



37. OTDK Biológia Szekció



Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Intézet, Molekuláris Biológiai és Mikrobiológiai Tanszék

**A Canine Distemper Virus kimutatása és genomikai vizsgálata
hazai vadászható ragadozó fajokban, Magyarországon**

Témavezető: Dr. Lanszki Zsófia
Egyetemi adjunktus

Készítette: Szieber Dominik (akhzjg)
Biológia BSc

Pécs, 2025.

Tartalom jegyzék

1.	BEVEZETÉS	4
1.1.	<i>TÉMAFELVETÉS</i>	4
1.2.	<i>CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV), TAXONÓMIA</i>	4
1.3.	<i>MORFOLÓGIA, GENOMSZERKEZET</i>	6
1.4.	<i>A CDV GAZDASPEKTRUMA ÉS A FAJOK KÖZÖTTI TERJEDÉSÉNEK MECHANIZMUSA</i>	7
1.5.	<i>A CDV FERTŐZÉS TŰNETEI, LEFOLYÁSA</i>	9
1.6.	<i>TELJES GENOM SZEKVENÁLÁS NAPJAINKBAN</i>	11
1.7.	<i>VIZSGÁLT FAJOK</i>	12
2.	CÉLKITŰZÉSEK	14
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
3.1.	<i>MINTAGYŰJTÉS</i>	15
3.2.	<i>NUKLEINSAV EXTRAKCIÓ</i>	15
3.3.	<i>REAL-TIME RT-PCR REAKCIÓ</i>	16
3.4.	<i>AMPLIKON ALAPÚ TELJES GENOM SZEKVENÁLÁS</i>	17
3.5.	<i>FILOGENETIKAI ANALÍZIS</i>	21
4.	EREDMÉNYEK	22
5.	DISZKUSSZIÓ	26
6.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	29
7.	HIVATKOZOTT IRODALMAK JEGYZÉKE.....	30

Absztrakt

A Canine Distemper Virus (CDV, szopornyica) egy negatív egyszálú RNS vírus, amely számos állatfajban képes súlyos megbetegedéseket okozni, mind a házi-, mind pedig a vadon élő állatok körében. A CDV a Hemagglutinin génjének szekvenciája alapján számos törzset különböztetünk meg. A vírus törzsek szerinti besorolásához ugyan elég a Hemagglutinin génjének szekvenciájának ismerete, azonban a teljes genom szekvenálás során kapott eredmények segítségével lényegesen több információt tudhatunk meg a CDV felépítéséről, működéséről és rendkívüli fajok közti fertőzőképességéről.

Munkánk során a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatallal (NÉBIH) együttműködve Magyarországon élő n=197 vörös rókától (*Vulpes vulpes*) és n=14 aransakáltól (*Canis aureus*) származó nyál és rektum-váladék mintát vizsgáltunk meg a CDV hazánkban történő jelenlétének felmérése érdekében. Elsőként Real-Time RT-PCR segítségével vizsgáltuk a vírus jelenlétét, majd ezt követően a pozitív mintából ampliton alapú teljes genom szekvenálási MinION (Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság) módszerrel meghatároztuk a vírus genomját, majd filogenetikai analízist végeztünk a CDV törzs meghatározása érdekében.

Összesen n=1/197 példányban, egy vörös róka esetében igazoltuk a vírus jelenlétét, amelyet 2024 május 29-én, Szabolcs-Szatmár-Bereg vármegyében ejtettek el. Az érintett példány esetében mindkét mintatípusból kimutatható volt a vírus RNS. A Real-Time RT-PCR vizsgálatot követően, NGS szekvenáló technológia segítségével meghatároztuk a vírus teljes genomját. A filogenetikai analízist alapján az általunk vizsgált, vörös rókából származó CDV a Europe törzsbe tartozott, amely Európában általánosan elterjedt törzsnek számít. A teljes genomok filogenetikai analízise alapján a legközelebbi szekvenciák Németországban, 2015-ben, mosómedvéből (*Procyon lotor*), valamint 2016-ban vörös rókából kimutatott szekvenciák voltak. A Hemagglutinin gén szekvenciák analízise szerint azonban egy 2017-ben, szintén Németországban elhullott vörös rókából származó szekvencia állt a legközelebb.

A teljes genom szekvenálás során kapott genom adatok segítségével további információkat kaphatunk a vírus fajspecifitásáról, vakcina kikerüléséről, fertőzőképességéről és genomjának módosulásairól. Ezek az adatok a jövőben fontos alappillérei lehetnek a CDV elleni védekezésnek, legyen szó háziállataink immunizálásáról, vagy akár vadon élő, a CDV-vel szemben alacsony túlélési rátával rendelkező védett és fokozottan védett fajokról.

1. Bevezetés

1.1. Témafelvetés

A vadon élő ragadozók kórokozóinak vizsgálata kiemelkedően fontos feladat mind ökológiai, mind betegségökológiai szempontból nézve, hiszen ezek az élőlények nagyban hozzájárulnak az ökoszisztémák egészséges működéséhez. A betegségek, köztük a vírusok vizsgálatával többek között információkat szerezhetünk az adott populáció egészségi állapotáról, az adott életközösségben cirkuláló kórokozókról, valamint egy jelenlevő kórokozó fertőzési spektrumáról. Ezen információk létfontosságúak a zoonótikus vagy éppen az állatokat érintő súlyos megbetegedések megértésének és megelőzésének szempontjából, továbbá hozzájárulhatnak haszon- és háziállataink megvédéséhez a természetes élőhelyeken cirkuláló kórokozókkal szemben. Mivel a természetben jelenlevő patogének a védett és fokozottan védett élőlények populációit is negatívan befolyásolhatják, ezért a vadonélő állatok kórokozóinak monitorozása fajvédelmi programokban is kulcsszerephez juthat (Aguirre, 2009; Bodewes et al., 2014; Murray et al., 1999).

1.2. *Canine Distemper Virus (CDV), taxonómia*

A *Paramyxoviridae* család tagjai nagy, burokkal rendelkező RNS vírusok, amelyek számos élőlényt képesek megbetegíteni. Egyes fajaik emlősöket, madarakat, míg mások akár halakat és hüllőket fertőznek, de akadnak olyan fajok is, amelyek emberi megbetegedésekért felelősek. Humán patogének többek között említhető például a Nipah vírus (NiV), humán parainfluenza-vírusok (HPIV) és a measles virus (MHV, humán kanyaró) (Rima et al., 2019).

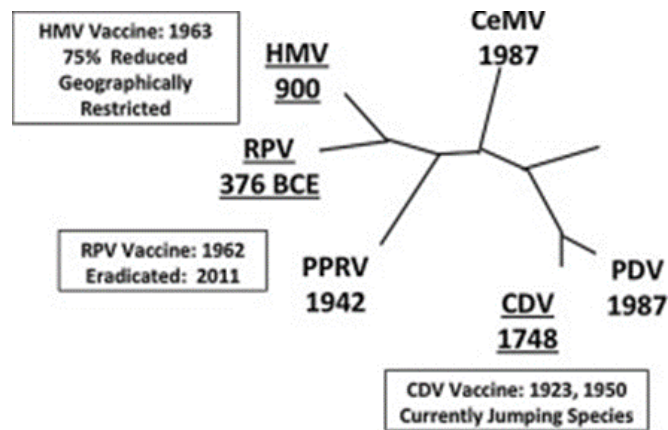
Magyarországon szopornyica nevű megbetegedésért felelős vírus a Canine Distemper Virus (CDV), amely a *Morbillivirus* nemzetség, *Paramyxoviridae* családjába tartozó negatív, egyszálú RNS vírus. A vadon élő állatokon túl a háziállatokat, legtöbb esetben a kutyákat érintő, súlyos emésztő-, légző-, és idegrendszeri megbetegedéséért felelős kórokozó. A kutyákon túl házimacskákat is fertőz, de a macskák az esetek többségében klinikai tünetek nélkül vészelik át a kórt (Vries et al., 2015; Deem et al., 2000).

A CDV világszerte elterjedt kórokozó, melynek széles gazdaspektruma és földrajzi elterjedésének köszönhetően számos különböző törzse alakult ki. A Hemagglutinin (H) gén szekvenciája alapján osztható törzsekre a vírus, azonban a teljes genomjának ismeretében további értékes információkat nyerhetünk róla. Az újonnan felfedezett törzsek nevüket többségében a felfedezés földrajzi helyzete alapján kapják. Jelenleg 21 különböző törzse ismert

a vírusnak, amelyek a következők: Artic-like, Rockborne like, Caspian, European Wildlife, Europe, South America 1, South America 2, America 1/Asia 3, America 2, North America 2, America 3, South/North America 4, Asia 1, Asia 2, Asia 4, India1/Asia 5, Asia 6, Africa 1/South Africa, Africa 2, South Africa 3, és Novel Australian (Bhatt et al., 2019; George et al., 2022; Giacinti et al., 2022; Glišić et al., 2024; Jo et al., 2019; Lanszki et al., 2024).

Magyarországon CDV-vel fertőzött állatokból eddig összesen 3 különböző törzset mutattak ki, amelyek a Europe, a European wildlife és az Arctic-like törzsek. Ezeket a törzseket hazánkban elsőként olyan kutyák vizeletéből, véréből és orrváladékából azonosították, amelyek a CDV klinikai tüneteinek valamelyikét mutatták, például egyes egyedek idegrendszeri, mások légző és emésztőrendszeri tüneteket mutattak (Demeter et al., 2007, 2010). További kutatások feltárták a CDV jelenlétét egyéb hazánkban előforduló vadon élő állatokban is, többek között európai vidrában (*Lutra lutra*), molnárgörényben (*Mustela eversmanii*), közönséges görényben (*Mustela putorius*), nyestben (*Martes foina*) és vörös rókában (*Vulpes vulpes*) is (Lanszki et al., 2022; Lanszki et al., 2022).

Történelmi feljegyzések, paleopatológiai vizsgálatok, valamint genetikai és molekulárisbiológiai kutatások is bebizonyították, hogy a CDV közeli rokonságban áll a *Morbillivirus* nemzetség egyéb képviselőivel, mint például a humán kanyaróval és a keleti marhavész vírussal (*rinderpest virus*, *RPV*) (1. ábra). Ezek a kutatások rávilágítottak arra is, hogy a CDV nem alakulhatott ki a fentebb említett vírusoktól függetlenül. Feltételezhetően az 1700-as években, az Újvilágban alakulhatott ki úgy, hogy a kanyaróval fertőzött gyarmatosítók továbbadták a betegséget, a helyi lakosoknak, akik azonban immunitás hiányában elhunytak. A kanyaróval fertőzött emberek húsát a helyi kutyák elfogyasztották, szervezetükhöz a vírus számos mutációt követően adaptálódott, ezáltal létrehozva a Canine Distemper Virust, amely elsődleges gazdaszervezeteivé a kutyák váltak. Ezek az adatok bizonyítják azt a tényt, hogy a CDV evolúciós léptékben mérve egy fiatal vírusnak számít (Uhl et al., 2019). A közös eredet alátámasztásának érdekében elvégzett genetikai vizsgálatok eredményeiből megfigyelhető, hogy mindhárom vírus fehérjéit kódoló gén és aminosav szekvenciája, valamint kodonhasználata hasonló. Ezen felül egyes kutatások bebizonyították, hogy kanyaróoltást követően termelt antitestek a CDV-hez is képesek kötődni, ezzel biztosítva a kanyaró elleni oltások bizonyos fokú hatékonyságát állatmodellek esetében (Vries et al., 2014; Sidhu et al., 1993; Stephenson & Meulen, 1979).

