

Állatorvostudományi Egyetem

Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Program

**Madarak polyomavírusainak és CRESS DNS
vírusainak összehasonlító genomvizsgálata**

PhD értekezés

Szabóné Kaszab Eszter

2021

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

dr. Fehér Enikő

Állatorvostudományi Kutatóintézet

Új kórokozók témacsoport

témavezető

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány

.....

Szabóné Kaszab Eszter

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	5
2.	Összefoglalás	7
3.	Summary	8
4.	Bevezetés	9
5.	Irodalmi áttekintés.....	10
5.1.	A <i>Circoviridae</i> család jellemzése	10
5.1.1.	A Circovirus nemzetség	12
5.1.2.	A Cyclovirus nemzetség.....	18
5.2.	A CRESS DNS vírusok jellemzése	19
5.3.	A polyomavírusok jellemzése	22
5.3.1.	A Gammapolyomavirus nemzetség.....	26
5.3.2.	A GHPV tulajdonságai.....	28
5.3.3.	A BFDV tulajdonságai	32
6.	Célkitűzés	34
7.	Anyag és módszer	35
7.1.	A vizsgált minták eredete.....	35
7.2.	A minták előkészítése, vírusok kimutatása, genom amplifikálás	38
7.2.1.	Virális nukleinsav kivonása	38
7.2.2.	CRESS DNS vírus specifikus széles spektrumú PCR	38
7.2.3.	Polyomavirus specifikus széles spektrumú PCR.....	38
7.2.4.	GHPV specifikus diagnosztikai PCR	40
7.2.5.	PCR termékek ellenőrzése és tisztítása	40
7.2.6.	Sanger szekvenálás.....	40
7.2.7.	CRESS DNS vírusok teljes genomjának amplifikálása	41
7.2.8.	Új GHPV törzsek teljes genomjának amplifikálása	41
7.2.9.	Új BFDV törzs teljes genomjának amplifikálása	41
7.2.10.	Újgenerációs szekvenálás.....	42
7.3.	Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek	43

7.3.1.	Szekvenciaillesztés és annotálás	43
7.3.2.	Evolúciós és filogenetikai elemzések	43
8.	Eredmények	45
8.1.	A CRESS DNS vírusokat érintő vizsgálatok eredményei	45
8.1.1.	A CRESS DNS vírus specifikus széles spektrumú PCR eredménye vadmadár eredetű minták esetében	45
8.1.2.	Az új CRESS DNS vírus törzsek teljes genom szekvenciáinak jellemzése, genetikai diverzitása, filogenetikai elemzése	46
8.1.3.	CRESS DNS vírusok előfordulása GHPV fertőzött ludak szöveteiben...	53
8.2.	A polyomavírusokat érintő vizsgálatok eredményei	55
8.2.1.	A polyomavírus specifikus széles spektrumú PCR eredménye vadmadár eredetű minták esetében.....	55
8.2.2.	Az új GHPV törzsek teljes genomszekvenciáinak jellemzése, evolúciós vizsgálatok.....	55
8.2.3.	Az új BFDV törzs teljes genomszekvenciájának jellemzése, evolúciós vizsgálatok.....	65
9.	Megbeszélés	69
9.1.	CRESS DNS vírusok vizsgálatai.....	69
9.2.	Polyomavírusokhoz kapcsolódó vizsgálatok	77
10.	Új tudományos eredmények	82
11.	Irodalomjegyzék	83
12.	A doktori kutatás eredményeinek közzélései	93
12.1.	Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	93
12.2.	A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk	93
12.3.	Konferencia közlemények.....	94
13.	Köszönetnyilvánítás.....	95
14.	Mellékletek	96

1. Rövidítések jegyzéke

as	aminosav	amino acid
ÁDI	Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság	Veterinary Diagnostic Directorate
bp	bázispár	base pair
BEAST	molekuláris szekvenciák Bayes alapú analízise	Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees
BFDV	papagáj polyomavírus	budgerigar fledgling disease virus
CaPyV	kanári polyomavírus	canary polyomavirus 1
<i>cp</i>	kapszid fehérje kódoló gén	capsid protein encoding gene
Cp	kapszid fehérje	capsid protein
CRESS	cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú	circular replication-associated protein encoding single-stranded
DNS	deoxiribonukleinsav	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxinukleotid-trifoszfát	deoxynucleoside triphosphate
dsDNS	duplaszálú DNS	double-stranded DNA
DuACyV-1	kacsa-asszociált cyclovírus 1	<i>Duck associated cyclovirus 1</i>
DuCV	kacsa circovírus	<i>Duck circovirus</i>
ESS	hatékony mintaelemszám	effective sample size
FPyV	süvöltő polyomavírus	finch polyomavirus
GgaCV-1	szajkó-asszociált cirkuláris vírus 1	Garrulus glandarius associated circular virus 1
GHPV	liba hemorrhagiás polyomavírus	goose hemorrhagic polyomavirus
GoCV	liba circovírus	<i>Goose circovirus</i>
HNEG	libák vérzésekese- és bélgyulladás	hemorrhagic nephritis and enteritis of geese
HPD	legmagasabb posteriori sűrűség	highest posterior density
ICTV	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság	International Committee on Taxonomy of Viruses

IR	intergénikus szakasz	intergenic region
kb	kilobázis	kilobase
LTA	nagy T antigén	large T antigen
MCC tree	időskálázott filogenetikai fa	maximum clade credibility tree
MCMC	Markov lánc Monte Carlo módszer	Markov chain Monte Carlo
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal	National Food Chain Safety Office
nt	nukleotid	nucleotide
ORF	nyitott leolvasási keret	open reading frame
<i>ori</i>	replikációs origó	replication origo
PBS	foszfát pufferes sóoldat	phosphate-buffered saline
PCR	polimeráz láncreakció	polymerase chain reaction
PCV	sertés circovírus	porcine circovirus
RCR	„rolling circle” replikáció	rolling circle replication
<i>rep</i>	replikáció-asszociált fehérje kódoló gén	replication-associated protein encoding gene
Rep	replikáció-asszociált fehérje	replication-associated protein
RNS	ribonukleinsav	ribonucleic acid
ssDNA	egyszálú DNS	single-stranded DNA
<i>s/s/y</i>	nukleotidcsere/hely/év	substitutions per nucleotide site per year
STA	kis t antigén	small t antigen
VP	virális fehérje	viral protein

2. Összefoglalás

A kisméretű, cirkuláris DNS genommal rendelkező vírusok tagjai közé sorolhatjuk a *Cressdnaviricota* törzs (phylum) - köztük a *Circoviridae* víruscsalád - egyszálú genommal, illetve a *Polyomaviridae* víruscsalád kétszálú genommal rendelkező, burok nélküli vírusait.

Kutatómunkánk során vizes élőhelyek környékén előforduló vadmadaraktól származó kloáka tampon mintákat használtunk fel circo-, cyclo- és egyéb cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú (circular replication-associated protein encoding single-stranded, CRESS) DNS vírusok szűrésére. Teljes genom analízis során igazoltuk a liba circovírus, az új fajként elfogadott *Duck associated cyclovirus 1*, és a szintén újonnan leírt *Garrulus glandarius associated circular virus 1* jelenlétét a rendelkezésünkre álló mintákban. Megállapítottuk, hogy az egyes CRESS DNS vírusok eloszlása adott vizes élőhelyhez, földrajzi régióhoz kötött mintázatot mutatott. A vizsgálatba bevont madárfajok vonuló életmódot folytatnak, mely elősegítheti a vírusok szóródását. A potenciális gazdafajokra és környezetre is kiterjedő mintavételezés elősegítheti a vizsgált vírusok szerepének feltárását adott ökológiai rendszerben, illetve a CRESS DNS vírusok esetleges járványtani jelentőségének meghatározását.

A *Polyomaviridae* családra kiterjedő munkánk során 22 új lúd haemorrhagiás polyomavírus (goose haemorrhagic polyomavirus, GHPV) törzs teljes genomszekvenciáját határoztuk meg házi víziszármayasokból, köztük az első, 1969-es járvány során gyűjtött törzsét. Ezen felül leírtuk egy hazai tenyészetben elhullott papagáj szövetmintájából származó papagáj polyomavírus (budgerigar fledgling disease virus, BFDV) törzs teljes genomjának nukleotid sorrendjét is. Mindegyik törzs genomja nagyfokú hasonlóságot mutatott a génbank adatbázisában elérhető referencia szekvenciákkal. Tanulmányoztuk a GHPV előfordulását 2005 és 2020 között. Éves viszonyításban a GHPV pozitív minták száma hullámzó tendenciát mutatott, amely a 2008., 2013. és 2017. években csúcsosodott ki.

Az elérhető GHPV, BFDV, süvöltő polyomavírus (finch polyomavirus, FPvV) és kanári polyomavírus (canary polyomavirus, CaPyV) szekvenciák felhasználásával evolúciós elemzéseket végeztünk. A szelekciós analízis szerint a madár polyomavírus genomokra/génekre negatív szelekciós nyomás hat, pozitív szelekciós nyomásra utaló értékeket a BFDV kapszid fehérjéket kódoló génjei esetében tapasztaltunk. A becsült szubsztitúciós ráták alapján megállapíthattuk, hogy a GHPV genomja lassabb ütemű változást mutatott a BFDV és FPvV törzsekhez képest. Saját és szakirodalmi adatok alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált, eddig szűk gazdaspektrumú kórokozóként kezelt, konzervatív genommal rendelkező CRESS DNS vírusok és polyomavírusok a korábban feltételezethez képest szélesebb körben elterjedtek és nagyobb genetikai változatosságot mutatnak.

3. Summary

Viruses with small circular DNA genomes comprise also members of *Cressdnaviricota* phylum (including *Circoviridae* family) with single-stranded genome, and viruses of the *Polyomaviridae* family with double-stranded genome.

In this study cloacal swab samples, collected from wild bird species living at various aquatic sites in Hungary, were examined to reveal the presence of circoviruses, cycloviruses or other circular replication-associated protein encoding single-stranded (CRESS) DNA viruses. The samples were collected for compulsory seasonal influenza virus surveillance. *Goose circovirus*, *Duck associated cyclovirus 1* and garrulus glandarius associated circular virus 1 were detected and subjected to whole genome sequencing. We observed that variable CRESS DNA viruses were more common in a particular study area. The investigated hosts are migratory wild birds that may facilitate the global spread of the virus. More intense sampling, including tissues of potential hosts and environmental specimens, could help better understanding of the ecology and epizootiology of CRESS DNA viruses.

To characterize the genome of circulating goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV) strains, 22 novel complete genome sequences were determined including a virus strain isolated from samples collected during the first recorded GHPV-associated disease outbreak in 1969. Furthermore, we identified the complete genome of a new budgerigar fledgling disease virus (BFDV) strain from a mixture of liver and kidney samples of a juvenile ring-necked parakeet. The genome structures were identical to the reference GHPV and BFDV genomes available in GenBank. We analysed the prevalence of GHPV in Hungary between 2015 and 2020. The number of the tested samples and positive case numbers fluctuated with higher GHPV positive case numbers for year 2008, 2013 and 2017.

Phylogenetic and evolutionary analyses were performed using the available GHPV, BFDV, finch polyomavirus (FPyV) and canary polyomavirus (CaPyV) sequences. Our analysis suggested that purifying selection acts on the protein coding regions of avian polyomavirus genomes. However, in case of BFDV, positive selection pressure was also predicted in a few positions within capsid proteins. Based on the estimated substitution rates, we assessed that GHPV evolves more slowly than BFDV and FPyV. We established that CRESS DNA viruses and polyomaviruses show a wider host spectrum and higher genetic diversity than previously thought.

4. Bevezetés

A *Polyomaviridae* és *Circoviridae* víruscsaládba tartozó kisméretű, cirkuláris DNS genommal rendelkező vírusok súlyos veszteségeket okozhatnak az érintett állatállományokban. Állatorvosi szempontból ezeknek a víruscsaládoknak legjelentősebb tagjai a sertés circovírus 2 (*Porcine circovirus 2*), a lúd haemorrhagiás polyomavírus (goose haemorrhagic polyomavirus, GHPV), a liba circovírus (*Goose circovirus*, GoCV), a papagájok csőr- és tollbetegségét okozó circovírus (*Beak and feather disease virus*), vagy a szintén papagájokat megbetegítő, tollasodási zavarokat okozó polyomavírus (budgerigar fledgling disease polyomavirus, BFDV). Immunszuppresszív hatásuk mellett fejlődési és szervi rendellenességet okozhatnak, de klinikai tünetek kiváltása nélkül is képesek szaporodni a gazdaszervezetben, ezáltal biztosítva a vírusok fennmaradását az érintett állományban.

A különböző újgenerációs szekvenálási technikák széleskörű alkalmazása, valamint a molekuláris virológiai vizsgáló módszerek fejlődése lehetővé teszi új vírusok azonosítását, valamint ismert vírusfajok leírását eddig ismeretlen gazdafajokban (vad-, haszon-, dísz- és társállatokban egyaránt) világszerte. A vírusfertőzések lefolyásának tisztázásához, valamint járványtani következtetések levonásához nélkülözhetetlen a vírusok genom szintű elemzése. A különböző módszerek együttes alkalmazása hozzájárulhat az egyre hatékonyabb diagnosztikai módszerek és a védekezésben kulcsfontosságú szerepet játszó vakcinák fejlesztéséhez is.

Tervezett kutatómunkánk során egyik fő célunk volt a különböző gazdafajokból származó, állategészségügyi szempontból jelentős, kisméretű cirkuláris DNS genommal rendelkező vírusok szekvencia adatainak gyűjtése és jellemzése. Ezen felül a hazai állományok járványügyi adatainak feltérképezésével igyekeztünk bővíteni eddigi ismereteinket. A különböző vírustörzsek genomjának összehasonlításával szeretnénk mélyebb ismeretet szerezni ezeknek a vírusoknak a genetikai diverzitásáról, a lehetséges gazdaszervezetekről és rezervoárokról, valamint a vírusokat érintő evolúciós mechanizmusok jelentőségéről.

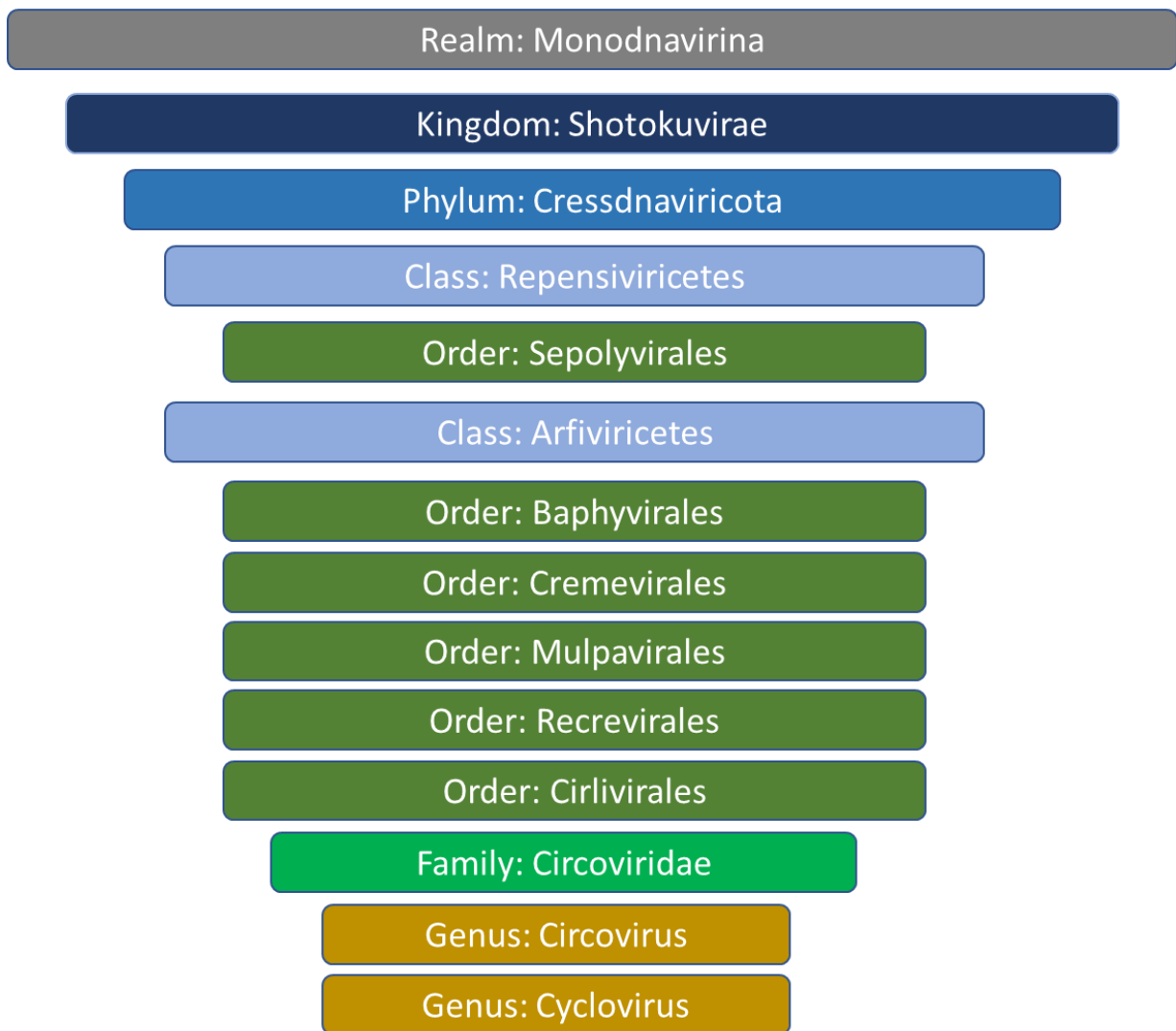
5. Irodalmi áttekintés

5.1. A *Circoviridae* család jellemzése

A *Circoviridae* család cirkuláris, egyszálú (single-stranded, ss) dezoxiribonukleinsav (DNS) genommal rendelkező vírusokat foglal magába, melyek örökítőanyaga megközelítőleg 1,7-2,1 kilobázis (kb) hosszúságú. A család tagjai burok nélküli, 15-25 nanométer átmérőjű, ikozaédres szimmetriát mutató kapsziddal rendelkeznek. Ambiszensz elrendeződésű genomjuk két fő nyitott leolvasási kerete a vírus replikációjához szükséges fehérjé(ke)t (replication-associated protein, Rep) és a kapszid fehérjét (capsid, Cp) kódolja (Delwart és Li, 2012; Li és mtsai, 2010a; Rosario és mtsai, 2017).

A *Circoviridae* családot 1995-ben hozták létre, amikor felismerték, hogy a család tagjainak genomja nem mutat homológiát más, szintén eukarióta ssDNS vírus, például a *Geminiviridae* vagy *Parvoviridae* családok fajainak genomjával. Végül az összes állati eredetű, cirkuláris, ssDNS genommal rendelkező vírus a családon belüli egyetlen nemzetségbe, a *Circovirus* nemzetségbe került (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). A család legismertebb tagja a sertéseket érintő kórképek (például választott malacok sokszervi elégtelensége, dermatitis, légzőszervi és reprodukív rendellenességek) kiváltásáért felelős sertés circovírus 2 (*Porcine circovirus 2*, PCV2), a papagájok csőr- és tollbetegségéért felelős circovírus (*Beak and feather disease virus*), valamint a vérképző szervek megbetegedését okozó csirke anaemia vírus (*Chicken anaemia virus*, CAV) volt (Rosario és mtsai, 2017). A molekuláris biológiai technológiák fejlődésének és metagenomikai kutatásoknak köszönhetően azonban egyre több szekenciát írtak le, így a *Circoviridae* család újabb fajokkal és nemzetséggel bővült. Később a kutatások rávilágítottak arra, hogy számos eltérés található a különböző vírusok genomszerkezetében, a nyitott leolvasási keretek (open reading frame, ORF) elhelyezkedésében, a replikációs mechanizmusban, ami indokoltá tette az addigi taxonómiai osztályozás felülbírálatát (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2017).

Jelenleg a *Circoviridae* víruscsalád a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) online felületén elérhető rendszertan alapján (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) két nemzetségből áll: a *Circovirus* nemzetség 43, a *Cyclovirus* nemzetség 51 vírus fajt foglal magába (**1. ábra**).



1. ábra A *Circoviridae* család rendszertani elhelyezkedése.

A korábban ide tartozó *Gyrovirus* nemzetséget, melybe a CAV is tartozott, átsorolták az *Anelloviridae* víruscsaládba (Rosario és mtsai, 2017). Az ICTV jelenlegi ajánlása szerint külön fajba tartozónak tekinthetünk egy circo- vagy cyclovírus törzset, ha egy másik vírustörzshöz viszonyítva a teljes genom szekvencia azonosság közöttük alacsonyabb, mint 80%. A replikáció-asszociált fehérje kódoló gén (*rep*) filogenetikai elemzése, és a genom elrendeződés (különös tekintettel a replikációs origó, az *ori* elhelyezkedésére a kódoló szakaszokhoz viszonyítva) segít eldönteni, hogy az adott genom a *Circovirus* vagy *Cyclovirus* nemzetséghez tartozik-e (1. táblázat) (Rosario és mtsai, 2017).

1. táblázat Circo- és cyclovírus genomok közötti eltérések összefoglalása.

	<i>Circovirus</i> nemzetség	<i>Cyclovirus</i> nemzetség
Méret	~1700-2100 bázis	~1700-1900 bázis
Virális szálon kódolt fő nyitott olvasási keret	replikáció-asszociált fehérjét kódoló	kapszid fehérjét kódoló
A replikációs origó elhelyezkedése	Rep-et kódoló szálon	Cp-t kódoló szálon
A két fő nyitott olvasási keret 3' vége közötti IR	nagyobb	hiányzik vagy rövidebb
„Rolling circle” replikáció motívumok	I.motívum: FT(L/I)NN II.motívum: PHLQG III.motívum: YC(S/x)K	I.motívum: FT(L/W)NN II.motívum: (P/x)HLQG III.motívum: Y(C/I)(S/x)K
Superfamily 3 helikáz motívumok	Walker-A: G(P/x)(P/x)GxGK(S/t) Walker-B: uuDDF C-motívum: uTSN	Walker-A: G(P/x)(P/t)(G/x)xGKS Walker-B: uuDDF C-motívum: uTS(N/e)

Az elmúlt években számos cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét (Rep) kódoló egyszálú (circular Rep-encoding single-stranded, CRESS) DNS vírust azonosítottak különböző eukarióta gazdafajokból és környezeti mintákból egyaránt (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2012), amelyek Rep szekvenciája hasonlóságot mutat a *Circoviridae* család tagjainak Rep szekvenciájával. Az ICTV ajánlása szerint amennyiben egy új vírus genomszekvenciája a circovírusokéval vagy cyclovírusokéval mutat hasonlóságot, viszont 55%-nál alacsonyabb teljes genom szekvencia azonosságot mutat, akkor az eddig besorolatlan CRESS DNS vírusok közé tartozik (Rosario és mtsai, 2017).

5.1.1. A *Circovirus* nemzetség

Általános jellemzés, előfordulás

A *Circovirus* nemzetséghez tartozó vírusok 1,7-2,1 kb hosszúságú genomjában a két fő ORF ambiszensz elrendeződést mutat. Az ORF1, melyet általánosságban *rep*-ként jegyeznek, a vírusgenom replikációhoz szükséges fehérjéket kódolja és a virion genomi nukleinsav szálának megfelelő szálon található, míg a replikatív kettőszálú nukleinsav komplementer szálán található ORF2 a Cp-t kódoló *cp* gént tartalmazza. A Cp N-terminális régiója bázikus aminosavban (as) gazdag, mely a sejtmagba jutásban, valamint a virális genom becsomagolásában játszik kiemelkedő szerepet (Rosario és mtsai, 2017; Zhao és mtsai, 2019). A két ORF 5' vége között a nagy intergénikus szakasz (intergenic region, IR) foglalja magában az *ori* régiót, benne szárhurok (stem-loop) struktúrával, amely egy konzervatív, 9 nukleotidból (nt) álló (nonanukleotid, nonamer) szekvenciát tartalmaz (általában

TAGTATTAC). A két ORF 3' vége közötti kis IR funkciója egyelőre ismeretlen (Todd és mtsai, 2001a).

A sertés circovírusoknál ismert egy harmadik ORF is, az ORF3, mely által kódolt fehérjének apoptotikus hatást tulajdonítanak. Szekvencia analízisek alapján a kacsza, galamb és papagáj circovírus genomjában is található ORF3, melynek pontos funkciója nem ismert, de a sertés circovírusok ORF3-jához hasonlóan apoptotikus tulajdonságot társítanak hozzá (Mankertz és mtsai, 2000; Robino és mtsai, 2014; Xiang és mtsai, 2012; Zhang és mtsai, 2020b). További ORF-ek jelenlétéről számos circovírus faj esetében beszámoltak (Zhao és mtsai, 2019). A PCV2 ORF4-ben leírt génjéhez például anti-apoptotikus funkciót társítanak (Rosario és mtsai, 2017).

A circovírus fertőzéseket 2010-ig csak különböző madárfajokhoz (például papagáj), valamint a sertésekhez kötötték. Metagenomikai módszerek, degenerált polimeráz láncreakció (PCR) és „rolling circle” amplifikáció segítségével azonban számos új (potenciális) gazdafajt sikerült azonosítani (Rosario és mtsai, 2017). A circovírusok jelenlétét kimutatták több emlős faj bélsár- és szövetmintáiban, például csimpánz, kutya, denevér, nyérc és ember esetében is (Ge és mtsai, 2011; He és mtsai, 2013; Kapoor és mtsai, 2012; Li és mtsai, 2010a; Li és mtsai, 2010b; Li és mtsai, 2013; Lian és mtsai, 2014). Emlősökön felül azonosították halakban (Lőrincz és mtsai, 2011; Lőrincz és mtsai, 2012) és hüllőkben (Altan és mtsai, 2019), valamint gerinctelenek közül kullancsban és szúnyogban is (Sadeghi és mtsai, 2018) (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Integrálódott circovírus szekvenciákat írtak le emlősök, madarak, kétélűek, hüllők, nyálkahalok, csontos halak és kígyók esetében, ám az integrált szakaszok funkcionális jelentősége nem ismert (Altan és mtsai, 2019; Dennis és mtsai, 2019).

A circovírusok előfordulása madarakban rendkívül széleskörű. Kimutatták azokat galambok (Columbidae), papagájok (Psittacidae), nyári lúd (*Anser anser*), kacsák (Anatidae), kanári (*Serinus canaria*), ezüstsirály (*Larus argentatus*), holló (*Corvus corax*), seregély (*Sturnus vulgaris*), hattyú (*Cygnus olor*), pinty (*Erythrura gouldiae*) fajok mintáiban is (Banda és mtsai, 2007; Halami és mtsai, 2008; Hattermann és mtsai, 2003; Johné és mtsai, 2006a; Mankertz és mtsai, 2000; Niagro és mtsai, 1998; Stewart és mtsai, 2006; Todd és mtsai, 2001b; Todd és mtsai, 2001c; Todd és mtsai, 2007). A madár circovírus fertőzésekről (papagáj, liba, kacsza, galamb és pinty) általánosságban elmondható, hogy immunszuppressziót váltanak ki, a fertőzött állatok elhullását sok esetben az emiatt kialakuló másodlagos fertőzésekre való fogékonyság okozza. Szakirodalmi adatok alapján a madár circovírus fertőzés jellemző közvetlen tünetei közé a levertség, letargia, súlyvesztés, hasmenés, tollasodási zavarok sorolhatóak. Kórszöveti vizsgálatok nyirokszervekben limfocita depléciót mutattak (Halami és mtsai, 2008; Todd, 2000, 2004).

A legismertebb madarakat fertőző circovírus a papagájok csőr- és tollbetegségét okozó vírus (*Beak and feather disease virus*), mely által okozott tüneteket már 1975-ben leírta egy ausztrál állatorvos (Hakimuddin és mtsai, 2016). Fiatal egyedek esetében gyakran elhullással jár a fertőzés, míg a felgyógyult és tünetmentes fiatal és idősebb példányok részt vehetnek a kórokozó terjesztésében. Fiatal állatok esetén a tünetek látványosak lehetnek, csőr deformáció (szerkezete felpuhul, megrepedezik, elhajlik), krónikus tollvesztés léphet fel (**2. ábra**). A röpképtelenné vált, csőrbetegség miatt alultáplált egyedek fokozottan fogékonyak másodlagos fertőzésekre, mely végül az állat pusztulásához vezethet. A vírus a Psittaciformes rend tagjait fertőzi, beleértve a kakadukat (*Cacatuidea* család fajai), arákat (*Psittacidae* család fajai), örvös sándorpapagájokat (*Psittacula krameri*) és jákópapagájokat (*Psittacus erithacus*) (Bert és mtsai, 2005; Hakimuddin és mtsai, 2016). Az intenzív papagájkereskedelemnek köszönhetően a csőr- és tollbetegséget okozó circovírus már az egész világon elterjedt (Bert és mtsai, 2005).

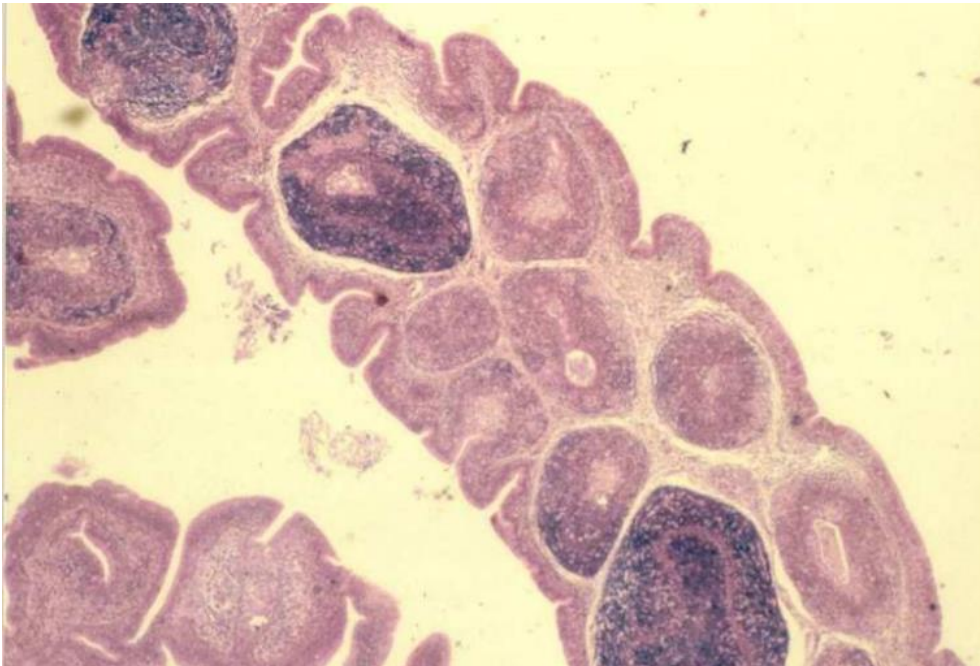


2. ábra Bal oldalon egy rózsás kakadu (*Eolophus roseicapilla*), míg jobb oldalon egy sárgabóbitás kakadu (*Cacatua galerita*) esetében figyelhetjük meg a circovírus fertőzés jellegzetes tollvesztéssel és csőrdeformitással járó tüneteit. (A kép forrása: Figure 1.1, <https://researchoutput.csu.edu.au/ws/portalfiles/portal/9315285/80155>)

A galamb circovírus jelentős veszteségeket okoz a versenyztetés céljából tartott tenyészetek vagy húsgalamb állományok esetében világszerte. A fiatal, többnyire 1-4 hónapos madarak étvágytalanokká válnak, lesóványodnak, légzőszervi tüneteket mutatnak, hasmenés

jelentkezhet náluk; hajlamossá válnak a másodlagos fertőzésekre. A nyirokszövetekben limfocita depléció alakul ki. A fertőzéssel járó kórképet sokszor nevezik „fiatal galamb betegség” szindrómának (Cságola és mtsai, 2012; Duchatel és mtsai, 2006).

Egy németországi libaállomány esetében 1997-ben csökkent táplálékfelvételt és hasznosulást írtak le. Az érintett ludak eltérő fejlettségi és tápláltsági állapotba kerültek, „szétnőttek”. Ezek a változások beleillettek a „satnyaság” kórképbe. A betegséget kiváltó kórokozót azonosítás után liba circovírusnak nevezték el (*Goose circovirus*, GoCV) (Soike és mtsai, 1999). A liba circovírus növendékkorban okozza a legsúlyosabb veszteségeket. A fertőzés tünetei közé sorolható a tollasodási zavar, egyéb fejlődési rendellenességek, „szétnövés”, hasmenés. Az elhullott egyedek vizsgálatai megállapították a lép, thymus és máj megnagyobbodását, valamint T-limfocita depléciót a thymusban, lépben és Fabricius-tömlőben (**3. ábra**). Utóbbiakban elektronmikroszkópos vizsgálattal kimutathatóvá válhatnak a circovírusok sorokba rendeződött csoportjai, úgynevezett parakristályos elrendeződésben. A circovírussal fertőzött állományokban a társfertőzések előfordulása sokkal gyakoribb lehet (Stenzel és mtsai, 2018a).



3. ábra A circovírus szaporodása következtében a Fabricius-tömlőben megfigyelhető limfocita depléció. (A kép forrása: Figure 11., <http://www.bvpa.org.uk/pdfs/palya1011.pdf>)

A kacsacircovírust (*Duck circovirus*, DuCV) először Németországban írták le 2003-ban (Soike és mtsai, 2004). Ezt követően számos országban kimutatták, többek között Magyarországon, Kínában, az Egyesült Államokban, Olaszországban és Dél-Koreában. A fertőzést követően az érintett állatok tollasodási zavarokat, fejlődési rendellenességet,

súlyvesztést mutathatnak. Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok limfocita depléciót, nekrozist, a Fabricius-tömlőben hisztiocitózist mutattak. Az állatok fogékonyá válnak másodlagos fertőzésekre (Liu és mtsai, 2020; Soike és mtsai, 2004)

Az eddigi kutatások alapján a circovírusok terjedése horizontális és vertikális (szülőről utódra történő fertőzés) úton egyaránt megvalósulhat. Papagáj, galamb és liba circovírust kimutattak bélsárban, ami feltételezi a vírus horizontális terjedését a bélsárral szennyezett táplálék és ivóvíz elfogyasztásával vagy por belégzésével. A vertikális fertőzés gyanúja is felmerült, mivel embriók és napos madarak szerveiből is sikerült circovírust kimutatni (Duchatel és mtsai, 2006; Hakimuddin és mtsai, 2016; Shehata és mtsai, 2016).

A circovírus fertőzés sejt szintű folyamatai, a vírus replikációja

A *Circoviridae* családba tartozó vírusok tekintetében legtöbb adat a PCV1 és PCV2 fertőzés sejt szintű folyamatairól áll rendelkezésre, mivel ezek (illetve a PCV1 és PCV2 mellett a PCV3) PK-15 sejt vonalon (sertés vese sejt vonal) jól tenyésztethetők (Mora-Diaz és mtsai, 2020; Todd és mtsai, 2001a; Zhang és mtsai, 2020a). A madár circovírusok szaporítása sejt kultúrákon nem megoldott, ennek köszönhetően hiányos információk állnak rendelkezésünkre.

A sertés circovírus célsejtjei közé tartoznak az epitéliális és endotél sejtek, valamint monociták, makrofágok és dendrikus sejtek (Nauwynck és mtsai, 2012). A vírus glikozaminoglikán (például heprán-szulfát és kondroitin-szulfát) és feltételezhetően egyéb sejt felszíni receptorokhoz (például szialsav) kötődést követően klatrin-, kaveloa- és dinamin-dependens, valamint ATP-áz és GTP-áz-dependens endocitózissal kerülhet a sejt citoplazmájába. A vírus genom fehérjeburokból történő kicsomagolódását követően az ssDNS genom a sejtmagba kerül, ahol a gazdasejt enzimméjéjét használja a virális genom sokszorozásához (Misinzo és mtsai, 2006; Nauwynck és mtsai, 2012), melyek az érintett sejt szaporodási ciklusának S fázisában elérhetőek. A replikáció „rolling circle” mechanizmussal (rolling circle replication, RCR) történik (Todd és mtsai, 2001a). Az ssDNS genom duplaszálú intermediér formává alakul és szuperhelikális szerkezetet vesz fel, így a transzkripció és replikáció templátjaként szolgál. Alternatív splicing folyamatoknak köszönhetően több különböző RNS íródhat át a circovírusok genomjáról, belérvé a különböző Rep fehérjéket, amelyek funkcióbeli különbségei még nem teljesen tisztázottak (Cheung, 2012). A Rep szekvencia igen konzervatív; olyan motívumokat tartalmaz, melyek jelentősége az RCR során érvényesül. A fehérje N-terminális régiójában három RCR motívumot különböztetünk meg (Rosario és mtsai, 2012). Az I. motívum ([FT(L/I)NN]) pontos funkciója nem ismert, valószínűleg az *ori* körüli ismétlődő szakaszok felismerésében játszhat szerepet. A II. motívum ([PHLQGG]) szerepe a Mg²⁺ ionok kötése, melyek a nonanukleotid motívumot tartalmazó hurok hasításhoz nélkülözhetetlenek. A III. motívum ([YC(S/x)K]) a hurok hasadását katalizálja. A

Rep C-terminális régiójában található domén a superfamily 3 (SF3) helikázokra jellemző három fő motívumot tartalmaz, melyek a következők: Walker-A ([G(P/x)(P/x)GxGK(S/t)]), Walker-B ([uuDDF]) és C-motívum ([uTSN]); mindezeket végül egy arginin motívum követ (**1. táblázat**) (Rosario és mtsai, 2012; Rosario és mtsai, 2017).

A sertés circovírusok esetében a RCR kiindulópontjaként szolgáló hurok szára 11, a hurok része 10-12 bázis hosszúságú. 3' végénél hat bázis hosszú tandem ismétlődések (repeat) helyezkednek el (négy repeat). A replikáció során a Rep fehérjéket is tartalmazó replikációs komplex a tandem repeateket felismerve a replikatív intermedier DNS-hez kötődik. A komplex endonukleáz és helikáz aktivitása révén a hurok szétcsavarását és szál vágását segíti a nonanukleotid motívum T-A (7. és 8. nt) nukleotidjai közt. A hasított szál szolgáltatja a replikáció primerjét. A sejt enzimek által végzett szálhosszabbítást követően a szárhurok struktúrát elérve a lánchosszabbítás terminációjában és az új szál összezárásában szintén a Rep fehérjék jutnak szerephez. A fertőzés során a replikációs és kapszid fehérjék a sejtmagban halmozódnak fel (Cheung, 2012). A kapszid fehérjék és a megsokszorozódott DNS segítségével a sejtmagban és citoplazmában szerelődnek össze az új virionok (Todd és mtsai, 2001a). Bár madár circovírusok esetében a folyamatok ilyen részletességgel nem ismertek, a rendelkezésre álló adatok a papagájok toll- és csőrbetegségét okozó vírusa esetében hasonló mechanizmusra utalnak (Chen és mtsai, 2019).

