



Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Hüllő RNS vírusok molekuláris jellemzése

A doktori értekezés tézisei

Tóth-Ihász Katalin

Keszthely

2022

A doktori iskola

megnevezése: Fesztetics 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

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

Egyetemi tanár, MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Állattenyésztési Tudományok Intézete

.....
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, célkitűzések

Az utóbbi évtizedekben a hullótartás egyre nagyobb népszerűségnek örvend az egzotikus állattartók körében, ezzel párhuzamosan növekszik az igény a hullókben gyakran halálos kimenetelű betegséget okozó vírusok kimutatására és megismerésére. A hullóket érintő vírusfertőzések esetében a kóroktani háttér többnyire tisztázatlan marad, valamint a vírusok diagnosztikája sem megfelelő, így a hatékony kezelés és megelőzés nehézségekbe ütközik. Az újgenerációs szekvenálási technikák széleskörű elterjedése lehetőséget nyújt az egyes vírustörzsek teljes genomszekvencia adatainak megismerésére, mellyel jobban feltérképezhető a vírusok genetikai diverzitása és leszármazási kapcsolataik, valamint hozzájárulhat a diagnosztikai módszerek és megelőző vakcinák fejlesztéséhez is. Munkánk során hullóket érintő RNS vírusfertőzésekkel foglalkoztunk, ezen belül is arénavírusokra, orthoreovírusokra és picornavírusokra összpontosítottunk.

A *Bunyivirales* rendbe sorolt *Arenaviridae* család négy nemzetséget foglal magába, ezek közül kettő, a *Hartmanivirus* és *Reptarenavirus* nemzetség képviselői fertőznek hullóket. A munkánk szempontjából fontos *Reptarenavirus* nemzetség tagjai szimplaszálú RNS örökítőanyaggal rendelkeznek, mely két szegmensre tagolódik (nincs valami neve ezeknek a szegmenseknek? esetleg ide lehetne írni zárójelben). Jelenleg öt fajt sorol a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) a nemzetségbe: *California-*, *Golden-*, *Giessen-*, *Ordinary-* és *Rotterdam reptarenavirus*. A reptarénavírusok a boa sejtzárványos betegség (BIBD) kórokozói, a betegség változatos tünetekkel jelentkezik, nevét jellegzetes szövettani képéről kapta: a fertőzött sejtek citoplazmájában eozinofil zárványok láthatók. A BIBD boákban és pitonokban eltérő kórlefordulású, ám közös jellemző a kígyók soványsága és a központi idegrendszeri tünetek. Míg boákban ismertek tünetmentes hordozók, pitonokban a betegség súlyosabb lefordulású. Számos

kígyófajban írtak le BIBD-t és mutattak ki reptarénavírust, az esetek többsége mégis vörösfarkú boákból (*Boa constrictor*) ismert.

Az *Orthoreovirus* nemzetség a *Reoviridae* család egyik legnagyobb fajszámmal rendelkező csoportja. Duplaszálú RNS (dsRNS) örökítőanyaguk tíz genomsegmentre tagolódik, mely kétrétegű, burok nélküli kapszidban található. A hüllők reovírusait számos esetben kimutatták már különböző pikkelyes és páncélos hüllőfajokból, légzőszervi és központi idegrendszeri tünetekkel kapcsolatosan, bár kóroktani szerepük jelenleg is tisztázásra vár. Jelenleg tíz orthoreovírus faj tartozik a nemzetségbe, ezek közül a pikkelyes hüllőkből izolált reovírusok a hüllő orthoreovírus (RRV) fajba tartoznak.

A *Picornaviridae* család kisméretű, gerinceseket fertőző, szimplaszálú RNS genommal rendelkező vírusokat foglal magába, mely jelenleg 65 nemzetséget tartalmaz. Számos teknősfajból mutattak ki picornavírusokat általában egyéb kórokozókkal társfertőzésben. Az esetek többségében fiatal állatok érintettek, legjellegzetesebb tünet a páncél felpuhulása, de tünetmentes hordozók is ismertek, tehát a teknős picornavírusok pontos kóroktani szerepe is tisztázásra szorul. A teknősökből kimutatott picornavírusokat a *Rafivirus* és *Torchivirus* nemzetségbe soroljuk.

