

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Galamb circovírusok magyarországi előfordulása és genetikai
jellemzése**

Szerző: Wladár Zsófia

V. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Cságola Attila és Dr. Tuboly Tamás

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2011

Tartalomjegyzék

	oldal
Rövidítések jegyzéke	3.
Összefoglaló	4.
Summary	5.
Bevezetés, irodalmi áttekintés és célkitűzések	6-11.
Anyagok és módszerek	12-16.
<i>A vizsgálati minták származása</i>	12.
<i>Nukleinsav kivonás</i>	12.
<i>Nukleinsav amplifikáció</i>	13.
<i>Polimeráz láncreakció(PCR)</i>	13.
<i>Körkörös amplifikáció (RCA)</i>	14.
<i>A PCR termékek ellenőrzése, tisztítása, klónozás</i>	15.
<i>Szekvenálás és szekvencia analízis</i>	15.
Eredmények	17-22.
Megbeszélés és következtetések	23-26.
Köszönetnyilvánítás	27.
Irodalomjegyzék	28-33.

Rövidítések jegyzéke

BFDV	Beak and feather disease virus, Papagájfélék csőr- és toll-képződés zavarának vírusa
CaCV	Canari circovirus, Kanári circovírus
CAV	Chicken anaemia virus, Csirkék fertőző anaemiájának vírusa
Cap	Capsid protein gene, Kapszid fehérjét kódoló gén
CoCV	Columbid circovirus, Galamb circovírus
DCV	Duck circovirus, Kacsa circovírus
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EM	Elektronmikroszkóp
FiCV	Finch circovirus, Pinty circovírus
GoCV	Goose circovirus, Liba circovírus
GuCV	Gull circovirus, Sirály circovírus
ISH	In situ hibridisation, In szitu hibridizáció
LB	Luria Broth
nt	nukleotid
ORF	Open reading frame, Nyílt olvasási keret
PCR	Polimerase chain reaction, Polimeráz láncreakció
PCV	Porcine circovirus, Sertés circovírus
PiCV	Pigeon circovirus, Galamb circovírus
RCA	Rolling circle amplification, Körkörös izotermikus amplifikáció
Rep	Replication associated gene, Replikációs fehérjéket kódoló gén
ssDNS	Single stranded- szimpla szálú- Dezoxiribonukleinsav
YPDS	Young pigeon disease syndrome, Fiatal galamb betegség szindróma

Összefoglaló

A galamb circovírusok (pigeon circovirus, PiCV) okozta fertőzések elterjedtségéről pontos felmérésekre alapozott adatokkal ma még nem rendelkezünk, de ahol ilyen irányú vizsgálatokat végeztek ott a vizsgált állományok 80-100%-os fertőzöttségéről számoltak be. A fertőzés jelentőségét csak becsülni lehet, mert annak ellenére, hogy gyakran csak jellegtelen és enyhe klinikai tünetekben jelentkezik, a fertőzött madarak immunrendszerére gyakorolt károsító hatása közvetett módon a galambok egészségének súlyos fokú romlását, a fertőzött egyedek elhullását okozhatja. Mindez különösen az 1 évnél fiatalabb galambokban játszik szerepet, ahol a legfontosabb tényezőnek tekintik a komplex megbetegedés a „young pigeon disease syndrome” (YPDS) kialakulásában. Idősebb korosztályokban akkor válik kiemelkedő jelentőségűvé, ha a fertőzéssel párhuzamosan valamilyen hajlamosító tényező is jelen van az állományban (pl.: verseny, tojásrakási időszak, zsúfolt tartás, nem megfelelő dűchigiénia, súlyos fokú parazitózisok, aktív társfertőzések, stb.). Ennek következtében a PiCV jelentős hatással van a posta- és húsgalamb tenyészetek egészségi állapotán túl azok teljesítményére és gazdasági értékére is.

Szerkezetileg a PiCV egy egyszálú DNS vírus, capsidja ikozahedrális, burok nélküli. Az eddigi vizsgálatok bizonyítékkal szolgálnak arra, hogy bár a PiCV DNS vírus, mégis igen variábilis természetű. A két fő gén közül az ORF1 (nyílt olvasási keret, open reading frame) a replikációs fehérjét kódolja és lényegesen konzervatívabb, mint az egyetlen capsid fehérjét kódoló ORF2. Így az ORF1-nek első sorban a molekuláris diagnosztikában jut szerep, míg az ORF2 esetében a gén elemzése hozzásegít a vírus változékonyságának a nyomon követéséhez, illetve a megfelelő hatékonyságú vakcinák kidolgozásához.

Kutatómunkánk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk jelen van-e és milyen arányban hazánkban a PiCV, a hazai víruspopuláció milyen genetikai viszonyban áll a már ismert vírusgenomokkal, vannak-e eltérések a capsidok aminosav összetételében és melyek azok? Így egy elsődleges felmérést követően a kutatásban elsősorban az ORF2 gének elemzésére fektettünk hangsúlyt. A felmérés eredményeként igazoltuk a vírus magyarországi jelenlétét, és a szekvencia adatok alapján a vírusokat 5 típusba tudtuk sorolni. Megállapítottuk, hogy az egyes típusok capsid fehérjéi között jelentős szekvencia eltérések mutatkoznak. Elsőként állapítottuk meg, hogy a PiCV capsidok változékonyságában nemcsak a sorozatos pontmutációk, hanem bázis triplet deléciók / addíciók és a gének közötti rekombináció is felelős.

Summary

Today we still lack documented results of surveys about the prevalence of pigeon circovirus (PiCV) infections from around the world but when such tests were performed data indicated 80-100% positivity of individual flocks. The significance of the infection can only be estimated as although the infection is usually characterized by mild clinical symptoms with no specific clinical appearance, the damage of the immune system is indirectly responsible for severe health problems and even the death of the pigeons. This is especially true for pigeons below 1 year of age where PiCV infection is considered as the most important factor in the development of the “young pigeon disease syndrome” (YPDS). Birds of older age are usually less affected, but the infection may become of high importance when other predisposing factors like pigeon races, laying period, crowding, inadequate hygiene, parasites, active co-infections and others are also present. Consequently, PiCV infections have significant impact on the general health status and the production or performance of meat producing or racing pigeon flocks.

PiCV is a single stranded DNA virus, without an envelope around the icosahedral capsid. Previous studies indicated that although PiCV is a DNA virus still it is genetically and hence antigenically as well among the most variable viruses. The genome has two major open reading frames (ORF), ORF1 is responsible for coding the replication associated protein and it is significantly more conservative than ORF2, which encodes the only structural protein (capsid) of the virion. From research and diagnostic points of view ORF1 has a primary role in molecular diagnostics, while sequence analysis of ORF2 helps to monitor the variability of the virus and also the production of effective vaccines.

The primary goals of our investigation were to examine the presence and prevalence of the PiCV in Hungary, analyze the genetic relations of the Hungarian virus population and those that already had been published, show whether there were any differences in the amino acid composition of the capsid proteins and to identify these differences. After a preliminary survey we focused primarily on the analysis of the ORF2 genes. As a result of the survey the presence of the PiCV was confirmed in Hungary and based on the sequence data PiCV could be grouped into 5 different phylogenetic groups. We found that the capsid proteins of individual groups showed significant sequence differences. We were first to detect that the variability of the PiCV capsids was not only the result of continuous point mutations but base triplet deletions / additions and recombinations were also responsible for the phenomenon.

Bevezetés, irodalmi áttekintés és célkitűzések

A galamb circovírus (pigeon circovirus, PiCV) a leggyakrabban kimutatható kórokozó a fiatal, változatos tüneteket mutató, klinikailag beteg galambokból, (Soike és mtsai., 2001) és emellett számtalan adat igazolja széleskörű elterjedését a sport- és a húsgalambok körében, bármilyen egészségi állapotú és korú egyedről legyen is szó (Todd és mtsai., 2004).

A vírus a *Circoviridae* család tagja, amely ma az egyik legaktívabban kutatott víruscsoport a világon. Ez részben annak köszönhető, hogy első tagjait csak a közelmúltban azonosították és ebből következően tulajdonképpen még csak igen keveset tudunk az elterjedtségükről, tulajdonságaikról, miközben egyre több fajukról derül ki, hogy jelentős gazdasági károkat idéznek elő. Leggyakrabban szubklinikai megbetegedésekkel, máskor pedig súlyos tünetekkel járó kórképekkel jelentkeznek és gyakran teremtik meg a másodlagos fertőzések okozta klinikai megbetegedések lehetőségét. Látszólag újabb és újabb területeket hódítanak meg, de nem tisztázott még pontosan, hogy honnan is indultak és mióta vannak jelen az állati szervezetben. A PiCV esetében például az elmúlt években egyre több vizsgálat során mutatták ki a vírus jelenlétét az első publikációt évekkel megelőzően gyűjtött mintákból is (Woods és mtsai., 1994; Duchatel és mtsai., 2009). Jelentőségük az elmúlt évek alatt fokozatosan felértékelődött elsősorban a haszonállat állományok kapcsán, illetve más a természetestől eltérően zsúfoltan tartott állatok (pl.: sportgalambok) esetében.