A circovírusok diagnosztikája, a fertőzések megelőzése

PCV2 fertőzés gyanúja esetében a klinikai tünetek, kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok, valamint a szövetekben a vírus nukleinsav és antigén (in situ hibridizáció és immunhisztokémiai módszerek) kimutatása nyújtják az elsődleges diagnosztikai eszközöket (Saikumar és Das, 2019). Egyéb circovírusok, közte a madár circovírusok esetében a klinikai kép kevésbé egyértelmű lehet, így elsősorban molekuláris biológiai módszereket használnak, leggyakrabban PCR-t (adott kórokozó genetikai anyagának jelenlétét vagy hiányát igazolja) és real-time PCR-t (a kórokozó mennyiségi meghatározására is alkalmas). A szekvenálási módszerek (Sanger szekvenálás, újgenerációs szekvenálás) alkalmasak az ismert és ismeretlen vírusok/vírusterhek kimutatására, a PCR eredményének megerősítésére (Rosario és mtsai, 2017). Ellenanyagok kimutatására irányuló vizsgálatot, például az enzimhez kötött immunsorbens próbát (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), elsősorban lezajlott fertőzés igazolására, a vakcinázás időzítésének meghatározására, valamint hatékonyságának követésére alkalmazzák (Saikumar és Das, 2019). Az ELISA módszer alkalmazása mellett az egyes kórokozók által generált immunválaszt hemagglutinációs és hemagglutináció-gátlási (HAG) próbával is vizsgálják (Cheng és mtsai, 2020; Khalesi és mtsai, 2005). A vírus izolálása a korábban leírtak szerint csak néhány vírus, például a PCV1, PCV2 és PCV3 esetében megoldott (Mora-Diaz és mtsai, 2020; Todd és mtsai, 2001a).

A circovírus fertőzés ellen az általános járványvédelmi és állathigiéniai szabályok betartásával lehet védekezni ([http://qpc.adm.slu.se/8 Animal Health at Farm level/page 13.htm](http://qpc.adm.slu.se/8_Animal_Health_at_Farm_level/page_13.htm)). Ennél hatékonyabb védekezést jelent a kereskedelmi forgalomban elérhető vakcinák megjelenése, mely a PCV2 esetében valósult meg. Jelenleg kétféle PCV2 elleni vakcina érhető el Európában és Észak-Amerikában: inaktivált (például Circovac, Suvaxyn PCV) vagy baculovírus rendszer által termelt rekombináns PCV2 Cp alegységvakcina (Porcilis PCV, CircoFLEX, Circumvent PCV) (Saikumar és Das, 2019). Az engedélyezett vakcinákon felül számos, még kísérleti fázisban lévő vakcinajelölt létezik, melyek a sertés circovírusok mellett megoldást nyújthatnak a papagájok csőr- és tollbetegségét okozó circovírus, valamint a galamb circovírus elleni védekezésre is (Bonne és mtsai, 2009; Regnard és mtsai, 2017; Stenzel és mtsai, 2018b).

5.1.2. A Cyclovírus nemzetség

Li és munkatársai 2010-ben főemlősök (csimpánz és humán) bélsármintájában és különböző állatokból származó hústermékekben (teve, csirke, marha, kecske és bárány) azonosítottak circovírus-szerű szekvenciákat, melyeket az eltérő genetikai tulajdonságok miatt cyclovírusoknak neveztek el (Li és mtsai, 2010a). Jelenlétüket azóta igazolták számos egyéb emlős eredetű mintában (denevér, macska, ló, mókus, egér), madarakban (kacsa) és rovarokban (csótány, szitakötő, pók, hangya) (Dayaram és mtsai, 2013; Fehér és mtsai, 2017; Ge és mtsai, 2011; Li és mtsai, 2010a; Li és mtsai, 2011; Li és mtsai, 2015; Lima és mtsai, 2015; Padilla-Rodriguez és mtsai, 2013; Rosario és mtsai, 2011; Rosario és mtsai, 2018; Sato és mtsai, 2015; Zhang és mtsai, 2014). Emberek esetében a vírust kimutatták széklet és szérum mintában, cerebrospinális folyadékban és légzőszervi váladékban is (Rosario és mtsai, 2017; Tan le és mtsai, 2013). A cyclovírusok nagy részét széklet- és bélmintában azonosították, ami megnehezíti a gazdafaj pontos meghatározását. Kérdéses, hogy a gazdaszervezetet fertőző vírust sikerült azonosítani vagy olyan vírusokat, melyek replikáció nélkül keresztülhaladtak a gazdaszervezet tápcsatornáján (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2017).

A cyclovírusok a circovírusokhoz hasonlóan cirkuláris, 1,7-1,9 kb hosszúságú ssDNS genommal rendelkeznek. A két fő, Rep és Cp fehérjét kódoló ORF szintén megtalálható a genomjukban, ám a circovírusokkal ellentétben itt a Rep fehérjét kódoló ORF a replikációs intermedier szálon helyezkedik el. A cyclovírus Rep a circovírushoz hasonló RCR és SF3 motívumokat tartalmaz, melyek sorrendben RCR motívum I [FT(L/W)NN], II [(P/x)HLQG], III [Y(C/I)(S/x)K] és SF3 helikáz motívum Walker-A [G(P/x)(P/t)(G/x)xGKS], Walker-B [uuDDF], és C-motívum [uTS(N/e)] (Rosario és mtsai, 2012). Ahogy már a circovírusoknál is láthattuk, a Cp N-terminális régiója bázikus aminosavakban gazdag. A feltételezett *ori*-t jellemzően ugyanaz a szárhurok részben megtalálható nonamer (TAGTATTAC) szekvencia jelöli, mint a

circovírusok esetében (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2012). A hasonlóságok ellenére a Rep szekvenciát érintő különbségek, a 3' intergénikus régió hiánya vagy rövidebb mivolta, a kódoló régiók eltérő elrendeződése, valamint az *ori* Cp-t kódoló szálon való elhelyezkedése miatt a két nemzetség tagjai jól elkülöníthetőek (Li és mtsai, 2010a; Rosario és mtsai, 2017). A replikáció mechanizmusának főbb lépései feltehetőleg megegyeznek a circovírusoknál tapasztaltakkal (Li és mtsai, 2010a; Rosario és mtsai, 2012).

5.2. A CRESS DNS vírusok jellemzése

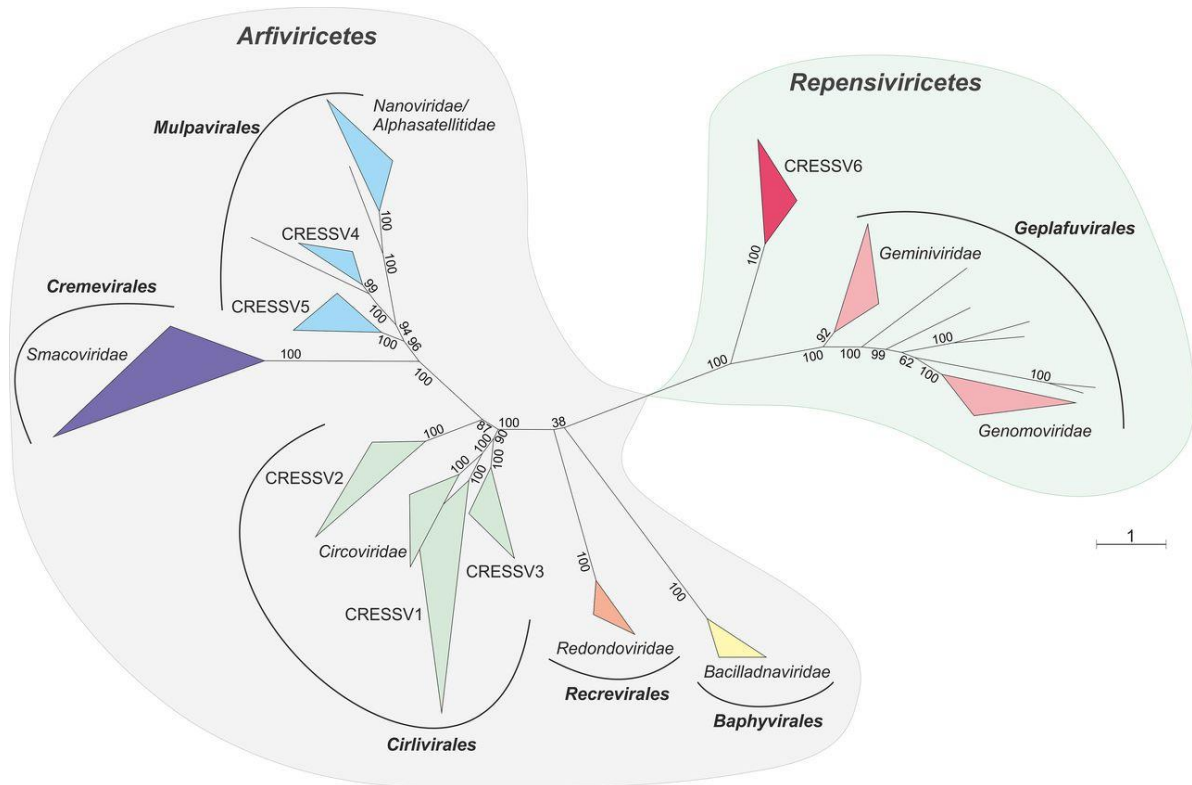
A virális metagenomikai kutatások az ssDNS vírusok nagy diverzitását fedték fel. Rávilágítottak, hogy számos új virális genom nem osztályozható a meglévő taxonómiai kategóriák szerint, így 2012-ben megpróbálták egy megfelelő klasszifikációs rendszert létrehozni ezek számára (Rosario és mtsai, 2012). Rosario és munkatársai (2012) ajánlása szerint nyolc típusra különíthetjük el a CRESS DNS vírusok genomját. A kategóriák kialakítása során szerepet játszik a genomi elrendeződés, a feltételezett ORF-ek száma, a lehetséges szárhurok struktúrát tartalmazó intergénikus régió elhelyezkedése, és a konzervált nonanukleotid motívum orientációja (Rosario és mtsai, 2012; Zhao és mtsai, 2019). Az évek során a be nem sorolt CRESS DNS vírusok száma rohamosan növekedett, így szükségessé vált a rendszertani kategorizálás lehetőségének vizsgálata. 2020-ban az ICTV létrehozott egy új vírus törzset (phylumot), a *Cressdnaviricota*-t. Ide olyan vírusok tartoznak, melyek cirkuláris genommal rendelkeznek, RCR mechanizmussal sokszorozódnak, két génjük kódolja a Rep és Cp fehérjéket, illetve eukarióta gazdákat fertőznek (Krupovic és mtsai, 2020). Hét víruscsalád sorolható a törzsbe, melyek tagjait állatok (*Circoviridae*, *Smacoviridae*, *Redondoviridae*), növények (*Nanoviridae*, *Geminiviridae*), gombák (*Genomoviridae*) és kovamoszatok (*Bacilladnaviridae*) mintáiból azonosítottak. A filogenetikai elemzésbe a hét víruscsaládon felül bevonták az eddig be nem sorolt CRESS DNS vírusokat is (Kazlauskas és mtsai, 2018). A végeredményként kapott 13 csoport (a 7 víruscsalád és CRESSV1-CRESSV6 csoport) két nagy kládba különült el (**4. ábra**):

I. klád, *Repensiviricetes* osztály: magában foglalja a *Geminiviridae* és *Genomoviridae* víruscsaládokat, valamint a CRESSV6 csoportot. Elkülönülésüket indokolja, hogy a Rep fehérjén belül található egy úgynevezett GRF motívum, ami a másik kládba tartozó vírusok Rep fehérjéjéből hiányzik, illetve hiányzik a helikáz doménből az „arginin ujj”.

II. klád, *Arfiviricetes* osztály: ide tartozik a többi eukarióta CRESS DNS vírus. Öt különböző rendet különböztetnek meg a Rep alapján készült filogenetikai fán belüli elhelyezkedés, eltérő genom hossz és felépítés alapján:

- *Baphyvirales*, ide tartozik a *Bacilladnaviridae* család.
- *Cirlivirales*, ide tartozik a *Circoviridae* család és a CRESSV1-3 csoportok.

- *Cremevirales*, ide tartozik a *Smacoviridae* család.
- *Mulpavirales*, ide tartozik a *Nanoviridae* család, CRESSV4-5 csoportok.
- *Recrevirales*, ide tartozik a *Redondoviridae* család.



4. ábra Eukarióta szervezetekben leírt CRESS DNS vírusok Rep szekvenciáján alapuló maximum-likelihood filogenetikai fa.
(A kép forrása: Krupovic és mtsai., 2020)

Az új rendszertani kategóriák segítségével az eddig ismert eukarióta gazda eredetű CRESS DNS vírusokat sikerült rendszerbe foglalni, ami remélhetőleg megkönnyíti a jövőben felfedezett új vírusok azonosítását is (Krupovic és mtsai, 2020).

A víruscsaládokba nem sorolható, *Cirlivirales* rendbe tartozó CRESS DNS vírusok széles körben elterjedtek. A gerinces gazdafajokon túl azonosították őket többek között édes- és sósvízi ökoszisztémákban (kagyló, vízi csiga, rovarlárva, víz- és üledék mintákban), szennyvízben (Dayaram és mtsai, 2015a; Dayaram és mtsai, 2015b; Dayaram és mtsai, 2016; Kaszab és mtsai, 2018; Zhao és mtsai, 2019).

A CRESS DNS vírusok evolúciójának egyik fő eleme a rekombináció, amely nemcsak taxonómiai szempontból közeli törzsek szekvenciái közt fordulhat elő, hanem egymástól igen távol eső törzsek kapcsolatával, vagy nem virális elemek közreműködésével is létrejöhethet.

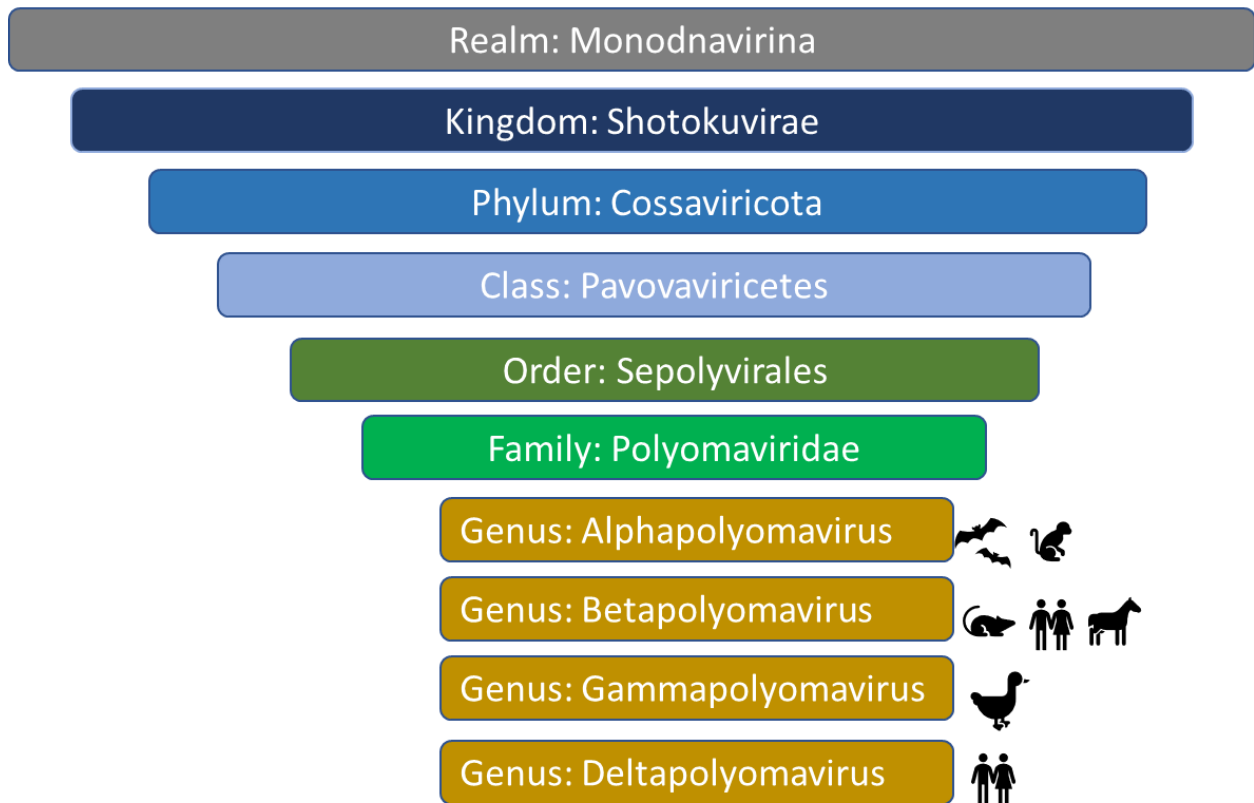
Mindez nagyban hozzájárul a CRESS DNS vírusok sokszínűségéhez és alkalmazkodóképességéhez (Kazlauskas és mtsai, 2018; Kazlauskas és mtsai, 2019).

Az utóbbi években több integrálódott CRESS DNS vírus szekvenciához hasonló szakaszt (a legtöbb a *rep*-pel mutatott homológiát) azonosítottak növényekben, gombákban, állatokban és protisztákban, melyek a múltban gazdaszervezetei lehettek CRESS DNS vírusoknak (Zhao és mtsai, 2019). Arról egyelőre nincs információnk, hogy ezek a genom részletek vagy vírusszerű szekvenciák mennyire aktívak, milyen mértékben befolyásolják a gazdaszervezet fitneszét. Felfedezésük segítséget nyújthat az evolúciós ismereteink elmélyítésében is. Ezek a genomi fossziliák információt szolgáltathatnak arról, hogy mikor és hol létezett a cirkuláris genommal rendelkező vírusok őse; eredetük feltehetőleg sokkal korábbra nyúlik, mint ahogy azt eddig képzeltük. Minél több integrálódott CRESS DNS vírusszakaszt találunk, annál közelebb juthatunk az evolúciós kérdések megválaszolásához (Zhao és mtsai, 2019).

5.3. A polyomavírusok jellemzése

Általános jellemzés, rendszertan

A *Polyomaviridae* víruscsalád – 9 faj kivételével – négy nemzetségre különíthető el a nagy tumor antigént (large tumor antigen, LTA) kódoló szekvenciák alapján, melyek az Alpha- (44 faj), Beta- (36 faj), Delta- (4 faj) és Gammapolyomavirus (9 faj) nemzetség (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) (5. ábra).



5. ábra A *Polyomaviridae* család rendszertana.

A polyomavírusok 45-50 nanométer átmérőjű, ikozaédres szimmetriát mutató virionja burok nélküli kapsziddal rendelkezik. A kapszid 72 kapszomerből áll, mely felépítésére jellemző, hogy a szimmetrikusan elhelyezkedő virális protein 1 (viral protein, VP) pentamereket VP2 és VP3 fehérjék veszik körül (Calvignac-Spencer és mtsai, 2016; Johne és mtsai, 2011). A duplaszálú DNS (double-stranded DNS, dsDNS) genom körülbelül 5000 bázispár (bp) hosszúságú, melyről kétirányú leolvasás lehetséges, korai és késői kifejeződésű géneket különítünk el. A korai gének kódolják a nagy és kis tumor (small tumor antigen, STA) antigéneket, melyeknek szerepe van a génexpresszió szabályozásában, a sejttanszformációban, a virális DNS replikációban, illetve patogenezisben. A késői gének kódolják a kapszidot alkotó VP1, VP2 és VP3 szerkezeti fehérjéket (Johne és Müller, 2007; Johne és mtsai, 2011). Az SV40 (simian virus 40, *Macaca mulatta polyomavirus 1*) és egyéb

emlős polyomavírusok kódolnak egy körülbelül 15 kDA (kilodalton) méretű, VP4-nek nevezett fehérjét, amely a kapszidban nem jelenik meg. Ez SV40 esetében a sejt lízisében játszhat szerepet (Johne és mtsai, 2011). Néhány humán polyomavírus (például JC és BK polyomavírus) kódol egy agnoproteinnek nevezett nem strukturális fehérjét, ami feltehetőleg bekapcsolódik a replikációs ciklus néhány lépésébe és kapszidképzésbe, de az érett virionnak már nem része (Johne és mtsai, 2011). A papagáj polyomavírusok genomja is tartalmaz VP4 ORF-et, ám az emlős polyomavírusokkal ellentétben a kódolt gének termékei már az érett virion részét képezik, valószínűleg részt vesznek a virális genom csomagolásában és apoptózist indukálnak (Johne és Müller, 2007). A többi madár polyomavírus esetében az LTA, STA, VP1, VP2 és VP3 mellett egy ORF-X nevű ORF-et azonosítottak, amit a nagyfokú szekvenciaszintű eltérés ellenére is a papagáj polyomavírus VP4 génjével homológ szakasznak tekintenek (Johne és Müller, 2001, 2007). Egyes rágcsáló polyomavírusoknál (egér és hörcsög polyomavírus) leírtak egy középső T antigént, melyhez onkogén szerepet társítanak (Calvignac-Spencer és mtsai, 2016; Johné és Müller, 2007; Johné és mtsai, 2011).

Előfordulás

A *Polyomaviridae* családba tartozó vírusok emlősök és madarak között széles körben elterjedtek. Emlősök esetében általában egyetlen fajt vagy néhány közeli rokon fajt képesek produktív formában fertőzni, míg madarak esetében sokkal tágabb gazdaspektrumról számoltak be (Johne és mtsai, 2005; Johné és mtsai, 2006b). Az 1950-es évek közepén elsőként leírt polyomavírus az egér polyomavírus (*Mus musculus polyomavirus 1*) volt (Stewart és mtsai, 1957); ezt követően egyéb rágcsálók, majomfélékből, denevérek, szarvasmarhából, emberből, sőt halakból és gerinctelenekből is mutattak ki újabb polyomavírus fajokat (Buck és mtsai, 2016; Calvignac-Spencer és mtsai, 2016; Moens és mtsai, 2017). Polyomavírus-szerű szekvenciákat kimutattak ízeltlábúakban is (Buck és mtsai, 2016).

A legtöbb emlős polyomavírus élethosszan át tartó szubklinikai fertőzést okoz. Immunhiányos gazdaszervezetben azonban súlyos betegségek, jelenhetnek meg, egyes polyomavírusok daganatkeltő képességgel is rendelkeznek (Johne és mtsai, 2011). Erre a tumorképző tulajdonságukra utal taxonómiai elnevezésük is, hisz a *polyoma* szó görög eredetű, jelentése: poly="sok", oma="tumorok". Ezzel szemben a madár polyomavírusokat heveny lefolyású, nagy mortalitással járó betegségek kapcsán írták le, melyek ép immunrendszerű gazdaszervezetet is érinthetnek (Johne és mtsai, 2005; Stewart és mtsai, 1958).

A daganatkutatás egyik modellvírusa a rhesus majomból származó SV40, ami egyben az első DNS vírus, amely genomszekvenciáját meghatározták (Sweet és Hilleman, 1960). Kimutatták, hogy az SV40 gyakran előfordul a vakcinagyártás során alkalmazott rhesus majom

veséjéből származó sejt kultúrákban. Ez 1955 és 1963 között hatalmas problémát jelentett, mivel a humán poliovírus (járványos gyermekbénulás) elleni vakcinák körülbelül 30%-áról kiderült, hogy SV40-nel szennyezettek. Kutatások bebizonyították, hogy laboratóriumi hörcsögökbe injektált SV40-el fertőzött vesesejtek tumorképző tulajdonsággal rendelkeznek. További *in vitro* kísérletek alátámasztották, hogy az SV40 alkalmas humán sejtek transzformálására. Ennek köszönhetően egyértelművé vált, hogy egy egészséges, de fertőzött gazdából származó vírus képes lehet megbetegíteni és daganatos elváltozásokat indukálni eltérő gazdafajban is (Dang-Tan és mtsai, 2004).

Az emlős polyomavírusok esetében általában nem társulnak klinikai tünetek az elsődleges fertőzéshez. Kivételt képez ez alól a BK polyomavírus (*Human polyomavirus 1*), mely által okozott fertőzés sokszor enyhe húgyúti panaszokkal és felső légúti tünetekkel párosul. Transzplantált betegek esetében a fertőzés súlyos hólyaggyulladást és vesekárosodást okoz, mely a transzplantált szerv kilökődéséhez vezethet. A JC polyomavírus (*Human polyomavirus 2*) fertőzés a központi idegrendszer megbetegedését, progresszív multifokális leukoencefalopátiát okozhat, amely gyakori szövődmény szerzett immunhiányos szindrómában (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) szenvedőknél. SV40 esetében kimutattak progresszív multifokális leukoencefalopátia-szerű megbetegedést olyan rhesus majmoknál, melyek HIV (human immunodeficiency virus) fertőzöttek voltak. A Merkel-sejtes polyomavírus (Merkel-cell polyomavirus, *Human polyomavirus 5*) fertőzés Merkel-sejtes karcinóma kialakulásához vezethet. A Trichodysplasia spinulosa polyomavírus (*Human polyomavirus 8*) felelős egy ritka bőrbetegség, a trichodysplasia spinulosa kialakulásáért (Buck és mtsai, 2016; Johne és Müller, 2007; Johne és mtsai, 2011). A *Human polyomavirus 6* és *7* fertőzés viszketéssel és diszkeratózissal járó bőrelváltozáshoz vezethet (Nguyen és mtsai, 2017). Több humán polyomavírus patológiai jelentősége még nem tisztázott, beleértve a WU polyomavírust (*Human polyomavirus 4*), KI polyomavírust (*Human polyomavirus 3*), MW polyomavírust (*Human polyomavirus 10*), STL polyomavírust (*Human polyomavirus 11*), New Jersey polyomavírust (*Human polyomavirus 13*), Lyon IARC polyomavírust (*Human polyomavirus 14*), valamint *Human polyomavirus 9*-et és *12*-t (Baez és mtsai, 2017; Gheit és mtsai, 2017; Johne és mtsai, 2011).

Az emlős és madár polyomavírusok esetében számos különbséget figyelhetünk meg. Ide tartozik a korábban említett, madár polyomavírusokra jellemző szélesebb gazdaspektrum. Míg az emlős polyomavírusok *in vivo* körülmények között kizárólagos szöveti tropizmust mutatnak, addig madár polyomavírusok esetén jellemző több szerv érintettsége is. Az emlős polyomavírusok daganatos elváltozásokat indukálhatnak, ám madár polyomavírusok körében ilyen tulajdonságot eddig nem tapasztaltak. A fent említetteknek megfelelően különbségek találhatóak a genom struktúrájában is. Az LTA DNS-kötő doménjének konszenzus szekvenciájában is eltéréseket írtak le. Az emlős polyomavírusok a GAGGC pentanukleotidot

használják a nagy T antigén kötőként, míg a madár polyomavírusok esetében egy palindrom motívumot (CC(AT₆)GG) figyelhetünk meg. Az itt említett szerkezeti és biológiai jellemzők miatt a madarak polyomavírusai különálló csoportot képviselnek a *Polyomaviridae* családon belül (Johné és mtsai, 2011).

A polyomavírus fertőzés sejt szintű folyamatai, a vírus replikációja

A polyomavírusok a gazdasejt gangliozid, glikoprotein és glikozaminoglikán molekuláihoz kötődést követően kaveolin- és klatrin-mediált endocitózissal, egyes esetekben kaveolin-független extracelluláris vezikulákkal jutnak a cytoplazmába (Mayberry és mtsai, 2021; Ströh és mtsai, 2020). A receptor használat meghatározza az érintett sejtek körét; a különböző polyomavírusok eltérő sejt tropizmust mutatnak (Yang és You, 2020). Emlős polyomavírusokra jellemző a specifikus sejt tropizmus, például a JC polyomavírus a központi idegrendszer, a BK polyomavírus a vese, a murine pneumotropikus polyomavírus a tüdő, a Merkel-sejtes polyomavírus pedig a bőr egyes sejtjeit fertőzheti. Ezzel szemben a madarakat érintő polyomavírus fertőzés után a vírus számos szervben kimutatható (Circella és mtsai, 2017; Johné és Müller, 2007).

A legtöbb információ a fertőzés sejt szintű folyamatairól az emlős polyomavírusok esetében áll rendelkezésre. A vírusok korai endoszómába csomagolva a vírusok az endoplazmatikus retikulumba jutnak, ahol a kapszid konformációja megváltozik. A vírus további útja a sejtmagba vezet, ahol az S fázisban lévő sejtek enzimkészletét használva replikálódik (Mayberry és mtsai, 2021). Az *ori* a LTA és ORFX/VP4 kódoló régiók 5' végei között található nemkódoló régióra esik. A replikáció folyamatában fontos szerepe van a fertőzés korai szakaszában expresszálandó LTA-nak (Baez és mtsai, 2017; Yang és You, 2020). Az LTA segíti a sejtek S-fázisba kerülését és annak megnyújtását, melynek egyik eleme a retinoblasztóma tumorszuppresszor fehérje foszforilálása, amely így inaktiválódik. A vírus replikáció során az LTA hexamer struktúrát vesz fel, az *ori* régióhoz kötődik és helikáz aktivitása révén a virális dsDNS szálak szétválását segíti. Az eukarióta replikációs fehérje az ssDNS szálhoz kötődik, majd a topoizomeráz, DNS polimeráz és primáz enzimek segítségével elindul a replikáció folyamata (Baez és mtsai, 2017). Az LTA első exonjában kódolt DnaJ domén a hő sokkfehérje 70 (Hsp70) molekulát köti, ami feltehetőleg a kapszid összeszerelődés helyének és minőségének szabályozásában jut szerephez (Chromy és mtsai, 2003). A humán polyomavírusok esetében a virális DNS replikációjának képessége, a transzformáció, valamint a kapszid összeszerelődése az intakt DnaJ doméntől függ (Baez és mtsai, 2017). A többi DNS vírushoz hasonlóan a polyomavírusok kapszid fehérjéi is a citoszolban szintetizálódnak, míg a virionok összeépülése a sejtmagban zajlik (Chromy és mtsai, 2003).

A polyomavírusok diagnosztikája, a fertőzések megelőzése

A circovírusokhoz hasonlóan a klinikai tünetek megjelenése, valamint a kórbonctani és kórszövettani (in situ hibridizáció, immunhisztokémia) vizsgálatok képezik a polyomavírus fertőzés diagnosztikájának alapját (Chen és mtsai, 2014; Hossain és mtsai, 2014; Latimer és mtsai, 1993). A virális nukleinsav kimutatására a PCR-t és real-time PCR-t alkalmazzák (Chen és mtsai, 2014). A humán betegek, valamint az állatállományok immunológiai státuszának nyomonkövetése érdekében ELISA és HAG-próbák, vírusneutralizációs tesztek végzése a legelterjedtebb (Chen és mtsai, 2014; Zielonka és mtsai, 2006).

Jelenlegi ismereteink szerint nem áll rendelkezésünkre hatékony kezelés, megfelelő antivirális szer a humán polyomavírus fertőzés ellen (De Gascun és Carr, 2013). A madarakat érintő polyomavírus fertőzés ellen már számos kísérleti vakcina született, melyeket a későbbiekben ismertetünk (Gelfi és mtsai, 2010; Ritchie és mtsai, 1998)..

5.3.1. A Gammapolyomavirus nemzetség

A *Gammapolyomavirus* nemzetség jelenleg kilenc, különböző madárfajokat fertőző vírust foglal magába az ICTV online felületén elérhető rendszertan alapján (<https://talk.ictvonline.org/>) (2. táblázat).

2. táblázat A *Gammapolyomavirus* nemzetségbe tartozó kilenc vírusfaj nevezéktana.

Fajnév	Vírusnév	Magyar név
<i>Anser anser polyomavirus 1</i>	goose haemorrhagic polyomavirus	lúd haemorrhagiás polyomavirus
<i>Aves polyomavirus 1</i>	budgerigar fledgling disease virus	papagáj polyomavirus
<i>Corvus monedula polyomavirus 1</i>	crow polyomavirus	csóka polyomavirus
<i>Cracticus torquatus polyomavirus 1</i>	butcherbird polyomavirus	örvös fojtógébics polyomavirus
<i>Erythrura gouldiae polyomavirus 1</i>	Erythrura gouldiae polyomavirus	Gould-amandina polyomavirus
<i>Lonchura maja polyomavirus 1</i>	Hungarian finch polyomavirus	fehérfejű apácapinty polyomavirus
<i>Pygoscelis adeliae polyomavirus 1</i>	Adélie penguin polyomavirus	Adélie-pingvin polyomavirus
<i>Pyrrhula pyrrhula polyomavirus 1</i>	finch polyomavirus	süvöltő polyomavirus
<i>Serinus canaria polyomavirus 1</i>	canary polyomavirus	kanári polyomavirus

A nemzetség tagjainak fő jellemzői megegyeznek a polyomavírusokra általánosan elmondható tulajdonságokkal. Genomjuk az időbeli kifejeződésük alapján elnevezett a korai (LTA és STA) és késői (VP1, VP2, VP3) fehérjéket kódoló ORF-ek mellett egy hatodik ORF-et (VP4-et vagy ORF-X) is tartalmaz (Calvignac-Spencer és mtsai, 2016; Johne és Müller, 2007). A papagáj polyomavírus (budgerigar fledgling disease virus, BFDV) VP4 génjéről két termék, a VP4 és VP4d képződhet alternatív splicing segítségével. Funkcionális vizsgálatok alapján előbbi szerkezeti fehérjeként működik és részt vesz a virális genom összeszerelésében, utóbbi pedig apoptózis indukálására képes, melyet sejtenyészeten végzett kísérletekkel igazoltak. Megállapították, hogy a VP4 fehérje középső régiója felelős a DNS-kötésért, míg az N- és C-terminális régiók az apoptózisban játszanak szerepet. A VP4 középső szakaszán található egy leucin-cipzár motívum, mely a fehérje multimerizációját idézheti elő (Bernier és mtsai, 1981; Bozeman és mtsai, 1981; Johne és Müller, 2001, 2007). A VP4/VP4d fehérje lehet a felelős az akut megbetegedések kialakulásáért. Deléciós mutáns madár polyomavírusok létrehozásával tanulmányozták a VP4 kódoló régióját érintő mutációk hatását. Megállapították, hogy a deléciós mutánsok fertőző- és szaporodóképessége lassult. Amennyiben a mutáció az iniciációs kodont érintette, a vírus replikációja csirke embrionális sejteken teljesen megszűnt. A madár polyomavírusok VP4 deléciós mutáns fehérjeit érdemes lehet vakcinajelöltként kezelni, ám ehhez további vizsgálatok szükségesek. Az ORF-X fehérje pontos szerepe máig ismeretlen (Johne és Müller, 2007; Johne és mtsai, 2007).

Az 1980-as években elsőként leírt gammapolyomavírust, a BFDV-t, 1-15 napos hullámpapagáj (*Melopsittacus undulatus*) fiókákból azonosították, melyek hirtelen elhullást okozó belső szervi rendellenességben és tollasodási zavarokban szenvedtek (Bernier és mtsai, 1981; Bozeman és mtsai, 1981; Johne és Müller, 2007). A BFDV fertőzést később más madárfajokban is kimutattak (Johne és Müller, 2007).

Az első, madár gazdafajhoz köthető polyomavírus okozta megbetegedést, napos korú libák vérzéses vese- és bélgyulladását (hemorrhagic nephritis and enteritis of geese, HNEG), 1969-ben jegyezték le hazai lúdállományokban. A tünetegyüttes megjelenése előtt a kislibákat a Derzsy-betegség ellen rekonvaleszcens szérummal kezelték, melyről a későbbi vizsgálatok során beigazolódott, hogy egy addig ismeretlen kórokozóval volt szennyezett, és végül ez vezetett a nagyarányú elhulláshoz (Bernáth és Szalai, 1970). A kórokozót azonban csak 30 évvel később, 2000-ben Guerin és munkatársai azonosították és írták le új polyomavírus fajként, *Goose hemorrhagic polyomavirus* (lúd haemorrhagiás polyomavírus, GHPV) néven (Guerin és mtsai, 2000). Az első megjelenést követően Németországból és Franciaországból jelentettek megbetegedéseket (Johne és Müller, 2003). A vírus azóta is folyamatosan jelen van az európai lúdállományokban; az utóbbi években Németországban, Franciaországban, Lengyelországban és Belgiumban is regisztráltak eseteket (Garmyn és mtsai, 2017; Gawel és

mtsai, 2014; Kozdrun és mtsai, 2012), míg Európán kívül tajvani lúdállományokban mutatták ki (Tu és mtsai, 2021).

A madár polyomavírusok két további képviselőjét 2006-ban széles spektrumú PCR segítségével sikerült azonosítani (Johne és mtsai, 2006b). Egy németországi madárházban 2000 és 2004 között fellépő nagy mortalitással járó megbetegedés több, a verébalakúak (Passeriformes) rendjébe tartozó madárfajt is érintett. Az idősebb madarak esetében tollasodási problémák léptek fel. A vizsgálatok elsőként egy hirtelen elpusztult fiatal süvöltőben (*Pyrrhula pyrrhula*) igazolták a süvöltő polyomavírus (finch polyomavirus, FPyV) jelenlétét. A csóka polyomavírust (crow polyomavirus) egy Spanyolországban elhullott csóka (*Corvus monedula*) lép mintájából mutatták ki, ám a vírus etiológiai szerepe a betegség lefolyásában kérdéses (Johne és mtsai, 2006b; Johné és Müller, 2007).

2010 és 2016 között további gammapolyomavírus fajokat is leírtak. Kanárimadár fiókák (*Serinus canaria*) nagyarányú elhullását, máj- és lépmegegyesülést kanári polyomavírus (canary polyomavirus, CaPyV) fertőzésnek tulajdonították (Halami és mtsai, 2010). A örvös fojtógébics polyomavírust (butcherbird polyomavirus) Ausztráliában egy szemközti környéki bőrelváltozásokat mutató fojtógébics (*Cracticus torquatus*) mintájából (Bennett és Gillett, 2014), míg az Adélie-pingvin polyomavírust (Adélie penguin polyomavirus) tollasodási problémákat mutató Adélie-pingvinek (*Pygoscelis adeliae*) ürülékéből mutatták ki (Varsani és mtsai, 2015). A FPyV mellett további két polyomavírust jegyeztek le pintyfélék mintáiból. A Gould-amandina polyomavírus (*Erythrura gouldiae* polyomavirus) genom szekvenciáját egy polyomavírus fertőzés gyanús Gould-amandina (*Erythrura gouldiae*) májából határozták meg (Heenemann és mtsai, 2015), A fehérfejű apácapinty polyomavírust (Hungarian finch polyomavirus) munkacsoportunk azonosította fehérfejű apácapinty (*Lonchura maja*) tüdő és máj mintáiból (Marton és mtsai, 2016).