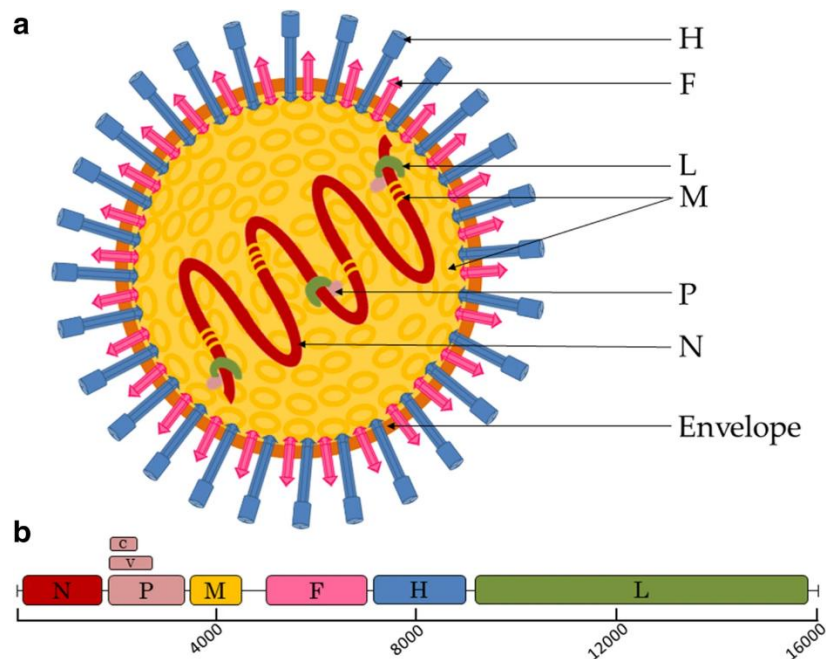


1. ábra: A *Morbillivirus* nemzetség filogenetikai fája. Az HMV, RPV és CDV minták gyűjtése az ellenük alkalmazott vakcinák elterjedését követően történt. Az évszámok jelölik a vírusok által okozott ismert fertőzések első leírását. A rövidítések az alábbi vírusokat jelölik: HMV: Human Measles Virus; RPV: Rinderpest Virus; PPRV: Peste de Pettis Ruminants Vírus; CDV: Canine Distemper Virus; PDV: Phocine Distemper Virus; CeMV: Cetacean Morbilivirus (Uhl et al., 2019).

1.3. Morfológia, genomszerkezet

A CDV viron körülbelül 150 nm átmérőjű, gömb alakú, burkolt és nem szegmentált, negatív egyszálú RNS-t (-ssRNS) tartalmaz. A genom 15690 nukleotid hosszú és 8 darab fehérjét kódol. (da Fontoura Budaszewski et al., 2016). A genom 6 transzkripció egységre bontható, (N-P-M-F-H-L), amelyek a fehérjék kódolásában játszanak szerepet. A transzkripció egységeket úgynevezett nem transzplantált (UTRs) régiók választják el egymástól, mely régiók hossza körülbelül egyenlő hosszúságú, kivéve a mátrix (M) és a fúziós (F) gének közötti UTR régiót (Kolakofsky, 2016; Rendon-Marin et al., 2019).

A virális RNS által kódolt minden fehérje fontos szerepet játszik a vírus ciklusában és a replikációban. Az N fehérje többek között szerepet játszik az RNS kapszidációjában, valamint mintaként szolgál az L elnevezésű polimeráz enzimnek és kofaktorának, a foszoproteinnek (P) az általuk végzett transzkripció és replikáció során. Ez a három fehérje (N; P; L) az RNS-sel közösen alkotja az RNP-nek nevezett ribonukleoprotein komplexet (Messling et al., 2001). A Hemagglutinin (H) és a fúziós (F) fehérjék a CDV burkának integráns membránfehérjéi. Ezek a fehérjék túl a vírus rendelkezik egy membrán asszociálta fehérjével, az úgy nevezett mátrixfehérjével (M) is. A mátrixfehérje segítségével zajlik az RNP szabályozása a gazdasejtben történő bimbózási folyamatok során (2. ábra) (Rendon-Marin et al., 2019).



2. ábra: A CDV virionjának és genomjának szerveződése. Az „a” jelzésű ábrán a CDV sematikus szerkezete látható, ahol az alábbi jelölések láthatók: N: nukleokapszid, P: foszfoprotein, M: mátrixfehérje, F: fúziós fehérje, H: hemagglutinin, L: nagy polimerázfehérje. A „b” jelzésű ábrán a CDV RNS-ének 3’-5’ végéig tartó genomikai térképe látható, ahol minden betűvel jelölt doboz egy-egy külön kódoló mRNS-t jelöl. A „P” genomrégióban több elkülönülő nyitott leolvasási keret (ORF) is megtalálható, amely átfedésekre enged következtetni (Rendon-Marín et al., 2019)

1.4. A CDV gazdaspektruma és a fajok közötti terjedésének mechanizmusa

A CDV széles fertőzési spektrumából adódóan képes megbetegedést okozni a számos, filogenetikailag egymástól távol álló állatfajban. A kutya félék (Canidae), a macska félék (Felidae), a hiéna félék (Hyenidae), a mosómedve félék (Procyonidae), a medve félék (Ursidae), a cibetmacska félék (Viverridae), valamint a cercóffélék (Cercopithecidae) családjából is számoltak be esetekről (Beineke et al., 2015; Deem et al., 2000). A kutya félék családjába tartozó, általunk vizsgált vörös róka ból és aranysakálból (*Canis aureus*) is több esetben kimutatták már a CDV-t (Deem et al., 2000; Glišić et al., 2024; Little et al., 1998). 1997 és 1999 között az ugandai Queen Elizabeth National Park 11 vadon élő oroszlánjának (*Panthera leo*) vérmintáiból azonosítottak CDV elleni antitesteket, ami arra enged következtetni, hogy a populáció egy része a mintavételt megelőző időszakban átesett a fertőzésen (Driciru et al., 2006). A CDV jelenlétét növényevő állatokból is kimutatták, többek között pekarikból (*Pecari tajacu*) Arizónában (Appel et al., 1991), a főemlősök közé tartozó, vadon élő japán makákókban (*Macaca fuscata*) (Yoshikawa et al., 1989), a medve félék családjába tartozó

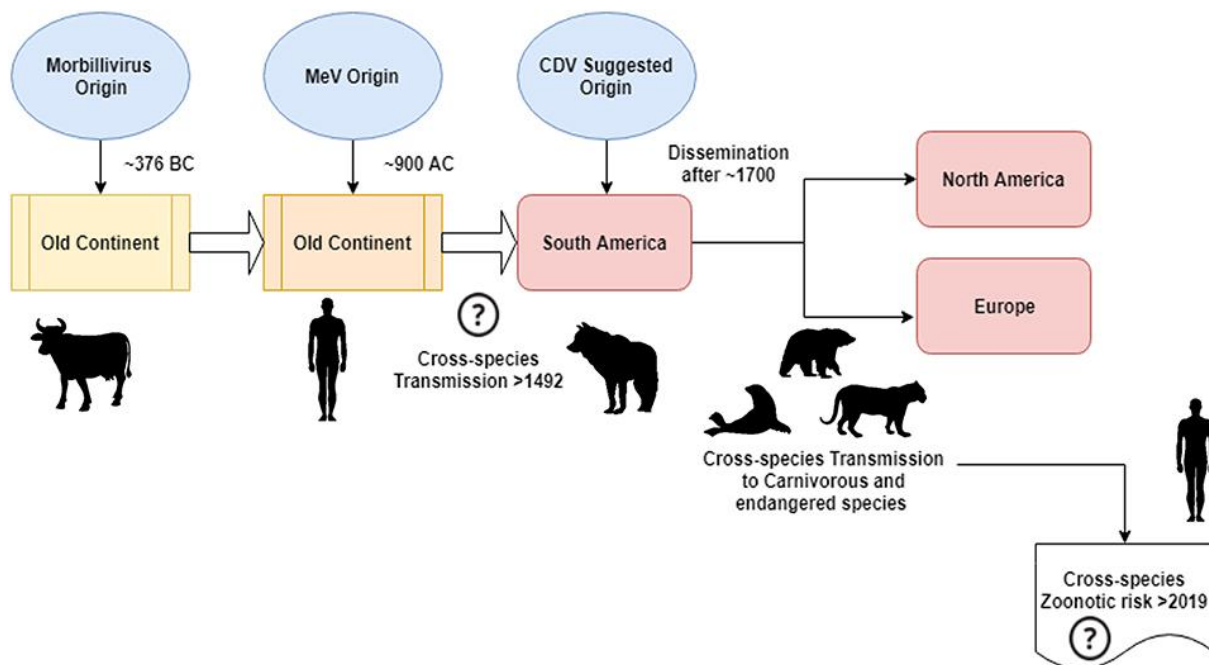
– a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) vörös listáján sebezhetett státuszú – óriás pandában (*Ailuropoda melanoleuca*) (IUCN Red List , 2025). Az óriás pandákat érintő megbetegedés 2014-15-ben 6 egyedet érintett, ezen fertőzött egyedek közül 5 elpusztult, a tünetek megjelenését követő 34 napos időintervallumon belül (Feng et al., 2016).

Magyarországon előforduló védett és fokozottan védett menyétféléből is azonosították már a kórokozót. 2022-ben egy csaknem 20 évre visszatekintő retrospektív vizsgálat során két, korábban elgázolt európai vidra fagyasztott mintáiból a vírus kimutatásán túl a genomjának teljes feltárása is megtörtént. (Lanszki et al., 2022). További hazai kutatás szintén rávilágít a menyétfélék kitettségére a CDV-vel szemben, hiszen több fajban is igazolták a vírus jelenlétét, többek között a védett molnárgörényben, és a Magyarországon vadászható státuszban lévő közönséges görényben és nyestben (Lanszki et al., 2022). Ezekből az esetekből is látszik, hogy a CDV vizsgálata nemcsak virológiai, hanem ökológiai szempontból is nélkülözhetetlen, hiszen veszélyeztetett, fokozottan veszélyeztetett fajokat is érint, ezzel nehezítve ezen fajok fennmaradását és a biodiverzitás sokszínűségének megőrzését.

A CDV rendkívüli fajok közötti fertőzőképességét részben a H fehérje aminosavsorrendjének változása teszi lehetővé. A jelenleg rendelkezésre álló információk mennyisége ugyan csekély, de feltételezhetően az F és az M fehérjék is lényeges szerepet játszanak ebben, tehát ezen folyamatok feltérképezésének érdekében kiváltképp fontos az általunk végzett teljes genom szekvenálás. A mutációk a vírus és a gazdaszervezettől (kutyáktól) eltérő fajok SLAM-je (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) közötti jobb kötődést segíti elő, melyek következtében sok esetben az 530. pozíció található glicin vagy glutaminsav argininre, aszpartánsavra vagy aszparginre valamint az 549. pozícióba található tirozin hisztidinre cserélődik le (Martinez-Gutierrez & Ruiz-Saenz, 2016; McCarthy et al., 2007).