A PiCV a *Circoviridae* családon belül a *Circovirus* genusba tartozik (Todd és mtsai., 2000). A *Circoviridae* család további két nemzetséget foglal magába, ezek egyike a *Gyrovirus* genus, melynek egyetlen elfogadott tagja a csirkék fertőző anaemiáját okozó vírus (chicken anaemia virus, CAV, Pringle és mtsai., 1999). Változatos, elsősorban a környezetből (talaj, víz) származó minták esetén végzett vizsgálatokkal egy hasonló genomszerkezettel és mérettel rendelkező víruscsoportot azonosítottak, amelynek egy új, nevezetesen a *Cyclovirus* genusba sorolását javasolták (Li és mtsai., 2010). A circovírusok rendkívül széles körű jelenlétét mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy nemrégiben kimutatták újabb változatait halakból is (Lőrincz és mtsai., 2011).

A circovírusok igen apró méretűek, nevüknek megfelelően cirkuláris genommal rendelkeznek, amit egy egyszálú DNS lánc alkot (ssDNS), ennek mérete általában 1,7-2,3 kilobázis. A vírusokra továbbá jellemző, hogy burok nélküliek, capsidjuk ikozaéder szerkezetű és mintegy 15-25 nm átmérőjűek (Todd és mtsai., 2000).

A *Circovirus* genusba már a PiCV-t (más néven Columbidae circovírus, CoCV, Mankertz és mtsai., 2000) megelőzően is több, nagy gazdasági jelentőséggel bíró fajt soroltak, úgymint a sertés circovírust (porcine circovirus, PCV, Tischer és mtsai., 1982; Mankertz és mtsai., 1997), a papagájfélék csőr- és toll-képződési zavarának a vírusát (psittacine beak and feather disease virus, BFDV, Bassami és mtsai., 1998). De az említetteken túl számos madárfajban kimutatták a vírus jelenlétét és esetenként a kórokozó képességét is: liba circovírus (goose circovirus, GoCV, Soike és mtsai., 1999), kanári circovírus (CaCV, Phenix és mtsai., 2001), kacsacircovírus (duck circovirus, DCV, Hattlemann és mtsai., 2003), pinty circovírus (finch circovirus, FiCV, Shivaprasad és mtsai., 2004), sirály circovírus (gull circovirus, GuCV, Twentyman és mtsai., 1999; Todd és mtsai., 2007).

Az első felfedezett circovírus a PCV1 volt, 1974-ben Németországban izolálták, majd írták le (Tischer és mtsai., 1974) sertés veséjéből készült sejtenyészetből (PK-15). Bár ez a vírus apatogénnek bizonyult hamarosan felfedezésre került, hogy egy patogén változata (PCV2) korunk egyik legnagyobb gazdasági kártétellel járó vírusos eredetű fertőző betegségének kórokozója a sertésállományokban (Ellis és mtsai., 1998).

A *Circoviridae* család tagjai, kisméretű genomjuk miatt önmaguk megsokszorozásához osztódó (S fázisban lévő) sejteket igényelnek. Ilyenek elsősorban az immunrendszer sejtjei, a T és B lymphociták és a macrophagok, de bizonyos circovírusok számára alkalmasak a vérsejt előalakok is (CAV), és a toll és csőr képződéséhez szükséges hámsejtek is (BFDV). A sejtek a vírus replikáció során károsodnak, és ennek megfelelően jönnek létre a klinikai tünetek és a kórképek. A madár circovírusok jellemzően a lymphoreticularis szöveteket alkotó sejtekben szaporodnak (John és mtsai., 2006). Mindezek miatt a circovírusok, így a madarak circovírusai is erőteljesen immunszuppresszív hatásúak, és igaz, hogy a vírus maga is képes önállóan megbetegedést előidézni, nagyon gyakran „csak” az egyéb kórokozók, akár fakultatív kórokozók számára teremt ideális szaporodási környezetet (Todd, 2004). A kórbonctani és kórszövettani elváltozások nagyobb hányadáért is gyakran elsősorban a másodlagos fertőzések felelősek (Latimer és mtsai., 1991).

PiCV-t először Észak-Amerikában azonosították (Woods és mtsai., 1993), majd ezt követően világszerte számos országban kimutatták a fertőzést: Kanada és Ausztrália (Woods és mtsai., 1994), Dél-Afrika (Gerdes és mtsai., 1993), Kína (Yu és mtsai., 2009), Taiwan (Genbank adat), illetve több európai országban is, így Észak-Írországon (Smyth és Carroll, 1995), Angliában (Gough és Drury, 1996), Németországban (Soike, 1997; Mankertz és mtsai., 2000; Raue és mtsai., 2005), Franciaországban (Abadie és mtsai., 2001), Belgiumban

(Duchatel és mtsai., 1998, 2005) és Olaszországban (Coletti és mtsai., 2000; Franciosini és mtsai., 2005).

A PiCV jellemzően a hám típusú sejtekben, a macrophagokban és a lymphoid sejtekben szaporodik. Utóbbiak miatt a legfőbb kórszövettani elváltozások az elsődleges és a másodlagos immunszervekben mutatkoznak meg, közülük is elsősorban a lépben és a Bursa Fabricii-ben (Woods és mtsai., 1994; Paré és mtsai., 1999; Coletti és mtsai., 2000; Soike és mtsai., 2001; Raue és mtsai., 2005; Scullion és Scullion, 2007; Schmidt és mtsai., 2008). Szövettani vizsgálatok során a vírusantigének jelenléte kimutatható a lép, a Bursa és a nyálkahártyák lymphoid szöveteiből (Woods és mtsai., 1994). Makroszkóposan az egyetlen közvetlen vírus okozta elváltozás a bursa atrófiája, amit thymus atrophia is kísérhet (Marlier és Vindevogel, 2006).

A PiCV felelőssé tehető a galambászok és állatorvosok által korábban már megfigyelt, általuk "young bird sickness" (fiatal galamb betegség) vagy "swollen gut syndrome" (duzzadt bélcsatorna szindróma) néven emlegetett kórképért. Ezek az elnevezések egy tünet együttest takarnak, ami legjellemzőbben a 4-12 hetes egyedekben jelentkezik, bár ritkábban és enyhébb formában, idősebb madarakban is előfordul. A PiCV fertőzés a kifejlett egyedekben, leggyakrabban szubklinikai jelleget ölt (Paré és mtsai., 1999; Todd és mtsai., 2000; Franciosini és mtsai., 2005; Raue és mtsai., 2005; Duchatel és mtsai., 2005, 2006), a fertőzött egyedek tünetmentes vírushordozóként tarják fent és terjesztik a kórokozót.

A megbetegedett madarakban a klinikai képet az általános tünetek uralják, amelyek lehetnek letargia, anorexia, hasmenés, légzési nehézségek, a súlygyarapodás csökkenése, illetve kifejlett egyedek esetén súlycsökkenés és gyenge verseny teljesítmény (Woods és mtsai., 1994; Raue és mtsai., 2005). A tünet együttest legújabban "young pigeon disease syndrome"-nak (YPDS, fiatal galamb betegség szindróma) nevezik, és ma már tudott, hogy ennek hátterében a PiCV által kiváltott immunszuppresszió áll. A védekezőképesség csökkenése miatt, a galambokat, olyan fertőző ágensek is megbetegíthetik, amelyeket normális esetben az immunrendszer humorális és celluláris elemei elimináltak volna (Woods és Shivaprasad, 1997). Emellett valószínűleg hajlamosít a kialakulására a zsúfolt tartás, a szállítás, vagy a verseny okozta stressz (Schmidt és mtsai., 2008). A vakcinázás nem játszik bizonyítottan szerepet a fertőzés fellobbbanásában (Duchatel és mtsai., 2010). Polimeráz láncreakció segítségével valamennyi, a YPDS tüneteit mutató galambból kimutatható a PiCV (Raue és mtsai., 2005).

Vizsgálatok arra utalnak, hogy a fiatal galambok az utónevelő dúcokban válnak intenzíven fertőzötté a 28 napos választási kor környékén és után, amelynek kiindulási forrása

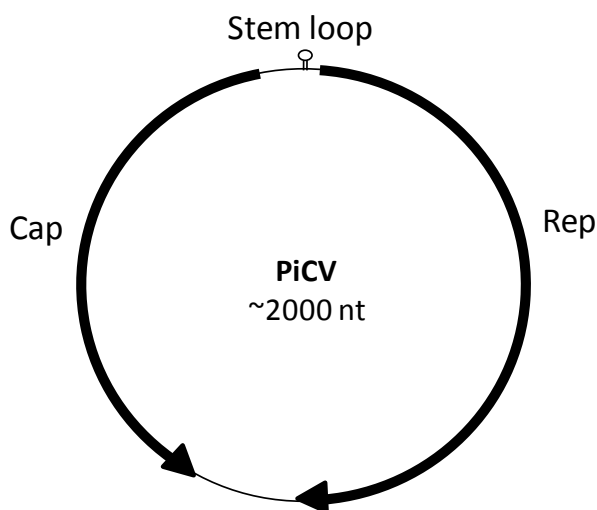
a germinatív úton fertőzött, vírusürítőként kikelt társak, illetve a kontaminált környezet. A fertőzött állományok galambjai 51 napos korukra polimeráz láncreakció (PCR) eljárással 100%-ban PiCV pozitívak voltak (Duchatel és mtsai., 2006; Todd és mtsai., 2006). Fiatal klinikailag beteg galambok tetemeiből elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatokkal 47%-ban volt kimutatható a vírus jelenléte (Soike és mtsai., 2001) és 89%-ban az *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálatok során (Smyth és mtsai., 2001).