Céljaink között szerepelt:

- Hüllő eredetű arénavírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése, valamint rendszertani besorolása.
- Hüllőből származó reovírus teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése.
- A hüllő orthoreovírus fertőzöttség gyakoriságának felmérése, a kimutatott vírusok teljes vagy részleges genomszekvenciáinak meghatározása, a hüllő orthoreovírusok genetikai diverzitásának

pontosabb megismerése, és egy magyarországi törzsgyűjtemény létrehozása.

- Szárazföldi teknősökből származó picornavírusok izolálása, továbbá a kimutatott vírusok teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése.
- Teknős eredetű picornavírusok kimutatására alkalmas szűrővizsgálat kifejlesztése.

1. Anyagok és módszerek

Vizsgált mintáink eredete

Hüllő eredetű arénavírus vizsgálatához fogságban született, nőtény vörösfarkú boa (*Boa constrictor*) boncolása során gyűjtöttünk szervmintákat.

Hüllő orthoreovírus teljes genomszekvenciájának meghatározását egy Németországban izolált bozótvipera (*Atheris squamigera*) eredetű reovírus törzsön (47/02) kíséreltük meg. Az RRV fertőzőtség gyakoriságának felméréséhez pedig kisállatkereskedésekből és hobbi állattartóktól származó elhullott állatokból (n=111) származó szervkeverékeket dolgoztunk fel.

Teknős eredetű picornavírusokkal végzett vizsgálatainkhoz németországi együttműködő partnerünk hat törzset bocsátott rendelkezésünkre: a 124/10, 144/10, 5/04 mór teknős (*Testudo graeca*), a 9/05 sarkantyús teknős (*Geochelone sulcata*), az 5/03 közönséges pókteknős (*Pyxis arachnoides*) és a 14/04 görög teknős (*Testudo hermanni*) eredetű. Egy törzset laboratóriumunkban izoláltunk 2014-ben mór teknősből (2013/T4).

A minták feldolgozásához használt molekuláris biológiai módszerek

A rendelkezésre álló szervkeverékekből TRI reagens segítségével izoláltunk nukleinsavat, majd az aréna-, orthoreo- és picornavírusok kimutatása széles spektrumú reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) rendszerrel történt. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a megfelelő mérettartományban található termékeket gélkivonásos módszerrel tisztítottuk és Sanger szekvenálás segítségével határoztuk meg a nukleinsav sorrendjüket.

Az újgenerációs szekvenáláshoz sejtenyészeten felszaporított vírusizolátumból TRI reagens segítségével izoláltunk nukleinsavat, majd az RNS-ről RT-PCR reakcióban, a 3' végén randomizált szakaszt tartalmazó

FR26RV-N oligonukleotid használatával készítettünk komplementer DNS (cDNS) másolatot. A cDNS-t PCR segítségével sokszoroztuk fel az FR26RV-N primerhez illeszkedő FR20RV primer használatával. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a 200-2000 bázispár (bp) közötti sávban lévő termékeket gélkivonással tisztítottuk. Az így amplifikált és tisztított cDNS-ből könyvtárkészítés után teljes genom szekvenálást végeztünk IonTorrent PGM újgenerációs szekvenáló platformon. A szegmensvégi szekvenciák megerősítése RNS ligálással kombinált módosított 5' és 3' RACE módszer segítségével történt.

Teknős eredetű picornavírusok specifikus kimutatásához az újgenerációs szekvenálás során meghatározott teknős picornavírus genomszekvenciák alapján primereket terveztünk, majd ismert vírustörzseken, klinikai és patológiai mintákon teszteltük őket. A specificitás ellenőrzését ismert hüllő eredetű orthoreo-, adeno-, irido-, rana-, herpesz- és paramyxovírus törzsön végeztünk. Az érzékenység tesztelése teknős picornavírus eredetű vírusizolátumokból készített hígítási sorokon történt.

Vírusizolálás

Az RT-PCR-es szűrővizsgálat során pozitívnak bizonyuló szervmintákból kíséreltünk meg vírust izolálni megfelelő szövettenyészetben: az óriáskígyó eredetű arénavírus esetén VH 2 (ATCC CCL-140), hüllő orthoreovírus esetén VH 2 és IgH-2 (ATCC CCL-108), teknős picornavírus esetén TH-1 (ATCC CCL50) sejtvonalat alkalmaztunk. Az együttműködő partnereinktől származó vírusizolátumokat is a fenti szövettenyészeteken tartottuk fent.

