



Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Hüllő RNS vírusok molekuláris jellemzése

Tóth-Ihász Katalin

Keszthely

2022

A doktori iskola

megnevezése: Festetics Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Dr. Anda Angéla DSc.
Egyetemi tanár, MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Környezettudományi
Intézet

Témavezetők: Dr. Farkas Szilvia
Klinikai állatorvos, PhD
Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti Tanszék és
Haszonállat-Gyógyászati Klinika

Dr. Nagy Szabolcs Tamás
Egyetemi tanár, MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Állattenyésztési
Tudományok Intézete

.....
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
2.1 Az arénavírusok és a boa sejtzárványos betegség	10
2.1.1 Az arénavírusok rendszertana	10
2.1.2 Az arénavírusok virionja és genomszerveződése	12
2.1.3 Az arénavírusok szaporodása	13
2.1.4 A boa sejtzárványos betegség.....	14
A BIBD klinikai tünetei és előfordulása	14
A BIBD jellegzetes szövettani képe	15
A BIBD diagnózisa.....	16
2.1.5 A reptarénavírusok koinfekciója	16
2.2 Hüllő orthoreovírusok jellemzése	17
2.2.1 A reovírusok általános jellemzése.....	17
2.2.2 Az orthoreovírusok rendszertana.....	17
2.2.3 Az orthoreovírusok virionja és genomszerveződése	19
2.2.4 Az orthoreovírusok szaporodása	22
2.2.5 Az orthoreovírusok patogenitása hüllőkben.....	22
2.3 Teknős picornavírusok jellemzése	24
2.3.1 A picornavírusok rendszertana	24
2.3.2 A picornavírusok virionja.....	25
2.3.3 A picornavírusok genomszerveződése és szaporodása	26
2.3.4 A picornavírusok patogenitása teknősökben.....	28
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1 A vizsgált minták eredete	30
3.1.1 Hüllő eredetű arénavírus vizsgálata	30
3.1.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata	30
3.1.3 Teknős picornavírusok vizsgálata	31
3.2 Virális nukleinsav izolálása.....	32
3.3 RT-PCR.....	32
3.3.1 Óriáskígyó eredetű arénavírusok vizsgálata	32
Általános RT-PCR.....	32
Egylépéses RT-PCR	33
3.3.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata	33
Kétlépéses RT-PCR szűrővizsgálathoz	33
Egylépéses RT-PCR	34
3.3.3 Teknős picornavírusok specifikus kimutatása RT-PCR rendszerrel.....	34
3.4 A PCR termékek ellenőrzése és tisztítása	35
3.5 Vírusizoláláshoz felhasznált sejtvonalak.....	35
3.6 Vírusizolálás.....	35
3.6.1 Óriáskígyó eredetű arénavírus izolálása	35
3.6.2 Hüllő orthoreovírusok izolálása	35

3.6.3	Teknős picornavírusok izolálása.....	36
3.7	Sanger szekvenálás	36
3.8	Újgenerációs szekvenálás	36
	RT-PCR.....	36
	PCR termékek ellenőrzése és tisztítása	37
	IonTorrent szekvenálás	37
3.9	Az RNS genom szegmensvégeinek meghatározása.....	37
3.9.1	Hüllő orthoreovírusok vizsgálata.....	37
	Kétlépéses RT-PCR.....	37
3.9.2	Teknős picornavírusok vizsgálata.....	38
3.10	A szekvenciaadatok elemzésére használt bioinformatikai módszerek	38
3.11	Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE).....	39
4.	EREDMÉNYEK.....	40
4.1	Óriáskígyó eredetű arénavírus vizsgálata.....	40
4.1.1	A szervek RT-PCR-es szűrővizsgálata	40
4.1.2	A Coldvalley vírus izolálása	40
4.1.3	A teljes genomszekvencia meghatározása és elemzése	40
4.2	Hüllő orthoreovírusok vizsgálata	48
4.2.1	A bozótvipera reovírus törzs teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése	48
4.2.2	Hüllő orthoreovírus fertőzöttség gyakoriságának felmérése	54
4.2.3	Hüllő orthoreovírusok izolálása	58
4.3	Teknős picornavírusok vizsgálata	59
4.3.1	Teknős eredetű picornavírusok teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése	59
4.3.2	Teknős picornavírusok izolálása.....	62
4.3.3	Diagnosztikai RT-PCR rendszer fejlesztése teknős picornavírusok specifikus kimutatásához	63
5.	MEGBESZÉLÉS.....	66
5.1	Kígyó arénavírusok vizsgálata.....	66
5.2	Hüllő orthoreovírusok vizsgálata	70
5.3	Teknős picornavírusok vizsgálata	74
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	79
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
7.1	Összefoglalás	80
7.2	Summary	82
8.	A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI	83
8.1	Referált/lektorált tudományos közlemények	83
	Konferencia közlemények.....	83

Konferencia kiadvány.....	83
Konferencia poszterek.....	83
8.2 Előadás magyar nyelven.....	83
M1. IRODALOMJEGYZÉK	85
M2. MELLÉKLETEK.....	95
M2.1 Az ábrák jegyzéke.....	96
M2.2 A táblázatok jegyzéke.....	99
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	101

Rövidítések jegyzéke

ABV	Aurora borealis virus	Aurora borealis vírus
ArSV	Arabuta snake virus	Arabuta snake vírus
ARV	<i>Avian orthoreovirus</i>	madár orthoreovírus
as	amino acid	aminosav
BIBD	boid inclusion body disease	boa sejtzáróványos betegség
bp	base pair	bázispár
BroV	<i>Broome orthoreovirus</i>	Broome orthoreovírus
BRV	<i>Baboon orthoreovirus</i>	pávián orthoreovírus
CASV	California Academy of Science virus	California Academy of Science vírus
cap	cap structure	sapka struktúra
cDNS	complementary DNA	komplementer DNS
CPE	cytopathic effect	citopatogén hatás
cre	cis replication elements	cisz replikációs elem
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
dsRNS	double-stranded RNA	duplaszálú RNS
FAST	fusion associated small transmembrane	fúzió-asszociált kis transzmembrán
GOGV	Golden Gate virus	Golden Gate vírus
GP	glycoprotein	glikoprotein
GPC	glycoprotein precursor	glikoprotein prekursor
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
IgH-2	Iguana heart, ATCC CCL-108	leguán szív sejtvonala
IGR	intergenic region	intergénikus régió
IH	immunohistochemistry	immunhisztokémia
IRES	internal ribosomal entry site	belső riboszóma kötőhely
KaBV	Kaltenbach virus	Kaltenbach vírus
kb	kilobase	kilobázis
kbp	kilobasepair	kilobázispár
L	large genome segment	nagy genomsegment
M	medium genome segment	közepes genomsegment
m/V%		vegyesszázalék, 100 cm ³ oldatban lévő oldott anyag tömege
MAHLV	<i>Mahlapitsi orthoreovirus</i>	Mahlapitsi orthoreovírus

mRNS	messenger RNA	hírvivő RNS
MRV	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	emlős orthoreovírus
NBV	<i>Nelson-Bay orthoreovirus</i>	denevér orthoreovírus
NeARV	<i>Neoavian orthoreovirus</i>	vadmadár orthoreovírus
NGS	next-generation sequencing	új generációs szekvenálás
nm	nanometer	nanométer
NP	nucleoprotein	nukleoprotein
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	poliakrilamid gélelektroforézis
PASC	pairwise sequence comparison	páronkénti szekvencia összehasonlítás
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát pufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PRV	<i>Piscine orthoreovirus</i>	hal orthoreovírus
PV	picorna virus	picornavírus
RaV-A1	<i>Rafivirus A</i> , tortoise rafivirus	teknős rafivirus A
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNS-függő RNS polimeráz
RNP	ribonucleoprotein	ribonukleoprotein
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RRV	<i>Reptilian orthoreovirus</i>	hüllő orthoreovírus
RT	reverse transcription	reverz transzkripció
S	small genome segment	kis genomszegmens
SSP	stable signal peptide	stabil szignál peptid
ssRNS	single-stranded RNA	szimplaszálú RNS
SSRV	Steller sea lion reovirus	Steller oroszlánfóka reovírus
TBE	tris-borate-EDTA	trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav
TEMED	tetramethylethylenediamine	tetrametil-etilén-diamin
TH-1	Terrapin heart, ATCC CCL-50	Teknős szív sejtvonal
ToPV	tortoise picornavirus	teknős picornavírus
TRV	<i>Testudine orthoreovirus</i>	teknős orthoreovírus
TVAV	Tvärminne avian virus	varjú orthoreovírus
UHV	University of Helsinki virus	University of Helsinki vírus
UTR	untranslated region	nem-átíródo szakasz
V/V%		térfogatszázalék, 100 cm ³ oldatban lévő oldott anyag térfogata

VH 2	Russell's viper heart, ATCC CCL-140	vipera szív sejtvonala
VPg	viral genome-linked protein	virális genom kötött fehérje
Z	zinc-binding matrix protein	cink-kötő mátrix fehérje

1. Bevezetés és célkitűzések

Az utóbbi évtizedekben a hullótartás egyre népszerűbb az egzotikus állattartók körében, ezzel párhuzamosan növekszik az igény a hullókben gyakran halálos kimenetelű betegséget okozó vírusok kimutatására és megismerésére. Az újgenerációs szekvenálási technikák (next-generation sequencing, NGS) és a metagenomikai módszerek rohamos fejlődésének és térhódításának köszönhetően egyre több adattal rendelkezünk a ribonukleinsav (RNS) genommal rendelkező vírusokról. A legtöbb kutatás ennek ellenére főleg a gazdaságilag jelentős állat- és növényfajokra összpontosít a humán megbetegedéseket okozó vírusokon felül és a gerinctelen, valamint az alacsonyabbrendű gerinces szervezetek viroszférájáról elenyészően keveset tudunk (Shi et al., 2018).

Az esetek többségében a hullókat érintő megbetegedések kóroki háttere tisztázatlan marad, és a már kimutatott vírusokból is csak részleges szekvencia adatok állnak rendelkezésünkre. A vírus eredetű betegségek diagnosztikája nem megfelelő, ezáltal a hatékony kezelés és megelőzés is jelentős nehézségekbe ütközik.

Munkánk során a hullókat érintő RNS vírusfertőzésekkel foglalkoztunk, ezen belül is a hulló orthoreovírusokra, a kígyókat fertőző arénavírusokra és a teknősöket érintő picornavírusokra összpontosítottunk. Céljaink az alábbiak voltak:

- Hulló eredetű arénavírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése, valamint rendszertani besorolása.
- Egy hullóból származó reovírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése.
- A hulló orthoreovírus fertőzöttség gyakoriságának felmérése, a kimutatott vírusok teljes vagy részleges genomszekvenciáinak meghatározása, a hulló orthoreovírusok genetikai diverzitásának pontosabb megismerése, és egy magyarországi törzsgyűjtemény létrehozása.
- Szárazföldi teknősből származó picornavírusok izolálása, továbbá a kimutatott vírusok teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése.
- Teknős eredetű picornavírusok kimutatására alkalmas szűrővizsgálat kifejlesztése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az arénavírusok és a boa sejtzárványos betegség

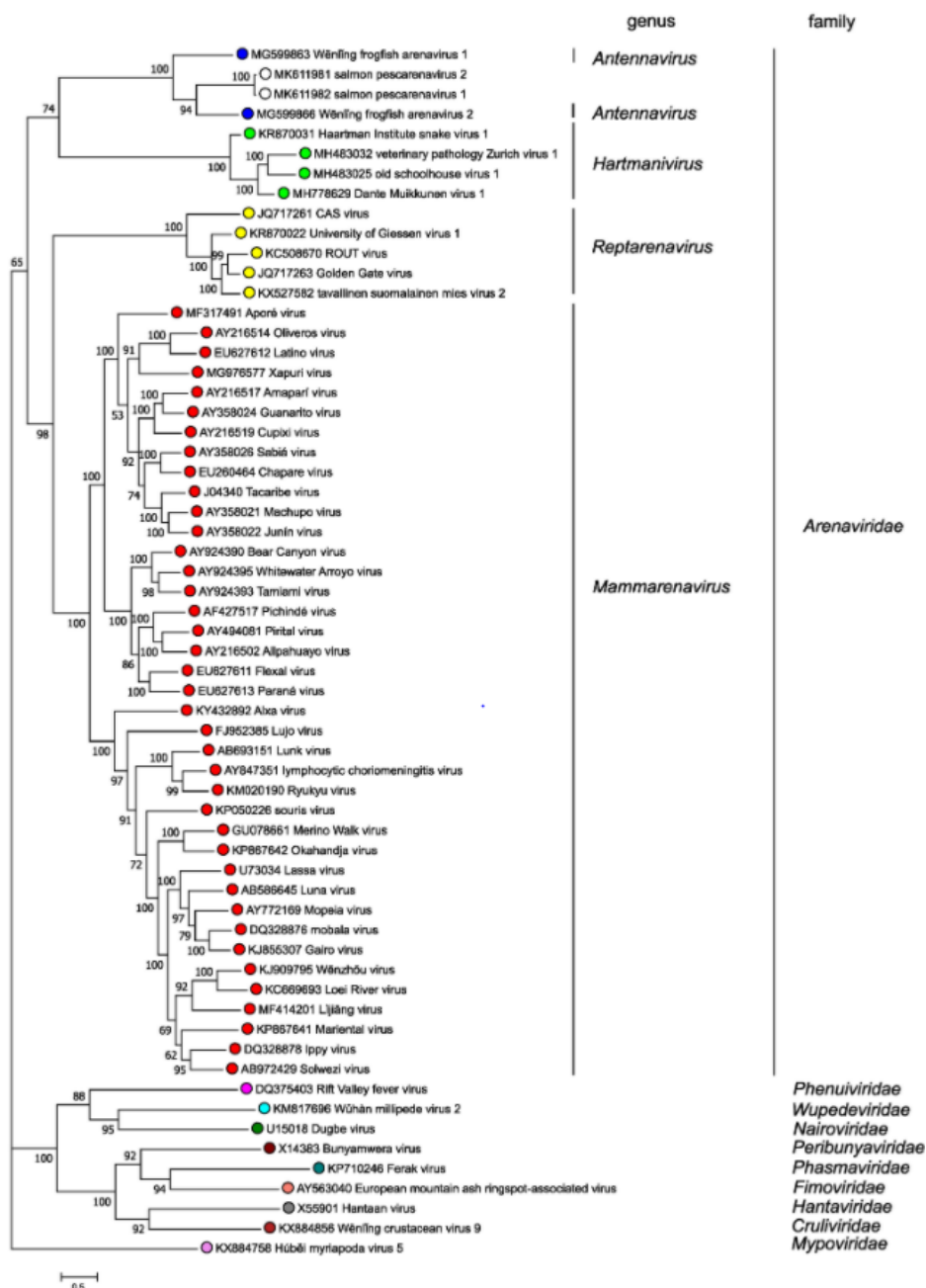
2.1.1 Az arénavírusok rendszertana

Az *Arenaviridae* család 1976-ban alakult, két szegmensből, nagy és kicsi (large, L és small, S) álló, ambiszensz kódolású, egyszálú RNS (ssRNS) örökítőanyaggal rendelkező burkos vírusokat foglalja magába (Maes et al., 2018). 2012-ig az *Arenaviridae* család egyetlen genuszból, az *Arenavirus* nemzetségből állt, és kizárólag emlősöket fertőző vírusok tartoztak ide, melyek természetes gazdái rágcsálók voltak (Pontremoli et al., 2019). A fejlődő molekuláris biológiai technikáknak köszönhetően egyre több arénavírust mutattak ki hullókból, melyek igen különbözőnek bizonyultak (Abba et al., 2016). Ennek köszönhetően 2015-ben az *Arenaviridae* család újabb nemzetséggel bővült: a kígyókat fertőző vírusokat a *Reptarenavirus* nemzetségbe, az emlősökben előforduló vírusokat pedig a *Mammarenavirus* nemzetségbe sorolták (Maes et al., 2018). Utóbbi nemzetségben a vírusok földrajzi elhelyezkedésük és antigenitási tulajdonságaik alapján két monofiletikus csoportot alkotnak, az óvilági (Old World, OW) és újvilági víruscsoportokat (New World, NW) (Pontremoli et al., 2019). A *Mammarenavirus* nemzetség képviselőinek természetes gazdái a rágcsálók, melyekben krónikus fertőzést alakítanak ki, majd zoonózis útján emberben vérzéses lázat vagy lágyagyburok gyulladást eredményezhetnek (Stenglein et al., 2015). Jelenleg 39 vírusfajt sorolhatunk a *Mammarenavirus* nemzetségbe (Radoshitzky et al., 2019).

Gerinctelen élőlényekből is sikerült kimutatni arénavírust, amely a Hubei myriapoda vírus 5 vírus nevet kapta. Ez az L és S szegmensek mellett egy harmadik, közepes méretű (medium, M) genomszegmessel is rendelkezik, ami nem mutatott homológiát a csoport más tagjainak genomszekvenciáival (Shi et al., 2016).

2017-ben a *Bunyaviridae* családból átalakított *Bunyavirales* rendbe gyűjtötték a szegmentált, lineáris, egyszálú RNS örökítőanyaggal rendelkező vírusokat, melyek negatív vagy ambiszensz kódolásúak. A rendbe az *Arenaviridae* család mellett 11 másik víruscsaládot soroltak: *Cruliviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Leishbuviridae*, *Mypoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae*, *Tospoviridae*, *Wupedeviridae* (Maes et al., 2018). Az *Arenaviridae* család 2018-ban további két nemzetséggel gyarapodott (**1. ábra**): az *Antennavirus* genusz képviselőit sugarasúszójú halakban mutatták ki, melyek – a Hubei myriapoda vírus 5-höz hasonlóan – három szegmessel rendelkeznek. Ezeket a csáposhal-félékben (*Antennarius striatus*) talált vírusokat Wenling frogfish arenavirus 1-nek (*Striated antennavirus*) és 2-nek (*Hairy antennavirus*) nevezték el (Shi et al., 2018; Radoshitzky et al., 2019). A *Hartmanivirus* nemzetség tagjai szintén kígyókat fertőznek és a reptarénavírusokhoz hasonló kódolási stratégiával rendelkeznek, azonNPban az L szegmensükről hiányzik a cink-kötő mátrixfehérjét (zinc-binding matrix protein, Z) kódoló gén (Hepojoki et al., 2018). Jelenleg négy fajuk ismert: *Muikkunen hartmanivirus*, *Schoolhouse hartmanivirus*, *Zurich hartmanivirus*, *Haartman hartmanivirus* (Radoshitzky et al., 2019). BIBD-ben szenvedő kígyók egy részében kimutattak hartmanvírusokat, azonban a betegség kialakulásában betöltött szerepük jelenleg tisztázatlan (Hepojoki et al., 2018). A munkánk szempontjából fontos *Reptarenavirus* nemzetségen belül jelenleg öt fajt tart számon a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV): *California*-, *Golden*-, *Giessen*-, *Ordinary*-, *Rotterdam reptarenavirus*, melyekbe mindösszesen nyolc vírustörzset sorolnak be, a többi GenBank adatbázisában található törzs besorolása még nem történt meg. Taxonómiai vizsgálatokra az RNS-függő RNS polimeráz gént (RNA-dependent RNA polymerase; *RdRp* vagy L) és nukleoprotein (nucleoprotein, NP) gént használják nagyfokú konzerváltsága miatt (Radoshitzky et al., 2019).

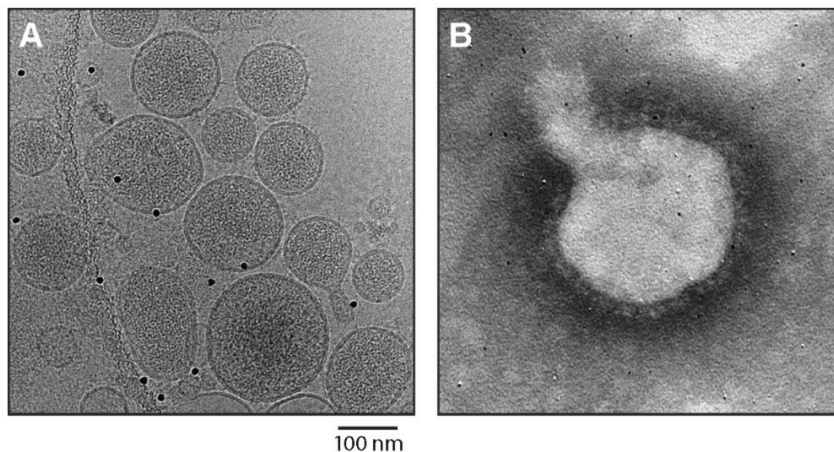
Az ICTV a vírusok rendszertani helyzetének meghatározására különböző biológiai és molekuláris jellemzők alapján ad ajánlást. Egyik fő szempont a szekvenciák páronkénti összehasonlítása (pairwise sequence comparison, PASC): két arénavírus egy nemzetségbe sorolandó, ha S szegmens esetén 40%-nál, L szegmens esetén 35%-nál magasabb nukleotid (nt) azonossági értékekkel rendelkeznek. A faji szintű besorolásnál S szegmens esetén 80% nt szekvencia azonosságtól, L szegmens esetén 76% feletti nt azonossági értékeknél tekinthetünk két vírust egyazon fajba tartozónak. A NP fehérje aminosav (as) szekvenciája esetén ez az érték 88%. A fenti csoportosításon kívül egyéb tényezőket is figyelembe kell venni: a vírus földrajzi elterjedését, az antigenitási tulajdonságokat, a gazdaspektrumot és az emberi megbetegedést okozó képességét vagy hiányát (Radoshitzky et al., 2019).



1. ábra. Az *Arenaviridae* család képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének szekvenciája alapján készült maximum-likelihood filogenetikai törzsfaj; jól elkülöníthetőek az egyes nemzetségek: *Antennavirus* nemzetség (kék pont), *Hartmanivirus* nemzetség (zöld pont), *Mammarenavirus* nemzetség (piros pont), *Reptarenavirus* nemzetség (sárga pont). A fa LG+G modellel készült, 1000-es bootstrap értékkel (Radoshitzky et al., 2019).

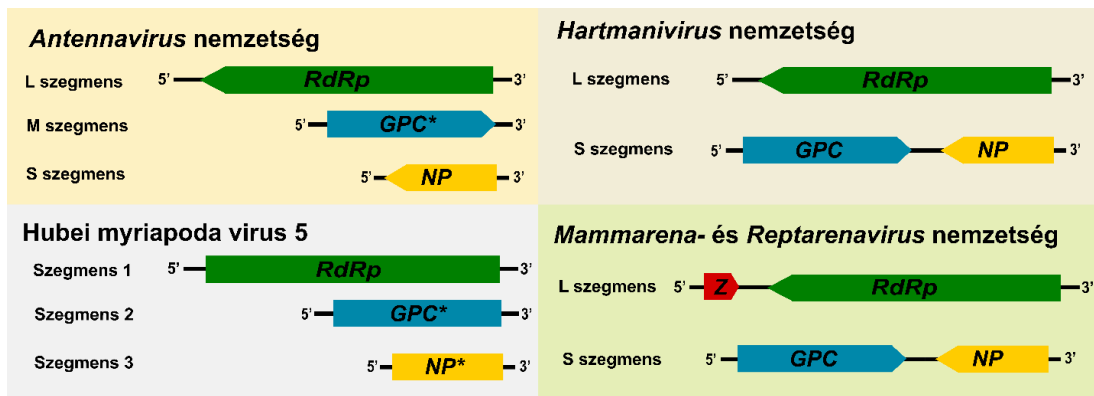
2.1.2 Az arénavírusok virionja és genomszerveződése

Az arénavírusok neve a latin arena, vagyis homok kifejezésből ered. A virionok elektronmikroszkópos képén jellegzetes, homokszerű, elektrondenz szemcséket láthatunk. A virionok lipidburokkal rendelkeznek, átmérőjük 40–200 nanométer (nm), szerkezetük pleomorf, kerek vagy kissé ellipszoid. A virion felületén tüskeszerű képletek találhatóak, melyek a vírus által kódolt glikoprotein trimerekből épülnek fel (Hetzl et al., 2013). (**2. ábra**)



2. ábra. University of Helsinki vírus (UHV) krioelektronmikroszkópos (A) és negatív festéses elektronmikroszkópos (B) felvétele (Radoshitzky et al., 2019).

Az arénavírusok általános genomszerveződése a víruscsaládon belül a reptaréna- és mammarénavírusok esetén megőrzöttséget mutat (**3. ábra**). Az örökítőanyag körülbelül 11 kilobázis (kb) hosszúságú, negatív irányultságú, szimplaszálú RNS, mely kettő (mammaréna-, reptaréna- és hartmani vírusok), esetenként három (antennavírusok és Hubei myriopoda vírus) szegmensből áll. Mindkét szegmens ambiszensz kódolási stratégiát használ, a két polipeptid ellenkező orientációjú szintézisét eredményezve (Radoshitzky et al., 2019). Az S szegmens hossza hozzávetőleg 3,5 kb, két fehérjét kódol: a glikoprotein prekuzort (glycoprotein precursor, GPC) a virális RNS szálon és az NP-t a genommal komplementer szekvencián. A körülbelül 6,7 kb hosszú L szegmens a genommal komplementer szekvencián kódolja az RdRp-t (másnéven L fehérjét) és – mammarénavírusok és reptarénavírusok esetén – az ún. really interesting new gene (RING) domént tartalmazó cink-kötő mátrix fehérjét (Z fehérje) (Hetzl et al., 2013; Pontremoli et al., 2019). Az antennavírusok genomjában további egy, ismeretlen funkcióval rendelkező fehérjét kódoló gén található (Radoshitzky et al., 2019). Az RdRp a leginkább megőrzött, míg a többi fehérje nagyfokú változatosságot mutat (Hepojoki et al., 2015b). Az RNS szegmenseken nem található „cap” struktúra (sapka struktúra), illetve a 3' végi poli-A struktúra is hiányzik. A kódoló régiókat nemkódoló intergenikus régió (intergenic region; IGR) választja el egymástól, mely stabil hajtű szerkezetet alkot (Hetzl et al., 2013).



3. ábra. Az *Arenaviridae* család genomszerveződésének sematikus ábrája a négy nemzetség és a Hubei myriapoda vírus 5 esetén (*Bunyavirales: Mypoviridae*) (Radoshitzky et al., 2019 alapján). A téglalapok és nyilak az egyes fehérjéket kódoló géneket jelölik, csillaggal a hipotetikus fehérjék jelöltek. RdRp – RNS-függő RNS polimeráz, GPC – glikoprotein prekursor, NP – nukleoprotein, Z – cink-kötő mátrix fehérje.

Az RNS szegmenseknek 5' és 3' végein nemkódoló konzervált reverz komplementer szekvenciák (untranslated region, UTR) találhatóak, melyek jellegzetes visszahajló (úgynevezett panhandle) struktúrát alakítanak ki bázispárosodáson keresztül. A 3'UTR szakaszon található a promóter régió, mely az RNS replikációját és a virális gének transzkripcióját irányítja (Radoshitzky et al., 2015).

Az arénavírusok négy szerkezeti fehérjét expresszálnak. A virális NP a nukleokapszid fő alkotója, mely a virális örökítőanyaggal gyöngysorszerű struktúrát, úgynevezett ribonukleoprotein (RNP) komplexet alkot. Az RdRp fehérje a vírusgenom transzkripciójáért és translációjáért felelős. A Z fehérje különböző funkciókat lát el, expressziója szabályozott: a vírus életciklusának korai szakaszában alacsony expressziója gátolja az RNS-szintézist, így korlátozza a replikációt, míg emelkedett szintje szükséges a vírus összeállításához és a vírus gazdasejtbe való kiszabadulásához (Hetzl et al., 2013; Radoshitzky et al., 2019). Hartmanivírusok esetén ez a Z fehérje nélkül zajlik, így feltételezhető, hogy az arénavírusok virion összeszerelése és kijutása a sejtbe különböző evolúciós utakon mehetett végbe (Pontremoli et al., 2019). A GPC fehérje poszttranszlációs módosításaival alakul ki a glikoprotein (GP). A GPC hasítását a gazdasejt eredetű S1P/SKI proteáz végzi, melynek eredményeként kialakulnak a GP1 és GP2 fehérjék. Hartmani- és mammarénavírusok esetében úgynevezett stabil szignál peptid (stable signal peptide, SSP) is keletkezik harmadik hasítás eredményeként, mely a GP komplexhez kapcsolódik. Reptarénavírusok nem rendelkeznek SSP-vel, GP komplexük egyedülálló a nemzetségen belül. Hartmanivírusok esetében GP1 és GP2 az SSP-hez kapcsolódva három alegységet tartalmazó tüske struktúrát hoznak létre (SSP-GP1-GP2). A GP1 a gazdasejt sejt felszíni receptoraihoz való kapcsolódásért, a GP2 – amely I-es típusú fúziós fehérje – a gazdasejtbe jutásért felelős. A tüskék a virion gazdasejt eredetű membránjának egész felületén megtalálhatóak, feji és szár régióból épülnek fel. A tüske behatol a virion membránjába, ezen keresztül kapcsolódik a Z fehérje alkotta réteggel, melyen keresztül kölcsönhatásba tud lépni a gyöngysorszerű struktúrát alkotó nukleinsav-polimeráz komplexszel (Radoshitzky et al., 2019). Reptarénavírusoknál a University of Helsinki vírus (UHV) esetében ismert a virion felépítése, mely a fentiek szerint épül fel (Hetzl et al., 2013).

2.1.3 Az arénavírusok szaporodása

A vírus a sejt felszíni receptorokon való kötődést követően az endoszomális útvonalat használva jut be a gazdasejtbe. Egyes mammarénavírusok glikoprotein molekulákat, alfa disztróglükán receptort használnak ehhez, reptarénavírusok esetén nem ismert, mely receptor segítségével jut be a vírus a sejtbe (Hepojoki et al., 2015a). Ott a késői endoszómákkal pH-függő módon egyesülve a citoplazmába juttatja az RNP komplexet. Az RNP irányítja a virális genom replikációját és translációját. A replikáció alatt az RdRp cap struktúra nélküli antigeonomi

és genomi RNS-t szintetizál. Az ambiszensz kódolási stratégia miatt csak az NP és RdRp messenger RNS (mRNS) tud a genomi RNS-ről szintetizálódni, a GPC és Z fehérjék mRNS-ének szintéziséhez templátként az S és L szegmensek antigenomja szolgál. A virális fehérjék szintézise a szubgenomi, 5' cap struktúrával rendelkező mRNS-ről történik, melyekről hiányzik a terminációért felelős poli-A farok. A virion összeépülésének mechanizmusa kevésbé megértett terület, az újonnan szintetizált genomi RNS, NP fehérje és RdRp fehérje nukleokapsziddá áll össze gazdasejt eredetű riboszómákkal, utóbbi funkciója jelenleg nem tisztázott (Radoshitzky et al., 2019).

2.1.4 A boa sejtzárványos betegség

A boa sejtzárványos betegség (BIBD; boid inclusion body disease) az 1970-es évek óta ismert. Három évtizeden keresztül az etiológiai ágensének a C-típusú retrovírusokat tartották, azonban az összefüggést nem tudták megerősíteni (Schumacher et al., 1994). 2012-ben és 2013-ban három csoport munkássága alapján a betegség mögött álló kórokozóként arénavírusokat - reptarénavírusokat - jelölték meg (Stenglein et al., 2012; Bodewes et al., 2013; Hetzel et al., 2013). A gyakran halálos kimenetelű és gyorsan terjedő kór nagy károkat okoz állattenyésztők és hobbi állattartók számára, óriáskígyó-félék (*Boidae* család) és a *Pythonidae* család tagjainak fertőzésével (Turchetti et al., 2013; Argenta et al., 2020). A két óriáskígyó taxon képviselőinek élőhelye eltérő: a boa fajok főként Közép- és Dél-Amerikában, Madagaszkáron, a pitonok Afrikában, Ázsiában és Ausztráliában honosak. A vadon élő kígyók reptarénavírus fertőzöttségéről jelenleg is kevés adattal rendelkezünk (Argenta et al., 2020).

A BIBD klinikai tünetei és előfordulása

A BIBD-vel érintett óriáskígyók tünetei sokrétűek. Boákban és pitonokban a betegség eltérő lefolyásáról számoltak be (Carlisle-Nowak et al., 1998). Boákban kezdetben a legjellegzetesebb tünet a regurgitáció, mely anorexiával párosul. Ezt követik pár héten belül a központi idegrendszeri tünetek, mint a fej remegése, dezorientáció, ataxia, anizokória, pupilla egyenlőtlen tágulata, viselkedésbeli változások és bénulás. Ezeket a tüneteket kísérheti tüdőgyulladás, fekélyes szájgyulladás, a száj rothadása, immunszuppresszió, abnormális vedlés, neoplasztikus elváltozások és elhalásos bőrgyulladás (Vancraeynest et al., 2006). A tünetek megjelenése után hetekkel, akár hónapokkal később következik be az elhullás, de ismert tünetmentes hordozás is (Schumacher et al., 1994; Orós et al., 1998). Pitonokban ezzel szemben nem számoltak be regurgitációról, azonban kóros soványság jellemző a fertőzésre. A központi idegrendszeri tünetek hamarabb megjelennek és súlyosabbak a boákhöz viszonyítva: koordinációs zavarok, időszakos görcsök, a test hátsó részének bénulása, a fej állandó felfelé néző pozíciója (úgynevezett stargazing szindróma) és ferde fejtartás (Carlisle-Nowak et al., 1998). A pitonok néhány héttel a tünetek megjelenése után elpusztulnak. Mivel a vörös- és fehérvérsejtekben is megtalálhatóak a betegségre jellemző sejtzárványok – melyek így képtelenek ellátni funkciójukat –, immunszuppresszív állapot alakul ki. Anti-reptarénavírus ellenanyagot a BIBD-s kígyók csak kis részéből tudtak kimutatni (Korzyukov et al., 2016). A kígyók gyakran másodlagos fertőzések miatt pusztulnak el: leírtak bakteriális (szalmonellozis), gomba eredetű (aszpergillozis) és protozoonotikus (amőbiázis) szeptikémiát (Hetzel et al., 2013).

Az elhullott kígyók boncolása során megfigyelték a hasnyálmirigy és a lép kötőszövetes elfajulását, a gyomor és a nyelőcső nyálkahártya lézióit, fekélyes szájnyálkahártya gyulladást, a máj sápadtságát, tüdőgyulladást és limfoproliferatív elváltozásokat. Továbbá a pitonokban a fertőzéshez köthető több szervet érintő gyulladás is előfordul boákkal ellentétben (Vancraeynest et al., 2006).

A reptarénavírusok terjedése történhet közvetlen kontaktussal cseppfertőzés vagy aeroszol útján, de a vektor közvetítette horizontális terjedést sem zárhatjuk ki. A

vertikális – szülőről utódra történő – terjedés mind az apától, mind az anyától bizonyítást nyert fogságban tartott kígyók körében (Keller et al., 2017).

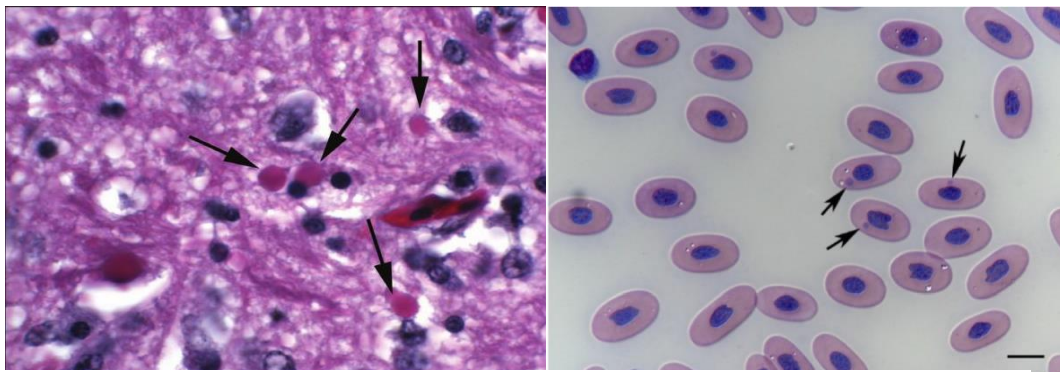
Az 1970-es évek óta leírtak BIBD-t vörösfarkú boában (*Boa constrictor*), zöld anakondában (*Eunectes murinus*), Haiti boában (*Epicrates striatus*), fán lakó boában (*Corallus annulatus*, *Corallus hortulanus*), szalagos tigrispitonban (*Python molurus*), kockás pitonban (*Python reticulatus*), királpitonban (*Python regius*), sziklapitonban (*Python sebae*) és szőnyegmintás pitonokban (*Morelia spilota variegata* és *Morelia spilota spilota*) (Carlisle-Nowak et al., 1998; Hetzel et al., 2013). Sikló- és viperafélékben is jegyezték le a BIBD-hez hasonló tünetekkel rendelkező megbetegedést: kaliforniai királysiklóban (*Lampropeltis getula californiae*), pálma viperában (*Botriechis marchi*) és fiatal vörös gabonasiklóban (*Pantherophis guttatus guttatus*) (Raymond et al., 2001; Fleming et al., 2003).

A BIBD jellegzetes szövettani képe

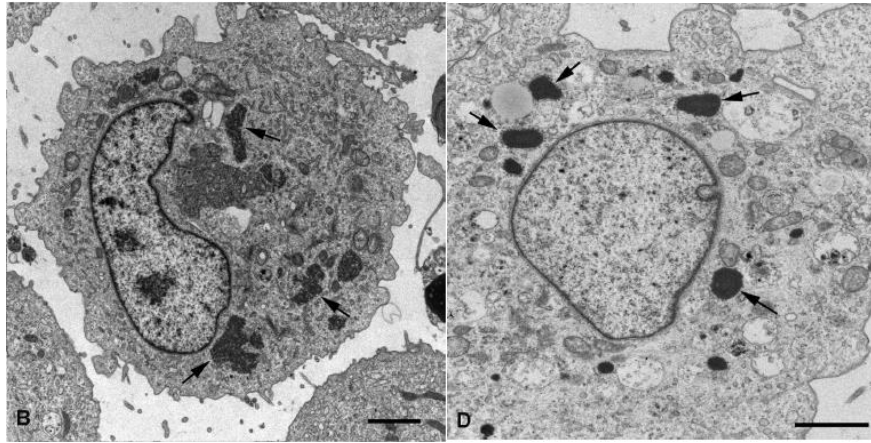
A BIBD a jellegzetes szövettani képről kapta a nevét: 2-10 µm átmérőjű eozinofil amorf zárványokat láthatunk a fertőzött sejtek citoplazmájában (**4. ábra**) (Wozniak et al., 2000).

A zárványok pitonokban főként a központi idegrendszer sejtjeiben találhatóak meg, míg boákban testszerte előfordulnak. Érintettek lehetnek a központi idegrendszer neuronjai, a retina, a perifériás ganglionok, az emésztőrendszer, légzőrendszer és vesetubulusok epitél sejtjei, a hepatociták, a mellékvese szöveti limfociták és a hasnyálmirigy acinus sejtjei (Chang and Jacobson, 2010; Stenglein et al., 2017). Zárványokat mutattak ki továbbá a vérből, limfocitákból, vörösvértestekből, bazofil granulocitákból is (Chang and Jacobson, 2010).

Elektronmikroszkópos vizsgálat (**5. ábra**) szerint a zárványképződés kezdeti fázisában a poliriboszómából származó, 68 kDa molekulatömegű fehérje alegységek, a virális nukleoproteinek (NP), a sejtek citoplazmájában akumulálódnak (Hetzel et al., 2013; Hepojoki et al., 2015a). A növekvő zárványokhoz további alegységek csatlakoznak, koncentrikus elrendezést kialakítva (Chang and Jacobson, 2010).



4. ábra. Tigrispiton (*Python molurus*) agy metszet (Hematoxilin és eozin festés). A nyilak jelölik a citoplazma zárványokat (Chang and Jacobson, 2007).



5. ábra. University of Helsinki (UHV) vírussal fertőzött boa vese sejtek (B) és UHV-val fertőzött Vero E6 sejtek (D) ultrastruktúrája. A zárványok a boa vese sejtek citoplazmájában amorf, míg a Vero sejteknél ellipszoid alakúak (Hepojoki et al., 2015b).

A BIBD diagnóza

Mivel a BIBD nem rendelkezik patognomikus tünetekkel, a betegség *ante mortem* diagnóza a szövettani metszetek fénymikroszkópos vizsgálatával történik (Vancraeynest et al., 2006). Leggyakrabban vérből, máj-, vese- és a bélbiopsziájával nyernek mintát, melyekben hematoxin-eozin festés után a nagy eozinofil és elektrondenz zárványok jelenléte a BIBD kórjelzője (Chang et al., 2010). Arról jelenleg nincsenek adatok, hogy a fertőzött egyedek hány százalékában alakulnak ki tünetek és mennyi a szubklinikai fertőzött. Valószínűleg a fertőzés sokáig fennmaradhat a kígyókban látens formában (Chang and Jacobson, 2010).

2.1.5 A reptarénavírusok koinfekciója

2015-ben két munkacsoport – Stenglein és munkatársai, valamint Hepojoki és munkatársai – BIBD-vel diagnosztizált kígyók metagenomikai vizsgálatával igazolta különböző reptarénavírusok egyidejű jelenlétét kígyókban, mely az S és L szegmens genotípusok különböző eloszlását eredményezte rekombináció és reasszortáció révén. Ezeknél a kígyóknál kiegyenlítetlen L és S szegmens arányt mutattak ki, mely az eddig ismert reptarénavírus diverzitást sokszorosára növelte (Hepojoki et al., 2015b; Stenglein et al., 2015). Erről a jelenségről mammarénavírusok esetében eddig nem számoltak be (Radoshitzky et al., 2019).

Kimutatták továbbá, hogy bizonyos S szegmensek előfordulása gyakoribb, illetve klinikai tünetekkel nem rendelkező kígyókban más S szegmens található meg, mint a tüneteket mutató egyedekben (Windbichler et al., 2019). Ez az eltérő szegmens eloszlás valószínűleg az egyes genotípusok közötti kompetíció következményeként alakult ki, mely különböző replikáció/csomagolódási hatékonyságban valósulhat meg (Pontremoli et al., 2019).

A reptarénavírus koinfekció hozzájárulhat a BIBD-re jellemző krónikus fertőzés és immunszuppresszív állapot kialakításához (Hepojoki et al., 2015b). Azonosítottak BIBD-ben szenvedő kígyókban multiplex reptarénavírus fertőzéssel felül hartmanavírusokat, melyek egy S és egy L szegmenst birtokoltak (Argenta et al., 2020).

2.2 Hüllő orthoreovírusok jellemzése

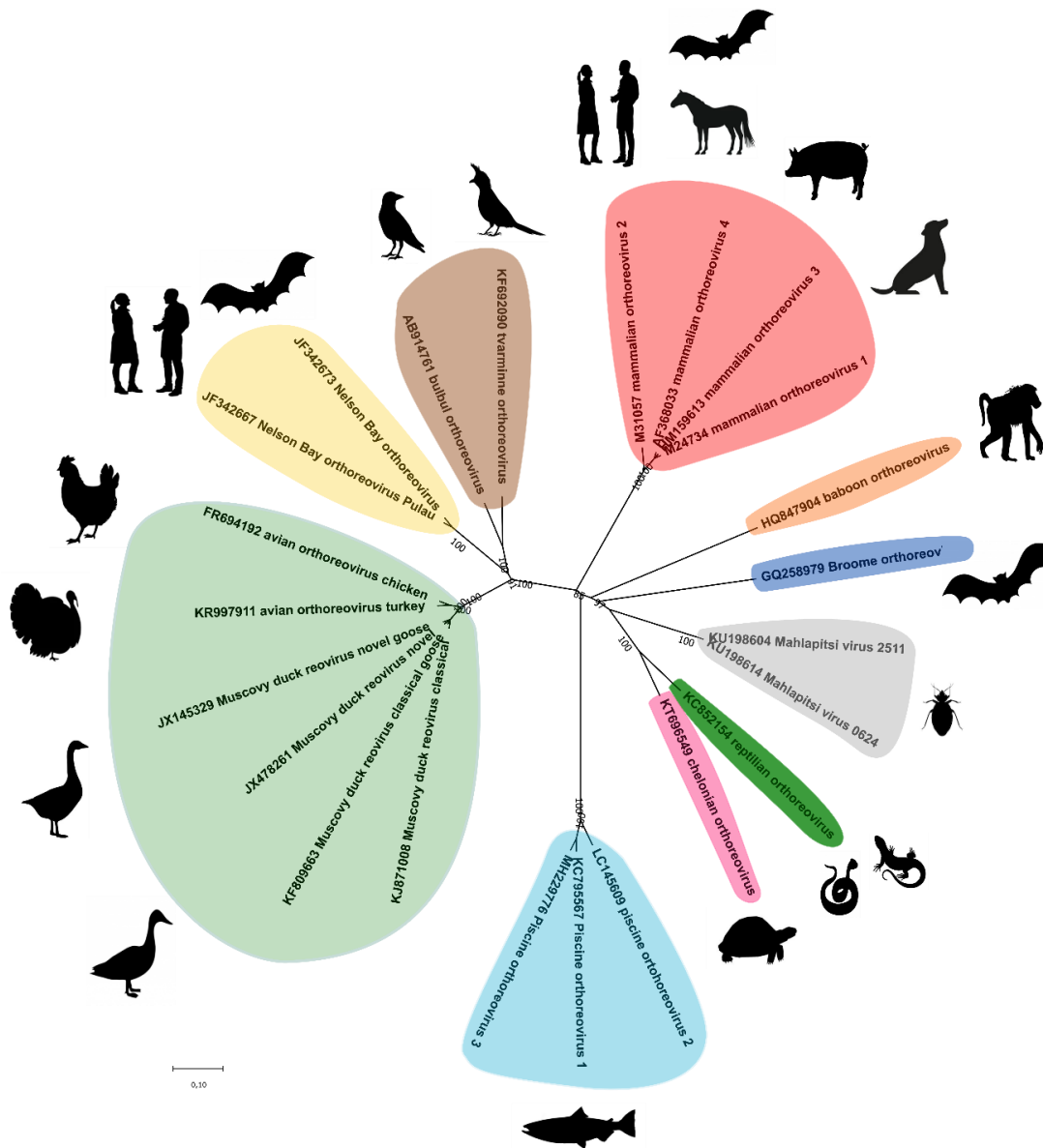
2.2.1 A reovírusok általános jellemzése

Reovírusokat először az 1950-es években mutatták ki az Egyesült Államokban és Mexikóban. A családnév elnevezésében a „reo” a respiratory enteric orphan kifejezés rövidítéséből ered, mely arra utal, hogy az első izolátumok állatok és emberek légző- és emésztőrendszeréből származtak, azonban betegséghez egyetlen esetben sem tudták társítani jelenlétüket (Sabin, 1959; Day, 2009). Reovírusokat azóta számos élőlényből sikerült kimutatni; gerinctelen- és gerinces élőlényekben, protistákban, gombákban és növényekben is igazolták jelenlétüket (Palacios et al., 2011). Duplaszálú (double-stranded, ds) RNS genomjuk 9–12 szegmensre tagolódik, virionjuk burok nélküli, 60–80 nm átmérőjű, ikozaéderes szimmetriát mutat (Attoui et al., 2011).