Todd és mtsai. (2002) összehasonlították az egyes alkalmazható diagnosztikai eljárások érzékenységét és megbízhatóságát, és eredményeik szerint ugyan a PCR bizonyult magasan a legérzékenyebbnek, de éppen a magas szenzitivitás miatt a klinikailag egészséges madarakból is jelentős számban képes kimutatni a vírus jelenlétét, éppen ezért kérdéses az alkalmassága a circovírussal közvetlenül összefüggésbe hozható klinikai tünetek definiálására.

A PiCV genomja megközelítően 2 kilobázis méretű, capsidja a többi circovírusra jellemző morfológiájú és méretű (Manketz és mtsai., 2000; Todd és mtsai., 2001). Első ízben Mankertz és mtsai. (2000) izoláltak, és szekvenáltak PiCV-t, és publikálták Columbid circovirus (CoCV) néven. Ezt követően Todd és mtsai. (2001) további 2 PiCV-t izoláltak galambok tetemeiből és vetettek szekvencia analízis alá. Megállapították, hogy a 2 különböző PiCV nagymértékben hasonlít a korábban leírt "Columbid circovírushoz". A kapott szekvenciák segítségével PiCV specifikus primerpárokat terveztek a teljes genom amplifikálására. Meghatározták a genom méretét (2037 nt és 2036 nt) és szekvenciáját; a két genom 96.5%-ban egyezett. Később (Todd és mtsai., 2008) 8 újabb galamb PiCV-t hasonlítottak össze a már megszekvenált vírusokkal. Megállapították, hogy a genom hossza 2032 és 2040 nt közé esik.

Valamennyi ismert PiCV genomra jellemző, hogy két fő nyílt olvasási keretet (open reading frame, ORF) hordoz (1. Ábra), mint általában a *Circovirus* genus tagjai mindannyian. Az ORF1 a pozitív szálon található és a megsokszorozódásért felelős (replication associated, Rep, Rep' proteins) fehérjéket kódoló gén. Mérete némi eltérést mutat, a különböző izolátumokban 315 vagy 317 aminosavat kódol. A rövidebb ORF2 az átíródo komplementer szálon foglal helyet és a capsid (Cap) fehérjét kódolja. Hasonlóan a Rep génhez, hossza eltérő lehet 270, 273 vagy 274 aminosav hosszúságú fehérjét kódol. A két fő ORF-n kívül megtalálhatók a genomba kisebb ORF-k is, amelyek funkciója, ha van, egyelőre ismeretlen. A két ORF között két intergenikus szakasz foglal helyet. Az 5' intergenikus szakasz a rövidebb, az ORF-ek kezdő szakaszai között helyezkedik el és 90-101 nukleotid alkotja. Tartalmazza a replikációhoz nélkülözhetetlen hurok szerkezetet (stem loop, 1. Ábra) amelyben egy nagymértékben konzervatív nonanukleotid szekvencia foglal helyet. Az 5' intergenikus

szakasz a hurokszerkezettől eltekintve nagy variabilitást mutat, szemben a 3' intergénikus szakasszal, ami a terminációs kodonok között fekszik, körülbelül 170-171 nukleotid hosszúságú és tartalmazza a két poly-A szekvenciát is. Az egyik az ORF1-hez tartozik (AGTAAA) és a 1015-1020 nt között található, a másik az ORF2-höz tartozik (AATAAA) és a 1170-1165 nt között helyeződik.



1. Ábra. A PiCV genom szerkezete. Az egyszálú DNS genom kovalensen zárt kört alkot. A fő ORF-eket nyilak jelölik. Rep: a replikációs fehérjét kódoló gén. Cap: a capsid fehérjét kódoló gén. Stem loop: a replikáció megindításához szükséges hurokszerkezet, csúcán a konzervatív nonanukleotid szekvenciát reprezentáló körrel.

Yu és mtsai. (2009) Kínában elsőként izoláltak PiCV-t és készítettek teljes genom meghatározást. Összehasonlítva a már előtűk publikált szekvenciákkal, a DNS láncok között 86.0%-99.1% hasonlóságot találtak, ami alapján 3 nagy filogenetikai csoportot állapítottak meg. Ezek közül egy csoportba sorolták valamennyi addig megismert európai és amerikai genotípust, további egy csoportot alkottak a Zhejang tartományból származó izolátumok, a harmadik csoportot pedig ausztrál eredetű minták képezték.

A Genbankban (ncbi.nlm.nih.gov) jelenleg elérhető 15 nt szekvencia alapján alátámasztható a korábbi feltételezés miszerint bár a PiCV DNS vírus, mégis igen variábilis. Elmondható az is, hogy a PiCV-nek mindkét fő génje nagy jelentőséggel bír a további kutatások szempontjából. Az ORF1 mellett a 3' intergénikus szakasz feltárása a konzervatív jelleg miatt elsősorban a diagnosztikai eljárások tökéletesítése miatt esszenciális. Ennek a szakasznak az ismerete elengedhetetlen a megfelelően érzékeny primerek tervezéséhez és az egyéb direkt vírus kimutatási eljárásokhoz. Az ORF2 nem kevésbé jelentős, ugyanis az általa

kódolt capsid protein felelős a protektív immunválasz kiváltásáért. Ugyanakkor a *Rep* génnél lényegesen variábilisabb, vagyis alkalmas a pontosabb filogenetikai vizsgálatok elvégzésére.

A galambtartók tapasztalatai alapján a PiCV fertőzöttség egyre elterjedtebb és egyre súlyosabb egészségi problémát jelent. A védekezés jelenleg még az alapvető járványvédelmi lehetőségek szintjén sem megoldott. Specifikus vakcina nem áll rendelkezésre.

A PiCV hazai elterjedtségéről pontos adatok nem állnak rendelkezésre, de az általános kép alapján és a versenyeztetések során tapasztalt egyre súlyosabb veszteségek mind sürgetőbben vetették fel egy alapos felmérés igényét. A Magyar Postagalamb Sportszövetség képviselői a problémával 2009 őszén megkeresték az Állatorvos-tudományi Kar Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékét és egy közös kutatási program elindítását javasolták. TDK munkám alapjául ez a program szolgált. A közösen meghatározott céljaink a következők voltak:

1. széles körű felmérés a hazai PiCV prevalencia tisztázása érdekében,
2. genetikai információk gyűjtése a hazai PiCV vírusokról,
3. a vírusok genetikai diverzitásának meghatározása,
4. a PiCV capsid fehérjében tapasztalható változékonyság dokumentálása,
5. a lehetséges vakcina változatok meghatározása.

Anyagok és módszerek

A vizsgálati minták származása

A felhasznált mintákat 2009-2010 során gyűjtöttük, gyakorló állatorvosok és galambászok segítségével Magyarország területéről, széles területi eloszlásban. Több mint száz klinikailag egészséges galambból származó mintát vetettünk vizsgálat alá. Egyedileg azonosítható vizsgálati anyag 16 dűcből érkezett, ez utóbbiak korcsoportok és mintatípusok szerinti megoszlását az Eredmények fejezetben a 2. Táblázat mutatja be.

A vizsgálati anyagok eredet szerint vérsavó, alvadásában gátolt vér, allantois folyadék, begytej, bélsár és különböző szervek (máj, lép, here és petefészek) voltak.

Nukleinsav kivonás

Vér és vérsavó, valamint allantois folyadék esetében 150 µl-t steril 1,6 ml-es mikrocentrifuga csőbe helyeztünk; a begytejjel átitatott tamponokat először 500 µl steril desztillált vizet tartalmazó mikro-centrifugacsőbe tettük majd szoba hőmérsékleten 1-2 percig állni hagytuk és ezt követően kevertük (Vortex), végül az így kapott elegyekből 150 µl-t mértünk újabb steril centrifugacsővekbe.

Szövetek és bélsár esetében először a minta homogenizálására volt szükség, ami a következő úton történt:

1.- Szövetek homogenizálásához körülbelül 0,1-0,2 g szervmintát szikével feldaraboltunk és ehhez 500 µl steril desztillált vizet mértünk majd eldörzsöltük. A kapott elegyből 150µl-t steril mikro-centrifugacsőbe mértünk.