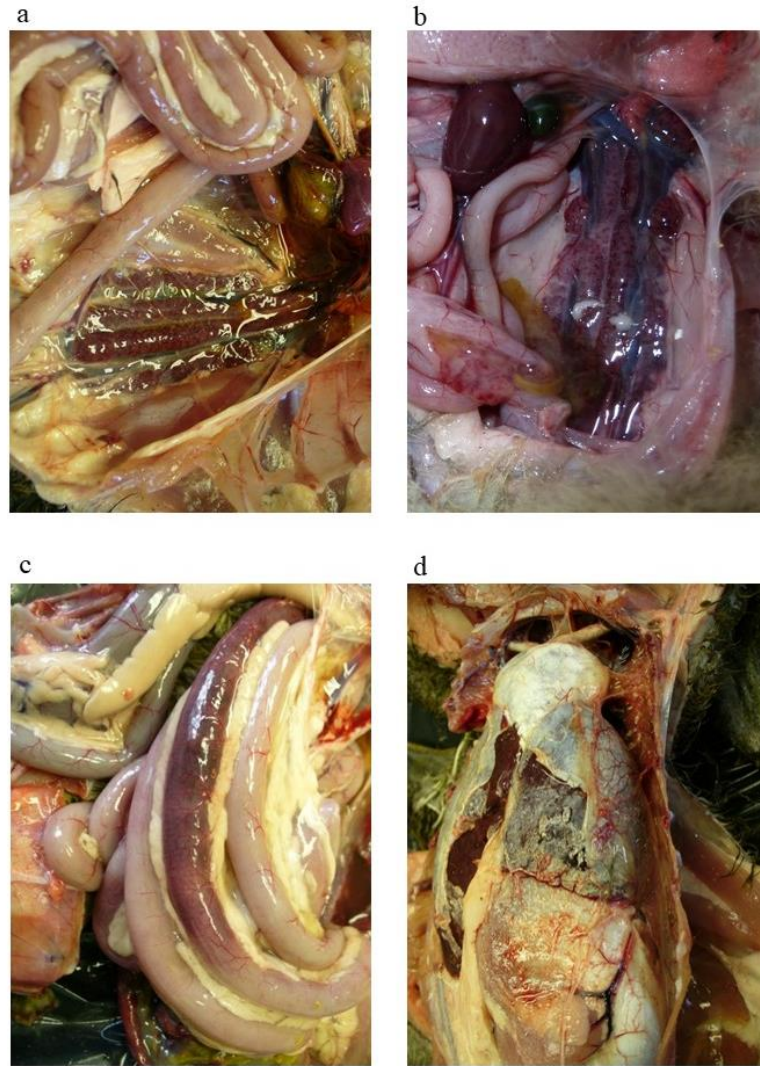
5.3.2. A GHPV tulajdonságai

Magyarországon a lúdtenyésztés és a libatömés több évszázados hagyományokra vezethető vissza. Hazánk globálisan is a legnagyobb hizott liba- és kacsamáj termelők közé tartozik (<https://mbtt.hu/>), de nagy népszerűségnek örvend a libahús és toll is. A termékek túlnyomó része exportra kerül. Néhány járványos betegség – például a HNEG, madárinfluenza és liba parvovírus fertőzés – hazánkban is óriási károkat okozott, ezért az állományok védelme fokozott figyelmet érdemel.

A HNEG kialakulásáért felelős GHPV 5252-5256 bp hosszúságú genommal rendelkezik. A már említett kis és nagy tumor antigéneken (STA, LTA) és VP1, VP2, VP3 szerkezeti fehérjéken felül az ORF-X régió egy további, 169 as hosszú fehérjét is kódolhat, melynek funkciója eddig ismeretlen. Feltételezések szerint a VP4-hez hasonlóan a vírus patogénitásban játszik szerepet (Fehér és mtsai, 2014; Johné és Müller, 2003). Annak

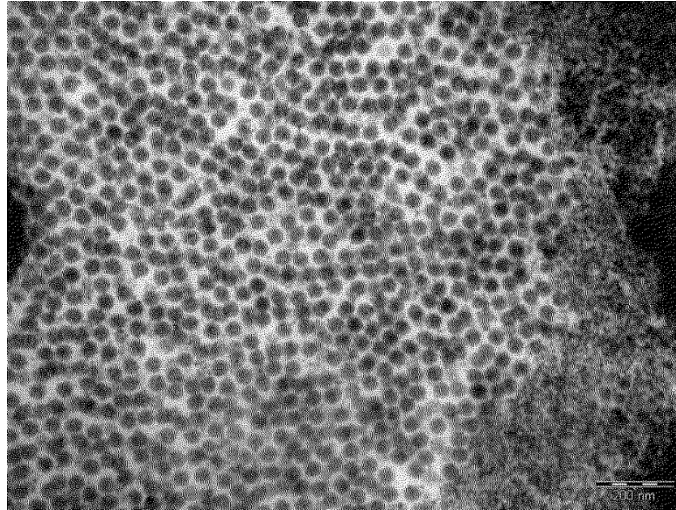
ellenére, hogy a GHPV által okozott megbetegedés több, mint 50 éve került leírásra, a fertőzés során lejátszódó intracelluláris folyamatok a mai napig ismeretlenek. A GHPV izolálása és a vírus szaporítása primer sejteken és sejtvonalakon változó sikerrel járt, a vírus életciklusáról és génextpressziós profiljáról szerzett ismereteink hiányosak (Guerin és mtsai, 2000; Johné és Müller, 2003; Mészáros és mtsai, 2014; Palya és mtsai, 2004). Fertőzött primer sejttényezetekben megfigyelhető a sejtmag enyhe megnagyobbodása, a sejtek leválása vagy aggregációja, valamint granulomok és vezikulák megjelenése a citoplazmában (Guerin és mtsai, 2000). A GHPV a házilúdon kívül kacsákban (pekingi kacsá, *Anas platyrhynchos domesticus*; pézsmaréce, *Cairina moschata*; mulard kacsá, *Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*) is képes szaporodni, így azok potenciális rezervoárok a vírus számára (Corrand és mtsai, 2011; Pingret és mtsai, 2008; Stys-Fijol és mtsai, 2016; Wan és mtsai, 2018). Egyes tanulmányok szerint a ludak GHPV fertőzésére jellemző tünetek jelentek meg kacsák esetében, ám ezt más vizsgálatok nem erősítették meg (Bernáth és Szalai, 1970; Corrand és mtsai, 2011). GHPV VP1 szekvenciákat mutattak ki különböző vadmadárfajok (tőkés réce, *Anas platyrhynchos*; szürke gém, *Ardea cinerea*; fehér gólya, *Ciconia ciconia*; szirti galamb, *Columba livia*; vörös vércse, *Falco tinnunculus*; egerészölyv, *Buteo buteo*; bütykös hattyú, *Cygnus olor*; csóka, *Coloeus monedula*) egyedeiből származó szövet- és bélsármintákban is, ám teljes virális genomszekvenciák nem állnak rendelkezésre és a lehetséges fertőzés jelentősége nem ismert (Stys-Fijol és mtsai, 2016).

A GHPV megjelenése védtelen állományokban nagyarányú (akár 80%-os) megbetegedéssel és elhullással járhat. Leginkább a 3-10 hetes kislibákat érinti, melyeknél véres bélsárürítés és idegrendszeri tünetek (apátia, mozgási zavarok, remegés, komatózus állapot) figyelhetőek meg (**6. ábra**) (Corrand és mtsai, 2011; Dobos-Kovács és mtsai, 2005; Palya és mtsai, 2004; Tu és mtsai, 2021). A kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok során tapasztalt legjellemzőbb elváltozások HNEG esetében: bőr alatti kötőszövetben ödéma, a kapilláris endotél nagyfokú sérülései miatt kialakuló vérzések, a testüregben és belső szervek burkaiban savó felhalmozódása, a belső szervek szöveteinek elhalása, a vesék, belek és Fabricius-féle tömlő esetében vérzéses gyulladás (Bernáth és mtsai, 2001; Bernáth és mtsai, 2006; Palya és mtsai, 2004; Tu és mtsai, 2021).



6. ábra A lúd haemorrhagiás polyomavírus fertőzésre jellemző kórszövettani és kórbonctani tünetek ludakban: savó felhalmozódása a hasüregben (a), erezetesen belövellt vastagbél nyálkahártya (b), duzzadt vesék vérzésekkel (a, b), vérzéses bélgyulladás (c), zsigeri köszvény (d).

Kísérletes fertőzés során a vese, tüdő, toll folliculus sejtek és endothel sejtek sejtmagjában vírusszerű részecskéket figyeltek meg (Lacroux és mtsai, 2004). A szövettani vizsgálatok alapján megállapították, hogy a GHPV a szervezet véreinek endotél sejteinek magjában szaporodik, aminek következtében azok sérülnek, funkciójuk ellátására képtelenné válnak, a kapillárisok falának átjárhatósága fokozódik, ami testszerte előforduló ödémák és vérzések kialakulásához vezet (**7. ábra**) (Bernáth és mtsai, 2006; Dobos-Kovács és mtsai, 2005; Tu és mtsai, 2021).



7. ábra A bélfal kapilláris endotél sejtjeinek magjában azonosított GHPV virionok. A felvétel transzmissziós elektronmikroszkóppal készült.

(A kép forrása: Bernáth és mtsai., 2006)

A GHPV fertőzés idősebb egyedekből álló lúdállományok esetében alacsonyabb elhullással, tünetmentességgel járhat. Azonban az állományt érő hatások, valamint a stressz befolyásolhatják a betegség súlyosságát (Palya és mtsai, 2004).

Tanulmányok alapján a fertőzés bejutása egy érintetlen állományba többféleképpen is megvalósulhat. A horizontális terjedéséhez hozzájárulhatnak az érintetlen állományokba kerülő fertőzött egyedek vagy környezetben fennmaradó vírusok, melynek következményeként folyamatosan jelentkezhetnek elhullások. Mivel idősebb madarak számára a kórokozó kisebb veszélyt jelent, a vírussal fertőződött tünetmentes, vagy felgyógyult egyedek perzisztensen fertőzöttek maradhatnak és szerepet játszhatnak a vírus horizontális és vertikális terjedésében. A vertikális terjedés lehetőségét a kislibák esetében már négy napos korban megfigyelt polyomavírus által okozott elhullás veti fel (Bernáth és Szalai, 1970; Palya és mtsai, 2004).

Hatékony védekezést a betegség ellen a vakcinázás nyújthat. A chorioallantois membránba injektált vírussal liba embriók fertőzhetőek voltak, azonban a vírus replikációja nem bizonyult elég hatékonynak a vakcinagyártáshoz (Bernáth és mtsai, 2006). Laboratóriumi körülmények között a fő strukturális fehérjét (VP1) tartalmazó alegység vakcinával jó eredményeket sikerült elérni (akár 95-100%-os hatékonysággal nyújtott védelmet az GHPV fertőzéssel szemben), ám a készítmény kereskedelmi forgalomba még nem került. A módszer lényege, hogy rekombináns baculovírus felhasználásával termeltek VP1 proteint, melynek különböző antigénkoncentrációban való felhasználásával olajemulziós vakcinát állítottak elő (Mató és mtsai, 2009). Napos korú libákon tesztelésre kerültek olyan oltóanyagok is, melyek

primer liba vesesejteken tenyésztett, inaktivált GHPV-t és különböző adjuvánsokat (Al(OH)₃, Carbopol) tartalmaztak. Kereskedelmi forgalomba ez a vakcina sem került (Gelfi és mtsai, 2010). Jelenleg inaktivált virionot tartalmazó telepspecifikus autovakcinával értek el sikereket hazánkban.

5.3.3. A BFDV tulajdonságai

A BFDV körülbelül 4981 bp hosszúságú genomjának fő szerkezeti felépítése más gammapolyomavírusokéval megegyező, egyedi elemként a VP4/VP4d fehérjéket kódoló ORF említendő. A vírus a díszmadarak kereskedelmének köszönhetően világszerte elterjedt, főleg hullámos papagáj (*Melopsittacus spp.*) és törpepapagáj (*Agapornis spp.*) tenyészetekben. A papagájféleken felül (Psittaciformes) kimutatták pintyfélékből (Fringillidae), vadmadár (súlyomfélék, Falconidae) és csirke (*Gallus gallus domesticus*) gazdafajokból is (Johné és Müller, 2007).

Habár a BFDV által okozott megbetegedést már 1981-ben leírták, a kórokozó azonosítására csak később került sor, először szerológiai módszerekkel 1987-ben, ezt követően pedig PCR segítségével 1991-ben (Bernier és mtsai, 1981; Phalen és mtsai, 1991; Wainright és mtsai, 1987).

Azokban a papagájtenyészetekben, ahol kimutatható az BFDV fertőzés, a fertőzési arány megközelítheti a 100%-ot, ezzel szemben a mortalitási arány 25-100% között mozog (Katoh és mtsai, 2009; Krautwald és mtsai, 1989; Phalen és mtsai, 1997). A mortalitási arány jelentős mértékben függ a fertőzött madarak életkorától és az őket ért stresszhatásoktól. A frissen kikelt fiókák a legveszélyeztetettebbek, a fertőzést követően látszólag normális fejlődésnek indulnak, majd 2-3 hetes korukban hirtelen elpusztulhatnak. Azoknál az egyedeknél, melyek túlélnek, később tollasodási problémák léphetnek fel és röpképtelenné válhatnak (Krautwald és mtsai, 1989; Müller és Nitschke, 1986).

A tollasodási zavarokon túl a leggyakoribb tünetek közé a bőr kékes elszíneződését, bőr alatti vérzéseket, hasmenéses tüneteket, hasüreg felfúvódását sorolják. Az idősebb madarak esetében a francia vedlésnek is nevezett klinikai kép jelenik meg: a madarak hirtelen elveszítik fark- és szárnytollaikat, röpképtelenné válnak (Bernier és mtsai, 1981; Müller és Nitschke, 1986). Kórbonctani vizsgálatok során megfigyelték a szív megnagyobbodását, szívburok és hasúri folyadékgyülemet, májgyulladást, a vesék halványává vagy vérbővé válását. Kórszöveti vizsgálatok vírusrészecskékből álló bazofil magzárványok azonosítottak különböző szervek (máj, lép) sejtjeinek magjában (Bernier és mtsai, 1981; Bozeman és mtsai, 1981; Müller és Nitschke, 1986). Beszámoltak tünetmentes hordozókról is, melyek hozzájárulnak a kórokozó terjesztéséhez (Katoh és mtsai, 2009; Krautwald és mtsai, 1989; Phalen és mtsai, 1997). A vírus átviteli módja a GHPV esetében közölteknek felel

meg; mind vertikális, mind horizontális átadás lehetséges (Phalen és mtsai, 1997). Más madárfajok esetében is megfigyelték a hullámos papagájoknál azonosított klinikai tüneteket, de leírtak olyan hirtelen elhullásokat, ahol előzetes tünetek nem jelentkeztek (Johné és Müller, 2007).

Hatékony védekezést a betegség megelőzésére a vakcinázás nyújthat. Laboratóriumi körülmények között már az 1990-es évek végén tesztelték inaktivált papagáj polyomavírust tartalmazó vakcinákat (Ritchie és mtsai, 1996). Kereskedelmi forgalomban jelenleg egy termék kapható, melyet a 3-9 hetes papagáj fiókák oltására alkalmaznak.

6. Célkitűzés

Tanulmányunk során az alábbi célokat tűztük ki:

- Különböző vadmadárfajok esetében CRESS DNS vírusok és polyomavírusok előfordulásának vizsgálata.
- Az általunk azonosított, új CRESS DNS vírusok teljes genomszekvenciájának meghatározása, a genomok szerkezeti elemzése, a filogenetikai kapcsolatok megismerése, modellezése.
- Hazai lúdállományokban előforduló GHPV törzsek genomjának vizsgálata, azok genetikai diverzitásának meghatározása.
- Az egyes gammapolyomavírusok filogenetikai és evolúciós kapcsolataink feltérképezése.
- Egy hazai tenyészetben elhullott papagáj szövetmintájából azonosított BFDV törzs genomjának jellemzése, összevetése szakirodalmi adatokkal.

7. Anyag és módszer

7.1. A vizsgált minták eredete

Tanulmányainkhoz a mintákat a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (NÉBIH ÁDI) biztosította.

Kisméretű, cirkuláris DNS genommal rendelkező vírusok, köztük circo-, cyclo- és egyéb CRESS DNS vírusok, valamint polyomavírusok kimutatására Magyarország különböző területeiről származó, 2013 novemberében és decemberében gyűjtött, influenza szűrésre érkezett 31 madárfaj 90 egyedének kloáka tampon mintáját vontuk be. Az érintett madárfajok az alábbi rendekbe tartoztak: vágómadár-alakúak (Accipitriformes), lúdalakúak (Anseriformes), lilealakúak (Charadriiformes), gólyaalakúak (Ciconiiformes), galambalakúak (Columbiformes), sólyomfélék (Falconiformes), tyúkalakúak (Galliformes), darualakúak (Gruiformes), verébalakúak (Passeriformes), gödényalakúak (Pelecaniformes), vöcsökfélék (Podicipediformes), bagolyalakúak (Strigiformes) és szulaalakúak (Suliformes). A tampon minták gazdafaj szerinti eredetét, illetve a mintagyűjtés helyét az **3. táblázat** tartalmazza. Az egyedek egészségi állapotáról, koráról, neméről nem állt rendelkezésünkre információ. A vizsgálatunkba bevont mintákat hazánk különböző vizes élőhelyeiről gyűjtötték: Sárbogárd (n=31), Hortobágy (n=29), Mezőberény (n=17), Köröstarcsa (n=5), Tizsakürt (n=1), Tizsásas (n=4), Magyarhertelend (n=3). A kloáka tampon minták gyűjtése a hazai madárinfluenza megfigyelési program (surveillance) keretében állatorvosok, vadászok és ornitológusok közreműködésével történt. Az elérni kívánt mintaszám és a gyűjtésbe bevonandó madárfajok előzetesen nem voltak meghatározva. Ennek köszönhetően az egyes területekről különböző vadmadárfajok mintázása történt.

3. táblázat A vizsgált vadmadárfajok listája, mintaszám és a mintagyűjtés helye.

Gazdafaj	Mintaszám	Mintagyűjtés helye
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)	6	Sárbogárd
	7	Mezőberény
	3	Magyarhertelend
	3	Köröstarcsa
	2	Tiszasas
nyári lúd (<i>Anser anser</i>)	2	Sárbogárd
nagy lilik (<i>Anser albifrons</i>)	3	Sárbogárd
szárcsa (<i>Fulica atra</i>)	3	Sárbogárd
csörgő réce (<i>Anas crecca</i>)	1	Sárbogárd
szürke gém (<i>Ardea cinerea</i>)	2	Sárbogárd
vetési varjú (<i>Corvus frugilegus</i>)	3	Sárbogárd
kárókatona (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	2	Sárbogárd
vetési lúd (<i>Anser fabalis</i>)	1	Sárbogárd
dankasirály (<i>Chroicocephalus ridibundus</i>)	1	Sárbogárd
vízityúk (<i>Gallinula chloropus</i>)	1	Sárbogárd
fácán (<i>Phasianus colchicus</i>)	1	Sárbogárd
egerészölyv (<i>Buteo buteo</i>)	1	Sárbogárd
	3	Hortobágy
szajkó (<i>Garrulus glandarius</i>)	1	Sárbogárd
balkáni gerle (<i>Streptopelia decaocto</i>)	1	Sárbogárd
	1	Tizsakúrt
szarka (<i>Pica pica</i>)	1	Sárbogárd
erdei fülesbagoly (<i>Asio otus</i>)	1	Sárbogárd
	2	Hortobágy
halászsas (<i>Pandion haliaetus</i>)	1	Hortobágy
karvaly (<i>Accipiter nisus</i>)	1	Hortobágy
vörös vércse (<i>Falco tinnunculus</i>)	2	Hortobágy
barna rétihéja (<i>Circus aeruginosus</i>)	3	Hortobágy
kabasólyom (<i>Falco subbuteo</i>)	3	Hortobágy
bakcsó (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	1	Hortobágy
gyöngybagoly (<i>Tyto alba</i>)	3	Hortobágy
fehér gólya (<i>Ciconia ciconia</i>)	3	Hortobágy
rétisas (<i>Haliaeetus albicilla</i>)	4	Hortobágy
holló (<i>Corvus corax</i>)	2	Hortobágy
kuvik (<i>Athene noctua</i>)	1	Hortobágy
búbos vöcsök (<i>Podiceps cristatus</i>)	2	Mezőberény
házi veréb (<i>Passer domesticus</i>)	2	Tiszasas
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)	8	Mezőberény
	2	Köröstarcsa

A hazánkban előforduló reprezentatív GHPV törzsek teljes genomszekvenciájának meghatározásához házilúdból (n=19) és mulard kacsából (n=2) származó vese/bursa szövetmintákat használtunk fel. A minták GHPV fertőzés tipikus tüneteit mutató madaraktól származtak. Az GHPV jelenlétét előzetesen már igazolta a NÉBIH ÁDI. Ezen felül egy, az 1969-es járvány kitörésekor azonosított magyarországi törzset is feldolgoztunk (**4. táblázat**). A kivont nukleinsav állományt (a dolgozatban szereplő 22, illetve egy, korábban a munkacsoport által feldolgozott egyéb minta) circo- és cyclovírusok, illetve egyéb CRESS DNS vírusok kimutatására alkalmas PCR rendszerrel is vizsgáltuk.

4. táblázat A vizsgált házi víziszárnyas minták listája, a mintázott gazdafajok, azok származási helye és mintavétel ideje.

Törzs	Gazdafaj	Gyűjtés helye	Mintavétel ideje
1969	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Szarvas	1969
2983	mulard kacsá (<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> x <i>Cairina moschata domestica</i>)	Bócsa	2015
3814	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Bócsa	2008
5171	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2008
5348	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Szatymaz	2013
6345	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Jászszentlászló	2013
6930	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Bócsa	2008
7169	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Bócsa	2008
7327	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Felpéc	2013
7613	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2008
10362	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kelebia	2008
10372	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Bócsa	2008
12016	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Jászszentlászló	2007
14451	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kelebia	2011
16005	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2013
16006	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2013
20158	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Bócsa	2015
20962	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2013
23900	mulard kacsá (<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> x <i>Cairina moschata domestica</i>)	Bócsa	2012
24131	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Kiskunfélegyháza	2013
24135	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Jászszentlászló	2013
37233	háзилúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	Rém	2015

Egy 2011-ben elhullott fiatal örvös sándorpapagájból (*Psittacula krameri*) származó szervminta elegyet (máj és lép) a gazdát fertőző BFDV törzs genomjának jellemzésére használtunk fel. Az állat jelentős súlyvesztést mutatott, majd pár napon belül elhullott. A makroszkópos elváltozások közé tartozott a lép- és májmegnagyobbodás, a vese duzzanata,

belső szervek vérbősége. A szövettani vizsgálatok feltárták a máj, vese, lép és szív vérömléses elváltozását, nekrotizáló májgyulladást, a vesék tubuláris nekrozisát.

7.2. A minták előkészítése, vírusok kimutatása, genom amplifikálás

7.2.1. Virális nukleinsav kivonása

A vadmadár eredetű kloáka tampon mintákat 1 ml PBS (phosphate buffered saline, foszfát pufferes sóoldat) (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) oldatban bocsátották rendelkezésünkre. A virális nukleinsav állomány kivonásához Direct-zol RNA MiniPrep Kitet (Zymo Research, Irvine, CA, USA) használtunk a gyártói előírásoknak megfelelően, a DNáz kezelést tartalmazó lépés kihagyásával. A kivont nukleinsavat 50 µl elúciós pufferben vettük fel, majd további felhasználásig -60 °C-os fagyaszttóban tároltuk.

Az GHPV és BFDV törzsek teljes genom meghatározásához használt virális nukleinsavat a kapott szövetekből DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki, a gyártói utasításoknak megfelelően. A kivont nukleinsavat 50 µl elúciós pufferben vettük fel, majd további felhasználásig -60 °C-on tároltuk.

7.2.2. CRESS DNS vírus specifikus széles spektrumú PCR

A circo- és cyclovírusok, vagy egyéb CRESS DNS vírusok kimutatása széles spektrumú nested PCR rendszerrel, univerzális primerekkel történt (**5. táblázat**) (Li és mtsai, 2010a). Ezzel a módszerrel a *rep* körülbelül 400 bp hosszú fragmensét amplifikálhatjuk. A PCR reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 1 µl kivont nukleinsavat, 200 nM primert, 200 µM dNTP keveréket, 1x DreamTaq Buffert és 0,625 U DreamTaq DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). A nested PCR első és második amplifikációs lépése tartalmazott egy 3 perc hosszú kezdeti denaturációt 95 °C-on, amit 40 ismétlődő ciklus követett (denaturáció 95 °C 30 mp, anelláció az első PCR lépésnél 52 °C 30 mp, másodiknál 56 °C 30 mp, lánchosszabítás 72 °C 1 perc), majd legvégül egy 72 °C-os 10 perc hosszú végső extenziós lépés zárt le.

A PCR-eket Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük.

7.2.3. Polyomavírus specifikus széles spektrumú PCR

A polyomavírusok kimutatása széles spektrumú nested PCR rendszerrel, a vírusgenom VP1 régiójára illeszkedő degenerált primerekkel (**5. táblázat**) történt (Johné és mtsai, 2005). A reakció kivitelezéséhez 25 µl végtérfogatban 1 µl kivont nukleinsavat (a második amplifikációs lépés során az első kör elegendőből 4 µl-t), 200 nM primert (**5. táblázat**),

200 µM dNTP keveréket, 1x DreamTaq Green Buffert és 0,625 U DreamTaq DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) használtunk. Mindkét amplifikációs lépésben a 95 °C 3 perc hosszú kezdeti denaturációs lépést egy 45 ciklusból álló amplifikáció követett (denaturáció 95 °C 30 mp, anelláció az első PCR lépésnél 46 °C 30 mp, másodiknál 56 °C 30 mp, extenzió 72 °C 30 mp), végül egy 10 perc hosszú 72 °C-os elongációval végződött. A PCR-eket Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük.

5. táblázat A vizsgálatok során használt primerek szekvenciái.

CRESS DNS vírus: cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú DNS vírus; GHPV: lúd haemorrhágiás polyomavírus; GgaCV-1: szajkó-asszociált cirkuláris vírus 1; DuACyV-1: kacsza-asszociált cyclovírus 1; GoCV: liba circovírus, BFDV: papagáj polyomavírus. Degenerált primerek bázisai: Y=C/T; R=A/G; W=A/T; N=A/C/T/G; I= inozin, A/C/T/G

Primer neve	Szekvencia	Elhelyezkedés	Felhasználás
CV-F1	GGIAYICCICAYYTICARGG	<i>rep</i>	circo-, cyclo- és egyéb CRESS DNS vírus szűrés (Li et al., 2010a)
CV-R1	AWCCAICCRTARAARTCRTC	<i>rep</i>	
CV-F2	GGIAYICCICAYYTICARGGITT	<i>rep</i>	
CV-R2	TGYTGYTCRTAICCRTCCCACCA	<i>rep</i>	
VP1-1f	CCAGACCCAACTARRAATGARAA	VP1	polyomavírus szűrés (Johne et al., 2005)
VP1-1r	AACAAGAGACACAAATNTTCCNCC	VP1	
VP1-2f	ATGAAAATGGGGTTGGCCNCTNTGYAARG	VP1	
VP1-2r	CCCTCATAAACCCGAACYTCYTCHACYTG	VP1	
PolyVP1-f	CCTCTACGGCACTGTGTACC	VP1	GHPV szűrés
PolyVP1-r	CGGCTTATGTCTGGATCACC	VP1	
GgACV1-f	GCAGGGCGAACGAACAGATTGG	348-369	GgaCV-1 teljes genom amplifikálás
GgACV1-r	GAGGAATTCGGCGAACTACCCCG	325-347	
DuACyV1-f	TCATCTCTTGAAGTGGTGTGCC	1528-1547	DuACyV-1 teljes genom amplifikálás
DuACyV1-r	CTGTGACGCAATAACGAGGTC	1548-1567	
GoCV-f	CCGGAAGTACCCGACNACTTATG	465-487	GoCV teljes genom amplifikálás
GoCV-r	TCTGCCGATAACTGACGTGGC	444-464	
2763F	CAGCATTTTAGGGGACTTCCACGG	2763-2786	GHPV teljes genom amplifikálás
2248R	ACCTCTGTTTTGACAGAGACTGCC	2225-2248	
4541F	TGCAGGATCAATGGCTGAAGCTC	4541-4563	
3792R	TTCAGGGGACCGGTTAACTG	3771-3792	
bPyVbbF1	ACGCTATTTAGTATCCAGCTG	2720-2741	BFDV teljes genom amplifikálás
bPyVbbR1	GGTAGGCCTCGCCAATATTG	2700-2719	
bPyVbbF2	TGTATCTGGTTTGCTAACTCCTTG	2771-2795	
bPyVbbR2	GGATAGGGGTTACGAACATTACG	2748-2770	

7.2.4. GHPV specifikus diagnosztikai PCR

A NÉBIH ÁDI által használt GHPV specifikus diagnosztikai PCR egy 1072 bp hosszú szakaszt sokszoroz fel a GHPV genom VP1-VP3 átfedő régiójából. A 25 µl végtérfogatú PCR reakció 200 nM primert (**5. táblázat**), 200 µM dNTP keveréket, 2,5 µl 10x DreamTaq Green Buffert és 0,625 U DreamTaq DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) tartalmazott. A hőprofil az alábbi lépésekből állt: 95 °C 30 mp kezdeti denaturáció, majd 40 ismétlődő ciklusból álló amplifikáció (denaturáció 95 °C 10 mp, anelláció 53 °C 30 mp, extenzió 72 °C 90 mp), végül 72 °C 10 perc végső extenzió (Fehér és mtsai, 2014). A PCR-eket Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük.

7.2.5. PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

A nested PCR termékek hosszát 1%-os agaróz (Lonza, Basel, Svájc) gélen történő elektroforézissel ellenőriztük. A gél elkészítéséhez 0,5X TBE (trisz-borát-etilén-diamin-tetraecetsav, Lonza, Basel, Svájc) puffert használtunk. A DNS láthatóvá tétele GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) festékkel történt. Molekulatömeg markerként O'Gene Ruler Mix DNA Laddert (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) alkalmaztunk. Az elektroforézist 80-120 V-on végeztük. A gél UV fényel átvilágítottuk, majd CSL-Microdoc Systems géldokumentációs rendszerrel (Cleaver Scientific, Rugby, Egyesült Királyság; Power Shot G12 kamera, Canon, Tokió, Japán) rögzítettük az eredményeket.

A megfelelő méretű fragmenseket először kivágtuk a gélből, majd ezt követően tisztítottuk ki Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A tisztított DNS fragmenseket -20 °C-on tároltuk további felhasználásig.

7.2.6. Sanger szekvenálás

A tisztított, felsokszorozott PCR termékek mindkét szálának nukleinsav sorrendjét BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) alkalmazásával, a nested PCR második amplifikációs lépésében is használt oligonukleotidokkal hajtottuk végre. A reakcióelegy 10 µl végtérfogatban tartalmazott 1 µl Sequencing Buffert, 1 µl BigDye Reaction Mixet, 500 nM primert (**5. táblázat**) és 5 µl tisztított PCR terméket. A szekvenálási reakcióban a 96 °C-on végzett, 1 perc hosszú kezdeti denaturációt 30 ciklus (denaturáció 95 °C 20 mp, anelláció 50 °C 5 mp, elongáció 60 °C 4 perc) követte.

A szekvenálási termékeket etil-alkohol és nátrium-acetát elegyével vontuk ki. Az elegy tartalmazott 10 µl szekvenálási terméket, 31 µl 96% etanolt, 1,5 µl 3M Na-acetátot (pH 5,2),

7,5 µl nukleáz mentes vizet. Az elegyet 4400 g fordulatszámon, 4 °C-on 45 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 70%-os etil-alkohollal mostuk. Ezt követően újra centrifugáltunk 4400 g fordulatszámon, 4 °C-on 15 percig, az így kapott üledéket pedig szobahőmérsékleten szárítottuk. A termékek nukleinsav sorrendjének meghatározása ABI PRISM 3100-Avant készüléken (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), együttműködő partnerünk segítségével történt.

7.2.7. CRESS DNS vírusok teljes genomjának amplifikálása

A teljes CRESS DNS vírus genomok amplifikálása back-to-back PCR segítségével történt, a nested PCR termék szekvenciája alapján tervezett primerpárok használatával. A reakcióelegy 25 µl végtérfogatban tartalmazott 1 µl kivont nukleinsavat, 200 nM primert (**5. táblázat**), 200 µM dNTP keveréket, 1x Phusion HF Buffert és 0,25 U Phusion DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). A back-to-back PCR 98 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 45 ciklusból állt (98 °C 10 mp, 60-61 °C 30 mp, 72 °C 1 perc), amit egy 72 °C-on 10 percig tartó végső elongációs lépés követett. A PCR-eket Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük. A PCR termékek további felhasználása a 7.2.5. pontban leírtak alapján történt.

7.2.8. Új GHPV törzsek teljes genomjának amplifikálása

Az GHPV teljes genomjának meghatározásához két, a GHPV genomjához viszonyítva átfedő PCR terméket használtunk. A PCR reakcióelegyek 1 µl kivont nukleinsavat, 200 nM primert (**5. táblázat**), 200 µM dNTP keveréket, 1x Phusion HF Buffert és 0,3 U Phusion DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) tartalmaztak. A PCR a következő lépésekből állt: 98 °C-on 30 mp hosszú kezdeti denaturáció, 40 ciklusból álló felsokszorozás (98 °C 10 mp, 57 °C 30 mp, 72 °C 5 perc), végül 72 °C-on 10 perc hosszú végső elongáció. A PCR-eket Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler típusú PCR készülék (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük. A PCR termékek további felhasználása a 7.2.5. pontban leírtak alapján történt.

7.2.9. Új BFDV törzs teljes genomjának amplifikálása

Az BFDV teljes genomjának meghatározása back-to-back PCR segítségével történt. A PCR reakcióelegy 200 nM primert (**5. táblázat**), 200 µM dNTP keveréket, 1x Phusion HF Buffert, 0,3 U Phusion DNA Polymerase enzimet (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) és 1 µl kivont nukleinsavat tartalmazott. A hőprofil az alábbiak szerint alakult: 98 °C 30 mp kezdeti denaturáció után 40 ciklusból álló felsokszorozás (98 °C 10 mp, 54 °C 30 mp, 72 °C 2,5 perc), végül 72 °C 10 perc hosszú végső elongációs lépés. A PCR-eket Applied Biosystems 2720

Thermal Cycler típusú PCR (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) készülék segítségével végeztük. A kapott back-to-back PCR termékekből a 7.2.5. pontban leírtak szerint tisztítottunk és további felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

7.2.10. Újgenerációs szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálást Ion Torrent Personal Genome Machine® (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) készülék segítségével végeztük. A back-to-back és a hosszú (GHPV esetén) PCR termékek enzimes fragmentációját, az adapterek fragszemshez ligálását a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit segítségével (New England Biolabs, Hitchin, Egyesült Királyság) hajtottuk végre, míg a könyvtárakhoz az egyedi mintazonosító kódokat az IonXpress™ Barcode adapterek közül választottuk (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA). Az indexelt cDNS (komplementer DNS) könyvtárak tisztítása a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Tajvan) alkalmazásával történt, a tisztított terméket 2%-os, előre gyártott, kereskedelmi forgalomban kapható E-Gel (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) segítségével elektroforetizáltuk. A 300–350 bp hosszúságú fragszenseket a gélből visszanyertük és PCR amplifikációt hajtottunk végre a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ kit (New England Biolabs, Hitchin, Egyesült Királyság) leírásának megfelelően. Az amplifikáció hőprofilja a következő volt: 30 mp kezdeti 98 °C-on történő denaturáció, majd 12 amplifikációs ciklus (98 °C 10 mp, 58 °C 30 mp, 72 °C 30 mp), legvégül 72 °C-on 5 percig tartó végső elongáció. Az így keletkezett termékeket ismét tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Tajvan) segítségével, majd mennyiségi meghatározást végeztünk Qubit® dsDNA BR Assay kit és Qubit® 2.0 fluorométer (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával. Az indexelt, megfelelő arányban kevert DNS termékek klonális amplifikációja IonSphere™ (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) paramágneses gyöngyök felszínén emulziós PCR-el történt Ion OneTouch 200 Template Kit és Ion One Touch 2 berendezés (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) segítségével, gyártói utasítások alapján. A megfelelő templátokat hordozó részecskék dúsítása Ion OneTouch™ ES robottal (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) történt. A szekvenálást 316 típusú chipeken, az Ion PGM™ Sequencing Kíthez (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) ajánlott 200 bp szekvenálási protokoll alapján végeztük.

7.3. Szekvenciaadatok elemzésére alkalmazott bioinformatikai módszerek

7.3.1. Szekvenciaillesztés és annotálás

A Sanger szekvenálásból származó elektroferogramok beolvasására és ellenőrzésére BioEdit szoftvert használtuk (Hall, 1999).

Az újgenerációs szekvenálás során kapott „nyers” szekvencia adatokat a CLC Genomics Workbench v7 (www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/), valamint Geneious (Biomatters Ltd., Új-Zéland) (Kearse és mtsai, 2012) szoftverek segítségével dolgoztuk fel. Minőségi ellenőrzés után (a rossz minőségű vagy túl rövid szekvenciákat kiszűrtük, az adapter régiókat levágtuk) referenciához történő szekvenciaillesztéssel, valamint *de novo* illesztés segítségével állítottuk össze a teljes genomokat. A kapott konszenzus genomokat manuálisan javítottuk és annotáltuk. Referencia genomok keresése a génbank adatbázisában BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritmussal történt, a virális ORF-ek keresésére pedig az ORF Finder alkalmaztuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). A kész genomok nt és as szekvenciáinak illesztését az Aliview és MEGA6 szoftverekkel végeztük el, a Muscle algoritmust használva (Larsson, 2014; Tamura és mtsai, 2013). Az illesztett szekvencia halmazoknál a mintapáronkénti szekvencia azonosságokat a MEGA6 szoftverrel határoztuk meg (Tamura és mtsai, 2013).

7.3.2. Evolúciós és filogenetikai elemzések

A filogenetikai elemzéseket az online elérhető PhyML szoftver legjobban illeszkedő modelljének segítségével készítettük el, az elkészült fákat a MEGA6 szoftver alkalmazásával vizualizáltuk (Guindon és mtsai, 2010; Tamura és mtsai, 2013). Az esetleges rekombinációs eseményeket az RDP4 szoftver RDP, GeneConv, Bootscan, MaxChi, Chimaera, SiScan és 3Seq módszereinek segítségével azonosítottuk (legmagasabb elfogadott P-érték=0,05 beállítással) (Martin és mtsai, 2015). Eredményeinket a SIMPLOT szoftver használatával is megerősítettük (Lole és mtsai, 1999), melynél a Kimura-2 parameter (K2P) modellt futtattuk alapértelmezett beállításokkal.

A szelekciós nyomás, valamint a nem szinonim (aminosav változással járó) és szinonim (aminosav változással nem járó) szubsztitúció arány (dN/dS) vizsgálatára a Datamonkey webszerver algoritmusait (FEL, FUBAR, MEME) alkalmaztuk (Weaver és mtsai, 2018).

Az illesztett szekvencia halmazok felhasználásával filogenetikai fákat készítettünk az IQ-Tree online szoftverrel (Trifinopoulos és mtsai, 2016). Az így kapott fa és a TempEst v1.5.3 szoftver segítségével ellenőriztük, hogy az adataink alkalmasak-e az időskálázott evolúciós elemzésekre (Rambaut és mtsai, 2016). Az evolúciós elemzéseket a BEAST (Bayesian

Evolutionary Analysis by Sampling Trees) v1.10.4 programcsomag segítségével hajtottuk végre (Suchard és mtsai, 2018), mely a filogenetikai rekonstrukciókhoz a Markov chain Monte Carlo (MCMC) módszert alkalmazza. Számításainkhoz az adatainkra legjobban illeszkedő szubsztitúciós modellt a TOPALi v2.5, MEGA6, JModelTest és PhyML programokkal választottuk ki (Milne és mtsai, 2009; Posada, 2008; Tamura és mtsai, 2013). Ezt követően a BEAUti v1.10.4 (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) alkalmazás segítségével, felvittük a rendszerbe szekvenciáinkat és az ezekkel együtt elemzendő jellegzetességeket (esetünkben a mintavétel dátumát), beállítottuk a megfelelő szubsztitúciós modellt, molekuláris órát, a megfelelő iterációt és a populáció „prior”-ját. Minden adathalmaz esetében az alábbi beállítások bizonyultak megfelelőnek: uncorrelated lognormal relaxed molecular clock, constant size coalescent prior (populáció prior), 50 millió MCMC iteráció.

