

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Madarak orthoreovírusainak
összehasonlító genomvizsgálata

PhD értekezés

Bayer-Dandár Eszter

2016

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Bányai Krisztián

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

témavezető

Dr. Benkő Mária

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

témabizottság tagja

Dr. Dán Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Molekuláris Biológiai Laboratórium

témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez az sz. példány.

.....

Bayer-Dandár Eszter

Tartalomjegyzék

Rövidítések	6
1. Összefoglalás.....	8
3. Bevezetés	10
4. Irodalmi áttekintés	12
4.1. A reovírusok felfedezése.....	12
4.2. A reovírusok taxonómiája.....	12
4.3. Az orthoreovírusok állatorvosi jelentősége	13
4.3.1. Emlősök orthoreovírusai (<i>Mammalian orthoreovirus, MRV</i>).....	14
4.3.2. Pávián orthoreovírus (<i>Baboon orthoreovirus, BRV</i>).....	15
4.3.3. Denevér orthoreovírus (<i>Pteropine orthoreovirus, PRV</i>).....	16
4.3.4. További orthoreovírusok emlősökben	17
4.3.5. Hüllők orthoreovírusai (<i>Reptilian orthoreovirus, RRV</i>).....	17
4.3.6. Madár orthoreovírusok (<i>Avian orthoreovirus, ARV</i>).....	19
4.4. Orthoreovírusok morfológiája és genomszerveződése.....	22
4.5. Madár orthoreovírusok által kiváltott kórképek	27
4.6. Orthoreovírusok replikációja és morfogenezise.....	29
4.7. Madár orthoreovírusok diagnosztikája.....	30
4.8. A madár orthoreovírusok evolúciós mechanizmusai	31
5. Anyag és módszer.....	32
5.1. Madár orthoreovírus törzsek eredete	32
5.2. Sejtvonalak	32
5.3. Vírusizolálás	37
5.4. Virális nukleinsav tisztítása	37
5.5. Primertervezés	38
5.6. Szegmensvégek azonosítása RNS ligációval	39
5.7. PCR-reakciók.....	39
5.7.1. Egylépéses reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	39

5.7.2. Kétlépéses RT-PCR	40
5.7.3. Random primerekkel elvégzett RT-PCR	40
5.8. PCR termékek elválasztása agaróz gélben.....	42
5.9. DNS fragmentumok tisztítása gélből	42
5.10. Szekvenálás	42
5.10.1. Sanger-féle szekvenálás	42
5.10.2. Új-generációs szekvenálás – Ion Torrent RGM segítségével.....	43
5.11. Szekvenancia analízis és filogenetika.....	43
6. Eredmények	44
6.1. Madarak orthoreovírusainak genomszerveződése	44
6.2. Filogenetikai kapcsolatok	55
6.2.1. Tvärminne avian virus (TVAV).....	55
6.2.1.1. Az L-osztályú szegmensek.....	55
6.2.1.2. Az M-osztályú szegmensek.....	57
6.2.1.3. Az S-osztályú szegmensek	58
6.2.1.4. Szekvenancia hasonlósági értékek és a külön fajba sorolás kritériumai.....	59
6.2.2. Víziszárnyasok orthoreovírusai.....	59
6.2.2.1. L-osztályú szegmensek.....	60
6.2.2.2. M-osztályú szegmensek.....	60
6.2.2.3. S-osztályú szegmensek	60
6.2.3. Házi pulykából származó orthoreovírus törzsek.....	61
6.2.3.1. Az L-osztályú szegmensek.....	61
6.2.3.2. Az M-osztályú szegmensek.....	62
6.2.3.3. Az S-osztályú szegmensek	62
6.2.4. Házi tyúk eredetű orthoreovírus törzsek	62
6.2.4.1. L-osztályú genomszegmensek	63
6.2.4.2. M-osztályú szegmensek.....	63
6.2.4.3. S-szegmensek	64
6.2.5. Fácán és fogoly eredetű orthoreovírus törzsek	65

6.2.5.1. L-osztályú szegmensek.....	65
6.2.5.2. M-osztályú szegmensek.....	65
6.2.5.3. S-osztályú szegmensek	66
7. Megbeszélés	71
7.1. Orthoreovírusok genomszerkezete	72
7.2. Tvärminne avian virus – egy lehetséges új orthoreovírus faj	73
7.3. A tyúk- és lúdalakúak orthoreovírusai – egy közös vírusfaj külön leszármazási vonalai	74
7.3.1. A házi pulykák és házi tyúkok orthoreovírusainak evolúciós története	75
7.3.2. A víziszárnyasok orthoreovírusainak evolúciós története.....	77
8. Új tudományos eredmények és megállapítások.....	79
9. Irodalomjegyzék	80
10. Tudományos publikációk	93
10.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények.....	93
10.2. Nemzetközi konferenciakiadványban megjelent abstract vagy proceedings.....	95
10.3. Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	96
11. Köszönetnyilvánítás.....	97
12. Melléklet	98
1.sz. melléklet – a dolgozat alapját képező szekvenciák.....	98

Rövidítések

ARV	Avian orthoreovirus (madár orthoreovírus)
as	aminosav
BHK-21	Baby hamster kidney (magzati hörcsög vese)
bp	bázispár
BRV	Baboon orthoreovirus (pávián orthoreovirus)
BroV	Broome reovirus (Broome reovírus)
CRV	Corvid reovirus (varjúfélék reovírusa)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsRNS	duplaszálú ribonukleinsav
ECHO	enteric cytopathogenic human orphan
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay (enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat)
FAST	fusion-associated small transmembrane (óriássejt-képzésért felelős fehérje)
GRV	goose reovirus (liba reovírus)
H. E.	hematoxillin-eozin festés
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság)
L	large (nagy)
LMH	chicken hepatocellular epithelial cell line (csirke májsejt felhám sejtvonal)
MDRV	Muscovy duck reovirus (pézsmaréce reovírus)
M	medium (közepes)
MEM	minimum essential medium eagle
ML	maximum likelihood
mRNS	messenger RNS (hírvívő RNS)
MRV	Mammalian reovirus (emlős orthoreovirus)
NBV	Nelson Bay orthoreovirus (Nelson Bay orthoreovírus)
N-MDRV	novel-muscovy duck reovirus (új típusú pézsmaréce reovírus)
nm	nanométer
ns	nukleinsav
ORF	open reading frame (nyitott leolvasási keret)
PBS	phosphate buffered saline (foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PEC	poult enteritis complex (pulykák bélgyulladásos komplexe)

PEG	polietilén-glikol
PEMS	poult enteritis and mortality syndrome (pulykák bélgyulladásos és elhullásos tünetegyüttese)
PRV	Pteropine orthoreovirus (denevér orthoreovírus)
PsRV	Psittacine orthoreovirus (papagáj orthoreovírus)
PuV	Pulau virus (Pulau vírus)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
RNS	ribonukleinsav
RRV	Reptilian orthoreovirus (hüllő orthoreovírus)
RSS	runting-stunting syndrome (satnyaság és törpenövés tünet-együttese)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
S	small (kicsi)
SPF	specific pathogen-free (meghatározott kórokozótól mentes)
SSRV	Steller sea lion reovirus (Steller oroszlánfóka reovírus)
TBE	trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát
TVAV	Tvärminne avian virus (Varjú orthoreovírus)
UTR	Untranslated region (nem transzlálódó régió)
v/v%	térfogatszázalék
m/v%	vegyesszázalék

1. Összefoglalás

A madarak reovírusai az *Orthoreovirus* nemzetségbe tartoznak. Ezekről a vírusokról egyre több adat halmozódott fel, mégis, munkánk kezdetén mindössze két házi tyúkból származó reovírus törzs teljes genomszekvenciája volt ismert. Így a szárnyasokban előforduló orthoreovírusok genetikai sokféleségéről kevés információ állt rendelkezésünkre. Munkánk fő célja ezért a különböző szárnyasokból származó vírustörzsek genomszekvenciáinak meghatározása és filogenetikai elemzése volt.

A vizsgálatoknak alávetett vírusizolátumok Magyarországról, Franciaországból, Finnországból, valamint az Amerikai Egyesült Államokból származtak. Gazdafaj szerint egy-egy dolmányos varjú (*Corvus corone cornix*), házi lúd (*Anser anser domestica*), fácán (*Phasianus colchicus*) és fogoly (*Perdix perdix*), továbbá két pézsmaréce (*Cairina moscata*), három házi pulyka (*Meleagris gallopavo*) és tizenkét házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) eredetű orthoreovírus törzset elemeztünk. A törzsek nukleotid sorrendjének meghatározását hagyományos és új-generációs szekvenálási módszerekkel végeztük. A törzsek közötti genetikai kapcsolatok megállapításához szekvencia és filogenetikai elemzéseket végeztünk.

A Finnországból származó dolmányos varjú eredetű orthoreovírus törzs (Tvärminne avian virus, TVAV) távoli rokonsági kapcsolatban áll a Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) által jelenleg elfogadott orthoreovírus referencia törzsekkel. A TVAV taxonómiai helyzete ma tisztázatlan; munkacsoportunk javaslatot tett annak különálló vírusfajba történő besorolására.

A magyarországi házi lúd és két franciaországi eredetű pézsmaréce orthoreovírus törzset a bicisztronos S4 szegmenssel rendelkező ún. klasszikus víziszárnyas reovírusok (muscovy duck reovirus, MDRV) közé soroltuk, bár a házi lúdból származó törzs egyes gének esetében önálló leszármazási vonalat képviselt. Vizsgálatainkban rámutattunk arra, hogy a klasszikus és 'újszerű' víziszárnyas reovírusok (novel-muscovy duck reovirus, N-MDRV) között génszegmens-csere (reassortáció) zajlott a múltban.

Valószínűsíthetően a gazdafajok közös taxonómiai eredete szerepet játszott a tyúkalakúak rendjében fellelhető orthoreovírus törzsek között észlelt genetikai hasonlóság kialakulásában. Bár a filogenetikai elemzések kimutatták, hogy a pulyka eredetű törzsek egyértelműen elkülönültek a házi tyúk eredetűektől, felmerült annak lehetősége, hogy a fogoly és fácán egyfajta genetikai olvasztótégelyként lehetőséget nyújt a házi tyúk és házi pulyka orthoreovírus törzsek génállományának keveredésére.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a madarak orthoreovírusai között megfigyelt genetikai sokféleség hátterében a javítómechanizmus nélküli virális RNS polimeráz működése folytán felhalmozódó mutációk mellett jelentős szerep jut a reassortációnak is.

2. Summary

Avian reoviruses belong to the genus *Orthoreovirus*. An increasing amount of data is becoming available about these viruses, however, by the time we have started our work, only two near-complete chicken reovirus genome sequences were known. Thus there is only a small amount of data available about the genetic variety of orthoreoviruses found in poultry. Therefore, the main aim of our work was to define the genomic sequences and to analyze the phylogenetic relationship of the virus strains derived from different poultry species.

The studied virus isolates originated from Hungary, France, Finland and the United States of America. We analyzed orthoreovirus strains derived from the following host species: a hooded crow (*Corvus corne cornix*), a domestic goose (*Anser anser domestica*), a pheasant (*Phasianus colchicus*) and a partridge (*Perdix perdix*); furthermore, two Muscovy ducks (*Cairina moschata*), three domesticated turkeys (*Meleagris gallopavo*) and twelve chickens (*Gallus gallus domesticus*). We determined the nucleotide sequence of the strains using traditional and next generation sequencing methods. We used phylogenetic analysis to define the relationship between different strains.

The orthoreovirus strain (Tvärminne avian virus, TVAV), derived from the hooded crow in Finland, is a distant relative of the orthoreovirus reference strains currently accepted by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The taxonomic status of TVAV is currently unknown; our group suggested its classification as a separate species.

We categorized the orthoreovirus strains derived from the Hungarian domestic goose and the two Muscovy ducks from France to be part of the bicistronic S4 segment containing so-called Classical Muscovy Duck Reoviruses (MDRV); though according to some of the genes, the strain derived from the domestic goose has an isolated phylogenetic lineage. In our studies we pointed out that there has been an exchange of gene-segments (reassortment) between the Classical and „Novel” Muscovy Duck Reoviruses (N-MDRV) in the past.

Supposedly, the taxonomic origin of the host species played an important role in the development of genetic similarities between orthoreovirus strains found in the order *Galliformes*. Although phylogenetic analyses have shown that the strains derived from turkey have unambiguously separated from the ones found in chicken, it is possible that the partridge and pheasant provide some sort of genetic melting pot, allowing the genetic recombination of chicken and turkey reovirus strains.

Our results indicate that the high genetic diversity observed in avian orthoreoviruses is a result of mutations, due to the lack of repair mechanism of the viral RNA polymerase, along with the important role of reassortment between different strains.

3. Bevezetés

A *Reoviridae* család a jelenlegi klasszifikáció szerint 15 nemzetséget foglal magába: a *Sedoreovirinae* alcsaládba tartozik a *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus*, *Seadornavirus* nemzetség, míg a *Spinareovirinae* alcsalád az *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus*, *Oryzavirus* nemzetségeket foglalja magába (<http://www.ictvonline.org>). Köztük nemcsak az ember és egyéb gerincesek (halak, hüllők, madarak és emlősök), hanem gerinctelen állatok (kagylók, rovarok), gombák, növények vírusai (Medveczky et al., 1998, Mertens et al., 2000, Schiff et al., 2007), valamint számos köz- és állategészségügyi szempontból fontos vírusnemzetség is megtalálható. A reovírusokat először légző- és emésztőszervi megbetegedésekből izolálták, de kezdetben kóroki szerepük ismeretlen volt, nevük is erre utal: respiratory enteric orphan (Medveczky et al., 1998).

A madarak reovírusai az *Orthoreovirus* nemzetségbe sorolhatóak. Ezek a vírusok a gazdaságilag fontos kórokozók közé tartoznak, amelyek időnként nagy károkat okoznak egyes baromfiállományokban. Patogén ágensként 1972-ben írták le őket először a broiler csirkék virális arthritis-ét vizsgálva, bár a vírus már 1954-óta ismert volt Fahley-Crowley vírus néven (Day, 2009). Az orthoreovírus fertőzések klinikai megjelenése nagyon változatos lehet: arthritist, gastrointestinalis malabsorptios syndroma-t, myocarditist, pericarditist, hepatitist, osteoporosist és légzőszervi tüneteket egyaránt okozhatnak (Chappell et al., 2000, Jones, 2000). Ugyanakkor a fertőzés közel 80%-ban tünetmentes formában zajlik le (Benavente & Martinez-Costas, 2007). Libákban az orthoreovírusok arthritist, epicarditist és splenitist, kacsákban pedig a tenosynovitisen kívül hasmenést és mozgási nehézségeket okoznak. Leírtak ezen kívül orthoreovírus fertőzéssel kapcsolatban epicarditist, máj és lép necrosist papagájokban, koordinációs problémákat és paralízist varjakban, hasmenést fácánban, kóros lesoványodást amerikai szalonkában, valamint tensynovitist galambban (Jones, 2008; Huhtamo et al., 2007). A terjedés légúti vagy feko-orális úton történik; közvetítő vektor nem ismert (Chappell et al., 2000). A legtöbb háziszárnyas esetében a fertőzés kimenetele korfüggő; a felnőtt állatok ellenállóbbak a vírussal szemben, mint a növendék példányok (Benavente & Martinez-Costas, 2007).

Annak ellenére, hogy a madár orthoreovírusok jelentős veszteségeket okozhatnak a különböző háziszárnyas állományokban, számos tulajdonságukról csak nagyon kevés adat áll rendelkezésre, ismereteink rendkívül hiányosak. Többek között mind a mai napig keveset tudunk a genomszerveződésről, és annak evolúciós hátteréről, az egyes vírustörzsek genomszintű diverzitásáról, valamint a különböző vírustörzsek gazdafajon belüli és gazdafajok közötti előfordulási gyakoriságáról. Mindezzel összefüggésben vizsgálataink fő pillérét a madarak orthoreovírusainak genomvizsgálata és bioinformatikai elemzése

jelentette. Vizsgálatainkkal igyekeztünk új megvilágításba helyezni a különböző madár orthoreovírus törzsek közötti rokonsági kapcsolatokat.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A reovírusok felfedezése

A *Reoviridae* család első tagjait az 1950-es években írták le mexikói és amerikai gyermekek székletmintáiból, amikor a poliomyelitis vizsgálata során előtérbe kerültek az emberi bélsárral terjedő vírusok (Sabin 1959). Ennek eredményeképpen számos új vírust mutattak ki az emberi emésztőrendszerből, köztük nagyon sok olyat is, amelyekhez nem tudtak betegséget kapcsolni. Mindezeket, egyes közös tulajdonságaik alapján egyetlen csoportba rendezték és ECHO (enteric cytopathogenic human orphan) vírusoknak nevezték el őket (Joklik, 1981; Sabin, 1959). Az újabb kutatási módszerek megjelenésével feltűnt, hogy a közös csoportba sorolt vírusok közül néhány jelentősen eltér a többi vírustól. Például az Echovírus 10 vizsgálata során fény derült arra, hogy a vírusrészecske mérete sokkal nagyobb, mint az *Enterovirus* nemzetség többi tagja esetén, hemagglutináló tulajdonsággal rendelkezik, éterre rezisztens, újszülött egereket fertőzve léziókat indukál a májban, myocardiumban és az agyban (Sabin, 1959).

Az új csoport Albert Sabintól származó neve a légző- és emésztőszervi eredetre utaló „*respiratory enteric orphan*” szavak rövidítéséből ered (Joklik, 1981; Mertens et al., 2000; Sabin, 1959).

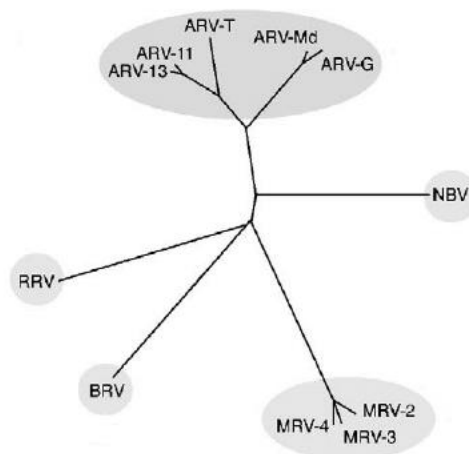
4.2. A reovírusok taxonómiája

A jelenlegi klasszifikáció szerint a *Reoviridae* család két alcsaládra osztható, ezen belül pedig 15 nemzetséget különítünk el egymástól. Az osztályozás alapját részben a kapszid morfológiai sajátosságai határozzák meg: a *Spinareovirinae* alcsalád tagjaira jellemző, hogy tüske- vagy tornyocska-szerű kitüremkedések találhatók a kapszid 5-fogású szimmetriatengelyei mentén, míg a *Sedoreovirinae* alcsalád tagjainak felülete sima (Mertens et al., 2000). A *Spinareovirinae* alcsaládba tartoznak az *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Oryzavirus*, *Fijivirus*, *Mycoreovirus*, *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Dinovernavirus*, *Coltivirus* nemzetség tagjai, míg a *Sedoreovirinae* alcsaládba az *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Seadornavirus*, *Phytoreovirus*, *Cardoreovirus* és *Mimoreovirus* nemzetségbe tartozó vírusokat sorolták (Attoui et al., 2011). Az alcsaládok tagjai nem csak az emberből és egyéb gerincesekből (halak, hüllők, madarak, emlősök), hanem gerinctelen állatokból (kagylók, rovarok), valamint gombákból és növényekből is kimutathatóak (Medveczky et al., 1998; Mertens et al., 2000; Schiff et al., 2007). Az *Orthoreovirus* nemzetségen belül a klasszifikáció genealógiai és biológiai alapokon nyugszik, így az osztályozás alapját képezi az elektronmikroszkópos

vizsgálatok során megállapított virion méret és morfológia, a genomi RNS elektroforetikus mintázata, a gazdaspektrum, a szövetspecificitás, a patogenitás, a klinikai tünetek, a fizikokémiai tulajdonságok, az antigén rokonság, a fehérje kódoló kapacitás, a fehérje kódoló egységek (open reading frame, ORF) száma és elrendeződése, valamint a nukleotid- és fehérje szekvencia hasonlóság (Duncan, 1999; Jones, 2008; Schiff et al., 2007).

Jelenleg a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (ICTV) által elfogadott klasszifikáció szerint azok a reovírus törzsek tartoznak egy fajba, amelyek homológ génjeinek nukleotid szekvenciája 75%-nál nagyobb azonosságot, 'core' (azaz mag) fehérjéinek aminosav szekvenciája 85%-nál, kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája pedig 55%-nál nagyobb azonosságot mutat. Azokat az orthoreovírusokat külön fajba soroljuk, melyeknek nukleotid szekvenciája kevesebb, mint 60%-ban, mag fehérjéinek aminosav szekvenciája 65%-ban, kapszid fehérjéinek aminosav szekvenciája pedig 35%-ban, vagy annál kisebb mértékben hasonlít egy már ismert és jól körülírt vírusfajba tartozó törzs homológ proteinjeihez (Attoui et al., 2011; Duncan et al., 2004). Az ezen tartományok közé eső, pontosan nem definiált „szürke zónába” tartozó nukleinsav és aminosav szekvencia hasonlósági értékekre az ICTV által elfogadott klasszifikációs kritériumok nem térnek ki.

Az *Orthoreovirus* nemzetségbe ma öt vírusfaj tartozik: emlős- (*Mammalian orthoreovirus*, MRV), hüllő- (*Reptilian orthoreovirus*, RRV), madár- (*Avian orthoreovirus*, ARV), denevér- (*Pteropine orthoreovirus*, PRV, hivatalosan *Nelson Bay orthoreovirus*, NBV) és pávián orthoreovírus (*Baboon orthoreovirus*, BRV). Ezek a fajok filogenetikai elemzések során is jól elkülöníthetőek egymástól (Attoui et al., 2011) (1. ábra). Az addig megismert madár orthoreovírusokat a taxonómia egységesen az *Avian orthoreovirus* fajba sorolta.



1. ábra. Az orthoreovírusok S3 szegmensének aminosav szekvenciáján alapuló gyökértelen filogenetikai fája. Az egyes orthoreovírus fajok jól elkülönülnek egymástól. Az ábrázolt vírustörzsek a madár eredetű orthoreovírusok (ARV; S1133 [ARV-11], 138a [ARV-13], pézsmakacsa eredetű orthoreovírus [ARV- Md], pulyka eredetű orthoreovírus [ARV-T], liba eredetű orthoreovírus [ARV-G]); a Nelson-Bay orthoreovírus (NBV); az emlős orthoreovírusok (MRV; 2-es, 3-es és 4-es szerotípusok); a pávián orthoreovírus (BRV), valamint a hüllők orthoreovírusainak (RRV; piton reovírus) egy képviselőjét tartalmazza (Duncan et al., 2004 alapján).

4.3. Az orthoreovírusok állatorvosi jelentősége

4.3.1. Emlősök orthoreovirusai (*Mammalian orthoreovirus, MRV*)

Az emlős orthoreovírusokat gyakran más kórokozókkal együtt mutatják ki és feltételezhető, hogy immunszuppresszió és egyéb hatások révén súlyosbítják a többi kórokozó által kiváltott elváltozásokat. Az okozott kórképek rendkívül változatosak. A haszonállatok között gyakori az orthoreovírusok okozta megbetegedés (Fairchild & Cohen, 1967; Fukutomi et al., 1996; McFerran & Connor, 1970; Schiff et al., 2007; Snodgrass et al., 1976). Szarvasmarha (*Bos taurus*), juh (*Ovis aries*), sertés (*Sus scrofa domestica*) és ló (*Equus caballus*) fiatal egyedeiben légző- és emésztőszervi megbetegedéseket okoznak és gyakoriak a másodlagos – elsősorban bakteriális – megbetegedések is (Kokubu et al., 1993; Medveczky et al., 1988; Mochizuki & Uchizono, 1993; Schiff et al., 2007). Kutyában (*Canis lupus familiaris*) és macskában (*Felis silvestris catus*) a különböző populációk folyamatos szeropozitivitása mellett emésztőrendszeri tünetek, enteritis, felső légúti megbetegedések és pneumonia egyaránt megfigyelhetőek (Csiza, 1974; Decaro et al., 2005; Muir et al., 1992).

Kínában tünetmentes álcás pálmásodró (*Paguma larvata*) egyedekben mutattak ki emlős orthoreovírust szövettani, szerológiai és molekuláris biológiai módszerekkel (Shao et al., 2008). Villásszarvú antilop borjak (*Antilocapra americana*) hasmenését és elhullását figyelték meg az USA-ban; az érintett állatok ürülékében elektronmikroszkópos vizsgálattal „reovírus-szerű” részecskéket találtak, a bakteriológiai vizsgálatok során pedig *Esherichia coli*-t izoláltak a bélből, tüdőből, májból és veséből (Reed et al., 1976). MRV fertőzést írtak le egy hathetes extrahepatikus biliaris atresiában szenvedő rhesus majomban (*Macaca mulatta*) (Rosenberg et al., 1983). Egerekben (*Mus musculus*) orthoreovírus fertőzéssel összefüggésben hasmenést, satnyaságot, „zsíros szőr szindrómát” (oily hair syndrome), hepatitiszt, sárgaságot, myocarditist, myositist, pneumoniát, encephalitist, egyensúlyvesztést, a lábak paralízisét és hydrocephalust írtak le (Attoui et al., 2011; Phillips et al., 1970).

Emberben a reovírus fertőzés myocarditist, enteritist, illetve légúti tüneteket okozhat. A fertőzés elsősorban fiatal korban következhet be (Attoui et al., 2011; Terheggen et al., 2003). Az MRV humánegészségügyi jelentősége elsősorban mégis a genetikailag módosított törzsek humángyógyászati alkalmazási lehetőségében rejlik. Az emlős orthoreovírusok replikációs ciklusa ugyanis rövid és egyes törzsek erős preferenciát mutatnak bizonyos daganatos sejtek iránt. Ezt a tulajdonságot próbálják ma az onkológiai kutatásokban és terápiában kiaknázni (Schiff et al., 2007; Yap et al., 2008) (1. táblázat).

1. táblázat. Emlősökben és emberben előforduló, az Emlős orthoreovírus (MRV) nemzetségbe tartozó vírusok által okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Gazdafaj	Kórkép	Referencia
MRV	<i>Bos taurus</i>	Enterális-, légúti tünetek, másodlagos, bakteriális fertőzések	Kokubu et al., 1993; Medveczky et al., 1988; Mochizuki & Uchizono, 1993; Schiff et al., 2007
	<i>Ovis aries</i>		
	<i>Sus scrofa domestica</i>		
	<i>Equus caballus</i>		
	<i>Canis lupus familiaris</i>	Enterális-, légúti tünetek	Csiza, 1974; Decaro et al., 2005; Muir et al., 1992
	<i>Felis silvestris catus</i>		
	<i>Paguma larvata</i>	Tünetmentes	Shao et al., 2008
	<i>Antilocapra americana</i>	Enterális tünetek	Reed et al., 1976
	<i>Macaca mulatta</i>	Extrahepatikus biliaris arthresia	Rosenberg et al., 1983
	<i>Mus musculus</i>	Hasmenés, satnyaság, „zsíros szőr szindróma”, hepatitis, sárgaság, myocarditis, myositis, pneumonia, encephalitis, egyensúlyvesztés, láb paralízise, hydrocephalus	Attoui et al., 2011; Phillips et al., 1970
<i>Ember</i>	Légzőszervi tünetek	Chua et al., 2008; Chua et al., 2011	

4.3.2. Pávián orthoreovírus (*Baboon orthoreovirus, BRV*)

A BRV az első, nem emberszabású majomból származó orthoreovírus, melyet egy meningoencephalo-myelitisben szenvedő pávián (*Papio cynocephalus*) agyából izoláltak. A vírus szövettenyészetben óriássejtet képez (Duncan et al., 1995; Leland et al., 2000; Yan et al., 2011). Az 1990-es években többször is leírták fiatal páviánok encephalitises megbetegedését, amelynek hátterében a későbbi vizsgálatok BRV-t azonosítottak (Leland et al., 2000). A vírus terjedéséről egyelőre nincs elegendő információ, mindenestre zoonotikus jelentőségének lehetősége felmerült (Yan et al., 2011).

4.3.3. Denevér orthoreovírus (Pteropine orthoreovirus, PRV)

A denevér orthoreovírusok óriássejt-képző tulajdonsággal rendelkeznek. Elsőként egy szürkefejű repülőkutya véreből (*Pteropus poliocephalus*) izolálták Új-Dél-Wales-ben, Nelson Bay-ben (Gard & Marshall, 1973). Innen kapta a Nelson-Bay orthoreovírus (NBV) nevet is. Antigenitás, génszerveződés és szekvencia analízis alapján az NBV a házi tyúk orthoreovírus törzsekkel mutatja a legnagyobb hasonlóságot, ami e két vírusfaj evolúciós rokonságára utal (Attoui et al., 2011).

A Nelson-Bay orthoreovírus megismerését követően több denevérfaj vizsgálata során is sikerült orthoreovírusokat azonosítani. Malajziában az 1998/1999-ben zajló Nipah vírus járvány lefolyása után a kórokozó eredeti rezervoárját keresvén izolálták a Pulau vírust változékony repülőkutya (*Pteropus hypomelanus*) vizeletmintájából. Ez a vírus szerológiailag az NBV-vel mutatott rokonságot (Pritchard et al., 2006). A Xi River vírust Kínában mutatták ki egészséges repülőkutya (*Rousettus leschenaultii*) tüdőmintáinak vizsgálata során (Du et al., 2010). 2006-ban egy maláj katonából mutatták ki a Melaka vírust; a vírus öt és néhány családtagját egyaránt megbetegítette. A vizsgálat során nemcsak a vírus zoonotikus eredete merült fel, hanem e fajidegen vírus emberről emberre terjedésének lehetősége is. A betegség tünetei láz, köhögés, torokgyulladás, gyengeség és letargia voltak. Későbbi monitorozási vizsgálatok azt is kiderítették, hogy a szeropozitivitás annak ellenére jelentős mértékű az emberi populációkban, hogy a fertőzés nem társítható konkrét tünetekhez (Chua et al., 2007). A Kampar és a Sikamat vírusokat is lázzal, valamint akut légzőszervi megbetegedésekkel kapcsolatban izolálták felnőttek torok-tampon mintáiból, szintén Malajziában (Chua et al., 2008; Chua et al., 2011) (2. táblázat).

2. táblázat. Páviában, denevérben és emberben előforduló Pávián (BRV) és Nelson Bay orthoreovírusok (NBV) által okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Faj	Kórkép	Referencia
BRV	<i>Papio cynocephalus</i>	Encephalitis	Duncan et al., 1995; Leland et al., 2000; Yan et al., 2011
PRV	<i>Pteropus poliocephalus</i>	Tünetmentes	Gard & Marshall, 1973
	<i>Pteropus hypomelanus</i>	Tünetmentes	Pritchard et al., 2006
	<i>Rousettus leschenaultii</i>	Tünetmentes	Du et al., 2010
	Ember	Légzőszervi tünetek	Chua et al., 2008; Chua et al., 2011

4.3.4. További orthoreovírusok emlősökben

Fiatal borjúfókák (*Phoca vitulina*) gyomortartalmának vizsgálata során anyatejből származó reovírus-szerű részecskéket mutattak ki; kaliforniai oroszlánfókából (*Zalophus californianus*), Steller oroszlánfókából (*Eumetopias jubatus*) és északi medvefókából (*Callorhinus ursinus*) pedig sikerült izolálni a vírust (Steiger et al., 1989). Brit-Columbiában Steller oroszlánfóka abortált magzatából mutattak ki reovírust (Steller sea lion reovirus, SSRV). A kórbonctani vizsgálatok során a légutakban, tüdőben-, szívben ödémát; a mellékvesében, szívben, légutakban, valamint a placentában gyulladást figyeltek meg, továbbá másodlagos bakteriális fertőzést állapítottak meg az agyban, a tüdőben, a májban, a vesében és a gyomor szöveteiben (Palacios et al., 2011). A Steller oroszlánfókából izolált reovírus egyes génjeiben meglepő hasonlóságot mutatott a papagájok orthoreovirusaival.

2002-ben ausztrál gyümölcsdenevérből (*Pteropus scapulatus*) mutatták ki a Broome reovírust (BroV). A vizsgált állat agresszív volt, gyengeség jeleit mutatta, részlegesen lebénult, majd elpusztult (Thalmann et al., 2009). A vírus rendszertani besorolása még ma is bizonytalan.

Csikos bűzösborz (*Mephitis mephitis*) agyából származó homogenizátumot szopós egerek agyába oltva izoláltak egy új reovírust, melynek a „szkunk orthoreovírus” elnevezést adták (Victoria et al., 2008) (3. táblázat).

3. táblázat. További, emlősökben előforduló orthoreovírusok és az általuk okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Faj	Kórkép	Referencia
-	<i>Phoca vitulina</i>	Ödéma, gyulladósos tünetek; másodlagos, bakteriális fertőzések	Steiger et al., 1989; Palacios et al., 2011
-	<i>Zalophus californianus</i>		
-	<i>Callorhinus ursinus</i>		
-	<i>Eumetopias jubatus</i>		
--	<i>Mephitis mephitis</i>	Tünetmentes	Victoria et al., 2008

4.3.5. Hüllők orthoreovirusai (Reptilian orthoreovirus, RRV)

A hüllők orthoreovirusait először 1976-ban zöld gyík bőrében megfigyelhető reovírus-szerű részecskéket mutattak ki elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével (Ahne et al., 1987).

A reovírussal fertőzött hüllők esetében gyakran légzőszervi és/vagy idegrendszeri tünetek kísérik a betegséget (Duncan et al., 2004). Valamennyi eddig ismert hüllő reovírus fogékony sejtvonalakon elszaporítva jellegzetes óriássejt-képződéssel járó citopatogén hatással bír (Day, 2009). Reovírusokat számos hüllőfajból sikerült kimutatni, többek között teknősökből (*Geochelone pardalis*, *Testudo graeca*) gyíkokból (*Lacerta viridis*, *Chameleo quadricornis*, *Uromastyx hardwickii*, *Iguana iguana*, *Eublepharis macularius*), kígyókból (*Azemiops feae*, *Python regius*, *Opheodris sp.*, *Orthriopsis sp.*, *Elaphe sp.*, *Pantherophis sp.*, *Corallus sp.*, *Boa sp.*, *Crotalus viridis*) (Abbas et al., 2011; Ahne et al., 1987; Blahak & Goebel, 1991; Blahak et al., 1995; Drury et al., 2002; Garner et al., 2009; Jacobson, 2007; Lamirande et al., 1999; Landolfi et al., 2010; Marschang et al., 2001; Raynaud, 1976; Vieler et al., 1994) (4. táblázat).

4. táblázat. Hüllőkben előforduló orthoreovírusok (RRV) által okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Gazdafaj	Kórkép	Referencia
RRV	<i>Geochelone pardalis</i>	Légzőszervi-, idegrendszeri tünetek	Abbas et al., 2011; Ahne et al., 1987; Blahak & Goebel, 1991; Blahak et al., 1995; Drury et al., 2002; Garner et al., 2009; Jacobson, 2007; Lamirande et al., 1999; Landolfi et al., 2010; Marschang et al., 2001; Raynaud, 1976; Vieler et al., 1994
	<i>Testudo graeca</i>		
	<i>Lacerta viridis</i>		
	<i>Chameleo quadricornis</i>		
	<i>Uromastyx hardwickii</i>		
	<i>Iguana iguana</i>		
	<i>Eublepharis macularius</i>		
	<i>Azemiops feae</i>		
	<i>Python regius</i>		
	<i>Opheodris sp.</i>		
	<i>Orthriopsis sp.</i>		
	<i>Elaphe sp.</i>		
	<i>Pantherophis sp.</i>		
	<i>Corallus sp.</i>		
<i>Boa sp.</i>			
<i>Crotalus viridis</i>			

4.3.6. Madár orthoreovírusok (*Avian orthoreovirus, ARV*)

A madár orthoreovírusok gazdasági kártétele baromfiállományokban és víziszárnyasokban egyaránt jelentős. A vírust házi tyúkokból 1954-ben, Torontóban izolálta Fahey és Crawley, akik csirkék enyhe lefolyású légzőszervi megbetegedéseit vizsgálták (Petek et al., 1967), de patogén ágensként csak 1972-ben írták le kísérletes körülmények között az állatok virális arthritisét vizsgálva (Day, 2009; van der Heide, 2000).

