

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Új vírusok magyarországi kutyák enterális
fertőzéseiben**

PhD értekezés tézisei

dr. Mihalov-Kovács Eszter

2019

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Bányai Krisztián, PhD

Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés

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

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

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

Egyes vírusok esetében, mint például kutya rotavírus, kutya astrovírus vagy a kutya calicivírusok, már régóta tudni lehet jelenlétükről, és feltételezik kórokozó szerepüket is. Ugyanakkor ezen vírusok magyarországi előfordulását kutyáknál csoportunknak sikerült először bizonyítania.

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

Célkitűzéseink

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

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

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

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

Anyag és módszer

A bélsár minták eredete, feldolgozása a nukleinsav kivonásig

A kutyáktól származó bélsármintákat egy észak-kelet magyarországi menhelyen (Miskolci Állatsegítő Alapítvány, M.Á.S.A.) gyűjtöttük, 2012. január és szeptember között. Mintákat gyűjtöttünk még egy magánszemély kutyáitól is, aki saját kutyái mellett ideiglenesen befogadott kutyákat is tart. Ezen a tartási helyen kevesebb kutya fordul meg, jellemzően csak klinikailag egészséges kutyák élnek együtt.

Összesen 76 bélsármintát gyűjtöttünk mintagyűjtő tégelyekbe. A gyűjtés véletlenszerűen történt, a tünetmentes és a hasmenéses egyedek vegyesen szerepeltek, a gyűjtést sem az életkor, sem az ivar nem befolyásolta. A mintákat egyedileg is, valamint kennelekből is gyűjtöttük, utóbbi esetben előfordult, hogy több minta került egy mintagyűjtő tégelybe. A laborba szállításig -20°C -os hűtőben tartottuk, vagy még aznap a laborba szállítottuk a mintákat.

A bélsármintákból 10-20%-os bélsár szuszpenziót készítettünk, melyhez PBS (phosphate buffered saline) oldatot használtunk. A mintákat ezután -65°C -os fagyasztóban tároltuk további felhasználásig.

Új generációs szekvenálás – mintaelőkészítés, könyvtárkészítés, szekvenálás

Az új generációs szekvenáláshoz RNS-t vontunk ki a bélsárminták felülúszójából. A kivont RNS mintából reverz transzkripciót (RT) végeztünk random hexamer oligonukleotid jelenlétében, melynek 3' végéhez általános oligonukleotid csatlakozott. Az RT lépés cDNS termékéből PCR amplifikálást végeztünk, a terméket pedig agarózgélben futtattuk. A 200 és 2000 nukleotid (nt) közötti sávban lévő termékeket kivágtuk, és gélből kitisztítottuk.

A könyvtárkészítés során enzimes fragmentációt végeztünk, a fragmensekhez pedig vonalkódos adaptereket kötöttünk. Az indexelt könyvtárakból fluorometriás mennyiségi meghatározás után egyforma mennyiségeket mértünk össze. Ezt a könyvtárkeveréket használtuk az emulziós PCR során, amelynek célja a könyvtár DNS-ek klonális amplifikációja. A szekvenálást az Ion Torrent Personal Genome Machine® készüléken végeztük, 316 ill. 318 típusú chipeken.

Hagyományos PCR szűrővizsgálatok – mintaelőkészítés, RT-PCR, real-time PCR

A hagyományos PCR alapú szűrővizsgálatokhoz a bélsár felülúszójából kombinált virális DNS/RNS kivonást végeztünk. A vírusok detektálása vírus specifikus RT-PCR segítségével történt, vírusonként külön reakciócsövekben. Az egy- és kétlépéses RT-PCR-ek és a kétkörös (hemineszt) PCR-ek a kutya astrovírus, kutya calicivírus és kutya kobuvírus (CAstV, CaCV és CaKoV) kimutatását szolgálták. A munkánk során használt oligonukleotidokat előzetes irodalmi adatok alapján választottuk ki, illetve a CaKoV esetében magunk terveztük génbanki szekvenciákból készített illesztések felhasználásával. A bufavírus szűrést az előzetes metagenomikai adatok ismeretében végeztük, a real-time (valós idejű) PCR-ben használt protokollt együttműködésben fejlesztettük (Vito Martella, Bari Egyetem, Olaszország).

Agarózgél elektroforézist követően a specifikus PCR termékeket a gél szeletekből tisztítottuk. A kivont PCR termékeken mindkét irányból közvetlen szekvencia meghatározást végeztünk Sanger-féle DNS szekvenálással együttműködő partnereinknél (PTE TTK és Honvédkórház).