A *Reovirales* rend családja 15 nemzetséget foglal magába. A *Spinareoviridae* család az *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Oryzavirus* és *Orthoreovirus* nemzetségekből áll, virionjuk felszíne tüskeszerű képleteket tartalmaz. A *Sedoreoviridae* család tagjainál ezek a tüskeszerű képletek hiányoznak – a gömb alakú virion felszíne sima –; a család a *Seadornavirus*, *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* nemzetségeket foglalja magában. A nemzetségek elkülönítése a genomszegmensek száma, a gazdaspektrum, az okozott klinikai tünetek, a kapszidstruktúra és a konzervált genomszegmensek, illetve fehérjék szekvenciahasonlósága szerint zajlik (Attoui et al., 2011).

2.2.2 Az orthoreovírusok rendszertana

Munkánk kezdetekor az orthoreovírus nemzetség öt fajból állt: madár orthoreovírus (*Avian orthoreovirus*, ARV), emlős orthoreovírus (*Mammalian orthoreovirus*, MRV), denevér orthoreovírus (*Nelson Bay orthoreovirus*, NBV), hüllő orthoreovírus (*Reptilian orthoreovirus*, RRV) és pávián orthoreovírus (*Baboon orthoreovirus*, BRV). Napjainkra az ICTV (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) további öt fajjal bővítette az orthoreovírus nemzetséget: Mahlapitsi orthoreovírus (*Mahlapitsi orthoreovirus*, MAHLV), hal orthoreovírus (*Piscine orthoreovirus*, PRV), teknős orthoreovírus (*Testudine orthoreovirus*, TRV), Broome orthoreovírus (*Broome orthoreovirus*, BrRV) és vadmadár orthoreovírus (*Neoavian orthoreovirus*, NeARV) (6. ábra) (Kloet, 2008; Thalmann et al., 2010; Attoui et al., 2011; Markussen et al., 2013; Dandár et al., 2014; Ogasawara et al., 2015; Kugler et al., 2016; Van Vuren et al. 2016).



6. ábra. Az *Orthoreovirus* nemzetségbe tartozó tíz vírusfaj RNS-függő RNS polimeráz génjének nukleotidszekvenciáján alapuló filogenetikai törzsfá (MEGAX program, Tamura 3 szubsztitúciós modell, 1000 bootstrap érték). A színek az egyes fajokat jelölik: világoszöld – madár orthoreovírus, világos kék – hal orthoreovírus, sötétzöld – hüllő orthoreovírus, rózsaszín – teknős orthoreovírus, szürke – Mahlapitsi orthoreovírus, sötétkék – Broome orthoreovírus, narancssárga – pávián orthoreovírus, piros – emlős orthoreovírus, barna – vadmadár orthoreovírus, sárga – denevér orthoreovírus. Az egyes fekete szimbólumok a vírusfaj gazdaspektrumát jelölik.

Az MRV sejtfüzióra képtelen orthoreovírusokat tartalmaz, melyek tünetmentes, vagy enyhe tünetekkel járó légzőszervi és enterális fertőzéseket képesek okozni emlős fajokban; emberekben elsősorban gyermekekben és immunszuppresszált egyéneknél mutatták ki. Vírusneutralizáció és hemagglutináció gátlás alapján három MRV szerotípust különíthetünk el: 1-es Lang, 2-es Jones és 3-as Dearing (Attoui et al., 2011).

Szintén emlősökből mutatták ki a denevér orthoreovírust. Az első izolátum egy ausztráliai szürkefejű repülőkutya (*Pteropus poliocephalus*) véréből származik, azóta kimutatták más denevér fajokból (*Pteropus hypomelanus*-Pulau vírus) és emberből is (Melaka és Kampar vírus) (Pritchard et al., 2006; Chua et al., 2007; 2008). A pávián orthoreovírust szintén emlősökből izolálták: egy agyhártya-és agyvelőgyulladásban szenvedő pávián kolónia tagjainak agyvelő homogenizátumából mutatták ki az Egyesült Államokban (Leland et al., 2000). A madár orthoreovírus faj baromfiállományokban gazdasági károkat is okozó patogén

vírusokat foglal magában. Leggyakrabban enterális és légzőszervi megbetegedésekkel, továbbá szívizom-, máj- és inüvelygyulladásal kapcsolatban írták le, azonban a madarak fogékonysága és a kórkép életkor függő, a felnőtt állatok ellenállóbbak a vírussal szemben (Benavente and Martínez-Costas, 2007). 2015-ben orfeusz bülbülből (*Hypsipetes amaurotis*) mutattak ki sejtfüzióra képes vadmadár orthoreovírust (Ogasawara et al., 2015). Utóbbi fajba tartozik a dolmányos varjúból (*Corvus cornix*) kimutatott varjú orthoreovírus (Tvärminne avian virus, TVAV) (Dandár et al. 2014). A Broome orthoreovírust repülőkutya-féléből (*Pteropus scapulatus*) mutatták ki először (Thalmann et al., 2010). Nílusi repülőkutya (*Rousettus aegyptiacus*) vérszívó ektoparazitájából (*Eucampsipoda africana*) izolált orthoreovírus a Mahlapitsi orthoreovírus nevet kapta (Van Vuren et al., 2016). Hal orthoreovírust szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) szív- és izomszövet gyulladásával diagnosztizált vörösvérsejtekből mutatták ki (Palacios et al., 2010; Olsen et al., 2015; Dhamotharan et al., 2018). A teknős orthoreovírus már teknősből származik (*Testudo graeca*), az egyéb hüllőfajokból izolált orthoreovírusokat pedig a hüllő orthoreovírus fajba soroljuk (Duncan et al., 2004; Attoui et al., 2011; Kugler et al., 2016).

A nemzetségen belül a vírusok egyazon fajba sorolása több tulajdonság figyelembevételével történik: az RNS-ujjlenyomat, a policisztronos S szegmens felépítése, a gazdafaj specificitás, a vírus által indukált klinikai tünetek, az RNS genom agaróz gélelektroforézissel nyert elektroferogramjának jellege és a különböző fajhoz tartozó vírustörzsek egymással történő reasszortációs képessége. A nukleotid- és az aminosav szekvencia azonosság is döntő tényező, az ICTV azonossági határértékei: ha homológ gének nt szekvenciájának azonossága nagyobb, mint 75%, akkor két vírus egyazon fajba tartozik, ha ez az érték kisebb, mint 60%, akkor két külön fajról beszélhetünk. Ha a változékonyabb külső kapszid fehérjék as szekvenciái között 55%-nál nagyobb hasonlóság van, akkor a vírusok egy fajba, ha 35%-nál kisebb, akkor a vírusok külön fajba tartoznak. A konzervatívabb mag fehérjéknél ezek az értékek 85%, illetve 65%. As és nt szinten is a határértékek között nagy intervallum található (nt: 60–75%, konzerváltabb fehérjék esetén 65-85%, változékonyabb fehérjék esetén 35-55%), melynél nem egyértelmű a fajba sorolás kérdése (Attoui et al., 2011).

2.2.3 Az orthoreovírusok virionja és genomszerveződése

Az orthoreovírusok dsRNS genomja 10 szegmensből áll, melynek mérete összesen körülbelül 23500 bázispár (bp). A szegmensek három csoportba sorolhatóak elektroforetikus mobilitásuk alapján: három nagy (large, L1-L3; méretük kb. 3,9-3,8 kbp), három közepes (medium, M1-M3; méretük kb. 2,3-2,2 kbp) és négy kicsi (small, S1-S4; méretük kb. 1,6-0,9 kbp), melyek a megfelelő λ , μ , σ fehérjéket kódolják. A dsRNS szegmensek a virionon belül ekvimoláris mennyiségben vannak jelen: szegmensenként egy kópia található (Attoui et al., 2011).

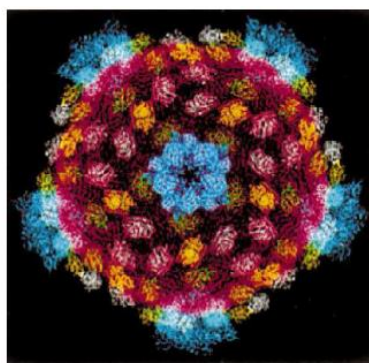
Az egyes szegmensek felépítése konzervált. A pozitív irányultságú RNS szál 5' végén dimetilált „cap” szekvencia található, míg a 3' végről hiányzik a poliadenilációs szignál szekvencia (Attoui et al., 2011). A szegmensek végein néhány bp hosszúságú konszenzus szekvencia található, melyek közül az 5' fajra jellemző, míg a 3' vég az *Orthoreovirus* nemzetségen belül konzervált UCAUC nukleotidsorból áll (Duncan, 1999) (1. táblázat).

1. táblázat. Az orthoreovírus nemzetség tagjainak terminális konzervált szekvenciái. Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.

Orthoreovírus faj	5' vég	3' vég
ARV	GCUUUU	UCAUC
BrRV	GUCAA	
BRV	GUAAAUUU	
MALHV	GGUCA	
MRV	GCUA	
NBV	GCUUUA	
NeARV	CGUUUUC	
PRV	GAUAAA/U	
RRV	GUUA/CUU	
TRV	GUUCA/UU	

Ezeket a konszenzus szekvenciákat az 5' végén rövidebb, a 3' végén hosszabb UTR előzi meg, illetve követi (Attoui et al., 2011). Az S1/S4 szegmens kivételével – amely bi-vagy tricisztronos – minden szegmens egy nyitott leolvasási keretet (open reading frame; ORF) tartalmaz (Lamirande et al., 1999). Így az orthoreovírusok genomja nyolc szerkezeti fehérjét kódol, melyek emlős és hal orthoreovírusok esetén λ_1 , λ_2 , λ_3 , μ_1 , μ_2 , σ_1 , σ_2 , σ_3 , a többi orthoreovírus faj esetén λ_A , λ_B , λ_C , μ_A , μ_B , σ_A , σ_B és σ_C fehérjék. További három vagy négy nem strukturális fehérje is átíródik vírushajtól függően, beleértve a μ_{NS} , σ_{NS} és egyéb kisméretű fehérjéket (Attoui et al., 2011). Utóbbiak a bi-vagy tricisztronos S szegmensen kódolódnak, fajoként eltérő méretűek: az emlős és hal orthoreovírusok biszisztronos S1 szegmense két, részben egymással átfedő ORF-mel rendelkezik, míg az ARV, NeARV és NBV esetében három átfedő ORF található (Benavente and Martínez-Costas, 2007). Az RRV, MAHLV és TRV bicisztronos S1 szegmensen két ORF található. BRV és BrRV esetén azonban az S4 a bicisztronos szegmens (Attoui et al., 2011).

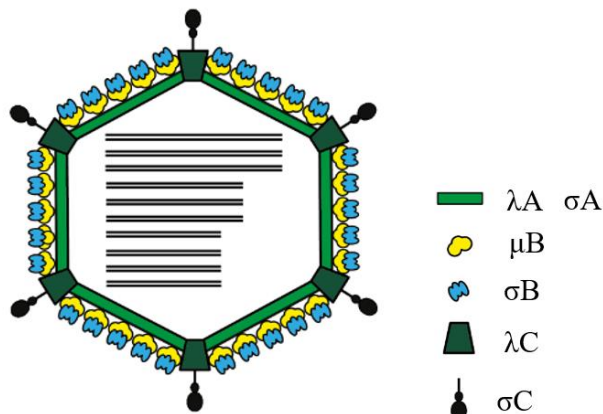
Az orthoreovírusok burok nélküli 60-80 nm átmérőjű virionja ikozaéderez szimmetriát mutat (**7. ábra**).



7. ábra. A reovírus virion morfológiája. A különböző színű alegységek különböző fehérjéket jelölnek: λ_1 (piros) a virion méretének és szimmetriájának meghatározója; σ_2 (sárga) stabilizálja a λ_1 -et; λ_2 pentamer (kék) tornyocska-szerű struktúrával formál az ikozaéder csúcsainál, cap struktúrával látja el a keletkező mRNS-eket és segíti a citoplazmába jutásukat (Reinichs et al., 2000).

A viriont kétrétegű fehérje kapszid építi fel (**8. ábra**). A 60 nm átmérőjű belső réteg a genomszegmensekkel együtt alkotja a core-t (mag) (Lamirande et al., 1999). A belső kapszid

fehérjéi a λA , λC , μA , σA és a λB , utóbbi a virális RNS-függő RNS polimeráz, a μA NTP-áz aktivitással rendelkezik, a vírus replikációjában játszik fontos szerepet. A λC a belső kapszidból kiemelkedő és a külső kapszidba átnyúló nyúlványokat alkotja. A külső kapszid 80 nm átmérőjű, fő szerkezetét a μB és σB fehérjék alkotják. A virion felszínén a σC fehérjéből felépülő sejtkapcsolódásért felelős fiber fehérje található, mely 40 nm-ra nyúlik ki a kapszidból (Attoui et al., 2011). Az orthoreovírusok fehérjéit és funkcióit a **2. táblázat** mutatja.



8. ábra. Az orthoreovírusok virionjának sematikus ábrája. A virion kétrétegű, a külső kapszidot felépítő fehérjék: μB , σB , σC , a belső kapszidot (core) pedig az alábbi fehérjékből áll: λA , λC , σA . A virionon belül található a három nagy (L), három közepes (M) és négy kisméretű (S) genomszegmens (Gummersheimer et al, 2021).

2. táblázat. Az *Orthoreovirus* nemzetség fajainak fehérjéi és funkcióik. Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.

Fehérjék		Funkció
MRV/PRV	ARV/BRV/BroV/ MAHL/NBV/RRV/TRV	
$\lambda 1$	λA	belső kapszid szerkezeti fehérje, NTP-áz, helikáz aktivitással
$\lambda 2$	λC	core nyúlvány, capping enzim, metiltranszferáz és guanililtranszferáz aktivitással
$\lambda 3$	λB	RNS-függő RNS polimeráz
$\mu 1$	μB	külső kapszid fő szerkezeti fehérje
$\mu 2$	μA	NTP-áz, sejt tropizmusért felelős, cejtés interferon válasz modulálása
μNS	μNS	ssRNS és citoszkeleton-kötő funkció
$\sigma 1$	σC^*	külső kapszid fiber, sejtkapcsolódásért felelős fehérje
$\sigma 2$	σA	belső kapszid szerkezeti fehérje
$\sigma 3$	σB	külső kapszid minor szerkezeti fehérje
σNS	σNS	ssRNS kötő funkció

* BroV, MAHLV, BRV esetén nincs σC

Az orthoreovírus nemzetség fúzióképes és nem fúzióképes vírusokra tagolódik. A burkos, fúzióra képes vírusokkal ellentétben az orthoreovírusok a sokmagvú óriássejtek, a szincíciumok kialakulását a sejten belülről indukálják, mely arra utal, hogy a folyamatban az újonnan szintetizált virális fehérjék játszanak szerepet (Duncan et al., 1996). Ezek a kisméretű

fehérjék a fúzió-asszociált kis transzmembrán (fusion associated small transmembrane, FAST) fehérjék közé tartoznak (Ciechonska and Duncan, 2014). A szincíciumok szövettanilag jól láthatóak és *in vivo* fontos szerepet játszhatnak a vírus szomszédos sejtekre történő terjedésében a szervezet immunválaszának kikerülésével (Benavente and Martinez-Costas, 2006). A FAST fehérje indukálta sejtfúziót követően apoptózis és membrán instabilitás alakul ki, a membrán szétesése az új virionok terjedéséhez vezet (Salsman et al., 2005). Az MRV és PRV kivételével az orthoreovírusok sejtfúzióra képesek (Attoui et al., 2011). Az ARV, NeARV és NBV a tricisztronos S1 genomsegment kódolja a szincícium kialakításáért felelős p10 fehérjét (Shmulevitz et al., 2002; Pritchard et al., 2006; Chua et al., 2007; Day et al., 2007). Az RRV, MAHLV és TRV esetében szintén megtalálható a szincícium kialakításáért felelős fehérje, a p14, melyet a bicisztronos S1 segment kódol (Duncan et al., 2004; Van Vuren et al., 2016). BRV esetében a bicisztronos S4-en található p15 fehérje, míg BrRV esetében a szintén az S4 kódolta p13 fehérje felelős az óriássejtek kialakításáért (Dawe et al., 2002).

2.2.4 Az orthoreovírusok szaporodása

Az orthoreovírusok a $\sigma 1/\sigma C$ fehérjén keresztül kapcsolódnak a gazdasejt megfelelő receptorához és receptor mediált endocitózissal a gazdasejtbe kerülnek. A késői endoszómában a külső burok proteolitikus hasításon esik át savas pH hatására, így alakul ki az aktív transzkripcióval rendelkező fertőző vírusrészecske, majd ez kijut a citoplazmába (infectious subviral particle, ISVP) (Benavente and Martínez-Costas, 2007). A reovírusok dsRNS-e mRNS-ként, vagyis translációs templákként szolgál a gazdasejtben. A vírus megfelelő transzkriptáz komplexszel rendelkezik a virionon belül, mely az átírt mRNS-t a gazdasejt citoplazmájába juttatja. A citoplazmában található core-on belül a virális dsRNS genom negatív szálát templákként használva a $\lambda 3/\lambda B$ kódolta RdRp mRNS-eket szintetizál. A cap struktúrát a λC fehérjékből álló capping enzim helyezi az RNS 5' végére, miközben az mRNS elhagyja a core-t (Benavente and Martínez-Costas, 2007). A reovírus mRNS kettős feladata a fertőzött sejtekben a virális fehérjék szintézise a gazdasejt riboszómáinak segítségével és templákként is szolgál a dsRNS genom negatív irányultságú szálának szintéziséhez (Attoui et al., 2011). A fertőzött sejtek citoplazmájában membrán nélküli, denz struktúrájú zárványok találhatóak, melyeket μ NS és σ NS fehérjékből álló viroplazmának neveznek. Itt találhatóak a citoplazmában keletkezett vírusfehérjék, a virális RNS, illetve a részben és teljesen szétszerelt vírusrészecskék. Az összeépült virion gazdasejtből való kijutásának mechanizmusa ismeretlen (Benavente and Martínez-Costas, 2007). Az orthoreovírusok apoptózist indukálnak a fertőzött sejtekben és szövettanilag.

A pontmutációt tartják az orthoreovírusok fő evolúciós mechanizmusának, mely az RNS-függő RNS polimeráz hibajavító funkciójának hiányából eredeztethető (Kugler et al., 2016).

2.2.5 Az orthoreovírusok patogenitása hüllőkben

Reovírusszerű képletet először 1986-ban írtak le hüllőkben, azóta számos fajban igazolták jelenlétüket (Attoui et al., 2011). A teknősök kivételével minden hüllőből kimutatott orthoreovírus az *Orthoreovirus* nemzetség hüllő orthoreovírus (*Reptilian orthoreovirus*) fájába sorolandó, a *Testudines* rend képviselőinek reovírusai pedig a teknős orthoreovírus fajba (*Testudine orthoreovirus*) tartoznak (Kugler et al., 2016).

Teknősökből eddig két esetben igazoltak orthoreovírus fertőzést: leopárdteknős (*Geochelone pardalis*) bélszövetének elektronmikroszkópos vizsgálatával, valamint mór teknős (*Testudo graeca*) nyelv, nyelöcső, tüdő és vese mintájából vírusizolálással (Dandár et al., 2012).

Gyíkokban több esetben igazoltak reovírus fertőzöttséget. Zöld gyík (*Iguana iguana*) papillómájából és négyszarvú kaméleon (*Chamaeleo quadricornis*) tüdejében elektronmikroszkópos vizsgálatokkal mutattak ki reovírusszerű részecskéket (Drury et al., 2002).

Fiatal leopárd gekkók (*Eublepharis macularius*) szövettani vizsgálata során gyulladással, óriássejtképződéssel járó elváltozásokat figyeltek meg a bélben, lépben és a májban, utóbbi szervből sikeresen izoláltak reovírust. E reovírus fertőzésre utaló tünetek mellett szikzacskó gyulladást és a bél cryptosporidiosisát diagnosztizáltak (Marschang, 2011). Fiatal tüskésfarkú gyíkok (*Uromastyx hardwickii*) kórbonctani vizsgálata során nem találtak elváltozást a szájüregben, nyelőcsőben, légcsőben, májban és vesében, azonban a tüdő sötétvöröses elszíneződését figyeltek meg a húgycsővek fehéres lerakódásával és tágulatával egyetemben. Vírusizolálással sikerrel mutattak ki reovírusokat az elhullott egyedekből (Drury et al., 2002). Aspecifikus tünetek, étvágytalanság és szisztémás bakteriális fertőzés mellett zöld leguánokból (*Iguana iguana*) elhullásuk után izoláltak két különböző reovírust (Blahak et al., 1995; Marschang and Papp, 2009). Egy másik tanulmányban két kaméleonfajból is izoláltak reovírust, az egyikben metabolikus csontbetegséget figyeltek meg, a másik kaméleon pedig vemhes volt. Ezek az elváltozások nem hozhatók egyértelműen összefüggésbe reovírus fertőzéssel, azonban lehetséges, hogy az immunszuppresszív állapot szerepet játszott a reovírusok elszaporodásában (Marschang and Papp, 2009). Mexikóban vadon élő bütykösgyík (*Xenosaurus* sp.) fajokban szerológiai vizsgálat alapján azonosítottak reovírust, Hondurasban zöld leguán (*Iguana iguana rhinolopha*) és tüskésfarkú leguánok (*Ctenosaura bakeri* és *Ctenosaura similis*) véréből igazolták reovírusok jelenlétét szerológiai vizsgálattal (Gravendyck et al., 1998; Marschang et al., 2002).

Kígyóknál az első feljegyzés reovírus fertőzésről 1987-ben keletkezett. Egy elhullott királypiton (*Python regius*) vérzések tartalmazó veséjéből, májából és lépéből izolált vírus elektronmikroszkópos vizsgálata során tipikus reovírus morfológiát mutatott, szegmentált dsRNS genommal rendelkezett és sokmagvú óriássejteket alakított ki szövettenyésztésben (Ahne and Thomsen, 1987). Reovírust izoláltak központi idegrendszeri tüneteket mutató (inkoordináció, propriocepció hiánya, görcsös testtartás) zöld csörgőkígyó (*Crotalus viridis*) agyszövetéből, kutyafejű boa (*Corallus caninus*) és erdei sikló (*Elaphe longissima*) vese és vékonybélből vett mintáiból; a sikló elhullása paramyxovírus okozta járvánnyal hozható összefüggésbe. Sejtzárványos betegséggel diagnosztizált vörösfarkú boa veséjéből, gerincvelőjéből és májából izoláltak reovírust, mellyel fiatal vörösfarkú boákat fertőztek. A fiatal állatok nem mutatták a BIBD-re jellemző tüneteket, azonban jelentősen lefogytak, és a reovírus izolálással visszanyerhető volt, arénavírus jelenlétét nem vizsgálták a kígyókban (Darke et al., 2014).

Siklófélékben is igazolták reovírusok jelenlétét (*Elaphe moellendorffi*, *Orthriophis taeniurus* és *Pantheropsis obsoletus*) (Lamirande et al., 1999). Erdei siklóból (*Elaphe longissima*) és gabonasiklóból (*Pantheropsis guttatus*) álló gyűjteményből vírusizolálással mutattak ki reovírusokat adeno- és paramyxovírus fertőzöttséggel egyetemben (Abbas et al., 2011). Zöld fűsiklóban (*Ophedrys aestivus*) reverz transzkripció PCR (RT-PCR) és elektronmikroszkópos vizsgálat tárta fel a reovírus fertőzést; az állatok boncolásakor a máj elhalásos gyulladást lehetett megfigyelni, illetve a gyomorra és vékonybéltre korlátozódó *Cryptosporidium* spp. fertőzést is leírtak (Gál et al., 2009; Landolfi et al., 2010).

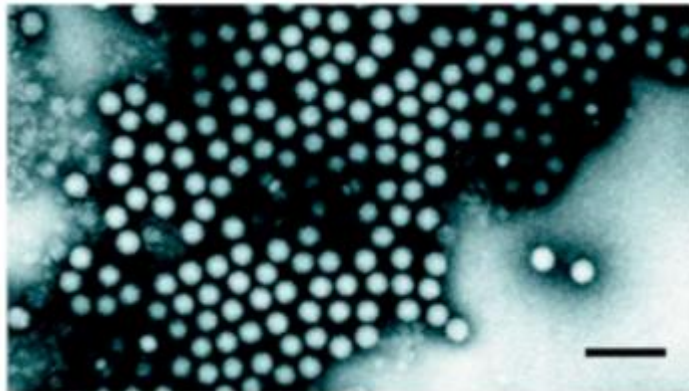
A reovírus fertőzöttség kóroki szerepe a különböző kórképekben kérdéses, hiszen sokszor a fertőzött egyedek nem mutatnak klinikai tüneteket elhullásukat megelőzően. A leggyakrabban kialakuló központi idegrendszeri és légzőszervi tünetek sem patognomikusak, így a hulló orthoreovírusok diagnosztikai célú kimutatására Wellehan és munkatársai 2009-ben kétkörös RT-PCR-t fejlesztettek ki, mely a virális RNS-függő RNS polimeráz gén közel 245 bp hosszúságú szakaszát erősíti fel (Wellehan et al., 2009).

2.3 Teknős picornavírusok jellemzése

A *Picornaviridae* család a legkisebb, gerinceseket fertőző RNS vírusokat foglalja magában. A család nevének eredetére két magyarázat is szolgál, a "pico", vagyis a kicsi (10^{-12} nagyságrendű) prefixum vagy a poliovírus, insensitivity to ether, coxsackievirus, orphan virus, rhinovirus, ribonucleic acid betűkből eredeztethető (Zell et al., 2017).

A *Picornaviridae* családba számos patogén vírus sorolható. Szubklinikai fertőzéstől az enyhe megbetegedésen át (megfázás) a súlyos tünetekben megnyilvánuló (poliomielitisz, encephalitisz, meningitisz, hepatitisz) megbetegedésekig változatos kórképek kialakításában játszanak szerepet (Jiang et al., 2014). A víruscsalád az ICTV szerint jelenleg 65 nemzetséget tartalmaz, valamint számos vírustörzs jelenleg is besorolás alatt áll. Kimutattak picornavírusokat (PV) emberből, számos emlősféléből, madaraktól, hullókból és halakból is. Az első PV-t – a száj-és-körömfájás vírusát – 1898-ban fedezték fel. Legismertebb képviselőik az *Enterovirus* nemzetségbe tartozó poliovírusok, rhinovírusok, echovírusok, az *Aphthovirus* nemzetségbe sorolandó száj- és körömfájás vírusa (foot-and-mouth disease virus, FMDV) és a *Hepatovirus* nemzetség hepatitis A vírusa (HAV) (Jiang et al., 2014).

A *Picornaviridae* család képviselői kicsi, ikozaéderes szimmetriát mutató, pozitív, egyszálú RNS örökítőanyaggal rendelkező vírusok (**9. ábra**). A család képviselőinek közös jellegzetessége általában a β -lemezes szerkezetű fehérjékből felépülő kapszid, a virális cisztein proteázok által hasított virális poliprotein és az RdRp enzim konzervált YGDD as szekvencia motívummal (Jablonski et al., 1991; Zell et al., 2017).



9. ábra. Poliovírus elektronmikroszkópos képe (Zell et al., 2017).

2.3.1 A picornavírusok rendszertana

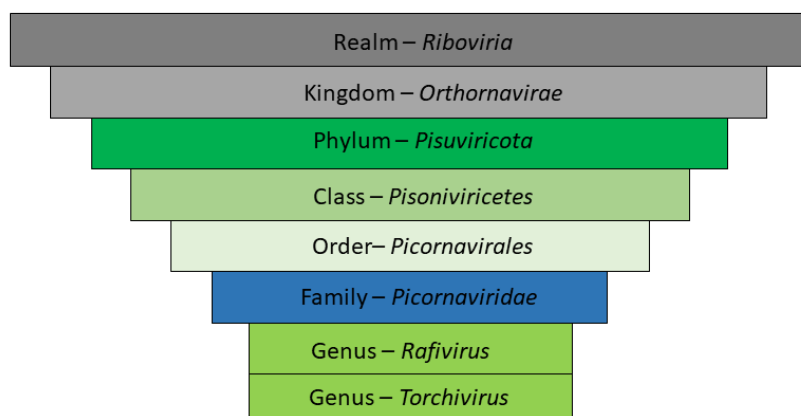
Az ICTV jelenlegi rendszerezése alapján a picornavírusokat (PV) a *Picornavirales* rend *Picornaviridae* családjába foglalja magába (Zell et al., 2017).

Egy nemzetségbe azokat a PV fajokat soroljuk, melyek képviselői a filogenetikai törzsfákon egyazon monofiletikus ágon helyezkednek el. Az ismert PV nemzetségek különböznek genomorganizációjukban, az L fehérjék között nem detektálható homológia és az ortológ fehérjék között divergencia jellemző (a szekvenciák egyes pozíciókban található különbözősége, mely P1^{cap} esetén meghaladja a 66%-ot, 2C^{hel}, 3C^{pro} és 3D^{pol} fehérjék esetében pedig a 64%-ot). Továbbá két különböző nemzetség képviselőinek L, 2B, 3A és 3B fehérjéje között nem detektálható hasonlóság (Zell et al., 2017; Zell, 2018). Jelenleg az ICTV ajánlása alapján két PV egy fajba sorolandó, ha P1, 2C, 3C és 3D fehérjék jelentős az azonossági értékekkel rendelkeznek, filogenetikai törzsfán monofiletikus elhelyezkedést mutatnak, a genomok elrendeződése megegyezik, tovább a fehérjék proteolitikus hasítása, a replikáció és enkapszidáció azonos mechanizmus szerint történik (Zell et al., 2017). Az ICTV *Picornaviridae* csoportjának további ajánlása szerint új PV faj leírásakor minden esetben szükséges feltüntetni

a gazdafajt, a vírustörzs nevét, az izolálás helyét és évét, továbbá vírusnév ajánlást is kell tenni. Az egy fajba sorolás szabályai azonban az egyes nemzetségekben változhatnak, az ismert szekvencia adatokat figyelembe véve (Zell, 2018).

Minden jelenleg kimutatott picornavírusban az 1B, 1C, 1D, 2C, 3C és 3D ortológ fehérjék konzerváltak, így jól alkalmazható a szekvenciák filogenetikai elemzéséhez. Az 1A, 2A, 2B, 3A és 3B fehérjék nagyfokú diverzitással rendelkeznek az egyes nemzetségek képviselői között (Zell et al., 2017).

A teknős eredetű PV-eket (Tortoise picornavirus, ToPV) a *Picornaviridae* család két nemzetségébe, a *Rafivirus* és *Torchivirus* nemzetségbe sorolják (Zell et al., 2017) (**10. ábra**).



10. ábra. Teknős eredetű picornavírusok aktuális rendszertani besorolása. Két nemzetség, a *Torchivirus* és *Rafivirus* foglalja magába teknős eredetű picornavírusokat.

A *Rafivirus* elnevezés Raph(ael)-ből származik, ami a Tini Nindzsa Teknőcök egyik fiktív karaktere. Az ICTV alapján jelenleg három faja van a nemzetségnek: *Rafivirus A* (RaV-A1), *B* és *C*. A nemzetség tagjai azonos genomstruktúrával rendelkeznek, a poliprotein, P1 és 2C+3CD as szekvenciák esetén 30%-nál kisebb divergenciával rendelkeznek (Zell et al., 2017). A *Rafivirus B* faj képviselőjét azonban nem teknősből, hanem egy Kínából származó gekkóból (*Gekko similignum*) mutatták ki, melynek a *Rafivirus B1*; Hainan gekko similignum picornavirus (RaV-B1) nevet adták (Shi et al., 2018). A *Rafivirus C* fajt óriásvarangyból írták le (*Rhinella marina*) Ausztráliában. Máj szervminta metatranszkriptom vizsgálatával segítségével határozták meg a vírus teljes genomstruktúráját, melynek eredetileg a Rhimavirus A (*Rhinella marina virus A*, RhiV-A) nevet adták (Russo et al., 2018).

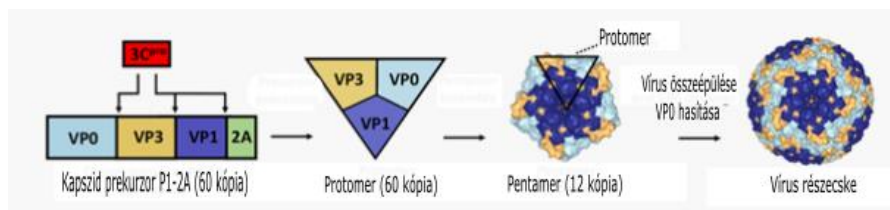
A *Torchivirus* nemzetség elnevezése a tortoise virus X (chi; görög C betű) -ből eredeztethető, egyetlen faja a *Torchivirus A* (torchivirus A1, tortoise picornavirus; TXV-A1) (Zell et al., 2017). Ezt a vírust munkacsoportunk mutatta ki, mely disszertációm tárgyát képezi.

2.3.2 A picornavírusok virionja

A PV-k burok nélküli virionja 30-32 nm átmérőjű, ikozaédres, mely körbeveszi a szimplaszálú RNS (simple-stranded RNA, ssRNS) genomot. A kapszid 60 egyforma egységből (protomer) épül fel, ezeket jellemzően három vagy négy fehérje alkotja. Azon PV-nél, ahol a protomert négy fehérjéből áll, ott három fehérje alkotja a felszíni (1B, 1C, 1D) és egy a belső alegységet (1A). A három fehérjéből álló szerkezet esetén ezek az 1C és 1D mellett a hasítatlan 1AB. Az 1A, 1B, 1C és 1D fehérjéket rendszerint VP4, VP2, VP3, és VP1-ként nevezik, a hasítatlan 1AB-t pedig VP0-nak. Az 1B, 1C, 1D és a hasítatlan 1AB fehérjék jellegzetes β -lemezes szerkezettel rendelkeznek (**11. ábra**) (Zell, 2018).

A különböző PV nemzetségek tagjai a β -hordókat összekötő külső hurokban is különböznek. A kapszidban öt protomerből épül fel egy pentamer, ezekből épül össze a kapszid.

A pentamerben az N-terminálisukon összekapcsolódó belső hálózatot alkotnak, míg a C-terminális található a kapszid felszínén (Zell et al., 2017).

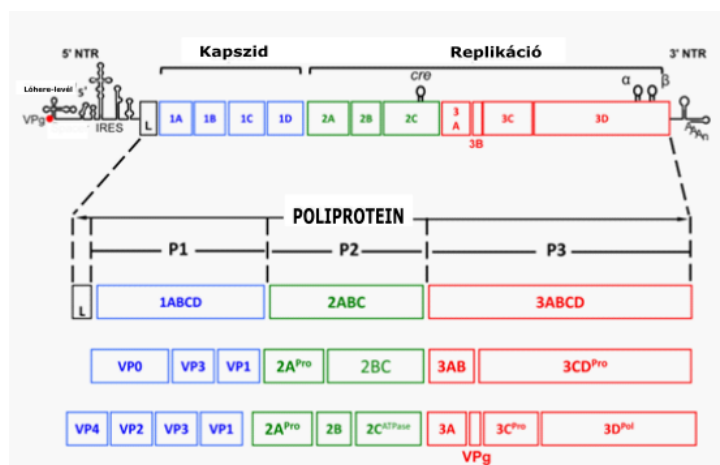


11. ábra. Picornavírus kapszid felépítése (száj-és-körömfájás vírus esetében). A kapszid prekurzor P1-2A hasítása 3C^{Pro} által történik, majd a keletkezett fehérjék (VP0, VP1 és VP3) protomerekké állnak össze. A protomerekből pentamerek lesznek, az ezekből álló egységek alkotják a kapszidot. A VP0 hasítása a virion összeépülése során történik VP4-é és VP2-é (Kristensen and Belsham, 2019).

2.3.3 A picornavírusok genomszerveződése és szaporodása

A picornavírusok 6,7-10,1 kb hosszú, szimplaszálú RNS genomjában egyetlen ORF található (Woo et al., 2012) (**12. ábra**). Genomszerveződésük moduláris, az egyes 5' és 3' UTR és a kódoló régió genetikai elemeiről feltételezik, hogy a különböző nemzetségek tagjai között cserélődtek (Zell, 2018).

A 3' vég UTR 50-100 nt hosszú, ezt követi a poli-A farok. Az 5' UTR régió 0,5-1,5 kb hosszúságú, melyhez a virális virus-encoded protein (VPg) fehérje kovalensen kötődik; a VPg-nek a genom replikációjában van szerepe. Az 5' vég úgynevezett lóhere levél RNS másodlagos szerkezeti elemet és belső riboszóma-kötőhelyet (internal ribosomal entry site, IRES) is tartalmaz, mely a transláció kezdőpontjától 220-450 nt távolságra található az UTR-ben. A lóhere levél a virális RNS-t védi az exonukleázoktól, az IRES pedig a vírus translációjában és replikációjában vesz részt. A picornavírus IRES elemek hét típusát különítik el másodlagos szerkezeti elemük függvényében (Takács, 2011; Zell et al., 2017). Minden ismert PV tartalmaz egy ún. cisz replikációs elemet (cis replication elements, *cre*), ennek elhelyezkedése az egyes vírusok genomjában eltérő (Jiang et al., 2014). Egyes nemzetségekben úgynevezett L fehérje kódolódik a poliprotein N-terminális részén. Az L fehérje szekvenciája a PV-k között eltérő és különböző funkciókhoz kapcsolódik (Racaniello, 2007). A PV-k alapvető genomszerveződése minden nemzetségben hasonló, a fő fehérjekódoló régiókat számok és betűk jelzik: VPg+5'UTR[(L)/1A-1B-1C1-D/2A-2B-2C/3A-3B-3C-3D]3'UTR-poli(A) (Zell, 2018). Ezt az úgynevezett L434 diagramon ábrázolják sematikusán (**12. ábra**) (Rueckert and Wimmer, 1984).



12. ábra. Picornavírusok általános genomszerveződése és a poliprotein feldolgozása. A picornavírusok egyetlen nyitott leolvasási keretéről szintetizálódó poliprotein poszttranszlációs hasítása révén alakulnak ki az érett virális fehérjék (Jiang et al., 2014).

A fertőzés során PV-k a gazdasejtek sejtfelszíni receptoraihoz kötődnek, ezek – ahogy a víruscsalád is – nagyon változatosak lehetnek. A rhinovírusok többsége az intracelluláris adhéziós molekulához kötődik (ICAM-1), a coxasackvírus B3 a coxsackievírus-adenovírus receptorhoz (CAR), a hepatitis A vírus hepatitisz A vírus celluláris receptorhoz, a poliovírusok pedig a topoliovírus receptorhoz (CD155) kapcsolódnak. A receptorok nagy részének közös tulajdonsága, hogy az immunglobulin szupergéncsalád molekulái közé tartozó sejtfelszíni molekulák (Rossmann et al., 2002). A receptorhoz való kapcsolódás eredményeként receptor mediált endocitózissal jut be a sejtbe a vírus, a virális RNS endoszómán keresztül a citoplazmában alakítja ki a virális replikációs organellumot intracelluláris membránok átszervezésével, melyben virális nem struktúr fehérjék, ezek prekursorai és gazdasejt eredetű molekulák is megtalálhatóak. A komplex védi a virális RNS-t a gazdasejt eredetű nukleázoktól (Jiang et al., 2014; Zell et al., 2017). A gazdasejtben folyó transzkripció folyamatok leállításának mértéke jellemző az egyes PV-re (Takács, 2011). A virális RNS mRNS-ként funkcionál az IRES-mediált translációhoz. A VPg molekulák a *cre* elemeken uridilálódnak és a VPg-pU-pU szolgál primerként a pozitív és negatív szálú RNS szintéziséhez. Ezt követően az egyetlen ORF kifejeződésével termelődik a poliprotein. Ez három különböző régióból áll: kapszid fehérjék (P1), illetve nem strukturális fehérjék (P2 és P3), melyek a genom replikációjában nélkülözhetetlenek (**12. ábra**) (Racaniello et al., 2017). A poliproteinből virális proteázok hasítása révén alakulnak ki a funkcionális fehérjék. Először az L fehérje hasítja a poliproteint P1, P2 és P3-ra, majd a következő lépésben a P1-ből alakulnak ki a kapszid fehérjék, P2-ből a nem strukturális fehérjék (2A, 2B, 2C) és a P3-ból a négy nem strukturális fehérje (3A, 3B, 3C, 3D). Legutoljára az 1AB-ből alakul ki az érett kapszid fehérje, az 1A és 1B (**12. ábra**, **3. táblázat**) (Zell, 2018).

3. táblázat. A picornavírusok fehérjei és általános funkcióik (Zell et al. 2017).

Fehérje neve	Fehérje funkciója
VP1	Kapszid alkotó fehérjék
VP2	
VP3	
VP4	
2A ^{pro}	Proteináz aktivitás révén poliprotein proteolitikus hasítása
2B	Membrán permeabilitás indukciója, az új virionok kijutásának segítése a gazdasejtből. Az RNS szintézis helyszínéül szolgáló membrán vezikulák kialakítása, a replikációs komplex része.
2C ^{ATP-áz}	A replikációs komplex része, NTP-áz aktivitás, a replikációs komplex elemeit irányítja a sejtmembránhoz.
3AB	A replikációs komplex része. A membránba horgonyozza a VPg fehérjét, mely az RNS szintézis kezdeti lépése. A 3D ^{pol} stimulációs kofaktora.
3C ^{pro}	Proteináz aktivitása révén a 3CD prekuzorral egyetemben a poliprotein hasításában játszik szerepet. RNS-kötő aktivitása stimulálja az RNS szintézist a kezdeti szakaszban.
3D ^{pol}	Virális RNS-függő RNS polimeráz. Virális RNS átírása. Sejtes membrán frakciókhoz kötődve RNS replikációs komplexet alkot a 2BC, 2C, 3AB és 3C ^{pro} fehérjékkel együtt

Többféle proteináz található a családon belül, a minden PV-ben megtalálható a legtöbb hasításért felelős 3C^{pro} (kimotripszin-szerű cisztein proteáz) (Sun et al., 2016). Ismert ezen felül a 2A^{pro} (enterovírusok, boosepivírusok, siresapivírusok, felipivírusok, parabovírusok, rabovírusok, sapelovírusok), L^{pro} (aphthovírusok, erbovírusok, mosavírusok) és a 2A proteáz is (aalivírusok, ailurivírusok, aphtovírusok, aquamavírusok, avihepatovírusok, avisivírusok, bopivírusok, cardiovírusok, cosavírusok, crohivírusok, erbovírusok, grusopivírusok, hunnivírusok, kunsagivírusok, limnipivírusok, malagasivírusok, mischivírusok, mosavírusok,

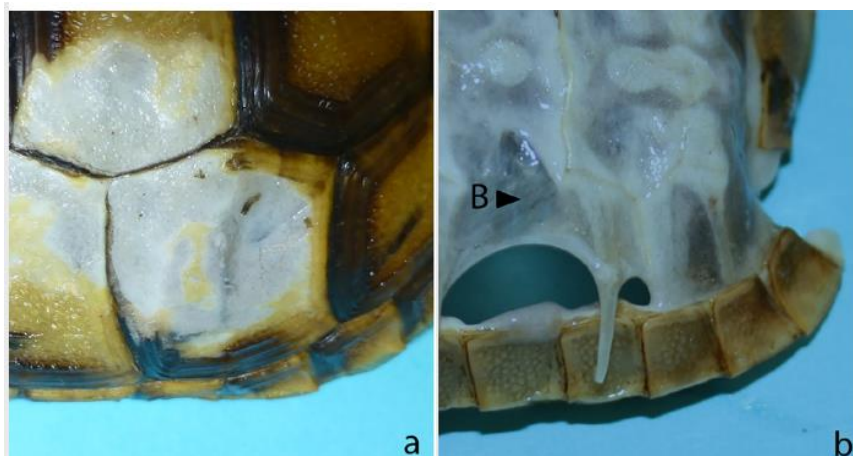
parechovírusok, pasivírusok, potamipivírusok, senecavírusok, shanbavírusok, teschovírusok, torhivírusok) (Zell et al., 2017).