2.- Bélsár esetében kb. 0,2-0,3 g-nyit 500 µl steril desztillált vízzel elkevertünk, szobahőmérsékleten 20 percig állni hagytuk, majd vortexeltük. Ezt követően 10 percig ismét állni hagytuk, majd újabb vortexelés után az előzőekhez hasonlóan 150 µl-t steril csőbe helyeztünk.

A vírus DNS-t a szövet és bélsár homogenizátumokból, az allantois folyadékból, a vérből és a vérsavóból a továbbiakban a Viral Gene-spin TM DNA/RNA Extraction KIT-tel a gyártó által megszabott protokoll alapján vontuk ki.

Nukleinsav amplifikáció

A PiCV DNS kimutatásához és amplifikálásához elsősorban PCR módszert alkalmaztunk, egyes PCR-rel csak gyengén pozitív mintákat körkörös izotermikus amplifikációval (rolling circle amplification, RCA) a megismételt PCR eljárás előtt felsokszoroztunk.

Polimeráz láncreakció(PCR)

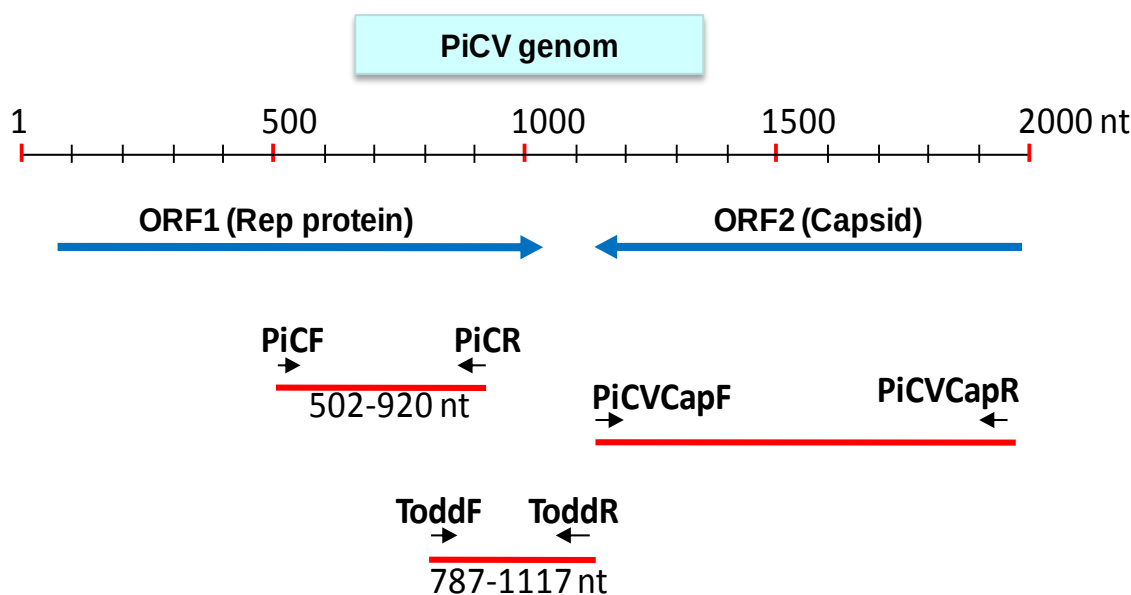
A PiCV jelenlétének a kimutatásához a ToddF-ToddR (Todd és mtsai., 2006), valamint az AJ298229.1 Genbank kóddal szereplő genomszekvenciát felhasználva a Primer2 (Scientific and Educational Software) programmal általunk tervezett PiCF-PiCR primereket használtuk.

A teljes *Cap* gén amplifikálásához a Primer2 programmal tervezett PiCV-CapF (*EcoRI* vágáshely) PiCV-CapR (*BamHI* vágáshely) primerpárt, a szekvencia analízishez a BAC1-BAC2 primerpárt alkalmaztuk. A primerek szekvenciáját és kötődési helyét az 1. Táblázat és a 2. Ábra mutatja be.

1. Táblázat. A PCR-hez és a szekvenáláshoz felhasznált primerek részletei.

Primer neve	Szekvencia	kötődés (nt)
PiCF	5'-CGCGCGAGACTTCAGTGAGA-3'	502 – 521
PiCR	5'-TGTTGATCCGCCGGAAGAG-3'	920 – 902
ToddF	5'-GCATAAGGTGCCCCGTGAAAGG-3'	787 – 807
ToddR	5'-ATTCGCGGTCGCTCCGCT-3'	1117 – 1100
PiCV-CapF	5'-GGAATTC-AGCGACCGCGAATGC-3'	1106-1120
PiCV-CapR	5'-CGCGGATCC-ATGAGGAGGCGGAGATTC-3'	1988-1971
BAC1- 5'	5'-AACCATCTCGCAAATAAATA-3'	plazmidon
BAC2- 5'	5'-ACGCACAGAATCTAGCGCTT-3'	plazmidon

Az aláhúzott szekvenciák az *EcoRI* (forward primeren) és *BamHI* (reverse primeren) restrikciós endonukleáz vágáshelyeket jelölik.



2. Ábra. A PiCV genom lineáris ábrázolása az egyes primerek és az amplifikált termékek ORF-hez viszonyított relatív pozíciójával. A felső vonal skálája 100 bázisonként mutatja a genomot. A kék nyilak a fő ORF-ek közelítőleges helyét mutatják. A fekete nyilak a primereket, míg a piros vonalak az ampikonokat reprezentálják.

Az alkalmazott protokoll szerint a PCR reakcióelegy összeállításánál 2 μ l mintához 1 μ l dNTP-t (1mmol), 0,5-0,5 μ l (25pmol) primert, 1 egység (0,2 μ l) DremTaq Green DNS polimeráz enzimet (Fermentas, Litvánia), 5 μ l 10xGreenTaq puffert (Fermentas, Litvánia) használtunk és mindezt 50 μ l-re egészítettük ki desztillált vízzel.

A DNS amplifikálását, a TGradient Thermocycler (Biometra, Németország) géppel végeztük a következő program alapján: előmelegítés 95°C-ra 5 percig, ezt követően 35 cikluson át 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s. Az amplifikációt egy 7 perces 72°C-s végső lánchosszabbítás követte, ami után a csöveket 4°C-ra hűtöttük. Abban az esetben, amikor az ORF2-t amplifikáltuk, az elongációs szakaszt 45-ről 90 s-ra emeltük.

A PiCV kimutatási PCR-hez a felhasznált 4 primert nemcsak az eredeti pároknak megfelelően, hanem azok kombinálásával is felhasználtuk a vizsgálat érzékenységének növelése céljából.

Körkörös amplifikáció (RCA)

A cirkuláris vírus DNS-eket TempliPhi 100 Amplification Kit (GE-Healthcare, USA) segítségével sokszoroztuk. Ennek során 1 μ l a korábbiak szerint leírt kivont DNS-t 5 μ l minta pufferrel (Sample Buffer) 3 percig forraltunk, majd jégre helyeztük. Néhány perc múlva hozzáadtunk 5 μ l reakció puffert (Reaction Buffer) és 0,2 μ l enzim-mixet. A reakció-elegyet

30°C-on inkubáltuk egy éjszakán át, végül 4°C-ra hűtöttük. A keletkezett amplifikált nukleinsavat agarózgélben ellenőriztük és PCR templátként használtuk.

A PCR termékek ellenőrzése, tisztítása, klónozás

Az amplifikációk eredményeit agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük. A PCR termékeket 2%-s agaróz gélben futtattuk GR Safe Nucleic Acid Stain (Excellgen Inc., USA) jelenlétében, ezzel meggyőződve a vírus jelenlétéről vagy hiányáról. Az amplikonokat szekvenálással ellenőriztük (Macrogen, Korea).

A mintákat a származási hely és az ORF1 szekvenciák szerint (ide értve az intergenikus szakasszal átfedő szekvenciákat is) csoportosítottuk, ami alapján 10 különböző vírus ORF2 génjét amplifikáltuk, klónoztuk és szekvenáltuk.

Az ORF2 génről PCR-rel a PiCVCapR-PiCVCapF primerek felhasználásával előállított amplikonokat a BIOBASIC EZ-10 Spin Column DNA PCR Product Purification Kit segítségével tisztítottuk és a végeiket *Bam*HI és *Eco*RI enzimekkel (Fermentas) emésztettük, majd az ismételten megtisztított termékeket a *Bam*HI és *Eco*RI enzimekkel linearizált pBacPak9 plazmidba (Clontech, Japán) ligáltuk (T4 DNA ligase, Fermentas), a gyártó ajánlásainak megfelelő módon. A plazmidokat elektroporációval (Eppendorf) DH5α *Escherichia coli* baktériumokba vittük és a transzformánsokat Luria Broth (LB) agargél táptalajon 100 µg / ml ampicillin jelenlétében tenyésztettük 1 éjszakán át, 37°C-on. A kinőtt telepekből mintánként ötöt párhuzamosan átoltottunk LB folyékony táptalajra, ahol további 10-12 órán át szaporítottuk a baktériumokat. A baktériumokból a Biobasic EZ-10 Spin Column Plasmid Product Purification Kit (Genaid, UK) segítségével a gyártó utasításai szerint nyertük vissza a rekombináns plazmidokat, majd a klónokat restrikciós endonukleázzal emésztve ellenőriztük, illetve szekvenáltattuk.