Az egyszálú RNS vírusok genomjának végeit 5' és 3' RACE módszer segítségével amplifikáltuk. A duplaszálú RNS vírusok esetében a szegmensvégek meghatározását RNS ligálással kombinált házilig adaptált 3' RACE-val végeztük.

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

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

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

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

A hagyományos Sanger szekvenálás során nyert szekvencia adatokat és az NGS szekvencia adatokat ettől a ponttól azonos módon elemeztük. A nyílt leolvasási kereteket (open reading frame, ORF) az NCBI internet alapú ORF keresőjével határoztuk meg (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A többszörös szekvencia illesztéseket a translatorX (<http://translatorx.co.uk/>) interaktív fordító-illesztő programmal készítettük el. A szekvenciák további szerkesztése és értékelése a GeneDoc, valamint a BioEdit szoftverekkel történt. A filogenetikai elemzést a MEGA6 szoftverrel végeztük és pedig *neighbor-joining* vagy *maximum likelihood* módszerrel, a program által legjobbnak ítélt szubsztitúciós modell alkalmazásával. Az átlagos nukleinsav és aminosav genetikai távolságokat a *p*-distance módszerrel számoltuk ki, szintén a MEGA6 programot használva.

Eredmények és megbeszélés

2012-ben összesen 76 db kutya bélsármintát gyűjtöttünk a M.Á.S.A. miskolci menhelyéről, valamint egy magánszemély kutyáitól. Összesen 37 mintát vizsgáltuk metagenomikai módszerekkel. 33 minta a menhelyről származott, míg négy mintát a magán állattartónál élő állatoktól gyűjtöttünk.

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

Kutya astrovírus, CAstV

A pan-astrovirus RT-PCR és a metagenomikai vizsgálatok eredményeinek összefésülésével együttesen a minták 21%-ban (16/76) detektáltunk astrovírust.

Négy teljes AstV genomot (HUN/2012/2, HUN/2012/115, HUN/2012/126, HUN/2012/135), két részleges genomot részletesen elemeztünk (HUN/2012/8, HUN/2012/6). A kódoló szakaszok szerkezete az AstV-kra jellemző képet mutatta. Három, egymással átfedő ORF-et tartalmazott, amelyek a szerkezeti és nem-strukturális fehérjéket kódolják. A kódoló szakaszok hossza 6441-6447 nt között, a GC (guanin: citozin) tartalom 45,19-45,48% között mozgott. A genomok hossza az 5' és 3' UTR-t beleszámolva, a poli(A) farkat pedig levonva 6535 és 6587 nt közötti hosszúságú volt. Az 5' UTR-t négy törzs (HUN/2012/2, HUN/2012/115, HUN/2012/126 és HUN/2012/135) esetében sikerült meghatároznunk, ezek hossza 42 és 60 nt között változott. A 3' UTR-t mind a hat törzs esetében megszekvenáltuk, ezek hossza 49 és 100 nt között alakult.

Az teljes ORF2 nukleotid szekvenciájának filogenetikai elemzése képezi alapját az AstV-ok rendszertani besorolásának és jellemzésének. Ebben az elemzésben az összes kínai törzs, a nagy-britanniai GBR/2014/Lincoln törzs, valamint a HUN/2012/2 és a HUN/2012/135 egy egyedülálló csoportot alkot, ahol a csoporton belül a nt hasonlóság több mint 91%. A második csoportba olaszországi törzsek tartoztak (ITA/2005-3, ITA/2005-6 és ITA/2005-8), valamint a nagy-britanniai GBR/2014/Gillingham és a magyarországi HUN/2012/6 törzsek, a nukleotidszintű hasonlóság szintén több mint 91%. A harmadik csoport a virulens ITA/2010/Zoid és a HUN/2012/126 törzseket tartalmazza, 97%-os csoporton belüli nukleotidszintű hasonlósággal. Egyéb CAstV törzsek (GBR/2014/Braintree, GBR/2014/Huntingdon, HUN/2012/115) a fenti törzsek között helyeződtek el, külön alcsoportokat alkotva.