A pozitív szálú RNS vírusokra jellemzően picornavírusok esetén is a vírus-kódolta fehérjék segítségével szintetizálódik meg a negatív irányultságú RNS szál, amely templátként szolgál majd a virális szál VPg iniciálta szintéziséhez. Az újonnan szintetizált RNS funkcionálhat translációhoz mRNS-ként, replikációhoz templátként vagy bekerülhet az új virionokba. Az érett vírus sejtből való kiszabadulása általában lízis útján történik (Jiang et al., 2014; Zell, 2018).

2.3.4 A picornavírusok patogenitása teknősökben

Az emlős és madár eredetű PV-k a leginkább tanulmányozottak humán-és állategészségügyi vonatkozásuk miatt. A többi, gerinces eredetű PV-ról kevesebb információval rendelkezünk annak ellenére, hogy gerinces élőlények nagy részében leírták jelenlétüket (Ng et al., 2015).

A *Testudinidae* család képviselőiből Európa-szerte kimutattak picornavírusokat. A vírusfertőzés a fiatal állatokban jellemző, legjellegzetesebb tünete a páncél felpuhulása (**13. ábra**), szájgyulladás, torokgyulladás, ornyálkahártya gyulladása, tüdőgyulladás, kötőhártya gyulladás, bélgyulladás és hasvízkór, de tünetmentes fertőzésekről is beszámoltak (Marschang et al., 2002; 2011).



13. ábra. Mór teknős (*Testudo graeca*) páncél struktúrája kontroll (a) és picornavírussal fertőzött egyed (b) esetében (Paries et al., 2019).

Számos teknősfajból sikeresen izoláltak szövettenyészetben picorna-szerű vírusokat (Teknős szív, *Terrapene heart cells*, TH-1; ATCC CCL-50): a mór teknősből (*Testudo graeca*), szegélyes teknősből (*T. marginata*), leopárd teknősből (*Geochelone pardalis*) és egyiptomi teknősből is (*T. kleinmanni*) kimutatott kórokozónak az X vírus nevet adták. A legtöbb esetben az X vírussal fertőzött teknősökben egyéb patogéneket (főként herpeszvírusokat és *Mycoplasma* fajokat) is detektáltak (Marchang, 2011). Visszamaradott méretű, puha has-és hátpáncéllal fejlődő fiatal mór teknősök és indiai csillagteknősök (*Geochelone elegans*) boncolása során megnagyobbodott vesét, májat, valamint tágult húgyhólyagot figyeltek meg. Szövetteni vizsgálattal anémiát, glomerulonefrózist, hemosziderózist állapítottak meg. Összesen 64 szerv-és 79 tamponmintából izolálták az X vírust TH-1 szövettenyészetben. A citopátiás hatás PV fertőzésre utalt, melyet az elektronmikroszkópos vizsgálat is megerősített. Egy görög teknősből izolált X vírus genomszekvenciájának meghatározása rávilágított, hogy ez a vírus a *Picornaviridae* család tagja (Heuser et al., 2010).

Egy nagyobb kereteket öltő tanulmányban 1015 Európából származó teknősből vettek mintát *Mycoplasma*, herpeszvírus, ranavírus, picornavírus és ferlavírus PCR szűréséhez. Az

esetek többségében tampon- és vérminták álltak rendelkezésre, néhány esetben szövetmintát is felhasználtak. A vizsgált teknősök közel két százalékából mutattak ki PV örökítőanyagot: görög teknősből (*Testudo hermanni*), mór teknősből, kirgiz teknősből (*T. horsfieldi*), leopárdteknősből (*Stigmochelys pardalis*), és ismeretlen vízi teknősfajból. A pozitív minták PCR termékének szekvenálása megerősítette teknős PV jelenlétét (Kolesnik et al., 2017).

Egy másik projekt során Németországban 27 gyűjtőtől összesen 334, a *Testudinidae* családba tartozó teknősből (mór teknős, görög teknős, szegélyes teknős (*T. marginata*), kirgiz teknős, sarkantyús teknős (*Centrochelys sulcata*), leopárdteknős, fekete teknős (*Chelonoidis carbonarius*)) vettek virológiai vizsgálat céljából az állatok kötőhártyájából, kloákájából és nyelvcsövéből tamponmintát és vért. A tamponmintákban PV örökítőanyag jelenlétét vizsgálták RT-PCR segítségével, a vérből pedig vírusneutralizációs tesztet végeztek. Egyik állat sem mutatott páncél felpuhulást. Hét fiatal, PV pozitív mór teknős mutatott elhullásukat megelőzően visszamaradást a növekedésben és páncél vékonyodást. Összesen 35 felnőtt és 11 fiatal egyednél detektáltak PV örökítőanyagot, vírusneutralizációval pedig 44 felnőtt és egy fiatal egyed esetében azonosítottak picornavírus-specifikus ellenanyagot; 16 esetben mindkét módszerrel pozitív eredményt kaptak. A legmagasabb pozitivitás mór teknősökre volt jellemző. Fekete teknősben, szegélyes teknősben és leopárdteknősben nem igazolták PV jelenlétét (Paries et al., 2019).

Az USA-ban közel száz travancori teknőst (*Indotestudo forstenii*) vizsgáltak. Az állatok rossz fizikai állapotban voltak, anorexia, letargia, fekélyesedés, orrfolyás, könnyezés és hasmenés jelentkezett náluk. Az elhullott egyedek szövettani vizsgálata sokszervi gyulladást és elhalást állapított meg. A teknősökből vett vérplazma, szövetminta és tamponminták PCR szűrővizsgálata az egyedek többségében adenovírus fertőzést állapított meg. Pár évvel később egyik adenovírus fertőzött teknősből származó lép minta metagenomikai vizsgálata során PV koinfekciót is megállapítottak és a teljes PV genom (ToRaV-A) szekvenciát sikerült belőle meghatározni (Ng et al., 2015; Rivera et al., 2009).

Tíz-tíz egészséges mór és görög teknőst fertőztek PV fertőzésben szenvedő mór teknős nyelvének homogenizátumával oronazális, kloákális és intracoelomikális úton. A teknősöket a fertőzést követően naponta vizsgálták garat- és kloáka tamponmintavétel mellett. Súlyos tünetek fellépésekor eutanáziát gyakoroltak, de legkésőbb 164 nappal a fertőzés után minden állatot elaltattak. Mindkét faj esetén előfordult visszamaradott növekedés és páncél puhulás, de látszólag egészséges egyedek is maradtak. Minden fertőzött teknős kloáka mintájából PV-t mutattak ki RT-PCR szűrővizsgálattal a fertőzést követő második naptól kezdve, de ez valószínűleg az inokulumban található vírus volt, mert a fertőzést követő 18. nappal PV jelenléte nem igazolódott. Az eutanáziát követő vizsgálatok során azonban az állatok több szervéből (nyelv, vese, csont, lép) is ToPV örökítőanyagot detektáltak, és szövettanilag 16 állat esetében izolálható volt a vírus. Vérből 14 állat esetében ToPV specifikus ellenanyagot mutattak ki (Paries et al., 2019).

3. Anyagok és módszerek

3.1 A vizsgált minták eredete

3.1.1 Hüllő eredetű arénavírus vizsgálata

Fogságban született, felnőtt, nőtény, albinó vörösfarkú boa tetemét virológiai vizsgálat céljából felboncoltuk. Az állatról nem rendelkezünk további információval. Az alábbi szervmintákat gyűjtöttük: tüdő, máj, vese, vékonybél, vastagbél, gyomor, légső, nyelőcső, nyelv, petefészek tüsző, lép és szív, majd steril foszfát pufferes sóoldatban (phosphate-buffered saline, PBS) homogenizáltuk.

3.1.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

RRV teljes genomszekvencia meghatározásához egy németországi hüllő gyűjteményben elpusztult bozótvipérából (*Atheris squamigera*) származó, majd ott izolált hüllő orthoreovírus törzset (bozótvipera reovírus, 47/02 számú törzs) használtunk fel.

Egzotikus állattartóktól és kisállat kereskedésekből származó elhullott állatok mintáit dolgoztuk fel (4. táblázat) RRV fertőzöttség felméréséhez, az állatok kora és az elhullások oka ismeretlen. Az elhullott egyedeket felboncoltuk, majd steril PBS-be az alábbi szervekből borsónyi darabokat vágunk: tüdő, máj, vese, gyomor, bél, szív, légső, nyelőcső és nyelv, valamint az előbbieket tartalmazó szervekeverék.

4. táblázat. A vizsgált minták eredete

Fajnév	Mintaszám
Telepes agáma (<i>Agama agama</i>)	29
Vörösfarkú boa (<i>Boa constrictor</i>)	1
Sisakos kaméleon (<i>Chamaeleo calpstratus</i>)	5
Közönséges kaméleon (<i>Chamaeleo chamaeleon</i>)	1
Tobzsfarkú gyík (<i>Cordilus tropidosternum</i>)	1
Vöröshasú huszártknős (<i>Emydura subglobosa</i>)	1
Kolumbiai szivárványos boa (<i>Epicrates maurus</i>)	2
Leopárdgekkó (<i>Eublepharis macularis</i>)	5
Schneider szkink (<i>Eumeces schneideri</i>)	1
Párduckaméleon (<i>Furcifer pardalis</i>)	1
Tüskés partiteknős (<i>Heosemys spinosa</i>)	1
Zöld leguán (<i>Iguana iguana</i>)	3
Togó szkink (<i>Mabuya perrotetti</i>)	1
Gabonasikló (<i>Pantherocheilus guttatus</i>)	2
Szakállas agáma (<i>Pogona vitticeps</i>)	2
Királypiton (<i>Python regius</i>)	21
Új-kaledóniai vitorlásgekkó (<i>Rhacodactylus ciliatus</i>)	1
Malachit sövényleguán (<i>Sceloporus malachiticus</i>)	2
Mór teknős (<i>Testudo graeca</i>)	1
Szavanna varánusz (<i>Varanus exanthematicus</i>)	9
Azonosítatlan gekkófaj	14
Azonosítatlan gyíkfaj	2
Azonosítatlan kígyófaj	5

3.1.3 Teknős picornavírusok vizsgálata

Teknős eredetű PV-k teljes genomszekvenciájának meghatározásához felhasznált törzseket 2003 és 2010 között izolálták Németországban, valamint egy törzset izoláltunk laboratóriumunkban (2013/T4). A vizsgált ToPV törzsek eredetét az **5. táblázat** mutatja.

5. táblázat. A vizsgált picornavírus törzsek eredete.

Törzs neve	Teknős faj
124/10 144/10 5/04	Mór teknős (<i>Testudo graeca</i>)
9/05	Sarkantyús teknős (<i>Geochelone sulcata</i>)
5/03	Közönséges pókteknős (<i>Pyxis arachnoides</i>)
2013/T4 14/04	Görög teknős (<i>Testudo hermanni</i>)

A diagnosztikai célú RT-PCR rendszer fejlesztéséhez használt mintákat 2000 és 2013 között gyűjtötték Németországban, Olaszországban és Magyarországon. A száj, garat és kloáka tampon minták élő állatokból, a vírusizoláláshoz felhasznált belső szervek elhullott állatokból származnak (**6. táblázat**). A vizsgált állatok kórtörténetét a melléklet **1. táblázata** tartalmazza. A mintákat PBS oldatban vettük fel.

6. táblázat. A diagnosztikai célú RT-PCR rendszer fejlesztéséhez felhasznált minták eredete

Állat azonosítója	Törzs neve	Gazdafaj	Minta	Ország
1	659/00	<i>Testudo hermanni</i>	nyelv	-
2	2041/00	<i>Testudo horsfieldi</i>	-	-
3	5/03	<i>Pyxis arachnoides</i>	tüdő	-
4-5	26/1-2/03	<i>Testudo marginata</i>	pharyngeális tampon	Olaszország
6	31/03	<i>Testudo hermanni</i>	nyelv	Németország
7	2/4/04	<i>Ismeretlen teknősfaj</i>	-	Németország
8	5/04	<i>Testudo graeca</i>	-	Németország
9	14/04	<i>Testudo hermanni</i>	kloáka tampon	Németország
10	15/04	<i>Testudo graeca</i>	nyelv	Németország
11	16/04	<i>Testudo hermanni boettgeri</i>	-	Németország
12	17/04	<i>Testudo hermanni boettgeri</i>	szív	Németország
13	9/05	<i>Centrochelys sulcata</i>	szájtampon	Olaszország
14	25/09	<i>Testudo marginata</i>	-	Németország
15	19/10	<i>Testudo horsfieldii</i>	nyelv tampon	Németország
16-21	124/1-2-4-5-6-7/10	<i>Testudo graeca</i>	orális és kloáka tampon	Németország
22	36/10	<i>Testudo marginata</i>	orális és kloáka tampon	Németország
23	144/10	<i>Testudo graeca</i>	orális tampon	Olaszország
24	130/12	<i>Stigmochelys pardalis</i>	fej	Olaszország
25	2013/T4	<i>Testudo hermanni</i>	belső szervek	Magyarország

A PBS oldatban felvett belső szerv mintákat minden esetben Qiagen Retsch TissueLyser II segítségével homogenizáltuk. Az így készült szuszpenziót a sejttörmelék üleptítése céljából centrifugáltuk (5 perc, 10510 g), majd a felülúszóból RNS-t vontunk ki.

3.2 Virális nukleinsav izolálása

A szervhomogenizátumokból a virális RNS kivonását TRI Reagent (Molecular Research Center) felhasználásával végeztük el a gyártói előírások szerint. A kivont RNS-t -65 °C-os fagyasztóban tároltuk további felhasználásig.

Vírust izoláltunk a vírusok izolálásra használt szövettényészetekből is. Hüllő orthoreovírusok és ToPV-k esetében a szövettényészetet három fagyasztás/olvasztási ciklusnak vetettük alá, hogy a letapadó sejteket elválasszuk a szövettényésztő edény felszínétől és a sejt feltárása céljából. Ezt a sejtsuszpenziót centrifugáltuk 10000 g-n, 4 °C-on, 5 percig, majd a felülúszó 1 ml-ét 0,5 ml 20m/V%-os NaCl és 0,5 ml 29 m/V%-os PEG6000 (Sigma-Aldrich) oldattal kiegészítve egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után 3000 g fordulatszám, 4 °C-on, 30 percig centrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszót eltávolítottuk. A pelletet 250 µl PBS oldatban vettük fel. Ezt követően a virális RNS kivonását TRI Reagent (Molecular Research Center) felhasználásával végeztük el a gyártói előírások szerint. A kivont RNS-t -65 °C-os fagyasztóban tároltuk további felhasználásig.

3.3 RT-PCR

3.3.1 Óriáskígyó eredetű arénavírusok vizsgálata

Általános RT-PCR

Arénavírus kimutatásához a GPC gén részleges szakaszát felerősítő RT-PCR-t alkalmaztunk Stenglein és munkatársai által 2012-ben publikált primerek felhasználásával (Stenglein et al., 2012).

Az RNS átírását RT reakcióban random hexamer primerekkel végeztük, amely az alábbi reagenseket tartalmazta 25µl végtérfogatban: 5 µl kivont RNS, 1 µM random hexamer primer, 400µM dNTP (Thermo Scientific) keverék, 1x AMV puffer és 10 egység (unit, U) AMV reverz transzkriptáz (Promega). Első lépésben az RNS és random hexamer keverékét (95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen lehűtöttük. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét és először 25 °C-on 10 percig, 42 °C-on 60 percig, végül 70 °C-on 15 percig inkubáltuk. Az így keletkezett komplementer dezoxiribonukleinsav (complementary DNA, cDNS) felsokszorozása PCR-rel történt.

A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3µl-t az RT reakció során keletkezett cDNS-ből, 0,5 µM MDS 436F és 0,5µM MDS 400R primert (**7. táblázat**), 400 µM dNTP keveréket (Thermo Scientific), 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific). A kezdeti 3 perc hosszúságú, 95 °C-on történő denaturációt 45 ismétlési ciklusból álló amplifikáció követte (95 °C 30 másodperc (mp), 47 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), majd a folyamatot 72 °C-on 7 percig történő elongáció zárta.

7. táblázat. A dolgozatban alkalmazott primerek nevei és szekvenciái. A primereket az Eurofins Scientific cég szintetizálta

Primer neve	Szekvencia (5'-3')	T _m (°C)	Primer felhasználása	Hivatkozás
MDS 436F	ARCACATTGGGCCYTTYAC	54,7	Arénavírus szűrő PCR	Stenglein et al., 2012
MDS 400R	TTCATTTCTTCATGRACTTTRTCAATC	52,5		
1607F	CARMGNCGNSCHMGHTCHATHATGCC	67,7	Reovírus szűrő PCR 1. kör, RdRp	Wellehan et al., 2009
2608R	TAVAYRAAVGWCCASMHNGGRTAYTG	62,7		
2200F	GGBTCMACNGCYACYTCBACYGAGCA	69,3	Reovírus szűrő PCR 2. kör, RdRp	Wellehan et al., 2009
2334R	CDATGTCRTAHWYCCANCCRAA	57,8		
Pic-gen-FOR-1	TGATGGCTATGAATGCTACACAGG	61	ToPV szűrő PCR, 5' UTR régió	saját primer
Pic-gen-REV-1	ATGGACGTTTTAACACGATCAGA	57,1	ToPV szűrő PCR, VP4 régió	
Pic-gen-FOR-2	GGTGTWGAYTGGAGTGAYTT	55,3	ToPV szűrő PCR, 3D régió	saját primer
Pic-gen-REV-2	ACACTYCTGATTTTRTCACCAAA	55,3	ToPV szűrő PCR, 3D régió	
FR26RV-N	GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNN		Random primer, NGS	Djikeng et al., 2008
FR20RV	GCCGGAGCTCTGCAGATATC		Random primer, NGS	
PC3	GGATCCCGGGAATTCGG-(ddC)		RNS szegmensvég meghatározás	Vreede et al., 1998
PC2	CCGAATTCCCGGGATCC		RNS szegmensvég meghatározás	Vreede et al., 1998

Egylépéses RT-PCR

Az új generációs szekvenálást követően a bizonytalan vagy hiányos szekvenciák meghatározása Sanger szekvenálással történt. Ehhez oligonukleotid primereket terveztünk az Eurofins PCR Primer Design Tool (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/>) program segítségével, majd egylépéses RT-PCR segítségével sokszoroztuk fel a megfelelő szakaszokat. A reakcióhoz szükséges elegyet az alábbiak szerint állítottuk össze 25 µl végtérfogatban: 1x OneStep RT-PCR puffer, 400 µM dNTP keverék, 1 µM forward és 1µM reverse primer, 1 µl QIAGEN One-Step RT-PCR Enzim Mix. A reakcióelegyhez 2 µl RNS-t adtunk, majd az alábbi hőprofilot alkalmaztuk: 50 °C 30 percig tartó RT lépés után a 95 °C-on 15 percig tartó denaturációt 45 ismétlési ciklusból álló amplifikáció követte (94 °C 30 mp, 48 °C/52 °C 30 mp, 72°C 1 perc), majd a folyamatot 10 percig tartó 72 °C-os elongáció zárta.

3.3.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

Kétlépéses RT-PCR szűrővizsgálathoz

Hüllő orthoreovírus kimutatásához a Wellehan és munkatársai által 2009-ben kidolgozott, az RdRp részleges szakaszát felerősítő kétkörös, úgynevezett nested RT-PCR-t alkalmaztuk 25 µl végtérfogatban (Wellehan et al. 2009). Az első PCR körben 5 µl RNS-t egy 1002 bp (nt 1607-2608) hosszúságú szakaszt átölelő primerekkel együtt 95°C-on 5 percig denaturáltunk, majd jégen hűtöttük. 0,5 µM 1607F és 0,5 µM 2608R primert használtunk a szintézishez. Ezt követően mértük hozzá a denaturált RNS-hez az alábbi reakcióelegyet: 400 µM dNTP, 1x RT puffer (Thermo Scientific), 20 U Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Scientific), 200 U Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). A cDNS szintézis hőprofilja a következőképpen

alakult: 25°C 5 perc, 42°C 30 perc, 70 °C 10 perc. A második PCR körben egy kisebb, 245 bp (2090-2334) hosszúságú szakaszt erősítettünk fel.

Az első PCR elegyhez 3 µl cDNS-t került hozzáadásra, a második PCR elegy pedig az első PCR termékének 3 µl-ét tartalmazta. A reakciókhoz szükséges reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 400 µM dNTP, 1xTaq Puffer (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific), 1 µM MgCl₂ (Thermo Scientific) és 1,25 U Taq polimeráz (Thermo Scientific) enzim. A második PCR körben a 2200F és 2334R 0,5-0,5 µM került a reakcióelegyekbe. A reakcióelegyet az alábbi hőprofil szerint inkubáltuk: 95 °C 3 perc kezdeti denaturáció után 35 ciklusból álló amplifikáció (95 °C 30 mp, 45 °C 30 mp, 72 °C 1 perc az első PCR körben/30 mp a második kör esetében), majd 72 °C 8 percig történő végső elongáció.

Egylépéses RT-PCR

A minták egy részét Qiagen OneStep RT-PCR kit segítségével vizsgáltuk a Wellehan és munkatársai által 2009-ben leírt protokoll szerint 25 µl végtérfogatban (Wellehan et al. 2009), melyhez a fent említett külső (1607F, 2608R) és belső (2090F, 2334R) primereket alkalmaztuk. A reakció első körében 5 µl RNS-t a már ismertetett módon denaturáltuk 0,5–0,5 µM primerrel, majd hozzáadtuk az alábbi reakcióelegyet: 1x OneStep RT-PCR puffer, 400 µM dNTP keverék, 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Enzim Mix. A második PCR körbe az első körben keletkezett PCR termék 2 µl-t vittük át a belső kör primereivel, az első körben ismertetett reakcióelegyet alkalmazva. A hőprofil az alábbiak szerint alakult: 42 °C 30 perc, 95 °C 15 perc, majd 45 ciklus amplifikáció, amelynek lépései 95 °C 30 mp, (47 °C 1 perc az első körben/30 mp a második körben, és 72 °C 1 perc; az amplifikációt végül 72 °C 8 perc inkubáció zárta.

3.3.3 Teknős picornavírusok specifikus kimutatása RT-PCR rendszerrel

A ToPV örökítőanyagának specifikus detektálásához két RT-PCR rendszert alkalmaztunk, melyeket az általunk NGS-el és Sanger szekvenálással meghatározott ToPV genomok alapján terveztünk. Az RT reakció az alábbi reagenseket tartalmazta 25 µl végtérfogatban: 5 µl kivont RNS, 50 µM random hexamer, 400 µM dNTP keverék, 1x AMV puffer és 10 U AMV reverz transzkriptáz (Promega), 20 U RiboLock RN-áz inhibitor (Thermo Scientific). Első lépésben az RNS és a random hexamer keverékét 95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen lehűtöttük. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét és először 25 °C-on 10 percig, 42 °C-on 60 percig, végül 70 °C-on 15 percig inkubáltuk. A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3µl cDNS-t, 0,5 µM Pic-gen-For-1/For2 és 0,5 µM Pic-gen-Rev-1/Rev-2 primert (**7. táblázat**), 400 µM dNTP keveréket, 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific). Az 5 perc hosszú, 95 °C-on történő denaturációt 40 ismétlési ciklusból álló amplifikáció követte (95 °C 30 mp, 45 °C 30 mp, 72 °C 40 mp), majd a folyamatot 72°C-on 8 percig történő elongáció zárta.

A diagnosztikai PCR primereink tesztelésére általunk előzetesen kimutatott ismert vírustörzseket (5/03 és 14/04), valamint klinikai és patológiai mintákat használtunk. A PCR terméket Sanger szekvenálással, az amplifikálásra használt primerekkel ellenőriztük.

Azért, hogy megállapítsuk RT-PCR rendszerünk specificitását, ismert hulló eredetű orthoreo- (CH 1197/96), adeno- (IBD 27/00), irido- (100/01), rana- (CH8), herpesz- (4295) és paramyxovírus (9/5/03) törzsekből izoláltunk DNS-t vagy RNS-t, majd mindkét primerpárral elvégeztük az RT-PCR-t a fent ismertetett protokollt alkalmazva. A primerpárok érzékenységét 5/03 és 14/04-es törzseinkből hét tagú, tízes alapú hígítási sorokat készítettünk PBS-ben, majd virális örökítőanyagot izoláltunk belőlük a már ismertetett módon. A virális RNS kimutatása ezt követően az általunk fejlesztett diagnosztikai primerek segítségével, PT-PCR rendszerben történt.

3.4 A PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

A PCR termékek hosszát elektroforézissel ellenőriztük. Az elektroforézist 1 m/V%-os agaróz (Lonza) gélen végeztük 90 V-on, 25 percig 0,5 m/V% TBE (trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav, Lonza) pufferben. A DNS láthatóvá tételéhez 0,5 V/V%-os (térfogatszázalék) koncentrációban GelRed (Biotium) festéket, molekulatömeg markerként pedig O'Gene Ruler DNS létrát (Thermo Scientific) alkalmaztunk. 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 megfelelő méretű termékeket kimetszettük a gélből, és Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kittel (Geneaid) tisztítottuk ki a gyártói utasítások alapján, 25-40 μ l elúcióval. A tisztított DNS-fragmenseket további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3.5 Vírusizoláláshoz felhasznált sejtvonalak

A kígyó eredetű arénavírust hulló eredetű VH 2 sejttenyészetben (Russell's viper heart, ATCC CCL-140, vipera szív) kíséreltük meg izolálni. A hulló orthoreovírusokat VH 2 és IgH-2 (iguana heart, ATCC CCL-108, leguán szív) sejtvonalakon izoláltuk, tartottuk fent és szaporítottuk. A teknős eredetű picornavírusokat TH-1 (terrapin heart, ATCC CCL-50, teknős szív) sejtvonalakon tartottuk fent és szaporítottuk.

A sejteket reptaréna- és hulló orthoreovírus esetén 5 V/V%, míg ToPV esetében 10 V/V% FBS (fetal bovine serum, magzati borjúsavó) (Gibco, Thermo Scientific), 1 V/V% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza) és 1 V/V% NEAA (non-essential amino acid, Lonza) tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápfolyadékban (Lonza) tenyésztettük, 28 °C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett.

3.6 Vírusizolálás

3.6.1 Óriáskígyó eredetű arénavírus izolálása

A PCR szűrővizsgálattal reptarénavírus pozitív eredményt adó szervek közül a gyomorból, veséből, májból, tracheából, nyelöcsőből, szívből és vastagbélből kíséreltünk meg arénavírust izolálni VH 2 sejtvonalon. Ehhez a szervhomogenizátumot 10000 g fordulatszámon 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót átszűrtük 0,22 μ m-es PES szűrőn (Sarstedt; Nümbrecht, Germany). Az így nyert felülúszó 100 μ l-ét 12 lyukú szövettenyésztő lemezen, 80%-os konfluenciával rendelkező VH 2 sejteken adszorbáltuk egy órán keresztül, majd kétszeri PBS-sel történő mosás után friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez és 28°C hőmérsékleten inkubáltuk 5% CO₂ tartalom mellett. A szövettenyészetet naponta vizsgáltuk fénymikroszkóppal. Öt nap elteltével passzálást végeztünk: háromszori fagyasztás-olvasztás ciklust követően a lemezek tartalmát egyedi csövekbe mértük, majd 10000 g fordulatszámon 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk és 100 μ l felülúszót mértünk át friss VH 2 sejteket tartalmazó 6 lyukú szövettenyésztő lemezre. Ilyen módon háromszori „vak” passzálást követően a lemezeket -65 °C-on fagyasztottuk. Mivel nem tapasztaltunk citopatogén hatást (CPE), a sejtek felülúszójából az arénavírus jelenlétét RT-PCR segítségével ellenőriztük, a 3.3.1. pontban leírtak szerint.

3.6.2 Hulló orthoreovírusok izolálása

A 47/02-es hulló orthoreovírus izolátummal 75 cm²-es szövettenyésztő flaskában 80 %-os konfluenciát mutató, VH 2 sejteket fertőztünk. A sejteken PBS oldattal történő mosás után 100 μ l izolátumot oszlattunk el abszorpció céljából, 1 órán keresztül, 28 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk.

A PCR szűrővizsgálat során pozitív eredményt adó mintákból kíséreltük meg RRV izolálását szervhomogenizátum mixekből, VH 2 és IgH-2 sejtvonalon. A

szervhomogenizátumot centrifugáltuk 10000 g fordulatszámon 4 °C-on tíz percig, majd a felülúszót átszűrtük 0,22 µm-es PES szűrőn (Sarstedt; Nümbrecht, Germany) keresztül. Az így nyert felülúszó 300 µl-ét 6 lyukú szövettenyésztő lemezen, 80%-os konfluenciával rendelkező VH 2 és IgH-2 sejteken adszorbaláltuk 1 órán keresztül, majd két kör PBS oldattal történő mosás után friss tápfolyadékot adtunk a sejtekhez és 28 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban tároltuk.

A szövettenyészeteket naponta vizsgáltuk fénymikroszkóppal. Három-öt nappal a fertőzést követően megjelentek a hulló orthoreovírusokra jellemző óriássejtek, ekkor további felhasználásig -65 °C-ra fagyasztottuk le a vírusszuszenziót tartalmazó lemezeket, flaskskákat.

3.6.3 Teknős picornavírusok izolálása

A 2013/14-es törzset laboratóriumunkban izoláltuk, a többi izolátum németországi együttműködő partnerünktől származik. A 2013/14-es törzs izolálása szervhomogenizátumból történt az arénavírusoknál ismertetett módon TH-1 szövettenyészetben. A teknős picornavírus törzseket szintén TH-1 szövettenyészetben szaporítottuk tovább a fent leírtak szerint.

3.7 Sanger szekvenálás

A szűrővizsgálatok során keletkezett PCR termékekről, valamint az újgenerációs szekvenálás során sikertelenül meghatározott DNS szakaszokról készült PCR termékekről közvetlen szekvencia meghatározást végeztünk BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) segítségével, a PCR reakcióban is használt oligonukleotidokat alkalmazva. A reakcióelegy 10 µl végtérfogatban tartalmazott 1 µl BigDye 3.1 reagenst (Applied Biosystem), 1 µl BigDye puffert, 500 nM primert és 1–4 µl tisztított PCR terméket. A szekvenálási reakcióban a 96 °C-on 1 perc hosszú kezdeti denaturáció után 30 amplifikálási ciklus (95 °C 20 mp, 50 °C 5 mp, 60 °C 4 perc) következett.

A terméket etanol és nátrium-acetát elegyével tisztítottuk, melyhez a szükséges oldat 50 µl végtérfogatban tartalmazott 10 µl szekvenálási reakcióelegyet, 60 V/V% etanolt (VWR) és 90 µM pH 4,6 nátrium-acetátot (Sigma Aldrich). Ezt az elegyet 4400 g-n, 4 °C-on 45 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 70 V/V% etanollal mostuk. Újabb centrifugálást követően (4400 g, 4 °C, 15 perc) az üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk. A szekvenálási termékek kapilláris gélelektroforézise együttműködő partnereinknél történt (Pécsi Tudományegyetem; Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Honvédkórház) ABI PRISM 3100, illetve ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser készülékek használatával.

3.8 Újgenerációs szekvenálás

A ToPV-ok és a 47/02 jelölésű RRV esetében vírusizolátum eredetű, míg kígyó arénavírus esetében máj szervhomogenizátumból származó nukleinsavat használtunk NGS-re. Az NGS előkészítése minden esetben az alábbiaknak megfelelően zajlott.

RT-PCR

Az RT lépést FR26RV-N primerrel végeztük; ez egy random hexamer primer melynek 5' vége meghatározott oligonukleotid szekvencia (**7. táblázat**) (Djikeng et al. 2008). Az RT reakció 25 µl végtérfogatban a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl kivont RNS, 1 µM FR26RV-N primer, 400 µM dNTP keverék (Thermo Scientific), 1x AMV puffer és 10 U AMV reverz transzkriptáz (Promega). Első lépésben az RNS és primer keverékét 95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd lehűtöttük jégen. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét, és a reakcióelegyet 25 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 60 percig, végül 70 °C-on 15 percig inkubáltuk. Az így keletkezett cDNS felszorzozása PCR-rel történt. A reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 3 µl cDNS-t, 1 µM FR20RV primert (**7. táblázat**), 400 µM dNTP keverék (Thermo Scientific), 1x DreamTaq puffert és 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz

enzimet (Thermo Scientific). A kezdeti 3 perc hosszú, 95 °C-on történő denaturációt egy 40 ismétlési ciklusból álló amplifikáció követte (95 °C 30 mp, 48 °C 30 mp, 72 °C 2 perc), majd a folyamatot egy 8 perces, 72 °C-on történő elongációs lépés zárta.

PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

PCR termékek méret szerinti elválasztását agaróz gélelektroforézissel végeztük a 3.4 pont szerint. A gélből a körülbelül 200-2000 bp hosszúságú termékeket nyertük ki a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kittel (Geneaid) a gyártó utasításai szerint. A tisztított PCR termékeket -20 °C-on tároltuk további felhasználásig.

IonTorrent szekvenálás

100 ng amplifikált cDNS-ből a NEB-Next[®] Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent[™] kit segítségével (New England Biolabs) enzimes fragmentációt végeztünk a gyártó utasításai szerint, majd ugyanezen kit használatával a fragmensekhez adaptereket kötöttünk. Az IonXpress[™] Barcode adapterek közül választottuk (Life Technologies) a könyvtárakhoz való egyedi nukleinsavkódokat. Az egyedi kódokkal ellátott cDNS könyvtár tisztítását a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) oszlopos módszerével végeztük, a tisztított mintákat 2 m/V%-os, előre gyártott géleken (Life Technologies) elektroforetizáltuk. A NEBNext[®] Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent[™] kit használatával, (New England Biolabs) PCR módszerrel amplifikáltuk a 300-350 bp hosszúságú termékeket. Ehhez egy 98 °C-on 30 mp denaturációt követő, 12 amplifikációs ciklusból (98 °C 10 mp, 58 °C 30 mp, 72 °C 30 mp) majd egy végső elongációs lépésből (72 °C 5 percig) álló hőprofil alkalmaztunk. Az így keletkezett könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid) tisztítottuk, majd Qubit[®] dsDNA BR Assay kittel (Life Technologies) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. Az egyedi kóddal ellátott DNS termékek klonális amplifikációja IonSphere[™] paramágneses gyöngyök felszínén emulziós PCR-rel zajlott PCR-t Ion OneTouch[™] Template Kit (Life Technologies) használatával, OneTouch v2 készüléken, a gyártó utasításai alapján. Ezután Ion OneTouch[™] ES robottal dúsítottuk az amplifikált könyvtár DNS-t tartalmazó részecskéit. A szekvenálást Ion Torrent Personal Genome Machine[®] készüléken végeztük, 316 és 318 típusú chippekkel, az Ion PGM[™] Sequencing kithoz ajánlott szekvenálási protokollt követve.

3.9 Az RNS genom szegmensvégeinek meghatározása

3.9.1 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

A virális RNS genomszegmensek nemkódoló végszekvenciáinak meghatározása céljából a kivont RNS 3' végeihez a PC3 primert ligáltuk (**7. táblázat**), mely 5' végén foszforilált, 3' végén didezoxi-citozinnal lezárt (Vreede et al. 1998). A ligálási reakció 30 µl végtérfogatban a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl kitisztított virális RNS, 1x T4 RNA Ligase puffer, 1 mM ATP (Thermo Fisher Scientific), 1,3 µM PC3 primer, 15 m/V% PEG8000, 10 U T4 RNS ligáz (New England Biolabs). A reakcióelegyet 17 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül (16-18 óra). Ezt követően a ligált kettősszálú RNS-t QIAQuick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével nyertük ki. A mintához 150 µl QG puffert és 150 µl izopropanolt (VWR) adtunk, majd a kitben található szilika membrán oszlopon tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. A ligált RNS-t további felhasználásig -65 °C-os fagyasztoóban tároltuk.

Kétlépeses RT-PCR

A ligált RNS átírását RT reakcióban a PC3 primerrel komplementer PC2 primerrel végeztük (**7. táblázat**) (Vreede et al. 1998). A reakció 25 µl végtérfogatban a következő reagenseket tartalmazta: 5 µl ligált RNS, 400 nM PC2 primer, 400 µM dNTP (Thermo Scientific), 4 µM DTT (Thermo Scientific), 1x First-Strand puffer (Thermo Scientific), 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) és 200 U SuperScriptIII reverz transzkriptáz

(Thermo Scientific). Első lépésben az RNS és a PC2 oligonukleotid keverékét 95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd jégen lehűtöttük. Ezután hozzáadtuk a reakció többi összetevőjét és az alábbi hőprofil szerint inkubáltuk: 25 °C-on 5 perc, 50 °C 60 perc, 70 °C 15 perc.

Az így keletkezett cDNS-ről a szegmensvégi szekvenciák felsokszorozása PCR reakcióban 25 µl végtérfogatban történt az alábbi reakcióelegy segítségével: 2 µl cDNS, 400 nM PC2 és 400 nM génspecifikus primer, melyet az előzőleg nyert szekvenciaadatok alapján terveztünk, 400 µM dNTP keverék (Thermo Scientific), 1x DreamTaq Green puffer, 1 U DreamTaq DNS polimeráz (Thermo Scientific). A reakcióelegyet 95 °C-on 3 percig denaturáltuk, majd 40 ciklusból álló hőprofil következett (95 °C 30 mp, 55 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), melyet 72 °C 8 perc hosszú végső elongációs lépés zárta.

A nyert PCR termékek méret szerinti elválasztását agaróz gélelektroforézissal végeztük a fent ismertetett módon (3.4. fejezet), majd a szekvenciák meghatározása Sanger szekvenálással történt.

3.9.2 Teknős picornavírusok vizsgálata

ToPV esetében az 5'/3' RACE Kit (rapid amplification of cDNA ends, cDNS végek gyors amplifikálása; Roche, 2nd Generation) segítségével határoztuk meg az 5' és 3' NTR szakaszokat a gyártó utasításai szerint vírusizolátum eredetű RNS-ből kiindulva. Az amplitonokat agaróz gélben futtattuk és gélből tisztítottuk a fent említett módon, majd a termékek nt sorrendjét Sanger szekvenálással határoztuk meg a fent ismertetettek szerint.

3.10 A szekvenciaadatok elemzésére használt bioinformatikai módszerek

A Sanger szekvenálás elektroferogramjait a BioEdit és Geneious Prime v 2020.0.3 szoftverek segítségével tekintettük meg és szerkesztettük (Hall 1999; Kearsse et al., 2012). A Sanger és NGS eredményeként kapott szekvenciák összeillesztését a Geneious Prime és az AliView szoftver segítségével végeztük el (Larsson, 2014). A GenBank adatbázisában a homológ gének keresése BLAST algoritmussal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) történt (Altschul et al., 1990).

A kodon alapú többszörös szekvencia illesztéseket Muscle algoritmus alkalmazásával Geneious Prime szoftverrel és a TranslatorX (<http://translatorx.co.uk/>) online illesztő programmal végeztük el (Abascal et al., 2010). A filogenetikai elemzéseket és a szekvencia azonossági számításokat a MEGA6 és MEGA X szoftvercsomag segítségével készítettük el (Tamura et al., 2013; Kumar et al. 2018). A szekvenciák közti átlagos nt és as távolságokat a *p*-distance módszerrel számoltuk ki. A filogenetikai fák rekonstrukciójához használt legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztását MEGA6 és MEGAX programmal végeztük. A törzsfák készítése maximum likelihood módszerrel történt, az elkészült fák megbízhatóságát bootstrap elemzéssel (500 vagy 1000 ismétléssel) ellenőriztük. A virális ORF-eket ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) segítségével kíséreltük meg azonosítani.

Az NGS során nyert adatokat a CLC Genomics Workbench szoftver (<https://digitalinsights.qiagen.com/>) segítségével dolgoztuk fel. A kapott szekvencia adatokat ellenőriztük, a rossz minőségű, vagy túl rövid nt szakaszokat (readek) kiszűrtük, levágtuk az adapter régiókat. Ezt követően a readeket egy GenBank-ban fellelhető referencia törzs szekvenciájához illesztettük; ezzel a módszerrel a vírustörzsek teljes, vagy közel teljes genomszekvenciáját határoztuk meg.

A Recombination Detection Program (RPD4) szoftver segítségével rekombinációs analízist végeztünk (Martin et al., 2015). Az SDT v1.2 szoftverrel szemléltettük az egyes gének kódoló régióinak nt és as szekvenciái közötti hasonlósági értékeket (Muhire et al., 2014).

ToPV-ok esetén a hipotetikus proteolitikus hasítási helyeket a NetPicoRNA online software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA/>) segítségével kerestünk a meghatározott szekvenciákban (Blom et al., 1996). A 14/04-es teknős PV törzset tekintettük referencia szekvenciának a többi teknős PV törzs esetén.

3.11 Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A 47/02 bozótvipera reovírus izolátumából kivont RNS állományban a reovírus szegmenseket PAGE segítségével választottuk el.

Az 5 m/V%-os szeparáló gél 15 ml végtérfogatban az alább összetevőkből állt: 6 V/V% akrilamid/biszakrilamid (40 m/V%-os) (Sigma Aldrich), 5 V/V % 10X TBE puffer (Lonza), 0,5 V/V% ammónium-perszulfát (APS, 10 m/V%-os) (Sigma Aldrich), 15 µl (0,05 V/V%) tetrametil-etilén-diamin (TEMED) (Sigma Aldrich). A 4 m/V%-os koncentráció gél 5 ml végtérfogatban az alábbi összetevőket tartalmazta: 10 V/V% akrilamid/biszakrilamid (40 m/V%-os), 10 V/V% 10X TBE puffer, 1 V/V% APS (10 m/V%-os), 0,01 V/V% TEMED. Az elektroforézis omniPAGE Mini Wide Vertical Protein Electrophoresis System (Clever Scientific) vertikális elektroforézis rendszerrel történt, 90 V-on, 4 °C-on.

Az RNS szegmensek megjelenítése céljából ezüst-nitrát festést alkalmaztunk. 2x5 percig 10 V/V%-os etanol és 0,5 V/V%-os ecetsav oldatban rázatás mellett fixálást két ioncserélt vizes mosás követett. Ezután 0,1 V/V%-os ezüstnitrát oldatban festettük a gélt 15 percig, majd ismét mostuk. Az előhívás 15 percig zajlott enyhe rázatással, 1,5% nátrium-hidroxid és 35 V/V%-os formaldehid oldatában. Ismételt két mosás után az előhívás leállítása 5 V/V%-os ecetsav oldattal történt 15 perces rázatással történő inkubálással.

4. Eredmények

4.1 Óriáskígyó eredetű arénavírus vizsgálata

4.1.1 A szervek RT-PCR-es szűrővizsgálata

A reptarénavírusok glikoprotein génjének egy rövid szakaszára tervezett általános primerek segítségével a vörösfarkú boa alábbi szerveinek homogenizátumából sikerült reptarénavírust kimutatnunk RT-PCR szűrővizsgálattal: petefészek tüsző, nyelőcső, vese, gerincvelő, agy, gyomor, vékonybél, máj és lép. A rövid szakasz Sanger-szekvenálása alapján arénavírus jelenlétét állapítottuk meg, melynek a tartási hely alapján Coldvalley vírus nevet adtuk.

4.1.2 A Coldvalley vírus izolálása

Annak ellenére, hogy vörösfarkú boa szerveinek nagy részéből RT-PCR-es szűrővizsgálattal ki tudtunk mutatni arénavírust, a vírus izolálása sikertelen maradt a vizsgált szervek esetében többszöri passzálás után is. RT-PCR segítségével sem tudtunk arénavírus örökítőanyagot kimutatni az egyes szervek homogenizátumával fertőzött szövettenyészetek felülűszójából.

4.1.3 A teljes genomszekvencia meghatározása és elemzése

Újgenerációs szekvenálás segítségével a kimutatott arénavírus 8775 nt hosszúságú, közel teljes genomszekvenciáját sikerült meghatározni. A szekvenciaadat alapján a Coldvalley vírus genomja két szegmensre tagolódik. Az L szegmens teljes szekvenciáját megismertük, mérete 6860 nt, az S szegmenst részlegesen, 1985 nt hosszúságban tudtuk meghatározni. A GC arány 40,8% (8. táblázat).