Házi tyúkokban (*Gallus gallus domesticus*) az orthoreovírusok okozta megbetegedések rendkívül változatos klinikai megjelenésűek lehetnek (Jones, 2000). Okozhatnak arthritist, gastrointestinalis malabsorptios syndroma-t, myocarditist, pericarditist, hepatitist, osteoporosist és légzőszervi tüneteket egyaránt (Chapell et al., 2000, Jones, 2000). Ugyanakkor az esetek közel 80%-ában a fertőzés tünetmentes (Benavente & Martinez-Costas, 2007).

Feltételezések szerint az orthoreovírusok házi pulykákban (*Meleagris gallopavo*) is szerepet játszhatnak tenosynovitis létrehozásában (Jones, 2000), de okozhatnak myocarditist (França et al., 2010, Shivaprasad et al., 2009), szerepük lehet a pulykák bélgyulladásos komplexének (PEC, poult enteritis complex) és a bélgyulladással és elhullással járó tünetegyüttesének a kialakulásában is (PEMS, poult enteritis and mortality syndrome) (Day et al., 2007; Heggen-Peay et al., 2002; Jones 2008; Sellers et al., 2004; Spackman et al., 2005).

Gyöngytyúkokban (*Numida meleagris*) orthoreovírust izoláltak hasnyálmirigy-gyulladással járó megbetegedésből, az izolátummal végzett fertőzési kísérlet pedig igazolta a betegség és a vírus közötti kapcsolatot. Egy közelebről nem jellemzett törzs 8-22 napos gyöngytyúkokat betegített meg, a betegséget depresszió, étvágytalanság, gyengeség, fejlődésben való elmaradás és idegrendszeri tünetek jellemezték (Tanyi et al., 1994).

Kacsákból (*Anatidae család*) és libákból (*Anser anser domestica*) is számos esetben izoláltak orthoreovírusokat. A vírusfertőzés következtében kialakulhat epicarditis, hasmenés, hepatitis, mozgási nehézségek, sántaság, splenitis, haemorrhagiák és necrotikus léziók a májban és a lépben, valamint tenosynovitis is (Chen et al., 2012; Jones, 2000; Jones, 2008; Malkinson et al., 1981; Palya et al., 2003, Wang et al., 2013).

Számos vadon élő, illetve farmon nevelt és kedvtelésből tartott madárfajból is sikerült kimutatni orthoreovírusokat, pl. nagy lilikben (*Anser albifrons*) tünetmentes fertőzést okozott (Hlinak et al., 1998), fácánban (*Phasianus colchicus*) hasmenéssel (Mutlu et al., 1998), az amerikai szalonkában (*Scolopax minor*) kóros lesóványodással hozták kapcsolatba (Docherty et al., 1994). Fiatal virginiai fogasfűrjekben (*Colinus virginianus*) cryptosporidiozissal együtt, elhullással is járó emésztőszervi megbetegedéssel

összefüggésben mutatták ki (Ritter et al., 1986). Szerológiai vizsgálatokkal számos egyéb vadon élő fajban igazoltak orthoreovírus fertőzöttséget (Jones, 2008). Finnországban dolmányos varjú (*Corvus corone cornix*) agyából izoláltak orthoreovírust; kimúlása előtt a fertőzött madár idegrendszeri tünetekkel, koordinációs problémákkal, bénulással és görcsökkel küzdött (Huhtamo et al., 2007). 1996-ban Finnországban pehelyréce (*Somateria mollissima*) fiókák tömeges elhullásának vizsgálata során mutattak ki orthoreovírusokat. A fertőzést a fejlődésben való elmaradás, rossz kondíció, a máj és a bursa necrosis jellemzte. A későbbi felmérések azt is igazolták, hogy a felnőtt állatok szeropozitivitása nagyon magas volt, tehát valószínűleg az idősebb állatok tünetmentes fertőzésen estek át (Hollmèn et al., 2002). Tenyésztett struccokban (*Struthio camelus*) több esetben is igazoltak orthoreovírus fertőzést annak ellenére, hogy a fertőzés bennük nem járt megbetegedéssel. Mivel a farmokon extenzíven tartott struccok szoros közelségben élnek a vadmadarakkal, így ez utóbbiak rezervoár szerepe is felvetődött (Cadman et al., 1994; Jones, 2000; Sakai et al., 2009).

Több papagájfajban (*Alisterus scapularis*, *Agapornis sp.*, *Amasona ssp*, *Cacatua sp.*, *Eolopus reseicapillus*, *Melopsittacus sp.*, *Psittacus erithracus erithracus*, stb.) is leírtak már orthoreovírus fertőzést. A klinikai és kórbonctani kép a különböző fajokban eltérő, jellemzőek a légzőszervi, emésztőrendszeri, esetlegesen idegrendszeri tünetek és másodlagos fertőzésként gyakran egyéb vírusok, baktériumok és gombák szerepe is felmerül. Emiatt az orthoreovírusok immunszuppresszív hatását is feltételezik (Ashton et al., 1984; Conzo et al., 2001; de Kloet, 2008; Hirai et al., 1979; Jones, 2000; Perpiñán et al., 2010; Sánchez-Cordón et al., 2002) (5. táblázat)

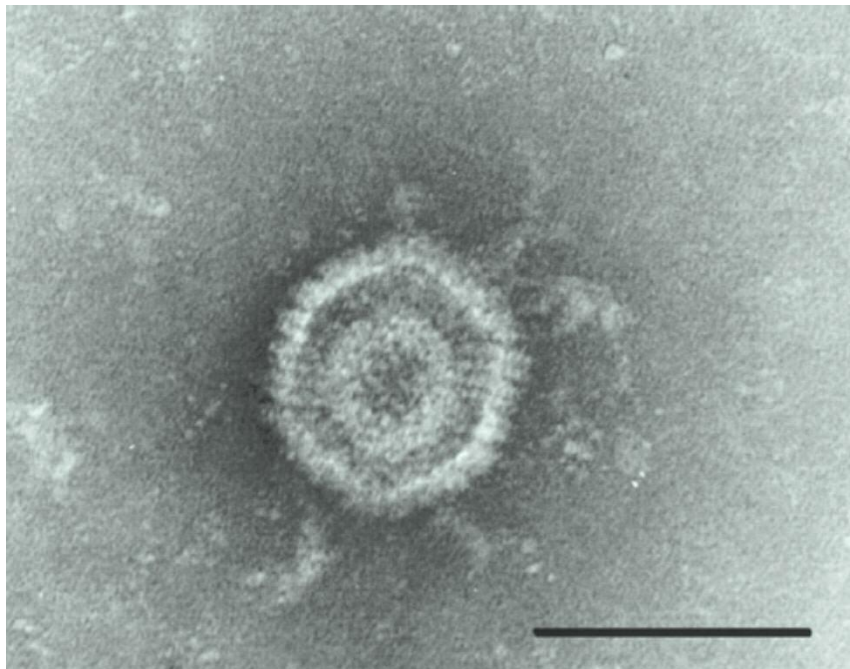
5. táblázat. Madarakban előforduló orthoreovírusok (ARV) által okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Gazdafaj	Kórkép	Referencia
ARV	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Arthritis, myocarditis, pericarditis, hepatitis, osteoporosis, légzőszervi tünetek, gastrointestinalis malabsorptios syndroma; tünetmentes	Jones, 2000; Chapell et al., 2000; Benavente & Martinez-Costas, 2007
	<i>Meleagris gallopavo</i>	Tenosynovitis, myocarditis, PEC, PEMS	Jones, 2000; França et al., 2010; Shivaprasad et al., 2009; Day et al., 2007; Heggen-Peay et al., 2002; Jones 2008; Sellers et al., 2004; Spackman et al., 2005

5. táblázat (folyt.). Madarakban előforduló orthoreovírusok (ARV) által okozott kórképek összefoglaló táblázata

Vírusnemzetség	Gazdafaj	Kórkép	Referencia
ARV	<i>Numida meleagris</i>	Depresszió, étvágytalanság, gyengeség, fejlődésben való elmaradás, idegrendszeri tünetek	Tanyi et al., 1994
	<i>Anser anser domestica</i> ; <i>Anatidae</i> család	Epicarditis, hasmenés, hepatitis, mozgási nehézségek, sántaság, splenitis, haemorrhagiák és necrotikus léziók a májban és a lépben, valamint tenosynovitis	Chen et al., 2012; Jones, 2000; Jones, 2008; Malkinson et al., 1981; Palya et al., 2003, Wang et al., 2013
	<i>Anser albifrons</i>	Tünetmentes	Hlinak et al., 1998
	<i>Phasianus colchicus</i>	Enterális tünet	Mutlu et al., 1998
	<i>Scolopax minor</i>	Kóros lesóványodás	Docherty et al., 1994
	<i>Colinus virginianus</i>	Enterális tünet	Ritter et al., 1986
	<i>Corvus corne cornix</i>	Idegrendszeri tünet	Huhtamo et al., 2007
	<i>Somateria mollissima</i>	Máj-, bursalis necrosis, fejlődésben visszamaradás	Hollmèn et al., 2002
	<i>Struthio camelus</i>	Tünetmentes	Cadman et al., 1994; Jones, 2000; Sakai et al., 2009
	<i>Alisterus scapularis</i>	Légzőszervi, emésztőrendszeri, idegrendszeri tünetek, másodlagos fertőzések	Ashton et al., 1984; Conzo et al., 2001; de Kloet, 2008; Hirai et al., 1979; Jones, 2000; Perpiñán et al., 2010; Sánchez-Cordón et al., 2002
	<i>Agapornis sp.</i>		
	<i>Amasona ssp</i>		
	<i>Cacatua sp.</i>		
	<i>Eolopus reseicapillus</i>		
<i>Psittacus erithracus erithracus</i>			

A madár orthoreovírusok ellen az elsődleges védekezési módszer a vakcinázás. Az első oltóanyagot 1975-ben az Amerikai Egyesült Államokból származó S1133-as törzs felhasználásával készítették. Ma az oltási folyamat élő- és inaktivált vakcinák alkalmazásával, subcutan, illetve spray formájában történhet. Az állatok a megfelelő fokú védettséget szerezhetnek élővírus-vakcina alkalmazásával, ami védettséget nyújt és lecsökkenti a vertikális transzmisszió esélyét. A szintén alkalmazott inaktivált vakcinákat kombinálhatják pl. a baromfipestis, vagy a Gumboro betegség elleni védekezéssel (Jones 2000; Rosenberger 2003; van der Heide 2000; www.ceva.com).



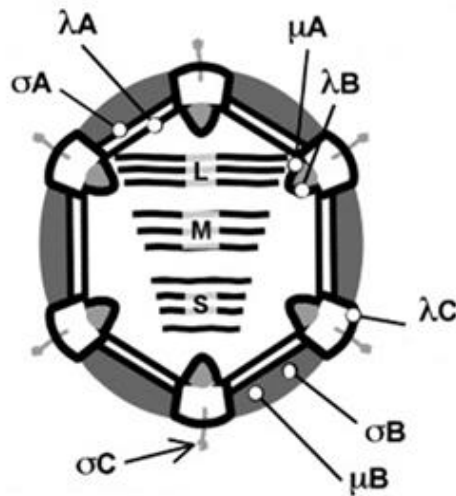
2. ábra. Madár orthoreovírus részecske elektronmikroszkópos képe (Dr Cornelia Büchen-Osmond, <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Cornelia/avire2.htm>).

4.4. Orthoreovírusok morfológiája és genomszerveződése

Az orthoreovírusok burok nélküli, ~80 nm átmérőjű, ikozaédes szimmetriájú duplaszálú RNS (dsRNS) vírusok (Attoui et al., 2011). A vírus a magból, a külső és a belső kapszidból épül fel, felszínén ujszerű nyúlványok találhatóak, amelyek körbe veszik azokat a csatornákat, melyek radiálisan nyúlnak a kapszid külső rétegébe (Attoui et al., 2011) (2. ábra).

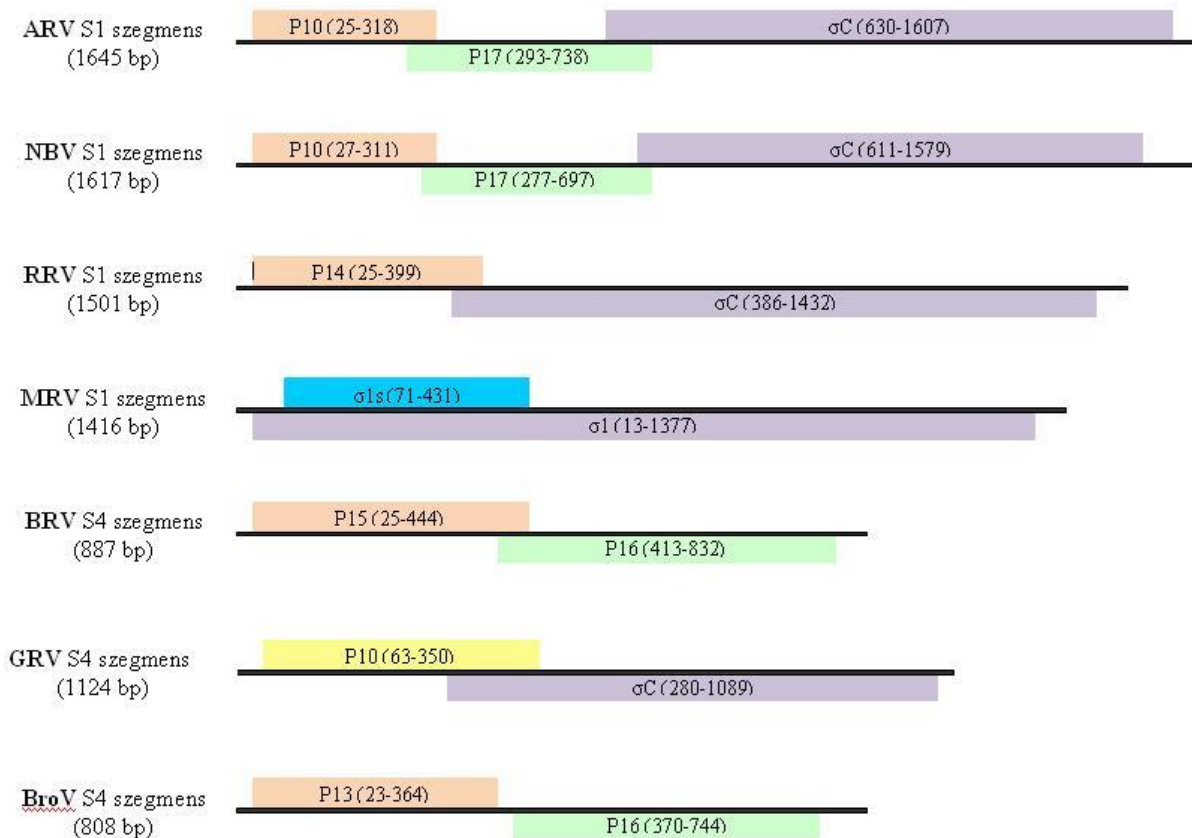
A kétrétegű kapszid tartalmazza a 10 duplaszálú RNS szegmensből álló genomot. A madár orthoreovírusok teljes genomja közelítőleg 23,5 kilobázis nagyságú, amely 8 strukturális (λA , λB , λC , μA , μB , σA , σB , σC) és 3 vagy 4 nem strukturális (μNS , p10, p17, σNS) fehérjét kódol. A szegmensek méretük alapján 3 osztályba sorolhatóak (L=large,

M=medium, S=small). Tipikusan 3 L (L1, L2, L3), 3 M (M1, M2, M3) és 4 S (S1, S2, S3, S4) szegmens különíthető el egymástól (3. ábra).



3. ábra. Orthoreovírus kapszid sematikus felépítése a kapszidot felépítő fehérjék helyeződésével (Benavente & Marinez-Costas, 2007).

A különböző orthoreovírus genomok molekuláris analízise a szegmensek viszonylag konzervatív strukturális felépítését mutatja. Valamennyi pozitív irányultságú RNS szál 5' végén metilált guanozint találunk. A dsRNS 5' és 3' vége valamennyi szegmensen megőrzött. Csaknem minden mRNS első 7 nukleotidja az 5' végen a konzervatív 5' – GCUUUUU – 3', a 3' végen pedig az 5' – UCAUC – 3' szakaszokkal kezdődik, illetve végződik. Ezek a szekvenciák a transzkripció és a genom replikáció folyamataiban fontos szignálokat tartalmaznak. A konzervatív szegmensvégeket egy-egy rövid nem kódoló régió követi – illetve előzi meg. Köztük a fehérjéket kódoló ORF-ek helyezkednek el (Benavente & Martinez-Costas, 2007). Az S1 (illetve törzstől függően az S4) kivételével valamennyi szegmens monocisztronos, rajtuk egyetlen ORF található (Dryden et al., 1998; Benavente & Martinez-Costas, 2007; Ji et al., 2008; Attoui et al., 2011). A transzláció az 5' véghez közel található start kodontól kezdődik (AUG). A policisztronos S1 (S4) szegmens felépítése viszont meglehetősen heterogén, rajta kettő vagy három ORF található (4. ábra).



4. ábra. Az ábrán a különböző orthoreovírusok policisztronos S1 (ARV, NBV, RRV, MRV), illetve S4 (BRV, liba reovírus (goose reovirus, GRV), BroV) génszegmenseinek szerveződése látható. A különböző ORF-ek által kódolt fehérjéket téglalapok jelzik, a hasonló funkcióval rendelkező homológ fehérjéket azonos színekkel jelöltük. A téglalapokban látható számok az egyes ORF-ek első, illetve utolsó nukleotidjait jelölik (Dandár et al., 2012).

A legtöbb madár orthoreovírus esetében tricisztronos S1 szegmensről beszélhetünk, amely három, egymást részlegesen átfedő ORF-fel rendelkezik. Az első két cisztronról szintetizálódnak a p10, és p17 nem-struktúrális fehérjék, míg a harmadik cisztronról a σC protein képződik (Benavente & Martinez-Costas, 2007). Az óriássejt-képződésért az ún. 'fusion associated small transmembrane' (FAST) proteint kódoló p10 gén felelős. A víziszárnyasok egyes orthoreovírus törzseinél megfigyelhető, hogy az S1 szegmensekkel ekvivalens S4 szegmens bicisztronos, rajtuk mindösszesen két egymást részlegesen átfedő ORF helyezkedik el és FAST proteint nem kódolnak (Bányai et al., 2005; Kuntz-Simon et al., 2002).

A vírus által termelt struktúrális fehérjék közül a λA (emlősökben az ezzel ekvivalens $\lambda 1$) a kapszid 50-60 nm átmérőjű belső rétegének alapját képezi, amely magába foglalja a genomszegmenseket, illetve a λB (emlősökben a $\lambda 3$) és μA (emlősökben a $\mu 2$) fehérjéket. A λA fehérje emellett a transzkripció folyamatában is részt vesz. A λB a vírus saját RNS-függő RNS-polimeráz fehérjéje, a μA pedig transzkripció kofaktorként működik. A kapszid belső

rétegét stabilizálja a λA felületére rásimuló σA (emlősökben a $\sigma 2$), mely ezáltal mintegy hidat képez a kapszid külső rétegével. A σA fehérjének interferon gátló hatása van. A kapszid felületén megfigyelhető tornyocskákban találhatóak a λC (emlősökben a $\lambda 2$) pentameterjei, melyek teljesen átívelik a virion többrétegű falát. A λC egyben guanylyl-transzferáz enzimként („capping enzim”) is működik. A kapszid tornyocskáinak csúcsán a σC (emlősökben a $\sigma 1$) által alkotott trimerek találhatóak, a külső kapszid rétegét pedig a μB (emlősökben a $\mu 1$) és σB (emlősökben a $\sigma 3$) fehérjék alkotják. A μB segítségével történik a fertőzés során a vírus penetrációja, a σB pedig a virion összeépülésében vesz részt. A σC felelős a sejthez kapcsolódásért, szövetspecifitásért és a neutralizáló antitestek elsődleges célpontja. A nem struktúr fehérjék közül a μNS (emlősben szintén μNS) segítségével történik meg a viroplazmában a virion összeépülése, az S1 szegmens szintetizálódó p10 a szövettenyészetben megfigyelhető sejt-sejt fúzióért, a p17 pedig a sejtek növekedésének késleltetéséért felel. A σNS fehérje felelős a szimplaszálú RNS kötődéséért a replikáció során (Benavente & Martinez-Costas, 2007; Dryden et al., 1998; Hsiao et al., 2002; Ji et al., 2008; Mertens et al., 2000) (6. táblázat).

6. táblázat. AVS-B madár orthoreovírus törzs szegmenseinek és leolvasási kereteinek (ORF) mérete, fehérjéi és azok funkciói (Attoui et al., 2011; Bányai et al., 2011; Benavente & Martinez Costas, 2007; Dryden et al., 1998; Ji et al., 2008)

Szegmens	ORF lokalizációja	Szegmens hossza	Protein	Funkció
L1	21-3902	3958	λ A	NTPáz aktivitás, transzkripció szerep, kapszid belső rétegének formázása
L2	14-3793	3829	λ B	RNS-függő RNS-polimeráz
L3	13-3870	3907	λ C	„Capping” enzim
M1	13-2211	2283	μ A	Transzkripció kofaktor
M2	30-2060	2158	μ B	Penetráció, kapszid külső rétegének létrehozása
M3	25-1932	1996	μ NS, μ NSC (nem strukturális)	Viroplazmában virion összeépülés
S1	33-323	1645	σ C	Sejthez kapcsolódás, szövetspecifitás, virulencia, antitest neutralizáció
	295-735		p10 (nem strukturális)	Sejt-sejt fúzió
	632-1612		p17 (nem strukturális)	Sejtek növekedésének késleltetése
S2	16-1266	1324	σ A	dsRNS kötődés, anti-interferon hatás, kapszid belső rétegének stabilizációja
S3	31-1134	1202	σ B	Virion összeépülés, kapszid külső rétegének létrehozása
S4	24-1127	1192	σ NS	ssRNS kötés

4.5. Madár orthoreovírusok által kiváltott kórképek

A madár orthoreovírusok virionja rendkívül ellenálló, fertőzőképességét megőrzi magasabb hőmérsékleten (akár 55 °C-on) és tágabb pH tartományban (pH=2-9) is, továbbá különféle detergenseknek is huzamosabb ideig ellenáll (Chappel et al., 2000; Mertens et al., 2000; Urbano & Urbano, 1994). Az érett virionok 10 napig fertőzőképesek maradhatnak takarmányon, üvegen, galvanizált fémen, madártollon, faforgácson és vízben egyaránt (Jones, 2000; Jones, 2008). A fertőzött állatokban a vírusok jelenlétét sokféle szövetből és szervből kimutatták. A megbetegedési arány összefügg a korról, az immunstátusszal, illetve a vírus patotípusával is (Jones, 2000). Vertikális és horizontális vírustranzmisszió egyaránt ismert (Chappel et al., 2000). A fertőzés általában feko-orális úton, valamint a talp bőrének repedésein keresztül történik (Jones, 2000). A tojásban fertőződés jelenségét ugyan leírták, de ennek járványügyi jelentősége nem pontosan ismert (Jones, 2008). Másodlagos bakteriális és virális fertőzések gyakran előfordulnak; többek között leírtak már mycoplasmával, staphylococusszal, *Esherichia colival*, illetve csirke anaemia vírussal történő felülfertőződést is (Jones, 2008).

Házi tyúk esetében jellemzően hús típusú, broiler csirke állományok fertőződése jár klinikai manifesztációkkal (De Gussem et al., 2010; Pu et al., 2008). Legnagyobb jelentősége a csirkék virális arthritisének (tenosynovitisének) van. Általában 4-16 hetes madarak betegszenek meg, a megbetegedések száma hét hetes korban a legmagasabb. A fertőzött állatokban a tibiotarsalis-tarsometatarsális ízületek gyulladása, súlyos esetben a gastrocnemius inának szakadása is megfigyelhető. A megbetegedett csirkék a lábak gyengesége miatt összeeshetnek, emiatt képtelenné válnak a megfelelő táplálkozásra. Bár a mortalitás általában 10% alatt marad, az anyagi károk mégis jelentősek lehetnek. A betegség következtében a csirkék takarmányhasznosítása számottevően romlik, emiatt az érintett madarak elmaradnak a fejlődésben, felépülés után pedig a betegség nyilvánvaló jelei megmaradnak az állatokon, így a vágás során visszaminősítik azokat (Attoui et al., 2011; Jones, 2000). Egyéb szervekben is kialakulhatnak elváltozások, myocarditist, pericarditist és tollasodási problémákat is leírtak orthoreovírus fertőzéssel kapcsolatban. Ezenkívül léziókat figyeltek meg a májban, a lépben és a bursában (Davis et al., 2012). Emellett házi tyúkokban számos más megbetegedés kapcsolatba hozható az orthoreovírus eredetű fertőzésekkel. Valószínűleg szerepet játszanak a „satnyaság és törpenövés tünet-együttese” (runting-stunting syndrome, RSS), vagy más néven malabszorpcios sydroma kialakításában (van Loon et al., 2001). Ezenkívül orthoreovírus fertőzés okozhat légzőszervi és bélrendszeri megbetegedést (Goodwin et al., 1993), immunszuppressziót, májgyulladást, hydropericardiumot, „kék szárny betegséget”, hasmenést, súlyvesztést, hirtelen elhullást,

illetve idegrendszeri tüneteket is (Attoui et al., 2011; Dandár et al., 2013; Jones, 2008; Van de Zande & Kuhn, 2007).

Feltételezések szerint az orthoreovírusok házi pulykákban is szerepet játszhatnak tenosynovitis létrehozásában (Jones, 2000), de okozhatnak myocarditist (França et al., 2010, Shivaprasad et al., 2009), valamint okai lehetnek a pulykák bélgyulladásos komplexének (PEC) és a bélgyulladásos és elhullásos tünetegyüttesnek (PEMS) (Day et al., 2007; Heggen-Peay et al., 2002; Jones, 2008; Sellers et al., 2004; Spackman et al., 2005), amely az 1990-es évek elején világszerte komoly gazdasági károkat okozott (Heggen-Peay et al., 2002; Lojkic et al., 2010). Mindkét emésztőszervi betegség multifaktoriális, baktériumok, vírusok, esetenként paraziták együttesen alakíthatják ki az elváltozásokat. Hasonló klinikai kép és elváltozások jellemzik a kórképeket, amelyekben szétnövést, tollasodási zavart, hasmenést, súlyos kiszáradást, súlyvesztést, anorexiát, levertséget, immunszuppressziót, a PEMS esetében pedig nagyfokú elhullást figyeltek meg. A kórfejlődés nagymértékben függ a kortól és a környezeti változóktól (pl. hőmérséklet és páratartalom) (Heggen-Peay et al., 2002; Moura-Alvarez et al., 2013).

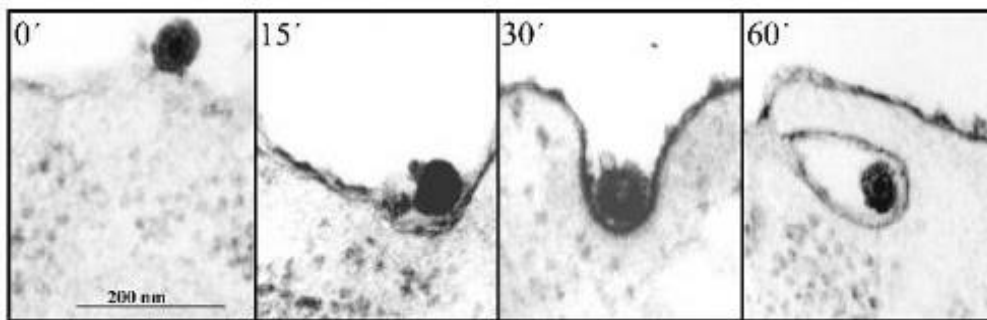
Kacsákból számos esetben izoláltak orthoreovírusokat. Pézsmarécékben a májban, lépben és vesében elhalásos góccokat (Jones, 2000; Jones, 2008), valamint mozgási nehézséget, hasmenést figyelhetek meg (Malkinson et al., 1981). A betegség az 1950-es évek óta ismert és magas morbiditással és mortalitással jár (Malkinson et al., 1981). Fiala ludakban az orthoreovírusok a betegség akut fázisában splenitist és hepatitist okoznak, míg a szubakut és krónikus fázisában arthritis, epicarditis, tenosynovitis, sántaság és lokomotoros zavarok alakulhatnak ki (Palya et al., 2003). 2000-ben, Dél-Kelet Kínában megjelent egy új típusú orthoreovírus, ami egy új tünetegyüttest váltott ki: haemorrhagiás- és necroticus léziókat okozott a májban és a lépben, emellett az elhullások számát is megnövelte (Chen et al., 2012; Wang et al., 2013). Az új típusú orthoreovírusok (N-MDRV) szélesebb gazdaspektrummal rendelkeznek és nemcsak pézsmakacsokat, hanem pekingi kacsákat és házi ludakat is képesek megfertőzni (Liu et al., 2011; Yun et al., 2012).

Az orthoreovírusok elsődleges replikációja *per os* fertőzés esetében a belekben és a Fabricius-féle tömlő epitheliumában történik, innen jut el a vírus a vér útján a többi szervbe, szövetbe. Egyes esetekben agresszívabb, több szövetet érintő fertőzés figyelhető meg (Ni & Kemp, 1995). Oronasalis fertőződés esetén a vírus 2 órával később már megjelenik a belekben és a Fabricius-féle tömlőben, 6 órával később a májban és a vesében, 12 óra múlva pedig a szívben és a hasnyálmirigyben. A vírus transzportja az epitheliális barrierben történik, valószínűleg a makromolekuláris transzport rendszeren keresztül (Jones et al., 1989, Rosenberger, 2003). A fertőzés és a megbetegedés első jeleinek megjelenése közötti inkubációs időszak hossza függ a vírus patotípusától, az állat korától és a fertőződés módjától. Két hetes speciális kórokozóktól mentes (specific pathogen-free, SPF) csirkék

kísérletes fertőzése során – az irodalmi adatok szerint - az inkubációs idő 1 naptól (lábpárnába oltás) egészen 11 napig tartott (intramuscularis, intravénás fertőzés) és intratracheálisan ez az idő 9-13 napra emelkedett (Jones et al., 1989).

4.6. Orthoreovírusok replikációja és morfogenezise

Az orthoreovírusok replikációja a sejt citoplazmájában zajlik (Jones, 2008). A fertőzés első lépése az adszorpció, majd ezt követi a penetráció (Attui et al., 2011). A vírus a σC révén kapcsolódik a sejthez és jut be receptor mediált endocitózissal annak citoplazmájába, majd a vírust tartalmazó endoszómák savasodásának következtében elveszíti a külső kapszid komponenseit, így a transzkripcióra képes egységek bejutnak a sejt citoplazmájába (5. ábra). A transzkripciót a virális maghoz kapcsolódó RNS-függő RNS-polimeráz katalizálja. Ennek hatására virális mRNS képződik, ami a dsRNS pozitív szálával azonos. Az mRNS-nek kettős funkciója van: programozza a vírus-fehérjék szintézisét a riboszómákban, valamint templátként szolgál a negatív szál szintézise során.



5. ábra. Elektronmikroszkópos kép a madár orthoreovírus penetrációjáról (Benavente & Martinez Costas, 2006).

A vírussal fertőzött sejtek nagy, denz citoplazma-zárványokat (ún. viroplazmát) tartalmaznak, melyek részben a replikáció, részben a virion morfogenezis színhelyei. Immunfluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálatok során fény derült arra, hogy a viroplazmák pontosan körülhatárolható, diszkrét struktúrák, amelyek kialakításában a μNS és σNS proteinek játsszák a legfontosabb szerepet. A különböző fehérjék viroplazmába szállítása egy szelektív és kontrollált folyamat, melyben egyes proteinek a μNS segítségével jutnak be, míg mások a mai napig ismeretlen úton teszik ezt (Benavente & Martinez Costas, 2006).

A megfelelő fehérjék viroplazmába kerülése után a virion magjának fehérjéi katalizálják a virális transzkriptumok szintézisét. Ezek többsége a létrejötte után helyben marad, köszönhetően a σNS RNS-kötő aktivitásának. Így ezek az mRNS-ek szolgálnak templátként a negatív szálú RNS szintézise során. A genomsegmentek a különböző felismerő szignálok segítségével kerülnek az utódvírusba. A σA a viroplazmába visszajutva stabilizálja a kapszid

felületét és megakadályozza a további mRNS-ek bejutását. A virion magjának (core) morfogenezise a λ C beépülésével és a negatív szálú RNS szintézisével fejeződik be. Az újonnan elkészült mag sorsa kétféleképpen alakulhat: vagy kialakul körülötte a kapszid és ezzel létrejön a kész utóvírus, vagy a genomról újból mRNS íródik át, amivel újabb replikációs ciklust indít el. A víruspartikulum felépítésében résztvevő többi alkotóelem szintén a citoplazmában épül az újonnan képződő virionba (Attui et al., 2011; Benavente & Martínez-Costas, 2007; Benavente & Martínez-Costas, 2006; Mertens et al., 2000).

4.7. Madár orthoreovírusok diagnosztikája

A madár orthoreovírusok laboratóriumi szaporítása embrionált tojásban és sejtenyészeten egyaránt lehetséges. A chorioallantois membrán és a szikzacskó területére oltva a vírust, a fertőzést követő 3-5. napon az embrió pusztulása figyelhető meg a máj és a lép megnagyobbodásával, vérzésekkel, elhalásos gócok kialakulásával, valamint az embrió torzulásával (Jones, 2008). Sejtenyészeten a madarak orthoreovírusainak többsége óriássejteket hoz létre (Day, 2009; Jones, 2000). Kivételt képeznek ez alól egyes víziszárnyas eredetű orthoreovírusok, mivel ezek S4 szegmenséről hiányzik az óriássejt-képzésért felelős FAST fehérjét kódoló ORF (Bányai et al., 2005). A szövettenyésztes során a sejtkárosító hatás megjelenéséig gyakran 2-3 passzálásra is szükség lehet, amelyek eredményeképpen a fertőzést követően megfigyelhető az óriássejtek képződése és a sejtek leválása a szövettenyésztes edény aljáról. A vírus által legfogékonyabb sejtvonalak máj, vese és fibroblast eredetűek (Jones, 2008). A madár orthoreovírusok megfelelő adaptálódás után tenyésztethetők emlős sejtvonalakon is (pl. hörcsög vese 21 (Baby hamster kidney, BHK-21), sárgahasú szavannacerkóf vese (Vero), Georgia marha vese (GBK)). (Barta et al., 1984; Grande & Benavente, 2000; Schiff et al., 2007). A sejtenyésztesek fertőzésének megerősítésére kínál alternatívát a monoklonáris ellenanyagok segítségével elvégzett immunfluoreszcens festés (Jones, 2000).

Az egyes patogén törzsek elkülönítésére különféle szerológiai módszereket dolgoztak ki: vírusneutralizációs próbát (Robertson & Wilcox, 1986), western immunoblottot (Endo-Munoz, 1990), agargél precipitációs teszteket (Olson & Weiss, 1972), valamint indirekt fluoreszcens antitest vizsgálatot (Ide, 1982). A szerológiai vizsgálatokat ma leginkább a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztek segítségével végzik (Jones, 2008; Rosenberger, 2003).

