

37. OTDK Biológia Szekció

Egyes DNS vírusok felmérése és genetikai jellemzése Budapest környéki kételtű populációkban

Screening and genetic characterisation of certain DNA viruses
in amphibian populations near Budapest

Fülei Zsombor Nimród
Biológia BSc, III. évfolyam



Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

Magyar Kutatási Hálózat, Állatorvostudományi Kutatóintézet

Témavezető:

Dr. Papp Tibor, PhD, tudományos főmunkatárs
Magyar Kutatási Hálózat, Állatorvostudományi Kutatóintézet

Társtémavezető:

Dr. Herczeg Dávid, PhD, tudományos munkatárs
HUN-REN-ELTE-MTM Integratív Ökológia Kutatócsoport

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
2.1 Békák (Anura)	4
2.1.1. Erdei béka (<i>Rana dalmatina</i>)	4
2.1.2. Barna varangy (<i>Bufo bufo</i>)	5
2.2. Vírusok	6
2.2.1. Kétéltűek vírusai	7
2.2.2. CRESS-DNS vírusok, cirkovírusok	7
2.2.3. Herpeszvírusok, alloherpeszvírusok	9
2.2.4. Ranavírusok	10
3. Célkitűzések	12
4. Anyag és módszer	13
4.1 Minta gyűjtés	13
4.2 DNS kivonás	14
4.3 Polimeráz láncreakció (PCR)	15
4.4 Gélelektroforézis	17
4.5 PCR amplikon tisztítása	17
4.6 Sanger-féle szekvenálás	17
4.7 Bioinformatikai elemzés	18
4.8 Új primerek tervezése	18
5. Eredmények	20
5.1. Cirkovírusok	21
5.2. Alloherpeszvírusok	24
5.3. Ranavírusok	26
6. Megbeszélés	27
7. Összefoglalás	34
8. Summary	35
9. Köszönetnyilvánítás	36
10. Irodalomjegyzék	37

1. Rövidítések jegyzéke

as	aminosav
BfCV(e)	bufonid cirkovírus (endogén)
BfHV-1	bufonid herpeszvírus 1
Blast	Basic Alignment Search Tool
bp	bázis pár
cap	kapszid fehérje kódoló gén
CMTV	common midwife toad vírus (közönséges dajkabéka vírus)
CRESS-DNS	cirkuláris replikáció asszociált fehérje-kódoló szimpla szálú DNS
CV	cirkovírus
CVe	(gazdagenomba beépült) endogén cirkovírus
CyV	ciklovírus
dsDNS	dupla szálú DNS
EHNV	epizootic hematopoietic necrosis virus (epizootikus vérképzőszervi nekrozis vírus)
FV3	frog vírus 3 (béka vírus 3)
GC arány	guanin és citozin arány
HV	herpeszvírus
HUN-REN ÁTKI	Magyar Kutatási Hálózat, Állatorvostudományi Kutatóintézet
Id	„Identities”, aminosav azonosság (%) a BlastX keresés során
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság
IIV	gerinctelen iridovírus (invertebrate iridovirus)
kbp	kilobázis (1000 bázispár)
MCP	fő kapszid fehérje
Milli-Q víz	Millipore MilliQ ultratiszta víz
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
nt	nukleotid
ORF	nyitott leolvasási keret
PBS	foszfát puffertolt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PCV	sértés cirkovírus
pol	DNS-dependens DNS polimeráz
Pos	„Positives”, aminosav hasonlóság (%) a BlastX keresés során
qPCR	kvantitatív PCR (valós idejű PCR, real-time PCR)
RaHV	ranid herpeszvírus
rep	replikáció asszociált fehérje
RV	ranavírus
SGIV	Singapore grouper iridovirus (szingapúri fűrészesfogú sügér iridovírus)
ssDNS	egyszálú DNS
TAE	trisz-acetát-EDTA

2. Bevezetés

2.1 Békák (Anura)

A békák (Anura) a kétélűek (Amphibia) osztályának legnépesebb rendje. Mint az osztály neve is mutatja egyedfejlődésük szokatlan utat jár be a többi gerinceshez képest. Általánosságban elmondható, hogy a megtermékenyítés után a peték vizes környezetben fejlődnek lárvává, majd a lárvá az átalakulást követően többnyire a szárazföldön fejlődik kifejlett békává. A kifejlett állatok életük túlnyomó részét is itt töltik és legtöbbször csak a szaporodási időszakban térnek vissza a vízbe. A táplálkozás szempontjából is találó az osztály neve, ugyanis az ebihalak növényi eredetű, ritkábban állati vagy mikrobiális eredetű táplálékot fogyasztanak, míg az összes ismert kétélű kifejlett állapotában ragadozó. A békák a fajok 88%-át kitevő kétélű csoport [1], minden kontinensen megtalálhatóak az Antarktika kivételével, ám legnagyobb diverzitásuk a trópusokon figyelhető meg. A rend tagjai közt rengeteg az anatómiai hasonlóság, a legfontosabbak ezek közül a megnyúlt, ugráshoz alkalmazkodott hátsó lábak, az általában nedves bőr, melyen keresztül a gázcseréjük jelentős hányadát végzik, a farok hiánya, valamint az összenőtt sing- és orsó- valamint szárkapocs- és sípcsontok [2]. A rend hozzávetőleg 240 millió éve alakult ki, a korai triászban, majd ezt követően 163 millió évvel ezelőttre tehető a Neobatrachia alrend ősi képviselőinek megjelenése, alrendbe tartozik a legtöbb ma élő béka, köztük a valódibéka-félék (Ranidae) és a varangyfélék (Bufonidae) családja is [3].

2.1.1. Erdei béka (*Rana dalmatina*)

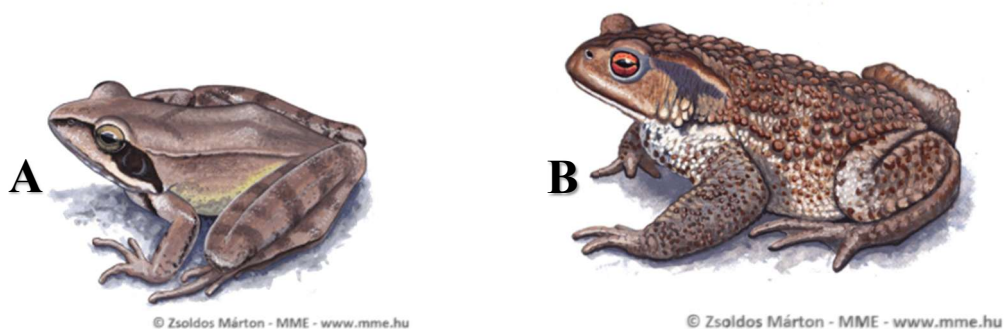
Az erdei béka (*Rana dalmatina*) a valódibéka-félék családjának tagja. Közepes termetű, és feltűnően hosszú hátsó lábakkal rendelkező faj. A nőstények 6-8 cm, a hímek 5-6 cm hosszúra nőnek. Színe világosbarna, sötét foltokkal, a legjellemzőbb mintázata a sötét kantár- és halántéksáv. A dobhártyája kisebb és közelebb helyezkedik el a szemhez, hozzá leginkább hasonlító gyepi béka esetében. Hátsó lábain sötét keresztsávok láthatók, hasoldala egyszínű, fehéres árnyalatú, egyenletes színátmenetű a hátával (**1. ábra**). Ebihalaik sötéten foltozott farokzászlóval és robusztus testtel rendelkeznek. Lábai pihenés közben összeérnek a test mögött.

A gyepi békától (*Rana temporaria*) és a megjelenésében szintén hasonló mocsári békától legkönnyebben a hegyes orráról, egyszínű hasáról, valamint hosszú lábairól, melyeket előre hajtva a sarokizület túlnyúlik az orron, lehet elkülöníteni.

Európában a Pireneusoktól egészen a Fekete-tengerig megtalálható, beleérve az Appennini-félszigetet és a Balkánt, északon egészen Dél-Svédorszáig terjed. Hazánk egyik leggyakoribb

faja, ugyanis az alacsonyabban fekvő, lombos erdőket kedveli, 1000 méter felett nem található meg.

Az erdei béka főként éjjel aktív, de magas páratartalmú, nedves időben nappal is látható. Főként rovarokkal, férgekkel és meztelencsigákkal táplálkozik, amelyeket az erdő aljnövényzetében keres. Hosszú ugrásokkal halad, meneküléskor akár 1-2 métert is ugrik. Peterakóhelyei tiszta vizű, időszakos erdei tavak. A hímek már február végén-március elején megjelennek a szaporodási helyeken, a párzási időszak április közepéig tart. A hímek halk, kattogó hangot adnak, de kórust nem alkotnak. Néhol az élőhelye átfed a gyepi békáéval és ilyenkor gyakran megfigyelhetünk vegyes amplexust, de hibridizáció nem történik. 400-2000 petét raknak gömbölyű csomókba, a kisbékák május végén-júniusban hagyják el a vizet. Az erdei béka késő ősziig aktív, és kövek, fatuskók alatt telet át. Mint minden kételtű és hüllő, így az erdei béka is védett Magyarországon, természetvédelmi értéke 10000 Ft [4].



1. ábra: (A) Az erdei béka (*Rana dalmatina*) és (B) a barna varangy (*Bufo bufo*) illusztrációi [4], [5].
(Zsoldos Márton festményei)

2.1.2. Barna varangy (*Bufo bufo*)

A barna varangy (*Bufo bufo*) egy a varangyfélék (Bufonidae) családjába tartozó faj. Nagy, erőteljes testű békafaj, ahol a nőstények hozzávetőleg 8-11 cm, a hímek 5-8 cm hosszúak. Bőrük gömbölyded dudorokkal borított, fejük hosszúkas, az orrcsúcs lekerekített, a pupilla tojásdad alakú, a szivárványhártya réz-arany színű. A dobhártya kicsi, alig látható, a fültömirigyek jól fejlettek. A hátulsó végtagok hosszú, úszóhártyás ujjakkal rendelkeznek. A hátoldal színe barnás vagy olívbarna, sötétebb foltokkal, nászidőben pedig egyszínű barna, míg a has fehéres, gyakran sötétén márványos (**1. ábra**). Az ebihalak feketék, légzőnyílásuk a test bal oldalán található, farokvégük lekerekített.

Európában mindenhol megtalálható, az Ír-szigeten és az Észak-Számiföld kivételével. Kelet felé egészen az Altaj-hegységig terjed, délkeletfelé pedig Anatóliában húzódik a faj elterjedtségének határa. Magyarország egyik leggyakoribb békafaja, sík-, domb- és

hegyvidéken egyaránt megtalálható, amennyiben nincs szárazság vagy tartósan víz alatt az élőhely. Főként erdőtársulásokban fordul elő, a nagy kiterjedésű famentes területeket kerüli. Településeken előfordul, bár rokon fajánál, a zöld varangynál ritkább.

Hazánkban általában novembertől februárig telel, szárazföldi, fagymentes helyeken, akár csoportosan is, ám ez az időszak részben a mikroklimatikus viszonyoktól is függ. Főleg tavakban, holtágakban, pocsolyákban szaporodik, erős szaporodóhely-hűség jellemzi, képesek hatalmas távolságokat is megtenni ilyenkor. A nőstény több méter hosszú petezsinórban akár 7000-10000 petét is lerak, melyeket a vízi növényzet köré csavar. Az egy víztestben élő fekete ebihalak sokszor 1-2 nap leforgása alatt alakulnak át. A kis varangyok eleinte nappal aktívak, majd távolabb vándorolnak a víztől. Táplálékukat, amely elsősorban ízeltlábúakból, puhatestűekből, gilisztákból áll, alkonyatkor és hajnalban szerzik meg, gyakran „ülni és várni” módszerrel, ritkábban aktívan keresve. Veszély esetén testüket felfújják, és mérgeik, a bufotoxin, a legtöbb ragadozót elriasztja. A vízisiklók, madarak és emlősök azonban immunisak a mérgeire vagy ügyesen kiforgatják a varangyot a mérget termelő bőréből. Mint minden kétélű és hulló, így az erdei béka is védett Magyarországon, természetvédelmi értéke 10000 Ft [5].

2.2. Vírusok

A vírusok a sejtes élet mindenütt jelenlévő parazitái, a Földön a legnagyobb számban előforduló organizmusok. Széles körben elfogadott, hogy egy polifiletikus csoport, de pontos eredetük még mindig homályba vész. Hagyományosan három lehetséges forgatókönyvet tartanak számon: 1) reduktív evolúció celluláris ősekből, 2) leszármazás primordiális, precelluláris genetikai elemekből, 3) a gének kiszabadulása a celluláris gazdaszervezetekből és parazita genetikai elemmé válásuk [6]. Egy friss tanulmány az utóbbi kettőt egyesítve egy „kiméra” forgatókönyvet vázolt fel, amely szerint a különböző típusú primordiális, önző replikonok vírusokat hoztak létre azáltal, hogy a virionképzéshez gazdafehérjéket toboroztak. E folyamat mentén vírusok új csoportjai az élet evolúciójának minden szakaszában ismételtelen megjelentek [7]. A vírusok és gazdaszervezeteik közötti folyamatos küzdelem egy szüntelen fegyverkezési verseny kialakulásához vezetett, ahol a fegyvereknek is tekinthető gének gyakran cserélődnek a résztvevők között [8].

A modern genetikai módszerek és a metagenomika térhódításával az újonnan leírt és osztályozásra váró vírusok száma tetemes mértékben növekszik. A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (ICTV), ezzel lépést tartva, a vírusoknál korábban nem alkalmazott taxonokat is bevezetett a vírusok osztályozására, valamint az eukarióta taxonómiában

megszokott binomiális fajnevek használatát is előírta. Határozatuk szerint, valamennyi vírus taxonnév dőlt betűvel írandó. A közismert Baltimore-féle rendszer felváltották a birodalmak, ezek a következők: *Adnaviria*, *Duplodnaviria*, *Monodnaviria*, *Riboviria*, *Ribozyviria*, *Varidnaviria*. A dolgozatban tárgyalandó víruscsoportok a *Duplodnaviria* és *Monodnaviria* birodalmakba tartoznak [9].