Szekvenálás és szekvencia analízis

Az ORF1 PCR termékeket közvetlenül, míg a 10 kiválasztott mintából származó teljes ORF2 amplikonokat klónozás után szekvenáltattuk (Macrogen, Korea). Az előbbiekhöz a PCR során alkalmazott primereket használtuk, míg az utóbbiak esetében a pBacPak9 plazmidon (Clontech, Japán) kötődő BAC1 és BAC2 primereket.

A Cap3 (pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php), a BioEdit és a MEGA 5 programot használtuk a szekvenálási eredmények értékelésére és a származtatott aminosav sorrend vizsgálatára. A BioEdit szoftverrel továbbá a szekvenciák összehasonlítását és az egyezések feltérképezését is elvégeztük. A filogenetikai analízist szintén a MEGA5 programmal végeztük, a bootstrap érték 1000 volt (Tamura és mtsai., 2007). A szekvenciákat a Genbankban a JF330089-JF330098 kódszámon helyeztük el. Az összehasonlításhoz használt 15 korábban leírt PiCV szekvenciát, a Genbankból töltöttük le, a kódokat a 3. és 4. Ábra mutatja.

Eredmények

A laboratóriumba beküldött vagy általunk gyűjtött mintákat PCR reakciókkal elemeztük, első megközelítésben azt vizsgálva, hogy a PiCV milyen arányban van jelen az egyes állományokban illetve az ország területén a galamb populációkban. A PCR termékek szekvenálása valamennyi esetben azt mutatta, hogy az amplikonok a kívánt nukleinsav szakaszok, vagyis valamennyi pozitívnak talált eset valóban PiCV genomot tartalmazott.

Megállapítottuk, hogy a beküldött minták többségében a vírus jelen volt, függetlenül attól, hogy az ország mely pontjáról származott vagy milyen típusú mintát vizsgáltunk. A legalacsonyabb pozitivitást a 15-30 napos korú állatokból gyűjtött vérsavókban tapasztaltuk, vagyis a tömeges virémiás állapot feltehetően ennél később kezdődik, ami jól egybeesik a korábban publikált eredményekkel (Duchatel és mtsai., 2006; Todd és mtsai., 2006).

A postagalamb tenyésztők által beküldött, a gyűjtést illetően precízen dokumentált vizsgálati mintákra vonatkozó eredményeket a 2. Táblázat mutatja be.

2. Táblázat. PiCV PCR pozitivitas az ORF1 gén alapján, valamennyi primer-kombináció összesített eredményként feltüntetve.

Vizsgálat	PiCV pozitivitas
Állomány	15/16
Tojás (10-12napos)	9/9
Begytej (4-5 napos)	3/3
Vérsavó (15-35 napos)	4/20
Alvadásban gátolt vér (9-10 hetes)	6/15
Vérsavó (1 éves kor felett)	18/25
Szervek (16 galamb szervei)	15/16
Bélsár	11/12

A tört számok pozitív minta / állományt vagy / összes mintát mutatják

Az ORF1 amplikonok előzetes szekvenálási eredményei, valamint a minta származási helye alapján a mintákat 10 csoportra tudtuk osztani. Az egyes csoportok 1-1 reprezentáns (vagyis összesen 10) vírusának a további elemzése céljából az ORF2 teljes szekvencia analízisét is elvégeztük, ami alapján a 10 PiCV-ből 2 (PiCV-H1 és PiCV-H9) teljes mértékben azonosnak bizonyult. Annak ellenére, hogy ez a két vírus földrajzilag egymástól távol eső helyekről származott.

A teljes ORF2 a vizsgált mintákban 813 vagy 822 nukleotidból állt, beleértve a stop kodont. Ennek megfelelően a vizsgált vírusokban a nukleinsav szekvencia alapján jóslott Cap fehérjét 270 vagy 273 aminosav alkotta.

A párhuzamosan előállított klónokból tisztított DNS-ek szekvenciája teljes mértékben identikus volt, leszámítva egy esetet, amikor a két klón a nukleinsav láncban a 43. és a 164. pozícióban eltérést mutatott. Mindkét helyen egy nukleotida eltérés volt detektálható: adenin/citozin, illetve citozin/timin. Ennek a felismerésnek a következtében a mintának egy további klónját is szekvenáltuk, ahol azt tapasztaltuk, hogy mindkét pozícióban citozin szerepel, de ezen túl a 194. pozícióban egy timin helyett citozin volt jelen. Az elülső pozícióban bekövetkezett mutáció nem járt aminosav változással, csendes maradt. A másik két pozícióban bekövetkezett változások azonban, a láncban az 55. és a 65. aminosav esetében változást indukált. Az előbbinél threonin módosult izoleucinná, az utóbbinál phenilalanin serinné. A három klón esetében a konszenzus szekvenciát helyeztük el a Genbankban, és a filogenetikai elemzésben is ekként szerepel.

A filogenetikai vizsgálat céljára a Genbankból valamennyi ismert, mindösszesen 15 izolált PiCV-ből származó ORF2 teljes szekvenciát töltöttünk le, ezek eredete és a genbanki kódja a 3. és 4. Ábrán lett feltüntetve. A komplett ORF2 gén filogenetikai analíziséhez nem, de a teljes összehasonlításhoz, a genetikai azonosság mértékének elemzésénél figyelembe vettünk 2 részleges PiCV szekvenciát is, amelyeket a Cseh Köztársaság területén azonosítottak (Taras és mtsai., 2003). Az összehasonlítás eredményeképpen megállapítottuk, hogy a már publikált 15 és a jelen tanulmányban azonosított további 10 PiCV az ORF2 szekvenciák alapján 5 genetikai csoportba osztható. A csoportokon belül és azok között mért nukleinsav és aminosav szekvenciák %-os értékeit a 3. Táblázat mutatja be. Az egyes csoportokon belül a tagok közti hasonlóság általában 92% fölött volt a nukleinsav szekvencia alapján, míg az aminosav sorrend elemzése szerint ez a hasonlóság minden esetben 94% fölött volt, de az E csoportba sorolt két vírus (Ausztrália és Egyesült Államok) között az eltérés nagyobbak bizonyult, itt a hasonlóság csak 88,4% és 89,7% nukleinsav illetve aminosav szinten.

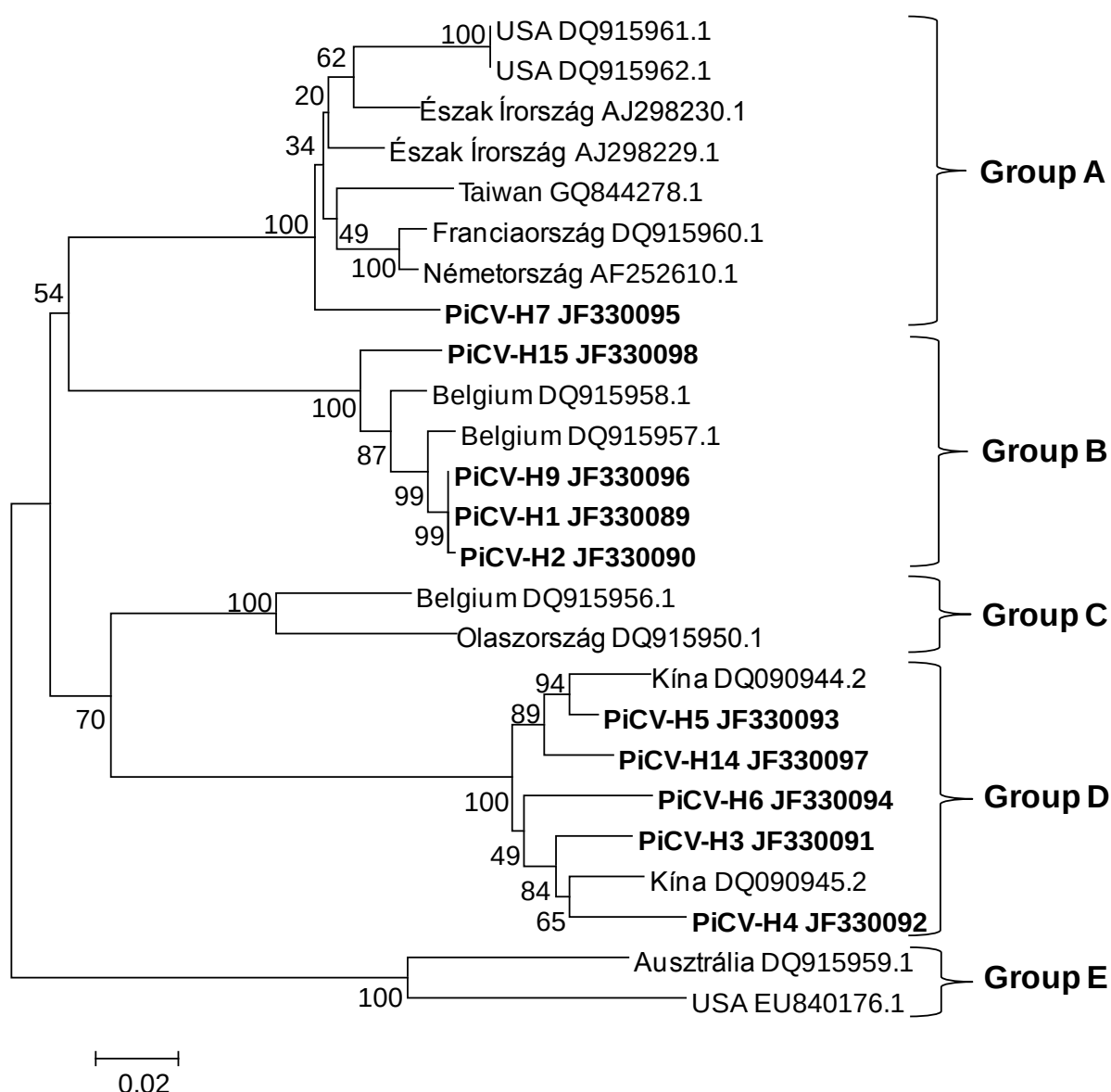
3. Táblázat. Csoportok közötti és csoportokon belüli nukleinsav és fehérje azonosság.