A nukleinsav kimutatáson alapuló vizsgálatok közül leírták a dot-blot hibridizációt (Yin & Lee, 1998), a reverz transzkripció-polimeráz láncreakciót (RT-PCR) (Jones, 2000), valamint a restrikciós fragmenthossz polimorfizmussal (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) kombinált PCR-t (Liu et al., 1999).

A molekuláris epidemiológiai kutatásokban elsősorban az RT-PCR-t alkalmazzák. Az első madár orthoreovírusokra specifikus RT-PCR-t Xie és munkatársai fejlesztették ki 1997-ben az S1133-as csirke törzs S1 szegmensének egy 521 bázispár hosszúságú szakaszának felerősítésére (Xie et al., 1997). A specifikus primer-kombinációk mellett az *Orthoreovírus* nemzetség valamennyi tagjának kimutatására alkalmas általános primereket is terveztek (Jindal et al., 2012; Wellehan et al., 2009; Zhang et al., 2006).

A madár orthoreovírusok nukleinsav kimutatáson alapuló vizsgálatai nem csak a különböző patogén törzsek megkülönböztetésében segítenek, hanem a vírusgenomok részleges vagy teljes szekvenálása során felderíthetőek az egyes törzsek közötti rokonsági kapcsolatok, valamint pontosabb rálátást kaphatunk a törzsek eredetére, evolúciós folyamataira (Bányai et al., 2011; Dandár et al., 2013).

4.8. A madár orthoreovírusok evolúciós mechanizmusai

A madár orthoreovírusok rendkívüli változékonyságukat elsősorban a pontmutációknak és különböző szegmensek reasszortációjának köszönhetik (Attui et al., 2011).

A reasszortánsok jelenléte jellemző a szegmentált vírusokra. Magát a jelenséget leírták már rotavírusok (Bányai et al., 2009; Bányai, 2010), a bluetonge-vírusok (Ramig et al., 1989), vagy a madár orthoreovírusok esetében is (Ramig & Fields, 1983). Ha ugyanazt a sejtet egy időben két eltérő vírus is megfertőzi, akkor a replikáció során keletkező utóvírusokba a különböző szülői vírusokból származó szegmensek kerülhetnek változatos kombinációban. Ez a kevert fertőzés elősegíti a vírusok evolúcióját, hiszen a génszegmensek cseréjének következtében olyan reasszortánsok keletkeznek, amelyek esetlegesen jobban adaptálódnak az általuk fertőzött gazdaszervezethez, könnyebben replikálódnak, vagy hatékonyabban védekeznek a gazdaszervezet immunrendszere ellen (Ni & Kemp, 1990). Ha a reasszortáció a külső kapszid fehérjéinek valamelyikét érinti, akkor a vírus új antigén tulajdonságokat kaphat (antigén váltás, shift) (Su et al., 2006). Ennek köszönhetően a madár orthoreovírusok rendkívül változékonnyak.

A nukleotid szubsztitúcióval járó változások szintén hozzájárulnak a diverzitás növeléséhez. A különböző pontmutációkat a vírus RNS-függő RNS-polimeráza generálja, amely nem rendelkezik saját javító-mechanizmussal, így a replikáció során pontmutációk halmozódhatnak fel (Liu et al., 2003). Különböző madár orthoreovírus törzsek szegmenseinek vizsgálata kimutatta, hogy a szinoním szubsztitúciók túlsúlyban vannak a nem szinonímakkal szemben.

Végül, az adott RNS szegmensen belül más mechanizmusok, például inzerciók, deléciók és duplikációk szintén bekövetkezhetnek, amelyek megváltoztathatják a törzsek tulajdonságait.

5. Anyag és módszer

5.1. Madár orthoreovírus törzsek eredete

A vizsgáltunkhoz használt 21 vírustörzset a CEVA Phylaxia Zrt., a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), illetve a Haartman Institute–University of Helsinki munkatársai bocsájtották a rendelkezésünkre bélsár, szövetfelülűszó, valamint liofilizátum formájában.

Vizsgálataink során egy dolmányos varjúból, egy fogolyból, egy házi lúdból, két pézsmakacsából, három házi pulykából, valamint tizenkét házi tyúkból származó orthoreovírus törzs teljes, illetve majdnem teljes; és egy fácánból izolált orthoreovírus törzs részleges genomszekvenciáját határoztuk meg. A minták az 1999-2012 közötti időszakból, Magyarország hat megyéjéből (Békés, Baranya, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Borsod-Abaúj-Zemplén, Bács-Kiskun), valamint Franciaországból, Finnországból és az USA-ból származtak. A mintákat feldolgozásig hűtve, illetve fagyasztva tároltuk (7. táblázat).

5.2. Sejtvonalak

A házi tyúkból, házi pulykából, pézsmakacsából és házi lúdból származó madár orthoreovírus törzseket csirke embrió vese (chicken embryo kidney, CEK) primer sejttenyészetben, a fogolyból, fácánból és dolmányos varjúból származó vírus törzseket csirke májsejt felhám (chicken hepatoma cell line, LMH, ATCC-CRL-2117™) és BHK-21 (ATCC-CCL-10™) sejtvonalakon szaporítottuk. A munkánk során borjúsavó nélküli (Hemoking), illetve 7%-os savó tartalmú, antibiotikum hozzáadásával (100x Antibioticum/Antimycoticum Solution: 10000 I.E. Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin (100x), Sigma-Aldrich) készült fenntartó tápfolyadékot (MEM, Minimum Essential Medium Eagle, Sigma Aldrich) használtunk.

7. táblázat. A vizsgálatok során felhasznált szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek

Iktatószám		Állatfaj	Ország	Megye	Település	Szárnyazási hely (ország/település)	Izolálás éve	Minta	Állatok kora	Kórkép
875Bi/05	házi tyúk	Magyarország	Borsod-Abaúj-Zemplén	Szakáld	2005		liofilizátum	14 napos	emésztési zavar, elhalásos bélyugulás, légzsák-, szívurokgyulladás, sziktómló visszamaradás	
3211V/02	házi tyúk	Magyarország	Hajdú-Bihar	Hajdúnánás	2002		liofilizátum	-	-	
T 1781	házi tyúk	Magyarország	Hajdú-Bihar	Debrecen	2012		szövetfelülűszó	18 napos	idegrendszeri tünetek	
284V/06	házi tyúk	Magyarország	Békés	Békéscsaba	2006		liofilizátum	-	emésztőrendszeri tünetek, szétnövés	
3457-M/11	házi tyúk	Magyarország	-	-	2011		liofilizátum	37 napos	elhalásos bélyugulás, köszvény, talpfekély	
AVS-B	Házi tyúk	USA	-	-	2006		szövetfelülűszó	6 napos	RSS	

7. táblázat (folyt.). A vizsgálatok során felhasznált szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek

Iktatószám	Állatfaj	Származási hely (ország/település)			Izolálás éve	Minta	Állatok kora	Kórkép
		Ország	Megye	Település				
		924Bi/05	házi tyúk	Magyarország				
878Bi/05	házi tyúk	Magyarország	Hajdú-Bihar	Debrecen	2005	liofilizátum	21 napos	elhalásos bélglyulladás, szívélegtelenység
16821-M/06	házi tyúk	Magyarország	Szabolcs-Szatmár-Bereg	Ajak	2006	liofilizátum	35 napos	sántaság, elhalásos bélglyulladás, szívurokgyullad ás, légzőszervi tünetek
17206-M/06	házi tyúk	Magyarország	Hajdú-Bihar	Görbeháza	2006	liofilizátum	-	májelhalás, légszák- , és szívurokgyulladás, elhalásos bélglyulladás
17227-M/10	házi tyúk	Magyarország	Hajdú-Bihar	Nagyhegyes	2010	liofilizátum	14-28 napos	elhalásos bélglyulladás, szívélegtelenység, vese-, szívurokgyulladás

7. táblázat (folyt.). A vizsgálatok során felhasznált szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek

Iktatószám	Állatfaj			Izolálás éve	Minta	Állatok kora	Kórkép
	Ország	Szárnyazási hely (ország/település)	Település				
D2044	pézsmaréce	Franciaország	-	-	2012	17 napos	nehéz légzés, mozgási rendellenesség
D20/99	házi liba	Magyarország	-	-	1999	-	májelhalás
D1104	házi pulyka	Magyarország	Baranya	Mágoos	2009	42 hetes	-
D1246	házi pulyka	Magyarország	Békés	Szarvas	2009	35 napos	-
19831-M/09	házi pulyka	Magyarország	Békés	Szarvas	2009	14 napos	csapzott tollazat, szívurok, vékonybélgyulladás
4599V/04	házi tyúk	Magyarország	Szabolcs- Szatmár-Bereg	Kisvárd	2004	-	-

7. táblázat (folyt.). A vizsgálatok során felhasznált szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek

Iktatószám	Állatfaj			Származási hely (ország/telep ülés)	Izolálás éve	Minta	Állatok kora	Kórkép
	Ország	Megye	Település					
D1546	pézsmaréce	Franciaország	-	-	2010	szövetfelülűszó	43 napos	mozgási-, tollasodási zavar
D1009	fogoly	-	-	-	-	szövetfelülűszó	-	-
18769	fácán	-	-	-	2011	ürülék	-	-
Tvárminne	dolmányos varjú	Finnország	-	-	2002	szövetfelülűszó	-	idegrendszeri tünetek

5.3. Vírusizolálás

Vírusizolálást szövetfelülúszókból és bélsár mintákból végeztük. Egyes esetekben az együttműködő kollégáktól kapott izolátumok felszaporítására is szükség volt annak érdekében, hogy elegendő templátot állítsunk elő a genomszekvenálásokhoz. A vírusokat tartalmazó mintát (bélsár, szövetfelülúszó) 10 percig 5000x g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót pipetta segítségével leszívtuk, és ennek 50 µl-ét 6 lyukú szövettenyésztő lemezen (Thermo Scientific) elszaporított, körülbelül 80%-osan benőtt sejtenyészethez adtuk. Ezt követően 1,5-2 órán keresztül 37°C-on adszorbeáltuk. Ezután a sejtekre 1,5 ml 7%-os MEM tápfolyadékot mértünk, majd 3-4 napig 37°C-on inkubáltuk. A jellemző citopatogén hatás (óriássejtek) megjelenése után a szövettenyészeteket háromszor -80°C-on lefagyasztottuk és felolvasztottuk. A szövetfelülúszót 10 percig 5000x g-vel centrifugáltuk, majd az így nyert szuszpenzió 50 µl-ét átoltottuk egy új szövettenyésztő lemezre. Három passzázst követően a centrifugálással végzett ülepités után (10 perc, 5000x g) a sejtmentes felülúszót használtuk fel a virális RNS kinyeréséhez.

5.4. Virális nukleinsav tisztítása

A virális RNS-t tartalmazó szövetfelülúszó, illetve steril, kétszeresen desztillált vízben oldott liofilizátum 1 ml-éhez 500 µl NaCl (5 m/v%) és 500 µl polietilén-glikol (PEG 6000, 7 m/v%, Sigma Aldrich) oldatot adtunk, amit ezután 4°C-on egy éjszakán át inkubáltunk. Másnap a pegilált vírusszuszenziót 4°C-on 3000x g-n 30 percig centrifugáltuk, majd az így nyert üledéket használtuk a további vizsgálatokra. A PBS-ben (phosphate buffered saline) felvett üledéket 3-szoros térfogatnyi TRIzol reagenssel kevertük (Invitrogen, Life Technologies), majd 20 perc inkubálás után egy térfogat egységnyi kloroformot mértünk az elegyhez és összekevertük. Az újabb inkubálást (5 perc) és a centrifugálást követően (12000x g, 15 perc) a felső vizes fázis 500 µl-éhez azonos térfogatú jéghideg izopropanolt adtunk. A keveréket 20 percig szobahőn, vagy -20°C-on egy éjszakán át állni hagytuk, majd ezt követően 15 percig 12000x g-n centrifugáltuk. Az izopropanollal kicsapott RNS pelletet 1000 µl 75 v/v %-os etanollal mostuk, 15 percig 12000x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítva az üledéket szobahőmérsékleten teljes száradásig állni hagytuk. Végül az RNS-t 25 µl nukleáz mentes vízben (Ambion) oldottuk be. A mintákat felhasználásig -80°C-on fagyasztva tároltuk.

Az RNS kivonását más esetekben közvetlenül a vírustartalmú szövetfelülúszóból a QIAmp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) segítségével végeztük a gyártó utasításait követve. Ebben az esetben a virális RNS-t tartalmazó szövetfelülúszó 140 µl-jét használtuk fel, majd a

kivonás utolsó lépéseként 50 µl nukleáz mentes vízben oldottuk vissza a szilika oszlopra adszorbeált nukleinsavakat. A mintákat -80°C-on fagyasztva tároltuk a további felhasználásig.

5.5. Primertervezés

Vizsgálataink során specifikus és degenerált primereket egyaránt alkalmaztunk. A degenerált primerek tervezése során a különböző madár orthoreovírus törzsek azonos szegmenseihez tartozó nukleinsav szekvenciáit a MULTALIN programmal (Corpet 1988, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) illesztettük össze. Az így létrehozott szekvencia illesztéseket használtuk fel a primerek tervezésénél. A primereket 18-25 bázispár (bp) hosszúságban a szegmensek leginkább megőrzött szakaszaira terveztük, felhasználva az Integrated DNA Technologies honlapján található OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) programot. A tervezés során igyekeztünk 50% körüli GC arányt, 50°C feletti (de lehetőleg 65°C alatti) olvadási hőmérsékletet választani, továbbá a hajtú-szerű másodlagos szerkezeteket próbáltuk kiküszöbölni (8. táblázat).

8. táblázat. Saját tervezésű primerek az általunk vizsgált különböző madár orthoreovírus törzsek genomjának szekvenálásához

Megnevezés	Primer	Szegmens	Pozíció	Olvadási átlag hőmérséklet
BK1	5' – GCN RAY TAC ATY AAY WAN CAY ATG AA – 3'	L2	1647-1672	52,8°C
BK2	5' – CCR TCR TCN CCY TGR CAN ACG TA – 3'	L2	2196-2218	60,8 °C
BK3	5' – CTC GAC ATG GCC TAT CTA GCC – 3'	M1	1-27	56,9 °C
BK4	5' – GAT GAR TAT CTC AAG ACG ACT AAC – 3'	M1	2283-2260	51,6 °C
BK5b	5' – AGG TAC GTG TGC CAA ACT TTC – 3'	S3	5-27	55,6 °C
BK6	5' – GAA TAG GCG AGT CCC GCT AA – 3'	S3	1180-1199	56,6 °C
BK7	5' – GAT GAA TAC ATC CAC GYG CT – 3'	S2	1324-1308	53,9 °C
BK8	5' – GCT TTT TCT CCC ACG ATG GC – 3'	S2	1-20	56,9 °C
BK9	5' – GCT TTT TGA GTC CTT GTG CAG – 3'	S4	1-21	54,8 °C
BK10	5' – GAT GAR TAA GAG TCC AAG TCG – 3'	S4	1172-1192	51,4 °C
BK11	5' – TCA ATC CCT TGT TCG TCG ATG – 3'	S1	7-27	55,0 °C
BK12	5' – GAT GAA TAA CCA ATC CCM GTA – 3'	S1	1625-1645	50,8 °C

5.6. Szegmensvégek azonosítása RNS ligációval

A szegmensek 5' és 3' végi szekvenciájának megállapításához a szegmensvégekhez egy, már korábban leírt, 5' végén foszforilált, 3' végén amino-csoporttal blokkolt PC3 elnevezésű primert (5' - P-CCCGTCGACGAATTCTTT-NH₃ - 3') kötöttünk (Lambden, 1992). A reakcióelegy 5 µl RNS-t, 7,5 µl nukleáz mentes vizet, 12,5 µl 34%-os PEG 8000-et, 3 µl 10x RNS ligáz puffert, valamint 20 U T4 RNS ligázt (New England Biolabs) tartalmazott. A reakció 17°C-on 17 órán keresztül zajlott. Az így kapott ligátumot a QIAGEN Gel Purification Kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai alapján. A további PCR vizsgálatok során a szegmenseket a PC3 primerrel komplementer PC2 (5' – AAAGAATTCGTCGACGGG – 3'), illetve egy szekvensspecifikus primerrel erősítettük fel (8. táblázat).

5.7. PCR-reakciók

Vizsgálataink során minden esetben a szekvenálási módszertől függően választottuk meg a genomamplifikációs módszert. Ennek megfelelően egylépeses vagy kétlépeses RT-PCR-t alkalmaztunk specifikus primerek segítségével akkor, amikor a felerősített génszakaszokat illetve genomszegmenseket a hagyományos (Sanger-féle) szekvenálásnak terveztük alávetni. Más esetekben, amikor nagy átírási képességű új-generációs szekvenálás végrehajtását terveztük, előzetesen random RT-PCR segítségével erősítettük fel a genomszegmenseket.

5.7.1. Egylépeses reverz transzkripció-polimeráz lánreakció (RT-PCR)

Az AVS-B és a T1781-es házi tyúk orthoreovírus törzsek génjeinek amplifikációját egylépeses RT-PCR módszer segítségével végeztük el One-Step RT-PCR Kittel (QIAGEN). Első lépésben 3 µl RNS-t adtunk 2 µl nukleáz mentes vízhez és 1- 1 µl (20 µM) „reverse” és „forward” primerhez (8. táblázat), majd 97°C-on 5 percig denaturáltuk az elegyet. Az RT-PCR keverék mintaként 2 µl nukleáz mentes vizet, 2,5 µl 5x OneStep RT-PCR puffert, 0,5 µl dNTP mixet (dezoxiribonukleotid-trifoszfát, egyenként 10 mM-os koncentrációjú), 0,5 µl OneStep RT-PCR enzim mixet (QIAGEN) tartalmazott. A reakció végtérfogata 12,5 µl volt. Az RT-PCR során alkalmazott programot a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat. Az egylépéses RT-PCR során alkalmazott program hőmérsékleti paraméterei

Reverz transzkripció	42°C	30 perc	} 40X
Előmelegítés	95°C	15 perc	
Denaturáció	95°C	30 mp	
Primer tapadás	42-55°C (primertől függően)	30 mp	
Láncépítés	72°C	2-3 perc	
Végső lánc hosszabbítás	72°C	5 perc	

5.7.2. Kétlépéses RT-PCR

Egy pulykából izolált vírustörzs (D1104) genomjának vizsgálata során kétlépéses RT-PCR-t alkalmaztunk. A kivont RNS-ről random-hexamer oligonukleotidok segítségével készítettünk cDNS átíratot a következő recept szerint.

A folyamat során 6 µl RNS-t és 1 µl (50 µM) random hexamer oligonukleotidot 97°C-on 5 percig denaturáltuk. Az inkubációt követően a reverz transzkripció során 11,5 µl nukleáz mentes vizet, 5 µl 5x puffert, 0,5 µl dNTP-t (10-10mM), 0,5 µl RevertAid Reverse transcriptase-t (200 U/µl, Thermo Scientific), 0,5 µl nukleáz inhibítort (40 U/µl, Thermo Scientific) mértünk az elegyhez.

A cDNS szintézis hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: 25°C 5 perc, majd ezt követően egy 42°C 30 perc és 70°C 10 perc.

A PCR elegy összetétele a következő volt: 3 µl cDNS, 0,5 µl DreamTaq polimeráz (5 U/µl Thermo Scientific), 1-1 µl (20 µM) forward és reverse primer (8. táblázat), 1 µl dNTP (10-10 mM), 5 µl 5x puffer, 13,5 µl nukleáz mentes víz, 25 µl végtérfogatban. A kétlépéses RT-PCR során alkalmazott programot a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. A kétlépéses RT-PCR során alkalmazott program hőmérsékleti paraméterei

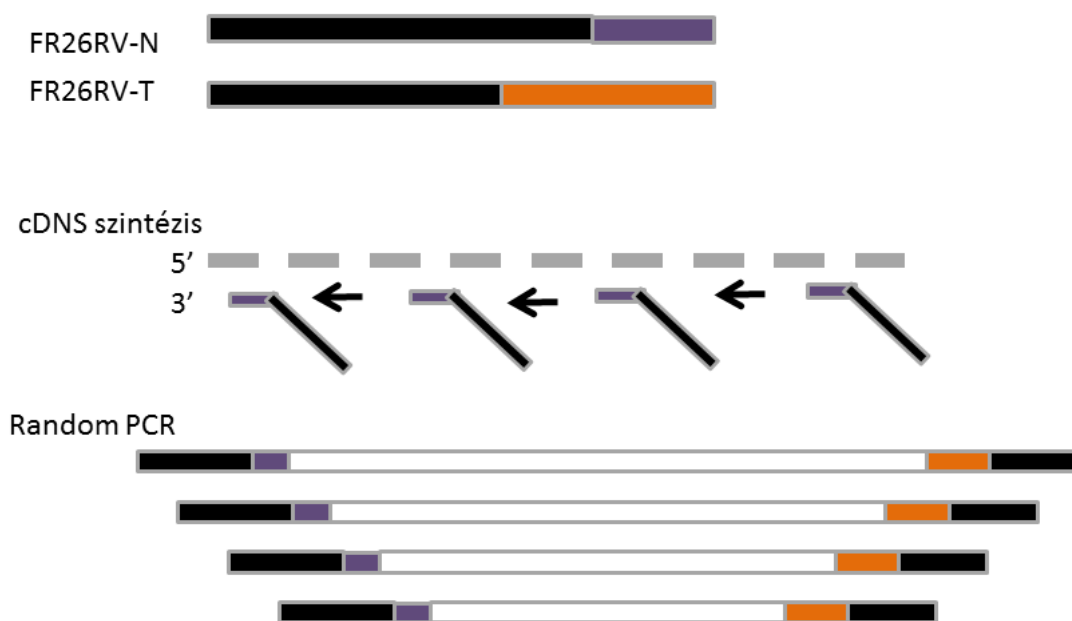
PCR aktiváló lépés	94 °C	3 perc	} 40
Denaturáció	94 °C	30 perc	
Primer tapadás	42-55°C (primertől függően)	30 mp	
Láncépítés	72°C	2-3 perc	
Végső lánc hosszabbítás	72°C	5 perc	

5.7.3. Random primerekkel elvégzett RT-PCR

A házi tyúkból, házi pulykából, pézsmarécéből, házi lúdból, fogolyból és fácánból származó orthoreovírus törzsek genomszekvenciáját random PCR-t követően az Ion Torrent szemikonduktor szekvenáló készülék (Ion Personal Genome Machine® [PGM™], Life

Technologies) segítségével állapítottuk meg a Djikeng et al. (2008) által közölt módszer adaptálásával. Röviden: 6 µl RNS-t és 1 µl, a 3' végén hat random nukleotidot tartalmazó FR26RV-N (5' – GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN – 3') (20 µM) primerrel 95°C-n 5 percig denaturáltuk. A reverz transzkripció keverék a következőket tartalmazta: 1 µl AMV reverz transzkriptáz (10 U/ µl, Promega), 5 µl 5x AMV puffer, 1 µl dNTP (10-10 mM) és 11 µl nukleáz mentes víz. A cDNS szintézis hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: a kezdeti denaturálás 95°C 5 perc, majd ezt követően 25°C 10 perc, 42°C 1 óra és végül 72°C 10 perc.

Az így elkészített cDNS 3 µl-ét használtuk fel a PCR-hez az alábbi módon: 2 µl FR20RV-T (5' – GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC – 3') primer (20 µM), 10 µl 5x puffer, 0,25 µl DreamTaq polimeráz (5 U/µl), 1µl dNTP (10-10 mM) és 33,75 µl nukleáz mentes víz. A reakcióelegy végtérfogata 50 µl volt. A PCR hőprofilja megegyezett a kétlépéses RT-PCR során alkalmazottal; a primer tapadás 48°C-on történt (6. ábra).



6. ábra. A random primerekkel elvégzett RT-PCR sematikus ábrája. A FR26RV-N primer 3' végén hat random nukleotidot tartalmaz (lila jelölés), amíg az FR26RV-T primer a 3' végén 20 nukleotidból álló poli-T farokkal rendelkezik. A reverz transzkripció során az FR26RV-N primerek random helyekre kötődnek a virális RNS-hez. Az FR20RV-T primer hozzáadásával végzett RT-PCR reakció után így a PCR termékek különböző hosszúságú szakaszokat tartalmaznak.

5.8. PCR termékek elválasztása agaróz gélben

A PCR termékeket 1 m/v%-os agaróz gélben (Lonza) 90V-on 25 percig elektroforetizáltuk (0,5 v/v%-os trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát oldatban (TBE) pH=8,3; GelRed (Biotium) festéssel). Molekulatömeg markerként 100 bp-os O'Gene Ruler DNS létrát (Thermo Scientific) használtunk. A futtatás után a gélt UV-átvilágítással vizsgáltuk, és az eredményeket CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Clever Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) rögzítettük.

5.9. DNS fragmentumok tisztítása gélből

A sikeresen amplifikált termékeket az elektroforézist követően a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (GeneAid) segítségével tisztítottuk ki a gélből a gyártó utasításai alapján, 50 µl végtérfogatban. A kitisztított DNS-fragmentumokat -20°C-on tároltuk a további felhasználásig.

5.10. Szekvenálás

5.10.1. Sanger-féle szekvenálás

A T1781, D1104, AVS-B illetve részben a TVAV orthoreovírus törzsek esetében a gélből visszanyert és kitisztított PCR-termékek szekvenáló reakcióját a BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Life Technologies) végeztük el. A reakcióelegy 2 µl nukleáz mentes vizet, 2 µl BigDye reakcióelegyet, 1 µl (10 µM) primert és 5 µl tisztított PCR terméket tartalmazott. A szekvenálás során ugyanazokat a primereket használtuk, amelyekkel az egyes génszakaszok felerősítését is végeztük (8. táblázat). A szekvenálás során alkalmazott hőmérsékleti profilt az 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat. A szekvenálás során alkalmazott program hőmérsékleti paraméterei

PCR aktiváló lépés	96 °C	1 perc	} 25X
Denaturáció	95 °C	20 mp	
Primer tapadás	50 °C	5 mp	
Láncépítés	60°C	4 perc	

A szekvenálási reakció után a termékeket nukleáz mentes víz, etanol és nátrium-acetát frissen készített keverékének segítségével csaptuk ki (31 µl 96 v/v% etanol; 1,5 µl 3 M, pH 4,6 Na-acetát; 7,5 µl nukleáz mentes víz), majd centrifugáltuk (1825x g, 30 perc, 4 °C). Ezt

követően 70 v/v% etanollal mostuk, majd újabb centrifugálást követően (1825x g, 30 perc, 4°C) az üledéket szobahőmérsékleten szárítottuk.

5.10.2. Új-generációs szekvenálás – Ion Torrent RGM segítségével

A random RT-PCR termékét GelRed-del megfestett 1%-os agaróz gélben megfuttattuk. A kapott körülbelül 200-2000 bp hosszúságú terméket tartalmazó gélsávot kivágtuk és kitisztítottuk a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) segítségével a gyártó utasításai szerint. A szekvenáláshoz szükséges könyvtárakat a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set-tel (New England Biolabs) készítettük IonTorrent Xpress vonalkód adapterek (Life Technologies) felhasználásával, a gyártó utasításai alapján. Az emulziós PCR-t az Ion OneTouch™ Template Kit-et (Life Technologies) felhasználva - szintén a gyártó utasításait követve – OneTouch készüléken végeztük el. A templátokat tartalmazó gyöngyöt az Ion OneTouch™ ES pipettázó robotjának segítségével dúsítottuk, majd az így előkészített mintákat az Ion Torrent semikonduktor szekvenáló készülék (Ion Personal Genome Machine® [PGM™]) segítségével elemeztük, 316-os illetve 318-as típusú chipeken.

5.11. Szekvenca analízis és filogenetika

A Sanger automata szekvenálás eredményét a BioEdit (Hall, 1999) programmal jelenítettük meg. A szekvenciákat a BLASTN és BLASTX (Altschul et al., 1990) homológiakereső programok segítségével online azonosítottuk a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbankjában (génbank: GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), majd a MULTALIN és a GeneDoc (Nicholas et al., 1997) szekvenciaillesztő programokkal illesztettük egymáshoz, valamint a referenciaként használt vírustörzsek szekvenciáihoz (1. melléklet).

Az Ion Torrent szekvenáló készülék által leképezett adatokat a CLC Bio (www.clcbio.com) program segítségével illesztettük a génbankból letöltött referencia szekvenciákhoz, majd a GeneDoc szekvenciaillesztő programmal illesztettük egymáshoz.

A filogenetikai törzsfák elkészítéséhez a MEGA5 programot (Tamura et al., 2011) vettük igénybe, maximum likelihood (ML) fa-rekonstrukciós algoritmust és a Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellt használva. A törzsfá megbízhatóságát 500-szor megismételt bootstrap teszttel ellenőriztük.

6. Eredmények

6.1. Madarak orthoreovírusainak genomszerveződése

A teljes hosszúságú orthoreovírus genomok mérete átlagosan 23 500 bp (22969 bp – 23579 bp) volt. Minden genomszegmens egy rövid, nagymértékben megőrzött szakasszal kezdődött és végződött. Ezek az 5' végen a dolmányos varjú orthoreovírusának esetében eltértek a többi orthoreovírusban megszokottól (GCCTTT a GCTTTT helyett), míg a 3' végen található (TCATC) tipikusnak volt mondható minden vizsgált orthoreovírus törzs esetében (12. táblázat).

12. táblázat. Konzervatív szegmensvégi szekvenciák a különböző madár eredetű orthoreovírus törzsekben (N=nem meghatározható, hogy a szekvencia A,T,G,C tartalmú-e)

Vírus törzs	Gazdafaj	Származási hely	Izolálás éve	Szegmens	Szegmensvégi szekvencia	
					5'	3'
Tvärminne avian virus (TVAV)	dolmányos varjú	Finnország	2002	L1	GCCTTTTCCTCCC	AGTTATTCATC
				M1	GCCTTTCCCCGC	GGGTGATCATC
				S1	GCCTTTGACCC	GGCTATTCATC
AVS-B	házi tyúk	USA	2006	L1	GCTTTTCTCCGA	GATTATTCATC
				M1	GCTTTTCTCGAC	AGATACTCATC
				S1	GCTTTTCAATC	GGTATTCATC
D1104	házi pulyka	Magyarország	2009	L1	GCTNTTCTCCGA	GATTATTCATC
				M1	GCTTTTCTCGAC	AGGTACTIONCATC
				S1	GCTTTTCAACC	GATTATTCATC
D1546	pézsmakacsa	Franciaország	2010	L1	GCTTTTCTCCGA	GGTATTCATC
				M1	GCTTTTCCTCGAC	AGATATTCATC
				S1	GCTTTTCCTTAG	GGTATTCATC
D20/99	házi lúd	Magyarország	1999	L1	GCTTTTCTCCGA	GGTATTCATC
				M1	GCTTTTCTCGAC	AGATATTCATC
				S1	GCTTTTCCTTC	GGTATTCATC

A nem transzlálódó régiók (untranslated region, UTR) hossza 12-62 bp volt az 5' végen és 30-98 bp a 3' végen. A teljes hosszukban megszekvenált szegmensek mérettartománya a következőképpen alakult: az L1 szegmens 3958-3993 bp, az L2 3796-3829 bp, az L3 3902-3907 bp, az M1 2282-2288 bp, az M2 2154-2158 bp, az M3 1996-2026 bp, az S2 1322-1327 bp, az S3 1169-1203 bp, az S4 1192-1201 bp közötti hosszúságú volt. A szegmensek – az orthoreovírusokra jellemző módon – általában monocisztronosok, a feltehetően róluk képződő egy-egy fehérje mérete az alábbi módon alakult: a λ A 1293-1295 as, λ B 1259 as, λ C 1283-1285 as, a μ A 732-737 as, μ B 676-675 as, μ NS 630-639 as, σ A 416 as, σ B 367 as, σ NS 367-368 as. Kivételt a σ C fehérjét kódoló S1 illetve S4 szegmens jelentette. A házi tyúk, házi pulykák, a fogoly, valamint a dolmányos varjú orthoreovírusainak esetében az S1 három egymást részlegesen átfedő ORF-fel rendelkezett: a p10 96-99 as, a p17 146-172 as, a σ C 326 as hosszúságú terméket kódolt. A pézsmarécék és a házi lúd esetében az S1 szegmensekkel ekvivalens S4 bizonyult policisztronosnak. Két, egymást részlegesen átfedő ORF-et hordoztak ezen a génszegmensen, amelyek a σ C (269 as), és a p10-es (95 as) fehérjéket kódolták.

A különböző szegmenseken kódolt fehérjék azonosítását – a szekvenciahomológiák meghatározásán kívül - azok tipikus aminosav szekvencia motívumai is segítették. Így a λ A fehérjére a cink-kötő motívum (as 182-202), a λ B fehérjére – a minden egyes RNS-függő RNS-polimerázra jellemző – GDD motívum (as 725-735), míg a λ C fehérjére az S-adenozil-L-methionin (SAM) kötő motívum (as 822-830) volt jellemző (Shen et al., 2007; Xu & Coombs, 2008) (7. ábra).