Az ebben a tanulmányban megszekvenált AstV-k ORF-jeinek vizsgálata rámutatott a szekvenciák változatosságára. A filogenetikai vizsgálatok során öt törzsünk a többi kutya astrovírussal együtt helyeződött, és több alcsoportot alkotott a kapszid szekvencia alapján. A humán astrovírusokat a MAstV 1 fajba soroljuk, és nyolc különböző szerotípusba oszthatóak. Lehetséges, hogy a humán astrovírusoknál megfigyelt alcsoportok a kutya astrovírusokra is jellemzőek. A HUN/2012/8-as magyar CAstV törzs csak távoli rokonságot mutatott mind a magyarországi, mind a világ többi tájáról származó CAstV törzsekkel. A HUN/2012/8 törzs esetében bizonytalan, hogy ez a törzs egy kutya CAstV, vagy egy lehetséges fajok közötti vírusátvitel eredményeképpen találtuk kutyában.

Tudásunk még rendkívül hézagos a CAstV-k tekintetében. Mindazonáltal az eddig megismert genetikai változatosság kihívás elé állítja a laboratóriumi diagnosztikát. Ugyanez a diverzitás gátat vethet a jövőbeni megelőző stratégiák tervezésében és kivitelezésében, a vakcina fejlesztésben. További vizsgálatok szükségesek, hogy a CAstV biológiáját jobban megértsük, valamint surveillance programok, hogy a vírus állategészségügyi jelentőségét felmérjük.

Kutya calicivírus, CaCV

Kutya calicivírus RNS-t a minták 3,9%-ban (3/76) mutattuk ki RT-PCR módszerrel, míg a metagenomikai elemzés során egy mintában találtunk calicivírus (ti. vesivírus) szekvencia részleteket, melyből sikerült a HUN/2012/528 törzs részleges genomját összeszerelni. A három calicivírusra pozitív minta PCR termékeinek szekvenálása után egy mintát (HUN/2012/528) vesivírusként azonosítottuk, míg a másik kettő (HUN/2012/7 és HUN/2012/64) norovírus volt.

A HUN/2012/528 vesivírus törzs részleges kódoló szekvenciájának a hossza 8270 nukleotid volt. A teljes 3' UTR 162 nukleotid hosszú volt, nem számolva a poli(A) farkat. A meghatározott szekvencia GC tartalma 47,56% volt. Az RNS genom három nyílt leolvasási keretet tartalmazott.

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

kontamináns vesivírus törzsekkel, a közelmúltban leírt egyesült államokbeli és olaszországi vesivírus törzsekkel együtt a *Vesivirus* nemzetség egy új képviselője lehet.

A dolgozatunkban meghatározott prevalencia (3,9%) egybe esett az irodalom által említett értékekkel (1,1-64,8%), ugyanakkor alacsonyabb volt a kennelekben, állatmenhelyeken detektált prevalencia értékeknél (9,7%, 64,8%). Munkánk során egyedülálló módon egy tartási helyről norovírust és vesivírust is kimutattunk. A norovírus törzseket RT-PCR módszerrel sikerült kimutatnunk, míg a vesivírus törzset az általános calicivírus primerrel, és metagenomikai módszerrel is detektáltuk.

Kutya kobuvírus, CaKoV

A 76 vizsgált bélsármintából összesen 11 (14,47%) bizonyult kobuvírus pozitívnak RT-PCR és/vagy metagenomikai módszerrel. Az RT-PCR rendszer saját fejlesztésünk, RdRp és VP1 genomi régiókra illeszkedő két-két primerpárt terveztünk. Vírus metagenomikai módszerekkel összesen hat mintában sikerült kobuvírus szekvencia részleteket azonosítani, amelyek közül egy mintából (HUN/2012/2) párhuzamos futtatásokban generált adatok összegzésével, és a konszenzus végek kiterjesztésével a teljes genomból egy 8279 nt hosszú szakaszt határoztunk meg. A kódoló szakasz nagyfokú hasonlóságot mutatott a GenBankban megtalálható CaKoV 1 szekvenciákkal (92,2-94,8% nt szinten, 97-99,4% as szinten). A genom szerkezete megegyezett a nemzetség többi tagjával: VPg+5'UTR[L/P1(VP0-VP3-VP1)-P2(2A^{H-box/NC}-2B-2C^{Hel})-P3(3A-3B^{VPg}-3C^{Pro}-3D^{Pol}]-3'UTR.

