

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

Új vírusok magyarországi kutyák enterális fertőzéseiben

PhD értekezés

dr. Mihalov-Kovács Eszter

2019

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....

Dr. Bányai Krisztián, PhD

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,

Állatorvos-tudományi Intézet

témavezető

Készült 8 példányban, ez a (az)sz. példány

.....

dr. Mihalov-Kovács Eszter

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	6
2. Összefoglalás.....	8
2.1. Summary.....	9
3. Bevezetés	10
3.1. Célkitűzéseink	11
4. Irodalmi áttekintés	12
4.1. A patogének virulenciáját, felbukkanását és a gazdák fogékonyságát befolyásoló tényezők a menhelyi környezetben	12
4.1.1. Túlzsúfolt környezet	12
4.1.2. Stressz.....	12
4.1.3. Vakcinázás.....	13
4.2. Az új generációs szekvenálás alkalmazási lehetőségei az állatorvosi virológiában	13
4.3. Metagenomika használata a menhelyi környezetben terjedő kórokozók vizsgálatában.....	15
4.4. Az új generációs szekvenálás technológiai háttere; Ion Torrent Personal Genome Machine	15
4.5. Kutya enterális vírusai	16
4.5.1. Kutya astrovírus (Canine astrovirus, CAstV)	17
4.5.2. Kutya calicivírus (Canine calicivirus, CaCV).....	18
4.5.3. Kutya kobuvírus (Canine kobuvirus, CaKoV).....	20
4.5.4. Kutya rotavírus (Canine rotavirus, CRV).....	21
4.5.5. Parvovírusok	23
5. Anyagok és módszerek	24
5.1. Mintagyűjtés, a menhely jellemzése	24
5.2. Minták feldolgozása, hígítás, tárolás	26
5.3. Minták előkészítése új generációs szekvenálásra	26
5.3.1. Nukleinsav kivonás	26
5.3.2. Reverz transzkripció, polimeráz láncreakció (RT, PCR)	26
5.3.3. PCR termékek ellenőrzése és tisztítása	27
5.4. Új generációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS); könyvtárkészítés, szekvenálás.....	27
5.5. Hagyományos PCR szűrővizsgálatok a vírusok detektálására	28
5.5.1. Mintaelőkészítés	28
5.5.2. Hagyományos PCR, RT-PCR szűrővizsgálatok a vírusok detektálására	28
5.5.3. PCR és RT-PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel, tisztítása gélből .	31
5.5.4. Sanger-féle DNS szekvenálás.....	31
5.6. Buvavírus real-time (valós idejű) PCR.....	31

5.7.	5' és 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends, cDNS végek gyors amplifikálása)	32
5.8.	RNS ligálás, dupla szálú RNS genomok szegmensvégeinek meghatározása	33
5.9.	Új generációs szekvenálás és hagyományos Sanger-féle DNS szekvenálás során nyert szekvencia adatok elemzése	34
6.	Eredmények	36
6.1.	Kutya eredetű bélsárminták virom vizsgálata	36
6.2.	Kutya astrovírus	37
6.2.1.	A kutya astrovírus genomok általános jellemzői	38
6.2.2.	Az ORF1a elemzése	41
6.2.3.	Az ORF1b elemzése	41
6.2.4.	Az ORF2 elemzése	42
6.2.5.	A kutya astrovírusok filogenetikai jellemzése	42
6.3.	Kutya calicivírus	47
6.3.1.	A minták calicivírus RT-PCR szűrése	47
6.3.2.	A HUN/2012/528 vesivírus törzs elemzése	47
6.3.3.	Az HUN/2012/528 vesivírus törzs filogenetikai elemzése	48
6.4.	Kutya kobuvírus	51
6.4.1.	A CaKoV pozitív minták általános tulajdonságai	51
6.4.2.	Metagenomikai módszerekkel kimutattott CaKoV törzs jellemzése	51
6.5.	Kutya rotavírus C	53
6.6.	Kutya rotavírus I	56
6.7.	Kutya bufavírus, CBuV	60
6.7.1.	CBuV pozitív minták	60
6.7.2.	Bufavírusok keresése real-time PCR módszerrel	61
6.7.3.	Kutya bufavírus metagenomikai eredmények	61
7.	Megbeszélés	65
7.1.	Magyarországon kutyában először identifikált vírusok enterális kórképben	65
7.1.1.	Kutya astrovírus	65
7.1.2.	Kutya calicivírus	66
7.1.3.	Kutya kobuvírus	67
7.1.4.	Rotavírus C	67
7.2.	Újonnan felfedezett vírusok a kutya fekális viromjában	68
7.2.1.	Rotavírus I	68
7.2.2.	Kutya bufavírus	69
8.	Új tudományos eredmények	70
9.	Irodalomjegyzék	71
10.	A doktori kutatás eredményeiből született közlemények	88

10.1.	Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények.....	88
10.2.	Könyvek, könyvfejezetek	89
10.3.	Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt	89
10.4.	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	89
11.	Köszönetnyilvánítás	91
12.	Függelék.....	92

1. Rövidítések jegyzéke

AMV	Avian Myeloblastosis Virus	madár-mieloblasztózis vírus
A, T, G, C	adenine, thymine, guanine, cytosine	adenin, timin, guanin, citozin
as	amino acid	aminosav
AstV	astrovirus	astrovírus
AvAstV	Avastrovirus genus	madár astrovírus nemzetség
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag
CAdV-1	canine adenovirus 1	kutya adenovírus 1
CaKoV	canine kobuvirus	kutya kobuvírus
CAstV	canine astrovirus	kutya astrovírus
CaCV	canine calicivirus	kutya calicvírus
CDV	canine distemper virus	kutya szopornyica vírus
CHO	Chinese hamster ovary cell line	kínai hörcsög petefészek sejtvonala
CnMV/CPV-1	canine minute virus	kutya minute vírus
CCoV	canine coronavirus	kutya coronavírus
CPV-2	canine parvovirus 2	kutyaparvovírus 2
CRV	canine rotavirus	kutya rotavírus
DNA, DNS	deoxyribonucleic acid	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxynucleoside triphosphate	dezinukleozid trifoszfát
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
FCV	feline calicivirus	macska calicvírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság
IRES	internal ribosomal entry site	belső riboszóma-kötőhely
kb	kilobase	kilobázis
MAstV	Mamastrovirus genus	emlős astrovírus nemzetség
M.Á.S.A.	Miskolc Animal Shelter	Miskolci Állatsegítő Alapítvány
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ
NGS	next generation sequencing	új generációs szekvenálás
nm	nanometer	nanométer
NoV	norovirus	norovírus
NS, NSP	non-structural protein	nem-szerkezeti/struktúrális fehérje
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	open reading frame	nyílt leolvasási keret

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	phosphate buffered saline	foszfátpufferes sóoldat
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PV	picornavirus	picornavírus
poly(A)	poly-adenine tail	poli-adenin farok
RACE	rapid amplification of cDNA ends	cDNS végek gyors amplifikálása
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNS-függő RNS polimeráz
RNS, RNA	ribonucleic acid	ribonukleinsav
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
RV	rotavirus	rotavírus
sgRNS	subgenomial RNA	szubgenomiális RNS
TBE	tris base-boric acid-EDTA	trisz-bórsav-EDTA
UTR	untranslated region	nem-kódoló régió
VESV	vesicular exanthema of swine virus	sertés hólyagos kiütésének vírusa
VPg	genome-linked viral protein	genomhoz kötött virális fehérje
VP	viral structural protein	vírus szerkezeti fehérje

2. Összefoglalás

Napjainkban a legnépszerűbb kedvtelésből tartott állat a kutya, ezzel párhuzamosan azonban rengeteg a gazdátlan, kóbor eb, melyeket állategészségügyi telepek, menhelyek fogadnak be. Ezeknek a kutyatartó telepeknek sajátos mikrokörnyezete kedvez a kórokozók, köztük a vírusok terjedésének. Érdeklődésünk középpontjában az ismeretlen eredetű hasmenéses betegségek álltak, így munkánk során menhelyi és magán állattartónál élő hasmenéses és tünetmentes ebektől gyűjtöttünk bélsármintákat. Ezeket a mintákat metagenomikai eszközökkel valamint különféle PCR-tesztekkel vizsgáltuk. A vizsgálat során újszerű vírusokat, valamint minor patogéneket kerestünk, melyek nem elsődleges kórokozóként merülnek fel a fertőző eredetű hasmenéses betegségek diagnosztikájában.

Magyarországon elsőként mutattunk ki kutya astrovírust. Sikerült meghatározni négy teljes genomot, és két részleges genomot. A meghatározott törzsek genomjai az astrovírusokéra jellemző szerkezetet mutatták és egy törzs kivételével a klasszikus kutya astrovírusok közé sorolódtak. A HUN/8/2012 törzs leginkább nyérc astrovírusokra hasonlított, a kutya astrovírustól nagymértékben eltért. Szintén elsőként írtunk le metagenomikai módszerrel kutya vesivírust és kutya kobuvírust magyarországi kutyák bélsármintáiból, mindkét vírus esetében majdnem a teljes genomot sikerült meghatározni. A világon először mi írtuk le a kutya rotavírus C genomját. Filogenetikai elemzéssel igazoltuk, hogy a kutyában azonosított törzs jól elkülönül a humán rotavírus C törzsektől, valamint a szarvasmarha és a sertés fajokban leírt rotavírus C törzsektől.

A metagenomikai adathalmazban ígéretes, újszerű vírusokra utaló szekvencia részleteket is találtunk, és kettő, eddig le nem írt vírust sikerült kimutatni. Egy új rotavírus fajt, a rotavírus I-t azonosítottunk, mely szekvencia analízise jelentős különbséget mutatott rotavírus A-H fajoktól. Filogenetikai elemzések az általunk rotavírus I-ként azonosított törzsek jól elkülönülő közös ágon helyezkedtek el, mégpedig a rotavírus B-vel, G-vel, és H-vel azonos kládban. Az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) a rotavírus I-t új fajként elfogadta. Azonosítottunk továbbá egy újszerű protoparvovírust is a gyűjtött bélsármintákban. A kérdéses vírust kutya bufavírusnak neveztük el a főemlősökben leírt bufavírusokkal mutatott genetikai rokonság okán, mely egyben távoli rokonsági fokon áll az ebek jól ismert saját protoparvovírusával (kutyaparvovírus 2).

2.1. Summary

The most popular companion animal of our days is the dog. However there is an increasing number of stray dogs, living in shelter homes and dog ponds. The microenvironment of these animal shelters favours the rapid spread of various pathogens, including viruses. Our focus of interest was diarrhoeal diseases of unknown etiology. We collected fecal specimens from dogs with or without diarrhoea. These specimens were examined by a metagenomic approach and by virus-specific RT-PCR screening. Our objective was to identify novel viruses and minor pathogens, which are typically not in first line of the diagnostic process of a diarrhoeal disease.

We detected canine astrovirus for the first time in Hungary. We determined four complete genomes, and two partial genome of canine astrovirus. The strains shared a common genomic structure that is typical for astroviruses, and all but one were classified as canine astrovirus. The strain HUN/8/2012 resembled mink astroviruses and was highly different from canine astroviruses. We described canine vesivirus and canine kobuvirus from fecal specimens first time in Hungary and almost the full genome was obtained for both viruses. We described the genome of canine *Rotavirus C* for the first time and this strain was clearly distinguishable from human, bovine and porcine *Rotavirus C* strains.

We found promising novel virus-like sequences in our metagenomic data set, and we characterized two undescribed novel viruses. A novel rotavirus species, *Rotavirus I* was described and its sequence analysis showed marked genotype diversity when compared with *Rotavirus A-H* species. Phylogenetic analysis showed, that our *Rotavirus I* strains clustered on a well-defined branch, in the same clade as *Rotavirus B*, *G* and *H*. The ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) accepted *Rotavirus I* as a new rotavirus species. We also found a novel protoparvovirus that we named canine bufavirus. The closest relatives of this canine bufavirus were primate bufaviruses, and it was genetically diverse from the canine parvovirus type 2.

3. Bevezetés

Az egész világon, beleértve hazánkat is, a kutya a legnépszerűbb kedvtelésből tartott állat. A kutyatartási kultúra fejlődésével a tulajdonosok egyre nagyobb gondot fordítanak kedvenceik egészségvédelmére, a higiénikus tartási viszonyokra, valamint a fertőző betegségek megelőzésére. Azonban ezzel párhuzamosan még mindig rengeteg gazdátlan, kóbor ebet fogadnak be állatmenhelyek vagy állategészségügyi telepek.

Ezekben a létesítményekben a tartási viszonyok számos tényezője (zsúfoltság, stressz, vakcinázási program) elősegíti a vírusok terjedését, újszerű vírusok megjelenését.

A régóta ismert kutya enterális kórokozókkal (úm. CPV-2, CAdV-1, szopornyicavírus) szemben vakcinával biztosíthatunk védelmet. Azonban a vakcinás védelem ellenére a hasmenéses betegségek időnkénti felbukkanása elkerülhetetlen. Ezen esetek hátterében gyakran a vakcinavírustól jelentősen különböző kórokozó vagy újszerű vírus áll. Így nagyobb figyelmet kell fordítanunk az ismeretlen eredetű hasmenések vizsgálatára, az újszerű kórokozók detektálására.

Egyes vírusok esetében, mint például kutya rotavírus (canine rotavirus–CRV, *Reoviridae* család), kutya astrovírus (canine astrovirus – CAstV, *Astroviridae* család) vagy a kutya calicivírusok (canine calicivirus – CaCV, *Caliciviridae* család), már régóta tudni lehet jelenlétükről, és feltételezik kórokozó szerepüket is. Ugyanakkor ezen vírusok magyarországi előfordulását kutyáknál eddig még nem sikerült bizonyítani.

Az utóbbi időben a különféle vírusok genomjának konzervatív szakaszaira illeszkedő, általános primerekkel működő polimeráz-láncreakciók (PCR), illetve a random DNS-amplifikációt követő mélyszekvenálás használatának térhódítása robbanásszerűen bővítette ismereteinket a kutyák enterális vírusainak sokféleségéről. Munkánk során az új generációs szekvenálásban rejlő lehetőségek közül alapvetően arra fókuszáltunk, hogy kiaknázzuk az abban rejlő diagnosztikai lehetőségeket és feltérképezzük egy menhelyi állományban keringő vírusok sokféleségét, beleértve az egyes egyedekben egyidejűleg megtalálható vírusok populációinak összetételét. Ilyen módszerekkel azonosítottak kutyákból többek között a *Picornaviridae* családba tartozó kobuvírust, valamint a *Caliciviridae* családba tartozó vesivírust is.

3.1. Célkitűzéseink

Munkánk során egy észak-magyarországi menhelyen kutya bélsármintákat gyűjtöttünk majd PCR rendszerek és mélyszekvenciális módszerek kombinálásával mutattunk ki vírusokat.

Munkánk során célunk volt kutyákból eddig még le nem írt enterális kórokozók kimutatása PCR technika segítségével, valamint új generációs szekvenálás felhasználásával.

Célunk volt a hasmenést okozó vírusok diverzitásának jobb megismerése és egyben a kutyák fekális viromjának feltérképezése, amelyhez ideális alapot nyújtott a menhelyen fellelhető sajátos mikrokörnyezet.

Célul tűztük ki kutyák bélsarából kimutatott vírusok elemzését, filogenetikai kapcsolatainak feltérképezését.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. A patogének virulenciáját, felbukkanását és a gazdák fogékonyságát befolyásoló tényezők a menhelyi környezetben

4.1.1. Túlzsúfolt környezet

A menhelyi körülmények egyik legáltalánosabb tényezője a túlzsúfoltság. Szinte az összes menhely, állategészségügyi telep küzd azzal, hogy a tervezettnél több állatot kell befogadniuk. A kennelek túlzsúfoltak, az újonnan érkező állatok elkülönítése gyakran megoldatlan vagy az elkülönítés feltételei nem megfelelőek. Ilyen helyzetben a kórokozók direkt és indirekt (szennyezett felület, ragályfogó tárgyak) közvetítésének gyakorisága is megnő (Monteiro et al., 2016; Turner et al., 2012). A képet árnyalja, hogy egy-egy ilyen túlzsúfolt periódus előre nem kiszámíthatóan jelentkezik és a bekerülő állatok által közvetített kórokozók azonosítására nem kerül sor.

Ugyanakkor a már régóta menhelyen élő állatok szintén veszélyt jelentenek az újonnan érkező egyedekre, hiszen az általuk hordozott patogének a bekerülő állatokat fertőzhetik. Gyakori, hogy a bekerülő állatok fiatalok, legyengültek, nagy valószínűséggel nem oltottak, így rendkívül fogékonyak.

4.1.2. Stressz

A stressz olyan tényező, amellyel mindig számolnunk kell egy menhelyen. Több kutya van összezárva egy kennelben, és az esetleges túlzsúfoltság még ronthat ezen a helyzeten. Az ebek a kennelben nem mindig tudják kiélni a normál viselkedési formákat, nem tudnak elbújni, elmenekülni, mozgásuk kis területre korlátozott, amelyet más egyedekkel is meg kell osztani (Stephen és Ledger, 2005). A kennelen belüli hierarchia is változhat, ha új kutyát helyeznek el. A nagy zajhatás, a nem kiegyensúlyozott etetés és a szállítások szintén stresszt okoznak (Hiby et al., 2006; Rooney et al., 2007).

A stressz tanulmányozható a viselkedésbeli változásokon, valamint egyes élettani paraméterek mérésén keresztül is. Ilyen mérésre alkalmas élettani érték lehet a katekolamin szint, a pulzus, a vizelet kortizol/kreatinin aránya, a bélsárban lévő kortikoid metabolitok mennyisége, valamint limfociták proliferációja (Beerda et al., 1996, 1999; Hiby et al., 2006; Rooney et al., 2007; Vincent és Leahy, 1997).

Számos tanulmány taglalja, hogy a stressz olyan élettani változásokat indít be, melyek immundeficienciához vezetnek, ezáltal a szervezet betegségekkel szembeni ellenálló képessége csökken. A krónikus stressz mind a sejt közvetítette, mind pedig a humorális immunitást károsítja (Griffin, 1989).

4.1.3. Vakcinázás

A vakcinázásnak fontos szerepe van a menhelyen felbukkanó fertőző betegségek, járványok kezelésében. A legtöbb menhely rendelkezik valamilyen vakcinázási programmal, a vakcinázások több előnnyel, mint hátránnyal járnak. Általában a kutyákat rövid idővel menhelyre kerülésük után már oltják, ezzel előzve meg a fertőző betegségek megjelenését. Azonban a vakcinázásoknak általában rövidtávú negatív hatásai is lehetnek. A polivalens vakcinák használata után az ebek vérében szignifikánsan csökken az abszolút limfocita szám, valamint lassabb a mitogén stimulált limfocita válasz (Phillips et al., 1989).

A módosított élő, attenuált kórokozót tartalmazó vakcinák enyhe fertőzést okozva alakítanak ki védettséget az állatokban, azonban ha egy gyenge, immunszuppresszált, esetleg konkurens szubklinikai fertőzésekkel küzdő egyed vakcináznak, ezek az oltóanyagok akár klinikai megbetegedést is előidézhetnek (Foley et al., 1999).

A teljes populációt érintő vakcinázási programok jelentősen hozzájárulhatnak az egyes kórokozók evolúciójához, mivel a vakcinázás a klinikai tünetekkel járó betegséget előzi meg, nem pedig a tünetmentes vírusürítést (Siedek et al., 2011).

4.2. Az új generációs szekvenálás alkalmazási lehetőségei az állatorvosi virológiában

Míg a humán genom projekthez 13 év és 3 milliárd US dollár kellett, amelyet több tucat kapilláris szekvenáló berendezésen sok száz technikus és kutató részvételével sikerült megvalósítani, addig ma egyetlen humán genom megszekvenálásához kevesebb, mint három nap is elegendő, egyetlen, nagy kapacitású NGS berendezés és egyetlen technikus bevonásával (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Nem meglepő tehát, hogy az NGS és a kapcsolódó informatikai módszerek a genomika és a vele rokon tudományterületek fejlődésének legfontosabb laboratóriumi eszközeivé váltak (Hood et al., 2013). Ugyanakkor az NGS állatorvosi felhasználása még ma is gyermekcipőben jár, annak ellenére is, hogy a jelentősebb háziállatok (pl. szarvasmarha, sertés, házi tyúk stb.) genomját már meghatározták és egyes háziállataink genetikai sokféleségét is elkezdtek feltérképezni (www.animalgenome.org). E genetikai sokféleség megismerésének hátterében a jobb termékhozamok elérése (hús, tej, gyapjú stb.) illetve egyes (fertőző) betegségek iránti fogékonyság megértése állnak.

Háziállatok kórokozóinak, köztük a vírusok genomjának megismerése kulcsfontosságú. Nem csupán azon aspektusok miatt, hogy ezek a vizsgálatok betekintést adnak például a vírusok evolúciójába (Marton et al., 2015b), hanem amiatt is, hogy hathatósan segítik a vakcinák és az antivirális hatóanyagok fejlesztését egyaránt (Kutscher

et al., 2012; Quiñones-Mateu et al., 2014; Stonik, 2009). A vírusgenomika területén természetesen át kell gondolni, hogy a genom megszekvenálása mely módszerrel a legjobb (és legköltséghatékonyabb), hiszen egy kettő kilobázisnyi sertés circovírus genomja és egy 360 kilobázisnyi kanáripoxvírus genomja egyaránt meghatározható hagyományos Sanger szekvenálással és NGS-sel is, de a befektetett munka és a költség szempontjából nem mindegy, melyik módszerhez nyúl a kutató.

Az NGS fontos felhasználási területe a viszonylag újnak számító tudományterület, a metagenomika. A mikroorganizmusok metagenomikai vizsgálata kezdetben Sanger szekvenálással folyt oly módon, hogy az amplifikált régiót (16S RNS) klónozás után egyedi reakciókban szekvenálták. A vírusoknál a mintaelőkészítés a közös célgén híján random PCR-rel történt, majd a véletlenszerűen amplifikált genomi régiókat klónozták és a klónokat szekvenálták. Az NGS e területen is áttörést hozott, hiszen a klónozás költséges és időigényes lépése kihagyhatóvá vált. A virom elnevezés viszonylag új keletű, és egy adott biológiai mintában (föld, víz, szennyvíz, bélsár, szérum stb) megtalálható vírusok összességét foglalja magában (Blinkova et al., 2009; Ng et al., 2014; Smits et al., 2013). Vírusmetagenomikával nyert adatokat különösen jól aknázza ki az állatorvosi járványtan, hiszen egy új, fenyegető fertőző betegség háttérében álló kórokozó felismerése, karakterizálása nélkülözhetetlen a járványok kontrolljához, diagnosztikai eszközök kifejlesztéséhez és a védekezési stratégia kialakításához.

Mára már klasszikussá vált példa erre a Schmallenberg vírus megjelenése, és azonosítása. A vírust 2011-ben azonosították először Németországban, ahol szarvasmarha állományokban okozott jelentős károkat; a tünetek között szerepelt a láz, a tejtermelés visszaesése és a hasmenés is. A mintákban a hasonló tüneteket okozó ismert vírusokat nem tudták azonosítani. Így azokat metagenomikai analízisnek vetették alá, amellyel sikerült egy újszerű orthobunyavírust azonosítani (Hoffmann et al., 2012). Később a vírust a világ több pontján is kimutatták (Barrett et al., 2015; Blomström et al., 2014; Elbers et al., 2012).

Az új vírusok felfedezésének üteme az említett módszertannal egyre nő és nagyon valószínű, hogy a Föld bioszférájának >99,9%-a még felfedezésre vár. Ezt a felfedező munkát segítik az olyan projektek, mint a Global Virome Project, mely elsősorban a vadállatokban előforduló, emberre veszélyes vírusok sokféleségének feltérképezését tűzte ki célul (www.globalviromeproject.org).

4.3. Metagenomika használata a menhelyi környezetben terjedő kórokozók vizsgálatában

A 4.1.1-4.1.3. bekezdésekben tárgyalt tényezőket figyelembe véve beláthatjuk, hogy menhelyeken élő állatok ideális alanyok régi és új vírusok detektálására; az elmúlt évtizedben robbanásszerűen fejlődő nukleinsav amplifikáción alapuló technikák drámaian kitágították a patogének felfedezésének határait.

A metagenomikai módszerek előnye az egyéb molekuláris technikákkal szemben, hogy nem szükséges a kórokozó előzetes ismerete, mivel elméletileg a biológiai mintában megtalálható összes nukleinsavat detektálni lehet (Delwart, 2007). Természetesen ilyenkor a mintát az amplifikáció előtt tisztítják, hogy a vizsgáló számára érdektelen információ hányada minél kisebbre csökkenjen. A laboratóriumi technikák alkalmazását a kinyert szekvenciaadatok bioinformatikai feldolgozása követi, ahol egy adatbázis (pl. GenBank) segítségével azonosítják a mintában lévő szekvenciákat.

Fontos, hogy a felfedezett vírus kóroktani felelősségét, szerepét tisztázzák az egyed tüneteinek kialakításában, ezért szükséges számos kiegészítő vizsgálat (populáció vizsgálatok, eset-kontroll tanulmányok, in situ hibridizációs módszerek, állat fertőzéses kísérletek stb.).

Az állatorvoslásban jelenleg leginkább a kórokozók felfedezésében játszik jelentős szerepet a mélyszekvenálás, azonban a módszer a jövőben egyes klinikai minták laboratóriumi diagnosztikájában is szerepet kaphat (Delwart, 2012).

4.4. Az új generációs szekvenálás technológiai háttere; Ion Torrent Personal Genome Machine

Immár 20 éves a metagenom kifejezés, melyet először a talaj mikroflóráját alkotó baktériumok genomjainak összességére alkalmazták (Handelsman et al., 1998). Az első vírus metagenomikai felmérést 2002-ben publikálták, melyben tengeri vírus közösségeket vizsgáltak (Breitbart et al., 2002). Becslések szerint a vírusok a leggyakoribb, legnagyobb számban előforduló entitások a világon (Paez-Espino et al., 2016). Töredékekről rendelkezünk információval, kis részük tenyészthető laboratóriumi körülmények között. Mindezek a tulajdonságok együttesen vezettek a különféle környezeti és biológiai minták metagenomikai módszerekkel való feltérképezéséhez.

Az Ion Torrent PGM által használt technológiát a DNA Electronics Ltd. birtokolta, és az Ion Torrent Inc. fejlesztette ki. Ezt az új generációs szekvenáló berendezést 2010 februárjában mutatták be. A mélyszekvenálót gyors, kompakt és gazdaságos eszközként írják le. Az Ion Torrent PGM a DNS templát alapján a komplement szál szintézise során szekvenál (sequencing by synthesis), a detektáláshoz pedig nincsen szükség bonyolult

optikai detektálásra (mint például a piroszekvenálásnál), valamint módosított dNTP-kre. A szekvenálás során a dNTP-k beépülése során egy pirofoszfát csoport és egy H⁺-ion szabadul fel. Ez utóbbi felszabadulása pH változást okoz, amely jól detektálható a reakcióban (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/ion-torrent.html>).

A szekvenálás chipen folyik, amelynek felszínén mikromélyedések vannak. Ezekben a mélyedésekben helyezkedik el gömb alakú részecskéhez kötötten a templát DNS. A szekvenáló egyszerre egyféle dNTP-vel árasztja el a templátokat; ha a dNTP komplementer a templát nukleotidjával, akkor beépül és H⁺-ion szabadul fel. A felszabaduló H⁺-ion pH változást okoz, amelyet a mélyedés alatt található ISFET (ion sensitive field effect transistor) ion szenzor érzékel, és elektromos jelet továbbít. Ha homopoliméria miatt egymás után több azonos dNTP épül be, több H⁺-ion szabadul fel, amely arányosan nagyobb elektromos jelet továbbít (Rothberg et al., 2011).

Az Ion Torrent PGM előnyei között szerepel kedvező ára, a futtatások gyorsasága, valamint az, hogy nem szükséges módosított dNTP-t és módosított enzimeket használni, amelyek szintén bonyolítanák a futtatásokat. Használata és fenntartása egyszerű. Hátránya, hogy homopoliméria esetén 7-8 homológ dNTP beépülése után nem képes az ion detektor szignifikáns különbséget tenni a pH változásában; így nehéz pontosan megmondani mennyi homológ dNTP épült be. Azt a korábbi hátrányt, hogy a rendszer rövid szekvenciákat tud generálni (100-200 bp), az újabb fejlesztések részben ledolgozták (~500 bp leolvasás hosszal), ugyanakkor a komplex genomok de novo összeállítása még ma is nehézkes. A platform főként kisebb genomok (bakteriális, virális genomok), metagenomok, mikrobiális transzkriptómák, amplikonok szekvenálására használható.

4.5. Kutyák enterális vírusai

A kutyákat érintő vírusos eredetű enterális fertőzések vezető tünetei a láz, hasi fájdalom, hasmenés és hányás, mely utóbbiak elősegítik a vírusok terjedését a fekális-orális fertőzési módon. Számos vírus kóroki szerepe tisztázódott már az ebek gyomor-bélrendszeri megbetegedéseiben, míg mások csak újabban kerültek a figyelem középpontjába.

A szopornyica vírus (canine distemper virus – CDV; *Paramyxoviridae* család) és a kutyaparvovírus 2 (canine parvovirus 2 – CPV-2; *Parvoviridae* család) súlyos, lázzal, hasmenéssel, hányással, illetve CDV esetében idegrendszeri és légúti tünetekkel járó betegséget okoz (Decaro és Buonavoglia, 2012; Martella et al., 2008a). Mindkét vírus jelenléte régóta ismert hazánkban, ellenük rutinszerűen alkalmaznak védőoltást. Széles körben elterjedt parvovírus a bocavírusok közé sorolt kutya minute vírus (CnMV, canine minute virus, *Parvoviridae* család). Ez a vírus vemhes állatokban az embrió elhalását, halvaszülést, fejlődési rendellenességeket és gyenge kölykök születését okozhatja, míg fiatal állatoknál idegrendszeri, légúti és bélrendszeri tüneteket idézhet elő (Manteufel és Truyen,

2008). Az kutya coronavirus (CCoV; *Coronaviridae* család) fertőzés általában enyhe gasztrointesztinális tünetekkel jár, súlyosabb lefolyású betegséget főleg fiatal állatokban és/vagy egyéb vírusokkal való társfertőzéses esetekben (CPV-2, CDV, kutya-adenovírus 1) tapasztalhatunk (Buonavoglia et al., 2006). A kutyák fertőző májgyulladását okozó kutya-adenovírus 1 (Canine adenovirus 1–CAAdV-1, *Adenoviridae* család) szintén okozhat gyomor-bélrendszeri tüneteket (MacLachlan és Dubovi, 2011a).

Kutyák bélsarából a molekuláris biológiai módszerek fejlődésével párhuzamosan az előbb említetteken kívül még számos, különböző családba tartozó vírust mutattak ki az elmúlt évtizedekben. Ezek többségének oktani szerepe még nem tisztázott, előfordulásukról gyakran valamelyik ismert kórokozó mellett társfertőzőként számolnak be.

4.5.1. Kutya astrovírus (Canine astrovirus, CAstV)

Az *Astroviridae* családba tartozó astrovírusok burok nélküli, kisméretű (28-30 nm átmérőjű) vírusok, alakjuk csillagra emlékeztet (astron= csillag, görög er.). Genomjuk pozitív, szimpla szálú RNS-ből áll, a genom mérete 6,4-7,3 kb közötti. A genomban három, egymással átfedő nyílt leolvasási keret (ORF) határozható meg. Az 5' és a 3' véget nem kódoló régió (untranslated region, UTR) zárja le, amelyhez a 3' végnél egy poli-adenin farok (poly(A)) kapcsolódik. Az vírusgenom 5' végén található két nem-szerkezeti fehérjét kódoló gén, az ORF1a és az ORF1b. Az ORF1a szerin 3C-típusú virális proteázt kódol. Az ORF1b egy 7 nukleotidból álló keret-elcsúszást jelölő szignál után (AAAAAAC) indul, és a virális RNS polimerázt kódolja. A vírusgenom 3' végéhez közelebb helyezkedő ORF2 a kapszid prekurzorként funkcionáló fehérjét kódolja (Mendez és Arias, 2007).

Az astrovírust először gyermekek hasmenéses székletéből mutatták ki (Madeley és Cosgrove, 1975a; 1975b). Az astrovírusok jellemzően gasztrointesztinális megbetegedést okoznak a legtöbb állatfajban és emberben is (Giordano et al., 2004; Harbour et al., 1987; Snodgrass et al., 1979). Több extraintesztinális betegség kórokozójaként is astrovírust írtak le; astrovírus okozza a csirke nefritiszt, a kacsza hepatitiszt és a nyérc remegés szindrómát (Blomström et al., 2010; Fu et al., 2009; Imada et al., 2000).

Az astrovírusok evolúciója főként genetikai sodródással, rekombinációval és valószínűleg gazdafaj váltással megy végbe (De Benedictis et al., 2011; Finkbeiner et al., 2008; Martella et al., 2014).

Az astrovírusokat a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) két nemzetségbe sorolja. A *Mamastrovirus* génusz (MAstV), amelyhez 19 MAstV (emlős astrovírus), valamint az *Avastrovirus* nemzetség (AvAstV), amelyhez 3 AvAstV (madár astrovírus) faj tartozik (Bosch et al., 2010). Számos további astrovírust írtak le többek között emberből, denevérből és kutyából, amelyeket molekuláris módszerek segítségével mutattak ki, azonban az ICTV

még nem fogadta el őket fajként (Chu et al., 2008; Finkbeiner et al., 2008; Toffan et al., 2009).

AstV-szerű képleteket kutya bélsarából először elektronmikroszkópos módszerrel mutattak ki, akár egyedüli vírusként, akár kevert fertőzésben, egyéb enterális vírusokkal (Marshall et al., 1984; Toffan et al., 2009; Vieler és Herbst, 1995; Williams, 1980). Toffan és mtsai. (2009) az elektronmikroszkópos vizsgálat mellett molekuláris meghatározást is végeztek, mely kimutatta, hogy a CAstV egy új AstV faj lehet a nemzetségen belül. Martella és mtsai. (2011) egy hasmenéses tüneteket mutató fiatal kutya bélsarából CAstV-t mutattak ki RT-PCR módszer segítségével; egyéb enterális vírust nem detektáltak a mintában. Ezt a CAstV ITA/08/Bari törzset sikerült MDCK sejtekhez (Madin-Darby canine kidney) adaptálni, és szaporítani, valamint konvaleszcens savóból kimutatni specifikus ellenanyagokat. AstV-t sikerült kimutatni enterális tüneteket mutató és tünetmentes kutyákból is, azonban az AstV prevalenciája nagyobb volt a klinikai tünetek mutató egyedekben (Caddy és Goodfellow, 2015; Martella et al., 2011; Takano et al., 2015; Zhu et al., 2011). Martella és mtsai. (2012) kettő, enterális tüneteket mutató eb bélsarából mutattak ki AstV-t molekuláris módszerekkel. Egyéb major patogént nem detektáltak, és a betegség monitorozása során az AstV ürítés csúcsa egybeesett a legsúlyosabb klinikai tünetek jelenlétével.

Jelenleg kevés CAstV törzs szekvenciája áll rendelkezésünkre a GenBankban, ezekből a szekvenciákból viszont arra következtethetünk, hogy a CAstV-ok genetikailag heterogének (Caddy és Goodfellow, 2015; Martella et al., 2011). Ez a heterogenitás, valamint az, hogy a fertőzés nem mindig nyilvánul meg klinikai tünetekben, megnehezíti az astrovírusok detektálását.

4.5.2. Kutya calicivírus (Canine calicivirus, CaCV)

A *Caliciviridae* család öt nemzetségre tagolható: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* és *Nebovirus*. A *Vesivirus* nemzetségbe több fontos állati kórokozó tartozik, mint például a macska calicivírus (feline calicivirus, FCV), sertés hólyagos kiütésének kórokozója (vesicular exanthema of swine, VESV), San Miguel fóka vírus (San Miguel sea lion virus, SMSV) és egyéb vírusok, amelyeket még nem fogadtak el a *Caliciviridae* család tagjaként pl. kutya calicivírus, nyérc calicivírus, 2117 CHO sejtvonal kontamináns calicivírus (CaCV, MCV, 2117) (King et al., 2012).