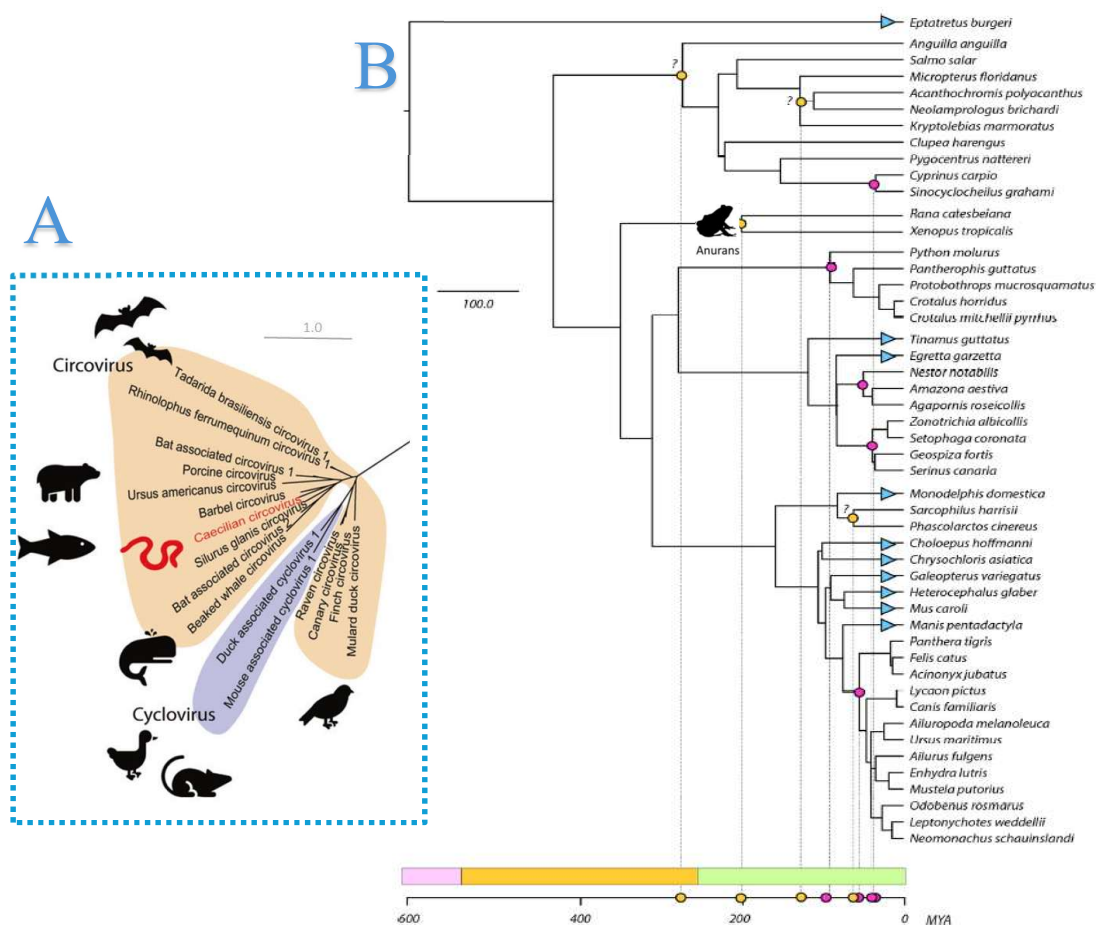
2.2.1. Kétéltűek vírusai

A kétéltűek, köztük a békák betegségeiről csupán az elmúlt pár évtizedben kezdett nőni a tudásunk. Ennek egyik oka a megnövekedett igény a háziállatként tartásukra ám fontos szempont, hogy a szakértők felismerték, a kétéltű populációk sokkal nagyobb arányban csökkennek, mint más gerinces osztályok képviselői, melyben az élőhelyeik elvesztésén túl a patogének is jelentős szerepet játszanak. A poikilotherm gerinceseket gyakran nem fajspecifikus, sőt nem is osztályra specializálódott kórokozók fertőzik, melynek egy potenciális magyarázata lehet a kevésbé fejlett adaptív immunrendszerük. A legfontosabb kórokozó vírusként számontartott ranavírusok mellett, kimutattak illetve izoláltak már herpeszvírust, adenovírust, calicivírust és számos retrovírust is [10]. Metagenomikai módszerrel mutattak ki továbbá adomavírusokat és papillomavírusokat is kétéltűekből [11].

2.2.2. CRESS-DNS vírusok, cirkovírusok

A CRESS-DNS (circular replication associated protein-encoding single stranded DNA) vírusok a Cressdnaviricota törzsbe tartozó vírus csoport, nevüket a gyűrűbe záródó, szimpla szálú DNS-ből (ssDNS) álló genomjukról, illetve az abban kódolt replikációért felelős génjükéről kapták. Ezek az egyik legkisebb méretű, eukariótákat fertőző vírusok, mindössze 15-25 nm átmérőjű ikozaéderes kapszidjukkal [12]. A modern molekuláris biológiai technikák fejlődése révén később rengeteg új CRESS-DNS vírust fedeztek fel különféle eukarióta élőlényekben, sokféle élőhelyről származó mintákból. Előfordulásuk különösen változatos bélsármintákban [13].

A *Circoviridae* családot két nemzetség alkotja, a *Cyclovirus* (CyV) illetve a család nevét adó *Circovirus*, ezek genomjában két gén, a kapszidfehérje kódoló (cap) illetve a replikáció iniciátor fehérjét kódoló (rep) egymással ellentétes orientációban (ambiszensz genom) helyezkednek el, filogenetikai viszonyaikat a **2/A. ábra** mutatja. A két nemzetség közt markáns különbség, hogy a replikációs origóhoz képest e két gén iránya ellentétes (pozitív/negatív ill. negatív/pozitív) a DNS szálon [14].



2. ábra: (A) A cirkovírusok és ciklovírusok Rep fehérje alapján számított filogenetikai kapcsolatai, (B) valamint az endogén cirkovírusok gazdafajainak filogenetikai fája.

(A) A részleges Rep fehérje szekvenciája (131 as) alapján származtatott fán pirossal kiemelve az egyetlen lábatlan kétéltű eredetű CV látható, amely metagenomikai elemzés eredményeként nyert adat, infekatív, avagy endogén (CV/CVe) jellege nem ismert. A mérce a szubsztitúciós arányt jelöli [11].

(B) A gerinces fajok evolúciós kapcsolataira vetítve az endogén cirkovírusok (CVe) evolúciójának feltételezett idővonala (lásd az ábra alján, millió években). A rózsaszín körök az igazolt ortológokat jelzik. Sárga körök jelzik a potenciális ortológok jelenlétét. Kék háromszögek pedig azokat az ismert CVe lókusztokat, amelyeknél nem volt becsülhető az evolúciós koruk [20].

A család ismertebb tagjai, a patogén sertés cirkovírusok [15] és a madarak csőr-toll szindrómáját [16] okozók mellett számos más madár és emlősfajból (köztük emberből) [17], sőt halakból is [18] mutattak már ki infekatív CV-t, változó patogenitási jellemzőkkel. Érdekesség, hogy halakból történt első teljes CV leíráshoz hasonlóan, kétéltűekből is először hazánkban történt meg CV rep szekvenciák kimutatása. Észak-Magyarországon elhullott barna varangyból nyert cirkovírus részleges rep szekvencia és egy hasonló szakasz, egy fogságban tartott ausztrál levelibékában (*Litoria caerulea*) eltérő cirkovírusából került közlésre [19]. Ezen két példán kívül két másik békafaj esetében, az amerikai ökörbéka (*Lithobates catesbeianus*) és egy karmosbéka faj (*Xenopus tropicalis*) esetében genomba beépült, úgynevezett endogén

cirkovírusokat (CVe) találtak. Ezek a szekvenciák olyan cirkovírusok genomjaiból származnak melyek több millió évvel ezelőtt szabadon léteztek, majd a gazda állat csírávonalába integrálódtak [20]; evolúciós múltjukat a **2/B ábra** mutatja [11].

2.2.3. Herpeszvírusok, alloherpeszvírusok

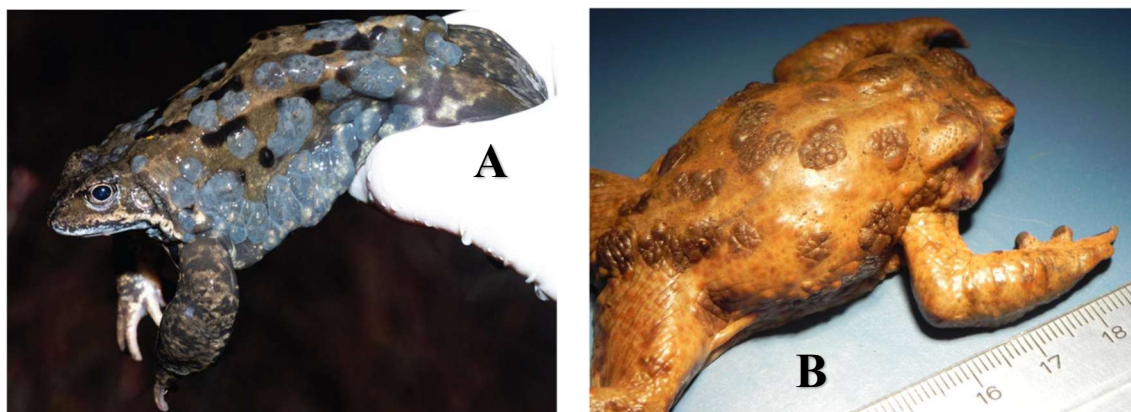
A herpesz vírusok a *Herpesvirales* rend tagjai, genomjuk lineáris, 125-260 kbp hosszú és dsDNS alkotja. Kapszidjuk ikozaéder alakú, melyet citoplazmatikus membránból származó lipid burok borít [21]. A családon belül 12 homológ gén található, szemben az orthoherpesz vírusokkal, ahol 40 található. Ezek a fő strukturális fehérjéket, replikációért felelős enzimeket és virionba csomagolásért felelős fehérjéket kódolnak. Ugyanakkor egy nemzetségben belül 40-60 homológ gén található.

Az összes ismert kétélűeket fertőző herpeszvírus az *Alloherpesviridae* családon belül a *Batravirus* nemzetségbe tartozik. Ebbe a családba tartoznak a kétélűek mellet a halakat fertőző herpeszvírusok is. A *Batravirus* nemzetségben jelenleg 4 fajt sorolunk, ezek a Ranid herpesvirus-1, -2, -3 (RaHV-1, -2, -3) valamint a Bufonid herpesvirus-1 (BfHV-1) [22]. Elsőként a RaHV-1-et írták le északi leopárd békák (*Lithobates pipiens*) vese tumoros elváltozásából [23], majd 3 évtizeddel később a RaHV-2-t szintúgy tumoros leopárd békák vizeletéből [24]. A két legújabban felismert béka herpeszvírust (RaHV-3 és BfHV-1) az elmúlt 7 évben írták le svájci kutatók, az előbbi gyepi békából [25] míg az utóbbit barna varangyból [26].

A Ranid herpesvirus-3 vírussal fertőzött egyedek sok esetben súlyos proliferatív bőrelváltozásokat mutatnak, amit multifokális, gyengén körülhatárolt, világosbarnától szürkésig terjedő színű, enyhén kiemelkedő, kemény bőrfoltok jellemeznek, s amelyek átmérője 1-3 mm között változik (**3/A ábra**). A háton súlyosabbak a bőrelváltozások, azonban a hasi oldalon is megjelenhetnek a nyaktól a has aljáig, valamint a combok háti oldalán. A bőrelváltozások epidermális hiperpláziát mutatnak, mely a bőr normál vastagságához képest háromszor vastagabb. A vastagabb epidermiszben világos sejtközötti terek alakulnak ki. Az érintett bőrterületeken dermális ödéma, limfociták és degenerálódott nyálkamirigyek is megjelennek. A vírus genomja 208 kbp hosszú, rajta 186, legalább 90 kodon hosszúságú nyitott leolvasási keret (ORF) található. Ezekből 41 mutat hasonlóságot a Ranid herpesvirus-1 vagy -2 genomjával. A GC arány 42%-os [25]. Vizsgálataink kezdetéig a vírus jelenlétét több európai országból (Egyesült Királyság, Norvégia, Svájc és Németország), ugyanakkor mindössze két fajban, a gyepi- és erdei békában mutatták ki [27], [28].

A Bufonid herpesvirus-1 szintúgy patogén a fertőzött egyedek bőrén szabad szemmel vizsgálva kiemelkedő, kör alakú, barna, multifokális foltok figyelhetők meg. A barna foltokat

szövettanilag az epidermisz hiperpláziája okozza, amely így akár ötször vastagabb is lehet a normálnál. Az érintett területeken sejtközötti ödéma, parakeratózis és diszkeratózis is jelentkezik, bár nem minden esetben. A vírus genomja 158 kbp hosszú, rajta 152, legalább 90 kodon hosszú ORF található. Ezekből 51 mutat hasonlóságot a RaHV-1 vagy -2 genomjával. A GC arány 41%-os.



3. ábra: Az Európában előforduló béka herpeszvírusok okozta tipikus bőrelváltozások [25], [26].
 (A) Ranid herpeszvírus 3 (RaHV-3) fertőzés a közönséges gyepi békában, Norvégia. A bőrön multifokális vagy összenövő, enyhén kiemelkedett, szürke foltok jelennek meg (epidermális hiperplázia eredményeként), melyek a kültakaró nagy részére kiterjednek, ezek között a normál bőr látható. © Jeroen van der Kooij [25].
 (B) Bufonid herpeszvírus 1 (BfHV-1) okozta durva bőrelváltozások barna varangyon. Multifokális domború hólyagok, sötétbarna, foltos bőrfelületek elszórtan helyezkednek el a varangy hátán [26].

2.2.4. Ranavírusok

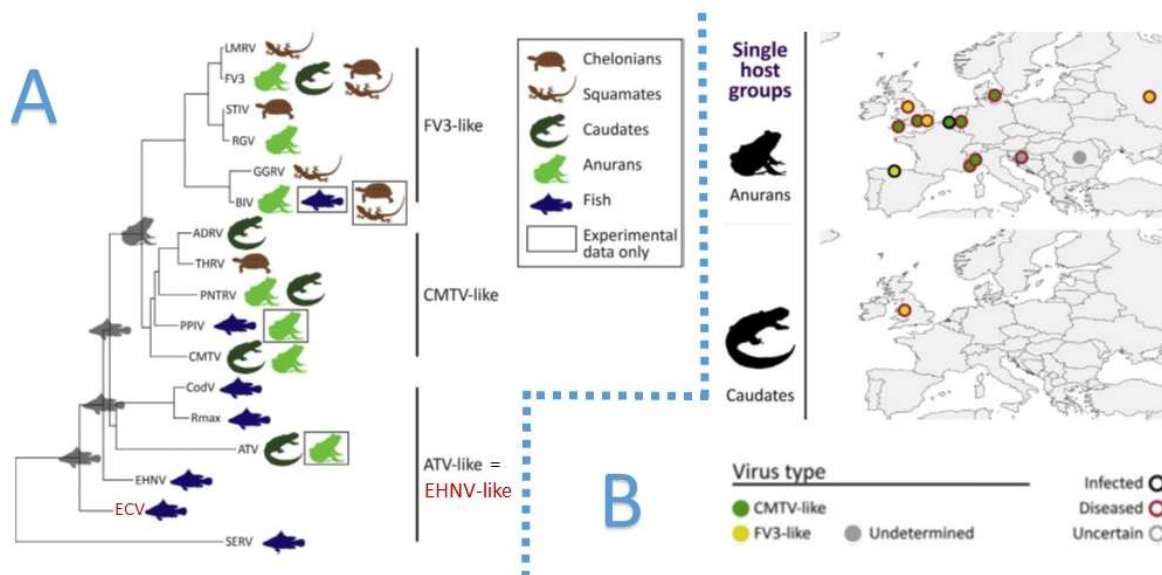
A *Ranavirus* az *Iridoviridae* család egyik nemzetsége. Az *Iridoviridae* család nagy, ikozaéder kapszidú, kétszálú DNS-t tartalmazó vírusokból áll, két alcsaládra osztható: *Alphairidovirinae* és *Betairidovirinae*. Az első főként poikiloterm gerinceseket (halakat, kétélűeket, hüllőket) fertőz, míg a második gerincteleneket (rovarokat, rákokat). A vírusok szaporodása a sejtmagban és citoplazmában történik, és az érett virionok sejtlízissel vagy membránbimbózással szabadulnak ki [29].

A *Ranavirus* nemzetség tagjai kétélűeket, hüllőket és csontos halakat fertőznek. A vírus fertőzés, különféle klinikai tüneteket eredményezhet, például belső szervi vérzést, bőrleválást és külső bőrvérzéseket. A jelenleg azonosított ranavírusok között a fő kapszidfehérje szekvenciaazonossága körülbelül 70% vagy annál magasabb.