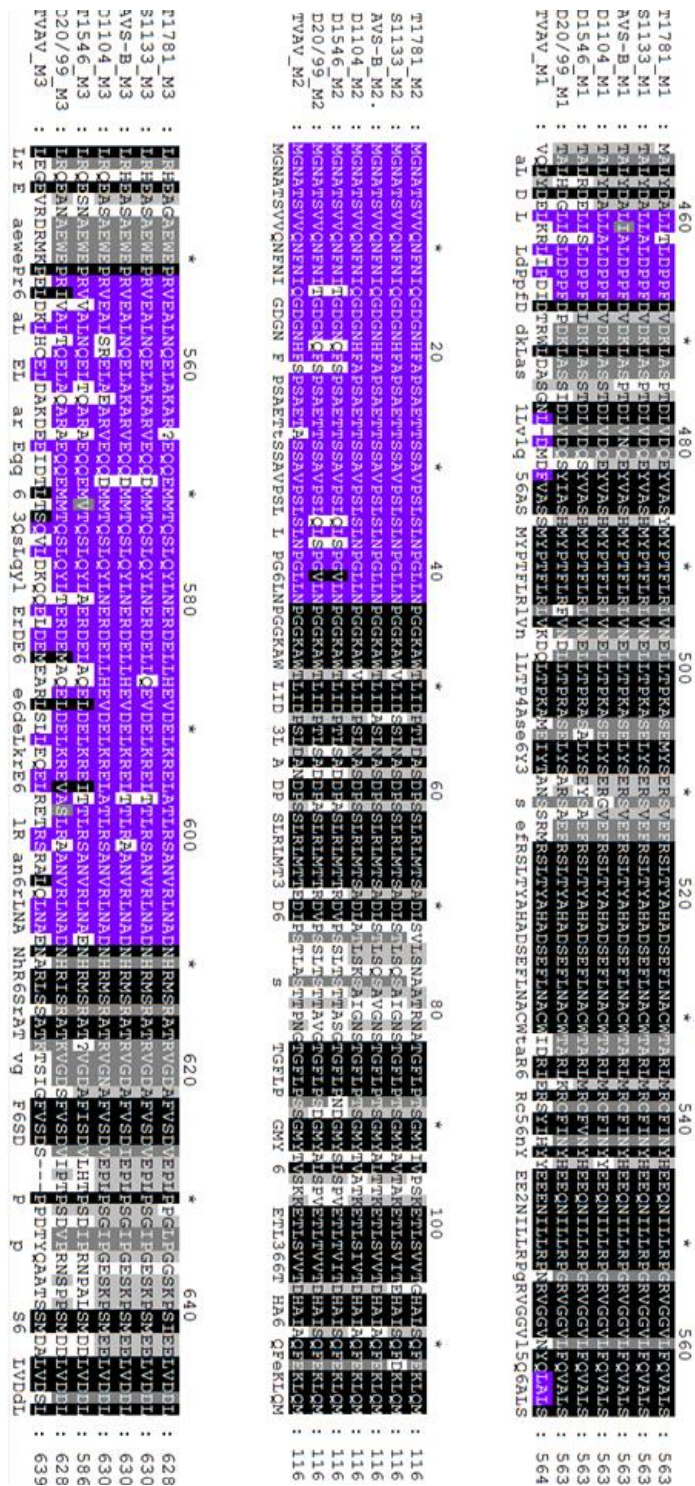
```

T1781_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 225
D1104_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 226
S1133_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 226
AVS-B_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 226
D1546_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 226
D20/99_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 226
TVAV_L1 : DNRKIDVYFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM : 228
D N D*DVVFGGSGGDRNAITKRTGAVDNDGGVAVVPRKATISAKAMMEQQLVAGLPRPSPNHICTVCMACQFASADALTIHQVTHSIGSNAAITFSISTAVEEFTQSM
T1781_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
S1133_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
AVS-B_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
D1104_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
D1546_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
D20/99_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
TVAV_L2 : TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA : 805
TANNSTWMDGLRWFIFSGSLVLRKRFCSISICRNYVCCGLMIVDGLTGRKIGELIEEVPELRVYGSFGANNVDIEFGNAEYIKLYFLNGCRIPNYSRHPICGERA
T1781_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
S1133_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
AVS-B_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
D1104_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
D1546_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
D20/99_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
TVAV_L3 : FYRATLSIDFTYDVRHWMLDVGCPPELRFLSILSDLPVILDTRRIFPFGCMTYRTRFESDYIVNVVLSGAVVSSILSISAAADANITL EGVMLLIQCWPNVWTL : 919
FYI L dit hwdLlGcgpEaR l3IepDdFecUtrPle F gwaSfId L yIYL tIvElsIvgadEeScElJl3gAcaDane3lH getrqeEgCe a V F

```

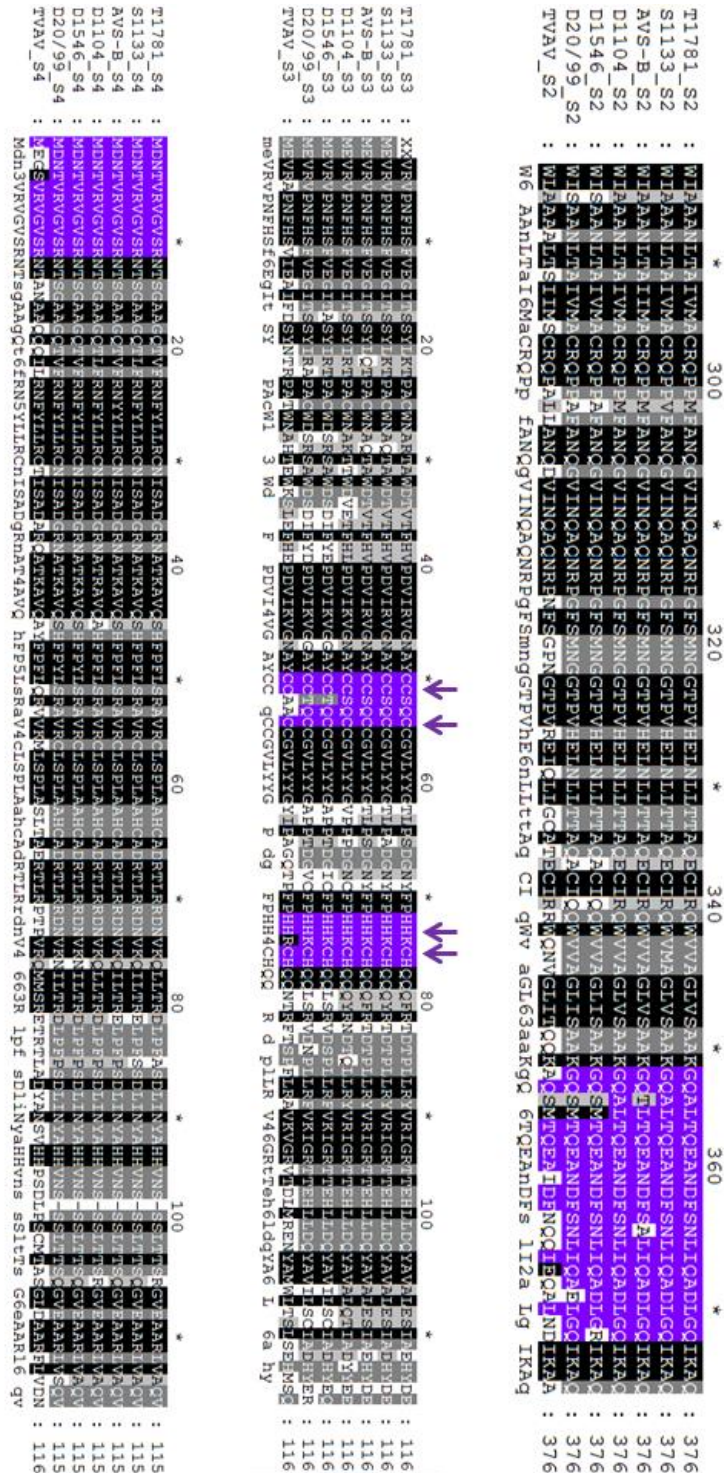
7. ábra. Az L-osztályú szegmenseken megfigyelhető, az általunk meghatározott madár eredetű orthoreovírus törzsek azonosításhoz alkalmazott tipikus aminosav mintázatok (lila színnel kiemelve). A fehér, a szürke és a fekete kiemelések a szekvenciák illeszkedésének mértékét jelzik. Az ábrán három házi tyúk (T1781, S1133, AVS-B), egy házi pulyka (D1104), egy pézsmaréca (D1546), egy házi lúd (D20/99) és egy dolmányos varjú (TVAV) eredetű virustörzsek szekvenciáinak pozicionális illesztései láthatóak.

A μ A fehérjére az N-6 adenin specifikus metiláz motívum (as 457-464), a μ B-re a hasítási termékekért felelős első 42 aminosav, míg a μ NS-re az ún. „hasítási spirál” (as 542-602) volt a jellemző (Su et al., 2006; Zhang et al., 2007) (8.ábra).



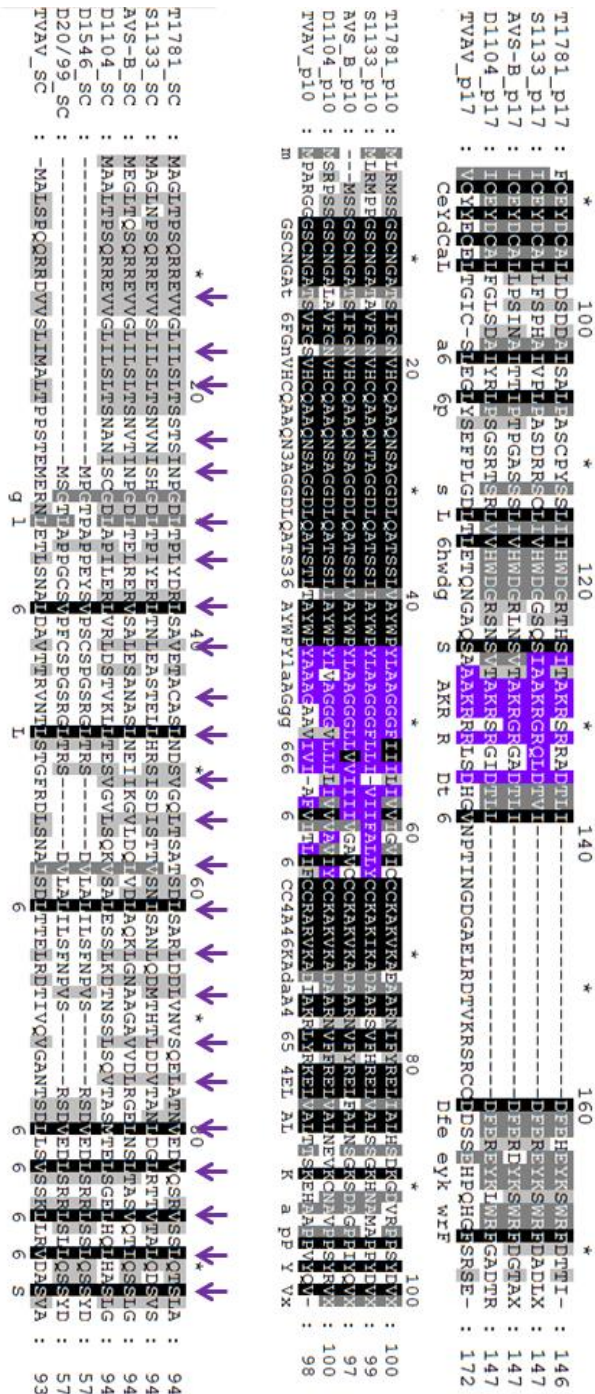
8. ábra. Az M-osztályú szegmenseken megfigyelhető, az azonosításhoz alkalmazott tipikus aminosav mintázatok (lila színnel kiemelve). A fehér, a szürke és a fekete kiemelések a szekvenciák illeszkedésének mértékét jelzik. Az ábrán három házi tyúk (T1781, S1133, AVS-B), egy házi pulyka (D1104), egy pézsmaréce (D1546), egy házi lúd (D20/99) és egy dolmányos varjú (TVAV) eredetű vírustörzs szekvenciáinak pozicionális illesztései láthatóak.

A σA fehérjére a duplaszálú RNS kötődéséért felelős aminosav szakasz (as 353-372), a σB fehérjére a minden orthoreovírusban fellelhető „cink-ujj” (CCHC) motívum (as 50-77), míg a σNS fehérjére az ssRNS kötődéséért felelős szakasz (as 1-11) volt jellemző (Duncan 1999) (9. ábra).



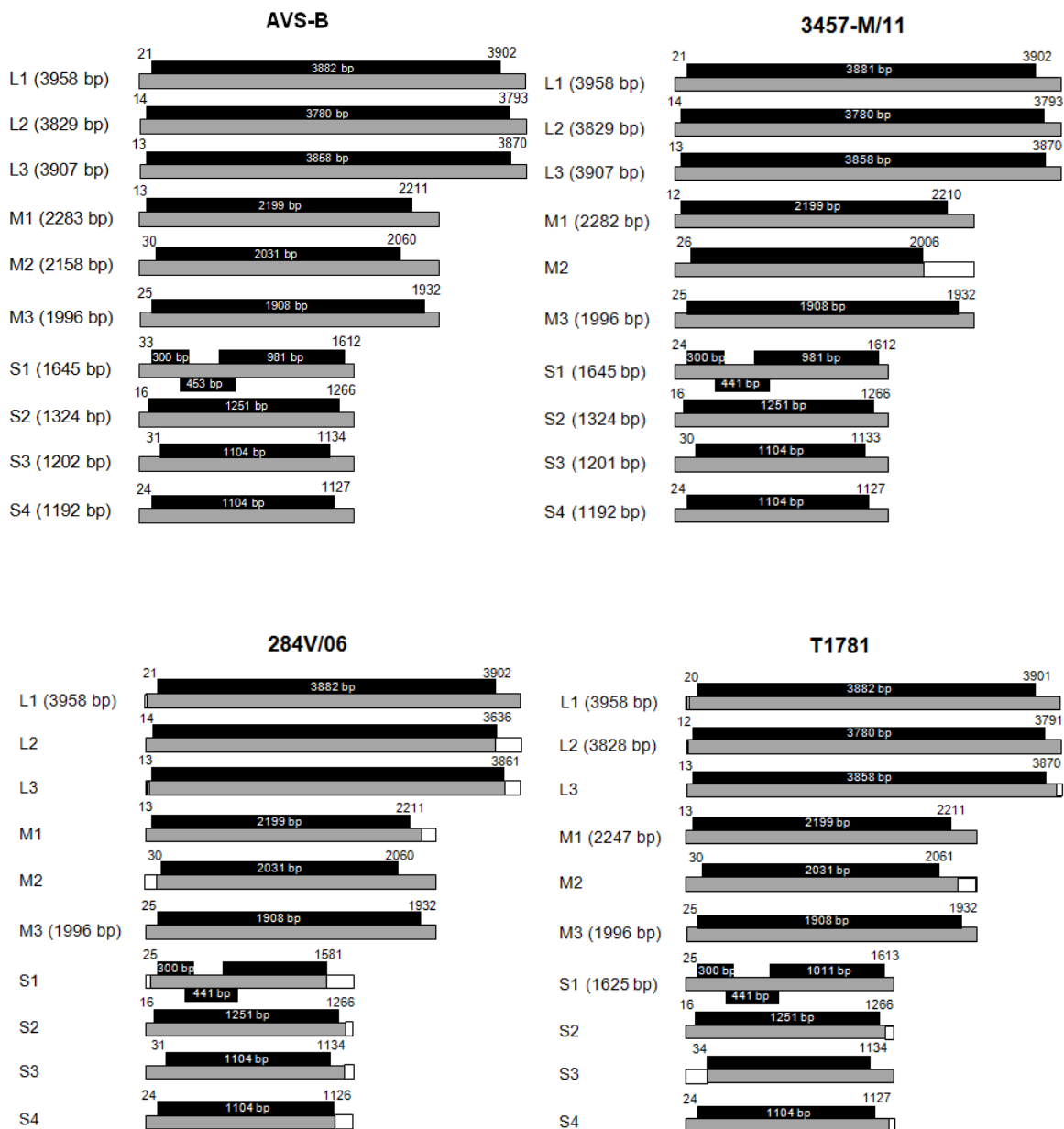
9. ábra. Az S2, S3, S4 szegmenseken megfigyelhető, az azonosításhoz alkalmazott tipikus aminosav mintázatok (lila színnel kiemelve. A nyilak a „cink-ujj” motívumot jelölik). A fehér, a szürke és a fekete kiemelések a szekvenciák illeszkedésének mértékét jelzik. Az ábrán három házi tyúk (T1781, S1133, AVS-B), egy házi pulyka (D1104), egy pézsmaréce (D1546), egy házi lúd (D20/99) és egy dolmányos varjú (TVAV) eredetű vírustörzs szekvenciáinak pozicionális illesztései láthatóak.

A σ C fehérje esetében az első 150 a hosszúságú fragmens volt a segítségünkre; ebben megfigyelhető egy 7 aminosavból álló heptapeptid ismétlődés, ami a „tekerceslt-farok” (Coiled coil) struktúra kialakításáért felelős. A p10 fehérje a házi tyúkok, házi pulykák és a varjú esetében a transzmembrán domén (as 424-62), a p17-es fehérje a nukleáris lokalizációs szignálért felelős peptidszakasz (as 12-82) segítségével volt felismerhető (Costas et al., 2005; Shmulevitz et al., 2002) (10. ábra).

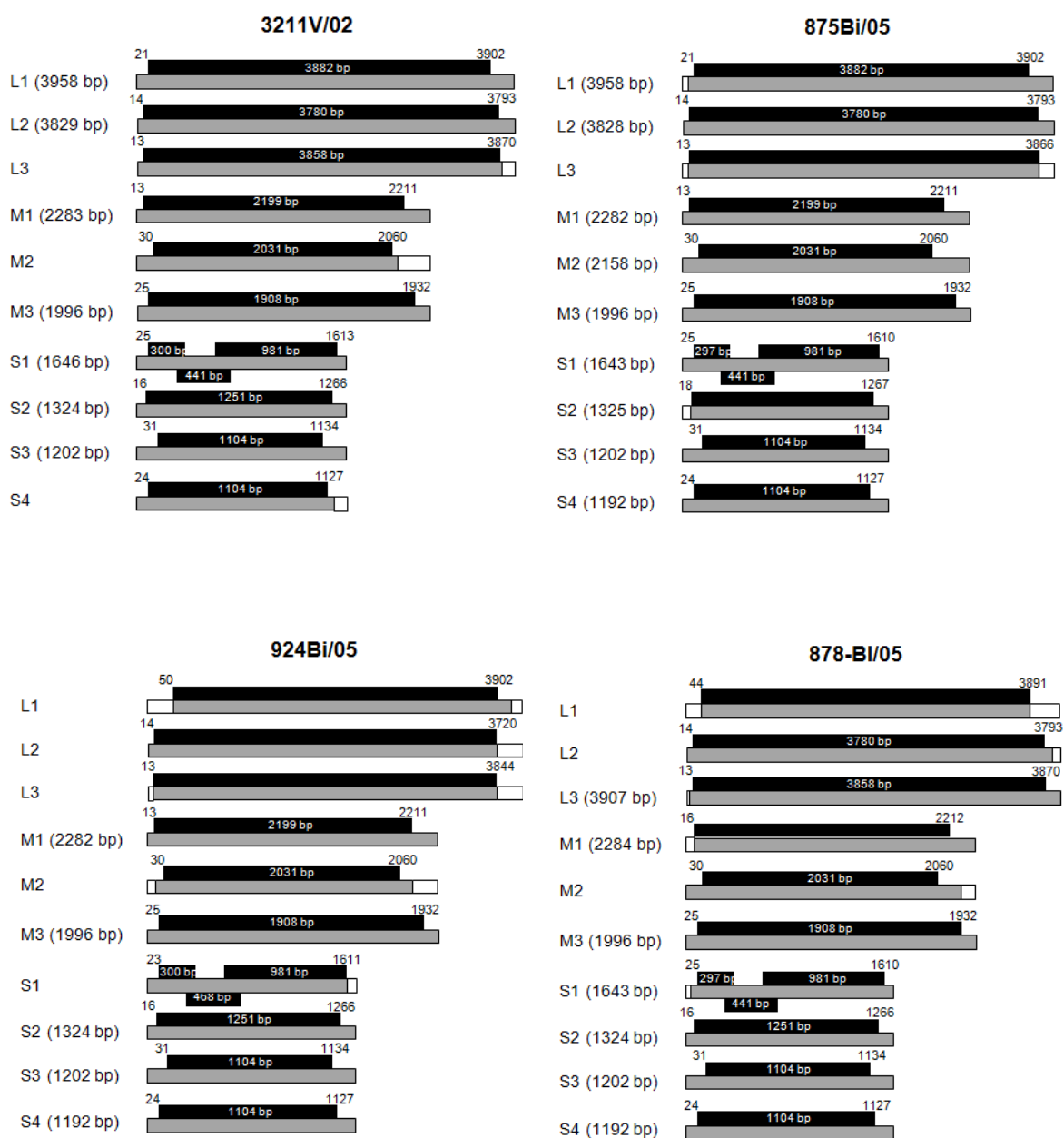


10. ábra. Az S1 szegmensen megfigyelhető, az azonosításhoz alkalmazott tipikus aminosav mintázatok (lila színnel kiemelve. A nyilak a σ C fehérje 7 aminosavból álló heptapeptid ismétlődését jelzik). A fehér, a szürke és a fekete kiemelések a szekvenciák illeszkedésének mértékét jelzik. Az ábrán három házi tyúk (T1781, S1133, AVS-B), egy házi pulyka (D1104), egy pézsmaróca (D1546), egy házi lúd (D20/99) és egy dolmányos variú (TVAV) eredetű virustörzs szekvenciáinak pozícionális illesztései láthatóak.

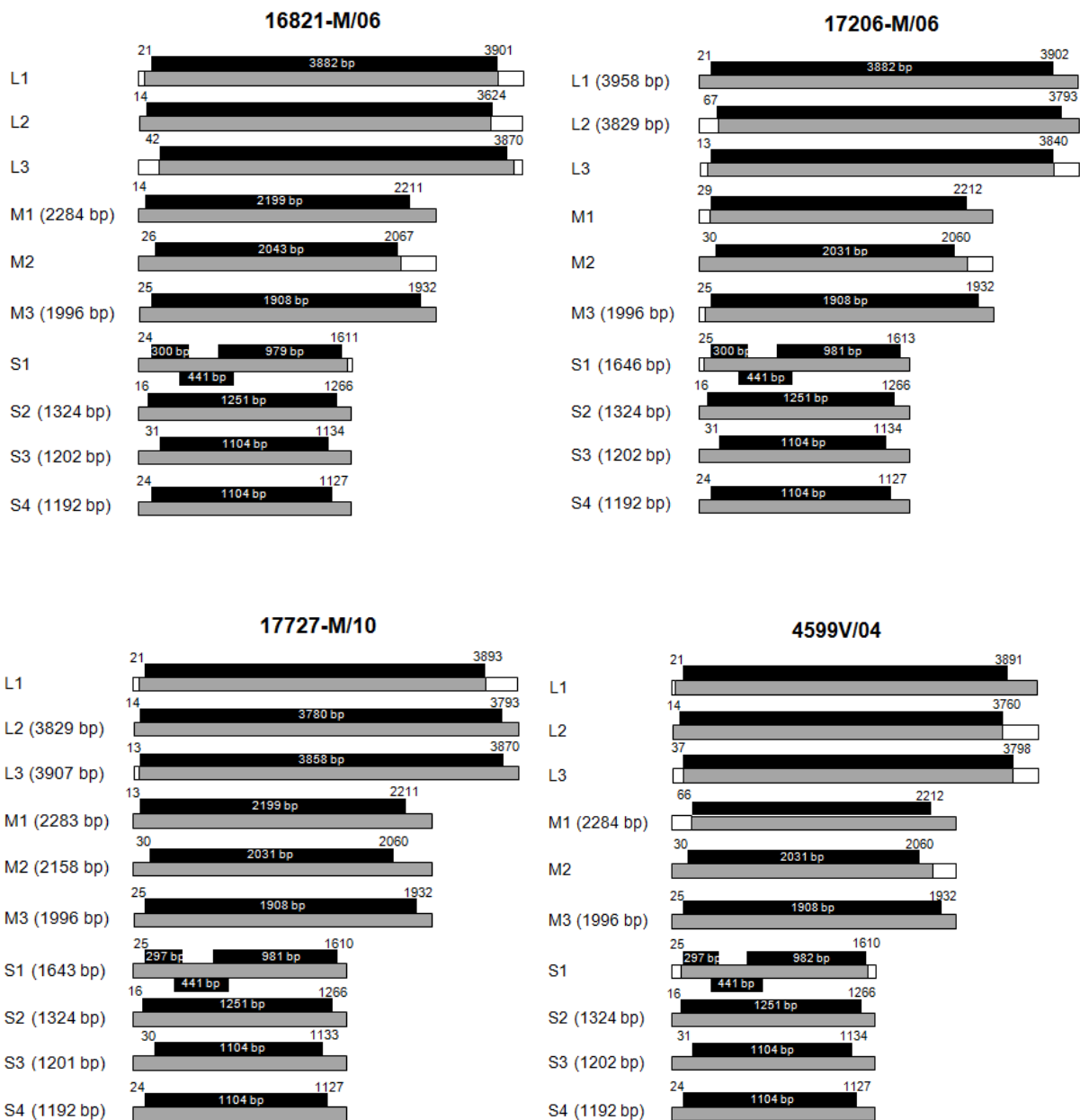
A munkánk során meghatározott különböző madár orthoreovírus törzsek részletes genomszerveződését a 11. ábra szemlélteti (50-55. oldal).



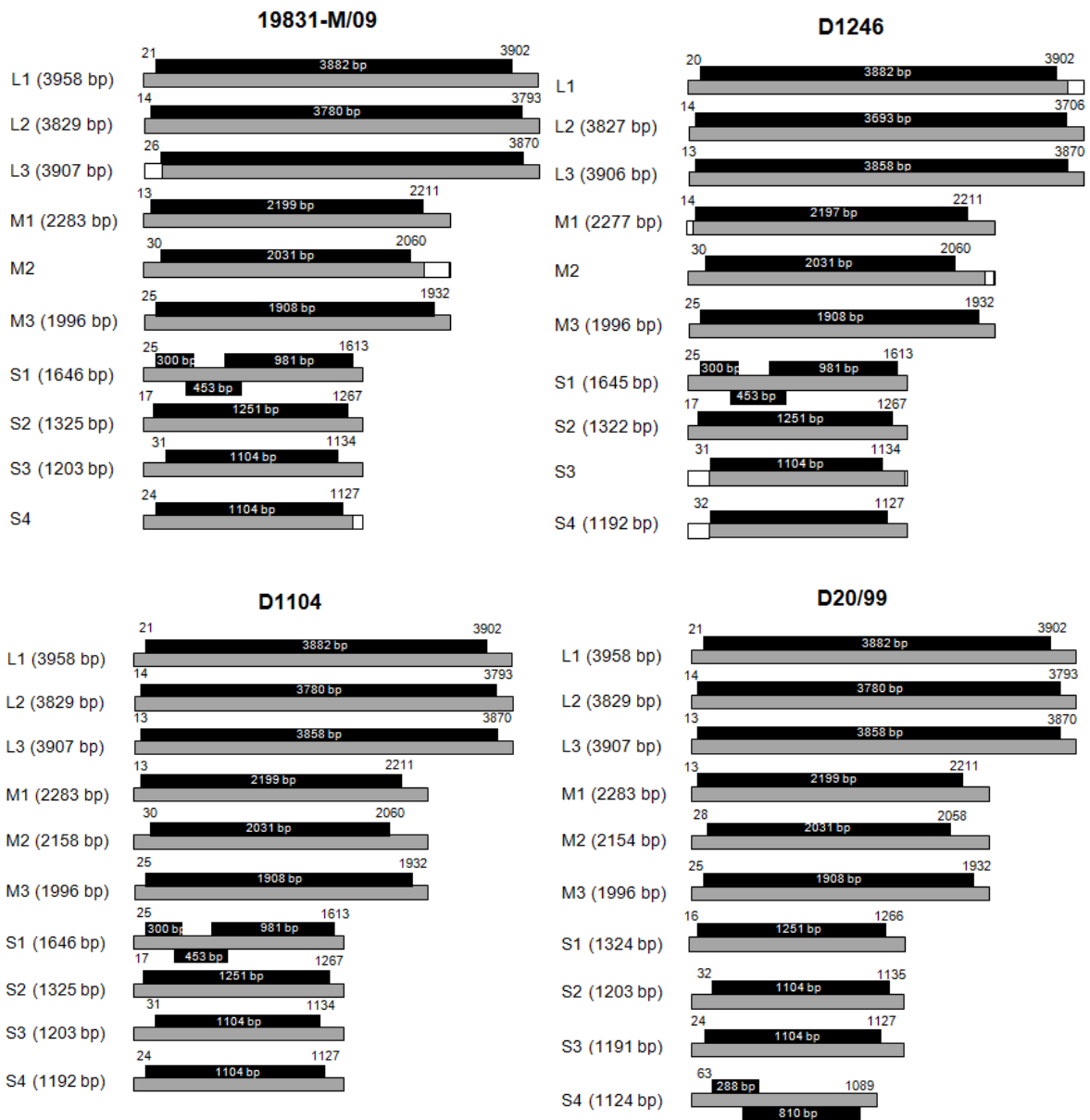
11. ábra. Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyezkedését is.



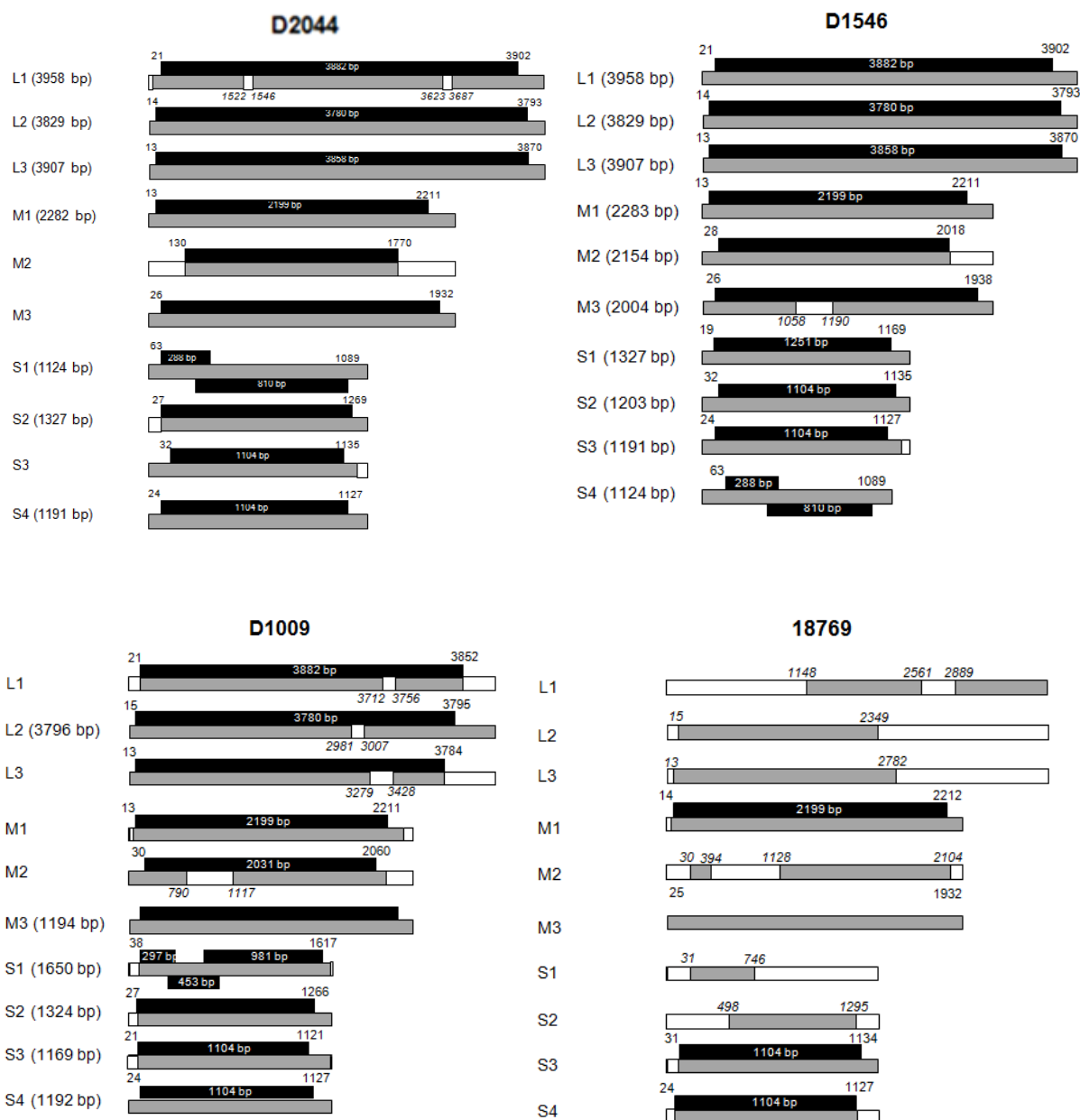
11. ábra (folyt.). Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyekedését is.



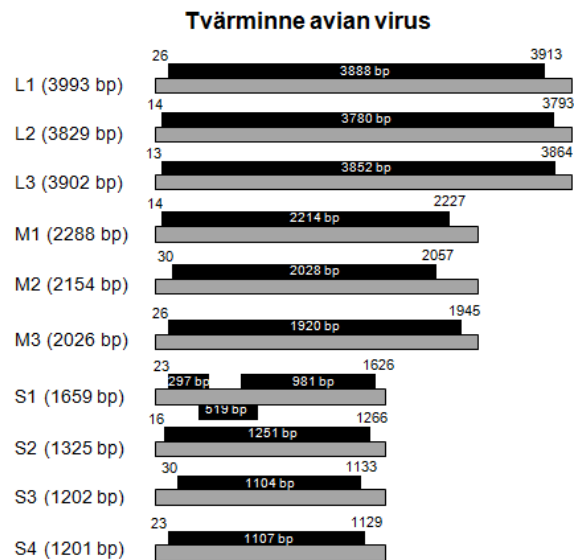
11. ábra (folyt.). Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyezkedését is.



11. ábra (folyt.). Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyezkedését is.



11. ábra (folyt.). Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyezkedését is.



11. ábra (folyt.). Az általunk vizsgált madár eredetű orthoreovírus törzsek genomszerveződése. Az ábrákon feketével a nyitott leolvasási kereteket (ORF), szürkével a meghatározott-, fehérrel a hiányos génszakaszokat jelöltük. Az ábra tartalmazza a szegmensek-, és a róluk képződő fehérjék hosszát, valamint az ORF-ek elhelyezkedését is.

6.2. Filogenetikai kapcsolatok

Eredményeim bemutatása során külön fogom elemezni a dolmányos varjúból származó orthoreovírus törzset a többi szárnyas eredetű vírustól, ami lehetőséget nyújt az orthoreovírusok rokonsági kapcsolatainak bemutatására is. A többi törzs elemzésére a későbbi fejezetekben kerül sor.

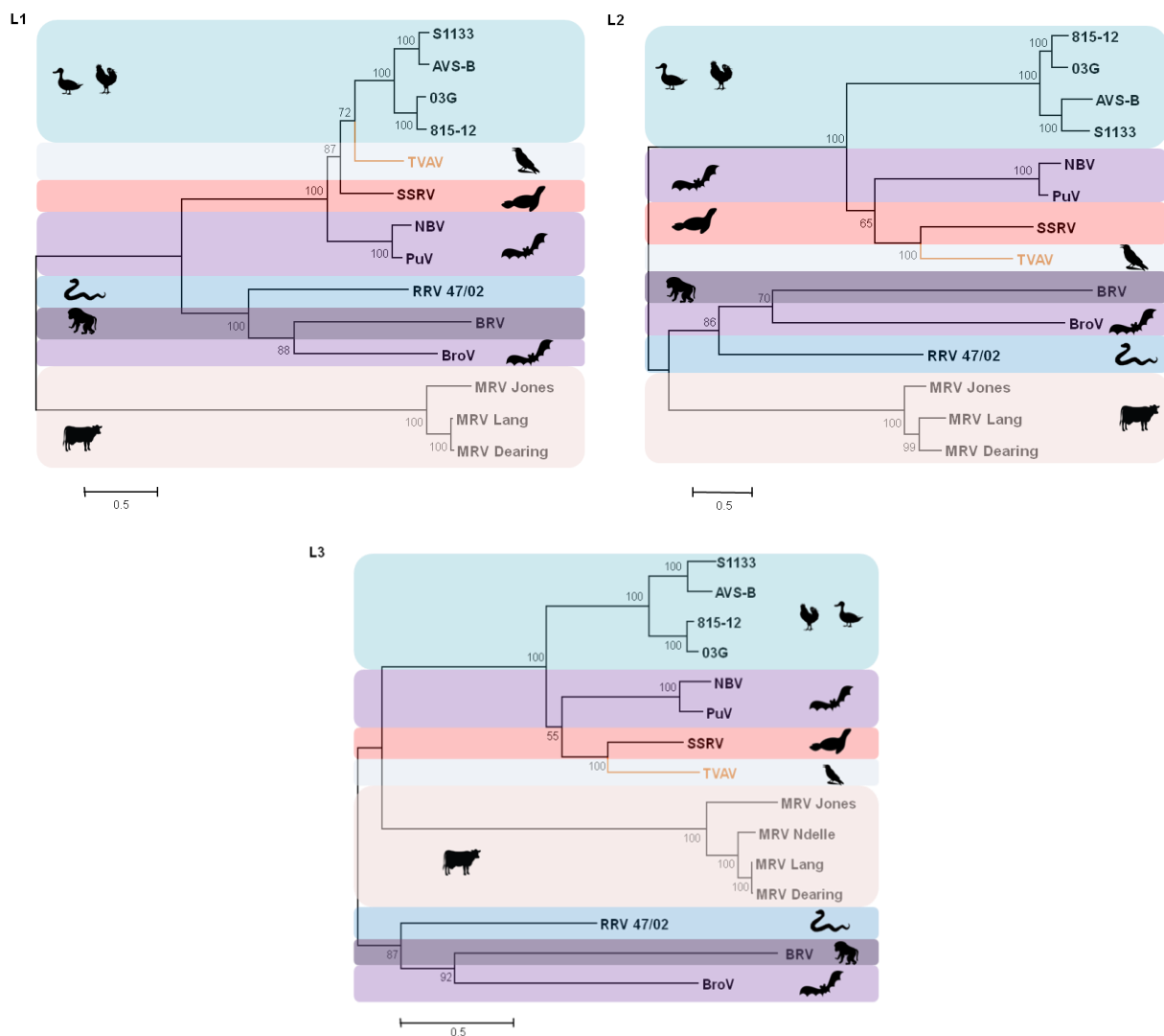
6.2.1. Tvärminne avian virus (TVAV)

A 12. ábra együttesben bemutatott filogenetikai fákban a TVAV rokonsági kapcsolatai mellett az *Orthoreovirus* nemzetség egyéb referencia törzsei is jól láthatók.