Bioinformatikai módszerek

Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatokat CLC Genomics Workbench szoftver segítségével dolgoztuk fel, a Sanger szekvenálásból

származó elektroferogramok beolvasása és szerkesztése pedig a BioEdit, illetve a Geneious Prime szoftverekkel történt. A kapott szekvenciák összeillesztése az újgenerációs szekvenálás eredményével a Geneious Prime mellett az AliView szoftverek segítségével végeztük el, majd GenBank adatbázisában BLASTN vagy BLASTP algoritmussal kerestünk homológ géneket. A kodon alapú többszörös szekvencia illesztéseket Geneious Prime szoftverrel és a TranslatorX online illesztőprogrammal végeztük el. A filogenetikai elemzéseket, illetve a szekvencia azonossági értékek számítását a MEGA6, illetve MEGAX szoftvercsomaggal készítettük el. A filogenetikai fák rekonstrukciójához alkalmazott, legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztása a Bayesi kritériumrendszer alapján történt. A törzsfák készítése maximum-likelihood módszerrel történt, megbízhatóságukat bootstrap elemzéssel (500 vagy 1000) ellenőriztük. A szekvenciák közti átlagos nukleinsav és aminosav távolságokat a p-distance módszerrel számítottuk ki. Teknős picornavírusok esetén a hipotetikus hasítási helyeket NetPicoRNA online programmal kerestük.

2. Eredmények és azok megbeszélése

Óriáskígyó eredetű arénavírus vizsgálata

A reptarénavírusok glikoprotein génjének egy rövid szakaszára tervezett általános primerek segítségével a vörösfarkú boa alábbi szerveinek homogenizátumaiból sikerült reptarénavírust kimutatnunk RT-PCR-es szűrővizsgálattal: petefészek tüsző, nyelőcső, vese, gerincvelő, agy, gyomor, vékonybél, máj és lép. A vírust a kígyó tartási helye alapján Coldvalley-nak neveztük el. A vírus izolálása sejtenyészeten sikertelen maradt a vizsgált szervek esetében többszöri passzálás után is. Irodalmi adatok alapján óriáskígyó eredetű arénavírus izolálása változó sikerrel járt viperaszív és egyéb, hüllő és emlős eredetű szövetnyészeten.

Újgenerációs és Sanger szekvenálás segítségével máj szervhomogenizátumból határoztuk meg a kimutatott vírus genomjának 8755 nukleotid (nt) hosszúságú szakaszát. A kapott adatok alapján a Coldvalley vírus genomja két szegmensre tagolódik: az L szegmens teljes szekvenciáját meghatároztuk, mérete 6860 nt, míg az S szegmenst részlegesen, 1985 nt hosszúságban tudtuk meghatározni. Az L szegmens 5' nem-kódoló régiója (UTR) 87, a 3' UTR 47 bázis hosszúságú. A szegmensen két nyitott leolvasási keret (ORF) helyezkedik el: 5' irányban a 115 aminosavból (as) álló Z fehérjét kódoló gén, 3' irányban a 2068 as-ból álló virális RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) fehérjét kódoló gén, köztük a 172 nt hosszú intergénikus régió található. Az S szegmens 5' vége ismeretlen, 3' irányban az 584 as hosszúságú nukleoprotein (NP) fehérje kódolt. A 3' UTR hossza 29 nt, az intergénikus régió (IGR) 111 nt-ot sikerült meghatározunk. A Coldvalley vírus genomszerveződése az L szegmensen megegyezik az *Reptarenavirus* nemzetség tagjainak genomszerveződésével, ugyanez mondható el az S szegmens ismert szakaszáról is.

Az ICTV az arénavírusok rendszertani helyzetének meghatározására a szekvenciák páronkénti összehasonlítása alapján ad ajánlást: két arénavírus egy nemzetségbe sorolandó, ha S szegmens esetén 40%-nál, L szegmens esetén 35%-nál magasabb 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 as szekvenciája esetén ez az érték 88%.

Összevetve a Coldvalley vírus genomszekvenciáit az *Arenaviridae* család reprezentatív képviselőinek homológ génszakaszaival, legmagasabb azonossági értékeket a *Reptarenavirus* nemzetség tagjaival láthattunk (L szegmens: 56,3-98,9,0% S szegmens: 65,4-98,7%). Tekintve, hogy az L szegmensben - a Reptarenavirus nemzetség tagjaira jellemzően - az *RdRp* gén mellett a Z fehérje kódoló szakasza is megtalálható, eredményeink alapján elmondható, hogy a Coldvalley arénavírus a *Reptarenavirus* nemzetségbe sorolandó.