A burkos virion 160-200 nm átmérőjű, míg a burok nélküli 150 nm. A genom 104-140 kbp közt mozog és körkörösén permutált, valamint nagyjából 30%-ban terminálisan redundáns, GC aránya 49-55%. A genomban 26 a családra jellemző proteint kódoló gén található, valamint 27 a nemzetségben közösen előforduló proteint kódoló gén. A nemzetségen belül 4 alcsoporthoz/genocsoportot különítenek el, ezek nevei: FV3-szerű (Frog Virus 3-like, „béka 3

vírus” -szerű), az EHNV-szerű (Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus-like, epizootiás vérképzőszervi nekrozis vírus-szerű), a CMTV-szerű (Common Midwife Toad Virus-like, közösleges dajkabéka vírus-szerű) valamint az SGIV-szerű (Singapore Grouper Iridovirus-like, szingapúri fűrészesfogú sügér iridovírus-szerű) (4. ábra). Az előbbi három csoport tagjaiban a gének (ORF-ek) nagyfokú kolinearitást mutatnak, helyenkénti szekvencia inverziókkal és törésekkel. A filogenetikailag távolabbiként besorolt az SGIV-szerű vírusok, csak rövidebb szakaszokon kolineárisak a többiekkel, náluk jelentősebb genom átrendeződéssel találkozunk [30].

A vírus terjedése lehetséges táplálkozás és kontakt útján vagy környezeti érintkezéssel. Sok faj képes egy adott vírus megfertőzni, akár más osztályból származó állatokat is. Európában 3 alcsoport terjed, halaknál az EHNV-szerű, míg kételtűekben az FV3-szerű, valamint a CMTV-szerű vírusok. A békákat Európa-szerte, de főleg a kontinens középső részén az utóbbiak fertőzik, míg FV3-szerű vírusok Nagy-Britannia, Spanyolország és Oroszország területéről is leírásra kerültek (4. ábra). Jelentős (olykor tömeges) elhullásokkal járó fertőzéseket okozhat egyes fajokban mindkét „kételtű-RV” csoport, s együttes jelenlétüket is kimutatták észak-spanyolországi területen, a beszámolóban kiemelve a klímaváltozás szerepét is e fertőzések kiváltó okaként [31], [32].



4.ábra: (A) A Ranavírus genus alcsoportjai és azok gazdafajai, (B) közülük térképen jelölve Európa honos farkos- és farkatlan kételtű populációban előforduló típusok és hatásuk [33]

(A) A ranavírusok különböző típusainak filogenetikai kapcsolata és gazdafajspektruma. A nemzetségben leírt 3 alcsoport (FV3-szerű, CMTV-szerű, és EHNV-szerű) az ágvégektől jobbra jelölve. A feltételezett ősgazdákat (halak vagy kételtűek) a csomópontokban lévő szürke gazdaképek jelölik.

(B) A kételtűek ranavírusainak elterjedése és hatása Európában. A pontok hozzávetőleges helyeket jelölnek, és néha helyi léptékben több szomszédos esetet jelölnek, amelyek ugyanazokkal a jellemzőkkel rendelkeznek. Piros kör jelöli az elhullásokkal járó járványos eseteket, míg fekete kör a megállapított fertőzöttséget tünetek nélkül. A kör belsejében a zöld pont CMTV-szerű, a sárga pont FV3-szerű vírus fertőzöttséget mutat.

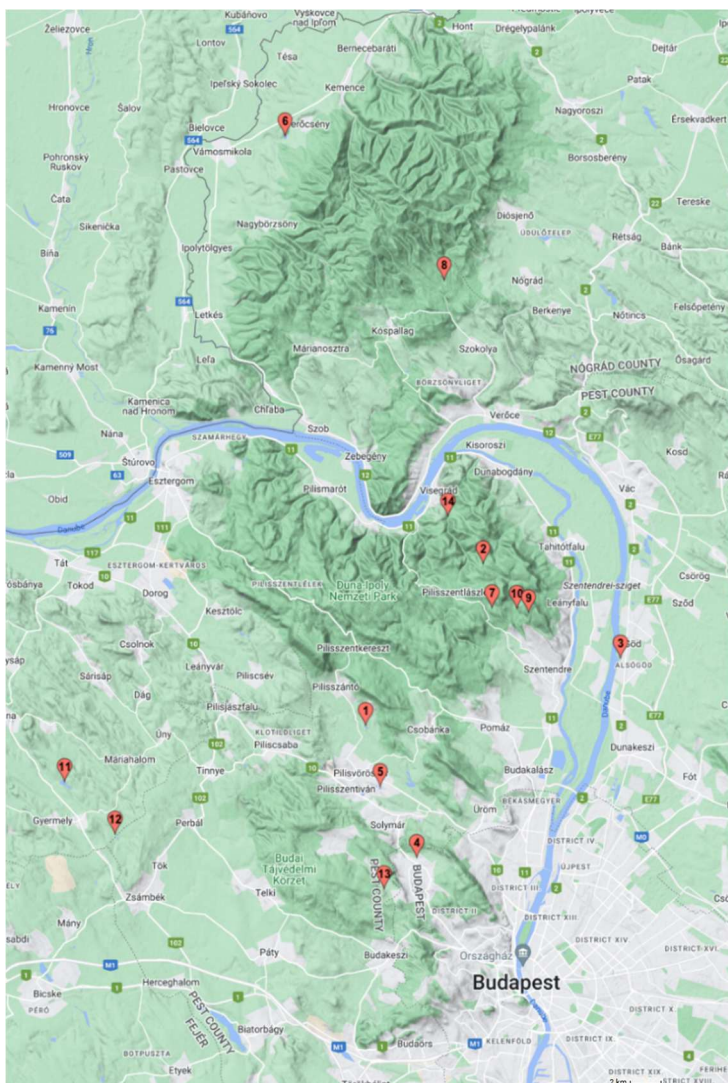
A halakat fertőző EHNV-szerű vírusok egyike, az európai harcsa vírus (ECV – European Catfish Virus) közel másfél évtizede hazánkban is felbukkant, és törpeharcsákban (*Ameiurus nebulosus*) többször is tömeges pusztulást okozott. E vírust hal szöveten izolálták és teljes genom szekvenciáját meghatározták [34], [35]. Magyarországról származó kételtű mintákból is sikerült kimutatni ranavírust, azonban csak annak DNS-ét, valós idejű PCR (qPCR) módszerrel, s alacsony kópiaszámban. Ennek tipizálása így, az alkalmazott módszer jellege miatt, nem történhetett meg [36].

3. Célkitűzések

Kutatásunk céljaként azt tűztük ki, hogy az általunk gyűjtött békákból származó tamponmintákból CRESS-DNS vírusokat, ranid herpeszvírus 3-at, bufonid herpeszvírus 1-et és ranavírust mutassunk ki. Szerettük volna az esetlegesen talált cirkovírusok teljes genomját szekvenálni, vagy endogén jellegüket bizonyítani. Továbbá célunk volt a ranid herpeszvírus 3 hazánkban előforduló típusának összehasonlítása a külföldön kimutatott törzsben lévő szekvenciákkal. Célunk volt a hazai kételtűekben detektálható ranavírust tipizálását elvégezni, és ezzel alátámasztani vagy megcáfolni azt a hipotézist, hogy saját kételtű vírustípusok (CMTV-szerű vagy FV3-szerű) vannak jelen Magyarországon is és nem csak hal-ranavírus (EHNV-szerű) típustól származó kontamináció eredménye volt a korábbi publikációban leírt qPCR alapú kimutatásuk.

4. Anyag és módszer

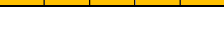
4.1 Minta gyűjtés



5. ábra: Élőhelyek, ahonnan mintát gyűjtöttünk. Az élőhelyek megnevezése az 1. táblázatban látható

A mintákat két fajból gyűjtöttük, erdei béka és a barna varangy eredetűek voltak. Mind, az összesen 104 egyedből (48 erdei béka és 56 barna varangy) vett minta 14 Budapest közeli élőhelyről származott (5. ábra, 1. táblázat). A 2023 tavaszán gyűjtött állatokból száj-, bőr- és kloáka-tamponmintát vettünk, steril mintavevő pálcákkal. A 2024 tavaszán gyűjtöttekből szájtamponmintát, illetve, a bőrelváltozásokat mutató egyedeknél, az elváltozás helyén bőrtampont is gyűjtöttünk. A pálcákat steril csővükbe visszahelyezve, -20°C-on tároltuk DNS izolálásig.

1. táblázat: Az 5. ábrán jelölt élőhelyekről gyűjtött tampon minták fajok alapján bontva. Egy sárga téglát egy egyedet jelöl. Összesen 48 minta származott erdei békákból és 56 barna varagyokból. A többes mintagyűjtés (száj-, bőr- kloákatampon) nincs külön jelölve.

Nr. (#)	Élőhely neve	Erdei béka	Barna varangy
1	Határréti-tó/2024		
2	Apátkúti víztározó/2024		
3	Feneketlen-tó/2024		
4	Hidegkúti horgásztó/2024		
5	Pálya-tó/2024		
6	Perőcsényi halastó/2024		
7	Jávor-tó/2024		
8	Bajdázó-tó/2024		
9	Katlan/2024		
10	Ilona tó/2024		
11	Gyermelyi halastó/2024		
12	Anyácsapusztai-tó/2024		
13	NÖVI tó/2024		
			
13	NÖVI tó/2023	 	
14	Pisztrángos tó/2023		

4.2 DNS kivonás

A tampon fejét steril ollóval levágva 0,5 ml foszfáttal pufferolt sóoldatba (PBS) helyeztem, majd a csövet 20 percre 37 kHz frekvencián egy Elmasonic ultrahangos szonikátor készülékben „rázattam”, hogy a tamponról leváljanak a sejtek és az esetlegesen jelen lévő szabad vírus részecskék. Ezután a felülúszóból 250 µl-t felhasználva a NucleoSpin® DNA Rapid Lyse kit-tel végeztem a DNS kivonást a gyártó utasításait követve.

A protokoll rövid, az első lépésben a mintához lízis puffert és proteináz K-t adtam, majd 56°C fokon 30 percre inkubáltam. A második lépésben DNS kötődést segítő (binding) puffert mértem

a mintához majd ezt szilikát oszlopra helyeztem és 1 percig centrifugáltam 11000g gyorsuláson, majd 2 körben mosó puffer rámerése után, illetve még egy körben folyadék rámerése nélkül szárítás céljából azonos körülmények között centrifugáltam. Az utolsó lépésben a szilikát oszlopot áthelyeztem egy 1,5 ml-es csőbe és elúciós puffert mértem rá, majd szobahőmérsékleten inkubáltam 4 percig és 1 percig 11000g gyorsulással centrifugáltam.

4.3 Polimeráz láncreakció (PCR)

A DNS kivonatokból a DNS vírusokat PCR segítségével próbáltuk kimutatni. A herpesz vírusok esetén a polimeráz génre, a ranavírus esetén a fő kapszid fehérje génjére, a cirkovírus esetén pedig a rep génre tervezett primerrel végeztem az első PCR-t. Az előbbi kettő egy körös, míg utóbbi két körös („nested”) PCR volt. A PCR-reakcióelegyek összetételei a **2. táblázat**ban, a protokolljaik a **3. táblázat**ban, a használt primerek szekvenciái a **4. táblázat**ban olvashatók. A két körös PCR esetében az első, illetve második kör reakcióelegy összetétele megegyezett. Pozitív kontrollként a ranavírus kimutatásakor Frog virus 3-at (FV3), a cirkovírus kimutatására sertés cirkovírus 2-t (PCV2), míg a ranid herpeszvírus 3 és a bufonid herpeszvírus 1 kimutatására első alkalmakkor semmit nem használtam. Utóbbi két PCR esetében, az időközben pozitívnak bizonyult mintáimat használtam a későbbiekben pozitív kontrollként. A PCR-t a Biometra T-Personal Thermal Cycler és a Biorad T100 Thermocycler készülékekben végeztem.

2. táblázat: A PCR reakciókhoz használt reakcióelegyek

Összetétel:	Ranavírus	Cirkovírus	RaHV-3	BfHV-1
Milli-Q víz	8 µl	10,5 µl	8 µl	8 µl
Dream Taq Green DNA polymerase	10 µl	12,5 µl	10 µl	10 µl
Fwd primer (50µM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Rev primer (50µM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Minta	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Végtérfogat:	20 µl	25 µl	20 µl	20 µl

3. táblázat: PCR programok idő- és hőmérséklet protokollja

Ranavírus		35X	Cirkovírus		45X
Hőmérséklet	Időtartam		Hőmérséklet	Időtartam	
95°C	5 min		95°C	5 min	
95°C	30 sec		95°C	30 sec	
50°C	30 sec		46°C	1 min	
72°C	1 min		72°C	1 min	
72°C	10 min		72°C	10 min	

RaHV-3		35X	BfHV-1		35x
Hőmérséklet	Időtartam		Hőmérséklet	Időtartam	
95°C	3 min		95°C	3 min	
95°C	30 sec		95°C	30 sec	
50°C	30 sec		55°C	30 sec	
72°C	30 sec		72°C	30 sec	
72°C	10 min		72°C	10 min	

4. táblázat: Az alkalmazott PCR primerek nukleotidsorrendjei. R = A/G, W = A/T, Y = C/T, I = G/A/T/C

Target (vírus, gén)	Neve/azonosító	Termék-méret	Szekvencia (5'-3')	Ref.
RV MCP	Rana MCP Frw	500 bp	GAC TTG GCC ACT TAT GAC	[37]
RV MCP	Rana MCP Rev		GTC TCT GGA GAA GAA GAA	[37]
CV rep	CV-F1		GGI AYI CCI CAY YTI CAR GG	[38]
CV rep	CV-R1		AWC CAI CCR TAR AAR TCR TC	[38]
CV rep	CV-F2	430 bp	GGI AYI CCI CAY YTI CAR GGI TT	[38]
CV rep	CV-R2		TGY TGY TCR TAI CCR TCC CAC CA	[38]
RaHV-3 pol	RaHV-3 F	250 bp	TTA TAT TCA ATT AGA GAC CAC C	[25]
RaHV-3 pol	RaHV-3 R		GCA GGA TCG GGA GAA TGG	[25]
BfHV-1 pol	BuHV-1 F	250 bp	CAA ACT GAA GAT ACA GAA GGT TGG GG	[26]
BfHV-1 pol	BuHV-1 R		GCG CGA GTG CTT TGT ACG CAA CC	[26]

4.4 Gélelektroforézis

A gélelektroforézis során a PCR termékét 1%-os agaróz gélen vizsgáltuk, melybe 5 µl-t mértem a termékből. A gélben a termékek megfestésére 4 µl/100 ml gél koncentrációban GelRed (Biotium Inc, Hayward, USA) festéket használtunk. Molekulatömeg markerként GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus-t (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) alkalmaztunk. Az elektroforézis során 0,5 x TAE (trisz-acetát-EDTA) puffert és 100 V feszültséget használtunk. A folyamat végeztével az eredmények értékeléséhez Kodak 212 Gel Logic és VWR Imager CHEMI Premium rendszerek segítségével, UV fénnel átvilágítva készítettünk fényképeket.

4.5 PCR amplikon tisztítása

A gélelektroforézis alapján pozitívnak tűnő (specifikus méretű) PCR terméket a reakcióelegyből tisztítottam ki, vagy 1,5%-os agaróz gélen újból megfuttatva abból kivágtam. Az előbbi esetben az ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher) kitet míg a második esetben NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitet (MacheryNagel, Düren, Németország) használtam követve a gyártó utasításait.