6.2.1.1. Az L-osztályú szegmensek

Az L1 szegmens törzsfa-rekonstrukciója során megfigyelhető volt, hogy a TVAV közeli rokonságban állt a Steller oroslánfókából izolált orthoreovírussal (SSRV; 71,2 % hasonlóság ns, 84,3 % hasonlóság as szinten), és ugyanabban a csoportban volt megtalálható, mint a PRV és az ARV eredetű törzsek. Az emlősökből származó (MRV Lang,

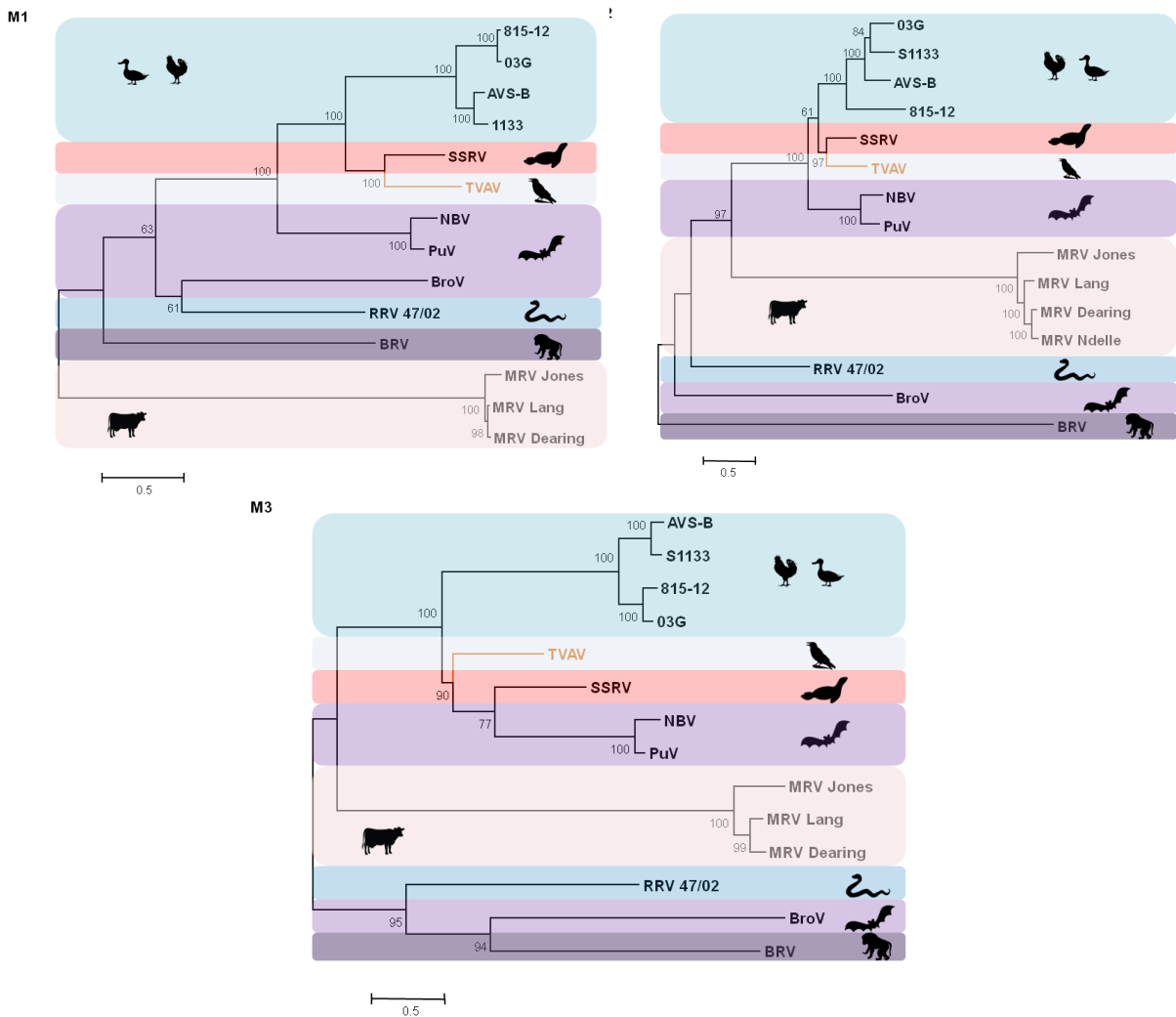
MRV Jones, MRV Dearing, MRV Ndelle) valamint az RRV 47/02, BRV és a BroV törzsek - a köztük lévő közös evolúciós kapcsolat miatt - a törzsfa egy-egy külön csoportjában helyezkedtek el. Az L2 és az L3 szegmens vizsgálatának eredménye szerint, a TVAV az SSRV-vel állt a legközelebbi rokonságban (70,1% ns, 82,3% as; 55,3% ns, 53,6% as); ezek a törzsek ugyanabba a nagyobb csoportba tartoztak, mint más madár (815-12, 03G, AVS-B, S1133) illetve denevér (PuV, NBV) eredetű vírus törzsek (12. ábra).



12.ábra. Nukleinsav alapú ML törzsfarekonstrukciók a TVAV és a GenBank-ban megtalálható referencia törzsek szekvenciáinak felhasználásával (házi tyúk eredetű törzsek - S1133 és AVS-B; denevér eredetű törzsek – BroV, NBV és PuV; Steller féle oroszlánfókából származó törzs – SSRV; emlős eredetű törzsek – MRV Jones, MRV Ndelle, MRV Lang, MRV Dearing; hulló eredetű törzs – RRV 47/02; Pávián eredetű törzs – BRV, dolmányos varjúból származó törzs – TVAV). A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1–L3, M1–M3, S1–S3: GTR+G; S4: TN93+G. A törzsfa készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

6.2.1.2. Az M-osztályú szegmensek

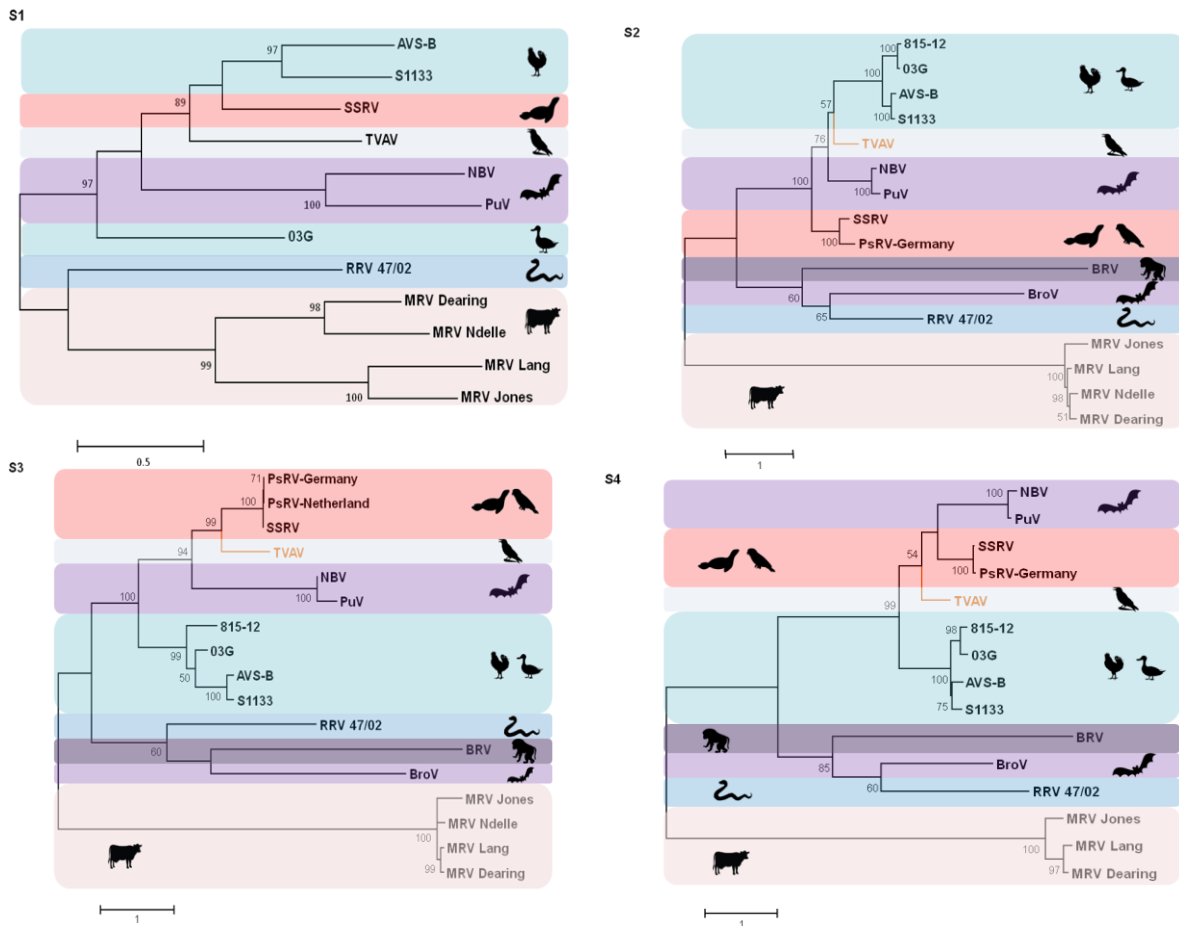
Az M1 és az M2 szegmens alapján a TVAV a törzsfán közös csoportban volt az ARV és PRV-eredetű törzsekkel, legközelebbi rokonának az oroszlánfókából izolált SSRV bizonyult (64,1% ns, 70,6% as; 72,1% ns, 82,9% as). Az M3 szegmens esetében a TVAV a legnagyobb hasonlóságot (54,9% ns, 51,2% as) szintén az SSRV-vel mutatta, és annak ellenére, hogy a vírus közös csoportban helyezkedett el az ARV-vel és a PRV-vel, mégis a filogenetikai fa egy külön ágán foglalt helyet (12. ábra).



12.ábra (folyt.). Nukleinsav alapú ML törzsfarekonstrukciók a TVAV és a génbankban megtalálható referencia törzsek szekvenciáinak felhasználásával (házi tyúk eredetű törzsek - S1133 és AVS-B; denevér eredetű törzsek – BroV, NBV és PuV; Steller féle oroszlánfókából származó törzs – SSRV; emlős eredetű törzsek – MRV Jones, MRV Ndelle, MRV Lang, MRV Dearing; hüllő eredetű törzs – RRV 47/02; Pávián eredetű törzs – BRV, dolmányos varjúból származó törzs – TVAV). A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1–L3, M1–M3, S1–S3: GTR+G; S4: TN93+G. A törzsfa készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

6.2.1.3. Az S-osztályú szegmensek

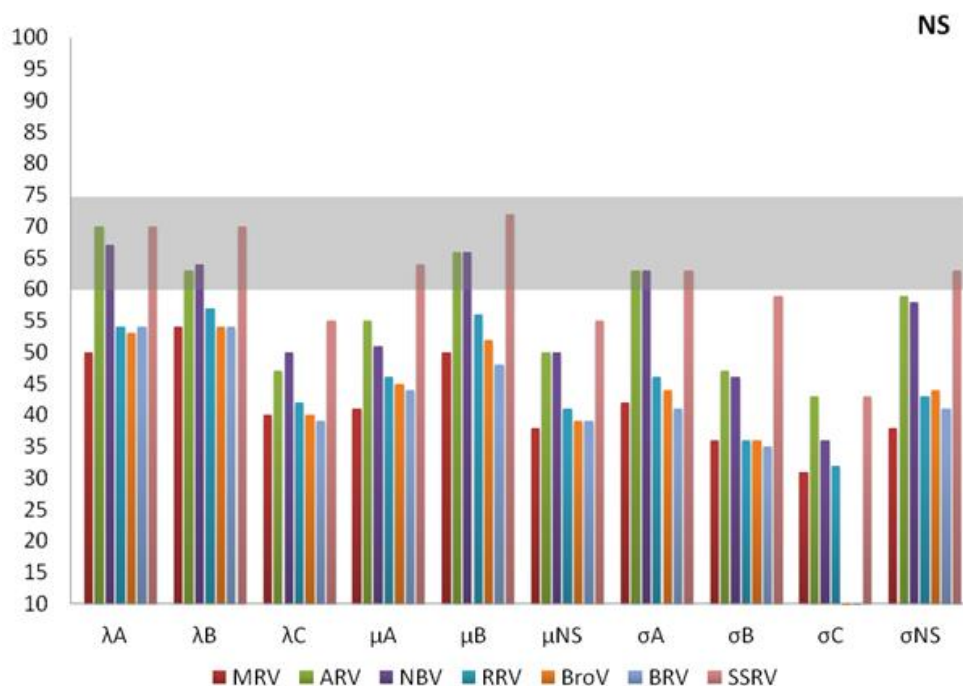
Az S1 szegmensen található σ C gén esetében a TVAV a madaraktól kimutatott orthoreovírus törzsekkel egy klaszterben, de a törzsfá külön ágán foglalt helyet. Legközelebbi rokonának az SSRV bizonyult (47,4% ns, 37,3% as). Az S2 szegmens alapján a TVAV a madaraktól származó orthoreovírus törzsekkel hozható rokonságba (60,7-63,2% ns, 64,6-66,1% as), habár ennek valószínűsége – a filogenetikai számítások során kapott alacsony bootstrap értékek alapján - nem volt meggyőző. Az S3 és S4 szegmens vizsgálatai szerint, a TVAV a legközelebbi rokonságot az SSRV-vel (58,8% ns 57,0% as S3, 62,5% ns, 68,33% as S4) valamint az SSRV-vel közvetlen rokonságban álló Psittacine orthoreovírusokkal (PsRV) mutatta, de a fán az ARV és PRV törzsekkel közös klaszterben helyezkedett el (12. ábra).



12.ábra (folyt.). Nukleinsav alapú ML törzsfarekonstrukciók a TVAV és a génbankban megtalálható referencia törzsek szekvenciáinak felhasználásával (házi tyúk eredetű törzsek - S1133 és AVS-B; denevér eredetű törzsek – BroV, NBV és PuV; Steller féle oroszlánfókából származó törzs – SSRV; emlős eredetű törzsek – MRV Jones, MRV Ndelle, MRV Lang, MRV Dearing; hulló eredetű törzs – RRV 47/02; Pávián eredetű törzs – BRV, dolmányos varjúból származó törzs – TVAV). A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1–L3, M1–M3, S1–S3: GTR+G; S4: TN93+G. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

6.2.1.4. Szekvencia hasonlósági értékek és a külön fajba sorolás kritériumai

A szekvencia hasonlósági értékek a TVAV vizsgálata során figyelemre méltó különbségeket mutattak abban az esetben, ha őket az öt ismert és jóváhagyott *Orthoreovírus* faj (ARV, BRV, MRV, NBV, RRV) egyes tagjaihoz hasonlítottuk. A tíz vizsgált génből hat 60% alatti ns hasonlósági százalékot mutatott (ami az ICTV által meghatározott demarkációs vonalnak felel meg) az összehasonlításban használt különböző orthoreovírus fajok génjeivel. Csak három magprotein (λ A, λ B, σ A) és a külső kapszidot formáló μ B esetében kaptunk magasabb, mint 60, de kevesebb, mint 75% ns azonosságot (13. ábra)



13. ábra. Százalékos nukleotid hasonlósági értékeken alapuló összehasonlító diagram a TVAV és az orthoreovírus nemzetség reprezentatív tagjai között. A szürke sáv jelzi az ICTV által jelenleg nem pontosan definiált zónát.

6.2.2. Víziszárnyasok orthoreovírusai

Az általunk vizsgált vízmadár-eredetű orthoreovírus törzsek egy házi lúdból (D20/99) és kettő pézsmakacsából (D1546, D2044) származtak (14. ábra, ld. 67-71. oldal).

6.2.2.1. L-osztályú szegmensek

Az L1 szegmens filogenetikai elemzésének eredménye szerint mindhárom vizsgált törzs (D20/99, D1546, D2044) a többi víziszárnyas eredetű törzzsel közös filogenetikai csoportban helyezkedett el. Rajtuk kívül ugyanebben a klaszterben még egy házi lúdból (03G) és három pézsmakacsából (815-12, ZJ2000M, NP03/CHN/2009) származó kínai eredetű törzs volt. A D20/99 liba törzs legközelebbi rokonának a ZJ2000M bizonyult (ns szinten 90,3%, as szinten 97,0% hasonlósági értékekkel). Az L2-es szegmens vizsgálata alapján a génbanki kacsá és liba orthoreovírusok két jól elkülöníthető csoportba tömörültek, a D2044 és D1546-os orthoreovírus törzsek pedig a törzsfá elkülönülő ágán helyezkedtek el. A törzsek legmagasabb hasonlósági értéke 99,3% ns és 99,6% as szinten, a legközelebbi rokonuk a ZJ2000M (88,5% ns és 97,2% as) volt. Ugyancsak ez a törzs a legközelebbi rokona (93,1% ns és 98,1% as) a törzsfá külön ágán helyet foglaló D20/99 orthoreovírusnak is. Az L3-as szegmens törzsfá rekonstrukciós analízise szerint, az általunk vizsgált törzsek (D1546, D2044, D20/99) a filogenetikai törzsfá egy-egy külön ágán, két kínai eredetű vírustörzzsel (815-12, ZJ2000M) közös klaszterben helyezkedtek el. A nukleotid szekvencia elemzés a liba (D20/99) és a pézsmarécék (D1546, D2044) esetében is a legnagyobb hasonlóságot ugyanazzal a törzzsel mutatta (ZJ2000M: 89,9% ns és 95,1% as szinten; 82,0% ns és 92,2% as szinten).

6.2.2.2. M-osztályú szegmensek

Az M1 szegmens alapján a kacsá és a liba eredetű orthoreovírusok két külön klaszterben, az általunk vizsgált vírusokkal közös leszármazási ágat alkotva, a filogenetikai fa egy-egy külön ágán helyezkedtek el. A D1546 és D2044 pézsmakacsá törzsek közeli rokonságban álltak egymással (99,0% ns, 99,2% as). A D20/99 liba törzs a törzsfá egy teljesen külön ágán foglalt helyet, legközelebbi rokona az S14 törzs (82,2% ns, 91,6% as) volt. Az M2 szegmens analízise alapján a D20/99, D1546 és D2044 törzsek a törzsfá egy külön ágán helyezkedtek el. A pézsmarécék egymással szoros filogenetikai kapcsolatban álltak, legközelebbi rokonuk a ZJ2000M-es törzs (94,0% ns, 97,8% as) volt. A D20/99 külön ágon volt található. Az M3 szegmensről készített törzsfán a D1546 és D2044 törzsek a fa külön ágán helyezkedtek el és egymással közeli rokonságban álltak, a D20/99 minta pedig egy külön filogenetikai csoportban volt és legközelebbi rokonának a kínai NP03/CHN/2009 pézsmakacsá törzs (78,3% ns, 86,5% as hasonlóság) bizonyult.

6.2.2.3. S-osztályú szegmensek

Az S1 szegmensen kódolódo σ C gén vizsgálata alapján a D20/99 liba orthoreovírus törzs közeli rokonsági kapcsolatban volt az 1999-ben - szintén - Magyarországon házi ludakból

izolált orthoreovírusokkal (99,1% ns, 97,9-98,9% as azonosság). A D1546 és a D2044 orthoreovírus törzsek a törzsfán közös ágon helyezkedtek el, és közeli rokonságban álltak két, szintén Franciaországban izolált vírussal (89330, 89026, 96,2-96,4% ns 96,3-96,8% as). Az S2 szegmens elemzése során a hazai D20/99 törzs a törzsfa külön ágán foglalt helyet, legközelebbi rokonának a francia 89026 törzs (87,5% ns, 95,4% as) bizonyult. A D1546 és D2044 törzsek között szoros rokonság volt és a filogenetikai fa külön ágán helyezkedtek el. Ehhez a csoporthoz tartozott még egy Franciaországból (89026) és egy Kínából származó orthoreovírus törzs (J18) is. Az S3 szegmens törzsfa rekonstrukciós vizsgálata során megfigyelhető volt, hogy a pézsmakacsa és a liba orthoreovírus törzsek két jól elkülöníthető csoportot alkottak. A D20/99 orthoreovírus a törzsfa külön ágán foglalt helyet és legjobban a kínai 815-12 törzshöz hasonlított (92,0% ns és 93,1% as). A pézsmakacsa orthoreovírusok a törzsfán egymás mellett helyezkedtek el, közös rokonságot feltételezve a szintén francia eredetű 89026 és 89330 törzsekkel (97,5-98,5% ns és 96,4-97,5% as). Az S4 szegmens alapján, az általunk vizsgált kacsa és liba eredetű törzsek két külön klasztert alkottak. Az első csoportban a D20/99 a törzsfa egy önálló ágán (legközelebbi rokona a 03G házi lúd törzs, 91,3% ns 98,0% as hasonlóság mellett), a második csoportban a D1546 és a D2044 közös ágon voltak megtalálhatóak (egymáshoz 93,0% ns és 98,6% as hasonlóság, legközelebbi rokonuk az S14 orthoreovírus törzs: 91,7% ns és 98,3% as).6.2.3. Házi pulykából származó orthoreovírus törzsek.

6.2.3. Házi pulykából származó orthoreovírus törzsek

Három pulyka eredetű orthoreovírus törzs genomját vizsgáltuk, mindegyikük magyarországi gyűjtésből származott. Ezek a D1104, 19831-M/09 és D1246 egyedi azonosítóval jelölt törzsek voltak. (14. ábra, ld. 67-71. oldal)

6.2.3.1. Az L-osztályú szegmensek

Az L1 szegmens filogenetikai vizsgálatai szerint, a pulyka eredetű törzsek a törzsfa külön ágán foglaltak helyet. Ezek a törzsek egymással szoros rokonságban álltak (99,6% ns, 99,7% as), és közös csoportot alkottak más, korábban izolált házi pulyka eredetű vírustörzsekkel. A hazai törzsek legközelebbi rokonának a TARV-MN11 (97,0% ns) és a TARV-MN2 és TERV-MN2 törzs (100,0% as) tekinthető. Az L2 szegmens törzsfarekonstrukciója során fény derült arra, hogy a három, hazai pulykából származó törzs a fán önálló csoportot alkot, elkülönülve a házi pulykából, fácánból és fogolyból kimutatott orthoreovírusoktól. A legmagasabb százalékos hasonlósági érték ns szinten 92,1% (D1009) as szinten 97,5% (D1009 és TARV-MN2) volt. Az előbbihez hasonló eredményt hozott az L3-as szegmens vizsgálata is (ns 93,8%, as 96,9% - TERV-MN2).

6.2.3.2. Az M-osztályú szegmensek

Az M1 szegmens vizsgálatának eredménye szerint a pulyka orthoreovírusok teljesen elkülönültek a csirke, liba és kacsza eredetű orthoreovírusoktól (ns 94,8% TARV-MN2 és TERV-MN2, as 98,3% TERV-MN2). Az M2 szegmens alapján az általunk vizsgált pulyka eredetű vírusok a fa egy külön ágán, de a házi tyúk eredetű vírusokkal közös klaszterben helyezkedtek el. A törzsek a legnagyobb hasonlóságot nukleotid szinten a 601G (80,0%), aminosav szinten a 916SI (95,4%) törzssel mutatták. Az M3 szegmens vizsgálata során az is megfigyelhető volt, hogy a pulyka eredetű orthoreovírusok - annak ellenére, hogy a házi tyúk eredetű orthoreovírus törzsekkel közös csoportban voltak - a filogenetikai fa egy önálló ágán foglaltak helyet. A legközelebbi rokonuknak az elemzés a TERV-MN3 és a TARV-MN5 törzseket mutatta.

6.2.3.3. Az S-osztályú szegmensek

Az S1 szegmens elhelyezkedő σ C gén filogenetikai vizsgálata során megfigyelhető volt, hogy a házi pulykákból származó magyarországi orthoreovírus törzsek közös klaszterben voltak más pulyka eredetű törzsekkel, mégis a törzsfa egy külön ágán foglaltak helyet. Legközelebbi rokonuknak az NC/SEP-R61/03 törzs bizonyult (ns 96,7%, as 96,9 %). Az S2 szegmens törzsfa rekonstrukciója során a házi pulykákból származó vírustörzsek a filogenetikai törzsfa külön ágán, a házi tyúkból származó vírusokkal egy filogenetikai csoportban helyezkedtek el. A legmagasabb hasonlósági értékek 96,7% ns (TARV-MN5) és 98,0% as (TARV-MN5) voltak. Az S3 szegmens analízise szerint más pulykákból kimutatott vírusokkal a D1104, D1246 és 19831-M/09 vírus törzsek közös csoportba sorolhatóak, annak ellenére, hogy a filogenetikai törzsfa külön ágán foglaltak helyet. A legnagyobb százalékos hasonlóságot nukleotid szinten (87,8%) és aminosav szinten is a VR-818 törzssel (92,6%) mutatták. Az S4 szegmens alapján a Magyarországon izolált pulyka orthoreovírus törzsek közös csoportba voltak sorolhatóak a különböző országokban izolált pulykákból származó orthoreovírusokkal, közvetlen rokonságot az amerikai eredetű TK/MN/D-048814/08 törzssel mutattak (99,1% ns, 99,7% as).

6.2.4. Házi tyúk eredetű orthoreovírus törzsek

Az általunk meghatározott madár eredetű orthoreovírus törzsek közül 12 származott házi tyúkból. Ezek az AVS-B, T1781, 875Bi/05, 878Bi/05, 16821-M/06, 924Bi/05, 284V/06, 4599V/04, 3211V/02, 3457-M/11, 17227-M/10, 17203-M/06 azonosító számmal rendelkeztek (14. ábra, ld. 67-71. oldal).

6.2.4.1. L-osztályú genomszegmensek

Az L1 szegmens esetében a vírustörzsek a homológ gének szekvenciáival 81,9-93,2% ns és 95,8-99,0% as; egymással 82,6-99,7% ns és 96,4-99,9% as hasonlóságot mutattak. A törzsfaelemzés során megállapítható volt, hogy a Magyarországról származó házi tyúk orthoreovírusok többsége közeli rokonságot mutattak egymással; a vizsgált 12 törzset két különböző csoportba lehetett besorolni. Az egyik csoportba a 875Bi/05, 878Bi/05 és az USA-beli AVS-B törzsek tartoztak, közös klasztert alkotva amerikai, kínai, kanadai és tajvani eredetű törzsekkel. A másik csoportban a többi magyarországi törzs egy teljesen különálló csoportot alkotott. Az L2 szegmens analízisekor a génbankból származó szekvenciákat összehasonlítva a vizsgált törzsekkel 83,3-93,0% ns és 95,9-98,6% as hasonlóságot mutattak, míg egymással összehasonlítva ez az érték 82,1-99,9% ns és 95,9-100,0% as volt. A filogenetikai analízis alapján a magyarországi házi tyúk eredetű törzseket két különböző klaszterbe lehetett besorolni. Az egyik klaszterben egy kanadai (138), több magyarországi (284V/06, 878Bi/05, 875Bi/05) és egy amerikai (AVS-B) eredetű törzs volt. A másikban a 16821-M/06, 3457-M/11, 4599V/04, 17203-M/06, 924Bi/05, 17227-M/10, T1781-es törzsek a törzsfá egy különálló ágán, de egy filogenetikai csoportban több különböző kínai, amerikai, és kanadai vírustörzsekkel; a 3211V/02-es törzs pedig - ugyanezen klaszteren belül - önálló ágat alkotott. Az L3 szegmens törzsfá rekonstrukciós elemzése szerint az általunk vizsgált ARV törzsek 72,0-94,2% ns és 82,7-97,6% as hasonlóságot mutattak más törzsekkel, és 71,8-100,0% ns valamint 83,8-100,0% as hasonlóságot egymással. A filogenetikai számítások alapján a törzsek két egymástól jól elkülöníthető csoportot alkottak. A 17206-M/06, 924Bi/05, 16821-M/06, T1781, 284V/06 valamint a 3211V/02 a törzsfá egy külön ágán, kínai, tajvani, amerikai és kanadai törzsekkel közös klaszterben, a többi magyarországi törzs egy másik csoportban volt megfigyelhető kanadai (138), tajvani (R2) és kínai (1017-1) eredetű törzsekkel együtt. A 878Bi/05, 875Bi/05, 3457-M/11 és a 17227-M/10 a törzsfá elkülönülő ágán helyezkedtek el.

6.2.4.2. M-osztályú szegmensek

Az M1 szegmensnél a szekvencia hasonlósági értékek az általunk vizsgált és a génbanki szekvenciák között nukleinsav szinten 79,0-90,8%, aminosav szinten 92,4-98,0% voltak. Ugyanezen értékek az M2 szegmensnél 65,1-89,5% (ns), 68,8-96,0% (as), míg az M3 szegmensnél 76,1-89,3% (ns) és 80,9-94,3% (as) voltak. Az általunk meghatározott házi tyúkokból származó orthoreovírus törzseket egymáshoz hasonlítva az M1 szegmens esetében 79,2-99,9% (ns), 92,8-99,9% (as), az M2 szegmens esetében 64,7-99,9% (ns) és 68,9-100,0% (as), az M3 szegmens esetében 76,1-100,0% (ns) és 82,6-100,0%-os (as) értékeket kaptunk.

Az M1 szegmens törzsfa rekonstrukciója alapján a magyar eredetű házi tyúkból származó orthoreovírus törzsek két egymástól jól elkülöníthető csoportot alkottak. Az egyik csoportban kizárólag magyar törzsek, a másik csoportban – a törzsfa egy-egy önálló ágán - a 878Bi/05, 875Bi/05 valamint az AVS-B helyezkedtek el. Az M2 szegmens filogenetikai elemzése alapján a magyarországi törzsek öt különböző csoportba voltak sorolhatóak. A 4599V/04, 17227-M/10, 878Bi/05, és a 875Bi/05 törzsek egy Kanadából származó vírustörzsszel (138) a törzsfa külön ágát alkották. Az AVS-B rokonságot mutatott három kínai és egy tajvani eredetű ARV törzsszel (916SI, 750505, 601G). A T1781, 3211V/02, 17203-M/06 és a 284V/06 egy Kínából származó orthoreovírus törzsszel (918) közösen, a filogenetikai fa külön ágán helyezkedtek el. A törzsfán a 3457-M/11, 924Bi/05, valamint a 16821-M/06 egy önálló külcsoportot alkotott; ez a csoport csak nagyon távoli rokonságot mutatott a ma ismert csirke, pulyka és víziszárnyas eredetű orthoreovírusokkal. Az M3 szegmens alapján a magyarországi csirke ARV törzsek két külön klaszterben, a filogenetikai fa külön ágán foglaltak helyet (878Bi/05, 875Bi/05, AVS-B). Ugyanez volt megfigyelhető a többi vizsgált vírustörzs esetében is, melyek egy olyan ágon helyezkedtek el, ahol csak magyar eredetű törzsek voltak.

6.2.4.3. S-szegmensek

Törzsfarekonstrukciós vizsgálat során, az általunk meghatározott és a génbankból származó szekvenciák között, a nukleinsav és aminosav szekvencia összehasonlítás az alábbi eredményeket adta: az S1 szegmens esetében 44,8-89,4% (ns) és 49,2-93,8% (as), az S2 szegmens esetében 79,5-93,0% (ns) és 95,6-98,3% (as), az S3 szegmens esetében 82,8-91,8% (ns) és 91,2-98,1% (as), és az S4 szegmens esetében 76,5-85,6% (ns) és 88,1-96,2% (as) hasonlóság volt tapasztalható. Az általunk meghatározott vírustörzseket egymással összehasonlítva ezek az értékek az S1 szegmens esetében 55,6-100,0% (ns), 49,7-100,0% (as), az S2 szegmens esetében 78,7-100,0% (ns) és 96,4-100,0% (as), az S3 szegmens esetében 83,0-99,7% (ns) és 92,3-100,0% (as), az S4 szegmens esetében pedig 76,5-100,0% (ns) és 89,1-100,0% (as) voltak.

Az S1 szegmens analízisének eredménye alapján a 878Bi/05 és 875Bi/05-ös, valamint a 17227-M/10 és 4599V/02-es törzsek a fa egy-egy külön ágán, a többi Magyarországon izolált törzs pedig külön klaszterben helyezkedett el. Rajtuk kívül ebbe a filogenetikai csoportba az amerikai AVS-B, és a kínai 918-as és 1017-1-es törzsek tartoztak.

Az S2 szegmens vizsgálata során megfigyelhető volt, hogy a 878Bi/05 és 875Bi/05-ös törzsek, a filogenetikai fa külön ágán helyezkedtek el. Ugyanúgy külön ágon volt megtalálható az AVS-B is, ami egy kanadai törzsszel (138) mutatott közeli rokonságot. A többi vizsgált magyarországi törzs a filogenetikai fán önálló csoportot alkotott. Az S3 szegmens elemzése során két különböző klasztert különíthettünk el egymástól. A 3211V/02 a fa önálló

ágán foglalt helyet, csakúgy, mint a 284V/06 és 4599V/04-es jelzésű törzsek. A többi vizsgált magyarországi törzs a fán - egy kanadai (138), és az amerikai eredetű AVS-B törzssel - külön csoportot alkotva helyezkedett el. Az S4 szegmens alapján a csirke eredetű ARV-k három jól elkülöníthető csoportot alkottak. Az első csoportban a 875Bi/05, 878Bi/05, 17227-M/10 és AVS-B a törzsfa külön ágán helyezkedtek el egy kínai eredetű vírustörzssel (601G). A második csoportba a 924Bi/05 tartozott, ami a törzsfa másik ágán foglalt helyet. A legközelebbi rokonai amerikai, kanadai, tajvani, és kínai eredetű törzsek voltak. A harmadik csoportban a 3457-M/11, 17203-M/06, 3211V/02, 16821-M/06, T1781, 284V/06 és 4599V/04 törzsek is a törzsfa egy külön ágán voltak megtalálhatóak, a legközelebbi rokonaik kínai eredetű törzsek voltak.

6.2.5. Fácán és fogoly eredetű orthoreovírus törzsek

Az általunk vizsgált ARV törzsek közül egy fogoly (D1009) és egy fácán (18769) eredetű volt (14. ábra, ld. 67-71. oldal).

6.2.5.1. L-osztályú szegmensek

Az L1 szegmens elemzése során megfigyelhető volt, hogy a 18769 és a D1009 törzs a filogenetikai fa egy teljesen külön ágán helyezkedtek el. Az egymáshoz viszonyított hasonlóságuk nukleinsav szinten 98,7%, aminosav szinten 98,6% volt, legközelebbi rokonuknak az AVS-B törzs számított (79,8-80,0% ns, 98,6-100,0% as). Az L2 szegmens alapján a fogoly és fácán eredetű ARV törzsek közös ágon helyezkedtek el és közös klasztert alkottak a házi pulyka eredetű orthoreovírus törzsekkel. Az egymáshoz viszonyított százalékos hasonlósági értékek ns szinten 98,5%, as szinten 99,2% voltak, a legnagyobb hasonlóságot pedig a D1246 és 19831-M/09 pulyka eredetű törzsekkel mutatták (91,6-92,2% ns, 97,1-97,5% as). Az L3 szegmens esetében ugyanez volt megfigyelhető, legközelebbi rokonaik ebben az esetben is a D1246 és 19831-M/09 törzsek (87,5-88,6% ns, 93,9% as) voltak.