A CDV zoonózisának veszélyére több különböző kutatás is felhívja a figyelmet (3. ábra). Egy ilyen vizsgálat során a közönséges makákók (*Macaca fascicularis*) (GenBank accession numbers AB742520 and AB742522) és az emberek (GenBank accession no. U33017 and NM_030916) SLAM-je és nektin 4 receptorai aminosavsorrendjének (tehát a CDV gazdaszervezetbe történő bejutásának helyének) nagyfokú azonosságán alapul (Bieringer et al., 2013; Sakai et al., 2013). Korábbi kutatások összeférhetetlenséget állapítottak meg az emberi SLAM és a CDV kapcsolódása között, feltételezhetően ennek köszönhető az is, hogy a vírus jelenlegi tudásunk szerint nem képes emberi sejteket használni gazdaszervezetként természetes körülmények között. Azonban, *in vitro* vizsgálatok során humán sejtvonalakat (NCI-H358)

sikeresen fertőztek CDV-vel, továbbá többszöri passzálást követően ismerté váltak a Hemagglutinin génben bekövetkező mutációs pontok, valamint ennek során bekövetkező aminosavsorrend változások (Otsuki et al., 2013).



3. ábra: A CDV tranzmissziós útjának lehetséges evolúciójának sematikus ábrája (Quintero-Gil et al., 2019).

1.5. A CDV fertőzés tünetei, lefolyása

A CDV a többségében ragadozó emlősöket érintő, világszinten az egyik legjelentősebb megbetegedést okozó vírus, amely nagyjából háromszáz éve ismert az emberiség számára, hiszen komoly tünetegyüttest mutat a megfertőzött egyedekben (Vries et al., 2015). A szopornyica fertőzéseket tekintve óriási különbség fedezhető fel mind a kór lefolyása, mind pedig a halálozási ráta tekintetében eltérő rendszertani családba tartozó élőlények között. A macskafélék közé tartozó házimacskák esetében a fertőzés az esetek többségében tünetmentesen vagy enyhe tünetekkel zajlik le, de az ugyanebbe a családba tartozó nagymacskáknál (pl.: afrikai oroszlán, tigris (*Panthera tigris*), leopárd (*Panthera pardus*), jaguár (*Panthera onca*)) megfigyelték, hogy az esetek 47%-ban a fertőzés tünetekkel járt, amelyekbe az egyedek 23%-a elpusztult (Deem et al., 2000). Egyes kutatások rávilágítottak arra, hogy a menyétfélék nagyon érzékenyek a vírussal szemben, mivel az őket érintő megbetegedések az esetek közel 100%-ban az egyed pusztulásával járnak (Mayer et al., 2015; Perpiñán et al., 2008).

A vírus az orr, illetve a száj nyálkahártyáján jut be a gazdaszervezetbe fertőzött egyedből származó folyadékcseppek (orr váladék, nyál, vizelet stb.) segítségével. A bejutást követően a gazdaszervezet makrofágjai segítségével eljut a garatmandulákba és a légzési szervrendszer egyéb nyirokcsomóiba, ahol megkezdődik a vírus gyors replikációja. A fertőzést követően további nyirokszervekben is megjelenik a CDV, többek között a lépben, a máj Kuffer sejtjeiben, illetve a gyomor és a vékonybél *lamina propria* nevű rétegében. A fertőzést követő 8-9. napon feltehetően a vér segítségével eljut az epitel sejtekbe és a központi idegrendszer sejtjeibe. Amennyiben a gazdaszervezet immunrendszere elég erős, tehát a sejtés és humorális immunválasz megfelelően zajlik le, az egyed képes felépülni a fertőzésből bármilyen klinikai tünet nélkül. Ellenkező esetben egy klinikai tünetegyüttest követően a gazdaszervezet elpusztul.

A klinikai tünetegyüttest különböző környezeti faktorokon túl, az egyed kora és immunrendszerének állapota, valamint a fertőzést okozó CDV törzs is befolyásolja. A fertőzés súlyos esetben emésztő-, légző-, és idegrendszeri tünetekkel jár, valamint az állat elpusztulásával végződhet. Gyenge fertőzés esetén az egyeden kismértékű fogyást, felső légúti megbetegedést és lázat tapasztalhatunk, ilyenkor az állat nem mutat klinikai tünetekkel (ebben az esetben kutyafélék túlélési mutatói jók). Azonban a klinikai tünetek megjelenését követően kialakul a megbetegedés akut formája, amely magas halálozási rátával, kötőhártyagyulladással, tüdőgyulladással, véres hasmenéssel, dehidratációval és fogyással jár. A központi idegrendszer megbetegedése a betegség súlyosságától függetlenül bármilyen egyednél kialakulhat és komoly tünetekkel járhat, ilyenek például a nyaki merevség, a hyperesthesia (az ingerekre való érzékenység rendellenesen nagy növekedése), az egyensúly érzékelési és mozgásszervi problémák (a cerebellum és a vestibulum károsodásának következtében), a végtagok bénulása, valamint rohamok kialakulása (Appel & Summers, 1995; Beineke et al., 2015; Deem et al., 2000; Koutinas et al., 2002).

Néhány ritka esetben – amikor a fertőzés következtében nem pusztul el az egyed – a tünetek elmúlását követően is jelen lehet a vírus az állat szervezetében, amely PCR vizsgálattal még továbbra is kimutatható. Erre a rendkívül ritka esetre egy Magyarországról Svájcba importált mentőkutya esete világít rá: az adott egyed 4 hónapig mutatott PCR pozitivitást (Willi et al., 2015). Ezen túl egy menhelyi kutya esete is kiváló példa, mivel az állat 17 hónapig volt PCR pozitív (Lanszki et al., 2021). Annak ellenére, hogy Magyarországon a házikutyák- és macskák CDV-vel szembeni immunizálása az állatorvosok által erősen ajánlott, a vírus a vadon élő és vakcinázatlan háziállatok révén képes fennmaradni.

1.6. Teljes genom szekvenálás napjainkban

Az emberiség történetében a humán genom projekt kulcsszerepet játszott, hiszen az emberi genom feltérképezésén túl, elindította az egyéb élőlények genomikai szintű feltárására irányuló kutatásokat is (Venter et al., 2001). A genomikai szerkezet megismerése rendkívül fontos, mert a teljes genomok ismeretében filogenetikai analízis segítségével megállapíthatók a fajok közötti rokonsági kapcsolatok, a genomon belüli változások és egyéb más tényezők (Arumugam et al., 2019).

Napjainkban az NGS (next-generation sequencing, következő generációs szekvenálási) technológia egyre szélesebb körben elérhető. Ezek közül fontos kiemelni a második és a harmadik generációs szekvenálási technikákat. Második generációs szekvenálási technikák közé tartozik az Illumina (Bio-Rad, USA), valamint az Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, USA) platformok, amelyek működési elve sok, milliós nagyságrendű, rövid DNS szakaszok párhuzamos szekvenálásán alapul. A rövid readekből kifolyólag a szekvenciák összeillesztése hosszú DNS szálak esetén az alacsony komplexitású régiókból, valamint a strukturális variabilitásból kifolyólag nehézségekkel járhat. Harmadik generációs szekvenálási eljárások közé sorolandók az Oxford Nanopore Technology (Egyesült Királyság), és a Pacific Biosciences (USA) platformjai. Ezen technológiákra jellemzőek a nagy hosszúságú readek, melyek segítségével a második generációs szekvenálási eljárások hátrányai kiküszöbölhetők olyan módon, hogy a nagy read-hosszoknak köszönhetően a genomon belüli ismétlődések és strukturális variációk detektálhatók. A korai harmadik generációs szekvenálási technológiák pontossága alacsonyabb volt, mint második generációs társaiké, azonban az idő előrehaladtával és a technológia fejlődésével jelentősen javult a harmadik generációs technikák read olvasási pontossága (Hu et al., 2021).

Az NGS technológiák számos formája felhasználható már a kórokozók szerkezetének és működésének a megértéséhez. Számos humán patogén kórokozó teljes genom szekvenálása történt már meg az NGS technológia segítségével, többek között a SARS-CoV-2 teljesgenomja is. (Kemenesi et al., 2020) A humán patogén kórokozók túl, már számos állati kórokozó esetén is sikeresen alkalmaztak NGS technológiákat. Ilyenek például egy kúpos foka (*Halichoerus grypus*) bőréről származó poxvirus (Günther et al., 2017), zsiráfból (*Giraffa camelopardalis*) származó papillomavirus (Vanmechelen et al., 2017), madarakból származó avipox vírus szekvenciák (Crovill et al., 2018). NGS technológia alkalmazásából is több teljes CDV genom származik már, mind hazai, mind pedig nemzetközi szinten is, hiszen a MinION

(Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság) az egyik leggyakrabban alkalmazott szekvenálási eljárás, gyorsaságának, valamint a szekvenciák nagy lefedettségének köszönhetően (Lanszki et al., 2024; Lanszki et al., 2022; Lanszki et al., 2022; Lanszki et al., 2022; Peserico et al., 2019).

Egy Kubából Olaszországba importált kutya agymintájából készített vírus izolátumból, olasz kutatók MinION platformon végzett metagenomikai vizsgálat során sikeresen meghatározták az érintett kutyát megfertőző CDV teljes genomját (Peserico et al., 2019). Az általunk használt, amplikon alapú teljes genom szekvenálási eljárás mintaelőkészítése nagy mértékben különbözik a korábban említett példánktól, mivel amplikon alapú módszer során az amplifikáció különböző enzimátikus reakciók segítségével zajlik és alacsony vírus titer esetén is elvégezhető a natív mintából. További előnye, hogy lényegesen rövidebb idő alatt végrehajtható, mint a vírus izolálással történő dúsítás, hiszen a reakciósorozatok elvégzése néhány órát vesz igénybe, míg a vírus izoláláshoz szükséges sejtkultúra gondozása, valamint a vírus megfelelő kópiaszámban történő replikációja akár napokat, heteket is igénybe vehet (Lanszki et al., 2022).

1.7. Vizsgált fajok

Vörös róka

A vörös róka a világ legelterjedtebb ragadozó emlőse, amely nagy adaptációs képességgel rendelkezik. Kiváló alkalmazkodókészségéből fakadóan a természetes élőhelyeken túl (erdők) urbanizált területeken, külvárosi, kisvárosi, valamint zöld területekkel dúsított nagyvárosi régiókban is könnyen megtalálja a számára megfelelő életfeltételeket. Éjszaka aktív, opportunista ragadozó, amely a kisméretűektől kezdve a gerincteleneken keresztül a madarakig minden nála kisebb élőlényt elfogyaszt. Táplálékában szerepelnek még gyümölcsök, de urbanizált környezetben a szemét fogyasztása is előfordul (Garcês & Pires, 2021). Vörös rókában több különböző kórokozót azonosítottak, ilyen például az *Echinococcus multilocularis* (galandféreg), a *Paragonimus kellicotti* (laposféreg), a *Spirocerca lupi* (fonálféreg), a Rabies (veszettség, RABV), a Canine parvovirus (CPV), a Canine adenovirus (CaDV), a Canine coronavirus (CCoV), a Canine herpes virus (CHV), a Canine parainfluenza (CPIV), és a Canine distemper virus (CDV) (Davidson et al., 1992). A rókákban megtalálható különféle kórokozók és az urbanizáció hatására kialakuló közös élőhelyek következtében a vörös rókák és az általuk

terjesztett betegségek komoly állategészségügyi kockázatot jelenthetnek az adott kórokozók ellen nem immunizált társállatokra nézve.

