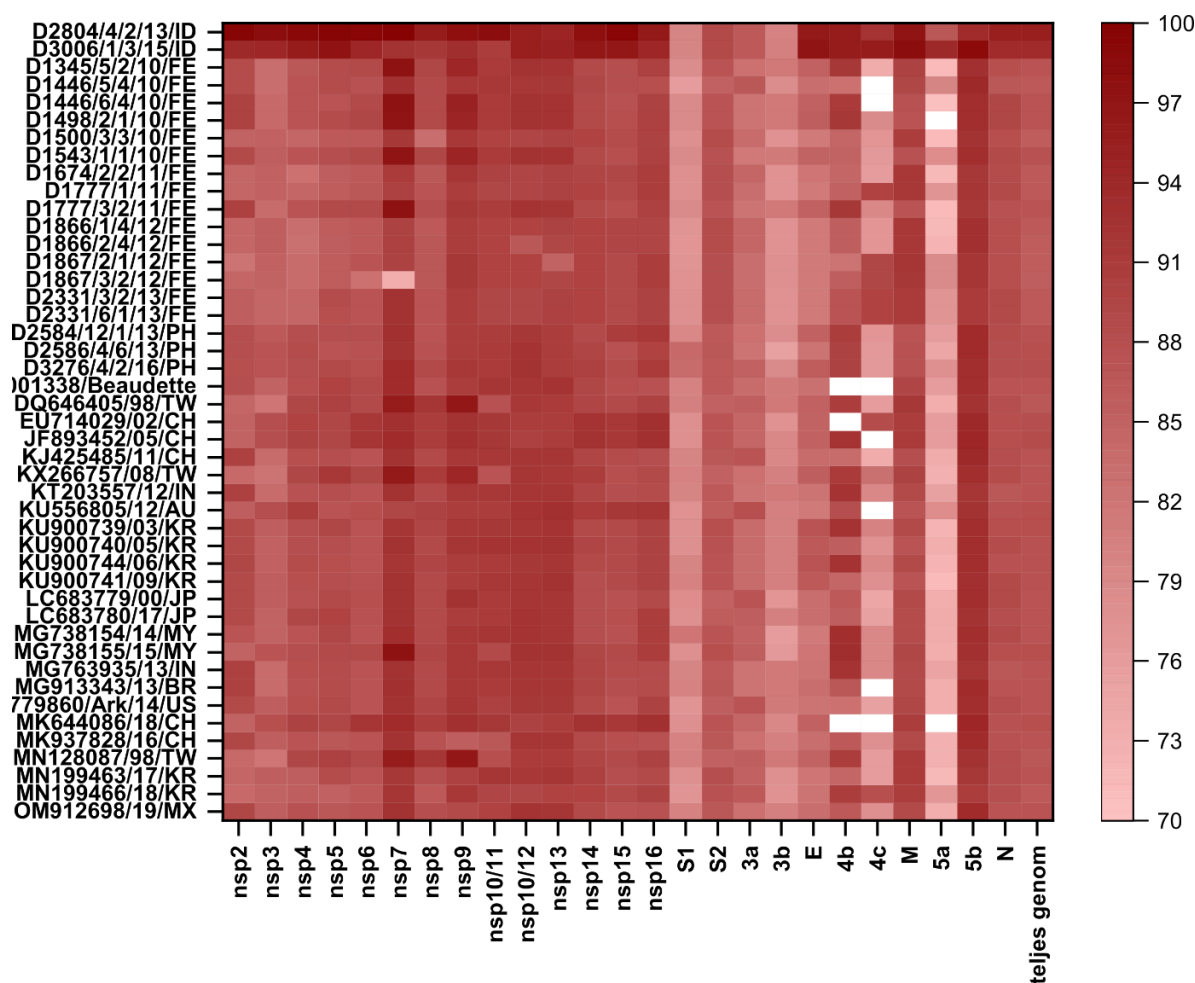
Az elefántcsontparti új variáns törzs (D2334/11/2/13/CI) a legmagasabb teljes genom szintű nukleotid azonosságot egy belga nefropatogén referencia törzssel (B1648, 92,4%) és egy másik, általunk vizsgált elefántcsontparti törzssel (D2334/12/2/13/CI, 94,6%) mutatta. A legnagyobb génenkénti nukleotid azonosság a 10-ből nyolc (8/10) ORF (ORF 3b, 4c, 5a, 5b, 6b, burok, membrán és nukleokapszid fehérjéket kódoló gének) és 15-ből 10 (10/15) nsp (nsp2-nsp5, nsp9-nsp14) esetében is a másik elefántcsontparti törzssel látható. Négy nsp (nsp6-nsp8, nsp15) és az ORF 4b szekvenciája egy általunk vizsgált ghánai törzshöz (D2328/15/3/13/GH) hasonlított legjobban. Az új variáns nsp16-ja egy pulyka eredetű törzshöz (KR822424/TCoV/FR/2008) (93,4%), míg az ORF 3a két saját és egy referencia afrikai törzshöz (D1679/1/3/11/ZA, D1812/2/1/11/ZA, KP662631/ZA/2011) volt leginkább hasonló (97,13%). Az S1 és S2 alegységek esetében a legmagasabb nukleotid azonosságot (78,35% és 95,28%) a saját törzsgyűjteményből származó GI-21 vonalba tartozó marokkói (D2628/1/4/13/MA), valamint két GI-14 vonalba tartozó kameruni törzssel (D2326/3/13/CM és D2326/4/13/CM) mutatta. Az azonossági mátrixba néhány pulyka eredetű coronavirus (TCoV) is bekerült, mivel a BLAST analízis nagyfokú, >90%-os (legfeljebb 96,9%-os) szekvenciaazonosságot jelzett a vizsgált törzs és a TCoV törzsek között a replikáz komplexben (nsp2-nsp16), a membrán (M), az 5b és a nukleokapszid (N) gének szekvenciái között (**14. ábra**).





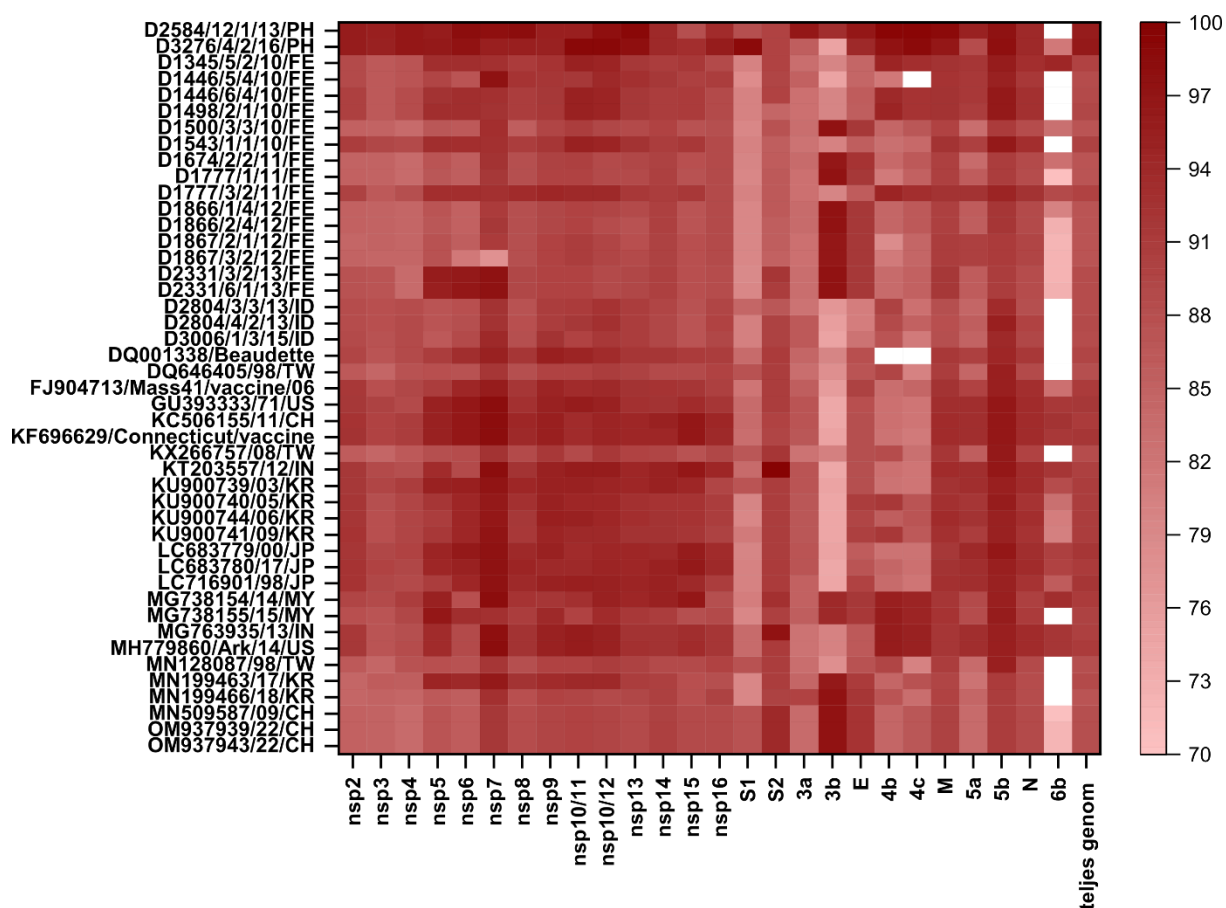
14. ábra A D2334/11/2/13/CI variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hő térkép. A legközelebbi rokon gének sötétkék színűek, amelyek a genetikai távolság növekedésével halványulnak. A fehér négyzetek az esetlegesen nem kódolt 4c vagy 6b fehérjéket jelzik.

Az indonéz új variáns törzs (D2804/3/3/13/ID) a legmagasabb teljes genom szintű nukleotid azonosságot egy másik indonéz törzsszel (D22804/4/2/13/ID, 95,61%) mutatta. A legnagyobb génenkénti nukleotid azonosság szintén ezzel a törzsszel látható a nukleokapszid fehérjét kódoló gén és 15-ből 13 (13/15) nsp (nsp2-nsp12, nsp14-nsp16) esetében. Az nsp13 és hat ORF (ORF 4b, 4c, 5a, 5b, burok és membrán fehérjét kódoló gének) szekvenciája egy másik saját indonéz törzshöz (D3006/1/3/15/ID) volt leginkább hasonló. Az új indonéz variáns ORF 3b génje számos saját távol-keleti eredetű és változatos származású referencia törzs szekvenciájával is 81,54%-ban megegyezett. Az S1 és S2 alegységek esetében a legmagasabb nukleotid azonosságot (83,96% és 87,93%) a saját törzsgyűjteményből származó variáns Fülöp-szk.-i (D2586/4/6/13/PH), valamint egy ausztrál eredetű referencia törzsszel (KU556805/12/AU) figyeltük meg (15. ábra).



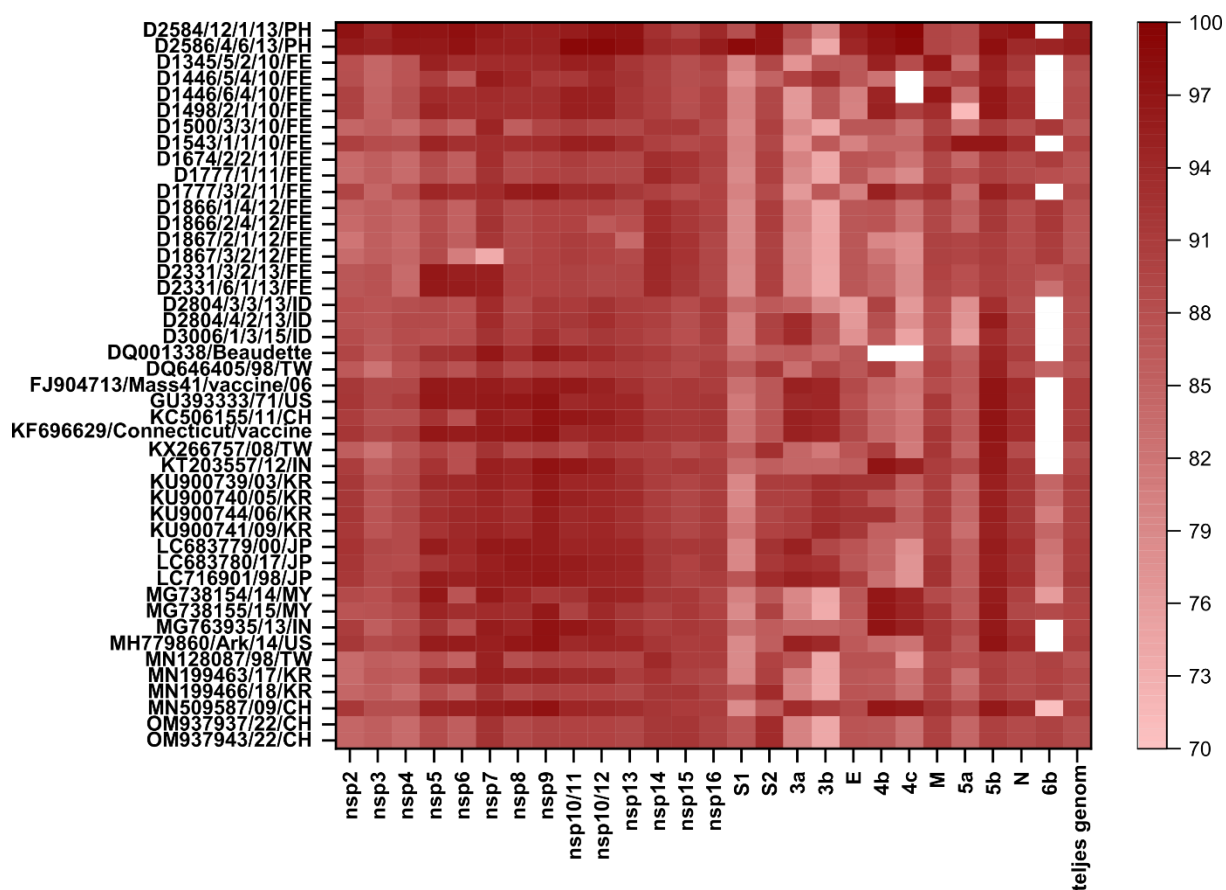
15. ábra A D2804/3/3/13/ID variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőterkép. A legközelebbi rokon gének mélyvörös színűek, amelyek a genetikai távolság növekedésével halványulnak. A fehér négyzetek az esetlegesen nem kódolt 4b, 4c vagy 6b fehérjéket jelzik.

A Fülöp-szk.-i új variáns törzsek (D2586/4/6/13/PH és D3276/4/2/16/PH) a legmagasabb teljes genom szintű nukleotid azonosságot (96,21%) egymással mutatták. A D2586/4/6/13/PH törzs esetében a legnagyobb génenkénti nukleotid azonosság is a 15-ből hat (6/15) nsp (nsp2, nsp4, nsp5, nsp10-12 és nsp16) és 10-ből két (2/10) ORF (ORF 5b és 6b) esetében is a két egyedi variáns törzs között látható. Öt nsp (nsp3, nsp6, nsp8, nsp8, nsp13) és 10-ből hét (7/10) ORF (ORF 3a, 4b, 4c, 5a és a burok, membrán és nukleokapszid fehérjéket kódoló gének) szekvenciája egy másik saját Fülöp-szk.-i eredetű törzshöz (D2584/12/1/13/PH) volt leginkább hasonló. Az nsp7, nsp14 és nsp15 egy indiai referencia törzshöz (KT203557/12/IN) hasonlított leginkább. Az új variáns D2586/4/6/13/PH törzs ORF 3b-je számos távol-keleti eredetű saját és referencia törzs szekvenciájával 97,35%-ban volt azonos. Az S1 és S2 alegységek esetében a legmagasabb nukleotid azonosságot (98,7% és 99,73%) a saját törzsgyűjteményből származó variáns D3276/4/2/16/PH, valamint a GI-1 vonalba tartozó indiai törzsszel (KT203557/12/IN) mutatta (16. ábra).



16. ábra A D2586/4/6/13/PH variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőtérkép. A legközelebbi rokon gének mélyvörös színűek, amelyek a genetikai távolság növekedésével halványulnak. A fehér négyzetek az esetlegesen nem kódolt 4b, 4c vagy 6b fehérjéket jelzik.

A D3276/4/2/16/PH törzs esetében is a 15-ből hét (7/15) nsp (nsp3, nsp10-13, nsp15 és nsp16) és 10-ből két (2/10) ORF (ORF 5b és 6b) és az S1 (98,7%) és S2 (97,38%) alegység esetében is a két egyedi variáns törzs között látható a legmagasabb nukleotid azonosság. Négy nsp (nsp2, nsp4-6) és 10-ből négy (4/10) ORF (ORF 4b, 4c, burok és nukleokapszid fehérjéket kódoló gének) szekvenciája egy másik saját Fülöp-szigeteki eredetű törzshöz (D2584/12/1/13/PH) volt leginkább hasonló. Az nsp7 a Beaudette törzssel (DQ001338/Beaudette), az nsp8 és nsp9 egy-egy amerikai (MH779860/Ark/14/US, GU393333/71/US) referencia törzssel, az nsp14 pedig egy saját távol-keleti eredetű törzssel (D2331/3/2/13/FE) mutatta a legnagyobb nukleotid azonosságot. A membrán fehérjét kódoló gén és az ORF 5a esetében 96,87% és 96,97% azonosságot figyeltünk meg egy-egy saját törzsgyűjteményből származó távol-keleti eredetű törzssel (D1446/6/4/10/FE és D1543/1/1/10/FE). Az új variáns D3276/4/2/16/PH törzs ORF 3a és 3b-je számos távol-keleti eredetű referencia törzshöz viszonyítva 94,82% és 94,56% azonosságot mutatott (17. ábra).

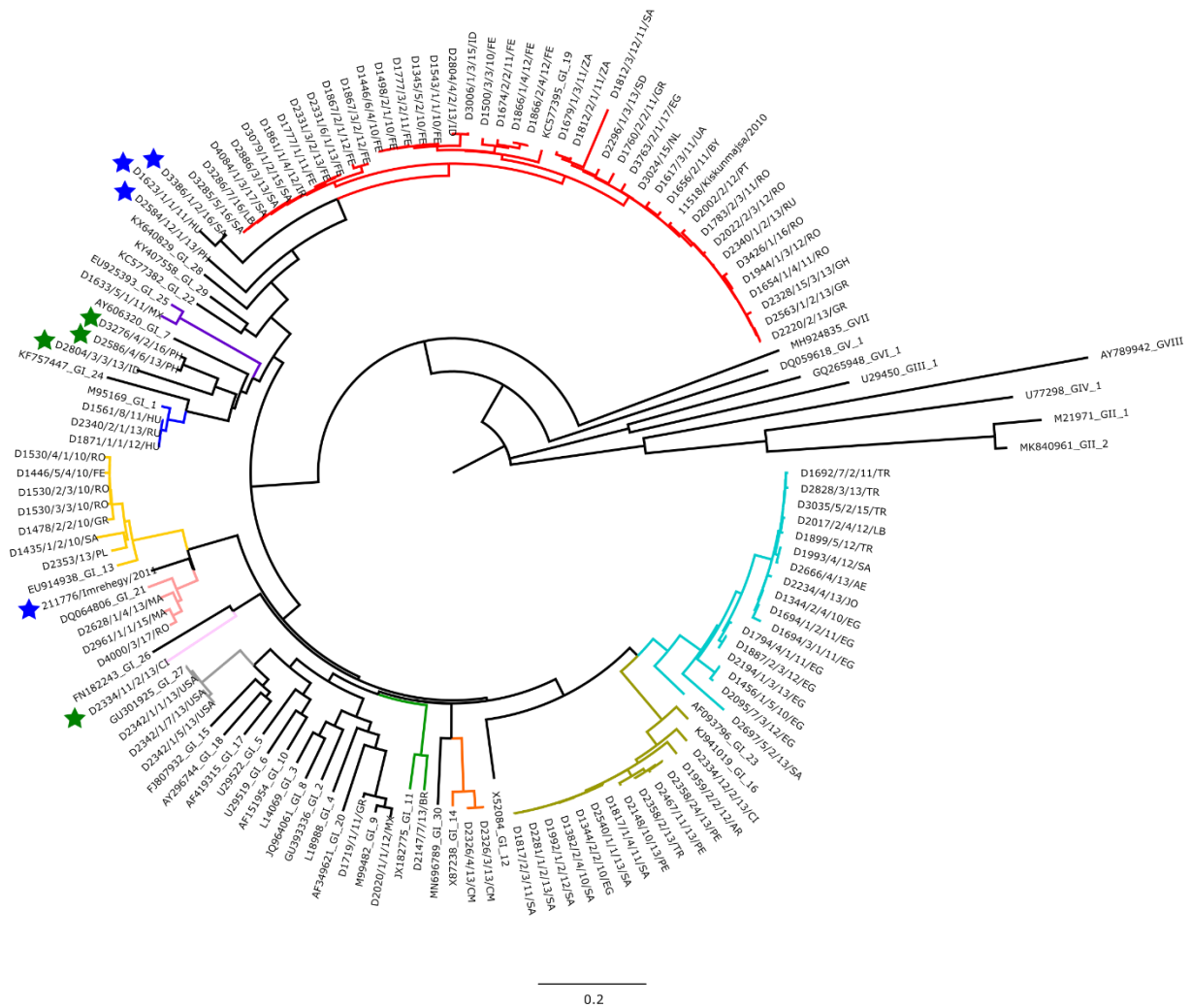


17. ábra A D3276/4/2/16/PH variáns referencia törzsekhez viszonyított páronkénti nukleotid azonosságait ábrázoló hőterkép. A legközelebbi rokon gének mélyvörös színűek, amelyek a genetikai távolság növekedésével halványulnak. A fehér négyzetek az esetlegesen nem kódolt 4b, 4c vagy 6b fehérjéket jelzik.

## 9.2 Az IBV S génjének vizsgálata

### 9.2.1 Hasonlósági és leszármazási kapcsolatok az S1 gén alapján

A vizsgált törzsek filogenetikai besorolása a tüskefehérje S1 alegységét kódoló genomi régió nukleotid szekvenciája alapján történt (Valastro et al., 2016). A vizsgált 102 törzs között a GI genotípus 11 genetikai vonalának képviselőit azonosítottunk, melyek közül a leggyakoribb a GI-19 vonal volt (42/102). A fennmaradó törzseket a GI-23 (17/102), a GI-16 (13/102), a GI-13 (7/102), a GI-1 (3/102), a GI-21 (3/102), a GI-27 (3/102), a GI-9 (2/102), a GI-14 (2/102), a GI-11 (1/102), és a GI-25 (1/102) vonalakba soroltuk. Ezen felül négy törzs egyedi variánsnak (UV: D2334/11/2/13/CI, D2804/3/3/13/ID, D2586/4/6/13/PH, D3276/4/2/16/PH), négy pedig rekombinánsnak (D1623/1/1/11/HU, D2584/12/1/13/PH, D3386/1/2/16/SA, 211776/Imrehegy/2011) bizonyult (18. ábra). Ezek egy részét már a genomszintű elemzésekben is említettük (ld. 9.1.3 fejezet).



**18. ábra** Az *Avian coronavirus* genotípusait és genetikai vonalait bemutató teljes S1 szekvenciák alapján készült nukleinsav alapú filogenetikai fa. A filogenetikai fa a nyolc genotípus 38 genetikai vonalába tartozó referenciátörzsek és a saját 102 törzs S1 nukleotid szekvenciái alapján készült. A fa generálása a maximum-likelihood módszerrel és a megfelelő szubsztitúciós modell kiválasztásával (GTR+G+I) történt a MEGA X szoftver segítségével és 1000 bootstrap ismétléssel. A rekombináns és egyedi variáns törzsek kék, illetve zöld csillaggal jelölve.

Az S1 gén alapú nukleotid szekvencia azonosságok a 102 törzs között 72,95% és 99,94% között alakultak. Az egyes genetikai vonalakon belüli nukleotid azonosságok között valamivel magasabb, 85,93% (GI-19) és 99,84% (GI-23) közötti azonosság értékeket tapasztaltunk. Aminosav szinten 82,19% (GI-19) és 100% (GI-16) között alakultak az azonossági értékek (**5. táblázat**).

**5. táblázat.** Intra-lineage teljes S1 gén nukleotid azonossági értékek

|              | nukleotid |        | aminosav |        |
|--------------|-----------|--------|----------|--------|
|              | min       | max    | min      | max    |
| <b>GI-1</b>  | 99,63%    | 99,69% | 99,25%   | 99,44% |
| <b>GI-9</b>  | 95,73%    |        | 94,14%   |        |
| <b>G-13</b>  | 90,31%    | 99,07% | 87,59%   | 97,77% |
| <b>G-14</b>  | 99,38%    |        | 98,70%   |        |
| <b>GI-16</b> | 94,52%    | 99,81% | 97,71%   | 100%   |
| <b>GI-19</b> | 85,93%    | 99,63% | 82,19%   | 99,88% |
| <b>GI-21</b> | 95,31%    | 97,78% | 94,08%   | 94,27% |
| <b>GI-23</b> | 86,19%    | 99,84% | 84,28%   | 99,62% |
| <b>GI-27</b> | 97,06%    | 99,33% | 96,32%   | 96,69% |

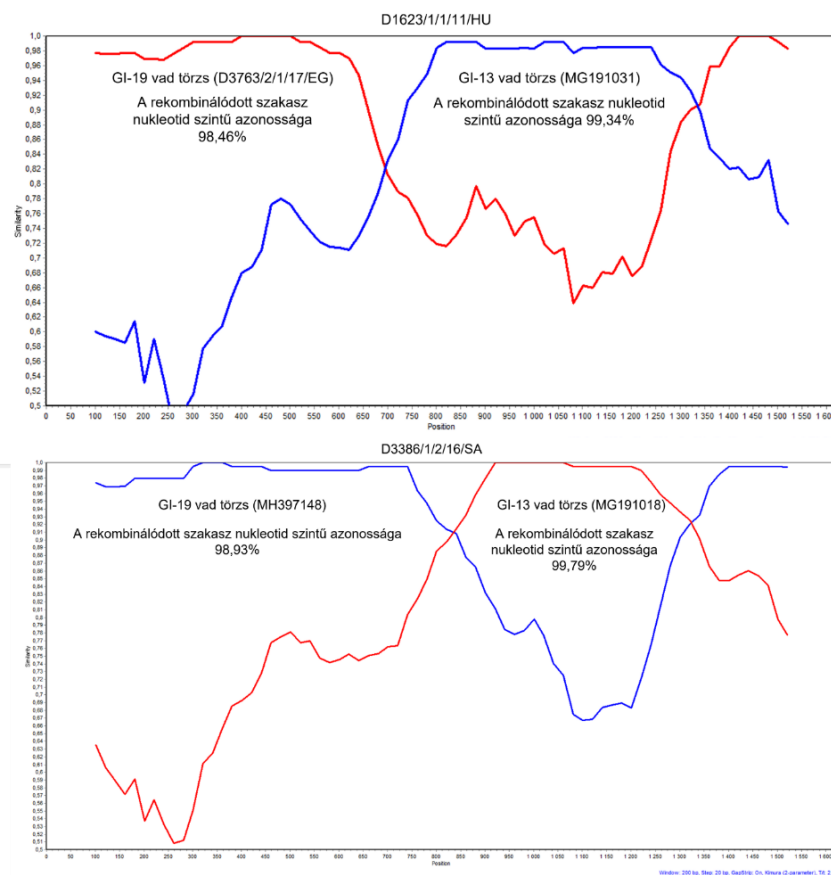
A két rekombináns törzs, D3386/1/2/16/SA és D1623/1/1/11/HU törzs teljes S1 gén nukleotid szekvenciája 95,99%-ban egyezett meg. Míg a GenBank-i referencia szekvenciák közül a D3386/1/2/16/SA törzs egy kínai eredetű (KX107674) GI-19 vonalba tartozó törzssel 97,41%, a D1623/1/1/11/HU törzs egy spanyol eredetű (KU934156) GI-19 vonalba tartozó törzssel 95,56% azonosságot mutatott. A rekombináns 211776/Imrehegy/2011 törzs a saját törzsgyűjteményből származó, GI-21 vonalba tartozó D2961/1/1/15/MA törzssel 87,88%-ban egyezett meg. A GenBank-i referencia szekvenciák közül pedig a GI-13 vonalba tartozó kínai eredetű törzshöz (KP036502) hasonlított legjobban (88,56%). A rekombináns D2584/12/1/13/PH törzs a legmagasabb teljes S1 nukleotid szintű azonosságot (88,41%) a GI-19 vonalba tartozó D1498/2/1/10/FE törzssel, a GenBank-i referencia szekvenciák közül pedig egy kínai eredetű (KC478647) törzssel (92,66%) mutatta. Az S génen belüli rekombináns törzsek elemzését rekombináció szempontjából a 9.2.2. fejezetben taglaljuk részletesen.

A két egyedi variáns D2586/4/6/13/PH és D3276/4/2/16/PH törzs teljes S1 gén nukleotid szekvenciája között 98,70% hasonlóságot figyeltünk meg, míg a D2804/3/3/13/ID egyedi variáns a leginkább a D2586/4/6/13/PH törzshöz hasonlított nukleotid szinten (84,07%). Az elefántcsontparti új variáns törzs (D2334/11/2/13/CI) a leginkább a saját törzsgyűjteményből származó GI-21 vonalba tartozó marokkói (D2628/1/4/13/MA) törzsre (78,35%), míg a GenBank-i referencia szekvenciák közül az orosz származású egyedi variáns RF/01/99 törzsre hasonlított leginkább (79,11%). A GenBank-i referencia szekvenciák közül a D2586/4/6/13/PH törzssel a GI-7 vonalba tartozó (TW-I) GQ229238 törzs (87,95%), a D3276/4/2/16/PH törzssel pedig egy másik tajvani törzs (DQ646406) mutatta a legmagasabb (87,57%) nukleotid szintű azonosságot. Az új variáns D2804/3/3/13/ID törzs pedig a malajziai GI-25 vonalba tartozó törzshöz (EU086600) hasonlított leginkább (82,34%).

## 9.2.2 S1 gén alapú rekombinációelemzés

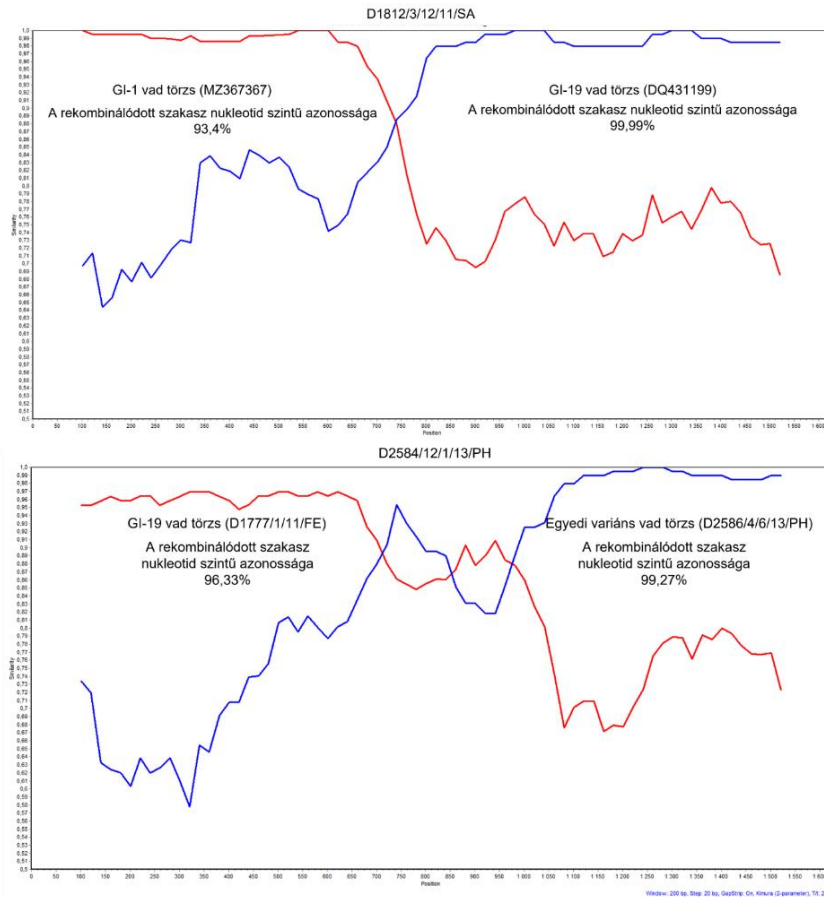
Az IBV genomok vizsgálatánál már ismertetett rekombináció elemzést külön elvégeztük S1 génre is, hiszen a rendelkezésre álló S1 referencia szekvenciák száma jelentősen meghaladja a teljes genom szekvenciák számát. A minél változatosabb, potenciálisan rekombinálódásra hajlamos szekvenciák reprezentálására különböző genetikai vonalakba sorolható törzseket válogattunk az elemzésekbe.

Mivel az IBV genomok vizsgálata során az S1 gén alapú genotipizálás segítségével genetikai vonalakba nem sorolható törzsek feltételezhetően rekombinánsok, a hipotézis alátámasztására, S1 gén alapú rekombinációelemzést végeztünk. Az elemzésbe a 102 saját genomból kiemelt S1 gén mellett összesen 500 GenBank-i referencia szekvenciát vontunk be (478 vad típusú törzs, 22 vakcina törzs). Az elemzés során az algoritmusok összesen 109 esetben detektáltak rekombinációt, mely többségében vad-vad típusú törzsek között jött létre. Összesen 39, az S1 gént érintő rekombinációs eseményt sikerült azonosítani, melyek nagy része genetikai vonalak között (inter-lineage), kisebb hányada pedig az egyes genetikai vonalakon belül (intra-lineage) zajlott le.