8. táblázat. A Coldvalley reptarénavírus genomjának általános jellemzői

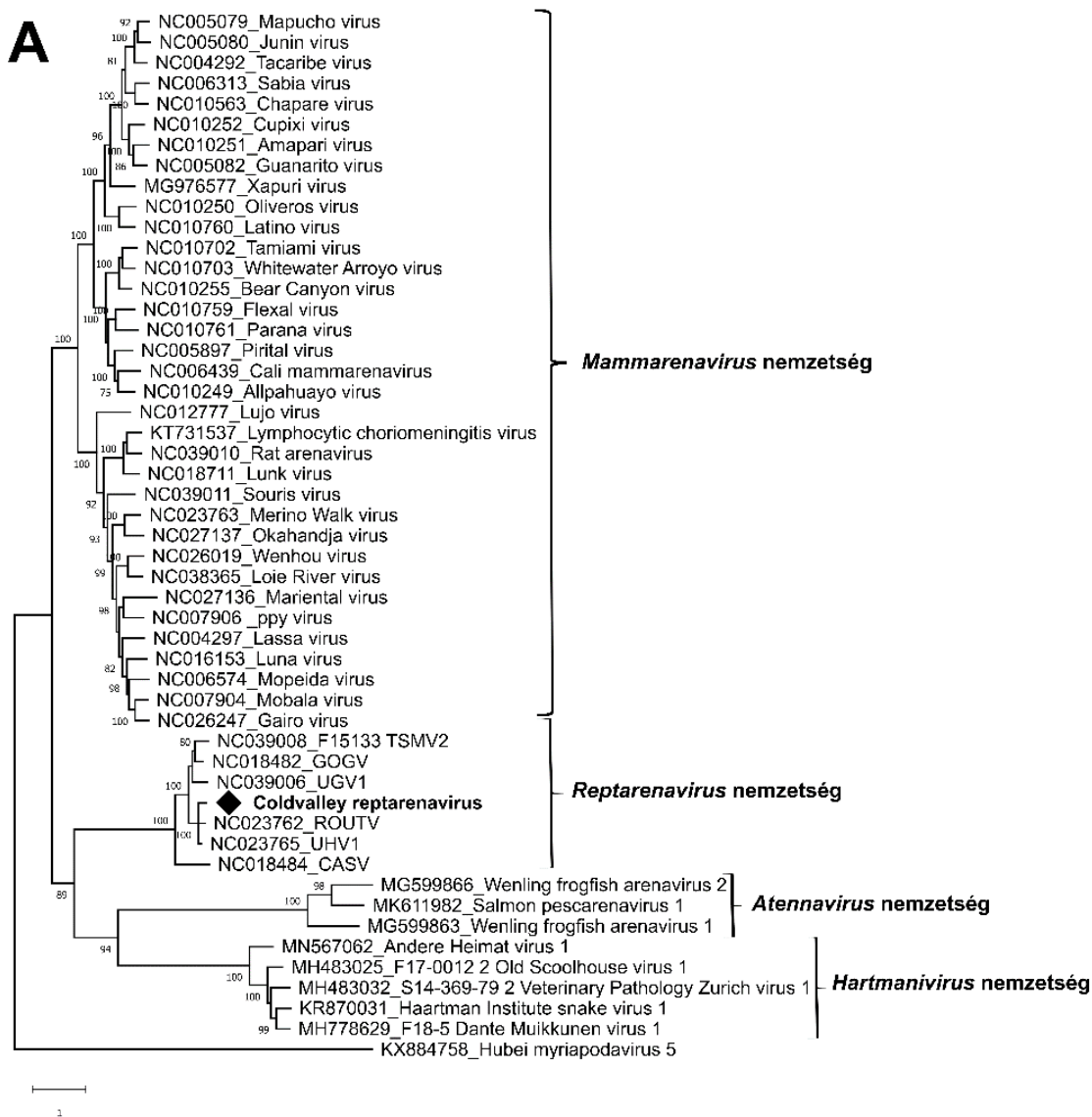
Szegmens	L		S	
Szegmens mérete (bázis)	6860		1895*	
5' UTR (bázis)	87		NA	
ORF hossza (bázis)	348	6208	NA	1755
kódolt fehérje	Z	RdRp	GPC	NP
fehérje mérete (as)	115	2068	NA	584
IGR hossza (bázis)	172		111*	
3' UTR (bázis)	47		29	

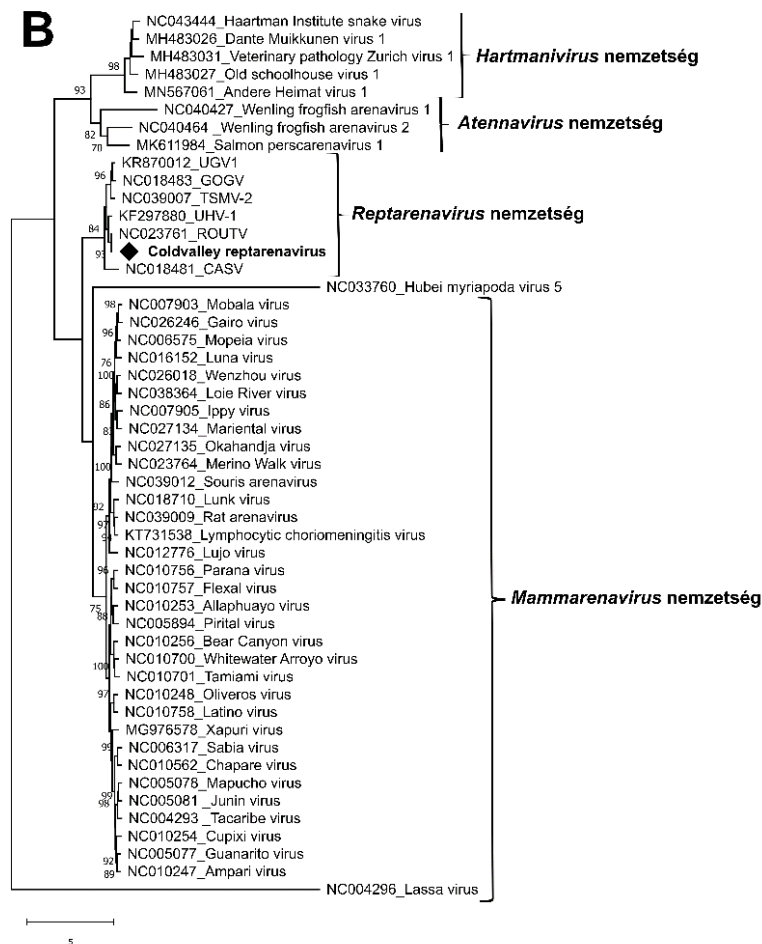
* Részleges szekvencia

NA: nincs adat

Az L szegmens 5' UTR régiója 87, a 3' UTR régiója 47 bázis hosszúságú. A szegmensen két ORF helyezkedik el: 5' irányban a Z gén található, mely a 115 as-ból álló Z fehérjét kódolja, 3' irányban az *RdRp* gén található, mely a 2068 as-ból álló virális RdRp fehérjét kódolja. A két ORF közötti IGR régió 172 nt hosszú. Az S szegmens 5' vége ismeretlen, míg a 3' irányban található ORF az 584 as hosszúságú NP fehérjét kódolja. A 3' UTR régió hossza 29 nt, az IGR régióból 111 nt-ot sikerült meghatározni, melyben hajtű struktúra alakul ki. A Coldvalley vírus genomszerveződése az L szegmensen megegyezik az *Arenaviridae* család tagjainak genomszerveződésével, ugyanez mondható el az S szegmens ismert szakaszáról is. Az általunk vizsgált vírus a reptarénavírusokkal megegyező genomszerveződéssel rendelkezik tekintve, hogy L szegmensén a virális polimeráz gén mellett a Z fehérje kódoló szakasza is megtalálható.

A Coldvalley vírus teljes L és részleges S szegmens szekvenciáját összehasonlítottuk az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselőinek homológ szakaszaival: a legmagasabb azonossági értékeket a *Reptarenavirus* nemzetség esetében láthattunk (L szegmens: 56,3–98,9, S szegmens: 65,4–98,7%). Ezek az azonossági értékek az ICTV ajánlása szerint egyazon arénavírus nemzetségbe tartozás határértékei (35% és 40%) felett állnak, ezért megállapítottuk, hogy a vörösfarkú boa eredetű vírusunk a *Reptarenavirus* nemzetségbe tartozik. Ezt megerősíti az *RdRp* és *NP* gének kódoló régióinak nt szekvenciája alapján készített filogenetikai törzsfája is, mely – az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselővel összevetve – a Coldvalley arénavírus a *Reptarenavirus* nemzetség tagjai között helyezkedik el (**14. ábra**).



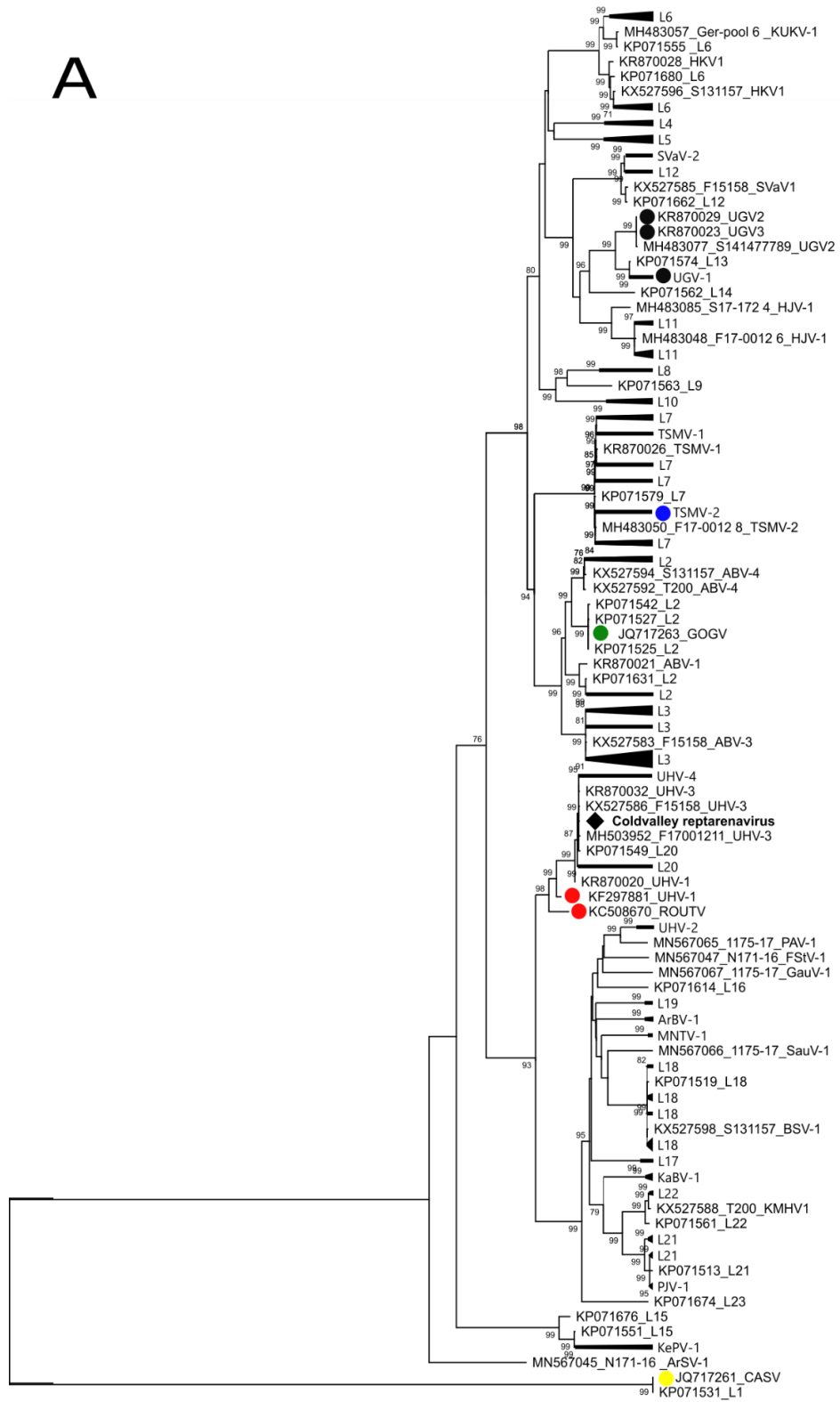


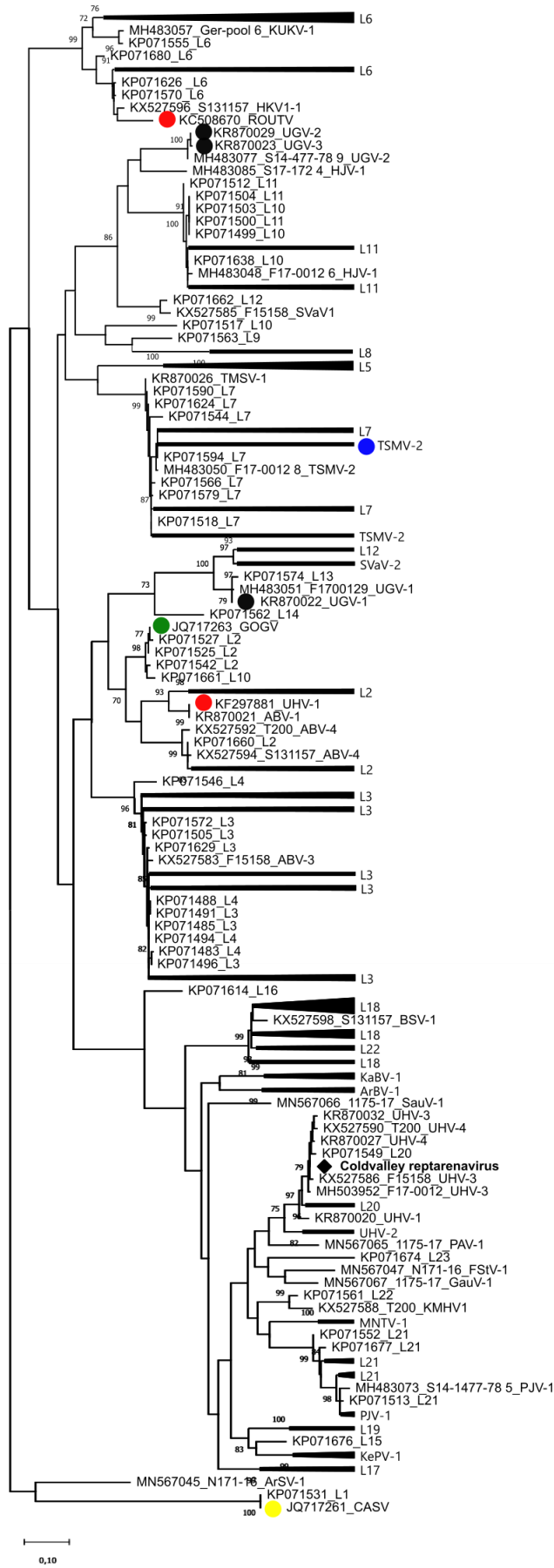
14. ábra. Az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz gén (A) és nukleoprotein gén (B) kódoló szakaszai alapján készített filogenetikai törzsfá. A fa maximum-likelihood módszerrel készült, 1000 bootstrap ismétléssel, a MEGAX program által javasolt legmegfelelőbb modell segítségével (RdRp – GTR+G+I; NP – GTR+G+I). Rövidítések: CASV – California Academy of Science vírus, UGV – University of Giessen vírus, TSMV – Tavallinen suomalainen mies vírus, GOGV – Golden Gate vírus, UHV – University of Helsinki vírus.

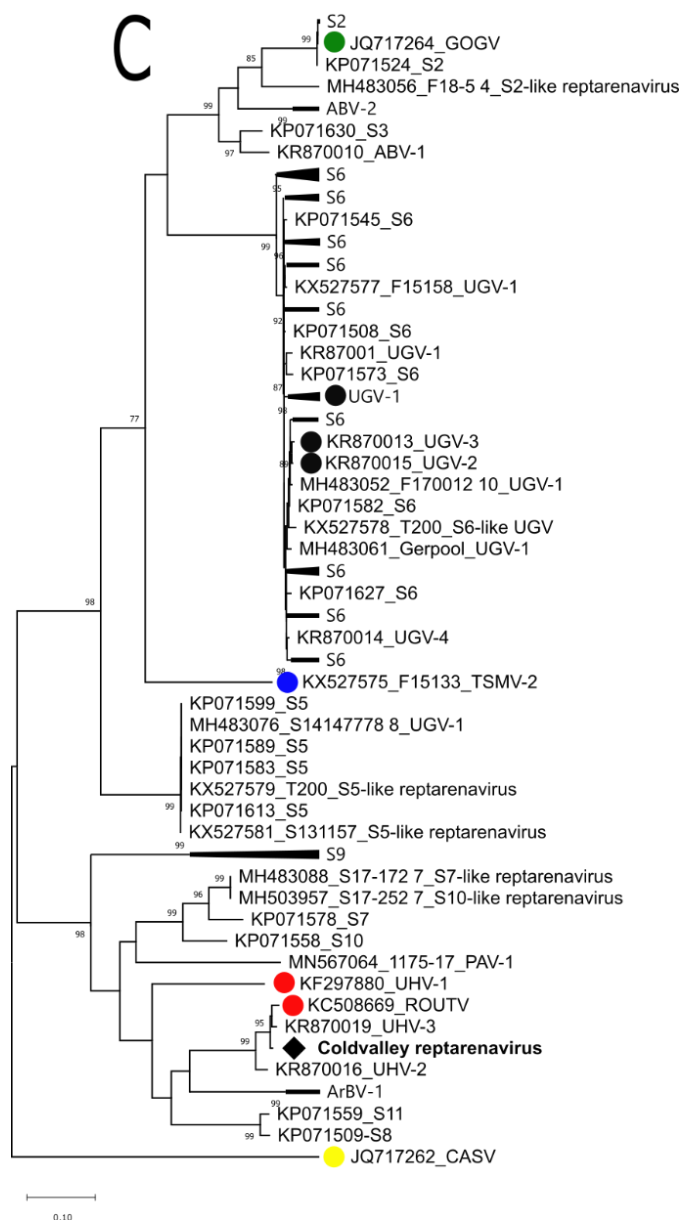
A Coldvalley vírus *RdRp* génjének szekvenciáját összehasonlítottuk az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselőinek homológ szakaszaival. A *Mammarenavirus* nemzetség tagjaival 38,6-40,0% nt, 22,7-25,9% as azonossági értékeket kaptunk. A *Hartmanivirus* nemzetség képviselőinél ezek az értékek nt szinten 37,3-38,3%, as szinten 19,3–21,3%; míg az *Antennavirus* nemzetség esetén 35,2-37,1% nt, 28,6-19,4% as azonossági értékeket kaptunk. A Coldvalley arenavírust szintén összevetettük a Hubei myriapoda vírussal, ez esetben 34,1% nt és 16,2% as azonossági értéket láthattunk. Az *NP* gén összehasonlítása során a *Mammarenavirus* nemzetség tagjaival 42,9-48,9% nt, 29,2-34,2% as azonossági értékeket, a *Hartmanivirus* nemzetség képviselőivel összevetve ezek az értékek nt szinten 38,2-40,2%, as szinten 15,6-20,6%; az *Antennavirus* nemzetség esetén 13,6-16,1% nt, 35,3-35,6% as azonossági értékeket kaptunk. A Hubei myriapodavírus 5-tel összehasonlítva a Coldvalley arenavírust 32,1% nt és 9,8% as azonossági értékeket láthattunk.

Az általunk vizsgált törzsek *RdRp*, *NP* és *Z* fehérjéit kódoló gének szekvenciaadatait egyenként összehasonlítottuk a *Reptarenavirus* nemzetség más képviselőinek GenBank-ban fellelhető szekvenciáival, valamint filogenetikai törzsfákat is készítettünk maximum likelihood módszerrel (**15. ábra**). Mindhárom gén alapján készült törzsfán az általunk vizsgált arenavírus a *Rotterdam reptarenavirus* faj képviselői között található.

A



B

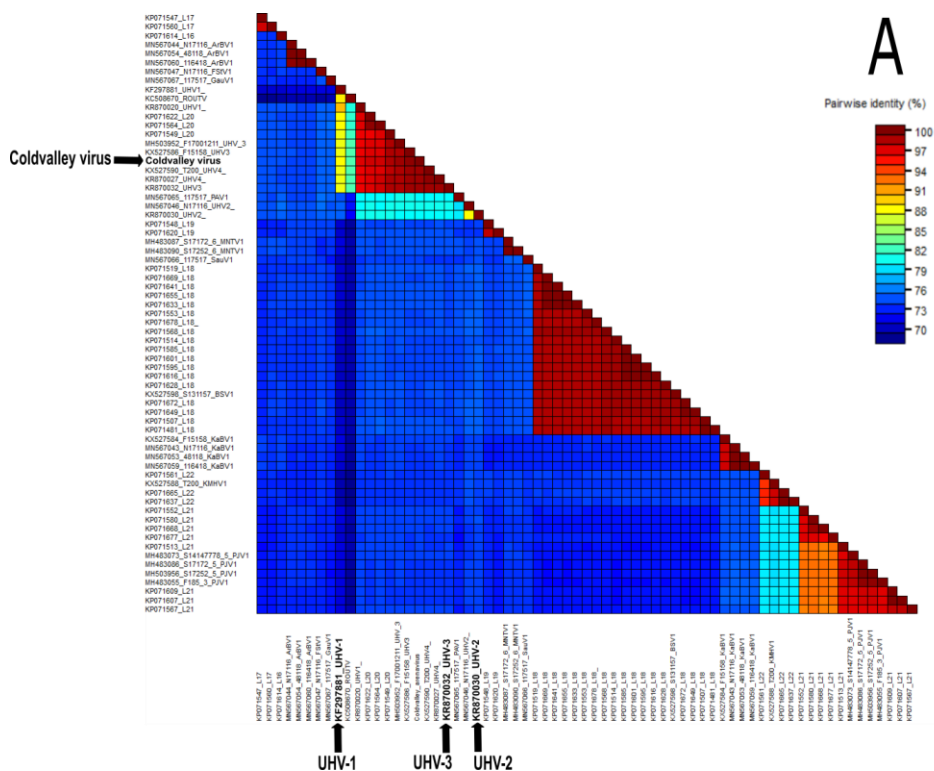


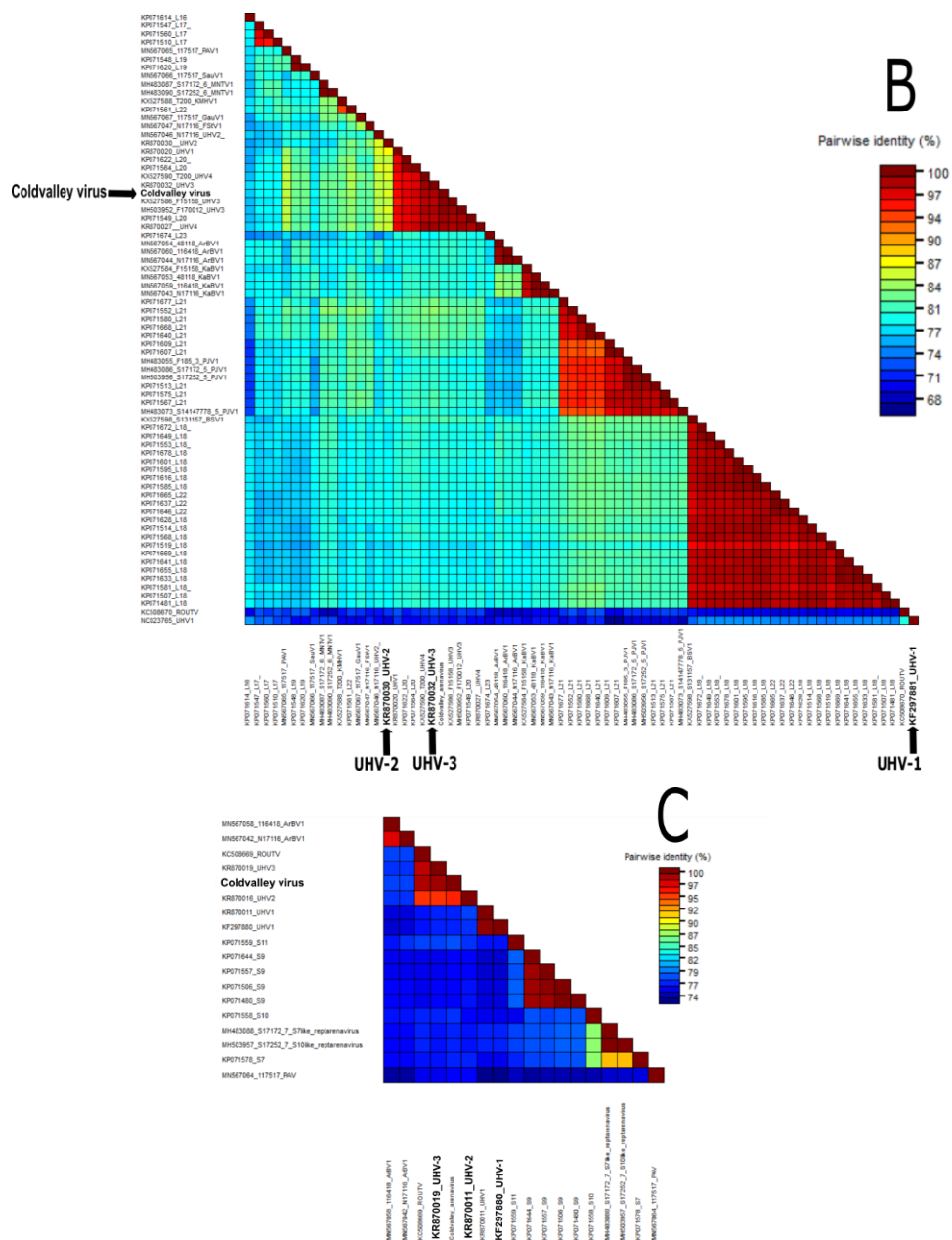
15. ábra. A *Reptarenavirus* nemzetség képviselőivel készült, az RNS-függő RNS polimeráz (A), Z (B) és NP (C) gén nukleotid szekvenciákra épülő, maximum-likelihood módszerrel készült filogenetikai törzsfá. Az egyes körök az ICTV által elfogadott, egy fajba tartozó törzseket jelzik: sárga – *California reptarenavirus*, piros – *Rotterdam reptarenavirus*, zöld – *Golden reptarenavirus*, kék – *Ordinary reptarenavirus*, szürke – *Giessen reptarenavirus*. A színes körök az ICTV által besorolt törzseket jelölik, a Coldvalley reptarenavirus élére állított fekete négyzettel jelölt. A fa 1000 bootstrap ismétléssel, a MEGAX program által javasolt megfelelő modell (T92; Tamura-3) segítségével. Rövidítések: KMHV – Kuka mitae haeh vírus; KaBV – Kaltenbach vírus; KePV – Keijut pohjoismaissa vírus; SVaV – Suria Vanera vírus; HKV – Hans Kompis vírus; ABV – Auroroa borealis vírus; BSV – Bis spoeter vírus; FStV – Frankfurter Strasse vírus; PAV – Porto Alegre vírus; SauV – Saudades vírus; GauV – Gaucho vírus; ArBV – Aramboia boa vírus; ArSV – Arabuta snake vírus; UGV – University of Giessen vírus; UHV – University of Helsinki vírus; CASV – California Academy of Science vírus; GOGV – Golden Gate vírus; HKV – Hans Kompis vírus; TSMV – Tavallinen suomalainen mies vírus.

A Coldvalley arénavirus kódoló szakaszainak szekvenciáját összehasonlítottuk a *Reptarenavirus* nemzetség GenBank-ban található képviselőivel: az *RdRp* gén nt szinten 99,3% hasonlóságot mutat az F15158-UHV-3 törzsszel (KX527586), míg as szinten 99,5% azonosságot láthattunk UHV-4-gyel (KR870027). A legalacsonyabb azonossági értékeket a California Academy of Science vírusnál (CASV, JQ717261) láthatunk (56,1% nt és 51,6% as). Az NP gén nt szinten az UHV-3 (KR870019) vírussal mutatja a legmagasabb, 98,9%-os azonossági

értéket, as szinten azonban az UHV-2 vírussal (KR870016) a leghasonlóbb (99,6%). A legalacsonyabb azonossági érték itt is CASV-nél (JQ717262) látható (59,0% nt és 58,2% as). A Z gént vizsgálva nt szinten F15158 UHV-3-mal kaptuk a legmagasabb azonossági értéket, 99,8%-ot nt, 100%-ot as szinten. Itt is CASV és L1-es genotípus esetében találhatóak a legalacsonyabb azonossági értékek: 58,8% nt és 47,2% as szinten. A teljes L és részleges S szegmens szintén az UHV-3-mal mutatta a legmagasabb nt azonossági értékeket (98,8-99,3% L és 98,8% S). A *Rotterdam reptarenavirus* két típusszekvenciájával, az UHV-1-gyel (L és S szegmens GenBank azonosító: KF297881, KR87011) és ROUV-al (L és S szegmens GenBank azonosító: KC508670, KC508669) szintén magas azonossági értékeket kaptunk a Coldvalley vírussal összevetve, az egyes géneket vizsgálva. Az *RdRp* génnél 82,1-87,2% nt, 84,9-87,8% as azonossági értékeket láthatunk, a filogenetikai fákön egy ágon helyezkednek el. Ezzel szemben a Z gén szekvenciája alapján készült törzsfákat vizsgálva a három vírus távoli ágakon helyezkedik el és azonossági értékeik is alacsonyabbak (72%>). Az *NP* gén alapján készült törzsfán a Coldvalley és ROUV egy ágon található (98,5% nt és 98,9% as azonosságok), míg az UHV-1 egy távolabbi ágon látható (77,6% nt és 85,0% as azonosság).

Az egyes génekre vonatkoztatott nt azonossági értékek alapján a legnagyobb hasonlóságot mutató reptarénavirus törzsekkel készítettünk összehasonlító ábrát SDT programmal. Minhárom vizsgált gén esetében az ábrák jól szemléltetik az UHV-3-mal való nagyfokú hasonlóságot (**16. ábra**).





16. ábra. SDT alapú páronkénti nukleotid szekvencia összehasonlításra alapuló ábra. A reptarénavírusok GenBank-ban fellelhető képviselői közül a Coldvalley reptarénavírussal magasabb azonossági értékeket mutató törzsetek vetettük össze. Az ábra SDT1.2 szoftverrel készült. (A) RNS-függő RNS polimeráz gén nukleotid szekvencia alapján, (B) Z gén nukleotid szekvenciája alapján, (C) NP gén nukleotid szekvencia alapján készült.

Az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ORFFinder programjának segítségével az L szegmensen azonosított kettő és az S szegmensen azonosított egy ORF-en felül további alternatív ORF-eket azonosítottunk.

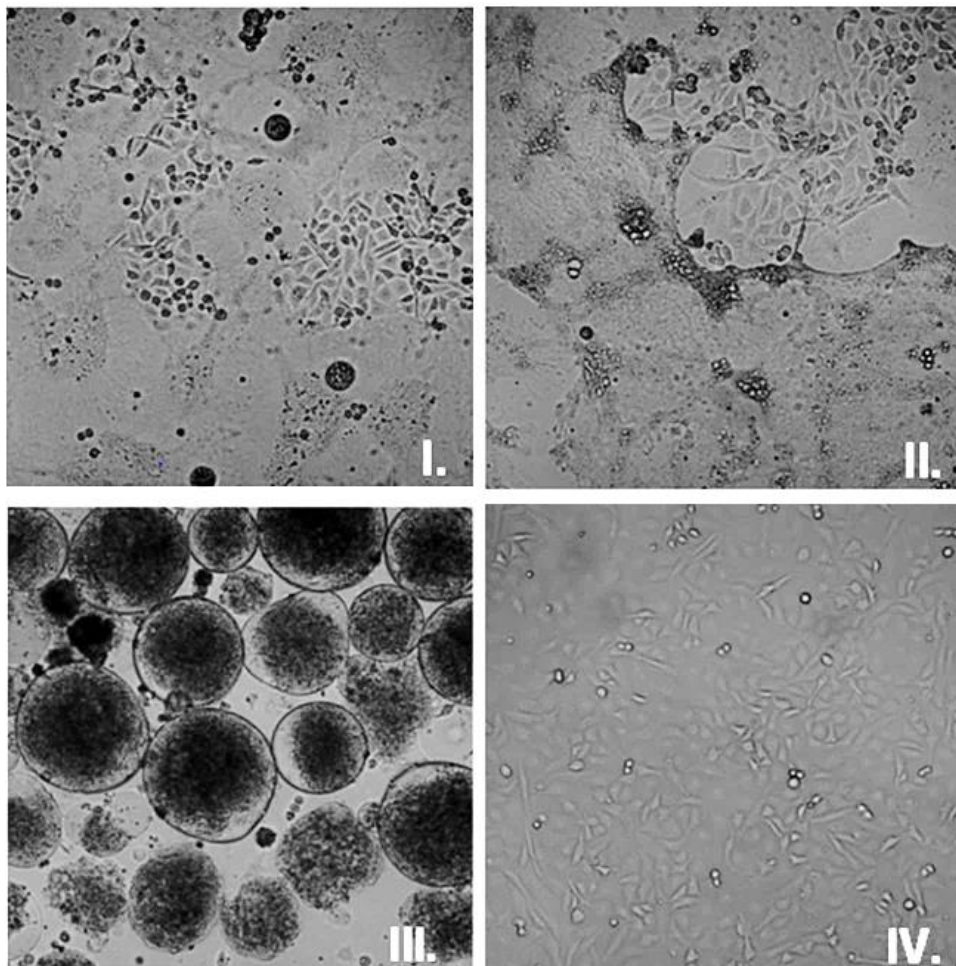
Az RDP4 program segítségével végeztünk rekombinációs analízist a Coldvalley reptarénavírus és az *Arenaviridae* család, valamint a *Reptarenavirus* nemzetség képviselőivel: a program nem talált rekombinációs eseményt a vizsgált vírusunk L szegmensén. Az S szegmensre a részleges szekvenciaadatok miatt nem végeztük el ezt a vizsgálatot.

A filogenetikai törzsfák vizsgálata, a magas bootstrap értékek és a vizsgált szekvenciák magas nt és as azonossági értékei is alátámasztják azt a megállapításunkat, hogy a vizsgált arénavírusunk a *Rotterdam reptarenavirus* faj képviselője. Első alkalommal határoztuk meg reptarénavírus közel teljes genomszekvenciáját Magyarországon.

4.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

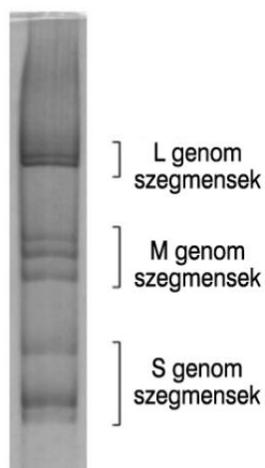
4.2.1 A bozótvipera reovírus törzs teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése

A bozótviperából izolált 47/02-es vírustörzs VH 2 sejtvonalon a hüllő orthoreovírusokra jellemző citopatogén hatást hozott létre (17. ábra).



17. ábra. A 47/02-es vírustörzssel fertőzött VH 2 sejtek. I. 24 órával a fertőzés után; II. 48 órával a fertőzés után; III. 72 órával a fertőzés után; IV. VH 2 sejtek negatív kontroll).

A tisztított virális RNS poliakrilamidgél elektroforetikus képe az orthoreovírusokra jellemző képet adta, a 47/02-es törzs, más néven bozótvipera reovírus genomja szegmensekre tagolódott (18. ábra).



18. ábra. A bozótvipera reovírus RNS-ének ezüstfestéssel előhívott poliakrilamid gélelektroforetikus képe. Jól látható az orthoreovírusokra jellemző RNS genom szegmentáltsága.

A 47/02-es hüllő orthoreovírus törzs teljes genomjának mérete összesen 24043 bp, mely tíz szegmensre tagolódik. Az egyes szegmensek mérete 1211 bp-tól (S4) 3970 bp-ig (L1) terjed, G+C aránya 45,67%. Az 5' UTR 13-31 nt, mely a viszonylag konzervált GUUA/CUUU szekvenciát tartalmazza: a negyedik nt pozícióban az S szegmensek és két M szegmens esetén adenin található, míg az L szegmenseknél és egy M szegmensnél citozin figyelhető meg. A 41-121 nt hosszúságú 3' UTR régióban megtalálható az orthoreovírus nemzetségre jellemző konzervált pentanukleotid UCAUC szekvencia. A bozótvipera reovírus minden genomsegmentje egy gént kódol, ez alól a bicisztronos S1 szegmens a kivétel. A vírus genomjáról így összesen 11 fehérje íródhat át: λ A (belső kapszid fő szerkezeti fehérjéje), λ B (RNS-függő RNS polimeráz), λ C (core nyúlvány), μ A (core ATP-áz), μ B (külső kapszid szerkezeti fehérje), μ NS (nem strukturális fehérje), σ A (belső kapszid szerkezeti fehérje), σ B (külső kapszid szerkezeti fehérje), σ C (sejtkapcsolódásért felelős fehérje), p14 (FAST fehérje) és σ NS (RNS kötő funkcióval rendelkező nem strukturális fehérje). A nem strukturális FAST és σ C fehérjék a bicisztronos S1 genom szegmensén kódoltak. A 47/02-es törzs genomjának jellemzőit a **9. táblázat** mutatja. Az egyes genomsegmentek mérete, szerveződése megegyezik az orthoreovírus genom sajátosságaival. Kijelenthetjük,

hogy a 47/02-es bozótvipera izolátum a hüllő orthoreovírus fajba tartozik.

9. táblázat. A 47/02-es bozótvipera orthoreovírus törzs genomjának általános jellemzői

47/02 szegmensek	Szegmens mérete (bázis)	Szegmens hossza			Kódolt fehérje	Fehérje mérete (as)
		5' vég	ORF (bázis)	3' vég		
L1	3970	GUUCUUU	3873	UUCAUC	λ A	1290
L2	3901	GUUCUUU	3846	UUCAUC	λ C	1281
L3	3847	GUUCUUU	3786	UUCAUC	λ B	1261
M1	2487	GUUAUUU	2379	UUCAUC	μ NS	792
M2	2348	GUUCUUU	2277	UUCAUC	μ A	758
M3	2310	GUUAUUU	2031	UUCAUC	μ B	676
S1	1554	GUUAUUU	360	UUCAUC	FAST	119
			1050		σ C	349
S2	1314	GUUAUUU	1251	UUCAUC	σ A	416
S3	1281	GUUAUUU	1164	UUCAUC	σ B	387
S4	1211	GUUAUUU	1113	UUCAUC	σ NS	370

Az orthoreovírus nemzetségén belül az egyes genomsegmentek mérete változatos. A 47/02-es törzs szegmenseinek mérete a legnagyobb eltérést a μ NS fehérjét kódoló M3 szegmens esetében mutatja, azaz az általunk vizsgált törzs rendelkezik a leghosszabb M1 szegmennel a nemzetség ismert tagjai közül.

A bozótvipera reovírus egyes szegmenseinek fehérjekódoló szekvenciáit egyenként elemeztük filogenetikai és hasonlósági vizsgálatokkal az *Orthoreovirus* nemzetség fajainak reprezentatív képviselőivel összevetve. A 47/02-es RRV törzs nt és as szekvenciái a TRV szekvenciákkal mutattak közelebbi rokonságot, az egyes szegmensek szekvenciáinak páronkénti összevetésekor az azonosság nt szinten maximum 71,6%, as szinten maximum 82,3 %-nak bizonyult (**10. és 11. táblázat**).

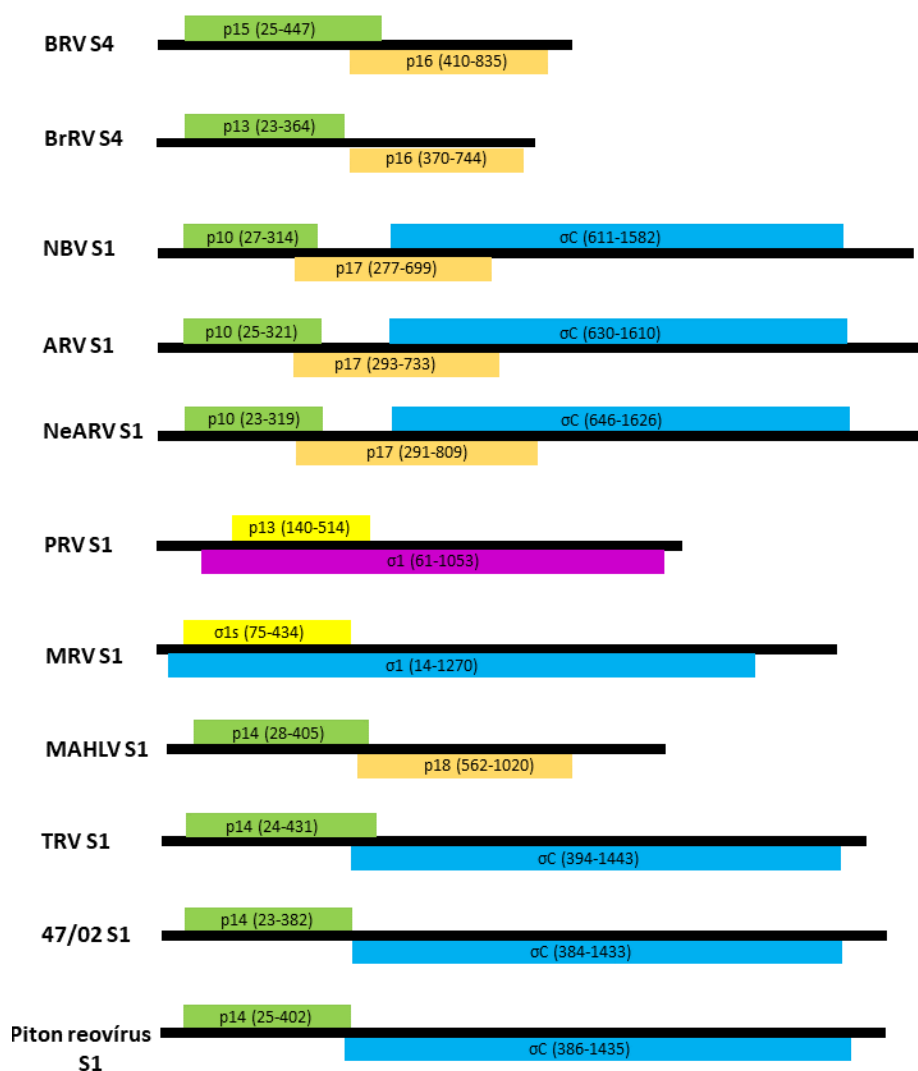
10. táblázat. 47/02 hulló orthoreovírus kódoló szekvenciáinak más orthoreovírus fajok homológ nukleotid szekvenciáival történő összehasonlításának azonossági értékei. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hulló orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.

47/02 ORF	MRV	NeARV	ARV	NBV	MAHLV	TRV	BrRV	BRV	PRV
λA	49,5-49,8%	55,4-54,7%	55,4-55,8%	54,8-55,1%	62,2-62,8%	71,6%	59,8%	58,3%	42,8-43,4%
λB	54,61-54,82%	56,2-56,9%	55,6-55,6%	56,4-56,4%	62,8-63,2%	69%	58,3%	56,3%	49,5-49,6%
λC	42,4-43,8%	40,9-41,7%	39,7-39,8%	41,8-42,0%	50,1-50,3%	60,9%	45,8%	44,1%	37,8-38,8%
μA	49,5-49,8%	55,4-55,7%	55,5-55,8%	54,8-55,1%	62,2-62,8%	71,6%	59,8%	58,3%	42,8-43,4%
μB	49,3-50,2%	54,9-56,1%	54,7-55,5%	54,2%	57,5-57,8%	70,8%	54,7%	51,4%	39,9-40,7%
μNS	35,8-36,2%	40,18-41,0%	38,2-38,9%	39,0-39,3%	44,5-45,01%	53,1%	42,9%	42,0%	32,1-33,1%
σA	40,1-40,5%	47,0-48,2%	45,0-45,4%	45,7-46,9%	53,6%-53,47%	63,2%	44,5%	27,4%	32,6-33,0%
σB	33,3-33,8%	35,4-37,8%	37,8-37,9%	33,2-34,2%	40,1-40,4%	53,3%	40,6%	39,2%	28,1-29,0%
σC	33,8-38,5%	28,9-32,9%	31,9-32,4%	31,2%	-	49,4%	-	-	31,3-31,9%
σNS	38,1-38,5%	43,7-45,1%	45,3-45,4%	42,9-44,2%	54,0-54,8%	61,0%	49,4%	46,3%	31,9-32,9%

11. táblázat. 47/02 hulló orthoreovírus kódoló szekvenciáinak más orthoreovírus fajok homológ aminosav szekvenciáival történő összehasonlításának azonosság értékei. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hulló orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.

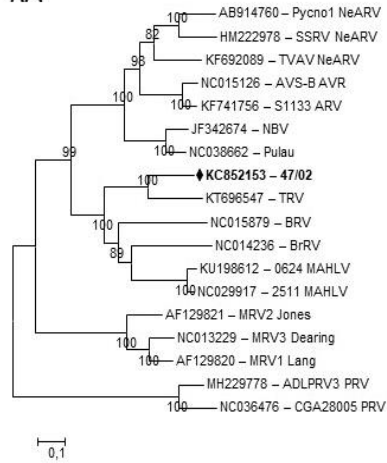
47/02 ORF	MRV	NeARV	ARV	NBV	MAHLV	TRV	BrRV	BRV	PRV
λA	42,5-42,9%	52,6-53,5%	52,8-53,2%	52,2-52,6%	64,1%	82,32%	59,9%	56,2%	30,3%
λB	52,0-52,2%	56,3-56,9%	55,40%	56,7-56,9%	66,4%	81,02%	56,2%	52,8%	43,4-43,6%
λC	32,7-33,5%	29,7-30,5%	27,9-28,1%	30,4-30,7%	43,6-43,7%	62,59%	33,9%	31,6%	23,3-24,0%
μA	27,2-27,9%	38,0-39,8%	36,30%	37,3-37,4%	46,4%	73,35%	41,0%	35,8%	20,1-20,2%
μB	42,3-42,8%	53,6-55,3%	51,9-53,8%	52,8-53,0%	56,3%	81,66%	49,2%	40,4%	26,3-26,7%
μNS	21,5%	24,8-27,8%	23,40%	25,2-25,5%	33,5%	47,05%	29,1%	29,5%	12,8-13,1%
σA	26,9-27,2%	39,6-41,7%	38,3-38,8%	39,8-40,4%	45,7%	69,92%	8,7%	34,3%	15,8-16,1%
σB	13,7-14,7%	20,2-21,2%	24,80%	18,9-19,5%	23,5-24,4%	49,84%	22,45	21,5%	9,8-10,1%
σC	14,92-19,32%	11,2-15,9%	12,5-17,6%	13,2-14,6%	NA	42,71%	NA	NA	10,9-11,9%
σNS	25,6%	33,9-35,8%	34,60%	32,7-33,3%	49,80%	63,86%	43,6%	36,4%	17,1-17,8%

A magas azonossági értékek mellett a teknős orthoreovírussal közeli kapcsolatot mutatják a policisztronos S1 felépítése is, a szegmensen az ORF1 kódolja a FAST fehérjét, míg az ORF2 a σ C-t (**19. ábra**), valamint az egyes szegmensek alapján készült, magas bootstrap értékekkel alátámasztott filogenetikai fák és genomszerveződésük is (**20. ábra**).