A calicivírusok burok nélküli, 27-40 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú vírusok. A genomjuk pozitív, szimpla szálú RNS-ből áll, melynek mérete 7,4-8,3 kb között mozog. A genom 5' végéhez egy virális fehérje (VPg, genome-linked viral protein) kapcsolódik, a 3' végen pedig egy poliadenil szál található. A vesivírusok általában jól tenyészthetőek, citopatogén hatásuk könnyen észlelhető (Green, 2007).

A kutya calicivírusok nem tartoznak az elsődleges kórokozók közé a hasmenéses betegségek diagnosztikájában. Kutyaiból calicivírus-szerű részecskéket sikerült kimutatni hasmenésből (Mochizuki et al., 1993; Schaffer et al., 1985), nemi szervek hólyagos elváltozásából (Crandell, 1988) és glosszitiszből (Evermann et al., 1983). A legtöbb esetben macska calicivírus (FCV) állt a tünetek háttérében (Evermann et al., 1985; Gabriel et al., 1996; Martella et al., 2002). Japánban, 1990-ben egy két hónapos kutya vízszerű hasmenéséből calicivírust mutattak ki (Mochizuki et al., 1993). Ez a 48-as törzs genetikailag és antigenitásban is jól elkülönül az FCV törzsektől. A *Vesivirus* génuszba sorolt 48-as törzs a kutya calicivírusok referenciagenomja (Roerink et al., 1999). Szerológiai felmérésekben Japánban a kutyák 57%-a, míg Dél-Koreában az ebek 36,5%-a bizonyult szeropozitívnak a CaCV 48 törzssel szemben (Jang et al., 2003; Mochizuki et al., 2002). Vesivírust sikerült azonosítani egy olaszországi kutya bélsármintában is (Martella et al., 2015). Ez a törzs nagyfokú (89-90%) nt hasonlóságot mutatott CHO sejtvonallal kontamináns vesivírus törzsekkel, míg a CaCV referencia törzssel mindössze 71%-ban volt azonos. Egy egyesült államokbeli tanulmány ezidáig azonosítatlan, archivált vírusizolátumokat vizsgált, a minták katonai munkakutyáktól származtak. Az izolátumokat molekuláris módszerekkel sikerült azonosítani; mind a négy minta vesivírusnak bizonyult. Klasszikus virológiai módszerekkel nem sikerült meghatározniuk e négy izolátumot. Az izolátumokat a vesivírusokon belül két kládra lehet osztani. Az ún. I-es típusba sorolt A128T és L198T izolátumok 87,6-90,7%-os nt hasonlóságot mutattak a 48-as törzssel; míg a II-es típusba sorolt 3-68 és a W191R izolátumok 86,5-89%-os nt hasonlóságot a kontamináns 2117 CHO calicivírus izolátummal. A két típus izolátumai egymással csupán 70,3-72,1% szekvencia azonosságot mutattak (Binn et al., 2018).

Két szeroepidemiológiai felmérés is készült, melyben kutya és nyérc calicivírusokkal rokon CHO sejtvonallal kontamináns calicivírus (2117) elleni ellenanyagokat detektáltak kutyákban és emberekben (Di Martino et al., 2017, 2015). Az USA-ban a 2117 vesivírus törzshöz nagyon hasonló vesivírust azonosítottak súlyos vérzéses gasztroenteritiszben szenvedő kutyákból. Az állatok mind megfelelően vakcinázottak voltak, mindegyik kutya egy kisállat panzióban betegedett meg. Összesen 11 eset volt, ezek közül négy eb a kezelés ellenére elpusztult, vagy elaltatásra került. A vesivírust in-situ hibridizációval és RT-PCR-rel is azonosították, valamint archivált mintákban is kimutatták a kórokozó jelenlétét (Renshaw et al., 2018).

Elsőként 2008-ban, Görögországban írtak le norovírus fertőzést kennelben tartott kutyáknál (Ntafis et al., 2010). A kutyák NoV mellett CCoV-sal is fertőzöttek voltak. Portugáliában egy egyéves tanulmány során szintén kimutattak kutyákból norovírust, a minták változatos tartási körülmények között élő kutyáktól származtak (Mesquita et al., 2010). Ugyanebben az évben egy olaszországi cikkben számoltak be egy esettanulmányról,

melyben egy ebnek kórházi kezelésre volt szüksége súlyos hasmenés és következményes kiszáradás miatt. A kutya bélsarából CPV-2a-t és NoV-t is kimutattak. Az eset érdekessége, hogy a CPV-2a a naponta gyűjtött bélsármintákból tíz napon keresztül volt kimutatható, míg a NoV 22 nappal a kórházba kerülés után is kimutatható volt. Ez az észrevétel alátámasztja, hogy a NoV valószínűleg aktívan szaporodott a kutya bélcsatornájában, nem pedig egyszerű virális passzázsként mutatták ki a kórokozót (Martella et al., 2008b). Mindhárom tanulmányban a gyomor-bélrendszeri tüneteket mutató ebek régóta patogénként ismert vírusokkal is fertőzöttek voltak, így a kérdés, hogy a NoV egyedül képes-e klinikai tünetekben megnyilvánuló megbetegedést okozni még továbbra is megválaszolatlan.

4.5.3. Kutya kobuvírus (Canine kobuvirus, CaKoV)

Az egyre növekvő és változatos genetikájú *Picornaviridae* család jelenleg 35 nemzetségből áll (<http://www.picornaviridae.com/>), és számos elfogadásra váró új nemzetséget, valamint el nem fogadott picornavírust (PV) foglal magába. A *Kobuvirus* nemzetség tagjai hat fajhoz sorolhatóak: Aichivirus A-F, emellett a közelmúltban leírt kecske kobuvírus, patkány kobuvírus és a guanóból kimutatott denevér kobuvírus még elfogadásra vár (Firth et al., 2014; Li et al., 2010; Oem et al., 2014b). Kobuvírus szekvenciákat mutattak még ki kutya, macska, görény, nyúl, európai szalakóta és szennyvíz mintákból is (Chung et al., 2013; Di Martino et al., 2013b; Li et al., 2011a; Pankovics et al., 2016, 2015, Smits et al., 2013; Yamashita et al., 2014).

A PV-k kisméretű (kb. 30 nm átmérőjű), ikozahedrális szimmetriájú burok nélküli vírusok. Pozitív, szimpla szálú RNS genomjuk 8,2-8,4 kb hosszúságú, egyetlen ORF-et tartalmaz, amely egy poliproteint kódol. Ebből a poliproteinből több strukturális és nem-szerkezeti fehérje szabadul fel a vírus replikáció során fehérje hasító mechanizmusok segítségével. A kódoló régiót 5' és 3' irányból is UTR szegélyezi, melyhez 3' irányból egy változó hosszúságú poli(A) farok is csatlakozik (MacLachlan és Dubovi, 2011b). A PV-k genomjuk 5' UTR szakaszában rendelkeznek egy belső riboszóma kötő hellyel (internal ribosomal entry site, IRES), melyet felépítése alapján öt csoportba lehet osztani. A sertés kobuvírus kivételével az összes ismert kobuvírus V. típusú IRES elemmel rendelkezik (Martínez-Salas et al., 2015).

Aichivirus A fajokhoz tartozó vírusokat többek között emberekben, rágcsálókban, vadonélő és házasított húsevőkben (kutyaiban, macskáiban), valamint szennyvíz mintákban is azonosították (Chung et al., 2013; Di Martino et al., 2014; Li et al., 2011a; Ng et al., 2012; Phan et al., 2011; Yamashita et al., 1998). A humán Aichi vírusokat sporadikus gasztroenterális fertőzések okozójaként írták le, a szeroprevalencia azonban általában magas, melyből arra következtethetünk, hogy a fertőzés ritkán nyilvánul meg klinikai tünetekben (Ribes et al., 2010).

A kutya kobuvírusokat (CaKoV) először hasmenéses és egészséges ebekből mutatták ki, 2011-ben, az USA-ban, metagenomikai módszerek segítségével (Kapoor et al., 2011; Li et al., 2011a). A későbbiekben CaKoV-t számos különböző kutyafélében is leírtak (úm. kutya, vörös róka, pöttyös hiéna, aranysakál és sujtásos sakál) Európában, Ázsiában és Afrikában is (Carmona-Vicente et al., 2013; Choi et al., 2014; Di Martino et al., 2013a; Kong et al., 2016; Li et al., 2016; Oem et al., 2014a; Olarte-Castillo et al., 2015; Soma et al., 2016). Ezekben a tanulmányokban a CaKoV prevalenciája tág határok között mozgott (2,34-50,6%), a prevalenciák különbsége a hasmenéses és tünetmentes egyedek között statisztikailag nem volt szignifikáns. Egy brazíliai tanulmányban extraintesztinálisan detektáltak kutya kobuvírust egy 5 hónapos kölyökkutyában, többek között a tüdőben, a tonzillában, a májban és a központi idegrendszerben is. A kutya fertőzött volt CRV, CDV és CAdV-1 vírusokkal is (Ribeiro et al., 2017). A CaKoV kórokozó szerepe még mindig nem tisztázott, feltételezhető, hogy a humán fertőzésekhez hasonlóan csak ritkán okoz gasztroenterális vagy egyéb tüneteket. A kevert fertőzések, ahol a CaKoV egyéb vírusokkal együtt kimutatható (CPV-2, CCoV, bocavirus), szintén általánosnak tekinthetők (Li et al., 2011a; Ribeiro et al., 2017).

4.5.4. Kutya rotavírus (Canine rotavirus, CRV)

A rotavírusokat (*Rotavirus* nemzetség, *Reoviridae* család) kilenc, ICTV által is elfogadott fajokba soroljuk (*Rotavirus A-I*). A közelmúltban egy újabb lehetséges rotavírus fajjal gazdagodott a rotavírusok spektruma, a *Rotavirus J*-t hosszúszárnyú denevérben írták le (Bányai et al., 2017). A besorolás szerológiai és genetikai tulajdonságok alapján történik (Estes és Greenberg, 2007; Matthijnssens et al., 2012; Mawatari et al., 2014; Suzuki és Hasebe, 2017). A rotavírusok genomja 11 szegmensből áll, amelyet dupla szálú RNS alkot, és háromrétegű fehérje burok ölel körbe. Ezek a szegmensek hat szerkezeti fehérjét (VP1-4, VP6 és VP7), valamint öt vagy hat nem-szerkezeti fehérjét (NSP1-NSP5/6) kódolnak. A nem-strukturális fehérjék elsődleges megjelenése a fajok között, de akár a fajon belül is eltérő lehet (Mihalov-Kovács et al., 2015a).

A rotavírusok leginkább fiatal emlős és madár gazdákat fertőznek. *Rotavirus A* (RVA) az egyik leggyakoribb kórokozója az akut, dehidrációval járó gyomor-bélgyulladásnak, mind humán, mind állatorvosi vonatkozásban. A többi rotavírus faj járványtanáról és a vírushelytelenítés lefolyásáról sokkal kevesebb információnk van. A *Rotavirus B*, *-C*, *-E*, *-H* és *-I* fajokat emlősökben írták le, sporadikus megbetegedésekben, endemikus és epidemikus körülmények között is; míg az *Rotavirus D*, *-F* és *-G* fajokat házi baromfi fajok (tyúk, pulyka) fertőző betegségeinek okozójaként írták le (Martella et al., 2010; Marthaler et al., 2014; Matthijnssens et al., 2010).

Rotavirus C-t (RVC) kimutattak humán, sertés, szarvasmarha, görény és kutya hasmenéses megbetegedése során (Bányai et al., 2006; Kim et al., 1999; Marthaler et al.,

2013; Mawatari et al., 2004; Otto et al., 1999; Torres-Medina, 1987). Az RVC fertőzés legfőbb forrásai a szennyezett étel és víz (Otsu, 1998). Humán szerológiai felmérés során kimutatták, hogy a szeroprevalencia növekszik a kor előrehaladtával (Iturriza-Gómara et al., 2004). Nagyüzemi körülmények között tartott szarvasmarhák és sertések RVC szeroprevalenciáját vizsgálva Saif és mtsa. nagymértékű szerológiai áthangolódást találtak a fejlődő országokban (Saif és Jiang, 1994). Az RVC tekintetében kevés bizonyítékot találunk arra, hogy a vírus gazdafajt váltva fertőz, eddig mindössze egy brazil és egy koreai tanulmány mutatott ki sertés eredetű RVC géneket emberi és szarvasmarha RVC törzsekben (Gabbay et al., 2008; Jeong et al., 2009).

A kilencvenes években írtak le először kutya RVC fertőzést Németországban (Otto et al., 1999). Elektronmikroszkópos vizsgálattal rotavírus-szerű partikulákat találtak a hasmenéses bélsárminták 34,6%-ban (9/26). A poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) vizsgált kilenc mintából három elektroferogramja mutatott nagyfokú hasonlóságot a RVC referencia törzsekkel. A vírus megbetegedést okozó képességére vonatkozóan további vizsgálatot azonban nem végeztek, valamint molekuláris meghatározást sem folytattak, így ezen törzsek pontos meghatározása nem sikerült.

Hagyományosan a rotavírusokat szerocsoportokba sorolják, amelynek alapja a VP6 génjük által kódolt szerkezeti fehérje antigenitás és a genom PAGE futtatása során nyert elektroferogram különbségei (Estes és Greenberg, 2007). Újabban egy VP6 gén szekvenciáján alapuló besorolási rendszert alkottak meg a rotavírus fajok elkülönítésére, amely átveheti a helyét a klasszikus módszereknek (Matthijssens et al., 2012).

A rotavírus törzsek jellemzésére napjainkban a legmegfelelőbb módszer a teljes genom szekvenálás, mely lehetővé teszi a vírus evolúciójának mélyreható vizsgálatát, és különösen alkalmas az újszerű RV törzsek meghatározására. Szintén értékes eszköz a reassortáció és a gazdafaj váltás vizsgálatára. Ezzel a módszerrel RVA törzsek szekvenciájának százait határozták meg az elmúlt években (Matthijssens et al., 2011b). Ezzel szemben a Rotavírus Klassifikációs Munkacsoport által az RVA-ra kifejlesztett rendszert nehézkes alkalmazni RVC törzsek meghatározására, mivel sokkal kevesebb szekvencia adat áll rendelkezésünkre, amelyek ráadásul nagyon kevés gazdafajból származnak. Mindaddig egy sertés RVC törzset, nyolc szarvasmarha RVC törzset és tíz emberi RVC törzset szekvenáltak meg és írtak le (Chen et al., 2002; Mackow, 1995; Marton et al., 2015a; Mawatari et al., 2014; Soma et al., 2013; Yamamoto et al., 2011). Mivel az RVC tenyésztése nehézségekbe ütközik, egyedül molekuláris módszerek használatával tudjuk vizsgálni a törzsek biológiai tulajdonságait, valamint genetikai változatosságukat és evolúciójukat a különböző gazdafajokban (Kusanagi et al., 1992).

4.5.5. Parvovírusok

A parvovírusok kisméretű, burok nélküli vírusok, genomjuk 4-6 kb méretű, szimpla szálú DNS. A genom két fő ORF-ből áll; a nagyobb ORF1 kettő nem-szerkezeti fehérjét (NS1, NS2), míg a kisebb ORF2 szerkezeti fehérjéket (VP1, VP2) kódol (Reed et al., 1988). Jelenleg a parvovírusok osztályozása a nem-szerkezeti fehérje (NS1) aminosav (as) sorrendjén alapul (Cotmore et al., 2013). A *Parvoviridae* családba tartozó vírusok különféle kórformákat idéznek elő háziállatainkban. Kutyaiban a *Bocaparvovirus* és a *Protoparvovirus* nemzetségbe tartozó vírusok okozhatnak változatos kórképeket. A bocaparvovírusok közé tartozó kutyaparvovírus 1 (más néven kutya minutevírus, CnMV) vemhes állatok embrióiban magzatkárosító hatású lehet, míg fiatal egyedeknél idegrendszeri, légúti és bélrendszeri tüneteket idézhet elő. Néhány újabban leírt kutya bocaparvovírust légúti megbetegedéssel, illetve májgyulladással hoznak kapcsolatba (Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013; Manteufel és Truyen, 2008; Ohshima et al., 2010). A *Protoparvovirus* nemzetségbe tartozó kutyaparvovírus 2 (CPV-2) által okozott kórképet (a kutya parvovírus okozta bélgyulladását) először a hetvenes évek végén írták le (Kelly, 1978). A CPV-2 súlyos, vérzéssel járó vékonybélgyulladást okoz, ellene élő, attenuált vírust tartalmazó vakcinát használunk. Az eredetileg leírt vírustól időközben új antigénvariánsok (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) alakultak ki; Magyarországon eddig a CPV-2a-t mutattak ki (Cságola et al., 2014; Decaro és Buonavoglia, 2012).

5. Anyagok és módszerek

5.1. Mintagyűjtés, a menhely jellemzése

A kutyáktól származó bélsármintákat gyűjtöttük egy észak-kelet magyarországi menhelyen (Miskolci Állatsegítő Alapítvány, M.Á.S.A.), 2012. január és szeptember között. A 17 éve működő Miskolci Állatsegítő Alapítvány, Kelet-Magyarország egyik legnagyobb menhelyét üzemelteti, állatmentő szolgálatot tart fenn. Évente több mint 600 kutya és 150 macska kerül be a menhelyre. Mintákat gyűjtöttünk még egy magánszemély kutyáitól is, aki saját kutyái mellett ideiglenesen befogadott kutyákat is tart. Ezen a tartási helyen kevesebb kutya fordul meg, jellemzően csak klinikailag egészséges kutyák élnek együtt.

Összesen 76 bélsármintát gyűjtöttünk mintagyűjtő tégelyekbe. A gyűjtés véletlenszerűen történt, a tünetmentes és a hasmenéses egyedek vegyesen szerepeltek, a gyűjtést sem az életkor, sem az ivar nem befolyásolta. A mintákat egyedileg, valamint kennelekből is gyűjtöttük, utóbbi esetben előfordult, hogy több minta került egy mintagyűjtő tégelybe. Az egyedekhez köthető mintákat közvetlenül a végbélből gyűjtöttük, vagy rövid idővel a bélsárürítés után, a talajról szedtük fel, majd a laborba szállításig -20°C-os hűtőben tartottuk, vagy még aznap a laborba szállítottuk azokat. A gyűjtések során néhány alapadatot is feljegyeztünk a kutyákról is, amelyektől a minta származott. Az adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: A vizsgált minták általános jellemzői

Minta név	Gyűjtés dátuma	Eb kora (ebek korai-pool minta)	Minta származási helye	Metagenomikai vizsgálat	Hasmenéses tünetek +/-
HUN/2012/1	2012.01.20	8 év	MÁSA*	igen	+
HUN/2012/2	2012.01.20	5 hét	MÁSA	igen	+
HUN/2012/3	2012.01.23	1 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/4	2012.01.26	5 hét	MÁSA	igen	+
HUN/2012/5	2012.01.30	3 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/6	2012.02.03	8 év	MÁSA	igen	-
HUN/2012/7	2012.02.03	6 hét	MÁSA	igen	+
HUN/2012/8	2012.02.10	4 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/9	2012.02.16	8 hét	MÁSA	igen	-
HUN/2012/10	2012.02.16	8 hét	MÁSA	igen	+
HUN/2012/11	2012.02.17	1 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/12	2012.02.17	5 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/13	2012.02.17	nem ismert	MÁSA		NA***
HUN/2012/14	2012.03.09	fejnött	MÁSA	igen	-
HUN/2012/15	2012.03.09	fejnött	MÁSA	igen	+
HUN/2012/16	2012.03.09	fejnött	MÁSA	igen	-
HUN/2012/17	2012.03.09	fejnött	MÁSA		-

Minta név	Gyűjtés dátuma	Eb kora (ebek korai-pool minta)	Minta származási helye	Metagenomikai vizsgálat	Hasmenéses tünetek +/-
HUN/2012/18	2012.03.19	1-6 év	MÁSA		-
HUN/2012/19	2013.03.19	2-6 év	MÁSA		-
HUN/2012/20	2012.03.19	1-9 év	MÁSA		-
HUN/2012/21	2012.03.19	11 év	MÁSA		-
HUN/2012/22	2012.02.17	3 hó	MÁSA	igen	-
HUN/2012/57	2012.04.01	6 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/58	2012.04.06	11 év	MÁSA		NA
HUN/2012/59	2012.04.06	1,5-7 év	MÁSA		-
HUN/2012/58/2	2012.03.09	1,5-7 év	MÁSA		NA
HUN/2012/59/2	2012.03.09	1 év alatt	MÁSA		-
HUN/2012/60	2012.04.06	2-6 év	MÁSA		-
HUN/2012/64	2012.04.06	6-15 hó	MÁSA		-
HUN/2012/65	2012.04.06	6 hó-3 év	MÁSA		-
HUN/2012/66	2012.04.06	feelnőtt	MÁSA		-
HUN/2012/67	2012.04.06	1-6 év	MÁSA		-
HUN/2012/68	2012.04.06	2 év	MÁSA		-
HUN/2012/69	2012.04.06	6 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/71	2012.04.06	6 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/113	2012.04.12	1 év	SZISZI**		-
HUN/2012/114	2012.04.15	6 év	MÁSA	igen	-
HUN/2012/115	2012.04.20	6 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/116	2012.04.20	1 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/117	2012.04.20	2 hó	MÁSA		+
HUN/2012/118	2012.04.20	6 év	MÁSA		+
HUN/2012/123	2012.04.27	7 hó	MÁSA	igen	-
HUN/2012/124	2012.04.27	4 hó	MÁSA	igen	+
HUN/2012/125	2012.04.27	1 év alatt	MÁSA	igen	+
HUN/2012/126	2012.04.27	1 év alatt	MÁSA	igen	-
HUN/2012/127	2012.04.27	3 hó	MÁSA		+
HUN/2012/128	2012.04.27	feelnőtt	MÁSA		-
HUN/2012/129	2012.05.09	3 év	MÁSA		-
HUN/2012/130	2012.05.09	5 év	MÁSA		-
HUN/2012/131	2012.05.09	1 év alatt	MÁSA		-
HUN/2012/132	2012.05.09	1 év alatt	MÁSA		-
HUN/2012/133	2012.05.09	4-6 hét	MÁSA		-
HUN/2012/134	2012.05.09	4-6 hét	MÁSA	igen	-
HUN/2012/135	2012.05.09	3 hét	MÁSA	igen	-
HUN/2012/136	2012.05.11	4-6 hét	MÁSA	igen	-
HUN/2012/143	2012.07.14	7 év	SZISZI	igen	-
HUN/2012/145	2012.07.14	1,5 év	SZISZI	igen	NA
HUN/2012/147	2012.07.14	4 év	SZISZI		NA
HUN/2012/149	2012.06.07	1,5 év	SZISZI	igen	NA

Minta név	Gyűjtés dátuma	Eb kora (ebek korai-pool minta)	Minta származási helye	Metagenomikai vizsgálat	Hasmenéses tünetek +/-
HUN/2012/150	2012.07.14	3 év	SZISZI		NA
HUN/2012/152	2012.07.14	1 év	SZISZI		NA
HUN/2012/154	2012.07.14	1 év	SZISZI		NA
HUN/2012/156	2012.07.14	8 hó	SZISZI		NA
HUN/2012/158	2012.06.07	7 hó	SZISZI		NA
HUN/2012/159	2012.05.29	7 hó	SZISZI		-
HUN/2012/161	2012.05.10	1,5 év	SZISZI	igen	NA
HUN/2012/174	2012.05.31	kölyök	MÁSA	igen	+
HUN/2012/175	2012.06.05	6 hét	MÁSA	igen	-
HUN/2012/492	2012.08.01	1 év	SZISZI		-
HUN/2012/493	2012.07.31	1,5 év	SZISZI		-
HUN/2012/494	2012.07.31	7 év	SZISZI		-
HUN/2012/495	2012.07.31	3 év	SZISZI		-
HUN/2012/496	2012.07.31	8 hó	SZISZI		-
HUN/2012/497	2012.08.03	4 év	SZISZI		-
HUN/2012/527	2012.08.23	1 év	MÁSA	igen	+
HUN/2012/528	2012.09.07	2 év	MÁSA	igen	+

*MÁSA: Miskolci Állatsegítő Alapítvány menhelyén gyűjtött minták megjelölése

**SZISZI: magán állattartótól gyűjtött minták megjelölése

*** NA: nincs adat

5.2. Minták feldolgozása, hígítás, tárolás

A bélsármintákat a laborba érkezésük után kiolvastottuk, majd 2 ml-es mikrocentrifuga csövekben 10-20%-os bélsár szuszpenziót készítettünk, melyhez PBS oldatot használtunk. A mintákat ezután -65°C-os fagyasztóban tároltuk további felhasználásig.

5.3. Minták előkészítése új generációs szekvenálásra

5.3.1. Nukleinsav kivonás

A bélsár szuszpenziókat vortexeléssel homogenizáltuk, majd ülepitő centrifugálással elválasztottuk a szilárd és a folyékony fázist. A centrifugálás 4°C-on 10000×g-n történt, 5 percen át. A felülúszó 100 µl-éből RNS izolálást végeztünk Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research Corp.) segítségével. A kivonást a gyártó utasítása szerint végeztük, RiboZol™ RNA Extraction Reagent (Amresco Inc.) használatával. Az RNS-t 50 µl nukleázmentes vízben oldottuk fel. A kivont RNS-t további felhasználásig -65°C-os fagyasztóban tároltuk.

5.3.2. Reverz transzkripció, polimeráz lánreakció (RT, PCR)

A kivont RNS mintákat először 95°C-on, 5 percen át denaturáltuk, 10 µM random hexamer oligonukleotid jelenlétében, melynek 3' véghez általános oligonukleotid illeszkedik (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN-3') (Djikeng et al., 2008). A reverz

transzkripció lépésben a minta és a random oligonukleotid keverékéhez adtunk még 400 μ M dNTP-t, 1 \times AMV RT puffert, valamint 1 egység (U) AMV reverz transzkriptáz enzimet (Promega), a reakció végtérfogata 25 μ l volt. A reakcióelegyet 42°C-on 45 percig inkubáltuk. A reverz transzkripció cDNS-éből 5 μ l-t továbbvittünk a PCR reakcióelegybe. Az 50 μ l-es PCR reakciókeverék tartalmazott 1 μ M PCR primert, 200 μ M dNTP keveréket, 1,5 mM MgCl₂-t, 1 \times Taq DNS polimeráz puffert és 0,5 U Taq DNS polimerázt (Thermo Scientific). A program hőprofilja a következő volt: egy kezdeti három perces, 95°C-on történő denaturáció után 40 ciklusos amplifikáció következett (95°C 30 mp, 48°C 30 mp, 72°C 2 perc), végül egy elongációs lépés, 72°C 8 percen át.

5.3.3. PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen (Lonza) történő elektroforézissel ellenőriztük. 90V-on 25 percig elektroforetizáltuk 0,5 \times TBE (trisz-borát-etilén-diamin-tetraacetát oldatban); GelRed (Biotium) festéssel. Molekulatömeg markerként 100 bp-os O'Gene Ruler DNS létrát (Thermo Scientific) használtunk. A futtatás után a gél UV-átvilágítással vizsgáltuk, és az eredményeket CSL-Microdoc Systems gél dokumentációs rendszerrel (Clever Scientific; Power Shot G12 kamera, Canon) rögzítettük.

A gélből a 200 és 2000 bp közötti sávban lévő terméket kimetsztük, majd Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid) gél kivonásos módszerével kitisztítottuk, végül 50 μ l eluáló pufferben leoldottuk az oszlopról.

5.4. Új generációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS); könyvtárkészítés, szekvenálás

Enzimes fragmentációt végeztünk 100 ng amplifikált cDNS-ből a NEB-Next® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit segítségével (New England Biolabs), a gyártó utasításai alapján. A fragmensekhez adaptereket kötöttünk, melyhez ugyanezen kit reagenseit használtuk, a könyvtárakhoz való vonalkódokat pedig az Ion Xpress™ Barcode Adapterek közül választottuk (Life Technologies). Az indexelt könyvtár DNS mintákat oszlopos tisztítási módszerrel tisztítottuk a Gel/PCR DNA Fragments kit (Geneaid) segítségével. A tisztított mintákat 2%-os, előre gyártott géleken futtattuk (Life Technologies), a 300 és 350 bp közötti termékeken PCR amplifikációt hajtottunk végre, melyhez a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kitet használtuk (Life Technologies). Az amplifikáció a következő hőprofillal zajlott: egy kezdeti 98°C-on történő, 30 mp-es denaturáció után 12 amplifikációs ciklus: 98°C, 10 mp, 58°C, 30 mp, 72°C, 30 mp, melyeket egy végső elongáció követett, 72°C-on, 5 percig. A könyvtárat ismét tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid), majd Qubit® dsDNA BR Assay kittel (Life Technologies) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk.

Egyforma mennyiségeket mértünk össze az eltérő vonalkódú könyvtárakból egyetlen csőbe, és ezt a könyvtárkeveréket használtuk az emulziós PCR során, ahol a hígítást úgy kell elvégezni, hogy egyetlen könyvtár DNS molekula kötődjön egyetlen IonSphere™ részecskéhez. A PCR-nél az Ion PGM Template kitet használtuk, követve utasításait, az emulziós PCR-t pedig egy OneTouch v2 eszköz segítségével végeztük. Ezután, az amplifikált könyvtár DNS-t tartalmazó részecskék dúsítását az Ion One Touch ES pipettázó robottal hajtottuk végre. A szekvenálást Ion Torrent Personal Genome Machine® készüléken végeztük, 316 ill. 318 típusú chipeken és az Ion PGM™ Sequencing kithoz ajánlott szekvenálási protokollt követtük.

5.5. Hagyományos PCR szűrővizsgálatok a vírusok detektálására

5.5.1. Mintaelőkészítés

A hagyományos PCR alapú szűrővizsgálatokhoz is ugyanazt a bélsárszuszpenziót használtuk, mint a vírusmetagenomikai vizsgálatokhoz, azonban a teljes nukleinsav kivonását innuPREP Virus DNA/RNA kittel végeztük (Analytik Jena AG), a gyártó utasításai alapján. Sejtmentes testnedvek kivonási protokollját követtük, egyedüli módosításként a hordozó RNS-t nem használtuk a munkafolyamatban. A mintákat további használatig -65°C-on tároltuk.

5.5.2. Hagyományos PCR, RT-PCR szűrővizsgálatok a vírusok detektálására

A vírusok detektálása vírus specifikus RT-PCR segítségével történt. Az egy- és kétlépéses RT-PCR-ek és a kétkörös (heminested) PCR-ek a CAstV, CaKoV és CaCV kimutatását szolgálták. A munkánk során használt oligonukleotidokat (2. táblázat) előzetes irodalmi adatok alapján választottuk ki, illetve a CaKoV esetében magunk terveztük génbanki szekvenciákból készített illesztések felhasználásával (Chu et al., 2008; Jiang et al., 1999).

Az RT-PCR és hemnested PCR programok hőprofiljait és a reakció keverékek összetételeit a 3-10. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: A munkánk során használt primerek neve és szekvenciája

Detektált vírus	Oligonukleotid elnevezése	5'-3' szekvencia	Amplifikált szakasz (bp)	Cél régió	Referencia
canine astrovirus (CAstV)	panastro F1a	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYG A	422	RdRp	Chu et al., 2008
	panastro F1b	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYG A			
	panastro R	GGYTTKACCCACATNCCRAA			
	panastro F2a	CGKTAYGATGGKACKATHCC AGGTAYGATGGKACKATHCC			
	panastro F2b				
calicivirus (CaCV)	P290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCA	297	RdRp	Jiang et al., 1999
	P289	C TGACAATGTAATCATCACCATA			
canine kobuvirus (CaKoV)	RdRp-kobu-f RdRp-kobu-r	CAGGTGTATGATCTGGACTACA AG TTCTGTTGCGTAGATGACATCG	323	RdRp	jelen tanulmány
canine kobuvirus (CaKoV)	VP1-kobu-f VP1-kobu-r	AACGTCCAGGACTGGTTT TTCCACCACTTGGAGAA	449	VP1	jelen tanulmány

3. táblázat: A CaCV egy lépéses RT-PCR elegy összetétele (Qiagen OneStep RT-PCR Kit)

Összetevők	Térfogat (végkoncentráció)
Víz (nukleáz-mentes, Invitrogen Ambion)	25 µl-ig
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 5×	5 µl
10 mM dNTP	1 µl (400 µM)
10 µM forward primer (p289)	1 µl (0,4 µM)
10 µM reverse primer (p290)	1 µl (0,4 µM)
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	1 µl
Minta	3 µl

4. táblázat: A CaCV egy lépéses RT-PCR program hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Reverz transzkripció	50°C	30 p	1
Kezdeti denaturáció	95°C	15 p	1
Denaturáció	95°C	30 mp	
Primer kötődés	42°C	1 p	35
Szintézis	72°C	2 p	
Végző szintézis	72°C	7 p	1

5. táblázat: A CaKoV egy lépéses RT-PCR elegy összetétele (Qiagen OneStep RT-PCR Kit).

A CaKoV kimutatását két különböző genomi régióra illeszkedő primerpárral végeztük (RdRp, VP1)

Összetevők	Térfogat (végkoncentráció)
Víz (nukleáz-mentes, Invitrogen Ambion)	25 µl-ig
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 5×	5 µl
10 mM dNTP	1 µl (400 µM)
10 µM forward primer (RdRp-kobu-F/VP1-kobu-F)	1 µl (0,4 µM)
10 µM reverse primer (RdRp-kobu-R/VP1-kobu-R)	1 µl (0,4 µM)
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	1 µl
Minta	3 µl

6. táblázat: CaKoV RdRp genomi régió egy lépéses RT-PCR program hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Reverz transzkripció	45°C	30 p	1
Kezdeti denaturáció	95°C	15 p	1
Denaturáció	95°C	30 mp	
Primer kötődés	45°C	30 mp	40
Szintézis	72°C	1 p	
Végső szintézis	72°C	10 p	1

7. táblázat: CaKoV VP1 genomi régió egy lépéses RT-PCR program hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Reverz transzkripció	42°C	30 p	1
Kezdeti denaturáció	95°C	15 p	1
Denaturáció	95°C	30 mp	
Primer kötődés	42°C	30 mp	40
Szintézis	72°C	1 p	
Végső szintézis	72°C	10 p	1

Az Astv-ok kimutatására kétlépéses, két körös (fél-fészkes, heminested) RT-PCR-t használtunk.

8. táblázat: AstV-k kimutatása, RT lépés reakcióelegy összetétele

Összetevők	Térfogat (végkoncentráció)
Víz (nukleáz-mentes, Invitrogen Ambion)	20 µl-ig
AMV Buffer, 5× (Promega)	5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl (200 µM)
50 µM random hexamer	1 µl (2,5 µM)
AMV RT Enzyme	1 µl (10 egység)
Minta	5 µl

Az astrovírus kimutatásakor az RT lépést megelőzően 5 µl RNS minta és 1 µl random hexamer elegyét 95°C-on 5 percen át denaturáltuk, majd jégre téve ráértük az RT-PCR elegyet. A reverz transzkripció egy tíz perces 25°C-on történő kezdeti inkubáció után 60 percig 45°C-on zajlott, melyet egy 15 perces denaturáció követett 60°C-on.

A hemi-nested PCR során a két körben a forward primerek különböztek, valamint a második körben a minta volumenét csökkentettük (9. és 10. táblázat).

9. táblázat: Az astrovírus fél-fészkes PCR elegy összetevői

Összetevők	Térfogat (végkoncentráció)
Víz (nukleáz mentes, Invitrogen Ambion)	50 µl-ig
10×DreamTaq Green buffer (Thermo Scientific)	5 µl
10 mM dNTP	1 µl (200 µM)
10µM forward primer 1. kör: panastro 1a, -1b 2. kör: panastro 2a, -2b	1 µl (0,2 µM)
10 µM reverse primer (panastroR)	1 µl (0,2 µM)
DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific)	0,5 µl (2,5 egység)
Minta	3 µl (második kör: 1 µl)

10. táblázat: Az astrovírus hemi-nested PCR hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	94°C	5 perc (p)	1
Denaturáció	94°C	30 mp	1. kör: 30 2. kör: 40
Primer kötődés	50°C	30 mp	
Szintézis	72°C	30 mp	
Végső szintézis	72°C	10 p	1

5.5.3. PCR és RT-PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel, tisztítása gélből

Agaróz gélelektroforézist követően a specifikus PCR termékeket a gélből tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid) segítségével, hasonlóan az 5.3.3. pontban leírtakhoz.