Az általunk vizsgált Coldvalley vírus egyes szegmenseit, valamint az *RdRp*, NP és Z fehérjéit kódoló gének nt és as szekvenciaadatait egyenként összehasonlítottuk a *Reptarenavirus* nemzetség más képviselőinek GenBank-ban fellelhető szekvenciáival. Minden esetben az University of Helsinki vírustörzsekkel kaptuk a legmagasabb azonossági értékeket (L szegmens 98,8-99,3% nt, S szegmens 98,9% nt; *RdRp* 99,3% nt, 99,5% as; *NP* 98,9% nt, 99,6% as; Z 99,8% nt, 100% as), ezen belül is az UHV-3 vírussal áll szoros rokonságban.

A *Rotterdam reptarenavirus* faj két képviselőjével, az UHV-1-gyel (KF297881, KR87011) és ROUTV-vel (KC508670, KC508669) összevetve szintén magas azonossági értékeket kaptunk az *RdRp* (82,1-87,2% nt, 84,9-87,8% as) és *NP* géneket vizsgálva (77,6-98,5% nt, 85,0-98,9% as). A Z gént összevetve mérsékeltebb azonossági értékeket láthattunk (72%>). Az

RdRp, *Z*, *NP* kódoló régiók alapján készült filogenetikai törzsfák eltérő topológiája UHV-1, ROUTV, UHV-2 és UHV-4 esetében is megerősíthet 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 detektáltuk.

A három gén kódoló szakasza alapján készített filogenetikai törzsfák vizsgálata – az azonossági értékeken felül – is megerősíti az általunk vizsgált vírus *Rotterdam reptarenavirus* fajba való tartozást az UHV-3 törzssel egyetemben.

Hüllő orthoreovírusok vizsgálata

A bozótvipera reovírus szövettenyészetben való elszaporítása során az orthoreovírusokra jellemző sokmagvú óriássejt képzéssel járó citopatogén hatást figyeltünk meg. A sikeres izolálás lehetőséget nyújtott a vírus örökítőanyagának további vizsgálataira: PAGE rendszerben a reovírusok esetében látottaknak megfelelő genomszegmens eloszlást mutatott, majd a tisztított nukleinsavból a teljes genomszekvencia, összesen 24043 nt 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 a GUUA/CUU szekvenciát tartalmazza, előbbi az *Orthoreovirus* nemzetség, utóbbi pedig valószínűleg a hüllő orthoreovírus faj jellegzetessége. Minden szegmens egyetlen fehérjét kódol, kivétel az S1 szegmens, mely bicisztronos.

A jelenlegi rendszertan szerint egy fajhoz tartozik két orthoreovírus törzs, ha köztük az azonosság nt szekvencia esetében >75%, core fehérje as

szekvencia esetében >85%, illetve külső kapszid fehérje as szekvencia esetében >55%.

Összehasonlítottuk a kódoló régiók nt és as szekvenciáit az *Orthoreovirus* nemzetséghez tartozó fajok reprezentatív képviselőinek homológ szakaszaival is. Minden szegmens esetén a legmagasabb azonossági értékeket a teknős orthoreovírus fajjal (TRV) kaptuk (49,4-71,6% nt, 47,05-82,32% as), azonban ezek az értékek alulmaradnak az ICTV által javasolt egyazon orthoreovírus fajba sorolás határértékeivel szemben. A GenBank-ban fellelhető részleges RRV nukleotidszekvencia adatokkal összevetve a bozótvipera reovírus nagyfokú hasonlóságot mutat (65-95% nt, 75-90% as). A TRV-vel való közeli rokoni kapcsolatot támasztja alá a filogenetikai törzsfák topológiája, valamint a bicisztronos genomszegmens felépítéseis: az S1 szegmensük kódolja a sejtkapcsolódásért felelős σ C fehérjét, valamint a sejtfúziós fehérjét (p14).

A 47/02-es bozótvipera reovírus az *Orthoreovirus* nemzetség RRV fajának képviselője, tekintettel genomszerveződésére, azonossági értékeire és a filogenetikai törzsfák elrendeződésére. Ezáltal sikeresen határoztuk meg az első teljes RRV genomszekvenciát is, melyet az ICTV típusörzének jelölt meg.