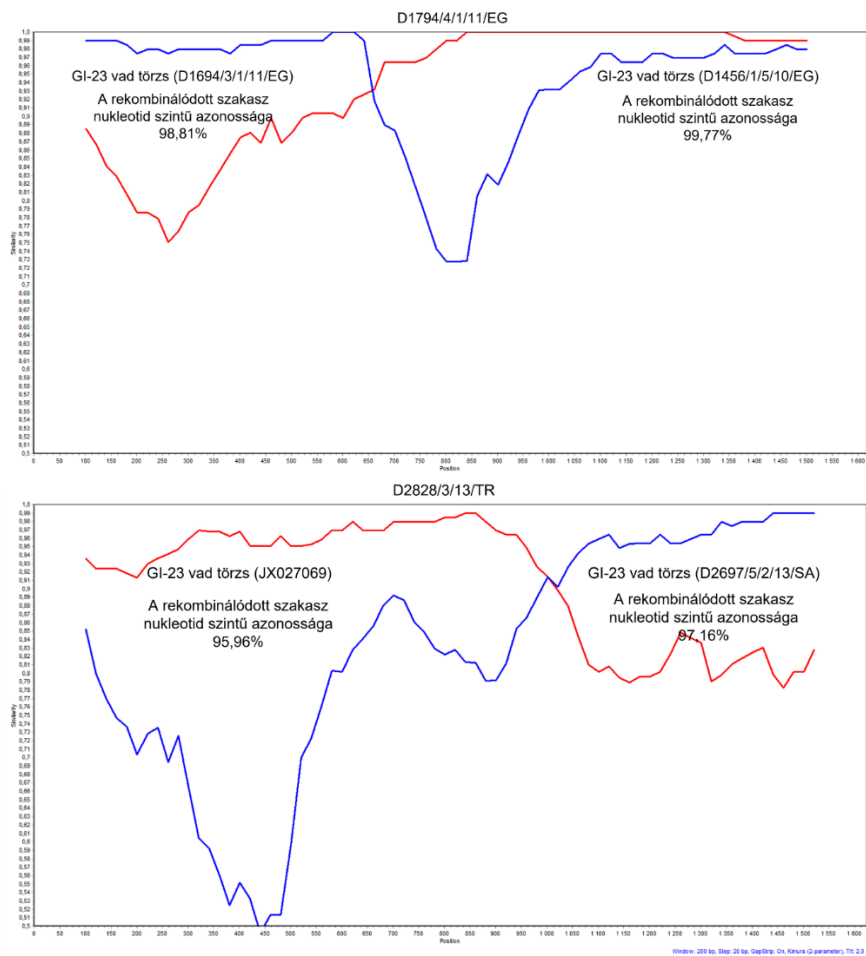
19. ábra A D1623/1/1/HU és D3385/1/2/SA törzsek az egyes szülői törzsekkel rekombinálódott genomi régióira kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva. Az y tengely a rekombináns törzsekhez való százalékos azonosságot, az x tengely pedig az S1 gén nukleotid pozícióit ábrázolja.

Az átadott szekvencia szakaszok nukleotid azonossága inter-lineage rekombináció esetén 93,4-99,79%, míg az intra-lineage rekombináció során 95,96-99,77% között alakult. Eredményeinket a SimPlot szoftver segítségével is megerősítettük (**19-21. ábrák**) (Lole et al., 1999). A saját törzsgyűjtemény tagjait érintő, elfogadott rekombinációs eseményeket a **6. táblázat** mutatja be részletesen.



**20. ábra** A D1818/3/12/11/SA és D2584/12/1/13/PH törzsek az egyes szülői törzsekkel rekombináldott genomi régióira kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva. Az y tengely a rekombináns törzsekhez való százalékos azonosságot, az x tengely pedig az S1 gén nukleotid pozícióit ábrázolja.





**21. ábra** A D1794/4/11/EG és D2828/3/13/TR törzsek az intra-genotipikus rekombináció során az egyes szülői törzsekkel kicserélődött genomi régióra kiszámított szekvencia-hasonlósági adatai SimPlot elemzés segítségével ábrázolva. Az y tengely a rekombináns törzsekhez való százalékos azonosságot, az x tengely pedig az S1 gén nukleotid pozícióit ábrázolja.

**6. táblázat.** Az IBV törzsekben azonosított rekombinációs töréspontokat és a rekombinációban résztvevő feltételezett major és minor szülői törzseket összefoglaló táblázat.

|   | Rekombináns törzs | Genotípus   |         |                 | Major szekvencia | Minor szekvencia | Töréspont |       | nt<br>azonosság<br>(%)                           | A rekombinációt detektáló algoritmusok                     |
|---|-------------------|-------------|---------|-----------------|------------------|------------------|-----------|-------|--|--|
|   |                   | rekombináns | major   | minor           |                  |                  | Kezdet    | Vége  |  |  |
| rekombináció<br>genetikai<br>vonalak<br>között  | D1812/3/12/11/SA  | rekombináns | GI-1    | GI-19           | MZ367367         | DQ431199         | 0*        | 697   | 93,4   | RDP, Geneconv, MaxChi, Chimaera,<br>SiScan, 3seq           |
|   |                   |             | GI-19   | GI-1            | DQ431199         | MZ367367         | 809       | 1690* | 98,99  |  |
|   | D3386/1/2/16/SA   | rekombináns | GI-13   | GI-19           | MG191018         | MH397148         | 0*        | 866   | 98,93  | Geneconv, BootScan, MaxChi, Chimaera,<br>SiScan, 3seq      |
|   |                   |             | GI-19   | GI-13           | MH397148         | MG191018         | 835       | 1324  | 99,79  |  |
| D2584/12/1/13/PH                                | rekombináns       | GI-19       | variáns | D1777/1/11/FE   | D2586/4/6/13/PH  | 0*               | 628       | 96,33 | RDP, Geneconv, MaxChi, Chimaera,<br>SiScan, 3seq |  |
|   |                   | variáns     | GI-19   | D2586/4/6/13/PH | D1777/1/11/FE    | 1076             | 1628*     | 99,27 |  |  |
| D1623/1/1/11/HU                                 | rekombináns       | GI-19       | GI-13   | D3763/2/1/17/EG | MG191031         | 0*               | 649       | 98,46 | RDP, Geneconv, MaxChi, Chimaera,<br>SiScan, 3seq |  |
|   |                   | GI-13       | GI-19   | MG191031        | D3763/2/1/17/EG  | 713              | 1320      | 99,34 |  |  |
| rekombináció<br>genetikai<br>vonalakon<br>belül | D2828/3/13/TR     | GI-23       | GI-23   | GI-23           | JX027069         | D2697/5/2/13/SA  | 0*        | 956   | 95,96  | RDP, Geneconv, BootScan, MaxChi,<br>SiScan, 3seq           |
|   |                   |             |         |                 | D2697/5/2/13/SA  | JX027069         | 1198      | 1620* | 97,16  |  |
|   | D1794/4/1/11/EG   | GI-23       | GI-23   | GI-23           | D1694/3/1/11/EG  | D1456/1/5/10/EG  | 0*        | 735   | 98,81  | RDP, Geneconv, BootScan, MaxChi,<br>Chimaera, SiScan, 3seq |
| D1456/1/5/10/EG                                 |                   |             |         |                 | D1694/3/1/11/EG  | 801              | 1619*     | 99,77 |  |  |

### 9.2.3 Az S1/S2 fehérje vágási helyek elemzése

Az IBV S glikoproteinje prekursor fehérjeként (S0) transzlálódik, majd a vírus érése során a gazdasejt saját proteázai két (S1 és S2) alegységre hasítják (Cavanagh et al., 1986). Az S1/S2 fehérje hasítási helyének motívuma polimorf, általában egy vagy több bázikus aminosavhoz kapcsolódik, például az Arg-Arg-X-Arg-Arg/Ser (RRXRR/S) aminosavakból tevődik össze (ahol X bármely aminosav) (Cavanagh et al., 1992).

Az elemzett 102 törzs S fehérje hasítási helyét meghatározó motívum aminosav szekvenciája változatos képet mutatott, összesen kilenc féle motívum volt megfigyelhető. A törzsek 30%-a (31/102) His-Arg-Arg-Arg-Arg (HRRRR), 18,62%-a (19/102) Arg-Arg-Thr-Arg-Arg (RRTRR), 14,7%-a (15/102) Arg-Arg-Ser-Arg-Arg (RRSRR), 12,74%-a (13/102) Arg-Arg-Thr-Gly-Arg (RRTGR), 6,86%-a (7/102) His-Arg-Arg-Lys-Arg (HRRK), 5,88%-a (6/102) Arg-Arg-Phe-Arg-Arg (RRFRR), 4,9%-a (5/102) Arg-Arg-Tyr-Arg-Arg (RRYRR), 3,92%-a (4/102) His-Arg-Ser-Arg-Arg (HRSRR), 1,96%-a (2/102) pedig Arg-Arg-His-Arg-Arg (RRHRR) S fehérje hasítási hely aminosav-motívummal rendelkezik. A kilenc féle motívum aminosav sorrendjét a **22. ábra** mutatja be, míg a 102 törzs aminosav motívumai a **4. mellékletben** találhatóak.

|                  | 520   | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                  | . . . .   . . . .   . . . .   . . . .   . . . .   . . . .   . . . .   . . . . |     |     |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| D2220/2/13/GR    | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | E | Q | V | E | N | Q | F | Y | V | K | L | T | N | S | S | H | R | R | K | R | S | I | G | Q | N | V | T | S | C | P | Y | V | S | Y | G | R | F | C | I | E | P | D | G | S | L | K | M | I | V | P |   |
| D1783/2/3/11/RO  | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | E | Q | V | E | N | Q | F | Y | V | K | L | T | N | S | S | H | R | R | R | R | S | I | G | Q | N | V | T | S | C | P | Y | V | S | Y | G | R | F | C | I | E | P | D | G | S | L | K | M | I | V | P |   |
| D1345/5/2/10/FE  | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | Q | P | I | E | N | Q | L | Y | V | K | L | T | N | V | S | R | R | R | S | I | E | N | V | T | S | C | Q | Y | V | S | Y | G | R | F | C | I | Q | P | D | G | L | I | K | Q | I | V | P |   |   |   |   |
| D2804/4/2/13/ID  | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | Q | P | I | E | N | Q | F | Y | V | K | L | T | N | V | S | R | R | H | R | S | I | E | N | V | T | S | C | P | Y | V | S | Y | G | R | F | C | I | E | P | D | G | L | I | K | Q | I | V | P |   |   |   |
| D2584/12/1/13/PH | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | A | Q | L | L | E | N | Q | F | Y | I | K | L | T | N | G | S | H | R | S | R | R | S | I | S | N | N | V | T | S | C | P | Y | V | S | Y | G | R | Y | C | I | E | P | D | G | S | L | K | Q | I | V | P |   |
| D4000/3/17/RO    | L   | T   | S   | H   | N   | E   | T | G | S | E | S | I | E | N | Q | F | Y | I | K | L | T | N | G | T | R | R | S | R | S | I | T | G | N | V | T | N | C | P | Y | V | S | Y | G | K | F | C | I | K | P | D | G | S | L | S | T | I | V | P |   |   |
| D1561/8/11/HU    | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | Q | L | L | E | N | Q | F | Y | I | K | L | T | N | G | T | R | R | F | R | S | I | T | E | S | V | E | N | C | P | Y | V | S | Y | G | K | F | C | I | K | P | D | G | S | L | S | I | A | T | I | V | P |
| D2326/3/13/CM    | L   | T   | S   | I   | N   | E   | T | G | S | Q | F | V | G | N | Q | F | Y | V | K | L | T | N | S | T | R | R | T | R | R | S | V | T | E | N | V | T | S | C | N | Y | V | S | Y | G | T | F | C | I | K | P | D | G | S | L | S | N | I | V | P |   |
| D1344/2/2/10/EG  | L   | T   | S   | R   | N   | E   | T | G | S | Q | P | I | E | N | R | F | Y | V | K | F | P | N | S | R | R | R | T | G | R | S | T | I | A | N | V | T | N | C | P | Y | V | S | Y | G | K | F | C | I | K | P | D | G | S | V | S | E | I | V | P |   |

**22. ábra.** A vizsgálatban izolált IBV törzsek S1/S2 hasítási helyeinek aminosav szekvenciája. Az aminosavak egyetlen karakterként jelennek meg, a hasítási hely motívumok piros keretben kiemelve találhatóak.

A kilenc megfigyelt motívum közül számos csak bizonyos genetikai vonalakba tartozó törzsekben fordult elő, például a HRRKR, RRYRR, RRHRR és RRTGR motívumokat csak GI-19 vonalba tartozó törzsekben figyeltük meg. Az RRTGR aminosav motívum kizárólag a GI-16 vonalba tartozó törzsekben fordult elő. A leggyakoribbnak számító HRRRR motívumot nagyrészt GI-19 vonalba tartozó törzsekben, ezen felül csupán egy GI-13 vonalba tartozó, valamint egy rekombináns törzsben azonosítottuk. Az RRTRR motívum GI-14 és GI-23 vonalakba tartozó törzsekben, a HRSRR a GI-9 vonalba tartozó és rekombináns vagy egyedi variáns törzsekben, az RRFRR pedig GI-1, GI-27 és egyedi variáns törzsekben egyaránt megtalálható volt. A széles körben elterjedt RRSRR motívum az általunk elemzett GI-1, GI-11, GI-13, GI-19, GI-21, GI-25, GI-27 és GI-31 vonalakba tartozó törzsekben egyaránt előfordult.

#### **9.2.4 Az S gén aminosav szintű összehasonlító elemzése**

A patogenitásért felelős markerek azonosítása diagnosztikai szempontból különösen fontos. Ezért a vizsgálatba bevont 102 törzs S génjének elemzése során kitértünk a szövettropizmus meghatározásában szerepet játszó aminosav mintázatok/motívumok vizsgálatára is. Az S1 alegységben számos esetben számos egyedi különbséget figyeltünk meg a prediktált hipervariábilis régiókban és a teljes receptorkötő doménben (RBD).

##### **A receptor-kötő domén (RBD) elemzése**

Az S1 alegység receptor-kötő doménjének (RBD) (19-272 as) elemzése során a szakirodalmi adatok alapján a trachea receptoraihoz való kötődése szempontjából kiemelt fontosságú pozíciókban számos szubsztitúciót figyeltünk meg a referencia M41 törzshöz képest. Az M41 törzs S1 alegységének 19., 38., 43., 56., 63., 66. és 69. pozícióiban található hét aminosav kulcsfontosságú az IBV tüskefehérjének a csirke trachea receptoraihoz való kötődés szempontjából, és a polimorfizmus befolyásolja a légcső csillós hámsejtjeihez való kötődési képességét (Promkuntod et al., 2014).

A vizsgált 102 törzs közül 43 esetében nem rendelkezünk információval a madarakban megfigyelhető tüneteket és elváltozásokat illetően. A vizsgált törzsek 48 esetben származtak olyan madaraktól, melyek légzőszervrendszerei, 11 esetben bélrendszerei és 15 esetben kiválasztószervrendszerei érintettségre utaló tüneteket mutattak. Noha a törzsek nagy része légzőszervrendszerei tüneteket mutató madaraktól származott, a szakirodalomban az M41 törzs esetében leírt, A19, N38, H43, S56, P63, I66 és T69 aminosav konstellációval megegyező szekvenciát egyik vizsgálatba bevont törzs esetében sem találtunk (**7. táblázat**).

A légzőszervrendszerei tüneteket mutató állatokból izolált 48 törzs esetében minimum négy (4/7) pozícióban figyeltünk meg szubsztitúciót, így összesen 22 féle aminosav motívumot azonosítottunk (**23. ábra**).

A 48 törzs közül három esetében egyetlen aminosav pozícióban sem volt egyezés. A leggyakoribb (12/48) aminosav konstelláció az A19, T38, H43, Y56, G63, T66 és S69 volt. De számos egyedi, csupán egy-egy törzs esetében megjelenő motívum is előfordult.

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

Mass41/USA/1972/FJ904721 MLVTPLLLVTLCCVLCSAALYDS-SSYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNISSESNAGSSPPCIVGTIHGGRRVNNAS  
D2334/12/2/13/CI MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1344/2/4/10/EG MLVKSFLVTLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2697/5/2/13/SA MLVKSFLVTLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1345/5/2/10/FE MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2804/4/2/13/ID MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1654/1/4/11/RO MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2220/2/13/GR MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2340/1/2/13/RU MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1617/3/11/UA MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1812/2/1/11/ZA MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2328/15/3/13/PH MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1760/2/2/11/GR MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D3286/7/16/LB MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D3386/1/2/16/SA MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2584/12/1/13/PH MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1446/5/4/10/FE MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1478/2/2/10/GR MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2340/2/1/13/RU MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2804/3/3/13/ID MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2326/3/13/CM MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1719/1/11/GR MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2334/11/2/13/CI MSVLHPLLVTLLFALCSAALHGD-SYVYYYQSEYRPEHGGWHLHGGAYAVVSTYNESSNAGSARICTAGAIWSRNFESHY

**23. ábra** A légzőszervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva. Az aminosavak egyetlen karakterként jelennek meg, a kiemelt aminosav pozíciók piros keretben kiemelve találhatóak.

A bélrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált 11 törzs esetében minimum négy (4/7) pozícióban figyeltünk meg szubsztitúciót, így összesen 8 féle aminosav konstellációt azonosítottunk (**24. ábra**). A 11 törzs közül egy esetében egyetlen aminosav pozícióban sem volt egyezés. A bélrendszeri tüneteket és elváltozásokat mutató állatokból származó törzsek között is felfedezhető volt egy-egy egyedi motívum: L19, G38, H43, T56, S63, T66 és V69 (D2628/1/4/13/MA) és N19, G38, H43, N56, -63, T66 és V69 (D2326/3/13/CM).

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

Mass41/USA/1972/FJ904721 MLVTPLLLVTLCCVLCSAALYD-SSYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNISSESNAGSSPPCIVGTIHGGRRVNNAS  
D1617/3/11/UA MLVKSFLVTLFALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2022/2/3/12/RO MLVKSFLVTLFALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D1777/1/11/FE MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2017/2/4/12/LB MLVKSFLVTLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2334/12/2/13/CI MLGKSLFIVTLLFALCSAALFDN-NEVYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2628/1/4/13/MA MLGKPLLLVTLWYALCSALLYD-NDTYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2326/3/13/CM MLVTPQLSVVTLCCALCSANLFDN-NDNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSVLETTNAGTASDCTAGAIWSKNFNSAS  
D2334/11/2/13/CI MSVLHPLLVTLLFALCSANLHGD-SYVYYYQSEYRPEHGGWHLHGGAYAVVSTYNESSNAGSARICTAGAIWSRNFESHY

**24. ábra** A bélrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva. Az aminosavak egyetlen karakterként jelennek meg, a kiemelt aminosav pozíciók piros keretben kiemelve találhatóak.

A 15 kiválasztószervrendszeri elváltozásokat okozó törzsben minimum négy (4/7) pozícióban figyeltünk meg szubsztitúciót, összesen 12 féle konstellációt azonosítottunk (**25. ábra**). A 15 törzs közül egy esetében egyetlen aminosav pozícióban sem volt egyezés a referenciával. Két törzs esetében egyedi, csak kiválasztószervrendszeri tüneteket mutató állatokból származó törzsekben előforduló motívumokat találtunk: A19, D38, H43, Y56, T63, T66 és A69 (211776/Imrehegy/2011) és I19, N38, H43, F56, R63, T66 és V69 (D2804/3/3/13/ID).

10 20 30 40 50 60 70 80

Mass41/USA/1972/FJ904721 MLVTPLLLVTLCCVLCSAALYDS--SSYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNISSESNAGSSPDCCTVGTIIGGRRVFNAS  
D2340/2/1/13/RU MLVTPLLLVTLCCALCSAALYDS--SSYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNISSESNAGSSPDCCTVGTIIGGRRVFNAS  
211776/Imrehegy/2011 MSVTPLLLATLLCCALCSAALYD--NSYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNISSESNAGSSPDCCTVGTIIGGRRVFNAS  
D1446/5/4/10/FE MLGKPLLLVTLWYALCSAALYDK--NTYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAIICRDKVFNSTNNAVSVSDCTAGTFYBSYNISAA  
D1654/1/4/11/RO MLVKSLFLVTLILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVSTNNTNNAGPAHECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D2340/1/2/13/RU MLVKSLFLVTLILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSTNNTNNAGSAQECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D1617/3/11/UA MLVKSLFLVTLILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSINNTNNAGSAHECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D1760/2/2/11/GR MLVKPLFSVTLILCALCSANLFDSDNNYVYYYKSAFRPENGWHLHGGAYAVVHSTNNTNNAGSANECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D1446/6/4/10/FE MLGKSLFLVTLILCALCSANLFDSDANNVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSTNNTNNAGSASECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D2804/4/2/13/ID MLGNSLFFVTLILFALGSAITYN--NNYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNTNNTNNAGSASECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D3386/1/2/16/SA MLGKSLFLVTLILCALCSANLFDSSNTYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNSTNNTNNAGPAHECTVGVIRKDVYNQSVAA  
D2804/3/3/13/ID MLGKSLFIVTLILFALGSAITYN--NDYVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNVSEBFNAGPAHECTVGVIRKDRVFNAS  
D2697/5/2/13/SA MLVKSLFIVTLILFALCSAALFDN--NETVYYYQSAFRPENGWHLHGGAYAVVNVSLAYANAQPT--CTVGTIIGWSKNFSAA

25. ábra A kiválasztószervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (1-80 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva. Az aminosavak egyetlen karakterként jelennek meg, a kiemelt aminosav pozíciók piros keretben kiemelve találhatók.

7. táblázat. A különböző tünetegyütteseket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 RBD szekvenciájának kiemelt pozícióiban található aminosav szekvenciák a referencia M41 törzshöz viszonyítva. A referencia szekvenciával való egyezés esetén félkövér betűtípussal kiemelve.

| S aminosav pozíció |          |          |          |          |          |          | Előfordulás (szövettopizmus)                     | Előfordulás (gyakoriság) |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|--------------------------|
| 19                 | 38       | 43       | 56       | 63       | 66       | 69       |  |                          |
| <b>A</b>           | <b>N</b> | <b>H</b> | <b>S</b> | <b>P</b> | <b>I</b> | <b>T</b> | <b>M41 referencia</b>                            |                          |
| A                  | D        | H        | T        | S        | I        | A        | légzőszervrendszeri, bélrendszeri                | 5                        |
| A                  | T        | H        | Y        | G        | T        | S        | légzőszervrendszeri                              | 12                       |
| A                  | D        | H        | Y        | P        | T        | A        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | N        | Q        | T        | S        | T        | V        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 2                        |
| I                  | N        | Q        | T        | S        | T        | V        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 2                        |
| N                  | N        | Q        | T        | H        | T        | V        | bélrendszeri, légző- és kiválasztószervrendszeri | 4                        |
| N                  | N        | Q        | T        | Q        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 2                        |
| N                  | N        | Q        | T        | Q        | T        | V        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 2                        |
| N                  | I        | Q        | T        | H        | T        | V        | bélrendszeri, légző- és kiválasztószervrendszeri | 1                        |
| N                  | T        | Q        | T        | Q        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | N        | Q        | T        | R        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | N        | Q        | T        | N        | T        | V        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 1                        |
| N                  | N        | Q        | T        | E        | T        | V        | bélrendszeri, légző- és kiválasztószervrendszeri | 2                        |
| N                  | N        | Q        | T        | E        | T        | -        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | D        | Q        | T        | D        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| L                  | Q        | H        | T        | S        | T        | T        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 3                        |
| S                  | P        | H        | T        | S        | T        | T        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| A                  | D        | H        | S        | S        | T        | I        | légzőszervrendszeri, kiválasztószervrendszeri    | 1                        |
| I                  | N        | H        | F        | R        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | G        | H        | N        | S        | T        | V        | légzőszervrendszeri                              | 2                        |
| N                  | H        | H        | N        | P        | T        | A        | légzőszervrendszeri                              | 1                        |
| N                  | N        | H        | S        | R        | T        | A        | légzőszervrendszeri, bélrendszeri                | 1                        |
| L                  | G        | H        | T        | S        | T        | V        | bélrendszeri                                     | 1                        |
| N                  | G        | H        | N        | -        | T        | V        | bélrendszeri                                     | 1                        |
| A                  | T        | H        | Y        | -        | T        | A        | bélrendszeri, kiválasztószervrendszeri           | 1                        |
| A                  | D        | H        | Y        | T        | T        | A        | kiválasztószervrendszeri                         | 1                        |
| I                  | N        | H        | F        | R        | T        | V        | kiválasztószervrendszeri                         | 1                        |

Bouwman és mtsai. (2020) korábban arra az eredményre jutottak, hogy a QX-RBD 99-159. aminosavait magában foglaló régió, különös tekintettel az M41 törzs  ${}_{110}\text{MLQ}_{112}$  aminosav motívumának megfelelő pozíciókban található  ${}_{110}\text{KIP}_{112}$  aminosavak szükségesek a vese sejtjeihez való kötődéshez. Ezért elemzéseink során kitértünk ennek a régióknak vizsgálatára is. A kiválasztószervrendszeri elváltozásokat mutató madaraktól származó törzsek azonban egy esetben sem mutatták a  ${}_{110}\text{KIP}_{112}$  aminosav motívumot. A vizsgált törzsek esetében az adott pozíciókban az MLQ/MIP/MIA/LIP vagy QLH aminosav tripeptidek voltak megtalálhatóak (26. ábra).



**26. ábra** A kiválasztószervrendszeri tüneteket mutató állatokból izolált IBV törzsek S1 N-terminális (9-180 as) aminosav szekvenciái a referencia M41 törzshöz viszonyítva. Az aminosavak egyetlen karakterként jelennek meg, a kiemelt aminosav pozíciók piros keretben kiemelve találhatók.

A QX-szerű GI-19 vonalba tartozó törzsek vizsgálata során sem találtunk  ${}_{110}\text{KIP}_{112}$  aminosav motívumot. A vizsgált törzsek megfelelő pozícióiban MIP/MIA vagy MVA aminosav tripeptidek fordultak elő és esetenként deléción történt ebben a régióban. A GI-19 vonalba tartozó törzseken felül megvizsgáltunk más, jellemzően nefropatogén IBV törzseket tartalmazó genetikai vonalakat is. A GI-13 (4/91 vagy 793B) és GI-14 (B1648-szerű) vonalak adott aminosav pozícióiban minden esetben a MIP és LIQ tripeptid motívumok voltak azonosíthatók.

A vizsgált RBD régiók (19-272as) különböző tünetegyütteseket mutató madaraktól izolált IBV törzsei és a referencia M41 törzs megfelelő peptid motívumai között nem volt kimutatható egyértelmű összefüggés. A légzőszervi tüneteket mutató madaraktól izolált törzsek 67,33-74,94%-os aminosav szintű szekvencia azonosságot mutattak az M41 törzssel. Azonban hasonló értékeket mutattak a bélrendszeri (67,19-73,89%) és a kiválasztószervrendszeri (68,38-94,76%) tüneteket mutató állatokból származó törzsek is. Utóbbi csoportban a kiemelkedően magas, 94,76%-os értéket egy GI-1 vonalba tartozó törzs (D2340/2/1/13/RU) esetében tapasztaltuk.

## Aminopeptidáz-N kötőhely motívumok (APN) elemzése

Az IBV tüskefehérjéjének egyik lehetséges funkcionális receptoraként leírt nagy affinitású amino-peptidáz-N (APN) peptid motívumok vizsgálata során a vizsgált törzseket az irodalomban korábban elemzett referencia M41 törzzsel hasonlítottuk össze. A különböző tünetegyüttest mutató csirkékből származó törzsek mellett az egyes genetikai vonalakba tartozó törzsek csoportjait is vizsgáltuk.

Az M41 IBV S1 N-terminális doménjében felismerhető 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLH-43 és az S2 fehérjén található 913-YxFxGN-917 APN peptid motívumok saját törzsekkel történő összehasonlítása során az aminosav szubsztitúcióknak köszönhetően összesen 19 különböző aminosav konstellációt figyeltünk meg, melyek a 26-Y/F/TxYY-29, 34-F/YxPP/S/G/A/F/RxxWxL/I/MH/Q-43 és 913-YxFxGS/I/N-917 voltak (**8. táblázat és 27. ábra**). Ezek közül a saját törzsek között a leggyakoribb (41/102) motívumok a 26-YxYY-29, 34-FxPPxxWxL**Q**-43 és 913-YxFx**GS**-917 voltak, melyeket főként a GI-19 genetikai vonalba sorolható törzsek körében figyeltünk meg.

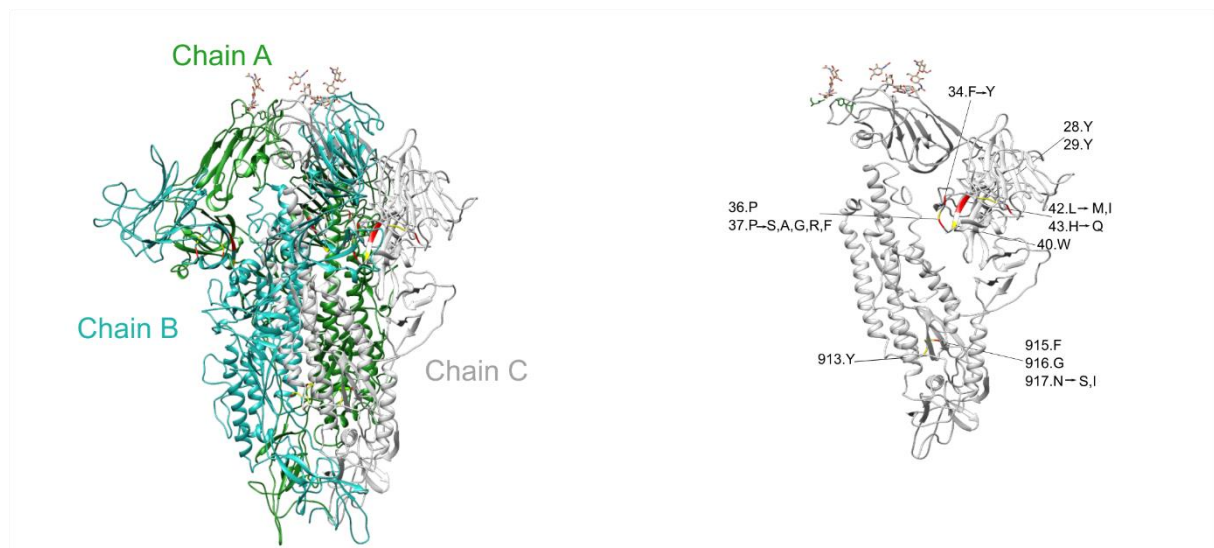
**8. táblázat.** Az egyes IBV törzsek S1 RBD szekvenciájának kiemelt pozícióiban található aminosav szekvenciák a referencia M41 törzshöz viszonyítva. A referencia szekvenciától való eltérés esetén félkövér betűtípussal kiemelve.

| Előfordulás                 | S aminosav pozíció |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | Gyakoriság |
|-----------------------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
|                             | 26                 | 28       | 29       | 34       | 36       | 37       | 40       | 42       | 43       | 913      | 915      | 916      | 917      |            |
| <b>M41 referencia</b>       | <b>Y</b>           | <b>Y</b> | <b>Y</b> | <b>F</b> | <b>P</b> | <b>P</b> | <b>W</b> | <b>L</b> | <b>H</b> | <b>Y</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>N</b> |            |
| variáns                     | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | P        | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | N        | 1          |
| GI-14, variáns, rekombináns | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>S</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | N        | 4          |
| GI-13                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>G</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | N        | 4          |
| GI-1, GI-19                 | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | P        | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 4          |
| GI-19, GI-25                | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | P        | W        | L        | <b>Q</b> | Y        | F        | G        | N        | 2          |
| variáns                     | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>A</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | N        | 1          |
| GI-13                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>S</b> | W        | <b>I</b> | H        | Y        | F        | G        | N        | 1          |
| GI-19, rekombináns          | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | P        | W        | L        | <b>Q</b> | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 41         |
| GI-21                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>S</b> | W        | <b>M</b> | H        | Y        | F        | G        | N        | 3          |
| GI-13                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>G</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 2          |
| GI-19                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | P        | W        | L        | <b>Q</b> | Y        | F        | G        | <b>I</b> | 1          |
| GI-11                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>F</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 1          |
| variáns                     | Y                  | Y        | Y        | <b>Y</b> | P        | P        | W        | <b>M</b> | H        | Y        | F        | G        | N        | 1          |
| GI-19                       | Y                  | Y        | Y        | F        | P        | <b>R</b> | W        | L        | <b>Q</b> | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 1          |
| GI-9, GI-27                 | <b>F</b>           | Y        | Y        | F        | P        | <b>G</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | N        | 5          |
| GI-23                       | <b>T</b>           | Y        | Y        | F        | P        | <b>S</b> | W        | <b>M</b> | H        | Y        | F        | G        | N        | 13         |
| GI-16                       | <b>T</b>           | Y        | Y        | F        | P        | <b>A</b> | W        | L        | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 13         |
| GI-23                       | <b>T</b>           | Y        | Y        | F        | P        | <b>S</b> | W        | <b>M</b> | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 3          |
| GI-23                       | <b>T</b>           | Y        | Y        | F        | P        | <b>F</b> | W        | <b>M</b> | H        | Y        | F        | G        | <b>S</b> | 1          |



Az APN motívumok aminosav szekvenciája csupán egy egyedi variáns törzs (D2586/4/6/13/PH) esetében egyezett meg a referenciával. 18 törzs esetében az egyes motívumok csupán 1-1 aminosav pozícióban tértek el a referenciától, mely hat különböző aminosav konstellációt jelent. Négy-négy esetben: 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLH-43 és 913-YxFxGS-917 vagy 26-YxYY-29 és 34-FxPSxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 vagy 26-YxYY-29 és 34-FxPGxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917. Három esetben: 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxMH-43 és 913-YxFxGN-917. Két esetben: 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLQ-43 és 913-YxFxGN-917. Egy esetben a 26-YxYY-29 és 34-FxPAxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 motívumokat figyeltük meg. 52 törzs esetében két aminosav pozícióban volt eltérés, mely hét különböző aminosav konstellációt jelent. 27 törzs esetében figyeltünk meg három pozícióban eltérést, ez három aminosav konstellációban nyilvánult meg. Míg négy aminosav eltérést összesen négy törzs esetében tapasztaltunk és kétféle aminosav konstellációt azonosítottunk (8. táblázat).

A genetikai vonalak szerinti csoportosítás során a GI-1 vonalba tartozó törzsek egységesen 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLH-43 és 913-YxFxGS-917 motívummal rendelkeztek. A GI-9 és GI-27 vonalak képviselői minden esetben két szubsztitúcióval a 26-FxYY-29 és 34-FxPGxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 motívumot tartalmazták. A GI-11 vonal egyetlen képviselőjében a 26-YxYY-29 és 34-FxPFxxWxLH-43 és 913-YxFxGS-917 motívum volt látható. A GI-13 vonalba tartozó törzsek körében általában egy szubsztitúcióval a 26-YxYY-29 és 34-FxPGxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 motívum fordult elő leggyakrabban. A GI-14 vonalba tartozó törzsek esetében a 26-YxYY-29 és 34-FxPSxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 motívumot figyeltük meg.



**27. ábra** Az S fehérje APN motívumaiban található aminosavak és szubsztitúciók  
Az S fehérje homotrimer három színnel jelölve. Az S fehérje monomerben a motívum megfelelő aminosav pozíciói pirossal jelölve A modell a <https://swissmodel.expasy.org/> weboldal, az egyéni formázás és színezés a Chimera 1.14 szoftver segítségével készült (Pettersen et al., 2004).

A GI-16 vonalba tartozó törzsek egységesen két szubsztitúciót és a 26-TxYY-29 és 34-FxPAxxWxLH-43 és 913-YxFxGN-917 motívumot tartalmazták. Az általunk vizsgált törzsek körében tapasztalt leggyakoribb 26-YxYY-29, 34-FxPPxxWxLQ-43 és 913-YxFxGS-917 motívum jelent meg három törzset leszámítva (39/42) a GI-19 vonalba tartozó törzsek mindegyikében. A GI-21 vonal képviselői esetében minden esetben a 26-YxYY-29 és 34-FxPSxxWxMH-43 és 913-YxFxGN-917 motívumot figyeltük meg. A GI-23 vonalba tartozó törzsek minden képviselője négy szubsztitúcióval rendelkezett a vizsgált motívumokban és leggyakrabban (16/17) a 26-TxYY-29 és 34-FxPSxxWxMH-43 és 913-YxFxGS-917 konstelláció fordult elő. A GI-25 vonalba tartozó egyetlen törzs esetében a 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLQ-43 és 913-YxFxGN-917 motívum volt megtalálható.