4.6 Sanger-féle szekvenálás

A szekvenáláshoz a BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kitet (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, USA) alkalmaztam a reakció elegy összetétele a **5/A táblázatban** leírtak alapján alakult. A PCR termék koncentrációja alapján változtattuk a reakció elegy összetételét, a gélelektroforézis alapján alacsonyabb koncentrációjú termékből többet, magasabb koncentrációjú termék esetén kevesebbet raktunk az elegybe, s ennek megfelelően alakult a Milli-Q víz mennyisége is úgy, hogy a végtérfogat azonos maradjon. A reakciók protokolja a **5/B táblázatban** látható.

A reakciót a szekvenálási termék „kicsapása” követte. Minden mintához 31 µl 96% etanolt, 7,5 µl Milli-Q vizet és 1,5 µl nátrium-acetátot (3M, pH5) mértem, majd óvatos összerázást követően 15 percig sötétben és szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt 2060g-n, egy 45 perces centrifugálás követte. Ennek végén a felülúszót eltávolítottam, 280g-n egy pár másodperces centrifugával, melynek során a csöveket kinyitottam és fordítva helyeztem az eszközbe. A csövekbe ezt követően 70 µl 70%-os etanolt mértem, és az előzővel azonos gyorsuláson, 15 percig centrifugáltam és a felülúszót eltávolítottam. Végül a csöveket 10 percig sötétben

szárítottam. A kapilláris elektroforézist külső cég végezte, az eredményeket ABI formátumban ímélben kaptam meg.

Összetétel	
Milli-Q víz	0-1,5 µl
BigDye puffer	1 µl
Primer (4 µM)	1 µl
PCR termék	0,5-2 µl
BigDye	1 µl
Végtérfogat	5 µl

5. táblázat: A szekvenálási reakcióelegy összetétele (5/A) és a reakció hőmérsékleti protokollja (5/B)

Hőmérséklet	Időtartam	35X
96°C	1 min	
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

4.7 Bioinformatikai elemzés

A kapott szekvencia megjelenítésére a BioEdit program 7.2.5-ös verzióját használtam [39], a nukleotidsorrend szerkesztésére és javítására a Staden [40], illetve a Geneious programot alkalmaztam [41]. A javított szekvenciákat a NCBI Blast segítségével hasonlítottam össze a GenBank adatbázisban található szekvenciákkal.

A filogenetikai számításokat a MEGA X program segítségével végeztem, melyben referencia szekvenciaként a GenBankban elérhető egyes vírus szekvenciákat vettem alapul. A protein szekvenciák pozicionális illesztéséhez a MAFFT és Muscle algoritmust alkalmaztam, majd ezen illesztéseket szerkesztve (GBlock), modellszelekciót követően, maximum likelihood elven alapuló számításokkal generáltam a filogenetikai fákat (PhyML), s ezek megbízhatóságát ún. bootstrap analízissel ellenőriztem [42].

4.8 Új primerek tervezése

Annak érdekében, hogy a RaHV-3 Magyarországon előforduló variánsát összehasonlítsam a nyugat-európai variánssal új primereket terveztem a 97-es sorszámú ORF-re, ami egy feltehetőleg antigenításban is szerepet játszó strukturális fehérjét kódol, valamint a nem struktúr-fehérje, a DNS-polimeráz génjére. Ehhez a rendelkezésre álló egyetlen teljes genom, a svájci variáns szekvenciáját (GenBank Accesion: KX832224) vettem alapul.

Annak érdekében, hogy a barna varangy eredetű cirkovírusról bizonyítsuk annak szabad vagy endogén mivoltát a rep gén alapján két „kifelé irányuló” (inverz) primert terveztem, melyhez

alapul a rendelkezésre álló, barna varangy eredetű cirkovírus rep gént (GenBank Accession Nr.: KF358282) vettem.

A primerek tervezését a Geneious v 9.1.8 (Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis) [41] programmal végeztem. A primer tervezés során a legfontosabb szempontok melyeket figyelembe vettem, hogy az primer pár két tagjának olvadási hőmérséklete ne sokkal térjen el egymástól, 19-20bp hosszú legyen, a GC arány 40-60% közt mozogjon, illetve, hogy a primer párok egymással, se magukkal ne alkossanak stabil kettősszalú szakaszt. A tervezett primerek szekvenciája a **6. táblázatban** található. A PCR protokolt úgy módosítottam a korábban leírtakhoz képest, hogy a primerek számított olvadási hőmérsékleténél 3°C fokkal alacsonyabb legyen a primer bekötési hőmérséklet, és a szintézis lépese (elongáció) 1 kbp-onként 1 perccel növekedjen.

6. táblázat: Az általam tervezett új primerek szekvenciái

Vírus, target gén	Primer neve	Szekvencia (5'-3')
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_F	AAG CTA CAA GAA ACC TTC CG
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_R	CTA CAA GAG TCT GTG AAC GC
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_F2	GAT AAG AAA GCC CCG TTG C
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_R2	CAC AGT TCA GTC CCA GAG G
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_F3	AAT AGG TCA TAA TTC CCC CG
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_R3	AAT TAA TAC GCC CAA GCC C
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_F3.2	AGC GTC GTT AAA GAT ATC CC
RaHV-3, ORF97	RaHV_ORF97_R3.2	CAT GGA TGC ACT CTA TCT CC
RaHV-3, polimeráz	RaHV_pol_F_99	ACA GTG TCC ACA GTA CAA CA
RaHV-3, polimeráz	RaHV_pol_R_99	CAT TGG GAA AAC AAA TTG GC
Cirkovírus, rep	BuCV_Fzs_F1	TTC AAG GTG AGC ACG AGT CG
Cirkovírus, rep	BuCV_Fzs_R1	ACG TGA CTG TGA TTG TGG GA
Cirkovírus, rep	BuCV_Fzs_F2	TTG GTT GGT CGT ATC ATC AG
Cirkovírus, rep	BuCV_Fzs_R2	AGT AGC GTG ACT TTA AGA CC

5. Eredmények

A vírusfertőzöttség felméréséhez alkalmazott PCR-ek és a képződött termékek szekvencia-meghatározásának eredményeit a **7. táblázatban** foglaltam össze. Az egyes vírus-csoportokra bontott részletes ismertetésük a következő alfejezetekben olvasható.

7. táblázat: A „virus-screening PCR-ek” és amplikon-szekvenálások eredményeinek összefoglalása.

Egy feketén keretezett rubrika egy állatot jelöl (lásd **1. táblázat**). A színes háttérben szereplő rövidítések az adott a vírusra alkalmazott PCR pozitív vagy kétes (fals) eredményét jelölik, míg a mindhárom vírusra negatívra tesztelt egyedek rubrikái üresen maradtak. Az élőhelyek teljes neve az 1. táblázatban szerepel.

Rövidítések: BfHV: bufonid herpeszvírus 1, CV: cirkovírus, CyV: ciklovírus, CoCV: columbid /galamb/ cirkovírus, IIV: gerinctelen /invertebrate/ iridovírus, RaHV: Ranid herpeszvírus 3, RV: ranavírus.

A „cv?” olyan specifikus méretű amplikonokat jelent melyekből nem kaptunk értelmezhető szekvenciát. A zárójeles (CV) jelöléssel pedig olyan termékeket jelöltem, amelyek a konszenzus CV PCR-ben vagy nagy mennyiségű, de aspecifikus méretű terméket eredményeztek (citromsárga), vagy szekvenálás után nem cirkovírus eredetűnek bizonyult az egyébként specifikus méretű termék (narancssárga).

Nr. (#)	Élőhely neve	Erdei béka				
1	Határréti-tó			RaHV		cv?
2	Apátkúti...					
3	Feneketlen-tó	RaHV				
		IIV				
4	Hidegkúti...					
5	Pálya-tó			(CV)		RaHV
6	Perőcsényi...					
7	Jávor-tó					
8	Bajdázó-tó					
9	Katlan		RV			
10	Ilona tó					
11	Gyermelyi...					
12	Anyácsa...					
13	NÖVI tó					(CV)

13	NÖVI tó/2023	RaHV	(CV)	(CV)	RaHV	(CV)
		CyV	RaHV	CoCV		
		RaHV		RaHV		
14	Pisztr. tó/2023					

Barna varangy				
BfCV	BfCV			
cv?		cv?		
BfHV				
BfCV	(CV)	(CV)	cv?	cv?
BfCV				
cv?				(CV)
BfCV	(CV)	(CV)	(CV)	
				cv?

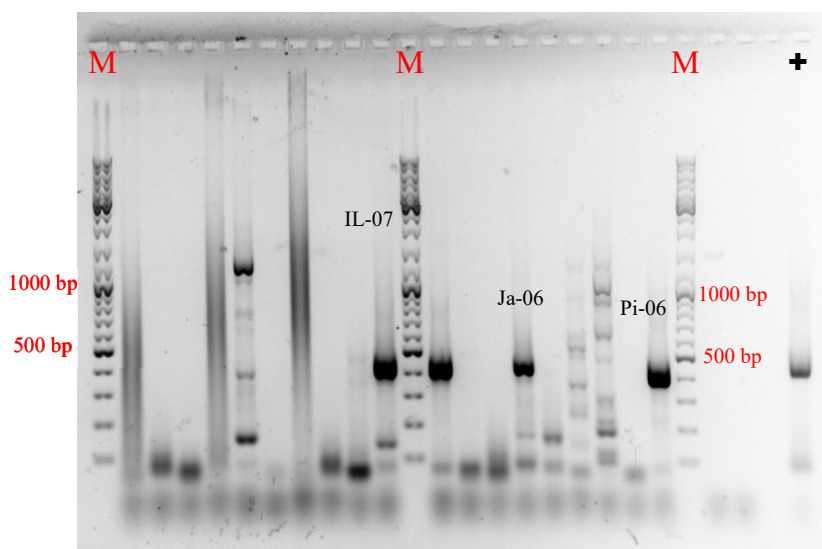
	BfCV	cv?		
		(CV)		BfHV
cv?			cv?	
cv?				

	BfCV	BfCV	BfCV
--	------	------	------

BfCV	BfCV
------	------

5.1. Cirkovírusok

Bufonid cirkovírus (BfCV) eredetű részleges rep gén szekvenciát 11 barna varangyból sikerült kimutatni (5. ábra és 1. táblázat: #1, #4, #5, #7, #10, #13 és #14 élőhelyek) (7. táblázat sötétkéék rubrikák). Az amplikonok (430 bp) (6. ábra) nukleotid szekvenciája 76–99% nt hasonlóságot mutatott a GenBank-ból ismert BfCV részleges rep szekvenciával (GenBank Accession: KX832224).



6. ábra: A konszenzus-CV PCR második körének termékei agaróz gélen szétválasztva. A molekulatömeg marker (M) 100 bp-os lépésközzel rendelkező „létra”. A specifikus termékméret 430 bp. A jobb oldalon a pozitív kontroll látható „+” -val jelölve, és vonalában baloldalt és középen a pozitív termékek az élőhely nevének rövidítése és a békaegyed sorszáma alapján. Csak azon minták lettek jelölve, melyeknél a termék specificitását szekvenálással bizonyítani tudtuk.

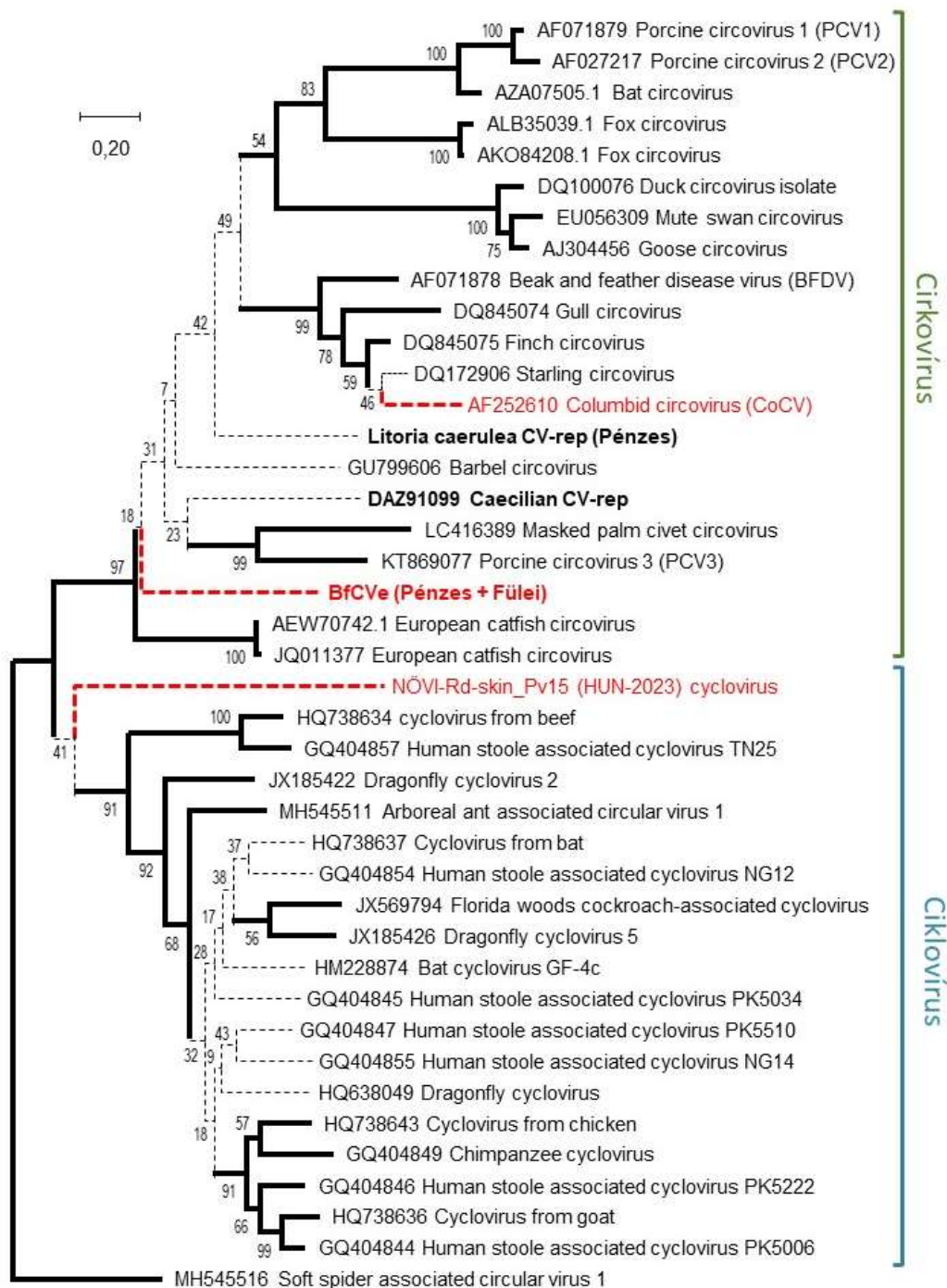
A 2023-ban megismert szekvenciák alapján, általam tervezett, „kifelé irányuló” (inverz) primerekkel végzett PCR-ek egyike is várthoz közeli hosszúságú (1300 bp) terméket eredményezett, s ennek szekvencia olvasata is kielégítő volt egyik irányból. (A másik irányból szétbogozhatatlan keverék-szekvenciát mutatott az elektroforetogramm.) Az ezúton megismert további ~700 nt hosszúságú új szakasz illeszthető volt a fenti 430 nt szakasz 3' végéhez. Ennek a szekvenciának azonban csak a „befelé eső” mintegy 280 nt hosszúságú részén mutatott BlastX hasonlóságot a GenBank „nr” protein adatbázis bármely adatával, s a vártaknak megfelelően a CV rep szekvenciákkal. Legmagasabb értékkel (57% as azonosság, 75% as hasonlóság; Identity/Positives – Id/Pos = 59/75%) a gyurgyalag cirkovírus rep fehérjére (UMM62403) hasonlított ez a szakasz. Az inverz PCR amplikon szekvenciájának fennmaradó, „kifelé eső” része, nem talált sem BlastN, sem BlastX, kereséssel homológ egyetlen GenBank-i „nr” adatbázisokban felelhető adattal sem. Ugyanakkor az eukarióta teljes genom projektek (Whole-genome shotgun contigs /wgs/ database) - kételtűekre szűkített - nyers adataiban keresve BlastN

algorimussal, már kapunk találatokat. Három barna varagy szekvencia kontiggal (CAJIMM010014670, CAJIMM010002988 és CAJIMM010003000) (Id: 78–88%) továbbá az Észak-Amerika nyugati partvidékén élő *Anaxyrus boreas* varagyfaj (Id: 75%) és a Közép-Amerikában őshonos óriás varagy (*Rhinella marina*) (Id: 74%) kontigokkal (JBEFLT010000003 és ONZH02000620 mutatnak szekvenciáink magas fokú hasonlóságot.