5.5.4. Sanger-féle DNS szekvenálás

Mindkét irányból közvetlen szekvencia meghatározást végeztünk BigDye™ Terminator v3.1 kittel (Applied Biosystems™). A szekvenálási reakciót a PCR során is használt primerekkel hajtottuk végre. A PCR termékek nátrium-acetátos és etil-alkoholos kicsapását követően a mintákat beszárítottuk. A termékek kapilláris gélelektroforézise ABI PRISM 310 illetve ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser készülékek segítségével történt együttműködő partnereinknél (PTE TTK, dr. Jakab Ferenc; Honvédkórház, dr. Lengyel György).

5.6. Bufavírus real-time (valós idejű) PCR

A bufavírus szűrést az előzetes metagenomikai adatok ismeretében végeztük, a real-time (valós idejű) PCR-ben használt protokollt Vito Martella professzor (Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Olaszország) bocsátotta rendelkezésünkre (Martella et al., 2018). A PCR elegy összetételét, az oligonukleotidok szekvenciáját, és a PCR hőprofilját a 11-13. táblázatban foglaltuk össze.

11. táblázat: A bufavírus PCR elegy összetétele

Összetevők	Térfogat
Víz (nukleáz mentes, Invitrogen Ambion)	10 µl-ig
Abi TaqMan Universal Mix II, no UNG (Applied Biosystems™)	5 µl
10 µM canine ppv probe	0,25 µl
10 µM forward primer (canine ppv 1337F)	0,5 µl
10 µM reverse primer (canine ppv 1338R)	0,5 µl
Minta	2 µl

12. táblázat: A bufavírus PCR során használt oligonukleotidok nt sorrendje

Oligonukleotid név	Nukleotid sorrend (5'-3')
Canine_ppv_1337F	TGAACAAGAAATAGACAACATTGTCAT
Canine_ppv_1338R	AAAGAGCAGTTAGGTCATTGTTGT
Canine_ppv_probe	FAM-CCAAACAAGGTACAGGACAGGAAGAAACAACACAA-BHQ1

13. táblázat: A bufavírus real-time PCR program hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	95°C	10 p	1
Denaturáció	95°C	15 mp	40
Szintézis és detektálás	60°C	1 p	

A reakciót és a detektálást egy Applied biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems™) gépen végeztük.

5.7. 5' és 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends, cDNS végek gyors amplifikálása)

Egyszálú RNS vírusok (CAstV, CaCV) esetében a biztató új generációs szekvenálás fényében megpróbáltuk a teljes genomot, a nem kódoló részekkel együtt amplifikálni.

A RACE protokollokban az RNS kivonása QIAmp Viral RNA Mini kittel (Qiagen) történt, a centrifugálás protokollt alkalmazva. A kivonáskor hordozó RNS-t nem használtunk, az RNS-t azonnal, a kivonást követően felhasználtuk.

Az ismeretlen szekvenciájú genomi RNS-ek végeinek meghatározásához az 5' és 3' RACE System for the rapid amplification of cDNA ends ver. 2.0 kitet (Life Technologies) használtuk. Az 5' és 3' RACE esetében is a gyártó utasításai alapján dolgoztunk. A RACE-k során általunk tervezett, valamint korábban publikált primerekkel is dolgoztunk (Scotto-Lavino et al., 2006).

Az ampikonokat 1,5%-os agaróz gélen futtattuk, majd termékeket QIAquick Gel Extraction kittel (Qiagen) tisztítottuk. A 3' RACE minták nukleotid sorrendjét új generációs szekvenálással határoztuk meg. Az 5' RACE termékeket TOPO XL PCR Cloning kittel klónoztuk, majd egy-egy minta három-három független klónját megszekvenáltuk mindkét

irányból általános szekvenáló oligonukleotidokat használva (M13F/R), BigDye Terminator v3.1 kittel (Applied Biosystems™). A szekvenálás leolvasást ABI PRISM 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™) készülékén végeztük (olaszországi együttműködés során generált szekvenciák).

5.8. RNS ligálás, dupla szálú RNS genomok szegmensvégeinek meghatározása

A rotavírusok szegmensvégeinek nem kódoló szekvenciáinak meghatározásához házilag adaptált 3' RACE-t alkalmaztunk, a következő módon. Egy rövid, 5' végen polifoszforilált, 3' végen dideoxi-citozinnal ellátott oligonukleotidot (PC3) ligáltunk a frissen kivont RNS 3' végeire (Lambden et al., 1992; Potgieter et al., 2009). Öt µl templátot összekevertünk 25 µl ligáló mixszel (összetevők: 3,5 µl nukleáz mentes víz, 2 µl 20 µM-os PC3 oligonukleotid, 12,5 µl 34 w/v% polietilén-glikol 8000, 3 µl ATP, 3 µl 10× T4 RNA Ligase puffer és 10 U T4 RNA Ligase I -New England Biolabs-), majd 16 órán át 17°C-on inkubáltuk. Az inkubálás után a keverékből az RNS-t QIAquick Gel Extraction kittel (Qiagen) vontuk ki. 150 µl QG puffert és 180 µl izopropanolt adtunk a mintához, majd szilika gél oszlopon tisztítottuk a gyártó utasítása szerint.

Ezután öt mikroliter ligált RNS-t denaturáltunk 95°-on, 5 percen át, 1 µl 20 µM PC2 primer (PC3 szekvencia komplementere) jelenlétében, majd az elegyet tartalmazó csövet azonnal jégre helyeztük. A reverz transzkripcióhoz használt keverék tartalmazott 14 µl nukleáz-mentes vizet, 6 µl 5×First Strand puffert, 1 µl 10 mM dNTP keveréket, 1 µl 0,1M dTT-t, 20 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific), és 300 U Superscript III Reverse Transcriptase enzimet. Ezt a keveréket a denaturált RNS mintához adtuk, majd 25°C-on 5 percig, 50°C-on pedig 60 percen át inkubáltuk, a reakció egy 15 perces 70°C-os inkubációval fejeződött be.

A mixből 2 µl cDNS-t vittünk tovább a PCR reakcióelegybe, melynek összetétele azonos volt az 5.3.2. pontban ismertetett elegy összetételével, a hőprofilja pedig az anelláció hőmérsékletében mutatott különbséget, ez 42°C volt 48°C helyett.

A PCR-ben alkalmazott oligonukleotidok egyike a PC2, míg a másik egy génspecifikus primer volt. Ezeket a génspecifikus primereket előzőleg nyert szekvenciaadatok alapján magunk terveztük. A termékeket 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, a megfelelő méretű amplikonokat a gélből kivágtuk. A termék tisztítását Gel/PCR DNA fragments Extraction kit (Geneaid) oszlop kivonásos módszerével végeztük. Az amplikonokat direkt Sanger szekvenálásnak vetettük alá, a PCR primerek használatával, BigDye 1.1 Cycle Sequencing kitet használtunk (Applied Biosystems™). A szekvenálásokat ABI PRISM 310 Genetic Analyzeren olvastattuk le (PTE TTK).

5.9. Új generációs szekvenálás és hagyományos Sanger-féle DNS szekvenálás során nyert szekvencia adatok elemzése

Az NGS során generált szekvenciaadatok vírusmetagenomikai kiértékelését együttműködő partnerünk (Vega Bt.) szolgáltatás formájában elemezte számunkra. A bioinformatikai elemzés folyamata a következő fontosabb lépéseket foglalta magában: az NGS során kapott nyers szekvencia részletek minőségi ellenőrzésen estek át, majd a túl rövid (≤ 35 nt) vagy rossz minőségű nukleotid szakaszok figyelmen kívül hagyásával és az adapter/vonalkód régiók törlésével referenciaillesztést végeztünk, melyhez a GenBankban elérhető vírusszekvenciákból álló adatbázist használtuk.

A virális genomok összeszerelését és elemzését magunk végeztük el. A szekvenálás során generált adatokat a CLC Genomics Workbench szoftver (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-main-workbench>) segítségével rendeztük és analizáltuk. Ugyanezt a szoftvercsomagot használtuk, amikor szekvencia részleteinket (*angolul* sequence reads) eukariótákban előforduló vírusok szekvenciáihoz hasonlítottuk, amelyeket a GenBankból töltöttünk le. Az összeillesztett egyedi szekvenciákat ellenőriztük, majd egyetlen contigot (nagyobb szekvencia szakasz, amely az átfedő leolvasott szakaszokból [readekből] áll) állítottunk össze az illesztésekből.

A Sanger szekvenálás során nyert szekvenciák szerkesztése és értékelése a GeneDoc, valamint a BioEdit szoftverekkel történt (Hall, 1999; Nicholas et al., 1997). A hasonlóság megállapítása BLAST algoritmus segítségével történt, az NCBI (National Center for Biotechnology Information) internetes alapú kereső programján keresztül.

A hagyományos Sanger szekvenálás során nyert szekvencia adatokat és az NGS szekvencia adatokat ettől a ponttól azonos módon elemeztük.

A nyílt leolvasási kereteket (open reading frame, ORF) az NCBI internet alapú ORF keresőjével határoztuk meg (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A többszörös szekvencia illesztéseket a translatorX (<http://translatorx.co.uk/>) interaktív fordító-illesztő programmal határoztuk meg (Abascal et al., 2010). A szekvenciák további szerkesztése és értékelése a GeneDoc, valamint a BioEdit szoftverekkel történt. A filogenetikai elemzést a MEGA6 szoftverrel végeztük (Tamura et al., 2013) éspedig *neighbor-joining* vagy *maximum likelihood* módszerrel, a program által legjobbnak ítélt szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az átlagos nukleinsav és aminosav genetikai távolságokat a *p-distance* módszerrel számoltuk ki, szintén a MEGA6 programot használva. A nukleotid sorrenden alapuló aminosav sorrend analízisét, és osztályozását az EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute) webszerverén végeztük (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). A transzmembrán domének helyét, és aminosav sorrendjét a

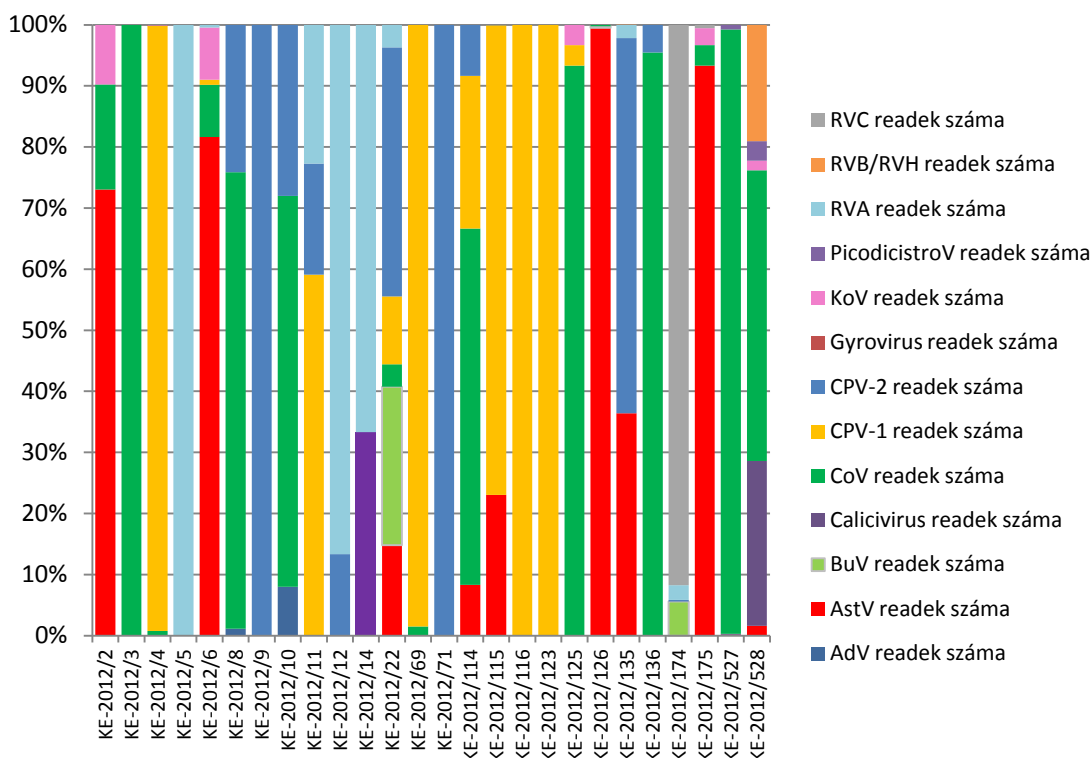
Phobius internetes alapú kereső segítségével határoztuk meg (Káll et al., 2007). A nukleáris lokalizációs szignálok helyét az alábbi keresővel határoztuk meg: <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>.

6. Eredmények

6.1. Kutya eredetű bélsárminták virom vizsgálata

Munkánk során mintáinkat a M.Á.S.A. miskolci menhelyéről, valamint egy magánszemély kutyáitól gyűjtöttük. Összesen 37 mintát vizsgáltuk metagenomikai módszerekkel. 33 minta a menhelyről származott, míg négy mintát a magán állattartónál élő állatoktól gyűjtöttünk. Az adathalmaz elemzésekor a szekvenciákat a könnyebb átláthatóság érdekében nagyobb csoportokra osztottuk, úgymint baktérium eredetű szekvenciákra, bakteriofág eredetű szekvenciákra, valamint eukariótákat fertőző vírusszekvenciákra. Az utóbbi csoporton belül megkülönböztettük az állatok fertőző vírusoktól származó szekvenciákat, valamint egyéb kategóriába sorolható egyedi szekvenciákat, melyek táplálék vagy környezeti eredetűek lehetnek, vagy származhattak a minta feldolgozása során használt anyagokból is. A menhelyi mintákban ezzel a módszerrel nulla és hat közötti eukarióta szervezeteket fertőző vírustól származó szekvenciát detektáltunk, melybe nem számoltuk be az egyéb kategóriájú eukariótát fertőző vírustól származó szekvenciákat (átlag 2,48) (1. ábra), míg a magán állattartói mintákban csak egyéb kategóriába sorolható eukariótákat fertőző vírusszekvenciát találtunk. A menhelyi minták 18,18%-ában (6/33) nem azonosítottunk csak egyéb kategóriába sorolható eukariótákat fertőző vírusszekvenciát, amelyek akár a táplálékból, környezetből származhattak, akár a minta feldolgozása során használt anyagokból.

Az előzetes vírusmetagenomikai adatok alapján vírus-specifikus PCR és RT-PCR rendszereket fejlesztettünk vagy adaptáltunk irodalmi hivatkozások alapján. A vírusmetagenomikai vizsgálatok és a PCR-rel végzett szűrővizsgálatok részletes eredményeit didaktikai megfontolásból az egyes vírusok tárgyalásakor ismertetjük.



1. ábra: Egyes eukariótákat fertőző vírusszekvenciák egymáshoz viszonyított aránya a mintákban.

A diagramban azok a minták szerepelnek, melyekben eukariótákat fertőző vírusszekvenciákat találtunk. Azon minták, ahol kizárólag egyéb kategóriájú vírusokból származó szekvenciarezszeleteket találtunk nem szerepelnek az ábrán.

6.2. Kutya astrovírus

2012-ben összesen 76 db kutya bélsármintát gyűjtöttünk, amelyeket RT-PCR módszerrel szűrtünk különféle RNS vírusokra. Az oligonukleotidokat az AstV-ok leginkább konzervatív ORF1b génjének kimutatására tervezték. A vizsgálati rendszert növényevő denevérfajokban található astrovírusok általános kimutatására fejlesztették ki, az alkalmazott primer párok erősen degeneráltak voltak (Chu et al., 2008). Ezt a vizsgálati rendszert a kutyákra jellemző astrovírusok laboratóriumi diagnosztikájában többször is sikerrel alkalmazták (Martella et al., 2012, 2011). Ezzel a módszerrel összesen hét pozitív mintát kaptunk.

Az előbbi csoportból véletlenszerűen kiválasztottuk 33 állat 37 darab mintáját, és ezeket a mintákat metagenomikai elemzésnek vetettük alá. A 37 mintából összesen 26-ban voltak eukariótákat fertőző vírus eredetű szekvenciák (1. ábra). Metagenomikai módszerekkel összesen 12 mintában találtunk AstV RNS-t. Ebben a 12 mintában az AstV szekvenciák aránya az eukariótákat fertőző vírus szekvenciákhoz viszonyítva <0,1% (1/18711) és 99,5% (1627/1635) között mozgott. Hat mintában rendkívül alacsony (egy és

négy közötti) volt az AstV egyedi szekvenciák (readek) száma, így azokat nem elemeztük tovább. Más enterális vírus eredetű szekvenciákat is találtunk a metagenomikai vizsgálat során, úgymint parvovírus – CPV-1, CPV-2 – (tíz mintában), coronavírus (tíz mintában), rotavírus (öt mintában), kobuvírus (öt mintában), calicivírus (kettő mintában), picodicrostrovírus (kettő mintában) és gyrovírus (egy mintában). Összességében a minták 21%-ban (16/76) detektáltunk astrovírust akár pan-astrovirus RT-PCR-rel, akár metagenomikai vizsgálatok során. Érdekes módon néhány RT-PCR-rel negatív minta mélyszekvenálással AstV pozitívnak mutatkozott, valamint egyes AstV szekvenciákat nem tartalmazó minta pozitívnak bizonyult a kevésbé érzékeny, de széles spektrumú pan-astrovirus RT-PCR-rel, ezzel jelezve a gyenge korrelációt a két módszer között (14. táblázat).

14. táblázat: Az AstV pozitív (panastro-RT-PCR v. metagenomikai) minták tulajdonságai

Minta név	Mintagyűjtés dátuma	Az eb kora	Hasmenéses tünetek	PCR szűrés eredménye	AstV readek száma
HUN/2012/2	2012.01.20	5 hét	igen	pozitív	717
HUN/2012/4	2012.01.26	5 hét	igen	pozitív	1
HUN/2012/5	2012.01.30	3 hó	igen	pozitív	0
HUN/2012/6	2012.02.03	8 év	nem	negatív	191
HUN/2012/8	2012.02.10	4 hónap	igen	pozitív	0
HUN/2012/22	2012.02.17	3 hónap	nem	negatív	4
HUN/2012/14	2012.03.09	3 felnőtt poolja	nem	pozitív	0
HUN/2012/16	2012.03.09	2 felnőtt poolja	nem	pozitív	0
HUN/2012/114	2012.04.15	6 év	nem	negatív	1
HUN/2012/115	2012.04.20	6 hó	igen	negatív	1920
HUN/2012/116	2012.04.20	1 év	igen	negatív	1
HUN/2012/126	2012.04.27	1 év alatt	nem	negatív	1627
HUN/2012/135	2012.05.09	3 hét	nem	negatív	2399
HUN/2012/175	2012.06.05	6 hét	nem	pozitív	531
HUN/2012/527	2012.08.23	1 év	igen	negatív	1
HUN/2012/528	2012.09.07	2 év	igen	negatív	1

6.2.1. A kutya astrovírus genomok általános jellemzői

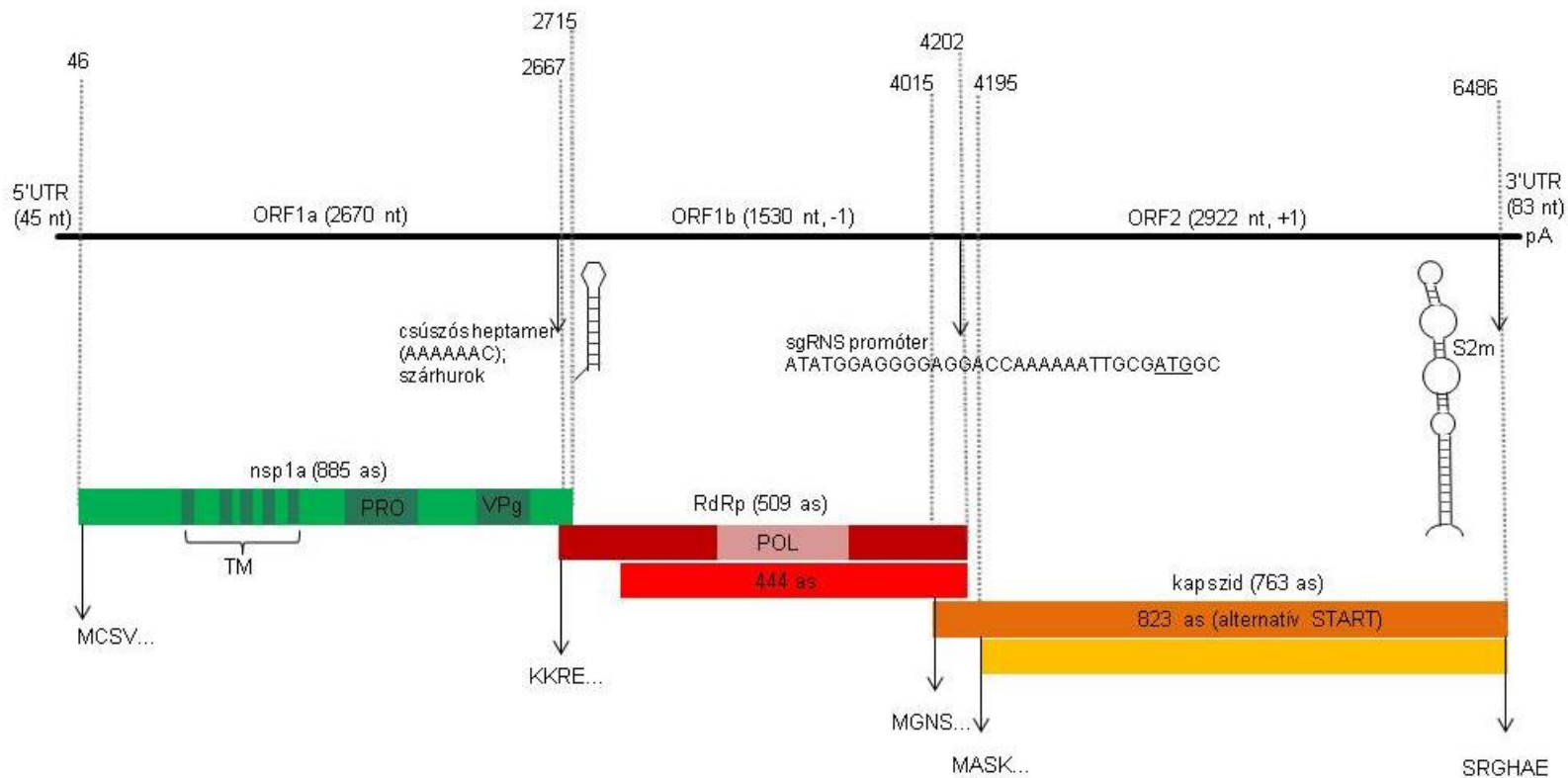
Négy teljes AstV genomot, és két részleges genomot részletesen elemeztünk. A kódoló szakaszok hossza 6441-6447 nukleotid (nt) között, a GC (guanin: citozin) tartalom 45,19-45,48% között mozgott. A genomok hossza az 5' és 3' UTR-t beleszámolva, a poli(A) farkat pedig levonva 6535 és 6587 nukleotid közötti hosszúságú volt. Az 5' UTR-t négy törzs (HUN/2012/2, HUN/2012/115, HUN/2012/126 és HUN/2012/135) esetében sikerült meghatároznunk, ezek hossza 42 és 60 nt között változott. A 3' UTR-t mind a hat törzs esetében megszekvenáltuk, ezek hossza 49 és 100 nt között alakult. Az AstV törzseink általános genomi jellemzőit a 15. táblázat foglalja össze.

A kódoló szakaszok szerkezete az AstV-kra jellemző képet mutatta. Három, egymással átfedő ORF-et tartalmazott, amelyek a szerkezeti és nem-struktúrális fehérjéket kódolják. A jóslott genom felépítését a HUN/2012/115-ös törzsön keresztül a 2. ábra szemlélteti.

15. táblázat: Az AstV törzseink genomi jellemzői.

Az ORF1 és ORF2 gének esetében a hosszukat az addicionális start kodon figyelembevételével határoztuk meg. Ezt az értéket az ORF1b/ORF2 gének átfedésben is meghatároztuk. Szimbólumok: * részleges szekvencia; + addicionális ATG kodon 18 nt-dal balra, 5' irányban (25-27 nt) az ORF1a gén start kodonja előtt, ++: az ORF1a gén addicionális start kodonja miatt az ORF1a-ból jóslott fehérje 6 as-val hosszabb lehet; - nem elérhető adat.

Törzs neve	5' UTR	ORF1a	ORF1b	1a/1b	ORF2	1b/2	3'UTR	Szekvencia hossza	GenBank azonosító
HUN/2012/8	-	-	770*	-	2328/ 2469	11/52	100	3187*	KX599354
HUN/2012/2	60	2670	1530	43	2295/ 2475	8/188	83	6587	KX599349
HUN/2012/6	19*	2670	1530	43	2325/ 2505	8/188	83	6576*	KX599350
HUN/2012/115	45	2670	1530	43	2292/ 2472	8/188	83	6569	KX599351
HUN/2012/126	24/42 ⁺	2667/ 2685 ⁺⁺	1530	43	2298/ 2478	8/188	49	6535	KX599352
HUN/2012/135	45	2670	1530	43	2292/ 2472	8/188	85	6571	KX599353



2. ábra: A HUN/2012/115 CastV törzs sematikus felépítése.

A felső vonal jelzi a teljes genom hosszát az 5' és 3' UTR-rel, poli(A) farokkal együtt. A csúszós heptamer (AAAAAAC) és azt azt követő stem-loop (szár-hurok) szerkezeti elem és a sgRNS kezdő nukleotidjának relatív helyzete nyíllal van jelölve. Az ábra alján a zöld, téglavörös és sárga téglalapok a három ORF-et jelölik, az alternatív ORF1b és ORF2 termékeket pirossal és narancssárgával jelöltük. A fehérjék kezdő motívumait, valamint az ORF2 által kódolt fehérje végén lévő motívumot is kiemeltük. A lehetséges transzmembrán motívumok (TM), a predikált proteáz motívum (PRO), a genomhoz kötött fehérje (VPg) és a polimeráz régió (POL) sötétzölddel van jelölve.

6.2.2. Az ORF1a elemzése

Az ORF1a 2670 nt méretű volt minden AstV törzsben, a HUN/2012/126 minta kivételével, és egy 889 as hosszú poliproteint kódolt. A HUN/2012/126 törzs esetében egy azonos leolvasási keretben lévő, alternatív start kodont is azonosítottunk 18 nt-dal balra, 5' irányban, így a leolvasási keret hossza 2667 vagy 2685 nt volt a start kodontól függően. A keret-elcsúszást jelölő szignált („csúszós” heptamer; AAAAAAC szekvencia) a 2622-2628 nukleotid pozíciók (a HUN/2012/126 törzsnél 2619/2637 nt) között azonosítottuk, mely szekvencia után az ORF1b kezdődött. A meghatározott fehérjén astrovírusokra jellemző konzervatív doméneket tudtunk azonosítani. Az astrovírus szerin-proteáz motívum 439 és 583 aminosav pozíciók között helyezkedett. Öt transzmembrán motívumot azonosítottunk, rendre a 151-168, 240-266, 287-313, 319-339 és 351-380 aminosav pozícióknál. Egy lehetséges coiled coil (dugóhúzó) domént is felismertünk 595-616 aminosav és 635-656 aminosav pozícióknál.

Az általunk meghatározott CAstV törzsek (HUN/2012/2, -6, -115, és -135) szekvenciáit egymással összehasonlítva a 96-99% közötti nukleotid hasonlóságot mutattunk ki. A HUN/2012/126 törzs legfeljebb 74%-os nukleotid hasonlóságot mutatott az CAstV törzseinkkel. A nem kutya eredetű AstV törzsekkel az általunk vizsgált hazai CAstV szekvenciák lényegesen kisebb (33-51%) azonosságot mutattak nukleotid szinten.

6.2.3. Az ORF1b elemzése

Az ORF1b 1530 nukleotid méretű volt minden törzsnél, ahol sikerült meghatároznunk a teljes kódoló szekvenciát (ld. 15. táblázat). A HUN/2012/8 törzsnél az ORF1b egy 770 nt hosszú szakaszt sikerült meghatároznunk. Az ORF1b a „csúszós” heptamer utolsó bázisával kezdődik, a leolvasási keret -1-gyel elcsúszik az ORF1a-hoz képest. Az ORF1b egy 509 aminosav hosszú fehérjét, az RNS-függő RNS polimerázt (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) kódolja. Az ORF1b-ben rendkívül konzervatív „nyél-hurok” szerkezetet (stem-loop structure) azonosítottunk (Caddy and Goodfellow, 2015). Az RdRp domén 168 és 373 aminosav pozíciók között helyeződik, benne a konzervatív motívumok beazonosíthatók: 321 as - GNPSG, 364 as - YGDD és 391 as - FGMWVK.

A szekvenciák összehasonlítását az ORF1b 3' végén helyeződő 415 nukleotid hosszú szakasz alapján végeztük. A HUN/2012/2, -6, -115 és -135 98-99% nukleotid (99% as) hasonlóságot mutatott egymással, míg egyéb CAstV törzsekkel 96-99%-ban egyezett nukleotid szinten (99% as). A HUN/2012/126 törzs a legnagyobb hasonlóságot egy olaszországi CAstV törzssel (ITA/2010/Zoid) mutatta (99% nt, 99% as), míg egyéb CAstV törzsekkel 85-86% nukleotid és 87-88% aminosav azonosságot határoztunk meg. A HUN/2012/8 leginkább egy nyérc AstV-ra hasonlított (68% nt azonosság, 70% as

azonosság), míg egyéb CAstV-okkal való hasonlóság jelentősen kisebb volt (56-58% nt, és 50-52% as).

6.2.4. Az ORF2 elemzése

Az ORF2 változó hosszúságú volt a különböző AstV törzsekben. Egy kivételével az összes elemzett törzsben az ORF1b és az ORF2 nyolc nukleotid hosszúságban fedte egymást. A HUN/2012/8-as törzsben ez az átfedés 11 nukleotid hosszúságú volt. Emellett volt egy második, ugyanabban a leolvasási keretben található start kodon 180 nukleotid pozícióval balra, 5' irányban, ez a jelenség más Mamastrovirus genomokban is megfigyelhető. Egyedülállóan, a HUN/2012/8 törzs esetében ez az addicionális ATG kodon 141 nukleotid pozícióval előrébb helyeződött.

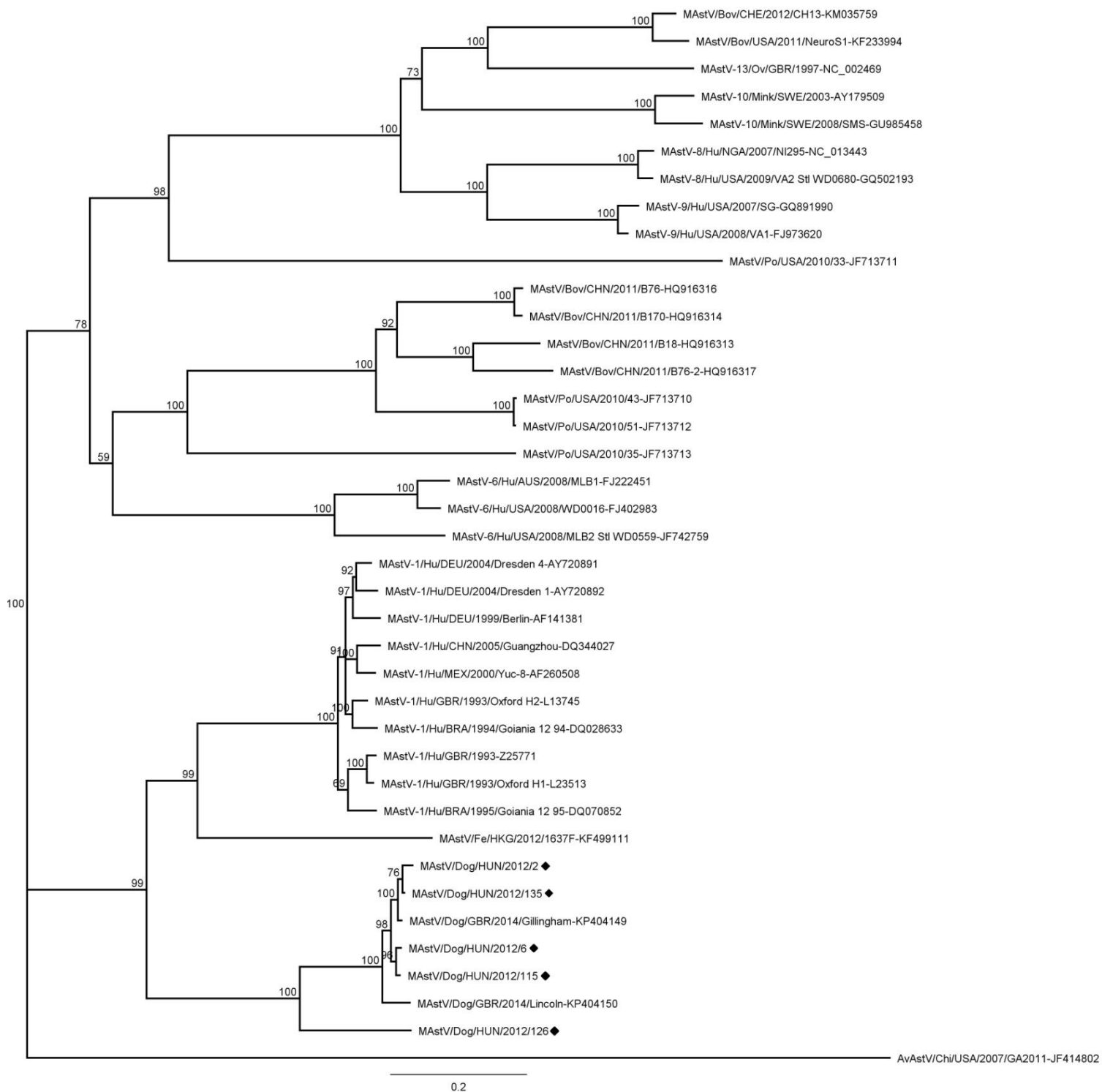
Szekvencaegyezés szempontjából vizsgálva a magyarországi CAstV törzseket a HUN/2012/2 és HUN/2012/135 törzsek nagymértékben hasonlítottak egymáshoz (92% nt, és 96% as hasonlóság), egyes kínai CAstV törzsekhez (91-96% nt, 95-99% as hasonlóság), továbbá egy nagy-britanniai CAstV törzshöz (GB/2014/Lincoln, 91-95% nt, 95-99% as hasonlóság). A HUN/2012/6 törzs legnagyobb hasonlóságot olaszországi és egy nagy-britanniai törzsekkel mutatta (ITA/2005/3, ITA/2005/6, ITA/2005/8, GBR/2014/Gillingham), 91-95% nukleotid, 96-98% aminosav szinten. A HUN/2012/126 törzs az ITA/2010/Zoid törzsszel mutatta a legnagyobb hasonlóságot nukleotid és aminosav szinten (97%, 98%) egyaránt. A HUN/2012/115 törzs szintén az ITA/2010/Zoid törzshöz állt a legközelebb (79% nt, 79% as hasonlóság), míg egyéb a hasonlósági vizsgálatba bevont törzsekkel 72-75% nukleotid hasonlóság, 75-80% aminosav hasonlóság volt megfigyelhető. A HUN/2012/8 törzs érdekes módon egy nyérc AstV-sal mutatta a legnagyobb, de összességében így is mérsékeltnek mondható szekvenca egyezést (63% nt, 64% as hasonlóság).

6.2.5. A kutya astrovírusok filogenetikai jellemzése

A filogenetikai jellemzéseket ORF1a, ORF1b és ORF2 nukleotid szekvenciák összerendezéséből készítettük. Az ORF1a és ORF2 szekvenciaillesztések a teljes kódoló szekvenciából készültek. Az ORF1b szekvenciaillesztés a leolvasási keret 3' végén található 415 nukleotid (138 as) hosszú szakaszából készült.