Az egyes pozíciókban azonosított aminosav szubsztitúciók általában az egyes genetikai vonalakhoz voltak köthetőek, a törzsek feltételezett szervotropizmusa és a motívumok között a vizsgálatba bevont törzsek esetében nem találtunk összefüggést.

### **A hipervariábilis régiók (HVR) elemzése**

A szekvencia heterogenitás az S gén S1 alegységén belül nagyrészt három különböző hipervariábilis régióban (HVR1, HVR2 és HVR3) a legmagasabb (Moore et al., 1997). A szakirodalmi adatok azonban nem egységesek a HVR-ek pontos nukleotid pozícióit illetően. A leggyakrabban a 114-201 (38-67 as), 297-423 (91-141 as) és 822-1161 (274-387 as) nukleotid pozíciókat határozzák meg hipervariábilis régiókként (Bourogâa et al., 2009; Khataby et al., 2016). Más információk alapján azonban a HVR1 a 114-153 (38-51 as) vagy a 130-207 (50-69 as), a HVR2 a 297-345 (99-115 as) vagy a 351-393 (117-131as) nukleotid pozíciókban található (Cavanagh et al., 1988; Niesters et al., 1986).

Az általunk vizsgált 102 törzs S1 gén nukleotid szekvenciájának a referencia M41 törzshöz való illesztése során a legtöbb, együtt csoportosuló nukleotid eltérést, a 141-192 (47-64 as) és 345-426 (115-142 as) régiókban található nukleotid pozíciókban tapasztaltunk. Ezen régiók egymáshoz viszonyított nukleotid szintű genetikai távolságai elérték akár a 61,82 és 74,73%-ot (70,97 és 66,66% as szinten).

Amennyiben az S1 fehérje aminosav szekvenciáinak illesztése során a leggyakrabban meghatározott HVR pozíciókat (38-67 as, 91-141 as és 274-387 as) vettük figyelembe, számos konzervált aminosav pozíciót figyeltünk meg. A HVR1 következő pozícióiban lévő megőrzött aminosavak a 102 törzs és az M41 referencia esetében a G39, W40, G44, A46 és C65 voltak. A HVR2 esetében a 102 törzsben az M41 referenciához viszonyítva konzervált aminosavak a W92, F97, C98, A100, C102, F104 és 109-VFVTH-113 voltak. A HVR3 esetében a 102 törzsben az M41 referenciához viszonyítva a rögzült aminosavak a 276N, 280A, 282-FN-283, 594-QT-295, 297-TA-298, 301G, 303Y, 306N, 308-SF-309, 313F, 315Y,

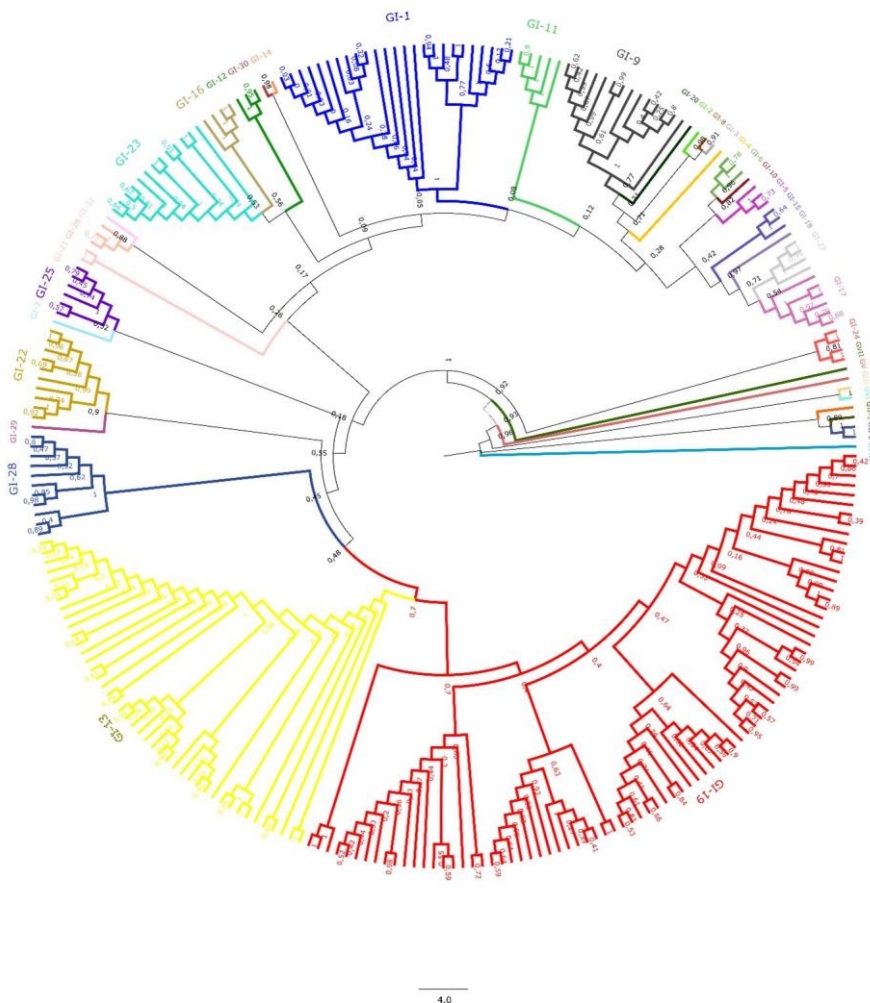
322-YGS-324, 326-HP-327, 329C, 331F, 334E, 337N, 340-LWFNSL-345, 348S, 351-YGP-353, 371-VF-372, 377-TCCYAYS-384 és a 386G voltak.

### 9.3 Az IBV genetikai vonalainak földrajzi elterjedése

Az IBV ismert genotípusai (GI-GVIII) közül a GI genotípusba tartozó törzsek a legváltozatosabbak és az irodalmi adatok alapján a legelterjedtebbek. A dolgozatban alapvetően a GI genotípusú törzsek elemzését végeztük el.

A GenBank adatbázisban elérhető összesen 3590 IBV S1 gén szekvencia (beleértve 502 teljes genomot) túlnyomó része, 66,1%-a (n=2375) Ázsiából izolált törzsektől származik, az ázsiai törzsek 88,4%-a (n=2099) pedig kínai eredetű. A fennmaradó szekvenciák származási hely alapján történő megoszlása a következőképpen alakult: 12,7% (n=455) Észak-Amerika, 1,9% (n=70) Közép- és Dél-Amerika, 6,5% (n=232) Európa, 4,9% (n=177) a Közel-Kelet, 1,8% (n=65) Afrika, 1,7% (n=63) pedig Ausztrália és Új-Zéland területéről származott (**28. ábra**).

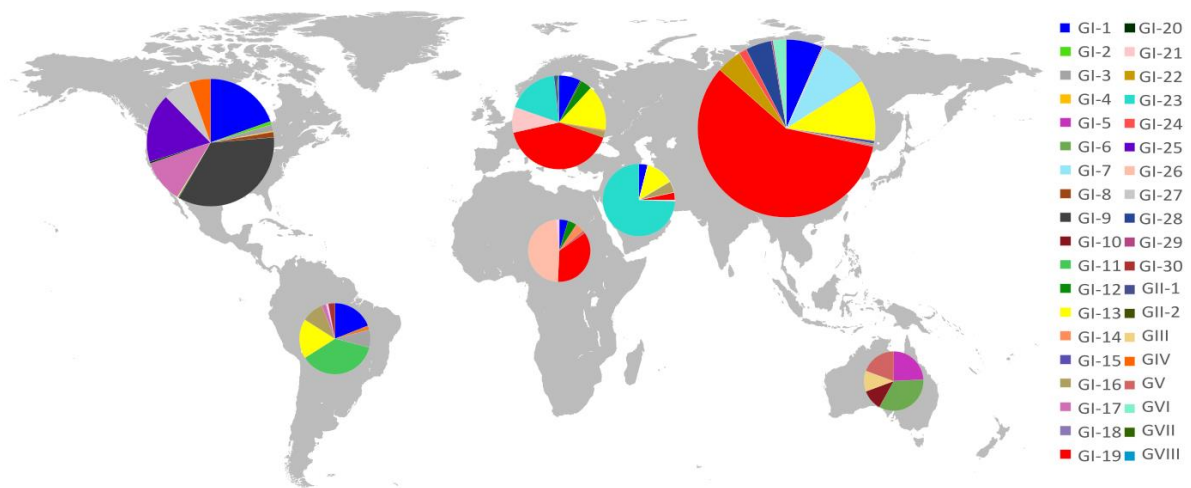
Elemzéseink során a GenBank adatbázisban elérhető szekvenciákat a saját törzsgyűjtemény 102 szekvenciájával is kiegészítettük. Így a genotípusok és genetikai vonalak megoszlását további 8 afrikai (Dél-Afrikai Köztársaság, Elefántcsontpart, Ghána, Kamerun, Szudán), 21 ázsiai (Fülöp-szk., Indonézia, Távol-Kelet), 31 európai (Fehéroroszország, Görögország, Hollandia, Lengyelország, Magyarország, Oroszország, Portugália, Románia, Törökország, Ukrajna), 3 észak-amerikai (USA), 7 közép- és dél-amerikai (Argentína, Brazília, Mexikó, Peru), valamint 32 közel-keleti (Egyesült-Arab Emírségek, Egyiptom, Irán, Jordánia, Libanon, Marokkó, Szaúd-Arábia) eredetű törzs bevonásával vizsgáltuk.



**28. ábra** Az *Avian coronavirus* genotípusait és genetikai vonalait bemutató teljes S1 szekvenciák alapján készült nukleinsav alapú filogenetikai fa.

A filogenetikai fa 200 reprezentatív törzs alapján készült az egyes vonalak előfordulási arányának megfelelően. A fa generálása a maximum-likelihood módszerrel és a megfelelő szubsztitúciós modell kiválasztásával történt a MEGA X szoftver segítségével. A teljes S1 szekvencia elemzés alapján azonos vonalba tartozó törzsek színkódolása megegyezik az 29. ábrával.

Összességében elmondható, hogy noha a világszerte elterjedt GI-1 vonal Auszália és Új-Zéland kivételével mindenhol előfordult, az összes genotípusba sorolható törzs ( $n=3514$ ) közül csupán 8,0% tartozott ebbe a genetikai vonalba. (**28. ábra**: kék szín). A globálisan elterjedt IBV genetikai vonalak közül a leggyakoribb a GI-19 vonal (42,8%) (**28. ábra**: piros), melybe az európai minták 40,5%-a, az ázsiai mintáknak pedig 56,0%-a volt sorolható (Észak-Amerikában és Ausztráliában nem fordult elő). Az Afrika és Auszália kivételével mindenhol előforduló GI-13 vonalba (**28. ábra**: sárga) a genotipizált törzsek 9,3%-a, az Európában és a Közel-Keleten uralkodó GI-23 vonalba (**28. ábra**: türkiz) a törzsek 4,7%-a, az Észak-Amerika és Auszália területét leszámítva globálisan elterjedt GI-16 vonalba (**28. ábra**: barna) pedig csupán a 0,9%-a volt sorolható (**28. és 29. ábrák**).



**29. ábra** Az Avian coronavirus egyes genetikai vonalainak eloszlása földrajzi régiók szerint a GenBank adatbázisban található S1 szekvenciák alapján (Észak-Amerika, Közép- és Dél-Amerika, Afrika, Ázsia, Európa, Közel-Kelet és Ausztrália és Óceánia). A kördiagramok mérete arányos a földrészen előforduló törzsek számával.

Az Észak-Amerika területén izolált törzsek 35%-a GI-9, 20%-a GI-1, 18%-a GI-25 és 11%-a GI-17, 7%-a GI-27 vonalakba, 5%-a pedig a GIV genotípusba voltak sorolhatóak. Ezen felül előfordultak még a GI-2, GI-3, GI-4, GI-8, GI-13 és a GI-15 vonalakba tartozó törzsek is, melyek a GI-13 vonal kivételével mind őshonosnak számítanak a földrészen. Észak-Amerika területéről csupán egyetlen GI-13 vonalba tartozó törzs teljes genom szekvenciája volt elérhető a GenBank adatbázisban, mely egy 2017-ben Kanadában, tojástermelési zavarokat okozó járványból izolált törzstől származik (Najimudeen et al., 2021).

A Közép- és Dél-Amerika területéről származó törzsek 54% és 4,2%-a a kizárólag a kontinensen őshonos GI-11 és GI-30 vonalakba tartoztak. A fennmaradó törzsek a globálisan elterjedt GI-1 (17%), GI-13 (6%), GI-16 (14%) és GI-19 (1,4%) vonalakba sorolhatóak. Ezen felül elérhető volt még egy GI-17 vonalba tartozó 2016-ban Costa Rica-i járványból izolált törzs teljes genom szekvenciája is (Villalobos-Agüero et al., 2021). Érdekesség, hogy a GI-17 vonal eredetileg Észak-Amerika területén őshonos. A fenti tanulmány azonban rámutatott, hogy a Costa Rica területén izolált törzs magas fokú azonosságot mutatott a 2016-ban az Egyesült Államok területén cirkuláló törzsekkel. A saját törzsgyűjtemény két mexikói eredetű törzse a GI-9 és GI-25 vonalakba sorolható, melyek leginkább az észak-amerikai régióban jellemzőek.

Az Európából izolált törzsek nagy része a világszerte elterjedt vonalakba tartozott: 7%-a GI-1, 16%-a GI-13, 2,1%-a GI-16, 41%-a GI-19. Ezen felül 4% és 0,4% az Európában és Afrikában őshonos GI-12 és GI-14 vonalakba volt sorolható. A csupán Európában endemikus GI-21 vonalba és GII-1, GII-2 és GVIII genotípusokba a GenBank adatbázisban található európai eredetű törzsek 9; 0,9; 0,4 és 0,4%-a tartozott. Ezen felül a közel-keleti eredetű GI-23 vonalba volt sorolható a törzsek 18%-a.

A Közel-Keleten izolált törzsek jelentős része (74%) a GI-23 vonalba tartozott, ezen felül 4% a GI-1, 13% a GI-13, 5% a GI-16 és 3% a GI-19 globálisan elterjedt vonalakba tartozott.

Az afrikai eredetű izolátumok 48%-a a GI-26 vonalba volt sorolható, mely kizárólag ezen a földrészen fordult elő. A fennmaradó törzsek 5%-a a GI-1, 1,5%-a a GI-16 és 35%-a GI-19 világszerte gyakori vonalakba, 5-5% pedig az Európában és Afrikában endemikus GI-12 és GI-14 vonalakba tartozott.

Az Ázsia területéről izolált törzsek 58%-a GI-19 vonalba volt sorolható. A többi ázsiai törzs 7%-a a GI-1, 11%-a a GI-13 és 0,3%-a a GI-16 világszerte elterjedt vonalakba tartozott. A fennmaradó törzsek az Ázsiában endemikus vonalakba tartoztak: GI-2, GI-3, GI-4, GI-7 (9%), GI-15 (0,5%), GI-18 (0,2%), GI-22 (5%) és GI-28 (5%), GI-29 (0,3%), a GVI (2%) és GVII genotípusba sorolható.

Az Ausztrália és Új-Zéland területén előforduló vonalak összetétele nagyban különbözött a többi kontinensétől, az itt izolált törzsek 24%-a GI-5, 34%-a GI-6, 11%-a GI-10 vonalakba, 11%-a GIII és 19%-a GV genotípusokba volt sorolható.

## **10 Megbeszélés**

### **10.1 Teljes genom alapú elemzések**

#### **10.1.1 Fertőző bronchitis vírus törzsek általános genomszerveződése**

Vizsgálataink során 102 házityúk eredetű *Avian coronavirus* törzs teljes genomjának nukleotid sorrendjét határoztuk meg. Összességében a vizsgált vírustörzsek genomjának felépítése nem tért el jelentősen az irodalomban eddig leírtaktól. Az egyes genomok mérete ~27 kb volt, mely legalább 11, maximum 13 ORF-et kódolt. Néhány törzs esetében hiányzott néhány járulékos fehérjét kódoló gén. Így egy törzs esetében az ORF4b, öt törzs esetében az ORF 4c, míg 18 törzs esetében hiányzott a 6c gén, ez pedig minden esetben a START vagy a STOP kodon hiányában nyilvánult meg. A genomszegmensek felépítésében a kódoló régiók előtt és után nemtranszlálódó szakaszokat azonosítottunk. A kódoló szakaszok monocisztronosnak bizonyultak, az ORF1ab esetében pedig két, részben átfedő leolvasási keretet azonosítottunk, mely összesen 15 fehérjét kódol. A vizsgált törzsek genomja minimum 24, de többségében 26 fehérjét kódolt.

#### **10.1.2 A rekombináció jelentősége a teljes genomban**

Vizsgálatainkat az európai (köztük magyarországi) törzsek elemzésére korlátoztuk, mert a teljes adatbázis elemzését a rendelkezésre álló számítási kapacitás nem tette lehetővé. Elemzéseink során a rekombinációs események többségét a vad típusú törzsek között,

valamint a vad és vakcinatörzsek között mutattuk ki. Ezt a nemzetközi szakirodalom is megerősítette, számos alkalommal beszámoltak vad és vakcina eredetű IBV törzsek közötti rekombinációról. Thor és mtsai. például olyan ázsiai és amerikai eredetű rekombináns vad vírusokról számoltak be, melyekben közös, mindkét régióban immunizálásra használt Mass típusú vakcinákhoz köthető fragmentumokat azonosítottak (Thor et al., 2011). Ezen kívül 4/91 típusú vakcina eredetű rekombináns vírusok jelenlétét igazolták többek között Kínában is, ahol a 4/91-es élő attenuált vakcinákat gyakran alkalmazzák immunizálásra (Liu et al., 2013; Mo et al., 2013). Az elemzés számos olyan eseményt azonosított, amikor az átvitt fragmens több mint 99%-os hasonlóságot mutatott a feltételezett vakcinatörzsszel. A 99%-ot meghaladó azonossági értékekről feltételezhető, hogy a vakcina és a vad típusú törzsek közötti újabb rekombinációs eseményeket reprezentálják, nagy valószínűséggel az esemény kevéssel megelőzhette az adott vad típusú törzs tényleges izolációját vagy egybeesett azzal. Hasonló következtetésekre jutottak néhány észak-amerikai és ázsiai eredetű izolátum elemzése során is (Ren et al., 2020; Thor et al., 2011).

Az elemzésünkbe bevont vakcinatörzsek eredetében elvértve találtunk rekombinációra utaló adatot. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a vizsgált vakcinatörzsek régebbiek voltak (izolálásuk időtartama, 1941-2017), mint az általunk szekvenált vad típusú és a GenBank-i referencia törzsek (2010-2017 és 1984-2017). Ezért az adatok megfelelő értelmezéséhez ki kell emelni, hogy a korábbi és a közelmúltban keringő törzsek közötti eltérés jelentős lehet, és egyes törzsek, amelyeket a vakcinafejlesztéshez használtak, már kihalhattak.

Elemzéseinkben számos esetben kimutatható volt akár több különböző vakcina törzsszel történt rekombináció is. Például a D2022/2/3/RO (GI-19) törzs esetében 99% feletti nukleotid szintű azonosságot figyeltünk meg a 4/91-es és a 1148-as (QX) vakcinatörzsekkel a genom különböző szakaszain. Információink szerint a törzs olyan állományból származik, melyben az állatok IB 88 vakcinát kaptak hat napos korban (CR88 variáns törzs, rokona a 4/91-nek), ezért nagyon is lehetséges, hogy a 4/91 szerű törzsszel való rekombináció az izolálást megelőzően történhetett a vizsgált állományban. Amellett, hogy ez a rekombinációs esemény ritka példája a kettős rekombinációnak, rávilágít az élő, attenuált vakcinák használatának kockázataira.

Egyes törzsek több rekombinációs törésponttal rendelkeztek, ami egybevág számos korábbi eredménnyel. Ren és mtsai. beszámoltak egy kínai eredetű izolátumról, mely valószínűleg többszörös rekombinációs események sorozatából alakult ki és legalább három (egy vad típusú és két vakcina törzs: 4/91 és Conn) rekombinációs törésponttal rendelkezett (Ren et al., 2020). Ezen felül Zhou és mtsai. vakcinázott állományból izoláltak olyan rekombináns vad típusú törzset, amelynek genomjáról bebizonyosodott, hogy vad típusú (Ck/CH/LSC/99I-, tI/CH/LTD3/03-típusú) és vakcinatörzsek (QX-szerű, 4/91 típusú) többszörös templát-váltásából származik (Zhou et al., 2017).

Az izolált törzsek és vakcinák között tapasztalt genotípus-azonosságok (értsd itt lineage vagy genetikai vonal azonosságok) szintén alátámasztják azt a hipotézist, hogy a rekombinációs események bizonyos esetekben abban az állományban zajlottak le, ahonnan a kérdéses izolátumok származnak. Hat esetben azonban a feltételezett vakcina eredetű szülői törzs különbözött az immunizálásra használt vakcinatörzstől. A jelenleg cirkuláló és korábbi európai törzsek elemzése hasonló eredményeket mutatott, így általában nem sikerült pontosan meghatározni a valódi szülői törzseket. A helyzetet tovább árnyalja, hogy az állományok immunizálására használt vakcinatörzsek szekvenciájáról nem volt elérhető adat.

Bár a rekombinációt detektáló programok az egyes rekombinánsokhoz hozzájáruló fő (major) és mellék (minor) szülőszekvenciákat kísérlik meg azonosítani, az itt közölt adatok csak más vírusok szekvenciáit reprezentálják, amelyek a legszorosabb rokonságban állnak az átvitt fragmenst körülvevő szekvenciával (főszekvencia) és a transzferált szakaszhoz nagyon hasonló szekvenciával, és nem utal az átvitt fragmens eredetére vagy forrására. Sok esetben az újonnan áthelyeződött genomi fragmens mutációkon ment keresztül, ami megnehezíti a fő- és mellékszekvenciák összes végpontjának és a major és minor „szülők” azonosítását. Ezen kívül, az áthelyeződött fragmensek át is fedhetnek, ami arra utal, hogy a rekombináció már önmagában is rekombináns vírusok között történt. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy az algoritmusok által azonosított „szülői” szekvenciák nem a fragmens eredeti forrására utalnak.

Vizsgálataink során rekombinációs forró és hideg pontokat is meghatároztunk. Mint azt korábbi tanulmányokban is leírták, a rekombinációs forró pontok, „hot spotok” a teljes genom mentén azonosíthatóak voltak, leginkább a nem-strukturális fehérjéket kódoló régiókban (Lee és Jackwood, 2000; Thor et al., 2011). Esetünkben a rekombinációs töréspontok az ORF1ab régióban (nsp2, nsp3, nsp8, nsp12 és nsp16) és közvetlenül az S gén előtt 5' irányban fordultak elő legnagyobb számban. A legtöbb átvitt fragmens az nsp2, nsp3, nsp16 és S génekhez kapcsolódott. Korábbi tanulmányokban is viszonylag sok töréspontot figyeltek meg az S génen belül és közvetlenül 5' irányban előtte (Estevez et al., 2003; Kusters et al., 1990; Lee és Jackwood, 2001; Thor et al., 2011). Hasonlóan többszörös rekombinációs forró pontokat észleltek az észak-amerikai IBV törzsek elemzésekor az S gén előtti (upstream) pozíciókban, valamint az nsp2, nsp3 és nsp16 génekben (Thor et al., 2011).

A virális replikációhoz létfontosságú nem szerkezeti fehérjéket kódoló ORF 1ab régióban történő rekombináció befolyásolhatja a vírus patogentiását (Armesto et al., 2009). Az nsp2-nek valószínűleg a replikációs komplex Golgi apparátushoz való rögzítésében van szerepe (Hagemeijer et al., 2010). Az nsp3 az nsp 2, 3 és 4 hasításáért felelős papain-szerű proteázdomént (PLP) kódolja, mely I-es típusú interferon (IFN) válasz antagonistája (Zheng et al., 2008). Az nsp3 egy, a koronavírusok körében konzervált ADP-ribóz 1'-foszfatáz (ADRP) aktivitással rendelkező régiót is tartalmaz, melynek a tumornekrózis faktor alfa és az interleukin-6 expressziójának modulálásában is szerepe van (Eriksson et al., 2008;



Gorbalenya et al., 1991). Ezen a területen a rekombináció megváltoztathatja a vírus patogenitását a gazda citokin expressziójának modulálásán keresztül. A primáz aktivitással rendelkező nsp8 az RNS-függő RNS polimeráz nsp12-vel replikációs és transzkripció komplexet képez, mely nélkülözhetetlen a virális RNS replikációjához (Tan et al., 2018). Az nsp16 által kódolt 2-O-ribóz-metiltransferáz (2'O-MTase) az mRNS sapka kialakításáért felelős, ezen felül az nsp16 I-es típusú interferon antagonistája így a vírusreplikáció mellett a patogenitást is jelentősen befolyásolja (Gorbalenya et al., 1989). A burok és a membrán fehérjék a virionok összeszereléséhez nélkülözhetetlenek, ezekben a fehérjékben bekövetkező változások befolyásolhatják a vírusrészecskék képződésének és a vírus terjedésének hatékonyságát.

Vizsgálatunkban a genom 5' és 3' végének közelében és az S gén nagyobb szakaszán találtunk olyan régiókat, úgynevezett rekombinációs hidegpontokat, amelyekben egyáltalán nem, vagy csak korlátozott számban sikerült rekombinációt azonosítani. Ez utóbbi megfigyelés különösen érdekes, és további magyarázatot érdemel. Az S génen belüli rekombinációs események relatív hiánya némileg talán ellentmond az irodalomban publikált adatoknak, és az elemzéseinkhez használt szekvenciaadatokkal állhat összefüggésben (Kiss et al., 2016; Moreno et al., 2017; Wang et al., 1993). A vizsgálatba bevont törzsek és a referenciák véletlenszerű kiválasztása nem azonosított mintavételi torzítást okozhat; ezért a kapott eredmények értelmezése körültekintést igényel. Mindazonáltal nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a biológiai jellemzők (pl. adott pozícióra irányuló szelekciós nyomás vagy a törzsek eltérő rekombinációs képessége ebben a régióban) szerepet játszhattak abban, hogy a kérdéses régiókban alacsony rekombinációs hajlamot kaptunk az elemzéseinkben.

A jól ismert horizontális és vertikális IBV terjedési útvonalak (OIE, 2018) valószínűleg elősegítik a rekombináns törzsek állományon belüli terjedését, de az emberi tevékenység (beleértve a szennyezett eszközök és anyagok mozgását) szintén elősegítheti ezen IBV-k nagy távolságokra történő elterjedését. Vizsgálataink során nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az azonosított rekombináns vad- vagy vakcina-vad típusú rekombináns törzseket távoli területekre hurcolták volna, bár a teljes genom rekombinációelemzésbe bevont törzsek száma korlátozott volt. A rekombináns törzsek hosszú távú fitnessének, valamint távoli állományok közötti terjedési potenciáljának meghatározásához szükséges lenne az epidemiológiai vizsgálatok kiterjesztésére nagyszámú teljes genom szekvencia adat bevonásával.

A genomialis RNS rekombinációja gyors antigéneltolódáshoz vezethet, amennyiben kulcsfontosságú szerkezeti elemeket (például a tüskefehérjét kódoló gén) érint. A tüskefehérjét és más genomi régiókat érintő rekombinációs események bizonyítékait korábban már számos alkalommal publikálták (Lin és Chen, 2017; Valastro et al., 2016). Az S génen kívüli genomi régiókat érintő rekombinációkat azonban a kizárólag az S génre összpontosító vizsgálatok nem veszik figyelembe. A megfelelő védelmet biztosító adaptív immunválaszhoz mind a

sejtes, mind a humorális védelmi vonalra szükség van; ezért a diverzitás mechanizmusainak felderítése a teljes genom mentén kiemelkedően fontos lehet a hatékonyabb védekezési intézkedések megtervezéséhez.

A vizsgált IBV törzsek többségükben térben és időben is izoláltak voltak, emiatt a rekombinációs események időbeli sorrendjét nem lehetett megállapítani. Ennek ellenére az európai eredetű vad, illetve vakcina IBV törzsek közötti rekombinációs események genotípus specificitástól függetlenül gyakorinak bizonyultak. A rekombináció a teljes genom mentén megfigyelhető volt, a leginkább érintett régiók az ORF 1ab és a tüskefehérjét kódoló szakaszok voltak, melyek befolyásolhatják az IBV törzsek pato-, szero- és genotípusát is. Ezért e gyorsan változó vírus elleni védekezés során a megfelelő vakcinatörzsek kiválasztásánál érdemes lehet a rekombinációra való hajlamot is vizsgálni. Mivel a koronavírusok RNS vírusok lévén meglehetősen hajlamosak mutációkra és rekombinációra (Su et al., 2016), várható a különböző genetikai változatok megjelenése, mely a vírus által okozott megbetegedés súlyosságára vagy a terjedés ütemére is hatással lehet.

## **10.2 S gén alapú elemzések**

### **10.2.1 S1 gén alapú rekombinációelemzés**

Vizsgálataink során az elemzésbe bevont 102 törzs teljes S1 gén szekvenciájának illesztésével rekombinációelemzést végeztünk. Az általunk több mint 600 teljes S1 szekvencia illesztésével végzett rekombinációelemzés során összesen 39, az S1 gént érintő rekombinációs eseményt sikerült azonosítani, melyek nagy része genetikai vonalak között (inter-lineage), kisebb hányada pedig az egyes genetikai vonalakon belül (intra-lineage) zajlott le. Könnyen elképzelhető, hogy az intra-lineage rekombinációk gyakorisága ennél nagyobb volt, de a szülői törzsek közötti genetikai rokonság miatt ezeket az eseményeket a szoftver nem azonosította. Mindenesetre az átadott szekvencia szakaszok nukleotid azonossága inter-lineage rekombináció esetén 93,4-99,79%, míg az intra-lineage rekombináció során 95,96-99,77% között alakult. A genom ezen régiójában bekövetkező változások az IBV új genotípusainak és szerotípusainak, vagy akár új koronavírussztrajok megjelenését is eredményezhetik (Jackwood et al., 2010; Pyrc et al., 2006; Worobey és Holmes, 1999).

### **10.2.2 Az S fehérje aminosav szintű elemzése**

#### **Az RBD és HVR szakaszok elemzése**

Az S1 régióban megfigyelt aminosav változások szerepét és a fertőzőképességre gyakorolt hatásait nehéz meghatározni, a rekombináns fehérjékkel végzett kísérletek azonban lehetővé tették egy-egy változás hatásának vizsgálatát.

A rekombinánsan előállított fehérjékkel és rekombináns IBV-kkel végzett fertőzési kísérletek eredményei alátámasztják, hogy az S fehérje aminosav-összetétele hatással van a szervtropizmusra (Casais et al., 2003; Leyson et al., 2016; Promkuntod et al., 2014). *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy az S fehérje receptor-kötő doménjében (RBD) mindössze három aminosav változása a sejtropizmus megváltozását idézheti elő, míg a hipervariábilis régiók (HVR) a vírus elleni neutralizáló antitestek indukálásával hozhatók összefüggésbe (Bouwman et al., 2020; Moore et al., 1997). A rekombináns DNS technológiával expresszált S fehérje doménekkal végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy az M41 törzs S fehérjéjének 19-272. aminosavai elegendőek az IBV légcsőhöz való kötődéséhez (Promkuntod et al., 2014). Az S1 fehérje szerkezetének modellezése alapján a kiemelt pozícióban található négy aminosav a fehérje felszínén helyezkedik el, ami arra enged következtetni, hogy befolyásolhatják a receptor-kötő régió konformációját is (Leyson et al., 2016). Mivel ezek a régiók fontosak a sejtropizmus meghatározásában, vizsgálataink során kitértünk a régióban található aminosav motívumok elemzésére is.

A vizsgált 102 törzs közül 59 esetben rendelkezünk információval a madarakban megfigyelhető tüneteket és elváltozásokat illetően, így az aminosav szubsztitúciók feltételezett szervtropizmusra gyakorolt hatásait csak ezekben a törzsekben tudtuk tanulmányozni. Az RBD régióban a szakirodalmi adatok alapján kiemelt jelentőségű aminosavak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a légzőszervrendszeri tüneteket mutató madaraktól izolált törzsek aminosav szekvenciája egy esetben sem egyezett meg a referencia M41 törzsével. A szubsztitúciók számát és a vizsgált pozíciókban található aminosavak változatosságát jól mutatja, hogy a 48 vizsgált törzsben összesen 22 féle aminosav konstellációt figyeltünk meg. Elemzéseink során külön kitértünk más tünetegyüttest mutató madaraktól izolált törzsek motívumaira is. A kiemelt aminosav pozíciókban megfigyelhető szekvencia és a feltételezett szövettropizmus közt azonban nem találtunk összefüggést, a különböző tünetegyütteseket mutató madaraktól izolált törzsek szekvenciáiban nem ismerhető fel egységes mintázat. Sőt, számos, különböző tünetegyüttest mutató madárból származó törzs aminosav szekvenciája megegyezett a vizsgált pozíciókban. Az adott pozíciókban tapasztalt eltérő aminosav szekvenciák nem feltétlenül eredményezik az adott törzs gyengébb kötődését vagy fertőzőképességének csökkenését. Leyson és mtsai. például arra mutattak rá, hogy az általuk vizsgált Arkansas típusú törzsben azonosított Y43H mutáció fokozta az érett légcsőszövethez való kötődést (Leyson et al., 2016). Megjegyzendő, hogy ezeket az aminosav pozíciókat az M41 referencia törzsben azonosították, amely egy Massachusetts típusú törzs. Más típusú IBV törzsekben eltérő aminosav pozíciók játszhatnak kritikus szerepet a gazdasejthez való kötődésben.

Bouwman és mtsai. korábban arra az eredményre jutottak, hogy a QX-RBD 99-159. aminosavait magában foglaló régió, különös tekintettel az M41 törzs <sup>110</sup>MLQ<sub>112</sub> aminosav

motívumának megfelelő pozíciókban található  ${}_{110}\text{KIP}_{112}$  aminosavak szükségesek a vese sejtjeihez való kötődéshez (Bouwman et al., 2020). Vizsgálataink során azonban a kiválasztószervrendszeri tüneteket és elváltozásokat mutató állatokból származó IBV törzsek egy esetben sem mutatták a QX nefropatogén törzs „KIP” aminosav motívumát. Ezért a vizsgált törzsek esetében sajnos nem tudtuk igazolni a kiemelt pozíciókban található aminosav szekvenciák és az okozott tünetegyüttes/szervtropizmus összefüggéseit. Eredményeink szerint a vizsgált motívumok leginkább a genetikai vonalak alapján és nem az okozott tünetek szerint rendeződnek, ezért a szövettropizmusért felelős aminosavakat nem sikerült azonosítani.

Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy az S fehérjének döntő szerepe van a koronavírusok patogenitásának meghatározásában, de az S fehérjében lévő hipervariábilis régiók (HVR) patogenitásra gyakorolt hatása nem egyértelműen meghatározott (Leparc-Goffart et al., 1997). Az S1 génen belül a nukleotid heterogenitás a három hipervariábilis régióban (HVR1, HVR2 és HVR3) a legmagasabb, melyeket a szakirodalmi adatok a leggyakrabban a 114-201 (38-67 as), 297-423 (91-141 as) és 822-1161 (274-387 as) nukleotid pozíciókban határoznak meg, (Bourogâa et al., 2009; Khataby et al., 2016; Moore et al., 1997).

A vizsgált IBV törzsek a HVR-ek aminosav szekvenciáiban változatos szubsztitúciós mintázatot mutattak. A 102 törzs S1 gén nukleotid szekvenciájának a referencia M41 törzshöz való illesztése során a legtöbb, együtt csoportosuló nukleotid eltérést, a 141-192 (47-64 as) és 345-426 (115-142 as) régiókban található nukleotid pozíciókban tapasztaltunk. Amennyiben az S1 gén aminosav szekvenciáinak illesztése során a leggyakrabban meghatározott HVR pozíciókat (38-67 as, 91-141 as és 274-387 as) vettük figyelembe, számos konzervált aminosav pozíciót figyeltünk meg. A megőrzött régiók arra utalhatnak, hogy az itt található aminosavak nélkülözhetetlenek az S1 fehérje megfelelő működéséhez.

Shan és mtsai. módosították a Beaudette törzs genomját, és hét rekombináns törzset hoztak létre úgy, hogy a Beaudette törzsben lévő HVR-eket a QX-szerű nefropatogén izolátum megfelelő fragmenseivel helyettesítették (Shan et al., 2018). Eredményeik azt mutatták, hogy a QX-szerű törzsből származó HVR-rel rendelkező rekombináns vírusok avirulensek maradtak, ami azt jelzi, hogy csak a HVR-szekvenciák cseréje nem volt jelentős hatással a patogenitásra. Hodgson és mtsai. korábbi eredményei alapján a rekombináns IBV BeauR-M41(S) apatogén természetét azt jelzi, hogy a virulens törzsből származó S fehérje nem feltétlenül elegendő az apatogén Beaudette törzs más génjeit érintő attenuáló mutációk leküzdésére (Hodgson et al., 2004). A koronavírusok patogenitásának meghatározásában az S fehérje mellett a replikáz gén is szerepet játszik, illetve néhány nem strukturális fehérje funkciója is hatással van a vírus kórokozó-képességére (Armesto et al., 2009; Eriksson et al., 2008; Sperry et al., 2005). Noha az S1 régióban található RBD és HVR-ek szekvenciájának elemzése hasznos információkkal szolgálhat az IBV genetikai variációjának

feltérképezésében – sőt akár a genetikai variancia biológiai vonatkozásainak tanulmányozására is alkalmas lehet – javasolt inkább a teljes S1 régió elemzése más antigén régiók bevonásával, amelyek módosíthatják a vírus szero- és patotípusát (Shan et al., 2018).

### **Az aminopeptidáz-N kötőhely motívumainak (APN) elemzése**

Az IBV tüskefehérjéjének egyik lehetséges funkcionális receptoraként nemrégiben azonosított nagy affinitású aminopeptidáz-N (APN) peptid motívumok vizsgálata során a vizsgált törzseket a referencia M41 törzzsel hasonlítottuk össze (Sun et al., 2021). A különböző tünetegyüttest mutató csirkékből származó törzsek mellett az egyes genetikai vonalakba tartozó törzsek csoportjait is vizsgáltuk. Az M41 IBV S1 N-terminális doménjében felismerhető 26-YxYY-29 és 34-FxPPxxWxLH-43 és az S2 fehérjén található 913-YxFxGN-917 APN peptid motívumok saját törzsekkel történő összehasonlítása során az aminosav szubsztitúcióknak köszönhetően összesen 19 különböző aminosav konstellációt figyeltünk meg. Érdekesség, hogy az APN motívumok aminosav szekvenciája csupán egy egyedi variáns törzs (D2586/4/6/13/PH) esetében egyezett meg a referenciával. Az egyes pozíciókban azonosított aminosav szubsztitúciók általában az egyes genetikai vonalakhoz voltak köthetőek, a törzsek feltételezett szervotropizmusa és a motívumok között a vizsgálatba bevont törzsek esetében nem találtunk összefüggést. Hasonló eredményre jutottak GI-7 és GI-19 genetikai vonalakba sorolható japán IBV törzsek S génjének elemzése során is, ahol a 34-FxPPxxWxLH-43 motívum 43. pozíciójában H/Q szubsztitúciót figyeltek meg (Mase et al., 2022).

### **Az S1/S2 fehérje hasítási helyének elemzése**

A dolgozat alapját képező 102 törzs vizsgálata kilencféle S1 fehérje hasítási motívum jelenlétét tárta fel, amelyek közül mindegyik előfordulására van példa a szakirodalomban. A leggyakoribb motívumok a HRRRR (31/102), az RRTRR (19/102), az RRSRR (15/102) és az RRTGR (13/102) voltak. A vizsgált törzsek többségénél a His-Arg-Arg-Arg-Arg (HRRRR) motívum volt megfigyelhető, mely a szakirodalmi adatokkal egybehangzó eredmény, miszerint ez az S1 fehérje egyik leggyakoribb hasítási hely motívuma, főként a GI-19 vonalba tartozó QX-szerű törzsek esetében (Ji et al., 2011; Feng et al., 2014, 2017). Ezt a motívumot kutatócsoportunk is nagyrészt GI-19 vonalba tartozó törzsekben, valamint egy GI-13 vonalba tartozó és egy rekombináns törzsben azonosította. A HRRRR motívum – mint ahogy a GI-19 vonal is – földrajzi elterjedés alapján változatos képet mutatott: afrikai (Libanon, Dél-Afrikai Köztársaság, Szudán), közel-keleti (Irán, Szaúd-Arábia), európai (Fehéroroszország, Görögország, Hollandia, Magyarország, Portugália, Románia, Ukrajna) és távol-keleti eredetű törzsekben egyaránt előfordult. Az általunk elemzett törzsek között a második leggyakoribb motívum az Arg-Arg-Thr-Arg-Arg (RRTRR), mely GI-14 és GI-23 vonalakba sorolható, Afrika és a Közel-Kelet területéről származó (Egyesült Arab Emírségek, Egyiptom, Jordánia,

Kamerun, Libanon, Szaúd-Arábia, Törökország) törzsekben fordult elő. Korábbi referenciák közül számos GI-23 vonalba tartozó törzs rendelkezik ilyen motívummal (Abozeid et al., 2017; Domanska-Blicharz et al., 2020a; Liu et al., 2021; Mousavi et al., 2018).

A vizsgálatunkban szereplő 102 törzsből 15 esetében az Arg-Arg-Ser-Arg-Arg (RRSRR) motívumot találtuk, GI-9, GI-11, GI-13, GI-19, GI-21, GI-25, GI-27 és GI-31 vonalakba tartozó törzsekben. Változatos származású, európai (Görögország, Lengyelország, Magyarország, Románia), amerikai (Brazília, Mexikó, USA), afrikai (Elefántcsontpart), közel-keleti (Marokkó, Szaúd-Arábia) és távol-keleti törzsekben egyaránt megfigyelhető volt. Az 1954-ben izolált, egyik első ismert szekvenciájú fertőző bronchitis vírus törzs (GU393336) S1/S2 hasítási hely motívuma szintén RRSRR (Thor et al., 2011). Az RRSRR valószínűleg egy ősi és gyakori hasítási hely motívum lehet, amelyet számos IBV genotípusban és szerotípusban, sőt más coronavírusokban is megfigyeltek (például Alfa-, Beta- és Gammacoronavírusok esetében) (Feng et al., 2014; Jackwood et al., 2001; Liu et al., 2021).

Az RRTGR motívumot 13, GI-16 vonalba sorolható, afrikai (Elefántcsontpart), közel-keleti (Egyiptom, Törökország, Szaúd-Arábia) és dél-amerikai (Argentína, Peru) eredetű törzsben azonosítottuk, mely gyakori az azonos genetikai vonalba tartozó IBV-k esetében (Franzo et al., 2015). A HRRKR motívumot hét, változatos földrajzi eredetű (Afrika (Ghána), Európa (Görögország, Románia, Oroszország)), GI-19 vonalba tartozó törzsben figyeltük meg. A szakirodalmi adatok alapján gyakori motívum a QX-szerű GI-19 törzsek esetében (Feng et al., 2017; Le et al., 2019; Li et al., 2010). Az RRFRR motívum hat törzs S1 aminosav szekvenciájában jelent meg, melyek származásukat (Indonézia, Magyarország, Oroszország, USA) és genetikai besorolásukat (GI-1, GI-27, egyedi variánsok) tekintve is változatosak voltak. Az RRFRR szintén ősi motívumnak tekinthető, az 1937-ben izolált Beaudette törzs (NC\_001451) és számos 1960-as 70-es évekből származó Mass-típusú törzs is ezzel a hasítási hely motívummal rendelkezik (Binns et al., 1985; McKinley et al., 2011; Mondal et al., 2013). Az RRYRR motívumot öt, távol-keleti eredetű GI-19 vonalba tartozó törzsben azonosítottuk, mely megfelel a korábbi szakirodalmi adatoknak (Khanh et al., 2017; Yan et al., 2011). A Fülöp-szigetek és Mexikó területéről származó, GI-9 vonalba tartozó, rekombináns vagy egyedi variáns törzsekben megfigyelt HRSRR motívum az Arkansas típusú (GI-9) IBV-kre jellemző (Ammayappan és Vakharia, 2009; Wang et al., 1993). A QX-szerű IBV-kre jellemző RRHRR motívum két, indonéz eredetű GI-19 vonalba tartozó törzsben jelent meg, (Li et al., 2010).

A kilenc megfigyelt motívum közül számos csak bizonyos genetikai vonalakba tartozó törzsekben fordult elő, például a HRRKR, RRYRR, RRHRR és RRTGR motívumokat csak GI-19 vonalba tartozó törzsekben figyeltük meg. Az RRTGR aminosav motívum pedig kizárólag a GI-16 vonalba tartozó törzsekben fordult elő. Az RRTRR motívum GI-14 és GI-23 vonalakba tartozó törzsekben, a HRSRR a GI-9 vonalba tartozó és rekombináns vagy egyedi variáns

törzsekben, az RRFRR pedig GI-1, GI-27 és egyedi variáns törzsekben egyaránt megtalálható volt. A széles körben elterjedt RRSRR motívum az általunk elemzett GI-1, GI-11, GI-13, GI-19, GI-21, GI-25, GI-27 és GI-31 vonalakba tartozó törzsekben egyaránt előfordult.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az egyes hasítási hely motívumok általában genotípustól függetlenül fordulnak elő, ezen felül a különböző tünetegyütteseket okozó (légzőszervi vagy nefropatogén) törzsek hasítási hely motívumai között sem találtunk összefüggést. Korábban szintén arról számoltak be, hogy a hasítási hely motívuma sem a patogenitással, sem a szöveti tropizmussal nem áll összefüggésben (Jackwood et al., 2001).

Habár az S1 fehérje felelős a gazdasejtekhez való kötődésért és részt vesz a szöveti tropizmus, a patogenitás és a vírusneutralizáció meghatározásában, a vírus genetikai jellemzői és a betegség klinikai tünetei közötti összefüggést azonban nem bizonyították egyértelműen az IBV esetében (Jackwood et al., 2001). Bár az S1 gén hasítási helyét meghatározó aminosav motívum az erre irányuló vizsgálatok alapján irreleváns a vírus patogenitása és a szöveti tropizmus szempontjából, folyamatos evolúciós változást mutat (Cavanagh és Davis, 1988).

### **10.2.3 Hasonlósági és leszármazási kapcsolatok az S1 gén alapján**

A vizsgált törzsek S1 nukleotid szekvencia alapján történő filogenetikai besorolása során a 102 törzs között a GI genotípus 11 genetikai vonalának képviselőit azonosítottunk. A leggyakoribb a GI-19 volt, mely a vonal globális elterjedését és a GenBank adatbázisban a vonalba tartozó szekvenciák nagy arányát tekintve nem meglepő eredmény (Valastro et al., 2016). A fennmaradó törzsek nagy része a szintén globális elterjedésű GI-13, GI-16 és GI-23 vonalakba tartozik, illetve azonosítottunk még GI-1, GI-9, GI-11, GI-14, GI-21, GI-25 és GI-27 vonalakba tartozó törzseket is. Ezen felül négy törzs egyedi variánsnak (D2334/11/2/13/CI, D2804/3/3/13/ID, D2586/4/6/13/PH, D3276/4/2/16/PH), négy pedig rekombinánsnak (D1623/1/1/11/HU, D2584/12/1/13/PH, D3386/1/2/16/SA, 211776/Imrehegy/2011) bizonyult. Ez összhangban áll az egyedi variánsok és rekombinánsok irodalomban közölt gyakori előfordulásával.

A D1623/1/1/11/HU, D3386/1/2/16/SA és D2584/12/1/13/PH rekombináns törzsek a teljes S1 nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fán a GI-19 vonal tagjai közelében, ám külön ágon csoportosulnak (58. oldalon található **18. ábra**). Az S1 alapú rekombinációelemzés során megállapítottuk, hogy az említett törzseket érintő rekombinációs eseményekben minden esetben részt vett egy-egy GI-19 vonalba tartozó „szülői” szekvencia. A D1623/1/1/11/HU és D3386/1/2/16/SA törzsek teljes S1 gén nukleotid szekvenciája 95,99%-ban egyezett meg egymással. Míg a D2584/12/1/13/PH törzs S1 szekvenciája egy GI-19 vonalba tartozó törzshöz (D1498/2/1/10/FE) hasonlított leginkább. Valamint a GenBank-i

szekvenciák közül GI-19 vonalakba tartozó referenciákkal mutattak 90% feletti nukleotid azonosságot.

A rekombináns 211776/Imrehegy/2011 törzs a saját gyűjteményből egy GI-21 vonalba tartozó törzzsel (D2961/1/1/15/MA, 87,88%), a GenBank-i referencia szekvenciák közül a GI-13 vonalba tartozó törzzsel mutatott magas hasonlóságot (88,56%). A teljes S1 nukleotid szekvenciája alapján készült filogenetikai fán is a GI-13 és GI-21 vonalak tagjai közelében, ám külön ágon helyezkedik el (58. oldalon található **18. ábra**).

Az egyedi variáns törzsek a filogenetikai elemzések alapján nem csoportosulnak egyik korábban meghatározott genotípus genetikai vonalának referencia törzseivel sem és a Valastro és mtsai. által korábban meghatározott 26 egyedi variánssal sem (Valastro et al., 2016). A két Fülöp-szk.-i származású egyedi variáns törzs (D2586/4/6/13/PH és D3276/4/2/16/PH) teljes S1 gén nukleotid szekvenciája között nagyfokú (98,70%) hasonlóságot figyeltünk meg, míg a törzsfán hozzájuk legközelebb elhelyezkedő indonéz egyedi variánssal (D2804/3/3/13/ID) összehasonlítva csupán 84,22 és 83,78% ez az érték. A GenBank-i referencia szekvenciák közül mindkét Fülöp-szk.-i törzs egy-egy GI-7 vonalba tartozó tajvani származású referenciához hasonlított leginkább (87,95 és 87,57%). Az egyedi variánsok további, GI-7 vonalba tartozó törzshöz viszonyítva is egyértelműen elkülönülnek a filogenetikai fán. Filogenetikai elemzéseink alapján a két Fülöp-szk.-i variáns jobban hasonlít egymáshoz, mint bármely más törzs, ami közös evolúciós eredetre utal. A Fülöp-szk.-i izolátumok közös ágat alkotnak az indonéziai törzzsel, de egyértelműen két különálló csoportot alkotnak a GI genotípuson belül. Az indonéz eredetű egyedi variáns (D2804/3/3/13/ID) a szintén variáns D2586/4/6/13/PH törzshöz hasonlított leginkább nukleotid szinten (84,07%), míg a másik két azonos származású, GI-19 vonalba tartozó törzzsel ez az érték a 80%-ot sem érte el. A GenBank-i referencia szekvenciák közül egy malajziai származású, GI-25 vonalba tartozó törzshöz hasonlított leginkább (82,34%).

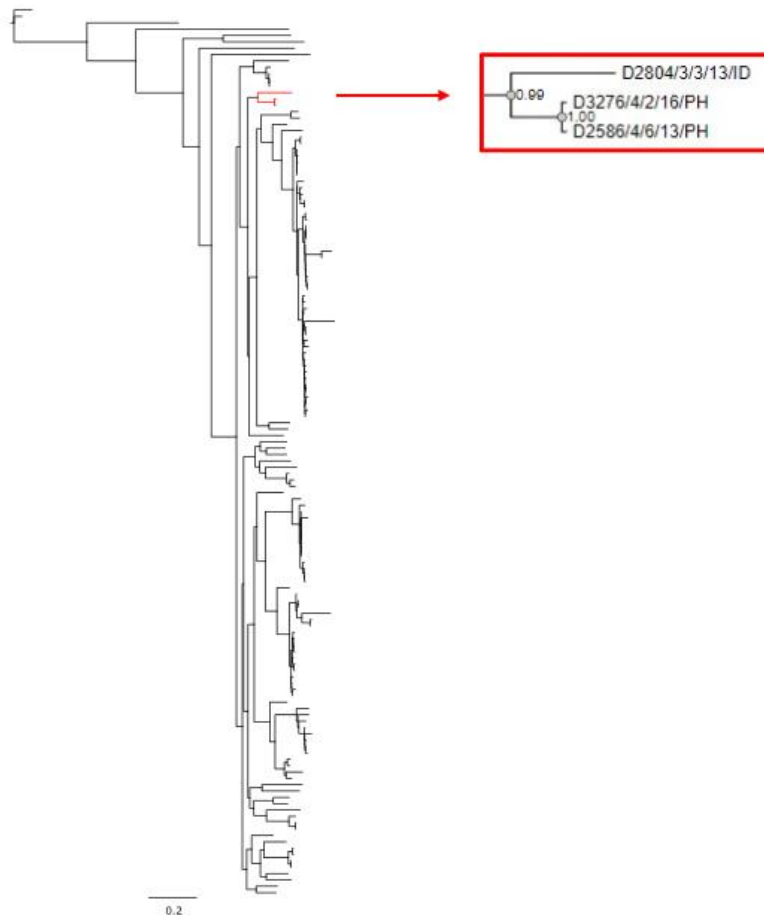
A D2586/4/6/13/PH és D3276/4/2/16/PH törzsek esetében a más genetikai vonalakba tartozó törzsekkel történő összehasonlítás csak alacsony, illetve közepes hasonlóságot mutatott. A nukleotid szekvenciák páronkénti távolság értékei elérték a Valastro és mtsai. által meghatározott 13%-ot. A korábban meghatározott szempontrendszer alapján ahhoz, hogy adott törzsek csoportját új genetikai vonalnak tekinthessük, az alábbi kritériumoknak kell teljesülnie:

- (a) A filogenetikai fa adott csomópontjának magas alátámasztottsága (SH-like érték  $>0.98$ ).
- (b) Legalább három, két különböző járványból származó törzs monofiletikus csoportja.

A Fülöp-szk.-i egyedi variánsok a filogenetikai fán tapasztalt 1,0 ( $>0,98$ ) SH-like értékkel és a külön járványból való származásukkal megfelelnek az új genetikai vonalhoz szükséges feltételeknek (**30. ábra**). Azonban sajnos a régióból elérhető szekvenciák alulreprezentáltsága



miatt nem találtunk a GenBank adatbázisban más, a kérdéses egyedi variánsokkal az S1 gén filogenetikai elemzése alapján monofiletikus csoportot alkotó törzseket. A Fülöp-szk.-i és indonéziai variánsok a filogenetikai fán a GI-7, GI-24 és GI-25 genetikai vonalakba tartozó törzsekkel együtt csoportosulnak.



**30. ábra** Az *Avian coronavirus* nyolc genotípus 38 genetikai vonalába tartozó referenciatörzsek és a saját 102 törzs S1 nukleotid szekvenciái alapján készült filogenetikai fa. A Fülöp-szk.-i és indonéz egyedi variáns törzsek pirossal kiemelve.

Az elefántcsontparti új variáns törzs (D2334/11/2/13/CI) leginkább a saját törzsgyűjteményből származó GI-21 vonalba tartozó marokkói (D2628/1/4/13/MA) törzsre, míg a GenBank-i referencia szekvenciák közül az orosz származású egyedi variáns RF/01/99 törzsre hasonlított leginkább (az egyezés 78,11%). Azonban a filogenetikai elemzések alapján a két egyedi variáns nem alkot monofiletikus csoportot, így közös genetikai vonalat sem. Az elefántcsontparti egyedi variáns törzs a filogenetikai fán az Afrikában regionálisan őshonos és elterjedt GI-26 genetikai vonal tagjaival csoportosul, ám az S1 gén nukleotid azonossági értékek csupán a 78%-ot érik el.

A Valastro és mtsai. által 2016-ban javasolt genotipizálási rendszert kiegészítendő, az S1 gén szekvenciájának filogenetikai elemzése alapján a közelmúltban négy új genetikai vonal és két új genotípus bevezetését javasolták. Többek között a Kínában endemikus GI-28 és GI-29 vonalakat és a GVII genotípust, a GI-30 vonalat Trinidad és Tobago területén, a GVIII genotípust Lengyelországban, a GII-2 vonalat pedig nemrégiben Hollandiában azonosították (Brown Jordan et al., 2020; Chen et al., 2017; Domanska-Blicharz et al., 2020b; Jiang et al., 2017; Ma et al., 2019; Molenaar et al., 2020). Az elegendő mintaszámmal rendelkező, így a kritériumok alapján elfogadott genetikai vonalak képviselői mellett az utóbbi években számos egyedi variánst azonosítottak, például Kenyában, Tunéziában és Thaiföldön (Junnu és Pohuang, 2022; Kariithi et al., 2023; Lachheb et al., 2019).

Egyes variánsok továbbra is csak az eredeti leírásuk földrajzi régióiban, madarak szubpopulációiban cirkulálnak, más variánsok adaptívan önálló genetikai vonalakká evolválódnak, amelyek szélesebb körben elterjedhetnek és megbetegedéseket okozhatnak (Montassier, 2010). A vírus genetikai állományának tulajdonságai mellett egy-egy variáns elterjedésében egyéb tényezők (fogékony gazdafajok, környezeti faktorok) is szerepet játszhatnak. A kérdés, hogy a Fülöp-szk.-i, elefántcsontparti és indonéziai egyedi variánsok milyen mértékben honosodtak meg azonosításuk területén és hogy elterjedhettek-e az országban vagy a régióban, még tisztázásra vár.

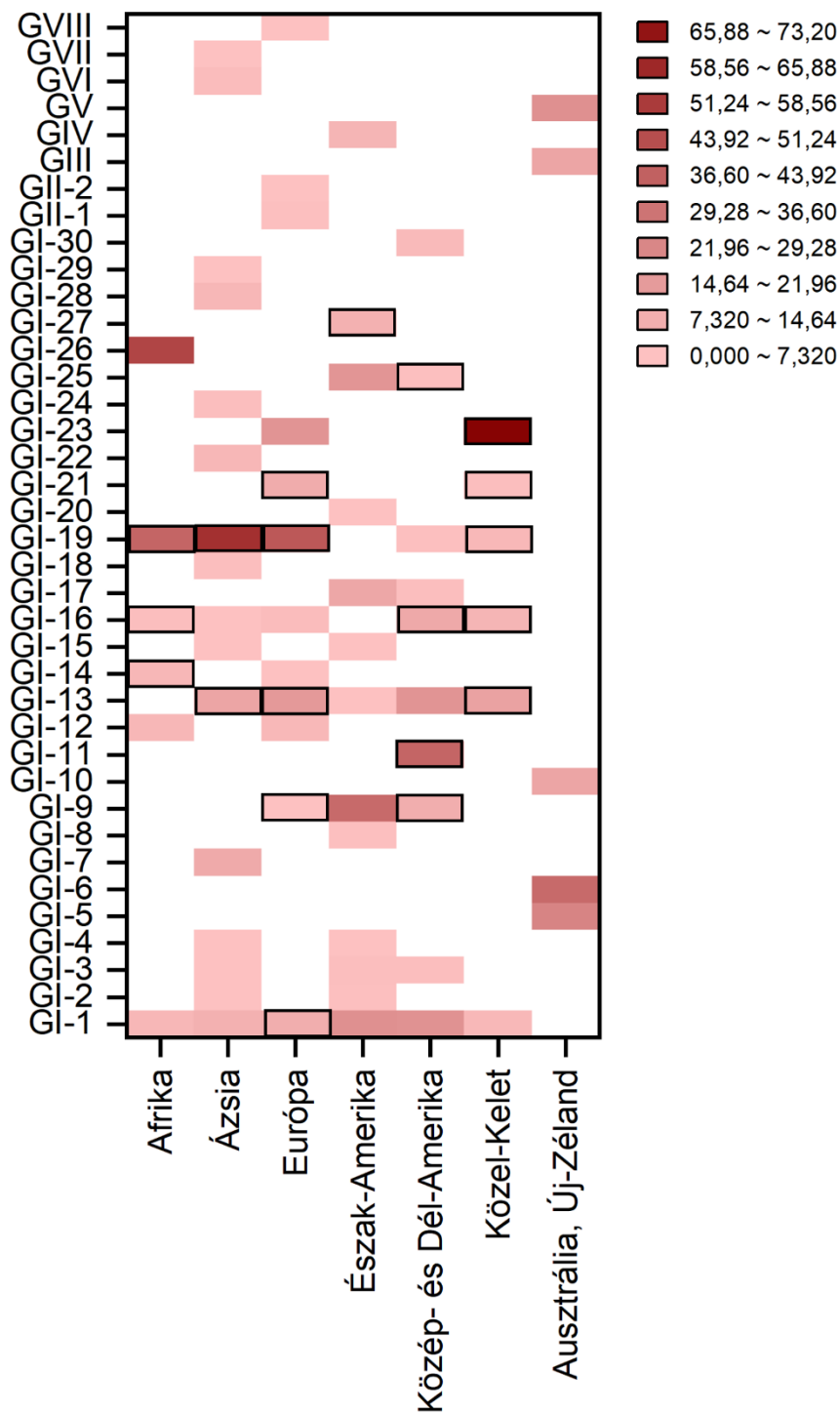
### **10.3 Az IBV genetikai vonalainak földrajzi elterjedése**

#### **10.3.1 Széles körben elterjedt genetikai vonalak**

A GI genotípusú IBV-k néhány genetikai vonalának széles földrajzi elterjedése valószínűleg egyes homológ vakcinák elterjedt használatának tulajdonítható. Így valószínűsíthető, hogy a GenBank adatbázisban található és ezekbe a vonalakba sorolható szekvenciák egy része vakcina törzsektől vagy vakcina eredetű IBV törzsekből evolválódott variánsoktól származik. Az IBV egyes genetikai vonalainak százalékos eloszlását földrajzi régiók szerint a **31. ábrán** látható hőtérkép szemlélteti.

Az elsőként leírt, napjainkban legjobban ismert és elterjedt genetikai csoport a GI-1 vonal. A ma GI-1 vonalba sorolt korai törzsekből állítottak elő elsőként vakcinákat (H120, Mass, M41, Ma5), melyeket napjainkban is minden intenzív baromfitartással foglalkozó országban alkalmaznak. Az IBV elleni első vakcinát az Amerikai Egyesült Államokban fejlesztették ki az 1950-es években, az M41-es törzs használatával (Van Roekel et al., 1942). Ezt követték az 1960-as években Hollandiában az úgynevezett H törzsből készült vakcinák (H120 és H52), melyek hamarosan széles körben elterjedtek (Bijlenga et al., 2004). Napjainkban a GI-1 vonalba tartozó Mass és H120 vakcina törzsek továbbra is a leggyakrabban alkalmazott élő attenuált oltóanyagok közé tartoznak. A GenBank

adatbázisban található szekvenciák 8%-a, valamint a dolgozatban vizsgált 102 törzs közül három a GI-1 vonalba sorolható.



**31. ábra** Az *Avian coronavirus* egyes genetikai vonalainak százalékos eloszlása földrajzi régiók szerint a GenBank adatbázisban található S1 szekvenciák alapján (Észak-Amerika, Közép- és Dél-Amerika, Afrika, Ázsia, Európa, Közel-Kelet és Ausztrália és Óceánia). A leggyakoribb vonalak mélyvörös színűek, amelyek a földrészen előforduló törzsek százalékos arányának csökkenésével halványulnak. A saját gyűjteményben is azonosított vonalak fekete kerettel jelöltek.

A GI-13 vonal (4/91, 793B és CR88) szintén előfordul a világ nagy részén. A CR88 törzs első ismert előfordulásáról Franciaországban, míg a 793B szerotípus megjelenéséről az Egyesült Királyságban számoltak be (Picault et al., 1995; Cook et al., 1996). Ezt követően hamarosan megjelentek a 4/91-es vakcinák, hatásukra pedig a törzshöz köthető megbetegedések visszaszorultak. Azonban mára a kiterjedt immunizálásnak köszönhetően a genetikai vonal világszerte elterjedt. A 793B törzsből Európában az 1990-es években készült vakcinát széles körben alkalmazták, a világ számos országában (pl. az amerikai és afrikai kontinens számos országában) viszont egyáltalán nem. Dél-Amerikai előfordulásának hátterében az állhat, hogy Chilében a GI-16 (Q1) vonalba tartozó törzsek által okozott járványos megbetegedések megelőzésére a szélesebb keresztvédelem elérése érdekében a Mass típusú oltóanyagok mellett bevezették a 4/91 vakcinatörzs használatát (de Wit et al., 2017). Ennek nyomán hat évvel a vakcina bevezetését követően már GI-13 vonalba tartozó vad típusú törzseket izoláltak (Guzmán et al., 2019; GenBank adat).

A GI-13 genetikai vonalat leírták még Észak-Afrikából (Egyiptom, Marokkó) és a Perzsa-öböl térségéből (Szaúd-Arábia, Irán), Észak-Amerikában pedig Kanadából (Jones et al., 2004; Martin et al., 2014; Rohaim et al., 2020). Ezen felül a saját törzsgyűjteményünk GI-13 vonalba tartozó törzsei között (7/102) távol-keleti származású minták is előfordulnak. A GenBank adatbázisban található szekvenciák 9,3%-a, GI-13 vonalba sorolható, melyek között vakcina és vad törzsekhez tartozó szekvenciák egyaránt megtalálhatóak.

Míg a GI-1 és GI-13 vonalak globális elterjedésének oka feltehetően az azonos típusba tartozó törzsekkel végzett vakcinázási programoknak köszönhető, a GI-19 vonalba tartozó (QX-szerű) nefropatogén törzsek térhódítása nem erre vezethető vissza, hiszen a GI-19 vonal elterjedése jóval azelőttre tehető, hogy a belőlük készült homológ vakcinát elkezdték volna alkalmazni. A kínai eredetű QX-szerű törzsek jelentősége annak köszönhető, hogy mind Kínában, mind Európában gyorsan terjedtek el és uralkodó szerotípusává váltak, jelentős gazdasági kárt okozva ezzel a baromfiágazat számára (Terregino et al., 2008). A GenBank adatbázisban található szekvenciák jelentős hányadát a GI-19 vonalba tartozó törzsek teszik ki (42%).

Az első GI-19 vonalba tartozó törzset 1996-ban Kínában azonosították súlyos mirigyes gyomor-gyulladással, vesekárosodással és áltojó-szindrómával együtt járó járványból (Wang et al., 1998). Ez a vonal 2004-ben elérte Európát és néhány év alatt a kontinens szinte összes országában elterjedt. Először Hollandiában számoltak be előfordulásáról (Landman et al., 2005), de hamarosan izolálták Olaszországban (Beato et al., 2005), majd Franciaország, Németország és Belgium (Worthington et al., 2008) területén is. Ezt követően 2006-ban Lengyelországban és Magyarországon (Domanska et al., 2007; Mató et al., 2007), majd 2008-ban Angliában (Gough et al., 2008) és 2011-ben Szlovéniában is megjelent (Krapez et al., 2011). A QX-szerű törzseket az ázsiai régióban Kína mellett később azonosították Japánban,

Dél-Koreában és Thaiföldön is (Mase et al., 2004; Lee et al., 2008; Pohuang et al., 2009), továbbá Oroszországból, Afrika és a Közel-Kelet egyes területeiről is beszámoltak a felbukkanásáról (Amin et al., 2012; Bochkov et al., 2006; Toffan et al., 2011). A saját törzsgyűjtemény tagjai közül számos európai (Fehéroroszország, Görögország, Hollandia, Magyarország, Oroszország, Portugália, Románia, Ukrajna), afrikai és közel-keleti (Dél-Afrikai Köztársaság, Egyiptom, Ghána, Irán, Szaúd-Arábia, Szudán), valamint távol-keleti eredetű törzs a GI-19 vonal képviselőjének bizonyult (42/102).

Napjainkban járványtani szempontból az egyik legnagyobb kihívást (az egyre terjedő GI-23 vonal mellett) jelenleg az Európában először 2004-ben, Hollandiában izolált QX-szerű IBV törzsek jelentik (Landman et al., 2005). Ráadásul az eredeti kínai beszámolóban enyhe proventriculitist okozó típusként írták le, Európában már megváltozott tropizmusról, a vesék és a petevezeték elváltozásairól számoltak be (YuDong et al., 1998; Monne et al., 2008)

A korábban Q1 típusként elnevezett GI-16 vonalba szintén globálisan elterjedt törzsek tartoznak. Többek között izolálták Dél-Amerikában (Argentína, Chile, Kolumbia, Peru és Uruguay), Ázsiában (Kína, Tajvan és Vietnám), a Közel-Keleten (Egyiptom), Európában (Lengyelország, Olaszország, Oroszország és Szlovénia) (Abdel-Sabour et al., 2017; Alvarado et al., 2005; Bochkov et al., 2006; Capua et al., 1999; Chen et al., 2009; Huang et al., 2004; Krapez et al., 2011; Le et al., 2019; Liu et al., 2009; Marandino et al., 2017, 2015; Sesti et al., 2014; Tataje-Lavanda et al., 2019; Toffan et al., 2013; Valastro et al., 2016). A saját törzsgyűjteményből számos afrikai és közel-keleti (Egyiptom, Elefántcsontpart, Szaúd-Arábia, Törökország), valamint dél-amerikai (Argentína, Peru) eredetű törzs sorolható ebbe a vonalba (13/102).