Csoportok	A	B	C	D	E
A	92,8-100%* 97,0-100%‡	81,9-84,3%*	79,3-83,9%*	76,2-79,4%*	75,5-77,3%*
B	83,8-85,3%‡	96,0-100%* 97,4-100%‡	80,1-82,2%*	77,8-79,7%*	75,4-78,0%*
C	82,6-86,9%‡	80,9-83,9%‡	92,4%* 94,8%‡	79,2-81,8%*	74,2-75,9%*
D	76,8-79,7%‡	76,6-78,4%‡	80,3-83,2%‡	93,1-97,3%* 96,7-99,6%‡	73,5-76,3%*
E	74,1-77,0%‡	75,0-77,2%‡	73,0-76,3%‡	71,6-72,7%‡	88,4%* 89,7%‡

*: nukleinsav azonosság.

‡: aminosav azonosság.

A nukleinsav és az aminosav szekvenciák azonosságának mértéke alapján, a filogenetikai fán is jól láthatóan az eddigi 25 teljes ORF2 szekvencia 5 nagy csoportot (**A-E**) alkotott (3. Ábra). Az **A** csoport európai, észak-amerikai és ázsiai PiCV-t egyaránt tartalmazott és a 2 Csehországból származó részleges szekvenciát is ide tudtuk besorolni. A **B** és **C** csoportok egyaránt kizárólag csak európai eredetű PiCV szekvenciákat tartalmaztak, míg a **D** öt hazai mintát és a Kínában leírt genotípusokat foglalta magába. Az **E** csoportban pedig egy észak-amerikai és egy ausztráliai vírus foglalt helyet.



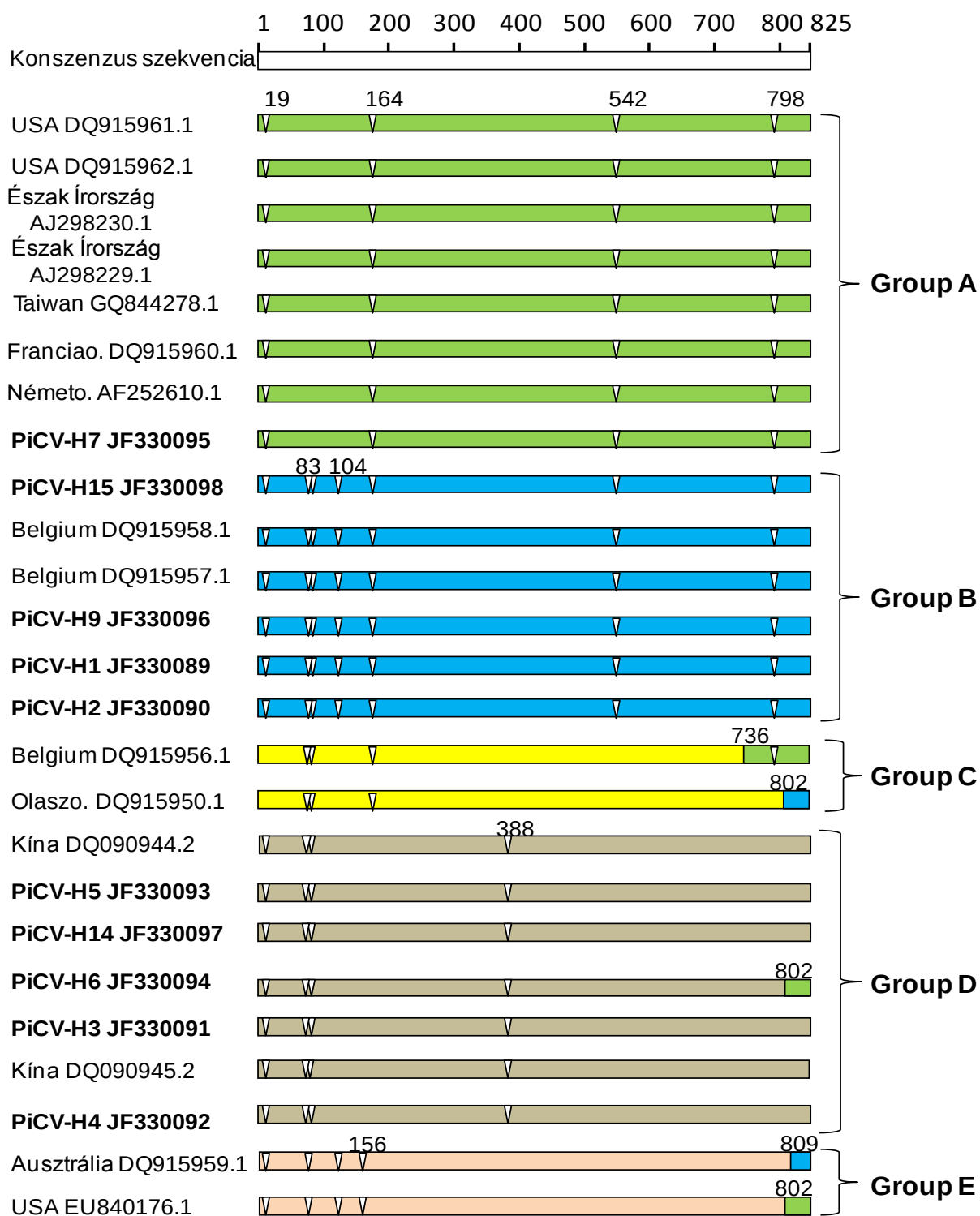
3. Ábra. A teljes PiCV ORF2 nukleinsav szekvenciák filogenetikai összehasonlítása. Az egyes vírusokat az izolálás helye (ország) és a Genbank kód alapján neveztük el. A jelen tanulmányban azonosított szekvenciákat félkövér betűkkel emeltük ki. Az egyes filogenetikai csoportokat (Group A-E) az ábra jobb oldalán jelöltük.

Az összehasonlító vizsgálatok azt is megmutatták, az alacsonyabb szintű aminosav egyezésein túl, hogy a **C** csoport esetében, az azt alkotó két PiCV ORF2 3' vége eltér egymástól. Ezen túlmenően az Olaszország DQ915950.1 (**C** csoport) minta ezen vége azonos a **B** csoportba tartozó szekvenciákéval, a **C** csoport egy másik tagja (Belgium DQ 915956.1) ORF2 3' vége pedig azonos az **A** csoport tagjaival. Ugyanilyen eltérések mutatkoztak az **E** csoport tagjai között is, ahol az Ausztrália DQ 915959.1 PiCV ORF2 3' vége szintén a **B** csoportba tartozókéval, az USA EU840176.1 pedig az **A**-ével azonos. A **D** csoportban egy

esetben egy hazai mintánál (PICV-H6) mutatható ki ilyen azonosság, szintén az **A** csoport tagjaival. A PiCV ORF2 nukleinsav szekvenciákon megfigyelt rekombinációkat a 4. Ábra mutatja be.

A nukleinsav és aminosav különbségek többsége egyaránt a PiCV ORF2 szekvenciák bal oldalára, vagyis az 5' vég (amino-terminális a fehérjén) területére esett. Ezen a szakaszon halmozottan jelentek meg bázis triplet (a fehérjén aminosav) deléciók (a konszenzushoz képest), illetve deléciók vagy addíciók, ha egymáshoz viszonyítjuk a szekvenciákat. A karboxy-terminális vég mozaik-szerű változásaival szemben, ahol a feltételezett rekombinációk okozták az eltéréseket, itt az amino-terminális részen, vagy attól lefelé a deléciók vagy addíciók a konkrét többleten vagy hiányon kívül az aminosav szekvenciára nem voltak hatással. A triplet különbségek a nukleinsav szekvencia csoporton belüli magas fokú identitása mellett szintén karakterisztikusak voltak az egyes csoportokra nézve.