A CV szűrésre használt kétkörös PCR során további 10 esetben, amikor specifikus méretű termék keletkezett a barna varagy mintákból, sajnos nem sikerült értékelhető szekvencia adatot nyernem (**7. táblázat** világoskék és narancssárga mezők).

Az erdei békák esetén ugyanez a kétkörös konszenzus PCR csupán 4 minta esetében adott specifikus méretű terméket (**7. táblázat** sötétkék és narancssárga rubrikák). Ezek egyike egy galamb cirkovírusok homológ rep részletével volt szinte azonos (OQ184742; nt Id: 95%). A másik a gyeplibéka genom projekt nyers adatainak számos kontigjával (pl. CAJIML010000624) mutatott nagyfokú hasonlóságot (nt Id: 93%) ugyanakkor –a BfCV fentebb leírt eseteitől eltérően– BlastX kereséssel sem mutatott homológiát CV rep fehérjékhez. A harmadik erdei béka mintából képződött PCR amplikon egy eddig ismeretlen ciklovírusnak bizonyult. Ez a BlastX keresésben legnagyobb hasonlóságot a denevér eredetű 2-es számú ciklovírus (Bat associated cyclovirus 2) homológ génrészletével (UOI84984) adta (as Id/Sim: 45/57%). A negyedik PCR termékből sajnos nem kaptunk értelmezhető szekvenciát.

A filogenetikai számítások eredményét a **7. ábra** mutatja. A fentebb felsorolt saját cirko- és ciklovírus nt szekvenciákból származtatott as (részleges rep fehérje) adatok összehasonlítása látható a GenBank-ból lehívott rep fehérjékkel. Ezek közül kettőt kiegészítettünk, a HUN-REN ÁTKI korábbi munkatársa (Pénzes Judit) munkáiból időközben rendelkezésünkre bocsájtott [Tarján Zoltán, személyes közlés] adatokkal. Azaz, az eddig csak rövidebb részben publikált ausztrál levelibéka CV és BfCV [19] eredmények is meghosszabbítva szerepelnek az összehasonlításban. A filogenetikai fán (**7. ábra**) jól kirajzolódik a *Circoviridae* család két nemzetsége, s a *Circovirus* nemzetségen belül a kétélű CV-ok viszonylag bazális (ősi) helyeződése a poikiloterm gazdák vírusaihoz képest.

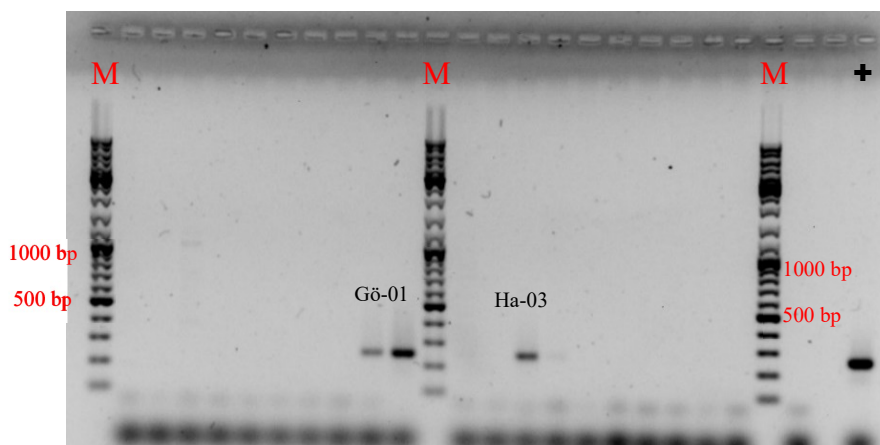


8. ábra: Az általunk kimutatott cirko- és ciklovírusok családon belüli helyzete a részleges rep gén szekvenciái alapján (saját adatok pirossal kiemelve)

A filogenetikai fa ML módszerrel, a LG+G modell alapján készült. Vízszintes ágain szereplő számok annak megbízhatósági (bootstrap) értékei százalékban. A 50-nél kisebb értékkel támogatott ágakat szaggatott vonallal jelöltem. Az elemzésben 41 CV részleges rep-je szerepel. A számításához használt, végső (szerkesztett) illesztés 253 as hosszú volt. Bootstrap permutációk száma:100. A kételtű fajokban detektált CV rep-eket vastagon szedve.

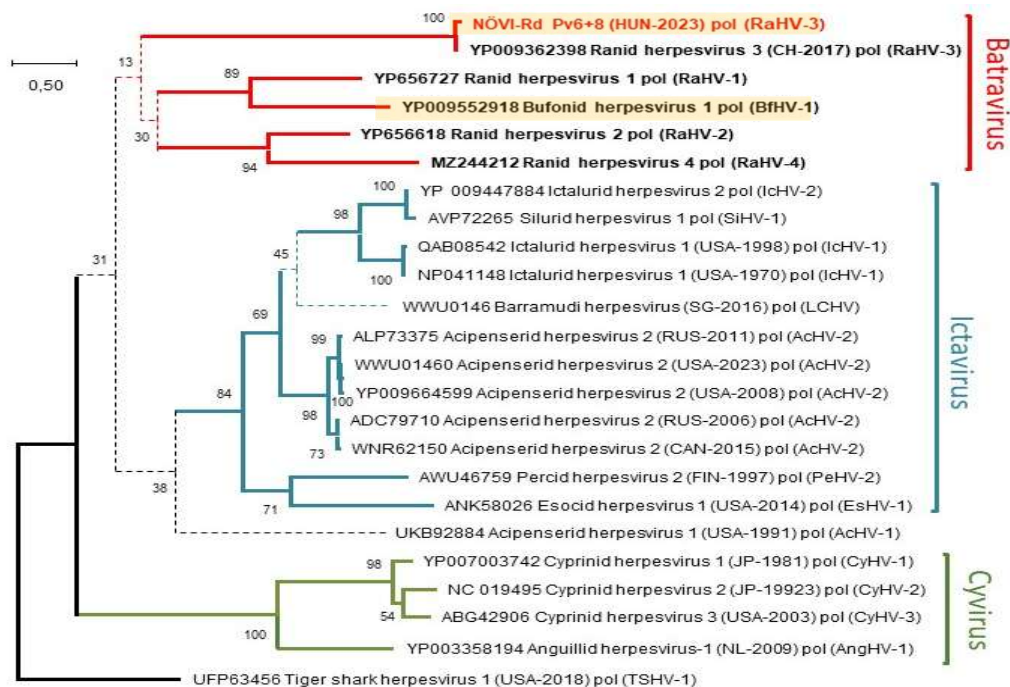
5.2. Alloherpeszvírusok

A ranid herpeszvírus 3 (RaHV-3) kimutatásra végzett PCR-ek, a 48 erdei béka szűrése során 4 élőhelyről származó (5. ábra és 1. táblázat: #1, #3, #5 és #13 élőhelyek), összesen 10 egyednél bizonyultak pozitívnak (7. táblázat világoszöld mezők). Ezek közül annál a két egyednél (#3 élőhely: „Gö-01” és #5 élőhely „Pi-05”) melyeknél kétféle tampon mintát is vettünk a látható bőrelváltozás miatt, mind a száj-, mind a bőrtamponminta pozitív eredményt adott, ám az utóbbi láthatóan több PCR terméket eredményezett (8. ábra).

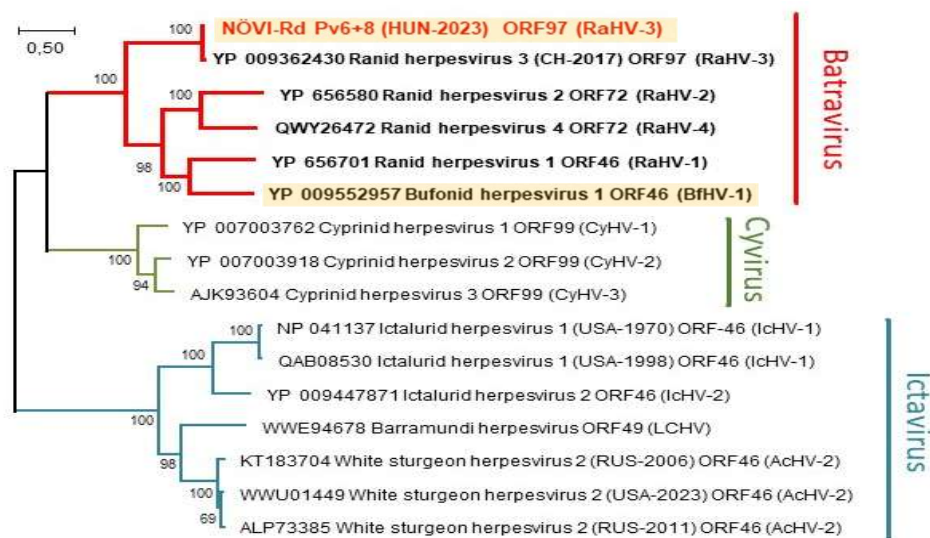


8. ábra: A RaHV-3 PCR termékek agaróz gélen történt szétválasztás után. A molekulatömeg marker (M) 100 bp-os lépésközökkel rendelkező „létra”. A várt termék hossz: 250 bp. A jobb oldalt pozitív kontroll látható „+” -val jelölve, és vonalában baloldalt a pozitív termék az élőhely rövidítése alapján. A Gö-01 jelölésű termékek azonos példányból származó száj- és bőrtampon.

A DNS-dependens DNS polimeráz (pol) gén e rövid szakaszán 4% nt és 3-4% as eltérést (Id/Sim: 96/97%) figyelhettünk meg a GenBank-ban található mindössze két RaHV-3 törzs, egymással megegyező pol adataihoz képest (nt: MG800826 és NC_034618). A saját tervezésű primerekkel végzett „primer-séta” szekvenálási eredményeként a pol fehérje C-terminális részét kódoló közel 30%-át derítettem fel a génnek (1177 nt). Itt a prototípus svájci RV genomhoz (NC_034618) képest 9 aminosav eltérést tapasztaltunk a feltárt 390 as hosszú kódoló szakaszon, amely 97,76% egyezést jelent, míg a RaHV-1 homológ fehérjéjéhez képest ezen értékek jóval alacsonyabbnak (Id/Pos: 23/38%) bizonyultak, amint ezt a filogenetikai fán is ábrázolódik (9. ábra).



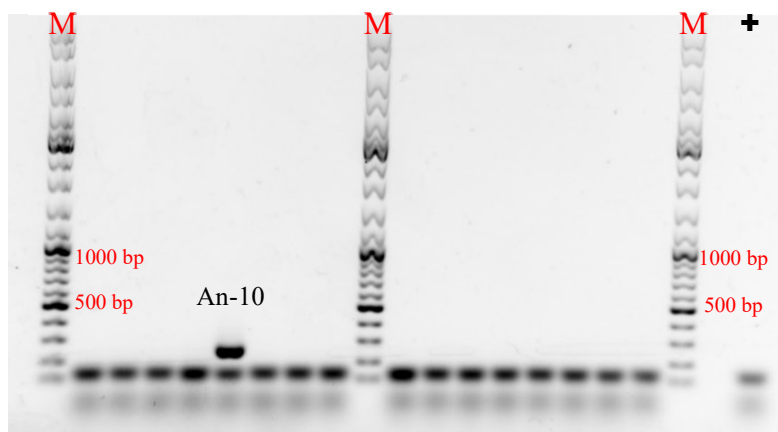
9. ábra: Az általunk kimutatott RaHV-3 törzs (sárga háttér, pirossal szedve) és BfHV-1 (sárga háttér) családon belüli helyzete a DNS-polimeráz származtatott részleges fehérje szekvenciái alapján. A fa ML módszerrel, a LG modell alapján készült, diszkrét gamma eloszlást alkalmazva. A vízszintes ágain szereplő számok azok megbízhatósági (bootstrap) értékei százalékban. A 50-nél kisebb értékkel támogatott ágakat szaggatott vonallal jelöltem. Az elemzés 28 vírustörzs adatain alapul, a szerkesztett illesztés hossza: 231 as volt. Bootstrap permutációk száma:100. Az ágak színei a nemzetséget jelölik a családon belül, melyeket az ágvégektől jobbra jelöltem.



10. ábra: Az általunk kimutatott RaHV-3 (sárga háttér, pirossal szedve) és BfHV-1 (sárga háttér) filogenetikai helyzete az ORF97-homológok származtatott fehérje szekvenciái alapján. A fa ML módszerrel, a WAG+G modell alapján készült és a vízszintes ágain szereplő számok azok megbízhatósági (bootstrap) értékei százalékban. Az elemzés 16 homológ alloherpeszvírus membránfehérje teljes szekvenciáján alapul. A szerkesztett illesztés hossza: 858 as volt. Bootstrap permutációk száma:100. Az ágak színei a családon belüli nemzetséget jelölik, melyeket az ágvégektől jobbra jelöltem.

A „membrán-glükoprotein” néven ismert strukturális fehérjét kódoló ORF97 gén megismerését célzó „primer-sétám” során, a több PCR-szekvenciából („read” -ből) összeillesztve nyert kontig (3874 nt), a gén teljes hosszában feltárta a genom-részletet. A teljes fehérje (1251 as) szekvenciát vizsgálva 34 aminosav különbséget találtam a prototípus RaHV-3 (NC_034618) törzshöz képest, ami 97,28% egyezésnek felel meg. A RaHV-1 homológ fehérjéjével (ORF46) való összevetésben az értékek (Id/Pos: 28/46%) valamivel magasabbnak bizonyultak a pol fehérje vonatkozásában fentebb leírtához képest. Az e membrán-glükoprotein alapján számolt filogenetikai fán is magasabb megbízhatósági („bootstrap”) értékkel ábrázolódtak az egyes alloherpeszvírusok feltételezett rokonsági viszonyai (**10. ábra**).

A bufonid herpeszvírus 1 kimutatását célzó PCR esetében 2 barna varangy egyed lett pozitív az 56 vizsgált példányból, a #3, illetve #12 élőhelyeken (pl.: **11. ábra**). Ezek részleges polimeráz gén szekvenciája megegyezett a svájci prototípusával (MF143550).