A GI-16 vonalba tartozó törzseket először 1996-ban Kínában írták le mirigyes gyomor gyulladással járó megbetegedések kapcsán, azonban egy retrospektív felmérés során bebizonyosodott, hogy az ezzel megegyező genetikai vonalba tartozó 624/I törzsek már az 1960-as évek óta Olaszország területén cirkulálnak (Yu et al., 2001; Taddei et al., 2012). Habár Olaszországban az 1990-es évektől sporadikussá vált a GI-16 előfordulása, Kínába történő eljutását követően átterjedt Dél-Amerika és a Közel-Kelet területére is. A legújabb filodinamikai elemzések arra engednek következtetni, hogy az utóbbi években a GI-16 vonalba tartozó törzsek Ázsiából visszakerültek Európába (Franzo et al., 2018). A GenBank adatbázisban található szekvenciák 0,9%-a sorolható a GI-16 vonalba.

A GI-23 vonalat alkotó variáns törzsek elterjedése hosszú ideig csupán a közel-keleti régióra korlátozódott, azonban gyors térhódításának és széles körű elterjedésének köszönhetően napjainkban inkább a globálisan elterjedt vonalak közé tartozik. A GI-23 vonal első képviselőjét 1998-ban azonosították Izraelben (Callison et al., 2001), majd az Egyiptomi variáns 1, Egyiptomi variáns 2 és Izraeli variáns 2 törzsek uralkodóvá váltak az egész Közel-Keleten (Abdel-Moneim et al., 2002; Ganapathy et al., 2015; Kahya et al., 2013; Mahmood et

al., 2011; Meir et al., 2004; Najafi et al., 2016; Yousefi et al., 2019). A GI-23 vonalba tartozó törzsek a megnövekedett elhullás mellett változatos klinikai tünetekkel hozhatók összefüggésbe, ide értve a légzőszervrendszeri tüneteket, vesekárosodást és tojástermelési zavarokat (de Wit et al., 2021). Egy 2016-ban Egyiptomban végzett felmérés alapján 14, vad madaraktól izolált IBV törzs a teljes S1 gén szekvencia alapján GI-23 vonalba tartozó IBV törzsnek bizonyult (A Rohaim et al., 2019), ami felveti a vadmadarak szerepét a GI-23 vonal Európában, Ázsiában és Afrikában való terjesztésében.

Európában a GI-23 vonalba tartozó IBV törzsek által okozott megbetegedésekről elsőként 2015-ben számoltak be egy lengyelországi brojler állományból (Lisowska et al., 2017). Ezt követően hamar uralkodó variáns lett az országban, ugyanis a 2018-2019 között kimutatott törzsek több mint 28%-a a GI-23 vonalba tartozott (Domanska-Blicharz et al., 2020a). Egy ebbe a genetikai vonalba tartozó törzset 2019-ben Németországban izoláltak brojler állományokból (Fischer et al., 2020), a közelmúltban pedig Kelet-Európában is jelentették előfordulását (Franzo et al., 2017b; Houta et al., 2021). A GI-23 vonalba tartozó törzsek Nigériában való feltételezhető megjelenésére utal két, GenBank adatbázisban fellelhető részleges S1 gén szekvencia. Egy 2019-ben megrendezésre kerülő konferencián pedig beszámoltak a vonalba tartozó törzsek széles körű afrikai és európai elterjedéséről, Belgiumban, Csehországban, Marokkóban, Ugandában, Zambiában és Zimbabweben is (Tal et al., 2019). Ezen felül a GI-23 vonalba tartozó törzsek nemrégiben Ázsiában is megjelentek (Scherbakova et al., 2018; Sadri et al., 2019). A dolgozatban vizsgált minták közül, 15 többségében közel-keleti származású törzs sorolható a vonalba. A GI-23 genetikai vonalba tartozó törzsek térhódítására utal, hogy a GenBank adatbázisban elérhető 164 teljes S1 gén és 8 teljes genom szekvencia közel 95%-a a közelmúltból származik. Az Európából származó törzsek 17,6%-a, a Közel-Keletről származó törzsek 74%-a sorolható ebbe a vonalba.

### **10.3.2 Egyéb, több kontinensen is előforduló genetikai vonalak**

#### **Ázsia és Észak-Amerika**

A GI-2, GI-3 és GI-4 vonalakba tartozó törzseket az 1950-es és 60-as években írták le először az USA-ban, majd később Ázsiában is kimutatták őket légzőszervrendszeri tünetekkel és vesekárosodással járó megbetegedésekből (Albassam et al., 1986; Bing et al., 2007; Hofstad, 1958; Kwon és Jackwood, 1995; Winterfield és Hitchner, 1962). A korábbi nevezéktan alapján ezekbe a vonalakba sorolhatóak a 'JMK', 'Gray', 'Iowa97' és 'Holte' szerotípusként ismert törzsek. Míg a GI-2 és GI-4 vonalakba tartozó törzsek előfordulásáról az 1950-1960-as évek óta nem számoltak be, GI-3 vonalba tartozó törzsek az 1990-es évek végén újra előkerültek az USA-ban, a 2000-es években pedig Kína, Tajvan és Japán területéről is (Bing et al., 2007; Gelb et al., 2005; Mase et al., 2022).

## **Európa és Afrika**

A GI-12 és GI-14 genetikai vonalak Európában és Afrikában egyaránt előfordulnak, néhány európai országban és Nigériában illetve Oroszországban izolálták őket (Bochkov et al., 2006; Ducatez et al., 2009).

A GI-12 vonalba tartozó D207 és D274-szerű törzseket, 1978-1986 között Hollandia és az Egyesült Királyság területén izolálták légzőszervrendszeri tüneteket és tojástermelési zavarokat mutató állományból (Cook, 1984; Davelaar et al., 1984; Cook és Huggins, 1986). Annak ellenére, hogy a GI-12 vonalba tartozó törzsek cirkulációja jól dokumentáltnak tekinthető, viszonylag kevés szekvencia (összesen 11) érhető el a GenBank adatbázisban, többek között Hollandia, az Egyesült Királyság, Lengyelország, Nigéria és Oroszország területéről (Bochkov et al., 2006; Cavanagh et al., 1992; Cook, 1984; de Wit et al., 2018; Domanska-Blicharz et al., 2020a; Jordi et al., 1989; Koch és Kant, 1990; Kusters et al., 1989; Valastro et al., 2014). Napjainkban a GI-12 vonal Európában alacsony gyakorisággal fordul elő.

A GI-14 vonalba tartozó, B1648-ként ismert vesekárosodást és tojástermelési zavarokat okozó vírusokat elsőként 1984-ben Belgiumban (Meulemans et al., 1987, 2001), majd később Olaszországban azonosították (Capua et al., 1999). A B1648-szerű törzsek az 1990-es években voltak a legelterjedtebbek, azóta szórványosan mutatták ki őket Oroszországban (Bochkov et al., 2006), Franciaország és Németország területén (Worthington et al., 2008), illetve Szlovéniában (Krapez et al., 2011). Afrika területén ez idáig Nigériában számoltak be előfordulásáról, valamint a dolgozatban vizsgált minták között meghatároztunk két kameruni GI-14 vonalba tartozó törzset is (Ducatez et al., 2009).

### **10.3.3 Regionálisan elterjedt őshonos genetikai vonalak**

Terjedelmi megfontolásból a következő bekezdésekben csak a saját törzsgyűjteményben is azonosított regionális elterjedésű genetikai vonalak kerültek részletes leírásra.

#### **Európa**

Az európai kontinensen három vonalat tekintünk őshonosnak, a GI-21, valamint a GII-1 és GII-2 vonalakat, bár az utóbbiakról meglehetősen kevés ismeret halmozódott fel.

A GI-21 vonalba a GenBank adatbázisban található teljes S1 és teljes genom szekvenciák alapján 1997-2011 között izolált törzsek tartoznak (Egyesült Királyság, Olaszország, Spanyolország) (Bochkov et al., 2007; Jones et al., 2005; Keep et al., 2020; Worthington és Jones, 2006). A GI-21 vonal típus-törzse az 1999-ben Olaszországban izolált Italy02 (Bochkov et al., 2007). Ezt követően a GI-21 vonal az egyik legelterjedtebb genotípus lett számos európai országban, többek között Spanyolországban, Szlovéniában, Horvátországban és az Egyesült Királyságban (Dolz et al., 2009; Krapez et al., 2011; Savić et

al., 2011). A GI-21 törzsek ezen felül megjelentek Franciaországban, Görögországban, Hollandiában, Németországban és Oroszországban is (Worthington et al., 2008; Bochkov et al., 2006; Heffels-Redmann és Kaleta, 2004). Egy 2002 és 2006 között végzett felmérés alapján Nyugat-Európában a GI-13 és GI-1 vonalak után a harmadik leggyakoribb genotípus volt (Worthington et al., 2008). Ezek a vírusok légzőszervi tüneteket, tojástermelési zavarokat, fiatal állatokban pedig veseproblémákat okoznak (Worthington et al., 2004; Dolz et al., 2012). Habár a GI-21 vonalba tartozó törzsek sokáig csak Európában fordultak elő, nemrégiben felbukkantak Marokkóban is (Fellahi et al., 2015). A saját törzsgyűjteményünkben található három GI-21 törzs is romániai, illetve marokkói származású.

### **Ázsia**

Jelenlegi ismereteink szerint szigorúan Ázsia területére korlátozódik hét leszármazási vonal és két genotípus előfordulása (Valastro et al., 2016). Ezek a következők: GI-7, GI-15, GI-18, GI-22, GI-24, GI-28, GI-29, GVI-1 és GVII-1.

### **Észak-Amerika**

Számos genotípus és vonal tekinthető őshonosnak Észak-Amerika területén (GI-8, GI-9, GI-17, GI-20, GI-25, GI-27 és GIV-1), azonban ezek közül csak a GI-9, GI-27 és GIV-1 vonalba tartozó törzsek tudtak széles körben elterjedni (Jackwood, 2012).

Habár a GI-9 vonal (Arkansas, Ark) előfordulása csak erre a földrajzi régióra korlátozódik, az egyik leggyakoribb típus, mely az USA területén széles körben elterjedt és légzőszervrendszeri tünetekkel járó járványokat okoz. Gyors terjedése miatt az 1973-as leírását követően rövid időn belül attenuált vakcina törzset fejlesztettek ki ellene (Fields, 1973; Johnson et al., 1973). Az Ark-típusú törzsekből származtatott attenuált vakcinák használata rövid időn belül elterjedt és az 1980-as évekre az egyik leggyakrabban izolált vad típusú törzsnek számított (Gelb et al., 1983). Napjainkban az USA-ban az egyik rendszeresen használt vakcinatörzsek, és gyakorta izolált szerotípusok közé tartozik (Jackwood et al., 2005). A kereskedelmi forgalomban kapható törzset is tartalmazó bivalens vakcinát (IBMM+Ark) előszeretettel használják az Egyesült Királyságban is, így valószínű, hogy a GenBank adatbázisban elérhető GI-9 vonalba tartozó szekvenciák vakcina törzsektől származnak (Worthington et al., 2008). Az Ark-típusú vakcinákat Kínában is gyakran használják a baromfi állományok immunizálására (Liu et al., 2006). Így azt feltételezzük, hogy az adatbázisba feltöltött, kínai eredetű GI-9 vonalba tartozó törzsek inkább ennek a vakcinatörzs reisolációját jelentik, nem pedig vad típusú vírus kimutatását. A saját gyűjteményből összesen két törzs sorolható a vonalba.

Valastro és munkatársai a GI-25 és GI-27 vonalakba sorolták a Georgia és Dél-Karolina államokban 2007-ben és 2008-ban leírásra került, légzőszervi megbetegedéseket okozó két új variáns törzset (GA07 és GA08) (Valastro et al., 2016). A GI-25 vonalba 2004-2013 között izolált törzsek tartoznak (Jackwood et al., 2007; Kulkarni, 2016). Az elsőként 2007-



ben azonosított GI-27 vonalba pedig 2004 és 2015 között izolált törzsek sorolhatóak (Kulkarni és Resurreccion, 2010). Újabb adatok szerint a GI-27 vonalba tartozó törzsek által okozott megbetegedések gyakorisága megnőtt, az általuk okozott gazdasági károk már érezhetőek (Kulkarni, 2016). A saját törzsgyűjteményünkben található észak-amerikai eredetű törzsek a GI-27 vonalba tartoznak. Valamint azonosítottunk egy GI-25 vonalba sorolható mexikói eredetű törzset is, mely a vonal új előfordulásának számít.

### **Közép- és Dél-Amerika**

Az egyik kizárólag Dél-Amerika területén előforduló vonal a GI-11, mely napjainkban is uralkodó típusnak számít egyes országokban (Brazília, Uruguay) (Marandino et al., 2019). A GI-11 vonalba sorolható törzseket először Brazíliában mutatták ki 1975-ben, noha feltételezhetően már az 1950-es évek óta cirkuláltak a régióban (Fraga et al., 2013; Marandino et al., 2019). Később a GI-11 törzseket Argentína és Uruguay területéről is leírták (Marandino et al., 2015; Villarreal et al., 2010; Chacón et al., 2011; Rimondi et al., 2009; Santos Fernando et al., 2017). Az ebbe a genetikai vonalba tartozó törzsek légzőszervrendszeri megbetegedésekkel, meddőséggel, tojástermelési zavarokkal és bélrendszeri tünetekkel hozhatók összefüggésbe (Chacón et al., 2011; Villarreal et al., 2010). A GenBank adatbázisba feltöltött szekvenciák többsége Argentínából, Brazíliából, és Uruguayból származik, valamint a saját gyűjteményünkben is egy brazíliai eredetű törzs sorolható a GI-11 vonalba (Marandino et al., 2017, 2019).

A legújabb GI-30 vonal nemrégiben került leírásra Trinidad és Tobago területén légzőszervrendszeri tüneteket mutató háztáji baromfikból izolált törzsek alapján (Jordan et al., 2020).

### **Afrika**

A GI-26 vonal egy egyedi afrikai csoport, melybe a GenBank adatbázis alapján 2006 és 2007 között Nigériában és Niger területén izolált törzsek (n=32) tartoznak csupán (Ducatez et al., 2009).

### **Ausztrália és Óceánia**

Ausztrália és Új-Zéland területén főként a földrajzi elszigeteltségüknek köszönhetően az IBV evolúciója a világ többi részétől függetlenül zajlott, számos egyedi, csak itt előforduló variánst eredményezve (GI-5, GI-6, GI-10, GIII és GV). Az elszigeteltség miatt a globálisan elterjedt GI-1 vonal itt nem is fordul elő, valószínűleg mert mindig is saját izolátumokból származó vakcinatörzseket használtak a kereskedelmi forgalomban kapható általános import készítmények helyett (Ignjatović és Sapats, 2000).

## 11 Új tudományos eredmények

1. Munkánk során 102 izolátumból álló Avian coronavirus törzsgyűjteményt jellemeztünk teljes genom szekvencia meghatározással. Eredményeink rávilágítottak az Avian coronavirus evolúciós mechanizmusában fontos szerepet játszó rekombináció jelentőségére. Elemzéseink során a genom számos régióját, köztük az S1 gént érintő rekombinációs eseményt sikerült azonosítani.

2. Meghatároztuk öt új, magyarországi eredetű, GI-1 és GI-19 vonalakba tartozó IBV törzs teljes genom szekvenciáját. Valamint azonosítottunk egy S génben rekombináns törzset is, mely többszörös rekombinációs események eredményeként jöhetett létre, és a legnagyobb hasonlóságot GI-13 és GI-21 vonalakba sorolható törzsekkel mutatta.

3. Vizsgálatunkban az nsp8 és nsp12 génekben találtunk új rekombinációs forrópontokat, valamint a genom 5' és 3' végének közelében és az S gén nagyobb szakaszán rekombinációs hidegpontokat azonosítottunk.

4. Elsőként azonosítottunk új egyedi variáns törzseket a Fülöp-szigetek, Elefántcsontpart és Indonézia területéről, melyek a többi referencia törzstől nagymértékben eltérő genomszekvenciájuk alapján akár egy-egy új genetikai vonal első képviselői lehetnek. Valamint Afrika és Közép-Amerika területén eddig le nem írt genetikai vonalakat találtunk (Elefántcsontpart GI-16, Mexikó GI-9, GI-25).

5. A GenBank adatbázisban elérhető teljes genom és teljes S1 szekvenciák, valamint a saját törzsgyűjtemény felhasználásával kiterjesztettük a ma használatos S1 gén alapú genotipizálási rendszert. Ezen kívül, saját adataink integrálásával frissítettük az egyes genotípusok földrajzi megoszlására vonatkozó ismereteket.

6. A dolgozatban vizsgált peptid motívumok tekintetében a szakirodalmi adatokkal ellentétben az egyes aminosav pozíciókban megfigyelhető szekvencia és a feltételezett szövettropizmus közt nem találtunk összefüggést. Eredményeink szerint a vizsgált motívumok leginkább a genetikai vonalak alapján és nem az okozott tünetek szerint rendeződnek, ezért a szövettropizmusért felelős aminosavakat nem sikerült azonosítani.

## 12 Irodalomjegyzék

- A Rohaim, M., F El Naggar, R., M Helal, A., M Bayoumi, M., A El-Saied, M., A Ahmed, K., Z Shabbir, M., Munir, M., 2019. Genetic diversity and phylodynamics of avian coronaviruses in Egyptian wild birds. *Viruses* 11, E57. <https://doi.org/10.3390/v11010057>
- Abd El Rahman, S., El-Kenawy, A.A., Neumann, U., Herrler, G., Winter, C., 2009. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 38, 41–45. <https://doi.org/10.1080/03079450802632049>
- Abdel-Moneim, A., Madbouly, H., Gelb, J., Ladman, B., 2002. Isolation and identification of Egypt/Beni-Suef/01 a novel genotype of infectious bronchitis virus. *Vet. Med. J. - Giza* 50, 1065–1078. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040204>
- Abdel-Moneim, A., 2017. Coronaviridae: Infectious bronchitis virus, in: *Emerging and re-emerging infectious diseases of Livestock*. Springer, Cham, pp. 133–166. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47426-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47426-7_5)
- Abdel-Sabour, M.A., Al-Ebshahy, E.M., Khaliel, S.A., Abdel-Wanis, N.A., Yanai, T., 2017. Isolation and molecular characterization of novel infectious bronchitis virus variants from vaccinated broiler flocks in Egypt. *Avian Dis.* 61, 307–310. <https://doi.org/10.1637/11566-121516-RegR>
- Abozeid, H.H., Paldurai, A., Khattar, S.K., Afifi, M.A., El-Kady, M.F., El-Deeb, A.H., Samal, S.K., 2017. Complete genome sequences of two avian infectious bronchitis viruses isolated in Egypt: Evidence for genetic drift and genetic recombination in the circulating viruses. *Infect. Genet. Evol.* 53, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.006>
- Abozeid, H.H., Paldurai, A., Varghese, B.P., Khattar, S.K., Afifi, M.A., Zouelfakkar, S., El-Deeb, A.H., El-Kady, M.F., Samal, S.K., 2019. Development of a recombinant Newcastle disease virus-vectored vaccine for infectious bronchitis virus variant strains circulating in Egypt. *Vet. Res.* 50, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0631-5>
- Albassam, M.A., Winterfield, R.W., Thacker, H.L., 1986. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 468–476.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarado, I.R., Villegas, P., Mossos, N., Jackwood, M.W., 2005. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis.* 49, 494–499. <https://doi.org/10.1637/7202-050304R.1>
- Amin, O.G.M., Valastro, V., Salviato, A., Drago, A., Cattoli, G., Monne, I., 2012. Circulation of QX-like infectious bronchitis virus in the Middle East. *Vet. Rec.* 171, 530. <https://doi.org/10.1136/vr.100896>
- Ammayappan, A., Vakharia, V.N., 2009. Complete nucleotide analysis of the structural genome of the infectious bronchitis virus strain md27 reveals its mosaic nature. *Viruses* 1, 1166–1177. <https://doi.org/10.3390/v1031166>
- Armesto, M., Cavanagh, D., Britton, P., 2009. The replicase gene of *Avian coronavirus* infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLOS ONE* 4, e7384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007384>
- Ayres, G., Brandão, P., 2016. Avian coronavirus Main Replicase Enzymes at a Glance. *Br. J. Virol.* 3, 161–165. <https://doi.org/10.17582/journal.bjv/2016.3.6.161.165>
- Balka, G., Bálint, Á., Cságola, A., Farsang, A., Kiss, I., Zádori, Z., 2020. A coronavirusok biológiája, különös tekintettel a SARS-CoV-2-re és a COVID-19-re. *Magy. Állatorvosok Lapja* 259–277.
- Bande, F., Arshad, S.S., Bejo, M.H., Moeini, H., Omar, A.R., 2015. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J. Immunol. Res.* 2015, 424860. <https://doi.org/10.1155/2015/424860>
- Beach, J.R., Schalm, O.W., 1936. A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. *Poult. Sci.* 15, 199–206. <https://doi.org/10.3382/ps.0150199>
- Beato, M.S., Battisti, C.D., Terregino, C., Drago, A., Capua, I., Orтали, G., 2005. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Vet. Rec.* <https://doi.org/10.1136/vr.156.22.720>
- Beaudette, F.R., Hudson, C.B., 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 90, 51–60.
- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* 4, 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
- Benyeda Z., Palya V., Rusvai M., 2009. A csirkék fertőző bronchitise. *131* 217–225.

- Benyeda, Z., 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B IBV strains from different pathological conditions. *Avian Pathol.* 38, 449–456. <https://doi.org/10.1080/03079450903349196>
- Benyeda, Z., Mató, T., Süveges, T., Szabó, E., Kardi, V., Abonyi-Tóth, Z., Rusvai, M., Palya, V., 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathol.* 38, 449–456. <https://doi.org/10.1080/03079450903349196>
- Benyeda, Z., Szeredi, L., Mató, T., Süveges, T., Balka, G., Abonyi-Tóth, Z., Rusvai, M., Palya, V., 2010. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. *J. Comp. Pathol.* 143, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.04.007>
- Bhuiyan, Md.S.A., Amin, Z., Rodrigues, K.F., Saallah, S., Shaarani, S.Md., Sarker, S., Siddiquee, S., 2021. Infectious bronchitis virus (*Gammacoronavirus*) in poultry farming: vaccination, immune response and measures for mitigation. *Vet. Sci.* 8, 273. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110273>
- Bijlenga, G., Cook, J.K.A., Gelb Jr., J., De Wit, J.J., 2004. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review. *Avian Pathol.* 33, 550–557. <https://doi.org/10.1080/03079450400013154>
- Bing, G.-X., Liu, X., Pu, J., Liu, Q.-F., Wu, Q.-M., Liu, J.-H., 2007. Different genotypes of nephropathogenic infectious bronchitis viruses co-circulating in chicken population in China. *Virus Genes* 35, 333–337. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0100-5>
- Binns, M.M., Boursnell, M.E., Cavanagh, D., Pappin, D.J., Brown, T.D., 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 4), 719–726. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-4-719>
- Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V., Drygin, V.V., 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol.* 35, 379–393. <https://doi.org/10.1080/03079450600921008>
- Bochkov, Y.A., Tosi, G., Massi, P., Drygin, V.V., 2007. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes* 35, 65–71. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0037-0>
- Boltz, D.A., Nakai, M., Bahra, J.M., 2004. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 48, 909–915. <https://doi.org/10.1637/7192-040808R1>
- Boni, M.F., Posada, D., Feldman, M.W., 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176, 1035–1047. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.068874>
- Bourogâa, H., Miled, K., Gribâa, L., El Behi, I., Ghram, A., 2009. Characterization of new variants of avian infectious bronchitis virus in Tunisia. *Avian Dis.* 53, 426–433. <https://doi.org/10.1637/8666-022609-Reg.1>
- Boursnell, M.E., Brown, T.D., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M., Binns, M.M., 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 1), 57–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-1-57>
- Bouwman, K.M., Parsons, L.M., Berends, A.J., de Vries, R.P., Cipollo, J.F., Verheije, M.H., 2020. Three amino acid changes in *Avian coronavirus* spike protein allow binding to kidney tissue. *J. Virol.* 94(2): e01363-19 <https://doi.org/10.1128/JVI.01363-19>
- Box, P.G., Beresford, A.V., Roberts, B., 1980. Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. *Vet. Rec.* 106, 264–268. <https://doi.org/10.1136/vr.106.12.264>
- Brandt, C.D., Van Roekel, H., Peck, H.A., 1952. An Egg-propagated immunizing agent for the control of infectious bronchitis of chickens. *Poult. Sci.* 31, 1004–1008. <https://doi.org/10.3382/ps.0311004>
- Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C., 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57, 537–547. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90124-4)
- Broadfoot, D.I., Pomeroy, B.S., Smith, W.M., 1954. Effect of infectious bronchitis on egg production. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 124, 128–130.
- Broadfoot, D.I., Smith Jr, W.M., 1954. Effects of infectious bronchitis in laying hens on egg production, percent unsetting eggs and hatchability. *Poult. Sci.* 33, 653–654.
- Broadfoot, D.I., Pomeroy, B.S., Smith, W.M., 1956. Effects of infectious bronchitis in baby chicks. *Poult. Sci.* 35, 757–762. <https://doi.org/10.3382/ps.0350757>
- Brown Jordan, A., Fusaro, A., Blake, L., Milani, A., Zamperin, G., Brown, G., Carrington, C.V.F., Monne, I., Oura, C.A.L., 2020. Characterization of novel, pathogenic field strains of infectious bronchitis

- virus (IBV) in poultry in Trinidad and Tobago. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 2775–2788. <https://doi.org/10.1111/tbed.13637>
- Bru, T., Vila, R., Cabana, M., Geerligs, H.J., 2017. Protection of chickens vaccinated with combinations of commercial live infectious bronchitis vaccines containing Massachusetts, Dutch and QX-like serotypes against challenge with virulent infectious bronchitis viruses 793B and IS/1494/06 Israel variant 2. *Avian Pathol.* 46, 52–58. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1203393>
- Burrell, C.J., Howard, C.R., Murphy, F.A., 2017. Coronaviruses. *Fenner Whites Med. Virol.* 437–446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X>
- Butcher, G.D., Winterfield, R.W., Shapiro, D.P., 1989. An outbreak of nephropathogenic H13 infectious bronchitis in commercial broilers. *Avian Dis.* 33, 823–826.
- Callison, S.A., Jackwood, M.W., Hilt, D.A., 2001. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis.* 45, 492–499.
- Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D., Gough, R.E., 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathol.* 28, 587–592. <https://doi.org/10.1080/03079459994380>
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., Britton, P., 2005. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J. Virol.* 79, 8065–8078. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8065-8078.2005>
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., Britton, P., 2003. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.* 77, 9084–9089. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.9084-9089.2003>
- Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* 38, 281–297. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006055>
- Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34, 439–448. <https://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Cavanagh, D., 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32, 567–582. <https://doi.org/10.1080/03079450310001621198>
- Cavanagh, D., Davis, P.J., 1988. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 3), 621–629. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-3-621>
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K., Li, D., Kant, A., Koch, G., 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21, 33–43. <https://doi.org/10.1080/03079459208418816>
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Mockett, A.P., 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res.* 11, 141–150.
- Cavanagh, D., Davis, P.J., Pappin, D.J., Binns, M.M., Boursnell, M.E., Brown, T.D.K., 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res.* 4, 133–143.
- Cavanagh, D., Naqi, S.A., 2003. *Infectious Bronchitis*. Iowa State University Press, Ames.
- Chacón, J.L., Assayag, M.S., Revollo, L., Astolfi-Ferreira, C.S., Vejarano, M.P., Jones, R.C., Piantino Ferreira, A.J., 2014. Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease. *Br. Poult. Sci.* 55, 271–283. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.903558>
- Chacón, J.L., Rodrigues, J.N., Assayag Júnior, M.S., Peloso, C., Pedroso, A.C., Piantino Ferreira, A.J., 2011. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Pathol.* 40, 153–162. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.544641>
- Chang, C., Hou, M.-H., Chang, C.-F., Hsiao, C.-D., Huang, T., 2014. The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antiviral Res.* 103, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.12.009>
- Chen, H.-W., Huang, Y.-P., Wang, C.-H., 2009. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Virus Res.* 140, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.012>
- Chen, Y., Jiang, L., Zhao, W., Liu, L., Zhao, Y., Shao, Y., Li, H., Han, Z., Liu, S., 2017. Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China. *Vet. Microbiol.* 198, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.017>

- Cheng, J., Huo, C., Zhao, J., Liu, T., Li, X., Yan, S., Wang, Z., Hu, Y., Zhang, G., 2018. Pathogenicity differences between QX-like and Mass-type infectious bronchitis viruses. *Vet. Microbiol.* 213, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.027>
- Chhabra, R., Forrester, A., Lemiere, S., Awad, F., Chantrey, J., Ganapathy, K., 2015. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 Strain. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 22, 1050–1059. <https://doi.org/10.1128/CVI.00368-15>
- Chousalkar, K.K., Roberts, J.R., 2007. Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. *Vet. Microbiol.* 122, 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.021>
- Coleman, C.M., Frieman, M.B., 2013. Emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS Pathog.* 9, e1003595. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003595>
- Collisson, E.W., Pei, J., Dzielawa, J., Seo, S.H., 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 187–200. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00072-5](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00072-5)
- Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B., 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477–485. <https://doi.org/10.1080/03079459994506>
- Cook, J.K.A., 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.* 13, 733–741. <https://doi.org/10.1080/03079458408418570>
- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., 1986. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: Their role in disease. *Avian Pathol.* 15, 129–138. <https://doi.org/10.1080/03079458608436272>
- Cook, J.K.A., Jackwood, M.W., Jones, R.C., 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41, 239–250. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.680432>
- Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B., 1996. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Vet. Rec.* 138, 178–180. <https://doi.org/10.1136/vr.138.8.178>
- Cosgrove, A.S., 1962. An apparently new disease of chickens: avian nephrosis. *Avian Dis.* 6, 385–389. <https://doi.org/10.2307/1587909>
- Crinion, R.A., Hofstad, M.S., 1972. Pathogenicity of two embryo-passage levels of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis.* 16, 967–973. <https://doi.org/10.2307/1588818>
- Davelaar, F.G., Kouwenhoven, B., 1977. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Pathol.* 6, 41–50. <https://doi.org/10.1080/03079457708418211>
- Davelaar, F.G., Kouwenhoven, B., Burger, A.G., 1984. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Vet. Q.* 6, 114–120. <https://doi.org/10.1080/01652176.1984.9693924>
- de Haan, C.A.M., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, P.J.M., 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296, 177–189. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1412>
- de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., Munster, V.J., 2016. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 523–534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
- de Wit, J.J., Cazaban, C., Dijkman, R., Ramon, G., Gardin, Y., 2018. Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathol.* 47, 140–151. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1387231>
- De Wit, J.J., Cook, J.K.A., van der Heijden, H.M.J.F., 2011. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol. J. WVPA* 40, 223–235. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.566260>
- de Wit, J.J., de Wit, M.K., Cook, J.K.A., 2021. Infectious Bronchitis Virus Types Affecting European Countries - A Review. *Avian Dis.* 65. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00106>
- de Wit, J.J., Dijkman, R., Guerrero, P., Calvo, J., Gonzalez, A., Hidalgo, H., 2017. Variability in biological behaviour, pathogenicity, protectotype and induction of virus neutralizing antibodies by different vaccination programmes to infectious bronchitis virus genotype Q1 strains from Chile. *Avian Pathol.* 46, 666–675. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1346782>

- De Wit, J.J., Swart, W. a. J.M., Fabri, T.H.F., 2010. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the alpha-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol.* 39, 123–131. <https://doi.org/10.1080/03079451003604639>
- de Wit, J.J., Cook, J.K.A., 2019. Spotlight on avian pathology: infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 48, 393–395. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1617400>
- de Wit, J.J., Cook, J.K.A., 2014. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol.* 43, 485–497. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.974504>
- de Wit, J.J., De Herdt, P., Cook, J.K.A., Andreopoulou, M., Jorna, I., Koopman, H.C.R., 2022. The inactivated infectious bronchitis virus (IBV) vaccine used as booster in layer hens influences the breadth of protection against challenge with IBV variants. *Avian Pathol.* 51, 244–256. <https://doi.org/10.1080/03079457.2022.2040731>
- Delmas, B., Laude, H., 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* 64, 5367–5375. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.11.5367-5375.1990>
- Derzsy, D., Lomniczi, B., 1966. A tyúkok fertőző bronchitisének előfordulása Magyarországon. *Magy. Állatorvosok Lapja* 194–196.
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J., 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>
- Dobos-Kovács, M., 2014. Házimadarak Kórbonctana. Magyar Állatorvosi Kamara, Budapest.
- Dolz, R., Bertran, K., Majó, N., 2009. First report of IBVQX-like strains in Spain. *VI Int. Symp. Avian Corona- Pneumo-Viruses Complicat. Pathog.* 27–33.
- Dolz, R., Vergara-Alert, J., Pérez, M., Pujols, J., Majó, N., 2012. New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: Characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Vet. Microbiol.* 156, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.001>
- Domanska, K., Śmietanka, K., Minta, Z., 2007. Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 51, 449–452.
- Domanska-Blicharz, K., Lisowska, A., Sajewicz-Krukowska, J., 2020a. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in Poland from 1980 to 2017. *Infect. Genet. Evol.* 80, 104177. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104177>
- Domanska-Blicharz, K., Sajewicz-Krukowska, J., Lisowska, A., 2020b. New PA/1220/98-like variant of infectious bronchitis virus in Poland. *Avian Pathol.* 49, 380–388. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1754332>
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* 40, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90017-4)
- Ducatez, M.F., Martin, A.M., Owoade, A.A., Olatoye, I.O., Alkali, B.R., Maikano, I., Snoeck, C.J., Sausy, A., Cordioli, P., Muller, C.P., 2009. Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. *J. Gen. Virol.* 90, 2679–2685. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012476-0>
- Duff, R.H., Macdonald, J.W., McMartin, D.A., Ross, J.G., 1971. Infection of day-old chicks with infectious bronchitis (IB) virus and subsequent anatomical abnormalities. *Vet. Rec.* 88, 315. <https://doi.org/10.1136/vr.88.12.315>
- Duffy, S., 2018. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol.* 16, e3000003. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Dwars, R.M., Matthijs, M.G.R., Daemen, A.J.J.M., van Eck, J.H.H., Vervelde, L., Landman, W.J.M., 2009. Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.019>
- Eldemery, F., Joiner, K.S., Toro, H., van Santen, V.L., 2017. Protection against infectious bronchitis virus by spike ectodomain subunit vaccine. *Vaccine* 35, 5864–5871. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.013>
- Enjuanes, L., Zuñiga, S., Castaño-Rodríguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., Sola, I., 2016. Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development. *Adv. Virus Res.* 96, 245–286. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.003>
- Eriksson, K.K., Cervantes-Barragán, L., Ludewig, B., Thiel, V., 2008. Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1''-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J. Virol.* 82, 12325–12334. <https://doi.org/10.1128/JVI.02082-08>