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

Vizsgálatunk során a kobuvírus pozitív minták közül nyolc egy év alatti, míg három felnőtt ebtől származott, valamint hat hasmenéses, öt pedig tünetmentes kutyától származott. A részletesen elemzett HUN/2012/2 CaKoV törzsnél társfertőzőként jelen volt CAstV és CCoV is. Előző tanulmányokban megjelent következtetések a mi munkánk során is megjelentek tendenciaként, miszerint a kobuvírus fertőzés valószínűleg általános lehet a kutyák körében (gyakoribb a fiatal állatok között), azonban a fertőzés nem valószínű, hogy megnyilvánul klinikai tünetekben, vagy pedig egyéb ismert patogén kórokozók is szerepet játszanak a hasmenéses tünetek kialakításában.

Kutya rotavírus C, CRVC

A vírus-metagenomikai vizsgálatok során egy tíz hetes, hasmenéses kutya bélsármintájából (HUN/174/2012) sikerült kimutatnunk *Rotavirus C*-vel rokon szekvenciárészleteket. Az online adatbázisokban mindeddig nem töltöttek fel kutya RVC törzs szekvenciát, így megkíséreltük a teljes kódoló szekvencia összeszerelését. A meghatározott törzs szekvenciája egyedi volt, és határozottan elkülönült a humán, sertés és szarvasmarha RVC törzsektől. A vizsgált RVC törzs genomja 11 fehérjét kódolt, hat szerkezeti fehérjét, valamint öt nem-szerkezeti fehérjét. A humán, sertés és szarvasmarha referencia törzseket összevetve az általunk meghatározott RVC törzssel a nukleotid szekvencia hasonlóságok összességében 67-84% között mozogtak az RVC törzsek génjei között. A referencia törzsekhez hasonlítva a legkisebb szekvenciaazonosságot az NSP1 és NSP4 esetében figyeltük meg (67-87%, valamint 67-77%), míg a legnagyobb szekvenciaazonosságot az NSP2-nél találtuk (79-84%). A VP7, VP4, VP6 gének tekintetében a kutya RVC törzsünk már nagy biztonsággal besorolható a G10 –VP7, P8 –VP4, és I8 –VP6 genotípusokba.

A VP4, VP6 és VP7 gének filogenetikai elemzése során bizonyítást nyert, ami már a hasonlósági számítások során sejthető volt, hogy a KE174/2012 törzs az eddig leírt genotípusokhoz képest külön csoportot képez.

Metagenomikai módszerekkel azonosítottunk egy olyan genetikailag heterogén *Rotavirus C* törzset, amely a legtöbb, ha nem az összes, génjében újszerű genotípust mutat. További kutya RVC törzsek leírása segíthet felderíteni az esetleges genetikai diverzitást a gazdafajból izolált RV törzsek között. Várhatóan, a leírt RVC törzsek számának növekedésével egy megbízható klasszifikációs rendszert sikerül kidolgozni.

Kutya rotavírus I, CRVI

A metagenomikai vizsgálatok során két minta esetében (KE135/2012; KE528/2012) szokatlan rotavírus szekvenciárészleteket fedeztünk fel az előzetes elemzések során. Mivel azonban a vírus alacsony titerben volt jelen a mintában (ti. PAGE-ben végzett ezüstoffestéssel sem volt kimutatható a genomi RNS), ezért a mélyszekvenálás során drasztikusan megemeltük a minta szekvenciáinak mennyiségét. A futtatás eredményeképpen megkaptuk az összes strukturális és nem strukturális gént. Ezek a gének lényegesen eltértek az eddig ismert rotavírus A-H referencia szekvenciáktól.

Mindkettő szokatlan rotavírusnál a szegmensvégek nukleotidsorrendje megőrzött volt (5' vég GGC/TA; 3' vég AACCC); valamint a legtöbb gén esetében nagyfokú volt kettőjük között a szekvencia hasonlóság (pl. VP2: 88% nt, 95% as hasonlóság; NSP4 99% nt, 99%

as hasonlóság). A VP7 gén esetében azonban rendkívül alacsony volt a szekvenciaazonosság (53% nt és 38% as szinten).

A szekvencia- és a filogenetikai analízis együttesen szemlélteti a mérsékelt genetikai hasonlóságot a rotavirus A-H fajok képviselőivel, alátámasztva, hogy egy új faj, a *Rotavirus I* képviselőit találtuk meg. Az új rotavirus faj első képviselőit a legújabb ajánlások alapján RVI/Dog-wt/HUN/KE135/2012-nek és RVI/Dog-wt/HUN/KE528/2012-nek neveztük el.