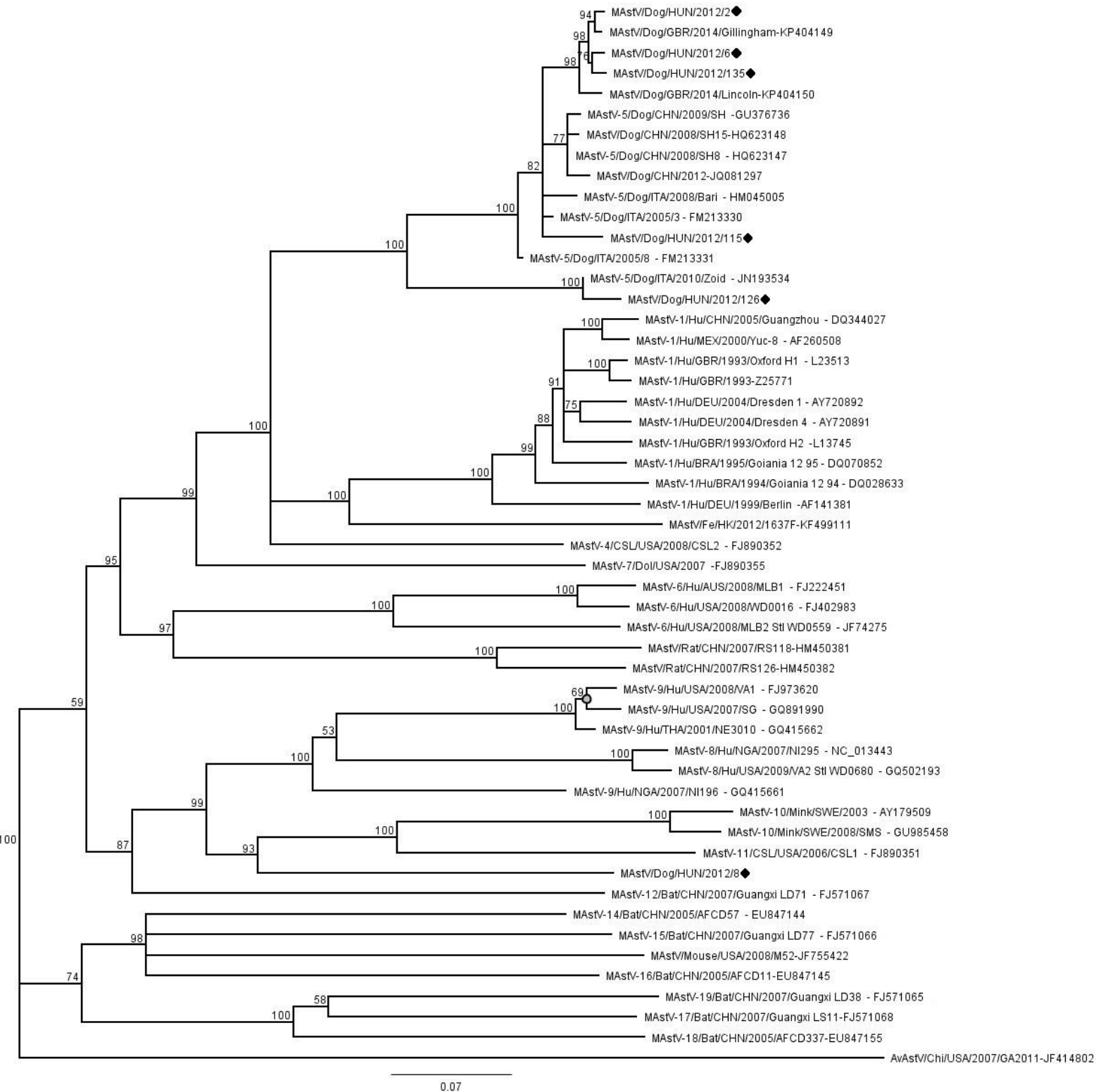
Az ORF1a elemzésében (3. ábra) összesen hét CAstV törzset tudunk vizsgálni (öt saját és kettő egyesült királyságbeli törzs), mivel több kutya eredetű törzs nem található a GenBankban. A kutya astrovírusok egy monofiletikus csoportot alkottak, mely két ágból állt, és a HUN/2012/126 egy külön ágon volt található, bazális pozícióban. Az ORF1b filogenetikai jellemzésébe bevont szekvenciák számát növelni tudtuk, így megerősítést nyert az ORF1a fánál megfigyelt mintázat. Négy törzs (HUN/2012/2, -6, -115, -135) egy csoportot alkotott a legtöbb európai és Európán kívüli CAstV törzsszel, míg a HUN/2012/126 törzsünk a virulens olaszországi törzsszel, ITA/2012/Zoiddal került egy ágra (4. ábra). A HUN/2012/8

törzs távolabb helyeződött a többi CAstV törzstől és egy csoportot képezett nyérc és kaliforniai oroszlánfóka AstV-ekkel. Ez az egyedülálló mintázat az ORF2 (kapszid) nt szekvenciák elemzésében (5. ábra) is megfigyelhető volt. Az ORF2 elemzése képezi alapját az AstV-ok rendszertani besorolásának és jellemzésének. Nagyszámú *Mamastrovirus 5* fajba sorolt CAstV törzs vizsgálatakor (Schultz-Cherry, 2013) megfigyelhető volt, hogy a csoporton belül legalább hat alcsoport különül el. Az összes kínai törzs, a nagy-britanniai GBR/2014/Lincoln törzs, valamint a HUN/2012/2 és a HUN/2012/135 egy egyedülálló csoportot alkot, ahol a csoporton belül a nt hasonlóság több mint 91%. A második csoportba olaszországi törzsek tartoztak (ITA/2005-3, ITA/2005-6 és ITA/2005-8), valamint a nagy-britanniai GBR/2014/Gillingham és a magyarországi HUN/2012/6 törzsek, a nukleotidszintű hasonlóság szintén több mint 91%. A harmadik csoport a virulens ITA/2010/Zoid és a HUN/2012/126 törzseket tartalmazza, 97%-os csoporton belüli nukleotidszintű hasonlósággal. Egyéb CAstV törzsek (GBR/2014/Braintree, GBR/2014/Huntingdon, HUN/2012/115) a fenti törzsek között helyeződtek el, külön alcsoportokat alkotva.



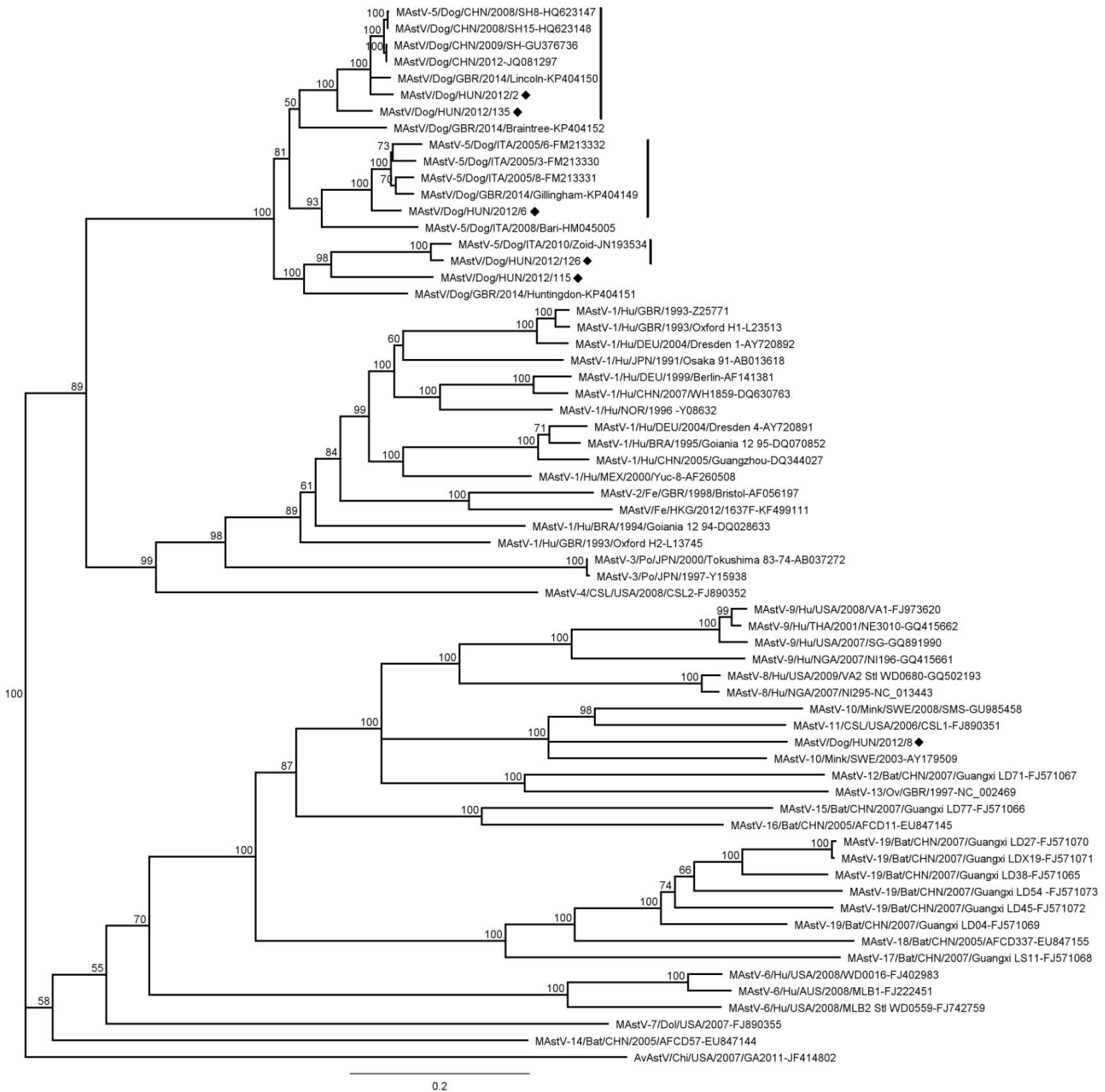
3. ábra: ORF1a fa

A filogenetikai elemzés a teljes ORF1a génnel (2670 nt) történt, kutya AstV és egyéb emlős AstV-k bevonásával. A fát *neighbor-joining* módszerrel, Jukes Cantor távolság korrekciós algoritmussal készítettük, 1000 mintavétellel. Saját törzseinket fekete rombuszsal jelöltük meg.



4. ábra: ORF1b fa

A filogenetikai elemzés a részleges ORF1b génnel (415 nt) történt, kutya AstV és egyéb emlős AstV-k bevonásával. A fát *neighbor-joining* módszerrel, Jukes Cantor távolság korrekciós algoritmussal készítettük, 1000 mintavétellel. Saját törzseinket fekete rombuszsal jelöltük meg.



5. ábra: ORF2 fa

A filogenetikai elemzés a teljes ORF2 génnel (2292 nt) történt, kutya AstV és egyéb emlős AstV-k bevonásával. A fát *neighbor-joining* módszerrel, Jukes Cantor távolság korrekciós algoritmussal készítettük, 1000 mintavétellel. Saját törzseinket fekete rombuszsal jelöltük meg. A szövegben kiemelt csoportokat függőleges vonallal jelöltük a fa jobb oldalán.

6.3. Kutya calicivírus

6.3.1. A minták calicivírus RT-PCR szűrése

Kutya calicivírus RNS-t a minták 3,9%-ban (3/76) mutattuk ki RT-PCR módszerrel. Bár a vizsgálati rendszert humán calicivírusok általános kimutatására fejlesztették ki (Jiang et al., 1999); későbbi vizsgálatokban állati calicivírusokra (noro-, sapo-, és vesivírusok) is érzékenynek bizonyult a módszer (L'Homme et al., 2009; Martella et al., 2015; Smiley et al., 2002). A három calicivírusra pozitív minta PCR termékeinek szekvenálása után egy mintát (HUN/2012/528) vesivírusként azonosítottuk, míg a másik kettő (HUN/2012/7 és HUN/2012/64) norovírus volt.

A HUN/2012/7 törzs magas (92%) nukleotid hasonlóságot mutatott a dog/170/02/ITA (EU224456) törzssel, bár egy rövidebb szakaszon costa ricai kutya norovírussal mutatta a legnagyobb szekvencia azonosságot (KM057712- 97%, KM057713- 96%; KM057714- 96%). A HUN/2012/64 törzs legnagyobb szekvencia azonosságot (98% nt) egy olaszországi kutya norovírus törzssel mutatott (dog/FD53/2007/ITA, JF930689). A HUN/2012/528 vesivírus PCR szekvencia 94% nukleotid hasonlóságot mutatott a Geel 2008/Belgium (GQ475303) törzssel, egy sejtvonali kontamináns calicivírus izolátummal.

6.3.2. A HUN/2012/528 vesivírus törzs elemzése

A vírusmetagenomikai vizsgálat során a HUN/2012/528 mintából, amely hasmenéses felnőtt ebtől származott, koronavírus (30 szekvencia részlet), vesivírus (17 szekvencia részlet), rotavírus (12 szekvencia részlet), picodisticrovírus (kettő szekvencia részlet), astrovírus (egy szekvencia részlet) és kobuvírus (egy szekvencia részlet) volt azonosítható. Ismételt futtatásokkal sikerült meghatározni a HUN/2012/528 vesivírus törzs részleges genomját.

A HUN/2012/528 vesivírus törzs részleges kódoló szekvenciájának a hossza 8270 nukleotid volt (kb. a genom 98%-a, a CU/296/15/USA törzshöz hasonlítva). A teljes 3' UTR 162 nukleotid hosszú volt, nem számolva a poli(A) farkat. A meghatározott szekvencia GC tartalma 47,56% volt. Az RNS genom három nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmazott. Az ORF1-et részlegesen sikerült meghatározni, egy 5790 nukleotid hosszú részt azonosítottunk. Az így kapott szekvencia a nem-szerkezeti fehérje részleges aminosav szekvenciáját kódolta (1929 as hosszú). Ezen a fehérjén calicivírusokra jellemző konzervatív doméneket sikerült azonosítani; helikáz motívumot 597-753 as között; ATPáz domént 615-742 as pozíciók között; 1256-1372 as pozíciók között peptidáz domént, míg 1428-1897 as pozíciók között az RdRp domént, 1643-1768 as pozíciók között pedig az RdRp katalitikus domént sikerült azonosítani. Az ORF2 ugyanabban a leolvasási keretben, 3 nukleotiddal a genom RNS 3' vég irányában eltolódva kezdődött, 2076 nt hosszúságúnak bizonyult és a

691 aminosavból álló kapszid fehérjét kódolta; a kapszid domén 151-430 aminosav pozíciók között volt beazonosítható. Az ORF2 által kódolt fehérjén konzervatív kapszid hasító motívumot (FRAES) azonosítottunk 155-159 as pozíciók között. A harmadik, legkisebb nyílt leolvasási keret, az ORF3 405 nukleotid hosszú volt és a 134 aminosav hosszú minor strukturális proteint kódolta; ez a leolvasási keret +2 nukleotiddal elcsúszott a többi ORF-hez képest (6. ábra, A panel). Az ORF2 és az ORF3 között 4 nukleotidos átfedés volt (ATGA), melyben az ATG az ORF3 start kodonja, míg a TGA az ORF2 stop kodonja volt.

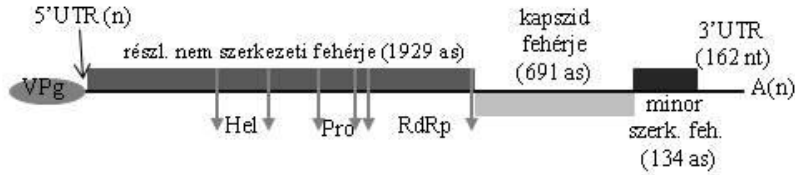
6.3.3. Az HUN/2012/528 vesivírus törzs filogenetikai elemzése

Filogenetikai elemzést és p-distance mátrixot készítettünk a három nyílt leolvasási keretből származtatott fehérje aminosav sorrendje alapján, hogy törzsünk filogenetikai helyzetét feltérképezzük. Az részleges ORF1 által kódolt nem-szerkezeti fehérje aminosav szekvenciájának elemzésekor a legközelebbi rokon törzs egy olaszországi kutya vesivírus (Dog/Bari/212/07/ITA) és egy amerikai egyesült államokbeli kutya vesivírus törzs volt (CU/296/15/USA); ezekkel a törzsekkel a maximális aminosav hasonlóság 99,5% volt. Az elemzésbe bevont törzsek 98,2-80,3%-os hasonlóságot mutattak a hazai kutya vesivírussal (6. ábra, A-C panel). A nem-strukturális fehérje a legjobban megőrzött a kódolt fehérjék között.

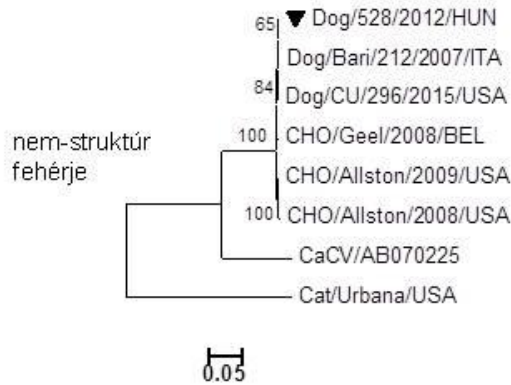
A kapszid fehérje aminosav sorrendje és annak szekvencia hasonlósági jellemzői képezik alapját a vírustörzsek besorolásának. A HUN/2012/528 vesivírus törzs 84,8-91,5% aminosav hasonlóságot mutatott a sejtvonal kontamináns vesivírus törzsekkel (87,4%-Allston/2009/USA, 88,3%-Allston/2008/USA, 91,2%-Geel/2008/BEL, 86,5-2117/DEU), a Binn és mtsai által II-es típusba sorolt kutya vesivírus törzsekkel (3-68, W191R), valamint a CU/296 törzsszel (hasonlóság 86,9-92,3%). Ugyanakkor a 48-as referencia kutya vesivírústörzsszel végzett összehasonlításban mindössze 70,3%-os as hasonlóság volt észlelhető (6. ábra, A-C panel).

A minor szerkezeti fehérje aminosav szekvencia filogenetikai elemzése is hasonló eredménnyel szolgált, mint a kapszidé. A törzsünk 98-100%-os as egyezést mutatott a sejt kontamináns vesivírus törzsekkel, valamint a virulens olaszországi és egyesült államokbeli törzsekkel, míg a 48-as referencia törzsszel 81,2%-os as szekvencia hasonlóságot mutatott (6. ábra, A-C panel).

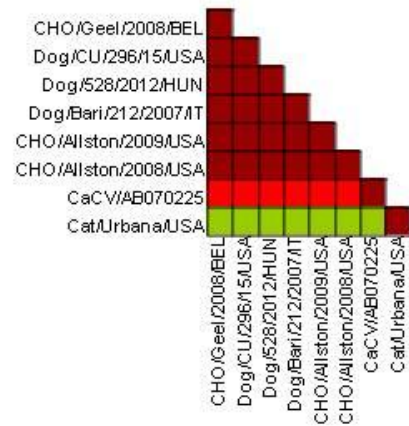
A



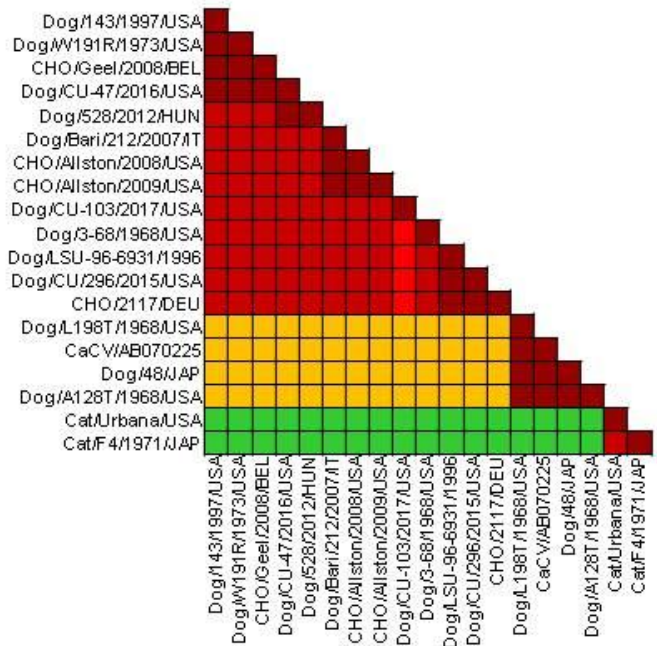
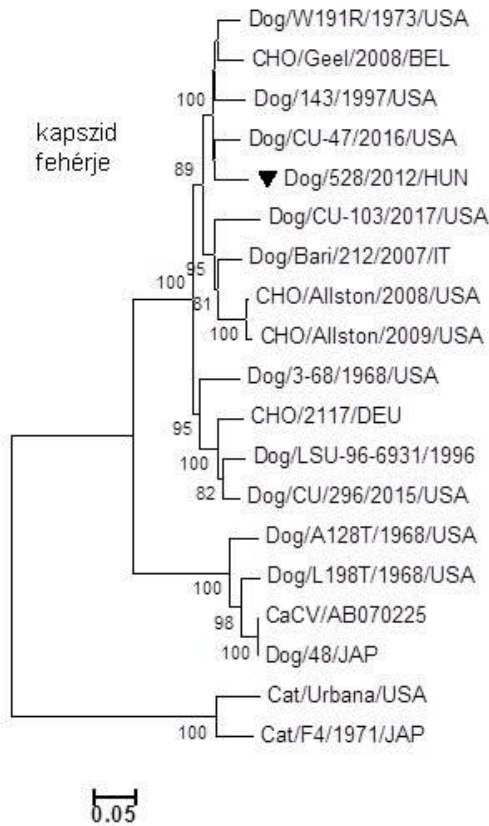
B

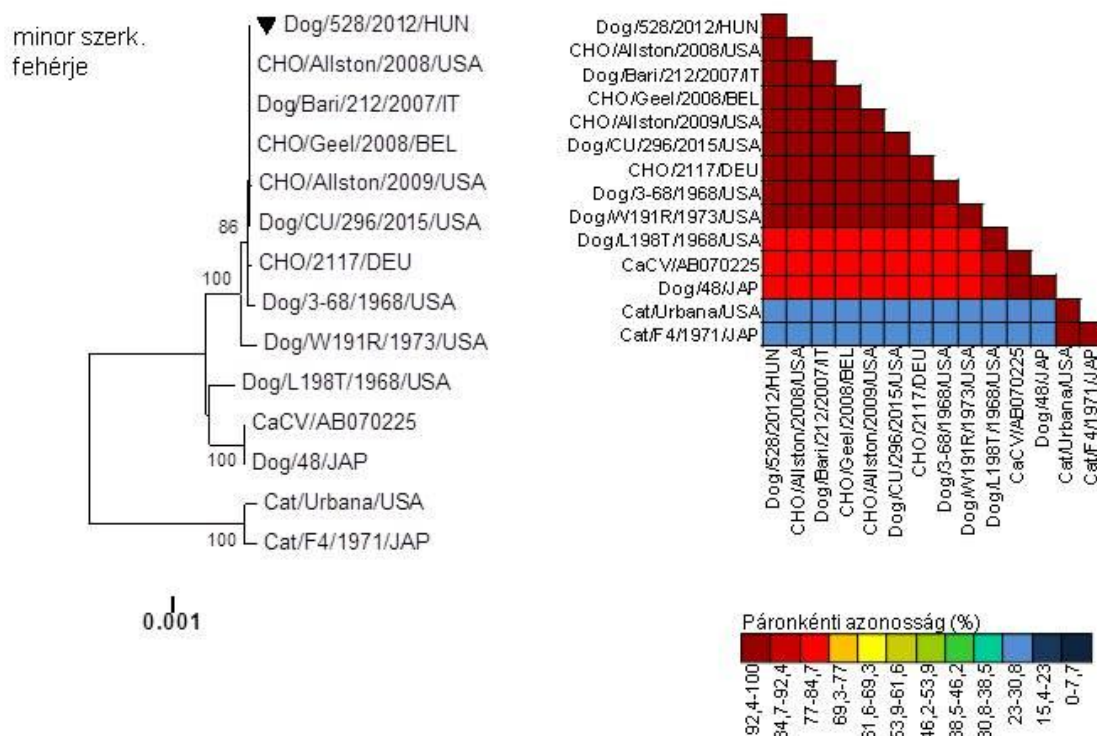


C



kapszid
fehérje





6. ábra: A HUN/2012/528 vesivírus törzs elemzése.

Panel A: A HUN/2012/528 törzs genomjának sematikus szerkezete. VPg: genomhoz kötött virális fehérje, Hel: helikáz. Prot: proteináz. RdRp: RNS dependens RNS polimeráz, UTR: nem-kódoló régió, A_(n): poli-adenin farok.

Panel B: Ugyanezen törzsek bevonásával készült aminosav alapú filogenetikai fák (nem szerkezeti fehérje – 1929 as; kapszid fehérje – 691 as; minor szerkezeti fehérje 134 as). Az evolúciós kapcsolatokat *neighbor-joining* módszerrel térképeztük fel, bootstrap érték: 500.

Panel C: A nem-szerkezeti fehérje, a kapszid fehérje és a minor strukturális fehérje p-distance ábrázolása, az elemzésbe a saját törzsünk (fekete háromszöggel jelölve) és válogatott vesivírus törzsek szerepelnek. Az elemzést a MEGA6 programmal végeztük.

6.4. Kutya kobuvírus

6.4.1. A CaKoV pozitív minták általános tulajdonságai

A 76 vizsgált bélsármintából összesen 11 bizonyult kobuvírus pozitívnak RT-PCR vagy metagenomikai módszerrel (14,47%). Az RT-PCR rendszer saját fejlesztésünk, RdRp és VP1 genomi régiókra illeszkedő két-két primerpárt terveztünk. A kobuvírus pozitív minták tulajdonságait a 16. táblázatban foglaljuk össze.

16. táblázat: A kobuvírus pozitív minták tulajdonságai

Minta név	Mintagyűjtés dátuma	Az eb kora	Hasmenéses tünetek	PCR szűrés eredménye	Kobuvírus readok száma*
HUN/2012/2	2012.01.20	5 hét	igen	pozitív	96
HUN/2012/4	2012.01.26	5 hét	igen	negatív	5
HUN/2012/6	2012.02.03	8 év	nem	negatív	20
HUN/2012/8	2012.02.10	4 hó	igen	pozitív	0
HUN/2012/64	2012.04.06	fiatal (6-15 hó)	nem	pozitív	-
HUN/2012/123	2012.04.27	6 hó	nem	pozitív	0
HUN/2012/125	2012.02.10	4 hónap	igen	pozitív	1
HUN/2012/174	2012.05.31	10 hetes	igen	pozitív	0
HUN/2012/175	2012.06.05	6 hét	nem	pozitív	16
HUN/2012/497	2012.08.03	4 év	nem	pozitív	-
HUN/2012/528	2012.09.07	2 év	igen	negatív	1

*: 0: nulla read kobuvírusra, -: a mintán nem végeztünk metagenomikai vizsgálatot

6.4.2. Metagenomikai módszerekkel kimutattott CaKoV törzs jellemzése

Vírus metagenomikai módszerekkel összesen hat mintában sikerült kobuvírus szekvencia részleteket azonosítani, amelyek közül egy mintából (HUN/2012/2) párhuzamos futtatásokban generált adatok összegzésével, és a konszenzus végek kiterjesztésével a teljes genomból egy 8279 nt hosszú szakaszt határoztunk meg. A HUN/2012/2 mintában detektáltunk még AstV-t (717 szekvencia részlet), és CCoV-t (169 szekvencia részlet). A szekvenciában egy 2444 as hosszú poliprotein prekuzort azonosítottunk. A kódoló szakasz nagyfokú hasonlóságot mutatott a GenBankban megtalálható CaKoV 1 szekvenciákkal (92,2-94,8% nt szinten, 97-99,4% as szinten). A magyarországi CaKoV szekvencia a legnagyobb hasonlóságot egy (UK003; KC161964) egyesült királyságbeli törzssel mutatta.

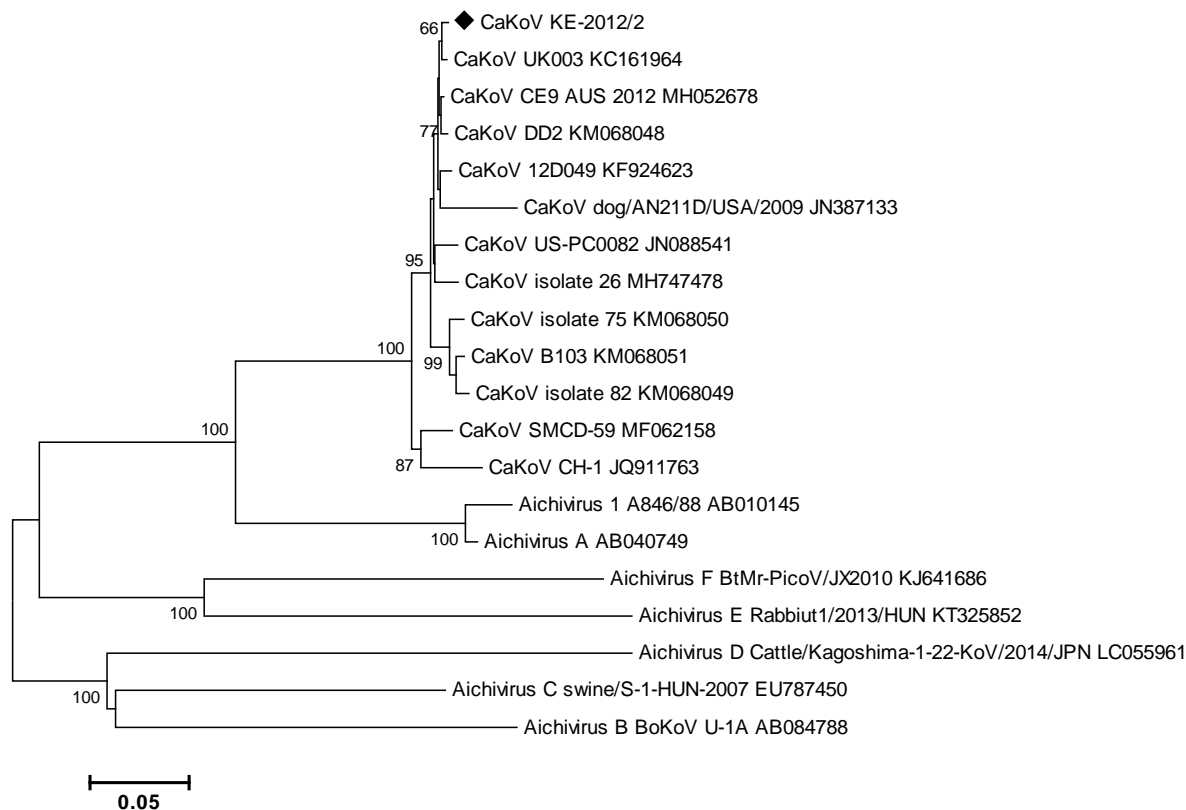
A kódoló szekvencia GC tartalma 58,7% (A=19,89%; T=21,36%; C=38,04%; G=20,71%) volt. Az 5' UTR 710 nukleotid hosszú és ez 95,7%-ban hasonlított a DD2 CaKV törzs azonos genomi régiójára.

A 3' UTR 236 nukleotid hosszú szakaszát sikerült meghatároznunk, a legnagyobb hasonlóságot az UK003 (97%) törzssel mutatta. A 3'UTR-en a súlyzó jellegű („barbell-like”) másodlagos szerkezetet sikerült azonosítanunk (Boros et al., 2012). A megjósolt fehérje

hasítási helyek hasonlóak voltak a homológ CaKoV-kban leírtakhoz. Egyedüli különbség a VP1 és 2A fehérje közti hasító helynél mutatkozott; itt a legvalószínűbb hasítási hely Q/G, nem pedig Y/V, amint azt előző tanulmányokban leírták (Olarde-Castillo et al., 2015). A genom szerkezete megegyezett a nemzetség többi tagjával: VPg+5'UTR[L/P1(VP0-VP3-VP1)-P2(2A^{H-box/NC}-2B-2C^{Hel})-P3(3A-3B^{VPg}-3C^{Pro}-3D^{Pol})-3'UTR.

A vezető (leader) fehérje 171 aminosav hosszú, hat ciszteint és négy hisztidint tartalmazott, amely aminosavak valószínűleg a papain-szerű proteáz katalitikus diádjának vagy triádjának tagjai (Gorbalenya et al., 1991). Ugyanakkor a kimotripszin-szerű proteáz aktivitásra jellemző GXCG motívum nem volt azonosítható (Gorbalenya et al., 1989). A VP0 kapszid fehérje N-terminálisán egy mirisztilációs motívumot sikerült azonosítanunk, G₁₇₂NSVT (GXXXT/S) (Chow et al., 1987). A 2A régióban a konzervatív H-boksz/NC motívumok, H₁₀₅₆WAL és N₁₁₁₈CTHFV motívumok, valamint transzmembrán domének voltak azonosíthatóak. A 2C fehérjén, más picornavírusokhoz hasonlóan a G₁₄₆₁PPGTGKS (GXXGXGKS) NTP kötő motívum (Gorbalenya et al., 1990), és a helikáz aktivitáshoz nélkülözhetetlen D₁₅₁₂DIGQ (DDLXQ) motívum volt meghatározható (Lau et al., 2012). A 27 aminosav hosszú VPg fehérje tirozin maradványt tartalmazott a harmadik pozícióban. A szerin típusú 3C proteáz (3C^{Pro}) a picornavírusok között konzervatíván megőrzött katalitikus triádot tartalmazott, hisztidinből (PTH₁₈₂₈L-[H₄₂]), aszparaginsavból (D₁₈₇₀MMR-[D₈₄]) és ciszteinből (GLC₁₉₂₉G-[C₁₄₃]) állt. A proteáz aktív helyét a G₁₉₂₇LCG (GXCG) motívum alkotta (Gorbalenya et al., 1989), azonban a K[F/Y]RDI RNS-kötő motívum hiányzott (Hämmerle et al., 1992). Más PV-khoz hasonlóan a 3C polimerázon (3C^{Pol}) a Y₂₃₀₄GDD, a K₂₁₃₆DER (KDE[L/I]R), a G₂₂₆₃GNPSG (GG[L/M/N]PSG) és a F₂₃₅₃LKR motívumok megtalálhatóak voltak (Sauvage et al., 2012).

Filogenetikai számításokat végeztünk, hogy megvizsgáljuk a CaKoV törzsünk helyzetét a kobuvírusok között. A számításunk alapját a poliprotein P1 régiójának aminosav sorrendje képezte (7.ábra). A filogenetikai fán a magyarországi CaKoV a többi CaKoV törzssel együtt csoportosult monofiletikus ágat alkotva. Az Aichivirus A állt legközelebb a CaKoV-khoz az ICTV által elfogadott Aichi vírus fajok közül. A HUN/2012/2 CaKoV jól elkülönült a *Kobuvirus* nemzetség többi tagjától, az Aichivirus B, C, D, E, F fajoktól.



7. ábra: A P1 régió aminosav szekvenciája (858 as) alapján készített filogenetikai fa, mely a *Kobuvirus* génuszon belüli kapcsolatokat mutatja be, hangsúlyozva a kutya kobuvírusokat. A fát *neighbor-joining* módszerrel, Jukes-Cantor algoritmus segítségével készítettük. Bootstrap érték 1000. A bal alsó sarokban a lépték a pozícionkénti aminosav szubsztitúciót jelöli. Saját CaKoV törzsünket fekete rombuszsal jelöltük.

6.5. Kutya rotavírus C

A vírus-metagenomikai vizsgálatok során egy tíz hetes, hasmenéses kutya bélsármintájából (HUN/174/2012) sikerült kimutatnunk *Rotavirus C*-vel rokon szekvencia részleteket. Az online adatbázisokban mindeddig nem töltöttek fel kutya RVC törzs szekvenciát, így megkíséreltük a teljes kódoló szekvencia összeszerelését. A meghatározott törzs szekvenciája egyedi volt, és határozottan elkülönült a humán, sertés és szarvasmarha RVC törzsektől.

Az előzetes metagenomikai adatelemzésen a mintánkban 24 szekvencia részlet parvovírusokra, tíz szekvencia részlet *rotavirus A*-ra, míg 377 szekvencia részlet humán, szarvasmarha és sertés referencia RVC genomokra hasonlított. A továbbiakban a törzs genomját szinte teljes egészében megszekvenáltuk, összesen 11826 szekvencia részletet kaptunk párhuzamos futtatásokból. A VP3 és a VP4 gén 3' végét, valamint a VP1 és VP5 gén 5' végét metagenomikai módszerekkel csak részlegesen tudtuk meghatározni. Így e szakaszok nukleotid sorrendjét RNS ligálás és hagyományos szekvenálás kombinációjával

determináltuk (Mihalov-Kovács et al., 2015a). A kapott genom szekvencián a contigok átlagos lefedettsége elfogadható tartományban mozgott (VP6 esetében a legkevesebb: 65×, NSP3 esetében a legtöbb: 194×).