- Estevez, C., Villegas, P., El-Attrache, J., 2003. A recombination event, induced in ovo, between a low passage infectious bronchitis virus field isolate and a highly embryo adapted vaccine strain. *Avian Dis.* 47, 1282–1290. <https://doi.org/10.1637/5919>
- Fabricant, J., Levine, P.P., 1962. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection (“air sac” disease). *Avian Dis.* 6, 13–23. <https://doi.org/10.2307/1588023>
- Fang, S.G., Shen, H., Wang, J., Tay, F.P.L., Liu, D.X., 2010. Functional and genetic studies of the substrate specificity of coronavirus infectious bronchitis virus 3C-like proteinase. *J. Virol.* 84, 7325–7336. <https://doi.org/10.1128/JVI.02490-09>
- Fang, S.G., Shen, S., Tay, F.P.L., Liu, D.X., 2005. Selection of and recombination between minor variants lead to the adaptation of an avian coronavirus to primate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.105>
- Fellahi, S., Ducatez, M., El Harrak, M., Guérin, J.-L., Touil, N., Sebbar, G., Bouaiti, E.A., Khataby, K., Ennaji, M.M., El-Houadfi, M., 2015. Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa. *Avian Pathol.* 44, 287–295. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1044422>
- Feng, K., Wang, F., Xue, Y., Zhou, Q., Chen, F., Bi, Y., Xie, Q., 2017. Epidemiology and characterization of avian infectious bronchitis virus strains circulating in southern China during the period from 2013-2015. *Sci. Rep.* 7, 6576. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06987-2>
- Feng, K., Xue, Y., Wang, F., Chen, F., Shu, D., Xie, Q., 2014. Analysis of S1 gene of avian infectious bronchitis virus isolated in southern China during 2011-2012. *Virus Genes* 49, 292–303. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1097-1>
- Fenner, F., Bachmann, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, D.O., 1987. *Coronaviridae*. *Vet. Virol.* 505. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-253055-5.50032-3>
- Fields, D.B., 1973. Case Report: Arkansas 99, a new infectious bronchitis serotype. *Avian Dis.* 659–661.
- Fischer, S., Klosterhalfen, D., Wilms-Schulze Kump, F., Casteel, M., 2020. Research Note: First evidence of infectious bronchitis virus Middle-East GI-23 lineage (Var2-like) in Germany1. *Poult. Sci.* 99, 797–800. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.031>
- Fraga, A.P., Balestrin, E., Ikuta, N., Fonseca, A.S.K., Spilki, F.R., Canal, C.W., Lunge, V.R., 2013. Emergence of a new genotype of avian infectious bronchitis virus in Brazil. *Avian Dis.* 57, 225–232. <https://doi.org/10.1637/10346-090412-Reg.1>
- Franzo, G., Cecchinato, M., Tosi, G., Fiorentini, L., Faccin, F., Tucciarone, C.M., Trogu, T., Barbieri, I., Massi, P., Moreno, A., 2018. GI-16 lineage (624/I or Q1), there and back again: The history of one of the major threats for poultry farming of our era. *PloS One* 13, e0203513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203513>
- Franzo, G., Listorti, V., Naylor, C.J., Lupini, C., Laconi, A., Felice, V., Drigo, M., Catelli, E., Cecchinato, M., 2015. Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Res.* 210, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.008>
- Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M., Moreno, A., 2017a. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLOS ONE* 12, e0184401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184401>
- Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype’s disappearance. *Vaccine* 32, 6765–6767. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.006>
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Nofrarias, M., Biarnés, M., Cortey, M., Majó, N., Catelli, E., Cecchinato, M., 2016. Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34, 5670–5676. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.014>
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Drigo, M., Cecchinato, M., Enache, M., Bejan, V., 2017b. Infectious bronchitis virus in Romanian broiler farms. *Vet. Rec.* 180. <https://doi.org/10.1136/vr.j2810>
- Gallardo, R.A., Hoerr, F.J., Berry, W.D., van Santen, V.L., Toro, H., 2011. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. *Avian Dis.* 55, 255–258. <https://doi.org/10.1637/9592-102910-Reg.1>
- Gallardo, R.A., Silva, A.P. da, Gilbert, R., Alfonso, M., Conley, A., Jones, K., Stayer, P.A., Hoerr, F.J., 2022. Testicular Atrophy and Epididymitis-Orchitis Associated with Infectious Bronchitis Virus in Broiler Breeder Roosters. *Avian Dis.* 66, 112–118. <https://doi.org/10.1637/21-00108>



- Ganapathy, K., Ball, C., Forrester, A., 2015. Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus Res.* 210, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.019>
- Gelb, Jr. J., Weisman, Y., Ladman, B.S., Meir, R., 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol. J. WVPA* 34, 194–203. <https://doi.org/10.1080/03079450500096539>
- Gelb Jr., J., Leary, J.H., Rosenberger, J.K., 1983. Prevalence of Arkansas-type infectious bronchitis virus in Delmarva peninsula chickens. *Avian Dis.* 27, 667–678. <https://doi.org/10.2307/1590309>
- Gibbs, M.J., Armstrong, J.S., Gibbs, A.J., 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 16, 573–582. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.7.573>
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 17, 4847–4861. <https://doi.org/10.1093/nar/17.12.4847>
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Lai, M.M., 1991. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* 288, 201–205. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81034-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81034-6)
- Gough, R.E., Alexander, D.J., 1979. Comparison of duration of immunity in chickens infected with a live infectious bronchitis vaccine by three different routes. *Res. Vet. Sci.* 26, 329–332. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32889-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32889-3)
- Gough, R.E., Cox, W.J., de B Welchman, D., Worthington, K.J., Jones, R.C., 2008. Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Vet. Rec.* 162, 99–100. <https://doi.org/10.1136/vr.162.3.99>
- Guo, X., Rosa, A.J.M., Chen, D.-G., Wang, X., 2008. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.016>
- Guzmán, M., Hidalgo, H., 2020. Live Attenuated Infectious Bronchitis Virus Vaccines in Poultry: Modifying Local Viral Populations Dynamics. *Anim.* 10, E2058. <https://doi.org/10.3390/ani10112058>
- Guzmán, M., Sáenz, L., Hidalgo, H., 2019. Molecular and Antigenic Characterization of GI-13 and GI-16 Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated in Chile from 2009 to 2017 Regarding 4/91 Vaccine Introduction. *Anim.* 9, E656. <https://doi.org/10.3390/ani9090656>
- Habibi, M., Karimi, V., Langeroudi, A.G., Ghafouri, S.A., Hashemzadeh, M., Farahani, R.K., Maghsoudloo, H., Abdollahi, H., Seifouri, P., 2017. Combination of H120 and 1/96 avian infectious bronchitis virus vaccine strains protect chickens against challenge with IS/1494/06 (variant 2)-like infectious bronchitis virus. *Acta Virol.* 61, 150–160. [https://doi.org/10.4149/av\\_2017\\_02\\_04](https://doi.org/10.4149/av_2017_02_04)
- Hagemeyer, M.C., Verheije, M.H., Ulasli, M., Shaltiël, I.A., Vries, L.A. de, Reggiori, F., Rottier, P.J.M., Haan, C.A.M. de, 2010. Dynamics of Coronavirus Replication-Transcription Complexes. *J. Virol.* 84, 2134–2149. <https://doi.org/10.1128/JVI.01716-09>
- Hanada, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., 2004. A large variation in the rates of synonymous substitution for rna viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1074–1080. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh109>
- Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A., Martin, D.P., 2006. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J. Virol.* 80, 11827–11832. <https://doi.org/10.1128/JVI.01100-06>
- Heffels-Redmann, U., Kaleta, E.F., 2004. IV. International symposium on avian corona- and pneumovirus infections, Rauschholzhausen, Germany, 20-23 June 2004.
- Hein, R., Koopman, R., García, M., Armour, N., Dunn, J.R., Barbosa, T., Martinez, A., 2021. Review of poultry recombinant vector vaccines. *Avian Dis.* 65, 438–452. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-65.3.438>
- Hewson, K.A., Ignjatovic, J., Browning, G.F., Devlin, J.M., Noormohammadi, A.H., 2011. Infectious bronchitis viruses with naturally occurring genomic rearrangement and gene deletion. *Arch. Virol.* 156, 245–252. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0850-6>
- Hodgson, T., Britton, P., Cavanagh, D., 2006. Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J. Virol.* 80, 296–305. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.1.296-305.2006>
- Hodgson, T., Casais, R., Dove, B., Britton, P., Cavanagh, D., 2004. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains

attenuated but induces protective immunity. *J. Virol.* 78, 13804–13811. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13804-13811.2004>

Hoerr, F.J., 2021. The Pathology of infectious bronchitis. *Avian Dis.* 65, 600–611. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00096>

Hofstad, M.S., 1958. Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 19, 740–743.

Holmes, E.C., 2009. The evolution and emergence of RNA viruses. Oxford University Press. <https://doi.org/10.3201/eid1605.100164>

Hosseini, H., Fard, M.H.B., Charkhkar, S., Morshed, R., 2015. Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis.* 59, 431–435. <https://doi.org/10.1637/11091-041515-ResNote.1>

Houta, M.H., Hassan, K.E., El-Sawah, A.A., Elkady, M.F., Kilany, W.H., Ali, A., Abdel-Moneim, A.S., 2021. The emergence, evolution and spread of infectious bronchitis virus genotype GI-23. *Arch. Virol.* 166, 9–26. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04920-z>

Huang, M., Zou, C., Liu, Y., Han, Z., Xue, C., Cao, Y., 2020. A novel low virulent respiratory infectious bronchitis virus originating from the recombination of QX, TW and 4/91 genotype strains in China. *Vet. Microbiol.* 242, 108579. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108579>

Huang, Y.-P., Lee, H.-C., Cheng, M.-C., Wang, C.-H., 2004. S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis.* 48, 581–589. <https://doi.org/10.1637/7186-033004R>

Hulswit, R.J.G., de Haan, C. a. M., Bosch, B.-J., 2016. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Adv. Virus Res.* 96, 29–57. <https://doi.org/10.1016/bs.avir.2016.08.004>

Ignjatović, J., Sapats, S., 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 19, 493–508. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1228>

Jackwood, M.W., 2012. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis.* 56, 634–641. <https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1>

Jackwood, M.W., Boynton, T.O., Hilt, D.A., McKinley, E.T., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Robertson, J., Lemke, C., McCall, A.W., Williams, S.M., Jackwood, J.W., Byrd, L.A., 2010. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. *Virology* 398, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.044>

Jackwood, M.W., de Wit, S., 2013. Infectious Bronchitis, in: *Diseases of Poultry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 139–159. <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch4>

Jackwood, M.W., Hall, D., Handel, A., 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1305–1311. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.003>

Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Callison, S.A., Lee, C.W., Plaza, H., Wade, E., 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 45, 366–372.

Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Lee, C., Kwon, H.M., Callison, S.A., Moore, K.M., Moscoso, H., Sellers, H., Thayer, S., 2005. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Dis.* 49, 614–618. <https://doi.org/10.1637/7389-052905R.1>

Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Williams, S.M., Woolcock, P., Cardona, C., O'Connor, R., 2007. Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. *Avian Dis.* 51, 527–533.

Jackwood, M.W., Lee, D.-H., 2017. Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176709>

Ji, J., Xie, J., Chen, F., Shu, D., Zuo, K., Xue, C., Qin, J., Li, H., Bi, Y., Ma, J., Xie, Q., 2011. Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009. *Virol. J.* 8, 184. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-184>

Jia, W., Karaca, K., Parrish, C.R., Naqi, S.A., 1995. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch. Virol.* 140, 259–271. <https://doi.org/10.1007/BF01309861>

Jiang, L., Zhao, W., Han, Z., Chen, Y., Zhao, Y., Sun, J., Li, H., Shao, Y., Liu, L., Liu, S., 2017. Genome characterization, antigenicity and pathogenicity of a novel infectious bronchitis virus type isolated from south China. *Infect. Genet. Evol.* 54, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.006>

Johnson, M.A., Pooley, C., Ignjatovic, J., Tyack, S.G., 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21, 2730–2736. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00227-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00227-5)

Johnson, R.B., Marquardt, W.W., Newman, J.A., 1973. A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broiler flocks. *Avian Dis.* 518–523.

- Jones, R.C., 1974. Nephrosis in laying chickens caused by Massachusetts-type infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.* 95, 319. <https://doi.org/10.1136/vr.95.14.319-a>
- Jones, R.C., Jordan, F.T.W., 1972. Persistence of virus in the tissues and development of the oviduct in the fowl following infection at day old with infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.* 13, 52–60. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)34088-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34088-8)
- Jones, R.C., Savage, C.E., Naylor, C.J., Cook, J.K.A., El-Houadfi, M.A., 2004. Possible North African progenitor of the major European infectious bronchitis variant (793B, 4/91, CR88), in: *Proceedings of the IV International Symposium on Avian Corona-and Pneumovirus Infections*. Rauschholzhausen Germany, pp. 105–111.
- Jones, R.C., Worthington, K.J., Capua, I., Naylor, C.J., 2005. Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Vet. Rec.* 156, 646–647. <https://doi.org/10.1136/vr.156.20.646>
- Jordan, B., 2017. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Vet. Microbiol.* 206, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.002>
- Jordi, B.J., Kremers, D.A., Kusters, H.G., van der Zeijst, B.A., 1989. Nucleotide sequence of the gene coding for the peplomer protein (= spike protein) of infectious bronchitis virus, strain D274. *Nucleic Acids Res.* 17, 6726. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6726>
- Jungherr, E., Chomiak, T., Luginbuhl, R., 1956. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. *Proc 60th Annual Meeting US Livestock Sanitary Assoc.*
- Junnu, S., Pohuang, T., 2022. Molecular investigation of S2-3a/3b-E-M-4b/4c-5a/5b-N gene of QX-like and variant genotype infectious bronchitis virus isolated in Thailand reveals a distinct E gene. *Infect. Genet. Evol.* 97, 105157. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105157>
- Kahya, S., Coven, F., Temelli, S., Eyigor, A., Carli, K.T., 2013. Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ank. Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 27–31. [https://doi.org/10.1501/Vetfak\\_0000002549](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002549)
- Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K.G., Makino, S., 2009. A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1134–1140. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1680>
- Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., Kusters, J.G., Poelwijk, F.A., van der Zeijst, B.A., 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 3), 591–596. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-3-591>
- Kapczynski, D.R., Hilt, D.A., Shapiro, D., Sellers, H.S., Jackwood, M.W., 2003. Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. *Avian Dis.* 47, 272–285. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2003\)047\[0272:POCFIB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0272:POCFIB]2.0.CO;2)
- Kariithi, H.M., Volkening, J.D., Goraichuk, I.V., Ateya, L.O., Williams-Coplin, D., Olivier, T.L., Binopal, Y.S., Afonso, C.L., Suarez, D.L., 2023. Unique variants of avian coronaviruses from indigenous chickens in Kenya. *Viruses* 15, 264. <https://doi.org/10.3390/v15020264>
- Karimi, V., Ghalyanchilangeroudi, A., Hashemzadeh, M., Rahimi, F., Zabihi Petroudi, M.T., Farahani, R.K., Maghsoudloo, H., Abdollahi, H., 2018. Efficacy of H120 and Ma5 avian infectious bronchitis vaccines in early challenge against QX strain. *VirusDisease* 29, 123–126. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0414-4>
- Karimi, V., Mohammadi, P., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S.A., Hashemzadeh, M., Farahani, R.K., Maghsoudloo, H., Isakakroudi, N., 2019. Including 793/B type avian infectious bronchitis vaccine in 1-day-old chicken increased the protection against QX genotype. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 629–635. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1730-4>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Keep, S., Oade, M.S., Lidzbarski-Silvestre, F., Bentley, K., Stevenson-Leggett, P., Freimanis, G.L., Tennakoon, C., Sanderson, N., Hammond, J.A., Jones, R.C., Britton, P., Bickerton, E., 2020. Multiple novel non-canonically transcribed sub-genomic mRNAs produced by avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 101, 1103–1118. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001474>
- Khalid, Z., He, L., Yu, Q., Breedlove, C., Joiner, K., Toro, H., 2021. Enhanced Protection by Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Infectious Bronchitis Virus Spike Ectodomain and Chicken Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Avian Dis.* 65, 364–372. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00032>

- Khanh, N.P., Tan, S.W., Yeap, S.K., Satharasinghe, D.A., Hair-Bejo, M., Bich, T.N., Omar, A.R., 2017. Molecular characterization of QX-like and variant infectious bronchitis virus strains in Malaysia based on partial genomic sequences comprising the S-3a/3b-E-M-intergenic region-5a/5b-N gene order. *Avian Dis.* 61, 442–452. <https://doi.org/10.1637/11637-032817-Reg.1>
- Khataby, K., Souiri, A., Kasmi, Y., Louffi, C., Ennaji, M.M., 2016. Current situation, genetic relationship and control measures of infectious bronchitis virus variants circulating in African regions. *J. Basic Appl. Zool., Cell Biology and Genetics* 76, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.08.002>
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adams, M.J., Dutilh, B.E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Davison, A.J., 2018. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Arch. Virol.* 163, 2601–2631. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>
- Kint, J., Fernandez-Gutierrez, M., Maier, H.J., Britton, P., Langereis, M.A., Koumans, J., Wiegertjes, G.F., Forlenza, M., 2014. Activation of the chicken type I interferon response by infectious bronchitis coronavirus. *J. Virol.* 89, 1156–1167. <https://doi.org/10.1128/JVI.02671-14>
- Kint, J., Langereis, M.A., Maier, H.J., Britton, P., Kuppeveld, F.J. van, Koumans, J., Wiegertjes, G.F., Forlenza, M., 2016. Infectious bronchitis coronavirus limits interferon production by inducing a host shutoff that requires accessory protein 5b. *J. Virol.* 90, 7519–7528. <https://doi.org/10.1128/JVI.00627-16>
- Kiss, I., Bálint, Á., Belák, S., 2010. Az RNS-vírusok kvázispecies jellege és önszabályozó mechanizmusa; példák ezek gyakorlati jelentőségére. *Magy. Állatorvosok Lapja* 132, 425–438.
- Kiss, I., Mató, T., Homonnay, Z., Tatár-Kis, T., Palya, V., 2016. Successive occurrence of recombinant infectious bronchitis virus strains in restricted area of Middle East. *Virus Evol.* 2, vew021. <https://doi.org/10.1093/ve/vew021>
- Kiss, I., Mató, T., Homonnay, Z.G., Kojer, J., Farsang, A., Bálint, Á., Palya, V., 2015. Survey indicates circulation of 4/91 and QX-type infectious bronchitis viruses in Hungary in 2014. *Acta Vet. Hung.* 63, 382–388. <https://doi.org/10.1556/004.2015.036>
- Koch, G., Hartog, L., Kant, A., van Roozelaar, D.J., 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* 71, 1929–1935. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-9-1929>
- Koch, G., Kant, A., 1990. Nucleotide and amino acid sequence of the S1 subunit of the spike glycoprotein of avian infectious bronchitis virus, strain D3896. *Nucleic Acids Res.* 18, 3063–3064. <https://doi.org/10.1093/nar/18.10.3063>
- Krapez, U., Slavec, B., Rojs, O.Z., 2011. Circulation of infectious bronchitis virus strains from Italy 02 and QX genotypes in Slovenia between 2007 and 2009. *Avian Dis.* 55, 155–161. <https://doi.org/10.1637/9533-091710-Case.1>
- Kulkarni, A., 2016. Characterization of recent infectious bronchitis virus isolates from broilers and backyard flocks of Georgia, in: *Proceedings of the 65th Western Poultry Disease Conference*. pp. 24–27.
- Kulkarni, A.B., Resurreccion, R.S., 2010. Genotyping of newly isolated infectious bronchitis virus isolates from northeastern Georgia. *Avian Dis.* 54, 1144–1151. <https://doi.org/10.1637/9358-040510-Reg.1>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kusters, J.G., Jager, E.J., Niesters, H.G.M., van der Zeijst, B.A.M., 1990. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* 8, 605–608. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(90\)90018-H](https://doi.org/10.1016/0264-410X(90)90018-H)
- Kusters, J.G., Niesters, H.G., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C., Zeijst, B.A. van der, 1989. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology* 169, 217–21. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90058-5)
- Kwon, H.M., Jackwood, M.W., 1995. Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus. *Virus Genes* 9, 219–229. <https://doi.org/10.1007/BF01702878>
- Lachheb, J., Turki, A., Nsiri, J., Fathallah, I., El Behi, I., Larbi, I., Ghram, A., 2019. Molecular characterization of a unique variant of avian infectious bronchitis virus in Tunisia. *Poult. Sci.* 98, 4338–4345. <https://doi.org/10.3382/ps/pez384>
- Laconi, A., van Beurden, S.J., Berends, A.J., Krämer-Kühl, A., Jansen, C.A., Spekreijse, D., Chénard, G., Philipp, H.-C., Mundt, E., Rottier, P.J.M., Hélène Verheije, M.Y., 2018, 2018. Deletion of

accessory genes 3a, 3b, 5a or 5b from avian coronavirus infectious bronchitis virus induces an attenuated phenotype both in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 99, 1381–1390. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001130>

Ladman, B.S., Pope, C.R., Ziegler, A.F., Swieczkowski, T., Callahan, C.J.M., Davison, S., Gelb, J., 2002. Protection of chickens after live and inactivated virus vaccination against challenge with nephropathogenic infectious bronchitis virus PA/Wolgemuth/98. *Avian Dis.* 46, 938–944. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0938:POCALA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0938:POCALA]2.0.CO;2)

Lai, C.-C., Shih, T.-P., Ko, W.-C., Tang, H.-J., Hsueh, P.-R., 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>

Lai, M.M., 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 61–79. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.61-79.1992>

Lai, M.M., Liao, C.L., Lin, Y.J., Zhang, X., 1994. Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed. *Infect. Agents Dis.* 3, 98–105.

Lai, M.M., Cavanagh, D., 1997. The Molecular Biology of Coronaviruses, in: Maramorosch, K., Murphy, F.A., Shatkin, A.J. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)

Landman, W.J.M., Dwars, R.M., De Wit, J.J., 2005. High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. 14th World Veterinary Poultry Congress, 22-26 August 2005, Istanbul, Turkey, 369.

Le, T.B., Lee, H.-J., Le, V.P., Choi, K.-S., 2019. Multiple Genotypes of Avian Infectious Bronchitis Virus Circulating in Vietnam. *Korean J. Poult. Sci.* 46, 127–136. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2019.46.2.127>

Lee, C.W., Jackwood, M.W., 2001. Origin and evolution of Georgia 98 (GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 80, 33–39. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00345-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00345-8)

Lee, C.W., Jackwood, M.W., 2000. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch. Virol.* 145, 2135–2148.

Lee, E.-K., Jeon, W.-J., Lee, Y.-J., Jeong, O.-M., Choi, J.-G., Kwon, J.-H., Choi, K.-S., 2008. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. *Avian Dis.* 52, 332–337. <https://doi.org/10.1007/s007050070044>

Legnardi, M., Tucciarone, C.M., Franzo, G., Cecchinato, M., 2020. Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Vet. Sci.* 7, 79. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020079>

Leparc-Goffart, I., Hingley, S.T., Chua, M.M., Jiang, X., Lavi, E., Weiss, S.R., 1997. Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. *Virology* 239, 1–10. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8877>

Leyson, C., França, M., Jackwood, M., Jordan, B., 2016. Polymorphisms in the S1 spike glycoprotein of Arkansas-type infectious bronchitis virus (IBV) show differential binding to host tissues and altered antigenicity. *Virology* 498, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.030>

Leyson, C., Jordan, B.J., Jackwood, M.W., 2016. Insights from molecular structure predictions of the infectious bronchitis virus S1 spike glycoprotein. *Infect. Genet. Evol.* 46, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.006>

Li, B.X., Ge, J.W., Li, Y.J., 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.031>

Li, F., 2016. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* 3, 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>

Li, H., Wang, Yulong, Han, Z., Wang, Yu, Liang, S., Jiang, L., Hu, Y., Kong, X., Liu, S., 2016. Recombinant duck enteritis viruses expressing major structural proteins of the infectious bronchitis virus provide protection against infectious bronchitis in chickens. *Antiviral Res.* 130, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.003>

Li, L., Xue, C., Chen, F., Qin, J., Xie, Q., Bi, Y., Cao, Y., 2010. Isolation and genetic analysis revealed no predominant new strains of avian infectious bronchitis virus circulating in South China during 2004-2008. *Vet. Microbiol.* 143, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.022>

Lian, J., Wang, Z., Xu, Z., Chen, T., Shao, G., Zhang, X., Qin, J., Xie, Q., Lin, W., 2021. Distribution and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in southern China. *Poult. Sci.* 100, 101169. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101169>

Lin, S.-Y., Chen, H.-W., 2017. Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis and Pathogenicity Investigation. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2030. <https://doi.org/10.3390/ijms18102030>

- Lisowska, A., Sajewicz-Krukowska, J., Fusaro, A., Pikula, A., Domanska-Blicharz, K., 2017. First characterization of a Middle-East GI-23 lineage (Var2-like) of infectious bronchitis virus in Europe. *Virus Res.* 242, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.010>
- Liu, D.X., Cavanagh, D., Green, P., Inglis, S.C., 1991. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 184, 531–544. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90423-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90423-9)
- Liu, D.X., Fung, T.S., Chong, K.K.-L., Shukla, A., Hilgenfeld, R., 2014. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res.* 109, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.013>
- Liu, S., Chen, J., Han, Z., Zhang, Q., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., 2006. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. *Avian Pathol.* 35, 394–399. <https://doi.org/10.1080/03079450600920984>
- Liu, S., Xu, Q., Han, Z., Liu, X., Li, H., Guo, H., Sun, N., Shao, Y., Kong, X., 2014. Origin and characteristics of the recombinant novel avian infectious bronchitis coronavirus isolate ck/CH/LJL/111054. *Infect. Genet. Evol.* 23, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.015>
- Liu, S., Zhang, Q., Chen, J., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., 2008. Identification of the avian infectious bronchitis coronaviruses with mutations in gene 3. *Gene* 412, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.01.004>
- Liu, S., Zhang, X., Wang, Y., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H., Kong, X., 2009. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses. *Intervirology* 52, 223–234. <https://doi.org/10.1159/000227134>
- Liu, X., Ma, H., Xu, Q., Sun, N., Han, Z., Sun, C., Guo, H., Shao, Y., Kong, X., Liu, S., 2013. Characterization of a recombinant coronavirus infectious bronchitis virus with distinct S1 subunits of spike and nucleocapsid genes and a 3' untranslated region. *Vet. Microbiol.* 162, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.027>
- Liu, X., Wu, Q., Zhang, Z., 2021. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front. Microbiol.* 12, 649314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649314>
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.152-160.1999>
- Lomniczi, B., 1966a. A tyúkok fertőző bronchitise. *Magy. Állatorvosok Lapja* 221–227.
- Lomniczi, B., Stipkovits, L., 1968. A fertőző bronchitis vírusának izolálása. *Magy. Állatorvosok Lapja* 600.
- Lukert, P.D., 1969. Differentiation of avian infectious bronchitis virus serotypes by immunofluorescence. *Avian Dis.* 847–852.
- Ma, T., Xu, L., Ren, M., Shen, J., Han, Z., Sun, J., Zhao, Y., Liu, S., 2019. Novel genotype of infectious bronchitis virus isolated in China. *Vet. Microbiol.* 230, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.020>
- Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., Rao, Z., 2015. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 9436–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112>
- Mahmood, Z.H., Sleman, R.R., Uthman, A.U., 2011. Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Vet. Microbiol.* 150, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.015>
- Marandino, A., Pereda, A., Tomás, G., Hernández, M., Iraola, G., Craig, M.I., Hernández, D., Banda, A., Villegas, P., Panzera, Y., Pérez, R., 2015. Phylodynamic analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J. Gen. Virol.* 96, 1340–1346. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000077>
- Marandino, A., Tomás, G., Panzera, Y., Greif, G., Parodi-Talice, A., Hernández, M., Techera, C., Hernández, D., Pérez, R., 2017. Whole-genome characterization of Uruguayan strains of avian infectious bronchitis virus reveals extensive recombination between the two major South American lineages. *Infect. Genet. Evol.* 54, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.009>
- Marandino, A., Vagnozzi, A., Craig, M.I., Tomás, G., Techera, C., Panzera, Y., Vera, F., Pérez, R., 2019. Genetic and antigenic heterogeneity of infectious bronchitis virus in South America: implications for control programmes. *Avian Pathol.* 48, 270–277. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1583315>
- Marandino, A., Vagnozzi, A., Tomás, G., Techera, C., Gerez, R., Hernández, M., Williman, J., Realpe, M., Greif, G., Panzera, Y., Pérez, R., 2022. Origin of new lineages by recombination and

- mutation in avian infectious bronchitis virus from South America. *Viruses* 14, 2095. <https://doi.org/10.3390/v14102095>
- Mardani, K., Noormohammadi, A.H., Ignjatovic, J., Browning, G.F., 2010. Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 155, 1581–1586. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0731-z>
- Martin, D., Rybicki, E., 2000. RDP: Detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 16, 562–563. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.6.562>
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>
- Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C., 2005. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 98–102. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.98>
- Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V., Murrell, B., 2021. RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evol.* 7, veaa087. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa087>
- Martin, E.A., Brash, M.L., Hoyland, S.K., Coventry, J.M., Sandrock, C., Guerin, M.T., Ojkic, D., 2014. Genotyping of infectious bronchitis viruses identified in Canada between 2000 and 2013. *Avian Pathol.* 43, 264–268. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.916395>
- Mase, M., Hiramatsu, K., Watanabe, S., Iseki, H., 2022. Genetic Analysis of the Complete S1 Gene in Japanese Infectious Bronchitis Virus Strains. *Viruses* 14, 716. <https://doi.org/10.3390/v14040716>
- Mase, M., Tsukamoto, K., Imai, K., Yamaguchi, S., 2004. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan. *Arch. Virol.* 149, 2069–2078. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0369-9>
- Masters, P.S., Perlman, S., 2013. Coronaviridae, in: *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103 USA, pp. 825–858.
- Masters, P.S., Sturman, L.S., 1990. Background paper functions of the coronavirus nucleocapsid protein, in: Cavanagh, D., Brown, T.D.K. (Eds.), *Coronaviruses and Their Diseases*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, Boston, MA, pp. 235–238. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5823-7\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5823-7_32)
- Mató, T., Farkas, T., Kardi, V., Benyeda, Zs., Péntzes, Z., Kiss, I., Palya, V., 2007. Magyarországi fertőző bronchitis izolátumok filogenetikai vizsgálata.
- Matthijs, M.G.R., Bouma, A., Velkers, F.C., van Eck, J.H.H., Stegeman, J.A., 2008. Transmissibility of infectious bronchitis virus H120 vaccine strain among broilers under experimental conditions. *Avian Dis.* 52, 461–466. <https://doi.org/10.1637/8204-010708-Reg.1>
- Matthijs, M.G.R., van Eck, J.H.H., de Wit, J.J., Bouma, A., Stegeman, J.A., 2005. Effect of IBV-H120 vaccination in broilers on colibacillosis susceptibility after infection with a virulent Massachusetts-type IBV strain. *Avian Dis.* 49, 540–545. <https://doi.org/10.1637/7380-051305R.1>
- McKinley, E.T., Hilt, D.A., Jackwood, M.W., 2008. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26, 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.006>
- McKinley, E.T., Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Robertson, J.S., Lemke, C., Paterson, A.H., 2011. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 158, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.006>
- Meeusen, E.N.T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.-P., Jungersen, G., 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 489–510, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-07>
- Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Perk, S., Hemsani, E., 2004. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 48, 635–641. <https://doi.org/10.1637/7107>
- Menzel, P., Ng, K.L., Krogh, A., 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* 7, 11257. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Berg, T.P., Denis, P., Cavanagh, D., 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol.* 30, 411–421. <https://doi.org/10.1080/03079450120066412>

- Meulemans, G., Carlier, M.C., Gonze, M., Petit, P., Vandebroek, M., 1987. Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Vet. Rec.* 120, 205–206. <https://doi.org/10.1136/vr.120.9.205>
- Miguel, B., Pharr, G.T., Wang, C., 2002. The role of feline aminopeptidase N as a receptor for infectious bronchitis virus: Brief Review. *Arch. Virol.* 147, 2047–2056. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0888-1>
- Mihindukulasuriya, K.A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R.W., Wang, D., 2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J. Virol.* 82, 5084–5088. <https://doi.org/10.1128/JVI.02722-07>
- Mo, M.-L., Li, M., Huang, B.-C., Fan, W.-S., Wei, P., Wei, T.-C., Cheng, Q.-Y., Wei, Z.-J., Lang, Y.-H., 2013. Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in southern China. *Viruses* 5, 3007–3020. <https://doi.org/10.3390/v5123007>
- Molenaar, R.J., Dijkman, R., de Wit, J.J., 2020. Characterization of infectious bronchitis virus D181, a new serotype (GII-2). *Avian Pathol.* 49, 243–250. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1713987>
- Mondal, S., Chang, Y.-F., Balasuriya, U., 2013. Sequence analysis of infectious bronchitis virus isolates from the 1960s in the United States. *Arch. Virol.* 158, 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1500-y>
- Monne, I., Cattoli, G., Jones, R., Worthington, K., Wijmenga, W., 2008. QX genotypes of infectious bronchitis virus circulating in Europe. *Vet. Rec.* 163, 606–607. <https://doi.org/10.1136/vr.163.20.606-d>
- Montassier, H., 2010. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus. *Rev. Bras. Ciênc. Avícola* 12, 87–96. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000200003>
- Moore, K.M., Jackwood, M.W., Hilt, D.A., 1997. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope with in the s1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 142, 2249–2256. <https://doi.org/10.1007/s007050050239>
- Moreno, A., Franzo, G., Massi, P., Tosi, G., Blanco, A., Antilles, N., Biarnes, M., Majó, N., Nofrarias, M., Dolz, R., Lelli, D., Sozzi, E., Lavazza, A., Cecchinato, M., 2017. A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46, 28–35. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1200011>
- Mousavi, F.S., Ghalyanchilangeroudi, A., Hosseini, H., Nayeri Fasaei, B., Ghafouri, S.A., Abdollahi, H., Fallah-Mehrabadi, M.H., Sadri, N., 2018. Complete genome analysis of Iranian IS-1494 like avian infectious bronchitis virus. *Virusdisease* 29, 390–394. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0462-4>
- Muneer, M.A., Halvorson, D.A., Sivanandan, V., Newman, J.A., Coon, C.N., 1986. Effects of infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on laying chickens. *Avian Dis.* 30, 644–647.
- Najafi, H., Langeroudi, A.G., Hashemzadeh, M., Karimi, V., Madadgar, O., Ghafouri, S.A., Maghsoudlo, H., Farahani, R.K., 2016. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014–2015. *Arch. Virol.* 161, 53–62. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2636-3>
- Najimudeen, S.M., Hassan, M.S.H., Goldsmith, D., Ojkic, D., Cork, S.C., Boulianne, M., Abdul-Careem, M.F., 2021. Molecular characterization of 4/91 infectious bronchitis virus leading to studies of pathogenesis and host responses in laying hens. *Pathog.* 10, 624. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050624>
- Nakagawa, K., Makino, S., 2021. Mechanisms of coronavirus nsp1-mediated control of host and viral gene expression. *Cells* 10, 300. <https://doi.org/10.3390/cells10020300>
- Niesters, H.G., Lenstra, J.A., Spaan, W.J., Zijderveld, A.J., Bleumink-Pluym, N.M., Hong, F., van Scharrenburg, G.J., Horzinek, M.C., van der Zeijst, B.A., 1986. The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res.* 5, 253–263. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(86\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0168-1702(86)90022-5)
- Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Verdía-Báguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodríguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>
- Nordin, N., Sani, N.I.M., Kadir, A.A., Shaari, R., Mohamed, M., Reduan, M.F.H., Nordin, M.L., 2021. Infectious bronchitis associated with *Escherichia coli* infection in commercial broiler chickens: a case report. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 8, 101–104. <https://doi.org/10.5455/javar.2021.h491>



Oh, S.J., Shin, O.S., 2021. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein targets rig-i-like receptor pathways to inhibit the induction of interferon response. *Cells* 10, 530. <https://doi.org/10.3390/cells10030530>

OIE, 2018. Avian infectious bronchitis virus. *Terrestrial Manual*. Chapter 3.3.2., 796-809.