A BEAST szofver által generált adatok tömörítését a LogCombiner v1.10.4-el végeztük (Drummond és Rambaut, 2007). A MCMC adatok és az ESS (Effective Sample Size) értékek ellenőrzése és a szubsztitúciós ráták leolvasása a Tracer v1.6 szoftver segítségével valósult meg (Rambaut és mtsai, 2018). A szubsztitúciós ráta értékeket nukleotidcsere/hely/év (substitutions per nucleotide site per year, s/s/y) egységben adtuk meg. A becslés pontosságára utaló valószínűségi tartományt 95% legmagasabb posteriori sűrűség (highest posterior probability, HPD) értékkel jelöltük. Ezt követően összegeztük az adatokat TreeAnnotator szoftverrel, és Maximum Clade Credibility (MCC) fát generáltunk, mely összegzi a bayes-i filogenetikai számítások eredményét (Drummond és Rambaut, 2007). Az így generált MCC filogenetikai fákat a FigTree v1.4.3 szoftverrel vizualizáltuk (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A BEAST programcsomag szoftvereit több számítógépen futtattuk párhuzamosan, melyek 64-bites Windows 7 és 10 operációs rendszerrel rendelkeztek. A gépek paramétereit az **6. táblázat** tartalmazza. A futási idő a számítógép teljesítményétől és a rendelkezésünkre álló adathalmaz méretétől függött.

6. táblázat Az evolúciós becslésekhez alkalmazott számítógépek konfigurációi.

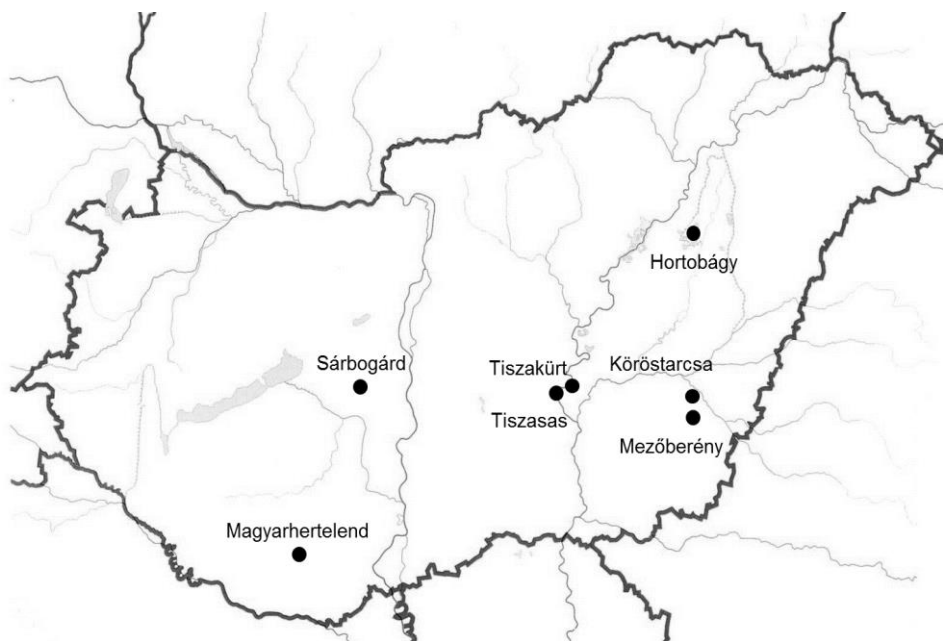
Számítógép	Memória (GB)	Processzor	Órajel (GHz)
1.	512	Intel Xeon E5-2630v4 (x2)	2,20
2.	32	Intel Core i7-3770K	3,50
3.	32	Intel Core i5-4460	3,20

8. Eredmények

8.1. A CRESS DNS vírusokat érintő vizsgálatok eredményei

8.1.1. A CRESS DNS vírus specifikus széles spektrumú PCR eredménye vadmadár eredetű minták esetében

A megvizsgált 90 vadmadár kloáka tampon mintában 30 esetben (14 különböző gazdafajból) igazoltuk PCR, Sanger szekvenálás és BLASTn keresés alapján CRESS DNS vírus jelenlétét (7. táblázat).



8. ábra A cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú DNS vírus specifikus PCR pozitív kloáka tampon minták gyűjtési helye.

Hasonlóságot mutattunk ki a GoCV (n=9), a *Duck associated cyclovirus 1* (DuACyV-1, n=17) és a *Garrulus glandarius associated circular virus 1* (GgaCV-1, n=2) *rep* szekvenciákkal. Két esetben a kapott elektroferogram eredmény nem volt egyértelműen értékelhető, valószínűleg több különböző *rep* szekvencia szakasza is felsokszorozódott a PCR során. A GoCV szekvenciákat Hortobágy (8/31, 25,8%) és Sárbogárd (1/29, 3,4%) környékéről, változatos gazdafajokból sikerült azonosítani, melyek a lúdalakúak, szulaalakúak, verébalakúak, gödényalakúak és vágómadár-alakúak rendjébe tartoztak. A GgaCV-1 szekvenciákat szajkó és csörgő réce mintákban mutattuk ki, mindegyik minta Sárbogárd környékéről származott. A DuACyV-1 törzseket Mezőberény és Köröstarcsa környékéről gyűjtött, lúdalakúak és vöcsökfélék rendjébe tartozó madaraktól határoztuk meg (8. ábra).

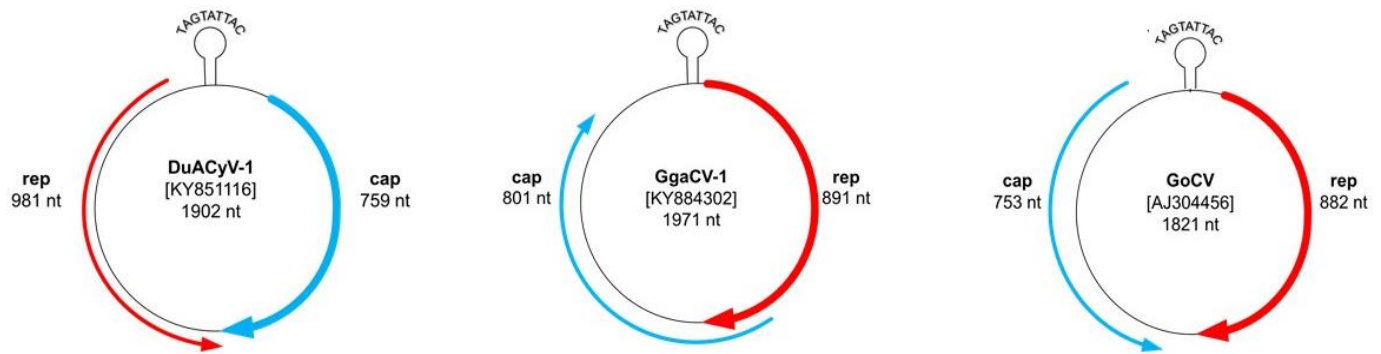
7. táblázat A vadmadár kloáka tampon minták cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú DNS vírusokra vonatkoztatott szűrővizsgálatának eredménye. GoCV: liba circovírus; GgaCV: szajkó-asszociált cirkuláris vírus; DuACyV: kacsá-asszociált cyclovírus.

Gazdafaj	Mintagyűjtés helye	Nested PCR eredménye	Törzs/Génbank azonosító
szajkó (<i>Garrulus glandarius</i>)	Sárbogárd, Fejér megye	GgaCV-1	GgaCV-1/1/ KY884302
csörgő réce (<i>Anas crecca</i>)		GgaCV-1	GgaCV-1/2/ MG254877
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		GoCV	GoCV-Hun1/ MG254878
nyári lúd (<i>Anser anser</i>)		GoCV	GoCV-Hun2/ MG254879
nagy lilik (<i>Anser albifrons</i>)		GoCV	GoCV-Hun3/ MG254880
kárókatona (<i>Phalacrocorax carbo</i>)		GoCV	
szürke gém (<i>Ardea cinerea</i>)		GoCV	
egerészölyv (<i>Buteo buteo</i>)		GoCV	
nyári lúd (<i>Anser anser</i>)		GoCV	
szarka (<i>Pica pica</i>)		GoCV	
vetési varjú (<i>Corvus frugilegus</i>)		nem értékelhető	
fehér gólya (<i>Ciconia ciconia</i>)		Hortobágy, Hajdú-Bihar megye	nem értékelhető
rétisas (<i>Haliaeetus albicilla</i>)	GoCV		
búbos vöcsök (<i>Podiceps cristatus</i>)	Mezőberény, Békés megye	DuACyV-1	DuACyV-1/2/ MG254873
búbos vöcsök (<i>Podiceps cristatus</i>)		DuACyV-1	DuACyV-1/5/ MG254876
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	DuACyV-1/1/ KY851116
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	DuACyV-1/3/ MG254874
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	
tőkés réce (<i>Anas platyrhynchos</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	DuACyV-1/4/ MG254875
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	DuACyV-1/4/ MG254875
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)		DuACyV-1	
kis lilik (<i>Anser erythropus</i>)	Köröstarcsa, Békés megye	DuACyV-1	

8.1.2. Az új CRESS DNS vírus törzsek teljes genom szekvenciáinak jellemzése, genetikai diverzitása, filogenetikai elemzése

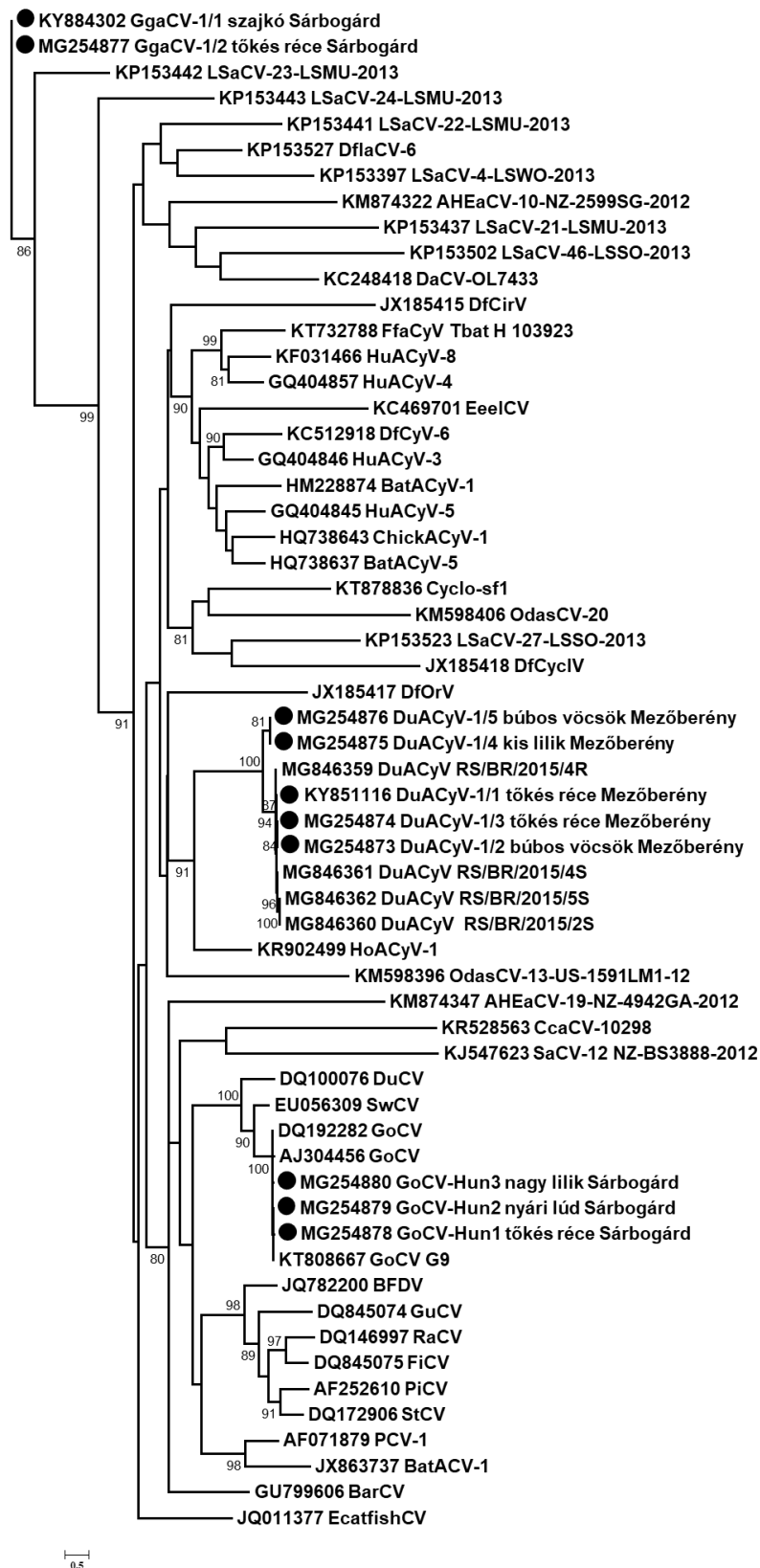
A back-to-back PCR során alkalmazott „forward” és „reverz” primerek 5' végei a genom ellentétes szálain szomszédos nukleotidokon helyezkedtek el. Három primerpár segítségével

összesen kilenc teljes genomot amplifikáltunk, majd ezt követően újgenerációs szekvenálás segítségével meghatároztuk azok szekvenciáját. Öt, három és egy szekvencia mutatott hasonlóságot GoCV, valamint a munkacsoportunk által korábban leírt DuACyV-1 és GgaCV-1 genomokkal (Fehér és mtsai, 2017; Kaszab és mtsai, 2018). Sikeresen azonosítottuk a *rep* és *cp* géneket, valamint további, a referencia genomokra is jellemző motívumokat.



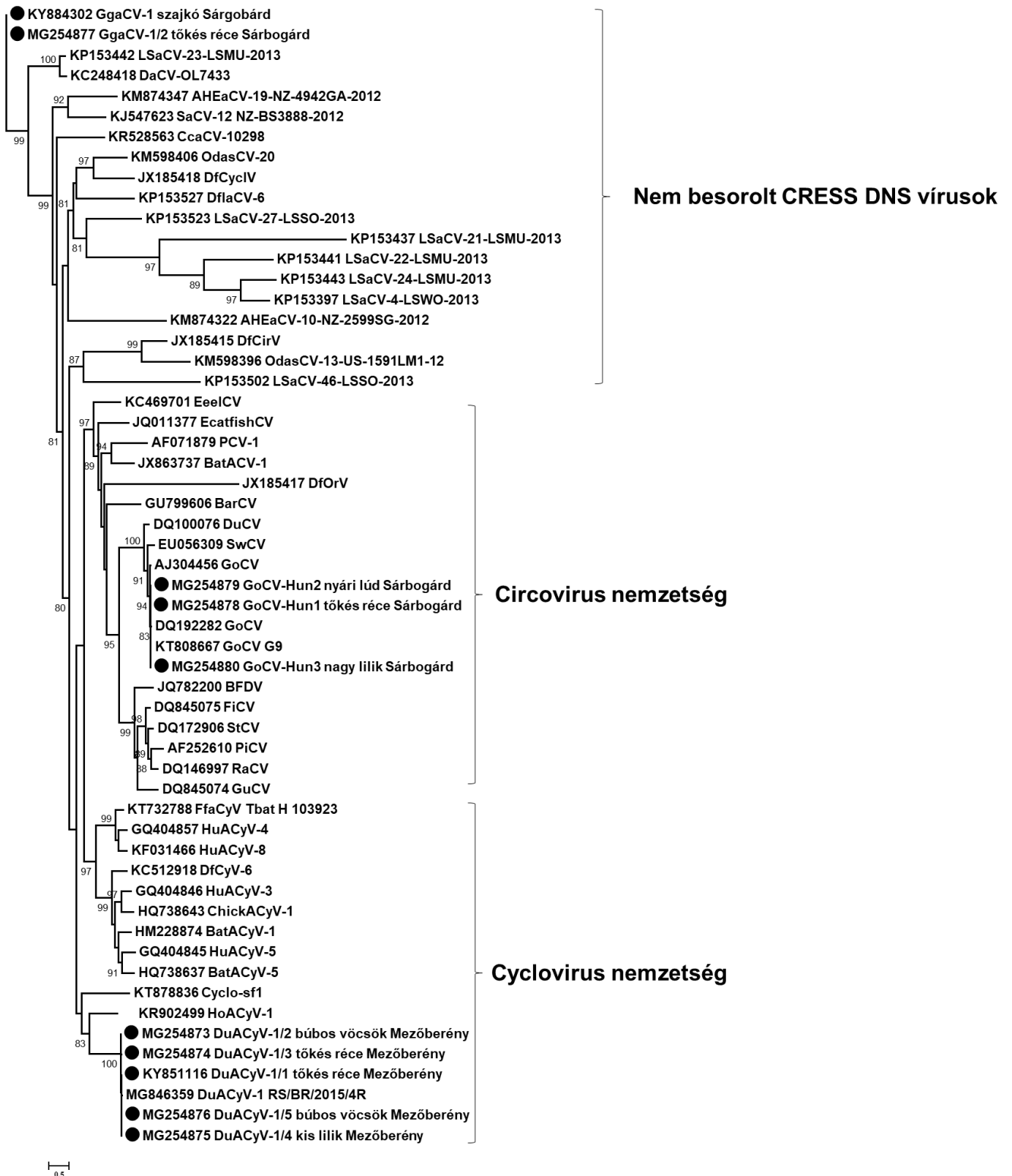
9. ábra A kacsza-asszociált cyclovírus (DuACyV-1), szajkó-asszociált cirkuláris vírus (GgaCV-1) és liba circovírus (GoCV) genomok sematikus ábrázolása.

A DuACyV-1 genomok virális szálán helyezkedik el a *cp* és a komplementer szál a *rep* (9. ábra). A két gén 5' végei között lévő IR 158 nt, míg a 3' végek közötti IR csupán négy nt hosszúságú. Az összes DuACyV-1 nonanukleotid motívumának szekvenciája TAGTATTAC (Fehér és mtsai, 2017). A munkacsoportunk által eddig azonosított genomok közül három törzs (DuACyV-1/1-DuACyV-1/3 törzsek) 1902 nt hosszú genommal rendelkezett, és 99,7–99,8% genom szintű azonosságot mutattak egymással. Egy szekvenciát búbos vöcsök, a másik két szekvenciát pedig tőkés réce kloáka tampon mintájából sikerült azonosítani. További három genom 1899 nt hosszúságú szekvenciája teljesen megegyezett (DuACyV-1/4 és DuACyV-1/5 törzsek), a gazdafajban mutattak eltérést (két minta kis lilikből, egy pedig búbos vöcsökből származott). A DuACyV-1 teljes genomok mérete közötti különbség a *cp* 5' régiójában bekövetkező, három nukleotidot érintő delécióból/inzercióból származik. A teljes genomokra vonatkoztatott azonossági érték 88,6–100% volt. Megvizsgáltuk az egyes génekre vonatkozó nt és as szekvencia azonossági értékeket. A DuACyV-1/1-DuACyV-1/5 törzsek *rep* szekvenciái 99,2 - 100% nt és 98,8 - 100% as szintű azonosságot mutattak. A *cp* esetében 72,1–100% nt és 73,4–100% as szekvencia azonossági értékeket kaptunk. A DuACyV-1/1-DuACyV-1/5 törzsek 87,4–100% teljes genom nt azonosságot mutattak olyan virális szekvenciákkal, melyeket Brazíliában azonosítottak csirke bélsármintákból (Lima és mtsai, 2019). A Cp alapján készült filogenetikai fa alapján a DuACyV-1/4 és 1/5 törzsek külön csoportosultak a többi DuACyV-1 törzstől (10. ábra).



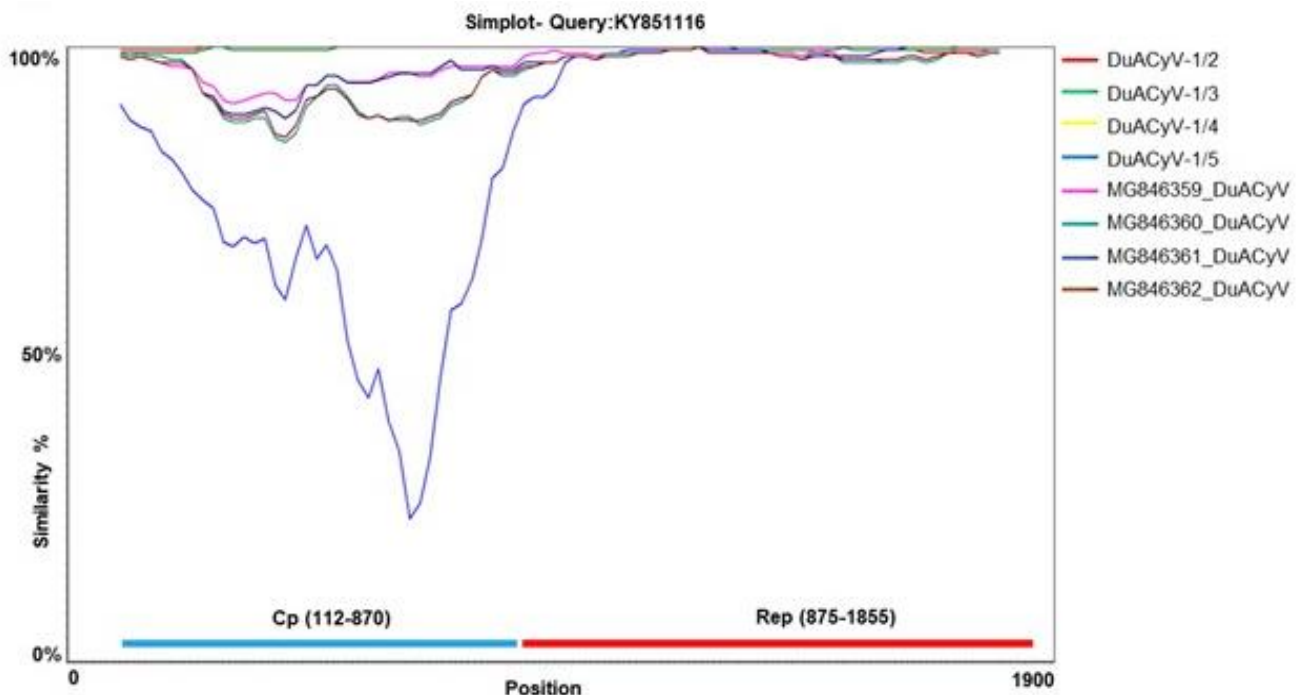
10. ábra A *Cirlivirales* rendbe tartozó vírusok kapszid fehérje aminosav szekvenciái alapján, a PhyML szoftverrel, RtREV+G+F modellel (SH-like support) készült maximum-likelihood filogenetikai fa. Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi.

Ezzel szemben a Rep alapján készült filogenetikai fa esetében az összes DuACyV-1 szekvencia közös ágon helyezkedett el (**11. ábra**).



11. ábra A *Cirlivirales* rendbe tartozó vírusok replikáció-asszociált fehérje aminosav szekvenciái alapján, a PhyML szoftverrel, LG+G+I modellel (SH-like support) készült maximum-likelihood filogenetikai fa. Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi.

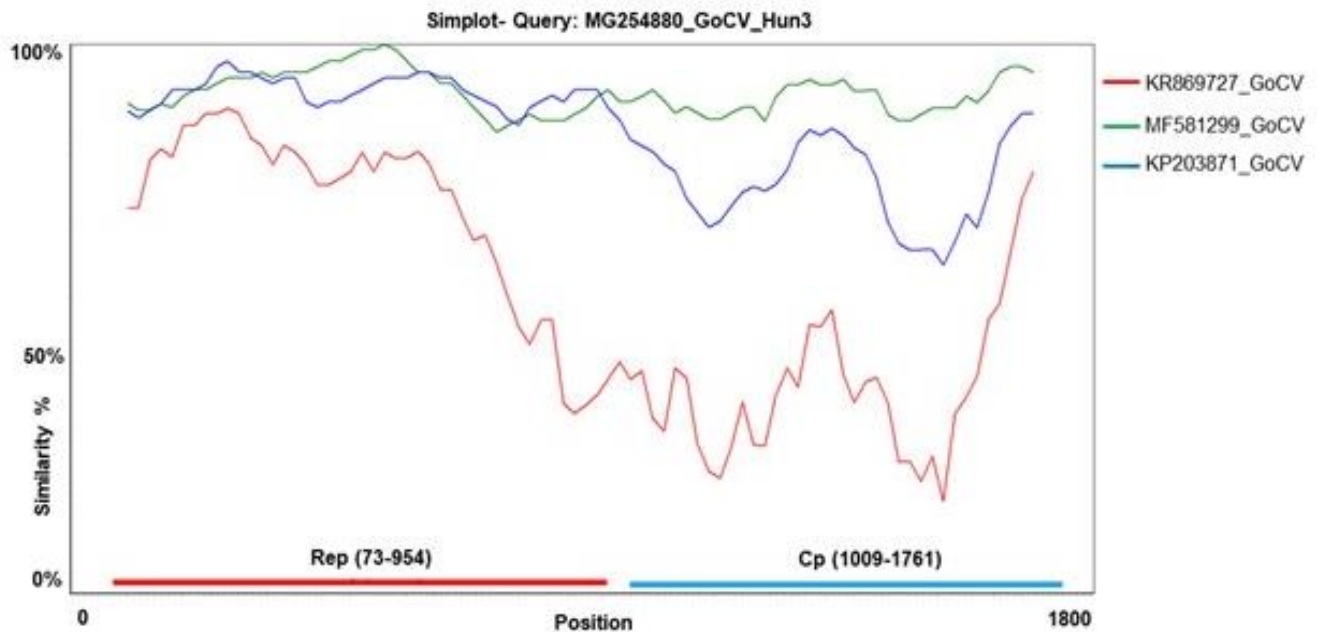
Annak érdekében, hogy tisztázzuk a két as szekvencia alapján készített filogenetikai fákon tapasztalható különbséget, a teljes genomsekvenciákkal rekombinációs analízist végeztünk. Az RDP4 elemzés különböző módszereivel végrehajtott vizsgálatok alapján az átlag p-érték $2,023 \times 10^{-2}$ és $1,230 \times 10^{-23}$ között mozgott. Az RDP4 és SIMPLOT elemzések eredményeit összevetve megállapíthattuk, hogy a *cp* génen belül lehetséges rekombinációs események zajlottak le (**12. ábra**). Azonban a génbankban elérhető korlátozott számú DuACyV-1 és egyéb, hasonlóságot mutató referencia szekvencia miatt ezek a vizsgálatok nem alkalmasak pontos filogenetikai kapcsolatok feltérképezésére, valamint a kapszid kódoló régió lehetséges eredetének megállapítására.



12. ábra A kacsza-asszociált cyclovírus 1 (DuACyV-1) szekvenciákkal, SIMPLOT szoftver segítségével végzett rekombinációs analízis eredménye.

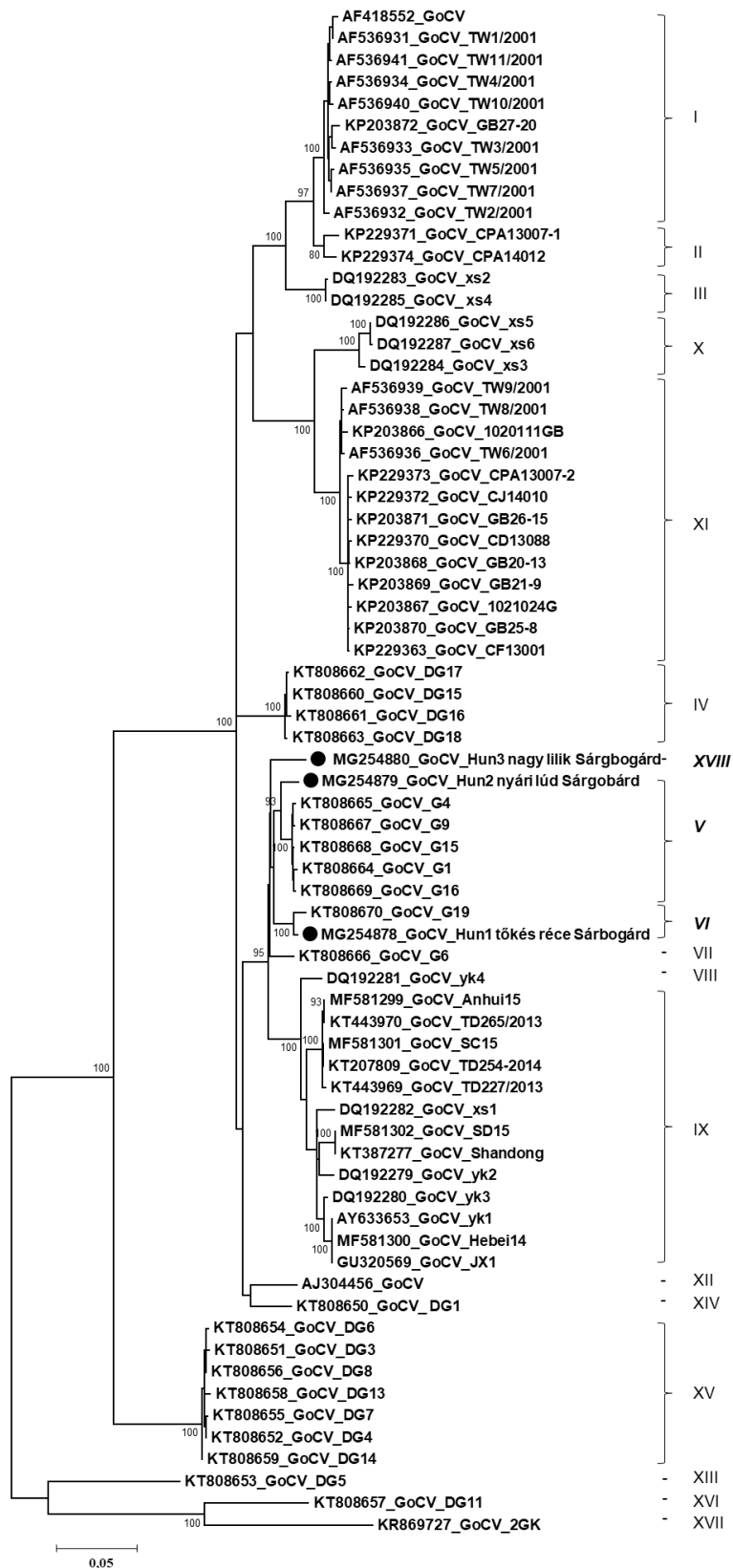
Tőkés réce, nyári lúd és nagy lilik kloáka tampon mintáiból három különböző, 1822 nt hosszúságú GoCV genomot írtunk le. A GoCV genomoknál a virális szálon kódolt a 882 nt hosszúságú *rep* (73-954 nt közötti szakaszon) és a komplementer szálon a 783 nt hosszú *cp* (1791-1009 nt közötti szakaszon) (**9. ábra**). A két gén 5' vége közötti IR 104 nt, míg a 3' végek közötti IR 54 nt hosszúságú. A nagy IR a circovírusokra jellemző TAGTATTAC nonanukleotid motívumot hordozza. A *rep* esetében 97,3–97,7% nt és 99,3–99,8% as azonosságot, míg a *cp* esetében 95,6–96,8% nt és 97,3–98,8% as azonosságot kaptunk. A törzsek közötti teljes genom szintű azonossági érték 96,8–97,3% volt. A magyarországi törzsek (GoCV-Hun1, -Hun2 és -Hun3) 97,0–99,4% teljes genomra vonatkoztatott nt azonosságot mutattak

lengyelországi vadmadár mintákból gyűjtött szekvenciákkal. Az RDP4 (SiScan módszer alapján p -érték $9,664 \times 10^{-8}$) és SIMPLOT segítségével elvégzett rekombinációs elemzés rávilágított lehetséges rekombinációs eseményre, mely a saját törzseinket és a lengyelországi szekvenciákat egyaránt érintheti (**13. ábra**).



13. ábra A lúd circovírus (GoCV) szekvenciákkal, SIMPLOT szoftver segítségével végzett rekombinációs analízis eredménye.

GoCV teljes genomok felhasználásával filogenetikai fát készítettünk, mely segítségével a GoCV szekvenciákat különböző genotípusokba sorolhatjuk (Stenzel és mtsai, 2018a). Ez alapján a Hun1 törzs a VI. genotípushoz, míg a Hun2 törzs az V. genotípushoz tartozik. A Hun3 törzs, mely maximum 96,9–97,1% teljes genom azonosságot mutatott a hozzá legközelebb álló, az V. és VI. genotípusba tartozó törzsekkel, a törzsfán teljesen elkülönülő ágat képviselt, így egy új genotípust (XVIII.) társítottunk hozzá. A **14. ábra** szemlélteti a GoCV teljes genomok felhasználásával készült maximum-likelihood filogenetikai törzsfát.



14. ábra A lúd circovírus (GoCV) teljes genomszekvenciák alapján, a PhyML szoftverrel, TN93+G+I modellel (SH-like support) készült maximum-likelihood filogenetikai fa. Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi.

A GoCV teljes genomok, valamint a teljes genomokból származó *rep* és *cp* génekre szubsztitúciós rátát számítottunk, melyeket az **8. táblázat** tartalmaz.

8. táblázat A lúd circovírus (GoCV) teljes genomokra és génjeire becsült szubsztitúciós ráta és nem szinonim/szinonim szubsztitúciós (dN/dS) arány értékek. A szubsztitúciós ráta értékeket nukleotidcsere/hely/év (s/s/y) egységben adtuk meg, mellette a 95% legmagasabb posteriori sűrűség (HPD) intervallum is szerepel.

Gén/genom	Szubsztitúciós modell	Szubsztitúciós ráta	dN/dS
GoCV teljes genom	GTR+G+I	$2,57 \times 10^{-4}$ ($4,44 \times 10^{-5}$ – $5,02 \times 10^{-4}$)	-
GoCV Rep	GTR+G+I	$2,44 \times 10^{-4}$ ($6,34 \times 10^{-5}$ – $4,45 \times 10^{-4}$)	0,058
GoCV Cp	GTR+G+I	$4,64 \times 10^{-4}$ ($2,50 \times 10^{-7}$ – $9,93 \times 10^{-4}$)	0,103

A Datamonkey webszerver algoritmusainak segítségével vizsgáltuk a génekre ható szelekciós erők hatását, valamint meghatároztuk a dN/dS arányt (**8. táblázat**). A GoCV genomokra/génekre összességében negatív szelekciós nyomás hat (dN/dS 0,058 a *rep* és 0,103 a *cp* esetében). Az egyedi as pozíciók tekintetében pozitív szelekciós nyomás érvényesül a Rep 72. as pozíciójában (K72N/T/S). A Cp esetében pozitív szelekciós nyomás feltehetően a 19. as pozíciójában (A19T/I/S/V) hat.

A munkacsoportunk által leírt két GgaCV-1 törzs 1971 nt hosszúságú genomja megegyezett. Közeli rokonságot egyetlen génbanki CRESS DNS vírus szekvenciájával sem mutatnak. A szekvenciák azonosítása egymástól távol álló madárfajok (szajkó és csörgő réce) kloáka tampon mintáiból történt. A genomra jellemző, hogy a virális szálon, egymást átfedve található meg a 891 nt hosszúságú *rep* és a 801 nt hosszúságú *cp* (**9. ábra**). A *rep* 5' és a *cp* 3' vége között található a 335 nt hosszúságú IR, mely a circovírus-szerű genomokra jellemző nonanukleotid motívumot (TAGTATTAC) tartalmazza. A filogenetikai fákön a GgaCV-1 törzsek a circo- és cyclovírusoktól elkülönülnek (**10. és 11. ábra**).

8.1.3. CRESS DNS vírusok előfordulása GHPV fertőzött ludak szöveteiben

Az általunk vizsgált 21 lúd és 2 mulard kacsza szövetmintából 17 esetben sikerült igazolnunk a CRESS DNS vírusok jelenlétét (**9. táblázat**). Minden szekvencia GoCV szekvenciákhoz illeszkedett a BLASTn analízis alapján. A szekvenciák 95,1–98,3% nt azonosságot mutattak a legközelebbi referenciákkal, köztük az általunk leírt Hun3 törzs *rep* régiójával. A GoCV szekvenciák egymás között 89,9–99,9% nt azonosságot mutattak. Teljes genomszekvenciákat a tanulmány keretei közt nem határoztunk meg.

9. táblázat Lúd haemorrhagiás polyomavírus pozitív minták cirkuláris, replikáció-asszociált fehérjét kódoló, egyszálú DNS vírus szűrésének eredménye.

Törzs	Génbanki azonosító	Gazdafaj	Circovírus nested PCR eredménye
1969	MN311452	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
2983	MN311453	mulard kacsa (<i>Anas platyrhynchos domesticus x Cairina moschata domestica</i>)	pozitív
3814	MN311454	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
5171	MN311455	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
5348	MN311456	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
6345	MN311457	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
6930	MN311458	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
7169	MN311459	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
7327	MN311460	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
7613	MN311461	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
10362	MN311462	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
10372	MN311463	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
12016	MN311464	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
14234	KJ452212	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
14451	MN311465	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
16005	MN311466	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
16006	MN311467	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	negatív
20158	MN311468	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
20962	MN311469	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
23900	MN311470	mulard kacsa (<i>Anas platyrhynchos domesticus x Cairina moschata domestica</i>)	pozitív
24131	MN311471	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
24135	MN311472	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív
37233	MN311473	házilúd (<i>Anser anser domesticus</i>)	pozitív

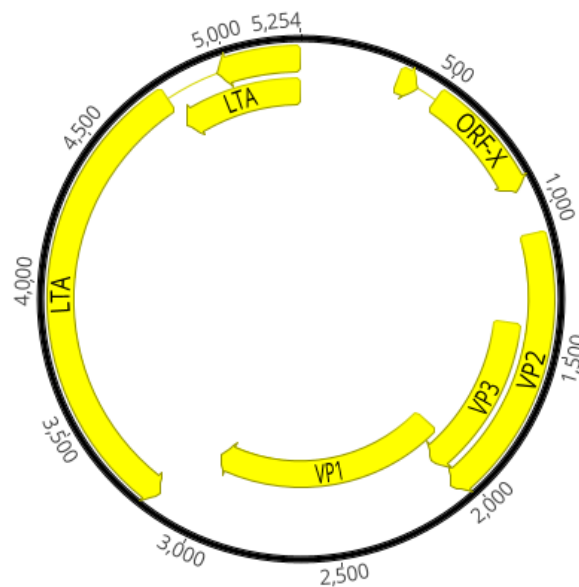
8.2. A polyomavírusokat érintő vizsgálatok eredményei

8.2.1. A polyomavírus specifikus széles spektrumú PCR eredménye vadmadár eredetű minták esetében

A CRESS DNS vírusok mellett polyomavírusok kimutatását is megkíséreltük a 90 vadmadár kloáka tampon minta nukleinsav állományából. Bár néhány esetben megfelelő mérettartományba eső PCR termékeket kaptunk, a szekvenálás eredménye alapján nem sikerült igazolnunk a polyomavírusok jelenlétét (Bali, 2017).