6.2.5.2. M-osztályú szegmensek

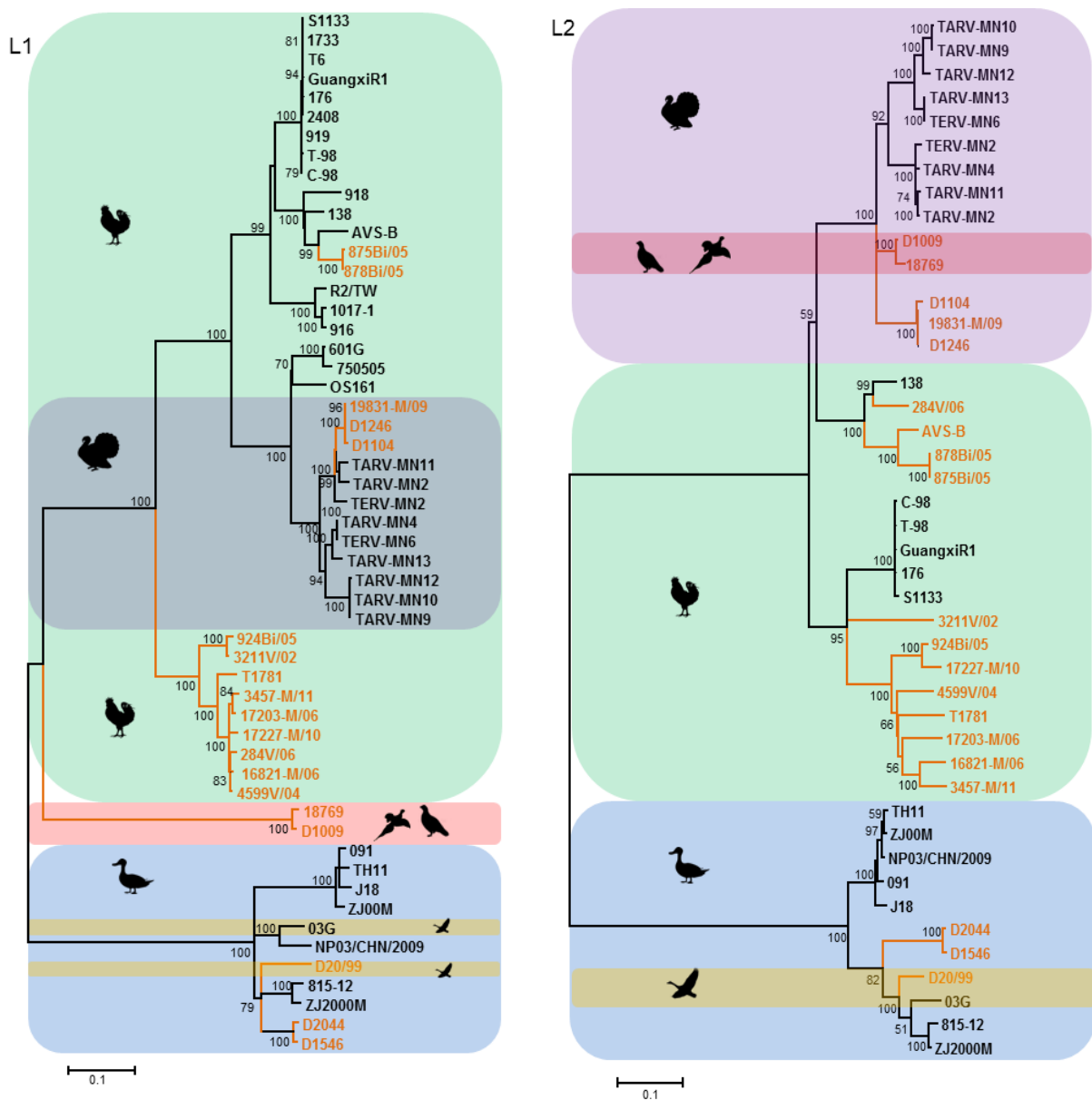
Az M1 szegmens vizsgálata alapján a D1009 és a 18769 a törzsfa egy külön ágán helyezkedtek el, beékelődve a magyarországi csirke eredetű ARV törzsek közé. Legközelebbi rokonuknak a T1781 házi tyúkból származó vírustörzs bizonyult (87,3-97,5% ns, 94,9-95,4% as). Az M2 szegmens elemzése során is ugyanezt az eredményt kaptuk. A D1009 és a 18769 törzsek közös klaszterben helyezkedtek el a házi tyúk eredetű orthoreovírus törzsekkel. Az egymáshoz viszonyított nukleotid és aminosav százalékos

értékeik 96,8% és 95,4% voltak. Az M3 szegmens vizsgálata alapján a fogoly ARV törzs Kínából, Tajvanból és Magyarországról származó házi tyúkokból származó törzsekkel volt közös filogenetikai csoportban (hasonlóságuk 78,1-86,3% ns és 85,2-91,6% as szinten). A fácánból kimutatott vírus a fa egy külön ágán, kulcsoportként volt megfigyelhető, legközelebbi rokona a kínai házi tyúkból izolált 1017-1 törzs volt (74,7% ns, 76,8% as).

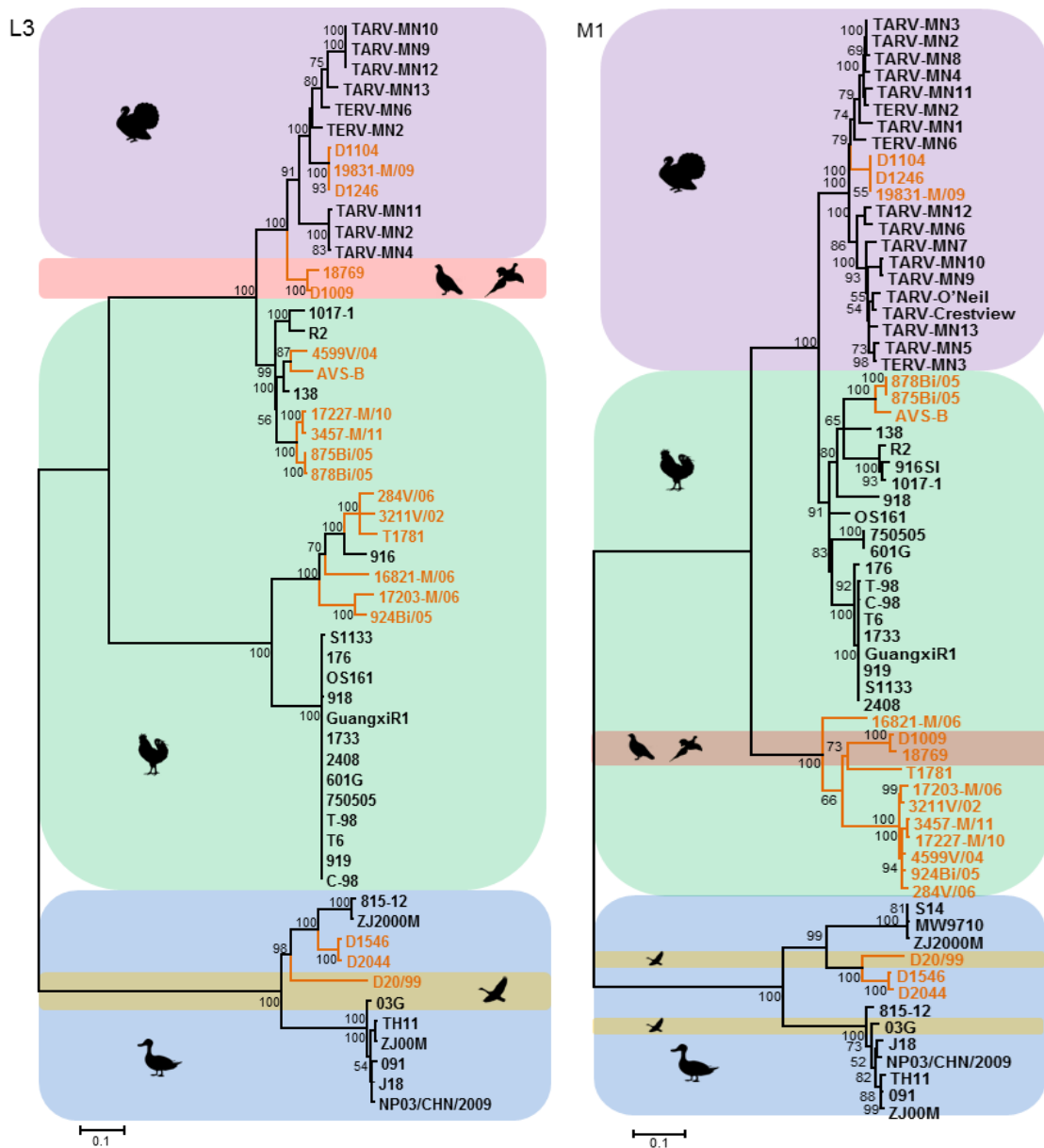
6.2.5.3. S-osztályú szegmensek

Az S1 szegmens vizsgálata alapján a D1009 a filogenetikai fán a házi pulyka eredetű vírustörzsek közé beékelődve helyezkedett el (a hasonlóság ns szinten 82,4-99,8%, as szinten 76,2-99,5% volt). A fácán eredetű 18769-es vírustörzsből nem állt rendelkezésünkre elegendő adat ezen törzsfa analízis elkészítéséhez.

Az S2 szegmens elemzésekor megállapítható volt, hogy a D1009 és 18769 ARV törzsek közeli rokonsági kapcsolatban voltak egymással (a hasonlóság 98,4% ns és 99,5% as szinten), a törzsfa egy külön ágán helyezkedtek el, közös filogenetikai csoportban több más, Magyarországon izolált csirke orthoreovírus törzssel. A hasonlósági értékek ebben az esetben nukleinsav szinten 81,3-88,3%, aminosav szinten 97,4-99,5% voltak. Az S3-as szegmens vizsgálata során ugyanezeket az eredményeket kaptuk. A D1009 és 18769 törzsek egymással szoros rokonsági kapcsolatban álltak (96,3% ns és 96,7% as), és közös klaszterbe tartoztak más, házi tyúk eredetű ARV-vel (a hasonlóság ns szinten 83,1-84,9%, as szinten 88,4-90,3% volt). Az S4 szegmens alapján a fogoly és fácán eredetű vírustörzsek közös ágon helyezkedtek el, legközelebbi rokonaiknak a házi pulyka eredetű ARV törzsek bizonyultak. A két vadmadár törzs egymáshoz viszonyított hasonlósága 99,2% volt ns és 99,7% as szinten, legközelebbi rokonuk a TK/MN/D-055431/08 pulyka eredetű törzs (84,9-85,1% ns és 94,9-94,5% as) volt.

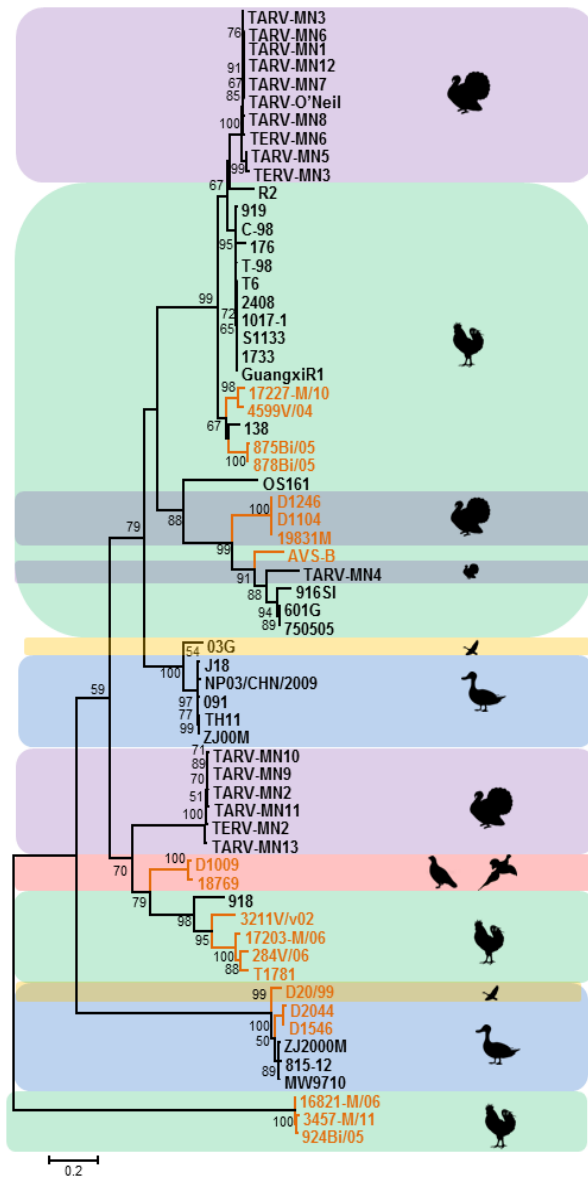


14. ábra. A különböző szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek felhasználásával készített nukleinsav alapú ML törzsfá. Az általunk meghatározott törzsek szekvenciáit narancssárga színnel jelöltük. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. Az általunk vizsgált törzseket narancs színnel jelöltük. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1: GTR+G+I; L2: HKY+G+I; L3: GTR+G+I; M1: GTR+G+I; M2: TN93+G; M3: K2+G+I; S1: GTR+G; S2: K2+G+I; S3: K2+G; S4: HKY+G+I. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

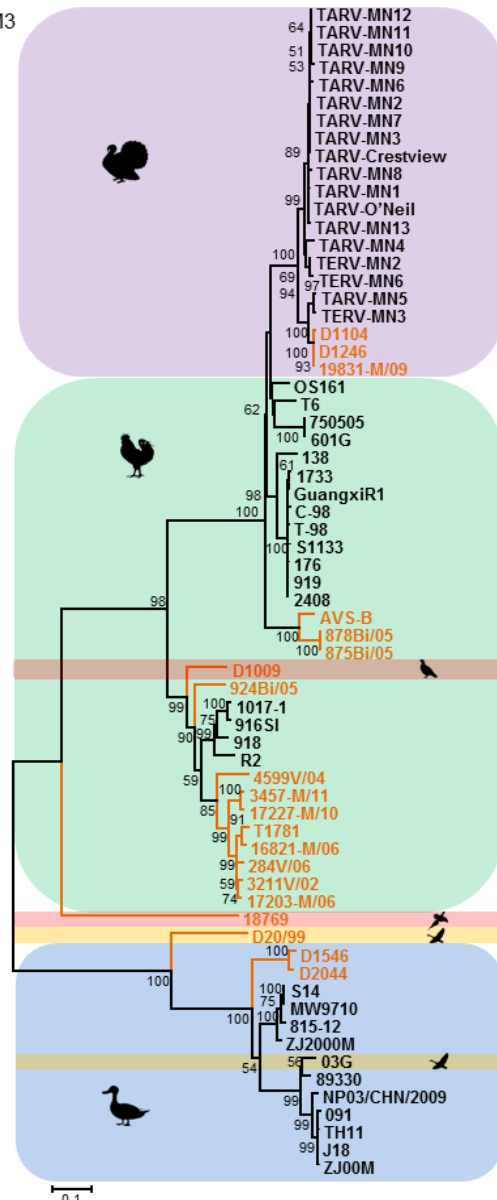


14. ábra (folyt.). A különböző szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek felhasználásával készített nukleinsav alapú ML törzsfá. Az általunk meghatározott törzsek szekvenciáit narancssárga színnel jelöltük. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. Az általunk vizsgált törzseket narancs színnel jelöltük. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1: GTR+G+I; L2: HKY+G+I; L3: GTR+G+I; M1: GTR+G+I; M2: TN93+G; M3: K2+G+I; S1: GTR+G; S2: K2+G+I; S3: K2+G; S4: HKY+G+I. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

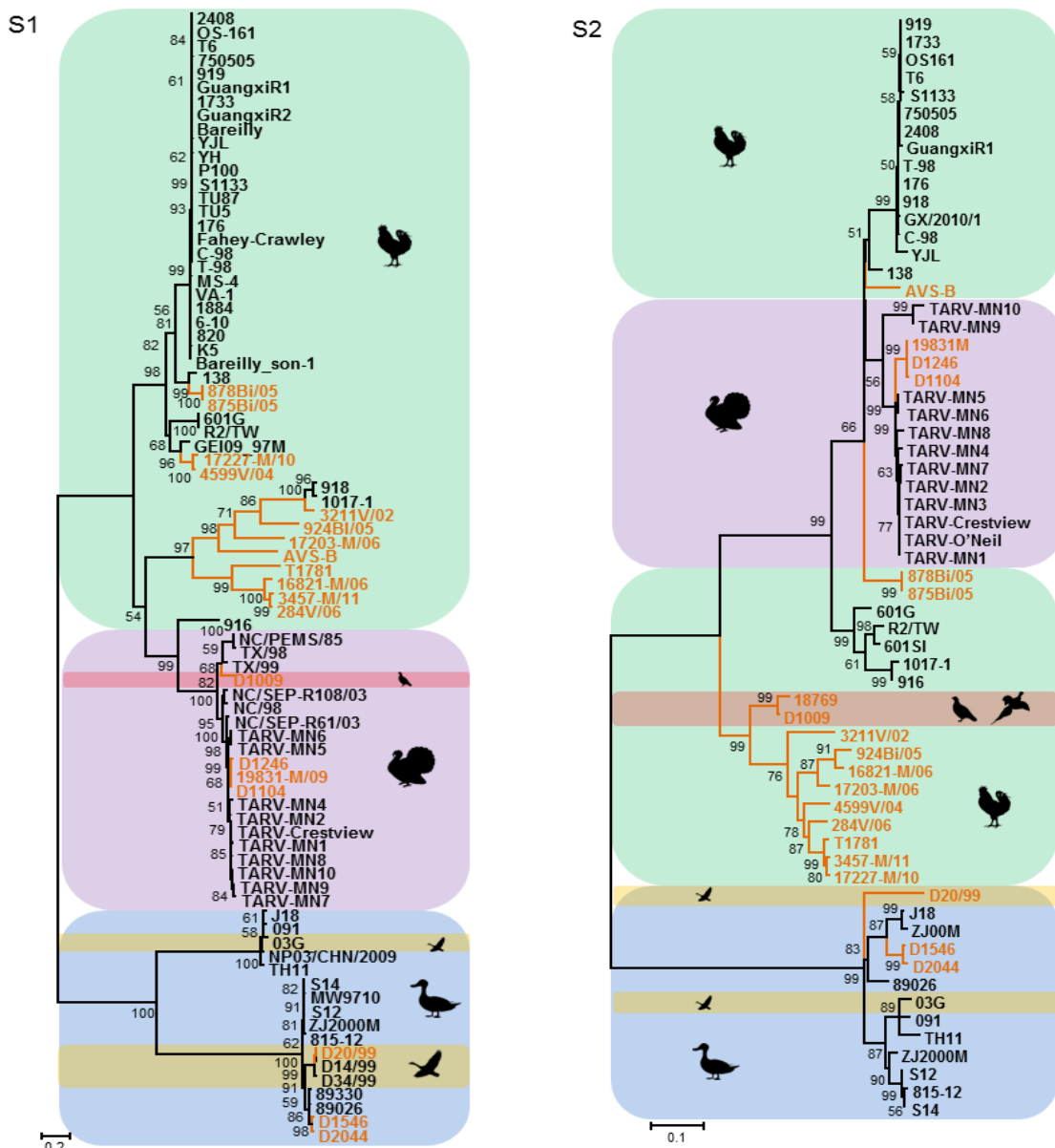
M2



M3

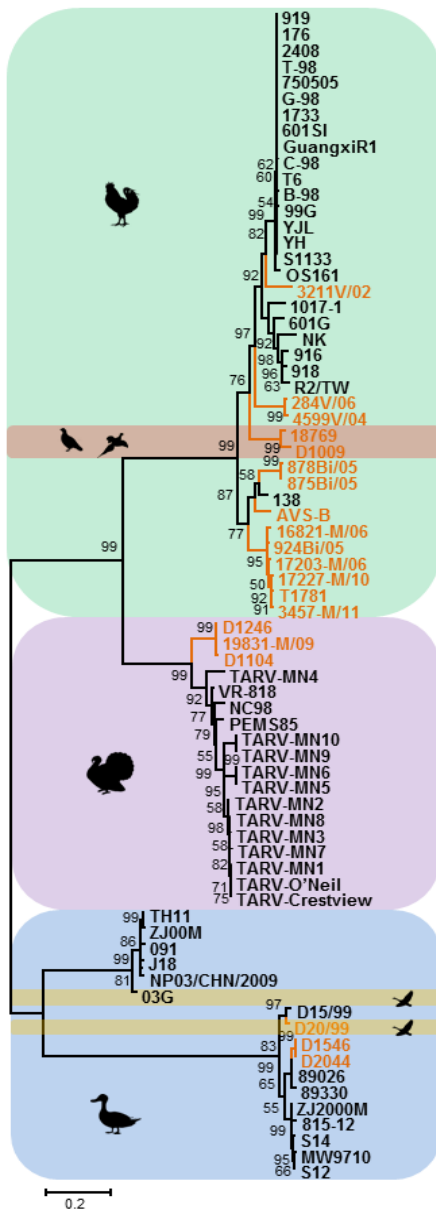


14. ábra (folyt.). A különböző szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek felhasználásával készített nukleinsav alapú ML törzsfá. Az általunk meghatározott törzsek szekvenciáit narancssárga színnel jelöltük. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. Az általunk vizsgált törzseket narancs színnel jelöltük. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1: GTR+G+I; L2: HKY+G+I; L3: GTR+G+I; M1: GTR+G+I; M2: TN93+G; M3: K2+G+I; S1: GTR+G; S2: K2+G+I; S3: K2+G; S4: HKY+G+I. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

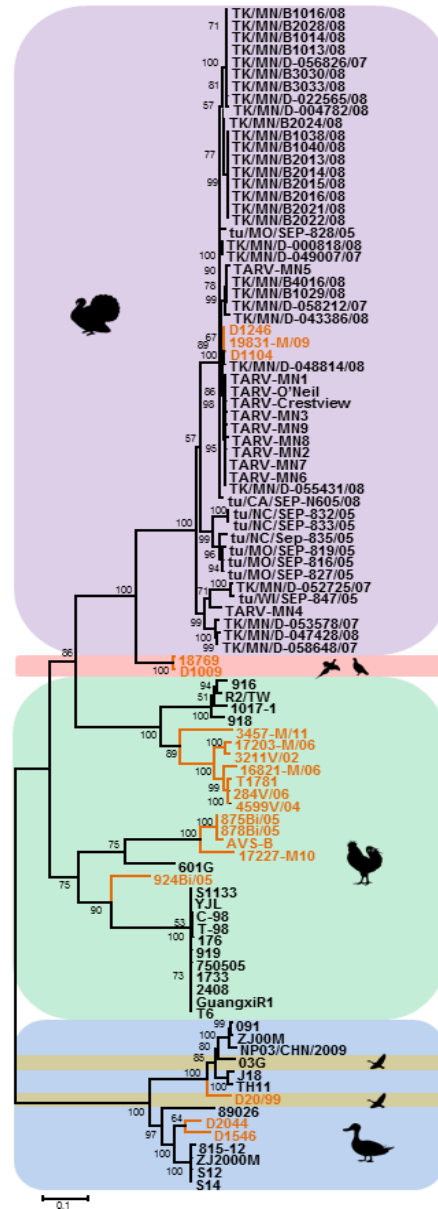


14. ábra (folyt.). A különböző szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek felhasználásával készített nukleinsav alapú ML törzsfá. Az általunk meghatározott törzsek szekvenciáit narancssárga színnel jelöltük. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. Az általunk vizsgált törzseket narancs színnel jelöltük. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1: GTR+G+I; L2: HKY+G+I; L3: GTR+G+I; M1: GTR+G+I; M2: TN93+G; M3: K2+G+I; S1: GTR+G; S2: K2+G+I; S3: K2+G; S4: HKY+G+I. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

S3



S4



14. ábra (folyt.). A különböző szárnyas-eredetű orthoreovírus törzsek felhasználásával készített nukleinsav alapú ML törzsfá. Az általunk meghatározott törzsek szekvenciáit narancssárga színnel jelöltük. A magas bootstrap értékek alátámasztják a fa topológiáját. A lépték megfeleltethető a filogenetikai távolságnak. Az általunk vizsgált törzseket narancs színnel jelöltük. A Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellek a következők voltak: L1: GTR+G+I; L2: HKY+G+I; L3: GTR+G+I; M1: GTR+G+I; M2: TN93+G; M3: K2+G+I; S1: GTR+G; S2: K2+G+I; S3: K2+G; S4: HKY+G+I. A törzsfá készítése során felhasznált szekvenciák génbanki azonosítóit az 1. sz. melléklet tartalmazza.

7. Megbeszélés

7.1. Orthoreovírusok genomszerkezete

Az emlős orthoreovírusok genomszerveződésének vizsgálata évtizedek óta intenzíven folyik. Érdekes módon a madarak orthoreovirusaival kapcsolatban ez a terület jóval lassabban bontakozott ki. PhD témám megkezdése előtt csupán két háziszárnyas eredetű, valamint egy emlősből izolált, a madarak orthoreovirusaival rokonságot mutató reovírus törzs genomszekvenciái álltak rendelkezésre (Bányai et al., 2011; Duncan et al., 1999; Shmulevitz et al., 2002; Voon et al., 2011). Ezért fontosnak tartottuk, hogy további célzott vizsgálatokkal feltárjuk a madarak orthoreovirusai genomjának közös, illetve elkülönítő jegyeit a többi, már ismert orthoreovírus (pl. MRV, PRV) genomhoz képest. Tanulmányunk során a felhalmozott szekvencia adatokat bioinformatikai módszerekkel elemeztük.

Általánosságban elmondható, hogy a háziszárnyasok, valamint a varjú, fogoly és a - részlegesen meghatározott - fácán orthoreovírusok genomjának, illetve genomszegmenseinek szerkezeti felépítése nem tért el jelentősen az irodalomban korábban már leírtaktól. A genom méret átlagosan 23,5 kbp volt. A vizsgált 21 ARV törzsnél a 10 genomszegmens felépítésében az 5' és 3' végeken nem transzlálódó régiókat azonosítottunk, melyek szekvenciája génenként és gazdafajonként megőrzött volt. A nem-transzlálódó szakaszok között elhelyezkedő fehérje kódoló régiókat illetően megállapítottuk, hogy az L1-L3, M1-M3 és S2-S4-es szegmensek minden esetben monocisztronosak voltak, míg az S1 szegmens bi- vagy tricisztronos. A kódolt fehérjék száma 11 vagy 12 volt, méretük pedig arányos volt a genomszegmens hosszával (Benavente & Martinez-Costas, 2007). Kivételt jelentett a policisztronos S1 genomszegmens, amely az S-osztályú szegmensek közül ugyan a leghosszabb, a róla képződő a σ C fehérje viszont a strukturális fehérjék közül a legkisebb.

A víziszárnyasok esetében az egyik fontos szerkezeti különbség a klasszikus és az ún. N-MDRV-k között az S1 illetve a vele ekvivalens S4 szegmens felépítésében figyelhető meg. A klasszikus MDRV-k esetében elmondható, hogy az S4 szegmens bicisztronos, rajta két, részlegesen átfedő ORF található. Ezeken kódolódik a sejttel való összekapcsolódásért, szövetspecifitásért és virulenciáért felelős σ C gén, valamint a p10 protein, ez utóbbi azonban nem hordozza a FAST proteinek funkcionális jegyeit, így szincícium-képződést sem indukál. Az N-MDRV-k esetében az S1 szegmens felépítése – a tyúkfélék orthoreovírus törzseihez hasonlóan – tricisztronos. A σ C és a p10/FAST fehérjéken kívül a p17 fehérje képződik róla, ami a szöveti növekedési retardációért felelős (Costas et al., 2005; Shmulevitz & Duncan, 2000).

7.2. Tvärminne avian virus – egy lehetséges új orthoreovírus faj

A szekvencia hasonlósági adatok fontos szerepet töltenek be a modern vírus taxonómiában. A reovírusok vírusfajba besorolását az ICTV végzi, részben empirikusan kapott szekvencia hasonlósági határértékek figyelembe vételével, részben egyéb kritériumok alapján (Duncan et al., 2004). Az orthoreovírusok jelenlegi klasszifikációja szerint az MRV-k, az ARV-k, az RRV-k, a PRV-k, valamint a BRV külön kládokat és vírusfajokat alkotnak. Az ARV-kkel és NBV-vel az újonnan leírt orthoreovírus törzsek többek között a TVAV, a papagájokból ismert PsRV és a Steller oroszlánfókákból kimutatott SSRV sorolhatók közös kládba. A hüllők orthoreovírusai, érdekes módon, a BRV-vel és a BroV-val alkotnak közös kládot, ami e vírusok közös evolúciós eredetére utal (Bányai et al., 2014; Palacios et al., 2011; Thalmann et al., 2009). A harmadik kládot a klasszikus emlős orthoreovírusok alkotják.

Az *Orthoreovirus* genus külön fajba sorolt, illetve valószínűsíthetően külön fajba sorolandó referencia törzseinek szekvenciáit a varjúból származó orthoreovírus törzssel összehasonlítva, a TVAV az ARV-szerű törzsekkel alkotott közös kládot, azon belül is a gének többségénél a legközelebbi rokonságot az SSRV-vel mutatta. Kivételt jelentettek egyes σ -osztályú fehérjék, amelyek filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy az SSRV közelebbi rokonságban áll a PsRV-vel, míg a TVAV rokonsági kapcsolata e törzsekkel csupán marginális. Fontos megjegyezni, hogy miközben egyes orthoreovírus törzsek rokonsági kapcsolatai a kisszámú genom szekvencia birtokában csak némi bizonytalansággal állapíthatóak meg, addig a TVAV közös leszármazása a különböző ARV, PRV valamint az ARV-szerű törzsekkel egyértelműnek tűnik. Korábban, az ARV és PRV genomszekvencia adatok birtokában ezeket a vírusokat az ARV kládba sorolták (Duncan, 1999) és az utóbbi időkig mindez a taxonómiai besorolás alapját is jelentette. Ennek a monofiletikus kládnak a létezését az újabb szekvencia adatok, többek között a TVAV, SSRV, PsRV törzsekből nyert információk megerősítették.

A TVAV általánosságban véve korlátozott szekvencia-egyezést mutatott a korábban megismert reprezentatív törzsekkel összevetve, és a génenkénti összehasonlításokban sok esetben ezek az értékek az ICTV által elfogadott határértékek alatti értékeket mutattak. Sőt, a szekvencia-adatokat vizsgálva feltűnt, hogy a megállapított szekvencia hasonlósági küszöbértékek az esetek egy részében egyáltalán nem érvényesek. Példaként megemlíthető, hogy a PRV és az ARV mindösszesen 68% és 75% as hasonlóságot mutatott a λA gén vizsgálata során. Ez felveti a határértékek jövőbeli újragondolásának szükségszerűségét, elősegítve ezzel az újonnan leírt reovírusok taxonómiai besorolását.

A TVAV jellemzőinek számbavételekor az is megemlíthető, hogy jelenleg bizonytalan vajon tényleg a varjú-e a vírus eredeti gazdája. Úgy tűnik, hogy egyes reovírus törzsek annak ellenére is közös leszármazási vonalat alkotnak, hogy gazdaállataik más gerinces osztályba tartoznak. Ezt támasztja alá az az észlelet is, hogy bár az SSRV és a PsRV törzsek orthoreovírusai közös klaszterbe tartoznak, gazdaállataik mégsem azonosak. Továbbá a PRV-eket ugyan tipikusan a *Megachiroptera* csoportba sorolt denevérekből lehet izolálni, ezek a vírusok mégis képesek emberi megbetegedéseket is okozni (Chua et al., 2008).

Összességében, a leírt jellemzők alapján azt valószínűsítjük, hogy a TVAV egy új *Orthoreovirus* speciesnek tekintendő, aminek elnevezésére a – gazdaszervezet alapján – *Corvid reovirus* (CRV) nevet javasoltuk (Dandár et al., 2014).

7.3. A tyúk- és lúdalakúak orthoreovírusai – egy közös vírushalmaz külön leszármazási vonalai

Rendszertanilag a madarak osztályába (*Aves*), a ma élő madárfajok a *Neornithes* alosztályba, ezen belül két öregrendbe, a Paleognatae-ba és a Neognatae-ba sorolhatóak. A Paleognatae alosztályba a tinamufélék (*Tinamiformes*) és a struccalakúak (*Struthioformes*) rendjei tartoznak, míg a Neognatae tovább bontható a Galloanserae és a Neoaves öregrendre (Hackett et al., 2008). A Galloanserae öregrendbe sorolható a tyúkalakúak (*Galliformes*), valamint a lúdalakúak (*Anseriformes*) rendje, amely magába foglalja mindazon gazdasági szempontból jelentős szárnyasokat, amelyek orthoreovirusaival munkám során foglalkoztam. Nevezetesen, a tyúkalakúak rendjébe tartozik a fácánfélék családja (*Phasianidae*), ahová a házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*), házi pulyka (*Meleagris gallopavo*), a közönséges fácán (*Phasianus colchicus*), valamint a fogoly (*Perdix perdix*) is tartozik. A lúdalakúak rendjébe tartozó récefélék családjába (*Anatidae*) sorolják a pézsmarécét (*Cairina moscata*) és a házi ludakat (*Anser anser domestica*) (Hackett et al., 2008)

Ahhoz, hogy jobban megértsük az egyes gazdafajokból izolált orthoreovírus törzsek eredetét, valamint a gazda-vírus koevolúció/kospeciáció jelenségét, minden génszegmens esetében törzsfákat készítettünk. Összesen tizennyolc magyarországi, egy USA-beli, és két franciaországi, a Galloanserae öregrendbe tartozó gazdafajból izolált orthoreovírus törzset elemeztünk. A törzsek többsége házi tyúkból, kisebb része pulykából, fácánból, fogolyból, pézsmarécéből és lúdból származott. A korábban felmerült vélemény különbségek annak kapcsán, hogy vajon a víziszárnyasok és a tyúkfélék orthoreovírusai közös vagy különálló

fajba sorolandóak-e, arra készítették bennünket, hogy további szekvencia adatokat gyűjtsünk az ezekből a gazdafajokból izolált törzsekről.

7.3.1. A házi pulykák és házi tyúkok orthoreovírusainak evolúciós története

Annak ellenére, hogy a házi pulykák orthoreovírusait fontos kórokozókként tartjuk számon, nagyon kevés molekuláris adat áll a rendelkezésünkre róluk. A génbankban jelenleg fellelhető információk alapján az ismert szekvenciájú pulyka eredetű orthoreovírus törzsek száma meglehetősen limitált. Ráadásul nem álltak rendelkezésre ezek az adatok akkor, amikor munkánkat elkezdtük és a törzsek filogenetikai összehasonlítását először elvégeztük. Az újabban deponált teljes genomsekvenciákkal és néhány részleges génszekvencia adattal kiegészítve saját adatsorunkat azonban lehetővé vált e vírusok rokonsági kapcsolatainak jobb megértése. A különböző gének szerkezeti vizsgálata során megfigyeltük, hogy a házi pulykákban fellelhető orthoreovírus törzsek nem tértek el nagymértékben a házi tyúkokból izoláltaktól. E törzsek homológ génjei közötti szekvencia azonosság 81-98% volt (aminosav szinten 91-99%). A filogenetikai elemzések során arra a megállapításra jutottunk, hogy a pulyka eredetű törzsek – a λ B és μ B fehérjéket kódoló gének kivételével - önálló ágakat alkottak a törzsfákon belül, ugyanakkor ezek az ágak a házi tyúk eredetű orthoreovírus törzsekkel közös kládba tartoztak. Ennek magyarázataként szolgálhat, hogy a házi tyúkok és a házi pulykák taxonómiai rokonai egymásnak, így a bennük megtalálható orthoreovírusok feltételezhetően közös őssel rendelkeztek, és különböző evolúciós mechanizmusok során adaptálódhattak a ma is ismert gazdafajukhoz. Hogy evolúciós léptékben mérve a pulykára jellemző leszármazási vonal szétválása a házi tyúkra jellemző vonal(ak)tól mikorra tehető, arra vonatkozóan nincsenek megfelelő ismeretek. Emellett a házi tyúkokban és házi pulykákban megtalálható orthoreovírus törzsek rokonsági kapcsolataira magyarázatot adhat az állatok tartási körülményeinek hasonlósága is. Mivel a házi szárnyasokat korábban a baromfiudvarokban együtt tartották, lehetséges, hogy közös vírus őssel rendelkeztek, ami az idők folyamán adaptálódott a ma már ismert gazdafajához.