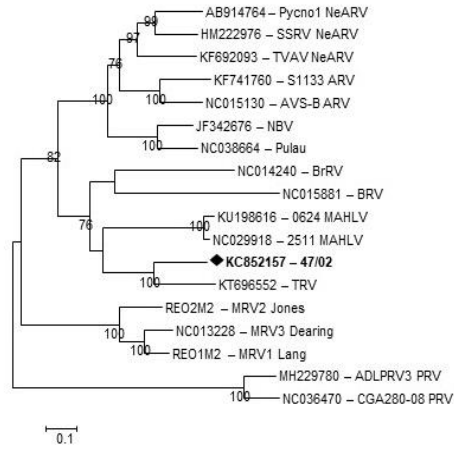


19. ábra. Az orthoreovírusok policisztronos S genomszégmense. A téglalapba írt számok az ORF-ek első és utolsó nukleotidjait jelzik, a homológ fehérjék azonos színnel jelöltek. A téglalapban látható az adott ORF által kódolt fehérje. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σ C. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hüllő orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. A GenBank-i azonosítók a következők: ARV – KF741762, BRV – NC015885, BrRV – NC014245, MAHLV – KU198621, MRV – REOS1A, NBV – AF218360, PRV – MH229785, NeARV – HM222974, TRV – KT696553, Piton reovírus - AY238887.

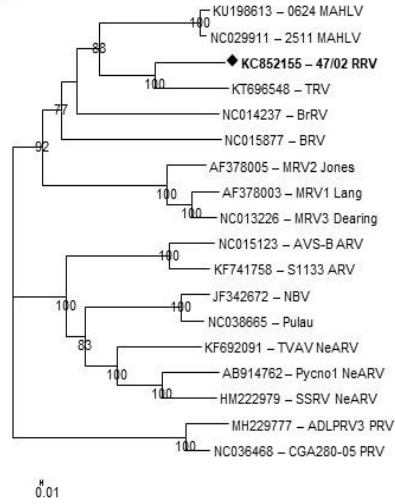
λA



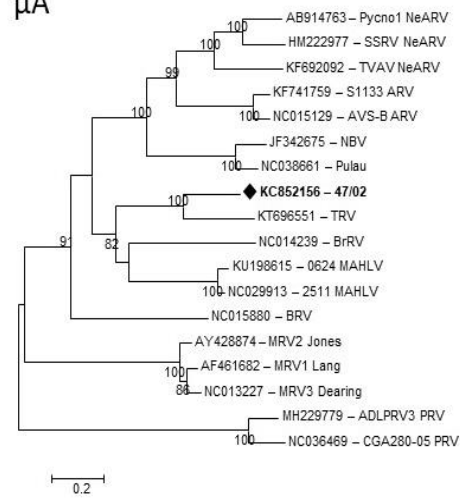
λB



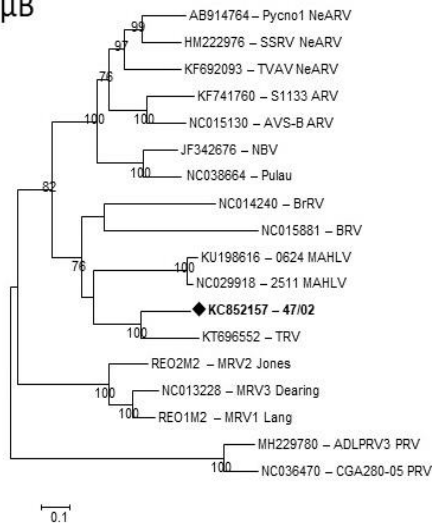
λC



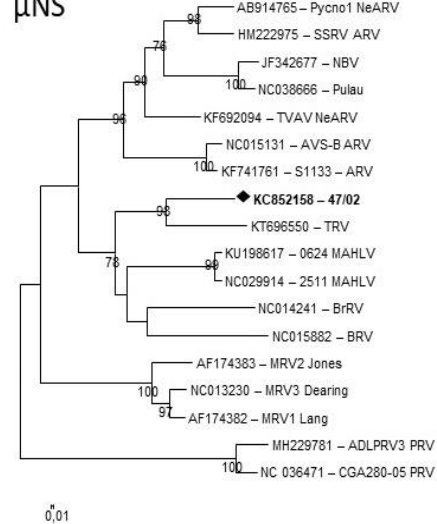
μA

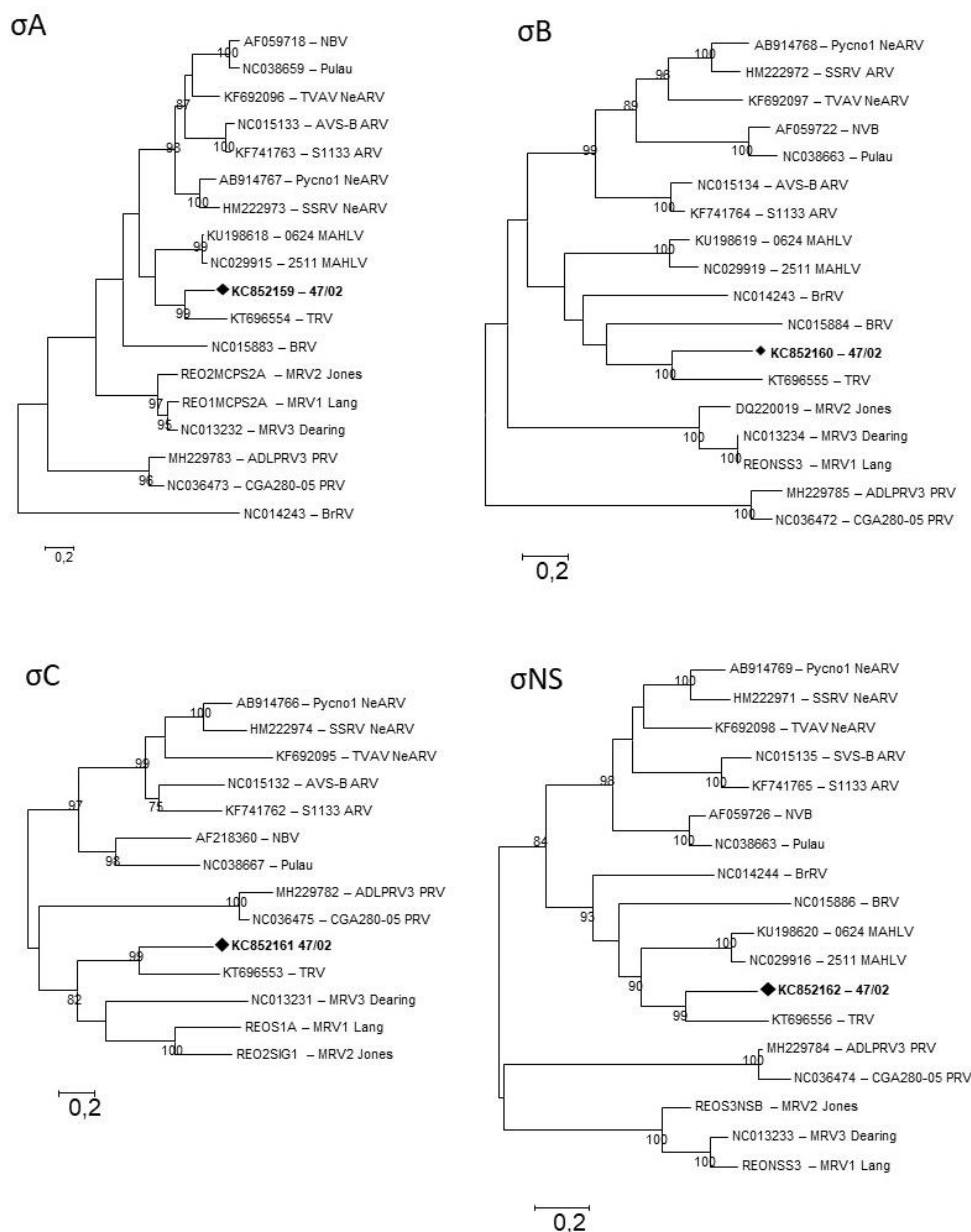


μB



μNS





20. ábra. Az orthoreovírus fajok reprezentatív képviselőinek, a megfelelő genomszégmensek kódoló szekvenciáiból, kodon alapú illesztéssel készített gyöker nélküli törzsfái. A filogenetikai fák maximum-likelihood módszerrel készültek a MEGAX programban az egyes génekre legjobban illeszkedő modell alapján, mely minden gén esetében egyedileg került kiszámolásra. Megbízhatóságukat 500 ismétléssel végeztük bootstrap analízissel. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hüllő orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. A 47/02 bozótvipera reovírus sarkára állított négyzettel jelölt.

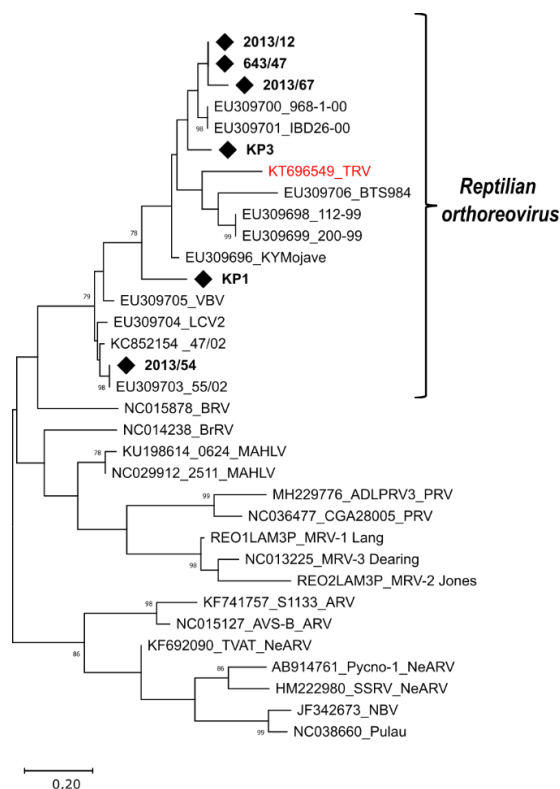
A bozótvipera reovírus szekvenciáját vizsgálatunk során összehasonlítottuk a GenBank-i adatbázisban fellelhető pitonból izolált reovírus szekvenciájával. A σB és σC külső kapszid fehérjeit kódoló szegmenseket vizsgálva mérsékelt azonosságot fedezhettünk fel közöttük. A σC fehérje esetén 61,70% nt és 63,32% as, a σB fehérje esetén 65,20% nt és 70,3 % as azonosság áll fenn. A konzervatívabb, RdRp-t kódoló gén részleges szekvenciáit összehasonlítva magasabb azonossági értékeket láthatunk a GenBank-ban fellelhető hüllő reovírus szekvenciákkal: as szekvencia esetén 75-98 %, míg ezek az értékek nt szekvencia

esetén 65-96%. Ezek az értékek a nemzetségen belül az egy adott fajba való besorolás határértékei felett találhatóak, így megállapíthatjuk, hogy az eddig ismert hulló reovírusok mindegyike az RRV fajba tartozik.

4.2.2 Hulló orthoreovírus fertőzöttség gyakoriságának felmérése

Az orthoreovírusok *RdRp* génjének egy rövid, körülbelül 245 nt hosszúságú szakaszát felerősítő RT-PCR-rel 111 mintából 5 (4,5%) pozitív mintát találtunk, melyek királypityonból (*Python regius*, n=2), zöld leguánból (*Iguana iguana*, n=1), Schneider szkinkből (*Eumeces schneideri*, n=1) és egy azonosítatlan kígyófajból (n=1) származtak.

Munkánk kezdetekor az *Orthoreovirus* nemzetség öt fajt foglalt magába, ezek képviselőinek bevonásával végeztünk hasonlósági és filogenetikai vizsgálatokat. Jelenleg a nemzetség tíz fajból áll, ezek reprezentatív képviselőivel készített filogenetikai törzsfá a **21. ábrán** látható. Az *RdRp* gén részleges szekvenciák alapján készített filogenetikai fa alapján valamennyi általunk kimutatott reovírus törzs (2013/12, 2013/67, 643/47, 2013/KP1, 2013/KP3, 2013/54) az RRV faj tagjának bizonyult. A TRV beékelődik a RRV törzsek közé, noha külön faj képviselője. Ennek oka lehet a vizsgált szakasz rövidsége és a TRV és RRV közeli kapcsolata.



21. ábra. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének 245 bp hosszúságú szakasza alapján készített törzsfá rekonstrukció. A törzsfá maximum likelihood módszerrel készült MEGA6 programmal (500 bootstrap értékkel, modell: K2+G+I) az alábbi, GenBank-ban található RRV törzsekkel: EU30969 – Mojave csörgőkígyó (*Crotalus scutulatus*); KC852154 és EU309705 – bozótvipera (*Atheris squamigera*), EU309703–szőnyegpityon (*Morelia spilota*); EU309704 – virágos/sávofarkú sikló (*Elaphe guttata*); EU 309706 – barna mangróvesikló (Boige irregularis); EU309698, EU30699, EU309700; EU309701 – vörösfarkú boa (*Boa constrictor*) Az általunk izolált törzsek fekete négyzettel jelöltek: 2013/67, 2013/KP1, 2013/KP3 – Királypityon (*Python regius*); 2013/12 – Schneider szkink (*Eumeces schneideri*); 643/37 – azonosítatlan kígyófaj; 2013/54 – Zöld leguán (*Iguana iguana*) és az *Orthoreovirus* nemzetség további kilenc fájának reprezentatív képviselőivel. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hulló orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus (pirossal), BrRV – Broome orthoreovírus.

Az általunk vizsgált RRV törzsek és az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek nt és as azonossági értékeit a **12. és 13. táblázat** foglalja össze. Nukleotid szinten a bozótvipera reovírussal >78%, TRV-vel összehasonlítva >68% azonossági értékeket kaptunk, míg BRV, BrRV, PRV, NeARV, MAHLV és NBV vírusokkal mérsékelt hasonlóságot láthatunk. A TRV-vel összevetve az új RRV törzsek >85%, bozótvipera reovírussal >86% as azonossági értékeket láthatunk, MAHLV esetén ismét csak mérsékelt, 66-68% az azonosság.

12. táblázat. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének körülbelül 245 bp hosszúságú szakasza alapján számított nukleotid azonossági értékei a vizsgált hulló orthoreovírus törzsekkel. Zöld színnel jelölve az egyazon fajba sorolás határértéke feletti, sárgával a szürke zónába eső értékeket láthatjuk, fehér háttérrel a külön fajba sorolás határértékei alatti értékei szerepelnek. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: KC963265 – 47/02, KT696549 – TRV, NC015878 – BRV, NC014238 – BrRV, KU198614 – 0624 MAHLV, NC029912 – 2511 MAHLV, NC013225 – MRV3 Dearing, REO1LAM3P – MRV1 Lang, REO2LAM3P – MRV2 Jones, MH229776 – ADLPRV3 PRV, NC036477 – CGA280-05 PRV, AB914761 – Pycno1 NeARV, HM222980 – SSRV NeARV, KF692090 – TVAT NeARV, KF741757 – S1133 ARV, NC015127 – AVS-B ARV, JF342673 – NBV, NC038660 – Pulau. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hulló orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus.

Vizsgált orthoreovírus törzsek	2013/KP3	2013/12	643/47	2013/67	2013/KP1	2013/54
47/02 RRV	78%	78%	78%	78%	79%	96%
TRV	78%	77%	77%	73%	68%	71%
BRV	60%	66%	66%	62%	58%	70%
BrRV	63%	61%	61%	61%	56%	66%
0624 MAHLV	64%	63%	63%	62%	60%	65%
2511 MAHLV	62%	62%	62%	61%	60%	66%
MRV3 Dearing	57%	56%	56%	60%	58%	58%
MRV1 Lang	56%	54%	54%	54%	56%	64%
MRV2 Jones	59%	55%	55%	56%	56%	55%
ADLPRV3 PRV	56%	60%	60%	58%	56%	60%
CGA280-05 PRV	60%	56%	56%	55%	53%	57%
Pycno1 NeARV	57%	56%	56%	57%	56%	60%
SSRV NeARV	58%	56%	56%	60%	59%	59%
TVAV NeARV	60%	63%	63%	60%	60%	63%
S1133 ARV	53%	56%	56%	57%	52%	57%
AVS-B ARV	52%	55%	55%	54%	54%	58%
NBV	59%	56%	56%	56%	57%	57%
Pulau NBV	60%	60%	60%	56%	58%	59%

13. táblázat. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének kb. 245 bp hosszúságú szakasza alapján számított aminosav azonossági értékei a vizsgált hulló orthoreovírus törzsekkel. Zöld színnel jelölve az egyazon fajba sorolás határértéke feletti értékeket láthatjuk, fehér háttérrel a külön fajba sorolás határértéke alatti értékek szerepelnek. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: KC963265 – 47/02, KT696549 – TRV, NC015878 – BRV, NC014238 – BrRV, KU198614 – 0624 MAHLV, NC029912 – 2511 MAHLV, NC013225 – MRV3 Dearing, REO1LAM3P – MRV1 Lang, REO2LAM3P – MRV2 Jones, MH229776 – ADLPRV3 PRV, NC036477 – CGA280-05 PRV, AB914761 – Pycno1 NeARV, HM222980 – SSRV NeARV, KF692090 – TVAT NeARV, KF741757 – S1133 ARV, NC015127 – AVS-B ARV, JF342673 – NBV, NC038660 – Pulau. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hulló orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus.

Vizsgált orthoreovírus törzsek	2013/KP 3	2013/12	643/47	2013/67	2013/KP 1	2013/54
47/02 RRV	93%	93%	93%	90%	86%	100%
TRV	90%	90%	90%	88%	85%	85%
BRV	59%	59%	59%	56%	54%	59%
BrRV	61%	61%	61%	63%	63%	61%
0624 MAHLV	66%	66%	66%	68%	68%	68%
2511 MAHLV	66%	66%	66%	68%	68%	68%
MRV3 Dearing	56%	56%	56%	59%	56%	59%
MRV1 Lang	56%	56%	56%	59%	56%	59%
MRV2 Jones	51%	51%	51%	54%	54%	54%
ADLPRV3 PRV	44%	44%	44%	46%	46%	44%
CGA280-05 PRV	44%	44%	44%	46%	46%	44%
Pycno1 NeARV	49%	49%	49%	51%	51%	49%
SSRV NeARV	49%	49%	49%	51%	51%	49%
TVAV NeARV	51%	51%	51%	54%	54%	56%
S1133 ARV	46%	46%	46%	49%	49%	51%
AVS-B ARV	46%	46%	46%	49%	49%	51%
NBV	46%	46%	46%	49%	49%	51%
Pulau NBV	46%	46%	46%	49%	49%	51%

A vizsgált RRV törzsek részleges nt és as szekvenciái a GenBank-ban fellelhető RRV törzsek homológ szekvenciáihoz viszonyítva nagyfokú hasonlóságot mutatnak: a páronkénti szekvenciák összehasonlításakor nt szinten ez 71-100% (**14. táblázat**), as szinten 88-100% (**15. táblázat**). As szinten ezek az értékek beleesnek az egyazon fajba sorolás határértékébe (core fehérjéknél >85%), míg nt szinten nem mindegyik törzs azonossági értéke éri el a 75%-nál nagyobb értéket. Két törzs külön fajba sorolandó, ha nt azonossági értékeik 60%-nál alacsonyabbak, így e törzsek esetében az azonossági értékek alapján nem egyértelműen dönthető el, hogy a két vírus egy fajba sorolható-e (60-75% azonosság).

14. táblázat. A GenBank adatbázisában található hulló reovírus törzsek és vizsgált törzsek nukleotid azonossági értékei az RNS-függő RNS polimeráz gén kb. 245 bázis hosszúságú szakaszán. Sárga színnel a 75% alatti nukleotid azonossági értékeket emeltük ki, az általunk izolált törzsek félkövérrel láthatóak. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: EU309700 – 968-1-00, EU309701 – IBD26-00, EU309698 – 112-99, EU309699 – 200-99, EU309696 – KY Mojave, EU309703 – 55-02, EU309704 – LCV2, KC852154 – 47/02, EU309705 – VBV, EU309706 – BTS984.

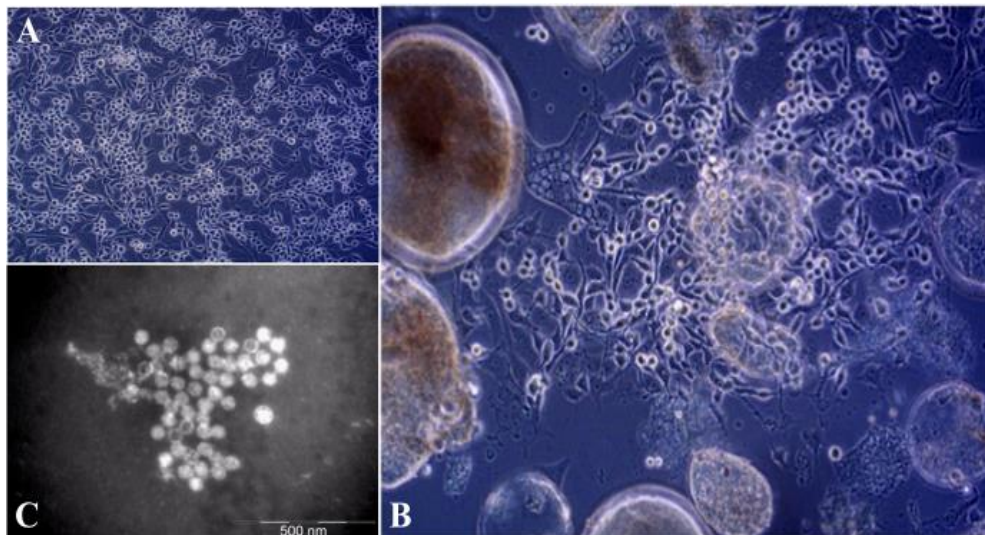
Vizsgált hulló reovírus törzsek	643/47	2013/12	2013/KP3	2013/67	2013/KP1	2013/54
968-1-00	94%	94%	88%	89%	76%	77%
IBD26-00	94%	94%	88%	89%	76%	77%
112-99	81%	81%	80%	78%	75%	73%
200-99	81%	81%	80%	78%	75%	73%
643/47		100%	89%	94%	79%	76%
2013/12	81%		89%	94%	79%	76%
KP3	80%	89%		88%	79%	76%
KYMojave	83%	90%	90%	86%	79%	78%
2013/67	78%	94%	94%		83%	75%
KP1	75%	79%	79%	83%		77%
55-02	73%	76%	76%	75%	75%	100%
LCV2	74%	79%	79%	77%	77%	94%
2013/54	73%	76%	76%	75%	75%	
47/02	71%	78%	78%	78%	78%	95%
VBV	77%	78%	78%	75%	75%	91%
BTS984	81%	78%	78%	78%	78%	73%

15. táblázat. A GenBank adatbázisában található hulló reovírus törzsek és vizsgált törzsek aminosav azonossági értékei az RNS-függő RNS polimeráz gén kb. 245 bázis hosszúságú szakaszán. Az általunk izolált törzsek félkövérrel láthatóak. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: EU309700 – 968-1-00, EU309701 – IBD26-00, EU309698 – 112-99, EU309699 – 200-99, EU309696 – KYMojave, EU309703 – 55-02, EU309704 – LCV2, KC852154 – 47/02, EU309705 – VBV, EU309706 – BTS984.

Vizsgált hulló reovírus törzsek	643/47	2013/12	2013/KP3	2013/67	2013/KP1	2013/54
968-1-00	98%	98%	98%	95%	93%	95%
IBD26-00	98%	98%	98%	95%	93%	95%
112-99	98%	98%	100%	98%	95%	93%
200-99	100%	100%	100%	98%	95%	93%
643/47		100%	100%	98%	95%	93%
2013/12	100%		100%	98%	95%	93%
KP3	100%	100%		98%	95%	93%
KYMojave	100%	98%	100%	98%	95%	93%
2013/67	98%	95%	98%		98%	90%
KP1	95%	93%	95%	98%		88%
55-02	93%	90%	93%	90%	88%	100%
LCV2	90%	93%	90%	88%	85%	98%
2013/54	93%	93%	93%	90%	88%	
47/02	93%	93%	93%	90%	88%	100%
VBV	93%	90%	93%	90%	88%	100%
BTS984	90%	90%	90%	88%	85%	90%

4.2.3 Hüllő orthoreovírusok izolálása

Az RT-PCR eredményei alapján pozitívnak bizonyult mintákból és a 2013/KP3-as mintából az alkalmazott sejtvonalakon minden esetben óriássejtképző hatással rendelkező vírusokat sikerült izolálni (22. ábra, 16. táblázat).



22. ábra. (A) VH 2 sejtek, vírussal nem fertőzött kontroll, (B) 2013/KP1 vírustörzssel fertőzött, VH 2 sejtek, a vírusfertőzés hatására kialakult óriássejtek, (C) 2013/KP1 orthoreovírus törzs transzmissziós elektronmikroszkópos képe, készítette: Pop Renáta (ÁTE, Patológiai Tanszék).

16. táblázat. Az általunk izolált hüllő orthoreovírus izolátumok

Sejtvonal	Törzs neve	Minta eredete
IgH-2	2013/54	Zöld leguán (<i>Iguana iguana</i>)
IgH-2	2013/12	Schneider szkink (<i>Eumeces schneideri</i>)
VH 2	2013/KP1	Királypiton (<i>Python regius</i>)
VH 2	2013/KP3	Királypiton (<i>Python regius</i>)
VH 2	2013/67	Királypiton (<i>Python regius</i>)
VH 2	643/47	Azonosítatlan kígyófaj

VH 2 sejtvonalon a négy kígyó mintából (2013/KP1, 2013/KP3, 643/47, 2013/67), IgH-2 sejtvonal esetében két gyík mintából (2013/12, 2013/54) származó törzs volt szaporítható. A 2013/KP1 számú törzs elektronmikroszkópos vizsgálatát is elvégeztük és a detektált vírusrészecskék az orthoreovírusokra jellemző morfológiai sajátosságokkal rendelkeztek, azaz jól látható az ikozaédes kapszid (Attoui et al., 2011).

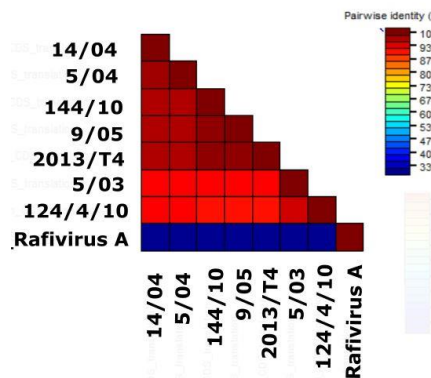
4.3 Teknős picornavírusok vizsgálata

4.3.1 Teknős eredetű picornavírusok teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése

NGS és Sanger szekvenálás segítségével hét, különböző teknős fajból származó picornavírus közel teljes, 7065-7079 nt hosszú genomszekvenciáját határoztunk meg az 5' UTR régió kivételével. A szoftveresen becsült ORF-ek mérete 6651-6657 nt; az 5/03 törzs 2216 as, míg a többi törzs 2218 as hosszú poliproteint kódolt. A 3' UTR régiók teljes genomszekvenciáját meghatároztuk, ezek hossza 235-248 nt, míg az 5' végek esetében részleges szekvenciaadatokat sikerült megismernünk. BLAST analízis alapján az általunk vizsgált ToPV törzsek a legközelebbi rokonságot saját magukkal mutatták a GenBank adatbázisában fellelhető PV szekvenciákkal összevetve.

A *Picornaviridae* család reprezentatív képviselőivel összevetve az általunk meghatározott ToPV törzsek genomszekvenciáit nagyon vegyes értékeket kaptunk. A legmagasabb nt azonossági értékeket a *Mosavirus* genusba sorolt *Mosavirus A*-val mutatta (JF973687, 61,5-63,1%). A poliprotein szekvenciáit összehasonlítva a legmagasabb azonossági értékeket nt szinten a *Mischivirus* nemzetségbe tartozó *Mischivirus D* faj Canine picornavirus/A128thr törzsével (KY512802, 68,1-71,7%) mutatta, as szinten ezt az értéket a *Mosavirus* nemzetségbe tartozó *Mosavirus A* faj Mouse/M-7/USA/2010 törzsével (JF973687, 51,2-52,2%) láthattuk. A legalacsonyabbat a *Fipivirus* nemzetség *Fipivirus C* fajának Wenling crossorhombus picornavírus törzsével kaptuk (MG600095, 23,1-23,8%). A *Rafivirus* nemzetségen belüli a szintén teknős eredetű *Rafivirus A* fajba sorolt UF4-es törzs (KJ415177) genomszekvenciáját összehasonlítva mérsékelt azonossági értékeket kaptunk (49,0-50,2%). A poliprotein as szekvenciája mindössze 30,3-31,1%, a nt szekvencia pedig 44,7-45,7% azonosságot mutatott az általunk meghatározott ToPV törzsekkel összevetve. BLAST analízissel nem találtunk hasonlóságot ToPV törzseink leader peptidjét vizsgálva egyik PV törzs homológ szekvenciájával sem.

A meghatározott hét ToPV törzs poliprotein szekvenciáinak egymással történő összehasonlítása során magas nt (81,2-99,0%) és as (90,1-97,6%) azonossági értékeket kaptunk (**23. ábra**). Szintén magas értékeket láthatunk a közel teljes genomok nt szekvenciáit összevetve (80,6-98,9%). Érdekes, hogy a 144/10 és 5/04 törzs, mely azonos gazdafajból, mór teknősből (*Testudo graeca*) származott, csupán 89% nt azonossági értékkel rendelkezett a meghatározott genomra nézve, míg a 144/10 számú és sarkantyús teknős (*Geochelone sulcata*) eredetű 9/05 számú törzsek szekvenciája közel azonosnak bizonyult (98,8% nt azonosság).



23. ábra. Páronkénti szekvencia összehasonlításra alapuló ábra, mely teknős eredetű picornavírusok poliproteinjének aminosavszekvenciája alapján készült SDT1.2 programmal, az alábbi szekvenciák felhasználásával: rafivirus A1 – KJ415177, 5/03 – KM873617, 5/04 – KM873612, 9/05 – KM873613, 14/04 – NC025890, 124/4/10 – KM873616, 144/10 – KM873614, 2013/T4 – KM873615.

Az általunk meghatározott ToPV törzsek nt szekvenciáinak összehasonlítása vegyes azonossági eredményeket adott a 3' UTR régióban (71,9-98,7%), míg az egyes genomi régiókat összevetve mind nt, mind as szinten magas azonossági értékeket kaptunk (P1 nt 81,3-99,0%, as 92,5-99,1%; P2 nt 78,6-98,7%, as 88,1-98,9%; P3 nt 81,3-99,0, as 91,3-99,2%; 2C nt 81,4-99,7%, as 92,8-100%; 3C nt 82,3-98,9%, aa 92,5-93,5%; 3D nt 80,0-98,6%, as 87,3-99,4%).

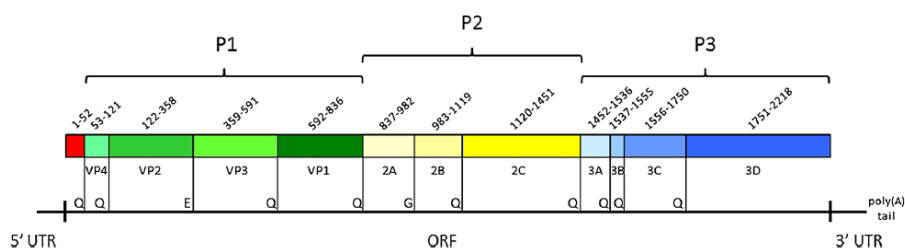
Minden vizsgált ToPV törzsünk kódoló régiói alacsony G+C tartalommal rendelkeznek: 35,8-36,8% (**17. táblázat**). A kapszid fehérjét kódoló régió, a P1 esetében magasabb G+C tartalmat tapasztaltunk (39,3%), mint a nem-struktúr fehérjét kódoló régióknál: P2 (36,1%) és P3 (36,2%). A 3' UTR szekvencia adenin tartalma nagyon magasnak bizonyult (84%).

Mivel egy új nemzetség első tagjait írtuk le, az általunk vizsgált 14/04 számú ToPV törzsünk szekvenciáját jelöltük ki referenciaként. Az egyéb PV szekvenciák segítségével jósolt ToPV fehérjék általános jellemzőit a **17. táblázat** mutatja.

17. táblázat. A 14/04-es teknős picornavírus törzs fehérjéinek általános jellemzése

Fehérje	Pozíció (as)	Hossz (as)	Hasítási hely	GC tartalom (%)	Legmagasabb as hasonlósági érték (BlastP használatával)
Leader peptid	1-52	52	EYQIQ/GQGQ (3C ^{pro})	34,0	Csak a saját teknős PV törzsekkel mutat hasonlóságot
1A/VP4	53-121	69	APLLL/DQDT (autokatalitikus hely)	42,3	Encephalomyocarditis virus, 41 %, P03304
1B/VP2	124-358	237	HLKEE/GIPT(3C ^{pro})	38,6	Mouse mosavirus, 51 %, AEM05833
1C/VP3	359-591	233	PMRSQ/GTEV (3C ^{pro})	40,5	Mouse mosavirus A2, 48 %, YP_009026384
1D/VP1	592-836	245	EIVFQ/GPID (3C ^{pro})	35,8	Mouse mosavirus A2, 32 %, YP_009026384
2A	837-982	145	DVEQNPG/P (riboszóma csúszás hely)	38,2	Csak a saját teknős PV törzsekkel mutat hasonlóságot
2B	983-1119	138	EIEQQ/GVLR (3C ^{pro})	33,1	Theiler's encephalomyelitis virus, 20 %, ACG55802
2C	1120-1451	332	GLVEQ/GVLD (3C ^{pro})	36,9	Human cosavirus A, 38.3 %, YP_002956103
3A	1452-1536	85	VKQGQ/GPYD (3C ^{pro})	36,9	Csak a saját teknős PV törzsekkel mutat hasonlóságot
3B	1537-1555	19	EILAQ/APDL (3C ^{pro})	36,8	Csak a saját teknős PV törzsekkel mutat hasonlóságot
3C	1556-1750	195	KIEEQ/GLKV (3C ^{pro})	36,2	Human cosavirus D, 28.5 %, YP002956128
3D	1751-2218	468		34,9	Mouse mosavirus, A2 45.6 %

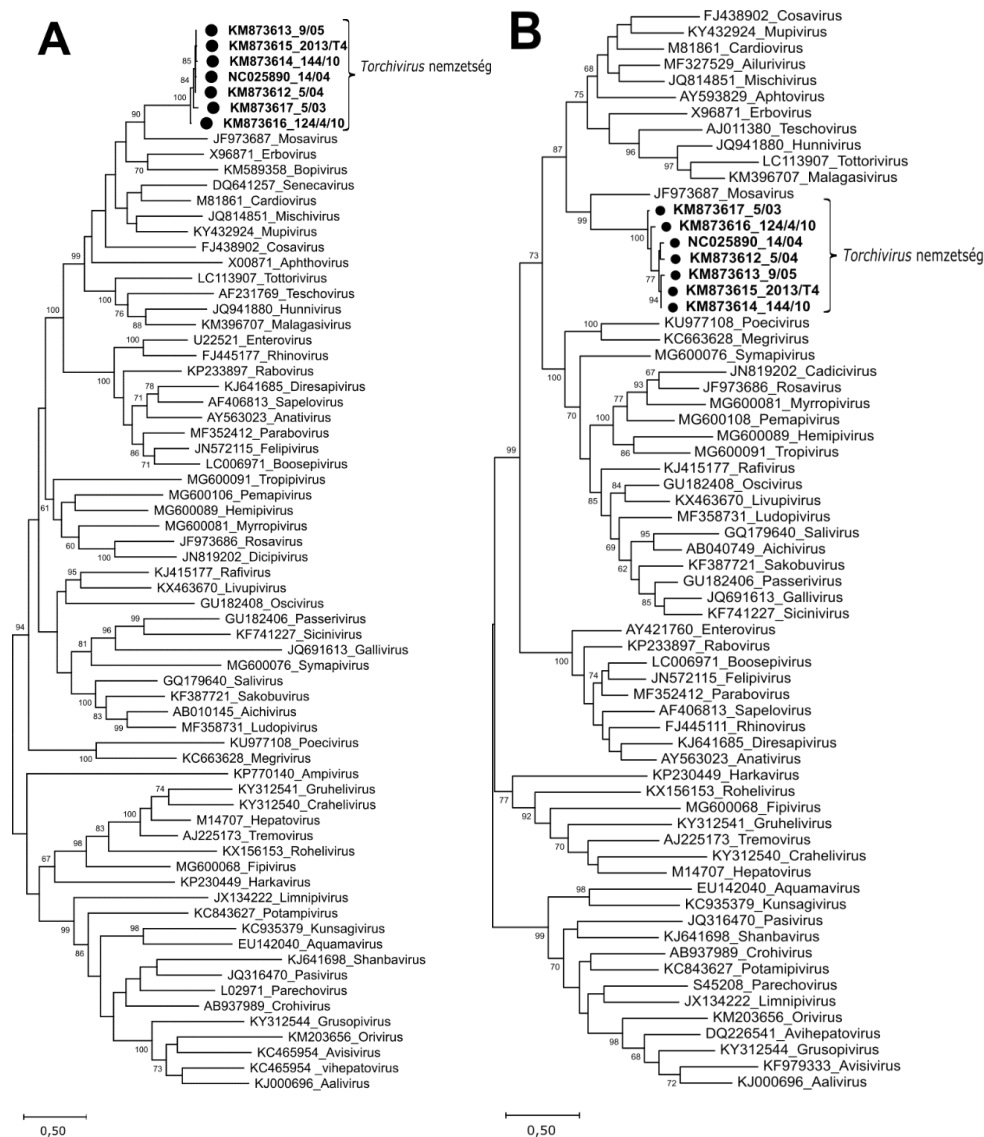
A teknős PV törzsek jósolt proteáz hasítási helyei alapján a genom szerveződése az alábbiak szerint alakul: VPg+5'UTR[L/1A-1B-1C-1D-2A^{np}/2B-2C/3A-3B^{VPg}-3C^{pro}-3D^{pol}]3'UTR-poly(A) (**24. ábra**).



24. ábra. A 14/04-es teknős picornavírus törzs sematikus genomszerveződése.

Mind a hét általunk meghatározott ToPV genomban megtalálható a leader peptid a poliprotein N-terminális részén. Összevetve a PV-k leader peptidjeinek as szekvenciáit, konzervált Cys és His aminosavak jellemzik, melyekről feltételezzük, hogy papain-szerű proteázok katalitikus aktív helyének tagjai, azonban ezekre jellemző GXCG motívumot nem tudtunk azonosítani (Gorbalenya et al., 1989; Gorbalenya et al., 1991). A többi PV-hoz hasonlóan a 14/04-es törzs 2C^{hel} fehérjében is megtalálható a G₁₂₅₀KPGCGKS (GXXGXXGKS) NTP-kötő hely és a helikáz aktivitáshoz szükséges D₁₂₉₉DLGQ (DDLXQ) motívum (Gorbalenya et al., 1990; Lau et al., 2012). A 3C^{pro} G₁₇₀₆YCG (GXCG) motívummal rendelkezik, mely a proteáz aktív helyének katalitikus tridáját (His-Asp-Cys) alkotja, de nem azonosítottunk K[F/Y]RDI RNS-kötő motívumot (Hämmerle et al., 1992; Gorbalenya et al., 1989; Sauvage et al., 2012). A PV-k 3D^{pol}-ra jellemző konzervált motívumokat is megtaláltuk a 14/04-es ToPV törzs as szekvenciájában: Y₂₀₈₂GDD, K₁₉₁₁DEL_R (KDE[L/I]R), G₂₀₄₀GLPSG (GG[L/M/N]PSG) és F₂₁₃₁LKR (Koonin et al., 1991; Sauvage et al., 2012). A VPg-t 19 as alkotja a referencia törzsünk esetében, a replikációt megelőzően az N-terminális harmadik pozíciójában található konzervált Tyr as-hoz kovalensen kötődik két uridin nukleotid (Zell et al., 2017). A VP4 kapszid fehérje as szekvenciájának G₅₃-QGQS (GXXX_{T/S}) konzervált mirisztilációs helyet sikerült azonosítanunk a C-terminálison (Chow et al., 1987).

Az általunk vizsgált teknős eredetű PV törzsek filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatához a 3D^{pol} és a P1-es genomi régiók szekvenciáival as alapú maximum likelihood filogenetikai törzsfákat készítettünk a *Picornaviridae* család reprezentatív képviselőivel összevetve (**25. ábra**).



25. ábra. A *Picornaviridae* család nemzetségeinek reprezentatív képviselőivel készített maximum likelihood filogenetikai törzsfák P1 (A) és 3D^{pol} (B) aminosav szekvencia alapján A törzsfák MEGAX programban, LG+G+I+F (A) és LG+G+I (B) szubsztitúciós modellel, 1000-es bootstrap értékkel készült. Az általunk izolált teknős eredetű picornavírus-törzseket kör jelzi.

ToPV törzseink a vizsgált filogenetikai törzsfákon különálló ágat alkotnak és a *Rafivirus* A nemzetségbe sorolt RaV-A1-től távol helyezkedtek el. A különböző régiók alapján készült filogenetikai törzsfák topológiája különböző. A 3D^{pol} és P1 alapú törzsfán törzseink legszorosabb kapcsolatot Mosavirus A-val mutatták.

Összehasonlítottuk teknős PV törzseink P1, 2C, 3C és 3D régióinak szekvenciáját egymással is. A P1 szakaszon 1-9,5%, a 2C régióban 0,3-9,6%, 3C esetében, 0,3-16,4%, míg 3D régiónál 0,9-20,0% különbséget kaptunk. Ezek az értékek igen csekélyek ahhoz, hogy két vírust külön nemzetségbe soroljuk.

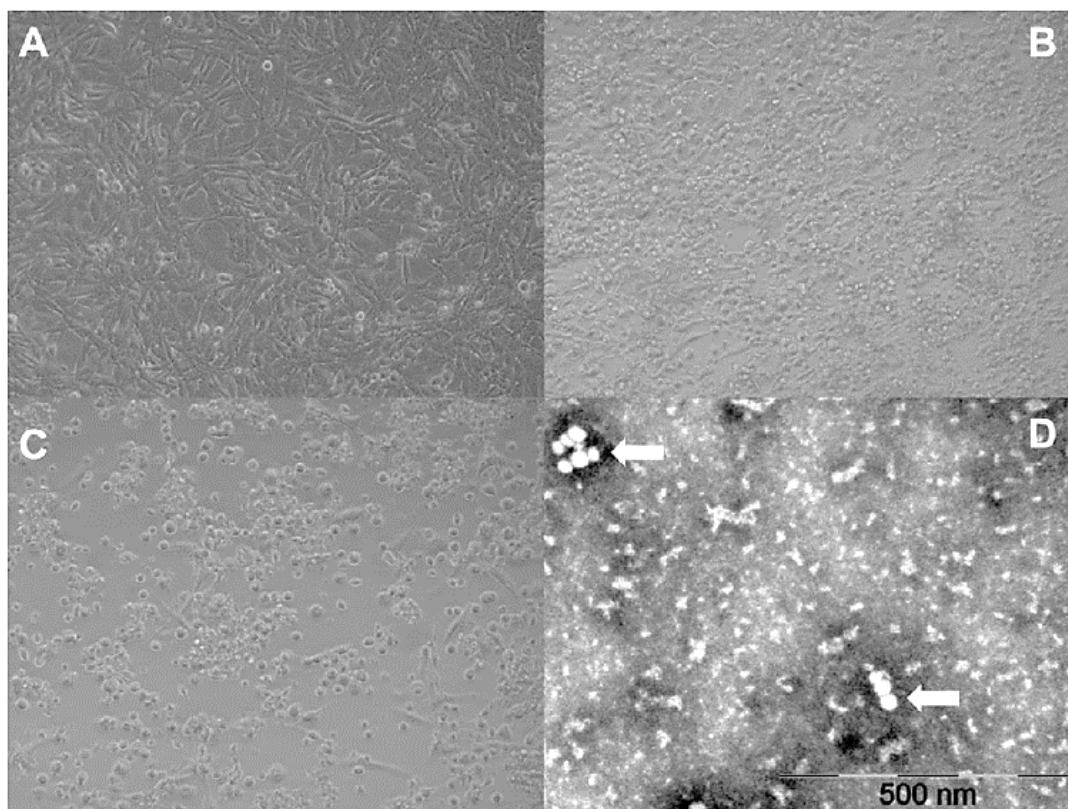
A fent ismertetett azonossági értékek és törzsfák topológiája alapján ToPV törzseink a *Rafivirus* nemzetség tagjaitól távol állnak, a *Picornaviridae* családon belül különálló egységet képeznek.

4.3.2 Teknős picornavírusok izolálása

25 ToPV törzset szaporítottunk (**6. táblázat**) élő állatok tampon- és elhullott egyedek szövetmintáiból, egészséges egyedekből csakúgy, mint tüneteket mutató teknősökből. Ebből a

2013/T4-es törzset izoláltunk Magyarországon. A TH-1 sejtenyészetek picornavírusokra jellemző citopatogén hatást mutatták, elvesztették nyúlványos alakjukat, lekerekedtek (**26. ábra**).