A törzsünk általános tulajdonságait a 17. táblázatban foglaltuk össze. A vizsgált RVC törzs genomja 11 fehérjét kódolt, hat szerkezeti fehérjét, valamint öt nem-szerkezeti fehérjét. A strukturális fehérjék a genomi dsRNS-t körülvevő háromrétegű fehérjeburkot alkotják, míg a nem-szerkezeti fehérjék a dsRNS replikációban, transzkripcióban, sejtszintű kórfejlődésben és a víruspartikulák érési folyamatában vesznek részt (Pesavento et al., 2006). 11 RNS szegmenst és az ORF-eket összehasonlítottuk humán, sertés és szarvasmarha RVC referencia törzsekkel (Függelék, F1. táblázat). A VP7 génből származtatott aminosav szekvencia kissé hosszabb volt, mint azt a humán, szarvasmarha és sertés referencia törzsek esetében láttuk (337 as vs. 332 as). A VP6, az NSP2 és az NSP3 aminosav szekvenciájának mérete megegyezett a más fajokból származó megfelelőjével (VP6, 395 as, NSP2, 312 as, NSP3, 402 as). A kutya RVC törzs, valamint a humán, sertés és szarvasmarha RVC törzsek közötti nt szekvencia hasonlósági értékeket és a génenkénti genotípusokat a 18. táblázatban foglaljuk össze. Röviden, a nukleotid szekvencia hasonlóságok összességében 67-84% között mozogtak az RVC törzsek génjei között. A referencia törzsekhez hasonlítva a legkisebb szekvencia azonosságot az NSP1 és NSP4 esetében figyeltük meg (67-87%, valamint 67-77%), míg a legnagyobb szekvencia azonosságot az NSP2-nél találtuk (79-84%).

17. táblázat: A magyarországi kutya RVC törzs génjeinek egyes tulajdonságai.

Kódolt fehérje (szegmens név)	GenBank azonosító	Kódoló szekvencia (nt/as)	Lehetséges molekuláris funkció az RVA homológiájára alapozva
NSP1 (5. szegmens)	KP988019	1182/393	nem teljesen tisztázott
NSP2 (8. szegmens)	KP988020	939/312	RNS-kötés, hidroláz aktivitás
NSP3 (7. szegmens)	KP988021	1209/402	dsRNS-kötés (5'-GACC-3' motívum felismerés)
NSP4 (10. szegmens)	KP988022	453/150	enterotoxin
NSP5 (11. szegmens)	KP988023	633/210	Mg-ion kötés, ATPáz aktivitás
VP1 (1. szegmens)	KP988013	3273/1090	RdRp
VP2 (2. szegmens)	KP988014	2646/881	virális nukleokapszid
VP3 (3. szegmens)	KP988015	2082/693	guanilil- transzferáz; GTP kötés
VP4 (4. szegmens)	KP988016	2208/735	tüske fehérje, külső kapszid réteg alkotója

Kódolt fehérje (szegmens név)	GenBank azonosító	Kódoló szekvencia (nt/as)	Lehetséges molekuláris funkció az RVA homológiájára alapozva
VP6 (6. szegmens)	KP988017	1188/395	külső kapszid réteg alkotója
VP7 (9. szegmens)	KP988018	1014/337	glikoprotein, külső kapszid réteg alkotója

18. táblázat: A KE174/2012 kutya RVC törzs nukleotid hasonlósági értékei génenként sertés, szarvasmarha és humán referencia törzsekhez viszonyítva.

Szegmens	Nukleotid szekvencia hasonlóság heterológ RVC törzsekkel (%)			Cut-off értékek (%)	Általunk meghatározott genotípus	Suzuki és mtsa. szerint feltételezett genotípus (2017.)
	humán (Bristol)	sertés (Cowden)	szarvasmarha (Shintoku)			
VP7	76.2-76.9	73.0-78.3	76.7	85	G10	G11
VP4	71.2-71.9	71.9-75.3	76.0-76.3	85	P8	P11
VP6	80.1-80.8	79.9-83.2	84.1-84.3	87	I8	I8
VP1	80.0-80.3	80.3	81.6-81.9	84	?	R4
VP2	78.1-78.9	79.8	80.6-81.2	85	?	C4
VP3	76.2-78.8	76.6	79.9-81.0	85	?	M5
NSP1	67.2-68.1	74.5	76.5-78.3	84	?	A4
NSP2	79.1-80.9	81.6	83.2-84.2	87	?	N4
NSP3	78.3-79.7	78.7	81.4-82.2	85	?	T4
NSP4	67.2-70.2	75.5-77.3	67.4-68.3	81	?	E4
NSP5	76.6-77.1	80.9	80.2-82.9	80	?	H4

A cut-off értékeket, amely alapján törzsünk genotípusát meghatároztuk az alábbi publikációból adaptáltuk: Suzuki et al. 2017.

A VP4, VP6 és VP7 gének filogenetikai elemzése során bizonyítást nyert, ami már a hasonlósági számítások során sejthető volt, hogy a KE174/2012 törzs külön csoportot képez az eddig leírt genotípusok között. Mindhárom fa esetében a törzsünkhöz legközelebb szarvasmarha RVC törzsek álltak. A többi nyolc fa esetében a humán, a sertés és a szarvasmarha törzsek jól elkülönülő csoportot formáltak. A magyarországi kutya RVC törzs külön ágon helyezkedett el, általában szarvasmarha RVC törzsekhez állt a legközelebb. Egyedüli kivétel az NSP4 gén volt, ahol a KE174/2012 törzs sertés eredetű RVC törzsekhez helyeződött közelebb. Ezek a megfigyelések felvetik a lehetőségét egy múltbeli sertés-szarvasmarha reaszortációnak, az azonban még bizonytalan, hogy ez az esemény a kutyaéhoz való adaptálódás előtt vagy azután következett be (Függelék: F1. ábra).

6.6. Kutya rotavírus I

A metagenomikai vizsgálatok során két minta esetében szokatlan rotavírus szekvencia részleteket fedeztünk fel az előzetes elemzések során. Egy kölyökkutya mintájában (KE135/2012), több enterális vírus volt azonosítható, többek között rotavírus A (141 szekvencia részlet), astrovírus (2399 szekvencia részlet), parvovírus (4053 szekvencia részlet); valamint egyetlen 53 nt hosszú szekvencia részlet, amelyet RVB VP1 génként azonosítottunk. Egy másik, a 6.3.2-3. pontokban már említett mintából, amely hasmenéses felnőtt ebtől származott (KE528/2012), coronavírus (30 szekvencia részlet), vesivírus (17 szekvencia részlet), picodocistrovírus (kettő szekvencia részlet), kobuvírus (egy szekvencia részlet) és astrovírus (egy szekvencia részlet) volt azonosítható; ezeken felül RVB/RVH-szerű szekvenciákat identifikáltunk, melyből öt a VP1 génre, hét a VP3 génre illeszkedett. Ezután LiCl-os precipitációval dsRNS dúsítást végeztünk a KE135/2012 jelű mintán. Mivel azonban a vírus alacsony titerben volt jelen a mintában (ti. PAGE-ben végzett ezüstoffestéssel sem volt kimutatható a genomi RNS), ezért a mélyszekvenálás során drasztikusan megemeltük a minta szekvenciáinak mennyiségét. A futtatás eredményeképpen 1,59 millió szekvencia readet kaptunk, amelyet összeillesztve megkaptuk az összes strukturális gént, és egyes nem strukturális géneket is rekonstruáltunk. Ezek a gének lényegesen eltértek az eddig ismert rotavírus A-H referencia szekvenciáktól (19. táblázat). A kódoló szekvenciák meghatározásában általában elégségesnek bizonyult, ha a konszenzus végeket kiterjesztettük az IonTorrent szekvenciák alapján. Azonban az NSP3 és NSP4 gének esetében ez a módszer nem vezetett eredményre, minden bizonnyal ezen gének nagyfokú változatossága miatt, ami az egész nemzetségben megfigyelhető (Kindler et al., 2013; Trojnar et al., 2010). Mivel minden rotavírus fajnál a genomi RNS GC (guanin:citozin) aránya kicsi (29-40%), ezért úgy számítottuk, hogy az alacsony GC tartalmú szakaszok (contigok), amelyeknek előzőleg nem adtak eredményt a génbanki kereséskor, megfelelő jelöltek lesznek a hiányzó gének összeállításában. És valóban, a további illesztések és elemzés során a kiválasztott szekvenciákból sikerült azonosítanunk az NSP3 gént, amit megerősítettünk egy hasonlósági kereséssel BlastX motoron keresztül (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Végül egy 800 nt hosszú szekvencia töredékből származtatott fehérje szekvenciának elemzése során az NSP4 gént is sikerült azonosítanunk. Az így összeállított konszenzus szekvenciát referenciaként használva újrazvizsgáltuk a menhelyi kutyáktól származó metagenomikai adathalmazt, azonban a fent említett mintákon kívül máshol nem ismertünk fel újszerű rotavírusokat. Mindkettő szokatlan rotavírusnál (KE135/2012 és KE528/2012) a szegmensvégek nukleotidsorrendje megőrzött volt (5' vég GGC/TA; 3' vég AACCC); valamint a legtöbb gén esetében nagyfokú volt kettőjük között a szekvencia hasonlóság (pl. VP2: 88% nt, 95% as hasonlóság; NSP4 99% nt, 99%

as hasonlóság). A VP7 gén esetében azonban rendkívül alacsony volt a szekvencia azonosság (53% nt és 38% as szinten). A két RVI törzs genomjának általános tulajdonságait a 20. táblázatban foglaltuk össze, a fehérjék pontos funkciójának feltérképezésére további vizsgálatok szükségesek.

19. táblázat: Az újszerű kutya RV törzsünk (KE135/2012), és az RVA-RVD, valamint az RVF-RVH referencia törzsek közötti aminosav alapú hasonlósági értékek.

A jóslott aminosav szekvencia alignmentet a Multalin internetes program segítségével, BLOSUM62 algoritmus alapján készítettük (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Az aminosav távolságokat a MEGA6 program p -distance algoritmusával számítottuk ki.

	RVA	RVB	RVC	RVD	RVF	RVG	RVH
VP1	23	53	21	22	23	55	57
VP2	15	42	14	13	14	41	45
VP3	15	32	12	14	13	33	39
VP4	11	24	12	12	11	26	27
VP6	16	38	14	14	13	38	46
VP7	17	26	11	14	11	22	29
NSP1	<10	≤10	<10	<10	<10	<10	20-21
NSP2	15	42	16	15	14	41	42
NSP3	21	14-21	10-12	<10	12	18-20	15-16
NSP4*	9-13	11	<10	11	10	10-11	14
NSP5	<10	25	<10	<10	<10	29	30

*Az NSP4 meghatározása nem volt lehetséges homológia kereséssel. Mindamelllett a szerkezeti ananlízis során azonosítottunk egy lehetséges helikális transzmembrán motívumot (47-64 as és/vagy 71-88 as pozíciókban), egy dugóhúzó motívumot (42-168 as pozícióban) valamint egy glikozilációs helyet (NGS motívum, 31 as pozícióban).

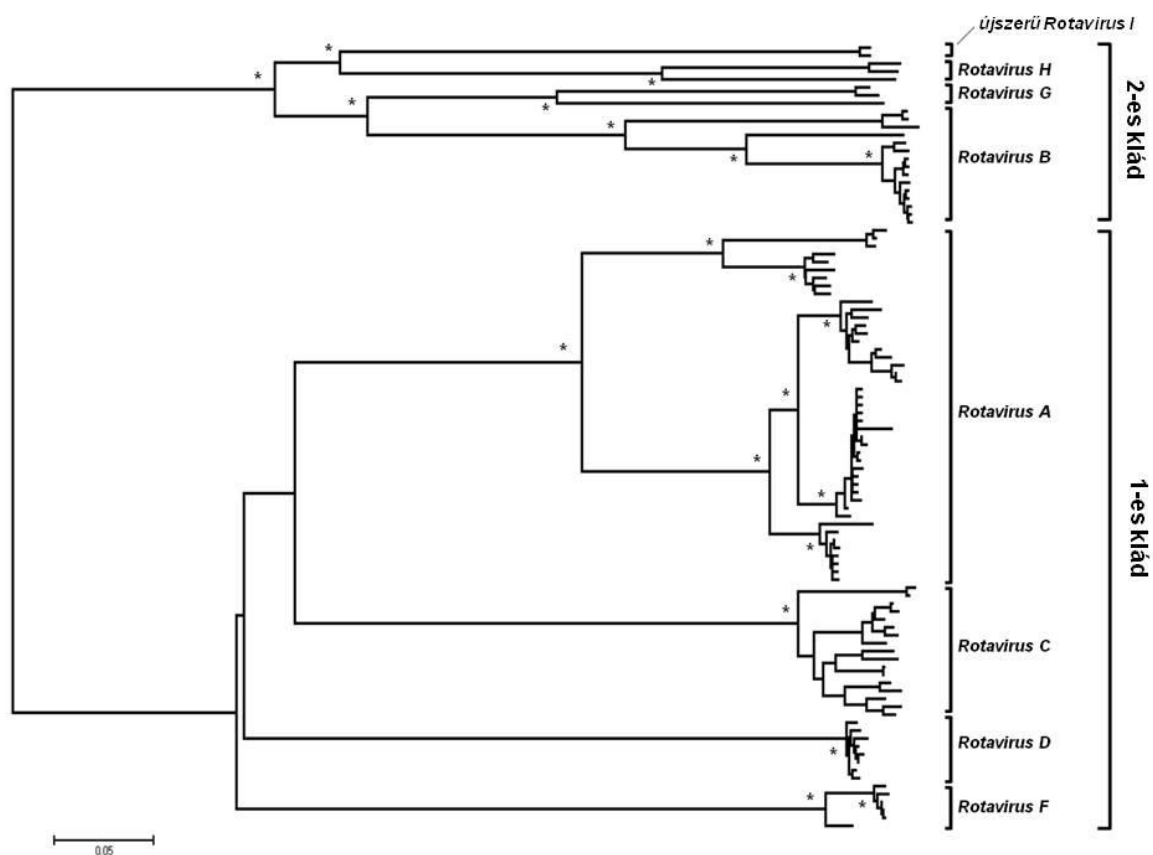
20. táblázat: RVI törzseink (KE528/2012; KE135/2012) génjeinek tulajdonságai

Kódolt fehérje (szegmens név)	Törzs neve	GenBank azonosító	5' UTR (nt)	Kódoló szekvencia (nt/as)	3' UTR (nt)
NSP1 (5. szegmens)	KE135/2012	KM369887	39	NSP1-1: 240/79 NSP1-2: 1173/390	64
	KE528/2012	KM369898	39	NSP1-1: 240/79 NSP1-2: 1173/390	63
NSP2 (8. szegmens)	KE135/2012	KM369888	52	906/301	60
	KE528/2012	KM369899	52	906/301	58
NSP3 (7. szegmens)	KE135/2012	KM369889	36	822/273	96
	KE528/2012	KM369900	36	813/270	102
NSP4 (10. szegmens)	KE135/2012	KM369890	15	660/219	76
	KE528/2012	KM369901	15	660/219	75
NSP5 (11. szegmens)	KE135/2012	KM369891	54	474/157	65
	KE528/2012	KM369902	54	474/157	61
VP1 (1. szegmens)	KE135/2012	KM369892	6	3489/1162	23
	KE528/2012	KM369903	6	3489/1162	23
VP2 (2. szegmens)	KE135/2012	KM369893	14	2949/982	39
	KE528/2012	KM369904	14	2949/982	37
VP3 (3. szegmens)	KE135/2012	KM369894	25	2106/701	29
	KE528/2012	KM369905	25	2106/701	29
VP4 (4. szegmens)	KE135/2012	KM369895	6	2334/777	31
	KE528/2012	KM369906	6	2334/777	30
VP6 (6. szegmens)	KE135/2012	KM369896	31	1188/395	59
	KE528/2012	KM369907	31	1188/395	60
VP7 (9. szegmens)	KE135/2012	KM369897	6	813/270	39
	KE528/2012	KM369908	12	798/265	59

A VP6-ból származtatott aminosav szekvencia szolgált alapjául a rotavírus törzseink besorolására (Matthijssens et al., 2012). Több száz VP6 gén as szekvenciájának elemzésével olyan hasonlósági határértéket határoztak meg (53%), mely használatával, nagy biztonsággal elkülöníthetők az RV fajok egymástól. Ez a módszer egyszerűbb, kevésbé időigényes, mint a klasszikus virológiai elkülönítő módszerek használata (klinikai, morfológiai, szerológiai tulajdonságok együttes vizsgálata). A legnagyobb aminosav hasonlóság egy új rotavírus H törzssel mutatkozott (46%). Kisebb szekvencia

hasonlóságokat találtunk, amikor más, véletlenszerűen kiválasztott rotavírus fajt vizsgáltunk (pl *rotavirus G* és *B* $\leq 37\%$, *rotavirus A, C, D* és *F* $\leq 18\%$).

A VP6 fehérje filogenetikai elemzése során két nagy csoportot figyeltünk meg a rotavírusok között (Kindler et al., 2013). Az újonnan leírt rotavírus törzseink a *rotavirus H, G* és *B* fajokkal alkottak egy csoportot (egyes klád), míg a második csoportba (kettes klád) a *rotavirus A, C, D* és *F* tartozott (8. ábra). Ez a mintázat a többi gén esetében is megfigyelhető volt. Összességében a szekvencia- és a filogenetikai analízis együttesen szemlélteti a mérsékelt genetikai hasonlóságot a rotavirus A-H fajok képviselőivel, alátámasztva, hogy egy új faj, a *Rotavirus I* képviselőit találtuk meg (Függelék, F2. ábra). Az új rotavírus faj első képviselőit a legújabb ajánlások alapján RVI/Dog-wt/HUN/KE135/2012-nek és RVI/Dog-wt/HUN/KE528/2012-nek neveztük el (Matthijssens et al., 2011a).



8. ábra: RVI VP6 aminosav (395 as) alapú filogenetikai fa

A fát *neighbor-joining* módszerrel készítettük, a csillagok a $>90\%$ bootstrap értékeket jelölik.

A két magyar kutya RV törzs, amelyeket az új *Rotavirus I* fajba soroltunk, a kettes kládba tartozik az RVH, RVG és RVB fajokkal. Az egyes kládba az RVA, RVC, RVD és RVF fajok tartoznak.

6.7. Kutya bufavírus, CBUV

6.7.1. CBUV pozitív minták

A bélsármintákban metagenomikai vizsgálattal igéretes újszerű parvovírus szekvencia részleteket azonosítottunk (három mintában). A kapott szekvencia adatok alapján real-time PCR módszerrel szűrtünk meg 70 vizsgált bélsármintát, melyből összesen 26 bizonyult bufavírus pozitívnak. Sajnos már nem tudtuk az összes mintát bevonni a real-time PCR-es szűrővizsgálatba, valamint a HUN/2012/174-es mintánál sem sikerült a viszonylag nagy readszám ellenére a további elemzés, mivel egyes minták elfogytak, vagy egyéb vírusok vizsgálata prioritást élvezett. A real-time PCR protokollt Vito Martella professzor (Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Olaszország) bocsátotta rendelkezésünkre (Martella et al., 2018). A bufavírus pozitív minták tulajdonságait a 21. táblázatban foglaljuk össze.

21. táblázat: CBUV pozitív minták metagenomikai vagy real-time PCR módszerrel

Minta név	Mintagyűjtés dátuma	Az eb kora	Hasmenéses tünetek	Real-time PCR szűrés eredménye	Bufavírus readok száma*
HUN/2012/3	2012.01.23	1 év	igen	+	0
HUN/2012/5	2012.01.30	3 hó	igen	+	0
HUN/2012/7	2012.02.03	6 hét	igen	+	0
HUN/2012/9	2012.02.16	8 hét	nem	+	0
HUN/2012/10	2012.02.16	8 hét	igen	+	0
HUN/2012/17	2012.03.09	feelnőtt	nem	+	-
HUN/2012/18	2012.03.19	1-6 év	nem	+	-
HUN/2012/19	2013.03.19	2-6 év	nem	+	-
HUN/2012/20	2012.03.19	1-9 év	nem	+	-
HUN/2012/22	2012.02.17	3 hó	nem	+	7
HUN/2012/57	2012.02.17	3 hó	igen	+	0
HUN/2012/59/2	2012.03.09	1 év alatt	nem	+	-
HUN/2012/65	2012.04.06	6 hó-3 év	nem	+	-
HUN/2012/66	2012.04.06	feelnőtt	nem	+	-
HUN/2012/114	2012.04.15	6 év	nem	+	0
HUN/2012/118	2012.04.20	6 év	igen	+	-
HUN/2012/125	2012.04.27	1 év alatt	igen	+	0
HUN/2012/126	2012.04.27	1 év alatt	nem	-	4
HUN/2012/129	2012.05.09	3 év	nem	+	-
HUN/2012/132	2012.05.09	1 év alatt	nem	+	-

Minta név	Mintagyűjtés dátuma	Az eb kora	Hasmenéses tünetek	Real-time PCR szűrés eredménye	Bufavírus readok száma*
HUN/2012/133	2012.05.09	4-6 hét	nem	+	-
HUN/2012/136	2012.05.11	4-6 hét	nem	+	-
HUN/2012/143	2012.07.14	7 év	nem	+	0
HUN/2012/159	2012.05.29	7 hó	nem	+	-
HUN/2012/174	2012.05.31	kölyök	igen	+	23
HUN/2012/175	2012.06.05	6 hét	nem	+	0
HUN/2012/527	2012.08.23	1 év	igen	+	0

*: 0: nulla read bufavírusra, -: a minta nincs bevonva a metagenomikai vizsgálatba.

6.7.2. Bufavírusok keresése real-time PCR módszerrel

Előzetes vírusmetagenomikai eredmények azt sejtették, hogy egyes mintákban (HUN/2012/22 és HUN/2012/126) új parvovírust azonosítottunk. Valós-idejű PCR módszert dolgoztunk ki a vírus azonosítására egy olaszországi kutatócsoporttal együttműködésben. A real-time módszerrel összesen 70 mintát szűrtünk meg, ebből 26 lett pozitív. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük. A Ct érték 14,7-37,9 közötti volt a pozitív esetekben. Kettő esetben a pozitív real-time görbe és pozitív gékép ellenére az elemző program nem tudott Ct értéket számolni.

6.7.3. Kutya bufavírus metagenomikai eredmények

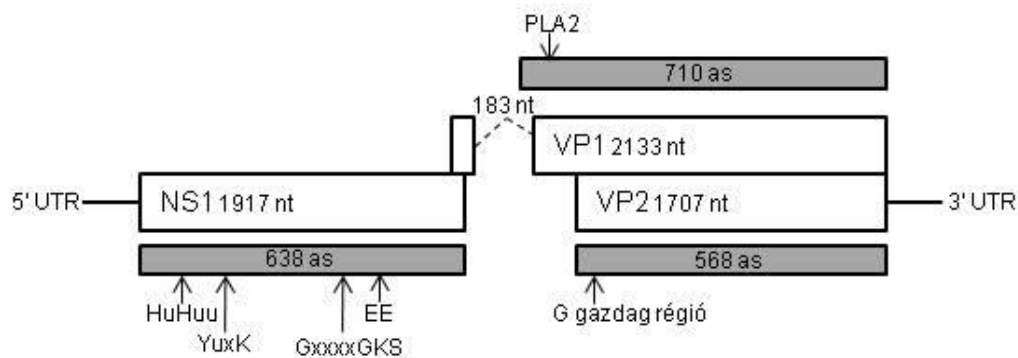
Két új protoparvovírus törzs közel teljes hosszúságú genom szekvenciáját sikerült meghatározni metagenomikai módszerek segítségével (HUN/2012/2 és HUN/2012/126). A kódoló szekvencia mindkét esetben 4219 nt hosszú volt, a részleges UTR-eket is beleszámítva a HUN/2012/22 esetében 4463 nt, a HUN/2012/126 esetében pedig 4308 nt hosszú szekvenciát kaptunk.

A kódoló szekvenciában két ORF-et azonosítottunk, a bal oldali 1917 nukleotid hosszú ORF1 kódolta a nem-szerkezeti fehérjét (NS1, 638 as), a jobb oldali, 2316 nukleotid hosszú ORF2 pedig a kapszidot alkotó két fehérjét (VP1, 710 as; VP2, 568 as) kódolta. A teljes kódoló szakasz szekvenciaillesztés elemzése rávilágított, hogy bufavírusaink jól elkülönülnek a parvovírusoktól (<58% nt hasonlóság) és egyéb bufavírusokkal csoportosulnak együtt. A CBuV a főemlős (61,6-63,2% nt), valamint sertés mintákból (59,6% nt) detektált bufavírusokkal mutatta a legnagyobb hasonlóságot (Handley et al., 2012; Hargitai et al., 2016; Phan et al., 2012; Sasaki et al., 2015; Yahiro et al., 2014), míg a CPV-2 törzsekkel 45% nukleotidszintű hasonlóságot mutatott. A feltételezett NS1 start kodon egy erős Kozak szekvenciában található (ACCATGG). Az ATP vagy GTP kötőhelyet jelző Walker motívumot (GXXXXGK[T/S]) azonosítottunk az NS1-ben (405-GPASTGKS-412) (Walker et al., 1982). Továbbá két konzervatív replikáció kezdő motívumot is azonosítottunk,

GLHFHVLLQ és IVRYFLTKQP (a konzervatív as-akat félkövér betűkkel jelöltük) (Phan et al., 2014). A nukleotid és aminosav szekvencia hasonlósági mátrixokban látható, hogy az NS1 kevesebb, mint 69,4% nt, és 51,4% as hasonlóságot mutatott a *Protoparvovirus* nemzetség tagjaival (22. táblázat).

Az ORF1 14 nukleotiddal átfedett az ORF2-n. Az összerendezett szekvenciákat vizsgálva, egyéb BuV-kkal összehasonlítva két lehetséges hasítási helyet is azonosítottunk az ORF1-ben. Az 1931 nt pozícióban egy lehetséges donor helyet (AG↓GT), míg az 2115 nt pozícióban egy lehetséges befogadó helyet (AG↓G) találtunk. A feltételezett VP1 szekvencia az ORF1 végénél kezdődött, 1906 nukleotid pozíciónál. A foszfolipáz A2 motívum erősen konzervatív kalcium kötőhelyét (YLGPG) is a VP1 ORF-jében azonosítottuk. A foszfolipáz katalitikus maradványai (HD és D) a 41-42, valamint a 63 as pozícióban helyeződtek. A VP1 <67,2% as hasonlóságot mutatott a *Parvovirinae* család többi tagjával. A CBuV VP2 fehérjéjének N-terminálisán glicin-gazdag szekvencia található (GGGGGGSGVG), ez a szekvencia más parvovírus VP2-nél is fellelhető (9. ábra).

A filogenetikai elemzés során a kutya bufavírusok egy jól elkülönült csoportot alkottak, körülöttük patkány, denevér, sertés, és főemlős bufavírusok helyeződtek (10. ábra). A csoportban törzseinkhez legközelebb humán bufavírusok helyeződtek (Phan et al., 2012; Yahiro et al., 2014), valamint rhesusmajomból (Handley et al., 2012) és sertésből detektált bufavírusok (Hargitai et al., 2016).

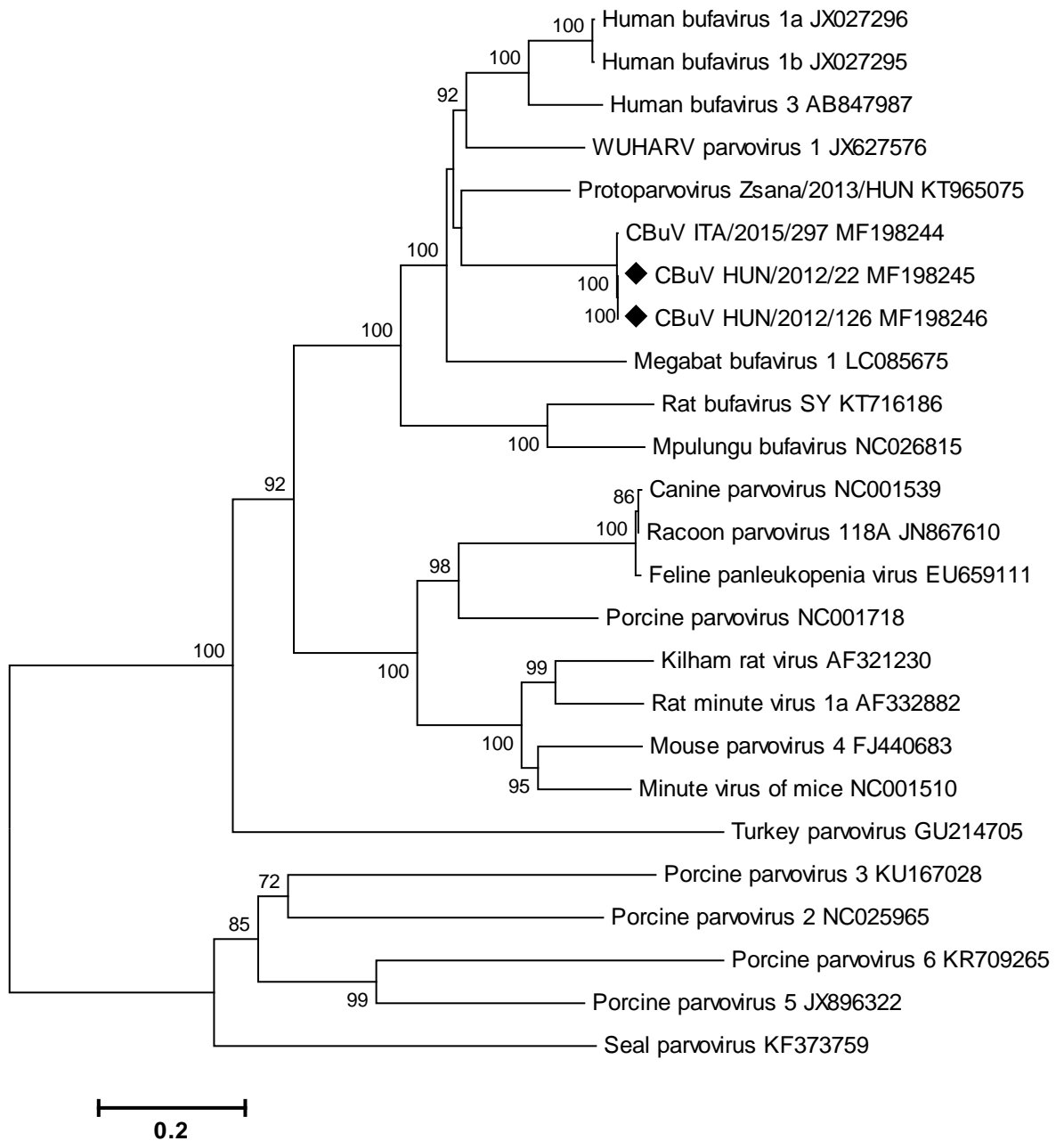


9. ábra: A CBuV vírus genom szerveződése

NS1 fehérje: GxxxxGKS -Walker A motívum, EE - Walker B motívum; HuHuu és YuxK - replikáció iniciálós motívumok. VP1 és VP 2 fehérjék: PLA2 - foszfolipáz A2 motívum, G gazdag régió - glicin gazdag régió. UTR: nem kódoló régió.

22. táblázat: Szekvenca hasonlósági százalékok a CBuV-k és egyéb parvovírusok között az általunk meghatározott, nem teljes szekvenciában; valamint az egyes ORF-ek és fehérjék között. A félkövér betűtípus a legnagyobb hasonlósági értéket jelzi.

Vírus	HUN/2012/22					HUN/2012/126								
	Genom		NS1			VP1		Genom		NS1			VP1	
	nt	nt	as	nt	as	nt	nt	as	nt	as				
Kutya bufavírusok														
HUN/2012/22	-	-	-	-	-	99,9	99,9	99,8	99,9	99,8				
HUN/2012/126	99,9	99,9	99,8	99,9	99,8	-	-	-	-	-				
ITA/2011/297-15	99,8	99,8	99,6	99,9	99,6	99,8	99,8	99,7	99,9	99,6				
Egyéb parvovírusok														
Hu/BuV 1a/JX027296	61,7	67	47,6	68,1	64,6	61,7	67	47,6	68,1	64,7				
Hu/BuV 1b/JX027295	61,7	67	47,3	68,2	64,6	61,7	67,1	47,3	68,2	64,7				
Hu/BuV 2/JX027297	61	66,9	48	66	62,7	61	67	48	66	62,9				
Hu/BuV 3/AB847987	61,1	67,2	48,4	66,5	62,9	61,1	67,3	48,5	66,5	63				
Si/WUHARV/JX627576	63,2	69,4	51,4	67,8	67,4	63,3	69,5	51,4	67,8	67,6				
Po/Zsana/2013/HUN/KT965075	59,6	65,7	46,5	66	65,8	59,6	65,7	46,5	66	66				
Bat/Megabat BuV 1/LC085675	59,4	65,2	45,7	61,1	60,9	59,4	65,2	45,7	61,1	61				
Ro/Mpulungu BuV/NC026815	57	64,3	45	55,8	55,1	57	64,4	45	55,8	55,1				
Ro/Rat BuV SY/KT716186	56,8	63,2	43,2	54,9	54,5	56,8	63,3	43,2	54,9	54,5				
Ca/CPV-2/NC001539	45	56	40,6	42,6	33,2	45	56,1	40,7	42,6	33,2				



10. ábra: CBUV kapszidjának nt szekvenciája (2316 nt) alapján készített filogenetikai fa, mely a protoparvovírusok változatosságát mutatja be. A fát *neighbor-joining* módszerrel, Jukes-Cantor algoritmus segítségével készítettük. Bootstrap érték 1000. A bal alsó sarokban a lépték a pozíciókénti nukleotid szubsztitúciót jelöli. Saját törzseinket fekete rombusszal jelöltük.

7. Megbeszélés

7.1. Magyarországon kutyában először identifikált vírusok enterális kórképben

7.1.1. Kutya astrovírus

Az astrovírus fertőzést a világ több pontján leírtak kutyából, azonban prevalencia adatok és a vírus genetikai változatossága még mindig nem teljesen ismert. Vizsgálatunk során sem megerősíteni, sem megcáfolni nem tudtuk az ok-okozati kapcsolatot az AstV fertőzés és a hasmenéses megbetegedés között. Továbbá a pan-astrovirus PCR szűrés és a metagenomikai eredmények között sem találtunk korrelációt, noha egyik módszer sem rutin diagnosztikai eszköz, valamint a tesztek szenzitivitását sem vizsgáltuk. Jelenleg ezeket a módszereket inkább a vírusok sokszínűségének vizsgálatára használjuk leginkább, mint egymástól független módszereket. Így a tanulmányunk során leírt prevalencia adatokat körültekintően kell értelmeznünk, még ha az arányok hasonlóak az irodalomban előforduló adatokhoz. AstV RNS-t mutattak ki olaszországi (Martella et al., 2011), kínai (Zhu et al., 2011), japán (Takano et al., 2015), franciaországi (Grellet et al., 2012) és egyesült királyságbeli kutyák (Caddy és Goodfellow, 2015) bélsármintáiban. A legtöbb tanulmányban a hasmenéses tüneteket mutató kutyáknál szignifikánsan nagyobb számban ki lehetett mutatni az AstV-t, még ha az állatok száma, tartási körülményei és kora rendkívül változatos is volt. Egy olasz tanulmányban két kutya természetes körülmények között fertőződött AstV-sal és a vírusürítés korrelációt mutatott a tünetek súlyosságával, valamint szerokonverzió is megtörtént (Martella et al., 2012). Ez utalhat az AstV kórokozó szerepére. További kísérletes fertőzések lehetnek szükségesek, hogy az AstV fertőzés, és a klinikai tünetek kapcsolatát vizsgálni tudjuk.

Az ebben a tanulmányban megszekvenált AstV-k ORF-jeinek vizsgálata rámutatott a szekvenciák változatosságára. A filogenetikai vizsgálatok során öt törzsünk a többi kutya astrovírussal együtt helyeződött, és több alcsoportot alkotott a kapszid szekvencia alapján. A humán astrovírusokat a MAstV 1 fajba soroljuk, és nyolc különböző szerotípusba oszthatóak. Lehetséges, hogy a humán astrovírusoknál megfigyelt alcsoportok a kutya astrovírusokra is jellemzőek (Caddy és Goodfellow, 2015).