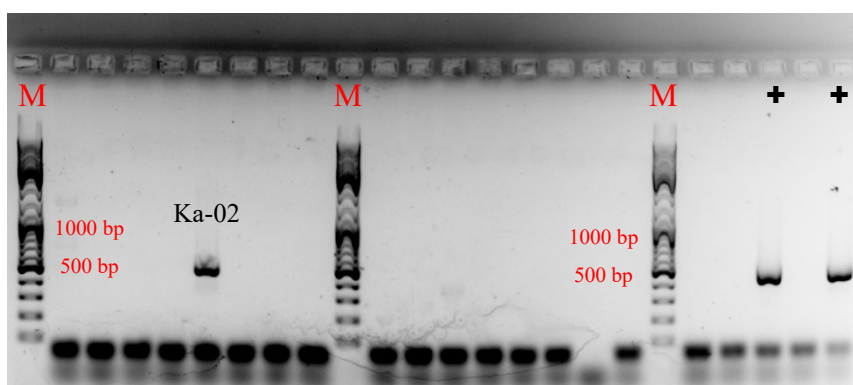


11. ábra: A BfHV-1 PCR termékek agaróz gélen történt szétválasztás után. A molekulatömeg marker (M) 100 bp-os lépésközökkel rendelkező „létra”. A várt termék hossz: 250 bp. A jobb oldalt pozitív kontroll látható „+” -val jelölve, és vonalában baloldalt a pozitív termék az élőhely rövidítése alapján.

5.3. Ranavírusok

A ranavírus MCP specifikus PCR mindössze két minta esetében eredményezett specifikus méretű amplikont (**5. ábra** és **1. táblázat**: #3 és #9 élőhelyek) (**7. táblázat** piros mezők), ebből az egyik esetben jelentős mennyiségű terméket (**12. ábra**). A szekvenálás után kiderült, hogy a #9 élőhelyről származó mintában a termékek nukleotid sorrendje 100%-ban megegyezik az európai harcsa vírus homológ szekvenciájával, ami egy halakat fertőző, EHNV-szerű vírus (**4/A ábra**).

A #3 élőhelyről származó erdei béka bőrtamponmintából származó jóval „gyengébb” amplikon szekvenciája BlastN keresésben egy gyökérrágó lepkéből kimutatott iridovírussal (*Wiseana iridescent virus*, IIV-9) (NC_015780) mutatta a legnagyobb hasonlóságot (nt Id: 68%). A BlastX keresés ugyanakkor egy csupalábállatból kimutatott iridovírussal (*Pentanympheon antarcticum* iridovirus) (WYL18956) adta a legjobb értéket (as Id: 63%). Ezek alapján legvalószínűbb, hogy egy a *Betairidovirinae* alcsaládba tartozó, de még le nem írt IIV-ből származott a termék.



12. ábra: A RV PCR termékek agaróz gélen történt szétválasztás után. A molekulatömeg marker (M) 100 bp-os lépésközökkel rendelkező „létra”. A várt termék hossz: 500 bp. A jobb oldalt pozitív kontroll látható „+” -val jelölve, és vonalában baloldalt a pozitív termék az élőhely rövidítése alapján.

6. Megbeszélés

Dolgozatomban három vírustaxon felmérését végeztem két viszonylag gyakori békafaj Budapest környéki populációiban. Amint azt a bevezetőben is említettem (2.2.1 alfejezet), a kételtű virológia meglehetősen hátrányban van a legtöbb gerinces osztály vírusainak vizsgálatához képest. Csupán a természetvédelmi szempontból jelentős, elhullásokért felelős, vagy kiterjedt elváltozásokat okozó vírusok kapnak hangsúlyosabb figyelmet. Olykor azok a zoonotikus kórokozó vírusok is előtérbe kerülnek, melynek rezervoárjaként vizsgálják ezen állatcsoportot is [10]. Manapság pedig, az újgenerációs szekvenálás elterjedése nyomán indult átfogó munkatervek (pl. 1000 species genome projekt) pedig immár nagy sebességgel termelik az olyan metagenomikai adathalmazokat, melyekben keresgélve újabb vírusszekvenciákra lehet bukkanni [11]. A dolgozatban ismertetett a cirkovírus vizsgálatok az utóbbi vonulathoz („metagenomi adathalászat”) kapcsolódtak végső soron, noha az eredeti céljuk tudományra új, infektív kételtű cirkovírusok kimutatása volt. E célt most nem értük el. Az egyéb vizsgálataim (a RV, RaHV-3 és BfHV vírusok kimutatása és jellemzése) pedig a természetvédelmileg jelentős vírusok vizsgálatának körébe tartoztak.

A *Circoviridae* család legrégebb óta ismert tagjai, a súlyosan patogén sertés cirkovírusok [15] és a madarak csőr-toll szindrómáját [16] okozó vírus, állatorvosi és gazdasági jelentősége miatt

kiemelten kutatottak. Több tucatnyi másik emlős-, madár- és hal teljes (infektív) CV genomja mellett [17], közöltek már kételtűekben detektált CV szekvenciákat is. Ezek vagy PCR-es felmérő vizsgálat [19] vagy a már említett „metagenomi adathalászat” során [11], [20] során felbukkant részleges rep szekvenciák voltak, utóbbi cikkbe [20] bizonyítottan a gazda (karmosbéka és ökörbéka) genomokba beépült endogén CV-ok (C_{Ve}). A Magyarországon kimutatott barna varangy cirkovírus részleges rep szekvenciájának jelenlétét én is megerősítettem ugyanezen faj 11 egyedéből nyert tamponmintáiból.

Az ehhez használt kétkörös PCR azonban sok fals pozitív amplikont és nem szekvenálható terméket eredményezett (**7. táblázat**). Fals pozitívnak azokat az eredményeket neveztem, ahol a PCR során keletkezett ám ez nem a keresett termék volt; bizonyos esetekben aspecifikus méretű (a vártnál rövidebb vagy hosszabb), vagy ha specifikus méretűnek tűnt is, akkor szekvenálás után derült ki, hogy nem CV eredetű. A felerősített „fals” amplikon lehet akár a mintát kontamináló baktérium-, gomba-, egyéb parazita eredetű, sőt olykor a gazdafaj genomjának egy szakasza is. Olyan eset is előfordult, hogy az általános BLAST keresés nem talál hasonlóságot semmilyen ismert szekvenciával. Ezen fals eredmények elsődleges okai a CV kimutatásra használt PCR-ben alkalmazott degenerált, konszenzus primerek voltak. Az ilyen primer több, egymástól meghatározott helyeken kissé eltérő oligonukleotidok keveréke. A PCR során a primerekben ekképpen megjelenő inherens variancia lehetővé teszi, hogy azok többféle szekvenciához is bekötődjenek, és több eltérő szekvenciájú vírus DNS-ét is képesek legyenek felerősíteni, így többféle vírusvariánst, -típust, -fajt vagy akár több vírusnemzetség tagjait is ki tudják mutatni. Érthető tehát, hogy a felmérő vírus PCR-ek közül a kétkörös jellege miatt érzékenyebb és degenerált primereket alkalmazóként kevésbé specifikus módszer, a CV kimutatását célzó PCR adta a legtöbb pozitív eredményt is, s köztük nagyszámú valódi pozitívot is.

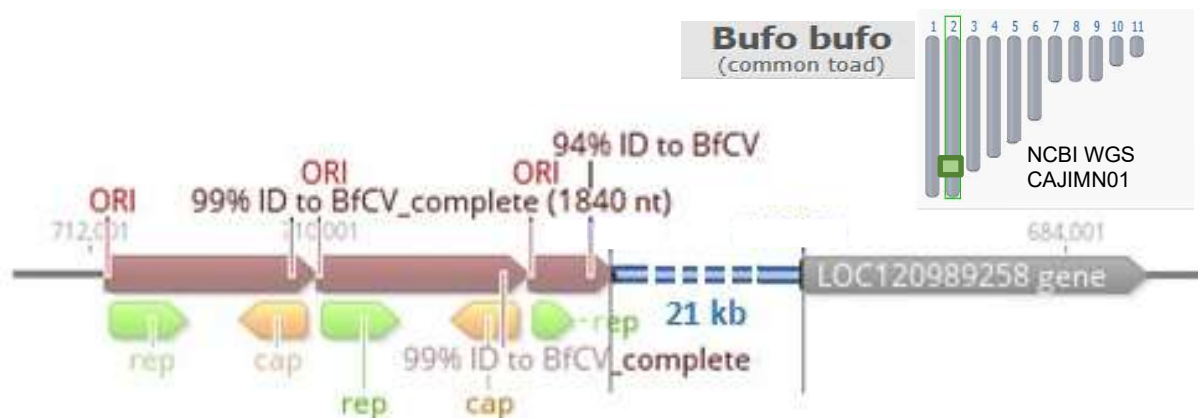
Összesen 7 élőhelyen gyűjtött 11 barna varangy tamponmintáiból bizonyítottam szekvenálással is a bufonid cirkovírus (BfCV) rep gén jelenlétét. Tekintve, hogy az elsőként feltártfeltárt ilyen szekvenciáim, a megfelelő leolvasási keretében (ORF-ben) stop kodon nélküli rep fehérje-részletet kódolt, így logikusnak tűnt a termék két végére inverz irányú primerek tervezése, hogy a feltételezetten teljes (infektív) vírusgenom (~1,8 kb) fennmaradó részének szekvenciáját is meghatározhassam. E lehetőséget már Tarján és munkatársai [19] is felvetették cikkükben, azonban a közelmúltig nem volt tudomásom arról, hogy e vizsgálatot el is végezték, s így természetesen sokáig nem is volt hozzáférésem e vizsgálatuk - még nem publikált - adataihoz nem [Tarján Zoltán, személyes közlés]. Ezért csupán azután jutottam ezekhez az adatokhoz, miután újonnan tervezett primerekkel (**6. táblázat**) én is sikeres inverz PCR-t végeztem és

annak termékét egyik irányból szekvenáltam. A szekvencia illeszthető volt a korábbi CV termék (430 bp) 3' végéhez, létrehozva egy 1340 nt hosszúságú kontigot. Ez és a Tarján munkatársa: Pénzes Judit korábbi munkájából származó [19], még publikálatlan szekvencia [Tarján Zoltán, személyes közlés] >95% nt hasonlóságot mutatott egymással. E kontigok BlastN és BlastX keresővel történt analízise során kiderült, hogy csupán a rep gén jelentős része (~800 nt) de nem egésze található bennük, s a fehérje C- terminálisát kódoló résznél számos korai stop kodont figyelhetünk meg bennük. Ezt a részt a barna varangy autoszomális (kromoszomális) DNS szakasz követte. Pontosabban az egész kontig fellelhető volt a barna varangy genom projekt több részletében 78- 99% nt hasonlósági értékkel. Ezzel bizonyítottuk, hogy a Pénzes Judit által [19], és általam is, kimutatott varangy cirkovírus nem szabadon előforduló, nem exogén. Hanem genomba beépült, endogén vírus: vagyis helyes rövidítése: BfCVe (**7. ábra**). A rep fehérje alapján számolt filogenetikai fán a BfCVe egyértelműen a *Circovirus* nemzetségbe sorolódik, közel a harcsa-, márna- és további két kételtű eredetű CV rep (az ausztrál levelibéka – *Litoria caerulea* és a fűreggőte – *Caecilian*, CV rep) ágaihoz, de azokkal nem alkotva monofiletikus csoportot (**7. ábra**), így közös eredetük nem nyert bizonyítást. Ezen ágak bootstrap értékei alacsonyak, szükség lesz valószínűleg további kételtű CV vagy CVe adatokra, hogy megalapozottabb számítást végezhessünk a jövőben.

A varangy genom projekt (NCBI WGS PROJECT NUMBER: CAJIMN01) [43] adatbázisban célozottabb BlastN keresést végezve és azt is megállapítottuk, hogy az integráció a 2. kromoszóma egyik végéhez közel történt és 2 és fél egymást követő (tandem) ismétlődésként jelent meg, vagyis valószínűleg duplikáció is végbement. Ezek a részek magas fokban (94-99%) hasonlítottak az általunk PCR-rel meghatározott kontig(ok) szekvenciájához. Érdekes megjegyezni, hogy az ismétlődés első két darabja 1840 nt hosszúságú, vagyis hasonló egy infektív CV genom méretéhez, s látszólag egy megrövidült CV kapszidot kódoló ORF (cap) is megbújik benne a rep génnel ellentétes orientációban, amint ez a *Circovirus* nemzetség tagjaira jellemző. A 2. kromoszómán talált ismétlődő szakasz cap-szerű ORF-je előtt (upstream irányban) szintén fellelhető volt a cirkovírusokra jellemző szárhurok 9 konzervált nukleotidja (nonamer): TAGTATTAC [17] (**13. ábra**).

A CV rep gén paralógjait is felleltük más genomi pozíciókban: a 2. számú kromoszóma egy másik lókusznál is egy kópiában, valamint a 3. kromoszóma egymáshoz közel eső részein, de nem fentebb leírthoz hasonló tandemként. Utóbbi 3 paralóg hasonlósága a mi szekvenciánkhoz már alacsonyabb (78-88%) volt, s ezek úgy tűnik nem tartalmazzák a vírus cap kódoló részét. CVe elemek ilyen hosszúságban eddig csak a pontyfélékből és kékhomlokú amazon papagájából,

míg ilyen másolatszámban pedig csak halakból és emlősökből lettek leírva, kételtűekből nem [20].



13. ábra: Jobbra fent a barna varangy sematikus kariogramján zöld négyzet jelöli a BfCVe integráció hozzávetőleges helyzetét, balra és alatta kinagyítva ez a rész látható. A 2. kromoszómán két és fél tandem ismétlődésben talált CVe-k (bordó téglalap-nyilak) helyzete egymáshoz és a legközelebbi génhez (szürke téglalap-nyíl) képest ábrázolva. Zölddel a rep gén, sárgával a cap látható. A piros ORI felirat a konzervált nonamer, a replikációs origó helyzetét jelöli. A szürke számok a kromoszóma kezdetétől mért pozíciókat jelölik.

A kétkörös CV PCR során további 13 esetben kaptunk specifikus méretű terméket, ám szekvenálásuk nem sikerült. Ennek egyes esetekben oka lehetett az előbb leírt genomi integráció jellege, vagyis, hogy egyszerre több egymástól részben eltérő szekvenciájú CVe rep is horogra akadhatott ugyanazon PCR során, ennek eredményeként kapott amplikon-keverék szekvelálása pedig nehézségekbe ütközött. Természetesen azt sem tudjuk kizárni, hogy a primerek egészen más organizmust (is) felerősítettek, lévén degeneráltak (lásd fentebb). További megválaszolatlan kérdés maradt azoknak a kétkörös CV PCR-ben negatívra tesztelt minták esete, amennyiben minden varangy egyed genomja tartalmazza a fentebb leírt BfCVe szegmenseket.

A CV felderítésére használt PCR során kimutatott columbid CV egyértelműen galambtól származó fekális kontaminációra utal, míg a NÖVI tónál még 2023-ban mintázott erdei béka bőrtamponjából kimutatott ciklovírus eredete, jelentősége, sőt pontos taxonómiai helyzete is ismeretlen még (7. ábra).