A 14/04 számú törzset elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk és kicsi, ~30 nm-es virális részecskét detektáltunk (**26. ábra**)



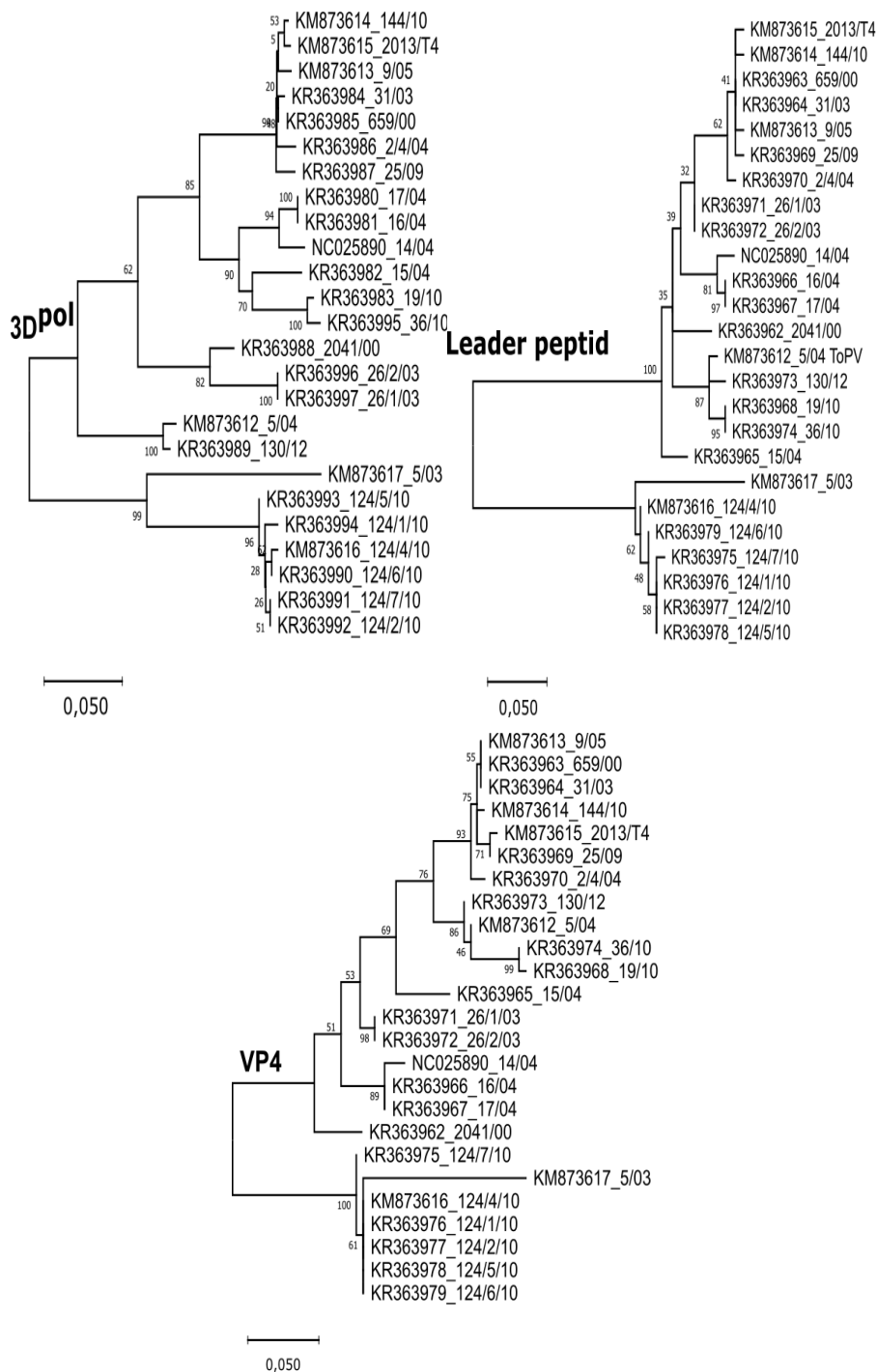
26. ábra. Vírusmentes kontroll TH-1 sejtek (A). Fertőzést követő negyedik (B) és hetedik (C) napon látható citopatogén hatás. (D) 14/04-es teknős picornavírus törzs izolátumából készült elektronmikroszkópos felvétel. Az elektronmikroszkópos képet az Állatorvostudományi Egyetem Patológia Tanszékén készítette Pop Renáta. A nyilak jelzik a ~30 nm átmérőjű részecskét.

4.3.3 Diagnosztikai RT-PCR rendszer fejlesztése teknős picornavírusok specifikus kimutatásához

Az újonnan fejlesztett diagnosztikai RT-PCR rendszer tesztelésére 25 vírusizolátumot használtunk fel (**6. táblázat**). A ToPV örökítőanyag kimutatását – a hét általunk meghatározott, közel teljes teknős PV törzsünk genomszekvenciái alapján – tervezett primer szettek közül kettő bizonyult jól alkalmazhatónak teknős eredetű PV törzseink specifikus kimutatására: a Leader peptid és VP4 régiókra tervezett Pic-gen-FOR-1 és Pic-gen-REV-1, valamint a 3D^{pol} régióra tervezett Pic-gen-FOR-2 és Pic-gen-REV-2. Minden izolátumból PV örökítőanyagot tudtunk kimutatni az általunk tervezett primer szetteket alkalmazó RT-PCR rendszerrel. A PCR termékek nt sorrendjét meghatároztuk, ellenőrizve a PCR sikerességét, a termékek szekvenciái KR363962-KR363997 azonosító alatt találhatóak meg a GenBank adatbázisában.

A szekvenciákat felhasználva filogenetikai törzsfákat készítettünk a leader peptid, a VP4 fehérjét kódoló teljes régió és a 3D^{pol} részleges nt szekvenciák alapján (**27. ábra**). E törzsek nt és as szekvencia azonossági értékei nagyon magasnak bizonyultak mindhárom gén esetében egymással összehasonlítva (leader peptid nt: 67,3-100%, as: 67,9-100%; VP4 nt: 72,9-100%, as: 94,2-100%; részleges 3D nt: 77,5-100%, as: 86,9-100%), míg RaV-A1-el mérsékelt

azonossági értékeket kaptunk (VP4 nt: 39,8-44,4%, as: 22,8-26,3%; leader peptid nt: 23,1-27,1%, as: 9,3-12,0%; 3D nt: 49,4-52,7%, as: 39,1-41,4%).



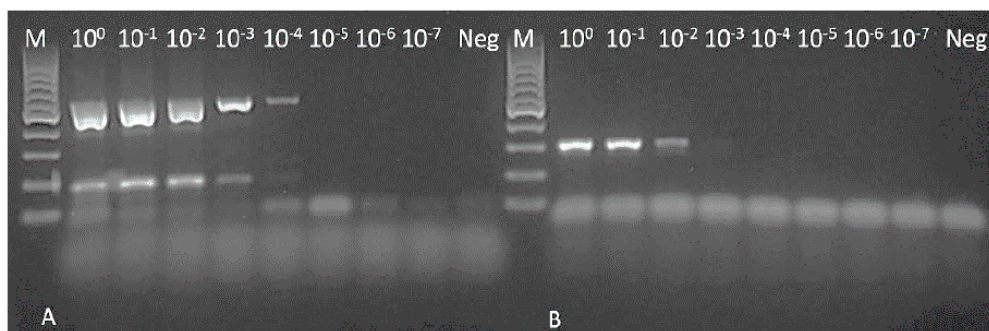
27. ábra. A 3D^{pol} részleges, a leader peptid és VP4 teljes nukleotid szekvenciája alapján készített filogenetikai törzsfák teknős picornavirus törzseink esetén. A filogenetikai törzsfá maximum-likelihood módszerrel készült MEGAX programmal és az általa számított legmegfelelőbb modellt alkalmazva (3D^{pol} – T92+I, leader peptid – TN93+I, VP4 -GTR+G) 1000 bootstrap ismétléssel.

A filogenetikai törzsfák topológiáját vizsgálva hasonló struktúrát láthatunk mindhárom fa esetében, két fő leszármazási vonal különül el. Az egyik vonalat az 5/03 és 124/1-2-4-5-6-7/10 törzsek alkotják, melyek Németországból származnak az 5/03 kivételével, mely ismeretlen eredetű. A 124/2-4-5-6-7/10-es törzsek közel azonosak, a 124/1/10-es pedig alig különbözik tőlük. A másik leszármazási vonalba a többi törzs tartozik. Itt is találunk közel azonos szekvenciával rendelkező törzseket a három vizsgált szakaszon, mint a 17/04 és 16/04,

31/03 és 659/00, 144/10 és 2013/T4, 5/04 és 130/12 vagy a 26/2/03 és 26/1/03. Ezen közel azonos törzsek közül nem mindegyik származik ugyanazon országból. Az 5/04 németországi, a 130/12, a 144/10-es olaszországi, a 2013/T4 pedig magyarországi törzs.

A primerpárok specificitásának tesztelését hulló eredetű orthoreo- (CH 1197/96), adeno- (IBD 27/00), irido- (100/01), rana- (CH8), herpesz- (4295) és paramyxovírus (9/5/03) törzsekből izolált DNS-en vagy RNS-en végeztük el. Egyik primer pár esetében sem kaptunk specifikus PCR terméket a fent ismertetett protokollt alkalmazva.

Az tervezett diagnosztikai RT-PCR rendszer érzékenységének tesztelésére vírusizolátumból készített hígítási sorokat alkalmaztunk. Az 5/03-as törzs titere $2.81E+04$ TCID₅₀/mL, a 14/04-es törzs titere $5.00E+05$ TCID₅₀/mL volt. Az 5/03-as törzs esetén kaptuk a legjobb eredményt, itt ugyanis a Pic-gen-FOR1 és REV1-es primereket alkalmazva 10^{-4} , a Pic-gen FOR2 és REV2 szettet alkalmazva 10^{-3} hígítási fokig kimutatható volt picornavírus örökítőanyag vírusizolátumból (**28. ábra**).



28. ábra. RT-PCR termékek gélelektroforetikus képe 5/03-es picornavírus törzs izolátumának hígítása esetén, a Pic-gen-FOR1 és REV1 (A), valamint a Pic-gen FOR2 és REV2 primer szettet (B) alkalmazva. Neg: negatív kontroll.

5. Megbeszélés

5.1 Kígyó arénavírusok vizsgálata

Tanulmányunk egyik célja egy ismeretlen okból elhullott vörösfarkú boa virológiai vizsgálata volt. Az állat belső szerveinek nagy részében arénavírus jelenlétét mutattuk ki RT-PCR-rel, amely a GPC gén egy rövid szakaszát erősíti fel. A PCR protokollt CASV és Golden Gate vírus (GOGV) teljes genomszekvenciájának meghatározása után dolgozták ki a szerzők, melyek az első reptarénavírus teljes genomszekvenciák voltak (Stenglein et al., 2012). Azóta a szekvenálási technikák fejlődésének köszönhetően fény derült a reptarénavírusok nagy genetikai diverzitására. A GPC felelős a virion gazdasejtbe történő bejutásáért, és habár a legtöbb reptarénavírus szekvencia vörösfarkú boából származik, e fehérjét kódoló gén sokszínűsége is nyilvánvalóvá vált a GenBank adatbázisában fellelhető nagyszámú szekvenciának köszönhetően. Az általunk használt PCR primerpár GPC génre már nem minden ismert reptarénavírus esetén megfelelő, azonban a GOGV faj képviselőire sikerrel alkalmazható. Emellett további RT-PCR rendszerek, és egyéb technikák is elérhetőek a reptarénavírus fertőzés kimutatására, például a szövettani metszetekben található, zárványok formájában felhalmozódó NP fehérje kimutatását célzó immunhisztokémia (IH) (Abba et al., 2016; Keller et al., 2017). Az *RdRp* gén megőrzött szekvenciájának köszönhetően ideális célpontja az RT-PCR alapú diagnosztikai célú szűrővizsgálatoknak, mely gyorsabb és hatékonyabb módja lehet kis mennyiségű reptarénavírus örökítőanyag kimutatásának (Keller et al., 2017). Ezzel a BIBD *ante mortem* diagnózisára jelenleg is szolgáló fénymikroszkópos vizsgálat eredménye megerősítést nyer, tekintve, hogy a klinikailag egészségesnek tűnő egyedek egy részéből kimutatható reptarénavírus örökítőanyag (Stenglein et al., 2015).

Reptarénavírusok izolálását eddig emlős (VERO, BHK-21, REF), hüllő (JK, I/1Ki) és ízeltlábú eredetű szövettenyészeteken kísérelték meg, CPE-t csupán az esetek egy részében detektáltak az citoplazma zárványokon felül (Stenglein et al., 2012; Hetzel et al., 2013; Hepojoki et al., 2015b; Korzyukov et al., 2016).

Szakirodalmi adatok alapján a különböző reptarénavírusok izolálása szövettenyészetben változó sikerrel járt. Stenglein és munkatársai (2012) VH 2 és IgH-2 sejteken kíséreltek meg vörösfarkú boa veséjéből és májából GOGV-t izolálni. A vírus proliferációjának sikerességét sejtenyészetek felülúszójából monitorozták qRT-PCR segítségével 18 napig. Sikertelenül virális RNS-t kimutatniuk a fertőzés elején, ám a fertőzést követő hetedik napon már nem lehetett azt detektálni. Hasonló eredményt kaptak Vero sejteken is, melyről ismert, hogy emlős arénavírusok szaporítására alkalmas. Ezt követően kígyó eredetű reptarénavírust izoláltak sikerrel limfómás betegség következtében elhullott nőstény boa veséjéből származó adherens sejtvonalon (JK sejtek). Vese és máj szervhomogenizátumból GOGV vírus örökítőanyagát sikerült kimutatni növekvő mennyiségben a sejtek tápfolyadékából, azonban CPE-t nem detektáltak (Stenglein et al., 2012).

Hetzel és munkacsoportja (2013) BIBD-vel diagnosztizált, valamint BIBD tüneteit nem mutató vörösfarkú boa csontvelőjéből, szívéből és veséjéből permanens sejtvonalat hozott létre reptarénavírus izolálása céljából. A BIBD pozitív szövettenyészetben zárványokat figyeltek meg a BIBD negatív szövettenyészetten ellentétben. A BIBD negatív szövettenyészetet fertőzték meg a BIBD pozitív szövet felülúszójával és sikerrel mutattak ki zárványokat a fertőzést követő hatodik napon, annak ellenére, hogy citopátiás hatást nem figyeltek meg. Szintén BIBD negatív vese szövettenyészetet (I/1Ki) fertőzték BIBD pozitív és negatív vörösfarkú boák máj-, szérum és teljes vér homogenizátumaival. A szervszuszpenziókat 24 napig inkubálták 30 °C-on, közben kétszer passzálták őket. A BIBD-re jellemző zárványokat figyeltek meg, reptarénavírus jelenlétét pedig RT-PCR és immunblott módszerekkel ellenőrizték, melyek pozitív eredményt

adtak, a vírust pedig UHV-nak keresztelték. VERO sejteket is fertőztek a fent ismertetett módon, annak ellenére, hogy Stenglein és munkatársai 2012-ben nem tudtak ezen a szöveten reptarénavírust izolálni. Jelen esetben zárványokat figyeltek meg a fertőzés utáni hatodik napon, és immunhisztokémiai módszerrel reptarénavírus antigént mutattak ki. A kontrollhoz képest a fertőzött sejtek sűrűsége csökkent, ezen felül egyéb CPE-t nem detektáltak (Hetzl et al., 2013). A I/1Ki szövetenyésztetet a későbbiekben további reptarénavírus tenyésztésére is felhasználták (Hepojoki et al., 2015b).

CPE-t okozó reptarénavírusokat elsőként Abba és munkatársai írták le, vörösfarkú boából, szalagos tigrispitonból (*Python bivittatus*), szőnyegmintás pitonból (*Morelia spilota variegata*), kockás pitonból (*Python reticulatus*), királpitonból (*Python regius*), sziklapitonból (*Python sebae*), kutyafejű boából (*Corallus caninus*) származó szervhomogenizátumokkal fertőztek VERO és REF sejteket. 72 órával a fertőzést követően a sejtek lekerekedése volt jellemző a fertőzések felében. Szöveti vizsgálatok zárványok jelenlétét erősítették meg a CPE-t mutató szervmintákban, illetve RT-PCR-es vizsgálattal arénavírus örökítőanyagot mutattak ki (Abba et al., 2016). Szintén VERO sejteken tenyésztettek UHV-1 vírust immunológiai vizsgálat céljából (Korzyukov et al., 2016).

VH 2 szövetenyészteten nem tudtuk eredményesen izolálni a vörösfarkú boából kimutatott Coldvalley reptarénavírust. A sikertelen izolálási kísérlet egyik oka lehet, hogy az általunk használt mintában nem volt megfelelő mennyiségű szaporodásra képes vírus. Mivel az izolálásra használt szervmintákat fagyasztva tároltuk, lehetséges, hogy a reptarénavírusok burkos virionját ért esetleges sérülés következtében nem tudott a gazsdasejthez kötődni. Másik lehetőség, hogy a Coldvalley vírus GPC régiójában történt változás miatt volt képtelen kötődni a viperaszív sejtek receptoraihoz. Reptarénavírusok esetén nem rendelkezünk adatokkal arra nézve, hogy a virion glikoproteinje milyen sejt felszíni receptorokhoz képes kötődni a gazdasejt felületén. Mammarenavírusok egyes óvilági képviselőinél (lymphocytas choriomeningitis vírus, lassa vírus) az alfa-disztroglikánt (α DG) azonosították, mint arénavírus receptort, funkcionálásához számos poszttranszlációs módosításon kell keresztülmennie, mint az acetilglükózaminiltranszferáz függő glikoziláció. Ettől eltérően újvilági arénavírusoknál (junin vírus) a humán transzferrin receptor 1 (TfR1) felelős a gazdasejtbe jutásért (Grande-Perez et al., 2016).

A kígyó arénavírusokat érintő tanulmányunk kezdetén, 2012-ben, mindössze néhány referencia szekvencia volt elérhető a GenBank adatbázisban. A reptarénavírusok diverzitásának megismerése céljából megkíséreltük az általunk amplifikált vírus teljes genom szekvenciájának meghatározását. Mivel a vírus izolálására tett kísérletünk meghiúsult, RT-PCR-es amplifikációt követő szekvenálást és NGS-t alkalmaztunk. A két szegmensből álló genom L szegmense esetében sikeresen megállapítottuk a teljes nt sorrendet, az S szegmensről részleges adatokkal rendelkezünk: az NP gén és a 3' UTR régió meghatározásra került, míg az IGR, GPC gén és 5' UTR régió szekvenciája ismeretlen. A szegmens szerződése a reptaréna- és mammarenavírusokra jellemző.

A GenBank-i adatok feldúsulásával és a Coldvalley vírus hosszabb genom szakaszainak meghatározása alapján jól látszik, hogy az általunk leírt törzs az UHV-3 vírussal áll szoros rokonságban, melyet az összes génre vetített azonossági és filogenetikai analízisek is alátámasztanak. Az *RdRp*, *NP* és *Z* gének teljes kódoló régiói alapján készített törzsfák mindegyikén a Coldvalley arénavírus az UHV-3 törzssel egy ágon, a *Rotterdam reptarenavirus* faj képviselői között helyezkedik el. A magas bootstrap értékek is megerősítik a megállapításunkat, mely szerint a fent említett vírusok közös evolúciós eredettel rendelkeznek. Mivel a Coldvalley reptarénavírus rendkívül magas azonossági értékekkel rendelkezik a részleges S és teljes L szegmens nt szekvenciáját nézve az UHV-3 törzsekkel, saját törzsünket Coldvalley UHV-3 névvel látjuk el. A *Rotterdam reptarenavirus* faj két képviselőjével

összevetve is nagyon magas azonossági értékeket kaptunk, mely megerősíti az általunk vizsgált vírus faji besorolását az UHV-3 törzssel egyetemben. A reptarénavírusok esetében a Coldvalley és UHV-3 vírus genomjának egyes génjei az UHV-1, UHV-2 és UHV-4 vírusok homológ szakaszaival is rokonságban állnak, génenként eltérő azonossági értékeket és filogenetikai értelemben vett távolságot mutatva, amit a reptarénavírusok közötti rekombináció eredményezhet. Az *RdRp*, *Z*, *NP* kódoló régiók alapján készült filogenetikai törzsfák eltérő topológiája is megerősítheti potenciális, múltbéli rekombinációs eseményeket reptarénavírusok között, mely jelenség ismert az UHV-1 és ROUTV esetében, míg a Coldvalley vírus és UHV-3 esetében ezt nem tapasztaltuk (Stenglein et al., 2015).

Jelenleg csupán egyetlen UHV-3 törzsből áll rendelkezésünkre L és S szegmens szekvencia (KR870032 és KR870019), melyet szintén vörösfarkú boa szervhomogenizátumából mutattak ki vírusizolálással Németországban. Az NGS-sel meghatározott szekvenciák mellett további reptarénavírus L (Aurora borealis virus 2, ABV-2, KR870033) és S szegmenst (ABV-2, KR870018; UHV-3, KR870019) is kimutattak (Hepojoki et al., 2015b). Az F15158 UHV-3 törzs esetében, mely egy svájci magántenyésztő 2015-ben elpusztult vörösfarkú boa mintájából származik, L szegmens szekvencia áll rendelkezésünkre. A tenyésztő kérésére eutanáziát hajtottak végre az állaton a vemhessége ellenére, és szövettani vizsgálattal BIBD-t diagnosztizáltak. Az UHV-3 reptarénavírus törzsen kívül még három másik reptarénavírus L szegmenst (KX527583, KX527584, KX527585) és két S szegmenst (KX527576, KX527577) is kimutattak NGS technikával agyszövetből (Keller et al., 2017). Szintén Svájcban származó felnőtt vörösfarkú boa szérumából mutatták ki az F17-0012 UHV-3 törzset (MH503952, L szegmens), mely mellett további nyolc L és egyetlen S reptarénavírus szegmens szekvenciáját is sikerült meghatározni hartmanivírus L és S genomszegmensekkel egyetemben (L és S szegmens GenBank-i azonosító MH483024 és MH483025) (Hepojoki et al., 2018).

A GenBank adatbázisában jelenleg számos reptarénavírus genomszekvencia található meg. A besorolatlan státuszú törzsek között akadnak olyanok, melyek az ICTV ajánlása szerinti egy fajba sorolás határértéke feletti azonossági értékekkel rendelkeznek (L szegmens nt >76%, S szegmens nt >80%, *NP* gén as >88%). Így például az UHV-1 (S és L szegmens GenBank-i azonosító: KR870011, KR870020) és UHV-3 törzsek (S és L szegmens GenBank-i azonosító: KR870032 és KR870019) a *Rotterdam reptarenavirus*, míg a F17-0012_9 University of Giessen vírus 1 (UGV-1; S és L szegmens GenBank-i azonosító: MH483051 és MH483052) törzsek a *Giessen reptarenavirus* fajba sorolandóak. A *Golden reptarenavirus* faj tagjait gyarapítja az ABV-1 (S és L szegmens GenBank-i azonosító: KR870010 és KR870021) és ABV-2 (S és L szegmens GenBank-i azonosító: KR870018 és KR870033).

Olyan esetben, mikor a csupán egyetlen arénavírus szegmens ismert, a besorolás az ICTV ajánlása szerint nem teljesülhet. ABV-3 és ABV-4-ből csupán L szegmens szekvencia áll rendelkezésre (ABV-3 GenBank-i azonosítók: KX527583, MH483045; ABV-4 azonosítók: KX527594, KX52792, MH483054, MH483071, MH483078, MH483091), ezek azonossági értékei alapján a *Golden reptarenavirus* fajba tartoznának, de nem ismert az S szegmens. Ugyanez a helyzet áll fenn a Hipoen jatkoon vírus 1-gyel (HJV-1; MH483085) és a *Giessen reptarenavirus*-sal, az F17-0012 UHV-3-mal (MH503952) és a *Rotterdam reptarenavirus*-sal, valamint a Tavallinen suomalainen mies vírussal (TSMV-2; F17-0012_8 (MH483050), T200 (KX527591)) és TSMV-1-gyel (KR870026), S13-1157 (KX527595), S14-369-79 (MH503953), S13-1157 (KX527595)) és az *Ordinary reptarenavirus*-sal.

Olyan törzsek is ismertek, melyeknek egy L szegmensük ismert és ezek egyik besorolt reptarénavírus törzssel sem mutatnak megfelelően magas hasonlóságot (<76/80/88%) (Hans Kompis virus 1 (HKV-1), KR870028, KX527593; Kuka mitae haeh virus 1 (KUKV-1), KX527588; Keijut pohjoismaissa virus 1 (KePV-1), MH483047, KX527597, KX527589),

Arabuta snake virus 1 (ArSV-1), MN567045) továbbá a be nem sorolt, ismert reptarénavírusokkal is csekélyebb azonossági értékekkel bírnak nt és as azonossági értékeik alapján, így taxonomiai besorolásuk szintén tisztázásra szorul.

Stenglein és munkatársai (2015) felállítottak egy genotipizáló rendszert az USA területén gyűjtött reptarénavírus törzsekre. 48 állatból 23 féle L és 11 féle S szegmens teljes szekvenciáját tudták meghatározni metagenomikai vizsgálattal. Két törzset egyazon genotípusba L és S szegmens esetén is 80% feletti nt azonossági érték felett sorolták. Ezek közül több genotípus is megfelel az ICTV faji besorolás követelményeinek az ismert S vagy L szegmensre vonatkozóan: az L7 az *Ordinary reptarenavirus*, az L1 és S1 a *California reptarenavirus*, L2, L3 és S2 a *Golden reptarenavirus*, L13, S6 és S7 a *Giessen reptarenavirus*, L20 pedig a *Rotterdam reptarenavirus* képviselői közé tartozhat, ennek ellenére másik szegmens hiányában a taxonómiai besorolás feltételei nem teljesülhetnek. Mindezek alapján, valamint a reasszortáció és rekombináció figyelembevételével szükségesnek látjuk a reptarénavírusok taxonómiájának felülvizsgálatát, további fajokkal kibővítve a nemzetséget.

Megvizsgálva a *Rotterdam reptarenavirus* faj képviselőinek földrajzi eredetét a törzsek a filogenetikai fákön földrajzi csoportosulást nem mutattak. Az L20-as genotípus képviselői (KP071549, KP071622, KP071564) az USA-ból származnak, a többi törzs pedig európai eredetű. Az L20-as genotípus szekvenciái > 97% azonosság értékekkel rendelkeznek a teljes L szegmens nt szekvenciáját nézve az UHV-3 és UHV-4 törzsekkel összehasonlítva, így feltételezhetjük, hogy az L20-as genotípus képviselői az UHV törzsek közé tartoznak. Ennek figyelembevételével UHV-t nem csupán Európában, hanem az USA több területén is kimutattak.

Az arénavírusok evolúciójával kapcsolatban több hipotézis létezik. Az egyik szerint a kígyókba a zsákmányból elfogyasztott rágcsálók útján terjedhetnek át arénavírusok. A reptaréna- és mammarénavírusok azonban eltérnek egymástól, így ez a kezdeti átadás az arénavírus evolúció egyik korai szakaszában történhetett meg, mely a kígyók és arénavírusaik koevolúciójához vezethetett (Hetzl et al., 2013).

A vírusok genetikai diverzitásának növekedése több mechanizmusnak köszönhető. Ilyen a vírus replikációban szerepet játszó RdRp enzim másolási hibára hajlamos működése, amely mutációk felhalmozódását eredményezheti a virális genomban (Duffy, 2018). Ha ez előnyös változásokat eredményez, új szövethez vagy gazdafajhoz adaptálódást eredményezhet. Különböző genotípusok vagy vírushajok egyidejű fertőzése esetén vírus rekombináció jelensége léphet fel, így a gazdasejtben változatos genomszekvenciájú virionok jöhetnek létre. Szegmentált vírusok esetében a szegmensek cserélődésével, a reaszortáció jelensége révén a szülői genotípusok keveredésével új genotípusú virionok keletkezhetnek. Ez a folyamat szintén jellemző lehet a reptarénavírusok evolúciójára (Stenglein et al., 2015). Reptarénavírusoknál az eltérő számú L és S szegmens általi fertőzöttség egy egyedben belül több esetben is bizonyítást nyert, mely nagyban nehezíti a vírusok rendszertani besorolását. Keller és munkatársai hipotézise szerint a múltban minden egyes S egy L szegmensevel párban alkotott egységet (Keller et al., 2017). A jelenlegi nyilvánvaló L szegmens számbeli fölényére magyarázat lehet, hogy az S szegmens kódolja a virális glikoproteint, mely esszenciális a virion gazdasejtbe jutásához. Az az S szegmens, mely ezt a leghatékonyabban tudja véghezvinni, egy esetleges koinfekció során több utóvirionba kerülhet be. Jelenleg nem rendelkezünk adatokkal arra nézve, hogy milyen faktorok befolyásolják az L és S szegmensek párosítását a virion összeépülése során (Keller et al., 2017). Vadon élő kígyók reptarénavírus fertőzésének vizsgálata mindenesetre közelebb hozna minket a reptarénavírusok számos megoldatlan kérdésének feloldására. Szintén ilyen kérdés a vírus természetes gazdáinak meghatározása, melyhez vadon élő kígyók reptarénavírus fertőzöttségének vizsgálata elengedhetetlen lenne. Ehhez visz közelebb minket Brazíliában, az Amazonas régiójából származó vörösfarkú boák vizsgálata. A vizsgált állatok igazoltan

BIBD-ben szenvedtek másodlagos, bakteriális fertőzésekkel egyetemben. A kígyókban több L és csupán egyetlen S szegmenst azonosítottak, az egyik közülük a KaBV-1 L szegmense 97%-os azonosságot mutatott a svájci vörösfarkú boából leírt azonos nevű törzzsel. Filogenetikai törzsfákon ezek a törzsek beékelődnek az európaiak közé. Így Argenta és munkatársai feltételezik, hogy a reptarénavírusok vadon élő kígyóktól származtathatóak. Reptarénavírusok mellett hartmani-és chuvírusokat is sikerült azonosítani a fertőzött egyedekben. Ezt leszámítva kevés adatunk van reptarénavírusok természetes gazdáiról és földrajzi elterjedéséről (Argenta et al., 2020).

A GenBank adatbázisában a fellelhető reptarénavírus genom szekvenciák többsége *Boa constrictor*-ból származik, ennek ellenére e szekvenciák rendkívül nagy genetikai diverzitással rendelkeznek. Ismertek még *Corallus annulatus*-ból származó teljes reptarénavírus genom szekvenciák: a CASV a *California reptarenavirus* faj jelenleg egyetlen besorolt képviselője, de az L1-es genotípus az ICTV L szegmensre vonatkozó kritériumai szerint szintén ebbe a fajba sorolható. Ezek a reptarénavírus nemzetség képviselőiből származó teljes kódoló régiók alapján készített filogenetikai törzsfákon a vörösfarkú boákból származó szekvenciáktól jól elkülönült, monofiletikus ágon helyezkednek el. Ez az elkülönülés lehet a gazdafaj különbség oka is. Az NP gén részleges genom szekvenciája többféle kígyóból is fellelhető (*Pantherophis guttatus*, *Antaresia stimsoni*, *Morelia carinata*), csakúgy, mint az RdRp egy-egy hosszabb rövidebb szakasza (*Python bivittatus*, *Python timoriensis*). A fenti kígyófajokból származó reptarénavírus törzsek teljes genom szekvenciájának megismerése közelebb vinne minket a reptarénavírusok diverzitásának megismeréséhez és a törzsek és gazdafajok evolúciós viszonyainak feltérképezéséhez.

A vörösfarkú boa világszerte nagyon népszerű és nagy számban tartott kígyó. Tekintve, hogy a boa sejtzárványos betegségére eddig nincs ismert gyógymód és vakcina sem áll rendelkezésre, a BIBD a tüneti kezelések ellenére a beteg kígyók elhullásával ér véget, így nagy károk keletkezhetnek kisállattenyésztők és hobbiállat tartók körében. Mivel a betegség ragályos és az esetek többségében a tünetek megjelenése után diagnosztizálják, az együtt tartott kígyók szűrővizsgálata elengedhetetlen, a fertőzött egyedek esetében eutanázia alkalmazása javasolt. Új egyed vásárlása esetén minden esetben legalább 90 napos karantén szükséges, hogy elkerüljük az állományok fertőződését. Mivel a boákban enyhébb klinikai tünetekkel is jelentkezhet a betegség és ismertek tünetmentes hordozók is, a pitonok védelme érdekében nem ajánlott a boák és pitonok együtt tartása.

5.2 Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

Vizsgálatunk célja a bozótvipera-ból (*Atheris squamigera*) izolált 47/02-es RRV törzs teljes genom szekvenciájának meghatározása és analízise volt. A bozótvipera kórbonctani vizsgálata során diphteroid-elhalásos száj-, nyelöcső- és bélgyulladást, valamint a nyálkahártya és bél limfoid szöveteinek hiperpláziáját állapították meg. A reovírus mellett számos enterális fakultatív patogén baktériumot is kimutattak (*Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus sp.*), ezen felül a bélcsatornában súlyos flagelláta fertőzöttséget azonosítottak. Az kétséges, hogy a bozótvipera legyengült fizikai állapota kedvezett-e a reovírus elszaporodásának, vagy a reovírus fertőzés következtében meggyengült immunrendszer járult hozzá egyéb patogének megtelepedéséhez. Mivel az orthoreovírus fertőzés hüllőkben általában nem körjelző – idegrendszeri és emésztőszervi – tünetekkel jár, így a bozótvipera esetében is felderítetlen maradt pontos kóroktani szerepe. A bozótvipera reovírus szövettenyészetben való elszaporítása során látott citopatogén hatás az orthoreovírusokra jellemző óriássejt képzést mutatta a fertőzést követő harmadik-ötödik napon. A sikeres izolálás lehetőséget nyújtott a vírus örökítőanyagának további vizsgálataira: a PAGE rendszerben a reovírusok esetében látottaknak megfelelő genom szegmens eloszlást mutatott, majd a tisztított nukleinsavból a

genomszekvencia meghatározásra került. A bozótvipera reovírus genomfelépítése az orthoreovírusokra jellemző sajátságokat mutatta. A tíz szegmensre tagolódó dsRNS örökítőanyag méret szerint három tartományra oszlik, az egyes szegmensek 3' UTR-e a konzervált UCAUC pentanukleotid szekvenciát, az 5' UTR pedig GUUA/CUU szekvenciát tartalmazza, előbbi az *Orthoreovirus* nemzetség jellegzetessége, utóbbi pedig valószínűleg a hullő orthoreovírus faj jellegzetessége.

Öszehasonlítottuk a kódoló régiók nt és as szekvenciáit az *Orthoreovirus* nemzetség fajainak reprezentatív képviselőivel is. Minden szegmens esetében a legmagasabb azonossági értékeket TRV esetében láthatunk, azonban ezek az értékek alulmaradnak az ICTV által javasolt egyazon orthoreovírus fajba sorolás határértékeivel szemben. Így 47/02-es reovírus törzs különálló RRV fajba jegyezhető, melyet a filogenetikai törzsfák topológiája és magas bootstrap értékek is alátámasztanak.

Munkánk kezdetekor nem volt ismert teljes hullő orthoreovírus genomszekvencia, csupán az RdRp génből rövid részleges szekvenciái voltak elérhetőek a GenBank-ban, így a hullő reovírusok genetikai változatosságáról és evolúciós kapcsolatairól kevés információval rendelkezünk. A 47/02-es bozótvipera reovírus az *Orthoreovirus* nemzetség RRV fajának képviselője, tekintettel genomszerveződésére, azonossági értékeire és a filogenetikai törzsfák elrendezésére. Ezáltal sikeresen határoztuk meg az első teljes RRV genomszekvenciát is, melyet az ICTV mint típus törzset jelöl meg.

A fúzióképes reovírusok az egyetlen ismert vírusok, melyek nem rendelkeznek burokkal és mégis szincícium kialakítására képesek FAST fehérjék segítségével. Burkos vírusoknál a gazdasejthez való kapcsolódásért és a membrán fúzióért nagy, multimer fehérjekomplexek felelősek (Ciechonska and Duncan, 2014). A FAST fehérjéknek jelenleg hat típusa ismert: a p10 (ARV, NEARV, NBV), p13, p14 és p15 (BroV, TRV, BRV, RRV), p11 és p16 (aquareovírusok A, C és G csoportja). A p13 és p14 esetében N-terminális konzervált dekapeptid szekvencia található, a többi orthoreovírus FAST fehérjében azonban eddig nem találtak közvetlen szekvencia hasonlóságokat. A *Reoviridae* víruscsalád egy másik nemzetsége, az *Aquareovirus* genusz képviselőinek esetében is csupán mérsékelt szekvencia hasonlóságot fedezhetünk fel a fehérje N-terminálisában az orthoreovírusok FAST fehérjével összevetve (Ciechonska and Duncan, 2014). Ezen fehérjék az endoplazmatikus retikulum - Golgi útvonalon keresztül jutnak el a sejtmembránhoz. A fúziós fehérjék felhalmozódása vezet azután a gazdasejt és a szomszédos, nem fertőzött sejtek fúziójához, ami a fertőzött állatokban és sejtenyészeten is megfigyelhető. A FAST fehérjék által kiváltott óriássejtképzés apoptotikus választ indukál a gazdasejtben, és az így megváltozott membrán permeabilitás végül a sejt pusztulását okozza (Salsman et al., 2005). Így az orthoreovírusok fúziós fehérjéjének megléte vagy hiánya, illetve típusa meghatározó lehet. A bozótvipera reovírus esetén az S1 genomszegmens felépítése hasonlóságokat mutat a pítón RRV, TRV és MAHLV homológ szegmenseivel, itt találhatóak a FAST (p14) és σ C fehérjét kódoló régiók. Szoros rokoni kapcsolataikra és közös evolúciós eredetükre utalhat ez a genomfelépítés. Ezt a feltételezést alátámasztják az egyes szegmensek kódoló régiói alapján készült filogenetikai törzsfák topológiái is: a λ A, λ B, λ C, μ B, μ NS, σ B és σ NS fákön 47/02 monofiletikus ágon helyezkedik el TRV-vel, MAHLV-vel, továbbá ezekkel egy ágon található a BroV és BRV, amely szintén közeli evolúciós kapcsolatra enged következtetni.

Fontos megvizsgálni a sejtkapcsolódásért felelős σ C fehérjét, illetve annak meglétét vagy hiányát. A virális patogenezis kritikus lépése a gazdasejt receptoraihoz való kötődés. Ez az interakció specifikus receptorokon keresztül megy végbe, eredménye a virion internalizációja és a gazdasejt fertőzése (Grande et al., 2000). BroV, BRV, MAHLV vírusok esetén a σ C hiányzik a policisztronos szegmensről, helyette a p16-os fehérje kódoló szakasza található meg, melynek funkciója jelenleg ismeretlen (Van Vuren et al., 2016). A bozótvipera reovírus

rendelkezik az S1 szegmensben kódolt σ C fehérjével csakúgy, mint a TRV. Vizsgálataink szerint az RRV és a BroV/BRV fajok képviselői között közeli filogenetikai kapcsolat áll fent, ezt láthatjuk az egyes szegmensekről készített filogenetikai törzsfákon is. Feltételezhető, hogy a BroV és BRV ORF2-n kódolt fehérjéje (p16) egy ősi RRV-ből vagy RRV-szerű vírus σ C fehérjét kódoló génjéből alakulhatott ki. Előfordulhat, hogy ez a strukturális változás egy korábbi gazdafaj váltás eredményeként jöhetett létre. Lehetséges tehát, hogy egy ősi hullő (-szerű) orthoreovírus központi szerepet játszhatott a különböző majom és denevér orthoreovírusok kialakulásában.

A hullőtartás egyre népszerűbbé válásának és a veszélyeztetett hullőfajok védelméért indított megőrzési programoknak köszönhetően a gazdaságilag kevésbé jelentős hullő virológiai kutatások napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak. Mivel az alacsonyabb rendű gerincesek számos meglehetősen diverz vírussal rendelkeznek, a vírusok kimutatása, szekvenciájának meghatározása és elemzése érdekes adatokkal szolgál az egyes vírusok evolúciójának megismerésében is.

Munkánk kezdetéig Magyarországon eddig csak egy esetben írtak le orthoreovírus fertőzöttséget egy USA-ból importált és nem sokkal később elhullott zöld fűsiklóból (*Opheodrys aestivus*) álló csapatban (Gál et al., 2009).

Vizsgálataink másik célja a különféle egzotikus hullőfajokban szaporodó orthoreovírusok előfordulásának felmérése és genetikai sokszínűségének megismerése. 20 hullőfaj 111 egyedének kevert szerv mintáit vizsgálva 3 faj 6 egyedében sikerült kimutatnunk orthoreovírust a korábban már ismertetett módszerekkel. Érdekes módon az alkalmazott kétkörös RT-PCR rendszer a 2013/KP3 törzs esetében negatívnak bizonyult, míg a vírusizolálás sikerrel járt. A sejttenyészetben elszaporított izolátum RT-PCR vizsgálata azonban már pozitív lett. Ennek magyarázata lehet, hogy a 2013/KP3-as törzs genomjában az RdRp génben található primer kötési helynél mutáció alakulhatott ki, így a primerek nem voltak képesek megfelelően bekötni. A vírusizolálás sokkal érzékenyebben képes kimutatni citopatogén hatással rendelkező élő vírusokat, ezért célszerű a PCR vizsgálatokkal párhuzamosan vírusizolálást végezni. Ezen következtetésünk megegyezik Abbas és munkatársai által 2011-ben publikált megállapításával is (Abbas et al., 2011).

Érdekes módon a három királypítónból (2013/KP1, 2013/KP3, 2013/67) kimutatott vírustörzsek szekvenciája az RdRp gén általunk vizsgált rövid és konzervatív szakaszán sem volt azonos. A 2013/KP3 és a 2013/67-es törzsek szekvenciái eltérést mutattak; míg az utóbb említett törzs, az ismeretlen kigyóból izolált 643/47-es törzs és a schneider szinkből izolált 2013/12-es törzs nt szekvenciája azonosnak bizonyult. A 2013/KP1-es törzs az előbbiekkal összehasonlítva jelentősebb eltérést mutatott, csakúgy, mint a zöld leguánból izolált 2013/54-es törzs. Tehát különböző hullőfajokból azonos részleges RdRp szekvenciával rendelkező vírustörzseket mutattunk ki, míg ugyanabból a hullőfajból különböző szekvenciával rendelkező vírustörzseket detektáltunk.

Bár hullőkben orthoreovírusokat általában légzőszervi és/vagy idegrendszeri elváltozásokkal kapcsolatban mutattak ki, közvetlen kórokozó szerepük a legtöbb esetben tisztázatlan maradt. Ezek a tünetek hasonlóak paramyxovírus eredetű megbetegedéseknél leírtakhoz, mely nehezíti a vírusok diagnosztikáját és a beteg állatok megfelelő kezelését. Gyakran más vírusokkal (például adeno- és paramyxovírusokkal), baktériumokkal (*Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp.), parazitákkal együtt okoznak betegséget, mint láthattuk ezt az általunk vizsgált bozótvipera esetében is. A hullő reovírusok, a madár orthoreovírusokhoz hasonlóan immunszuppresszív hatásuk révén játszhatnak szerepet az elváltozások súlyosbításában (Benavente and Martínez-Costas, 2007).

A betegség kialakulását és összefüggését a vírushordozással eddig két állatfertőzési kísérletben vizsgálták. 1988-ban fiatal virágos siklókból (*Orthriophis moellendorffi*) és sávofarkú siklókból (*Orthriophis taeniurus*) álló gyűjtemény tagjait holtan találták nem sokkal az után, hogy Ázsiából az USA-ba importálták őket. Az állatok elhullásuk előtt semmilyen tünetet nem mutattak. A kígyók boncolása során az ödémás tüdőben sűrű, nyákos váladékot írtak le. Ezek közül egy virágos sikló szövettani vizsgálata során jelentős elváltozásokat fedeztek fel a tüdőben: diffúz, félheveny interstitialis tüdőgyulladást állapítottak meg a légutak epithel sejtjeinek hiperpláziájával és óriássejt képződéssel egyetemben. Ezen felül folyadék felhalmozódást és baktériumokat figyeltek meg a légutakban. A végső diagnózis primer vírusos eredetű tüdőgyulladás volt bakteriális felülfertőződéssel. A siklókból vírusizolálással és elektronmikroszkópos vizsgálattal reovírust mutattak ki, melynek kórokozó képességét vírushordozási kísérlettel vizsgálták. A kísérlet során egy fogságban született fiatal fekete patkánysiklót (*Elaphe obsoleta obsoleta*) fertőztek a vírusizolátummal intratracheálisan, per os és nazálisan. Ezt követően a patkánysikló semmilyen tünetet sem mutatott, azonban a fertőzést követő 26. napon elpusztult. A boncolás során megállapítást nyert, hogy nagy mennyiségű nyálka halmozódott fel a tüdőben, a garatban és a légcsőben. A szövettani vizsgálat során szintén diffúz, szubakut intersticiális tüdőgyulladást állapítottak meg, a tüdő epithel sejtjei óriássejteket képeztek. A májban nagy kiterjedésű elhalt területet figyeltek meg bakteriális szeptikémiával egyetemben. A többi szerv számottevő elváltozásokat nem mutatott. A patkánysikló májából és tüdejéből sikerült újra reovírust izolálni, melyet az elektronmikroszkópos vizsgálat is alátámasztott. Egy második fekete patkánysiklót is fertőztek intratracheálisan, per os és nazálisan a tüdőből izolált reovírossal. A kígyó anorexián kívül más klinikai tünetet nem mutatott. A fertőzés utáni negyvenedik napon a túlaltatott patkánysikló kórbonctani vizsgálata az előző kígyó boncolásával megegyező eredményt hozott. Az állat tüdejéből, májából és hasnyálmirigyéből újra izoláltak reovírust. A tüdő szövettani vizsgálata során proliferatív intersticiális tüdőgyulladást állapítottak meg, a légcső szubakut proliferatív gyulladásával együtt. A virágos- és sávofarkú siklókból izolált reovírus jelenléte nem bizonyítja a vírus súlyos, halálos kimenetelű légzőszervi betegség okozó képességét, azonban a kísérletes vírushordozás eredménye felhívja a figyelmünket reovírusok esetleges kórokozó szerepére ezekben a siklófajokban (Lamirande et al., 1999). A másik fertőzéses kísérletet Németországban végezték el. Három, BIBD-vel diagnosztizált vörösfarkú boából izoláltak reovírusokat, majd az izolátumokkal fiatal vörösfarkú boákat fertőztek meg. A fertőzött kígyók azonban nem betegedtek meg, bennük semmilyen kóros elváltozást sem figyeltek meg, mely ellentétben áll Lamirande és munkatársai (1999) sikló fajokkal végzett fertőzéses kísérletével.