A HUN/2012/126-os magyar CAstV törzs leginkább a virulens ITA/2010/Zoid olasz törzsre hasonlított, amely klinikai tünetekben megnyilvánuló fertőzést okozott fiatal és felnőtt kutyákban (Martella et al., 2011). A kérdés, hogy a CAstV törzsek biológiai tulajdonságai mennyiben befolyásolják a vírus kórokozó képességét továbbra is megválaszolatlan marad.

A HUN/2012/8-as magyar CAstV törzs csak távoli rokonságot mutatott mind a magyarországi, mind a világ többi tájáról származó CAstV törzsekkel. A vírusgenom 3,2 kb

nagyságú 3' végét sikerült megszekvenálnunk és a genomot vizsgálva egyedülálló tulajdonságokat mutatott a törzs. Az ORF1b/ORF2 gének átfedése hosszabb volt (11 nt), valamint a 3'UTR is hosszabb volt, mint ahogy azt a többi ismert CAstV-nál megfigyeltük. Az sgRNS szintézis promóter régiója is jelentősen eltért a többi CAstV törzs ugyanezen szakaszához képest, noha ez a szekvencia általában jól megőrzött (Méndez et al., 2014; Walter és Mitchell, 2003).

A HUN/2012/8 törzs esetében még mindig bizonytalan, hogy ez a törzs egy kutya CAstV, vagy egy lehetséges fajok közötti (nyérc-kutya) vírusátvitel eredményeképpen találtuk kutyában. Noha az AstV-kat erősen fajspecifikus vírusoknak tekintjük, tanulmányok bizonyították, hogy egyes esetekben az emlősök között (beleértve az embert is) lehetséges gazdafaj váltás, majd adaptálódás az új fajhoz (Finkbeiner et al., 2009, 2008; Nagai et al., 2015). Időről időre még emlős és madár gazdafajok közötti váltás is megfigyelhető mindkét irányban (Pankovics et al., 2015; Sun et al., 2014).

Összegezve, tudásunk még rendkívül hézagos a CAstV-k tekintetében. Mindazonáltal az eddig megismert genetikai változatosság kihívás elé állítja a laboratóriumi diagnosztikát. Ugyanez a diverzitás gátat vethet a jövőbeni megelőző stratégiák tervezésében és kivitelezésében, a vakcina fejlesztésben, mivel az antigén keresztreakciók gyengék, így a törzsek közötti keresztvédettség is gyenge lehet. További vizsgálatok szükségesek, hogy a CAstV biológiáját jobban megértsük, valamint surveillance programok, hogy a vírus állategészségügyi jelentőségét felmérjük.

7.1.2. Kutya calicivírus

Magyarországon elsőként sikerült kimutatnunk kutya norovírust, és kutya vesivírust menhelyi kutyák bélsarából. A dolgozatunkban meghatározott prevalencia (3,9%) egybe esett az irodalom által említett értékekkel (1,1-64,8%) (Martella et al., 2015; Mesquita et al., 2010; Mochizuki et al., 2002; Ntafis et al., 2010), ugyanakkor alacsonyabb volt a kennelekben, állatmenhelyeken detektált prevalencia értékeknél (Ntafis- 9,7%, Martella- 64,8%).

Az ICTV kilencedik jelentésben a *Vesivirus* génuszba sorolódik egy calicivírusként azonosított vírus, ha a nemzetség többi tagjával egy filogenetikai ágon helyeződik és genomjuk felépítése azonos. Ezen kritériumoknak megfelelően elemezve a törzsünket úgy tűnik, hogy törzsünk a sejtvonal kontamináns vesivírus törzsekkel, a közelmúltban leírt egyesült államokbeli és olaszországi vesivírus törzsekkel együtt a *Vesivirus* nemzetség egy új képviselője lehet.

Munkánk során egyedülálló módon egy tartási helyről norovírust és vesivírust is kimutattunk. A norovírus törzseket RT-PCR módszerrel sikerült kimutatnunk, míg a vesivírus

törzset az általános calicivírus primerrel, és metagenomikai módszerrel is detektáltuk. Norovírus törzseink, valamint vesivírus törzsünk kórokozó szerepét nem tudtuk megerősíteni.

7.1.3. Kutya kobuvírus

A *Kobuvirus* nemzetség egy viszonylag új, gyorsan gyarapodó génusz, melynek tagjai embereket és állatokat is képesek megfertőzni (<http://www.picornaviridae.com/>). A kobuvírusok elsősorban hasmenéses fertőző betegségekkel hozhatók összefüggésbe, azonban szerepük kórokozóként kétséges (Ribes et al., 2010). Magyarországon elsőként sikerült kobuvírust kimutatnunk kutyák bélsarából RT-PCR módszert, és új generációs szekvenálást alkalmazva. A vírus prevalenciája vizsgálatunk során 14,47% volt (11/76), nyolc kutya egy év alatti volt, míg három felnőtt eb, hat hasmenéses, öt pedig tünetmentes kutyától származott. Az általunk részletesen elemzett HUN/2012/2 CaKoV törzs egy hasmenéses kölyökkutyától származott, mely mintában társfertőzőként CAstV és CCoV is jelen volt. CaKoV detektálásakor gyakoriak a társfertőzések, irodalmi adatok alapján CDV, CPV-2, CAdV-1, CCoV és CPV-1 a leggyakoribb vírusok (Di Martino et al., 2013a; Moreno et al., 2018; Oem et al., 2014a; Ribeiro et al., 2017) Az irodalomban változatos prevalencia adatokkal találkozhatunk (1,25-50,55% közötti értékekkel), jellemző, hogy a hasmenéses egyedekben nem szignifikánsan magasabb a CaKoV pozitívitas, valamint hogy a fiatalabb állatok között gyakrabban előfordul a CaKoV fertőzés (Carmona-Vicente et al., 2013; Di Martino et al., 2013a; Li et al., 2016; Soma et al., 2016).

Összességében a kobuvírus fertőzés valószínűleg általános lehet a kutyák körében, azonban a fertőzés nem valószínű, hogy megnyilvánul klinikai tünetekben, vagy pedig egyéb ismert patogén kórokozók is szerepet játszanak a hasmenéses tünetek kialakításában.

7.1.4. Rotavírus C

Azonosítottunk metagenomikai módszerekkel egy olyan genetikailag heterogén *Rotavirus C* törzset, amely a legtöbb, ha nem az összes, génjében újszerű genotípust mutat. Az RVC törzsekről íródott tanulmányokban a génenkénti genotípusok mintázata viszonylag állandó az egy gazdafajból izolált törzseknél, noha nagy különbség mutatkozott a sertés RVC törzsek neutralizációs antigénjei között (Jeong et al., 2015; Marthaler et al., 2013; Soma et al., 2013).

Soma és mtsai. (2013) korábban javaslatot tettek egy RVC klasszifikációs rendszerre, melyet humán, sertés és szarvasmarha RVC szekvenciák felhasználásával dolgoztak ki a Matthijnsens és mtsai. (2008) által létrehozott, és azóta széles körben elfogadott mintára, mely eredeti formájában a RVA törzsek klasszifikációját segítette. A Soma-féle rendszerben a magyarországi kutya RVC törzs VP1-VP7 és NSP2 génjeit be tudtuk sorolni, míg az NSP1 valamint az NSP3-NSP5 gének helyzete tisztázatlan maradt. Az előzőektől különböző genotípus demarkációs határértékeket határozott meg egymástól függetlenül több

kutatócsoport is (Jeong et al., 2015; Marthaler et al., 2013; Suzuki et al., 2015, 2014), melyekben azonban már nagyobb szekvencia-adatbázisból indultak ki a kutatók. A VP7, VP4, VP6 gének tekintetében a kutya RVC törzsünk már nagy biztonsággal besorolható a G10 – VP7, P8 – VP4, és I8 – VP6 genotípusokba, azonban a többi gén genotípusokba sorolásával kapcsolatban az adatok publikálásakor úgy gondoltuk, hogy további szekvencia adatokra lenne szükség. Cikkünk publikálása óta Suzuki és mtsa (2017) átfogó, minden génre kiterjedő klasszifikációs rendszert hozott létre, melyben nagyszámú mintát vizsgálva cut-off értékeket határoztak meg génenként. E tanulmány alapján törzsünk génenkénti genotípus besorolását a 18. táblázat utolsó oszlopa tartalmazza.

További kutya RVC törzsek leírása segíthet felderíteni az esetleges genetikai diverzitást a gazdafajból izolált RV törzsek között. Várhatóan, a leírt RVC törzsek számának növekedésével egy megbízható klasszifikációs rendszert sikerül kidolgozni.

7.2. Újonnan felfedezett vírusok a kutya fekális viromjában

7.2.1. Rotavírus I

Munkánk során metagenomikai módszerek segítségével sikerült meghatároznunk egy új rotavírus fajt (*rotavirus I, RVI*), amelyet az ICTV is új rotavírus fajként elfogadott (Mihalov-Kovács et al., 2015a). Az addig ismert rotavírusfajoktól eltérő vírusok jelenlétére macskák és kaliforniai oroszlánfókák fekális viromjában korábban is voltak árulkodó jelek, azonban a teljes genomok meghatározása nehézségekbe ütközött (Li et al., 2011b; Ng et al., 2014). Az ezekben a mintákban azonosított rövid VP6 és VP2 géneként azonosított szakaszok közelebbi rokonságot mutattak a mi újonnan leírt rotavírus törzseinkkel, mint az egyéb referencia rotavírus törzsek (VP6 \approx 70 as, 67% szemben egyéb törzseknél <55%; VP2 \approx 160 as, 78-86% szemben egyéb törzseknél <44%). Nemrég egy macska hasmenéses bélsár-mintájából is sikerült azonosítani a RVI-t (Phan et al., 2017). Ezek a tanulmányok, a mi leírásunkkal együtt megerősítik a feltevést, hogy egy újfajta rotavírus bukkant fel egyes hűsevő fajokban változatos földrajzi eloszlásban.

További kutatási területeken várható előrelendülés az NGS segítségével, többek között a vírusok járványtanáról, a gazdafaj spektrumáról, és a faj evolúciójáról nyerhetünk újabb ismereteket. Az egyik legérdekesebb lelet a két törzs rendkívül különböző VP7 génje, amelyhez egy viszonylag jól megőrzött gerinc aminosav szekvencia tartozott. Általában a különböző gazdafajokból származó, ugyanahhoz a fajhoz tartozó törzsek esetében a VP7-re jellemző az alacsony szekvencia hasonlósági érték (pl. RVA, 60% nt szinten, 55% as szinten; RVB, 54% nt, 46% as; RVH 63% nt, 56% as) (Marthaler et al., 2012; Matthijnsens et al., 2008; Wakuda et al., 2011). Bizonytalan, hogy a törzsek VP7 génjei a múltban esetleg egy reasszortáció során kerültek az új faj génkészletébe, tudván, hogy a rotavírus fajok

közötti reasszortáció rendkívül ritka jelenség (Esona et al., 2010; Trojnar et al., 2010). További információ szükséges, hogy jobban megértsük az RVI genetikai sokszínűségét.

7.2.2. Kutya bufavírus

Kutyák fekális viromjában azonosítottunk, és elemeztünk egy újszerű kutya protoparvovírust, valamint real-time PCR módszerrel vizsgáltuk mintáinkat a lehetséges etiológiai kapcsolat feltárása érdekében. A leírt vírust, mivel legközelebbi rokonai a bufavírusok, kutya bufavírusnak neveztük el (canine bufavirus, CBUV). Az NS1 gén tekintetében alacsony hasonlóságot mutatott mind nt (24,1-69,4%), mind as (19,3-51,4%) szintjén a *Protoparvovirus* nemzetség többi tagjával. Protoparvovírusok azonos fajba sorolhatók, ha az NS1 fehérje as sorrendje legalább 85%-ban azonos (az ICTV által meghatározott kritérium). Ezen jellemző alapján az általunk metagenomikai módszerekkel meghatározott CBUV törzsek új PV fajhoz sorolhatóak. A CBUV-nk legközelebbi rokonai a bufavírusnak nevezett, emberből és más emlősökből leírt protoparvovírusok.

A bufavírusokat először burkina fasoi gyermekek hasmenéses székletéből írták le 2012-ben (Phan et al., 2012). Ezzel párhuzamosan hasonló bufavírusokat írtak le háziállatokban és vadállatokban egyaránt (Sasaki et al., 2016). Az általunk kimutatott bufavírusok a legnagyobb hasonlóságot az NS1 gén tekintetében (66,9-67,2% nt, 47,2-51,4% as) és a VP1 gén tekintetében (66-68,2% nt és 62,5-67,2% as) főemlős bufavírusokkal mutattak. Valamint a genom felépítése, tulajdonságai is a főemlősökben leírt bufavírusokra emlékeztetnek, a VP1 által kódolt splicing mechanizmus is megőrzött. Ezzel szemben az általunk kimutatott bufavírusok genetikailag távolabb álltak a CPV-2-től. A két protoparvovírus NS1 génje 56% nt, és 40,6% as hasonlóságot mutatott, míg a VP1 nt szinten 42,6%-ban és as szinten 33,4%-ban volt azonos. CBUV DNS-t magas prevalenciával fordult elő mintáinkban, azonban az egészséges és tünetmentes állatok közötti prevalencia különbség nem volt szignifikáns. A magas prevalencia és a szignifikancia hiánya utalhat arra, hogy a CBUV a kutya fekális viromjának gyakori alkotója. A potenciális kórokozók detektálására szolgáló technika rohamos fejlődése gyorsan bővíti a kutyákat fertőző lehetséges kórokozó vírusok listáját. Ezen vírusoknak a kutya egészségére gyakorolt hatásáról jelenleg elenyésző ismeretünk van, ezen hatások mélyebb ismerete kulcsfontosságú lesz a későbbi megelőző stratégiák kidolgozásában.

8. Új tudományos eredmények

Magyarországon először végeztünk metagenomikai vizsgálatot menhelyi körülmények között élő kutyák bélsármintáiban. Az e témakörben elért új tudományos eredményeket az alábbi pontokban foglaljuk össze:

1. Magyarországon először sikerült kimutatnunk kutyákból astrovírust és vizsgáltuk e vírusok genomszerkezetét.
2. Magyarországon először mutattunk ki kutya calicivírust, mely kutya vesivírusnak bizonyult. Ennek a törzsnek a részleges genomját meghatároztuk és elemeztük.
3. Magyarországon először mutattunk ki kutya kobuvírust metagenomikai és RT-PCR módszerekkel.
4. A világon elsőként elemeztük egy kutya rotavírus C genomját.
5. Leírtunk egy eddig ismeretlen rotavírust kutyában (*Rotavirus I*), melyet azóta a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság új fajként is elfogadott.
6. A világon először mutattunk ki kutyában új, bufa-szerű parvovírust és meghatároztuk e vírustörzs fehérjekódoló genomi szekvenciáját.

9. Irodalomjegyzék

- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M. J.: **TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations**, *Nucleic Acids Res.*, 38. W7–W13, 2010.
- Bányai K., Jiang, B., Bogdán Á., Horváth B., Jakab F., Meleg E., Martella, V., Magyari L., Melegh B., Szűcs G.: **Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary**, *J. Clin. Virol.*, 37. 317–322, 2006.
- Bányai K., Kemenesi G., Budinski, I., Földes F., Zana B., Marton Sz., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F.: **Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia**, *Infect. Genet. Evol.*, 48. 19–26, 2017.
- Barrett, D., More, S. J., O'Neill, R., Bradshaw, B., Casey, M., Keane, M., McGrath, G., Sammin, D.: **Prevalence and distribution of exposure to Schmallenberg virus in Irish cattle during October 2012 to November 2013.**, *BMC Vet. Res.*, 11. 267, 2015.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Bernadina, W., van Hooff, J. A., de Vries, H. W., Mol, J. A.: **Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses**, *Physiol. Behav.*, 66. 243–254, 1999.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., Mol, J. A.: **The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs**, *Horm. Behav.*, 30. 272–279, 1996.
- Binn, L. N., Norby, E. A., Marchwicki, R. H., Jarman, R. G., Keiser, P. B., Hang, J.: **Canine caliciviruses of four serotypes from military and research dogs recovered in 1963–1978 belong to two phylogenetic clades in the Vesivirus genus**, *Virol. J.*, 15. 39, 2018.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., Breitbart, M., Delwart, E.: **Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 3507–3513, 2009.
- Blomström, A.-L., Stenberg, H., Scharin, I., Figueiredo, J., Nhambirre, O., Abilio, A. P., Fafetine, J., Berg, M.: **Serological Screening Suggests Presence of Schmallenberg Virus in Cattle, Sheep and Goat in the Zambezia Province, Mozambique**, *Transbound. Emerg. Dis.*, 61. 289–292, 2014.
- Blomström, A.-L., Widén, F., Hammer, A.-S., Belák S., Berg, M.: **Detection of a Novel Astrovirus in Brain Tissue of Mink Suffering from Shaking Mink Syndrome by Use of Viral Metagenomics**, *J. Clin. Microbiol.*, 48. 4392–4396, 2010.

- Boros Á., Nemes Cs., Pankovics P., Kapusinszky B., Delwart, E., Reuter G.: **Identification and complete genome characterization of a novel picornavirus in turkey (Meleagris gallopavo)**, J. Gen. Virol., 93. 2171–2182, 2012.
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N., Méndez, E., Monroe, S. S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S.: **Nineteen new species in the genus Mamastrovirus in the Astroviridae family**, in: ICTV 2010.018.AV.2010b. 2010.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F., Rohwer, F.: **Genomic analysis of uncultured marine viral communities**, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 99. 14250–14255, 2002.
- Buonavoglia, C., Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Castagnaro, M., Tempesta, M.: **Canine coronavirus highly pathogenic for dogs**, Emerg. Infect. Dis., 12. 492–494, 2006.
- Caddy, S. L., Goodfellow, I.: **Complete genome sequence of canine astrovirus with molecular and epidemiological characterisation of UK strains**, Vet. Microbiol., 177. 206–213, 2015.
- Carmona-Vicente, N., Buesa, J., Brown, P. A., Merga, J. Y., Darby, A. C., Stavisky, J., Sadler, L., Gaskell, R. M., Dawson, S., Radford, A. D.: **Phylogeny and prevalence of kobuviruses in dogs and cats in the UK**, Vet. Microbiol., 164. 246–252, 2013.
- Chen, Z., Lambden, P. R., Lau, J., Caul, E. O., Clarke, I. N.: **Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus**, Virus Res., 83. 179–187, 2002.
- Choi, S., Lim, S.-I., Kim, Y. K., Cho, Y.-Y., Song, J.-Y., An, D.-J.: **Phylogenetic Analysis of Astrovirus and Kobuvirus in Korean Dogs**, J. Vet. Med. Sci., 76. 1141-1145, 2014.
- Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J., Brown, F.: **Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance**, Nature, 327. 482–486, 1987.
- Chu, D. K. W., Poon, L. L. M., Guan, Y., Peiris, J. S. M.: **Novel Astroviruses in Insectivorous Bats**, J. Virol., 82. 9107–9114, 2008.
- Chung, J.-Y., Kim, S.-H., Kim, Y.-H., Lee, M.-H., Lee, K.-K., Oem, J.-K.: **Detection and genetic characterization of feline kobuviruses**, Virus Genes, 47. 559–562, 2013.
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A. J.: **The family Parvoviridae**, Arch. Virol., 159. 1239–1247, 2013.

- Crandell, R. A.: **Isolation and characterization of caliciviruses from dogs with vesicular genital disease**, Arch. Virol., 98. 65–71, 1988.
- Cságola A., Varga Sz., Lőrincz M., Tuboly T.: **Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary**, Arch. Virol., 159. 2441–2444, 2014.
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G.: **Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions**, Infect. Genet. Evol., 11. 1529–1544, 2011.
- Decaro, N., Buonavoglia, C.: **Canine parvovirus-a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c**, Vet. Microbiol., 155. 1–12, 2012.
- Delwart, E.: **Animal virus discovery: improving animal health, understanding zoonoses, and opportunities for vaccine development**, Curr. Opin. Virol., 2. 344–352, 2012.
- Delwart, E.: **Viral metagenomics**, Rev. Med. Virol., 17. 115–131, 2007.
- Di Martino, B., Di Felice, E., Ceci, C., Di Profio, F., Marsilio, F.: **Canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in Italy**, Vet. Microbiol., 166. 246–249, 2013a.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Bodnar, L., Melegari, I., Sarchese, V., Massirio, I., Dowgier, G., Lanave, G., Marsilio, F., Bányai K., Buonavoglia, C., Martella, V.: **Seroprevalence for 2117-like vesiviruses in Italian household dogs**, Vet. Microbiol., 201. 14–17, 2017.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Ceci, C., Di Felice, E., Marsilio, F.: **Molecular detection of Aichi virus in raw sewage in Italy**, Arch. Virol. 158. 2001–2005, 2013b.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Lanave, G., De Grazia, S., Giammanco, G. M., Lavazza, A., Buonavoglia, C., Marsilio, F., Bányai K., Martella, V.: **Antibodies for strain 2117-like vesiviruses (caliciviruses) in humans**, Virus Res., 210. 279–282, 2015.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Melegari, I., Robetto, S., Di Felice, E., Orusa, R., Marsilio, F.: **Molecular evidence of kobuviruses in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*)**, Arch. Virol., 159. 1803–1806, 2014.
- 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. 5, 2008.
- Elbers, A. R. W., Loeffen, W. L. A., Quak, S., de Boer-Luijtzte, E., van der Spek, A. N., Bouwstra, R., Maas, R., Spierenburg, M. A. H., de Kluijver, E. P., van Schaik, G., van der Poel, W. H. M.: **Seroprevalence of Schmallenberg Virus Antibodies among Dairy Cattle, the Netherlands, Winter 2011–2012.**, Emerg. Infect. Dis., 18. 1065–1071, 2012.

Esona, M. D., Mijatovic-Rustempasic, S., Conrardy, C., Tong, S., Kuzmin, I. V., Agwanda, B., Breiman, R. F., Bányai, K., Niezgodna, M., Rupprecht, C. E., Gentsch, J. R., Bowen, M. D.: **Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*)**, *Emerg. Infect. Dis.*, 16. 1844–1852, 2010.

Estes, M. K., Greenberg, H. B.: **Rotaviruses**, in: *Fields Virology*, 5th ed., Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., vol. 2. 1917-1974, 2007.

Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Smith, A. W., Skilling, D. E., Ott, R. L.: **Isolation and identification of caliciviruses from dogs with enteric infections**, *Am. J. Vet. Res.*, 46. 218–220, 1985.

Evermann, J. F., Smith, A. W., Skilling, D. E., McKeirnan, A. J.: **Ultrastructure of newly recognized caliciviruses of the dog and mink**, *Arch. Virol.*, 76. 257–261, 1983.

Finkbeiner, S. R., Kirkwood, C. D., Wang, D.: **Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea**, *Viol. J.*, 5. 117, 2008.

Finkbeiner, S. R., Li, Y., Ruone, S., Conrardy, C., Gregoricus, N., Toney, D., Virgin, H. W., Anderson, L. J., Vinjé, J., Wang, D., Tong, S.: **Identification of a Novel Astrovirus (Astrovirus VA1) Associated with an Outbreak of Acute Gastroenteritis**, *J. Virol.*, 83. 10836–10839, 2009.

Firth, C., Bhat, M., Firth, M. A., Williams, S. H., Frye, M. J., Simmonds, P., Conte, J. M., Ng, J., Garcia, J., Bhuvana, N. P., Lee, B., Che, X., Quan, P.-L., Lipkin, W. I.: **Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City**, *mBio* 5. e01933-01914, 2014.

Foley, J. E., Orgad, U., Hirsh, D. C., Poland, A., Pedersen, N. C.: **Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine**, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 214. 67–70, 1999.

Fu, Y., Pan, M., Wang, X., Xu, Y., Xie, X., Knowles, N. J., Yang, H., Zhang, D.: **Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings**, *J. Gen. Virol.* 90. 1104–1108, 2009.

Gabbay, Y. B., Borges, A. A., Oliveira, D. S., Linhares, A. C., Mascarenhas, J. D. P., Barardi, C. R. M., Simões, C. M. O., Wang, Y., Glass, R. I., Jiang, B.: **Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil**, *J. Med. Virol.*, 80. 1666–1674, 2008.

Gabriel, S. S., Tohya, Y., Mochizuki, M.: **Isolation of a calicivirus antigenically related to feline caliciviruses from feces of a dog with diarrhea**, *J. Vet. Med. Sci.*, 58. 1041–1043, 1996.

Giordano, M. O., Martinez, L. C., Isa, M. B., Paez Rearte, M., Nates, S. V.: **Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina**, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 46. 93–96, 2004.

Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Blinov, V. M., Koonin, E. V.: **Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold**, FEBS Lett., 243. 103–114, 1989.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Lai, M. M.: **Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses**, FEBS Lett., 288. 201–205, 1991.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Wolf, Y. I.: **A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses**, FEBS Lett., 262. 145–148, 1990.

Green, K. Y.: **Caliciviridae**, in: Fields Virology, 5th ed., Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., vol. 2. 949-979, 2007.

Grellet, A., De Battisti, C., Feugier, A., Pantile, M., Marciano, S., Grandjean, D., Cattoli, G.: **Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels**, Vet. Microbiol., 157. 214–219, 2012.

Griffin, J.F.: **Stress and immunity: a unifying concept**, Vet. Immunol. Immunopathol., 20. 263–312, 1989.

Hall, T. A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucl. Acids. Symp., 41. 95-98, 1999.

Hämmerle, T., Molla, A., Wimmer, E.: **Mutational analysis of the proposed FG loop of poliovirus proteinase 3C identifies amino acids that are necessary for 3CD cleavage and might be determinants of a function distinct from proteolytic activity**, J. Virol., 66. 6028–6034, 1992.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Goodman, R. M.: **Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products**, Chem. Biol., 5. R245-249, 1998.

Handley, S. A., Thackray, L. B., Zhao, G., Presti, R., Miller, A.D., Droit, L., Abbink, P., Maxfield, L. F., Kambal, A., Duan, E., Stanley, K., Kramer, J., Macri, S. C., Permar, S. R., Schmitz, J. E., Mansfield, K., Brenchley, J. M., Veazey, R. S., Stappenbeck, T. S., Wang, D., Barouch, D. H., Virgin, H. W.: **Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection Is Associated with Expansion of the Enteric Virome**, Cell, 151. 253–266, 2012.

- Harbour, D. A., Ashley, C. R., Williams, P. D., Gruffydd-Jones, T. J.: **Natural and experimental astrovirus infection of cats**, *Vet. Rec.*, 120. 555–557, 1987.
- Hargitai R., Pankovics P., Kertész A. M., Bíró H., Boros Á., Phan, T. G., Delwart, E., Reuter G.: **Detection and genetic characterization of a novel parvovirus distantly related to human bufavirus in domestic pigs**, *Arch. Virol.*, 161. 1033–1037, 2016.
- Hiby, E. F., Rooney, N. J., Bradshaw, J. W.S.: **Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels**, *Physiol. Behav.*, 89. 385–391, 2006.
- Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K. V., Wernike, K., Fischer, M., Breithaupt, A., Mettenleiter, T. C., Beer, M.: **Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011.**, *Emerg. Infect. Dis.*, 18. 469–472, 2012.
- Hood, L., Rowen, L.: **The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine**, *Genome Med.*, 5. 79, 2013.
- International Human Genome Sequencing Consortium: **Finishing the euchromatic sequence of the human genome**, *Nature*, 431. 931–945, 2004.
- Imada, T., Yamaguchi, S., Mase, M., Tsukamoto, K., Kubo, M., Morooka, A.: **Avian Nephritis Virus (ANV) as a New Member of the Family Astroviridae and Construction of Infectious ANV cDNA**, *J. Virol.*, 74. 8487–8493, 2000.
- Iturriza-Gómara, M., Clarke, I., Desselberger, U., Brown, D., Thomas, D., Gray, J.: **Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales**, *Eur. J. Epidemiol.*, 19. 589–595, 2004.
- Jang, H. K., Tohya, Y., Han, K. Y., Kim, T. J., Song, C. S., Mochizuki, M.: **Seroprevalence of canine calicivirus and canine minute virus in the Republic of Korea**, *Vet. Rec.*, 153. 150–152, 2003.
- Jeong, Y.-J., Matthijnssens, J., Kim, D.-S., Kim, J.-Y., Alfajaro, M. M., Park, J.-G., Hosmillo, M., Son, K.-Y., Soliman, M., Baek, Y.-B., Kwon, J., Choi, J.-S., Kang, M.-I., Cho, K.-O.: **Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses**, *Vet. Microbiol.*, 176. 61–69, 2015.
- Jeong, Y.-J., Park, S.-I., Hosmillo, M., Shin, D.-J., Chun, Y.-H., Kim, H.-J., Kwon, H.-J., Kang, S.-Y., Woo, S.-K., Park, S.-J., Kim, G.-Y., Kang, M.-I., Cho, K.-O.: **Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea**, *Vet. Microbiol.*, 138. 217–224, 2009.

- Jiang, X., Huang, P. W., Zhong, W. M., Farkas T., Cubitt, D. W., Matson, D. O.: **Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR**, *J. Virol. Methods*, 83. 145–154, 1999.
- Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E. L. L.: **Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server**, *Nucleic Acids Res.*, 35. W429-432, 2007.
- Kapoor, A., Mehta, N., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Govindasamy, L., Medina, J. L., Street, C., Shields, S., Lipkin, W. I., **Characterization of novel canine bocaviruses and their association with respiratory disease**, *J. Gen. Virol.*, 93. 341–346, 2012.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Dubovi, E. J., Qaisar, N., Henriquez, J. A., Medina, J., Shields, S., Lipkin, W. I.: **Characterization of a canine homolog of human Aichivirus**, *J. Virol.*, 85. 11520–11525, 2011.
- Kelly, W. R.: **An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia**, *Aust. Vet. J.*, 54. 593, 1978.
- Kim, Y., Chang, K. O., Straw, B., Saif, L. J.: **Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs**, *J. Clin. Microbiol.*, 37. 1484–1488, 1999.
- Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P. H., Johne, R.: **Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G**, *Infect. Genet. Evol.*, 14, 58–67. 2013.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (Szerk.): **Virus Taxonomy, IXth Report of the ICTV**, 1. ed. Elsevier/Academic Press, 2012.
- Kong, N., Zuo, Y., Wang, Z., Yu, H., Zhou, E.-M., Shan, T., Tong, G.: **Molecular characterization of new described kobuvirus in dogs with diarrhea in China**, *Springerplus*, 5. 2047, 2016.
- Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T., Tajima, M.: **Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate**, *J. Vet. Med. Sci.*, 54. 313–318, 1992.
- Kutscher, S., Bauer, T., Dembek, C., Sprinzl, M., Protzer, U.: **Design of therapeutic vaccines: hepatitis B as an example**, *Microb. Biotechnol.*, 5. 270–282, 2012.
- 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.

- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Yip, C. C. Y., Choi, G. K. Y., Wu, Y., Bai, R., Fan, R. Y. Y., Lai, K. K. Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y.: **Identification of a novel feline picornavirus from the domestic cat**, *J. Virol.*, 86. 395–405, 2012.
- L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, É., Lamontagne, A.-M., Lacroix, G., Ouardani, M., Deschamps, J., Simard, G., Simard, C.: **Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005–2007.**, *Arch. Virol.*, 154. 581–593, 2009.
- Li, C., Wei, S., Guo, D., Wang, Z., Geng, Y., Wang, E., Zhao, X., Su, M., Wang, X., Sun, D.: **Prevalence and phylogenetic analysis of canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in northeast China**, *J. Vet. Med. Sci.*, 78. 7–11. 2016.
- Li, L., Pesavento, P. A., Leutenegger, C. M., Estrada, M., Coffey, L. L., Naccache, S. N., Samayoa, E., Chiu, C., Qiu, J., Wang, C., Deng, X., Delwart, E.: **A novel bocavirus in canine liver**, *Virol. J.*, 10. 54, 2013.
- Li, L., Pesavento, P. A., Shan, T., Leutenegger, C. M., Wang, C., Delwart, E.: **Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses**, *J. Gen. Virol.*, 92. 2534–2541, 2011a.
- Li, L., Shan, T., Wang, C., Cote, C., Kolman, J., Onions, D., Gulland, F. M. D., Delwart, E.: **The Fecal Viral Flora of California Sea Lions**, *J. Virol.*, 85. 9909–9917, 2011b.
- Li, L., Victoria, J. G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G. M., Kunz, T. H., Delwart, E.: **Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses**, *J. Virol.*, 84. 6955–6965, 2010.
- Mackow, E. R.: **Group B and C rotaviruses**, in: *Infections of the Gastrointestinal Tract*, 983–1008, Raven Press, New York, NY. 1995.
- MacLachlan, N. J., Dubovi, E. J. (Szerk): **Chapter 10 - Adenoviridae**, in: *Fenner's Veterinary Virology* (4th ed.). Academic Press, San Diego, 203–212, 2011a.
- MacLachlan, N. J., Dubovi, E. J. (Szerk): **Chapter 26 - Picornaviridae**, in: *Fenner's Veterinary Virology* (4th ed.). Academic Press, San Diego, 425–441, 2011b.
- Madeley, C. R., Cosgrove, B. P.: **Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis**, *Lancet*, 2. 451–452, 1975a.
- Madeley, C. R., Cosgrove, B. P.: **VIRUSES IN INFANTILE GASTROENTERITIS**, *Lancet*, 306. 124, 1975b.
- Manteufel, J., Truyen, U.: **Animal bocaviruses: a brief review**, *Intervirology*, 51. 328–334, 2008.

- Marshall, J. A., Healey, D. S., Studdert, M. J., Scott, P. C., Kennett, M. L., Ward, B. K., Gust, I. D.: **Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea**, *Aust. Vet. J.*, 61. 33–38, 1984.
- Martella, V., Bányai K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M.: **Zoonotic aspects of rotaviruses**, *Vet. Microbiol.*, 140. 246–255, 2010.
- Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C.: **Canine distemper virus**, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 38. 787–797, 2008a.
- Martella, V., Lanave, G., Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Varga-Kugler R., Kaszab E., Di Martino, B., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia, C., Bányai K.: **Novel Parvovirus Related to Primate Bufaviruses in Dogs**, *Emerg. Infect. Dis.*, 24. 1061–1068, 2018.
- Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D’Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C. A., Bányai K., Di Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L. E., Buonavoglia, C.: **Detection and molecular characterization of a canine norovirus**, *Emerg. Infect. Dis.*, 14. 1306–1308, 2008b.
- Martella, V., Moschidou, P., Catella, C., Larocca, V., Pinto, P., Losurdo, M., Corrente, M., Lorusso, E., Bányai K., Decaro, N., Lavazza, A., Buonavoglia, C.: **Enteric Disease in Dogs Naturally Infected by a Novel Canine Astrovirus**, *J. Clin. Microbiol.*, 50. 1066–1069, 2012.
- Martella, V., Moschidou, P., Lorusso, E., Mari, V., Camero, M., Bellacicco, A., Losurdo, M., Pinto, P., Desario, C., Bányai K., Elia, G., Decaro, N., Buonavoglia, C.: **Detection and characterization of canine astroviruses**, *J. Gen. Virol.*, 92. 1880–1887, 2011.
- Martella, V., Pinto, P., Lorusso, E., Di Martino, B., Wang, Q., Larocca, V., Cavalli, A., Camero, M., Decaro, N., Bányai K., Saif, L. J., Buonavoglia, C.: **Detection and Full-Length Genome Characterization of Novel Canine Vesiviruses**, *Emerg. Infect. Dis.*, 21. 1433–1436, 2015.
- Martella, V., Pinto, P., Tummolo, F., De Grazia, S., Giammanco, G. M., Medici, M. C., Ganesh, B., L’Homme, Y., Farkas T., Jakab F., Bányai K.: **Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a novel sub-classification system**, *Arch. Virol.*, 159. 3185–3196, 2014.
- Martella, V., Pratelli, A., Gentile, M., Buonavoglia, D., Decaro, N., Fiorente, P., Buonavoglia, C.: **Analysis of the capsid protein gene of a feline-like calicivirus isolated from a dog**, *Vet. Microbiol.*, 85. 315–322, 2002.

- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Ciarlet, M., Matthijnsens, J.: **Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada**, *Virology*, 446. 189–198, 2013.
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J., Nelson, M., Ciarlet, M.: **Widespread Rotavirus H in Commercially Raised Pigs, United States**, *Emerg. Infect. Dis.*, 20. 1203–1206, 2014.
- Marthaler, D., Rossow, K., Gramer, M., Collins, J., Goyal, S., Tsunemitsu, H., Kuga, K., Suzuki, T., Ciarlet, M., Matthijnsens, J.: **Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes**, *Virology*, 433. 85–96, 2012.
- Martínez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernández-Chamorro, J., Lozano, G., Díaz-Toledano, R.: **Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions**, *Virus Res.*, 206. 62–73, 2015.
- Marton Sz., Deák J., Dóró R., Csata T., Farkas Sz. L., Martella, V., Bányai K.: **Reassortant human group C rotaviruses in Hungary**, *Infect. Genet. Evol.* 34. 410–414, 2015a.
- Marton Sz., Mihalov-Kovács E., Dóró R., Csata T., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Matthijnsens, J., Martella, V., Bányai K.: **Canine rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity**, *J. Gen. Virol.*, 96. 3059–3071, 2015b.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M.: **Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains**, *J. Virol.*, 82. 3204–3219, 2008.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U., Van Ranst, M.: **Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)**, *Arch. Virol.*, 156. 1397–1413, 2011a.
- Matthijnsens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G.M., Bányai K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., Martella, V., Van Ranst, M.: **Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains**, *Infect. Genet. Evol.*, 11. 1396–1406, 2011b.

- Matthijnssens, J., Martella, V., Van Ranst, M.: **Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses**, *Future Virol.*, 5. 385–390, 2010.
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., Johne, R.: **VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation**, *Arch. Virol.*, 157. 1177–1182, 2012.
- Mawatari, T., Hirano, K., Tsunemitsu, H., Suzuki, T.: **Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010.**, *J. Gen. Virol.*, 95. 1117–1125, 2014.
- Mawatari, T., Taneichi, A., Kawagoe, T., Hosokawa, M., Togashi, K., Tsunemitsu, H.: **Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production**, *J. Vet. Med. Sci.*, 66. 887–890. 2004.
- Méndez, E., Muñoz-Yañez, C., Sánchez-San Martín, C., Aguirre-Crespo, G., del Rocio Baños-Lara, M., Gutierrez, M., Espinosa, R., Acevedo, Y., Arias, C. F., López, S.: **Characterization of human astrovirus cell entry**, *J. Virol.*, 88. 2452–2460, 2014.
- Mendez, E., Arias, C. F.: **Astroviruses**, in: *Fields Virology*, 5th ed., Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., vol. 2. 981-1000, 2007.
- Mesquita, J. R., Barclay, L., Nascimento, M. S. J., Vinjé, J.: **Novel norovirus in dogs with diarrhea**, *Emerg. Infect. Dis.*, 16. 980–982, 2010.
- Mihalov-Kovács E., Gellért Á., Marton Sz., Farkas Sz. L., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Martella, V., Bányai K.: **Candidate New Rotavirus Species in Sheltered Dogs, Hungary**, *Emerg. Infect. Dis.*, 21. 660-663, 2015a.
- Mihalov-Kovács E., Tuboly T., Bányai K., **Új parvovírus menhelyi kutyákban**, *Magy. Állatorvosok Lapja* 137. 438–439, 2015b.
- Mochizuki, M., Hashimoto, M., Roerink, F., Tohya, Y., Matsuura, Y., Sasaki, N.: **Molecular and seroepidemiological evidence of canine calicivirus infections in Japan**, *J. Clin. Microbiol.*, 40. 2629–2631, 2002.
- Mochizuki, M., Kawanishi, A., Sakamoto, H., Tashiro, S., Fujimoto, R., Ohwaki, M.: **A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea**, *Vet. Rec.*, 132. 221–222, 1993.
- Monteiro, F. L., Cargnelutti, J. F., Martins, M., Anziliero, D., Erhardt, M. M., Weiblen, R., Flores, E. F.: **Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions**, *Braz. J. Microbiol.*, 47. 876–881, 2016.

- Moreno, P. S., Wagner, J., Kirkwood, C. D., Gilkerson, J. R., Mansfield, C. S.: **Characterization of the fecal virome in dogs with chronic enteropathy**, *Vet. Microbiol.*, 221. 38–43, 2018.
- Nagai, M., Omatsu, T., Aoki, H., Otomaru, K., Uto, T., Koizumi, M., Minami-Fukuda, F., Takai, H., Murakami, T., Masuda, T., Yamasato, H., Shiokawa, M., Tsuchiaka, S., Naoi, Y., Sano, K., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T.: **Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus**, *Arch. Virol.*, 160. 2491–2501, 2015.
- Ng, T. F. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky B., Bodhidatta, L., Oderinde, B. S., Wommack, K. E., Delwart, E.: **High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage**, *J. Virol.*, 86. 12161–12175, 2012.
- Ng, T. F. F., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S. J., Kondov, N. O., Wong, W., Reuter G., Knowles, N. J., Vega, E., Esona, M. D., Deng, X., Vinjé, J., Delwart, E.: **Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses**, *Vet. Microbiol.*, 171. 102–111, 2014.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Deerfield, D. W.: **GeneDoc: analysis and visualisation of genetic variation**, *EMBNET News*, 4. 1–4, 1997.
- Ntafis, V., Xylouri, E., Radogna, A., Buonavoglia, C., Martella, V.: **Outbreak of Canine Norovirus Infection in Young Dogs**, *J. Clin. Microbiol.*, 48. 2605–2608, 2010.
- Oem, J.-K., Choi, J.-W., Lee, M.-H., Lee, K.-K., Choi, K.-S.: **Canine kobuvirus infections in Korean dogs**, *Arch. Virol.*, 159. 2751–2755, 2014a.
- Oem, J.-K., Lee, M.-H., Lee, K.-K., An, D.-J.: **Novel Kobuvirus species identified from black goat with diarrhea**, *Vet. Microbiol.*, 172. 563–567, 2014b.
- Ohshima, T., Kawakami, K., Abe, T., Mochizuki, M.: **A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains**, *Vet. Microbiol.*, 145. 334–338, 2010.
- Olarte-Castillo, X. A., Heeger, F., Mazzoni, C. J., Greenwood, A. D., Fyumagwa, R., Moehlman, P. D., Hofer, H., East, M. L.: **Molecular characterization of canine kobuvirus in wild carnivores and the domestic dog in Africa**, *Virology*, 477. 89–97, 2015.
- Otsu, R.: **A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren**, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21. 75–80, 1998.
- Otto, P., Schulze, P., Herbst, W.: **Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany**, *Arch. Virol.*, 144. 2467–2473, 1999.

- Paez-Espino, D., Eloë-Fadrosch, E. A., Pavlopoulos, G. A., Thomas, A. D., Huntemann, M., Mikhailova, N., Rubin, E., Ivanova, N. N., Kyripides, N. C.: **Uncovering Earth's virome**, *Nature*, 536. 425–430, 2016.
- Pankovics P., Boros Á., Bíró H., Horváth K. B., Phan, T. G., Delwart, E., Reuter G.: **Novel picornavirus in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus* var. *domestica*)**, *Infect. Genet. Evol.*, 37. 117–122, 2016.
- Pankovics P., Boros Á., Kiss T., Delwart, E., Reuter G.: **Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*)**, *Infect. Genet. Evol.*, 34. 114–121, 2015.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., Prasad, B. V. V.: **Rotavirus proteins: structure and assembly**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 309. 189–219, 2006.
- Phan, T. G., Kapusinszky B., Wang, C., Rose, R. K., Lipton, H. L., Delwart, E. L.: **The Fecal Viral Flora of Wild Rodents**, *PLoS Pathog.*, 7. e1002218, 2011.
- Phan, T. G., Leutenegger, C. M., Chan, R., Delwart, E.: **Rotavirus I in feces of a cat with diarrhea**, *Virus Genes*, 53. 487–490, 2017.
- Phan, T. G., Sdiri-Loulizi, K., Aouni, M., Ambert-Balay, K., Pothier, P., Deng, X., Delwart, E.: **New Parvovirus in Child with Unexplained Diarrhea, Tunisia**, *Emerg. Infect. Dis.*, 20. 1911–1913, 2014.
- Phan, T. G., Vo, N. P., Bonkougou, I. J. O., Kapoor, A., Barro, N., O’Ryan, M., Kapusinszky B., Wang, C., Delwart, E.: **Acute Diarrhea in West African Children: Diverse Enteric Viruses and a Novel Parvovirus Genus**, *J. Virol.*, 86. 11024–11030, 2012.
- Phillips, T. R., Jensen, J. L., Rubino, M. J., Yang, W. C., Schultz, R. D.: **Effects of vaccines on the canine immune system**, *Can. J. Vet. Res.*, 53. 154–160, 1989.
- Potgieter, A. C., Page, N. A., Liebenberg, J., Wright, I. M., Landt, O., Dijk van, A. A.: **Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes**, *J. Gen. Virol.*, 90. 1423–1432, 2009.
- Quiñones-Mateu, M. E., Avila, S., Reyes-Teran, G., Martinez, M. A.: **Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology**, *J. Clin. Virol.*, 61. 9–19, 2014.
- Reed, A. P., Jones, E. V., Miller, T. J.: **Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus**, *J. Virol.*, 62. 266–276, 1988.
- Renshaw, R. W., Griffing, J., Weisman, J., Crofton, L. M., Laverack, M. A., Poston, R. P., Duhamel, G. E., Dubovi, E. J.: **Characterization of a Vesivirus Associated with an**

Outbreak of Acute Hemorrhagic Gastroenteritis in Domestic Dogs, *J. Clin. Microbiol.*, 56. e01951-17, 2018.

Ribeiro, J., Headley, S. A., Diniz, J. A., Pereira, A. H. T., Lorenzetti, E., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F.: **Extra-intestinal detection of canine kobuvirus in a puppy from Southern Brazil**, *Arch. Virol.*, 162. 867–872, 2017.

Ribes, J. M., Montava, R., Téllez-Castillo, C. J., Fernández-Jiménez, M., Buesa, J.: **Seroprevalence of Aichi virus in a Spanish population from 2007 to 2008.**, *Clin. Vaccine Immunol.*, 17. 545–549, 2010.

Roerink, F., Hashimoto, M., Tohya, Y., Mochizuki, M.: **Organization of the canine calicivirus genome from the RNA polymerase gene to the poly(A) tail**, *J. Gen. Virol.*, 80. 929–935, 1999.

Rooney, N. J., Gaines, S. A., Bradshaw, J. W. S.: **Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: Investigating mitigation of stress by prior habituation**, *Physiol. Behav.*, 92. 847–854, 2007.

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., Bustillo, J.: **An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing**, *Nature*, 475. 348–352, 2011.

Saif, L. J., Jiang, B.: **Nongroup A rotaviruses of humans and animals**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 185, 339–371, 1994.

Sasaki, M., Gonzalez, G., Wada, Y., Setiyono, A., Handharyani, E., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Latief, M., Kholilullah, Z. A., Subangkit, M., Kobayashi, S., Nakamura, I., Kimura, T., Orba, Y., Ito, K., Sawa, H.: **Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses**, *Sci. Rep.*, 6. 24257, 2016.

Sasaki, M., Orba, Y., Anindita, P. D., Ishii, A., Ueno, K., Hang'ombe, B. M., Mweene, A. S., Ito, K., Sawa, H.: **Distinct Lineages of Bufavirus in Wild Shrews and Nonhuman Primates**, *Emerg. Infect. Dis.*, 21. 1230-1233, 2015.

Sauvage, V., Ar Gouilh, M., Cheval, J., Muth, E., Pariente, K., Burguiere, A., Caro, V., Manuguerra, J.-C., Eloit, M.: **A Member of a New Picornaviridae Genus Is Shed in Pig Feces**, *J. Virol.*, 86. 10036–10046, 2012.

- Schaffer, F. L., Soergel, M. E., Black, J. W., Skilling, D. E., Smith, A. W., Cubitt, W. D.: **Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog**, Arch. Virol., 84. 181–195. 1985.
- Schultz-Cherry, S. (Szerk.): **Astrovirus Research**, Springer New York, New York, NY. 2013.
- Scotto-Lavino, E., Du, G., Frohman, M. A.: **3' end cDNA amplification using classic RACE**, Nat. Protoc., 1. 2742–2745, 2006.
- Siedek, E. M., Schmidt, H., Sture, G. H., Raue, R.: **Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c**, Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 124. 58–64, 2011.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinjé, J., Saif, L. J.: **Characterization of an Enteropathogenic Bovine Calicivirus Representing a Potentially New Calicivirus Genus**, J. Virol., 76. 10089–10098, 2002.
- Smits, S. L., Raj, V. S., Oduber, M. D., Schapendonk, C. M. E., Bodewes, R., Provacica, L., Stittelaar, K. J., Osterhaus, A. D. M. E., Haagmans, B. L.: **Metagenomic Analysis of the Ferret Fecal Viral Flora**, PLoS ONE 8. e71595, 2013.
- Snodgrass, D. R., Angus, K. W., Gray, E. W., Menzies, J. D., Paul, G.: **Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs**, Arch. Virol., 60. 217–226, 1979.
- Soma, J., Tsunemitsu, H., Miyamoto, T., Suzuki, G., Sasaki, T., Suzuki, T.: **Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama**, J. Gen. Virol., 94. 128–135, 2013.
- Soma, T., Matsubayashi, M., Sasai, K.: **Detection of kobuvirus RNA in Japanese domestic dogs**, J. Vet. Med. Sci., 78. 1731–1735, 2016.
- Stephen, J. M., Ledger, R. A.: **An audit of behavioral indicators of poor welfare in kenneled dogs in the United Kingdom**, J. Appl. Anim. Welf. Sci., 8. 79–96, 2005.
- Stonik, V.A.: **Marine Natural Products: A Way to New Drugs**, Acta Naturae 1. 15–25, 2009.
- Sun, N., Yang, Y., Wang, G.-S., Shao, X.-Q., Zhang, S.-Q., Wang, F.-X., Tan, B., Tian, F.-L., Cheng, S.-P., Wen, Y.-J.: **Detection and characterization of avastrovirus associated with diarrhea isolated from minks in China**, Food Environ. Virol., 6. 169–174, 2014.
- Suzuki, T., Hasebe, A.: **A provisional complete genome-based genotyping system for rotavirus species C from terrestrial mammals**, J. Gen. Virol., 98. 2647–2662, 2017.

- Suzuki, T., Hasebe, A., Miyazaki, A., Tsunemitsu, H.: **Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan**, *Virus Res.*, 197. 26–34, 2015.
- Suzuki, T., Hasebe, A., Miyazaki, A., Tsunemitsu, H.: **Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan**, *Infect. Genet. Evol.*, 26. 223–227, 2014.
- Takano, T., Takashina, M., Doki, T., Hohdatsu, T.: **Detection of canine astrovirus in dogs with diarrhea in Japan**, *Arch. Virol.*, 160. 1549–1553, 2015.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S.: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.**, *Mol. Biol. Evol.* 30. 2725–2729, 2013.
- Toffan, A., Jonassen, C.M., De Battisti, C., Schiavon, E., Kofstad, T., Capua, I., Cattoli, G.: **Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea**, *Vet. Microbiol.*, 139. 147–152, 2009.
- Torres-Medina, A.: **Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets**, *Lab. Anim. Sci.*, 37. 167–171, 1987.
- Trojnar, E., Otto, P., Roth, B., Reetz, J., Johne, R.: **The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-Specific Proteins**, *J. Virol.*, 84. 10254–10265, 2010.
- Turner, P., Berry, J., MacDonald, S.: **Animal shelters and animal welfare: Raising the bar**, *Can. Vet. J.*, 53. 893–896, 2012.
- Vieler, E., Herbst, W.: **Electron microscopic demonstration of viruses in feces of dogs with diarrhea**, *Tierärztl. Prax.*, 23, 66–69. 1995.
- Vincent, I. C., Leahy, R. A.: **Real-time non-invasive measurement of heart rate in working dogs: a technique with potential applications in the objective assessment of welfare problems**, *Vet. J. Lond. Engl.*, 153. 179–183, 1997.
- Wakuda, M., Ide, T., Sasaki, J., Komoto, S., Ishii, J., Sanekata, T., Taniguchi, K.: **Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses**, *Emerg. Infect. Dis.*, 17. 1491–1493, 2011.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, N. J. G.: **Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold**, *EMBO J.*, 1. 945-951, 1982.
- Walter, J. E., Mitchell, D. K.: **Astrovirus infection in children**, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16. 247–253, 2003.

- Williams, F. P., Jr.: **Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups**, Arch. Virol., 66. 215–226. 1980.
- Yahiro, T., Wangchuk, S., Kinlay, T., Bandhari, P., Zangmo, S., Dorji, T., Karchung, T., Matsumoto, T., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M., Ahmed, K.: **Novel Human Bufavirus Genotype 3 in Children with Severe Diarrhea, Bhutan**, Emerg. Infect. Dis., 20. 1037–1039, 2014.
- Yamamoto, D., Ghosh, S., Kuzuya, M., Wang, Y.-H., Zhou, X., Chawla-Sarkar, M., Paul, S. K., Ishino, M., Kobayashi, N.: **Whole-genome characterization of human group C rotaviruses: identification of two lineages in the VP3 gene**, J. Gen. Virol., 92. 361–369, 2011.
- Yamashita, T., Adachi, H., Hirose, E., Nakamura, N., Ito, M., Yasui, Y., Kobayashi, S., Minagawa, H.: **Molecular detection and nucleotide sequence analysis of a new Aichi virus closely related to canine kobuvirus in sewage samples**, J. Med. Microbiol., 63. 715–720, 2014.
- Yamashita, T., Sakae, K., Tsuzuki, H., Suzuki, Y., Ishikawa, N., Takeda, N., Miyamura, T., Yamazaki, S.: **Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans**, J. Virol. 72, 8408–8412. 1998.
- Zhu, A. L., Zhao, W., Yin, H., Shan, T. L., Zhu, C. X., Yang, X., Hua, X. G., Cui, L.: **Isolation and characterization of canine astrovirus in China**, Arch. Virol., 156. 1671–1675, 2011.

10.A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

10.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Martella, V., Lanave, G., Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Varga-Kugler R., Kaszab E., Di Martino, B., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia, C., Bányai K.: **Novel parvovirus related to primate bufaviruses in dogs**, *Emerg. Infect. Dis.*, 24. 1061-1068, 2018.

IF: 7,422

Mihalov-Kovács E., Martella, V., Lanave, G., Bodnar, L., Fehér E., Marton Sz., Kemenesi G., Jakab F., Bányai K.: **Genome analysis of canine astroviruses reveals genetic heterogeneity and suggests possible inter-species transmission**, *Virus Res.*, 232. 162-170, 2017.

IF: 2,484

Marton Sz., Mihalov-Kovács E., Dóró R., Csata T., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Matthijnssens, J., Martella, V., Bányai K.: **Canine Rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity**, *J. Gen. Virol.*, 96. 3059-3071, 2015.

IF: 3,192

Mihalov-Kovács E., Gellért Á., Marton Sz., Farkas Sz. L., Fehér E., Oldal M., Jakab F., Martella, V., Bányai K.: **Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary**, *Emerg. Infect. Dis.*, 21. 660-663, 2015.

IF: 6,994

Mihalov-Kovács E., Tuboly T., Bányai K.: **Új parvovírus menhelyi kutyákban** *Magy. Állatorvosok*, 137. 438-439, 2015.

IF: 0,212

Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Fehér E., Lengyel Gy., Jakab F., Tuboly T., Bányai K.: **Enterális vírusfertőzések menhelyi kutyákban Magyarországon: Enteric viral infections of sheltered dogs in Hungary**, *Magy. Állatorvosok*, 136. 661-670, 2014.

IF: 0,185

Mihalov-Kovács E., Fehér E., Martella, V., Bányai K., Farkas Sz. L.: **The fecal virome of domesticated animals**, *Virus Dis.*, 25. 150-157, 2014.

IF: 0,364

10.2. Könyvek, könyvfejezetek

Mihalov-Kovács E., De Grazia, S., Martella, V., Bányai K.: **Astrovirus**, in: Hansman G, Netzler N, White P (szerk.) Foodborne Viral Pathogens, CRC Press - Taylor and Francis Group, 163-178, 2017.

10.3. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt

SfAM/MVNA Summer Conference 2014. június 30-július 3.: Fehér E., Pazár P., Kovács E., Farkas Sz. L., Lengyel Gy., Jakab F., Martella, V., Bányai K.: **Human gyroviruses in the ferret fecal virome** (poszter)

Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése 2014. október 16-18.: Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Tuboly T., Martella, V., Bányai K.: **Hazai kutya astrovírus törzsek kimutatása és jellemzése** (előadás)

Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése 2014. október 16-18.: Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Farkas Sz. L., Martella, V., Bányai K.: **Új rotavirus faj kimutatása kutya fekális viromjában** (poszter)

International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2014. október 31- november 3.: Kovács E., Marton Sz., Tuboly T., Martella, V., Bányai K.: **Genetic diversity and possible recombination events in canine astroviruses** (poszter)

10.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Dóró R., Mihalov-Kovács E., Marton Sz., Farkas Sz. L., László B., Deák J., Jakab F., Juhász Á., Sántha I., Bányai K.: **Rotavirus surveillance in Hungary, 2013**, Acta Microbiol Imm H 62. 18-19, 2015. IF: 0,778

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

Fehér E., Pazár P., Kovács E., Farkas Sz. L., Lengyel Gy., Jakab F., Martella, V., Bányai K.: **Molecular detection and characterization of human gyroviruses identified in the ferret fecal virome**, Arch. Virol., 159. 3401-3406, 2014. IF: 2,282

Dóró R., Mihalov-Kovács E., Marton Sz., László B., Deák J., Jakab F., Juhász Á., Kisfali P., Martella, V., Melegh B., Molnár P., Sántha I., Schneider F., Bányai K.: **Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012.**, Infect. Genet. Evol., 28. 495-512, 2014. IF: 3,264

Dóró R., Kovács E., Marton Sz., Farkas Sz. L., László B., Deák J., Jakab F., Juhász Á., Sántha I., Bányai K., Hungarian Rotavirus Surveillance Network: **Re-emerging G9 rotaviruses in 2012, Hungary**, Acta Microbiol Imm H 60. 129-130, 2013.

IF: 0,787

Ndze, V. N., Achidi, E. A., Papp H., Kovács E., Farkas Sz. L., Adiogo, D., Kisfali P., Ngeng, M. B., Abena, M. T. O., Martella, V., Esona, M. D., Bányai K.: **Shared G12 VP7 gene among human and bovine rotaviruses detected in Cameroonian villages**, Acta Microbiol. Imm. H., 60. 21-28, 2013. IF: 0,787

Ndze, V. N., Cadar, D., Cságola A., Kisfali P., Kovács E., Farkas Sz. L., Ngu, A. F., Esona, M. D., Dán Á., Tuboly T., Bányai K.: **Detection of novel porcine bocaviruses in fecal samples of asymptomatic pigs in Cameroon**, Infect. Genet. Evol., 17. 277-282, 2013.

IF: 2,768

Bányai K., Kovács E., Tóth Á. Gy., Biksi I., Szentpáli-Gavallér K., Bálint Á., Dencső L., Dán Á.: **Genome sequence of a monoreassortant H1N1 swine influenza virus isolated from a pig in Hungary**, J. Virol., 86. 13133, 2012. IF: 5,402

Cságola A., Lőrincz M., Tombácz K., Wladár Zs., Kovács E., Tuboly T.: **Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary**, Virus Genes, 44. 75-79, 2012. IF: 1,845

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Bányai Krisztiánnak és Dr. Tuboly Tamásnak a lehetőséget, hogy doktori tanulmányaimat az ő irányításuk alatt végezhettem. Tamás egyetemi éveim alatt szeretett meg velem a laboratóriumi munkát, és a kutatást, az ő segítségével lehettem tagja a Krisztián vezette Új kórokozók felfedezése témacsoportnak. Tamás halála hatalmas űrt hagyott, melyet nem lehet pótolni. Köszönöm Krisztiánnak, hogy bizalmat adott nekem, szakmailag és emberileg is sokat fejlődtem a laborjában töltött évek alatt. Köszönöm az Új kórokozók felfedezése témacsoportok minden tagjának a sok elméleti és gyakorlati segítséget és a vidám légkört.

PhD munkám során a mintagyűjtés szakaszában nagy segítséget nyújtott dr. Gulya Angéla állatorvos, aki megengedte, hogy a Miskolci Állatsegítő Alapítvány menhelyén mintákat gyűjthessek. Szeretnék köszönetet mondani a menhely összes dolgozójának a mintagyűjtés során nyújtott segítségért.

Köszönöm dr. Vito Martellának, valamint prof. Canio Bounavogliának, hogy segítséget nyújtottak az astrovírus, a bufavírus és az RVI minták feldolgozásában, valamint köszönettel tartozom dr. Gianvito Lanavenak, aki olaszországi tartózkodásom alatt felügyelte, szervezte és segítette munkámat (Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università Aldo Moro di Bari, Olaszország).

Hálásan köszönöm a családomnak, hogy nyugodt családi háttérrel biztosítva, mindvégig támogattak és bíztattak, ami különösen a PhD munka utolsó fázisában volt elengedhetetlen. Köszönöm a támogatást páromnak, Csabinak. Köszönöm kedves barátnőimnek Barinak, Sziszkónak, Eninek, Reninek, Katóknak, és Kicsi Reninek a rengeteg segítséget. Anyukámat, dr. Vass Andrea kolleganőmet, és dr. Kenéz Ákost külön köszönet illeti a dolgozat gondos átolvasásáért és hasznos tanácsaikért. Végül, de nem utolsósorban köszönöm a Népkerti Állatklinika minden dolgozójának a biztatást, a rugalmas beosztást, mely lehetővé tette, hogy befejezzem a dolgozatom írását.

A munka anyagi háttérét a Lendület program biztosította.

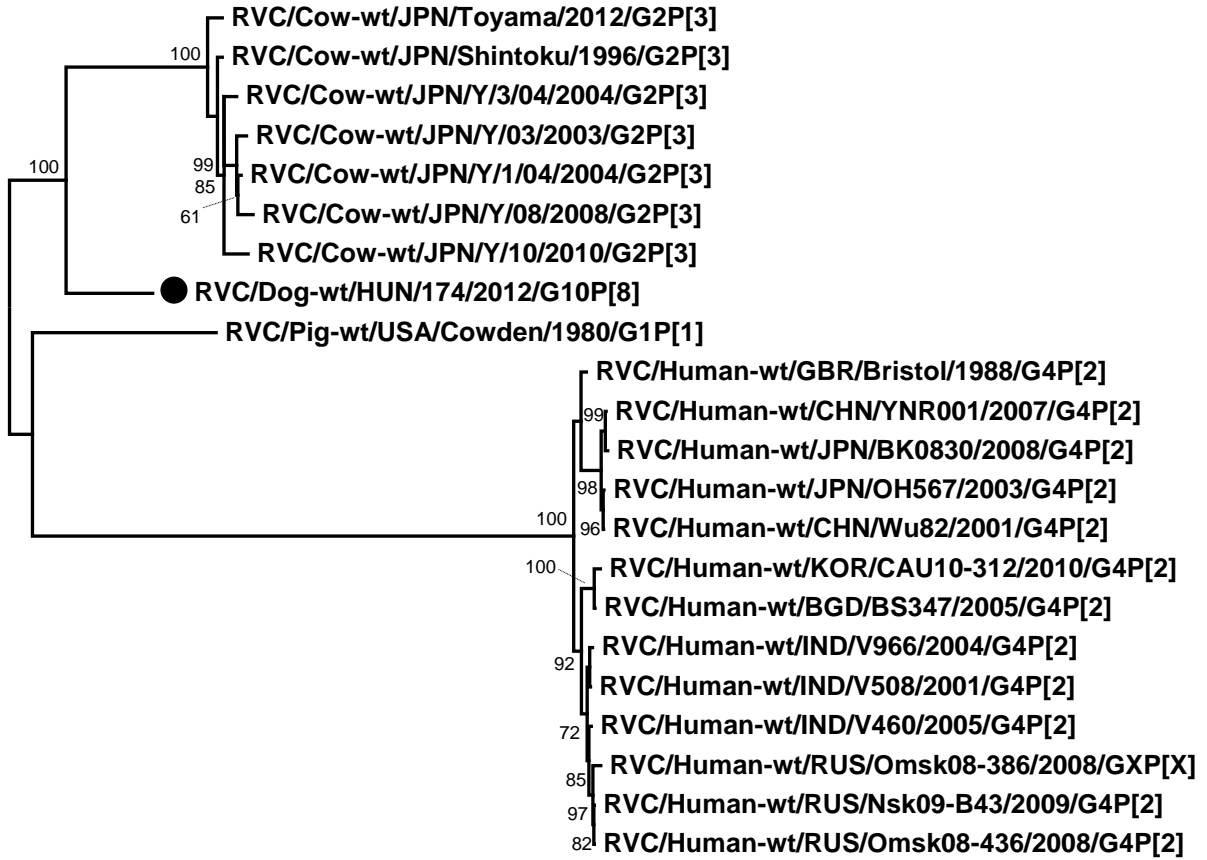
12. Függelék

F1. táblázat: A KE174/2012 kutya RVC törzs génjeinek összehasonlítása sertés (Cowden), szarvasmarha (Shintoku) és humán (Bristol) referencia törzsekkel.

Genom szegmens	RVC/Cowden			RVC/Shintoku			RVC/Bristol			Rotavirus C, KE174/2012		
	szegmens méret (nt)	ORF (nt)	as	szegmens méret (nt)	ORF (nt)	as	szegmens méret (nt)	ORF (nt)	as	szegmens méret (nt)	ORF (nt)	as
VP7	1063	999	332	1063	999	332	1063	999	332	1078	1014	337
VP4	2246	2211	736	2253	2202	733	2283	2235	744	2258	2208	735
VP6	1352	1188	395	1352	1188	395	1353	1188	395	1353	1188	395
VP1	3290	3249	1082	3309	3273	1090	3309	3273	1090	3306	3273	1090
VP2	2736	2655	884	2727	2646	881	2736	2655	884	2727	2646	881
VP3	2145	2079	692	2166	2088	695	2166	2082	693	2165	2082	693
NSP1	1235	1182	393	1273	1188	395	1270	1185	394	1266	1182	393
NSP2	995	939	312	1037	939	312	1037	939	312	1037	939	312
NSP3	1348	1209	402	1350	1209	402	1350	1209	402	1350	1209	402
NSP4	613	453	150	részleges	441	146	613	453	150	613	453	150
NSP5	693	633	210	719	630	209	730	639	212	723	633	210

a)

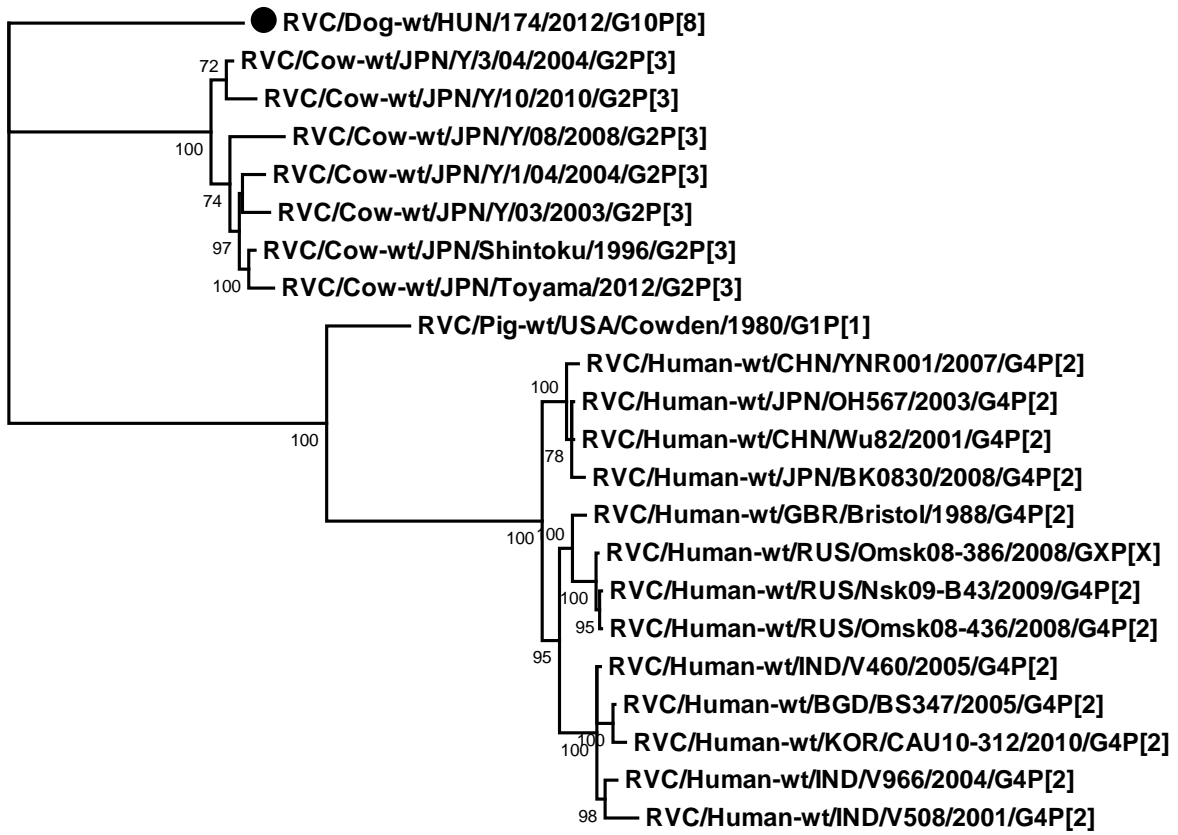
NSP1, 1182 nt



0.1

b)

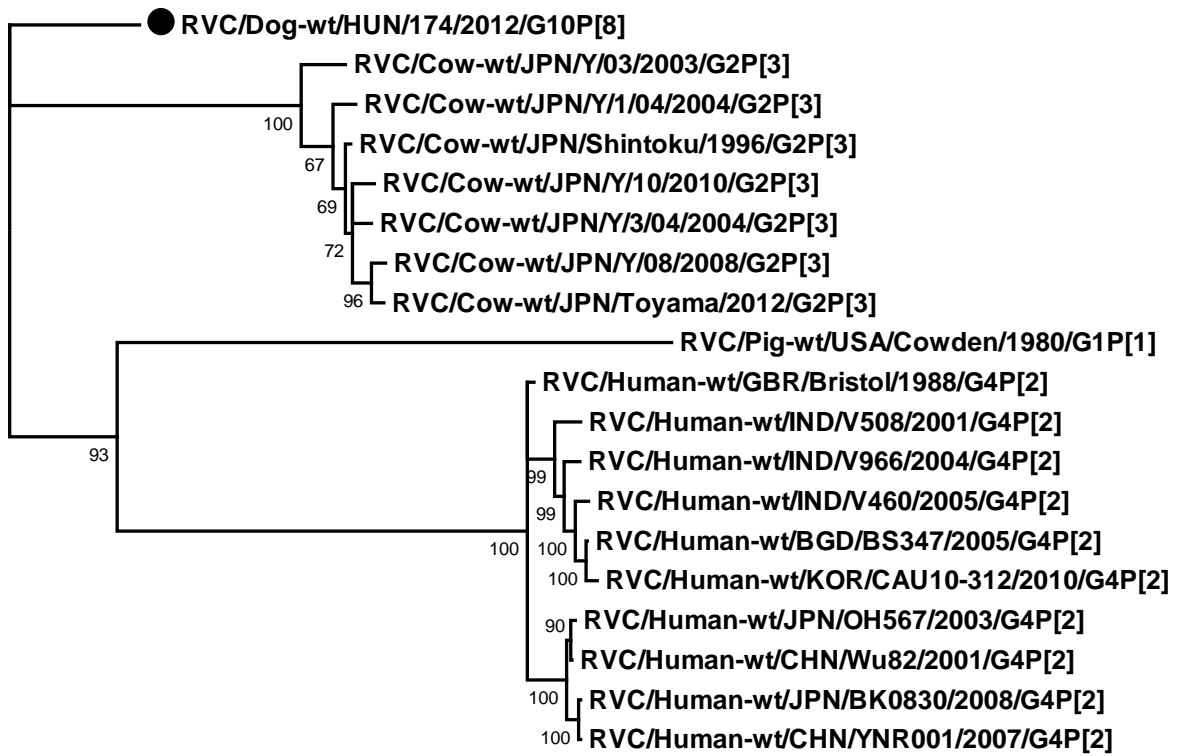
NSP2, 939 nt



0.05

c)