Az **A** csoportban a 19., 164., 542. és 798., a **B** csoportban az előző 4 mellett még a 83., a 86. és a 104. pozíciókban történtek triplet változások (a konszenzus szekvencia nukleinsav számozása alapján). A **C** csoport 2 tagjánál a 83. helyen a **B**-hez hasonlóan 2 triplet törlődött, és a 164. pozícióban szintén volt egy bázis triplet deléció. A **D** esetében a 19. és a **B** csoportban is megfigyelt 83. és 86. pozícióval kezdődő triplet hiánya mellett, erre a csoportra jellemzően a 388. bázisnál induló triplet is kiesett. Az **E** csoportban a 19. és a 104. pozíciókban volt felfedezhető hiány, a 83. pozícióban emellett egyedileg csak 1 triplet kiesése volt detektálható, továbbá a csoportra jellemző egyedi tulajdonság a 156. triplet kiesése is.



4. Ábra. A PiCV ORF2 génnek nukleinsav szekvencia különbségei. A vírusok jelölése azonos a 2. Ábrán alkalmazott jelölésekkel. A vízszintes szalagok színezése csoportonként eltérő. Legfelül az ismert PiCV ORF2 szekvenciák alapján megállapított lehetséges leghosszabb (mesterséges) konszenzust ábrázoltuk, 100 bázisonkénti beosztással. Az üres nyílhegyek a konszenzushoz képest delécióként mutatják be a bázis triplet eltéréseket. A lehetséges (jósolt) rekombinációs események helyét a gén 3' végén, a C, D és E csoportokban, a donor szekvenciának megfelelő szín jelzi.

Megbeszélés és következtetések

A galambok circovirusaival kapcsolatos kutatások mindezidáig elsősorban a vírus terjedésére, az általa okozott klinikai tünetekre és a veszélyeztetett korosztályokra fókuszáltak, ahogyan az irodalmi áttekintésben is elsősorban ezekre az információkra alapozott összegzést próbáltam nyújtani. A cikkek által szolgáltatott adatok alapján biztonsággal kijelenthető, hogy a PiCV világszerte magas gyakorisággal van jelen a posta- és húsgalamb állományokban (Soike és mtsai., 2001), és ez a fiatal galambokban leggyakrabban detektálható kórokozó. A fertőzött egyedek egy részénél korosztály- és stressz- függő módon klinikai tüneteket okozhat önmagában is, de más circovírusokhoz hasonlóan itt is a közvetett kártétel a legjelentősebb. A közvetett problémákért elsősorban azért lehet felelős, mert szintén más circovírusokhoz hasonlóan a PiCV fertőzés is enyhébb/súlyosabb immunszuppressziót indukál (Woods és Shivaprasad, 1997), vagyis kiváló teret nyit más kórokozók számára.

A PiCV genomra vonatkozóan, viszonylag kevés információ áll rendelkezésre, köszönhetően az alacsony számú szekvencia meghatározásnak. Ennek a kutatásnak az elsődleges céljai azok voltak, hogy betekintést nyerjünk a PiCV magyarországi előfordulásának gyakoriságába és elkészítsük az itt előforduló vírusok genetikai jellemzését, összehasonlításban a már publikált adatokkal. Mindezt azzal a céllal tettük, hogy a szerzett adatok ismeretében olyan specifikus vakcinát lehessen a továbbiakban előállítani, ami hatékonyan véd a PiCV okozta károsító hatásoktól, hiszen ma még ez semmilyen formában nem áll rendelkezésre.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a PiCV Magyarországon jelentős arányban van jelen, mivel a 16 különböző dűcből érkező minták között 15 esetben találtunk pozitív egyedeket és az egyedileg gyűjtött szövet és bélsár minták többsége is pozitív volt a PCR tesztek valamelyikében. A kontrollált körülmények között gyűjtött minták eredményei alapján itt is igazolódott az a tény, ami a korábban publikált cikkek alapján már várható volt, hogy elsősorban a fiatalabb korosztály a veszélyeztetett, tehát korcsoportonként eltérő a fertőzés intenzitása. Az egyes szerveket tekintve legnagyobb biztonsággal a májból és a lépből tudtuk kimutatni a vírust, vagyis a továbbiakban, ha elhullott vagy kényszervágott egyedek vizsgálatára kerül sor, mindenképpen ezeknek a szerveknek a specifikus vizsgálatát tudjuk javasolni. Ugyanakkor erre a célra a legkevésbé alkalmasnak a vér vagy vérsavó minták bizonyultak, feltehetően a csak korlátozott ideig zajló virémiás fázisnak köszönhetően.

A mi kutatásunkban a 9 embrionált tojásból 9 volt pozitív PCR módszerrel. Bár ez nagyon alacsony mintaszám, de a germinatív fertőzés lehetőségét a korábbi ismeretekhez képest jobban kihangsúlyozza, hiszen szemben áll a publikált eredményekkel, ahol nem volt ilyen magas a tojásban mért prevalencia. Igaz, hogy mi az allantois folyadékot használtuk a kimutatásra, nem pedig szerveket vagy szerv homogenizátumokat (Soike és mtsai., 2001; Duchatel és mtsai., 2005, 2006). A begytej minták, bár nagyon kevés érkezett belőlük, egyértelmű pozitivitásuk miatt, szintén ellentmondanak a korábbi kutatások eredményeinek (Duchatel és mtsai., 2006). Elmondható, hogy a szülőpárok ilyen módon is fertőzhetik a fiókákat, bár messzemenő járványtani következtetések levonásához nagyobb volumenű vizsgálatokra lenne szükség.

A megvizsgált bélsár minták egyértelműen bizonyítják, hogy a vírus nagy számban ürül ily módon, hangsúlyozva ezzel a horizontális terjedés jelentőségét. Ez a megállapítás kiemelt jelentőségű, hiszen a galambok, különösképpen pedig a sport célból tartott postagalambok egy-egy verseny alkalmával több száz km-t repülnek és ilyen alkalmakkor a közös ivóhelyekre járással, azokat szennyezve, jó alkalom nyílik a PiCV fokozott terjedésére. A vírus az ilyen fekál-orál típusú terjedésre szerkezetéből adódóan kiválóan alkalmas, hiszen rendkívül ellenálló, a környezetben hosszú ideig megtartja fertőzőképességét, ezzel tovább növelve a horizontális fertőzések jelentőségét. Ugyancsak a vírus terjedését szolgálja, hogy a sportgalamb tartók szívesen vásárolnak egymástól, illetve cserélnék galambokat. Valószínűleg ennek is köszönhető, hogy a különböző genotípusok, nem köthetők kisebb földrajzi egységekhez, sőt még kontinensekhez sem.

A felmérő vizsgálatok során alapvetően két primerpárt alkalmaztunk, és ezeknek a kombinációját. Sok esetben előfordult, hogy az így kiállítható négy kombinációból csak egy vagy két esetben kaptunk pozitív eredményt a vírus jelenlétének az igazolásához. Ebből arra lehetett következtetni, a kutatásnak már ebben a kezdeti fázisában, hogy a PiCV genom, hasonlóan a többi circovírushoz variábilis természetű. Emiatt, bár a primerek konzervatív szakaszokra voltak tervezve nem működtek kellő érzékenységgel. Ennek ellenére az ORF1-ből készült szekvencia, ahogyan azt vártuk, kisebb változásokat leszámítva egészében konzervatívnak mutatkozott.

Az ORF2 gén esetében már számítottunk nagyobb fokú eltérésekre, az eredmények azonban így is számos meglepetéssel szolgáltak. A klónok vizsgálata (igaz alacsony számban történt) arra utalt, hogy az egyes fertőzések során a jelenlévő PiCV nem kevert fertőzés formájában van jelen, ha egyedeket vizsgálunk. Egyetlen esetben talákoztunk olyan azonos mintából származó klónokkal, ahol a klónok szekvenciája nem egyezett, sőt a vizsgálatot

folytatva nagyobb diverzitást lehetett kimutatni. Ennek okát nem tudjuk, a kevert fertőzés, vagy a PCR hiba sem kizárható, de ugyanígy elképzelhető, hogy valamilyen ismeretlen ok folytán az adott egyedben a vírus egy szélesebb kvázi-specieszben szaporodott.

Az eredetileg a Genbankban elérhető 15 különböző galambból izolált majd szekvenált ORF2 információhoz a munkánkkal 10 újat adtunk, amiből 9 nagymértékben különbözött egymástól. A *Cap* gén szekvenciák alapján, a korábbi elemzésektől eltérően (Todd és mtsai., 2006; Yu és mtsai., 2009) 5 csoportra tudtuk osztani az vírusokat a filogenetikai fán. A Yu és munkatársai által publikált cikkben 3 nagy csoportot állapítottak meg, az ezt megelőzően 2006-ban Todd és munkatársai által közzétett cikkben, pedig még csak kettőt. Ezen csoportoknak nem csak a száma, hanem az összetétele is változott a 10 új szekvenciával együtt elemezve őket. A Magyarországon, a jelen kutatómunka során általunk azonosított és elemzett minták az ötből három csoportban szerepeltek.