Aranysakál

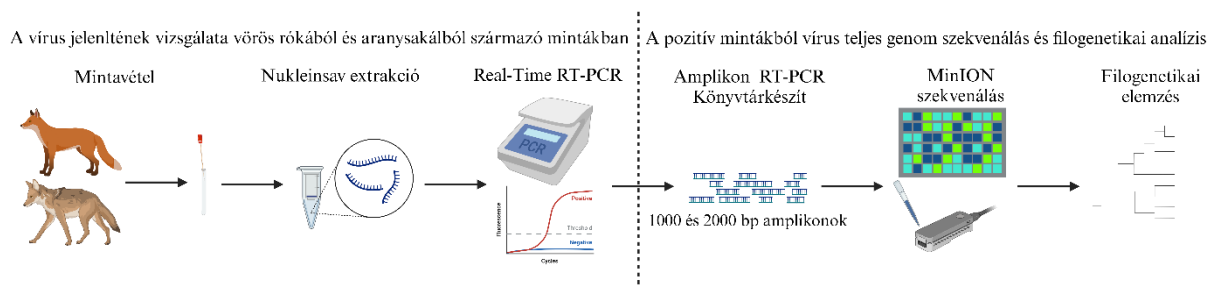
Az aranysakál Nyugat és Kelet Afrika, Közép és Dél-Kelet Ázsia, a Közel-Kelet és Európa elterjedt északai életmódot folytató, közepes méretű ragadozó kutyaféléje. A táplálékláncban betöltött szerepe hasonló a vörös rókáéhoz, azonban Európában többnyire kerüli a településeket és az embert. Főként kisemlősökkel, madarakkal, hüllőkkel és gerinctelenekkel táplálkozik, de alkalmanként a dögöt is fogyaszt. A vörös rókával egyetemben több különböző vírust is kimutattak már aranysakálból, ilyen az általunk is vizsgált CDV (Deem et al., 2000; Glišić et al., 2024), a Canine parvovirus, a Rabies, valamint a sapovirusok (Alexander et al., 1994; Balázs et al., 2024; Hanlon, 2013).

2. Célkitűzések

Fő célunk a CDV jelenlétének felmérése a Magyarországon vadon élő vadászható ragadozó emlősökben (vörös róka, aranyakál). A CDV vadon élő populációkban történő jelenlétét ismerve további lépéseket javasolhatunk a háziállatok védelmének érdekében (pl.: vakcinák segítségével történő immunizáció) az érintett területeken.

További célunk volt a fertőzött egyedekből származó vírusok teljes genomjának szekvenálása és filogenetikai analízise. Ezen túl a szekvenciák nemzetközi adatbázisba történő feltöltése, mellyel segítjük a témában érdekelt többi kutató munkáját is, és hozzájárulunk olyan folyamatok megértéséhez, mint a vakcina kikerülő képesség, a széles gazdaspektrum vagy a zoonotikus potenciál.

3. Anyagok és módszerek



4. ábra: A munkafolyamatok sematikus ábrázolása, készült <https://BioRender.com>

3.1. Mintagyűjtés

A vizsgálatba bevont példányokat szakképzett vadászok gyűjtötték Magyarország északkeleti régiójában (Békés vármegye, Borsod-Abaúj-Zemplén vármegye, Csongrád-Csanád vármegye, Hajdú-Bihar vármegye, Szabolcs-Szatmár-Bereg vármegye) 2024 májusa és augusztusa között, veszettség-monitoring program keretein belül. A mintagyűjtést a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) végezte. Összesen (n=197 vörös rókától és n=14 aranysakáltól) egyedenként két mintatípus: n=211 darab orális és n=211 rektális minta gyűjtése történt meg (1. táblázat).

1. táblázat: A gyűjtött példányszámok vármegyékre lebontva

	Vörös róka (n)	Aranysakál (n)
Békés vármegye	49	4
Borsod-Abaúj-Zemplén vármegye	56	3
Hajdú-Bihar vármegye	18	3
Csongrád-Csanád vármegye	4	1
Szabolcs-Szatmár-Bereg vármegye	70	3
Összesen:	197	14

3.2. Nukleinsav extrakció

Összesen n=422 mintát dolgoztunk fel. A mintákat a nukleinsav extrakció kezdetéig -20°C-on tároltuk. A tamponmintákat beletörtük 300 µl foszfátpufferált sóoldatot (PBS) tartalmazó 2 ml ürtartalmú steril Eppendorf csőbe, ezt vortexeltük majd 3 percig 16.000 rpm fordulatszámon 18 °C-on centrifugáltuk. Ezt követően a mintából 100 µl-t mértünk át 300 µl lízispufferbe. A nukleinsav extrakció a Zymo Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research,

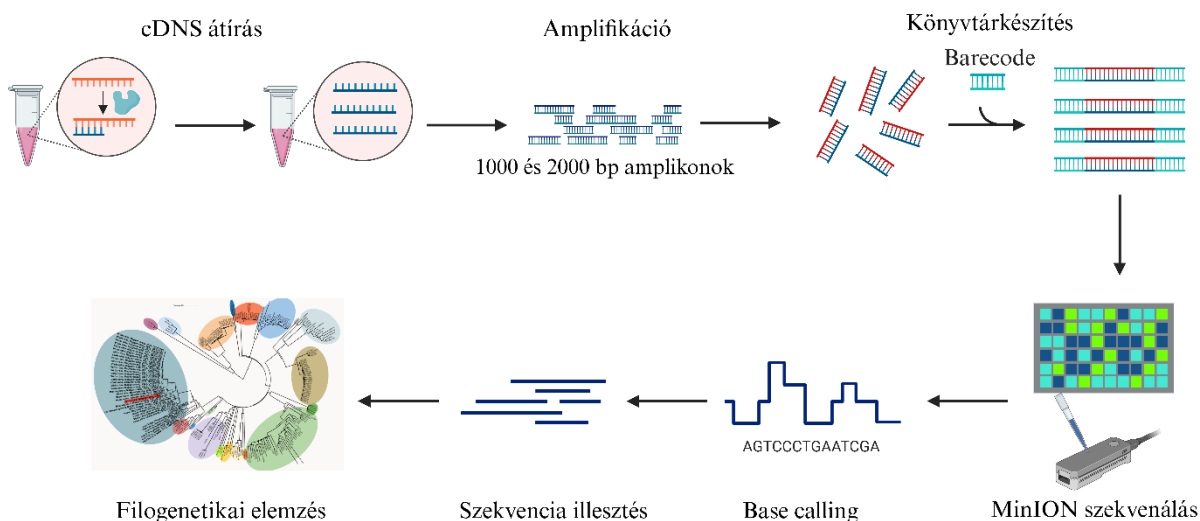
USA) segítségével zajlott. A nukleinsavat (RNS) 50 µl nukleáz mentes vízbe oldottuk be. A kinyert nukleinsavat a PCR reakciókig -80°C-on tároltuk.

3.3. Real-Time RT-PCR reakció

A Real-Time RT-PCR a Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, USA) használatával, CFX OPUS 96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA) segítségével történt. A Real-Time RT-PCR mastermix összeméréséhez, mintánként 2,5 µl nukleáz mentes vizet, 10 µl Luna Universal One-Step Reaction Mixet, 1 µl Luna WarmStart® RT Enzim mixet, 0,5 µl forward primert, 0,5 µl reverse primert (Elia et al., 2006), továbbá 0,5 µl próbát mértünk össze nukleáz-mentes Eppendorf csőbe steril PCR fülkében. Majd a mastermixet 15 µl-enként szétmértük PCR-csövekbe úgy, hogy a vizsgálni kívánt mintákon kívül még 2 darab PCR csőbe jusson belőle. Ez a 2 PCR cső a pozitív, valamint a negatív kontrolunk számára volt szükséges. A negatív kontrolt tartalmazó PCR csőbe 5 µl nukleáz mentes vizet mértünk. A templát RNS bemérése egy másik PCR fülkében történt, a kontamináció érdekében úgy, hogy a fagyasztott nukleinsav 5 µl-ét egyesével külön PCR csövekbe mértük, ügyelve a sterilitás megtartására. A minták bemérését követően az utolsó PCR csőbe bemértük a pozitív kontrolt, ami egy korábbi pozitív mintából származott. Ezután behelyeztük a mintákat az OPUS PCR gépbe, amelyet az alábbi programon indítottunk el: 55°C-on, 10 percre, amelyen az RNS cDNS-sé történő átírása, tehát a reverz transzkripció zajlott, 95°C-on 1 percig, egy predenaturációs lépés történt, ezt követte a denaturáció 95°C-on 10 másodpercig, majd a primer kötődés 46°C-on 15 másodpercig és végül az új DNS szál szintézise 60°C-on 15 másodpercig. A denaturációt, a primerkötődést, valamint a szálhosszabbítást 45-ös ciklusszámmal megismételtük.

3.4. Amplikon alapú teljes genom szekvenálás

Az amplikon alapú teljes genom szekvenálást már létező protokoll részleges módosításával hajtottuk végre (*Protocols.io*, CDV, 2021) az azóta a gyártó által fejlesztett MinION szekvenáló protokollnak megfelelően.



5. ábra: Az amplikon alapú teljes genom szekvenálás részletes ábrázolása, készült: <https://BioRender.com>

3.4.1. cDNS átírás

A cDNS preparációs eljárásához először egy steril fülkében (későbbiekben mastermix cabinet) elkészítettük a mastermix-et, ami 1 μ l 50 μ M-os random hexamerekből és 1 μ l 10 μ M-os dNTP-ből állt. Ezt követően egy másik PCR fülkében hozzáadtuk a templát RNS-ből 11 μ l-t, majd PCR gép segítségével 65°C-on 5 percig inkubáltuk, amelyet 1 perces fagyasztott mintatartó állványon történő hűtés követett. Az inkubációval párhuzamosan a mastermix cabinet-ben elkészítettük a Superscript IV-et (Invitrogen, USA) tartalmazó mastermix-et, amely mintánként 4 μ l Superscript IV puffert, 1 μ l 100mM-os DTT-t, 1 μ l RNaseOUT RNázinhibítort és 1 μ l Superscript IV Reverz Transzkriptázt tartalmazott. A minta inkubációs idejének lejártát követően hozzáadtuk a mastermix 20 μ l-ét, majd 55°C-on 50 percre, majd 70°C-on 10 percre PCR gépbe helyeztük és 4°C fokon felhasználásig tároltuk. Fontos megjegyeznünk, hogy a kontamináció elkerülése végett, minden egyes munkafolyamat szakasz megkezdését megelőzően és befejezését követően a PCR fülkéket 0,5%-os nátrium-hipoklorit vizes oldat (NaOCl, hypo) és mikrozid® AF liquid felületfertőtlenítő segítségével kifertőtlenítettük, valamint UV fény segítségével sterilizáltuk.

3.4.2. Amplikon PCR

A cDNS átírást követően előkészítettük a multiplex PCR-hez szükséges 1000 bp és 2000 bp primer szetteket a mastermix cabinet-ben. Az alkalmazott primer szettek tervezése korábbi munkákban történt, amelyek elméletileg az összes ismert CDV törzs teljes genom szekvenálásához alkalmazhatóak, alternatív primerek segítségével (Lanszki et al., 2022). Mindegyik primer pár megközelítőleg 1000 bp, illetve 2000 bp hosszúságú DNS szakasz felszorzására alkalmas. Mindkét szettet további 2 pool-ra bontottuk, annak érdekében, hogy az átfedő szakaszok esetében, a forward primer ne a távolabb eső reverse primerrel kötődjön, hanem a hozzá tervezett párjával. A (Protocols.Io, CDV, 2021) már meglévő protokoll alapján történt az 1000 bp amplikon szett első pool-ja (későbbiekben 1000_1) 10 µl 5X Q5 reakció puffert, 1 µl 10mM-os dNTP-t, 0,5 µl Q5 Hot Start DNS Polimeráz enzimet, 5 µl 10 µM-os Primer Pool 1-et, valamint 31 µl nukleáz mentes vizet tartalmazott. Az 1000_2-es, 2000_1-es, 2000_2-es amplikon szettek, 10 µl 5X Q5 reakció puffert, 1 µl 10mM-os dNTP-t, 0,5 µl Q5 Hot Start DNS Polimeráz enzimet, 32 µl nukleáz mentes vizet, valamint az adott pool-nak megfelelően, 4 µl 10 µM-os Primer Pool 1-et, vagy 2-t tartalmaztunk. A reagensek eltérő mennyiségét a különböző primer szettek esetében, a primerek eltérő mennyisége (db) okozta, annak érdekében, hogy minden DNS szakasz egyforma arányban amplifikálódjon.