Okba, N.M.A., Müller, M.A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C.H., Corman, V.M., Lamers, M.M., Sikkema, R.S., de Bruin, E., Chandler, F.D., Yazdanpanah, Y., Le Hingrat, Q., Descamps, D., Houhou-Fidouh, N., Reusken, C.B.E.M., Bosch, B.-J., Drosten, C., Koopmans, M.P.G., Haagsmans, B.L., 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1478–1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>

Okino, C.H., Alessi, A.C., Montassier, M. de F.S., Rosa, A.J. de M., Wang, X., Montassier, H.J., 2013. Humoral and cell-mediated immune responses to different doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus. *Viral Immunol.* 26, 259–267. <https://doi.org/10.1089/vim.2013.0015>

O'Sullivan, J., Tedim Ferreira, M., Gagné, J.-P., Sharma, A.K., Hendzel, M.J., Masson, J.-Y., Poirier, G.G., 2019. Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation. *Nat. Commun.* 10, 1182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08859-x>

Ovchinnikova, E.V., Bochkov, Y.A., Shcherbakova, L.O., Nikonova, Z.B., Zinyakov, N.G., Elatkin, N.P., Mudrak, N.S., Borisov, A.V., Drygin, V.V., 2011. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene. *Avian Pathol.* 40, 507–514. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.605782>

Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C.M., 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218–225. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056>

Patel, R., Kaki, M., Potluri, V.S., Kahar, P., Khanna, D., 2022. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum. Vaccines Immunother.* 18, 2002083. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>

Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Tsang, D.N.C., Yung, R.W.H., Ng, T.K., Yuen, K.Y., SARS study group, 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 361, 1319–1325. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2)

Peng, S., Wang, Y., Zhang, Y., Song, X., Zou, Y., Li, L., Zhao, X., Yin, Z., 2022. Current Knowledge on Infectious Bronchitis Virus Non-structural Proteins: The Bearer for Achieving Immune Evasion Function. *Front. Vet. Sci.* 9, 820625. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.820625>

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Picault, J.P., Drouin, P., Lamande, J., Allee, C., Toux, J.Y., Coq, H.L., Guittet, M., Bennejean, G., 1995. L'épizootie récente de bronchite infectieuse aviaire en France: importance, évolution et étiologie, in: Angers 1eres Journee de La Recherche Avicole, Centre de Congres d'Angers. pp. 177–179.

Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A., Sasipreeyajan, J., 2009. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *J. Vet. Sci.* 10, 219–223. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.3.219>

Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13757–13762. <https://doi.org/10.1073/pnas.241370698>

Promkuntod, N., van Eijndhoven, R.E.W., de Vrieze, G., Gröne, A., Verheije, M.H., 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 448, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.018>

Pyrk, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M.F., Ross, H.A., Berkhout, B., Van der Hoek, L., 2006. Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J. Mol. Biol.* 364, 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.074>

Quinteros, J.A., Lee, S.-W., Markham, P.F., Noormohammadi, A.H., Hartley, C.A., Legione, A.R., Coppo, M.J.C., Vaz, P.K., Browning, G.F., 2016. Full genome analysis of Australian infectious bronchitis viruses suggests frequent recombination events between vaccine strains and multiple phylogenetically distant avian coronaviruses of unknown origin. *Vet. Microbiol.* 197, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.003>

Raj, G.D., Jones, R.C., 1997. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 26, 677–706. <https://doi.org/10.1080/03079459708419246>

- Ramakrishnan, S., Kappala, D., 2019. Avian Infectious Bronchitis Virus, in: Malik, Y.S., Singh, R.K., Yadav, M.P. (Eds.), *Recent Advances in Animal Virology*. Springer, Singapore, pp. 301–319. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9073-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9073-9_16)
- Ren, M., Han, Z., Zhao, Y., Sun, J., Liu, S., Ma, D., 2020. Multiple recombination events between field and vaccine strains resulted in the emergence of a novel infectious bronchitis virus with decreased pathogenicity and altered replication capacity. *Poult. Sci.* 99, 1928–1938. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.056>
- Rimondi, A., Craig, M.I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M., Pereda, A., 2009. Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol.* 38, 149–153. <https://doi.org/10.1080/03079450902737821>
- Rohaim, M.A., El Naggar, R.F., Abdelsabour, M.A., Mohamed, M.H.A., El-Sabagh, I.M., Munir, M., 2020. evolutionary analysis of infectious bronchitis virus reveals marked genetic diversity and recombination events. *Genes* 11, 605. <https://doi.org/10.3390/genes11060605>
- Sadri, N., Ghalyanchilangeroudi, A., Fallah Mehrabadi, M.H., Hosseini, H., Shayeganmehr, A., Sediqian, M.S., Jabbarifakhr, M., Hamdan, A.M., Mousavi, F.S., 2019. Genotyping of avian infectious bronchitis virus in Afghanistan (2016-2017): the first report. *Iran. J. Vet. Res.* 20, 60–63.
- Saiada, F., Gallardo, R.A., Shivaprasad, H.L., Corsiglia, C., Van Santen, V.L., 2020. Intestinal tropism of an infectious bronchitis virus isolate not explained by spike protein binding specificity. *Avian Dis.* 64, 23–35. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.1.23>
- Samiullah, S., Roberts, J., Chousalkar, K., 2016. Infectious bronchitis virus and brown shell colour: Australian strains of infectious bronchitis virus affect brown eggshell colour in commercial laying hens differently. *Avian Pathol.* 45, 552–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1184744>
- Santos Fernando, F., Coelho Kasmanas, T., Diniz Lopes, P., da Silva Montassier, M. de F., Zanella Mores, M.A., Casagrande Mariguela, V., Pavani, C., Moreira Dos Santos, R., Assayag, M.S., Montassier, H.J., 2017. Assessment of molecular and genetic evolution, antigenicity and virulence properties during the persistence of the infectious bronchitis virus in broiler breeders. *J. Gen. Virol.* 98, 2470–2481. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000893>
- Savić, V., Jurinović, L., Balenović, M., Amšel Zelenika, T., 2011. Zarazni bronhitis – zaboravljeni problem? IX Simp. Perad. Dani 2011 Međunar. Sudjelov. - Zb. 14.
- Sawicki, S.G., 2009. Coronavirus Genome Replication, in: Raney, K.D., Gotte, M., Cameron, C.E. (Eds.), *Viral Genome Replication*. Springer US, Boston, MA, pp. 25–39. [https://doi.org/10.1007/b135974\\_2](https://doi.org/10.1007/b135974_2)
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 499–506. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1899-0\\_79](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1899-0_79)
- Schalk, A.F., Hawn, M.C., 1931. An Apparently New Respiratory Disease of Baby Chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78, 413–423.
- Scherbakova, L.O., Kolosov, S.N., Nikonova, Z.B., Zinyakov, N.G., Ovchinnikova, Y.V., Chvala, I.A., 2018. Genetic characterization of Avian infectious bronchitis virus isolates recovered in cis countries in 2015–2017. *Vet Sci Today* 3, 30–39. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-3-26-30-34>
- Sesti, L., Sara, L., Alvarado, L., Mató, T., Palya, V., De Wit, J.J., 2014. Diagnostic, epidemiology and control of the Q1 infectious bronchitis virus (IBV) variant strain in Peru, Colombia, Argentina and Chile, in: 8th SYMPOSIUM on ACOV & AMPV/2nd MEETING COST ACTION.
- Sethna, P.B., Hung, S.L., Brian, D.A., 1989. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5626–5630. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.14.5626>
- Sevoian, M., Levine, P.P., 1957. Effects of Infectious Bronchitis on the Reproductive Tracts, Egg Production, and Egg Quality of Laying Chickens. *Avian Dis.* 1, 136–164. <https://doi.org/10.2307/1587727>
- Shan, D., Fang, S., Han, Z., Ai, H., Zhao, W., Chen, Y., Jiang, L., Liu, S., 2018. Effects of hypervariable regions in spike protein on pathogenicity, tropism, and serotypes of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 250, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.04.013>
- Shen, S., Wen, Z.L., Liu, D.X., 2003. Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. *Virology* 311, 16–27.
- Shirvani, E., Samal, S.K., 2020. Comparative Protective Efficacies of Novel Avian Paramyxovirus-Vectored Vaccines against Virulent Infectious Bronchitis Virus in Chickens. *Viruses* 12, 697. <https://doi.org/10.3390/v12070697>
- Simon-Loriere, E., Holmes, E.C., 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 617–626.

Sjaak de Wit, J.J., Ter Veen, C., Koopman, H.C.R., 2020. Effect of IBV D1466 on egg production and egg quality and the effect of heterologous priming to increase the efficacy of an inactivated IBV vaccine. *Avian Pathol.* 49, 185–192. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1710462>

Smialek, M., Tykalowski, B., Dziewulska, D., Stenzel, T., Koncicki, A., 2017. Immunological aspects of the efficiency of protectotype vaccination strategy against chicken infectious bronchitis. *BMC Vet. Res.* 13, 44. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0963-1>

Smith, J.M., 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34, 126–129. <https://doi.org/10.1007/BF00182389>

Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J., Johnson, T., Shaver, A., 2000. The evolution of mutation rates: separating causes from consequences. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22, 1057–1066. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200012\)22:12<1057::AID-BIES3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200012)22:12<1057::AID-BIES3>3.0.CO;2-W)

Snijder, E.J., Decroly, E., Ziebuhr, J., 2016. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv. Virus Res.* 96, 59–126. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.008>

Song, C.S., Kim, J.H., Lee, Y.J., Kim, S.J., Izumiya, Y., Tohya, Y., Jang, H.K., Mikami, T., 1998. Detection and classification of infectious bronchitis viruses isolated in Korea by dot-immunoblotting assay using monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 42, 92–100.

Sperry, S.M., Kazi, L., Graham, R.L., Baric, R.S., Weiss, S.R., Denison, M.R., 2005. Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. *J. Virol.* 79, 3391–3400. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3391-3400.2005>

Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G.F., 2016. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>

Sun, X., Li, L., Pan, L., Wang, Z., Chen, H., Shao, C., Yu, J., Ren, Y., Wang, X., Huang, X., Zhang, R., Li, G., 2021. Infectious bronchitis virus: Identification of *Gallus gallus* APN high-affinity ligands with antiviral effects. *Antiviral Res.* 186, 104998. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104998>

Taddei, R., Tosi, G., Boniotti, M.B., Casadio, M., Fiorentini, L., Fabbi, M., Massi, P., 2012. Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bronchite infettiva aviaria isolati in Italia tra il 1963 ed il 1989. *LI Convegno Annu. Soc. Patol. Aviare SIPA Salsomaggiore Terme PR Italy* 332–341.

Tal, E.-C., Beny, P., Wojciech, H., Udi, A., Charles, C., 2019. Epidemiology and Spread of a dominant Infectious Bronchitis Virus (IS/1494/06) The XX1st World Veterinary Poultry Association Congress "WVPAC"

Tan, Y.W., Fung, T.S., Shen, H., Huang, M., Liu, D.X., 2018. Coronavirus infectious bronchitis virus non-structural proteins 8 and 12 form stable complex independent of the non-translated regions of viral RNA and other viral proteins. *Virology* 513, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.004>

Tataje-Lavanda, L., Izquierdo-Lara, R., Ormeño-Vásquez, P., Huamán-Gutiérrez, K., Zimic-Peralta, M., Fernández-Díaz, M., 2019. Near-complete genome sequence of infectious bronchitis virus strain VFAR-047 (GI-16 Lineage), isolated in Peru. *Microbiol. Resour. Announc.* 8, e01555-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01555-18>

Terregino, C., Toffan, A., Beato, M.S., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua, I., 2008. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.* 37, 487–493. <https://doi.org/10.1080/03079450802356938>

Thor, S.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W., 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3, 1777–1799. <https://doi.org/10.3390/v3091777>

Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I., Terregino, C., 2013. Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. *Vet. Ital.* 49, 347–355. <https://doi.org/10.12834/VetIt.1303.01>

Toffan, A., Monne, I., Terregino, C., Cattoli, G., Hodobo, C.T., Gadaga, B., Makaya, P.V., Mdlongwa, E., Swiswa, S., 2011. QX-like infectious bronchitis virus in Africa. *Vet. Rec.* 169, 589. <https://doi.org/10.1136/vr.d7636>

Toro, H., 2021. Global control of infectious bronchitis requires replacing live attenuated vaccines by alternative technologies. *Avian Dis.* 65, 637–642. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00105>

Toro, H., Van Santen, V.L., Jackwood, M.W., 2012. Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 56, 449–455. <https://doi.org/10.1637/10072-020212-Review.1>

- Toro, H., Zhang, J.F., Gallardo, R.A., Van Santen, V.L., Van Ginkel, F.W., Joiner, K.S., Breedlove, C., 2014. S1 of distinct IBV population expressed from recombinant adenovirus confers protection against challenge. *Avian Dis.* 58, 211–215. <https://doi.org/10.1637/10670-091913>
- Tyrell, D.A., 1968. Coronaviruses. *Nature*,(London) 220, 650.
- Uenaka, T., Kishimoto, I., Sato, S., Animas, S.B., Ito, T., Otsuki, K., Cook, J.K., 1998. Intracloacal infection with avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol. J. WVPA* 27, 309–312. <https://doi.org/10.1080/03079459808419342>
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39, 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.015>
- Valastro, V., Monne, I., Koopman, R., Currie, R.J.W., Cattoli, G., 2014. An update of infectious bronchitis virus strains circulating in Europe between 2011 and 2013. *Proceedings XIVth Eur. Poult. Conf. Stavanger Nor.* 444.
- van Empel, P., van den Bosch, H., Goovaerts, D., Storm, P., 1996. Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Dis.* 40, 858–864. <https://doi.org/10.2307/1592310>
- Van Roeckel, H., Bullis, K.L., Flint, O.S., Clarke, M.K., 1942. Poultry disease control service. *Annu Rep Bull* 388, 99–103.
- Villalobos-Agüero, R.A., Ramírez-Carvajal, L., Zamora-Sanabria, R., León, B., Karkashian-Córdoba, J., 2021. Molecular characterization of an avian GA13-like infectious bronchitis virus full-length genome from Costa Rica. *VirusDisease* 32, 347–353. <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00667-6>
- Villarreal, L.Y.B., Brandão, P.E., Chacón, J.L., Assayag, M.S., Maiorka, P.C., Raffi, P., Saidenberg, A.B.S., Jones, R.C., Ferreira, A.J.P., 2007. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. *Avian Dis.* 51, 900–904. <https://doi.org/10.1637/7815-121306-REGR4.1>
- Villarreal, L.Y.B., Sandri, T.L., Souza, S.P., Richtzenhain, L.J., de Wit, J.J., Brandao, P.E., 2010. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis.* 54, 894–898. <https://doi.org/10.1637/9218-121709-Reg.1>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V., 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Wakenell, P.S., Sharma, J.M., Slocombe, R.F., 1995. Embryo vaccination of chickens with infectious bronchitis virus: histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination. *Avian Dis.* 39, 752–765.
- Wang, L., Junker, D., Collisson, E.W., 1993. Evidence of natural recombination within the s1 gens of infectious bronchitis virus. *Virology* 192, 710–716. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1093>
- Wang, L., Maddox, C., Terio, K., Lanka, S., Fredrickson, R., Novick, B., Parry, C., McClain, A., Ross, K., 2020. Detection and characterization of new coronavirus in bottlenose dolphin, United States, 2019. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1610–1612. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200093>
- Wang, Q., Wu, J., Wang, H., Gao, Y., Liu, Q., Mu, A., Ji, W., Yan, L., Zhu, Y., Zhu, C., Fang, X., Yang, Xiaobao, Huang, Y., Gao, H., Liu, F., Ge, J., Sun, Q., Yang, Xiuna, Xu, W., Liu, Z., Yang, H., Lou, Z., Jiang, B., Guddat, L.W., Gong, P., Rao, Z., 2020. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase. *Cell* 182, 417–428.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.034>
- Wang, W., Ye, Linbai, Ye, Li, Li, B., Gao, B., Zeng, Y., Kong, L., Fang, X., Zheng, H., Wu, Z., She, Y., 2007. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res.* 128, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.007>
- Wang, Y.-F., Sun, Y.-K., Tian, Z.-C., Shi, X.-M., Tong, G.-Z., Liu, S.-W., Zhi, H.-D., Kong, X.-G., Wang, M., 2009. Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN $\gamma$ . *Vaccine* 27, 7046–7052. <https://doi.org/10.4142/jvs.2013.14.1.53>
- Wang, YuDong, Wang, YongLin, Zhang, Z., Fan, G., Jiang, Y., Liu, X., Ding, J., Wang, S., 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quar.* 15, 1–3.
- Weerts, E.A.W.S., Matthijs, M.G.R., Bonhof, J., van Haarlem, D.A., Dwars, R.M., Gröne, A., Verheije, M.H., Jansen, C.A., 2021. The contribution of the immune response to enhanced colibacillosis upon preceding viral respiratory infection in broiler chicken in a dual infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 238, 110276. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110276>

- Weiss, S.R., Leibowitz, J.L., 2011. Chapter 4 - Coronavirus pathogenesis, in: Maramorosch, K., Shatkin, A.J., Murphy, F.A. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 85–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>
- Wickramasinghe, I.N.A., de Vries, R.P., Gröne, A., de Haan, C.A.M., Verheije, M.H., 2011. Binding of *Avian coronavirus* spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J. Virol.* 85, 8903–8912. <https://doi.org/10.1128/JVI.05112-11>
- Wickramasinghe, I.N.A., van Beurden, S.J., Weerts, E. a. W.S., Verheije, M.H., 2014. The *Avian coronavirus* spike protein. *Virus Res.* 194, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.009>
- Winter, C., Schwegmann-Weßels, C., Cavanagh, D., Neumann, U., Herrler, G., 2006. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 87, 1209–1216. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81651-0>
- Winterfield, R.W., Hitchner, S.B., 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23, 1273–1279.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., Yuen, K.-Y., 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 234, 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., Bai, R., Teng, J.L.L., Tsang, C.C.C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Worobey, M., Holmes, E.C., 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 80 ( Pt 10), 2535–2543. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2535>
- Worthington, K.J., Currie, R.J.W., Jones, R.C., 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* 37, 247–257. <https://doi.org/10.1080/03079450801986529>
- Worthington, K.J., Jones, R.C., 2006. New genotype of infectious bronchitis virus in chickens in Scotland. *Vet. Rec.* 159, 291–292. <https://doi.org/10.1136/vr.159.9.291-b>
- Worthington, K.J., Savage, C., Naylor, C.J., Wijmenga, W., Jones, R.C., 2004. An RT-PCR survey of infectious bronchitis virus genotypes in the UK and selected European countries between 2002 and 2004 and the results from a vaccine trial. *Proc. IV Symp. Avian Corona Pneumovirus Infect.* 125–133.
- Xu, L., Han, Z., Jiang, L., Sun, J., Zhao, Y., Liu, S., 2018. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus in China in recent years. *Infect. Genet. Evol.* 66, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.018>
- Yan, F., Zhao, Y., Yue, W., J, Y., Lv, L., Ji, W., Li, X., Liu, F., Wu, Q., 2011. Phylogenetic analysis of S1 gene of infectious bronchitis virus isolates from china. *Avian Dis.* 55, 451–458. <https://doi.org/10.1637/9446-070510-ResNote.1>
- Yang, T., Wang, H.-N., Wang, X., Tang, J.-N., Lu, D., Zhang, Y.-F., Guo, Z.-C., Li, Y.-L., Gao, R., Kang, R.-M., 2009. The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi-epitope based peptide vaccines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1500–1504. <https://doi.org/10.1271/bbb.80864>
- Ye, Z.-W., Yuan, S., Yuen, K.-S., Fung, S.-Y., Chan, C.-P., Jin, D.-Y., 2020. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Youn, S., Leibowitz, J.L., Collisson, E.W., 2005. In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology* 332, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.045>
- Yousefi, Y., Bassami, M.R., Kalidari, G.A., Seno, M.M.G., 2019. Sequence characterization of full-length S1 gene of infectious bronchitis viruses isolated from poultry farms in Khorasan Razavi, Iran. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 235–243. <https://doi.org/10.3906/vet-1808-19>
- Yu, Li, Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S.J., Liu, W., Kwang, J., 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from china associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45, 416–424. <https://doi.org/10.2307/1592981>
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S.J., Liu, W., Kwang, J., 2001. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.* 45, 416–424.
- YuDong, W., YongLin, W., ZiChun, Z., GenChe, F., YiHai, J., XiangE, L., Jiang, D., ShuShuang, W., 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quar.* 15, 1–3.

- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 367, 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- Zavala, G., 2016. Emerging and reemerging poultry diseases: an international perspective. *American Association of Avian Pathologists*
- Zhang, X., Wu, Y., Huang, Y., Liu, X., 2012. Protection conferred by a recombinant Marek's disease virus that expresses the spike protein from infectious bronchitis virus in specific pathogen-free chicken. *Virology* 533, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-85>
- Zhao, Y., Cheng, J., Yan, S., Jia, W., Zhang, K., Zhang, G., 2019. S gene and 5a accessory gene are responsible for the attenuation of virulent infectious bronchitis coronavirus. *Virology* 533, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.04.014>
- Zheng, D., Chen, G., Guo, B., Cheng, G., Tang, H., 2008. PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Res.* 18, 1105–1113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.294>
- Zhou, H., Zhang, M., Tian, X., Shao, H., Qian, K., Ye, J., Qin, A., 2017. Identification of a novel recombinant virulent avian infectious bronchitis virus. *Vet. Microbiol.* 199, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.038>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., 2020. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhu, X., Liu, S., Wang, X., Luo, Z., Shi, Y., Wang, D., Peng, G., Chen, H., Fang, L., Xiao, S., 2018. Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0068->
- Ziegler, A.F., Ladman, B.S., Dunn, P.A., Schneider, A., Davison, S., Miller, P.G., Lu, H., Weinstock, D., Salem, M., Eckroade, R.J., 2002. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997–2000. *Avian Dis.* 46, 847–858. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0847:NIBIPC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0847:NIBIPC]2.0.CO;2)
- Zúñiga, S., Cruz, J.L.G., Sola, I., Mateos-Gómez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L., 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 84, 2169–2175. <https://doi.org/10.1128/JVI.02011-09>
- Züst, R., Cervantes-Barragán, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., Thiel, V., 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog.* 3, e109. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030109>

## 13 Közlemények listája

### 13.1 A doktori kutatás eredményeiből született, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Bali, K., Bálint, Á., Farsang, A., Marton, S., Nagy, B., Kaszab, E., Belák, S., Palya, V., Bányai, K., 2021. **Recombination events shape the genomic evolution of infectious bronchitis virus in europe.** Viruses 13(4), 535. <https://doi.org/10.3390/v13040535>

Bali K, Kaszab E, Marton Sz, Hamdiou SH, Bentaleb RK, Kiss I, Palya V, Bányai K. (2022): **Novel lineage of infectious bronchitis virus from Sub-Saharan Africa identified by random amplification and next-generation sequencing of viral genome.** Life 14(4): 475. <https://doi.org/10.3390/life12040475>

Bali K, Bálint Á, Bányai K, **A csirkék fertőző bronchitisét okozó coronavírus genetikai vonalainak földrajzi elterjedése.** (2022) Magyar állatorvosok lapja, 144. 673-690.

### 13.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

Fehér E, Kaszab E, Forró B, Bali K, Marton Sz, Lengyel Gy, Bányai K. (2017): **Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1.** Archives of Virology, 162(12): 3925-3929. <http://doi.org/10.1007/s00705-017-3566-z>

Kaszab E, Marton S, Forró B, Bali K, Lengyel G, Bányai K, Fehér E. (2018) **Characterization of the genomic sequence of a novel CRESS DNA virus identified in Eurasian jay (Garrulus glandarius)** Archives of Virology, 163 (5), 285-289. <http://doi.org/10.1007/s00705-017-3598-4>

Fehér E, Bálint Á, Marton Sz, Bali K, Belák S, Bányai K. (2020): **Coding-complete genome sequencing suggests that Newcastle disease virus challenge strain Herts'33 (IVMP) may represent a distinct genotype.** Archives of Virology, 165 (1), 245-248. <http://doi.org/10.1007/s00705-019-04441-4>

Gyuranecz M, Mitter A, Kovács ÁB, Gróznér D, Kreizinger Zs, Bali K, Bányai K, Morrow CJ. (2020): **Isolation of Mycoplasma anserisalpingitidis from swan goose (Anser cygnoides) in China.** BMC Veterinary Research, 16: 178. 1 <http://doi.org/0.1186/s12917-020-02393-5>

Kovács ÁB, Kreizinger Zs, Forró B, Gróznér D, Mitter A, Marton Sz, Bali K, Sawicka A, Tomczyk G, Bányai K, Gyuranecz M. (2020): **The core genome multi-locus sequence typing of Mycoplasma anserisalpingitidis.** BMC Genomics 21: 403. <http://doi.org/10.1186/s12864-020-06817-2>

Domán M, Makrai L, Bali K, Lengyel Gy, Laukó T, Bányai K. (2020): **Unexpected diversity of yeast species in oesophageal mycosis of waterfowls.** Avian Diseases, 64(4): 532-535. <http://doi.org/10.1637/aviandiseases-D20-00053>

Homonnay Z, Jakab Sz, Bali K, Kaszab E, Mató T, Kiss I, Palya V, Bányai K. (2021): **Genome sequencing of a novel variant of fowl adenovirus B reveals mosaicism in the pattern of homologous recombination events.** Archives of Virology, 166: 1477-1480 <http://doi.org/10.1007/s00705-021-04972-9>

Kovács ÁB, Wehmann E, Sváb D, Bekő K, Gróznér D, Mitter A, Bali K, Morrow CJ, Bányai K, Gyuranecz M. (2021): **Novel prophage-like sequences in Mycoplasma anserisalpingitidis.** Infection, Genetics and Evolution, 92: 104886. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104886>

Kaszab E, Bali K, Bálint Á, Süli T, Bajnóczi P, Bányai K, Fehér E. (2021): **Víziszárnyasok polyomavírus-fertőzése.** Magyar Állatorvosok Lapja, 143(7): 401-408.

Fehér E, Jakab Sz, Bali K, Kaszab E, Nagy B, Ihász K, Bálint Á, Palya V, Bányai K. (2021): **Genomic epidemiology and evolution of duck hepatitis A virus.** Viruses, 13(8): 1592. <http://doi.org/10.3390/v13081592>

Kaszab E, Laczkó L, Bali K, Fidrus E, Bányai K, Kardos G. (2022): **Draft genome sequences of Lacticaseibacillus rhamnosus cek-R1, Lacticaseibacillus paracasei cek-R2, and Lentilactobacillus otakiensis cek-R3, isolated from a beetroot product.** Microbiology Resource Announcements, 11(1): e00921-21. <http://doi.org/10.1128/MRA.00921-21>

Nagy BJ, Balázs B, Benmazouz I, Gyüre P, Kövér L, Kaszab E, Bali K, Lovas-Kiss Á, Damjanova I, Majoros L, Tóth Á, Bányai K, Kardos G. (2022): **Comparison of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from rooks (Corvus frugilegus) and contemporary human-derived strains: A One Health Perspective.** Frontiers in Microbiology, 12: 785411. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785411>



Fehér E, Kaszab E, Bali K, Hoitsy M, Sós E, Bányai K. (2022): **Novel circoviruses from birds share common evolutionary roots with fish origin circoviruses.** Life, 12(3): 368. <http://doi.org/10.3390/life12030368>

Fehér E, Kaszab E, Bali K, Hoitsy M, Sós E, Bányai K. (2022): **A novel gammapolyomavirus in a great cormorant (*Phalacrocorax carbo*).** Archives of Virology, 167: 1721-1724. <http://doi.org/10.1007/s00705-022-05478-8>

Fehér E, Bali K, Kaszab E, Ihász K, Jakab Sz, Nagy B, Ursu K, Farkas S, Bányai K. (2022): **A novel gyrovirus in a common pheasant (*Phasianus colchicus*) with poult enteritis and mortality syndrome.** Archives of Virology, 167: 1349-1353. <http://doi.org/10.1007/s00705-022-05417-7>

Bekő K, Gróznér D, Mitter A, Udvari L, Földi D, Wehmann E, Kovács ÁB, Domán M, Bali K, Bányai K, Gyuris É, Thuma Á, Kreizinger Zs, Gyuranecz M. (2022): **Development and evaluation of temperature-sensitive *Mycoplasma anserisalpingitidis* clones as vaccine candidates.** Avian Pathology, 51(6): 535-549. <http://doi.org/10.1080/03079457.2022.2102967>

Kovács, ÁB. Wehmann E, Gróznér D, Bali K, Nemesházi E, Hrivnák V, Morrow CJ, Bányai K, Kreizinger Zs, Gyuranecz M. (2023) **Characterization of atypical *Mycoplasma anserisalpingitidis* strains** Veterinary Microbiology, 280 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109722>

## 14 Mellékletek

### 14.1 melléklet. A vizsgált fertőző bronchitis törzsek jellemzői

| Genotípus | Azonosító       | Származás     | Életkor (nap) | Szövet              | Klinikai tünetek/kórbonctani elváltozások  | Vakcinázás          |
|-----------|-----------------|---------------|---------------|---------------------|--|---------------------|
| GI-1      | D1561/8/11/HU   | Magyarország  | 7             | nyiroktüszők        | na   | H120                |
| GI-1      | D1871/1/1/12/HU | Magyarország  | na            | na                  | na   | na                  |
| GI-1      | D2340/2/1/13/RU | Oroszország   | 15            | légcső              | légzőszervrendszeri tünetek, duzzadt vesék   | na                  |
| GI-9      | D1719/1/11/GR   | Görögország   | 26            | nyiroktüszők        | légzőszervrendszeri tünetek, növekedésbeli elmaradás   | D1: Ark             |
| GI-9      | D2020/1/1/12/MX | Mexikó        |               | na                  | na   | na                  |
| GI-11     | D2147/7/13/BR   | Brazília      | 35            | tüdő, légcső        | másodlagos bakteriális fertőzés  | D1: Mass            |
| GI-13     | D1435/1/2/10/SA | Szaúd-Arábia  | 21            | nyiroktüszők        | na   | na                  |
| GI-13     | D1446/5/4/10/FE | Távol-Kelet   | 34            | nyiroktüszők        | magas mortalitás, légzőszervi tünetek, vesemegnagyobbodás  | D0: H120, D7:4/90   |
| GI-13     | D1478/2/2/10/GR | Görögország   | 40            | nyiroktüszők        | légzőszervrendszeri tünetek, 1%-os mortalitás/nap  | D0: H120; D15: H120 |
| GI-13     | D1530/2/3/10/RO | Románia       | na            | vese                | na   | na                  |
| GI-13     | D1530/3/3/10/RO | Románia       | 31            | nyiroktüszők        | 2-3 hetes korban légzőszervrendszeri tünetek, kötőhártya gyulladás, duzzadt fej, 50%-os morbiditás, 6-7%-os mortalitás | na                  |
| GI-13     | D1530/4/1/10/RO | Románia       | 39            | nyiroktüszők        | légzőszervrendszeri tünetek, kötőhártyagyulladás, ödémás fej, 50%-os morbiditás, 6-7%-os mortalitás                    | D1: Ma5; D9: 4/91   |
| GI-13     | D2353/13/PL     | Lengyelország | na            | na                  | na   | na                  |
| GI-14     | D2326/3/13/CM   | Kamerun       | 42            | bélszövet           | légzőszervrendszeri tünetek, híg bélsár  | nem vakcinázott     |
| GI-14     | D2326/4/13/CM   | Kamerun       | 60            | bélszövet           | légzőszervrendszeri tünetek: horkolás, sűrű váladékos orrfolyás  | nem vakcinázott     |
| GI-16     | D1344/2/2/10/EG | Egyiptom      | 21            | légcső              | légzőszervrendszeri tünetek, erősen kipirult légcső  | na                  |
| GI-16     | D1382/2/4/10/SA | Szaúd-Arábia  | 23            | nyiroktüszők        | légszomj   | D1: H120            |
| GI-16     | D1817/1/4/11/SA | Szaúd-Arábia  | 34            | nyiroktüszők        | na   | na                  |
| GI-16     | D1817/2/3/11/SA | Szaúd-Arábia  | 28            | allantoisz folyadék | na   | na                  |
| GI-16     | D1959/2/2/12/AR | Argentína     | 42            | vese                | na   | D1: Ma5, D14: H120  |
| GI-16     | D1992/1/2/12/SA | Szaúd-Arábia  |               | légcső              | na   | na                  |
| GI-16     | D2148/10/13/PE  | Peru          | 28            | tüdő, légcső        | na   | H120                |
| GI-16     | D2281/1/2/13/SA | Szaúd-Arábia  | 37            | tüdő                | na   | Ma5                 |