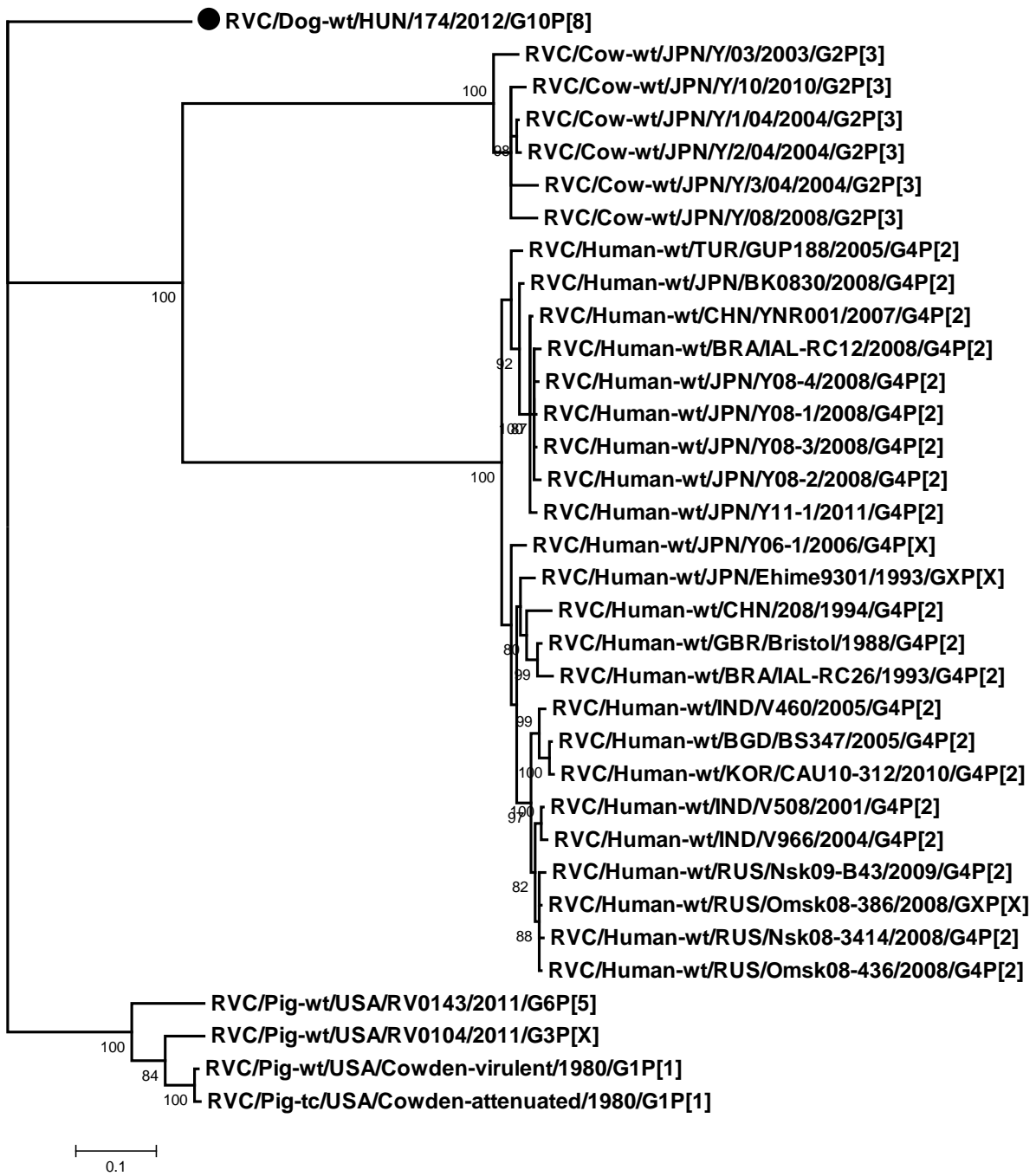
NSP3, 1209 nt



0.05

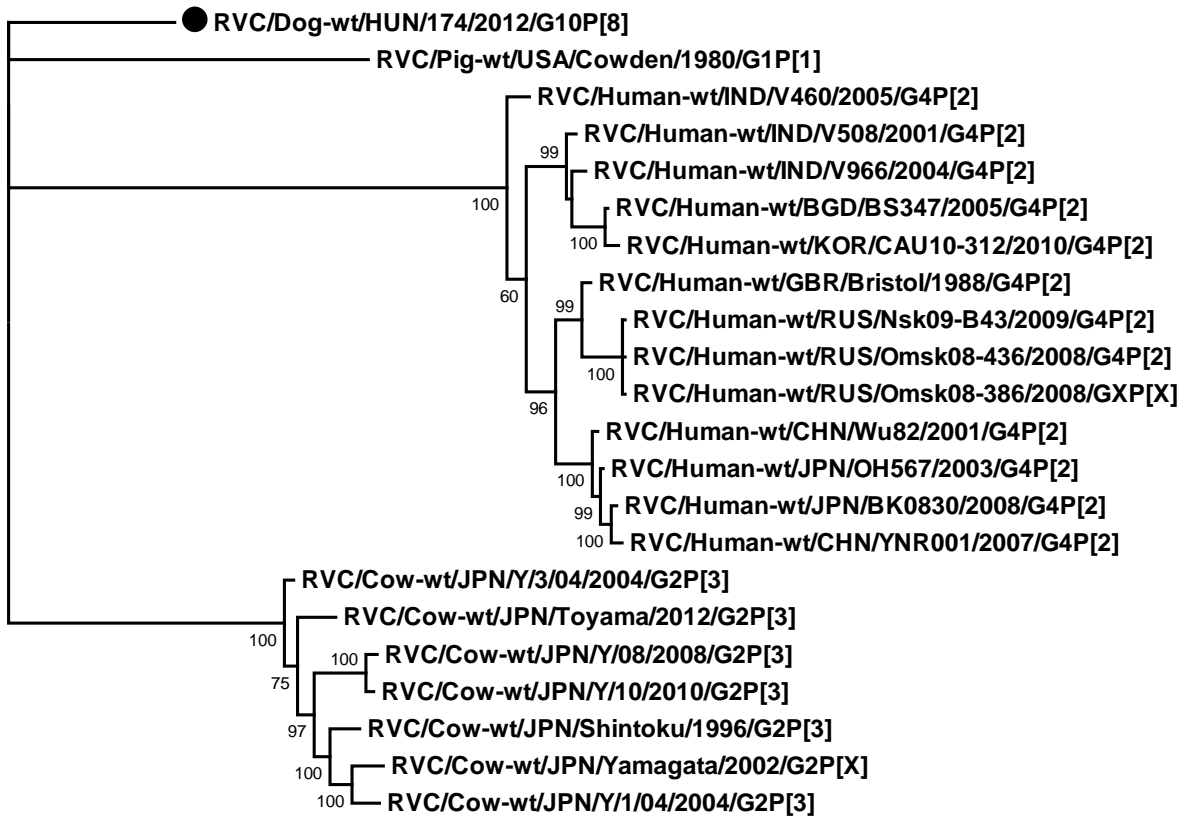
d)

NSP4, 453 nt



e)

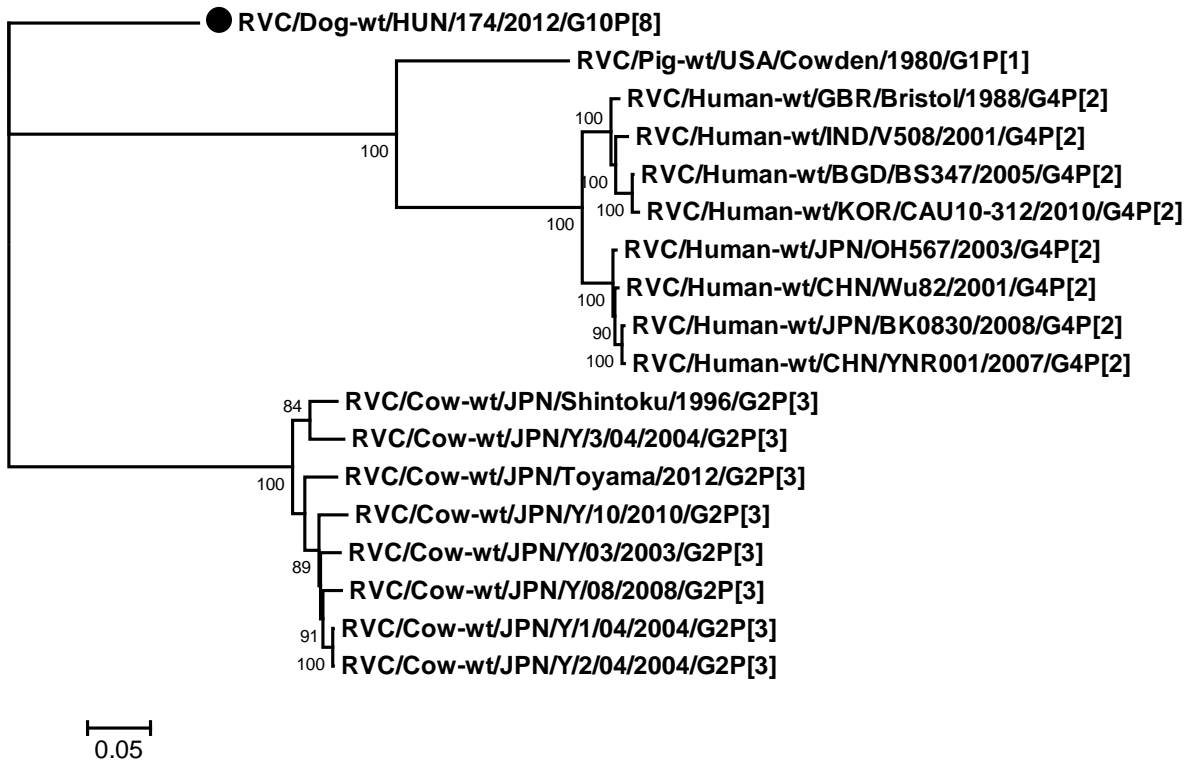
NSP5, 633 nt



0.05

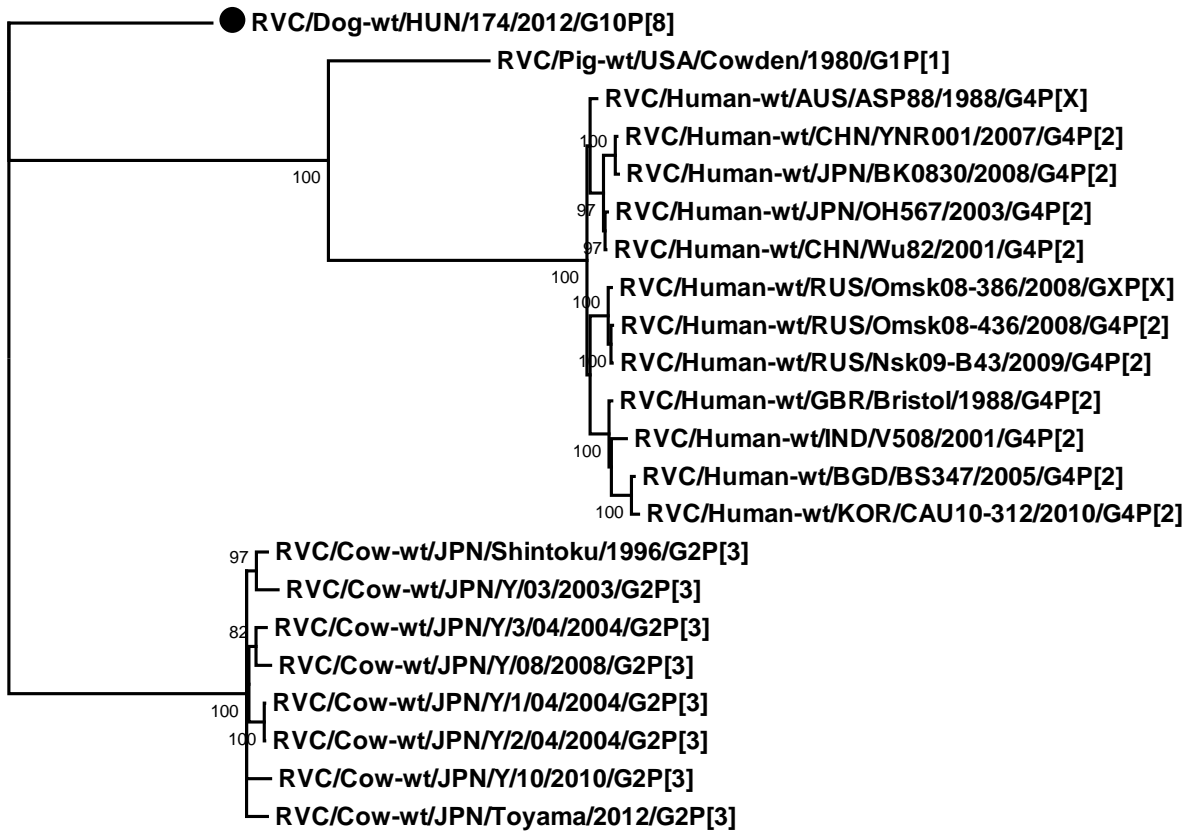
f)

VP1, 3273 nt



g)

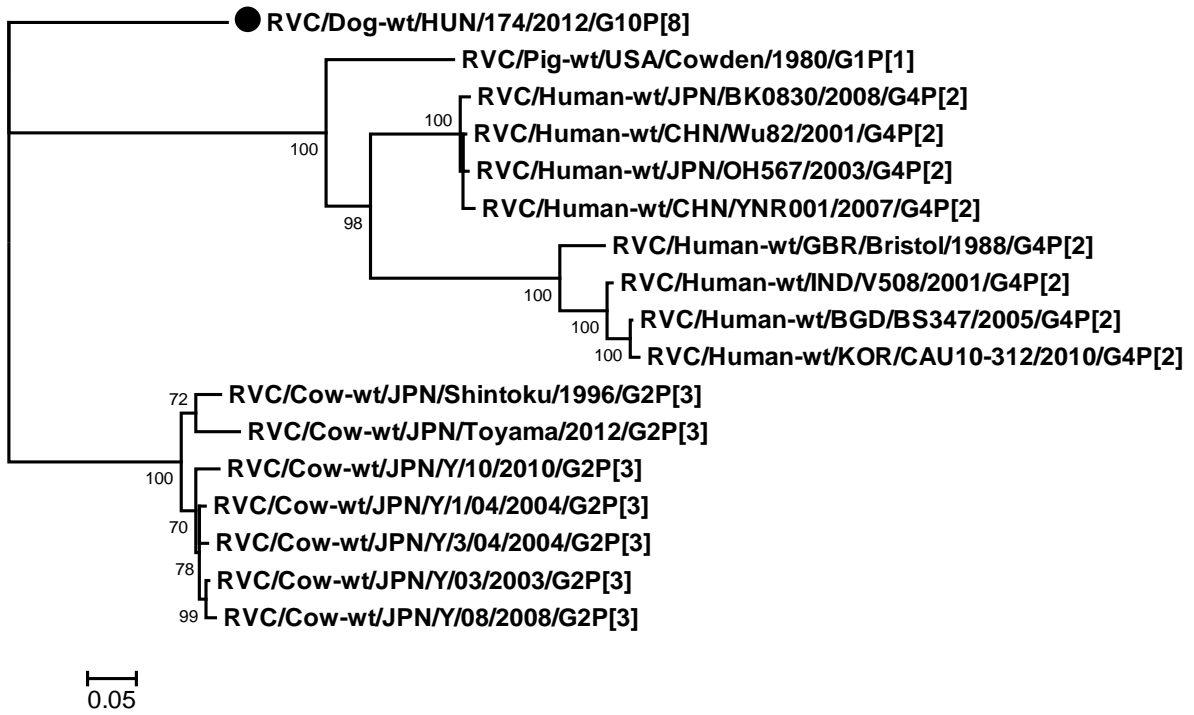
VP2, 2646 nt



0.1

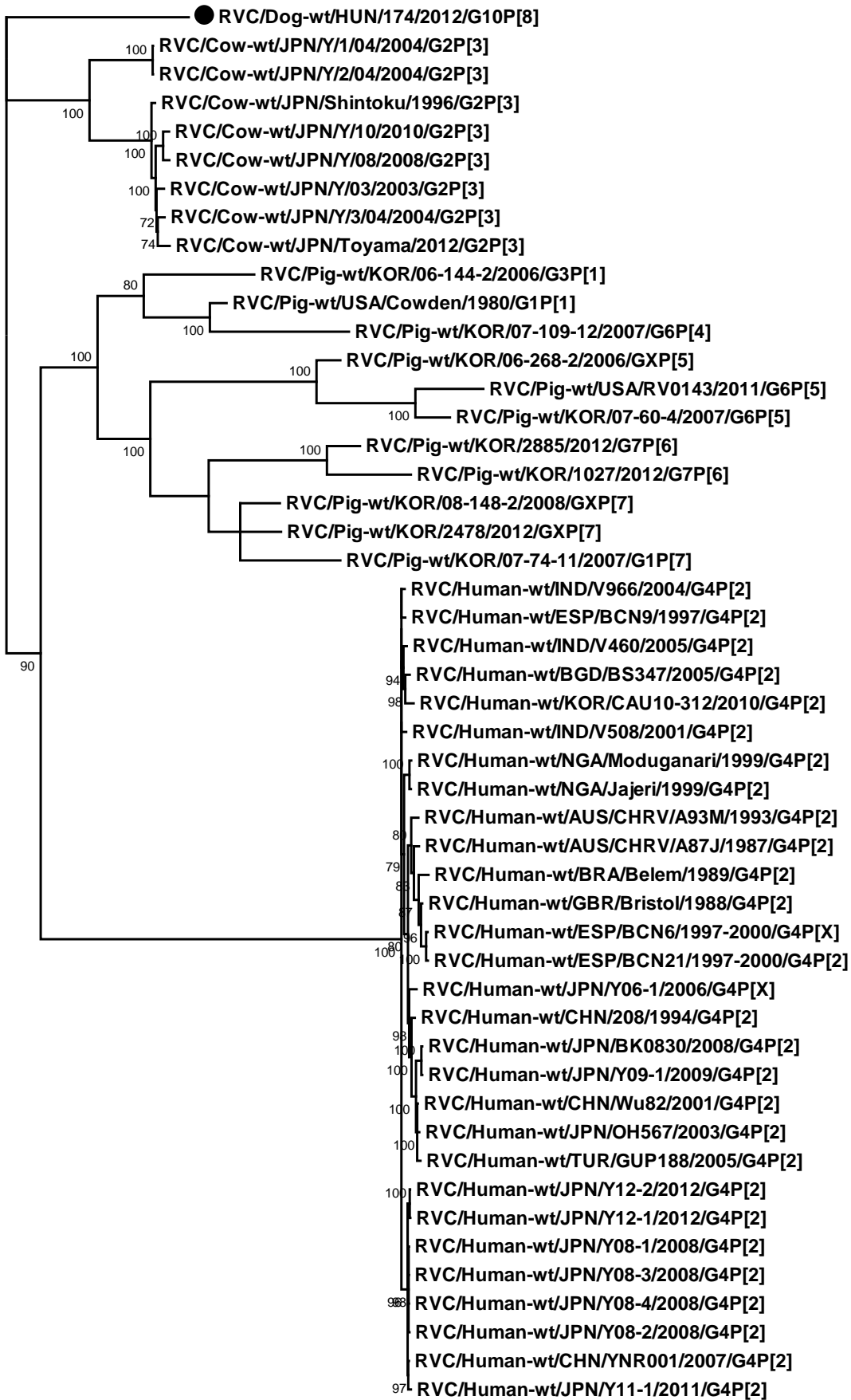
h)

VP3, 2082 nt



i)

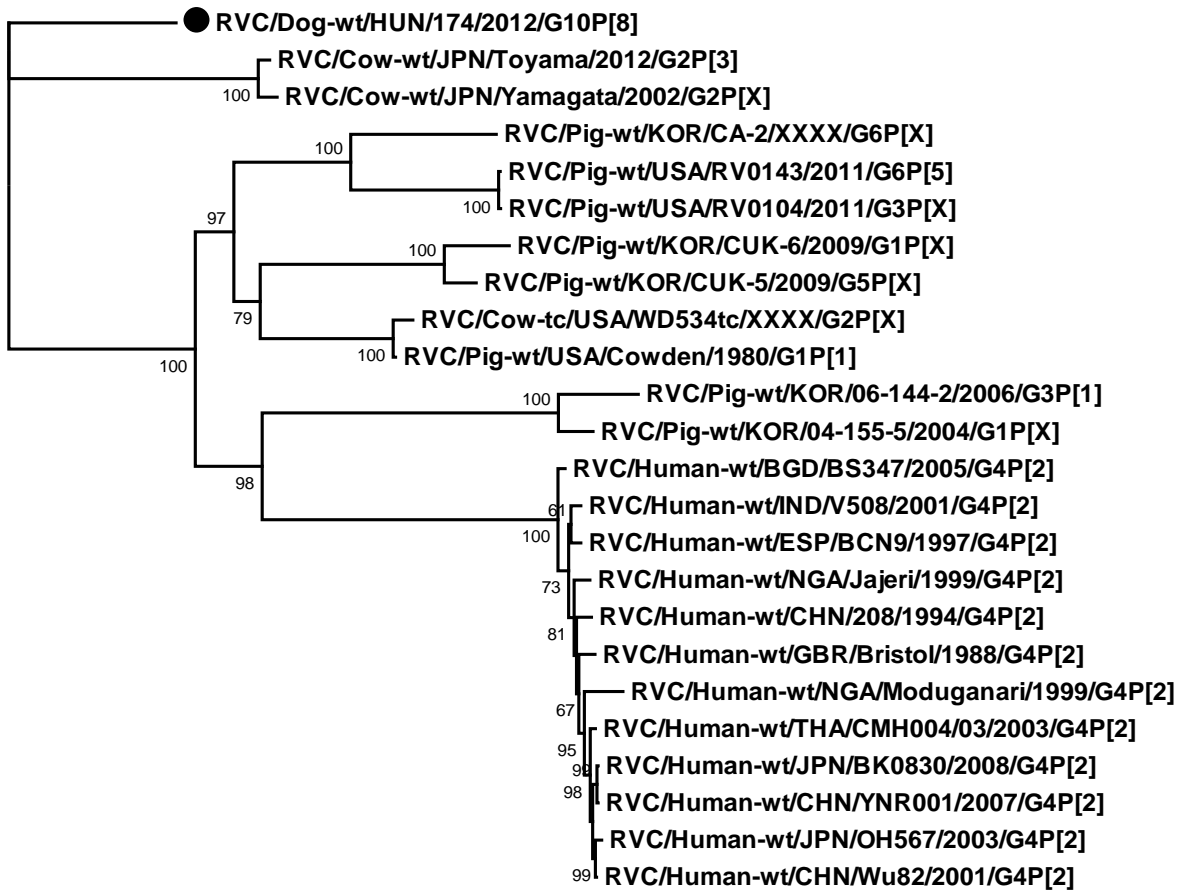
VP4, 2208 nt



0.1

j)

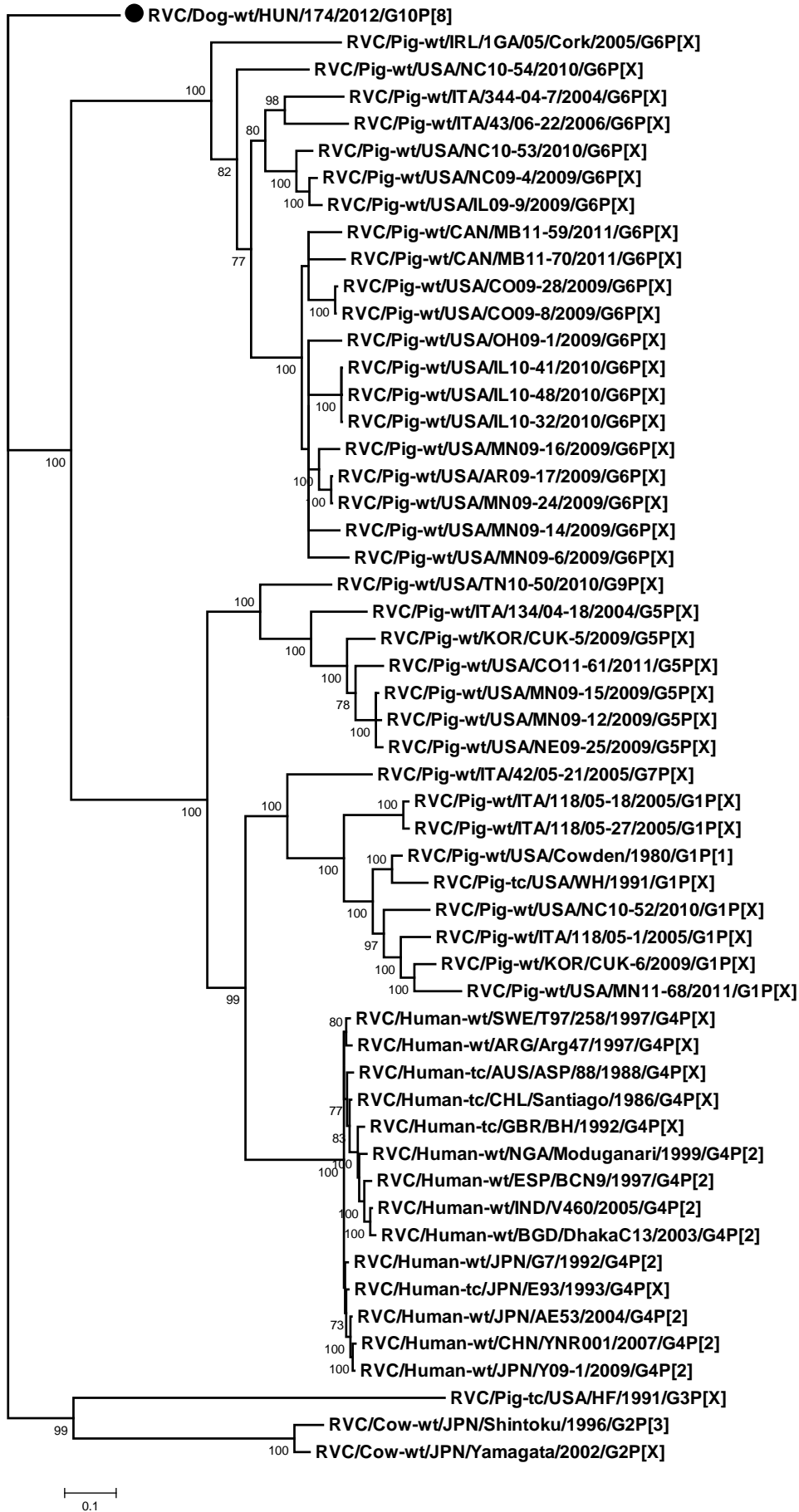
VP6, 1188 nt



0.05

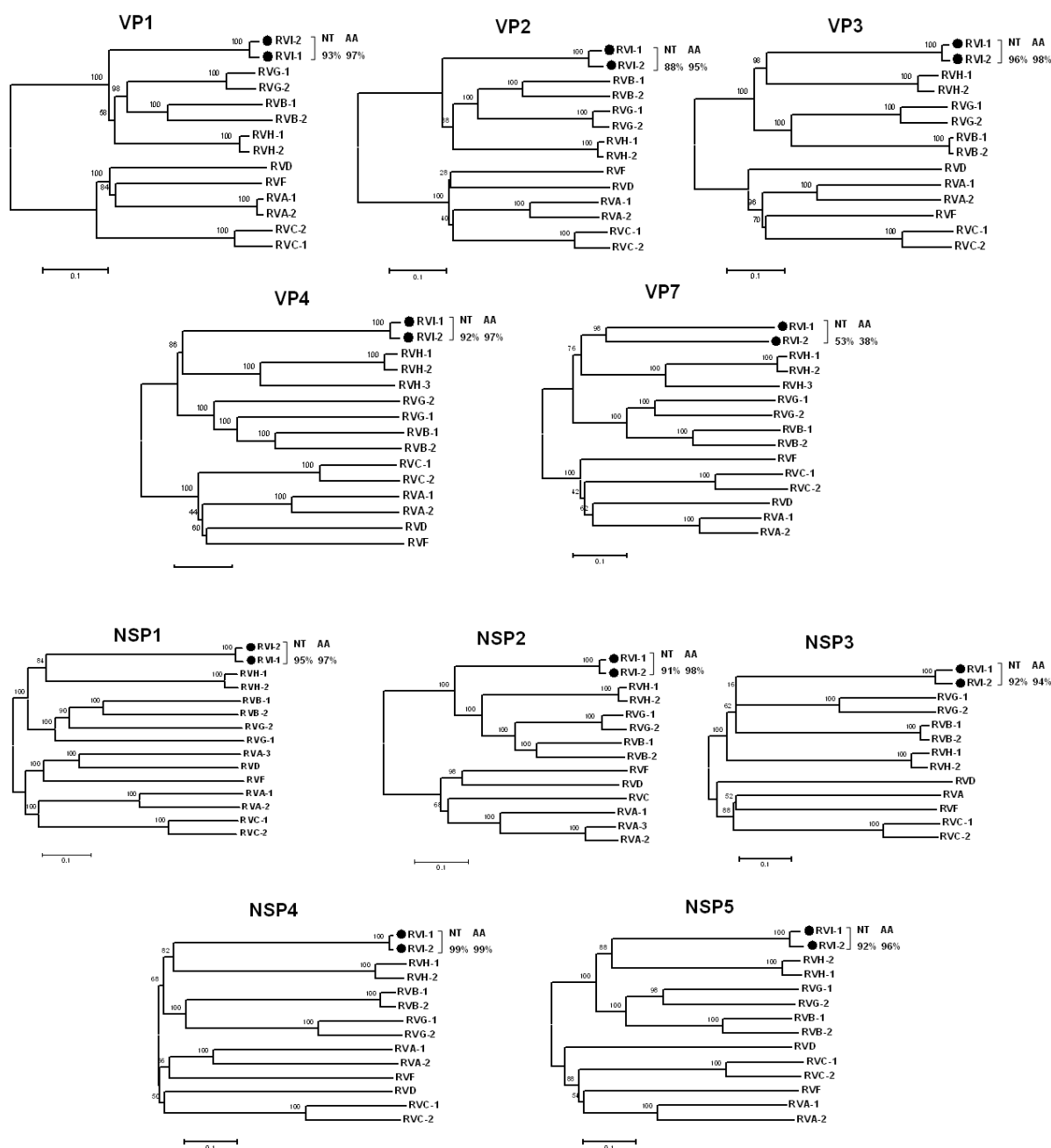
k)

VP7, 1014 nt



F1. ábra: KE174/2012 RVC törzsünk szegmenseinek nt alapú filogenetikai fáí.

Maximum likelihood fák, melyeket a 11 vírusszegmens alapján készítettünk el, a legjobb szubsztitúciós modellt használva minden egyes adathalmaznál. a) NSP1, K2P+G; b) NSP2, T3P+I; c) NSP3, TN+I; d) NSP4, T3P+G; e) NSP5, HKY+G; f) VP1, T3P+G+I; g) VP2, TN+G+I; h) VP3, GTR+G+I; i) VP4, GTR+G; j) VP6, T3P+G+I; k) VP7, T3P+G+; A legvalószínűbb genotípust csak a VP7, VP4 és VP6 esetében határoztuk meg. A többi fán az összefogó jelek a feltételezett genotípusokat jelzik, számozás nélkül. A 60-nál nagyobb bootstrap értékeket mutatjuk. Az ágak hossza arányos a genetikai távolsággal (nt szubsztitúció/ hely). Saját törzsünket fekete pöttyel jelöltük. Génenként az elemzésbe bevont szekvenciák hosszát az egyes filogenetikai fák mellett jelöltük, a bal felső sarokban.



F2. ábra: RVI törzseink filogenetikai fái génenként.

Filogenetikai fákat készítettünk a VP1-VP4, VP7, NSP1-NSP5 fehérjékből, RVA-RVH törzsek felhasználásával. Génenként az elemzésbe bevont szekvenciák hossza (as): NSP1- 390, NSP2-301, NSP3- 270, NSP4- 219, NSP5- 157 as, VP1- 1162, VP2- 982, VP3- 701, VP4- 777, VP6- 395, VP7- 265). KE135/2012 törzset RVI-1-ként, KE258/2012 törzset RVI-2-ként jelöltük (fekete pöttyel kiemelve). Az alignmenteket a Multalin internet alapú programmal készítettük, BLOSUM 62 algoritmus segítségével (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). A fákat *neighbor-joining* módszerrel hoztuk létre. A bootstrap értékeket az elágazási pontoknál tüntettük fel. A KE135/2012 és a KE528/2012 törzsek nukleotid és aminosav hasonlósági értékeit a fa jobb oldalán látjuk. Itt hívjuk fel a figyelmet, hogy a VP7 fehérje rendkívül

alacsony szekvencia homológiát mutat a két RVI törzsben. Rotavírus A-C esetében az ennyire alacsony szekvencia hasonlósági értékeknél már eltérő G genotípusba sorolódnak a törzsek. Így a két RVI törzsünket különböző G genotípusba soroltuk (G1 és G2). Más gének esetében az RVI törzseink ugyanabba a genotípusba sorolódtak.

F2. táblázat: Munkánk során a GenBankba feltöltött szekvenciák azonosítói.

Minta név	Vírus genom/gén	Genbank-i azonosító
HUN/2012/2	CAstV teljes genom	KX599349
HUN/2012/6	CAstV részleges genom	KX599350
HUN/2012/115	CAstV teljes genom	KX599351
HUN/2012/126	CAstV teljes genom	KX599352
HUN/2012/135	CAstV teljes genom	KX599353
HUN/2012/8	CAstV részleges genom	KX599354
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP1	RVC VP1, kódoló szekvencia	KP988013
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP2	RVC VP2, kódoló szekvencia	KP988014
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP3	RVC VP3, kódoló szekvencia	KP988015
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP4	RVC VP4, kódoló szekvencia	KP988016
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP6	RVC VP6, kódoló szekvencia	KP988017
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] VP7	RVC VP7, kódoló szekvencia	KP988018
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] NSP1	RVC NSP1, kódoló szekvencia	KP988019
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] NSP2	RVC NSP2, kódoló szekvencia	KP988020
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] NSP3	RVC NSP3, kódoló szekvencia	KP988021
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] NSP4	RVC NSP4, kódoló szekvencia	KP988022
RVC/Dog-wt/174/2012/G10P[8] NSP5	RVC NSP5, kódoló szekvencia	KP988023
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP1	RVI VP1, teljes szekvencia	KM369892
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP2	RVI VP2, teljes szekvencia	KM369893
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP3	RVI VP3, teljes szekvencia	KM369894
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP4	RVI VP4, teljes szekvencia	KM369895
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP6	RVI VP6, teljes szekvencia	KM369896
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] VP7	RVI VP7, teljes szekvencia	KM369897
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] NSP1	RVI NSP1, teljes szekvencia	KM369887
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] NSP2	RVI NSP2, teljes szekvencia	KM369888
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] NSP3	RVI NSP3, teljes szekvencia	KM369889
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] NSP4	RVI NSP4, teljes szekvencia	KM369890
RVI/Dog-wt/KE135/2012/GXP[X] NSP5	RVI NSP5, teljes szekvencia	KM369891
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP1	RVI VP1, teljes szekvencia	KM369903
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP2	RVI VP2, teljes szekvencia	KM369904
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP3	RVI VP3, teljes szekvencia	KM369905
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP4	RVI VP4, teljes szekvencia	KM369906
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP6	RVI VP6, teljes szekvencia	KM369907
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] VP7	RVI VP7, teljes szekvencia	KM369908
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] NSP1	RVI NSP1, teljes szekvencia	KM369898
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] NSP2	RVI NSP2, teljes szekvencia	KM369899
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] NSP3	RVI NSP3, teljes szekvencia	KM369900
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] NSP4	RVI NSP4, teljes szekvencia	KM369901
RVI/Dog-wt/KE528/2012/GXP[X] NSP5	RVI NSP5, teljes szekvencia	KM369902
HUN/2012/22	CBuV, kódoló szekvencia	MF198245
HUN/2012/126	CBuV, kódoló szekvencia	MF198246