Ezek után PCR fülkében minden egyes primer pool-hoz hozzáadtunk 2,5-2,5 µl cDNS-t és PCR gép segítségével végrehajtottuk a reakciókat (Two-Step PCR). Az elő denaturálási lépés 98°C-on 30 másodpercig zajlott, amelyet egy 30 ciklusból álló denaturációs és primer kötődési/lánchosszabbítási lépések ismétlődése követett. A denaturációs lépések 98°C-on 15 másodpercig zajlottak, míg a primerkötődés/lánchosszabbítás 64°C-on 5 percig történt, amely után a mintánk a további felhasználásig 4 °C-on volt tárolva.

3.4.2. Könyvtár készítés és szekvenálás

Egy új, steril LoBind csőbe (Eppendorf, Németország) 60 µl SPRI gyöngyöt (AMPure XP beads, Beckman Coulter, USA, a későbbiekben: mágnesgyöngy) mértünk, amelyhez az amplikon PCR reakciót követően az azonos pool-hoz tartozó 1-es és 2-es PCR termékek 50- 50 µl-ét pipettáztunk, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ennek célja, hogy a számunkra szükséges DNS a mágnesgyöngyök felületéhez kötődjön és elváljon a nem szükséges komponenseitől (mint például az amplikon PCR során alkalmazott enzimek és primerek). A mintákat egy mágneses tartóban helyeztük, majd óvatosan megforgattuk, ezután a felesleges folyadékot LoBind csőből eltávolítottuk, és 250 µl 70%-os etil-alkohollal történő

mostuk. Az alkoholos mosási lépést további egy alkalommal elvégeztük, magas tisztaságú DNS amplikonok kinyerésének érdekében. Az etil-alkohol eltávolítását a mágnesgyöngyök „szárítása” követte, ahol a maradék etil-alkohol elpárolgott a mintáról. Ezután a lépés után a DNS amplikonok leoldása következett a mágnesgyöngyök felületéről, 15 µl nukleázmentes víz segítségével.

Barcode-olás előtt megállapítottuk a megtisztított DNS koncentrációját QUBIT 4 (Thermo Fisher Scientific, USA) fluorométer segítségével. A mérést high sensitivity beállításon végeztük, a méréshez szükséges standard oldatok a Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) protokolla alapján készültek. A DNS koncentráció ismeretében a mintánk 1000-es pooljának 3,2 µl-éhez 9,3 µl nukleázmentes vizet, míg a 2000-es pooljának 7 µl-éhez 5,5 µl nukleázmentes vizet adtunk (annak érdekében, hogy egyenlő arányban történhessen a szekvenálásuk), majd mindegyik mintánkhoz 1,75 µl End Prep Reaction Buffert és 0,75 µl End Prep Enzyme Mixet adtunk, a DNS végek javítása érdekében. A reakcióelegy összemérését követően 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd PCR gép segítségével 65°C-on további 10 percig, végül 1 percig fagyasztott tartóra helyeztük.

A barcode-olást (vagyis a 1000bp és 2000bp hosszú amplikonok egyedi jelölését) az SQK-NBD114.96 szekvenáló és barcode kit (Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság) segítségével hajtottuk végre. A reakcióhoz egy steril Eppendorf csőbe helyeztünk 5,7 µl nukleázmentes vizet, 2,5 µl egyedi barcode-ot, 10 µl Ultra II ligation Master Mixet, 0,3 µl ligation enhancer-t mintánként, majd a mintákra mértük, így az egyedi barcode-okat ligáltuk a DNS-ek mindkét végére. A reakció végbemeneteléhez 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk az oldatunkat majd PCR gép segítségével 10 percig 65°C-ra melegítettük, melyet 1 perc hűtés követett, hűtött tartó segítségével a ligáz enzim inaktiválása érdekében. Mivel már megtörtént a barcode-olás (tehát az adott DNS szakaszok jelölése), a további reakciók már ugyan abban az Eppendorf csőben történtek minden minta esetében. A mintáinkat összemértük egy LoBind csőbe a tisztítási lépésekhez, melyet a mintánk térfogatának 0,4x mennyiségű mágnesgyöngy segítségével végeztünk. 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után, a mintákat a mágneses tartóban helyeztük, majd óvatos forgatásokat követően, a mágnesgyöngyök egy oldalra helyezéséig állni hagytuk, és lemértük a folyadékot a mágnesgyöngyök érintése nélkül. Mosást végeztünk 200 µl 70%-os etil-alkohollal és a már ismertetett forgatási eljárást, valamint a folyadék eltávolítását követően a gyöngyök „szárítási” lépése következett, ami után hozzáadtunk 30 µl elúciós puffert és 2 perc inkubáció után a

folyadékot áthelyeztük egy steril Eppendorf csőbe, ügyelve a mágnesgyöngyök átpipettázásának elkerülésére.

A tisztítási lépéseket követően ismételten elvégeztük a DNS koncentráció mérését QUBIT fluorométer segítségével. A tisztított mintából 30 µl-t, egy 10 µl NEBNext Quick Ligation Reakció Puffert, 5 µl Adapter Mixet, valamint 5 µl Quick DNS ligázt tartalmazó LoBind csőbe mértünk, és 20 percig inkubáltuk. Hozzáadtunk 50 µl mágnesgyöngyöt, 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd mágneses tartóban helyeztük és a folyadékot eltávolítottuk. 250 µl Small Fregmant Buffer (SFB) segítségével mostuk összesen 2 alkalommal. Ebben az esetben már nem alkalmazhatunk etil-alkoholt, mivel az Adapter Mix tartalmazza az adapter fehérjét, amelyet kicsapna az etanolos mosás. Az SFB eltávolítását követően 15 µl elúciós puffer segítségével 2 percig inkubáltuk és mágneses tároló segítségével a mágnesgyöngyök nélkül átpipettáztuk a könyvtárunkat egy Eppendorf csőbe.

A végső könyvtárunkat rápipettáztuk a MinION R10.4.1-es Flow Cell-re (Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság), amelyen a szekvenálás 18 órán keresztül zajlott, mely idő alatt valós időben követhető volt számunkra a Flow Cell aktív pórusainak száma, továbbá a szekvenciák minősége és hossza is.

3.4.3. Bioinformatikai analízis

A bioinformatikai analízis Ubuntu 22.04 operációsrendszeren (Canonical company, Anglia) futott. A basecalling a Guppy basecaller (v6.5.7) (Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság) software segítségével, MinION R10.4.1-es flowcellen szekvenált, DNS-hez optimalizált superaccurate model használatával történt, az ehhez szükséges konfigurációs fájl a „dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup.cfg” volt. A Guppy barcoder (v6.5.7) (Oxford Nanopore Technologies, Egyesült Királyság) software hajtotta végre a demultiplexing folyamatot, mely során a mintáinkat barcode-ok alapján mappákba válogatta szét, amit egy quality check követett a NanoPlot (v1.41) softwarerel, mely segítségével megállapítottuk a read-ek hosszát és minőségét. NanoFilt (v.2.0.8) software használatával zajlott a szűrés. A minimum szekvenciahossz az 1000-es szett esetében 300 bp, míg a 2000-es szett esetében 400 bp, a minimum minőség pedig Q12 volt. Minden egyes szekvenciánk elejéből és végéből eltávolításra került egy-egy 25 bp hosszúságú szakasz, ami az átfedő primereket tartalmazta. Minimap 2 (v2.24) software-t alkalmazva egy CDV referencia genomra feltérképeztük a megszűrt szekvenciák, majd a medaka (v2.0.1) software-rel és az

„r1041_e82_400bps_sup_g615” modellel készítettünk egy polírozott konszenzus szekvenciát, amelyet manuális korrekciót követően véglegesítettünk.

3.5. Filogenetikai analízis

A teljes genomok filogenetikai analíziséhez (n=264 szekvencia), letöltöttük nemzetközi adatbázisban (NCBI) megtalálható összes CDV teljes genom szekvenciát, majd a többszörös szekvencia illesztést a Geneious Prime (Geneious, Új-Zéland) program MUSCLE nevű algoritmusával végeztük el. Az általunk szekvenált CDV teljes genom Maximum-Likelihood filogenetikai analízisét a Geneious Prime (Geneious, Új-Zéland) program RAXML-NG algoritmusának segítségével, a legjobb modell szelekciót követően a GTR+I+G modellt használva 1000 bootstrap-pel végeztük el. A filogenetikai fa outgroup-jaként a közeli rokon vírus, a Porcine Distemper Virust (PDV) (GenBank accession number: KY629928) teljes genom szekvenciáját használtunk. A filogenetikai fa formázására iTOL software-t használtunk.

A Hemagglutinin gén filogenetikai analíziséhez (n=1157 szekvencia), szintén letöltöttük nemzetközi adatbázisban (NCBI) megtalálható összes CDV Hemagglutinin gén szekvenciát, majd a többszörös szekvencia illesztést a Geneious Prime (Geneious, Új-Zéland) program MUSCLE nevű algoritmusával végeztük el. Az általunk szekvenált CDV Hemagglutinin gén Maximum-Likelihood filogenetikai analízisét a IQTREE2 program segítségével, a legjobb modell szelekciót követően a TVM+I+G4 modellt használva 1000 bootstrap-pel végeztük el. A filogenetikai fa outgroup-jaként ebben az esetben is a Porcine Distemper Virust Hemagglutinin gén szekvenciáját használtunk. A filogenetikai fa formázására iTOL software-t használtunk.

4. Eredmények

A n=422 mintából a Real-Time RT-PCR során összesen n=2 mintából mutattuk ki a CDV jelenlétét. Az aranyakálokból származó mintákból nem sikerült kimutatnunk a vírus jelenlétét, azonban a 931-es (0046163) számú, vörös rókától származó, mind két minta esetén PCR pozitív eredményt kaptunk (2. táblázat).