Vizsgálataink másik célja a különféle egzotikus hüllőfajokban szaporodó orthoreovírusok előfordulásának felmérése és genetikai sokszínűségének megismerése. Az orthoreovírusok *RdRp* génjének egy rövid, körülbelül 245 nt hosszúságú szakaszát felerősítő RT-PCR-rel 20 hüllőfaj 111 egyedének kevert szervmintáit vizsgálva 5 (4,5%) pozitív mintát találtunk, melyek királypítóból (*Python regius*, n=2), zöld leguánból (*Iguana iguana*, n=1), Schneider szkinkből (*Eumeces schneideri*, n=1) és egy azonosítatlan kígyófajból (n=1) származtak. Az *Orthoreovirus* nemzetség reprezentatív képviselőivel történő összehasonlítás során a legmagasabb azonossági értékeket a bozótvipera reovírussal (78-96% nt, 86-100% as), valamint a TRV-vel (68-78% nt, 85-90%

as) láthattuk. A vizsgált RRV törzsek részleges nt és as szekvenciái a GenBank-ban fellelhető RRV törzsek homológ szekvenciáihoz viszonyítva nagyfokú hasonlóságot mutatnak (71-100% nt, 88-100% as). 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. Viszont az *RdRp* gén részleges szekvenciák alapján készített filogenetikai fán valamennyi általunk kimutatott reovírus törzs (2013/12, 2013/67, 643/47, 2013/KP1, 2013/KP3, 2013/54) egy monofiletikus ágon helyezkedett el, így az RRV faj tagjának bizonyult. Az RT-PCR eredményei alapján pozitív mintákból és a 2013/KP3-as mintából az alkalmazott sejtvonalakon minden esetben óriássejtképző hatással rendelkező vírusokat sikerült izolálnunk. A 2013/KP1 számú törzs elektronmikroszkópos vizsgálata során a detektált vírusrészecskék az orthoreovírusokra jellemző ikozaéderez kapszid morfológiával rendelkeztek.

Teknős picornavírusok vizsgálata

Újgenerációs és Sanger szekvenálás segítségével hét, szárazföldi teknős fajból származó picornavírus közel teljes, 7065-7079 nt hosszú genomszekvenciáját határoztunk meg az 5' UTR kivételével. Ezek közül hat származott németországi együttműködő partnerünktől és egyet izoláltunk laboratóriumunkban. Minden törzs a picornavírusokra jellemző genomszerveződéssel rendelkezik, genomjuk egyetlen poliproteint kódol, mely virális eredetű proteázok hasításai révén feldarabolódik, így alakulnak ki az érett virális fehérjék. 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 teljes genomszekvenciáját meghatároztuk, ezek hossza 235-248 nt, míg az 5' végek esetében részleges szekvencia adatokat sikerült megismernünk.

A *Picornaviridae* család reprezentatív képviselőivel összevetve az általunk meghatározott teknős picornavírus törzsek genomszekvenciáit változatos értékeket kaptunk. A legmagasabb nt azonossági értékeket a genomra nézve *Mosavirus A*-val láthattuk (JF973687, 61,5-63,1%). A poliprotein szekvenciáit összehasonlítva a legmagasabb azonossági értékeket nt szinten a *Mischivirus* nemzetség *Mischivirus D* faj képviselőjével (KY512802, 68,1-71,7%), as szinten ezt az értéket a *Mosavirus* nemzetségbe tartozó *Mosavirus A* faj törzsével (JF973687, 51,2-52,2%) láthattuk. A *Rafivirus* nemzetség szintén teknős eredetű *Rafivirus A* fajának (KJ415177) teljes 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 teknős picornavírus törzsekkel összevetve.

A meghatározott hét teknős picornavírus törzs poliprotein szekvenciáinak egymással történő összehasonlítása során magas nt (81,2-99,0%) és as (90,1-97,6%) azonossági értékeket kaptunk. Szintén magas értékeket láthatunk a közel teljes genomok nt szekvenciáit összevetve (80,6-98,9%). A 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%).