Az általunk vizsgált állatok esetében az elhullás oka ismeretlen, a nem megfelelő szállítási és tartási körülmények okozta stressz nagymértékben hozzájárulhatott a patogén és fakultatív patogén kórokozók, köztük az orthoreovírusok elszaporodásához és az állatok pusztulásához. Mivel e vírusok pontos kórokozó szerepe még nem ismert és a feldolgozott minták viszonylag jelentős százaléka pozitívnak bizonyult, új állatok vásárlása esetén fontosnak tartjuk a karanténosztást állományaink védelmében. Ezen kívül érdemes lenne fertőzési kísérletekkel a vírus önálló kórokozó képességét vizsgálni.

Az RNS vírusok rendelkeznek a leggyorsabban mutálódó genommal a természetben, mely milliószor nagyobb, mint a gazdáiké. Ez a magas ráta kedvező változásokat is előidézhethet a vírus számára, mellyel növelheti virulenciáját. Ugyancsak járhat a vírus számára végzetes következményekkel is. Poliovírusok esetében például erős a szelektív nyomás gyorsabb replikációs mechanizmus elérésére, azonban a gyorsabb polimerázok több hibát is vételnek. Így a mutációk feldúsulásával kifejezetten káros következmények is kialakulhatnak a vírus számára (Duffy, 2018). Ennek hátterében részben az RNS polimeráz generálta pontmutációk állhatnak, hiszen ez az enzim nem rendelkezik a DNS polimerázokra jellemző hibajavító mechanizmussal (Choi, 2012). Hozzájárulhat továbbá a gazdaszervezet immunrendszerének védekezése – többek

között az orthoreovírusok esetében is – a vírusok ellen, amely szelekciós nyomást gyakorol a virális genomra. Ezen evolúciós mechanizmusokon kívül a genomszegmenseken belüli inszerciók és deléciók is növelhetik a törzsek genetikai diverzitását. A szegmentált vírusokra jellemző, hogy több vírus egyidejű fertőzése esetén a különböző vírusok szegmensei kicserélődhetnek, reasszortálódhatnak. Az így keletkezett vírusok kórokozó képessége növekedhet, könnyebben fertőzhetnek új gazdafajokat és hatékonyabban kerülhetnek ki az immunrendszer válaszreakcióit (Stenglein et al., 2015). A szegmentált vírusok evolúciójának nyomon követése klinikai jelentőségekkel is bírhat.

Az *RdRp* gén egy szakaszának vizsgálata lehetőséget ad a vírusok diagnosztizálására, mert rendkívül konzervált a hulló orthoreovírus faj képviselői között. Ez a konzerváltság lehet az oka, hogy az általunk vizsgált rövid, kb. 245 bp hosszúságú szakaszon magas nt és as azonossági értékeket kaptunk. A filogenetikai törzsfán a RRV törzsek közé ékelődő TRV jelenléte is a vizsgált szakasz rövidegének következménye, hiszen ez a régió a teljes *RdRp* génnek mindössze hat százaléka, így nem tekinthető reprezentatívnak és az RRV és TRV fajok közeli rokonsági kapcsolatban állnak egymással. Ennek ellenére diagnosztikai célokra jól alkalmazható az általunk is használt RT-PCR módszer (Wellehan et al., 2009). Továbbá a fajba sorolás további tényezőktől is függ, úgymint az RNS-ujjlenyomat, a policisztronos S szegmens felépítése, a gazdafaj specificitás, a vírus által indukált klinikai tünetek, az RNS genom agaróz gélelektroforézissel nyert elektroferogramjának jellege és a különböző fajhoz tartozó vírustörzsek egymással történő reasszortációs képességének hiánya (Attoui et al. 2011). A konzervatív jelleg miatt sorolhatjuk mégis a RRV faj tagai közé az általunk vizsgált törzseket. A teljes genomszekvenciák meghatározása megtörtént (publikálás alatt). Mindezek ellenére a királypitonok esetében látható szekvencia különbségek ennél a génnél is felhívják a figyelmet a pontmutációk okozta esetleges változásokra, ami akár azok diagnosztizálást is befolyásolhatja.

A virális polimeráz gének hosszú távú filogenetikai vizsgálatokra is kiválóan alkalmasak. Az orthoreovírusok RNS polimeráza a belső kapszidban található, így a gazda immunválaszának kevésbé van kitéve. A polimeráz működése esszenciális a vírus számára, így a vírus evolúcióját vélhetően a leginkább tükrözi. Azonban a legtöbb vírustörzs esetében szekvencia-adatok csak a külső kapszid fehérje génekből állnak rendelkezésünkre, így az *RdRp* gén szekvenciák gyakorlati alkalmazása nehézségekbe ütközik. Az orthoreovírusok evolúciós mechanizmusainak és törzsfajlásának vizsgálatához a reasszortáció jelensége és az egyes szegmensek eltérő mutációs rátája miatt valamennyi szegmens analízisére szükség van.

További tanulmányok szükségesek az orthoreovírusok genetikai jellemzésének és evolúciós kapcsolatainak felderítéséhez. Az általunk meghatározott első teljes genomszekvencia adatok feltárták, hogy az RRV külön fajt képviselhet az *Orthoreovirus* nemzetségben belül.

5.3 Teknős picornavírusok vizsgálata

A PV-k nagyfokú genetikai diverzitással és rendkívül széles gazdaspektrummal rendelkeznek. Mivel genomszerveződésük változatos, nem csoda, hogy rendszerezésük nem egyszerű feladat. (Zell, 2018). Az újgenerációs szekvenálási technikáknak köszönhetően egyre több adat áll rendelkezésünkre az alacsonyabbrendű gerinces szervezetek picornavírusairól is, újabb és újabb vírustörzsek kerülnek elő világszerte.

Munkánk kezdetekor egy mór teknősből származó PV törzs (TGT1A/96), a vírus X közel teljes genomszekvenciáját meghatározták az 5' NTR régió kivételével, ám ez a szekvencia nem került be a GenBank adatbázisába (Heuser et al., 2010). Ezt követően a travancori teknősből kimutatott RaV-A1 teljes genomszekvenciáját írták le (Ng et al., 2015). Ez a két törzs jelentősen különbözik egymástól, így nem sorolhatók egyazon nemzetségbe. Munkacsoportunk

hét szárazföldi teknős eredetű PV-t izolált sikerrel, melyek közel teljes genomszekvenciáját határoztuk meg és elemeztük.

Az ICTV ajánlása szerint két vírustörzs külön nemzetségbe tartozik, ha az ortológ fehérjék szekvenciái közötti különbség P1 régió esetében 66%-nál, míg a 2C, 3C, 3D régiók esetében pedig 64%-nál magasabb (Zell et al., 2017). Esetünkben mind a négy vizsgált régióban jelentősen különböznek törzseink a *Picornaviridae* család többi nemzetségének reprezentatív képviselőitől, valamint olyan magas az azonossági értékeket kaptunk hét ToPV törzsünk egyes genomi régiót tekintve, mely nemcsak az egy nemzetségbe, de az azonos fajba sorolást is feltételezi. Genomszerveződésük mind a hét törzs esetén azonos, a filogenetikai törzsfákon mind a hét törzs egyazon ágon helyezkedik el, távol állnak a RaV-A1-től és a GenBank-ban található további picornavírus törzsek képviselőinek szekvenciáitól is, így mind a hét ToPV törzsünk egyazon nemzetség egyazon fájába tartozik. Ezek alapján javasoltuk 2014-ben, hogy a teknősökből izolált PV törzseink a vírus „X” -szel egyetemben különálló nemzetségbe tartozzanak a *Picornaviridae* családon belül, Topivirus (Tortoise picornavirus) elnevezéssel. 2016-ban az ICTV az általunk izolált vírusokat külön nemzetségbe sorolta és a Topivirus elnevezés helyett a *Torchivirus* nevet adta.

2018-ban a be nem sorolt teknős rafivírust különálló nemzetségbe, a *Rafivirus* genuszba sorolták a *Picornaviridae* családon belül. Az általunk izolált 14/04-es törzs szolgál a *Torchivirus* A faj típusörzseként.

Az ismert PV-k kapszid fehérjéi (1B, 1C, 1D), a 2C^{hel}, 3C^{pro} és 3D^{pol} ortológok, így konzerváltabbak is. Az 1A, 2B, 3A és 3B fehérjék esetében gyakran nincs detektálható hasonlóság a közös evolúciós eredet és a funkcionális analógia ellenére sem a jelenleg ismert PV-k között. Az L és 2A fehérjék valószínűsíthetően különböző evolúciós eredettel rendelkeznek a különböző nemzetségekben (Zell, 2018).

Érdekesség, hogy két törzs, a 144/10 és 5/04, mely azonos gazdafajból, mór teknősből származik csupán 89% nt szekvencia azonossági értékkel rendelkezik a poliproteint vizsgálva, míg különböző állatfajból származó, mór teknős eredetű 144/10 és sarkantyús teknős eredetű 9/05-es törzsek közel azonosnak bizonyultak (98,8%). Erre magyarázatul szolgálhat, hogy a teknős PV-ok nem kötődnek szorosan gazdafajhoz, hanem különböző teknősfajokat is képesek hatékonyan megfertőzni.

A kodonok használata jellemző az egyes organizmusokra, a genomra ható evolúciós nyomást reprezentálhatja. Vírusok esetén ez különösen fontos, mert virális fehérjék szintéziséhez celluláris transzfer RNS-ekre (tRNS) van szükségük, alkalmazkodniuk kell a gazdasejtjük kodonhasználatához (Pintó et al., 2018). A szinoním kodonok használatának okai a genom összetételében keresendők (GC tartalom, CG tartalom a kodon harmadik nt-ban, mono- és dinukleotid összetétel). A teknősökből izolált PV törzsek kódoló régiói alacsony G+C tartalommal rendelkeznek, mely nem egyedülálló eset PV-k körében: a hepatitisz A vírusnál ez az érték 37%, humán parechovírus 1 esetében 38,5%, humán rhinovírus A2-nél 38,2%. RaV-A1 esetében szintén alacsony a GC tartalom, ez 39,1% (Pintó et al. 2018). A leginkább preferált kodonok az általunk vizsgált teknős PV törzsek esetén A-és U végűek voltak, kivéve a His kodon a 14/04 és 5/04 törzsek esetén (CAC). A virális genom dinukleotid összetétele a celluláris antivirális immunválasz kikerülésében játszik fontos szerepet, a virális RNS összetételét celluláris ún. patogén asszociált molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern; PAMP) receptorok érzékelik. HAV-nál a CpG dinukleotidok alacsony számáról feltételezik, hogy evolúciós nyomás hatására alakul ki, mely indirekten befolyásolja a kodonhasználatot. A CpG gyakoriság vélhetően a replikációs kapacitást fordított arányban befolyásolja, ezáltal a PAMP receptorok kevésbé ismerik fel az alacsony CpG tartalmú virális genomokat, így a gazdasejt immunrendszerének nyomása fontos faktor a kodonhasználat tekintetében (Jenkins and Holmes, 2003; Lukashev, 2010; Atkinson et al., 2014).

A filogenetikai törzsfák topológiáját vizsgálva az általunk jellemzett teknős PV törzsek a 3D^{pol} és P1 régió alapján készült törzsfákon is a *Mosavirus* nemzetség képviselőjével helyezkednek el egy ágon, valamint az összehasonlító elemzések alapján is e nemzetséggel mutatják a legmagasabb azonossági értékeket a vizsgált szakaszokon. Mosavírust először vadon élő rágcsáló (*Peromyscus crinitus*) bélsár mintájából mutattak ki metagenomikai módszerek segítségével (Phan et al., 2011). Elnevezése a mouse stool-associated kifejezésből ered. Azóta számos különböző élőlényben igazolták jelenlétét, például európai szalakóta, (*Coriaca garrulus*) és himalájai mormota mintáiban (*Marmota himalayana*), ami a nemzetség nagyfokú heterogenitására utal gazdaspecifitás terén (Zell et al., 2017). Genomszerveződése is hasonló a teknős PV-kéhez, továbbá a törzsfák topológiája alapján feltételezhető a két nemzetség közös evolúciós eredete.

Az *RdRp* gén nagyon konzervált genomszakasz a PV genomokon belül. Esszenciális feladatuk ellenére közismert, hogy nagyfokú hibarátával rendelkeznek az RNS genom replikációja során (Duffy, 2018). Ezzel a jelenséggel az RNS vírusok növelhetik genetikai diverzitásukat, újabb, a fertőzés és immunrendszer kikerülésének tekintetében sikeresebb utódvírusokat hozva létre. Az RNS polimeráz és helikáz szekvenciák tanulmányozása, továbbá a *Picornaviridae* család nagyon széles gazdaspektruma arra enged következtetni, hogy a vírussalád diverzifikációja az eukarióta szervezetek evolúciójának egy igen korai szakaszában történhetett (Koonin et al., 2008).

A rekombináció és moduláris evolúció fontos szerepet játszik a PV-k magas genetikai diverzitásának kialakulásában (Lukashev, 2010). Irodalmi adatok alapján a leggyakoribb rekombinációs esemény a P1 régió határát és ezáltal az L, 2A, 2B és VP4 fehérjék kódoló régióit érinti, így e fehérjék nagyfokú változatosságot mutatnak. Ez a jelenség szintén látható a teknős PV-k körében is, az L és 2A kódoló gének és a 3' UTR nem mutat hasonlóságot más, GenBank-ban fellelhető PV törzsszel, a többi teknős eredetű PV törzset leszámítva. A teknős PV-ok VP4 és 2B fehérjét kódoló régiói azonban cardiovírusok azonos régióihoz, az 5' UTR régió 65 nt hosszúságú szakasza pedig leginkább a kutya kobuvírus 1 és az Aichi vírus UTR szekvenciájához hasonlít. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a ToPV-ok mozaikos genommal rendelkeznek, mely moduláris evolúció eredménye.

A hát- és testpáncél puhulása gyakori jelenség fogságban tartott teknősök esetében. Ezt követheti anorexia, apátia és elhullás. Azonban nem minden esetben áll PV fertőzés a tünetek mögött: nem megfelelő tartás következményeként az UVB sugarak hiánya és a nem megfelelő étrend (nem megfelelő kalcium:foszfát arány, magas fehérje és oxálsav bevitel) is okozhatja ezt a jelenséget. Ezen kívül protozoa parazita fertőzés (*Hexamita parva*) okozta veseelégtelenség is kiválthatja a fenti tüneteket (Gerlach, 2004). Így a teknős nem megfelelő fejlődése esetén klinikai kivizsgálás szükséges: bakteriológiai és mikológiai vizsgálatokat is érdemes végezni a PV specifikus RT-PCR szűrővizsgálat mellett. Célravezetőbb a teknős tartását kültéri ketrecekben tartással is kiegészíteni, ajánlott a friss zöldségek és széna beiktatása a táplálékba, továbbá ásványi anyagok és vitaminok kiegészítő adagolása is szükséges (Paries et al., 2019).

Az általunk fejlesztett, a *Torchivirus* nemzetség képviselőinek specifikus kimutatását célzó diagnosztikai RT-PCR rendszert fejlesztettünk ki. A specificitás tesztelése hullőkben ismert kórokozó képességű vírusok törzsein történt (Marschang, 2011). Egyik vírustörzs esetében sem kaptunk pozitív eredményt RT-PCR-rel. A szenzitivitás tesztelése pozitív eredményt hozott, így a mintában található kis mennyiségű PV kimutatására is sikerrel alkalmazható. Mindkét primer szettel sikeresen mutattunk ki PV RNS-t szervkeverékekből is (2013/T4, 2013/T11, 2011/247), megerősítve ezzel munkacsoportunk korábbi vizsgálatait, melynek során e szervmintákban PV jelenlétét mutattuk ki molekuláris biológiai módszerek segítségével Magyarországon. Így rendszerünk nem csak vírusizolátumon, hanem szervmintákon is alkalmazható. Ezen felül minden törzset sikerrel tenyésztettünk TH-1

sejttenyészetben és hasonló CPE hatást is detektálhattunk, mint a sejtek lekerekedése. Mindezen eredmények alapján ezek a teknős eredetű PV-k egyazon nemzetségbe, a *Torchivirus* nemzetség tagjai közé tartozhatnak. A VP4, leader peptid és 3D szekvenciák magas as és nt hasonlósági értékekkel rendelkeznek egymáshoz viszonyítva. A *Rafivirus* nemzetség is tartalmaz teknős eredetű picornavírusokat, azonban a nt és as azonosság értékei messze alulmaradnak az általunk izolált törzsek értékeitől.

A diagnosztikai PCR rendszer fejlesztése során kapott szekvenciákból készített filogenetikai törzsfák mindegyikén (Leader peptid, VP4, 3D régiók) két fő leszármazási vonalat tudtunk elkülöníteni azok topológiáját tekintve. Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az egyes leszármazási vonalak, a törzsfák topológiája és az izolálás helyszíne között. A vizsgált PV törzsek három különböző európai országból származnak (Németország, Magyarország és Olaszország), ezek közül az egyik ág németországi, míg a másik ág vegyes eredetű törzseket tartalmaz. Továbbá mindkét ágon található közel azonos szekvenciájú teknős PV törzseket is. Ezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy PV törzseink genetikai kapcsolatai és a földrajzi elhelyezkedés között nincs összefüggés. Azonban egy Európát szélesebb körben lefedő vizsgálat közelebb hozhatna minket egy biztosabb alapokon álló konklúzió levonására.

A vírusizolálás szövettenyészetben hatékony módja a PV-k kimutatásának, sok esetben diagnosztikai célra is alkalmazzák. A vírusizolálás számos előnnyel rendelkezik, mint a vírus elszaporítása (így a vírus mennyisége nem limitálja a vizsgálatokat), megfigyelhető a citopátiás hatás, esetlegesen kimutatható egy másik virális patogén is a mintából. Azonban több nehézségbe is ütközhetünk a PV-k kimutatása kapcsán. Az enterovírusok például genetikailag diverz csoportot alkotnak, egyetlen sejtvonal nem alkalmazható sikerrel az egyes szerotípusok szaporítására, így többféle sejtvonal egyidejű alkalmazása lenne szükséges (Prim et al., 2013). A nem megfelelő mintatárolás is ronthatja a vírusizolálás hatékonyságát, mely fals negatív eredményhez vezethet, továbbá időigényes, míg a vírus megfelelően el tud szaporodni a sejtenyészetben.

Annak ellenére, hogy teknős PV fertőzést gyakran diagnosztizálnak teknősökben, a vírus jelenléte és az elváltozások közötti összefüggést eddigi ismereteink szerint nem vizsgálták. Az általunk vizsgált teknősök kloáka- és szájtampon mintáiból detektált PV örökítőanyag arra utalhat, hogy a PV fertőzés hosszabb lappangási idővel rendelkezik, illetve a tünetek megjelenése előtt a fertőzött állatok képesek üríteni a vírust, vagy tünetmentesek maradhatnak a fertőzés fennállása alatt. Így észrevétlenül megfertőzhetnek egész gyűjteményeket, populációkat, tekintve, hogy a teknősöket általában csoportosan tartják. Addig, míg kiderül a ToPV-k pontos kóroktani szerepe, fontos, hogy új egyed vásárlása esetén karanténozzuk az állatokat és az általunk fejlesztett diagnosztikai RT-PCR rendszer segítségével gyorsan és költséghatékonyan azonosítsuk az esetleges PV fertőzést. Vírusizolálással is megerősíthetjük a diagnózist, a két módszer együttes alkalmazása biztos diagnózist nyújthat a teknős állapatáról.

A hullók nemzetközi kereskedelme igen intenzív az egyre nagyobb népszerűségnek örvendő hullótartás miatt. Mindhárom vizsgált vírus esetén kiemelkedő fontosságú a kereskedelem, hiszen az egyes vírustörzsek terjedése akár nagy földrajzi távolságokba is lehetséges. A hullók, mint házi kedvencek iránt megnövekedett igény adhat okot illegális tenyészetek kialakulásához, melyekben ellenőrizetlen körülmények között tartják az állatokat, így utat engedve betegségek terjedésének. Ezekhez hozzájárulhatnak a nem megfelelő szállítási, esetlegesen csempészési körülmények is, mely rossz fizikai állapotot eredményez, a kórokozók terjedésének szabad utat biztosítva. Nagyon fontos lenne a megfelelő higiénés állapotok

betartása, új állatok vásárlása esetén karantén bevezetése a meglévő állományok védelme érdekében.

Az általam vizsgált kórokozók közös sajátága az RNS örökítő anyag és a velük kapcsolatos megválaszolatlan kérdések sora. Csupán reptarénavírusok esetén bizonyították a vírus kóroktani szerepét a BIBD-ben, reo-és picornavírusok esetében ennek felderítése még várat magára. Ezek megválaszolásához közelebb hoz minket a vírusok genomszekvenciájának ismerete és vizsgálata, mely nélkülözhetetlen a betegség kóroktani és járványtani szerepének tisztázásához, eredményes védekezés kialakításához. A kereskedelem ellenőrzése, a szállítási és tartási körülmények javítása szintén fontos tényező lenne a kórokozók visszaszorításában. Nem utolsó sorban hatékony diagnosztikai rendszerek rutinszerű alkalmazásával, mint a gyors és érzékeny PCR-es vizsgálatok, a vírusizolálás a hullóket érintő megbetegedések is visszaszoríthatók lennének.

6. Új tudományos eredmények

1. Magyarországi vörösfarkú boa eredetű reptarénavírust mutattunk ki és meghatároztuk közel teljes genomszekvenciáját NGS-sel. A vírustörzs szekvenciájának filogenetikai elemzésével elvégeztük rendszertani besorolását. Ez az első magyarországi reptarénavírus genomszekvencia.
2. Németországi bozótvipérából származó 47/02-es RRV törzs teljes genomszekvenciáját határoztuk meg NGS és Sanger szekvenálás segítségével. A kapott szekvencia filogenetikai vizsgálatát is elvégeztük. Ez az első teljes RRV genomszekvencia.
3. Magyarországi magángyűjtőktől és kisállatkereskedésekből származó különböző hullófajok RRV fertőzöttségét vizsgáltuk. Részleges szekvenciaadatok segítségével filogenetikai elemzéseket végeztünk, majd sikeresen izoláltunk hat RRV-t szövettenyészetben.
4. Teknős eredetű PV-t izoláltunk szövettenyészetben, melynek teljes genomszekvenciáját is meghatároztuk másik hat ToPV törzssel egyetemben. A kapott szekvenciákat elemeztük, mely rávilágított, hogy e törzsek egyéb PV-kkal csak mérsékelt hasonlóságot mutatnak. Eredményeink fényében tettünk javaslatot az ICTV felé különálló nemzetségbe sorolásukra, mely a *Torchivirus* nevet kapta. A nemzetség típusfaja a 14/04-es törzs lett *Torchivirus A* néven.
5. Teknős PV törzseink szekvenciáinak felhasználásával diagnosztikai RT-PCR rendszert fejlesztettünk ki, mely specifikusan képes kimutatni a *Torchivirus* nemzetség képviselőinek örökítőanyagát mind vírusizolátumból, mint szövetmintából, így diagnosztikai célokra is alkalmazható.

7. Összefoglalás

7.1 Összefoglalás

Munkánk során hullóket fertőző RNS vírusokkal foglalkoztunk. A hullótartás napjainkban egyre nagyobb népszerűségnek örvend szerte a világon, ennek ellenére a hullóket érintő megbetegedések kóroki háttere az esetek túlnyomó részében tisztázatlan marad. A felderített esetek kapcsán kevés szekvenciaadattal rendelkezünk, a vírus genomsekvenciájából legtöbbször csak részleges információk állnak rendelkezésünkre. Az új generációs szekvenálási technikáknak köszönhetően egyre több és több adat elérhető RNS vírusok kapcsán, mely segítségével átfogóbb képet kaphatunk a hullóket és a vírusfertőzés kóroktani összefüggéséről.

Magyarországi magángyűjtőtől származó, nőstény vörösfarkú boából kimutatott arénavírus közel teljes genomsekvenciáját sikerült meghatározni NGS és Sanger szekvenálás segítségével. A kapott szekvenciák elemzésének köszönhetően megállapíthattuk, hogy a Coldvalley névre keresztelt vírusunk a *Reptarenavirus* nemzetség tagja. Genomfelépítése megegyezik a mammaréna-és reptarénavírusokra jellemző, két szegmensre tagolódó, szimplaszálú RNS genommal, mely négy gént kódol. Továbbá a virális gének kódoló régióinak nukleotid és aminosav azonossági értékei, valamint ezek alapján készült maximum likelihood filogenetikai fák topológiája alapján a Coldvalley vírus a *Rotterdam reptarenavirus* faj képviselője.

Németországból származó bozótvipera (*Atheris squamigera*) eredetű hulló orthoreovírus (*Reptilian orthoreovirus*, RRV) izolátum teljes genomsekvenciájának meghatározását végeztük el Ion Torrent új generációs és Sanger szekvenálással. A bozótvipera reovírus az orthoreovírusokéval megegyező genomfelépítéssel rendelkezik, duplaszálú RNS örökítőanyaga tíz szegmensre tagolódik. A vírus az *Orthoreovirus* nemzetség további fajaival összehasonlítva a teknős orthoreovírussal (*Testudine orthoreovirus*, TRV) mutatta a legmagasabb azonossági értékeket nukleotid és aminosav szinten, melyet megerősítettek a filogenetikai törzsfák topológiái is. Ez az első teljes RRV genomsekvencia. Magyarországi magángyűjtőtől és kisállat kereskedésekből származó, 20 hullófaj 111 egyedét szűrtük RRV fertőzésre. Öt egyedben tudtuk kimutatni a vírust RT-PCR-es vizsgálattal, mely a konzervált RNS-függő RNS polimeráz gén 245 bázispár hosszúságú szakaszát erősítette fel. Vírusizolálással a pozitív mintákból és egy negatív mintából tudtunk vírust tenyésztani VH 2 szövettenyészetben és az orthoreovírusokra jellemző citopatogén hatást, óráissejtek képződését figyeltünk meg. A kimutatott vírusok Sanger szekvenálásával megállapíthattuk, hogy az RRV faj képviselői közé tartoznak.

Szárazföldi teknősökből származó hét teknős eredetű picornavírus (ToPV) izolátum közel teljes genomsekvenciáját határoztuk meg új generációs és Sanger szekvenálás segítségével. Az izolátumok Németországból és Magyarországról származnak. A kapott szekvenciák a PV-ra jellemző genom szerveződéssel rendelkeznek, szimplaszálú RNS genomjuk egyetlen poliproteint kódol, melyből proteolitikus hasítások révén alakulnak ki a virális fehérjék. A genom egyes régióinak vizsgálata csupán mérsékelt azonossági értékeket mutatott a *Picornaviridae* család további és a szintén teknősökből kimutatott *Rafivirus* nemzetség reprezentatív képviselőivel. Így megállapítottuk, hogy az általunk kimutatott teknős PV törzsek különálló nemzetséget alkotnak, mely a *Torchivirus* nevet kapta. A 14/04-es törzsünk a *Torchivirus A* faj típusfaja. Felhasználva az új generációs szekvenálás során kapott ToPV teljes genomsekvenciákat, specifikusan ToPV örökítőanyag kimutatására alkalmazható diagnosztikai RT-PCR rendszert fejlesztettünk ki. A primerpárok tesztelése során kettő bizonyult hatékonynak az általunk izolált vírusizolátumokon és teknős szervmintákon egyaránt. A kapott PCR termékek szekvenálását is elvégeztük.

Az általunk vizsgált vírusok közül csupán reptarénavírusok esetén nyert igazolást a boja sejtzárványos betegségben betöltött kóroktani szerepe, reo- és picornavírus esetén ez jelenleg nem bizonyított. A vírusok teljes genomszekvenciájának elemzése közelebb hozhat minket ezen összefüggés feltáráshoz, valamint eredményes védekezés kialakításához és a vírusok filogenetikai kapcsolatainak feltáráshoz is.

7.2 Summary

Our work has focused on RNA virus infections in reptiles. Exotic animal keeping become more and more popular in the world, our knowledge about viruses of reptiles is scanty. In the absence of sufficient data, diagnosis of these viruses is difficult, therefore, in most cases, the pathogenic background of infectious diseases of reptiles remains unclear. Next-generation sequencing methods can provide opportunity to collect complete genomic sequence data of the circulating virus strains, broadening our knowledge about genetic diversity, etiological role and phylogenetic relationships of the viruses causing infections.

We determined almost complete genome sequence of an arenavirus detected in a female red-tailed boa (*Boa constrictor*) that had succumbed in a private collection in Hungary. We used a combination of next-generation sequencing and Sanger sequencing methods. Based on the analysis of the obtained sequence data, the virus, tentatively named Coldvalley virus, seemed to belong to the *Reptarenavirus* genus of the *Arenaviridae* family. This classification was confirmed by the genome structure (bisegmented, single-stranded RNA) characteristic of the genera *Mammarenavirus* and *Reptarenavirus*. The pairwise comparison of the nucleotide and amino acid sequences, as well as the topology of the maximum likelihood phylogenetic trees, suggested that the newly-characterised Coldvalley virus can be classified into the species *Rotterdam reptarenavirus*.

We sequenced the the first whole genome of a *Reptilian orthoreovirus* strain isolated from a green bushviper (*Atheris squamigera*) with the combination of next-generation and Sanger sequencing. The bush viper reovirus shared several features with other orthoreoviruses, including its genome organization (double-stranded RNA genome divided into ten segments). In phylogenetic analysis, this reovirus strain was monophyletic and showed the highest nucleotide and amino acid identity values with *Testudine orthoreovirus*.

111 tissue samples from 20 exotic reptile species were collected from pet shops and private collectors in Hungary. Applying RT-PCR amplification of a short, 245 nt long sequence of the orthoreovirus *RdRp* gene five positive samples were found. Reoviruses were isolated from all the RT-PCR positive and one negative (2013/KP3) samples on VH 2 cell line and observed syncytia formation characteristic of orthoreoviruses. Based on Sanger sequencing, the detected viruses belong to the *Reptilian orthoreovirus* species.

Applying the combination of next-generation and Sanger sequencing we obtained the nearly complete genome sequence of seven picornavirus strains from different terrestrial tortoise species. The isolates were of German and Hungarian origin. The genome organization of the strains proved to be similar and displayed a typical picornavirus layout (a single stranding RNA genome encodes a single polyprotein which is co- and post-translationally processed into mature viral polypeptides). The polyprotein and each region showed low similarity to those of other picornaviruses, even to the members of *Rafivirus* genus. These results suggest that these tortoise picornaviruses belong to a distinct species in a separate genus in the family *Picornaviridae*, called *Torchivirus A*.

We developed a diagnostic RT-PCR system for rapid and specific detection of *Torchivirus* genus based on the identified seven tortoise picornavirus strain genome sequences. Two primer sets proved to be effective on both virus isolates and organ samples. We also sequenced the PCR products.

The etiological role of the investigated viruses is proven only in reptarenaviruses in bovine inclusion body disease whereas in the case of tortoise picornaviruses and reptilian orthoreoviruses is unclear. Analysis of the whole genome sequence may bring us closer to unveil this relationship as well as developing effective protection and reveal the phylogenetic relationship of these viruses.

8. A doktori kutatás eredményeinek közlései

8.1 Referált/lektorált tudományos közlemények

- Farkas, S. L., Ihasz, K., Erdelyi, K., Marschang, R. E., Papp, T., Pilis, T. & Banyai, K. (2013). Kígyók sejtzárványos betegsége. Irodalmi áttekintés. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135:751-757.
- Banyai, K., Borzak, R., Ihasz, K., Feher, E., Dan, A., Jakab, F., Papp, T., Hetzel, U., Marschang, R. E. & Farkas, S. L. (2014). Whole-genome sequencing of a green bush viper reovirus reveals a shared evolutionary history between reptilian and unusual mammalian orthoreoviruses. *Archives of Virology* 159:153-8.
- Ihasz, K., Farkas, S. L., Lengyel, G., Bányai, K. & Gál, J. (2014). Orthoreovírusok előfordulásának és genetikai diverzitásának vizsgálata egzotikus hüllőfajokban Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135:247-252.
- Farkas, S. L., Ihasz, K., Feher, E., Bartha, D., Jakab, F., Gal, J., Banyai, K. & Marschang, R. E. (2015). Sequencing and phylogenetic analysis identifies candidate members of a new picornavirus genus in terrestrial tortoise species. *Archives of Virology* 160:811-6.
- Marschang, R. E., Ihasz, K., Kugler, R., Lengyel, G., Feher, E., Marton, S., Banyai, K., Aqrawi, T. & Farkas, S. L. (2016). Development of a consensus reverse transcription PCR assay for the specific detection of tortoise picornaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 28:309-14.
- Ihasz, K., Marton, Sz., Feher E., Banyai, K. & Farkas, S. L. (2022). Genetic characterisation of a novel reptarenavirus detected in a dead pet red-tailed boa (*Boa constrictor*). *Acta Veterinaria Hungarica* 70(1): 77-82. <https://doi.org/10.1556/004.2022.00001>

Konferencia közlemények

Konferencia kiadvány

Ihasz, K., Banyai, K. & Farkas, S. L. (2021). *XXVII. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely.*

Konferencia poszterek

A Magyar Vad- és Állatkerti Állatorvosok Társasága, valamint a Fővárosi Állat- és Növénykert közös konferenciája, 2014. március 28-30. Budapest.

Ihasz K., Farkas Sz. L., Lengyel Gy., Bányai K., Gál J. The occurrence and genetic diversity of the Reptilian orthoreovirus in hungarian exotic reptile species.

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely.

Ihasz K., Farkas L. Sz., Fehér E., Bartha D., Jakab F., Gál J., Bányai K., Marchang R. E. Comparative sequence analyses of picornaviruses isolated from different terrestrial tortoise species.

8.2 Előadás magyar nyelven

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és SZIE Állatorvos-tudományi Doktori Iskola „Akadémiai Beszámoló” ülésorozat. 2014. január 28. Budapest.

Ihasz K., Farkas Sz. L., Lengyel Gy., Gál J., Rachel M. E., Bányai K. Egy németországi bozótvipérából (*Atheris squamigera*) izolált orthoreovírus törzs teljes

genomszekvenciájának meghatározása és elemzése, valamint orthoreovírusok előfordulásának és genetikai diverzitásának vizsgálata egzotikus hüllőfajokban Magyarországon.

M1. Irodalomjegyzék

- Abascal, F., Zardoya, F., Telford, M. J. **2010**. TranslatorX: Multiple Alignment of Nucleotide Sequences Guided by Amino Acid Translations. *Nucleic Acids Research* 38:W7–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>
- Abba, Y., Hasliza, H., Hazilawati, H., Omar, E. I., Yusuf, I., Faruku, B., Mohd, A. M. L., Mohamed, M. N. **2016**. In Vitro Isolation and Molecular Identification of Reptarenavirus in Malaysia. *Virus Genes* 52(5):640–50. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1345-7>
- Abbas, M. D., Marschang, R. E., Schmidt, V., Kasper, A., Papp, T. **2011**. A Unique Novel Reptilian Paramyxovirus, Four Atadenovirus Types and a Reovirus Identified in a Concurrent Infection of a Corn Snake (*Pantherophis guttatus*) Collection in Germany. *Veterinary Microbiology* 150(1–2):70–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.010>
- Ahne, W., Thomsen, I., Winton, J. **1987**. Isolation of a Reovirus from the Snake, *Python regius*. Brief Report. *Archives of Virology* 94(1–2):135–39. <https://doi.org/10.1007/BF01313731>
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. **1990**. Basic Local Alignment Search Tool. *Molecular Biology* 215:403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Argenta, F.F., Hepojoki, J., Smura, T., Szirovicza, L., Hammerschmitt, M. E., Driemeier, D., Kipar, A., Hetzel, U. **2020**. Identification of Reptarenaviruses, Hartmaniviruses and a Novel Chuvirus in Captive Brazilian Native Boa Constrictors with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology* 94(11):1–19. <https://doi.org/10.1101/2020.01.02.893420>
- Atkinson, N. J., Witteveldt, J., Evans, D. J., Simmonds, P. **2014**. The Influence of CpG and UpA Dinucleotide Frequencies on RNA Virus Replication and Characterization of the Innate Cellular Pathways Underlying Virus Attenuation and Enhanced Replication. *Nucleic Acids Research* 42(7):4527–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gku075>
- Attoui, H., Mertens, P. H., Bencel, H., Belaganahalli, J. S., Bergoin, C. P., Brussaard, J. D., Ciarlet, C. M., del Vas, M., Dermody, T. S., Dormitzer, P. R., Duncan, R., Fang, Q., Graham, R., Guglielmi, K. L., Harding, R. M., Hillman, B., Makkay, A., Marzachi, A., Matthjssens, J., Milne, R. G., Jafaat, F., Mori, H., Noordeloos, A. A., Omura, T., Patton, J. T., Tao, S., Maan, M., Stoltz, D., Suzuki, N., Upadhyaya, N. M., Wei, C., Zhou, H. **2011**. Family *Reoviridae*. Pp. 514–54 in *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. San Diego: Elsevier.
- Benavente, J., Martínez-Costas J. **2007**. Avian Reovirus: Structure and Biology. *Virus Research* 123(2):105–19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.09.005>
- Blahak, S., I. Ott, E. Vieler. **1995**. Comparison of 6 Different Reoviruses of Various Reptiles. *Veterinary Research* 26(5–6):470–76. [https://doi.org/10.1016/0928-4249\(96\)82463-1](https://doi.org/10.1016/0928-4249(96)82463-1)
- Blom, N., Hansen, J., Blaas, D., Brunak, S. **1996**. Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks. *Protein Science* 5(11):2203–2216
- Bodewes, R., Kik, M. J. L., Raj, V. S., Schapendonk, C. M. E., Haagmans, B. L., Smits, S. L., Osterhaus, A. D. M. E. **2013**. Detection of Novel Divergent Arenaviruses in Boid Snakes with Inclusion Body Disease in The Netherlands. *Journal of General Virology* 94(part6):1206–10. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051995-0>
- Carlisle-Nowak, M. S., Sullivan, N., Carrigan, M., Knight, C., Ryan, C., Jacobson, E. R. **1998**.

- Inclusion Body Disease in Two Captive Australian Pythons (*Morelia spilota variegata* and *Morelia spilota spilota*). *Australian Veterinary Journal* 76(2):98–100. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb14535.x>
- Chang, L. W., Jacobson E. R. **2010**. Inclusion Body Disease, a Worldwide Infectious Disease of Boid Snakes: A Review. *Journal of Exotic Pet Medicine* 19(3):216–25. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2010.07.014>
- Choi, Kyung. **2012**. Viral Polymerases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726:267–304. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_12
- Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands D. J., Brown, F. **1987**. Myristylation of Picornavirus Capsid Protein VP4 and Its Structural Significance. *Nature* 327:482–86. <https://doi.org/10.1038/327482a0>
- Chua, B. K., Crameri, G., Hyatt, A., Yu, M., Tompang, M. R., Rosli, J., McEachern, J., Crameri, S., Kumarasamy, V., Eaton, B. T., Wang, L. F. **2007**. A Previously Unknown Reovirus of Bat Origin Is Associated with an Acute Respiratory Disease in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27):11424–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>
- Chua, K. B., Voon, K., Crameri, G., Tan, H. S., Rosli, J., McEachern, J. A., Suluraju, S., Yu, M., Wang, L. F. **2008**. Identification and Characterization of a New Orthoreovirus from Patients with Acute Respiratory Infections. *PLoS ONE* 3(11):1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003803>
- Ciechonska, M., Duncan, R. **2014**. Reovirus FAST Proteins: Virus-Encoded Cellular Fusogens. *Trends in Microbiology* 22(12):715–24. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.08.005>
- Dandár, E., Borzák, R., Bányai, K., Farkas, S. L. **2012**. Hüllök, Madarak És Emlősök Orthoreovirus Okozta Megbetegedései. *Magyar Állatorvosok Lapja* 134:564–73
- Dandár, E., Huhtamo, E., Farkas, S. L., Oldal, M., Jakab, R., Vapalahti, O., Bányai, K. **2014**. Complete Genome Analysis Identifies Tvärminne Avian Virus as a Candidate New Species within the Genus Orthoreovirus. *Journal of General Virology* 95(part 4):898–904. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060699-0>
- Darke, S., Marschang, R. E., Hetzel, U., Reinacher, M. **2014**. Experimental Infection of Boa Constrictor with an Orthoreovirus Isolated from a Snake with Inclusion Body Disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 45(2):433–36. <https://doi.org/10.1638/2013-0194R.1>
- Dawe, S., Boutilier, J., Duncan, R. **2002**. Identification and Characterization of a Baboon Reovirus-Specific Nonstructural Protein Encoded by the Bicistronic S4 Genome Segment. *Virology* 304(1):44–52. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1725>
- Day, J. M., Pantin-Jackwood, M. J., Spackman, E. **2007**. Sequence and Phylogenetic Analysis of the S1 Genome Segment of Turkey-Origin Reoviruses. *Virus Genes* 35(2):235–42. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0044-1>
- Day, J. M. **2009**. The Diversity of the Orthoreoviruses: Molecular Taxonomy and Phylogenetic Divides. *Infection, Genetics and Evolution* 9:390–400. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.011>
- Dhamotharan, K., Vendramin, N., Markussen, M., Wessel, O., Cuenca, A., Nyman, I. B., Olsen, A. B., Tengs, T., Dahle, M. K., Rimstad, E. **2018**. Molecular and Antigenic Characterization of Piscine Orthoreovirus (PRV) from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Viruses* 10(4):1–16. <https://doi.org/10.3390/v10040170>

- 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* 9:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>
- Duffy, S. **2018**. Why Are RNA Virus Mutation Rates so Damn High? *PLoS Biology* 16(8):1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Duncan, R., Chen, Z., Walsh, S., Wu, S. **1996**. Avian Reovirus-Induced Syncytium Formation Is Independent of Infectious Progeny Virus Production and Enhances the Rate, but Is Not Essential, for Virus-Induced Cytopathology and Virus Egress. *Virology* 224(2):453–64. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0552>
- Duncan, R. **1999**. Extensive Sequence Divergence and Phylogenetic Relationships between the Fusogenic and Nonfusogenic Orthoreoviruses: A Species Proposal. *Virology* 260(2):316–28. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9832>
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., Stoltz, D. **2004**. Reptilian Reovirus: A New Fusogenic Orthoreovirus Species. *Virology* 319(1):131–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.025>
- Drury, S., Gough, R., Welchman, D. **2002**. Isolation and identification of a reovirus from a lizard, *Uromastix hardwickii*, in the United Kingdom. *The Veterinary Record* 151:637–8. <https://doi.org/10.1136/vr.151.21.637>
- Fleming, G. J., Heard, D. J., Jacobson, E. J., Buergelt, C. **2003**. Cytoplasmic Inclusions in Corn Snakes, *Elaphe guttata*, Resembling Inclusion Body Disease of Boid Snakes. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 13(2):18–22. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.13.2.18>
- Gál, J., Mándoki, M., Rusvai, M., Tavasi, J., Farkas, S. L. **2009**. Reovirus Related Pathological Lesions and Consequential Death in Rough Green Snake (*Opheodrys aestivus*). Proceedings 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary.
- Gerlach, J. **2004**. Effects of diet on the systematic utility of the tortoise carapace. *African Journal of Herpetology* 53:77–85. <https://doi.org/10.1080/21564574.2004.9635499>
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. E., Blinov V. M., Koonin E. V. **1989**. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases: A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Letters* 243(2): 103-114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80109-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80109-7)
- Gorbalenya A. E., Koonin E. V., Wolf Y.I. **1990**. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Letters* 262(1):145-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80175-i](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80175-i)
- 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 Letters* 288(1-2):201-5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81034-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81034-6)
- Grande-Perez, A., Martin, V., Moreno, H., Torre, J. C. **2016**. Arenavirus Quasispecies and Their Biological Implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 392:231–76. https://doi.org/10.1007/82_2015_468
- Grande, A., Rodriguez, E., Costas, C., Everitt, E., Benavente, J. **2000**. Oligomerization and Cell-Binding Properties of the Avian Reovirus Cell-Attachment Protein SigmaC. *Virology*

274(2):367–77. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0473>

- Gravendyck, M., Ammermann, P., Marschang, R. E., Kaleta, E. F. **1998**. Paramyxoviral and Reoviral Infections of Iguanas on Honduran Islands. *Journal of Wildlife Diseases* 34(1):33–38. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.1.33>
- Gummersheimer S. L., Snyder A. J., Danthi P. **2021**. Control of Capsid Transformations during Reovirus Entry. *Viruses* 13(2):153. <https://doi.org/10.3390/v13020153>
- Hall, T. A. **1999**. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
- Hämmerle, T., Molla, A., Wimmer, E. **1992**. Mutational Analysis of the Proposed FG Loop of Poliovirus Proteinase 3C Identifies Amino Acids That Are Necessary for 3CD Cleavage and Might Be Determinants of a Function Distinct from Proteolytic Activity. *Journal of Virology*. 66(10):6028–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.10.6028-6034.1992>
- Hepojoki, J., Kipar, A., Korzyukov, Y., Bell-Sakyi, L., Vapalahti, O., Hetzel, U. **2015a**. Replication of Boid Inclusion Body Disease-Associated Arenaviruses Is Temperature Sensitive in Both Boid and Mammalian Cells. *Journal of Virology* 89(2):1119–28. <https://doi.org/10.1128/jvi.03119-14>
- Hepojoki, J., Salmenperä, P., Sironen, T., Hetzel, U., Korzyukov, Y., Kipar, A., Vapalahti, O. **2015b**. Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology* 89(16):8657–60. <https://doi.org/10.1128/jvi.01112-15>
- Hepojoki, J., Hepojoki, S., Smura, T., Szirovicza, L., Dervas, E., Prähauser, B., Nufer, L., Schraner, E. M., Vapalahti, O., Kipar, A., Hetzel, U. **2018**. Characterization of Haartman Institute Snake Virus-1 (HISV-1) and HISV-like Viruses—The Representatives of Genus Hartmanivirus, Family *Arenaviridae*. *PLoS Pathogens* 14(11):1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007415>
- Hetzel, U., Sironen, T., Laurinmaki, P., Liljeroos, L., Patjas, A., Henttonen, H., Vaheri, A., Artelt, A., Kipar, A., Butcher, S. J., Vapalahti, O., Hepojoki, J. **2013**. Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology* 87(20):10918–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.01123-13>
- Heuser W, Kaleta E.F., Giesow K., Keil G. M., Knowles N. **2010**. Genome Sequence of Virus ‘X’, a Picornavirus Isolated from a Spur-Thighed Tortoise (*Testudo graeca*). Proceedings of EUROPIE XVI meeting of the European Study Group on the molecular biology of picornaviruses, St. Andrews, p 147
- Jenkins, G. M., Holmes, E. C. **2003**. The Extent of Codon Usage Bias in Human RNA Viruses and Its Evolutionary Origin. *Virus Research* 92:1–7. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00309-x)
- Jiang, P., Liu, Y., Ma, H. C., Paul, A. V., Wimmer, E. **2014**. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78(3):418–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00012-14>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Havas-Stones, 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. *Bioinformatics* 28:1647–49. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

- Keller, S., Hetzel, U., Sironen, T., Korzyukov, Y., Vapalahti, O., Kipar, A., Hepojoki, J. **2017**. Co-Infecting Reptarenaviruses Can Be Vertically Transmitted in Boa Constrictor. *PLoS Pathogens* 13(1):1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006179>
- Kloet, S. R. **2008**. Sequence Analysis of Four Double-Stranded RNA Genomic Segments Reveals an Orthoreovirus with a Unique Genotype Infecting Psittaciformes. *Avian Diseases* 52(3):480–86. <https://doi.org/10.1637/8212-011908-reg.1>
- Kolesnik, E., Obiegala, A., Marschang, R. E. **2017**. Detection of *Mycoplasma* Spp., Herpesviruses, Topiviruses, and Ferlaviruses in Samples from Chelonians in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29(6):820–32. <https://doi.org/10.1177/1040638717722387>
- Koonin, E.V. **1991**. Genome replication/expression strategies of positive-strand RNA viruses: A simple version of a combinatorial classification and prediction of new strategies. *Virus Genes* 5: 273–281. <https://doi.org/10.1007/BF00568977>
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nagasaki, K., Dolja, V. V. **2008**. The Big Bang of Picorna-like Virus Evolution Antedates the Radiation of Eukaryotic Supergroups. *Nature Reviews Microbiology* 6(12):925–39. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2030>
- Korzyukov, Y., Hetzel, U., Kipar, A., Vapalahti, O., Hepojoki, Y. **2016**. Generation of Anti-Boa Immunoglobulin Antibodies for Serodiagnostic Applications, and Their Use to Detect Anti-Reptarenavirus Antibodies in Boa Constrictor. *PLoS ONE* 11(6):1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158417>
- Kristensen, T., Belsham, G. J. **2019**. Identification of Plasticity and Interactions of a Highly Conserved Motif within a Picornavirus Capsid Precursor Required for Virus Infectivity. *Scientific Reports* 9(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48170-9>
- Kugler, R., Marschang, R. E., Ihász, K., Lengyel, Gy., Jakab, F., Bányai, K., Farkas, S. L. **2016**. Whole Genome Characterization of a Chelonian Orthoreovirus Strain Identifies Significant Genetic Diversity and May Classify Reptile Orthoreoviruses into Distinct Species. *Virus Research* 215:94–98. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.02.005>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. **2018**. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547–49. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lamirande, E. W., Nichols, D., Owens, J. W., Gaskin, J. M., Jacobson, El. R. **1999**. Isolation and Experimental Transmission of a Reovirus Pathogenic in Ratsnakes (*Elaphe* Species). *Virus Research* 63(1–2):135–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00067-2)
- Landolfi, J. A., Terio, K. A., Kinsel, M. J., Langan, J., Zachariah, T. T., Childress, A. L., Wellehan, J. F. **2010**. Orthoreovirus Infection and Concurrent Cryptosporidiosis in Rough Green Snakes (*Opheodrys aestivus*): Pathology and Identification of a Novel Orthoreovirus Strain via Polymerase Chain Reaction and Sequencing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22(1):37–43. <https://doi.org/10.1177/104063871002200106>
- Larsson, A. **2014**. AliView: A Fast and Lightweight Alignment Viewer and Editor for Large Datasets. *Bioinformatics* 30:3276–78. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lau S.K., Woo P.C., Yip C.C., Choi G.K., Wu Y., Bai R., Fan R.Y., Lai K.K., Chan K.H., Yuen K.Y. **2012**. Identification of a novel feline picornavirus from the domestic cat. *Journal of Virology* 86:395–405. <https://doi.org/10.1128/JVI.06253-11>
- Leland, M. Michelle, Gene B. Hubbard, Henry T. Sentmore, Kenneth F. Soike, and Julia K. Hilliard. **2000**. Outbreak of Orthoreovirus-Induced Meningoencephalomyelitis in

Baboons. *Comparative Medicine* 50(2):199–205.