2. táblázat: A fertőzött vörös róka adatai

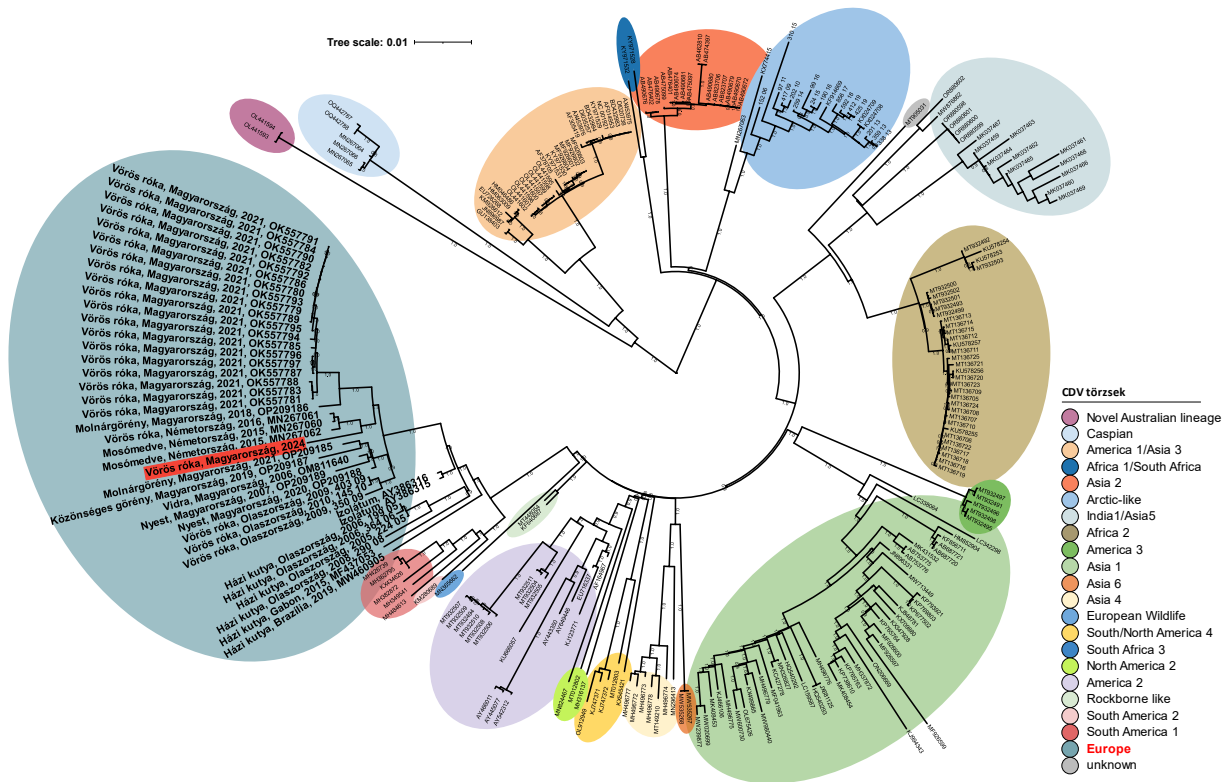
Kor	Származásihely	Kilövés helye	Kilövés ideje
Adult	Szabolcs-Szatmár-Bereg	857350-es vadászterület, Nyírlugos	2024.05.29.

A nyál és a rektumváladék minták Ct (Cycle threshold, küszöbérték) értékei eltérőek voltak (a nyálmintában mért Ct érték 28,475, míg a rektumváladékból vett mintáé 33,865 volt) (3. táblázat). A két minta közül, mivel egyazon egyedből származtak, az univerzális amplikon alapú teljesgenom szekvenálási eljárásunkhoz az alacsonyabb Ct értékű mintát (tehát a nyálmintát) használtuk fel, hiszen ebben feltételezhetően magasabb volt a vírus titer.

3. táblázat: A vörös rókából származó mintákon végzett Real-Time RT-PCR eredménye

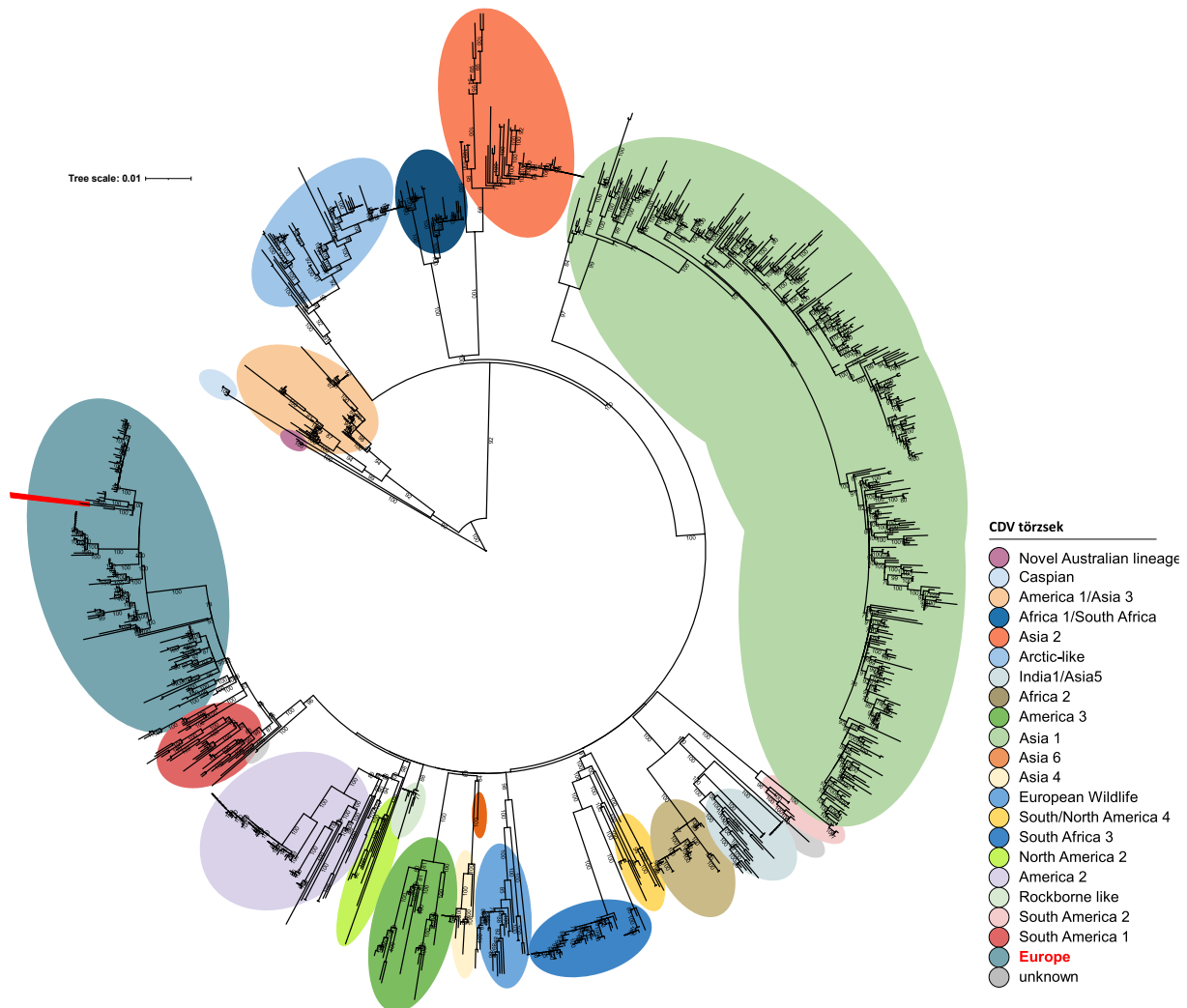
Mintasorszám	Minta típusa	Real-Time RT-PCR Ct érték
931	Nyálminta	28,475
931	Rektumváladék minta	33,865

A teljesgenom szekvenálást követően a filogenetikai analízisünk során megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált CDV a Europe törzsbe tartozott (6. ábra) és legközelebbi szekvenciák a 2015-ben, 2 mosómedvéből, Németországban kimutatott (NCBI accession numbers: MN267060 illetve MN267062), valamint 2016-ban szintén Németországban, vörös rókából kimutatott (NCBI accession number: MN267061) CDV genom szekvenciák voltak.



6. ábra: Maximum-Likelihood filogenetikai fa, n=264 CDV teljes genom nukleotid szekvenciájából. A filogenetikai fa kiindulópontjaként, outgroupnak a Phocine distemper virus (PDV) (GenBank accession number: KY629928) szekvenciát használtunk. A CDV Europe törzse az ábra bal oldalán, kék színnel jelölve látható, benne pirossal kiemelve az általunk szekvenált CDV teljes genom. Az ábrán szereplő CDV törzsek jelölései a jobb oldalon láthatók.

A teljesgenom szekvenálást követően a Hemagglutinin gén szekvenciájának analízise megerősítette, hogy az általunk vizsgált CDV a Europe törzsbe tartozott (7. ábra), azonban a nagyobb mintaelemszámnak (n=1157) köszönhetően a Hemagglutinin gén szekvenciái alapján a legközelebbi szekvencia egy 2017-ben Németországban elhullott vörös rókából (NCBI accession number: OL795424) származott (8. ábra).



7. ábra: Maximum-Likelihood filogenetikai fa, n=1157 Hemagglutinin gén (1824 nt) nukleotid szekvencia alapján. Az elemzés során outgroupnak a Phocine Distemper Virus (PDV) (GenBank accession number: KY629928) szekvenciát használtunk. A CDV Europe törzse az ábra bal oldalán, kék színnel jelölve látható, benne pirossal kiemelve az általunk szekvenált CDV Hemagglutinin gén nukleotid szekvenciája. Az ábrán szereplő CDV törzsek jelölései a jobb oldalon láthatók.

Az általunk meghatározott vírus szekvencia, mind a teljes genom (6. ábra), mind pedig a Hemagglutinin gén alapján (7. és 8. ábra) elkészített filogenetikai fán távolabb helyezkedik el a 2021-ben szintén Magyarországról kimutatott, vörös rókákból származó CDV szekvenciáktól (Lanszki et al., 2022). Feltételezhető, hogy az általunk vizsgált eset nem függ szorosan össze a 2021-ben kitört járvánnyal.



8. ábra: Hemagglutinin gén szekvencia alapján készült Maximum-likelihood filogenetikai fa kinagyított változata, amelyen az általunk szekvenált CDV Hemagglutinin gén szekvencia – pirossal jelölve – elhelyezkedése látható a CDV Europe törzsén belül.

5. Diszkusszió

Kutatásunk során $n=197$ vörös rókából és $n=14$ aranysakálból származó, összesen $n=211$ nyál és $n=211$ rektumváladék minta vizsgálata során $n=1$ vörös róka esetében mutattuk ki a CDV jelenlétét, mind a nyál, mind pedig a rektumváladék mintából. Ezzel bizonyítva a vírus jelenlétét a vadonélő és vadászható hazai ragadozóemlős populációkban 2024-ben. A rókák territoriális, táplálékszerzési és viselkedési ismeretében feltételezhetjük, hogy a Szabolcs-Szatmár-Bereg vármegyében kilőtt, fertőzött egyed a szomszédos Hajdú-Bihar vármegye, illetve Románia területén is terjeszthette a betegséget (Saunders et al., 1993). Ezt alátámasztja a filogenetikai analízisünk eredménye is, ahol a vizsgált CDV szekvencia amely a Europe törzsbe tartozott, távolabb helyezkedett el a 2021-ben, Magyarország északi régiójában járványt okozó CDV szekvenciáktól. A 2021-es járvány során közel 50 esetet regisztráltak, amelyekből 21 egyed esetében (jelen munkában is alkalmazott) MinION szekvenálási eljárás segítségével sikeresen azonosították a CDV Europe törzsét (Lanszki et al., 2022).

Számos hazai és nemzetközi kutatás rávilágított már a CDV rendkívül széles gazdaspektrumára és fertőzőképességére. A vírus széles gazdaspektrumából kifolyóan fontos megjegyeznünk azt is, hogy számos védett és fokozottan védett faj (többek között a molnárgörény és a vidra) megfertőzésére is képes (Lanszki et al., 2022; Lanszki et al., 2022). A korábbi védett és fokozottan védett állatokra irányuló kutatások, valamint a CDV jelenlétének igazolása tükrében fontos a jelenlegi vizsgálatok folytatása és kibővítése, a biodiverzitás védelmének érdekében.