A magyarországi pulyka orthoreovírus törzsek emellett egymással is jelentős hasonlóságot mutattak és elkülönülve helyezkedtek el a többi házi pulyka eredetű orthoreovírustól. Ennek oka valószínűsíthetően a közös földrajzi eredet lehet, valamint az hogy, mindhárom vírustörzs azonos évből származott.

A génbankban jelenleg a házi tyúk eredetű ARV-kból található meg a legtöbb szekvenciaadat. Bár kínai, amerikai, kanadai és tajvani eredetű törzsekből egyaránt fellelhetőek információk az adatbázisban, Magyarországról korábban nem állt

rendelkezésünkre házi tyúk eredetű orthoreovírus izolátumból származó adat. A kutatócsoportunk által vizsgált csirke eredetű ARV-k közül 12 Magyarországról, egy további törzs pedig az USA-ból származott. Az általunk vizsgált hazai vírustörzsek a 2002-2012 közötti időszakból származtak, az ország keleti részéből.

Ellentétben a pulyka orthoreovírus törzsek viszonylag szűk genetikai variabilitásával, a csirke orthoreovírus törzsek génjei több nagy klaszterbe voltak sorolhatóak. A fák elemzésekor megfigyeltük, hogy a törzsek az esetek nagy részében három különböző leszármazási ágat alkottak. Kivételt képezett ez alól az M2 és S4 szegmensek, ahol négy, valamint az M3, S1 és S2 szegmensek, ahol két ágat figyelhettünk meg. Külön érdekesség, hogy a magyarországi ARV törzseknél az L1, L2, M1, M3, S1, S2 és S3 szegmensek vizsgálatakor az általunk meghatározott orthoreovírusok a filogenetikai fák külön ágán helyezkedtek el, ami így egy külön leszármazási ágat feltételez a hazai házi tyúk eredetű ARV-k esetében. A törzsfák topológiájában a nagy ághosszak a pontmutációk halmozódását sejtette, míg az egyes törzsek génjeinek heterogén megoszlása reasszortációra utalt. A reasszortáció jelensége a szegmentált vírusok esetében gyakran megfigyelt evolúciós mechanizmus, amit a madár és emlős orthoreovírusok esetében is számos alkalommal dokumentáltak már (Liu et al., 2003; Shen et al., 2007; Su et al., 2006).

Az M2 szegmens vizsgálata tovább árnyalta a reasszortáció jelentőségével kapcsolatos megfigyeléseinket. A 3457-M/11, 16821-M/06 és 924Bi/05, házi tyúkból származó vírustörzsek a filogenetikai fán egy különálló ágon voltak megfigyelhetőek, mintegy kulcsoportot alkotva. Ezeknek a törzseknek az egymáshoz viszonyított hasonlósága 98-99% volt ns és 99-100% as szinten, a többi házi tyúk, a házi pulyka, a pézsmakacsa és a házi lúd eredetű törzsekhez viszonyítva viszont egyaránt nagyon alacsony szekvencia hasonlóságot tapasztaltunk (61-66% ns, 66-71% as szinten). A mérsékelt szekvencia hasonlóság alapján feltételezhető, hogy az M2 szegmens ezekben a törzsekben eredetileg egy másik gazdafaj orthoreovírusának M2 szegmense volt, amelyből reasszortáció révén került a csirke eredetű orthoreovírusok genomjába és az évek során képes volt az új gazdafaj orthoreovírus törzseiben fennmaradni (Farkas et al., 2016).

Összefoglalva, a filogenetikai számítások megerősítették, hogy a tyúkok és a pulykák orthoreovírusai közeli rokonsági kapcsolatban vannak egymással (Spackman et al., 2005), ezért az a korábbi felvetés, hogy e gazdafajok orthoreovírusai külön fajba sorolandóak (Kapczynski et al., 2002), megalapozatlannak tűnik. Érdekes megfigyelés volt a tyúk és pulyka eredetű orthoreovírusok magyarországi fogoly és részben fácán vírusokkal mutatott közeli rokonsága az egyes gének esetében, hiszen ezek vadmadár-eredetű, de a gazdafaj tekintetében hasonló rendszertani háttérrel rendelkező vírustörzsek. A szekvencia-adatok elemzése során megfigyelhető volt, hogy az M3-as – illetve az 18769-es, fácán eredetű minta esetében a hiányos szekvenciaadatok miatt meghatározásra nem került S1 - szegmens

kivételével mind a fogoly, mind a fácán eredetű törzsek közeli rokonsági kapcsolatban álltak egymással (a hasonlóság ns szinten 72,9-99,2%, as szinten 74,2-100,0% volt). A törzsek az L1-es szegmens esetében külön leszármazási ágat alkotva helyezkedtek el, elkülönültek mind a házi tyúk, mind a házi pulyka eredetű ARV-któl. Ezzel szemben, minden más filogenetikai fán ugyan külön ágon, de mindig beékelődve helyezkedtek el a fácánfélék családjában fellelhető orthoreovírus törzsek közé. Így feltételezhető, hogy a közös taxonómiai eredet segítheti a reasszortációs folyamatok létrejöttét.

7.3.2. A víziszárnyasok orthoreovírusainak evolúciós története

A víziszárnyasok orthoreovírusai két nagyobb csoportba sorolhatóak. Az ún. klasszikus MDRV törzseket pézsmakacsából izolálták először 1950-ben Dél-Afrikában (Kaschula, 1950), majd Európában 1972-ben találták meg őket (Gaudry et al., 1972). Magyarországon először 1999-ben sikerült MDRV-t kimutatni házi lúdban (Palya et al., 2003). Az elmúlt évtizedben Dél-Kelet Kínában megjelent egy új típusú, orthoreovírus fertőzéshez köthető kórkép (haemorrhagia, máj és lép necrosis) (Chen et al., 2012; Wang et al., 2013) és a betegség okaként felismert új orthoreovírus variáns (Novel MDRV, azaz N-MDRV), pézsmakacsák, pekingi kacsák és házi ludak állományait egyaránt veszélyezteti (Liu et al., 2011; Yun et al., 2012).

A genomszegmensek molekuláris vizsgálata során jelentős hasonlóságok fedezhetőek fel a klasszikus és az N-MDRV-k között. Kivételt képez ez alól a vírus penetrációjáért felelős μ B fehérjét kódoló gén, melyeknél a N-MDRV-k közeli rokonsági viszonyban állnak a házi tyúk eredetű ARV-vel. Elképzelhető, hogy az N-MDRV-kenél az M2 szegmenst érintő reasszortáció eredményeképpen az ARV-khez hasonló penetrációs képességgel rendelkeznek, ami kihathat a vírusfertőzés folyamatára és a kórlefolásra is.

Manapság a molekuláris analízisek elvégzéséhez egyre növekvő számú kacska és liba eredetű orthoreovírus törzs szekvenciája áll a rendelkezésünkre, bár ezek zöme kínai eredetű. Európából mindösszesen két franciaországi és két magyarországi vírustörzs részleges genom-szekvenciája volt elérhető vizsgálataink megkezdése előtt (Le Gall-Reculé et al., 1999; Palya et al., 2003; Bányai et al., 2005). Az általunk vizsgált törzsek genom-szerveződésük alapján a klasszikus MDRV-k közé sorolhatóak. Az elvégzett elemzések kimutatták, hogy valamennyi ismert víziszárnyas orthoreovírus, köztük az általunk vizsgált két pézsmaréce és egy házi lúd eredetű törzs, akárcsak a nagyszámú kínai MDRV és N-MDRV törzs, az ARV vírusfajba tartozik. A filogenetikai fákban a víziszárnyasok orthoreovírusai – a μ B fehérjét kódoló gén kivételével – minden esetben elkülönültek a csirkékből és házi pulykákból izolált orthoreovírus törzsektől.

Molekuláris epidemiológiai szempontból érdemes kiemelni, hogy a franciaországi mintákból 2010 és 2011 során izolált D1546 és D2044 törzsek minden esetben a filogenetikai fa ugyanazon ágán helyezkedtek el. A két törzset egymást követő években izolálták, így feltételezhető, hogy ugyanazon törzs szóródásának eredményeképp kerültek kimutatására Franciaország különböző területeiről.

A klasszikus és új típusú MDRV-k vizsgálata során korábban felállított elmélet, miszerint a kacsákban és ludakban megtalálható orthoreovírusok közös őse Kínában fejlődött ki, majd az európai és kínai ágak egymástól független evolúciós folyamatok révén jöttek létre és így különálló fejlődési ágakat alkottak (Yun et al., 2013), az általunk vizsgált törzsek szekvenciáinak ismeretében nem látszik megalapozottnak. Mert, bár a λ C, μ B, σ C, és σ B fehérjéket kódoló gének vizsgálata során megállapítható volt, hogy a klasszikus és az N-MDRV vírustörzsek elkülönülnek egymástól és a törzsfá egy-egy külön ágán foglaltak helyet, azonban a többi 6 szegmens vizsgálata során ez a jelenség nem volt megfigyelhető. Ugyanis az MDRV és N-MDRV törzsek egyes génjei között reasszortációt figyeltünk meg. Mindemellett a vírustörzsek a törzsfákon nem mutattak egyértelmű földrajzi elhelyezkedés szerinti eloszlást sem, Kínában mindkét patotípus előfordul, ráadásul ezek egy része bizonyosan kevert génkombinációt hordozó reasszortáns (Farkas et al., 2014).

8. Új tudományos eredmények és megállapítások

1. Elsőként határoztuk meg dolmányos varjúból (*Corvus corone cornix*) származó orthoreovírus genomszekvenciáját. A filogenetikai elemzések elvégzése után javaslatot tettünk egy új reovírus faj, a *Corvid reovirus* (CRV) létrehozására
2. Elsőként határoztuk meg európai eredetű pézsmarécéből (*Cairina moscata*) és házi lúdból (*Anser anser domestica*) származó vírustörzs genomszekvenciáját. Megállapítottuk, hogy mindhárom törzs a klasszikus genomszerkezetű MDRV-k közé sorolható, ugyanakkor rámutattunk a klasszikus MDRV és N-MDRV törzsek közötti reasszortáció lehetőségére, cáfolva ezzel a két patotípus földrajzi elkülönüléséről alkotott hipotézist.
3. Elsőként izoláltunk és elemeztünk molekuláris módszerekkel fácánból (*Phasianus colchicus*) származó ARV törzset. Továbbá elsőként határoztuk meg egy fogoly (*Perdix perdix*) eredetű orthoreovírus izolátum genomszekvenciáját. Rezervoár szerepükénél fogva feltételezzük e gazdafajok jelentőségét a pulyka és csirke orthoreovírusok genetikai állományának kialakításában/fenntartásában.
4. Elsőként határoztuk meg európai eredetű házi pulyka (*Meleagris gallopavo*) eredetű orthoreovírus kódoló szakaszainak szekvenciáit, rámutatva a különböző földrajzi területeken izolált homológ törzsek közötti nagyfokú genetikai hasonlóságra.
5. Elsőként határoztuk meg nem tenosynovitis-ből származó házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) eredetű orthoreovírus izolátumok genomszekvenciáját.
6. A filogenetikai vizsgálatokba bevont tucatnyi orthoreovírus törzs elemzése során megállapítottuk, hogy a különböző gazdafajok orthoreovírusainak génösszetételében vannak konzervatív mintázatok, ugyanakkor a fajidegen törzsek közötti reasszortáció új génváltozatok beépülését teszi lehetővé.

9. Irodalomjegyzék

- Abbas, M.D, Marschang, R.E, Schmidt, V, Kasper A., Papp T.: **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**, Vet. Microbiol., 150. 70-79, 2011.
- Ahne, W., Thomsen, I., Winton, J.: **Isolation of a reovirus from the snake, *Python regius***, Arch. Virol., 94. 135-139, 1987.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: **Basic local alignment search tool**, J. Mol. Biol., 215. 403-410, 1990.
- Ashton, W.L, Randall, C.J, Dagless, M.D., Eaton, T.M.: **Suspected reovirus-associated hepatitis in parrots**, Vet. Rec., 114. 476-477, 1984.
- Attoui, H., Mertens, P.P.C., Becnel, J., Belaganahalli, S., Bergoin, M., Brussaard, C.P., Chappell, J.D., Ciarlet, M., del Vas, M., Dermody, T.S., Dormitzer, P.R., Duncan, R., Fang, Q., Graham, R., Guglielmi, K.M., Harding, R.M., Hillman, B., Makkay, A., Marzachi, C., Matthijssens, J., Milne, R.G., Mohd Jaafar, F., Mori, H., Noordeloos, A.A., Omura, T., Patton, J.T., Rao, S., Maan, M., Stoltz, D., Suzuki, N., Upadhyaya, N.M., Wei, C. and Zhou, H.: **Family *Reoviridae***. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Szerk.: King AMQ, A.M., Carstens EB, Lefkowitz EJ. San Diego: Elsevier, 2011. p. 541-554.
- Bányai, K., Borzák, R., Ihász, K., Fehér, E., Dán, Á., Jakab, F., Papp, T., Hetzel, U., Marschang, R.E., Farkas S.L.: **Whole-genome sequencing of a green bush viper reovirus reveals a shared evolutionary history between reptilian and unusual mammalian orthoreoviruses**, Arch Virol., 159. 153-158, 2014.
- Bányai, K., Dandár, E., Dorsey, K.M., Mató, T., Palya, V.: **The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers**, Virus Genes, 42. 82-89, 2011.
- Bányai, K.: ***Reoviridae***. In: *Klinikai és Járványügyi Virologia*. Szerk.: Takács M, Kárpáti J. Veszprém: Vox Medika Kiadó Kft, 2010. p. 467-473.
- Bányai, K., Esona, M.D., Kerin, T.K., Hull, J.J., Mijatovic, S., Vascenez, N., Torres, C., de Filippis, A.M., Foytich, K.R., Gentsch, J.R.: **Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador**, Arch. Virol., 154. 1823-1829, 2009.

- Bányai, K., Palya, V., Benkő, M., Bene, J., Havasi, V., Melegh, B., Szűcs, Gy.: **The goose reovirus genome segment encoding the minor outer capsid protein, $\sigma 1/\sigma C$, is bicistronic and shares structural similarities with its counterpart in muscovy duck reovirus.** *Virus Genes*, 31. 285-291, 2005.
- Barta, V., Springer, W.T., Millar, D.L.: **A comparison of avian and mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937,** *Avian. Dis.*, 28. 216-223, 1984.
- Benavente, J. and Martinez-Costas, J.: **Avian reovirus: structure and biology,** *Virus. Res.*, 123. 105-119, 2007.
- Benavente, J., Martinez-Costas, J.: **Early steps in avian reovirus morphogenesis,** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 309. 67-85, 2006.
- Blahak, S., Goebel, T.: **A case reported of a reovirus infection in an emerald tree boa (*Corallus caninus*).** In: *Proceedings of the 4th International Colloquium on the Pathology of Reptiles and Amphibians.* Bad Nauheim, Germany. 27-29 September 1991. p. 13-16.
- Blahak, S., Ott, I., Vieler, E.: **Comparison of 6 different reoviruses of various reptiles,** *Vet. Res.*, 26. 470-476, 1995.
- Cadman, H.F., Kelly, P.J., Zhou, R., Davelaar, F., Mason, P.R.: **A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe,** *Avian. Dis.*, 38. 621-625, 1994.
- Chappell, J.D., Duncan, R., Mertens, P.P.C., Dermody, T.S.: **Genus *Orthoreovirus*.** In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Szerk.: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. San Diego: Academic Press, 2000. p. 455-465.
- Chen, Z., Zhu, Y., Li, C., Liu, G.: **Outbreak-associated novel duck reovirus, China, 2011,** *Emerg. Infect. Dis.*, 18. 1209–1211, 2012.
- Chua, K.B., Voon, K., Yu, M., Keniscope, C., Abdul Rasid, K., Wang, L.F.: **Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with acute influenza-like illness in an adult patient,** *PLoS One*, 6. e25434, 2011.
- Chua, K.B, Voon, K., Cramer, G., Tan, H.S., Rosli, J., McEachern, J.A., Suluraju, S., Yu, M., Wang, L.F.: **Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections,** *PLoS One*, 3. e3803, 2008.

- Chua, K.B., Crameri, G., Hyatt, A., Yu, M., Tompang, M.R., Rosli, J., McEachern, J., Crameri, S., Kumarasamy, V., Eaton, B.T., Wang, L.: **A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104. 11424-11429, 2007.
- Conzo, G., Magnino, S., Sironi, G., Lavazza, A., Vigo, P.G., Fioretti, A., Kaleta, E.F.: **Reovirus infection in two species of Psittaciformes recently imported into Italy**, Avian. Pathol., 30. 43-47, 2001.
- Corpet, F.: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, Nucl. Acids Res., 16. 10881-10890, 1988.
- Costas, C., Martínez-Costas, J., Bodelón, G., Benavente, J.: **The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein**, J. Virol., 79. 2141-2150, 2005.
- Csiza, C.K.: **Characterization and serotyping of three feline reovirus isolates**, Infect. Immun., 9. 159-166, 1974.
- Dandár, E., Huhtamo, E., Farkas, S.L., Oldal, M., Jakab, F., Vapalahti, O., Bányai, K.: **Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus *Orthoreovirus***. J. Gen. Virol., 95. 898-904, 2014.
- Dandár, E., Bálint, A., Kecskeméti, S., Szentpáli-Gavallér, K., Kisfali, P., Meleg, B., Farkas, S.L., Bányai, K.: **Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease**, Arch. Virol., 158. 2583-2588, 2013.
- Dandár, E., Borzák, R., Bányai, K., Farkas, S. L.: **Hüllők, madarak és emlősök orthoreovírus okozta megbetegedései – Irodalmi áttekintés**, Magy. Állatorvosok., 134. 564-573, 2012.
- Davis, J.F., Kulkarni, A., Fletcher, O.: **Myocarditis in 9- and 11-day-old broiler breeder chicks associated with a reovirus infection**, Avian Dis., 56. 786-790, 2012.
- Day, J.M.: **The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides**, Infect. Genet. Evol., 9. 390-400, 2009.
- Day, J.M., Pantin-Jackwood, M.J., Spackman, E.: **Sequence and phylogenetic analysis of the S1 genome segment of turkey-origin reoviruses**, Virus. Genes, 35. 235-242, 2007.

- De Gussem, J., Swam, H., Lievens, K., De Herdt, P.: **Reovirus tenosynovitis in a flock of layer breeders**, Avian Pathol., 39. 169-170, 2010.
- de Kloet, S.R.: **Sequence analysis of four double-stranded RNA genomic segments reveals an orthoreovirus with a unique genotype infecting psittaciformes**, Avian Dis., 52. 480-486, 2008.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Ricci, D., Camero, M., Lorusso, E., Elia, G., Lavazza, A., Martella, V., Buonavoglia, C.: **Virological and molecular characterization of a mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy**, Vet. Microbiol., 109. 19-27, 2005.
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., Depasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J.: **Viral genome sequencing by random priming methods**, BMC Genomics, 9. 1471-2164-9-5, 2008.
- Docherty, D.E., Converse, K.A., Hansen, W.R., Norman, G.W.: **American woodcock (*Scolopax minor*) mortality associated with a reovirus**, Avian. Dis., 38. 899-904, 1994.
- Drury, S.E., Gough, R.E., de Welchman, D.B.: **Isolation and identification of a reovirus from a lizard, *Uromastix hardwickii*, in the United Kingdom**, Vet. Rec., 151. 637-638, 2002.
- Dryden, K.A., Farsetta, D.L., Wang, G., Keegan, J.M., Fields, B.N., Baker, T.S., Nibert, M.L.: **Internal/structures containing transcriptase-related proteins in top component particles of mammalian orthoreovirus**, Virology, 245. 33-46, 1998.
- Du, L., Lu, Z., Fan, Y., Meng, K., Jiang, Y., Zhu, Y., Wang, S., Gu, W., Zou, X., Tu, C.: **Xi River virus, a new bat reovirus isolated in southern China**, Arch. Virol., 155. 1295-1299, 2010.
- Duncan, R., Murphy, F.A., Mirkovic, R.R.: **Characterization of a novel syncytium-inducing baboon reovirus**, Virology, 212. 752-756, 1995.
- Duncan, R.: **Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreoviruses: a species proposal**, Virology, 260. 316-328, 1999.
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou J., Stoltz, D.: **Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species**, Virology, 319. 131-140, 2004.
- Endo-Munoz, L.B.: **A Western blot to detect antibody to avian reovirus**, Avian Pathol., 19: 477-487, 1990.

- Fairchild, G.A., Cohen, D.: **Serologic study of reovirus infection in dogs**, *Am. J. Vet. Res.*, 28. 1487-1490, 1967.
- Farkas, S.L., Dandár, E., Marton, S., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Mató, T., Palya, V., Bányai, K.: **Detection of shared genes among Asian and European waterfowl reoviruses in the whole genome constellations**, *Infect. Genet. Evol.*, 28. 55-57, 2014.
- Farkas S. L., Marton S., Dandár E., Kugler R., Gál B., Jakab F., Bálint Á., Kecskeméti S., Bányai K.: **Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses**, *Sci. Rep.*, 6. 36960. 2016.
- França, M., Crespo, R., Chin, R., Woolcock, P., Shivaprasad, H.L.: **Retrospective study of myocarditis associated with reovirus in turkeys**, *Avian Dis.*, 54. 1026-1031, 2010.
- Fukutomi, T., Sanekata, T., Akashi, H.: **Isolation of reovirus type 2 from diarrheal feces of pigs**, *J. Vet. Med. Sci.*, 58. 555-557, 1996.
- Gard, G.P., Marshall, I.D.: **Nelson Bay virus. A novel reovirus**, *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, 43. 34-42, 1973.
- Garner, M.M., Farina, L.L., Wellehan J.F.X., Chang L.-W., Childress A.L., Miller L.A., Nordhausen R.W., Pearson M.: **Reovirus-associated syncytial cell enteropathy and hepatopathy in leopard geckos (*Eublepharis macularius*)**. In: *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Milwaukee, p. 82, 8–15 August 2009.
- Gaudry, D., Tetkoff, J., Charles, J. M.: **A Propos D'On Nouveau Virus Isole Chez Le Canard de Barbarie**, *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.*, 21. 2916-1919, 1972.
- Goodwin, M.A., Davis, J.F., Player, E.C.: **Reovirus-associated enteritis in Georgia broiler chicks**, *Avian. Dis.*, 37. 229-233, 1993.
- Grande, A., Benavente, J.: **Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133**, *J. Virol. Methods*, 85. 43-54, 2000.
- Hackett, S.J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R.C., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T.: **A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history**, *Science*, 320. 1763-1768, 2008.

- Hall, T. A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucleic Acids Symp., 41. 95-98, 1999.
- Heggen-Peay, C.L., Qureshi, M.A., Edens, F.W., Sherry, B., Wakenell, P.S., O'Connell, P.H., Schat, K.A.: **Isolation of a reovirus from poult enteritis and mortality syndrome and its pathogenicity in turkey poults**, Avian. Dis., 46. 32-47, 2002.
- Hirai, K., Hitchner, S.B., Calnek, B.W.: **Characterization of paramyxo-, herpes-, and orbiviruses isolated from psittacine birds**, Avian Dis., 23. 148-163, 1979.
- Hlinak, A., Müller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, H., Ziedler, K.: **Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany**, J. Wildl. Dis., 34. 479-486, 1998.
- Hollmèn, T., Franson, J.C., Kilpi, M., Docherty, D.E., Hansen, W.R., Hario, M.: **Isolation and characterization of a reovirus from common eiders (*Somateria mollissima*) from Finland**, Avian. Dis., 46. 478-484, 2002.
- Hsiao, J., Martinez-Costas, J., Benavente, J., Vakharia, V. N.: **Cloning, Expression, and Characterization of Avian Reovirus Guanylyltransferase**, Virology, 296. 288-299, 2002.
- Huhtamo, E., Uzcátegui, N.Y., Manni, T., Munsterhjelm, R., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Vapalahti, O.: **Novel orthoreovirus from diseased crow, Finland**, Emerg. Infect. Dis., 13. 1967-1969, 2007.
- Ide, P.R.: **Avian reovirus antibody assay by indirect immunofluorescence using plastic microculture plates**, Can. J. Comp. Med., 46. 39-42, 1982.
- Jacobson, E.R.: **Viruses and viral diseases of reptiles**. In: *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles*. Szerk.: Jacobson, E.R. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis, 2007. p. 395-460.
- Ji, W.T., Chulu, J.L., Lin, F.L., Li, S.K., Lee, L.H., Liu, H.J.: **Suppression of protein expression of three avian reovirus S-class genome segments by RNA interference**, Vet. Microbiol., 129. 252-261, 2008.
- Jindal, N., Chander, Y., Patnayak, D.P., Mor, S.K., Ziegler, A.F., Goyal, S.M.: **A multiplex RT-PCR for the detection of astrovirus, rotavirus, and reovirus in turkeys**, Avian Dis., 56. 592-596, 2012.
- Joklik, W.K.: **Structure and function of the reovirus genome**, Microbiol. Rev., 45. 483-501, 1981.

- Jones, R.C.: **Reovirus Infections**. In: *Diseases of Poultry*. 12th Edition. Szerk.: Saifm Y. M., F., A. M, Glisson, J. R, McDougald L. R, Nolan L. K, Swayne D. E. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2008. p. 309-328.
- Jones, R.C.: **Avian reovirus infections**, Rev. Sci. Tech., 19. 614-625, 2000.
- Jones, R.C., Islam, M.R., Kelly, D.F.: **Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens**, Avian Pathol., 18. 239-253, 1989.
- Kapczynski, D.R., Sellers, H.S., Simmons, V., Schultz-Cherry, S.: **Sequence analysis of the S3 gene from a turkey reovirus**, Virus Genes, 25. 95-100, 2002.
- Kaschula, V. R.: **A new virus disease of the Muscovy duck (*Cairina moscata*) present in Natal**, Afr. Vet. Med. Assoc., 21. 18-26, 1950.
- Kokubu, T., Takahashi, T., Takamura, K., Yasuda, H., Hiramatsu, K., Nakai, M.: **Isolation of reovirus type 3 from dogs with diarrhea**, J. Vet. Med. Sci., 55. 453-454, 1993.
- Kuntz-Simon, G., Le Gall-Reculé, G., de Boisséson, C., Jestin, V.: **Muscovy duck reovirus sigmaC protein is atypically encoded by the smallest genome segment**, J. Gen. Virol., 83. 1189-1200, 2002.
- Lambden, P.R., Cooke, S.J., Caul, E.O., Clarke, I.N.: **Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification**, J. Virol., 66. 1817-1822, 1992.
- Lamirande, E.W., Nichols, D.K., Owens, J.W., Gaskin, J.M., Jacobson, E.R.: **Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (*Elaphe species*)**, Virus Res., 63. 135-141, 1999.
- Landolfi, J.A., Terio, K.A., Kinsel, M.J., Langan, J., Zachariah, T.T., Childress, A.L., Wellehan, J.F. Jr.: **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**, J. Vet. Diagn. Invest., 22. 37-43, 2010.
- Le Gall-Reculé, G., Cherbonnel, M., Arnauld, C., Blanchard, P., Jestin, A., Jestin, V.: **Molecular characterization and expression of the S3 gene of muscovy duck reovirus strain 89026**, J. Gen. Virol., 80. 195-203, 1999.
- Leland, M.M., Hubbard, G.B., Sentmore, H.T., Soike, K.F., Hilliard, J.K.: **Outbreak of Orthoreovirus-induced meningoencephalomyelitis in baboons**, Comp. Med., 50. 199-205, 2000.
- Liu, H.J., Lee, L.H., Hsu, H.W., Kuo, L.C., Liao, M.H.: **Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class**

- genome segments and multiple cocirculating lineages**, *Virology*, 314. 336-349, 2003.
- Liu, H.J., Chen, J.H., Liao, M.H., Lin, M.Y., Chang, G.N.: **Identification of the sigma C-encoded gene of avian reovirus by nested PCR and restriction endonuclease analysis**, *J. Virol. Methods*, 81. 83-90, 1999.
- Liu, Q., Zhang, G., Huang, Y., Ren, G., Chen, L., Gao, J., Zhang, D., Han, B., Su, W., Zhao, J., Hu, X., Su, J.: **Isolation and characterization of a reovirus causing spleen necrosis in Pekin ducklings**, *Vet. Microbiol.*, 148. 200-206, 2011.
- Lojkić, I., Biđin, M., Biđin, Z., Mikec, M.: **Viral Agents Associated with Poult Enteritis in Croatian Commercial Turkey Flocks**, *Acta. Veterinaria. Brno*, 79. 91-98, 2010.
- Malkinson, M., Perk, K., Weisman, Y.: **Reovirus infection of young Muscovy ducks (*Cairina moschata*)**, *Avian. Pathol.*, 10. 433-440, 1981.
- Marschang, R.E., Hetzel U., Schwartz D., Michling R., Matthes K. : **Isolation of viruses from boa constrictors (*Boa constrictor* spp.) with inclusion body disease in Europe**. In: *Proceedings AAZV, AAWZ, ARAV, NAZWV, Joint Conference*. Florida, p. 30-31, 18-23 September 2001.
- McFerran, J.B. and Connor, T.: **A reovirus isolated from a pig**, *Res. Vet. Sci.*, 11. 388-390, 1970.
- Medveczky, I., Rusvai, M, Tuboly, S, Varga, J.: **Állatorvosi Járványtan I.** Szerk.: Tuboly, S. Szeged: Szegedi Kossuth Nyomda Kft., 1998. p. 372-375.
- Mertens, P.P.C., Duncan, R., Attoui, H., Dermody, T. S.: **Family Reoviridae**. In: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Szerk.: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. San Diego: Academic Press, 2000. p. 447-454.
- Mochizuki, M. and Uchizono, S.: **Experimental infections of feline reovirus serotype 2 isolates**, *J. Vet. Med. Sci.*, 55. 469-470, 1993.
- Moura-Alvarez, J., Chacon, J.V., Scanavini, L.S., Nuñez, L.F., Astolfi-Ferreira, C.S., Jones, R.C., Piantino Ferreira A.J.: **Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: Single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease**, *Poult Sci*, 92. 945-955, 2013.

- Muir, P., Harbour, D.A., Gruffydd-Jones, T.J.: **Reovirus type 2 in domestic cats: isolation and experimental transmission**, Vet. Microbiol., 30. 309-316, 1992.
- Mutlu, O.F., Grund, C., Cöven, F.: **Reovirus infection of pheasants (*Phasianus colchicus*)**, Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere., 26. 104-107, 1998.
- Ni, Y., Kemp, M.C.: **A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions**, Avian. Dis., 39. 554-566, 1995.
- Ni, Y.W., Kemp, M.C.: **Selection of genome segments following coinfection of chicken fibroblasts with avian reoviruses**, Virology, 177: 625-633, 1990.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H .B. Jr., Deerfield, D.W. II.: **GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation**, Embnew. News, 4, 1997.
- Olson, N.O.; Weiss, R.: **Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus**, Avian Dis., 16:535-540, 1972.
- Palacios, G., Wellehan, J.F., 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.: **Discovery of an orthoreovirus in the aborted fetus of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*)**, J. Gen. Virol., 92. 2558-2565, 2011.
- Palya, V., Glávits, R., Dobos-Kovács, M., Ivanics, E., Nagy, E., Bányai, K., Reuter, G., Szucs, G., Dán, A., Benko, M.: **Reovirus identified as cause of disease in young geese**, Avian. Pathol., 32. 129-138, 2003.
- Perpiñán, D., Garner, M.M., Wellehan, J.F., Armstrong, D.L.: **Mixed infection with reovirus and Chlamydophila in a flock of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*)**. J. Avian Med. Surg., 24. 316-321, 2010.
- Petek, M., Felluga, B., Borghi, G., Baroni, A.: **The Crawley agent: an avian reovirus**, Arch. Gesamte. Virusforsch., 21. 413-424, 1967.
- Phillips, P.A., Stanley, N.F., Walters, M.N.: **Murine disease induced by avian reovirus**, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48. 277-284, 1970.
- Pritchard, L.I., Chua, K.B., Cummins, D., Hyatt, A., Crameri, G., Eaton, B.T., Wang, L.F.: **Pulau virus; a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia**, Arch. Virol, 151. 229-239, 2006.
- Pu, J., Liu, X., Guo, Y., Cao, Y., Zhao, J., Zhang, G.: **Seroprevalence of avian reovirus in egg-laying chicken flocks in China**, Avian Dis., 52. 675-679, 2008.

- Ramig, R.F., Garrison, C., Chen, D., Bell-Robinson, D.: **Analysis of reassortment and superinfection during mixed infection of Vero cells with bluetongue virus serotypes 10 and 17**, J. Gen. Virol., 70. 2595-2603, 1989.
- Ramig, R., Fields B.N.: **Genetics of reovirus**. In: *The Reoviridae*. Szerk.: Joklik, W. New York: Plenum Publishing, 1983. p. 197-228.
- Raynaud A, A.M.: **Cutaneous lesions with papillomatous structure associated with viruses in the green lizard (*Lacerta viridis* Laur.)**, C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D. 845-847, 1976.
- Reed, D.E., Daley, C.A., Shave, A.J.: **Reovirus-like agent associated with neonatal diarrhea in pronghorn antelope**, J. Wildl. Dis., 12. 488-491, 1976.
- Ritter, G.D, Ley, D.H., Levy, M., Guy, J., Barnes, H.J.: **Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis**, Avian. Dis., 30. 603-608, 1986.
- Robertson, M.D., Wilcox, G.E.: **Avian reoviruses**, Vet. Bull., 56. 154-174, 1986.
- Rosenberg, D.P, Morecki, R., Lollini, L.O., Glaser, J., Cornelius, C.E.: **Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*)**, Hepatology, 3. 577-580, 1983.
- Rosenberger, J.K.: **Reovirus infections**. In: *Diseases of poultry, 11th* Szerk.: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 283–293.
- Sabin, A.B.: **Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described**, Science, 130. 1387-1389, 1959.
- Sakai, K., Ueno, Y., Ueda, S., Yada, K., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Mutoh, K., Yoshioka, K., Nakamura, M., Takehara, K., Morikawa, S., Mizutani, T.: **Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan**, Vet. Microbiol., 134. 227-232, 2009.
- Sánchez-Cordón, P.J., Hervás, J., Chacón de Lara, F., Jahn, J., Salguero, F.J., Gómez-Villamandos, J.C.: **Reovirus infection in psittacine birds (*Psittacus erithacus*): morphologic and immunohistochemical study**, Avian. Dis, 46. 485-492, 2002.
- Schiff, L.A., Nibert M. L., Tyler K. L.: **Orthoreoviruses and Their Replication**. In: *Fields Virology, Fifth edition*. Szerk.: Knipe, D.M., Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, 2007. p. 1854-1915.
- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I., Duncan, R.: **Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1**

- genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation**, J. Virol., 76. 609-618, 2002.
- Shmulevitz, M., Duncan, R.: **A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fosogenic reoviruses**, EMBO J., 19. 902-912, 2000.
- Sellers, H.S., Linnemann, E.G., Pereira, L., Kapczynski, D.R.: **Phylogenetic analysis of the sigma 2 protein gene of turkey reoviruses**, Avian. Dis., 48. 651-657, 2004.
- Shao, Y.H., Han, Z.X., Chen, L.F., Kong, X.G., Liu, S.W.: **[Isolation and identification of A reovirus from masked civet cats (*Paguma Larvata*)]**, Bing. Du. Xue. Bao, 24. 376-382, 2008.
- Shen, P.C., Chiou, Y.F., Liu, H.J., Song, C.H., Su, Y.P., Lee, L.H.: **Genetic variation of the IA and IC protein encoding genes of avian reoviruses**, Res. Vet. Sci., 83. 394-402, 2007.
- Shivaprasad, H.L., Franca, M., Woolcock, P.R., Nordhausen, R., Day, J.M., Pantin-Jackwood, M.: **Myocarditis associated with reovirus in turkey poults**, Avian Dis., 53. 523-532, 2009.
- Snodgrass, D.R., Burrells, C., Wells, P.W.: **Isolation of Reovirus type 2 from respiratory tract of sheep**, Arch. Virol., 52. 143-149, 1976.
- Spackman, E., Pantin-Jackwood, M., Day, J.M., Sellers, H.: **The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens**, Avian Pathol., 34. 291-296, 2005.
- Steiger, G.H., Calambokidis, J., Cabbage, J.C., Skilling, D.E., Smith, A.W., Gribble, D.H.: **Mortality of harbor seal pups at different sites in the inland waters of Washington**, J. Wildl. Dis., 25. 319-328, 1989.
- Su, Y.P., Su, B.S., Shien, J.H., Liu, H.J., Lee, L.H.: **The sequence and phylogenetic analysis of avian reovirus genome segments M1, M2, and M3 encoding the minor core protein muA, the major outer capsid protein muB, and the nonstructural protein muNS**, J. Virol. Methods, 133. 146-157, 2006.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**, Mol. Biol. Evol., 28. 2731-2739, 2011.
- Tanyi, J., Glavits, R., Salyi, G., Rudas, P., Kosa, E., Szabo, J.: **Pancreatitis caused by reovirus in guinea-fowl**, Avian. Pathol., 23. 61-77, 1994.