Európa kételtű populációiban a tavalyi évig csupán két herpeszvírus típust írtak le, mindkettőt békákból. A RaHV-3-at illetve a BfHV-1-et mutatták ki Svájcban, az Egyesült Királyságból, Norvégiából és Németországból [27], [28], [44]. Észak Amerikából további két, ritka vírus típus ismert korábbról, a RaHV-1 illetve 2 [23], [24]. A RaHV-3 hazai előfordulását saját [45] és szimultán kutatások [46] egyidőben erősítették meg erdei békákból. Emellett a BfHV-1 első

hazai megjelenése is leírásra került barna varangyból [46]. A BfHV-1 s jelenlétének igazolása számomra csak az idei évben gyűjtött nagyobb számú barna varagy mintákból volt lehetséges. Jelen vizsgálatban 10 erdei békából sikerült kimutatnom a RaHV-3-at, míg BfHV-1-et 2 barna varangyból mutattam ki. A BfHV-1 szekvenciája, akárcsak a többi észlelés, teljesen megegyezett a prototípus szekvenciájával, ugyanakkor a RaHV-3 szekvenciánk eltért már az elsőnek szekvenált polimeráz részlet alapján is. Ezzel szemben a korábbi észlelések esetében (Anglia, Norvégia) [27], [28] a szekvencia megegyezett a svájci prototípus szekvenciájával. Ezért felmerült bennünk a kérdés, hogy mennyire tér el egy a polimeráznál kevésbé konzervált gén esetében a szekvencia. Újonnan tervezett primerekkel az ORF97 gént céloztam meg, és a polimeráz génre is egy új primereket terveztem, hogy e gén teljes szekvenciáját megismerhessük. Azért esett a választás az membrán-glükoproteint kódoló ORF97-re, mert a halakat fertőző alloherpeszvírusok közt egy finomabb felbontású összehasonlító vizsgálatokhoz jól alkalmazható, variábilis gén, melyről képződő fehérje homológ bizonyos koronavírusok tüske fehérjéjével. Így alkalmazható a vírusfajon belüli törzsek, genocsoportok elkülönítésére [47]. A „primer-sétával” nyert teljes ORF97-et (3753 nt, 1250 aa) tartalmazó kontig (3873 nt) szekvenálás után azonban azt tapasztaltuk, hogy mind a két gén hasonlóan alacsony mértékben, (3-4%-ban) tért el a prototípusnak tekinthető svájci RaHV-3 törzs nukleotid és származtatott aminosav sorrend alapján (**9. és 10. ábra**). Ez a különbség lényegileg megfelel a különböző hal alloherpeszvírusok (pl. AcHV-2) különböző vírustörzsei között mért távolságnak, amint ez a filogenetikai fák (**9. és 10. ábra**) is megfigyelhető.

A RaHV-3 pozitívnak bizonyult egyedek közül voltak olyanok, amelyeken szemmel látható bőrelváltozások voltak megfigyelhetőek, ám koránt sem minden egyeden. Mint az ismert, a herpeszvírusok képesek látens állapotba kerülni, amely során a sejtek egy része fertőzött marad, de nem termelnek vírus részecskéket [48]. Alloherpeszvírusok közt is megfigyeltek már látenciát ám csak halak vírusainál, fajtól függően a fehérvérsejtekben, vagy a környéki idegrendszer sejtjeiben, ám hasonló vizsgálat a *Batravirus* nemzetség egyetlen tagja esetében sem történt [49].

Annak ellenére, hogy a legtöbb élőhelyről több egyedből is vettünk mintát, csak a NÖVI tó élőhelyen, és csak a 2023-as gyűjtésből származó minták esetében volt több fertőzött egyed, míg minden más élőhelyen legfeljebb egy fertőzött egyed volt. A NÖVI tóban a 2024-es gyűjtésben egyetlen fertőzött egyed sem került elő. Bár a szakirodalomban alloherpeszvírusokra nem találunk adatokat, teknős herpeszvírusokban (*Orthoherpesviridae*) kimutatták, hogy a vírus aktív és látens fertőzései közötti eltérést a minták típusa és a mintavétel időpontja befolyásolhatja, illetve a prevalencia szezonalitást mutat [50]. Vizsgálataink kezdetén

a ranavírus felmérés volt a fő cél, így ennek megfelelően elsősorban szájtamponmintákat vettünk, és csak egyértelmű elváltozások esetén vettünk bőrtamponmintát is, a 2024-es gyűjtés során. Ebben az évben a két bőrelváltozások egyedtől gyűjtött mintáknál, mindkét esetben pozitívrá tesztelt bőr mellett a szájtampon is, igaz valamivel gyengébben. Volt továbbá egy tünetmentes állatból vett szájtamponminta, ami szintén pozitív lett. Mindezek dacára, a téma szakértőjével való konzultáció után arra a következtetésre jutottunk, hogy minden tünetmentes állatból is érdemes lesz bőrtampon tesztelni, hiszen ők qPCR-rel itt (s olykor csak itt) mérték a legnagyobb kópiaszámot [Francesco Origgi, személyes közlés].

Ranavírust Magyarországon már sikeresen izoláltak egy bő évtizede, miután a 2000-es évek végén tömeges pusztulásokat okozott két törpeharcsa populációban [34]. E vizsgálatok során kiderült, hogy egy az EHN-szerű csoportba tartozó, európai harcsa vírus (ECV) volt a kórokozó [35]. Később, 2020-ban retrospektív vizsgálatban kételtű mintákból is kimutattak RV-t ám csak qPCR-rel, amely bár jóval érzékenyebb, de tipizálást nem tesz lehetővé. Így nem derült ki, hogy mely csoportba tartoztak a nemzetségen belül a kételtűekben detektált vírusok. Lévé a qPCR során mindig nagyon alacsony kópiaszámmal (magas C_q értékekkel) került a virális DNS kimutatásra, felmerült az az eshetőség, hogy ez talán nem a békák saját fertőzése (mely esetben földrajzi helyzetünkből adódóan leginkább CMTV-szerű vírus jelenlétét várnánk), hanem a halak fertőzéséből származó kontamináció, s ebben az esetben EHN-szerű vírus lenne található bennük [36]. Európa nagy részéről, Nagy-Britannia, Spanyolország és Oroszország kivételével kételtűekből CMTV-szerű fertőzés ismert, míg Észak Amerikában és a felsorolt országokban főleg FV3-szerű vírus fertőz [33]. Rachel Marschang személyes közlése alapján tudjuk, hogy tőlünk nyugatabbra, Németországban több mint 10 év alatt összesen 1 ranavírus fertőzést észleltek kételtűekben, amely egy CMTV fertőzés volt, egy zöld békából (*Pelophylax* sp.). Kísérletes fertőzéses kutatásban bizonyították, hogy az EHN-szerű vírusok nem képesek békákat fertőzni [51]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az általunk kimutatott ranavírus csupán környezeti kontamináció lehetett. Ugyanakkor ennek ellent mond, hogy a #9s élőhelyen, ahonnan az egyik pozitív egyed származott csak egy időszakos víztest található, amely a nyár közepére szinte minden évben kiszárad és a közelben sincs állandó víztest, amelyben halak élnek. A legközelebb két patak található fél-fél km-re, amelyek nem a legmegfelelőbb élőhelyei az ECV által leginkább fertőzött törpe harcsáknak. Elképzelhető több lehetőség is, már amennyiben nem kontamináció okozta ezt a vírus kimutatást. A kételtűek diszperziós képessége sokszor alulbecsült, de irodalmi adatok szerint a farkatlan kételtűek általánosságban akár 11-13 km-es távolságokat is képesek megtenni [52]. Az erdei békák diszperziós képességeit eddig nem vizsgálták, de könnyen elképzelhető, hogy a szárazföldön

nagyobb távolságokat is képesek megtenni a szaporodásra alkalmas víztestek között. Így egy közeli, fertőzött halak számára is élőhelyt biztosító víztest előző szezonban történő meglátogatása után, az adott évben erre az élőhelyre vándorolt, miközben hosszú ideig inapparensten hordozta a vírust. Lehetséges továbbá, hogy egy, a törpeharcsát (vagy más halat) korábban fogyasztó madár ürüléke került a #9 élőhelyre, s így a mintánkba. Lévén a ranavírusok gazdaspecifitása alacsony [30] ezért nem zárható teljesen az az eshetőség sem, hogy a béka egyed ECV vírussal fertőződött meg tünetmentesen. Ezt a gyanút, németországi szakértővel való konzultáció során, újabb adatokkal megtámogatták [Rachel Marschang, személyes közlés].

Szükséges lenne az általunk kimutatott vírus minél hosszabb genomrészletének, vagy ha lehet a teljes genom szekvenciájának a feltárása, hiszen mi annak csak egy nagyon rövid részletét ismertük meg. Így nem zárhatjuk ki bizonyossággal egy esetleges rekombináció/mutáció lehetőségét sem. Környezeti nyomások és az immunrendszer legyőzése érdekében a nagyméretű dsDNS vírusok, köztük a ranavírusok is különböző genetikai mechanizmusok (génduplikáció, horizontális géntranszfer) révén adaptálódnak, s ezek egyben lehetővé teszik a vírus gazdaváltását is [53]. Továbbá ökológiai tényezők is szerepet játszhatnak a fertőzések gyakoriságának és intenzitásának formálásában, ami szintén kialakíthat gazdaváltást [54]. Bár jelenleg az EHNV-szerű vírusok, köztük az ECV főként halakra jelentenek veszélyt (**4. ábra**), genetikai mutációik révén a jövőben kételtűekre is fenyegetést jelenthetnek.

Az *Iridoviridae* család másik alcsaládjába tartozó gerinctelen iridovírus (IIV) eredetű DNS detektálása a #3 élőhelyről származó erdei béka bőrtamponjából valószínűleg környezeti eredetű kontamináció vagy a rovar-predáció során történt kontamináció eredménye lehetett. A kétféle (alfa- és béta-) iridovírus (rana- és IIV) fő kapszid protein (MCP) génjének nagyfokú hasonlósága miatt volt képes az IIV MCP-t is gyengén amplifikálni a ranavírus homológ génjére tervezett primer; erre utalhat a képződött termék kis mennyiség is.

Dolgozatommal néhány új adatot szolgáltatottam két hazai békafaj vonatkozásában a természetes kételtű populációkban fellelhető egyed DNS vírusokról, illetve virális eredetű szekvenciákról. Bízom benne, hogy ezek az eredmények, bármilyen szerények is, de a jövőben akár természetvédelmi, akár alapvető virológiai (vírus-evolúciós) jelentőséggel bírhatnak majd. A megbeszélésben felvetett kérdések mentén bővítve a célkitűzéseket, e vizsgálatokat folytatásra érdemesnek ítéljük.

7. Összefoglalás

A kétéltűek populációi világszerte drasztikusan zsugorodnak vagy eltűnnek. A közismert környezeti okok mellett, ebben fertőző betegségek, köztük vírusok is, jelentős szerepet játszanak. A ranavírusok súlyos lokális elhullásokat okozhatnak, s Magyarországon előforduló kétéltűekben is kimutatták már ezeket, igaz csupán az érzékeny qPCR módszerrel, így genetikai jellemzésük nem történt meg. Az elmúlt évtizedben két új béka herpeszvírust írtak le Nyugat-Európa több országából, s e fertőzésekre utaló tüneteket már itthon is jelentettek, ám a kórokozó(k) kimutatása és karakterizálása nélkül. Világszerte kétéltűekből mindössze néhány fajban írtak le eddig részleges cirkovírus szekvenciát, két esetben bizonyítottan a gazda genomjába beépült maradványokat, ún. endogén vírusokat, de ez idáig még nem publikáltak belőlük teljes genommal rendelkező, fertőző (exogén) cirkovírust. Vizsgálatunk célja volt, hogy frissen gyűjtött tamponmintákból a fenti 3 víruscsoport képviselőit mutassuk ki polimeráz láncreakció (PCR) segítségével és genetikailag jellemezzük ezeket. Mintáinkat 14 Budapest közeli élőhelyről gyűjtöttük, összesen 56 barna varangy (*Bufo bufo*) és 48 erdei béka (*Rana dalmatina*) egyedből. A ranavírus esetében a fő kapszid fehérje génjét, a herpeszvírusok esetében a DNS-polimeráz gént, a cirkovírus esetében a rep gént célozta a szűréshez használt PCR. További primereket terveztem, hogy ranid herpeszvírus egy variábilisabbnak vélt génjét (ORF97) teljes hosszában feltárjuk, valamint, hogy a cirkovírus teljes genomját megismerjük (vagy endogén voltát igazoljuk). Ranavírust egyetlen erdei béka egyedből sikerült kimutatni, s meglepő módon egy eddig csak halakból kimutatott törzset. Ranid herpeszvírus-3 jelenlétét négy különböző élőhelyről származó 12 erdei békában igazoltuk. A két génből nyert (1200 és 3750 bp) szekvenciák alapján e hazai törzs 3 %-ban tér el a nyugat-európai prototípustól. Bufonid herpeszvírust két élőhelyről, 1-1 varangyból detektáltunk, ezek rövid szekvenciája azonos volt a svájci prototípuséval. Varangy mintákat vizsgálva 10 állatból mutattuk ki részleges cirkovírus rep gén jelenlétét és jellemeztük szekvencia variánsait. Saját primerekkel igazoltuk e cirkovírus endogén voltát, és azonosítottuk az integráció helyét a gazda kromoszómán. Erdei béka mintáknál, egy eddig ismeretlen ciklovírus kimutatását is eredményezte a vizsgálat.

8. Summary

Amphibian populations are drastically shrinking or disappearing worldwide. In addition to the environmental factors, infectious diseases, including viruses, play a significant role in this process. Ranaviruses (RV), which can cause severe local mortality events, have already been detected in Hungary qPCR method, yet no genetic characterisation has been done. In the last decade, two new frog herpesviruses have been described from several Western European countries, and signs resembling these infections have been reported in our country as well. Still, the causative agents have not been detected and characterised in Hungary so far. In amphibians worldwide, only a few species have been described with partial circovirus (CV) sequences, in two cases these were proven to be endogenous viruses, residues incorporated into the host genome. Yet, amphibians remain a class without a complete genome of an infectious (exogenous) circovirus described. Our study aimed to detect representatives of the above-listed virus groups in Hungary, from freshly collected swab samples by polymerase chain reaction (PCR) and to characterise them genetically. Samples were collected in 14 habitats near Budapest, from a total of 56 common toads (*Bufo bufo*) and 48 agile frogs (*Rana dalmatina*). We targeted the major capsid protein gene of RV, the DNA polymerase gene of herpesviruses and the rep gene of circoviruses for the screening. Additional primers were designed to reveal the full length of a gene (ORF97) of the detected ranid herpesvirus, which was presumed to be more variable, and to obtain the full genome of the circovirus (or to confirm its endogeneity). We detected an RV strain (ECV) belonging to the fish-related genogroup, for the first time in an amphibian. The presence of ranid herpesvirus-3 was confirmed in 12 agile frogs from four different habitats. Based on sequences from the two genes, this Hungarian strain differs from the Western European prototype by 3%. Bufonid herpesvirus was detected from one toad in each of two habitats, with short sequences identical to the Swiss prototype. Screening the common toad samples, using highly degenerate CV primers, we could verify the presence of variable partial rep genes in 10 individuals. Using novel primers, we confirmed that the toad circovirus is endogenous, and identified its site of integration into the host chromosome. In the case of agile frog samples, the CV screening resulted in the description of a novel cyclovirus sequence.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, **Dr. Papp Tibornak**, a rendkívüli segítségért, kitartásért és türelemért, amelyet irántam tanúsított. Az ő támogatása és a rám szánt idő nélkül biztosan nem készülhetett volna el a dolgozatom.

Külön köszönet társtémavezetőmnek **Dr. Herczeg Dávidnak**, a terepen nyújtott segítségért és a dolgozat javításáért, továbbá a mintagyűjtésben és konferencia összefoglaló írásban nyújtott segítségükért **Dr. Bókony Veronikának** és munkatársainak (HUN-REN ATK NÖVI Evolúciós ökológiai osztály)

Köszönettel tartozom **Dr. Szabó Krisztiánnak**, amiért egyetemi belső konzulensként segítette dolgozatom létrejöttét.

Továbbá köszönettel tartozom az Állatorvostudományi Kutatóintézet Molekuláris Virologia Témacsoport munkatársainak, amiért a felmerülő kérdéseimmel bátran fordulhattam hozzájuk, külön köszönet **Prof. Dr. Harrach Balázsnak**, aki bölcs iránymutatásával segítette és észrevételeivel látta el dolgozatomat.