NGS technológia segítségével történő szekvenálást, valamint a szekvenciánk és a már ismert CDV teljesgenom szekvenciák segítségével elvégzett filogenetikai analízist követően megállapítottuk, hogy az általunk kimutatott CDV a Europe törzsbe tartozik. Számos külföldi kutatás is rávilágított már a CDV Europe törzsének jelenlétére mind a hazai, mind Európai ragadozó emlős populációk esetén. Többek között a Berlin városában élő, invazív fajnak számító mosómedvékből is azonosították a Europe törzset (Rentería-Solís et al., 2014). Vörös rókákból és házikutyákból sikeresen kimutatták a CDV Europe törzsét teljes genom szekvenálási eljárások és Hemagglutinin gén szekvenálások segítségével Európa szerte (Demeter et al., 2007; Lanszki et al., 2022; Sekulin et al., 2011). Továbbá olasz kutatók tanulmányainak következtében ismert, hogy a hazánkban is előforduló európai borz is fogékony a CDV Europe törzsével szemben (Di Sabatino et al., 2016). Egy friss tanulmány szerint az

említett törzs a szerbiai aransakál populációban is jelen van és megbetegedéseket okoz (Glišić et al., 2024).

Számos kutatás fókuszában azonban nem az invazív vagy közönséges fajok, hanem a ritka, védett, illetve fokozottan védett élőlények állnak. Egy korábbi tanulmány a Spanyolországban élő, veszélyeztetett státuszú ibériai hiúzoknál (*Lynx pardinus*) számolt be CDV fertőzésről (Meli et al., 2010). A CDV Europe törzsét 2020-ban Németországban elhullott, eurázsiai hiútból (*Lynx lynx*) is leírták, Hemagglutinin gén szekvenálását követően (Lombardo et al., 2023). Végül, de nem utolsó sorban fontos megemlítenünk, hogy a CDV Europe törzsét számos hazánkban is megtalálható menyétféléből kimutatták mind hazai, mind nemzetközi kutatók. Egy 2022-es tanulmány rávilágított, a hazai molnárgörény, közönségesgörény és nyest populációk érintettségére (Lanszki et al., 2022). Egy másik, szintén 2022-ben közölt retrospektív kutatás pedig a hazai vidra populációk kitérttségére hívja fel a figyelmet a vírussal szemben (Lanszki et al., 2022). A védett állatok CDV-vel történő megfertőződésének és magas halálozási arányára való tekintettel a CDV monitorozása fontos szerepet játszhat ezen fajok megóvásában. A monitorozáson túl fontos szerepet játszik ezen élőlények védelmének érdekében a háziállataink megfelelő immunizálása CDV-vel szemben, hiszen a házikutyák fontos szerepet játszanak a vírus terjedése során (Martinez-Gutierrez & Ruiz-Saenz, 2016).

A CDV Europe törzs mellett említést érdemel az Arctic-like törzs, amely jelenléte szintén ismert mind hazánkban, mind pedig az Eurázsiai szubkontinens valamennyi pontján. Magyarországon az Arctic-like törzset számos alkalommal azonosították kutyákból (Demeter et al., 2007; Lanszki et al., 2021). Az Alpokban élő szürke farkas (*Canis lupus*) populációban is igazoltan jelen van a vírus Arctic-like törzse, amely 20 egyed elhullásához vezetett (Di Sabatino et al., 2014). Továbbá a veszélyeztetett státuszú szibériai tigrisek (*Panthera tigris altaica*) pusztulásáról is beszámoltak 2001-ben, 2004-ben és 2010-ben CDV Arctic-like törzsének fertőzése következtében (Seimon et al., 2013).

A nanopore alapú teljes genom szekvenálás egyre gyakrabban használt módszer, az utóbbi években számos kórokozó vizsgálatához alkalmazták (Crovile et al., 2018; Günther et al., 2017; Kemenesi et al., 2020). A szekvenálás többféleképpen is végrehajtható, az egyik lehetséges módszer, a metagenomikai MinION alapú teljes genom szekvenálás. Ezzel a módszert olasz kutatók használták CDV teljes genom szekvenálásra úgy, hogy vírus izolátumot készítettek egy fertőzött kutya agyszövetét felhasználva (Peserico et al., 2019). Az általunk használt amplitikon alapú szekvenálási eljárás az előbb említett vírus izolációs eljáráshoz viszonyítva lényegesen gyorsabb, hiszen itt enzimek segítségével zajlik az örökítőanyagról

készült DNS amplifikálása, míg vírus izoláció esetén a vírus replikációja élő sejteken történik. Az amplitikon alapú teljes genom szekvenálási eljárások további előnye az, hogy alacsony vírus titer esetén is képes elég nagy mértékben amplifikálni az örökítőanyagot, így biztosítva a szekvenált read-ek nagy mennyiségét, valamint a genom nagymértékű lefedettséget, rövid időn belül (Lanszki et al., 2022).

Az általunk szekvenált teljes genom nemcsak a megbetegedést okozó CDV törzs megállapítására alkalmas, hanem későbbi rekombinációval kapcsolatos vizsgálatok és vakcinafejlesztési kutatásokhoz is felhasználható. Annak érdekében, hogy megismerhessük a hazai fajok CDV érintettségét, kiemelt figyelmet kell fordítani, mind az invazív, közönséges és ritka fajok vizsgálatára. A jövőben tervezzük a munka folytatását, hogy időben is nyomon tudjuk követni a CDV hazai előfordulását, illetve további genomikai vizsgálatokat végezhessünk.

6. Köszönetnyilvánítás

Kiemelten köszönöm a segítséget a Szentágothai János Kutatóközpont, Virologia Nemzeti Laboratórium valamennyi munkatársának, akik a szellemi és anyagi háttérrel biztosították a kutatás megvalósulásához, kivált képpen témavezetőmnek, Dr. Lanszki Zsófiának, valamint Dr. Bodó Kornéliának, Dr. Hetényi Rolandnak, Ábrahám Ágotának és Dr. Kemenesi Gábornak. A NÉBIH munkatársainak, akik a mintagyűjtést végezték. Továbbá köszönöm összes eddigi egyetemi Oktatómnak és volt biológia tanárainknak a rengeteg tudást, amelyet mindaddig átadtak számomra!

7. Hivatkozott irodalmak jegyzéke

- Aguirre, A. A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S7>
- Alexander, K. A., Kat, P. W., Wayne, R. K. & Fuller, T. K. (1994). Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(4), 486–491. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-30.4.486>
- Appel, M. J. G., Reggiardo, C., Summers, B. A., Pearce-Kelling, S., Mare, C. J., Noon, T. H., Reed, R. E., Shively, J. N. & Örvell, C. (1991). Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of Virology*, 119(1–2), 147–152. <https://doi.org/10.1007/BF01314331>
- Appel, Max J.G. & Summers, B. A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 44(2–4), 187–191. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00011-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00011-X)
- Arumugam, R., Uli, J. E. & Annavi, G. (2019). A Review of the Application of Next Generation Sequencing (NGS) in Wild Terrestrial Vertebrate Research. *Annual Research & Review in Biology*, 1–9. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i530061>
- Balázs, B., Boros, Á., Pankovics, P., Nagy, G., Szekeres, S., Urbán, P. & Reuter, G. (2024). Detection and complete genome characterization of a genogroup X (GX) sapovirus (family Caliciviridae) from a golden jackal (*Canis aureus*) in Hungary. *Archives of Virology*, 169(5), 100. <https://doi.org/10.1007/s00705-024-06034-2>
- Beineke, A., Baumgärtner, W. & Wohlsein, P. (2015). Cross-species transmission of canine distemper virus—an update. *One Health*, 1, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.09.002>
- Bhatt, M., Rajak, K. K., Chakravarti, S., Yadav, A. K., Kumar, A., Gupta, V., Chander, V., Mathesh, K., Chandramohan, S., Sharma, A. K., Mahendran, K., Sankar, M., Muthuchelvan, D., Gandham, R. K., Baig, M., Singh, R. P. & Singh, R. K. (2019). Phylogenetic analysis of haemagglutinin gene deciphering a new genetically distinct lineage of canine distemper virus circulating among domestic dogs in India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(3), 1252–1267. <https://doi.org/10.1111/tbed.13142>
- Bieringer, M., Han, J. W., Kendl, S., Khosravi, M., Plattet, P. & Schneider-Schaulies, J. (2013). Experimental Adaptation of Wild-Type Canine Distemper Virus (CDV) to the Human Entry Receptor CD150. *PLoS ONE*, 8(3), e57488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057488>
- Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M., van den Brand, J. M., Osterhaus, A. D. & Smits, S. L. (2014). Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virology Journal*, 11(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-89>

- Croville, G., Le Loc'h, G., Zanchetta, C., Manno, M., Camus-Bouclainville, C., Klopp, C., Delverdier, M., Lucas, M.-N., Donnadieu, C., Delpont, M. & Guérin, J.-L. (2018). Rapid whole-genome based typing and surveillance of avipoxviruses using nanopore sequencing. *Journal of Virological Methods*, 261, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.08.003>
- da Fontoura Budaszewski, R., Streck, A. F., Nunes Weber, M., Maboni Siqueira, F., Muniz Guedes, R. L. & Wageck Canal, C. (2016). Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.014>
- Davidson, W. R., Appel, M. J., Doster, G. L., Baker, O. E. & Brown, J. F. (1992). Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 581–589. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.4.581>
- de Vries, R. D., Ludlow, M., Verburch, R. J., van Amerongen, G., Yüksel, S., Nguyen, D. T., McQuaid, S., Osterhaus, A. D. M. E., Duprex, W. P. & de Swart, R. L. (2014). Measles Vaccination of Nonhuman Primates Provides Partial Protection against Infection with Canine Distemper Virus. *Journal of Virology*, 88(8), 4423–4433. <https://doi.org/10.1128/JVI.03676-13>
- De Vries, R., Duprex, W. & De Swart, R. (2015). Morbillivirus Infections: An Introduction. *Viruses*, 7(2), 699–706. <https://doi.org/10.3390/v7020699>
- Deem, S. L., Spelman, L. H., Yates, R. A. & Montali, R. J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 31(4), 441–451. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0441:CDITCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0441:CDITCA]2.0.CO;2)
- Demeter, Z., Lakatos, B., Palade, E. A., Kozma, T., Forgách, P. & Rusvai, M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Veterinary Microbiology*, 122(3–4), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.001>
- Demeter, Z., Palade, E. A., Hornyák, Á. & Rusvai, M. (2010). Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 142(3–4), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.017>
- Di Sabatino, D., Di Francesco, G., Zaccaria, G., Malatesta, D., Brugnola, L., Marcacci, M., Portanti, O., De Massis, F., Savini, G., Teodori, L., Ruggieri, E., Mangone, I., Badagliacca, P. & Lorusso, A. (2016). Lethal distemper in badgers (*Meles meles*) following epidemic in dogs and wolves. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.020>
- Di Sabatino, D., Lorusso, A., Di Francesco, C. E., Gentile, L., Di Pirro, V., Bellacicco, A. L., Giovannini, A., Di Francesco, G., Marruchella, G., Marsilio, F. & Savini, G. (2014). Arctic Lineage-Canine Distemper Virus as a Cause of Death in Apennine Wolves (*Canis lupus*) in Italy. *PLoS ONE*, 9(1), e82356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082356>