- Terheggen, F., Benedikz, E., Frissen, P.H., Brinkman, K.: **Myocarditis associated with reovirus infection**, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 22. 197-198, 2003.
- Thalmann, C.M., Cummins, D.M., Yu, M., Lunt, R., Prichard, L. I., Hanson, E., Crameri, S., Hyatt, A., Wang, L. F.: **Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat**, Virology, 402. 26-40, 2009.
- Urbano, P., Urbano, F.G.: **The *Reoviridae* family**, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 17. 151-161, 1994.
- van Loon, A.A., Koopman, H.C., Kosman, W., Mumczur, J., Szeleszczuk, O., Karpinska, E., Kosowska, G., Lütticken, D.: **Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens**, Vet. Q, 23. 129-133, 2001.
- van der Heide, L.: **The history of avian reovirus**, Avian. Dis., 44. 638-641, 2000.
- van de Zande, S., Kuhn, E.M.: **Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study**, Vet. Microbiol., 120. 42-49, 2007.
- Victoria, J.G., Kapoor, A., Dupuis, K., Schnurr, D.P., Delwart, E.L.: **Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues**, PLoS. Pathog, 4. e1000163, 2008.
- Vieler, E., Baumgärtner, W., Herbst, W., Köhler, G.: **Characterization of a reovirus isolate from a rattle snake, *Crotalus viridis*, with neurological dysfunction**, Arch. Virol., 138. 341-344, 1994.
- Voon, K., Chua, K.B., Yu, M., Crameri, G., Barr, J.A., Malik, Y., Wang, L.F.: **Evolutionary relationship of the L- and M-class genome segments of bat-borne fusogenic orthoreoviruses in Malaysia and Australia**, J. Gen. Virol., 92. 2930-2936, 2011.
- Wang, D., Shi, J., Yuan, Y., Zheng, L., Zhang, D.: **Complete sequence of a reovirus associated with necrotic focus formation in the liver and spleen of Muscovy ducklings**, Vet. Microbiol., 166. 109-122, 2013.
- Wellehan, J.F., Childress, A.L., Marschang, R.E., Johnson, A.J., Lamirande, E.W., Roberts, J.F., Vickers, M.L., Gaskin, J.M., Jacobson, E.R.: **Consensus nested PCR amplification and sequencing of diverse reptilian, avian, and mammalian orthoreoviruses**. Vet. Microbiol., 133. 34-42, 2009.
- Xie, Z., Fadl, A.A., Girshick, T., Khan, M.I.: **Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction**, Avian Dis., 41. 654-660, 1997.

- Xu, W., Coombs, K.M.: **Avian reovirus L2 genome segment sequences and predicted structure/function of the encoded RNA-dependent RNA polymerase protein**, J. Virol., 76. 609-618, 2008.
- Yan, X., Parent, K.N., Goodman, R.P., Tang, J., Shou, J., Nibert, M.L., Duncan, R., Baker, T.S.: **Virion structure of baboon reovirus, a fusogenic orthoreovirus that lacks an adhesion fiber**, J. Virol., 85. 7483-7495, 2011.
- Yap, T.A, Brunetto, A., Pandha, H., Harrington, K., Debono, J.S.: **Reovirus therapy in cancer: has the orphan virus found a home?** Expert. Opin. Investig. Drugs, 17. 1925-1935, 2008.
- Yin, H.S., Lee, L.H.: **Development and characterization of a nucleic acid probe for avian reoviruses**, Avian Pathol., 27. 423-426, 1998.
- Yun, T., Yu, B., Ni, Z., Ye, W., Chen, L., Hua, J., Zhang, C.: **Isolation and genomic characterization of a classical Muscovy duck reovirus isolated in Zhejiang, China**, Infect. Genet. Evol., 20. 444-453, 2013.
- Yun, T., Ye, W., Ni, Z., Chen, L., Yu, B., Hua, J., Zhang, Y., Zhang, C.: **Complete genomic sequence of goose-origin reovirus from China**, J. Virol., 86. 10257, 2012.
- Zhang, Y, Guo, D., Geng, H., Liu, M., Hu, Q., Wang, J., Tong, G., Kong, X., Liu, N., Liu, C.: **Characterization of M-class genome segments of muscovy duck reovirus S14**, Virus. Res., 125. 42-53, 2007.
- Zhang, Y., Liu, M., Shuidong, O., Hu, Q.L., Guo, D.C., Chen, H.Y., Han, Z.: **Detection and identification of avian, duck, and goose reoviruses by RT-PCR: goose and duck reoviruses are part of the same genogroup in the genus *Orthoreovirus***, Arch. Virol., 151. 1525-1538, 2006.

10. Tudományos publikációk

10.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Farkas S. L., Marton S., Dandár E., Kugler R., Gál B., Jakab F., Bálint Á., Kecskeméti S., Bányai K.: **Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses**, Sci. Rep., 6. 36960. 2016.

IF: 5,228

Kugler R., Dandár E., Fehér E., Jakab F., Mató T., Palya V., Bányai K., Farkas S. L.: **Phylogenetic analysis of a novel reassortant orthoreovirus strain detected in partridge (*Perdix perdix*)**, Virus Res., 215. 99-103, 2016.

IF: 2,324

Dandár E., Fehér E., Bálint Á., Kisfali P., Melegh B., Mató T., Kecskeméti S., Palya V., Bányai K., Farkas S.L.: **Genome sequences of three turkey orthoreovirus strains isolated in Hungary**, Genome Announc., 3. e01333-15, 2014.

IF: -

Farkas S.L., Dandár E., Marton S., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Mató T., Palya V., Bányai K.: **Detection of shared genes among Asian and European waterfowl reoviruses in the whole genome constellations**, Infect. Genet. Evol., 28. 55-57, 2014.

IF: 3,264

Dandár E., Farkas S.L., Marton S., Oldal M., Jakab F., Mató T., Palya V., Bányai K.: **The complete genome sequence of a European goose reovirus strain**, Arch. Virol., 8. 2165-2169, 2014.

IF: 2,030

Dandár E., Huhtamo E., Farkas S.L., Oldal M., Jakab F., Vapalahti O., Bányai K.: **Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus *Orthoreovirus***, J. Gen. Virol., 95. 898-904, 2014.

IF: 3,127

Dandár E., Bálint Á., Kecskeméti S., Szentpáli-Gavallér K., Kisfali P., Melegh B., Farkas S.L., Bányai K.: **Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease**, Arch. Virol., 158. 2583-2588, 2013.

IF: 2,030

Dandár E., Borzák R., Bányai K., Farkas S. L.: **Hüllők, madarak és emlősök orthoreovírus okozta megbetegedései – Irodalmi áttekintés**, Magy. Állatorvosok., 134. 564-573, 2012.

IF:0,146

Bányai K., Dandár E., Dorsey, K.M., Mató T., Palya V.: **The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers**, Virus Genes, 42. 82-89, 2011.

IF: 1,170

10.2. Nemzetközi konferenciakiadványban megjelent abstract vagy proceedings

Dandár E., Doszpoly A., Jánoska M., Heltai M., Szabó L., Benkő M.: **PCR Screening of Mammalian predators (*Carnivora*) for adeno- and herpesviruses**, 8th International Congress of Veterinary Virology, In: *Proceedings of the ESVV 8th Int Congr Vet Virol*. Szerk.: Benkő M., Harrach B. Budapest, p. 226., 2009.

Dandár E., Bálint Á., Kecskeméti S., Szentpáli-Gavallér K., Farkas S.L., Bányai K.: **Detection and characterization of an avian reovirus strain with divergent genes from central nervous system disease of broiler chicken**, Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Lipcse, 2013.

László B., Papp H., Dandár E., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara, M., Jakab F., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Lengyel Gy., Martella, V., Mészáros J., Mészner J., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Tóth A., Tóth E., Szűcs Gy., Bányai K.: **Emerging rotavirus strains, 2007-2010, Hungary**, 4th European Rotavirus Biology Meeting, Altafiumara, 2011.

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

Bányai K., Dandár E., Dorsey, K. M., Mató T., Palya V.: **Novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers**, International Meeting on Emerging Diseases (IMED), Bécs, 2011.

10.3. Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Bayer-Dandár E., Kassa Cs.: **EBV fertőzések őssejt-transzplantáltakban: klinikum, diagnosztika és terápiás lehetőségek**, Focus Medicinae, 17. 16-21, 2015.

IF:-

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

IF: 3,287

Sós E., Molnár V., Dandár E., Bálint Á., Bakonyi T.: **Szerológiai vizsgálatok hazai túzok- (*Otis tarda*) állományokban**, Magy. Állatorvosok., 134. 361-365, 2012.

IF: 0,146

Dandár E., Szabó L., Heltai M., Doszpoly A.: **Adeno- és herpeszvírusok előfordulásának felmérése ragadozók (*Carnivora*) mintáinak PCR-es vizsgálatával**, Magy. Állatorvosok., 132. 302-308, 2010.

IF: 0,300

Bányai K., Papp H., Dandár E., Molnár P., Mihály I., van Ranst, M., Martella, V., Matthijnsens, J.: **Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain**, Infect. Genet. Evol., 10. 1140-1444, 2010.

IF: 2,792

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy támogatta elképzeléseimet, a kutatómunkámat és bevezetett a molekuláris virológia rejtelseibe. Elméleti és gyakorlati útmutatása, kritikus észrevételei nagyban hozzájárultak a munka elkészültéhez.

Külön köszönet illeti Dr. Farkas Szilviát, aki fáradtságos munkával sok hibát gyomlált ki a kéziratból az írás során.

Köszönöm az *Új kórokozók felderítése* témacsoport jelenlegi és volt kollégáinak, Dr. Fehér Enikőnek, Bartókné Horváth Anettnek, Borzák Rékának, Papp Hajnalkának, Dr. Kovács Eszternek, Dr. Marton Szilviának, Dr. Sellyei Boglárkának, Ihász Katalinnak és Dóró Renátának, amiért támogatták mindennapi munkámat és segítségükkel át tudtam lendülni a hétköznapi nehézségeim.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Bálint Ádámnak, Dr. Dán Ádámnak, Dr. Szentpáli-Gavallér Katalinnak, Dr. Kecskeméti Sándornak, Michna Juditnak, Dr. Thuma Ákosnak, Dr. Jakab Ferencnek, Dr. Mató Tamásnak, Dr. Palya Vilmosnak, valamint Dr. Eili Huhtamo-nak és Dr. Olli Vapalahti-nak azért a segítségért, ami nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönöm a családomnak és a barátaimnak, akik végig hittek bennem, támogattak és biztattak az elmúlt években, ami nagymértékben segített megbirkózni az előttem álló feladatokkal. Külön köszönet illeti édesanyámat, aki fáradhatatlanul olvasta mindig újra és újra a készülő kéziratot.

Végül szeretném megköszönni férjemnek, Bayer Lászlónak, hogy végtelen türelemmel és megértéssel viselte az utolsó hónapok megpróbáltatásait és sokszor eloszlatta a kudarctól való félelmeimet és a kétségeimet.

Jelen értekezés a K108727 sz. OTKA pályázat támogatásával készült.

12. Melléklet

1.sz. melléklet – a dolgozat alapját képező szekvenciák

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
<i>BroV</i>	Kis vörös repülőkutya	Ausztrália	GQ258977 – L1 GQ258978 – L2 GQ258979 – L3 GQ258980 – M1 GQ258981 – M2 GQ258982 – M3 GQ258983 – S1 GQ258984 – S2 GQ258985 – S3 GQ258986 – S4
<i>BRV</i>	Pávián	Kanada	AF059716 – L1 AF059717 – L2 AF059718 – L3 AF059719 – M1 AF059720 – M2 AF059721 – M3 AF059722 – S1 AF059723 – S2 AF059724 – S3 AF059725 – S4
<i>MRV Dearing</i>	Ember	Kanada	HM159613 – L1 HM159614 – L2 HM159615 – L3 HM159616 – M1 HM159617 – M2 HM159618 – M3 HM159619 – S1 HM159620 – S2 HM159621 – S3 HM159622 – S4
<i>MRV Jones</i>	Ember	USA	AF129821 – L1 M31057 – L2 AF378005 – L3 AY428874 – M1 M19355 – M2 AF174383 – M3 M35964 – S1 L19775 – S2 DQ220019 – S3 M18390 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
MRV Lang	Szarvasmarha	Franciaország	M24734 – L1 AF378007 – L2 AF129820 – L3 AF490617 – M1 X59945 – M2 AF174382 – M3 M14779 – S1 AJ133089 – S2 M14325 – S3 M13139 – S4
MRV Ndelle	Házi egér	Kamerun	AF368033 – L3 AF368034 – M2 AF368035 – S2 AF368037 – S3
NBV	Szürkefejű repülőkutya	Ausztrália	JF342672 – L1 JF342673 – L2 JF342674 – L3 JF342675 – M1 JF342676 – M2 JF342677 – M3 JF342678 – S1 JF342679 – S2 JF342680 – S3 JF342681 – S4
PuV	Változékony repülőkutya	Malajzia	JF342666 – L1 JF342667 – L2 JF342668 – L3 JF342669 – M1 JF342670 – M2 JF342671 – M3 AY357730 – S1 AY357731 – S2 AY357732 – S3 AY357733 – S4
RRV 47/02	Bozótvipera	Németország	KC852153 – L1 KC852154 – L2 KC852155 – L3 KC852156 – M1 KC852157 – M2 KC852158 – M3 KC852159 – S1 KC852160 – S2 KC852161 – S3 KC852162 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
SSRV	Steller-féle oroszlánfóka	USA	HM222971 – L1 HM222972 – L2 HM222973 – L3 HM222974 – M1 HM222975 – M2 HM222976 – M3 HM222977 – S1 HM222978 – S2 HM222979 – S3 HM222980 – S4
TVAV	dolmányos varjú	Finnország	KF692089 – L1 KF692090 – L2 KF692091 – L3 KF692092 – M1 KF692093 – M2 KF692094 – M3 KF692095 – S1 KF692096 – S2 KF692097 – S3 KF692098 – S4
1017-1	házi tyúk	Kína	AY641740 – L1 DQ238096 – L3 AY639611 – M1 AY635935 – M2 AY573905 – M3 AF297216 – S1 AF294762 – S2 AF301474 – S3 AF294771 – S4
138	házi tyúk	Kanada	EU707933 – L1 EU707935 – L2 EU707937 – L3 AY557188 – M1 AY750052 – M2 AY557190 – M3 AF218359 – S1 AF059717 – S2 AF059721 – S3
16821-M/06	házi tyúk	Magyarország	KX398302 - L1 KX398303 – L2 KX398304 – L3 KX398305 – M1 KX398306 – M2 KX398307 – M3 KX398308 – S1 KX398309 – S2 KX398310 – S3 KX398311 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
17206-M/06	házi tyúk	Magyarország	KX398312 - L1 KX398313 - L2 KX398314 - L3 KX398315 - M1 KX398316 - M2 KX398317 - M3 KX398318 - S1 KX398319 - S2 KX398320 - S3 KX398321 - S4
1733	házi tyúk	USA	KF741706 - L1 KF741708 - L3 KF741709 - M1 KF741710 - M2 KF741711 - M3 KF741712 - S1 KF741713 - S2 KF741714 - S3 KF741715 - S4
176	házi tyúk	Kanada	EU707934 - L1 EU707936 - L2 EU707938 - L3 AY557189 - M1 AY750053 - M2 AY557191 - M3 AF218358 - S1 AF059716 - S2 AF059720 - S3 AF059724 - S4
17727-M/10	házi tyúk	Magyarország	KX398322 - L1 KX398323 - L2 KX398324 - L3 KX398325 - M1 KX398326 - M2 KX398327 - M3 KX398328 - S1 KX398329 - S2 KX398330 - S3 KX398331 - S4
1884	házi tyúk		EU681257 - S1
2408	házi tyúk	Kína	AY641742 - L1 AY652694 - L3 AY639613 - M1 AY635937 - M2 AY573907 - M3 AF204945 - S1 AF247724 - S2 AF208038 - S3 AF213468 - S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
284V/06	házi tyúk	Magyarország	KX398232 - L1 KX398233 - L2 KX398234 - L3 KX398235 - M1 KX398236 - M2 KX398237 - M3 KX398238 - S1 KX398239 - S2 KX398240 - S3 KX398241 - S4
3211V/02	házi tyúk	Magyarország	KX398272 - L1 KX398273 - L2 KX398274 - L3 KX398275 - M1 KX398276 - M2 KX398277 - M3 KX398278 - S1 KX398279 - S2 KX398280 - S3 KX398281 - S4
3457-M/11	házi tyúk	Magyarország	KX398282 - L1 KX398283 - L2 KX398284 - L3 KX398285 - M1 KX398286 - M2 KX398287 - M3 KX398288 - S1 KX398289 - S2 KX398290 - S3 KX398291 - S4
4599V/04	házi tyúk	Magyarország	KX398292 - L1 KX398293 - L2 KX398294 - L3 KX398295 - M1 KX398296 - M2 KX398297 - M3 KX398298 - S1 KX398299 - S2 KX398300 - S3 KX398301 - S4
601G	házi tyúk	Kína	AY641736 - L1 AY652699 - L3 AY639614 - M1 AY635941 - M2 AY573908 - M3 AF297217 - S1 AF311322 - S2 AY008384 - S3 AY008385 - S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
601SI	házi tyúk	-	AF294769 – S1 AF208037 – S2
6-10	házi tyúk	India	EU681256 – S1
750505	házi tyúk	Kína	DQ238093 – L1 AY652695 – L3 AY639615 – M1 AY635942 – M2 AY573909 – M3 AF204950 – S1 AF294767 – S2 AF208035 – S3 AF213470 – S4
820	házi tyúk	India	EU681260 – S1
875Bi/05	házi tyúk	Magyarország	KX398242 – L1 KX398243 – L2 KX398244 – L3 KX398245 – M1 KX398246 – M2 KX398247 – M3 KX398248 – S1 KX398249 – S2 KX398250 – S3 KX398251 – S4
878Bi/05	házi tyúk	Magyarország	KX398252 – L1 KX398253 – L2 KX398254 – L3 KX398255 – M1 KX398256 – M2 KX398257 – M3 KX398258 – S1 KX398259 – S2 KX398260 – S3 KX398261 – S4
916	házi tyúk	Kína	AY641737 – L1 AY652701 – L3 AF297214 – S1 AF294764 – S2 AY008383 – S3 AF294774 – S4
916SI	házi tyúk	Kína	AY639616 – M1 AY635943 – M2 AY573910 – M3

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
918	házi tyúk	Kína	AY641738 – L1 AY652700 – L3 AY639617 – M1 AY635945 – M2 AY573911 – M3 AF297215 – S1 AF294766 – S2 AF301473 – S3 AF294775 – S4
919	házi tyúk	Tajvan	AY641739 – L1 AY652697 – L3 AY639618 – M1 AY635939 – M2 AY573912 – M3 AF204949 – S1 AF294763 – S2 AF208034 – S3 AF294776 – S4
924Bi/05	házi tyúk	Magyarország	KX398262 – L1 KX398263 – L2 KX398264 – L3 KX398265 – M1 KX398266 – M2 KX398267 – M3 KX398268 – S1 KX398269 – S2 KX398270 – S3 KX398271 – S4
99G	házi tyúk	-	DQ415659 – S3
AVS-B	házi tyúk	USA	FR694191 – L1 FR694192 – L2 FR694193 – L3 FR694194 – M1 FR694195 – M2 FR694196 – M3 FR694197 – S1 FR694198 – S2 FR694199 – S3 FR694200 – S4
B-98	házi tyúk	Kína	EF030498 – S3
Bareilly	házi tyúk	India	FJ949087 – S1
Bareilly_son-1	házi tyúk	India	HM015906 – S1

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
C-98	házi tyúk	Kína	EU616735 – L1 JN641888 – L2 EU616737 – L3 EU616740 – M1 EU616741 – M2 EU616744 – M3 EF057397 – S1 JN641886 – S2 EF030496 – S3 JN641885 – S4
Fahey-Crawley	házi tyúk	USA	DQ868789 – S1
G-98	házi tyúk	Kína	EF030497 – S3
GEI09_97M	házi tyúk	Hollandia	AF354220 – S1
GuangxiR1	házi tyúk	Kína	KC183743 – L1 KC183744 – L2 KC183745 – L3 KC183746 – M1 KC183747 – M2 KC183748 – M3 KC183749 – S1 KC183750 – S2 KC183751 – S3 KC183752 – S4
GuangxiR2	házi tyúk	Kína	KF741732 – S1
GX/2010/1	házi tyúk	-	JN559376 – S2
K5	házi tyúk	India	EU681261 – S1
MS-4	házi tyúk	India	EU681258 – S1
NK	házi tyúk	-	JQ916907 – S3
OS161	házi tyúk	Kína	AY641743 – L1 AY652696 – L3 AY639619 – M1 AY635944 – M2 AY573913 – M3 AF294770 – S1 AF301471 – S2 AF294777 – S3
P100	házi tyúk	USA	DQ868791 – S1

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
R2	házi tyúk	-	DQ238095 – L3 AY639620 – M1 AY635940 – M2 AY573914 – M3
R2/TW	házi tyúk	Kína	AY641744 – L1 AF297213 – S1 AF294765 – S2 AF301472 – S3 AF294778 – S4
S1133	házi tyúk	USA	AY547458 – L1 DQ534201 – L2 AY652693 – L3 AY639610 – M1 AY635934 – M2 AY573904 – M3 AF330703 – S1 KF741763 – S2 KF741764 – S3 KF741765 – S4
T1781	házi tyúk	Magyarország	KC865787 – L1 KC865788 – L2 KC865789 – L3 KC865790 – M1 KC865791 – M2 KC865792 – M3 KC865793 – S1 KC865794 – S2 KC865795 – S3 KC865796 – S4
T6	házi tyúk	Kína	DQ238094 – L1 AY652698 – L3 AY639621 – M1 AY635936 – M2 AY573915 – M3 AF204948 – S1 AF294768 – S2 AF208036 – S3 AF213469 – S4
T-98	házi tyúk	Kína	EU616739 – L1 JN641889 – L2 EU616738 – L3 EU616736 – M1 EU616742 – M2 EU616743 – M3 EF057398 – S1 JN641887 – S2 EF030499 – S3 JN641884 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
TU5	házi tyúk	Tunézia	HM751145 – S1
TU87	házi tyúk	Tunézia	HM751144 – S1
VA-1	házi tyúk	India	EU681255 – S1
19831-M/09	házi pulyka	Magyarország	KR997899 – L1 KR997900 – L2 KR997901 – L3 KR997902 – M1 KR997903 – M2 KR997904 – M3 KR997905 – S1 KR997906 – S2 KR997907 – S3 KR997908 – S4
D1104	házi pulyka	Magyarország	KR997919 – L1 KR997920 – L2 KR997921 – L3 KR997922 – M1 KR997923 – M2 KR997924 – M3 KR997925 – S1 KR997926 – S2 KR997927 – S3 KR997928 – S4
D1246	házi pulyka	Magyarország	KR997909 – L1 KR997910 – L2 KR997911 – L3 KR997912 – M1 KR997913 – M2 KR997914 – M3 KR997915 – S1 KR997916 – S2 KR997917 – S3 KR997918 – S4
NC/98	házi pulyka	USA	DQ995806 – S3
NC/SEP-R108/3	házi pulyka	USA	DQ996604 – S1
NC/SEP-R61/03	házi pulyka	USA	DQ996605 – S1
NC98	házi pulyka	USA	AF465799 – S3
PEMS85	házi pulyka	USA	DQ996603 – S1 AY444913 – S3

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
TARV-Crestwiev	házi pulyka	USA	KJ874304 – M1 KJ874258 – M3 KF872238 – S1 KF872244 – S2 KF872263 – S3 KF872267 – S4
TARV-MN1	házi pulyka	USA	KJ874306 – M1 KJ874283 – M2 KJ874260 – M3 KF872232 – S1 KF872245 – S2 KF872265 – S3 KF872269 – S4
TARV-MN10	házi pulyka	USA	KJ865906 – L1 KJ865896 – L2 KJ865886 – L3 KJ874315 – M1 KJ874292 – M2 KJ874269 – M3 KF872242 – S1 KF872254 – S2 KF872262 – S3
TARV-MN11	házi pulyka	USA	KJ865907 – L1 KJ865897 – L2 KJ865887 – L3 KJ874316 – M1 KJ874293 – M2 KJ874270 – M3
TARV-MN12	házi pulyka	USA	KJ865908 – L1 KJ865898 – L2 KJ865888 – L3 KJ874317 – M1 KJ874294 – M2
TARV-MN13	házi pulyka	USA	KJ865909 – L1 KJ865899 – L2 KJ865889 – L3 KJ874318 – M1 KJ874272 – M2 KJ874295 – M3

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
TARV-MN2	házi pulyka	USA	KJ865911 – L1 KJ865893 – L2 KJ865883 – L3 KJ874307 – M1 KJ874284 – M2 KJ874261 – M3 KF872233 – S1 KF872246 – S2 KF872255 – S3 JQ954691 – S4
TARV-MN3	házi pulyka	USA	KJ874308 – M1 KJ874285 – M2 KJ874262 – M3 KF872247 – S2 KF872256 – S3 KF872271 – S4
TARV-MN4	házi pulyka	USA	KJ865904 – L1 KJ865894 – L2 KJ865884 – L3 KJ874309 – M1 KJ874286 – M2 KJ874263 – M3 KF872235 – S1 KF872248 – S2 KF872257 – S3 JQ954693 – S4
TARV-MN5	házi pulyka	USA	KJ874310 – M1 KJ874287 – M2 KJ874264 – M3 KF872236 – S1 KF872249 – S2 KF872258 – S3 KF872273 – S4
TARV-MN6	házi pulyka	USA	KJ874311 – M1 KJ874288 – M2 KJ874265 – M3 KF872237 – S1 KF872250 – S2 KF872266 – S3 KF872274 – S4;

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
TARV-MN7	házi pulyka	USA	KJ874312 – M1 KJ874289 – M2 KJ874266 – M3 KF872239 – S1 KF872251 – S2 KF872259 – S3 KF872275 – S4
TARV-MN8	házi pulyka	USA	KJ874313 – M2 KJ874267 – M3 KF872240 – S1 KF872252 – S2 KF872260 – S3 KF872276 – S4
TARV-MN9	házi pulyka	USA	KJ865905 – L1 KJ865895 – L2 KJ865885 – L3 KJ874314 – M1 KJ874291 – M2 KJ874268 – M3 KF872241 – S1 KF872253 – S2 KF872261 – S3 KF872277 – S4
TARV-O'Neil	házi pulyka	USA	KJ874305 – M1 KJ874282 – M2 KJ874259 – M3 KF872243 – S2 KF872264 – S3 KF872268 – S4
TERV-MN2	házi pulyka	USA	KJ865911 – L1 KJ865901 – L2 KJ865891 – L3 KJ874320 – M1 KJ874297 – M2 KJ874274 – M3
TERV-MN3	házi pulyka	USA	KJ874321 – M1 KJ874298 – M2 KJ874275 – M3
TERV-MN6	házi pulyka	USA	KJ865912 – L1 KJ865902 – L2 KJ865892 – L3 KJ874324 – M1 KJ874301 – M2 KJ874278 – M3

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
<i>TK/MN/B1013/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693688 – S4
<i>TK/MN/B1014/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693700 – S4
<i>TK/MN/B1016/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693690 – S4
<i>TK/MN/B1029/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693691 – S4
<i>TK/MN/B1038/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693698 – S4
<i>TK/MN/B1040/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693699 – S4
<i>TK/MN/B2013/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693692 – S4
<i>TK/MN/B2014/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693700 – S4
<i>TK/MN/B2015/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693693 – S4
<i>TK/MN/B2016/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693694 – S4
<i>TK/MN/B2021/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693695 – S4
<i>TK/MN/B2022/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693696 – S4
<i>TK/MN/B2024/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693697 – S4
<i>TK/MN/B2028/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693702 – S4
<i>TK/MN/B3030/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693703 – S4
<i>TK/MN/B3033/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693704 – S4
<i>TK/MN/B4016/08</i>	házi pulyka	USA	FJ693701 – S4
<i>TK/MN/D-000818/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353324 – S4
<i>TK/MN/D-004782/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353325 – S4
<i>TK/MN/D-022565/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353326 – S4
<i>TK/MN/D-043386/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353327 – S4
<i>TK/MN/D-047428/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353328 – S4
<i>TK/MN/D-048814/08</i>	házi pulyka	USA	GQ353329 – S4
<i>TK/MN/D-049007/07</i>	házi pulyka	USA	GQ353318 – S4
<i>TK/MN/D-052725/07</i>	házi pulyka	USA	GQ353319 – S4
<i>TK/MN/D-053578/07</i>	házi pulyka	USA	GQ353320 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
TK/MN/D-055431/08	házi pulyka	USA	GQ353330 – S4
TK/MN/D-056826/07	házi pulyka	USA	GQ353321 – S4
TK/MN/D-058212/07	házi pulyka	USA	GQ353322 – S4
TK/MN/D-058648/07	házi pulyka	USA	GQ353323 – S4
tu/CA/SEP-N605/08	házi pulyka	USA	FJ969425 – S4
tu/MO/SEP-816/05	házi pulyka	USA	EU400279 – S4
tu/MO/SEP-819/05	házi pulyka	USA	EU400280 – S4
tu/MO/SEP-827/05	házi pulyka	USA	EU400281 – S4
tu/MO/SEP-828/05	házi pulyka	USA	EU400282 – S4
tu/NC/SEP-832/05	házi pulyka	USA	EU400283 – S4
tu/NC/SEP-833/05	házi pulyka	USA	EU400284 – S4
tu/NC/Sep-835/05	házi pulyka	USA	EU400285 – S4
tu/WI/SEP-847/05	házi pulyka	USA	EU400293 – S4
TX98	házi pulyka	USA	AY444911 – S1
TX99	házi pulyka	USA	AY444910 – S1
VR-818	házi pulyka	USA	AY444912 – S3
18769	fácán	-	-
D1009	fogoly	-	KR476798 – L1 KR476799 – L2 KR476800 – L3 KR476801 – M1 KR476802 – M2 KR476803 – M3 KR476804 – S1 KR476805 – S2 KR476806 – S3 KR476807 – S4
03G	Házi lúd	Kína	JX415328 – L1 JX415329 – L2 JX415330 – L3 JX415331 – M1 JX415332 – M2 JX415333 – M3 JX415334 – S1 JX415335 – S2 JX415336 – S3 JX145337 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
D14/99	Házi lúd	Magyarország	AJ717735 – S1
D15/99	Házi lúd	Magyarország	AY114138 – S3
D20/99	házi lúd	Magyarország	KF809662 – L1 KF809663 – L2 KF809664 – L3 KF809665 – M1 KF809666 – M2 KF809667 – M3 KF809668 – S1 KF809669 – S2 KF809670 – S3 KF809671 – S4
D34/99	Házi lúd	Magyarország	AJ717738 – S1
091	Pekingi kacsa	Kína	JX478250 – L1 JX478251 – L2 JX478252 – L3 JX478253 – M1 JX478254 – M2 JX478255 – M3 JX478256 – S1 JX478257 – S2 JX478258 – S3 JX478259 – S4
815-12	Pézsmaréce	Kína	KC508647 – L1 KC508648 – L2 KC508649 – L3 KC508650 – M1 KC508651 – M2 KC508652 – M3 KC508653 – S1 KC508654 – S2 KC508655 – S3 KC508656 – S4
89026	Pézsmaréce	Franciaország	AJ310525 – S1 AJ278102 – S2 AJ006476 – S3 AJ133122 – S4
89330	Pézsmaréce	Franciaország	AJ293969 – M3 AJ251834 – S1 AJ243881 – S3

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
D1546	Pézsmaréce	Franciaország	KJ871017 – L1 KJ871018 – L2 KJ871019 – L3 KJ871020 – M1 KJ871021 – M2 KJ871022 – M3 KJ871023 – S1 KJ871024 – S2 KJ871025 – S3 KJ871026 – S4
D2044	Pézsmaréce	Franciaország	KJ871007 – L1 KJ871008 – L2 KJ871009 – L3 KJ871010 – M1 KJ871011 – M2 KJ871012 – M3 KJ871013 – S1 KJ871014 – S2 KJ871015 – S3 KJ871016 – S4
J18	Pézsmaréce	Kína	JX478260 – L1 JX478261 – L2 JX478262 – L3 JX478263 – M1 JX478264 – M2 JX478265 – M3 JX478266 – S1 JX478267 – S2 JX478268 – S3 JX478269 – S4
MW9710	Pézsmaréce	Kína	GU480805 – M1 KC756359 – M2 AY580159 – S1 AY219225 – S2 GU369968 – S3 EF581012 – S4
NP03/CHN/ 2009	Pézsmaréce	Kína	KC312700 – L1 KC312701 – L2 KC312702 – L3 JF320800 – M1 JF320801 – M2 JF320802 – M3 KC312699 – S1 GQ888710 – S3 GU338025 – S4

Törzs	Gazdafaj	Ország	NCBI azonosító
S12	Pézsmaréce	Kína	DQ643970 – S1 EF076764 – S2 DQ643971 – S3 DQ325536 – S4
S14	Pézsmaréce	Kína	DQ989558 – M1 DQ989559 – M3 DQ066925 – S1 AY962259 – S2 EF100416 – S3 DQ066923 – S4
YH	Pézsmaréce	Kína	DQ198854 – S3
YJL	pézsmaréce	Kína	DQ191363 – S1 DQ198857 – S2 DQ198855 – S3 DQ198858 – S4
ZJ00M	Pézsmaréce	Kína	KF154110 – L1 KF154111 – L2 KF154112 – L3 KF154113 – M1 KF154114 – M2 KF154115 – M3 KF154117 – S2 KF154118 – S3 KF154119 – S4
ZJ2000M	Pézsmaréce	Kína	KF306082 – L1 KF306083 – L2 KF306084 – L3 KF306085 – M1 KF306086 – M2 KF306087 – M3 KF306088 – S1 KF306089 – S2 KF306090 – S3 KF306091 – S4
TH11	Tökésréce	Kína	KC493572 – L1 KC493573 – L2 KC493574 – L3 JX440512 – M1 JX440513 – M2 JX440514 – M3 KC493571 – S1 JQ664689 – S2 JX826588 – S3 JX826587 – S4