Egy nemzetségbe azokat a PV törzseket soroljuk, melyek képviselői a filogenetikai törzsfákon egyazon monofiletikus ágon helyezkednek el, továbbá ortológ fehérjéik között divergencia jellemző (P1^{cap} esetén >66%, 2C^{hel}, 3C^{pro} és 3D^{pol} fehérjék >64%). Jelenleg az ICTV ajánlása alapján két PV egy fajba sorolandó, ha P1, 2C, 3C és 3D fehérjéik jelentős as azonossági értékekkel

rendelkeznek, filogenetikai törzsfán monofiletikus elhelyezkedést mutatnak és a genomok elrendeződése megegyezik.

Összehasonlítottuk teknős picornavírus törzseink P1, 2C, 3C és 3D régióinak szekvenciáit 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 soroljunk. A P1 és 3D régiók alapján készített filogenetikai törzsfákon teknős picornavírus törzseink egy ágon helyezkednek a *Mosavirus A* mellett, mely szoros rokoni kapcsolatokra utalhat.

A fent ismertetett azonossági értékek és törzsfák topológiája alapján az általunk vizsgált teknős picornavírus törzsek a *Rafivirus* nemzetség tagjaitól távol állnak, a *Picornaviridae* családon belül különálló egységet képeznek. Ezen eredmények fényében tettünk javaslatot az ICTV felé teknős picornavírus törzseink számára különálló nemzetség létrehozására, melyet elfogadtak, s melynek a *Torchivirus* nevet adták. Egyetlen faja a *Torchivirus A*, melynek típus törzse a 14/04 lett.

A *Torchivirus* nemzetség képviselőit gyorsan és specifikusan kimutató diagnosztikai RT-PCR rendszert fejlesztettünk az általunk meghatározott hét teknős picornavírus törzs genomszekvenciája alapján. A tervezett primer szettjeink tesztelésére 25 teknős picornavírus törzset szaporítottunk élő állatok tampon- és elhullott egyedek szövetmintáiból, egészséges egyedekből csakúgy, mint tüneteket mutató teknősökből. Minden esetben hasonló citopatogén hatást, a sejtek lekerekedését figyeltük meg. Két primer szett bizonyult jól alkalmazhatónak a klinikai és patológiai mintákon, valamint a vírusizolátumon való tesztelés során: 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, valamint kloáka- és szervmintákból picornavírus örökítőanyagot tudunk kimutatni az általunk tervezett primer

szettek alkalmazó RT-PCR rendszerrel. E törzsek nt és as szekvencia azonossági értékei nagyon magasnak bizonyultak egymással összehasonlítva mindhárom gén esetében (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-gyel 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%). A szekvenciákat felhasználva filogenetikai törzsfákat készítettünk a leader peptid, a VP4 fehérjét kódoló teljes régió és a 3D^{pol} részleges nt szekvenciák alapján. A fák topológiáját vizsgálva hasonló struktúrát láthatunk mindhárom fa esetében: két fő leszármazási vonal különül el, azonban nem találtunk összefüggést az egyes leszármazási vonalak, a törzsfák topológiája és az izolálás helyszíne között.

A specificitás tesztelése hullókben ismert kórokozó képességű vírusok törzsein történt, 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.

3. Új tudományos eredmények

1. Magyarországi vörösfarkú boa eredetű reptarénavírust mutattunk ki és meghatároztuk közel teljes genomszekvenciáját újgenerációs szekvenálás segítségével. A vírustörzs szekvenciájának filogenetikai elemzésével elvégeztük rendszertani besorolását. Ez az első magyarországi reptarénavírus genomszekvencia.
2. Elsőként határoztuk meg hulló orthoreovírus törzs teljes genomszekvenciáját, mely németországi bozótvípera eredetű 47/02-es RRV törzs. A kapott szekvencia filogenetikai vizsgálatát is elvégeztük.
3. Magyarországi magángyűjtőktől és kisállatkereskedésekből származó különböző hullófajok RRV fertőzöttségét vizsgáltuk. Részleges szekvenciaadatok segítségével filogenetikai elemzéseket végeztünk, majd sikeresen izoláltunk hat RRV-t szövettanyán.
4. Teknős eredetű picornavírust izoláltunk szövettanyán, melynek teljes genomszekvenciáját is meghatároztuk másik hat teknős eredetű picornavírus törzssel egyetemben. A kapott szekvenciákat elemeztük, mely rávilágított, hogy ezen törzsek egyéb picornavírusokkal 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. Az általunk vizsgált teknős picornavírus törzsek 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.

6. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

- 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1796-2>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2292-z>
- 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. <https://doi.org/10.1177/1040638716628584>
- 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>