- Driciru, M., Siefert, L., Prager, K. C., Dubovi, E., Sande, R., Princee, F., Friday, T. & Munson, L. (2006). A Serosurvey of Viral Infections in Lions (*Panthera leo*), from Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 667–671. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.3.667>
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M. S., Lorusso, E., Di Trani, L. & Buonavoglia, C. (2006). Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 136(1–2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.004>
- Feng, N., Yu, Y., Wang, T., Wilker, P., Wang, J., Li, Y., Sun, Z., Gao, Y. & Xia, X. (2016). Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Scientific Reports*, 6(1), 27518. <https://doi.org/10.1038/srep27518>
- Garcês, A. & Pires, I. (2021). Secrets of the Astute Red Fox (*Vulpes vulpes*, Linnaeus, 1758): An Inside-Ecosystem Secret Agent Serving One Health. *Environments*, 8(10), 103. <https://doi.org/10.3390/environments8100103>
- George, A. M., Wille, M., Wang, J., Anderson, K., Cohen, S., Moselen, J., Lee, L. Y. Y., Suen, W. W., Bingham, J., Dalziel, A. E., Whitney, P., Stannard, H., Hurt, A. C., Williams, D. T., Deng, Y.-M. & Barr, I. G. (2022). A novel and highly divergent Canine Distemper Virus lineage causing distemper in ferrets in Australia. *Virology*, 576, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.09.001>
- Giacinti, J. A., Pearl, D. L., Ojkic, D., Campbell, G. D. & Jardine, C. M. (2022). Genetic characterization of canine distemper virus from wild and domestic animal submissions to diagnostic facilities in Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 198, 105535. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105535>
- Glišić, D., Kuručki, M., Ćirović, D., Šolaja, S., Mirčeta, J. & Milićević, V. (2024). Molecular analysis of canine distemper virus H gene in the golden jackal (*Canis aureus*) population from Serbia. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 426. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04284-5>
- Günther, T., Haas, L., Alawi, M., Wohlsein, P., Marks, J., Grundhoff, A., Becher, P. & Fischer, N. (2017). Recovery of the first full-length genome sequence of a parapoxvirus directly from a clinical sample. *Scientific Reports*, 7(1), 3734. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03997-y>
- Hanlon, C. A. (2013). Rabies in Terrestrial Animals. In *Rabies* (pp. 179–213). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396547-9.00005-5>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- IUCN Red List . (2025). <https://www.iucnredlist.org/species/712/121745669>

- Jo, W. K., Peters, M., Kydyrmanov, A., van de Bildt, M. W. G., Kuiken, T., Osterhaus, A. & Ludlow, M. (2019). The Canine Morbillivirus Strain Associated with An Epizootic in Caspian Seals Provides New Insights into the Evolutionary History of this Virus. *Viruses*, 11(10), 894. <https://doi.org/10.3390/v11100894>
- Kemenesi, G., Zeghib, S., Somogyi, B. A., Tóth, G. E., Bányai, K., Solymosi, N., Szabo, P. M., Szabó, I., Bálint, Á., Urbán, P., Herczeg, R., Gyenesei, A., Nagy, Á., Pereszlényi, C. I., Babinszky, G. C., Dudás, G., Terhes, G., Zöldi, V., Lovas, R., ... Jakab, F. (2020). Multiple SARS-CoV-2 Introductions Shaped the Early Outbreak in Central Eastern Europe: Comparing Hungarian Data to a Worldwide Sequence Data-Matrix. *Viruses*, 12(12), 1401. <https://doi.org/10.3390/v12121401>
- Kolakofsky, D. (2016). Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology*, 498, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.018>
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Baumgaertner, W., Lekkas, S. & Kontos, V. (2002). Relation of Clinical Signs to Pathological Changes in 19 Cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. *Journal of Comparative Pathology*, 126(1), 47–56. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0521>
- Lanszki, Z., Islam, Md. S., Shikder, Md. F., Sarder, Md. J. U., Khan, S. A., Chowdhury, S., Islam, Md. N., Tauber, Z., Tóth, G. E., Jakab, F., Kemenesi, G. & Akter, S. (2024). Snapshot study of canine distemper virus in Bangladesh with on-site PCR detection and nanopore sequencing. *Scientific Reports*, 14(1), 9250. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59343-6>
- Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G. E., Cserkés, T., Csorba, G., Görföl, T., Csathó, A. I., Jakab, F. & Kemenesi, G. (2022). Detection and sequence analysis of Canine morbillivirus in multiple species of the Mustelidae family. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 450. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03551-7>
- Lanszki, Z., Lanszki, J., Tóth, G. E., Zeghib, S., Jakab, F. & Kemenesi, G. (2022). Retrospective Detection and Complete Genomic Sequencing of Canine morbillivirus in Eurasian Otter (*Lutra lutra*) Using Nanopore Technology. *Viruses*, 14(7), 1433. <https://doi.org/10.3390/v14071433>
- Lanszki, Z., Tóth, G. E., Schütz, É., Zeghib, S., Rusvai, M., Jakab, F. & Kemenesi, G. (2022). Complete genomic sequencing of canine distemper virus with nanopore technology during an epizootic event. *Scientific Reports*, 12(1), 4116. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08183-3>
- Lanszki, Z., Zana, B., Zeghib, S., Jakab, F., Szabó, N. & Kemenesi, G. (2021). Prolonged Infection of Canine Distemper Virus in a Mixed-Breed Dog. *Veterinary Sciences*, 8(4), 61. <https://doi.org/10.3390/vetsci8040061>
- Little, S. E., Davidson, W. R., Howerth, E. W., Rakich, P. M. & Nettles, V. F. (1998). Diseases Diagnosed in Red Foxes from the Southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(3), 620–624. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.620>

- Lombardo, M. S., Mirolo, M., Brandes, F., Osterhaus, A. D. M. E., Schütte, K., Ludlow, M., Barkhoff, M., Baumgärtner, W. & Puff, C. (2023). Case report: Canine distemper virus infection as a cause of central nervous system disease in a Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1251018>
- Martinez-Gutierrez, M. & Ruiz-Saenz, J. (2016). Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0702-z>
- Mayer, J., Marini, R. P. & Fox, J. G. (2015). Biology and Diseases of Ferrets. In *Laboratory Animal Medicine* (pp. 577–622). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00014-6>
- McCarthy, A. J., Shaw, M.-A. & Goodman, S. J. (2007). Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1629), 3165–3174. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0884>
- Meli, M. L., Simmler, P., Cattori, V., Martínez, F., Vargas, A., Palomares, F., López-Bao, J. V., Simón, M. A., López, G., León-Vizcaino, L., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2010). Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary Microbiology*, 146(1–2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.024>
- Murray, D. L., Kapke, C. A., Evermann, J. F. & Fuller, T. K. (1999). Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*, 2(4), 241–254. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.1999.tb00070.x>
- Otsuki, N., Nakatsu, Y., Kubota, T., Sekizuka, T., Seki, F., Sakai, K., Kuroda, M., Yamaguchi, R. & Takeda, M. (2013). The V Protein of Canine Distemper Virus Is Required for Virus Replication in Human Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 8(12), e82343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082343>
- Perpiñán, D., Ramis, A., Tomás, A., Carpintero, E. & Bargalló, F. (2008). Outbreak of canine distemper in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Record*, 163(8), 246–250. <https://doi.org/10.1136/vr.163.8.246>
- Peserico, A., Marcacci, M., Malatesta, D., Di Domenico, M., Pratelli, A., Mangone, I., D’Alterio, N., Pizzurro, F., Cirone, F., Zaccaria, G., Cammà, C. & Lorusso, A. (2019). Diagnosis and characterization of canine distemper virus through sequencing by MinION nanopore technology. *Scientific Reports*, 9(1), 1714. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37497-4>
- protocols.io*, CDV. (2021). <https://www.protocols.io/view/universal-amplicon-based-sequencing-method-for-can-x54v9j6mpg3e/v1>
- Quintero-Gil, C., Rendon-Marin, S., Martinez-Gutierrez, M. & Ruiz-Saenz, J. (2019). Origin of Canine Distemper Virus: Consolidating Evidence to Understand Potential Zoonoses. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01982>

- Rendon-Marin, S., da Fontoura Budaszewski, R., Canal, C. W. & Ruiz-Saenz, J. (2019). Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*, 16(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>
- Rentería-Solís, Z., Förster, C., Aue, A., Wittstatt, U., Wibbelt, G. & König, M. (2014). Canine distemper outbreak in raccoons suggests pathogen interspecies transmission amongst alien and native carnivores in urban areas from Germany. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.034>
- Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W. G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Rota, P. & Wang, L. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *Journal of General Virology*, 100(12), 1593–1594. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001328>
- Sakai, K., Nagata, N., Ami, Y., Seki, F., Suzaki, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Suzuki, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Yoshikawa, T., Otsuki, N., Kurane, I., Komase, K., Yamaguchi, R., Hasegawa, H., Saijo, M., Takeda, M. & Morikawa, S. (2013). Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *Journal of Virology*, 87(2), 1105–1114. <https://doi.org/10.1128/JVI.02419-12>
- Saunders, G., White, P. C. L., Harris, S. & Rayner, J. M. V. (1993). Urban foxes (*Vulpes vulpes*): food acquisition, time and energy budgeting of a generalized predator. In *Mammals as Predators* (pp. 215–234). Oxford University Press Oxford. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198540670.003.0011>
- Seimon, T. A., Miquelle, D. G., Chang, T. Y., Newton, A. L., Korotkova, I., Ivanchuk, G., Lyubchenko, E., Tupikov, A., Slabe, E. & McAloose, D. (2013). Canine Distemper Virus: an Emerging Disease in Wild Endangered Amur Tigers (*Panthera tigris altaica*). *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00410-13>
- Sekulin, K., Hafner-Marx, A., Kolodziejek, J., Janik, D., Schmidt, P. & Nowotny, N. (2011). Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino acid exchange in the haemagglutinin protein. *The Veterinary Journal*, 187(3), 399–401. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.029>
- Sidhu, M. S., Menonna, J. P., Cook, S. D., Dowling, P. C. & Udem, S. A. (1993). Canine Distemper Virus L Gene: Sequence and Comparison with Related Viruses. *Virology*, 193(1), 50–65. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1102>
- Stephenson, J. R. & ter Meulen, V. (1979). Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(12), 6601–6605. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6601>
- Uhl, E. W., Kelderhouse, C., Buikstra, J., Blick, J. P., Bolon, B. & Hogan, R. J. (2019). New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. *International Journal of Paleopathology*, 24, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.12.007>

- Vanmechelen, B., Bertelsen, M. F., Rector, A., Van den Oord, J. J., Laenen, L., Vergote, V. & Maes, P. (2017). Identification of a novel species of papillomavirus in giraffe lesions using nanopore sequencing. *Veterinary Microbiology*, 201, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.035>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L. & Cattaneo, R. (2001). The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 75(14), 6418–6427. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6418-6427.2001>
- Willi, B., Spiri, A. M., Meli, M. L., Grimm, F., Beatrice, L., Riond, B., Bley, T., Jordi, R., Dennler, M. & Hofmann-Lehmann, R. (2015). Clinical and molecular investigation of a canine distemper outbreak and vector-borne infections in a group of rescue dogs imported from Hungary to Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0471-0>
- Yoshikawa, Y., Ochikubo, F., Matsubara, Y., Tsuruoka, H., Ishii, M., Shirota, K., Nomura, Y., Sugiyama, M. & Yamanouchi, K. (1989). Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology*, 20(3), 193–205. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90043-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90043-6)