8.2.2. Az új GHPV törzsek teljes genomszekvenciáinak jellemzése, evolúciós vizsgálatok

Összesen 22 új GHPV törzs teljes genomszekvenciáját határoztuk meg, köztük az 1969-es járvány során gyűjtött törzsét is. A genomok 5252-5254 bp hosszúságúak, a különbség a nemkódoló régióban bekövetkező delécióknak/inzerciónak köszönhető (6. táblázat).



15. ábra A lúd haemorrhagiás polyomavírus genom (génbanki azonosító szám MN311452) sematikus felépítése. Az ábra a Geneious Prime 2020.2.4 szoftver segítségével készült.

Mindegyik törzs genomjában megtalálható a korai (STA és LTA) és késői (VP1, VP2, VP3) fehérjéket kódoló ORF, illetve a feltételezett ORF-X (15. ábra). A feltételezett gének

hosszát, valamint a leírt törzsek szekvenciáinak génbanki azonosítóját a **10. táblázat** tartalmazza.

10. táblázat Az általunk azonosított új lúd haemorrhagiás polyomavírus genomok génbanki azonosítója és genomra jellemző tulajdonságai. VP1-VP3: vírusfehérje 1-3; LTA: nagy tumor antigén; STA: kis tumor antigén.

Génbanki azonosító	Genom	VP1	VP2	VP3	LTA	STA	ORF-X
MN311452	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311453	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311454	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311455	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311456	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311457	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311458	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311459	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311460	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311461	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311462	5253	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5253-4957, 4764-3151	5253-4771	347-424, 498-929
MN311463	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311464	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	5252-4956, 4763-3150	5252-4770	347-424, 497-928
MN311465	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311466	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311467	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311468	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311469	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311470	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311471	5252	1962-3023	1082-2062	1409-2062	4763-3150, 5252-4956	5252-4770	347-424, 497-928
MN311472	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929
MN311473	5254	1963-3024	1083-2063	1410-2063	5254-4958, 4765-3152	5254-4772	347-424, 498-929

A genomok felépítése, valamint az ORF-ek hossza megegyezik a génbankban megtalálható további kilenc GHPV teljes genomával, melyek közül egyet munkacsoportunk határozott meg korábban (Fehér és mtsai, 2014). Az összesen 31 teljes genomszekvencia, illetve a Magyarországon gyűjtött szekvenciák is magas, 99,6–100% nt azonosságot mutattak egymással.

A saját és a génbankban elérhető szekvencia adatok segítségével a GHPV törzsek rokonsági viszonyait elemeztük, teljes genomra és génekre vetítve is. A fő kapszid fehérje (VP1) szekvencia adatokat két csoportra tudtuk osztani. Az egyik csoport a 31 teljes genom VP1 szekvenciáját tartalmazta, míg a másik csoport a génbankban fellelhető, teljes és részleges genom szekvenciákból gyűjtött egyedi VP1 szekvenciákat (n=61) foglalta magába; utóbbi csoport vadmadár gazdafajokból gyűjtött szekvenciákat is reprezentált (gólya, szirti galamb, szürke gém, ezüstsirály, egerészölyv, csóka). A VP1 gén esetében a legalacsonyabb azonossági értéket a vadmadár eredetű – köztük a gólya eredetű – szekvenciák esetében (nukleotid, $\geq 97,9\%$) kaptuk. Néhány korábban vizsgált hazai GHPV törzs VP1 szekvenciája is rendelkezésre állt (Palya és mtsai, 2004), melyekkel saját törzseink 99,6–100% nt, valamint 99,7–100% as azonosságot mutattak.

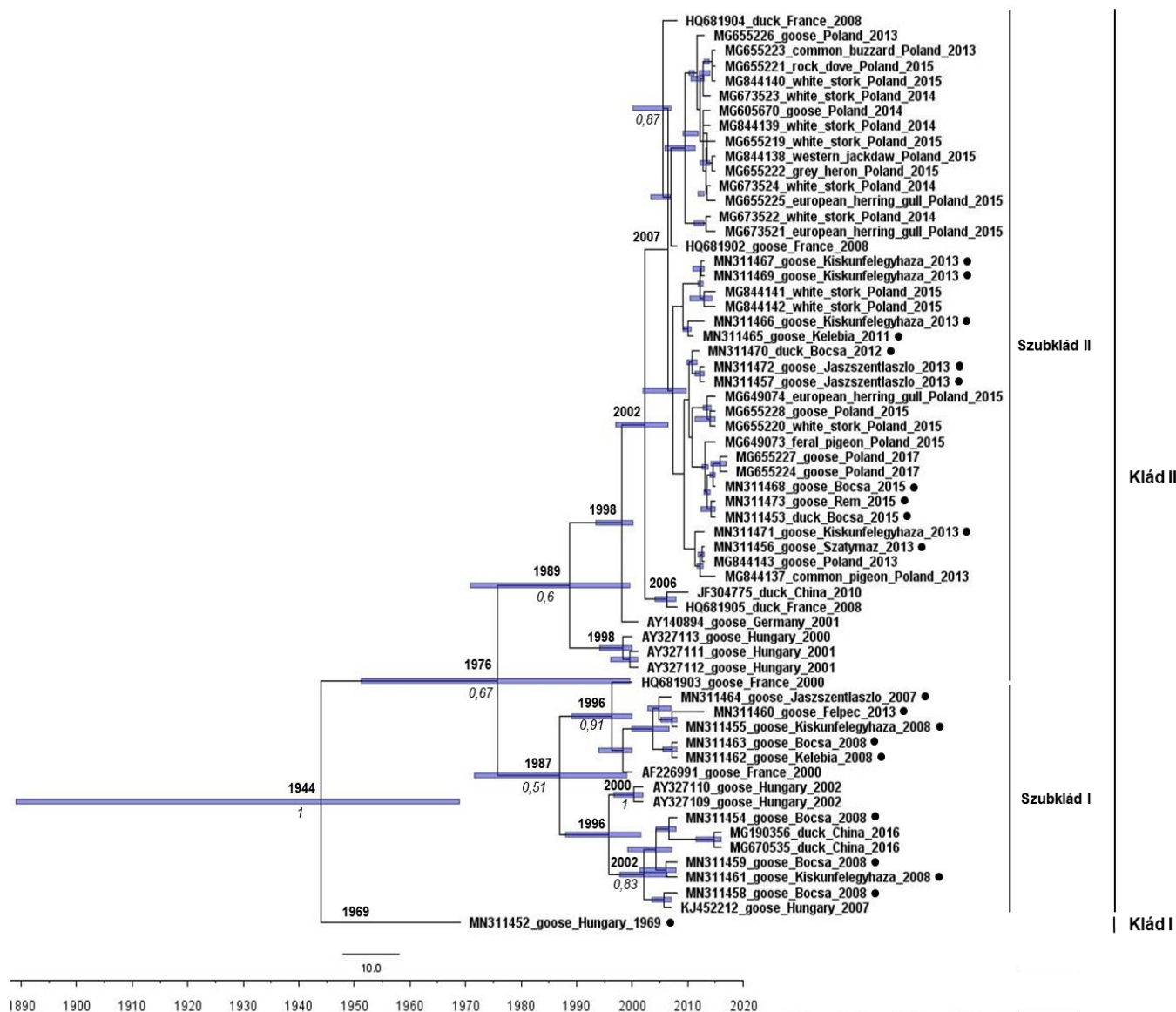
A GHPV szekvenciák tekintetében rekombinációs eseményt nem mutattunk ki. A TempEst szoftver segítségével megállapítottuk, hogy az adatsorunk alkalmas evolúciós elemzés végrehajtására (Rambaut és mtsai, 2016). A teljes genomokra és a teljes genomokból származó VP1, VP2, LTA, STA, ORF-X génekre becsült átlagos evolúciós ráta $1,25 \times 10^{-5}$ – $5,82 \times 10^{-5}$ s/s/y volt (**11. táblázat**). Ezekhez képest a VP3 gén esetében alacsonyabb, $6,57 \times 10^{-6}$ s/s/y értéket kaptunk. A szubsztitúciós ráta emelkedését ($1,54 \times 10^{-4}$ s/s/y) tapasztalhattuk, amikor a vizsgálatba bevontuk a vadmadár eredetű VP1 szekvenciákat is.

A Datamonkey webszerver algoritmusainak segítségével vizsgáltuk a génekre ható szelekciót. GHPV genomokra/génekre összességében negatív szelekciós nyomás hat. A dN/dS arány értéke minden esetben 1 alatt maradt, a legmagasabb értéket az ORF-X esetében kaptuk (**11. táblázat**). Kismértékű eltérést tapasztaltunk a VP1 szekvenciák két csoportjának dN/dS arány értékeiben, ami a bővített VP1 adathalmazban enyhén magasabb volt. Az egyes as pozíciókat vizsgálva pozitív szelekciós nyomás egy esetben feltételezhető, három Magyarországról származó törzs esetében, az LTA régióban (G100V). Ez a pozíció egyetlen ismert LTA funkcionális doménnek sem része, a mutáció jelentőségét nem ismerjük.

11. táblázat A lúd haemorrhagiás polyomavírus (GHPV), papagáj polyomavírus (BFDV) és süvöltő polyomavírus (FPyV) teljes genomjára és egyes génjeire meghatározott szubsztitúciós ráta és nem szinonim/szinonim szubsztitúció (dN/dS) arány értékek. A szubsztitúciós ráta értékeket nukleotidcsere/hely/év (s/s/y) egységben adtuk meg, mellette a 95% legmagasabb posteriori sűrűség (HPD) intervallum is szerepel. VP1-VP3: vírusfehérje 1-3; LTA: nagy tumor antigén; STA: kis tumor antigén.

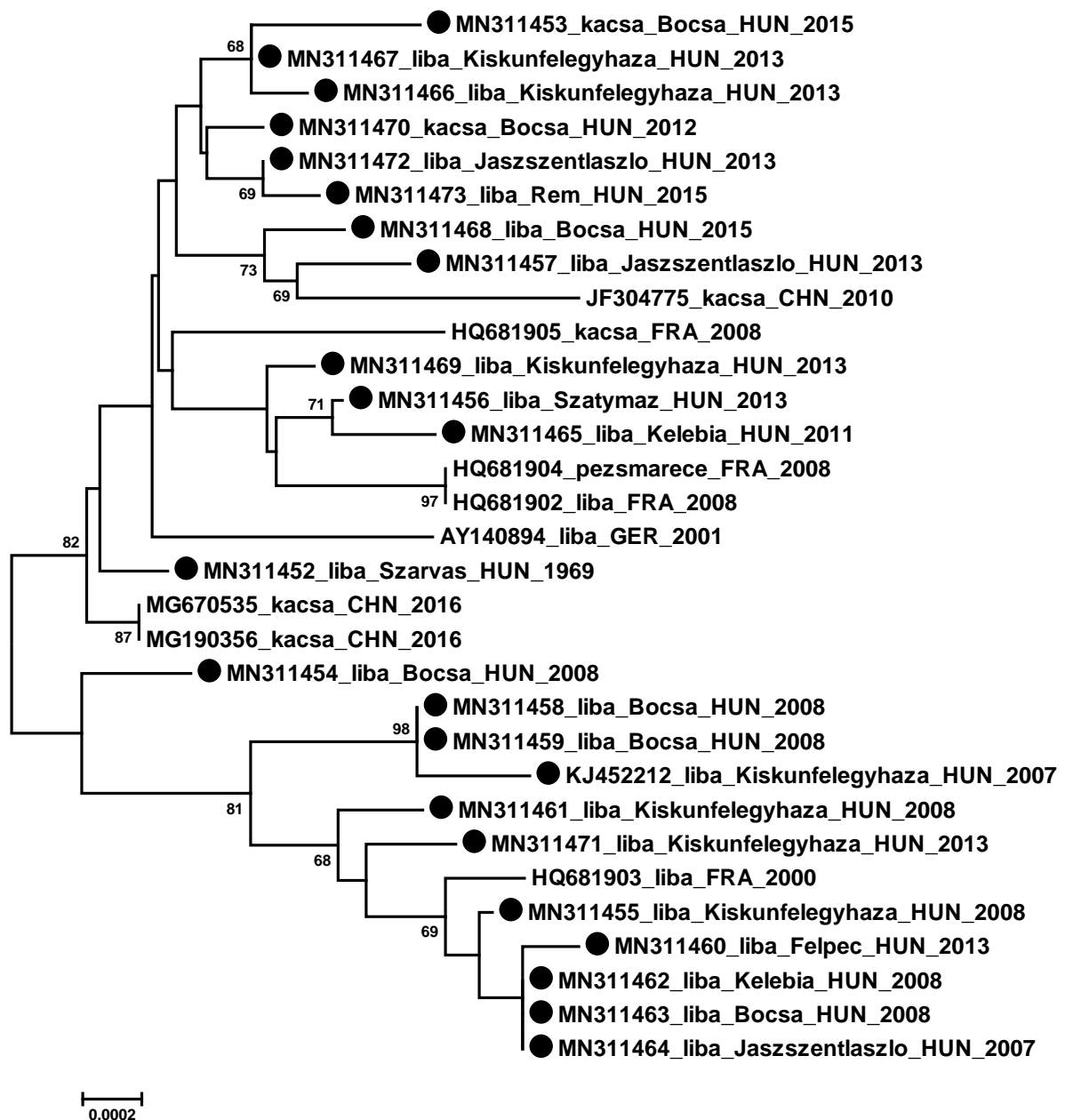
GHPV				BFDV				FPyV			
Gén	Szubsz. model	Szubsztitúciós ráta	dN/dS	Gén	Szubsz. model	Szubsztitúciós ráta	dN/dS	Gén	Szubsz. model	Szubsztitúciós ráta	dN/dS
VP1	HKY+G +I	4,82 x10⁻⁵ (1,03 x10 ⁻⁸ –1,24 x10 ⁻⁴)	0,111	VP1	JC	1,58x10⁻⁴ (7,88x10 ⁻⁵ –2,45x10 ⁻⁴)	0,322	VP1	JC	2,00x10⁻⁴ (4,40x10 ⁻⁶ –4,77x10 ⁻⁴)	0,038
VP2	HKY	1,25x10⁻⁵ (6,76 x10 ⁻¹² –5,46x10 ⁻⁵)	0,194	VP2	JC+G	1,78x10⁻⁴ (8,93x10 ⁻⁵ –2,74x10 ⁻⁴)	0,798	VP2	JC	1,452x10⁻⁴ (2,45x10 ⁻⁶ –3,59x10 ⁻⁴)	0,110
VP3	HKY	6,57x10⁻⁶ (5,27x10 ⁻¹³ –3,38x10 ⁻⁵)	0,644	VP3	JC+G	2,28x10⁻⁴ (1,11x10 ⁻⁴ –3,60x10 ⁻⁴)	0,702	VP3	JC	1,84x10⁻⁴ (3,03x10 ⁻⁶ –4,61x10 ⁻⁴)	0,160
LTA	HKY+G	4,87x10⁻⁵ (4,39 x10 ⁻⁶ –1,00 x10 ⁻⁴)	0,0916	LTA	JC+G	8,02x10⁻⁵ (3,63x10 ⁻⁵ –1,30x10 ⁻⁴)	0,156	LTA	JC	2,931x10⁻⁴ (1,28x10 ⁻⁵ –6,53x10 ⁻⁴)	0,180
STA	HKY+G	5,82x10⁻⁵ (3,05x10 ⁻¹⁰ –1,37x10 ⁻⁴)	0,111	STA	JC	1,55x10⁻⁴ (6,19x10 ⁻⁵ –2,62x10 ⁻⁴)	0,0547	STA	JC	2,28x10⁻⁴ (2,72x10 ⁻⁶ –5,96x10 ⁻⁴)	0,270
ORF-X	HKY	2,98x10⁻⁵ (1,73 x10 ⁻⁹ –8,53x10 ⁻⁵)	0,963	VP4	JC	9,64x10⁻⁵ (3,41x10 ⁻⁵ –1,69x10 ⁻⁴)	0,720	ORF-X	JC	3,214x10⁻⁴ (5,60x10 ⁻⁶ –7,77x10 ⁻⁴)	0,264
-	-	-	-	VP4d	JC	7,03x10⁻⁵ (1,29x10 ⁻⁵ –1,39x10 ⁻⁴)	1,430	-	-	-	-
VP1 (n=61)	HKY+G	1,54 x10⁻⁴ (5,77 x10 ⁻⁵ –2,53 x10 ⁻⁴)	0,442	-	-	-	-	-	-	-	-
genom	HKY+G +I	3,03x10⁻⁵ (1,09x10 ⁻⁵ –5,33x10 ⁻⁵)	-	genom	JC+G	1,39x10⁻⁴ (7,18x10 ⁻⁵ –2,10x10 ⁻⁴)	-	genom	JC	2,63x10⁻⁴ (1,60x10 ⁻⁸ –6,26x10 ⁻⁴)	-

A fő kapszid fehérjét (VP1) kódoló gén szekvenciáinak (n=61) felhasználásával időskálázott filogenetikai fát készítettünk (**16. ábra**). Ehhez felhasználtuk a mintavétel helyének és időpontjának adatait, amelyeket a fákon is feltüntettük (**16. és 17. ábra**). Egy 1944-ben (95% HPD 1889-1969) bekövetkező esemény hatására a GHPV törzseket két kládra oszthattuk. Az egyik kládba az 1969-ből származó magyarországi törzs különült el. A másik kládba a 2000 után gyűjtött mintákban leírt törzsek szekvenciái tartoztak, melyek nagy része Magyarországról és Lengyelországból származott. Ezen a kládon belül valószínűleg egy 1976-ban (95% HPD 1951-1999) bekövetkező elválás következményeként két szubkládot különíthettünk el. A 2007-2008-ban gyűjtött mintákból származó magyar törzsek, valamint a 2013-ban Felpécen gyűjtött mintából származó magyar törzs szekvenciája együtt alkotta az egyik szubkládot (szubklád I). Ebbe a szubkládba sorolható három referencia törzs szekvenciája is, melyek közül egyiket Franciaországban (2000), libából származó mintában azonosítottak, a másik kettőt kacsza eredetű mintában Kínából (2016). A 2013-ban Magyarországon gyűjtött mintákból származó GHPV szekvenciák közül a felpéci mintában kimutatott szekvencia volt az egyetlen, amely ebbe a szubkládba került és további érdekességként ez volt az egyedüli, amit az ország északnyugati régiójában gyűjtöttek. A másik szubkládot (szubklád II) a 2011-2015-ben gyűjtött magyarországi kacsza és liba eredetű minták szekvenciái, valamint 2001-2015-ben leírt további európai (lengyel, francia, német, magyar) és kínai törzsek alkotják. Az újonnan azonosított magyarországi, valamint néhány lengyelországi vadmadár, liba és kacsza eredetű mintákból nyert GHPV szekvenciák jól elkülönülnek a 2000-2001 között leírt hazai GHPV törzsek szekvenciáitól, valamint egyéb földrajzi területekről és évekből származó szekvenciáktól.



16. ábra A lúd haemorrhagiás polyomavírus VP1 szekvenciák alapján készített időskálázott filogenetikai fa. Az egyes ágakra vonatkozó 95% HPD értékeket kék sávval jelöltük. Az ágak alatt a 0,6-nál magasabb posterior valószínűséget tüntettük fel. Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi. VP1: vírusfehérje 1; HPD: legmagasabb posteriori sűrűség.

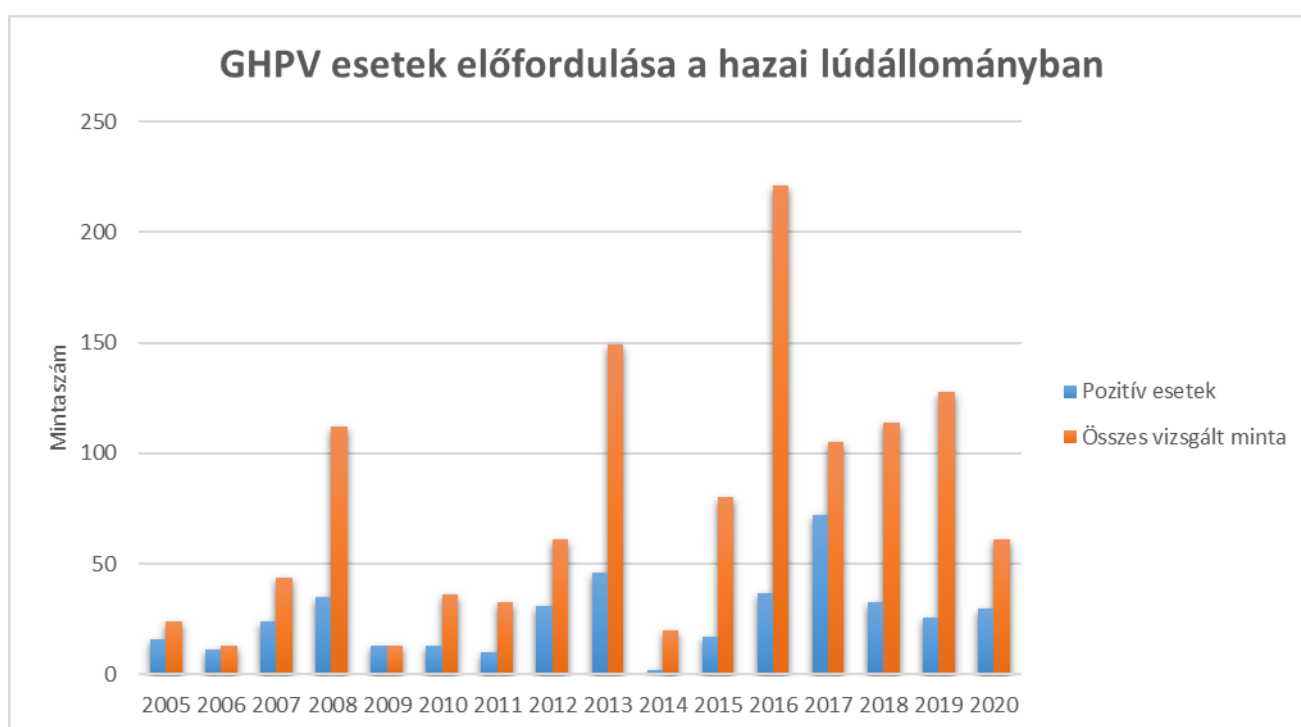
A lúd és kacska eredetű mintákból leírt GHPV törzsek teljes genomszekvenciával neighbor joining filogenetikai fát generáltunk (**17. ábra**), mely eredménye összhangban állt az előbb említettekkel.



17. ábra A lúd haemorrhagiás polyomavírus teljes genomszekvenciák felhasználásával, MEGA6 szoftverrel készített neighbor joining filogenetikai fa (p-distance modell, 1000 bootstrap ismétlés). Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi.

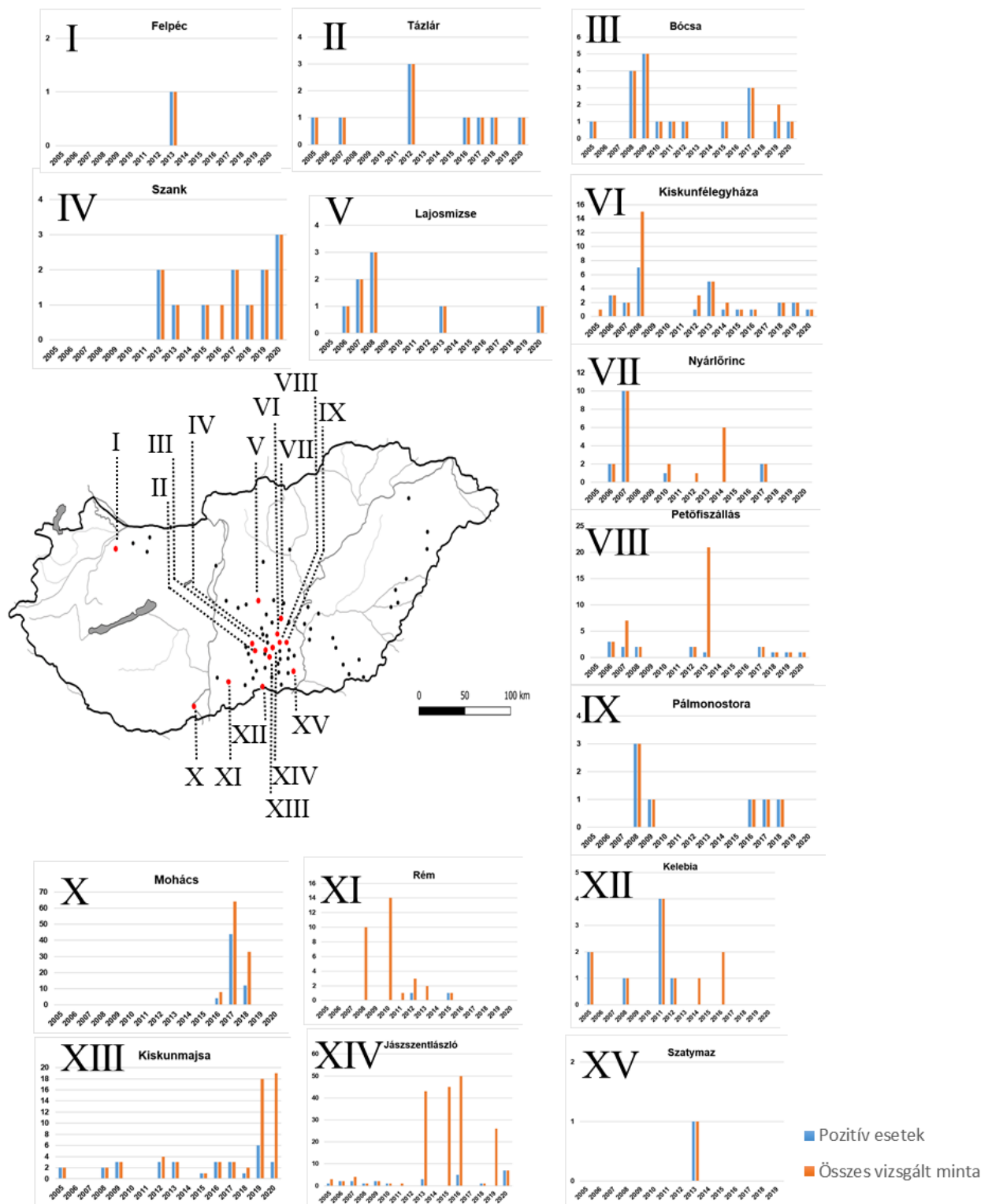
A filogenetikai fán látható, hogy a 2011 után gyűjtött törzsek genomja külön csoportosul, pusztán a 2013-as felpéci és 2013-as kiskunfélegyházi mintákból származó törzsek szekvenciái illeszkednek a 2007-2008 évekből származók közé.

Elvégeztük a hazai járványtani adatok elemzését is. A NÉBIH ÁDI 2005-2020 között 1214 házilúd és 30 kacsa (pekingi kacsa; mulard; mandarin réce, *Aix galericulata*; sarlós réce, *Anas falcata*; vörösvállú réce, *Callonetta leucophrys*; karolina réce, *Aix sponsa*) belső szerv és bélsármintájában vizsgálta a GHPV előfordulását. A vírust 420 esetben, 416 lúd és négy mulard kacsa eredetű mintából sikeresen azonosították. A GHPV specifikus PCR vizsgálatokat ismeretlen okból elhullott állatok, valamint GHPV fertőzés gyanúja esetén végezték el. Éves viszonyításban a beérkező minták száma és a GHPV pozitív esetek száma hullámzó tendenciát mutatott, a 2008., 2013. és 2017. években mérhető csúcsokkal a GHPV fertőzött esetszám tekintetében (**18. ábra**).



18. ábra A lúd haemorrhagiás polyomavírus (GHPV) specifikus vizsgálatok és igazolt GHPV fertőzések száma a hazai lúdállományokban 2005-2020 között. Az X-tengelyen a minták beküldési idejét, az Y-tengelyen a mintaszámot tüntettük fel.

A minták az ország 75 településéről érkeztek, többnyire a Duna-Tisza közéről, valamint Dél-Magyarországról. A víziszárnyas termelés hazánkban főként ezekre a régiókra orientálódik. A legtöbb pozitív minta 15 településről származott (**19. ábra**).



19. ábra A kiemelt hazai régiókra vonatkoztatott, a lúd haemorrhagiás polyomavírus kimutatásra irányuló vizsgálatok és igazolt fertőzések száma. Fekete kör jelöli a 75 mintát szolgáltató település elhelyezkedését, míg piros kör jelöli a 15 kiemelt települést, melyekről a legtöbb pozitív minta származott. Az X-tengelyen a minták beküldési idejét, az Y-tengelyen a mintaszámot tüntettük fel.

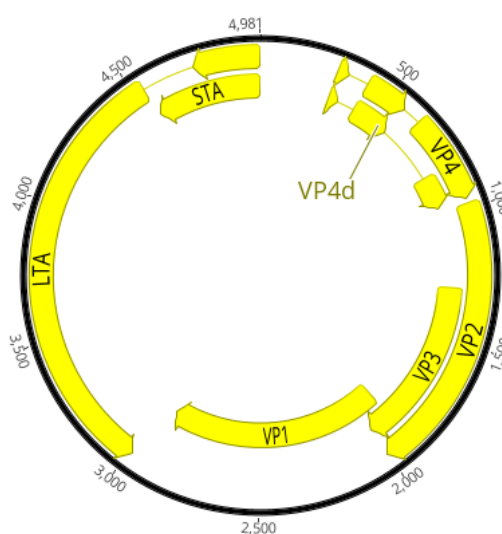
A GHPV fertőzött ludak esetében a szakirodalomban leírtaknak megfelelő klinikai tünetek megjelenését tapasztalták. Az GHPV fertőzött négy mulard kacsá esetében a GHPV fertőzésre jellemző kórbonctani/kórszövettani kép is feltűnt (**12. táblázat**). Mindegyik esetben kimutatható volt különböző társfertőzések (*Escherichia coli*, *Candida albicans*, lúd circovírus) jelenléte.

12. táblázat A NÉBIH ÁDI által igazolt, lúd haemorrhagiás polyomavírus fertőzött mulard kacsá egyedek esetében regisztrált kórbonctani és kórszövettani jellemzők, egyéb fertőzések.

Gazdafaj	Kor	Év	Kórbonctan / kórszövettan	Társfertőzés
mulard	4 hét	2012	Lúd haemorrhagiás polyomavírus fertőzésére jellemző kórbonctani és kórszövettani kép	Lúd circovírus
mulard	3,5 hét	2015	A vesékben vérzésekkel kísért zonális tubulus elfajulás	Lúd circovírus
mulard	6 hét	2016	Súlyos fokú vérzések, csatornahám elhalással járó heveny tubulonephrosis	<i>Escherichia coli</i> (máj)
mulard	11 hét, tömött	2019	Circovírus fertőzés gyanú, Fabricius-féle tömlő vacuolás degeneratioval járó sorvadása, nyelőső mikózis, bélflóra eltolódás, zsigeri köszvény, hurutos tüdőgyulladás	<i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> (tüdő)

8.2.3. Az új BFDV törzs teljes genomszekvenciájának jellemzése, evolúciós vizsgálatok

Az elhullott örvös sándorpapagájából származó új BFDV törzs (génbanki azonosító: MN657184) genomja 4981 bp hosszúságú. A genom felépítése és a feltételezett ORF-ek hossza megegyezik az elérhető referencia törzsekével. Megtalálhatóak a genomban a korai (STA és LTA) és késői fehérjék (VP1, VP2, VP3), valamint a VP4 és VP4d fehérjéket kódoló ORF-ek is (**20. ábra**). Az általunk leírt BFDV törzs a génbank adatbázisában elérhető BFDV szekvenciákkal 99,8% genom szintű nt azonosságot mutatott, a génenkénti nt és az azonossági értékek pedig 100%-ot is elérték.



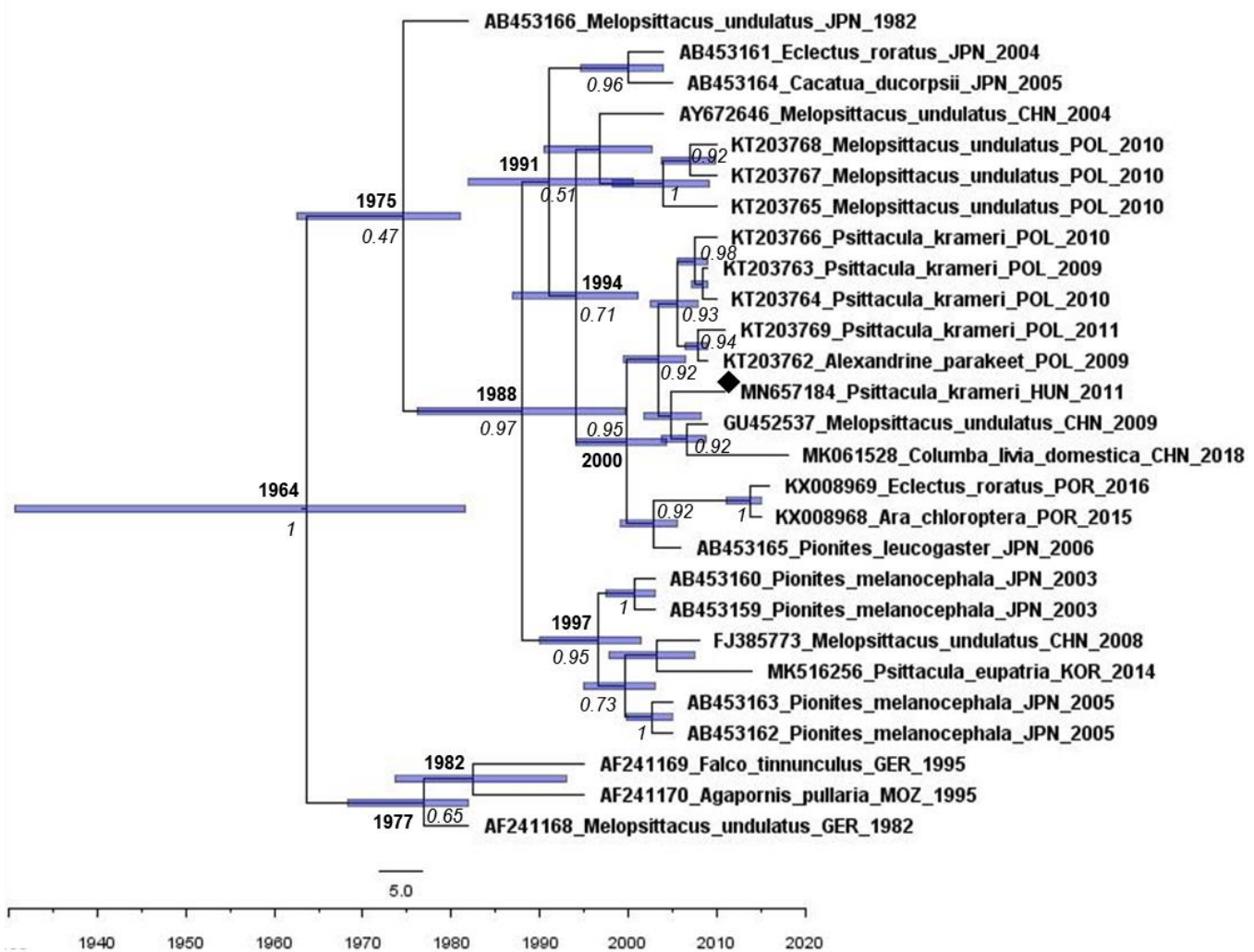
20. ábra Sematikus ábra a papagáj polyomavírus genomról. Az ábra a Geneious Prime 2020.2.4 szoftver segítségével készült.

A génbankban elérhető BFDV (n=27), FPyV (n=5) és CaPyV (n=6) szekvenciákat egymáshoz illesztettük, majd evolúciós elemzéseket folytattunk. Az evolúciós analízis előtt ellenőriztük az esetleges rekombináció lehetőségét, ám potenciális eseményt nem azonosítottunk. A TempEst szoftver segítségével megállapítottuk, hogy az adatsorunk alkalmas az evolúciós elemzés végrehajtására (Rambaut és mtsai, 2016). Az adataink pozitív korrelációt mutattak a mintavételi idő és genetikai diverzitás között. Teljes genomok esetében a korrelációs koefficiens 0,631–0,774, míg a génenként kapott érték 0,187–0,862 volt.

A BFDV szekvenciák felhasználásával maximum-likelihood és időskálázott filogenetikai fákat generáltunk. A minták gazdafaj eredetét és gyűjtési idejét a filogenetikai fán jelöltük (**21. és 22. ábra**).

A BFDV teljes genomszekvenciák felhasználásával készült időskálázott MCC fa alapján két leszármazási vonalat különböztethetünk meg, melyek időbeli szétválása 1964-re

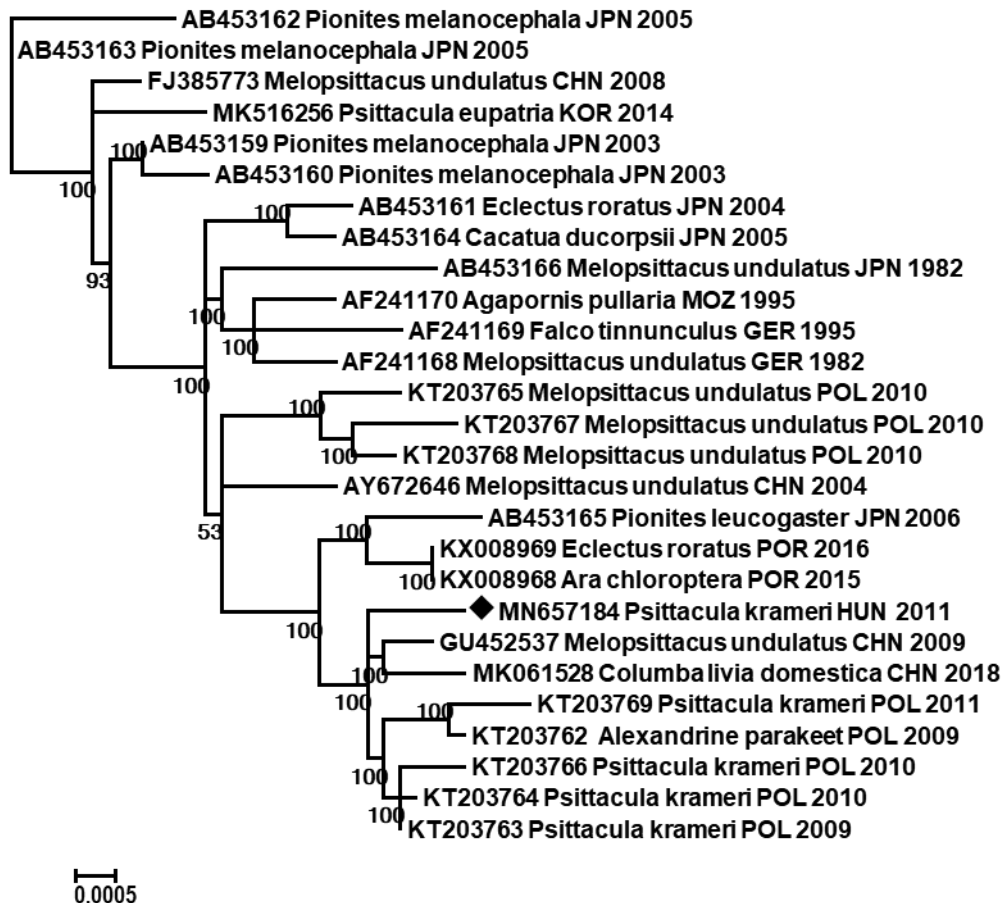
tehető (95% HPD 1931-1982) (**21. ábra**). Az egyik leszármazási vonalon található egy 1982-ben, Németországban gyűjtött mintából származó BFDV szekvencia, valamint további két szekvencia, melyek Németországban és Mozambikban gyűjtött mintákból származtak (1995). Ide nem tartoznak későbbi évek során azonosított szekvenciák. A másik leszármazási vonalat két fő ágra bonthattuk, az elágazás ideje 1975-re tehető. Az egyik ágon egyedülként található egy 1982-ben, Japánban gyűjtött mintában azonosított szekvencia, míg a másik ágon találhatóak a 2003-2018 között leírt genomok.