- Lukashev, A. N. **2010**. Recombination among Picornaviruses. *Reviews in Medical Virology* 20(5):327–37. <https://doi.org/10.1002/rmv.660>
- Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T., Buchmeier, M. J., Calisher, C. H., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, C. S., de la Torre, J. C., Delwart, E., DeRisi, J. L., Di Bello, P. L., Di Serio, F., Digiaro, M., Dolja, V. V., Drosten, C., Druciarek, T., Du, J., Ebihara, H., Elbeaino, T., Gergerich, R. C., Gillis, A. N., Gonzalez, J. P. J., Haenni, A., Hepojoki, J., Hetzel, U., Hồ, T., Hóng, N., Jain, R. K., van Vuren, P. J., Jin, Q., Jonson, M. G., Junglen, S., Keller, K. E., Kemp, A., Kipar, A., Kondov, N. O., Koonin, E. V., Kormelink, R., Korzyukov, Y., Krupovic, Donoghue, M., Lambert, A. J., Laney, A. G., LeBreton, M., Lukashevich, I., Marklewitz, M., Markotter, W., Martelli, G. V., Martin, R. R., Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H. P., Navarro, B., Ng, T. F. F., Teixeira Nunes, M. R., Palacios, G., Pawęska, J. T., Peters, C. J., Plyusnin, A., Radoshitzky, S. R. R., Romanowski, V., Salmenperä, P., Salvato, M. S., Sanfaçon, H., Sasaya, T., Schmaljohn, C., Schneider, B. S., Shirako, Y., Siddell, S., Sironen, T. A., Stenglein, M. D., Storm, N., Sudini, H., Tesh, R. B., Tzanetakis, I. E., Uppala, M., Vapalahti, O., Vasilakis, N., Walker, P., Wáng, G., Wáng, L., Wáng, Y., Wèi, T., Wiley, M. R., Wolf, Y. I., Wolfe, N. D., Wú, Z., Xú, W., Yang, L., Yāng, Z., Yeh, S. D., Zhāng, Y. Z., Zhèng, Y., Zhou, X., Zhū, C., Zirkel, X., Kuhn, J. H. **2018**. Taxonomy of the Family *Arenaviridae* and the Order *Bunyavirales*: Update 2018. *Archives of Virology* 163(8):2295–2310. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>
- Markussen, T., Dahle, M. K., Tengs, T., Løvoll, O. V., Finstad, M., Wiik-Nielsen Søren Grove, C. R., Lauksund, S., Robertsen, B., Rimstad, E. **2013**. Sequence Analysis of the Genome of Piscine Orthoreovirus (PRV) Associated with Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS One* 8(7). <https://doi.org/10.1371/annotation/746a9036-0e54-4a9a-ab16-adb108a3a227>
- Marschang, R. E., Donahoe, S., Manvell, R., Lemos-Espinal, J. **2002**. Paramyxovirus and Reovirus Infections in Wild-Caught Mexican Lizards (*Xenosaurus* and *Abronia* Spp.). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(4):317–21. [https://doi.org/10.1638/10427260\(2002\)033\[0317:PARIIW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/10427260(2002)033[0317:PARIIW]2.0.CO;2)
- Marschang, R. E., Papp, T. **2009**. Isolation and Partial Characterization of Three Reoviruses from Lizards. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 19(1):13–15. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.19.1.13>
- Marschang, R. E. **2011**. Viruses Infecting Reptiles. *Viruses* 3(11):2087–2126. <https://doi.org/10.3390/v3112087>
- Martin, D. P., Murrell, P., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. M. 2015. RDP4: Detection and Analysis of Recombination Patterns in Virus Genomes. *Virus Evolution* 1(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>
- Muhire, B. M., Varsani, A., Martin, D. P. **2014**. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE* 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Ng, T. F. F., Wellehan, J. F. X., Coleman, J. K., Kondov, N. O., Deng, X., Waltzek, T. B., Reuter, G., Knowles, N. J., Delwart, E. **2015**. A Tortoise-Infecting Picornavirus Expands the Host Range of the Family *Picornaviridae*. *Archives of Virology* 160(5):1319–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2366-6>
- Ogasawara, Y., Ueda, H., Kikuchi, N., Kirisawa, K. **2015**. Isolation and Genomic Characterization of a Novel Orthoreovirus from a Brown-Eared Bulbul (*Hypsipetes*

- amaurotis*) in Japan. *Journal of General Virology* 96(7):777–1786. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000110>
- Olsen, A. B., Hjortaas, M., Tengs, T., Hellberg, H., Johansen, R. **2015**. First Description of a New Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss (walbaum)*) Similar to Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) and Detection of a Gene Sequence Related to Piscine Orthoreovirus (PRV). *PLoS ONE* 10(7):1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131638>
- Orós, J., Tucker, S., Jacobson, E. R. **1998**. Inclusion Body Disease in Two Captive Boas in the Canary Islands. *Veterinary Record* 143(10):283–85. <https://doi.org/10.1136/vr.143.10.283>
- Palacios, G., Lovoll, M., Tengs, T., Hornig, M., Hutchison, S., Hui, J., Kongtorp, R. T., Savji, N., Bussetti, A. V., Solovyov, A., Kristoffersen, A. B., Celone, C., Street, C., Trifonov, C., Hirschberg, D. L., Rabadan, R., Egholm, M., Rimstad, E., Lipkin, W. I. **2010**. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus. *PLoS ONE* 5(7):3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011487>
- Palacios, G., Wellehan, J. F. X., Raverty, S., Bussetti, A. V., Hui, J., Savji, N., Nollens, H. H., Lambourn, D., Celone, C., Hutchison, S., Calisher, C. H., Nielsen, O., Lipkin, W. I. **2011**. Discovery of an Orthoreovirus in the Aborted Fetus of a Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*). *Journal of General Virology* 92(11):2558–65. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032649-0>
- Paries, S., Funcke, S., Kershaw, O., Failing, K., Lierz, M. **2019**. The Role of Virus ‘X’ (Tortoise Picornavirus) in Kidney Disease and Shell Weakness Syndrome in European Tortoise Species Determined by Experimental Infection. *PLoS ONE* 14(2):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210790>
- Phan, T. G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R. K., Lipton, H. L., Delwart, E. L. **2011**. The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. *PLoS Pathogens* 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002218>
- Pintó, R. M., Pérez-Rodríguez, F. J., D’andrea, L., de Castellarnau, M., Guix, S., Bosch, A. **2018**. Hepatitis a Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8(10):1–11. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A031781>
- Pontremoli, C., Forni, D., Sironi, M. **2019**. Arenavirus Genomics: Novel Insights into Viral Diversity, Origin, and Evolution. *Current Opinion in Virology* 34:18–28. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.11.001>
- Prim, N., Rodríguez, G., Margall, N., Cuerp, M. D., Trallero, G., Rabella, N. **2013**. Combining Cell Lines to Optimize Isolation of Human Enterovirus From Clinical Specimens: Report of 25 Years of Experience. *Journal of Medical Virology* 85(1):116–20. <https://doi.org/10.1002/jmv.23426>
- Pritchard, L. I., Chua, K. B., Cummins, D., Hyatt, A., Cramer, G., Eaton, B. T., Wang, L. F. **2006**. Pulau Virus; a New Member of the Nelson Bay Orthoreovirus Species Isolated from Fruit Bats in Malaysia. *Archives of Virology* 151(2):229–39. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0644-4>
- Racaniello, V. R. **2007**. *Picornaviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Strauss, S. E. editors. *Fields Virology*. 5th ed Lippincott Williams & Wilkins; USA. pp. 795–838.
- Radoshitzky, S. R., Bào, Y., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clawson, A. N., Clegg, C. S., DeRisi, J. L., Emonet, S., Gonzalez, J. P., Kuhn, J. H., Lukashevich, I. S., Peters, C. J.,

- Romanowski, V., Salvato, M., Stenglein, M. D., de la Torre, J. C. **2015**. Past, Present, and Future of Arenavirus Taxonomy. *Archives of Virology* 160(7):1851–74. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2418-y>
- Radoshitzky, S. R., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clegg, J. C. S., Gonzalez, J. P. J., Günther, S., Hepojoki, J., Kuhn, J., Lukashevich, I., Romanowski, V., Salvato, M. S., Sironi, M., Stenglein, M. S., De La Torre, J. C. **2019**. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Arenaviridae*. *Journal of General Virology* 100(8):1200–1201. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001280>
- Raymond, J. T., Garner, M. M., Nordhausen, R. W., Jacobson, E. R. **2001**. A Disease Resembling Inclusion Body Disease of Boid Snakes in Captive Palm Vipers (*Bothriechis marchi*).” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13(1):82–86. <https://doi.org/10.1177/104063870101300118>
- Reinisch K. M., Nibert M. L., Harrison S. C. **2000**. Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404(6781):960–7. <https://doi.org/10.1038/35010041>
- Rivera, S., Wellehan, J. F. X., McManamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-Figueroa, O., Marlari, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., Frasca, S. **2009**. Systemic Adenovirus Infection in Sulawesi Tortoises (*Indotestudo forsteni*) Caused by a Novel Siadenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21(4):415–26. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1601-7>
- Rossmann, M. G., He, Y., Kuhn, R. J. **2002**. Picornavirus-Receptor Interactions.” *Trends in Microbiology* 10(7):324–31. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02383-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02383-1)
- Rueckert, R. R., Wimmer, E. **1984**. Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins. *Journal of Virology* 50(3):957–59. <https://doi.org/10.1128/jvi.50.3.957-959.1984>
- Russo, A. G., Eden, J. S., Tuipulotu, D. E., Shi, M., Selechnik, D., Shine, R., Rollins, L. E., Holmes, E. C., White, P. A. **2018**. Viral Discovery in the Invasive Australian Cane Toad (*Rhinella marina*) Using Metatranscriptomic and Genomic Approaches. *Journal of Virology* 92(17):1–18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00768-18>
- Sabin, A. **1959**. Reoviruses: A New Group of Respiratory and Enteric Viruses Formerly Classified as ECHO Type 10 Is Described. *Science*. 130:1387–89. <https://doi.org/10.1126/science.130.3386.1387>
- Salsman, J., Top, D., Boutilier, J., Duncan, R. **2005**. Extensive Syncytium Formation Mediated by the Reovirus FAST Proteins Triggers Apoptosis-Induced Membrane Instability. *Journal of Virology* 79(13):8090–8100. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8090-8100.2005>
- Sauvage, V., Gouilh, M. A., Cheval, J., Muth, E., Pariente, K., Burguiere, A., Caro, V., Manuguerra, J. C., Eloit, M. **2012**. A Member of a New Picornaviridae Genus Is Shed in Pig Feces. *Journal of Virology* 86(18):10036–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.00046-12>
- Schumacher, J., Jacobson, E. R., Homer, B. L., Gaskin, J. M. **1994**. Inclusion Body Disease in Boid Snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25(4):511–24
- Shi, M., Lin, X. D., Tian, J. H., Chen, L. J., Chen, X., Li, C. X., Qin, X. C., Li, J., Cao, J. P., Eden, J. S., Buchmann, J., Wang, W., Xu, J., Holmes, E. C., Zhang, J. Z. **2016**. Redefining the Invertebrate RNA Virosphere. *Nature* 540(7634):539–43. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- Shi, M., Lin, X. D., Chen, X., Tian, J. H., Chen, J. J., Li, K., Wang, K., Eden, J. S., Shen, J. J., Liu, L., Holmes, E. D., Zhang, Y., Z. **2018**. The Evolutionary History of Vertebrate RNA Viruses. *Nature* 556(7700):197–202. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0012-7>

- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, Y., O'Hara, D., Holmes, I., Duncan, R. **2002**. Sequential Partially Overlapping Gene Arrangement in the Tricistronic S1 Genome Segments of Avian Reovirus and Nelson Bay Reovirus: Implications for Translation Initiation. *Journal of Virology* 76(2):609–18. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.2.609-618.2002>
- Stenglein, M. D., Sanders, C., Kistler, A. L., Ruby, J. G., Franco, J. Y., Reavill, D. R. R., Dunker, F., DeRisi, J. L. **2012**. Identification, Characterization, and in Vitro Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. *MBio* 3(4):1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-12>
- Stenglein, M. D., Jacobson, E. R., Chang, L. W., Sanders, C., Hawkins, M. G., Guzman, D. S. M., Drazenovich, T., Dunker, F., Kamaka, E. K., Fisher, D., Reavill, D. R. R., Meola, L. F., Levens, G., DeRisi, J. R. **2015**. Widespread Recombination, Reassortment, and Transmission of Unbalanced Compound Viral Genotypes in Natural Arenavirus Infections. *PLoS Pathogens* 11(5):1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004900>
- Stenglein, M. D., Guzman, D. S. M., Garcia, V. E., Layton, M. L., Hoon-Hanks, L. L., Boback, S. M., Keel, M. K., Drazenovich, T., Hawkins, M. G., DeRisi, J. L. **2017**. Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. *Journal of Virology* 91(15):1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.00451-17>
- Sun, D., Chen, S., Cheng, A., Wang, M. **2016**. Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses* 8(3), 82. <https://doi.org/10.3390/v8030082>
- Takacs, M. **2011**. Klinikai és járványügyi virológia, Vox Medicina Kiadó Kft.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. **2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725–29. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thalmann, C. M., Cummins, D. M., Yu, M., Lunt, R., Pritchard, L. I., Hansson, E., Cramer, S., Hyatt, A., Wang, L. F. **2010**. Broome Virus, a New Fusogenic Orthoreovirus Species Isolated from an Australian Fruit Bat. *Virology* 402(1):26–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.048>
- Turchetti, A. P., Tinoco, H. P., Campos Cordeiro Malta, M., Lola Teixeira da Costa, M. E., Tinoco Pessanha, A., Azevedo Soave, S., Paixão, T. A., Santos, R. **2013**. Inclusion Body Disease in a *Corallus hortulanus*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 6(1):15–18
- Vancraeynest, D., Pasmans, F., Martel, A., Chiers, K., Meulemans, G., Mast, J., Zwart, R., Ducatelle, R. **2006**. Inclusion Body Disease in Snakes: A Review and Description of Three Cases in Boa Constrictors in Belgium. *Veterinary Record* 158(22):757–61. <https://doi.org/10.1136/vr.158.22.757>
- Vreede, F. T., Cloete, M., Napier, G. B., Van Dijk, A. A., Viljoen, G. J. **1998**. Sequence-Independent Amplification and Cloning of Large DsRNA Virus Genome Segments by Poly(DA)-Oligonucleotide Ligation. *Journal of Virological Methods* 72(2):243–47. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00031-7)
- Van Vuren, P. J., Wiley, M., Palacios, G., Storm, N., McCulloch, S., Markotter, W., Birkhead, M., Kemp, A., Paweska, J. T. **2016**. Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* 8(3):1–25. <https://doi.org/10.3390/v8030065>
- Wellehan, J. F. X., Childress, A. L., Marschang, R. E., Johnson, A. J., Lamirande, E. W., Roberts, J. F., Vickers, M. L., Gaskin, J. M., Jacobson, E. R. **2009**. Consensus Nested PCR

Amplification and Sequencing of Diverse Reptilian, Avian, and Mammalian Orthoreoviruses. *Veterinary Microbiology* 133(1–2):34–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.011>

- Windbichler, K., Michalopoulou, E., Palamides, P., Pesch, T., Jelinek, C., Vapalahti, O., Kipar, A., Hetzel, U., Hepojoki, J. **2019**. Antibody Response in Snakes with Boid Inclusion Body Disease.” *PLoS ONE* 14(9):1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221863>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Choi, G. K. Y., Huang, Y., Teng, J. L. L., Tsoi, H. W., Tse, H., Yeung, M. L., Chan, K. H., Jin, D. Y., Yuen, K. Y. **2012**. Natural Occurrence and Characterization of Two Internal Ribosome Entry Site Elements in a Novel Virus, Canine Picodistrovirus, in the Picornavirus-Like Superfamily. *Journal of Virology* 86(5):2797–2808. <https://doi.org/10.1128/jvi.05481-11>
- Wozniak, E., McBride, J., Denardo, D., Tarara, R., Wong, V., Osburn, B. **2000**. Isolation and Characterization of an Antigenically Distinct 68-Kd Protein from Nonviral Intracytoplasmic Inclusions in Boa Constrictors Chronically Infected with the Inclusion Body Disease Virus (IBDV: *Retroviridae*). *Veterinary Pathology* 37(5):449–59. <https://doi.org/10.1354/vp.37-5-449>
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. **2017**. Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*. *Journal of General Virology* 98(10):2421–2422. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
- Zell, R. **2018**. *Picornaviridae*—the Ever-Growing Virus Family. *Archives of Virology* 163(2):299–317. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3614-8>

M2. Mellékletek

1. táblázat. A diagnosztikai célú RT-PCR rendszer fejlesztéséhez felhasznált minták eredete és kórtörténetük.

Törzs	Gazdafaj	Minta	Ország	Kórtörténet
659/00	<i>Testudo hermanni</i>	nyelv	-	Herpeszvírus PCR pozitív.
2041/00	<i>Testudo horsfieldi</i>	-	-	Herpeszvírust találtak a tartó csoportjában.
5/03	<i>Pyxis arachnoides</i>	tüdő	-	Giessen/Hetzel (2401/02)-től származik.
26/1-2/03	<i>Testudo marginata</i>	phariengeális tampon	Olaszország	Indiai csillagteknős került a csoportba, ezt követően elhullott.
31/03	<i>Testudo hermanni</i>	nyelv	Németország	Giessen/Hetzel (786/03)-től származik.
2/4/04	<i>Ismeretlen teknősfaj</i>	-	Németország	Hirtelen elhullás. Boncolás során kövér máj, diffúz vakuoláris hepatocelluláris zsírszövet degeneráció.
5/04	<i>Testudo graeca</i>	-	Németország	<i>Mycoplasma agassizii</i> PCR pozitív.
14/04	<i>Testudo hermanni</i>	kloáka tampon	Németország	-
15/04	<i>Testudo graeca</i>	nyelv	Németország	8 egyedből 4 tamponmintája pozitív. Klinikailag egészséges állatok, de miután eladták őket, új helyükön elpusztultak. Herpesz-és ranavírus PCR negatív.
16/04	<i>Testudo hermanni boettgeri</i>	-	Németország	A gyűjteménybe érkezés után egy évvel hirtelen pusztult el, páncél puhulás, ascites, tüdőszövet keményedés. Herpesz-és ranavírus PCR negatív.
17/04	<i>Testudo hermanni boettgeri</i>	szív	Németország	Páncél felpuhulás, vese világos, széteső szerkezetű. Vírus izolálva a veséből, vékonybélből, szívből, tüdőből és nyelvből.
9/05	<i>Centrochelys sulcata</i>	szájtampon	Olaszország	Herpeszvírus PCR negatív.
25/09	<i>Testudo marginata</i>	-	Németország	Klinikailag egészséges.
19/10	<i>Testudo horsfieldii</i>	nyelv tampon	Németország	Piros, puha páncél, sárga plakkok a szájüregben. Herpesz-és ranavírus PCR negatív.
124/1-2-4-5-6-7/10	<i>Testudo graeca</i>	orális és kloáka tampon	Németország	Klinikailag egészséges. Herpesz-és ranavírus PCR negatív.
36/10	<i>Testudo marginata</i>	orális és kloáka tampon	Németország	Gasztritisz, obstpáció. A partner állat elhullása után picornavírus PCR pozitív, herpesz-és ranavírus PCR negatív.
144/10	<i>Testudo graeca</i>	orális tampon	Olaszország	Konjunktivitisz és glosszitisz.
130/12	<i>Stigmochelys pardalis</i>	fej	Olaszország	Herpesz-, rana- és adenovírus PCR pozitív.
2013/T4	<i>Testudo hermanni</i>	belső szervek	Magyarország	Számos teknőssel egyetemben fiatalon elpusztult a kisállatkereskedésben.

M2.1 Az ábrák jegyzéke

- 1. ábra.** Az *Arenaviridae* család képviselőnek RNS-függő RNS polimeráz génjének szekvenciája alapján készült maximum-likelihood filogenetikai törzsfá; jól elkülöníthetőek az egyes nemzetségek: *Antennavirus* nemzetség (kék pont), *Hartmanivirus* nemzetség (zöld pont), *Mammarenavirus* nemzetség (piros pont), *Reptarenavirus* nemzetség (sárga pont). A fá LG+G modellel készült, 1000-es bootstrap értékkel (Radoshitzky et al., 2019). 11
- 2. ábra.** University of Helsinki vírus (UHV) krioelektronmikroszkópos (A) és negatív festésű elektronmikroszkópos (B) felvétele (Radoshitzky et al., 2019). 12
- 3. ábra.** Az *Arenaviridae* család genomszerveződésének sematikus ábrája a négy nemzetség és a Hubei myriapoda vírus 5 esetén (*Bunyavirales: Mypoviridae*) (Radoshitzky et al., 2019 alapján). A téglalapok és nyilak az egyes fehérjéket kódoló géneket jelölik, csillaggal a hipotetikus fehérjék jelöltek. RdRp – RNS-függő RNS polimeráz, GPC – glikoprotein prekursor, NP – nukleoprotein, Z – cink-kötő mátrix fehérje. 13
- 4. ábra.** Tigrispiton (*Python molurus*) agy metszet (Hematoxilín és eozin festés). A nyilak jelölik a citoplazma zárványokat (Chang and Jacobson, 2007). 15
- 5. ábra.** University of Helsinki (UHV) vírussal fertőzött boa vese sejtek (B) és UHV-val fertőzött Vero E6 sejtek (D) ultrastruktúrája. A zárványok a boa vese sejtek citoplazmájában amorf, míg a Vero sejteknél ellipszoid alakúak (Hepojoki et al., 2015b). 16
- 6. ábra.** Az *Orthoreovirus* nemzetségbe tartozó tíz vírusfaj RNS-függő RNS polimeráz génjének nukleotidszekvenciáján alapuló filogenetikai törzsfá (MEGAX program, Tamura 3 szubsztitúciós modell, 1000 bootstrap érték). A színek az egyes fajokat jelölik: világoszöld – madár orthoreovírus, világos kék – hal orthoreovírus, sötétzöld – hulló orthoreovírus, rózsaszín – teknős orthoreovírus, szürke – Mahlapitsi orthoreovírus, sötétkék – Broome orthoreovírus, narancssárga – pávián orthoreovírus, piros – emlős orthoreovírus, barna – vadmadár orthoreovírus, sárga – denevér orthoreovírus. Az egyes fekete szimbólumok a vírusfaj gazdaspektrumát jelölik. 18
- 7. ábra.** A reovírus virion morfológiája. A különböző színű alegységek különböző fehérjéket jelölnek: $\lambda 1$ (piros) a virion méretének és szimmetriájának meghatározója; $\sigma 2$ (sárga) stabilizálja a $\lambda 1$ -et; $\lambda 2$ pentamer (kék) tornyocska-szerű struktúrát formál az ikozaéder csúcsainál, cap struktúrával látja el a keletkező mRNS-eket és segíti a citoplazmába jutásukat (Reinichs et al., 2000). 20
- 8. ábra.** Az orthoreovírusok virionjának sematikus ábrája. A virion kétrétegű, a külső kapszidot felépítő fehérjék: μB , σB , σC , a belső kapszidot (core) pedig az alábbi fehérjékből áll: λA , λC , σA . A virionon belül található a három nagy (L), három közepes (M) és négy kisméretű (S) genomszegmens (Gummersheimer et al, 2021). 21
- 9. ábra.** Poliovírus elektronmikroszkópos képe (Zell et al., 2017). 24
- 10. ábra.** Teknős eredetű picornavírusok aktuális rendszertani besorolása. Két nemzetség, a *Torchivirus* és *Rafivirus* foglalja magába teknős eredetű picornavírusokat. 25
- 11. ábra.** Picornavírus kapszid felépítése (száj-és-körömfájás vírus esetében). A kapszid prekursor P1-2A hasítása $3C^{pro}$ által történik, majd a keletkezett fehérjék (VP0, VP1 és VP3) protomerekké állnak össze. A protomerekből pentamerek lesznek, az ezekből álló egységek alkotják a kapszidot. A VP0 hasítása a virion összeépülése során történik VP4-é és VP2-évé (Kristensen and Belsham, 2019). 26
- 12. ábra.** Picornavírusok általános genomszerveződése és a poliprotein feldolgozása. A picornavírusok egyetlen nyitott leolvasási keretéről szintetizálódó poliprotein poszttranszlációs hasítása révén alakulnak ki az érett virális fehérjék (Jiang et al., 2014). 26

- 13. ábra.** Mór teknős (*Testudo graeca*) páncél struktúrája kontroll (a) és picornavírussal fertőzött egyed (b) esetében (Paries et al., 2019).28
- 14. ábra.** Az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz gén (A) és nukleoprotein gén (B) kódoló szakaszai alapján készített filogenetikai törzsfá. A fá maximum-likelihood módszerrel készült, 1000 bootstrap ismétléssel, a MEGAX program által javasolt legmegfelelőbb modell segítségével (RdRp – GTR+G+I; NP – GTR+G+I). Rövidítések: CASV – California Academy of Science virus, UGV – University of Giessen virus, TSMV – Tavallinen suomalainen mies virus, GOGV – Golden Gate virus, UHV – University of Helsinki virus.42
- 15. ábra.** A *Reptarenavirus* nemzetség képviselőivel készült, az RNS-függő RNS polimeráz (A), Z (B) és NP (C) gén nukleotid szekvenciákra épülő, maximum-likelihood módszerrel készült filogenetikai törzsfá. Az egyes körök az ICTV által elfogadott, egy fajba tartozó törzseket jelzik: sárga – *California reptarenavirus*, piros – *Rotterdam reptarenavirus*, zöld – *Golden reptarenavirus*, kék – *Ordinary reptarenavirus*, szürke – *Giessen reptarenavirus*. A színes körök az ICTV által besorolt törzseket jelölik, a Coldvalley reptarénavírus élére állított fekete négyzettel jelölt. A fá 1000 bootstrap ismétléssel, a MEGAX program által javasolt megfelelő modell (T92; Tamura-3) segítségével. Rövidítések: KMHV – Kuka mitae haeh virus; KaBV – Kaltenbach virus; KePV – Keijut pohjoismaissa virus; SVaV – Suria Vanera virus; HKV – Hans Kompis virus; ABV – Auroroa borealis virus; BSV – Bis spoeter virus; FStV – Frankfurter Strasse virus; PAV – Porto Alegre virus; SauV – Saudades virus; GauV – Gaucho virus; ArBV – Aramboia boa virus; ArSV – Arabuta snake virus; UGV – University of Giessen virus; UHV – University of Helsinki virus; CASV – California Academy of Science virus; GOGV – Golden Gate virus; HKV – Hans Kompis virus; TSMV – Tavallinen suomalainen mies virus.45
- 16. ábra.** SDT alapú páronkénti nukleotid szekvencia összehasonlításra alapuló ábra. A reptarénavírusok GenBank-ban fellelhető képviselői közül a Coldvalley reptarénavírussal magasabb azonossági értékeket mutató törzsetek vetették össze. Az ábra SDT1.2 szoftverrel készült. (A) RNS-függő RNS polimeráz gén nukleotid szekvencia alapján, (B) Z gén nukleotid szekvenciája alapján, (C) NP gén nukleotid szekvencia alapján készült.47
- 17. ábra.** A 47/02-es vírustörzsszel fertőzött VH 2 sejtek. I. 24 órával a fertőzés után; II. 48 órával a fertőzés után; III. 72 órával a fertőzés után; IV. VH 2 sejtek negatív kontroll).48
- 18. ábra.** A bozótvipera reovírus RNS-ének ezüstfestéssel előhívott poliakrilamid gélelektroforetikus képe. Jól látható az orthoreovírusokra jellemző RNS genom szegmentáltsága.49
- 19. ábra.** Az orthoreovírusok policisztronos S genomszegmense. A téglalapba írt számok az ORF-ek első és utolsó nukleotidjait jelzik, a homológ fehérjék azonos színnel jelöltek. A téglalapban látható az adott ORF által kódolt fehérje. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hüllő orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. A GenBank-i azonosítók a következők: ARV – KF741762, BRV – NC015885, BrRV – NC014245, MAHLV – KU198621, MRV – REOS1A, NBV – AF218360, PRV – MH229785, NeARV – HM222974, TRV – KT696553, Piton reovírus - AY238887.51
- 20. ábra.** Az orthoreovírus fajok reprezentatív képviselőinek, a megfelelő genomszegmensek kódoló szekvenciáiból, kodon alapú illesztéssel készített gyökér nélküli törzsfái. A filogenetikai fák maximum-likelihood módszerrel készültek a MEGAX programban az egyes génekre legjobban illeszkedő modell alapján, mely minden gén esetében egyedileg került kiszámolásra.

Megbízhatóságukat 500 ismétléssel végeztük bootstrap analízissel. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hüllő orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. A 47/02 bozótvipera reovírus sarkára állított négyzettel jelölt. 53

21. ábra. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének 245 bp hosszúságú szakasza alapján készített törzsfá rekonstrukció. A törzsfá maximum likelihood módszerrel készült MEGA6 programmal (500 bootstrap értékkel, modell: K2+G+I) az alábbi, GenBank-ban található RRV törzsekkel: EU30969 – Mojave csörgőkígyó (*Crotalus scutulatus*); KC852154 és EU309705 – bozótvipera (*Atheris squamigera*), EU309703-szőnyegpiton (*Morelia spilota*); EU309704 – virágos/sávofsarkú sikló (*Elaphe guttata*); EU 309706 – barna mangróvesikló (Boige irregularis); EU309698, EU30699,EU309700; EU309701 – vörösfarkú boa (*Boa constrictor*) Az általunk izolált törzsek fekete négyzettel jelöltek: 2013/67, 2013/KP1, 2013/KP3 – Királypiton (*Python regius*); 2013/12 – Schneider szkink (*Eumeces schneideri*); 643/37 – azonosítatlan kígyófaj; 2013/54 – Zöld leguán (*Iguana iguana*) és az *Orthoreovirus* nemzetség további kilenc fájának reprezentatív képviselőivel. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hüllő orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus (pirossal), BrRV – Broome orthoreovírus. 54

22. ábra. (A) VH 2 sejtek, vírussal nem fertőzött kontroll, (B) 2013/KP1 vírustörzsszel fertőzött, VH 2 sejtek, a vírusfertőzés hatására kialakult óriássejtek, (C) 2013/KP1 orthoreovírus törzs transzmissziós elektronmikroszkópos képe, készítette: Pop Renáta (ÁTE, Patológiai Tanszék). 58

23. ábra. Párunkénti szekvencia összehasonlításra alapuló ábra, mely teknős eredetű picornavírusok poliproteinjének aminosavszekvenciája alapján készült SDT1.2 programmal, az alábbi szekvenciák felhasználásával: rafivirus A1 – KJ415177, 5/03 – KM873617, 5/04 – KM873612, 9/05 – KM873613, 14/04 – NC025890, 124/4/10 – KM873616, 144/10 – KM873614, 2013/T4 – KM873615. 59

24. ábra. A 14/04-es teknős picornavírus törzs sematikus genom szerveződése..... 61

25. ábra. A *Picornaviridae* család nemzetségeinek reprezentatív képviselőivel készített maximum likelihood filogenetikai törzsfá P1 (A) és 3D^{pol} (B) aminosav szekvencia alapján A törzsfák MEGAX programban, LG+G+I+F (A) és LG+G+I (B) szubsztitúciós modellel, 1000-es bootstrap értékkel készült. Az általunk izolált teknős eredetű picornavírus törzseket kör jelzi. 62

26. ábra. Vírusmentes kontroll TH-1 sejtek (A). Fertőzést követő negyedik (B) és hetedik (C) napon látható citopatogén hatás. (D) 14/04-es teknős picornavírus törzs izolátumából készült elektronmikroszkópos felvétel. Az elektronmikroszkópos képet az Állatorvostudományi Egyetem Patológia Tanszékén készítette Pop Renáta. A nyilak jelzik a ~30 nm átmérőjű részecskét. 63

27. ábra. A 3D^{pol} részleges, a leader peptid és VP4 teljes nukleotid szekvenciája alapján készített filogenetikai törzsfák teknős picornavírus törzseink esetén. A filogenetikai törzsfá maximum-likelihood módszerrel készült MEGAX programmal és az általa számított legmegfelelőbb modellt alkalmazva (3D^{pol} – T92+I, leader peptid – TN93+I, VP4 -GTR+G) 1000 bootstrap ismétléssel. 64

28. ábra. RT-PCR termékek gélelektroforetikus képe 5/03-es picornavírus törzs izolátumának hígítása esetén, a Pic-gen-FOR1 és REV1 (A), valamint a Pic-gen FOR2 és REV2 primer szettet (B) alkalmazva. Neg: negatív kontroll. 65

M2.2 A táblázatok jegyzéke

1. táblázat. Az orthoreovírus nemzetség tagjainak terminális konzervált szekvenciái. Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.	20
2. táblázat. Az <i>Orthoreovirus</i> nemzetség fajainak fehérjéi és funkcióik. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.	21
3. táblázat. A picornavírusok fehérjéi és általános funkcióik (Zell et al. 2017).	27
4. táblázat. A vizsgált minták eredete	30
5. táblázat. A vizsgált picornavírus törzsek eredete.....	31
6. táblázat. A diagnosztikai célú RT-PCR rendszer fejlesztéséhez felhasznált minták eredete	31
7. táblázat. A dolgozatban alkalmazott primerek nevei és szekvenciái. A primereket az Eurofins Scientific cég szintetizálta	33
8. táblázat. A Coldvalley reptarénavírus genomjának általános jellemzői	40
9. táblázat. A 47/02-es bozótvipera orthoreovírus törzs genomjának általános jellemzői.....	49
10. táblázat. 47/02 hüllő orthoreovírus kódoló szekvenciáinak más orthoreovírus fajok homológ nukleotid szekvenciáival történő összehasonlításának azonossági értékei. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.	50
11. táblázat. 47/02 hüllő orthoreovírus kódoló szekvenciáinak más orthoreovírus fajok homológ aminosav szekvenciáival történő összehasonlításának azonosság értékei. BroV, BRV és MAHLV esetén nincs σC . Rövidítések: ARV –madár orthoreovírus; BrRV – Broome orthoreovírus; BRV – pávián orthoreovírus; MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus; MRV – emlős orthoreovírus; NBV – denevér orthoreovírus; NeARV – vadmadár orthoreovírus; PRV – hal orthoreovírus; RRV – hüllő orthoreovírus; TRV – teknős orthoreovírus.	50
12. táblázat. Az <i>Orthoreovirus</i> nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének körülbelül 245 bp hosszúságú szakasza alapján számított nukleotid azonossági értékei a vizsgált hüllő orthoreovírus törzsekkel. Zöld színnel jelölve az egyazon fajba sorolás határértéke feletti, sárgával a szürke zónába eső értékeket láthatjuk, fehér háttérrel a külön fajba sorolás határértékei alatti értékei szerepelnek. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: KC963265 – 47/02, KT696549 – TRV, NC015878 – BRV, NC014238 – BrRV, KU198614 – 0624 MAHLV, NC029912 – 2511 MAHLV, NC013225 – MRV3 Dearing, REO1LAM3P – MRV1 Lang, REO2LAM3P – MRV2 Jones, MH229776 – ADLPRV3 PRV, NC036477 – CGA280-05 PRV, AB914761 – Pycno1 NeARV,	

HM222980 – SSRV NeARV, KF692090 – TVAT NeARV, KF741757 – S1133 ARV, NC015127 – AVS-B ARV, JF342673 – NBV, NC038660 – Pulau. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hulló orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. 55

13. táblázat. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőinek RNS-függő RNS polimeráz génjének kb. 245 bp hosszúságú szakasza alapján számított aminosav azonossági értékei a vizsgált hulló orthoreovírus törzsekkel. Zöld színnel jelölve az egyazon fajba sorolás határértéke feletti értékeket láthatjuk, fehér háttérrel a külön fajba sorolás határértékei alatti értékek szerepelnek. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: KC963265 – 47/02, KT696549 – TRV, NC015878 – BRV, NC014238 – BrRV, KU198614 – 0624 MAHLV, NC029912 – 2511 MAHLV, NC013225 – MRV3 Dearing, REO1LAM3P – MRV1 Lang, REO2LAM3P – MRV2 Jones, MH229776 – ADLPRV3 PRV, NC036477 – CGA280-05 PRV, AB914761 – Pycno1 NeARV, HM222980 – SSRV NeARV, KF692090 – TVAT NeARV, KF741757 – S1133 ARV, NC015127 – AVS-B ARV, JF342673 – NBV, NC038660 – Pulau. Rövidítések: ARV – madár orthoreovírus, BRV – pávián orthoreovírus, MAHLV – Mahlapitsi orthoreovírus, MRV – emlős orthoreovírus, NBV – denevér orthoreovírus, PRV – hal orthoreovírus, RRV – hulló orthoreovírus, NeARV – vadmadár orthoreovírus, TRV – teknős orthoreovírus, BrRV – Broome orthoreovírus. 56

14. táblázat. A GenBank adatbázisában található hulló reovírus törzsek és vizsgált törzsek nukleotid azonossági értékei az RNS-függő RNS polimeráz gén kb. 245 bázis hosszúságú szakaszán. Sárga színnel a 75% alatti nukleotid azonossági értékeket emeltük ki, az általunk izolált törzsek félkövérrel láthatóak. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: EU309700 – 968-1-00, EU309701 – IBD26-00, EU309698 – 112-99, EU309699 – 200-99, EU309696 – KY Mojave, EU309703 – 55-02, EU309704 – LCV2, KC852154 – 47/02, EU309705 – VBV, EU309706 – BTS984..... 57

15. táblázat. A GenBank adatbázisában található hulló reovírus törzsek és vizsgált törzsek aminosav azonossági értékei az RNS-függő RNS polimeráz gén kb. 245 bázis hosszúságú szakaszán. Az általunk izolált törzsek félkövérrel láthatóak. Az összehasonlításban szereplő törzsek GenBank-i azonosítói a következők: EU309700 – 968-1-00, EU309701 – IBD26-00, EU309698 – 112-99, EU309699 – 200-99, EU309696 – KYMojave, EU309703 – 55-02, EU309704 – LCV2, KC852154 – 47/02, EU309705 – VBV, EU309706 – BTS984. 57

16. táblázat. Az általunk izolált hulló orthoreovírus izolátumok..... 58

17. táblázat. A 14/04-es teknős picornavírus törzs fehérjéinek általános jellemzése 60

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Farkas Szilviának, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám végzéséhez, bevezetett a labormunka és a vírusok világának rejtelseibe. Tanácsainak és lelkiismeretes javításainak köszönhetően jöhetett létre ez a dolgozat. Köszönettel tartozom belső témavezetőmnek, Dr. Nagy Szabolcs Tamásnak mindenkori segítségéért. Hálásan köszönöm Főninem, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy munkacsoportjában helyet biztosított számomra és neki köszönhetően számos munkafolyamatba be tudtam csatlakozni, bővítve eddigi tudásom.

Köszönet illeti Dr. Lengyel Györgyöt a minták Sanger szekvenálásában nyújtott szerepéért és Pop Renátát a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséért.

Köszönöm az Új kórokozók csoport minden tagjának, hogy nekik köszönhetően a sűrű hétköznapok ragyogóvá váltak, mivel kis csapatunk nem csupán kollégák, hanem barátok gyülekezete is. Külön köszönet illeti Enit, Renit és Esztit, akik elviselik hóbortjaim és akár a munkában, akár a magánéletben is számíthatok támogatásukra.

Hálásan köszönöm a családomnak, hogy céljaim elérése során mindig részesülhettem támogatásukban és igyekeztek nyugodt, harmonikus háttérrel biztosítani számomra. Köszönöm férjemnek, hogy mindig az aktuális helyzetnek megfelelően nyújtott segítséget a doktori munka során, ha kellett bátorított, ha kellett megnevettetett. Köszönet illeti barátaimat, akiktől az évek során rengeteg biztatást kaptam és végre megértük ezt a pillanatot is.

A munka anyagai feltételeit a Dr. Bányai Krisztián által elnyert Lendület pályázat, valamint a Dr. Farkas Szilvia által elnyert OTKA PD K108727 pályázat biztosította.