|       |                   |                         |       |                    |  |                          |
|-------|-------------------|-------------------------|-------|--------------------|--|--------------------------|
| GI-16 | D2334/12/2/13/CI  | Elefántcsontpart        | 45    | nyiroktűszők       | légzőszervrendszeri tünetek, híg bélsár  | D1: H120, D28: Mass      |
| GI-16 | D2358/2/13/TR     | Törökország             | na    | lép                | na   | na                       |
| GI-16 | D2358/24/13/PE    | Peru                    | 28    | vese, nyiroktűszők | köhögés  | D1: Mass                 |
| GI-16 | D2467/11/13/PE    | Peru                    | 26    | tüdő, légcső       | légzőszervrendszeri tünetek: köhögés, 10-40% morbiditás  | D1: Mass                 |
| GI-16 | D2540/1/1/13/SA   | Szaúd-Arábia            | 19    | vese, nyiroktűszők | na   | D15: IB CR88             |
| GI-19 | 11518 Kiskunmajsa | Magyarország            | na    | na                 | na   | na                       |
| GI-19 | D1345/5/2/10/FE   | Távol-Kelet             | 30    | nyiroktűszők       | kipirult légcső  | D0: H120                 |
| GI-19 | D1446/6/4/10/FE   | Távol-Kelet             | 35    | nyiroktűszők       | magas mortalitás, légzőszervi tünetek, vesemegnagyobbodás  | D0: H120, D7:4/91        |
| GI-19 | D1498/2/1/10/FE   | Távol-Kelet             | 35    | nyiroktűszők       | na   | H120                     |
| GI-19 | D1500/3/3/10/FE   | Távol-Kelet             | 21    | nyiroktűszők       | szétnövés  | na                       |
| GI-19 | D1543/1/1/10/FE   | Távol-Kelet             | 38    | légcső             | na   | na                       |
| GI-19 | D1617/3/11/UA     | Ukrajna                 | 28    | légcső             | légcsőgyulladás, vesegyulladás, bélgyulladás   | D0: IB primer; D10: H120 |
| GI-19 | D1623/1/1/11/HU   | Magyarország            | na    | légcső             | na   | na                       |
| GI-19 | D1654/1/4/11/RO   | Románia                 | 31    | nyiroktűszők       | légzőszervrendszeri tünetek: légcsőgyulladás, étvágytalanság, növekedésbeli visszamaradás, vesegyulladás | D1: Ma5                  |
| GI-19 | D1656/2/11/BY     | Fehéroroszország        | 31    | nyiroktűszők       | bélgyulladás, májgyulladás, bursa elsovadása, vérzések a béltraktusban és a nyiroktűszőkben              | na                       |
| GI-19 | D1674/2/2/11/FE   | Távol-Kelet             | 37    | vese               | na   | na                       |
| GI-19 | D1679/1/3/11/ZA   | Dél-Afrikai Köztársaság | 25    | nyiroktűszők       | na   | na                       |
| GI-19 | D1760/2/2/11/GR   | Görögország             | 29/40 | légcső             | légzőszervrendszeri tünetek  | D1: Ark; D18: 4/91       |
| GI-19 | D1777/1/11/FE     | Távol-Kelet             | 30    | vese               | vesegyulladás, hasmenés, híg bélsár  | Mass                     |
| GI-19 | D1777/3/2/11/FE   | Távol-Kelet             | 30    | légcső             | torticollis (csillagvizsgáló fejtartás)  | H120                     |
| GI-19 | D1783/2/3/11/RO   | Románia                 | 28    | tüdő, légcső, vesé | légzőszervrendszeri tünetek: légszomj, tüszögés, légcső szűkület   | D1: H120                 |
| GI-19 | D1812/2/1/11/ZA   | Dél-Afrikai Köztársaság | 28    | légcső             | légzőszervrendszeri tünetek  | na                       |
| GI-19 | D1812/3/12/11/SA  | Szaúd-Arábia            | na    | na                 | na   | na                       |
| GI-19 | D1861/1/4/12/IR   | Irán                    | 28    | nyiroktűszők       | na   | na                       |
| GI-19 | D1866/1/4/12/FE   | Távol-Kelet             | 28    | hasnyálmirigy      | na   | D3: H120, D9: H120       |
| GI-19 | D1866/2/4/12/FE   | Távol-Kelet             | 28    | nyiroktűszők       | na   | D3: H120, D9: H120       |

|       |                  |              |    |              |   |  |
|-------|------------------|--------------|----|--------------|---|--|
| GI-19 | D1867/2/1/12/FE  | Távol-Kelet  | 33 | tüdő         | na  | D1: H120, D9: H120 + 4/91  |
| GI-19 | D1867/3/2/12/FE  | Távol-Kelet  | 35 | tüdő         | na  | D1: H120, D9: H120 + 4/91  |
| GI-19 | D1944/1/3/12/RO  | Románia      | 39 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek: tüszögés, szőrcsögés; duzzadt fej, fehér híg bélsár                                      | D1: Ma5; D8: H120  |
| GI-19 | D2002/2/12/PT    | Portugália   | 35 | légcső       | na  | D1: H120; D9: IB primer  |
| GI-19 | D2022/2/3/12/RO  | Románia      | 29 | nyiroktüszők | Kedvetlenség, csapzott tollazat, láz, fehér híg bélsár  | D6: IB 88  |
| GI-19 | D2220/2/13/GR    | Görögország  | na | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek, elhullás   | D1: H120; D18: 4/91  |
| GI-19 | D2296/1/3/13/SD  | Szudán       | 14 | nyiroktüszők | na  | na   |
| GI-19 | D2328/15/3/13/GH | Ghána        | 27 | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek: nehézlégzés, orrfolyás;<br>emésztőszervrendszeri tünetek: zöld bélsár                    | nem vakcinázott  |
| GI-19 | D2331/3/2/13/FE  | Távol-Kelet  | 34 | nyiroktüszők | na  | D1: H120, D7: IB88, D14: Mass  |
| GI-19 | D2331/6/1/13/FE  | Távol-Kelet  | 36 | nyiroktüszők | torticollis (csillagvizsgáló fejtartás)   | D1: H120, D7: IB88, D14: Mass  |
| GI-19 | D2340/1/2/13/RU  | Oroszország  | 22 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek: légzsákgyulladás, légcsőgyulladás, veseléziók  | na   |
| GI-19 | D2563/1/2/13/GR  | Görögország  | na | nyiroktüszők | légzőszervi tünetek   | na   |
| GI-19 | D2886/3/13/SA    | Szaúd-Arábia | 21 | légcső, tüdő | na  | na   |
| GI-19 | D2804/4/2/13/ID  | Indonézia    | 33 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek: légcsőgyulladás, légzsákgyulladás, kötőhártyagyulladás, duzzadt vesék                    | H120   |
| GI-19 | D3006/1/3/15/ID  | Indonézia    | 35 | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek, kötőhártyagyulladás, légzsákgyulladás, duzzadt vesék                                     | na   |
| GI-19 | D3024/15/NL      | Hollandia    | na | na           | na  | na   |
| GI-19 | D3079/1/2/15/SA  | Szaúd-Arábia | 28 | nyiroktüszők | na  | D0: IB primer, D14: Ma5  |
| GI-19 | D3285/5/16/SA    | Szaúd-Arábia | 38 | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek, tojástermelés csökkenése   | D1: Mass + Ma5, D14: Nobilis 4/91, D16: IB élő, D44: IB előlt, D45: Ma5, D99: Nobilis 4/91, D105: IB előlt |
| GI-19 | D3286/7/16/LB    | Libanon      | 20 | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek   | D1: Mass, D19: Mass + Ma5  |
| GI-19 | D3386/1/2/16/SA  | Szaúd-Arábia | 30 | vese         | légcsőgyulladás, vesegyulladás, sűrű ragacos váladék a főhörgő elágazásban, 19% mortalitás, madárinfluenza koinfekció | D1: Ma5, D11: Ma5  |
| GI-19 | D3426/1/16/RO    | Románia      | 42 | légcső       | légzőszervrendszeri tünetek: orrfolyás, tüszögés, súlyos szemgyulladás  | na   |
| GI-19 | D3763/2/1/17/EG  | Egyiptom     | 26 | légcső       | légzőszervrendszeri tünetek, légcsőgyulladás, vesegyulladás   | Ma5  |
| GI-19 | D4084/1/3/17/SA  | Szaúd-Arábia | 28 | nyiroktüszők | na  | CR88   |
| GI-21 | D2628/1/4/13/MA  | Marokkó      | 33 | légcső       | lépmegnagyobbodás, híg bélsár   | na   |
| GI-21 | D2961/1/1/15/MA  | Marokkó      | 33 | légcső, tüdő | na  | na   |

|             |                  |                         |    |              |  |                       |
|-------------|------------------|-------------------------|----|--------------|--|-----------------------|
| GI-21       | D4000/3/17/RO    | Románia                 | 39 | nyiroktűszők | na   | na                    |
| GI-23       | D1344/2/4/10/EG  | Egyiptom                | 21 | tüdő         | légzőszervrendszeri tünetek, erősen kipirult légcső                                  | na                    |
| GI-23       | D1456/1/5/10/EG  | Egyiptom                | na | nyiroktűszők | na   | na                    |
| GI-23       | D1692/7/2/11/TR  | Törökország             | 37 | nyiroktűszők | akut légzőszervi tünetek   | H120 + 4/91           |
| GI-23       | D1694/1/2/11/EG  | Egyiptom                | 22 | nyiroktűszők | légzőszervi tünetek, szétnövés   | H120                  |
| GI-23       | D1694/3/1/11/EG  | Egyiptom                | 23 | nyiroktűszők | légzőszervi tünetek, szétnövés   | H120                  |
| GI-23       | D1794/4/1/11/EG  | Egyiptom                | 32 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek  | H120                  |
| GI-23       | D1887/2/3/12/EG  | Egyiptom                | 28 | nyiroktűszők | légzőszervrendszeri tünetek: légcsőgyulladás, tüdőgyulladás, idegrendszeri tünetek   | na                    |
| GI-23       | D1899/5/12/TR    | Törökország             | 31 | légcső       | légzőszervi tünetek  | D1: H120, később 4/91 |
| GI-23       | D1993/4/12/SA    | Szaúd-Arábia            | 16 | légcső       | légzőszervrendszeri tünetek  | na                    |
| GI-23       | D2017/2/4/12/LB  | Libanon                 | 36 | légcső       | emésztőrendszeri elváltozások, bevezések   | na                    |
| GI-23       | D2095/7/3/12/EG  | Egyiptom                | 36 | légzsák      | na   | na                    |
| GI-23       | D2194/1/3/13/EG  | Egyiptom                | 37 | nyiroktűszők | na   | D1: H120, D14: 4/91   |
| GI-23       | D2234/4/13/JO    | Jordánia                | 20 | nyiroktűszők | légzőszervrendszeri tünetek  | D1: IB primer         |
| GI-23       | D2666/4/13/AE    | Egyesült Arab Emírségek | 22 | nyiroktűszők | légzőszervrendszeri tünetek: tüsszögés, köhögés, véres légcső,                       | na                    |
| GI-23       | D2697/5/2/13/SA  | Szaúd-Arábia            | 32 | nyiroktűszők | légzőszervrendszeri tünetek: légcsőgyulladás, vesemegnagyobbodás, csökkent aktivitás | H120                  |
| GI-23       | D2828/3/13/TR    | Törökország             | 29 | légcső       | légzőszervrendszeri tünetek, 1% mortalitás   | na                    |
| GI-23       | D3035/5/2/15/TR  | Törökország             | 40 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek  | D0: IB primer, Var2   |
| GI-25       | D1633/5/1/11/MX  | Mexikó                  | na | légcső       | 1% mortalitás  | na                    |
| GI-27       | D2342/1/1/13/USA | USA                     | na | na           | na   | na                    |
| GI-27       | D2342/1/5/13/USA | USA                     | na | na           | na   | na                    |
| GI-27       | D2342/1/7/13/USA | USA                     | na | na           | na   | na                    |
| rekombináns | 211776 Imrehegy  | Magyarország            | 28 | vese         | vesegyulladás, 8%-os mortalitás  | na                    |
| rekombináns | D2584/12/1/13/PH | Fülöp-szigetek          | 26 | vese         | légzőszervrendszeri tünetek, veseérintettség, duzzadt vesék                          | na                    |
| variáns     | D2334/11/2/13/CI | Elefántcsontpart        | 31 | nyiroktűszők | orrfolyás, híg bélsár, növekedésbeli elmaradás                                       | D1: H120              |

|         |                 |                |    |              |   |      |
|---------|-----------------|----------------|----|--------------|---|------|
| variáns | D2586/4/6/13/PH | Fülöp-szigetek | 35 | nyiroktüszők | na  | na   |
| variáns | D2804/3/3/13/ID | Indonézia      | 29 | nyiroktüszők | légzőszervrendszeri tünetek: légcsőgyulladás, légzsákgyulladás,<br>kötőhártyagyulladás, duzzadt vesék | H120 |
| variáns | D3276/4/2/16/PH | Fülöp-szigetek | na | na           | na  | na   |

na: nincs adat; D: nap (day)

## 14.2 melléklet. A dolgozatban vizsgált törzsek genomszerveződése

| Azonosító         | ORF hossz (nt) |       |           |     |     |           |             |     |     |     |     |                   |     |
|-------------------|----------------|-------|-----------|-----|-----|-----------|-------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-----|
|                   | 1a             | 1ab   | tüske (S) | 3a  | 3b  | burok (E) | membrán (M) | 4b  | 4c  | 5a  | 5b  | nukleokapszid (N) | 6b  |
| 11518 Kiskunmajsa | 11847          | 19881 | 3498      | 174 | 192 | 286       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| 211776 Imrehegy   | 11847          | 19881 | 3492      | 174 | 195 | 279       | 672         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1344/2/2/10/EG   | 11859          | 19893 | 3501      | 174 | 195 | 309       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | na  |
| D1344/2/4/10/EG   | 11820          | 19869 | 3492      | 174 | 192 | 285       | 681         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1345/5/2/10/FE   | 11799          | 19833 | 3498      | 174 | 195 | 330       | 678         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1382/2/4/10/SA   | 11859          | 19896 | 3501      | 174 | 195 | 309       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1236              | na  |
| D1435/1/2/10/SA   | 11865          | 19791 | 3465      | 174 | 195 | 285       | 672         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1446/5/4/10/FE   | 11802          | 19836 | 3495      | 174 | 195 | 327       | 678         | 285 | na  | 198 | 273 | 1230              | na  |
| D1446/6/4/10/FE   | 11766          | 19725 | 3498      | 174 | 192 | 282       | 672         | 285 | na  | 186 | 249 | 1230              | na  |
| D1456/1/5/10/EG   | 11826          | 19860 | 3492      | 174 | 192 | 279       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1478/2/2/10/GR   | 11847          | 19806 | 3498      | 174 | 195 | 282       | 681         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1498/2/1/10/FE   | 11826          | 19785 | 3498      | 174 | 195 | 282       | 672         | 285 | 162 | 138 | 249 | 1230              | na  |
| D1500/3/3/10/FE   | 11865          | 19899 | 3498      | 174 | 189 | 327       | 678         | 285 | 162 | 198 | 273 | 1230              | 222 |
| D1530/2/3/10/RO   | 11802          | 19761 | 3495      | 174 | 192 | 315       | 669         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 204 |
| D1530/3/3/10/RO   | 11802          | 19761 | 3495      | 174 | 195 | 304       | 669         | 285 | na  | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1530/4/1/10/RO   | 11826          | 19797 | 3495      | 174 | 195 | 298       | 693         | 285 | na  | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1543/1/1/10/FE   | 11856          | 19815 | 3498      | 174 | 195 | 282       | 672         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | na  |
| D1561/8/11/HU     | 11802          | 19836 | 3489      | 174 | 195 | 327       | 678         | 243 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 231 |
| D1617/3/11/UA     | 11856          | 19890 | 3498      | 174 | 195 | 330       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1623/1/1/11/HU   | 11850          | 19884 | 3498      | 174 | 195 | 311       | 681         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1633/5/1/11/MX   | 11862          | 19896 | 3492      | 174 | 192 | 324       | 672         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 231 |
| D1654/1/4/11/RO   | 11832          | 19806 | 3498      | 174 | 192 | 309       | 705         | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230              | 222 |
| D1656/2/11/BY     | 11835          | 19869 | 3498      | 187 | 195 | 330       | 681         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 225 |
| D1674/2/2/11/FE   | 11856          | 19890 | 3498      | 174 | 189 | 327       | 678         | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230              | 222 |

|                  |       |       |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
|------------------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| D1679/1/3/11/ZA  | 11850 | 19884 | 3498 | 174 | 192 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1692/7/2/11/TR  | 11835 | 19869 | 3492 | 174 | 192 | 324 | 681 | na  | 168 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1694/1/2/11/EG  | 11787 | 19761 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 162 | 195 | 249 | 1230 | 222 |
| D1694/3/1/11/EG  | 11835 | 19884 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 171 | 195 | 249 | 1230 | 222 |
| D1719/1/1/11/GR  | 11799 | 19833 | 3510 | 174 | 195 | 324 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1760/2/2/11/GR  | 11793 | 19827 | 3498 | 174 | 195 | 315 | 684 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1777/1/1/11/FE  | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1777/3/2/11/FE  | 11787 | 19821 | 3498 | 174 | 195 | 301 | 674 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1227 | 225 |
| D1783/2/3/11/RO  | 11862 | 19821 | 3498 | 174 | 192 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1794/4/1/11/EG  | 11826 | 19875 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1812/2/1/11/ZA  | 11844 | 19878 | 3498 | 174 | 192 | 333 | 690 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1812/3/12/11/SA | 11811 | 19845 | 3447 | 174 | 192 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1817/1/4/11/SA  | 11859 | 19893 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D1817/2/3/11/SA  | 11883 | 19917 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 705 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1224 | 189 |
| D1861/1/4/12/IR  | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1866/1/4/12/FE  | 11862 | 19911 | 3489 | 174 | 192 | 285 | 702 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1866/2/4/12/FE  | 11862 | 19815 | 3501 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1867/2/1/12/FE  | 11817 | 19770 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1867/3/2/12/FE  | 11868 | 19902 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 675 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1871/1/1/12/HU  | 11802 | 19836 | 3489 | 174 | 195 | 330 | 678 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 231 |
| D1887/2/3/12/EG  | 11847 | 19866 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 228 |
| D1899/5/12/TR    | 11832 | 19866 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 669 | 285 | 171 | 198 | 246 | 1230 | 225 |
| D1944/1/3/12/RO  | 11832 | 19791 | 3495 | 174 | 189 | 330 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D1959/2/2/12/AR  | 11811 | 19770 | 3474 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D1992/1/2/12/SA  | 11859 | 19893 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D1993/4/12/SA    | 11862 | 19896 | 3492 | 174 | 195 | 279 | 669 | 285 | 171 | 201 | 249 | 1233 | 222 |
| D2002/2/12/PT    | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 195 | 321 | 669 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2017/2/4/12/LB  | 11748 | 19797 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 279 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2020/1/1/12/MX  | 11862 | 19896 | 3510 | 174 | 195 | 300 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | na  |



|                  |       |       |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
|------------------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| D2022/2/3/12/RO  | 11802 | 19836 | 3471 | 174 | 192 | 330 | 681 | 288 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2095/7/3/12/EG  | 11823 | 19857 | 3492 | 174 | 213 | 306 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2147/7/13/BR    | 11802 | 19836 | 3510 | 174 | 195 | 324 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1227 | 225 |
| D2148/10/13/PE   | 11859 | 19818 | 3492 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2194/1/3/13/EG  | 11823 | 19872 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 228 |
| D2220/2/13/GR    | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 192 | 330 | 681 | 288 | 165 | 201 | 249 | 1230 | 222 |
| D2234/4/13/JO    | 11814 | 19785 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2281/1/2/13/SA  | 11859 | 19893 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D2296/1/3/13/SD  | 11853 | 19887 | 3498 | 174 | 192 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 273 | 1230 | 228 |
| D2326/3/13/CM    | 11841 | 19875 | 3498 | 174 | 186 | 324 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 228 |
| D2326/4/13/CM    | 11862 | 19896 | 3501 | 174 | 192 | 324 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2328/15/3/13/GH | 11829 | 19863 | 3498 | 174 | 192 | 285 | 678 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1224 | 225 |
| D2331/3/2/13/FE  | 11865 | 19899 | 3498 | 174 | 192 | 327 | 678 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2331/6/1/13/FE  | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 183 |
| D2334/11/2/13/CI | 11850 | 19884 | 3507 | 174 | 195 | 282 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2334/12/2/13/CI | 11862 | 19896 | 3501 | 174 | 195 | 282 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2340/1/2/13/RU  | 11829 | 19863 | 3498 | 174 | 177 | 309 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2340/2/1/13/RU  | 11832 | 19866 | 3489 | 174 | 195 | 327 | 678 | 243 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 231 |
| D2342/1/1/13/USA | 11856 | 19890 | 3510 | 174 | 195 | 324 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2342/1/5/13/USA | 11781 | 19815 | 3483 | 174 | 195 | 324 | 672 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2342/1/7/13/USA | 11781 | 19815 | 3510 | 174 | 195 | 330 | 678 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2353/13/PL      | 11859 | 19893 | 3495 | 174 | 177 | 279 | 684 | 285 | na  | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D2358/2/13/TR    | 11859 | 19818 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2358/24/13/PE   | 11859 | 19818 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2467/11/13/PE   | 11856 | 19815 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D2540/1/1/13/SA  | 11859 | 19893 | 3501 | 174 | 195 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D2563/1/2/13/GR  | 11802 | 19836 | 3495 | 174 | 192 | 330 | 681 | 288 | 165 | 201 | 249 | 1230 | 225 |
| D2584/12/1/13/PH | 11814 | 19845 | 3498 | 174 | 195 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D2586/4/6/13/PH  | 11856 | 19890 | 3495 | 174 | 192 | 330 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |

|                 |       |       |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
|-----------------|-------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| D2628/1/4/13/MA | 11859 | 19893 | 3501 | 174 | 192 | 314 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2666/4/13/AE   | 11859 | 19899 | 3492 | 174 | 192 | 308 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | na  |
| D2697/5/2/13/SA | 11847 | 19863 | 3495 | 174 | 192 | 331 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1221 | 225 |
| D2804/3/3/13/ID | 11829 | 19788 | 3492 | 174 | 195 | 300 | 678 | 285 | 162 | 174 | 249 | 1230 | na  |
| D2804/4/2/13/ID | 11820 | 19779 | 3492 | 174 | 192 | 348 | 633 | 285 | 165 | 138 | 249 | 1230 | na  |
| D2828/3/13/TR   | 11820 | 19854 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 675 | 285 | 165 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2886/3/13/SA   | 11859 | 19893 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 174 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D2961/1/1/15/MA | 11862 | 19896 | 3501 | 174 | 192 | 315 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D3006/1/3/15/ID | 11832 | 19791 | 3492 | 174 | 192 | 348 | 633 | 285 | 165 | 138 | 249 | 1230 | na  |
| D3024/15/NL     | 11850 | 19884 | 3471 | 174 | 192 | 333 | 681 | 285 | 165 | 201 | 249 | 1230 | 222 |
| D3035/5/2/15/TR | 11832 | 19863 | 3492 | 174 | 192 | 285 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D3079/1/2/15/SA | 11802 | 19836 | 3447 | 174 | 192 | 309 | 681 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D3276/4/2/16/PH | 11838 | 19797 | 3495 | 174 | 195 | 333 | 681 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D3285/5/16/SA   | 11850 | 19884 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 714 | 285 | 174 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D3286/7/16/LB   | 11748 | 19782 | 3495 | 174 | 189 | 306 | 678 | 285 | 174 | 198 | 249 | 1230 | 222 |
| D3386/1/2/16/SA | 11862 | 19896 | 3498 | 174 | 192 | 333 | 717 | 285 | 162 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D3426/1/16/RO   | 11802 | 19761 | 3495 | 174 | 192 | 321 | 669 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D3763/2/1/17/EG | 11844 | 19878 | 3498 | 174 | 195 | 321 | 669 | 285 | 171 | 198 | 249 | 1230 | 225 |
| D4000/3/17/RO   | 11802 | 19836 | 3501 | 174 | 195 | 285 | 681 | 285 | 171 | 201 | 249 | 1230 | 225 |
| D4084/1/3/17/SA | 11850 | 19884 | 3498 | 174 | 189 | 327 | 678 | 285 | 174 | 198 | 249 | 1230 | na  |

**14.3 melléklet. A teljes genom alapú rekombinációelemzéshez használt GenBank adatbázisban elérhető vakcina törzsek GenBank azonosítói**

| <b>Vakcina törzs</b>        | <b>GenBank azonosító</b>   |
|-----------------------------|--|
| <b>Massachusetts típusú</b> | FJ904713,<br>FJ904720-FJ904723,<br>GQ504725, KY626045,<br>MK728875 |
| <b>Arkansas típusú</b>      | GQ504721<br>MH779856- MH779860                                     |
| <b>Connecticut típusú</b>   | FJ904716-FJ904719<br>KF696629                                      |
| <b>Californai típusú</b>    | FJ904714, FJ904715   |
| <b>Georgia típusú</b>       | GQ504723   |
| <b>L1148</b>                | KY933090   |
| <b>YX10</b>                 | MF508703   |
| <b>VicS-v</b>               | KF460437   |
| <b>VicS-del</b>             | KF931628   |
| <b>BR-I</b>                 | KY626044   |
| <b>SAIBK</b>                | DQ288927   |
| <b>1148-A</b>               | KY933089   |
| <b>4/91</b>                 | KF377577   |
| <b>H52</b>                  | EU817497   |
| <b>H120</b>                 | FJ888351, GU393335   |

## 14.4 melléklet. A dolgozatban vizsgált 102 törzs S fehérje S1/S2 vágási hely motívumai

|                        | 520                      | 530    | 540    | 550            | 560     | 570  |
|------------------------|--------------------------|--------|--------|----------------|---------|------|
| 11518/Kiskunmajsa/2010 | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1654/1/4/11/RO        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2220/2/13/GR          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2563/1/2/13/GR        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1783/2/3/11/RO        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1944/1/3/12/RO        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | IIVP |
| D2022/2/3/12/RO        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2340/1/2/13/RU        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2002/2/12/PT          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3024/15/NL            | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1656/2/11/BY          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTSSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1617/3/11/UA          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3426/1/16/RO          | LTSRNETGSEQIENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | IIVP |
| D2328/15/3/13/GH       | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRKRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1679/1/3/11/ZA        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1812/2/1/11/ZA        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2296/1/3/13/SD        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1760/2/2/11/GR        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3763/2/1/17/EG        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1500/3/3/10/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1674/2/2/11/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | LIVP |
| D1866/1/4/12/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | IDQNV  | TSCSYVSYGRFCIK | PDGSLN  | MIVP |
| D1866/2/4/12/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | IDQNV  | TSCSYVSYGRFCIK | PDGSLN  | MIVP |
| D1867/2/1/12/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1867/3/2/12/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1777/1/11/FE          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2331/3/2/13/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2331/6/1/13/FE        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1861/1/4/12/IR        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2886/3/13/SA          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3079/1/2/15/SA        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3285/5/16/SA          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3286/7/16/LB          | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D4084/1/3/17/SA        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D3386/1/2/16/SA        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCSYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1623/1/1/11/HU        | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D1345/5/2/10/FE        | LTSRNETGSQPIENQLYVKLTNV  | RRYRRS | ISENVT | TSCQYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D1446/6/4/10/FE        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRYRRS | ISENVT | TSCQYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D1498/2/1/10/FE        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRYRRS | ISENVT | TSCQYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D1543/1/1/10/FE        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRYRRS | ISENVT | TSCQYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D1777/3/2/11/FE        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRYRRS | ISENVT | TSCQYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D2804/4/2/13/ID        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRHRRS | ISENVT | TSCPYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D3006/1/3/15/ID        | LTSRNETGSQPIENQFYVKLTNV  | RRHRRS | ISENVT | TSCPYVSYGRFCIQ | PDGLIKQ | IIVP |
| D1812/3/12/11/SA       | LTSRNETGSEQVENQFYVKLTNSS | HRRRRS | SIGQNV | TSCPYVSYGRFCIE | PDGSLK  | MIVP |
| D2584/12/1/13/PH       | LTSRNETGAQLLENQFYIKLTNGS | HRSRRS | SISNNV | TSCPYVSYGRYCI  | PDGSLKQ | IIVP |
| D2586/4/6/13/PH        | LTSRNETGAQLLENQFYIKLTNGS | HRSRRS | SISNNV | TSCPYVSYGRYCI  | PDGSLKQ | IIVP |
| D3276/4/2/16/PH        | LTSRNETGAQLLENQFYIKLTNGS | HRSRRS | SISNNV | TSCPYVSYGRYCI  | PDGSLKQ | IIVP |
| 211776/Imrehegy/2011   | LTSRNETDSEFIENRFYIKLTNGT | RRSRRS | SVTANV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLSM | IIVP |
| D4000/3/17/RO          | LTSRNETGSESIENQFYIKLTNGT | RRSRRS | SITGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLST | IIVP |
| D2961/1/1/15/MA        | LTSRNETGSESIENQFYIKLTNGT | RRSRRS | SITGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLST | IIVP |
| D2628/1/4/13/MA        | LTSRNETGSESIENQFYIKLTNGT | RRSRRS | SITGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLST | IIVP |
| D1446/5/4/10/FE        | LTSRNETDSEFIENRFYIKLTNGT | RRSRRS | SVTGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLFI | IIVP |
| D1530/2/3/10/RO        | LTSRNETDSEFIENRFYIKLTNGT | RRSRRS | SVTGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLFI | IIVP |
| D1530/4/1/10/RO        | LTSRNETDSEFIENRFYIKLTNGT | RRSRRS | SVTGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLFI | IIVP |
| D1530/3/3/10/RO        | LTSRNETDSEFIENRFYIKLTNGT | RRSRRS | SVTGNV | TNCPYVSYGKFCIK | PDGSLFI | IIVP |

|                  | 520         | 530            | 540         | 550                        | 560 | 570 | ... |
|------------------|-------------|----------------|-------------|----------------------------|-----|-----|-----|
| D2353/13/PL      | LTSHNETGSE  | SIENQFYIKLTNGT | RRRRSVTGN   | VNCPYVSYGKFCIKPDGSLSTIVP   |     |     |     |
| D1435/1/2/10/SA  | LTSHNETGSE  | PIENQFYIKFTNGT | RRRRSVTAN   | VNCPYVSYGKFCIKPDGSLSTIVP   |     |     |     |
| D1478/2/2/10/GR  | LTSRNETGSE  | QVENQFYVKLTNNS | RRRRSIGQNL  | TSCPYVSYGRFCIEPDGSLKMIVP   |     |     |     |
| D2804/3/3/13/ID  | LTSRNETASQ  | LLENQFYIRLVNGS | RRFRSSVNN   | VTSCPYVSYGKFCIEPDGSKTIVP   |     |     |     |
| D1561/8/11/HU    | LTSRNETGSQ  | LLENQFYIKITNGT | RRFRRSITE   | SVENCPYVSYGKFCIKPDGSIATIVP |     |     |     |
| D2340/2/1/13/RU  | LTSRNETGSQ  | LLENQFYIKITNGT | RRFRRSITE   | SVENCPYVSYGKFCIKPDGSIATIVP |     |     |     |
| D1871/1/1/12/HU  | LTSRNETGSQ  | LLENQFYIKITNGT | RRFRRSITE   | SVENCPYVSYGKFCIKPDGSIATIVP |     |     |     |
| D2147/7/13/BR    | LTSINQTSQ   | LENQFYVKLTNNS  | RRRSVSE     | NVTSCPYVSYGKFCIKPDGSLSTIVP |     |     |     |
| D2326/3/13/CM    | LTSINETGYL  | FVGNQFYVKLTN   | STRRSVTEN   | VTSNCPYVSYGTFCIKPDGSLSNIVP |     |     |     |
| D2326/4/13/CM    | LTSINETGSQ  | FVGNQFYVKLTN   | STRRSVTEN   | VTSNCPYVSYGTFCIKPDGSLSNIVP |     |     |     |
| D1344/2/2/10/EG  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2540/1/1/13/SA  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1992/1/2/12/SA  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1817/1/4/11/SA  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2281/1/2/13/SA  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYAKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1817/2/3/11/SA  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKLPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1382/2/4/10/SA  | HTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2358/2/13/TR    | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFLNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2467/11/13/PE   | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFLNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2358/24/13/PE   | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFLNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2148/10/13/PE   | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D2334/12/2/13/CI | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1959/2/2/12/AR  | LTSRNETGSQ  | PIENRFYVKFPNS  | RRRTGRSTIAN | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSVSEIVP  |     |     |     |
| D1344/2/4/10/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1694/1/2/11/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2234/4/13/JO    | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2017/2/4/12/LB  | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1899/5/12/TR    | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D3035/5/2/15/TR  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1993/4/12/SA    | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2666/4/13/AE    | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNS  | IRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2828/3/13/TR    | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1694/3/1/11/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1692/7/2/11/TR  | LTSHNETGSQ  | QLENLFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1456/1/5/10/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2095/7/3/12/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1794/4/1/11/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1887/2/3/12/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2194/1/3/13/EG  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D2697/5/2/13/SA  | LTSHNETGSQ  | QLENRFYVKLTNST | RRTRRSTIAN  | VTTCPYVSYGRFCIKPDGLVSEIVP  |     |     |     |
| D1719/1/11/GR    | LTSRNETGSQ  | LLENQFYIKITNGT | RRRRSVTEN   | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSIVIVP   |     |     |     |
| D2020/1/1/12/MX  | LTSRNETGSQ  | LLENQFYIKITNGT | RRRRSVTEN   | VNCPYVSYGKFCIKPDGSSIVIVP   |     |     |     |
| D2342/1/5/13/USA | LTSRNETDSQ  | FLENQFYIKLTNGS | RRFRSSISS   | VNCPYVTYGRYCIEPDGLKQIVP    |     |     |     |
| D2342/1/7/13/USA | LTSRNETDSQ  | FLENQFYIKLTNGS | RRFRSSISS   | VNCPYVTYGRYCIEPDGLKQIVP    |     |     |     |
| D2342/1/1/13/USA | LTSRNETDSQ  | FLENQFYIKLTNGS | RRFRSSISS   | VNCPYVTYGRYCIEPDGLKQIVP    |     |     |     |
| D2334/11/2/13/CI | LTSRNETSNSQ | LVEDKFYVKLTSSA | RRSRSTISN   | VTSYVTYGTFCIKPDGSLASIVP    |     |     |     |
| D1633/5/1/11/MX  | LTSRNETGSQ  | FLENQFFIKLVNGT | RRRRSVTEN   | VTTCPYVSYGKFCITPDGLISQIVP  |     |     |     |

## 15 Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy lehetőséget teremtett a doktori munkám végzéséhez, tanácsai és kritikus észrevételei nagyban hozzájárultak e munka elkészültéhez. Hálás vagyok, hogy megtisztelt bizalmával és részt vehetek a témacsoportban zajló változatos és kihívásokkal teli munkában, lehetőséget teremtve ezzel a folyamatos szakmai fejlődésre.

Köszönöm társtémavezetőmnek, Dr. Bálint Ádámnak a rendelkezésünkre bocsátott mintákat, a publikációk kéziratának lektorálását és a dolgozat állatorvosi szemmel történő és alapos átolvasását.

Köszönettel tartozom a CEVA-PHYLAXIA Oltóanyagtermelő Zrt. munkatársainak, külön kiemelve Dr. Palya Vilmost, Dr. Kiss Istvánt, Homonnay Zalánt és Dr. Mató Tamást, a rendelkezésünkre bocsátott mintákért és adatokért, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Dr. Thuma Ákosnak külön köszönöm a fényképeket, amelyekkel szemléletesebbé tudtam tenni a leírtakat.

Köszönöm az Új kórokozók csoport minden egykori és jelenlegi tagjának, hogy támogatnak a munkám során és nekik köszönhetően jó hangulatban telnek a szürke hétköznapok. Külön köszönet illeti Enit, Esztit, Mariannt, Szilvikét és Renit az ábrakészítésben nyújtott segítségükért, a dolgozat átolvasásáért, valamint, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Hálásan köszönöm a családomnak, hogy támogattak céljaim elérésében és igyekeztek nyugodt és harmonikus háttérrel biztosítani számomra. Köszönöm férjemnek, Marcinak, hogy végtelen türelemmel viselte a disszertációírás időszakát és hol humorral és bátorítással, hol szigorral, de mindig átlendített a mélypontokon.

Hálásan köszönöm Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy biztosította a munka anyagi és infrastrukturális feltételeit, lehetővé téve, hogy „ágyúval löjek verébre”.