21. ábra A papagáj polyomavírus teljes genomok alapján készített időskálázott filogenetikai fa. Az egyes ágakra vonatkozó 95% HPD értékeket kék sávval jelöltük. Az ágak alatt a 0,4-nél magasabb posterior valószínűséget tüntettük fel. Az általunk leírt törzseket fekete négyszög jelzi. HPD: legmagasabb posteriori sűrűség.

A BFDV teljes genomok alapján készített maximum-likelihood filogenetikai fa (**22. ábra**) az időskálázott fához hasonló topológiát mutatott. Az általunk leírt, hazai mintában

azonosított BFDV szekvencia együtt csoportosul más papagájfajok mintáiban azonosított szekvenciákkal, melyeket Lengyelországban és Kínában gyűjtöttek. Ugyanebbe a csoportba került egy galamb mintában leírt BFDV törzs is, melyet 2018-ban gyűjtöttek Kínában.



22. ábra A papagáj polyomavírus teljes genomszekvenciák alapján, a PhyML szoftverrel, GTR+G+I modellel (SH-like support) készült maximum-likelihood filogenetikai fa. Az általunk leírt törzseket fekete négyszög jelzi.

Elvégeztük a BFDV törzsek teljes genomszekvenciái, valamint az egyes gének szekvenciái esetében is az evolúciós ráta becslést. A BFDV teljes genomszekvenciákra vonatkoztatott szubsztitúciós ráta átlag értéke $1,39 \times 10^{-4}$ s/s/y (95% HPD $7,18 \times 10^{-5}$ – $2,10 \times 10^{-4}$). Az egyes génekre meghatározott evolúciós ráta $7,03 \times 10^{-5}$ – $2,28 \times 10^{-4}$ között mozgott; a leggyorsabban evolválódó genomi régió a VP1-VP3 fehérjéket kódoló szakasz, ahogy azt a **11. táblázat** is szemlélteti.

Elemzéseinket elvégeztük a FPyV és CaPyV teljes genomszekvenciák esetén is: a BFDV-hez hasonló evolúciós rátákat kaptunk, amely FPyV esetén $2,63 \times 10^{-4}$ s/s/y (95% HPD $1,60 \times 10^{-8}$ – $6,26 \times 10^{-4}$), míg CaPyV esetén $1,41 \times 10^{-4}$ s/s/y (95% HPD $5,75 \times 10^{-10}$ – $7,17 \times 10^{-4}$) (**11.**

táblázat). A BFDV, FPyV és CaPyV esetében kalkulált értékeket összehasonlítva a GHPV esetében számítottakkal megállapítottuk, hogy a GHPV teljes genomokra számított szubsztitúciós ráta ($3,03 \times 10^{-5}$ s/s/y, 95% HPD $1,09 \times 10^{-5}$ – $5,33 \times 10^{-5}$) a másik három vírusra vonatkozó értékhez képest egy nagyságrenddel alacsonyabb volt. (**11. táblázat**). FPyV esetében is végeztünk génenkénti elemzést, ahol a BFDV-hez hasonló szubsztitúciós rátákat kaptunk, melyek általában magasabbak a GHPV esetén meghatározottakhoz képest. A kapott értékeket a **11. táblázat** szemlélteti. CaPyV esetén a génbankban elérhető korlátozott számú szekvencia és a szekvenciák közti nagyfokú hasonlóság következményeként génenkénti evolúciós és szelekciós analízis nem történt.

A BFDV egyes génjeire kapott dN/dS arány 0,054–1,430 közötti érték közé esett, míg a FPyV esetében ez alacsonyabb tartományban (0,038–0,270 között) mozgott. Ez alól kivételt az STA gén esetében láthattunk, ahol a FPyV dN/dS aránya 0,270, míg BFDV dN/dS aránya 0,055 volt (**11. táblázat**). Amennyiben összehasonlítottuk a GHPV STA és ORF-X, valamint a BFDV STA és VP4 régiója esetében kalkulált dN/dS arányt, a GHPV-re vonatkoztatott értékek némileg magasabbak, minden egyéb gén esetében azonban a GHPV szekvenciákra vonatkoztatott értékek alacsonyabbak a BFDV-hez viszonyítva.

Ahogy a GHPV esetében is, negatív szelekciós nyomás jellemző a BFDV és FPyV esetében is. Az egyedi as pozíciók tekintetében pozitív szelekciós nyomás érvényesül a BFDV fő kapszid fehérjéjének (VP1) 65. (Q65K), 173. (R173E), 205. (K205R) és 325. (Y325I) as pozíciójában. A további kapszid fehérjék esetében a nem szinonim mutációk a VP2 gén, valamint az ugyanazon leolvasási keretben lévő, ám VP2-nél rövidebb VP3 gén középső régiójára estek. Az elemzések statisztikailag is megerősítették a diverzifikáló szelekció hatását a VP2 gén 221. (G221V/S) és 240. (S240T/P), illetve a VP3 gén 115. (G115V/S) és 134. (S134T/P) as pozíciójában (amelyek egymás megfelelői az adott ORF-ben). Az említett, pozitív szelekciós nyomás alatt álló pozíciókban azonosított as csere legtöbb esetben egy-egy szekvencia esetében jelent meg. A GHPV, BFDV és FPyV esetében kalkulált as pozíciónkénti szelekciós számítások eredményét az **1. melléklet** szemlélteti.

9. Megbeszélés

A magyar víziszárnyas termelés Európa szinten meghatározó. Nagy népszerűségnek örvend a „foie gras”, mely fellendíti a hazai házilúd, mulard kacsza és pézsmaréce hizalt májának előállítását. Emellett magas a kereslet a hústermékek és toll iránt is. Bár az utóbbi években – a madárinfluenza járványának is köszönhetően – csökkent a lúdállományok mennyisége, a hizalásra szánt napos libák száma elérte a 3,9 milliót 2020-ban (Központi Statisztikai Hivatal, <https://www.ksh.hu/>). Emellett kacsatermelésben is élvonalban járunk; 2020-as adatok alapján ez a szám kacsák esetében 29,9 millió volt (<https://www.ksh.hu/>). Ennek a nemzetgazdasági szempontból is fontos ágazatnak a védelme kiemelt szerepet élvez hazánkban. Sajnos a hazai lúd- és kacsállományokat számos járványos megbetegedés veszélyezteti, mint például a madárinfluenza, a lúd parvovírus okozta Derzsy-betegség, a GHPV által okozott HNEG, vagy liba és kacsza circovírusok okozta megbetegedések (Ivanics és mtsai, 2003). Az említett vírusokhoz társítható betegségek előfordulása súlyos gazdasági károkat okoz az állattenyésztőknek, így a védekezés szempontjából fontos az állományokban cirkuláló vírustörzsek genomvariabilitásának feltérképezése, valamint a potenciális rezervoár szervezetek felkutatása. Munkánk során igyekeztünk eddigi ismereteinket bővíteni a víziszárnyasokat fertőző CRESS DNS vírusok és polyomavírusok előfordulásának és potenciális gazdafajainak leírásával, valamint az előforduló törzsek azonosításával és genetikai jellemzésével.

9.1. CRESS DNS vírusok vizsgálatai

Vizsgálataink során a CRESS DNS vírusok előfordulását különböző vadmadárfajok kloáka tampon mintájában tanulmányoztuk. Reprezentatív törzsek teljes genomjának felsokszorozásával és szekvenálással lehetőségünk nyílt új adatokat szolgáltatni egyes CRESS DNS vírusok genetikai értelemben vett felépítéséről. Mivel CRESS DNS vírusokra jellemző *rep*-szerű szekvenciák integrálódott formában megtalálhatóak eukarióta genomokban (Marton és mtsai, 2015; Zhao és mtsai, 2019), a teljes genom amplifikálással ellenőrizhettük, hogy az általunk felsokszorozott részleges *rep* génhez hasonló szakaszok nem a gazda genomjába integrált vírus eredetű szekvenciák lehettek.

Az előzetes vizsgálatok során leírtunk egy új cyclovírus fajt, a *Duck associated cyclovirus 1*-et (DuACyV-1) (Fehér és mtsai, 2017). Jelen tanulmányunk során további öt DuACyV-1 teljes genomszekvenciát sikerült meghatároznunk különböző vadmadárfajokból. Elemzések alapján ezek nagyfokú azonosságot mutatnak olyan virális szekvenciákkal, melyeket csirkék bélsármintájából azonosítottak Brazíliában (Lima és mtsai, 2019). A broiler csirkék esetében gyakran előfordul a satnyaság és törpenövés

szindrómája, mely fejlődési rendellenességgel, tollfejlődési problémákkal és hasmenéssel jár. A betegség következtében megnövekedik a mortalitási ráta, csökken a hústermelés, mely hosszú távon gazdasági károkhoz vezet. A betegség etiológiája pontosan nem ismert, valószínűleg különböző vírusos megbetegedések (astrovirus, reovirus, parvovirus, rotavirus), bakteriális fertőzések, környezeti hatások játszanak szerepet a kiváltásában (Lima és mtsai, 2019). Az esetleges kórokozók felderítése céljából egy brazil kutatócsoport 2015-ben gyűjtött egészséges és beteg csirkék bélsármintájában metagenom vizsgálattal határozta meg a csirkék intestinális viromját. Ennek köszönhetően négy DuACyV-1 szekvenciát írtak le egészséges állatok esetében (Lima és mtsai, 2019). BLASTn elemzés során további szekvenciák mutattak 94–96% azonosságot a DuACyV-1 szekvenciákkal, melyeket csirke eredetű trachea tampon mintákból azonosítottak (MN379599–MN379600) az Egyesült Államokban, ám a tanulmány részletei nem kerültek közlésre.

Munkacsoportunk korábban leírt egy másik CRESS DNS vírust, a GgaCV-1-et is, ami szajkóból származó mintából került azonosításra (Kaszab és mtsai, 2018). Jelen tanulmányunk keretei között csörgő réce kloaka tampon mintájából sikerült kimutatnunk ugyanezt a vírust. Filogenetikai és azonossági vizsgálatok alapján a két GgaCV-1 törzs *rep* szekvenciája egy Új-Zélandon élő édesvízi kagyló (*Echmyridella menziesii*) mintájából azonosított vírus (Lake Sarah-associated circular virus-23, LSA CV-23, KP153442; *rep* 50% as azonosság), valamint az Egyesült Államokban gyűjtött édesvízi zooplankton eredetű vírus (Diporeia sp. associated circular virus, DaCV, KC248418; *rep* 48% as azonosság), szekvenciáikhoz állt legközelebb, ám így is igen messze álló törzsekről beszélhetünk. A genom felépítése és a specifikus as motívumok jelenléte arra utal, hogy a GgACV-1 RCR mechanizmussal replikálódó vírus. A *rep* esetében megtalálhatóak az eukariótákat fertőző CRESS DNS vírusokra jellemző RCR I, II és III. motívumok (CWTLNN, PHLQG, YCKE), valamint a Walker-A, -B és -C motívumok (GTGKS, LLDDD, ITSN). A konzervatív motívumok tekintetében a GgaCV-1 törzsek, valamint a circo- és cyclovírus fajok törzsei hasonlóságot mutatnak, de a genom felépítése alapján elkülönülnek egymástól. Ezt az elkülönülést figyelhettük meg a filogenetikai törzsfákban is.

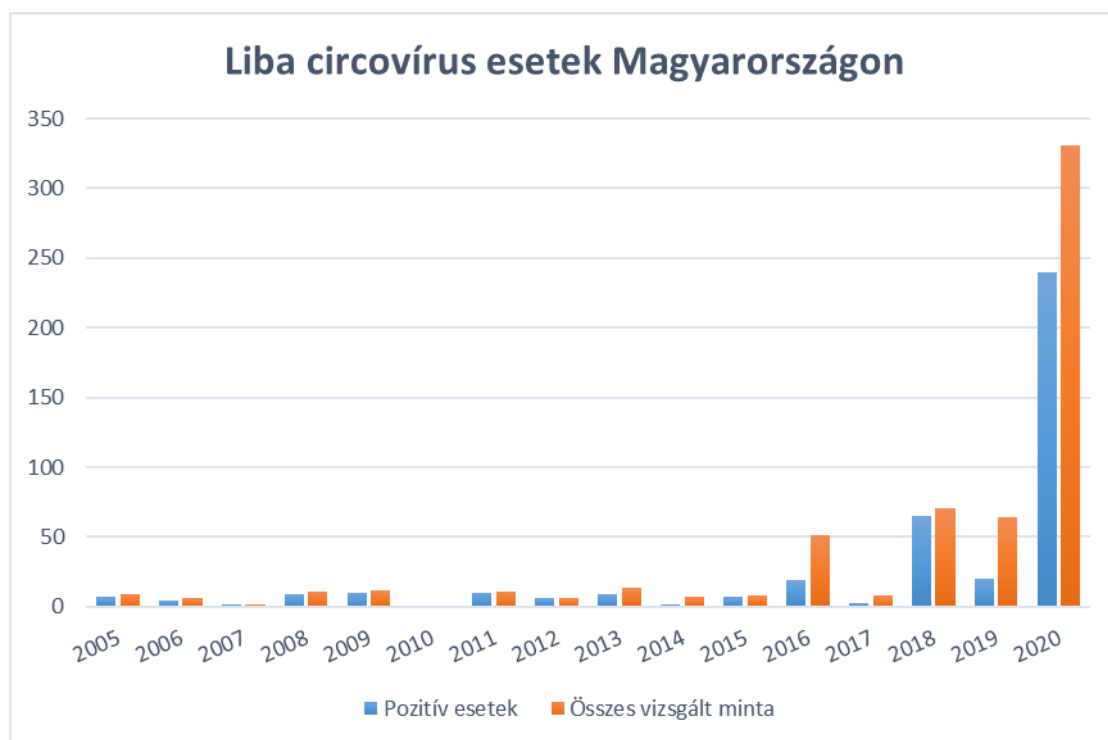
E két új vírus (DuACyV-1 és GgaCV-1) potenciális gazdaszervezetre kifejtett hatása, esetleges patogén mivolta továbbra is kérdéses. A szekvencia adatokon és potenciális gazdafajokon felül további információ nem áll rendelkezésünkre. Mivel a CRESS DNS vírusok egysejtű organizmusokat is fertőzhetnek, nem zárható ki, hogy gerincesek és/vagy gerinctelenek gasztrointesztinális traktusát kolonizáló, eddig azonosítatlan exogén vírusokról beszélünk. Felmerül a lehetőség, hogy a vírusok táplálék útján kerülnek a gazdaszervezet emésztőrendszerébe és a tápcsatornán áthaladva, az érintett szervezettel való bármilyen kölcsönhatás nélkül jelennek meg a bélsárban (Dayaram és mtsai, 2015a; Dayaram és mtsai, 2016; Fehér és mtsai, 2017; Kaszab és mtsai, 2018).

A vizsgált vadmadár mintákban a DuACyV-1 és GgaCV-1 mellett a GoCV jelenlétét is leírtuk, amely esetében az eddigiekhez képest szélesebb potenciális gazdaspektrumot sikerült feltárnunk. A GoCV eddigi ismereteink szerint a házilibák kórokozója, ám a lúdalakúak mellett kimutattuk kárókatona (*Phalacrocorax carbo*), szürke gém (*Ardea cinerea*), szarka (*Pica pica*), egerészölyv (*Buteo buteo*) és rétisas (*Haliaeetus albicilla*) esetében. Néhány reprezentatív törzs teljes genomszekvenciáját is meghatároztuk, amely igazolta, hogy GoCV törzseket detektáltunk. A génbank adatbázisában több részleges GoCV *cp* szekvencia elérhető, melyeket vadmadarak bél- és egyéb szövetmintáiból (lép, szív, vese, zúzógyomor) azonosítottak (tudományos folyóiratban nem publikált). A mintákat 2014 és 2017 között Lengyelországban gyűjtötték különböző vadmadarokból (nyári lúd, tőkés réce, gólya, csóka, ezüstsirály, fenyőpinty és szirti galamb). A GoCV eredetű szekvenciák szövetekben való kimutatása arra utal, hogy a vírus sikeresen szaporodhat távoli rokonságban álló vadmadárfajokban, ám ennek megerősítéséhez további vizsgálatokra, teljes vírusgenom szekvenciák meghatározására is szükség lenne. Nem zárhatjuk ki, hogy a GoCV a házi ludakkal szoros rokonságot mutató lúdalakúakat fertőzi és más madárfajok egyedeibe véletlenszerűen került a vírus. Az is előfordulhat, hogy a DuACyV-1 és a GgaCV-1 esetében leírt módok valamelyike okozta valamennyi esetben a GoCV előfordulását. Mindhárom vírus esetében közös pont lehet a víz, mint közvetítő közeg, azaz a táplálék és a vízfelvétel során történő vírus behatolás.

Növendék ludak esetében a két leggyakoribb betegség a Derzsy-betegség és a HNEG (Ivanics és mtsai, 2003). Azonban a liba circovírus okozta esetek száma növekedést mutat. Egyre gyakoribbak azok a lúdállományok, melyeknél az 5-10 hetes állatok tollvesztés és „szétnövés” tüneteit mutatják. A GoCV fertőzött növendék lúdállományokban gyakori a társfertőzések megjelenése (például lúd parvovírus és GHPV), melyek végül az állatok elhullását okozhatják (Glávits és mtsai, 2005; Ivanics és mtsai, 2003). A társfertőzések nagy arányát mutatja, hogy az általunk vizsgált 23 GHPV fertőzött liba és mulard kacska vese/bursa szövetmintáiban 17 esetben igazoltuk a liba circovírus jelenlétét.

A mortalitási ráta jelentősen függ a társfertőzőktől. Glávits és munkatársai 2005-ben áttekintették a növendék ludak parvo-, circo-, reo- és polyomavírus okozta megbetegedéseinek kapcsolatát. E tanulmány keretein belül vizsgálták az Országos Állategészségügyi Intézetben a növendék ludakban megállapított vírusos betegségek százalékos megoszlását 2000-2003. években, ami az igazolt liba circovírus fertőzések számának növekedését mutatta 2003-ra (Glávits és mtsai, 2005). A GoCV előfordulására vonatkozó ismereteink bővítése céljából összegyűjtöttük, hogy a későbbiek során miként alakult hazánkban ezeknek az eseteknek száma. A NÉBIH ÁDI adatai alapján 2005-2020

között összesen 612 esetben hajtottak végre liba circovírus specifikus vizsgálatot, melyből 414 esetben pozitív eredményt kaptak (**23. ábra**).



23. ábra A NÉBIH ÁDI által vizsgált liba circovírus esetek megoszlása 2005-2020 között. X-tengelyen a minta beküldésének ideje, Y-tengelyen a mintaszám látható.

Jól megfigyelhető, hogy az évek előrehaladtával egyre inkább megnövekedett a GoCV fertőzés gyanúja miatt beküldött minták száma és sokkal több erre specifikus vizsgálatot hajtottak végre (**23. ábra**). Ennek oka lehet, hogy nem mindig egyértelmű a klinikai tünet vagy kórbonctani elváltozás alapján, hogy milyen fertőzés áll a háttérben. Mindössze néhány támpont szolgál ennek elkülönítésére. Circovírus fertőzéssel jellemzően az egy hónaposnál idősebb állományokban kell számolni. A „szétnövés”, fejlődési rendellenességek, tollasodási zavarok többféle libabetegségnél is előfordulnak, ám amennyiben ezek a klinikai tünetek két hónapos korban tűnnek fel, akkor circovírus fertőzésre gyanakodhatunk. Tipikus kórbonctani elváltozások nem ismertek, a halmozódó társfertőzések előfordulásából, a tollhiányos egyedek viszonylag nagy számából, valamint a Fabricius-tömlő kisebb méretéből következtethetünk a circovírus fertőzésre (Ivanics és mtsai, 2003).

Az egyszerűbb és olcsóbb tartásnak köszönhetően a hazai piacon megfigyelhető a kacsá ágazat előretörése, ezért összegyűjtöttük a DuCV előfordulására vonatkozó, 2005-2020 közötti időszakra eső adatokat is. Ezen időszakban összesen 118 esetben végeztek

vizsgálatot házikacsákban, melyekből 84 egyed bizonyult a vírussal fertőzöttnek, míg mulard kacsá esetében 47 esetből 40 minősült pozitívnak. Ezek megoszlását a mellékletben található diagramok szemléltetik (**2. melléklet**).

A vadmadarakban szaporodó, vagy emésztőrendszerükben szaporodás nélkül áthaladó vírusok veszélyt jelentenek mind a háztáji szárnyasokra, mind a gazdaságok állományaira. A vonuló, költöző életmódot folytató madárfajok egyedei és az állatok kereskedelme hozzájárulhat a mikrobák széleskörű elterjedéséhez. Megfigyeltük, hogy egyes vírusok eloszlása (például GoCV Sárbogárd környékén, DuACyV-1 Mezőberény környékén) madárfajtól független, az adott vizes élőhelyhez, illetve földrajzi régióhoz kötött mintázatot mutatott. Mindez arra utalhat, hogy a madarak taxonómiai hovatartozásán és életmódján túl egyéb, ismeretlen tényezők formálhatják a (potenciális patogén) CRESS DNS vírusok elterjedését, járványtani szerepét. A minták típusa (kloáka tampon), a viszonylag alacsony mintaszám és az egyes területekre vonatkozó, madárfaj és mintaszám tekintetében eltérő mintavételezési mintázat nem tette lehetővé számunkra, hogy meghatározzuk a vírusok sikeres szaporodására alkalmas gazdafajok körét. A limitáló tényezők ellenére tanulmányunk új ismeretet szolgáltatott az azonosított CRESS DNS vírusok földrajzi eloszlásának és genetikai diverzitásának megismeréséhez.

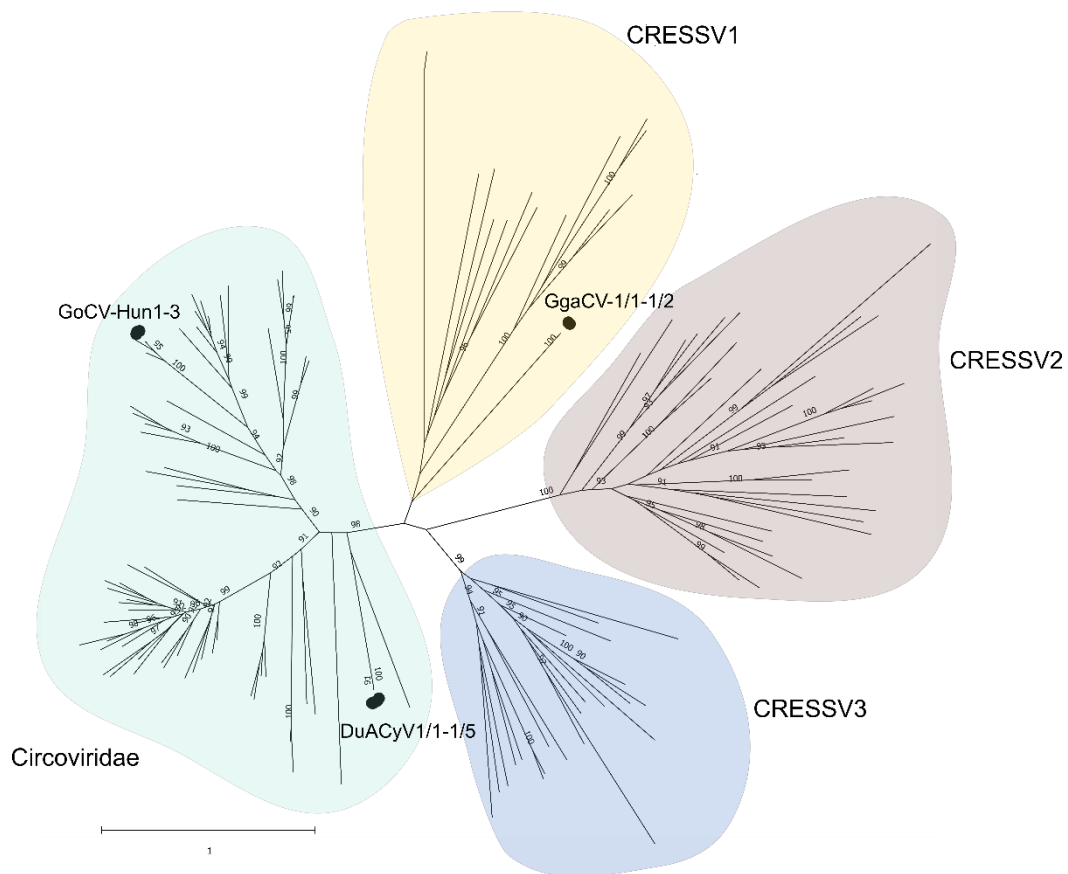
A vadmadarak, főként a vízi szárnyasok, természetes gazdafajai lehetnek alacsony- és magas patogenitású madár vírusoknak, melyek rövid időn belüli szóródását segíti a nagy földrajzi területeken átívelő vándorlásuk. A madárinfluenza vírusok gyors terjedése jól szemlélteti, hogy a költöző madarak a kontinensek közötti nagy távolságokat áthidalva képesek a vírusok továbbterjesztésére (Lycett és mtsai, 2016). A nyári lúd, tőkés réce és nagy lilik számára Magyarország kedvelt költési és pihenő hely. A vándorlási útvonaluk Észak-Európától Közép- és Kelet-Európáig, valamint a Kárpát-medencétől Dél-Európáig és Észak-Afrikáig tart. A CRESS DNS vírusok jelen lehetnek az édesvízi ökoszisztémában, a víz megfelelő közvetítő közeg lehet a vírusok továbbadására, így távoli vizes élőhelyeken is megfigyelhető lehet a vírus cirkulációja. Ez lehet a magyarázata annak a jelenségnek, hogy közel azonos GoCV szekvenciákat azonosítottak Lengyelországban és Magyarországon. További példaként szolgálhat DuACyV-1-szerű részleges rep szekvenciák azonosítása (mellyel a DuACyV-1 rep 98% azonosságot mutatott) Tunéziában gyűjtött humán székletmintában (Li és mtsai, 2010a) vagy DuACyV-1 genom szekvenciák leírása csirke bélsármintákban Brazíliában (Lima és mtsai, 2019), mely felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a CRESS DNS vírusok is világszerte elterjedtek.

A teljes genomszekvenciák elemzésének köszönhetően az alábbi megállapításokat tettük az új CRESS DNS vírustörzsek kapcsán:

- I. Az ORF-ek elrendeződése alapján az újonnan azonosított GoCV, DuACyV-1 és GgaCV-1 törzsek a Rosario és munkatársai által korábban felállított klasszifikációs

rendszerben sorrendben a CRESS DNS vírusok I., II. és V. típusába tartoznak (Rosario és mtsai, 2012). Az osztályozási rendszer kialakítása során a főbb kritériumokat a *rep* és *cp* gének elhelyezkedése, a genom polaritása, valamint a genom által kódolt gének száma jelentette (Rosario és mtsai, 2012; Rosario és mtsai, 2017).

- II. 2020-ban Krupovic és munkatársai a Rep alapján készített filogenetikai törzsfatopológiája szerint új rendszertani kategóriákat alakítottak ki (Krupovic és mtsai, 2020). Az általunk leírt törzsek adott csoportba/családba sorolásához a Krupovic és munkatársai által felhasznált szekvenciák segítségével filogenetikai törzsfát készítettünk (**3. melléklet**) (Abbas és mtsai, 2019; Kazlauskas és mtsai, 2018; Kazlauskas és mtsai, 2019; Krupovic és mtsai, 2020). Mivel az általunk leírt vírustörzsek genomjában kódolt Rep motívumok a *Circoviridae* család tagjainak genomjában leírtakhoz hasonlítottak, készítettünk egy olyan törzsfát is, melyhez a saját szekvenciáinkon felül a *Cirivirales* rendbe tartozó referencia vírusok szekvencia adatait használtuk fel a Kazlauskas és munkatársai által közölteknek megfelelően (**4. melléklet**). Megállapítottuk, hogy a GoCV és DuACyV-1 szekvenciáink a filogenetikai fán a *Circoviridae* család tagjaival csoportosulnak, míg a GgaCV-1 szekvencia a CRESSV1 csoporttal helyezkedik el közös ágon (**24. ábra**). A CRESSV1-CRESSV3 csoport ismert víruscsaládokba be nem sorolt vírusok szekvenciáit foglalja magába, melyeket leginkább gerincesek bélsármintáiban, gerinctelenekben vagy környezeti mintákban azonosítottak (**4. melléklet**). A GgaCV-1 szekvenciák a CRESSV1 csoporton belül különálló ágat képeznek, és bár ebben a csoportban nem állapítottak meg a fajok elkülönítésére szolgáló szekvencia azonossági határértékeket, a filogenetikai csoportosulása és a legközelebbi referencia szekvenciákhoz mért hasonlósága alapján valószínűleg egy önálló vírushat képviselője lehet.



24. ábra A *Circovirales* rendbe tartozó vírusok reprezentatív replikáció-asszociált fehérje szekvenciái alapján, a PhyML szoftverrel, TN93+G+I modellel (SH-like support) készült maximum-likelihood filogenetikai fa. Az általunk leírt törzseket fekete kör jelzi.

- III. Bár DNS genommal rendelkeznek, a pontmutációk felhalmozódása nagyobb genetikai diverzitást eredményezhet egyazon vírus(faj)hoz tartozó különböző kocirkuláló törzsek között. Ez a PCV mellett igaz például a GoCV-ra is, melyek törzseit eddig 17 genotípusra osztották, ám jelen tanulmányunknak köszönhetően egy további, XVIII. genotípus is leírásra került (Stenzel és mtsai, 2018a). A három új GoCV genomot ugyanarról a földrajzi területről, de különböző gazdafajból gyűjtött mintákból mutattuk ki, és bár közeli rokonságot mutattak, a felállított csoportosítás szerint külön genotípust képezhetnek. A GoCV szekvenciák elég nagy adathalmazt jelentettek evolúciós vizsgálatok végrehajtására. Az általunk kapott 10^{-4} s/s/y nagyságrendű szubsztitúciós ráta egybevág az irodalomban már ismertetett, egyéb circovírusok esetében számított értékekkel. A legfrissebb tanulmányok az ssDNS vírusok evolúciós rátáját 10^{-3} és 10^{-6} s/s/y nagyságrendben határozzák meg, ami az

RNS vírusoknál kalkulált értékekhez közelít (Domingo-Calap és mtsai, 2018). Firth és munkatársai (2009) számítása alapján a PCV2 törzsekre jellemző becsült szubsztitúciós ráta magas $\sim 1,2 \times 10^{-3}$ s/s/y volt (Firth és mtsai, 2009). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a számított evolúciós rátát több tényező befolyásolhatja, beleértve a vírus replikációs stratégiáját, vagy a felhasznált adathalmaz tulajdonságait, a mintagyűjtés geográfiai kiterjedését és időbeli intervallumát (Firth és mtsai, 2009; Firth és mtsai, 2010).

- IV. Amellett, hogy a CRESS DNS vírusok evolúciós elemzések során magas szubsztitúciós rátát mutattak, rekombinációra is erősen hajlamosak. Ezen tulajdonságok kombinációja hozzájárulhat ezeknek a vírusoknak a gyors diverzifikációjához, az új gazdafajhoz és az új környezethez való adaptálódásához (Kazlauskas és mtsai, 2018). A folyamatok nemcsak genetikai értelemben véve közel álló szekvenciák között történhetnek, hanem távolálló víruscsoportok, bakteriális vagy plazmid szekvenciák részvételével is (Kazlauskas és mtsai, 2018; Kazlauskas és mtsai, 2019). A rekombináció lehetősége felmerült GoCV és DuACyV-1 törzsek szekvenciáival kapcsolatban is. A GoCV esetében a rekombináció homológ vírusokat érintett. Ezzel szemben a rekombináns DuACyV-1 *cp* génje a predikció szerint ismeretlen szülőttől származik. A DuACyV-1 genomok két variánsának *cp* génje esetében kapott alacsony azonossági értékek (72,1–72,4% nt, 73,4–73,8% as azonosság) azt sugallják, hogy a rekombinációs esemény egyéb cyclovírus faj vagy más heterológ vírus genomi régiójának részvételével léphetett fel. Vírusfajon belüli rekombinációs eseményt már korábban leírtak másik cyclovírus faj esetében, a szitakötő cyclovírus (dragonfly cyclovirus) kapcsán (Dayaram és mtsai, 2013).

Magyarország egyes vizes élőhelyeinek környezetében élő vadmadárfajok mintáiban nagy arányban mutattuk ki CRESS DNS vírusok jelenlétét. A potenciális gazdafajokra és környezetre is kiterjedő mintavételezés elősegítheti a vizsgált vírusok szerepének feltárását az adott ökológiai rendszerben betöltött, vagy esetleges járványtani szerepének meghatározásában. Az újonnan leírt genomok szekvencia adataival tovább bővült a már ismert CRESS DNS víruscsaládok és a még be nem sorolt CRESS DNS vírus csoportok tagjainak száma. A munkacsoportunk által leírt új vírusok és vírustörzsek mind geográfiai, mind gazdafaj tekintetében széles körben elterjedtek lehetnek, ám a vírusok szerepének tisztázása még jövőbeni feladatunk.

9.2. Polyomavírusokhoz kapcsolódó vizsgálatok

Az emlős polyomavírusokra általában jellemző, hogy szűk gazdaspektrummal rendelkeznek. Ugyanezt nem tudjuk elmondani a gammapolyomavírusok tagjaira, a BFDV, GHPV, valamint a kanárikat és pintyféléket fertőző polyomavírusok esetében ugyanis több lehetséges gazdafajt is azonosítottak (Circella és mtsai, 2017; Johne és Müller, 2007; Pingret és mtsai, 2008). Stys-Fijol és munkcsoportja (2016) egy Lengyelországban végzett tanulmány keretein belül vadmadarakban is megállapította a GHPV jelenlétét. Néhány esetben a GHPV fertőzésre jellemző tüneteket is tapasztaltak, mint például a vese és máj megnagyobbodását, vérbőséget, máj- és bélvérzést (Stys-Fijol és mtsai, 2016). Ezzel párhuzamosan munkacsoportunk a CRESS DNS vírusok szűrésére felhasznált kloáka tampon mintákból próbálta azonosítani a GHPV genom jelenlétét, ám egy esetben sem igazoltuk azt. Mivel a polyomavírusok kórokozóként jelentős károkat okozhatnak madárállományokban, érdemes lenne elterjedésüket mérni nagy mintaszám és elhullott egyedek esetében szervminták felhasználásával.

Munkánk kezdetén a génbank adatbázisában mindössze kilenc teljes GHPV genom szekvencia állt rendelkezésre, melyek Magyarországról (munkacsoportunk korábbi közlése), Franciaországból, Németországból és Kínából származtak. Tanulmányunknak köszönhetően további 22 új GHPV törzs teljes genomjának nukleotid sorrendjével bővíthettük az adatbázist. A genomok szerkezete és a kódolt gének hossza megegyezett a szakirodalmi adatokkal, eltéréseket a nemkódoló régió hosszának különbségei adtak. Az így vizsgált, összesen 31 teljes genom nukleotid szintű azonossági értéke rendkívül magas volt. Ez az eredmény az állományokban cirkuláló vírustörzsek szoros genetikai rokonságára utalhat, valamint a duplaszálú DNS örökítőanyag stabilitására vezethető vissza.

Palya és munkatársai 2000 és 2002 között 41 hazai lúdállományban azonosítottak olyan eseteket, ahol felmerült a GHPV fertőzés gyanúja. A fertőzött libák száma az érintett állományokban 1000 és 4000 között változott. A klinikai tünetek megjelenését, az esetleges elhullásokat az adott tartási helyen rögzítették. Megállapították, hogy a járvány kitörése a 3–6 hetes lúdállományokat érintette leginkább, valamint néhány esetet jegyeztek négy napos, valamint 17–20 hetes állatok esetében. A mortalitás aránya széles skálán mozgott, 4–67% között változott. Egyes esetekben a libák normális fejlődésnek indultak, majd bármilyen klinikai tünet kialakulása nélkül hirtelen elpusztultak. Más esetben megjelentek a fertőzésre jellemző klinikai tünetek, mint például ataxia, fej és nyak remegése, bőr alatti vérzések, véres bélsárürítés. A tanulmány keretein belül meghatározták öt törzs VP1 génjének teljes nukleotid sorrendjét, melyek az általunk vizsgált törzsek ugyanezen szekvenciáitól kis mértékben eltértek (AY327109-AY327113) (Palya és mtsai, 2004, 2005). A NÉBIH ÁDI által nyújtott adatok alapján rálátásunk nyílt a 2005-2020 között regisztrált GHPV fertőzések esetszámára.

Sajnos nem állt rendelkezésünkre információ arról, hogy adott helység környékén hány telep van, adott telepről pontosan hány minta érkezett, milyen létszámú az adott telep lúdállománya, és milyen klinikai tüneteket mutatott az állomány. Az igazolt GHPV fertőzések száma hullámzó tendenciát mutatott, néhány évenkénti csúcsosodással. Ez, és adott területen a nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciák több évben jellemző regisztrálása arra utalhat, hogy a vírus az adott térségben folyamatosan jelen van és fertőzi a naiv egyedeket. Mivel a fertőződés horizontálisan (feko-orális út, ragályfogó tárgyak), valamint feltételezhetően vertikálisan is bekövetkezhet, nagyon fontos a megfelelő tartástechnológiai körülmények beállítása és az állatok szállítása során az állományok érintettségének felmérése. Figyelmet kell fordítani az épületek, kifutók megfelelő fertőtlenítésére, valamint az állatok jólétét befolyásoló tényezők körültekintő kiválasztására (almozás, hőmérséklet igény, víz- és táplálék szükséglet). A GHPV ludak és kacsák szöveteiben/szerveiben perzisztálhat vagy látens fertőzést okozhat, így belső (például hormonhatás) és külső stresszhatások (például zsúfoltság, szállítás) a betegség fellángolását okozhatják. Ez magyarázhatja a mért esetszámok hullámzó tendenciáját is. Mulard kacsák GHPV fertőzése esetén is feltűnt a libáknál leírt kórkép, ám mivel társfertőzők is jelen voltak, a megjelenő tünetek és azok kóroktanának feltárásához további vizsgálatok szükségesek. A hazai telepeken végzett követéses vizsgálatok, a cirkuláló törzsek genomszekvenciájának meghatározása, elemzése segíthet a GHPV által okozott fertőzés folyamatának megértésében és elősegítheti a vírus elleni hatékony védekezés kialakítását.