Az addig ismert rotavírusfajoktól eltérő vírusok jelenlétére macskák és kaliforniai oroszlánfókák fekális viromjában korábban is voltak árulkodó jelek, a közelmúltban pedig egy macska hasmenéses bélsár-mintájából is sikerült azonosítani a RVI-t. Ezek a tanulmányok, a mi leírásunkkal együtt megerősítik a feltevést, hogy egy újfajta rotavirus fertőz egyes húsevő emlősfajokat.

Kutya bufavírus, CBuV

A 70 vizsgált bélsármintából összesen 26 bizonyult bufavírus pozitívnek real-time PCR módszerrel, míg a metagenomikai módszerrel két mintában (HUN/2012/22 és HUN/2012/126) találtunk újszerű parvovírusokra utaló szekvencia részleteket.

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

A kódoló szekvenciában két ORF-et azonosítottunk, a bal oldali 1917 nukleotid hosszú ORF1 kódolta a nem-szerkezeti fehérjét (NS1, 638 as), a jobb oldali, 2316 nukleotid hosszú ORF2 pedig a kapszidot alkotó két fehérjét (VP1, 710 as; VP2, 568 as) kódolta. A teljes kódoló szakasz szekvenciaillesztés elemzése rávilágított, hogy ezek az új bufavírusok jól elkülönülnek a már ismert kutya parvovírusoktól (<58% nt hasonlóság) és egyéb bufavírusokkal csoportosulnak együtt. A CBuV a főemlős (61,6-63,2% nt), valamint sertés mintákból (59,6% nt) detektált bufavírusokkal mutatta a legnagyobb hasonlóságot, míg a CPV-2 törzsekkel 45% nukleotidszintű hasonlóságot mutatott.

A filogenetikai elemzés során a kutya bufavírusok egy jól elkülönült csoportot alkottak, körülöttük patkány, denevér, sertés, és főemlős bufavírusok helyeződtek. A csoportban törzseinkhez legközelebb humán bufavírusok helyeződtek, valamint rhesusmajomból és sertésből detektált bufavírusok.

Kutyák fekális viromjában azonosítottunk, és elemeztünk egy újszerű kutya protoparvovírust, valamint real-time PCR módszerrel megszürtük a mintáinkat a lehetséges etiológiai kapcsolat feltárása érdekében. A leírt vírust, mivel legközelebbi rokonai a

bufavírusok, kutya bufavírusnak neveztük el (canine bufavirus, CBuV). Az NS1 gén tekintetében alacsony hasonlóságot mutatott mind nt (24,1-69,4%), mind as (19,3-51,4%) szintjén a *Protoparvovirus* nemzetség többi tagjával. A protoparvovírusok azonos fajba sorolhatók, ha az NS1 fehérje as sorrendje legalább 85%-ban azonos (az ICTV által meghatározott kritérium). Ezen jellemző alapján az általunk metagenomikai módszerekkel meghatározott CBuV törzsek új PV fajhoz sorolhatóak.

CBuV DNS magas prevalenciával fordult elő mintáinkban, azonban az egészséges és tünetmentes állatok közötti prevalencia különbség nem volt szignifikáns. Ez utalhat arra, hogy a CBuV a kutya fekáliis viromjának gyakori alkotója.

Új tudományos eredmények

1. Magyarországon először végeztünk metagenomikai vizsgálatot menhelyi körülmények között élő kutyák mintáiból.
2. Magyarországon először sikerült kimutatnunk kutyákból astrovírust és vizsgáltuk e vírusok genomszerkezetét.
3. Magyarországon először mutattunk ki kutya calicivírust, mely kutya vesivírusnak bizonyult. Ennek a törzsnek a részleges genomját meghatároztuk és elemeztük.
4. Magyarországon először mutattunk ki kutya kobuvírust metagenomikai és RT-PCR módszerekkel.
5. A világon elsőként elemeztük egy kutya RVC genomját.
6. Leírtunk egy eddig ismeretlen rotavírust kutyában (*Rotavirus I*), melyet azóta az ICTV új fajként is elfogadott.
7. A világon először mutattunk ki kutyában új, bufa-szerű parvovírust és meghatároztuk e vírusok fehérjekódoló genomi szekvenciáját.

A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

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

IF: 7,422

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

IF: 2,484

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

IF: 3,192

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

IF: 6,994

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

IF: 0,212

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

IF: 0,185

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

IF: 0,364

2. Könyvek, könyvfejezetek

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

3. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt

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

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

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

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

4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

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

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

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

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

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

IF: 0,787

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

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

IF: 2,768

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

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

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

A munka anyagi háttérét a Lendület program biztosította.