Köszönet **Dr. Erdélyi Károlynak**, az Állatorvostudományi Kutatóintézet Betegség Ökológia és Vadegészségügy Témacsoport vezetőjének, amiért befogadta dolgozatom témáját és támogatta annak létrejöttét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, barátaimnak (Detti, Enikő, Ráhel, Ábris, Ágoston, Levi, Szabi) és a páromnak, **Viának** a sok segítséget és támogatást.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Frost, Darrel R., ‘Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. doi.org/10.5531/db.vz.0001’, *American Museum of Natural History, New York, USA*. 2024. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
- [2] Duellman, W. E. and Zug, . George R., ‘Amphibian - Adaptation, Metamorphosis, Ecology | Britannica’. Sep. 14, 2024. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/animal/amphibian/General-features>
- [3] P. Zhang, D. Liang, R. L. Mao, D. M. Hillis, D. B. Wake, and D. C. Cannatella, ‘Efficient Sequencing of Anuran mtDNAs and a Mitogenomic Exploration of the Phylogeny and Evolution of Frogs’, *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30, no. 8, pp. 1899–1915, Aug. 2013, doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst091>.
- [4] ‘Erdei béka’, Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: <https://mme.hu/keteltuek-es-hullok/erdei-beka>
- [5] ‘Barna varangy | Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület’. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: <https://mme.hu/keteltuek-es-hullok/barna-varangy>
- [6] A. Campbell, ‘The origins and evolution of viruses’, *Trends Microbiol.*, vol. 9, no. 2, p. 61, Feb. 2001, doi: 10.1016/S0966-842X(00)01934-X.
- [7] M. Krupovic, V. V. Dolja, and E. V. Koonin, ‘Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts’, *Nat. Rev. Microbiol.*, no. 17, pp. 449–458, 2019, doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0205-6>.
- [8] G. L. Kaján, A. Doszpoly, Z. L. Tarján, M. Z. Vidovszky, and T. Papp, ‘Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses’, *J. Mol. Evol.*, vol. 88, no. 1, pp. 41–56, 2020, doi: 10.1007/s00239-019-09913-4.
- [9] P. J. Walker, S. G. Siddell, E. J. Lefkowitz, A. R. Mushegian, E. M. Adriaenssens, P. Alfenas-Zerbini, D. M. Dempsey, B. E. Dutilh, M. L. García, R. Curtis Hendrickson, S. Junglen, M. Krupovic, J. H. Kuhn, A. J. Lambert, M. Łobocka, H. M. Oksanen, R. J. Orton, D. L. Robertson, L. Rubino, S. Sabanadzovic, P. Simmonds, D. B. Smith, N. Suzuki, K. Van Doorslaer, A.-M. Vandamme, A. Varsani, and F. M. Zerbini, ‘Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022)’, *Arch. Virol.*, vol. 167, no. 11, pp. 2429–2440, Nov. 2022, doi: 10.1007/s00705-022-05516-5.
- [10] C. L. Densmore and D. E. Green, ‘Diseases of Amphibians’, *ILAR J.*, vol. 48, no. 3, pp. 235–254, 2007, doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.235>.
- [11] E. F. Harding, A. G. Russo, G. J. H. Yan, L. K. Mercer, and P. A. White, ‘Revealing the uncharacterised diversity of amphibian and reptile viruses’, *ISME Commun.*, vol. 2, no. 95, 2022, doi: <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00180-x>.
- [12] K. Rosario, S. Duffy, and M. Breitbart, ‘A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics’, *Arch. Virol.*, vol. 157, no. 10, pp. 1851–1871, Oct. 2012, doi: 10.1007/s00705-012-1391-y.
- [13] P. C. Y. Woo, S. K. P. Lau, J. L. L. Teng, A. K. L. Tsang, M. Joseph, E. Y. M. Wong, Y. Tang, S. Sivakumar, R. Bai, R. Wernery, U. Wernery, and K.-Y. Yuen, ‘Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses’, *Virology*, vol. 471–473, pp. 117–125, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.virol.2014.09.020.
- [14] K. Rosario, M. Breitbart, B. Harrach, J. Segalés, E. Delwart, P. Biagini, and A. Varsani, ‘Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus

- Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus', *Arch. Virol.*, vol. 162, no. 5, pp. 1447–1463, May 2017, doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.
- [15] Á. Dán, T. Molnár, I. Biksi, R. Glávits, M. Shaheim, and B. Harrach, 'Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases', *Jul. 2005*, doi: 10.1556/avet.51.2003.4.13.
- [16] E. Kaszab, G. Lengyel, S. Marton, Á. Dán, K. Bányai, and E. Fehér, 'Occurrence and genetic diversity of CRESS DNA viruses in wild birds: a Hungarian study', *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 7036, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63795-x.
- [17] A. Varsani, B. Harrach, P. Roumagnac, M. Benkő, M. Breitbart, E. Delwart, G. Franzo, D. Kazlauskas, K. Rosario, J. Segalés, E. Dunay, J. Rukundo, T. L. Goldberg, E. Fehér, E. Kaszab, K. Bányai, and M. Krupovic, '2024 taxonomy update for the family Circoviridae', *Arch. Virol.*, vol. 169, no. 9, p. 176, Aug. 2024, doi: 10.1007/s00705-024-06107-2.
- [18] M. Lőrincz, A. Cságola, S. L. Farkas, C. Székely, and T. Tuboly, 'First detection and analysis of a fish circovirus', *Journal of General Virology*, vol. 92, no. 8. Microbiology Society, pp. 1817–1821, 2011. doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.031344-0>.
- [19] Z. L. Tarján, J. J. Péntes, R. P. Tóth, and M. Benkő, 'First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes', *Acta Vet. Hung.*, vol. 62, no. 1, pp. 134–144, Mar. 2014, doi: 10.1556/AVet.2013.061.
- [20] T. P. W. Dennis, W. M. de Souza, S. Marsile-Medun, J. B. Singer, S. J. Wilson, and R. J. Gifford, 'The evolution, distribution and diversity of endogenous circoviral elements in vertebrate genomes', *Virus Res.*, vol. 262, pp. 15–23, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.virusres.2018.03.014.
- [21] 'Herpesvirales | ICTV'. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Herpesvirales
- [22] M. Boutier, L. Morvan, N. Delrez, F. Origgi, A. Doszpoly, and A. Vanderplasschen, 'Fish and Amphibian Alloherpesviruses (*Herpesviridae*)', in *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, D. H. Bamford and M. Zuckerman, Eds., Oxford: Academic Press, 2021, pp. 306–315. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20931-X.
- [23] B. Lucké, 'A Neoplastic Disease of the Kidney of the Frog, *Rana Pipiens*1', *Am. J. Cancer*, vol. 20, no. 2, pp. 352–379, Feb. 1934, doi: 10.1158/ajc.1934.352.
- [24] A. Granoff, P. E. Came, and K. A. Rafferty Jr., 'The Isolation and Properties of Viruses from *Rana Pipiens*: Their Possible Relationship to the Renal Adenocarcinoma of the Leopard Frog', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 126, no. 1, pp. 237–255, 1965, doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb14278.x.
- [25] F. C. Origgi, B. R. Schmidt, P. Lohmann, P. Otten, E. Akdesir, V. Gaschen, L. Aguilar-Bultet, T. Wahli, U. Sattler, and M. H. Stoffel, 'Ranid Herpesvirus 3 and Proliferative Dermatitis in Free-Ranging Wild Common Frogs (*Rana Temporaria*)', *Vet. Pathol.*, vol. 54, no. 4, pp. 686–694, 2017, doi: 10.1177/0300985817705176.
- [26] F. C. Origgi, B. R. Schmidt, P. Lohmann, P. Otten, R. K. Meier, S. R. R. Pisano, G. Moore-Jones, M. Tecilla, U. Sattler, T. Wahli, V. Gaschen, and M. H. Stoffel, 'Bufonid herpesvirus 1 (BfHV1) associated dermatitis and mortality in free ranging common toads (*Bufo bufo*) in Switzerland', *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 14737, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32841-0.
- [27] L. H. V. Franklinos, J. R.-R. Fernandez, H. B. Hydeskov, K. P. Hopkins, D. J. Everest, A. A. Cunningham, and B. Lawson, 'Herpesvirus skin disease in free-living common frogs *Rana temporaria* in Great Britain', *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 129, no. 3, pp. 239–244, Aug. 2018, doi: 10.3354/dao03246.

- [28] F. C. Origgi and A. Taugbøl, 'Ranid Herpesvirus 3 Infection in Common Frog *Rana temporaria* Tadpoles - Volume 29, Number 6—June 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC', doi: 10.3201/eid2906.230255.
- [29] V. G. Chinchar, P. Hick, I. A. Ince, J. K. Jancovich, R. Marschang, Q. Qin, K. Subramaniam, T. B. Waltzek, R. Whittington, T. Williams, Q.-Y. Zhang, and ICTV Report Consortium, 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae', *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 5, pp. 890–891, May 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000818.
- [30] 'Genus: Ranavirus | ICTV'. Accessed: May 26, 2024. [Online]. Available: <https://ictv.global/report/chapter/iridoviridae/iridoviridae/ranavirus>
- [31] S. J. Price, T. W. J. Garner, R. A. Nichols, F. Balloux, C. Ayres, A. Mora-Cabello de Alba, and J. Bosch, 'Collapse of Amphibian Communities Due to an Introduced Ranavirus', *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 21, pp. 2586–2591, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.09.028.
- [32] B. Thumsová, S. J. Price, V. González-Cascón, J. Vörös, A. Martínez-Silvestre, G. M. Rosa, A. Machordom, and J. Bosch, 'Climate warming triggers the emergence of native viruses in Iberian amphibians', *iScience*, vol. 25, no. 12, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.105541.
- [33] S. J. Price, E. Ariel, A. Maclaine, G. M. Rosa, M. J. Gray, J. L. Brunner, and T. W. J. Garner, 'From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses', *Virology*, vol. 511, pp. 272–279, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.virol.2017.08.001.
- [34] T. Juhász, W. L. Mária, C. György, F. L. Szilvia, and Á. Dán, 'Isolation of ranavirus causing mass mortality in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) in Hungary', *Magy. Allatorvosok Lapja*, vol. 135, pp. 763–768, Dec. 2013.
- [35] E. Fehér, A. Doszpoly, B. Horváth, Sz. Marton, B. Forró, Sz. L. Farkas, K. Bányai, and T. Juhász, 'Whole genome sequencing and phylogenetic characterization of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) origin ranavirus strains from independent disease outbreaks', *Infect. Genet. Evol.*, vol. 45, pp. 402–407, doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.001>.
- [36] J. Vörös, D. Herczeg, T. Papp, C. Monsalve-Carcaño, and J. Bosch, 'First detection of Ranavirus infection in amphibians in Hungary'.
- [37] J. Mao, J. Wang, G. D. Chinchar, and V. G. Chinchar, 'Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*', *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 37, no. 2, pp. 107–114, Jul. 1999, doi: 10.3354/dao037107.
- [38] L. Li, A. Kapoor, B. Slikas, O. S. Bamidele, C. Wang, S. Shaukat, M. A. Masroor, M. L. Wilson, J.-B. N. Ndjango, M. Peeters, N. D. Gross-Camp, M. N. Muller, B. H. Hahn, N. D. Wolfe, H. Triki, J. Bartkus, S. Z. Zaidi, and E. Delwart, 'Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces', *J. Virol.*, vol. 84, no. 4, pp. 1674–1682, Feb. 2010, doi: 10.1128/jvi.02109-09.
- [39] Hall, T.A., 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.', *Nucl Acids Symp Ser*, vol. 41:95-98., 1999.
- [40] Bonfield, J.K., Smith, K.F., and Staden, R, 'A new DNA sequence assembly program.', *Nucleic Acids Res*, vol. 23, no. 4992–4999, 1995.
- [41] 'Geneious v 9.1.8 (Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis)', Geneious. Accessed: Jan. 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.geneious.com/>
- [42] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, 'MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms', *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549, Jun. 2018, doi: 10.1093/molbev/msy096.
- [43] J. Streicher, 'The genome sequence of the common toad, *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) [version 1; peer review: 2 approved]', *Wellcome Open Res.*, vol. 6, no. 281, 2021, doi: 10.12688/wellcomeopenres.17298.1.

- [44] Eisenberg T, Hamann HP, Reuscher C, Kwet A, Klier-Heil K, and Lamp B, ‘Emergence of a bufonid herpesvirus in a population of the common toad *Bufo bufo* in Germany’, *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 145, pp. 15–20, 2021.
- [45] Zs. Fülei, D. Herczeg, V. Bókony, E. Nemesházi, N. Ujhegyi, Zs. Mikó, A. Kásler, A. Doszpoly, K. Erdélyi, B. Harrach, and T. Papp, ‘Előzetes eredmények magyarországi kétéltű populációk virológiai szűrővizsgálatából: ranid herpeszvírus (RaHV-3) első hazai kimutatása’, in *VII. Herpetológiai Előadóiülés Előadások Összefoglalói 2023*, Nov. 2023, p. 16. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: https://drive.google.com/file/d/1P1oyff_2P7u0G4Tl5A4rEB088-rSYgnw/view
- [46] K. Harnos and J. Vörös, ‘Kétéltűek fertőző betegségei Észak-Magyarországon’, in *VII. Herpetológiai Előadóiülés Előadások Összefoglalói 2023*, Nov. 2023, p. 16. Accessed: Sep. 15, 2024. [Online]. Available: https://drive.google.com/file/d/1P1oyff_2P7u0G4Tl5A4rEB088-rSYgnw/view
- [47] L. Hanson, A. Doszpoly, S.J. van Beurden, P.H. de Oliveira Viadanna, and T. Waltzek, ‘Chapter 9 - Alloherpesviruses of Fish’, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00009-7>, in *Aquaculture Virology*, Frederick S. B. Kibenge and Marcos G. Godoy, Eds., Academic Press, 2016, pp. 153–172. Accessed: May 27, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/alloherpesviridae>
- [48] J. Minarovits, E. Gonczol, and T. Valyi-Nagy, Eds., *Latency Strategies of Herpesviruses*. Boston, MA: Springer US, 2007. doi: 10.1007/978-0-387-34127-9.
- [49] E. M. Quijano Cardé and E. Soto, ‘A review of latency in the Alloherpesviridae family’, *J. Fish Dis.*, vol. n/a, no. n/a, p. e14016, doi: 10.1111/jfd.14016.
- [50] C. Leineweber, E. Müller, and R. E. Marschang, ‘Herpesviruses in Captive Chelonians in Europe Between 2016 and 2020’, *Front. Vet. Sci.*, vol. 8, Oct. 2021, doi: 10.3389/fvets.2021.733299.
- [51] A. E. Bayley, B. J. Hill, and S. W. Feist, ‘Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts’, *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 103, no. 3, pp. 171–183, Apr. 2013, doi: 10.3354/dao02574.
- [52] M. Alex Smith and D. M. Green, ‘Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?’, *Ecography*, vol. 28, no. 1, pp. 110–128, 2005, doi: 10.1111/j.0906-7590.2005.04042.x.
- [53] Jancovich James K., Bremont Michel, Touchman Jeffrey W., and Jacobs Bertram L., ‘Evidence for Multiple Recent Host Species Shifts among the Ranaviruses (Family Iridoviridae)’, *J. Virol.*, vol. 84, no. 6, pp. 2636–2647, Mar. 2010, doi: 10.1128/jvi.01991-09.
- [54] A. C. Stöhr, A. Hoffmann, T. Papp, N. Robert, N. B. M. Pruvost, H.-U. Reyer, and R. E. Marschang, ‘Long-term study of an infection with ranaviruses in a group of edible frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) and partial characterization of two viruses based on four genomic regions’, *Vet. J.*, vol. 197, no. 2, pp. 238–244, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.02.014.