A polyomavírusokat gazdafaj specifikus, konzervatív genomszekvenciájuknak köszönhetően lassan evolválódó vírusokként jellemzik (Torres és mtsai, 2018). A szekvencia adatok számának növekedése, az elemző szoftverek egyre bővülő tárháza és a virális evolúció gazdafajtól független vizsgálata a kisméretű dsDNS vírusok becsült evolúciós rátájának emelkedéséhez vezetett (Domingo-Calap és mtsai, 2018; Firth és mtsai, 2010). A legfrissebb tanulmányok a dsDNS vírusok – beleértve a polyomavírusok – evolúciós rátáját 10^{-8} és 10^{-3} s/s/y nagyságrendben határozták meg (Aiewsakun és Katzourakis, 2016; Torres és mtsai, 2018). Számításaink szerint a GHPV teljes genomszekvenciákra vonatkoztatott evolúciós rátája 10^{-5} s/s/y nagyságrendű, míg BFDV, FPyV és CaPyV esetén ugyanez 10^{-4} s/s/y nagyságrendet mutatott. Az utóbbi években mindezen vírusok esetében bővült a bizonyított vagy potenciális gazdafajok listája. A mutációk felhalmozódása a virális genomban javíthatja a vírus fitnessét és segítheti az új gazdafajokhoz történő adaptálódást. Így, ha a számításainkat olyan adatsoron hajtjuk végre, mely a különböző gazdafajokat széles skálán reprezentálja viszonylag szűk időintervallumon belül, akkor a becsült szubsztitúciós ráta emelkedését figyelhetjük meg (Aiewsakun és Katzourakis, 2016; Firth és mtsai, 2010). Bár génenként is vizsgáltuk a szubsztitúciós rátát, egyes adathalmazoknál a 95%-os HPD értéktartomány igen széles volt, ami az adatok bizonytalanságára utalt. A rövid szekvenciák, a rövid időintervallumból származó és homogén szekvenciahalmazok tehát kevésbé

alkalmasak pontos evolúciós vizsgálatok kivitelezésére. A vizsgálandó vírustörzsek gyűjtésének tér- és időbeli eltérése és a vírusok szubpopulációinak mintázásbeli különbségei befolyásolhatják az evolúciós és szelekciós kényszerre vonatkozó számítások kimenetelét (Aiewsakun és Katzourakis, 2016). Ahogy korábban is említettük, házi víziszárnyasokon felül vadmadarakban is kimutatták a VP1 jelenlétét (Stys-Fijol és mtsai, 2016). Mindez arra utal, hogy ezek a polyomavírusok nem olyan szigorúan fajspecifikusak, ahogy eddig gondoltuk. Amennyiben evolúciós vizsgálatainkba részleges szekvenciákat is bevontunk és adathalmazunk vadmadár eredetű VP1 szekvenciákkal is bővült, a szubsztitúciós ráta emelkedett (10^{-4} s/s/y), ami a felhalmozott nt változásoknak köszönhető. A vadmadár eredetű törzsek VP1 szekvenciáinak bevonásával végrehajtott filogenetikai vizsgálat rávilágított, hogy a kacsza és egyéb vadmadár eredetű mintákból azonosított szekvenciák nem különültek el a lúd eredetűektől. Lehetséges, hogy fajspecifikus variánsok nem alakultak ki, bár ennek megállapításához további, teljes genomszekvenciák elemzése szükséges. Elképzelhető, hogy a különböző kacsza fajokhoz (házikacsza, pézsmaréce és hibridjeik) hasonlóan a GHPV tünetmentesen szaporodhat az újonnan felismert gazdafajokban. A további lehetséges rezervoár fajok azonosítása segítséget nyújthat a vírus terjedésének megakadályozásában. Az analízisek eredményei alapján megfigyelhető, hogy a különböző országokból származó törzsek szekvenciái elszórtan bukkannak fel más országból (vagy esetünkben más városból) gyűjtött minták GHPV szekvenciái között. Továbbá egyazon területről származó, de különböző dátummal gyűjtött minták GHPV szekvenciái egy ágon csoportosulnak. Mindez utalhat különböző vírustörzsek kocirkulációjára, egyes törzsek időközönkénti újbóli felbukkanására, új genomvariánsok megjelenésére, vagy adott törzs esetében mutációk felhalmozódására is. Mindebben szerepet játszhat a GHPV vertikális és horizontális átviteli módja, a tünetmentes rezervoárok, a perzisztens fertőzés fennállása, a környezet szennyezettsége és az állatok kereskedelme, amely tényezők együttesen elősegíthetik, valamint fenntarthatják a GHPV terjedését.

Egy örvös sándorpapagáj eredetű minta esetében meghatároztuk az azt fertőző BFDV törzs teljes genomszekvenciáját. Szekvencia és filogenetikai analízis során megállapítottuk, hogy az új törzs nagyfokú hasonlóságot mutatott a génbankban elérhető további szekvenciákkal. A törzsfákon is jól látható, hogy a nagy hasonlóságot mutató BFDV törzsek nem mind a papagájfélék (Psittacidae) családjába tartozó madaraktól származnak, hanem genomjuk nagyfokú hasonlóságot mutat egyéb papagájalakúak (például Cacatuidae család), illetve sólyomfélék (Falconidae) és galambfélék (Columbidae) családjába tartozó fajok törzseivel is. Irodalmi adatok beszámoltak a BFDV törzsek baromfikban való előfordulásáról is (Katoh és mtsai, 2009; Riaz és mtsai, 2019). Mivel a nemzetközi díszmadárkereskedelem virágkorát éli és gyakoriak az ellenőrizetlen tenyészetek, így a madarak szállításának és tartásának körülményei, valamint a kereskedelem ellenőrzése nagy odafigyelést igényelnek.

Fennáll a veszély, hogy a vírus átterjedhet különféle gazdafajok fogékony példányaira. A GHPV esetében leírt tényezők – úgymint a horizontális terjedés, a perzisztens fertőzés és környezetben fennmaradó fertőzőképes virionok – meghatározóak a BFDV járványos elterjedésben is (Phalen és mtsai, 1997).

A madár polyomavírusok génjeire általánosságban negatív szelekció hat és csak néhány as pozíció esetében azonosítottunk pozitív szelekciós nyomást. A GHPV-vel összevetve a BFDV esetében a génenként számított evolúciós ráta magasabb értékeket mutatott, és a kapszid fehérjéket kódoló ORF-ek egyes as pozíciójára méréseink alapján pozitív szelekció hat. Az itt fellépő mutációknak köszönhetően lehetséges, hogy a vírus sikeresebben fertőzi a gazda sejtjeit, vagy hatékonyabban kerül ki az immunválaszt, azaz kihatással lehet a virulenciára. Bár a többi gammapolyomavírus genomjában is előfordultak nem szinonim szubsztitúciók, statisztikailag releváns, pozitív szelekciós nyomás alatt álló pozíciókat sem a GHPV, sem a FPyV kapszid fehérjéi esetén nem találtunk. Az adott pozícióra vonatkoztatott nt és/vagy as változások sokszor csak egyedi szekvenciákon belül találhatóak meg, amely háttérben könnyen lehet, hogy más folyamatok állnak, nem pedig szelekciós nyomás hatása érvényesül. Megjegyzendő, hogy az elérhető szekvenciák száma korlátozott, mely a kapott eredmények kiértékelését és megbízhatóságát torzíthatja. A pozitív és negatív szelekciós nyomás alatt álló pozíciók génenkénti eloszlása és mennyisége eltért a különböző madár polyomavírus fajok esetében. Az ismert genomszekvenciák alapján elmondhatjuk, hogy a GHPV a BFDV és FPyV fajokhoz képest konzervatív genommal rendelkezik. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy további gazdafajokból származó GHPV szekvencia adatok módosíthatják a számított értékeket, ahogy az a VP1 elemzésekor is látható volt.

A legmagasabb dN/dS arányt a BFDV VP4/VP4d, valamint a GHPV ORF-X régiók esetén tapasztaltuk. A VP4 fehérje strukturális elem, mely részt vesz a virális genom összeszerelésében. A nem strukturális VP4d fehérje (mely a VP4 splicing variánsa) apoptózist indukál a fertőzött sejtben, ezáltal részt vesz a virális patogenezisben (Johne és Müller, 2001; Johné és mtsai, 2007). A GHPV kapcsán az ORF-X funkciója ismeretlen, de úgy gondolják, hogy BFDV VP4/VP4d fehérjéihez hasonló funkcióval rendelkezik (Johne és Müller, 2007). Bár a nem szinonim/szinonim mutációk aránya ebben a régióban a legmagasabb, ennek jelentősége ismeretlen. A szelekciós analízis egyetlen helyet sem emelt ki, ahol pozitív szelekciós nyomás nagy valószínűséggel érvényesülne.

A GHPV-hez és BFDV-hez hasonlóan a FPyV és CaPyV esetében szintén jellemző a széles gazdaspektrum, amely dísz- és vadmadarakat is magában foglal. Ez is megerősíti, hogy nagyfokú hasonlóságot mutató gammapolyomavírus törzsek közeli rokonságban nem álló gazdafajokban is sikeresen szaporodhatnak. A pintyfélék esetében ráadásul egy gazdafajt több gammapolyomavírus is megfertőzhet: a tengelic (*Carduelis carduelis*) vagy Gould-

amandina fajok egyedeiben két különböző polyomavírus is megbetegedést okozhat (Alley és mtsai, 2013; Circella és mtsai, 2017; Manarolla és mtsai, 2007).

Az elmúlt évek során mind a CRESS DNS vírusok, mind a gammapolyomavírusok esetében egyaránt bővült az igazolt, valamint a potenciális gazdafajok száma. A széles gazdaspektrum járványügyi és gazdasági jelentősége és az esetleges koinfekciók esetében a vírusok lehetséges kölcsönhatásainak megállapítása még feltárásra vár. A jövőbeni kutatások során mindenképpen érdemes monitorozni a különböző vad-, díszmadár és háziszárnyas fajokban felbukkanó kisméretű, cirkuláris genommal rendelkező DNS vírusokat.

10. Új tudományos eredmények

1. A munkacsoportunk által korábban leírt DuACyV-1 cyclovírus fajt további potenciális gazdafajokban is azonosítottuk és meghatároztuk a törzsek teljes genomszekvenciáját.
2. A munkacsoportunk által korábban leírt, taxonómiai értelemben be nem sorolt CRESS DNS vírust (GgaCV-1) is kimutattuk további gazdafajban, meghatároztuk a törzs a teljes genomszekvenciáját és a GgaCV-1 filogenetikai helyzetét.
3. Vadmadár eredetű mintákból meghatároztuk és jellemeztük új GoCV törzsek teljes genomszekvenciáját. Megállapítottuk, hogy a teljes genomot érintő filogenetikai osztályozás alapján az egyik általunk leírt új törzs egy új genotípusba sorolható. Az elérhető szekvenciák felhasználásával evolúciós elemzéseket végeztünk, megállapítottuk a GoCV-ra jellemző evolúciós rátát.
4. 22 új törzs genetikai állományának feltérképezésével jelentősen bővítettük a génbanki adatbázisban elérhető GHPV genomok számát.
5. Meghatároztuk és elemeztük egy új BFDV törzs teljes genomszekvenciáját és filogenetikai helyzetét.
6. Az elérhető gammapolyomavírus szekvenciák felhasználásával evolúciós elemzéseket végeztünk, meghatározva az adott vírusra jellemző evolúciós rátát.

11. Irodalomjegyzék

- Abbas, A.A., Taylor, L.J., Dothard, M.I., Leiby, J.S., Fitzgerald, A.S., Khatib, L.A., Collman, R.G., Bushman, F.D., 2019. **Redondoviridae, a family of small, circular DNA viruses of the human oro-respiratory tract associated with periodontitis and critical illness.** Cell Host Microbe 25, 719-729 e714.
- Aiewsakun, P., Katzourakis, A., 2016. **Time-dependent rate phenomenon in viruses.** J Virol 90, 7184-7195.
- Alley, M.R., Rasiyah, I., Lee, E.A., Howe, L., Gartrell, B.D., 2013. **Avian polyomavirus identified in a nestling Gouldian finch (*Erythrura gouldiae*) in New Zealand.** N Z Vet J 61, 359-361.
- Altan, E., Kubiski, S.V., Burchell, J., Bicknese, E., Deng, X., Delwart, E., 2019. **The first reptilian circovirus identified infects gut and liver tissues of black-headed pythons.** Vet Res 50, 35.
- Baez, C.F., Brandao Varella, R., Villani, S., Delbue, S., 2017. **Human polyomaviruses: the battle of large and small tumor antigens.** Virology 8, 1178122X17744785.
- Bali, K., 2017. **Madár polyomavírusok vizsgálata házi szárnyasokban, vad- és díszmadarakban.** Szakdolgozat.
- Banda, A., Galloway-Haskins, R.I., Sandhu, T.S., Schat, K.A., 2007. **Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial Pekin ducks in New York.** Avian Dis 51, 90-95.
- Bennett, M.D., Gillett, A., 2014. **Butcherbird polyomavirus isolated from a grey butcherbird (*Cracticus torquatus*) in Queensland, Australia.** Vet Microbiol 168, 302-311.
- Bernáth, S., Szalai, F., 1970. **Investigations for clearing the etiology of the disease appeared among goslings in 1969.** Magyar Állatorvosok Lapja, 531-536.
- Bernáth, S., Horváth, E., Kovacs, A., Nagy, E., Dobos-Kovács, M., Szalai, F., Farsang, A., 2001. **A libák vérömléses vese- és bélgyulladásának kóroktana és a betegség járványtani jelentősége.** Magyar Állatorvosok Lapja 123, 522-525.
- Bernáth, S., Farsang, A., Kovács, A., Nagy, E., Dobos-Kovács, M., 2006. **Pathology of goose haemorrhagic polyomavirus infection in goose embryos.** Avian Pathol 35, 49-52.
- Bernier, G., Morin, M., Marsolais, G., 1981. **A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent.** Avian Dis 25, 1083-1092.
- Bert, E., Tomassone, L., Peccati, C., Navarrete, M.G., Sola, S.C., 2005. **Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy.** J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52, 64-68.
- Bonne, N., Shearer, P., Sharp, M., Clark, P., Raidal, S., 2009. **Assessment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease.** J Gen Virol 90, 640-647.
- Bozeman, L.H., Davis, R.B., Gaudry, D., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Dykstra, M.J., 1981. **Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars.** Avian Dis 25, 972-980.
- Buck, C.B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E.M., Tisza, M.J., An, P., Katz, J.P., Pipas, J.M., McBride, A.A., Camus, A.C., McDermott, A.J., Dill, J.A., Delwart, E., Ng, T.F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D.V., Varsani, A., 2016. **The ancient evolutionary history of polyomaviruses.** PLoS Pathog 12, e1005574.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B., 2016. **A taxonomy update for the family Polyomaviridae.** Arch Virol 161, 1739-1750.

- Chen, J.K., Hsiao, C., Wu, J.S., Lin, S.Y., Wang, C.Y., 2019. **Characterization of the endonuclease activity of the replication-associated protein of beak and feather disease virus.** Arch Virol 164, 2091-2106.
- Chen, T., Tanner, L., Simell, V., Hedman, L., Makinen, M., Sadeghi, M., Veijola, R., Hyoty, H., Ilonen, J., Knip, M., Toppari, J., Simell, O., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., 2014. **Diagnostic methods for and clinical pictures of polyomavirus primary infections in children, Finland.** Emerg Infect Dis 20, 689-692.
- Cheng, H., Yang, L., Cai, Z., Qiao, X., Du, L., Hou, J., Chen, J., Zheng, Q., 2020. **Development of haemagglutination assay for titration of porcine circovirus type 2.** Anal Biochem 598, 113706.
- Cheung, A.K., 2012. **Porcine circovirus: transcription and DNA replication.** Virus Res 164, 46-53.
- Chromy, L.R., Pipas, J.M., Garcea, R.L., 2003. **Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids.** Proc Natl Acad Sci U S A 100, 10477-10482.
- Circella, E., Caroli, A., Marino, M., Legretto, M., Pugliese, N., Bozzo, G., Cocciolo, G., Dibari, D., Camarda, A., 2017. **Polyomavirus infection in gouldian finches (*Erythrura gouldiae*) and other pet Birds of the family Estrildidae.** J Comp Pathol 156, 436-439.
- Corrand, L., Gelfi, J., Albaric, O., Etievant, M., Pingret, J.L., Guerin, J.L., 2011. **Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks.** Avian Pathol 40, 355-360.
- Csárgola, A., Lőrincz, M., Tombacz, K., Wladar, Z., Kovács, E., Tuboly, T., 2012. **Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary.** Virus Genes 44, 75-79.
- Dang-Tan, T., Mahmud, S.M., Puntoni, R., Franco, E.L., 2004. **Polio vaccines, Simian Virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association.** Oncogene 23, 6535-6540.
- Dayaram, A., Potter, K.A., Moline, A.B., Rosenstein, D.D., Marinov, M., Thomas, J.E., Breitbart, M., Rosario, K., Arguello-Astorga, G.R., Varsani, A., 2013. **High global diversity of cycloviruses amongst dragonflies.** J Gen Virol 94, 1827-1840.
- Dayaram, A., Goldstien, S., Arguello-Astorga, G.R., Zavar-Reza, P., Gomez, C., Harding, J.S., Varsani, A., 2015a. **Diverse small circular DNA viruses circulating amongst estuarine molluscs.** Infect Genet Evol 31, 284-295.
- Dayaram, A., Potter, K.A., Pailles, R., Marinov, M., Rosenstein, D.D., Varsani, A., 2015b. **Identification of diverse circular single-stranded DNA viruses in adult dragonflies and damselflies (Insecta: Odonata) of Arizona and Oklahoma, USA.** Infect Genet Evol 30, 278-287.
- Dayaram, A., Galatowitsch, M.L., Arguello-Astorga, G.R., van Bysterveldt, K., Kraberger, S., Stainton, D., Harding, J.S., Roumagnac, P., Martin, D.P., Lefeuvre, P., Varsani, A., 2016. **Diverse circular replication-associated protein encoding viruses circulating in invertebrates within a lake ecosystem.** Infect Genet Evol 39, 304-316.
- De Gascun, C.F., Carr, M.J., 2013. **Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches.** Clin Dev Immunol 2013, 373579.
- Delwart, E., Li, L., 2012. **Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes.** Virus Res 164, 114-121.
- Dennis, T.P.W., de Souza, W.M., Marsile-Medun, S., Singer, J.B., Wilson, S.J., Gifford, R.J., 2019. **The evolution, distribution and diversity of endogenous circoviral elements in vertebrate genomes.** Virus Res 262, 15-23.
- Dobos-Kovács, M., Horváth, E., Farsang, A., Nagy, E., Kovács, A., Szalai, F., Bernath, S., 2005. **Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese: pathomorphological investigations and proposed pathogenesis.** Acta Vet Hung 53, 213-223.
- Domingo-Calap, P., Schubert, B., Joly, M., Solis, M., Untrau, M., Carapito, R., Georgel, P., Caillard, S., Fafi-Kremer, S., Paul, N., Kohlbacher, O., Gonzalez-Candelas, F., Bahram, S., 2018. **An unusually high substitution rate in transplant-associated**

- BK polyomavirus in vivo is further concentrated in HLA-C-bound viral peptides.** PLoS Pathog 14, e1007368.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** BMC Evol Biol 7, 214.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Smyth, J.A., Bustin, J.C., Vindevogel, H., 2006. **Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons.** Avian Pathol 35, 30-34.
- Fehér, E., Lengyel, G., Dán, Á., Farkas, S.L., Bányai, K., 2014. **Whole genome sequence of a goose haemorrhagic polyomavirus detected in Hungary.** Acta Microbiol Immunol Hung 61, 221-227.
- Fehér, E., Kaszab, E., Forró, B., Bali, K., Marton, S., Lengyel, G., Bányai, K., 2017. **Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1.** Arch Virol 162, 3925-3929.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. **Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2.** J Virol 83, 12813-12821.
- Firth, C., Kitchen, A., Shapiro, B., Suchard, M.A., Holmes, E.C., Rambaut, A., 2010. **Using time-structured data to estimate evolutionary rates of double-stranded DNA viruses.** Mol Biol Evol 27, 2038-2051.
- Garmyn, A., Verlinden, M., Bosseler, L., Adriaensen, C., Martel, A., 2017. **Persistent goose hemorrhagic polyomavirus infection on a Belgian goose farm.** Avian Dis 61, 536-538.
- Gawel, A., Wozniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., Kozdrun, W., Bobrek, K., Bobusia, K., Nowak, M., 2014. **Hemorrhagic nephritis and enteritis in a goose flock in Poland--disease course analysis and characterization of etiologic agent.** Avian Dis 58, 518-522.
- Ge, X., Li, J., Peng, C., Wu, L., Yang, X., Wu, Y., Zhang, Y., Shi, Z., 2011. **Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China.** J Gen Virol 92, 2646-2653.
- Gelfi, J., Pappalardo, M., Claverys, C., Peralta, B., Guerin, J.L., 2010. **Safety and efficacy of an inactivated carbopol-adjuvanted goose haemorrhagic polyomavirus vaccine for domestic geese.** Avian Pathol 39, 111-116.
- Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J.D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B., Giuliano, A.R., Franceschi, S., McKay, J., Rollison, D.E., Tommasino, M., 2017. **Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus.** Virology 506, 45-54.
- Glávits, R., Ivanics, E., Palya, V., Zolnai, A., Nagy, E., Zarka, P., Mató, T., Ursu, K., 2005. **Növendék ludak parvo-, circo-, reo- és polyomavírus megbetegedéseivel kapcsolatos újabb diagnosztikai és kísérleti megfigyelések.** Magyar Állatorvosok Lapja 127, 21-28.
- Guerin, J.L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C., Pingret, J.L., 2000. **A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese.** J Virol 74, 4523-4529.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** Syst Biol 59, 307-321.
- Hakimuddin, F., Abidi, F., Jafer, O., Li, C., Wernery, U., Hebel, C., Khazanehdari, K., 2016. **Incidence and detection of beak and feather disease virus in psittacine birds in the UAE.** Biomol Detect Quantif 6, 27-32.
- Halami, M.Y., Nieper, H., Müller, H., Johne, R., 2008. **Detection of a novel circovirus in mute swans (Cygnus olor) by using nested broad-spectrum PCR.** Virus Res 132, 208-212.
- Halami, M.Y., Dorrestein, G.M., Couteel, P., Heckel, G., Müller, H., Johne, R., 2010. **Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds.** J Gen Virol 91, 3016-3022.

- Hall, T.A., 1999. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucleic Acids Symposium Series, 95-98.
- Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., Mankertz, A., 2003. **Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV)**. Arch Virol 148, 2471-2480.
- He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., Guo, H., Li, Y., Wang, Y., Su, N., Zhang, F., Fan, Q., Tu, C., 2013. **Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel Mammalian viruses**. PLoS One 8, e61950.
- Heenemann, K., Sieg, M., Rueckner, A., Vahlenkamp, T.W., 2015. **Complete genome sequence of a novel avian polyomavirus isolated from gouldian finch**. Genome Announc 3.
- Hossain, D., Hull, D., Kalantarpour, F., Maitlen, R., Qian, J., Bostwick, D.G., 2014. **Does polyomavirus infection interfere with bladder cancer fluorescence in situ hybridization?** Diagn Cytopathol 42, 225-229.
- Ivanics, E., Glávits, R., Palya, V., Nagy, E., Zarka, P., Dán, Á., Mató, T., 2003. **Növendék ludak vírusos betegségeinek diagnosztikai tapasztalatai és elkülönítő kórjelzése**. Magyar Állatorvosok Lapja 125, 577-640.
- Johne, R., Müller, H., 2001. **Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4**. J Gen Virol 82, 909-918.
- Johne, R., Müller, H., 2003. **The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus**. Virology 308, 291-302.
- Johne, R., Enderlein, D., Nieper, H., Müller, H., 2005. **Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR**. J Virol 79, 3883-3887.
- Johne, R., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Müller, H., 2006a. **Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification**. J Gen Virol 87, 1189-1195.
- Johne, R., Wittig, W., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Müller, H., 2006b. **Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes**. J Virol 80, 3523-3531.
- Johne, R., Müller, H., 2007. **Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family**. J Virol 81, 11554-11559.
- Johne, R., Paul, G., Enderlein, D., Stahl, T., Grund, C., Müller, H., 2007. **Avian polyomavirus mutants with deletions in the VP4-encoding region show deficiencies in capsid assembly and virus release, and have reduced infectivity in chicken**. J Gen Virol 88, 823-830.
- Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood, W.J., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Major, E.O., Ramqvist, T., Norkin, L.C., 2011. **Taxonomical developments in the family Polyomaviridae**. Arch Virol 156, 1627-1634.
- Kapoor, A., Dubovi, E.J., Henriquez-Rivera, J.A., Lipkin, W.I., 2012. **Complete genome sequence of the first canine circovirus**. J Virol 86, 7018.
- Kaszab, E., Marton, S., Forró, B., Bali, K., Lengyel, G., Bányai, K., Fehér, E., 2018. **Characterization of the genomic sequence of a novel CRESS DNA virus identified in Eurasian jay (Garrulus glandarius)**. Arch Virol 163, 285-289.
- Katoh, H., Ohya, K., Une, Y., Yamaguchi, T., Fukushi, H., 2009. **Molecular characterization of avian polyomavirus isolated from psittacine birds based on the whole genome sequence analysis**. Vet Microbiol 138, 69-77.
- Kazlauskas, D., Varsani, A., Krupovic, M., 2018. **Pervasive chimerism in the replication-associated proteins of uncultured single-stranded DNA viruses**. Viruses 10.
- Kazlauskas, D., Varsani, A., Koonin, E.V., Krupovic, M., 2019. **Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids**. Nat Commun 10, 3425.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. **Geneious Basic: an integrated and extendable desktop**

- software platform for the organization and analysis of sequence data.** *Bioinformatics* 28, 1647-1649.
- Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M., Raidal, S., 2005. **A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from loriiids.** *J Gen Virol* 86, 3039-3046.
- Kozdrun, W., Wozniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., Czekaj, H., 2012. **Viral infections in goose flocks in Poland.** *Pol J Vet Sci* 15, 525-530.
- Krautwald, M.E., Müller, H., Kaleta, E.F., 1989. **Polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): clinical and aetiological studies.** *Zentralbl Veterinarmed B* 36, 459-467.
- Krupovic, M., Varsani, A., Kazlauskas, D., Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Yutin, N., Wolf, Y.I., Harrach, B., Zerbini, F.M., Dolja, V.V., Kuhn, J.H., Koonin, E.V., 2020. **Cressnaviricota: a virus phylum unifying seven families of Rep-encoding viruses with single-stranded, circular DNA genomes.** *J Virol* 94.
- Lacroux, C., Andreoletti, O., Payre, B., Pingret, J.L., Dissais, A., Guerin, J.L., 2004. **Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus.** *Avian Pathol* 33, 351-358.
- Larsson, A., 2014. **AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets.** *Bioinformatics* 30, 3276-3278.
- Latimer, K.S., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., Ritchie, B.W., Pesti, D.A., Steffens, W.L., 1993. **Diagnosis of concurrent avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes.** *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 7, 141-146.
- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Müller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010a. **Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces.** *J Virol* 84, 1674-1682.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E., 2010b. **Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses.** *J Virol* 84, 6955-6965.
- Li, L., Shan, T., Soji, O.B., Alam, M.M., Kunz, T.H., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2011. **Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals.** *J Gen Virol* 92, 768-772.
- Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C.M., Marks, S.L., Kubiski, S., Gaffney, P., Dela Cruz, F.N., Jr., Wang, C., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2013. **Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage.** *Emerg Infect Dis* 19, 534-541.
- Li, L., Giannitti, F., Low, J., Keyes, C., Ullmann, L.S., Deng, X., Aleman, M., Pesavento, P.A., Pusterla, N., Delwart, E., 2015. **Exploring the virome of diseased horses.** *J Gen Virol* 96, 2721-2733.
- Lian, H., Liu, Y., Li, N., Wang, Y., Zhang, S., Hu, R., 2014. **Novel circovirus from mink, China.** *Emerg Infect Dis* 20, 1548-1550.
- Lima, D.A., Cibulski, S.P., Tochetto, C., Varela, A.P.M., Finkler, F., Teixeira, T.F., Loiko, M.R., Cerva, C., Junqueira, D.M., Mayer, F.Q., Roehe, P.M., 2019. **The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics.** *Virus Res* 261, 9-20.
- Lima, F.E., Cibulski, S.P., Dos Santos, H.F., Teixeira, T.F., Varela, A.P., Roehe, P.M., Delwart, E., Franco, A.C., 2015. **Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil.** *PLoS One* 10, e0118070.
- Liu, H., Li, L.X., Sun, W.C., Shi, N., Sun, X.T., Jin, N.Y., Si, X.K., 2020. **Molecular survey of duck circovirus infection in poultry in southern and southwestern China during 2018 and 2019.** *BMC Vet Res* 16, 80.

- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. **Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination.** J Virol 73, 152-160.
- Lőrincz, M., Cságola, A., Farkas, S.L., Székely, C., Tuboly, T., 2011. **First detection and analysis of a fish circovirus.** J Gen Virol 92, 1817-1821.
- Lőrincz, M., Dán, Á., Lang, M., Csaba, G., Tóth, A.G., Székely, C., Cságola, A., Tuboly, T., 2012. **Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*).** Arch Virol 157, 1173-1176.
- Lycett, S.J., Bodewes, R., Pohlmann, A., Banks, J., Bányai, K., Boni, M.F., Bouwstra, R., Breed, A.C., Brown, I.H., Chen, H., Dan, A., DeLiberto, T.J., Diep, N., Gilbert, M., Hill, S., Ip, H.S., Ke, C.H., Kida, H., Killian, M.L., Koopmans, M.P., Kwon, J.-H., Lee, D.-H., Lee, Y.L., Lu, L., Monne, I., Pasick, J., Pybus, O.G., Rambaut, A., Robinson, T.P., Sakoda, Y., Zohari, S., Song, C.-S., Swayne, D.E., Torchetti, M.K., Tsai, H.-J., Fouchier, R.A., Beer, M., Woolhouse, M., Kuiken, T., 2016. **Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8.** Science 354, 213-217.
- Manarolla, G., Liandris, E., Pisoni, G., Moroni, P., Piccinini, R., Rampin, T., 2007. **Mycobacterium genavense and avian polyomavirus co-infection in a European goldfinch (*Carduelis carduelis*).** Avian Pathol 36, 423-426.
- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D., 2000. **Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons.** Arch Virol 145, 2469-2479.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. **RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes.** Virus Evol 1, vev003.
- Marton, S., Ihász, K., Lengyel, G., Farkas, S.L., Dán, Á., Paulus, P., Bányai, K., Fehér, E., 2015. **Ubiquiter circovirus sequences raise challenges in laboratory diagnosis: the case of honey bee and bee mite, reptiles, and free living amoebae.** Acta Microbiol Immunol Hung 62, 57-73.
- Marton, S., Erdélyi, K., Dán, Á., Bányai, K., Fehér, E., 2016. **Complete genome sequence of a variant Pyrrhula pyrrhula polyomavirus 1 strain isolated from white-headed munia (*Lonchura maja*).** Genome Announc 4.
- Mató, T., Péntzes, Z., Rueda, P., Vela, C., Kardi, V., Zolnai, A., Misak, F., Palya, V., 2009. **Recombinant subunit vaccine elicits protection against goose haemorrhagic nephritis and enteritis.** Avian Pathol 38, 233-237.
- Mayberry, C.L., Bond, A.C., Wilczek, M.P., Mehmood, K., Maginnis, M.S., 2021. **Sending mixed signals: polyomavirus entry and trafficking.** Curr Opin Virol 47, 95-105.
- Mészáros, I., Tóth, R., Bálint, Á., Dán, Á., Jordan, I., Zádori, Z., 2014. **Propagation of viruses infecting waterfowl on continuous cell lines of Muscovy duck (*Cairina moschata*) origin.** Avian Pathol 43, 379-386.
- Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D.F., Wright, F., 2009. **TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops.** Bioinformatics 25, 126-127.
- Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H.J., 2006. **Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells.** J Virol 80, 3487-3494.
- Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., 2017. **Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update.** Infect Genet Evol 54, 18-38.
- Mora-Diaz, J., Pineyro, P., Shen, H., Schwartz, K., Vannucci, F., Li, G., Arruda, B., Gimenez-Lirola, L., 2020. **Isolation of PCV3 from perinatal and reproductive cases of PCV3-associated disease and in vivo characterization of PCV3 replication in CD/CD growing pigs.** Viruses 12.

- Müller, H., Nitschke, R., 1986. **A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*)**. *Med Microbiol Immunol* 175, 1-13.
- Nauwynck, H.J., Sanchez, R., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Saha, D., Huang, L., Misinzo, G., 2012. **Cell tropism and entry of porcine circovirus 2**. *Virus Res* 164, 43-45.
- Nguyen, K.D., Lee, E.E., Yue, Y., Stork, J., Pock, L., North, J.P., Vandergriff, T., Cockerell, C., Hosler, G.A., Pastrana, D.V., Buck, C.B., Wang, R.C., 2017. **Human polyomavirus 6 and 7 are associated with pruritic and dyskeratotic dermatoses**. *J Am Acad Dermatol* 76, 932-940 e933.
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D., 1998. **Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses**. *Arch Virol* 143, 1723-1744.
- Padilla-Rodriguez, M., Rosario, K., Breitbart, M., 2013. **Novel cyclovirus discovered in the Florida woods cockroach *Eurycotis floridana* (Walker)**. *Arch Virol* 158, 1389-1392.
- Palya, V., Ivanics, E., Glávits, R., Dán, Á., Mató, T., Zarka, P., 2004. **Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese**. *Avian Pathol* 33, 244-250.
- Palya, V., Ivanics, E., Glávits, R., Dán, Á., Mató, T., Zarka, P., 2005. **A libák vérzéses vese-és bélgyulladásának (polyomavirus -fertőzésének) járványos előfordulása**. *Magyar Állatorvosok Lapja* 127, 91-97.
- Phalen, D.N., Wilson, V.G., Graham, D.L., 1991. **Polymerase chain reaction assay for avian polyomavirus**. *J Clin Microbiol* 29, 1030-1037.
- Phalen, D.N., Wilson, V.G., Graham, D.L., 1997. **Prevalence of neutralizing antibody and virus shedding in psittacine birds infected with avian polyomavirus**. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 11, 98-104.
- Pingret, J.L., Boucraut-Baralon, C., Guerin, J.L., 2008. **Goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks**. *Vet Rec* 162, 164.
- Posada, D., 2008. **jModelTest: phylogenetic model averaging**. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. **Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen)**. *Virus Evol* 2, vew007.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. **Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**. *Syst Biol* 67, 901-904.
- Regnard, G.L., Rybicki, E.P., Hitzeroth, II, 2017. **Recombinant expression of beak and feather disease virus capsid protein and assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana***. *Virology* 500, 174.
- Riaz, A., Yousaf, A., Moaen-Ud-Din, M., Shah, M.A.A., Zainab, T., Masood, S., Akhter, N., Ali, A., 2019. **First detection and molecular characterization of avian polyomavirus in young parrots in Pakistan**. *Vet Res Commun* 43, 197-202.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Latimer, K.S., Pritchard, N., Campagnoli, R.P., Lukert, P.D., 1996. **An inactivated avian polyomavirus vaccine is safe and immunogenic in various Psittaciformes**. *Vaccine* 14, 1103-1107.
- Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Leonard, J., Pesti, D., Campagnoli, R., Lukert, P.D., 1998. **Safety, immunogenicity, and efficacy of an inactivated avian polyomavirus vaccine**. *Am J Vet Res* 59, 143-148.
- Robino, P., Grego, E., Rossi, G., Bert, E., Tramuta, C., Stella, M.C., Bertoni, P., Nebbia, P., 2014. **Molecular analysis and associated pathology of beak and feather disease virus isolated in Italy from young Congo African grey parrots (*Psittacus erithacus*) with an "atypical peracute form" of the disease**. *Avian Pathol* 43, 333-344.

- Rosario, K., Marinov, M., Stainton, D., Kraberger, S., Wiltshire, E.J., Collings, D.A., Walters, M., Martin, D.P., Breitbart, M., Varsani, A., 2011. **Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera)**. J Gen Virol 92, 1302-1308.
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M., 2012. **A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics**. Arch Virol 157, 1851-1871.
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segales, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A., 2017. **Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus**. Arch Virol 162, 1447-1463.
- Rosario, K., Mettel, K.A., Benner, B.E., Johnson, R., Scott, C., Youssef-Vanegas, S.Z., Baker, C.C.M., Cassill, D.L., Storer, C., Varsani, A., Breitbart, M., 2018. **Virus discovery in all three major lineages of terrestrial arthropods highlights the diversity of single-stranded DNA viruses associated with invertebrates**. PeerJ 6, e5761.
- Sadeghi, M., Altan, E., Deng, X., Barker, C.M., Fang, Y., Coffey, L.L., Delwart, E., 2018. **Virome of >12 thousand Culex mosquitoes from throughout California**. Virology 523, 74-88.
- Saikumar, G., Das, T. 2019. **Porcine Circovirus**. In Recent Advances in Animal Virology, Malik, Y., Singh, R., Yadav, M., eds. (Springer, Singapore), 171-195.
- Sato, G., Kawashima, T., Kiuchi, M., Tohya, Y., 2015. **Novel cyclovirus detected in the intestinal contents of Taiwan squirrels (Callosciurus erythraeus taiwanensis)**. Virus Genes 51, 148-151.
- Shehata, A.A., Gerry, D.M., Heenemann, K., Halami, M.Y., Tokarzewski, S., Wencel, P., Vahlenkamp, T.W., 2016. **Goose parvovirus and circovirus coinfections in ornamental ducks**. Avian Dis 60, 516-522.
- Soike, D., Kohler, B., Albrecht, K., 1999. **A circovirus-like infection in geese related to a runting syndrome**. Avian Pathol 28, 199-202.
- Soike, D., Albrecht, K., Hattermann, K., Schmitt, C., Mankertz, A., 2004. **Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders**. Vet Rec 154, 792-793.
- Stenzel, T., Dziejulska, D., Muhire, B.M., Hartnady, P., Kraberger, S., Martin, D.P., Varsani, A., 2018a. **Recombinant goose circoviruses circulating in domesticated and wild geese in Poland**. Viruses 10.
- Stenzel, T., Dziejulska, D., Tykalowski, B., Smialek, M., Kowalczyk, J., Koncicki, A., 2018b. **Immunogenicity of pigeon circovirus recombinant capsid protein in pigeons**. Viruses 10.
- Stewart, M.E., Perry, R., Raidal, S.R., 2006. **Identification of a novel circovirus in Australian ravens (Corvus coronoides) with feather disease**. Avian Pathol 35, 86-92.
- Stewart, S.E., Eddy, B.E., Gochenour, A.M., Borgese, N.G., Grubbs, G.E., 1957. **The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture**. Virology 3, 380-400.
- Stewart, S.E., Eddy, B.E., Borgese, N., 1958. **Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture**. J Natl Cancer Inst 20, 1223-1243.
- Ströh, L.J., Rustmeier, N.H., Blaum, B.S., Botsch, J., Rossler, P., Wedekink, F., Lipkin, W.I., Mishra, N., Stehle, T., 2020. **Structural basis and evolution of glycan receptor specificities within the Polyomavirus family**. mBio 11.
- Stys-Fijol, N., Kozdrun, W., Czekaj, H., 2016. **Preliminary survey of the occurrence of goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV) in wild birds in Poland**. Journal of Veterinary Research 60.
- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A., 2018. **Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10**. Virus Evol 4, vey016.
- Sweet, B.H., Hilleman, M.R., 1960. **The vacuolating virus, S.V. 40**. Proc Soc Exp Biol Med 105, 420-427.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., Kumar, S., 2013. **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.
- Tan le, V., van Doorn, H.R., Nghia, H.D., Chau, T.T., Tu le, T.P., de Vries, M., Canuti, M., Deijis, M., Jebbink, M.F., Baker, S., Bryant, J.E., Tham, N.T., NT, B.K., Boni, M.F., Loi, T.Q., Phuong le, T., Verhoeven, J.T., Crusat, M., Jeeninga, R.E., Schultsz, C., Chau, N.V., Hien, T.T., van der Hoek, L., Farrar, J., de Jong, M.D., 2013. **Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections**. *mBio* 4, e00231-00213.
- Todd, D., 2000. **Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review**. *Avian Pathol* 29, 373-394.
- Todd, D., McNulty, M.S., Adair, B.M., Allan, G.M., 2001a. **Animal circoviruses**. *Adv Virus Res* 57, 1-70.
- Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L., Lavazza, A., 2001b. **Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries**. *Avian Pathol* 30, 321-325.
- Todd, D., Weston, J.H., Soike, D., Smyth, J.A., 2001c. **Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon**. *Virology* 286, 354-362.
- Todd, D., 2004. **Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS**. *Vet Microbiol* 98, 169-174.
- Todd, D., Scott, A.N., Fringuelli, E., Shivraprasad, H.L., Gavier-Widen, D., Smyth, J.A., 2007. **Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull**. *Avian Pathol* 36, 75-81.
- Torres, C., Barrios, M.E., Cammarata, R.V., Victoria, M., Fernandez-Cassi, X., Bofill-Mas, S., Colina, R., Blanco Fernandez, M.D., Mbayed, V.A., 2018. **Phylogenetics of Merkel-cell polyomavirus and human polyomavirus 6: A long-term history with humans**. *Mol Phylogenet Evol* 126, 210-220.
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. **W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis**. *Nucleic Acids Res* 44, W232-235.
- Tu, Y.C., Li, W.T., Lee, F., Huang, C.W., Chang, J.C., Hsu, W.C., Hu, S.C., Chiou, C.J., Chen, Y.P., 2021. **Localization of goose haemorrhagic polyomavirus in naturally infected geese using in situ hybridization**. *Avian Pathol* 50, 41-51.
- Varsani, A., Porzig, E.L., Jennings, S., Kraberger, S., Farkas, K., Julian, L., Massaro, M., Ballard, G., Ainley, D.G., 2015. **Identification of an avian polyomavirus associated with Adelle penguins (*Pygoscelis adeliae*)**. *J Gen Virol* 96, 851-857.
- Wainright, P.O., Lukert, P.D., Davis, R.B., Villegas, P., 1987. **Serological evaluation of some psittaciformes for budgerigar fledgling disease virus**. *Avian Dis* 31, 673-676.
- Wan, C., Chen, C., Cheng, L., Liu, R., Fu, G., Shi, S., Chen, H., Fu, Q., Huang, Y., 2018. **Genomic analysis of Sheldrake origin goose hemorrhagic polyomavirus, China**. *J Vet Sci* 19, 782-787.
- Weaver, S., Shank, S.D., Spielman, S.J., Li, M., Muse, S.V., Kosakovsky Pond, S.L., 2018. **Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes**. *Mol Biol Evol* 35, 773-777.
- Xiang, Q.W., Wang, X., Xie, Z.J., Sun, Y.N., Zhu, Y.L., Wang, S.J., Liu, H.J., Jiang, S.J., 2012. **ORF3 of duck circovirus: a novel protein with apoptotic activity**. *Vet Microbiol* 159, 251-256.
- Yang, J.F., You, J., 2020. **Regulation of polyomavirus transcription by viral and cellular factors**. *Viruses* 12.
- Zhang, H.H., Hu, W.Q., Li, J.Y., Liu, T.N., Zhou, J.Y., Opriessnig, T., Xiao, C.T., 2020a. **Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China**. *Transbound Emerg Dis* 67, 1057-1061.
- Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Pesavento, P.A., Delwart, E., 2014. **Faecal virome of cats in an animal shelter**. *J Gen Virol* 95, 2553-2564.

- Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., Huang, J., Jia, R., 2020b. **Apoptosis triggered by ORF3 proteins of the Circoviridae family**. Front Cell Infect Microbiol 10, 609071.
- Zhao, L., Rosario, K., Breitbart, M., Duffy, S., 2019. **Eukaryotic circular Rep-encoding single-stranded DNA (CRESS DNA) viruses: ubiquitous viruses with small genomes and a diverse host range**. Adv Virus Res 103, 71-133.
- Zielonka, A., Gedvilaite, A., Ulrich, R., Luschow, D., Sasnauskas, K., Müller, H., Johne, R., 2006. **Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests**. Virus Res 120, 128-137.

Hivatkozott weboldalak:

A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság honlap:

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Subir Sarker PhD értekezés:

<https://researchoutput.csu.edu.au/ws/portalfiles/portal/9315285/80155>

Palya Vilmos, Major Viral Diseases of Waterfowl and Their Control:

<http://www.bvpa.org.uk/pdfs/palya1011.pdf>

Baromfi Termék Tanács honlap:

<https://mbtt.hu/>

Qiagen honlap:

www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/

NCBI honlapok:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

Figtree honlap:

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Központi Statisztikai Hivatal:

<https://www.ksh.hu/>

12. A doktori kutatás eredményeinek közlései

12.1. Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Kaszab, E., Marton, S., Erdélyi, K., Bányai, K., Fehér, E., 2021. **Genomic evolution of avian polyomaviruses with focus on budgerigar fledgling disease virus.** Infect Genet Evol 90,104762.

Kaszab, E., Lengyel, Gy., Marton, S., Dán, Á., Bányai, K., Fehér, E. 2020. **Occurrence and genetic diversity of CRESS DNA viruses in wild birds: a Hungarian study.** Sci Rep 10, 7036.

Kaszab, E., Marton, S., Dán, Á., Farsang, A., Bálint, Á., Bányai, K., Fehér, E., 2020. **Molecular epidemiology and phylodynamics of goose haemorrhagic polyomavirus.** Transbound Emerg Dis 67, 2602-2608.

Kaszab, E., Bali, K., Bálint, Á., Bányai, K., Fehér, E., 2021. **Víziszárnyasok polyomavírus-fertőzése.** Magyar Állatorvosok Lapja (közlésre elfogadva)

12.2. A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

Fehér, E., Kaszab, E., Forró, B., Bali, K., Marton, S., Lengyel, G., Bányai, K., 2017. **Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1.** Arch Virol 162, 3925-3929.

Kaszab, E., Marton, S., Forró, B., Bali, K., Lengyel, G., Bányai, K., Fehér, E., 2018. **Characterization of the genomic sequence of a novel CRESS DNA virus identified in Eurasian jay (*Garrulus glandarius*).** Arch Virol 163, 285-289.

Martella, V., Lanave, G., Mihalov-Kovács, E., Marton, S., Varga-Kugler, R., Kaszab, E., Di Martino, B., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia, C., Bányai, K., 2018. **Novel Parvovirus Related to Primate Buvaviruses in Dogs.** Emerg Infect Dis 24, 1061-1068.

Homonnay, Z., Jakab, S., Bali, K., Kaszab, E., Mató, T., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K., 2021. **Genome sequencing of a novel variant of fowl adenovirus B reveals mosaicism in the pattern of homologous recombination events.** Arch Virol 22,1-4.

Kaszab, E., Doszpoly, A., Lanave, G., Verma, AK., Bányai, K., Malik, YS., Marton, S., 2020. **Metagenomics revealing new virus species in farm and pet animals and aquaculture.** In: Malik, YS; Barh, D; Azevedo, V; Khurana, SMP Genomics and biotechnological advances in veterinary, poultry, and fisheries. Academic Press 29-73.

Bali, K., Bálint, Á., Farsang, A., Marton, S., Nagy, B., Kaszab, E., Belák, S., Palya, V., Bányai, K., 2021. **Recombination Events Shape the Genomic Evolution of Infectious Bronchitis Virus in Europe.** Viruses 13(4), 535

12.3. Konferencia közlemények

Kaszab, E., Marton, S., Dán, Á., Farsang, A., Bányai, K., Fehér, E. **Genome analysis of Anser anser polyomavirus 1 in Hungary.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 66. Abstract of the 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2019.

Kaszab, E., Lengyel, G., Marton, S., Dán, Á., Bányai, K., Fehér, E. **CRESS vírusok vizsgálata hazai vizes élőhelyeken vadmadarakban.** Akadémiai beszámolók, Budapest, 2020.

Kaszab, E., Marton, S., Dán, Á., Farsang, A., Bálint, Á., Bányai, K., Fehér, E. **A lúd haemorrhagiás polyomavírus filodinamikai vizsgálata.** Akadémiai beszámolók, Budapest, 2020.

13. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Fehér Enikőnek, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám végzéséhez, bevezetett a labormunka és a vírusok világának rejtelmeibe. Tanácsainak és lelkiismeretes, éjszakába nyúló javításainak köszönhetően jöhetett létre ez a dolgozat. Hálásan köszönöm Főninek, Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy munkacsoportjában helyet biztosított számomra és neki köszönhetően számos munkafolyamatba be tudtam csatlakozni, bővítve eddigi tudásom.

Köszönöm Dr. Bálint Ádámnak, Dr. Dán Ádámnak és Dr. Erdélyi Károlynak a felhasználásunkra bocsátott mintákat és adatokat, melyek nélkül ez a dolgozat nem valósulhatott volna meg. Külön köszönet illeti Dr. Lengyel Györgyöt, aki a minták Sanger szekvenálásában nyújtott szerepet. Továbbá köszönettel tartozom a Prophyl Kft. munkatársainak, hogy megosztották velünk a kórbonctani/kórszövettani vizsgálatok során szerzett tapasztalataikat.

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

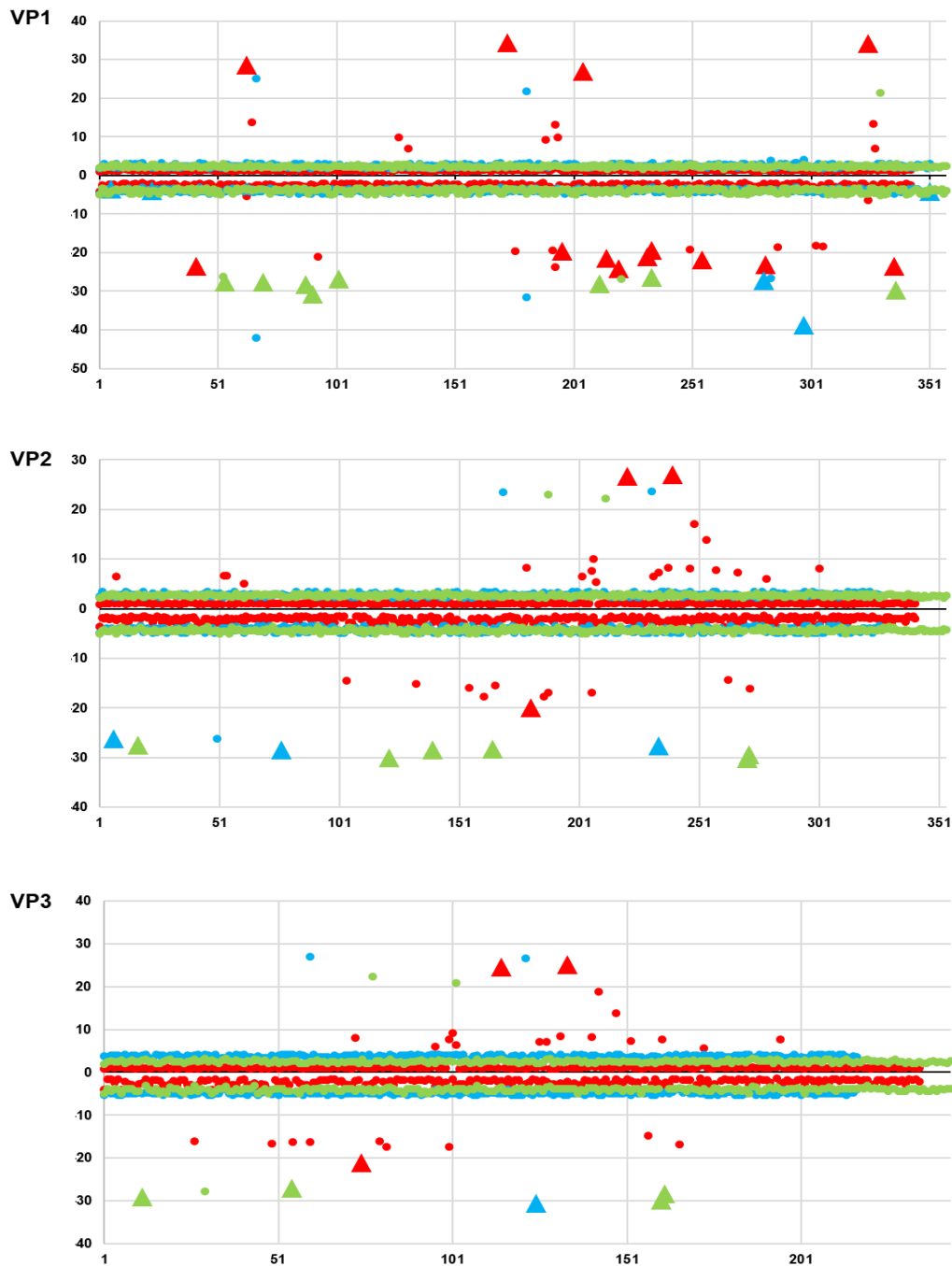
Hálásan köszönöm a családomnak, hogy céljaim elérése során mindig részesülhettem támogatásukban és igyekeztek nyugodt, harmonikus háttérrel biztosítani számomra. Köszönöm férjemnek, Ádinak, hogy mindig az aktuális helyzetnek megfelelően nyújtott segítséget a doktori munka során, ha kellett bátorított, ha kellett megnevettetett, ha kellett drákói szigorral vett rá a dolgozat írására.

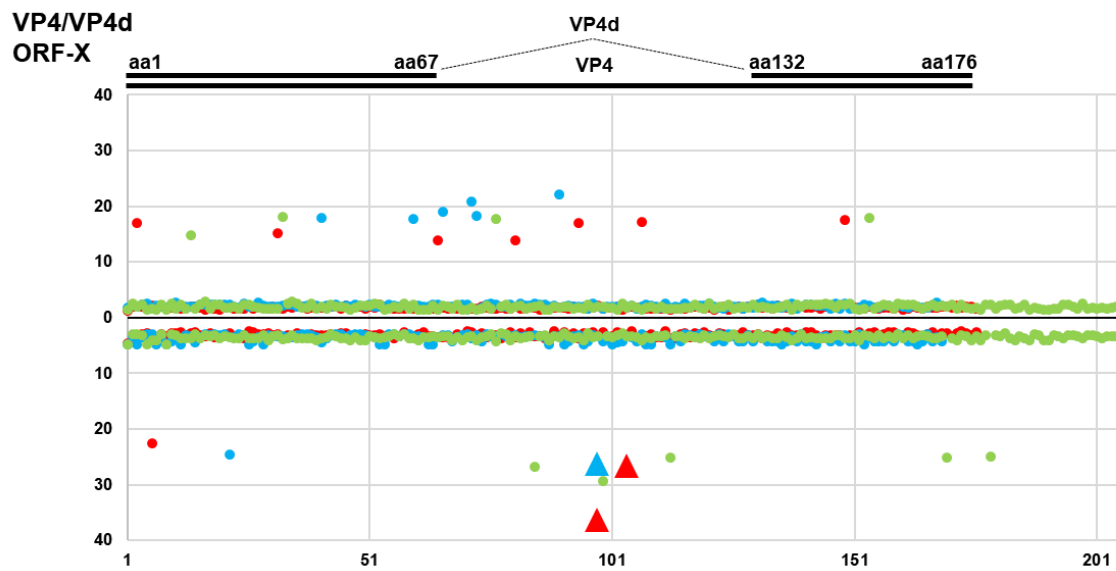
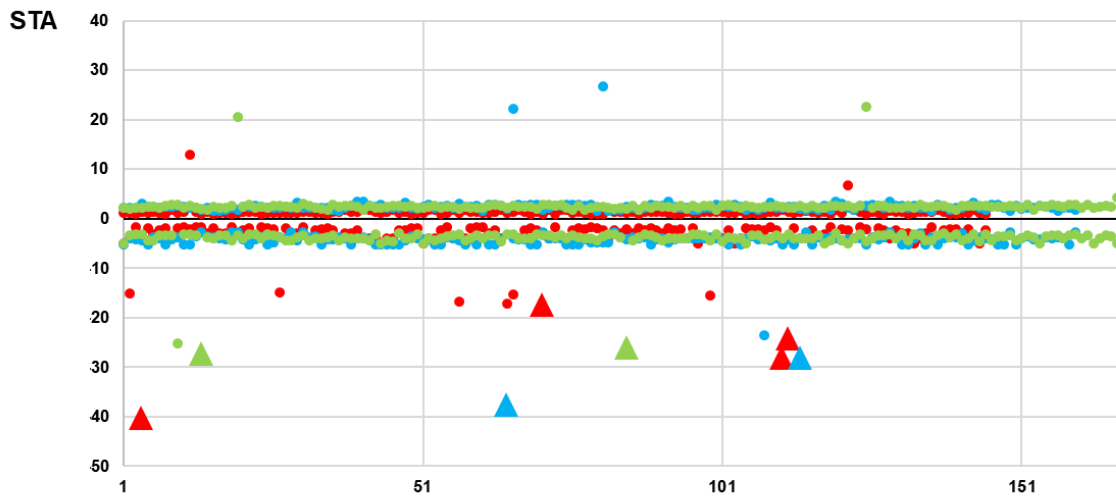
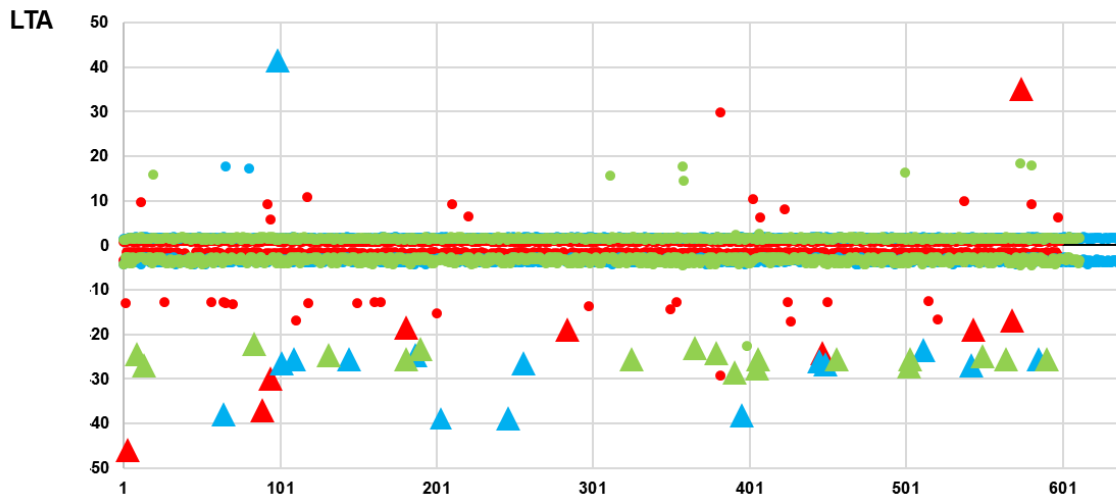
Köszönet illeti barátaimat, akiktől az évek során rengeteg biztatást kaptam és végre megértük ezt a pillanatot is. Külön köszönet illeti Micikét, aki nélkülözte anyukáját az esti játékban, így a PhD dolgozatom tudta javítani.

A munka anyagai feltételeit a Dr. Bányai Krisztián által elnyert Lendület pályázat, valamint a Dr. Fehér Enikő által elnyert OTKA PD 115519 pályázat biztosította.

14. Mellékletek

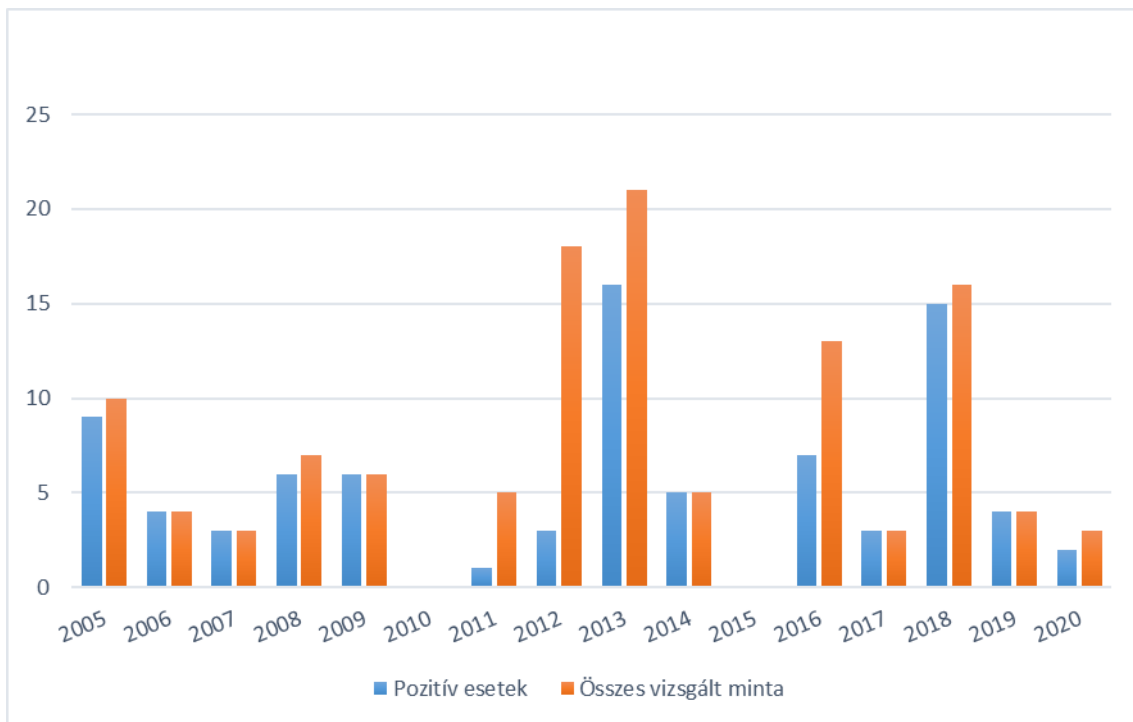
1. melléklet Az ábra a BFDV (piros), GHPV (kék) és FPyV (zöld) genomok génekenkénti FUBAR elemzésének eredményeit reprezentálja. Az Y-tengely X-tengely feletti része a β (adott pozícióra vonatkozó átlag posterior szubsztitúciós ráta), az Y-tengely X-tengely alá eső része pedig α (átlag posterior szinonim szubsztitúciós ráta) értékek láthatóak. A statisztikailag releváns értékeket (posterior probabilitás: 0,9) háromszögekkel emeltük ki.



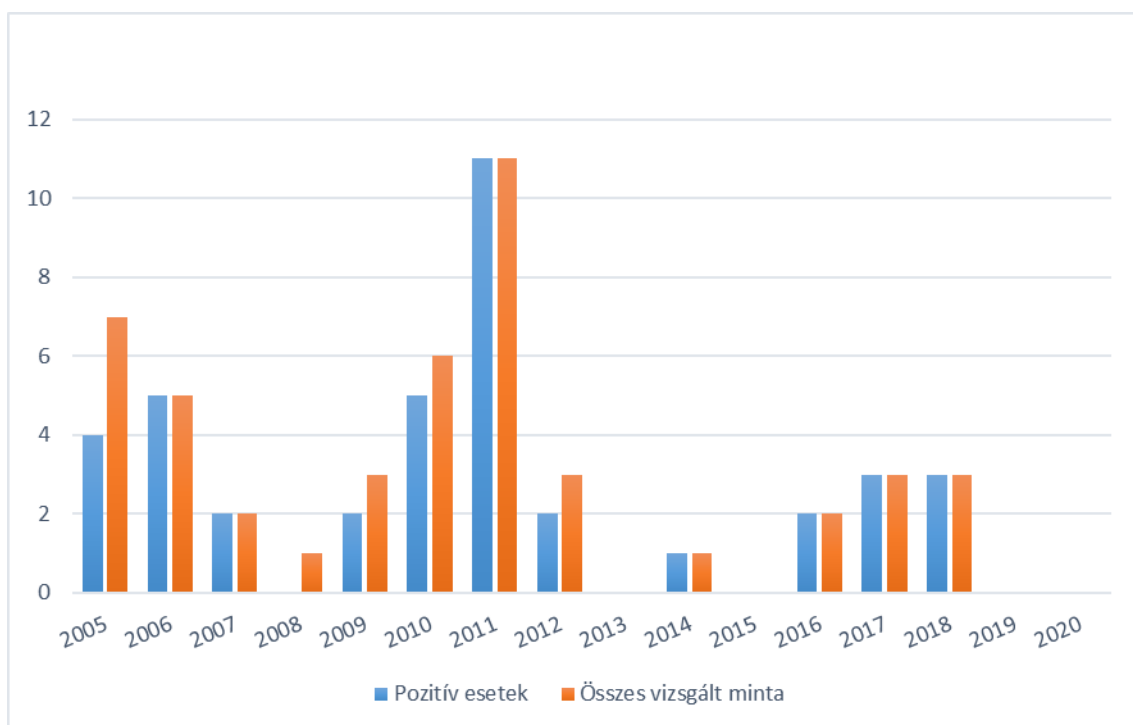


2. melléklet A NÉBIH ÁDI által vizsgált kacsacircovírus pozitív esetek megoszlása 2005-2020 között (a) házikacsák és (b) mulard kacsák esetében.

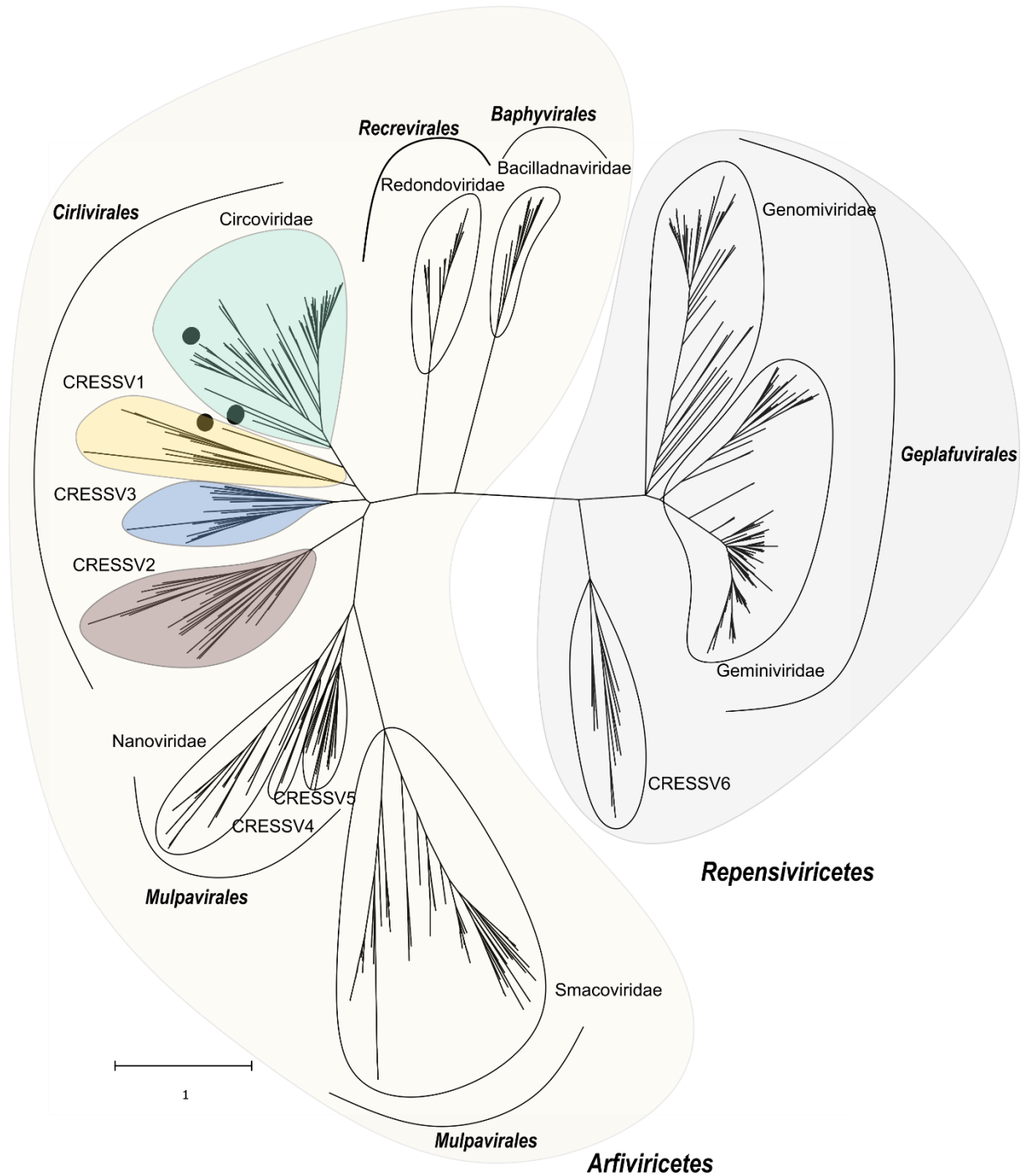
a



b



3. melléklet Rep az szekvenciái alapján készített filogenetikai fa, melyek Krupovic és munkatársai által taxonómiai besorolásra összeállított adathalmazra épül (Krupovic és mtsai, 2020). A fa a PhyML szoftver segítségével, RtREV+G+F modell alapján készült. A fekete kör jelöli az általunk leírt szekvenciákat.



4. melléklet A 24. ábrán látható filogenetikai törzsfa készítéséhez felhasznált, *Cirivirales* rendbe tartozó reprezentatív szekvenciák génbanki azonosító száma.

Génbanki azonosító	Vírus	Csoport
KC339249	Bat associated circovirus 2	Circoviridae
DQ151643	Porcine circovirus 2	Circoviridae
KJ641741	Bat circovirus isolate BtRf-CV-61/YN2010	Circoviridae
KJ641742	Bat circovirus isolate BtRf-CV-62/YN2010	Circoviridae
JX863737	Bat associated circovirus 1	Circoviridae
KJ020099	Mink circovirus	Circoviridae
KP260925	Fox circovirus	Circoviridae
KJ641727	Bat associated circovirus 5	Circoviridae
KJ641716	Bat circovirus isolate BtP spp.-CV/GD2012	Circoviridae
KJ641711	Bat associated circovirus 8	Circoviridae
KJ641723	Bat associated circovirus 7	Circoviridae
KT783484	Tadarida brasiliensis circovirus 1	Circoviridae
GQ404856	Human stool-associated circular virus NG13	Circoviridae
GU799606	Barbel circovirus	Circoviridae
JQ011377	Silurus glanis circovirus	Circoviridae
KC469701	Anguilla anguilla circovirus	Circoviridae
JQ782200	Beak and feather disease virus	Circoviridae
HQ738642	Circovirus NGchicken38/NGA/2009	Circoviridae
DQ146997	Raven circovirus	Circoviridae
KU230452	Avian-like circovirus isolate A1	Circoviridae
KP793918	Zebra finch circovirus	Circoviridae
AJ301633	Canary circovirus	Circoviridae
DQ845074	Gull circovirus	Circoviridae
JN377562	Bat circovirus ZS/Yunnan-China/2009	Circoviridae
EU056310	Swan circovirus	Circoviridae
KF941309	Duck circovirus	Circoviridae
GQ404844	Cyclovirus PK5006	Circoviridae

GQ404846	Cyclovirus PK5222	Circoviridae
HQ738643	Cyclovirus NGchicken8/NGA/2009	Circoviridae
KC512919	Dragonfly associated cyclovirus 7	Circoviridae
GQ404849	Cyclovirus Chimp11	Circoviridae
KP151567	Cyclovirus NI-204	Circoviridae
KC512918	Dragonfly associated cyclovirus 6	Circoviridae
KM382269	Bat circovirus POA/2012/II	Circoviridae
KC512920	Dragonfly associated cyclovirus 8	Circoviridae
JX185426	Dragonfly associated cyclovirus 5	Circoviridae
JF938079	Bat associated cyclovirus 2	Circoviridae
HQ738637	Cyclovirus bat/USA/2009	Circoviridae
GQ404854	Cyclovirus NG12	Circoviridae
KJ641715	Bat associated cyclovirus 8	Circoviridae
JF938081	Bat associated cyclovirus 3	Circoviridae
HM228874	Bat cyclovirus GF-4c	Circoviridae
GQ404845	Cyclovirus PK5034	Circoviridae
HQ638049	Dragonfly associated cyclovirus 1	Circoviridae
GQ404847	Cyclovirus PK5510	Circoviridae
KJ641728	Bat associated cyclovirus 13	Circoviridae
GQ404855	Cyclovirus NG14	Circoviridae
JF938082	Bat associated cyclovirus 4	Circoviridae
KJ641712	Bat associated cyclovirus 6	Circoviridae
KJ641717	Bat associated cyclovirus 11	Circoviridae
KF726984	Human cyclovirus	Circoviridae
JX185423	Dragonfly associated cyclovirus 2	Circoviridae
KF031465	Cyclovirus VN	Circoviridae
GQ404857	Cyclovirus TN25	Circoviridae
KC771281	Human cyclovirus VS5700009	Circoviridae
HQ738634	Cyclovirus PKbeef23/PAK/2009	Circoviridae
KR902499	Cyclovirus Equ1	Circoviridae
KP153414	Lake Sarah-associated circular virus-14	Circoviridae
KM821758	Sewage-associated circular DNA virus-23	Circoviridae
KT732785	Pacific flying fox associated cyclovirus-1	Circoviridae

KT732786	Pacific flying fox associated cyclovirus-2	Circoviridae
KJ641714	Bat circovirus isolate BtRp-CV-14/GD2012	Circoviridae
KT732825	Pacific flying fox faeces associated circular DNA virus-8 isolat Tbat_H_103163	Circoviridae
KT862256	Bovine faeces associated circular DNA molecule 1 isolat 5_Fec60361_cow	CRESS1
KF246569	Fur seal faeces associated circular DNA virus	CRESS1
KJ206566	Human circovirus VS6600022	CRESS1
KU043411	Unidentified circular ssDNA virus isolate cg1855	CRESS1
KT600066	Human feces pecovirus strain PeCV-NI	CRESS1
KU043424	Unidentified circular ssDNA virus isolate cg5269	CRESS1
KM573766	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus isolat DcSCV_c1054	CRESS1
KX388513	Cruciviridae sp. isolate CRUV-34-B	CRESS1
KX388514	Cruciviridae sp. isolate CRUV-35-B	CRESS1
KX388515	Cruciviridae sp. isolate CRUV-36-B	CRESS1
KM573763	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus	CRESS1
KM821764	Sewage-associated circular DNA virus-29 isolat SaCV-29_NZ-BS4325-2012	CRESS2
KU043397	Unidentified circular ssDNA virus isolate 2035	CRESS2
KU043406	Unidentified circular ssDNA virus isolate cg_1467 Cap and Re genes	CRESS2
KM573776	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus isolat DcSCV_c1566	CRESS2
KM573767	Dromedary stool-associated circular ssDNA virus isolat DcSCV_c1422	CRESS2
JX904107	Uncultured marine virus clone SOG00781	CRESS2
JX904562	Uncultured marine virus clone SI03717	CRESS2
KM821755	Sewage-associated circular DNA virus-20 isolat SaCV-20_NZ-BS3900-2012	CRESS2
KT732816	Pacific flying fox associated multicomponent virus isolat Tbat_K_12099 segment DNA-R	CRESS2
JF755415	Rodent stool-associated circular genome virus	CRESS2
JX904344	Uncultured marine virus clone GOM03041	CRESS2
KP153364	Lake Sarah-associated circular molecule 5 isolat LSaCM-5-LSWO-2013	CRESS2
JX904185	Uncultured marine virus clone SOG05268	CRESS2
JX904420	Uncultured marine virus clone SI00197	CRESS2
KP153404	Lake Sarah-associated circular virus-7	CRESS2
KC248416	Diporeia sp. associated circular virus isolate LM348	CRESS2
KT149398	Circovirus-like genome DCCV-5	CRESS2
KP153447	Dragonfly larvae associated circular virus-3	CRESS2

KT732819	Pacific flying fox faeces associated circular DNA virus-4 isolat Tbat_29894	CRESS2
KP153377	Lake Sarah-associated circular molecule 9 isolat LSaCM-9-LSLA-2013	CRESS2
KT149394	Circovirus-like genome DCCV-1	CRESS2
KP153360	Lake Sarah-associated circular molecule 2 isolat LSaCM-2-LSMU-2013	CRESS2
KP153369	Lake Sarah-associated circular molecule 6 isolat LSaCM-6-LSGA-2013	CRESS2
KP153485	Lake Sarah-associated circular virus-39	CRESS2
KJ547648	McMurdo Ice Shelf pond-associated circular DNA virus-3 isolat alg49-39	CRESS2
KT149412	Circovirus-like genome DHCV-6	CRESS2
KP153468	Lake Sarah-associated circular virus-32	CRESS2
FJ959082	Circovirus-like genome CB-A	CRESS2
KF738877	Dragonfly larvae associated circular virus-4 isolat DflaCV-4_NZ-PG3-LG	CRESS2
KP153483	Lake Sarah-associated circular virus-38	CRESS2
KT732823	Pacific flying fox faeces associated circular DNA virus-6 isolat Tbat_H_77994	CRESS2
KM598396	Odonata-associated circular virus-13 isolat OdasCV-13-US-1591LM1-12	CRESS2
JX185415	Dragonfly circularisvirus isolate TO-DF3E-2010	CRESS2
JX904407	Uncultured marine virus clone SI00078	CRESS3
KJ641729	Bat circovirus isolate BtPa-CV-3/NX2013	CRESS3
JN857329	Circoviridae batCV-SC703	CRESS3
KJ641718	Bat circovirus isolate BtMf-CV-1/GD2012	CRESS3
KJ641722	Bat circovirus isolate BtMf-CV/HeN2013	CRESS3
HM228875	Circoviridae TM-6c	CRESS3
KM972726	Mosquito circovirus strain B51	CRESS3
KP153422	Lake Sarah-associated circular virus-16	CRESS3
KM874317	Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 9	CRESS3
KM874304	Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 6	CRESS3
KP153408	Lake Sarah-associated circular virus-10	CRESS3
JX904075	Uncultured marine virus clone SOG00160	CRESS3
JX904139	Uncultured marine virus clone SOG03994	CRESS3
JX904076	Uncultured marine virus clone SOG00164	CRESS3
JX904581	Uncultured marine virus clone SI03931	CRESS3
KM598406	Odonata-associated circular virus-20 isolat OdasCV-20-US-718DFS-12	CRESS3
KT149409	Circovirus-like genome DHCV-3	CRESS3
JX185418	Dragonfly cyclicusvirus isolate FL1-NZ37-2010	CRESS3

KM874300	Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 4 isolat AHEaCV-4-NZ-3049C3-2012	CRESS3
KM598404	Odonata-associated circular virus-19 isolat OdasCV-19-US-1594LM1-12	CRESS3
KF738883	Dragonfly larvae associated circular virus-9 isolat DflaCV-9_NZ-PG10-LD	CRESS3
KP153359	Lake Sarah-associated circular molecule 1 isolat LSaCM-1-LSCO-2013	CRESS3