A csoportokon belüli hasonlóság elemzése kimutatta, hogy egyes genetikai csoportok tagjai közelebb állnak egymáshoz, mint azt más, jelen esetben a **C** és **E** csoportok esetében tapasztalni lehetett. Az ezekbe a csoportokba tartozó alacsony mintaszám (2-2 vírus) együtt a nagyobb filogenetikai távolsággal, azt sugallja, hogy feltehetően nem valódi clusterekről van szó, hanem az alacsony mintaszámból és az elemző programok sajátosságaiból adódó „műtermékről”. Feltételezzük, hogy az ide sorolt vírusok önálló csoportokba, vagy alcsoportokba sorolódnak, amennyiben nagyobb számban azonosítanak hasonló genetikai állománnyal rendelkező vírusokat.

Az igazán érdekes és váratlan megfigyelések az ORF2 variabilitásával kapcsolatosak. Korábban nem figyeltek meg circovírusoknál bázis triplet deléciókat vagy addíciókat. Ezeknek a triplet differenciáknak a változatos száma és helyeződése egy-egy genetikai csoporton belül jellemzőnek tűnik, és annak ellenére, hogy nem jár a triplet-különbség olvasási keret-változással, feltételezzük, hogy a vírus valamilyen előnyre tesz szert a változatok megjelenése révén. Tekintve, hogy a capsid fehérje az egyetlen strukturális protein a virionban és egymagában felelős a protektív immunitás kiváltásáért, nagyon valószínű, hogy a változások a vírus fertőzőképességének a megőrzését szolgálják olyan környezetben, ami akár már áthangolódott egy másik csoportbeli vírussal szemben.

Hasonló szerepük lehet, de feltehetően még hatékonyabban működnek az immunválasz kijátszásában azok a szintén elsőként leírt rekombinációs változások, amelyeket egyes *Cap* fehérjék C-terminális végén mutattunk ki. A PiCV *Cap* fehérje epitop térképe ma még nem ismert, de a hasonló szerkezetű sertés circovírus (PCV) *Cap* fehérje analógiájára építve ezek jelentős változásoknak tűnnek. A PCV *Cap* esetében ugyanis ez egy olyan régió a

vírusfehérjén belül, ami nagymértékben meghatározó a vírusneutralizáló ellenanyagok indukálásában (Shang és mtsai., 2009).

A PiCV fertőzések és az általa okozott betegségek elleni védekezés ma még világszerte a megoldatlan feladatok közé tartozik. Munkánk nem titkolt távlati célja az volt, hogy megteremtsük azt a vírusra vonatkozó információs háttérrel, amelynek segítségével hatékony, specifikus vakcinák állíthatók elő. A vizsgálatokból kiderült, hogy a vírus nagyfokú változékonyságra képes, vagyis egy vakcinázási stratégiának ezzel számolnia kell. Képes lehet a PiCV arra, hogy antigénszerkezetét megváltoztatva egy nem tökéletesen illeszkedő antigénszerkezetű vakcina által indított immunválasz hatása alól kibújjon. Éppen ezért a vizsgálataink egyik talán legfontosabb következtetése az, hogy egyetlen vírus csoportba tartozó antigénnel nem lehet hatékonyan védekezni, ez csak akkor lehetséges, ha ezeknek a Cap fehérjéknek olyan kombinációját használják vakcinázásra egyidejűleg, ami valamennyi lehetséges antigén variánssal epitop-szerkezeti átfedést nyújt.

A TDK munkámnak már nem volt része az a vakcinafejlesztési kutatás, ami az itt előállított pBacPak9 plazmid alapú ORF2 klónokra épült és egy baculovírus expressziós rendszeren keresztül 3 különböző capsid fehérje előállításával és kombinációjával megkezdődött. Az első vakcinázási kísérletek azt mutatják, hogy a stratégia, ami a megelőző genetikai vizsgálatokra épül sikeres.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Cságola Attilának és Dr. Tuboly Tamásnak a munkám és a dolgozatom elkészítése során tanúsított rengeteg türelemért és segítségért, a tanszék dolgozóinak különösen Dr. Tombácz Katának, Dr. Lőrincz Mártának és Herbák Józsefnének a számtalan praktikus ötletért.

Külön köszönet illeti az állatorvos kollégákat, kiemelten Dr. Csapó Istvánt a mintagyűjtésekkel kapcsolatos munkájukért.

A kutatás finanszírozása részben a SZIU-NKB # 15921 projektből történt, részben pedig a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjából (Dr. Cságola Attila).

Az itt bemutatott munka egy része a 2011. évi Akadémiai Beszámolókon előadásra került.

Máig 1 kézirat jelent meg a témakörben:

Cságola A, Lőrincz M, Tombácz K, **Wladár Z**, Kovács E, Tuboly T. (2011) Virus Genes
DOI: 10.1007/s11262-011-0669-6

Irodalomjegyzék

ABADIE J., NGUYEN F., GROIZELEAU C., AMENNA N., FERNANDEZ B., GUEREAUD C., GUIGAND L., ROBART P., LEFEBVRE B., WYERS M. (2001) Pigeon circovirus infection: pathological observations and suggested pathogenesis. *Avian Pathology* 30, 149-158

BASSAMI M. R., BERRYMAN D., WILCOX G. E., RAIDAL S. R. (1998) Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 392-400

COLETTI M., FEANCIOSINI M. P., ASDRUBALI G., PASSAMONTI F. (2000) Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circovirus -like particles in the bursa of Fabricius. *Avian Disease* 44, 454-459

DUCHATEL J. P., JAUNIAUX T., SMYTH J., HABSCH I., DE BOURNOVILLE M., LOSSON B., TODD D. (2010) Effect of a commercial Paratyphus Vaccine on the development of pigeon circovirus infection in young pigeons (*Columba Livia Domestica*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 24(2), 107-114

DUCHATEL J. P., JAUNIAUX T., VANDERSANGEN F., CHARLIER G., COIGNOUL F., VINDEVOGEL H. (1998) Première mise en évidence en Belgique de particules ressemblant à des circovirus. *Annales de Médecine Vétérinaire* 142, 425-428

DUCHATEL J. P., TODD D., CURRY A., SMYTH J. A., BUSTIN C. J., VINDEVOGEL H. (2005) New data on the transmission of pigeon circovirus. *Veterinary Record* 157, 413-415

DUCHATEL J. P., TODD D., SMYTH J. A., BUSTIN J. C., VINDEVOGEL H. (2006) Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathology* 35(1), 30-34

DUCHATEL J. P., TODD D., WILLEMANN C., LOSSON B. (2009) Quantification of pigeon circovirus in serum, blood, semen, and different tissues of naturally infected pigeons using real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 38(2), 143-148

ELLIS J., HASSARD L., CLARK E., HARDLING J., ALLAN G., WILSON P., STROKAPPE J., MARTIN K., MCNEILLY F., MEEHAN B., TODD D., HAINES D. (1998) Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal* 39, 44-51

FRANCIOSINI M. P., FRINGUELLI E., TARHUNI O., GUELFY G., TODD D., CASAGRANDE PROIETTI P., FALOCCHINI N., ASDRUBALI G. (2005) Development of polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical Pigeon Circovirus infection. *Avian Disease* 49, 340-343

GOUGH R. E., DRURY S. E. N. (1996) Circovirus-like particles in the bursae of young racing pigeons. *Veterinary Record* 138, 167

GREDES G. H. (1993) Two very small viruses - a presumptive identification. *Journal of the South African Veterinary Association* 64, 2

HATTERMANN K., SCHNITT C., SOIKE D., MANKERTZ A. (2003) Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Archives of Virology* 148, 2471-2480

JOHNE R., FERNANDEZ-DE-LUCO D., HOFLE U., MULLER H. (2006) Genome of a novel circovirus of starlings, amplifies by multiply primed rolling circle amplification. *Journal of General Virology* 87, 1189-1195

LATIMER K. S., RAKICH P. M., STEFFENS W. L., KIRCHER I. M., RITCHIE B. W., NIGARO F. D., LUKERT P. D. (1991) A novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease. *Veterinary Pathology* 28(4), 300-304

LI L., KAPOOR A., SLIKAS B., BAMIDELE O. S., WANG C., SHAUKAT S., MASROOR M. A., WILSON M. L., NDJANGO J. B., & other authors. (2010) Multiple diverse

circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of Virology* 84, 1674-1682

LÓRINCZ M., CSÁGOLA A., FARKAS S. L., SZÉKELY C., TUBOLY T. (2011) First detection and analysis of a fish circovirus. *Journal of General Virology* 92, 1817-1821

MANKERZ A., HATTERMANN K., EHLERS B., SOIKE D. (2000) Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a genus circovirus from pigeons. *Archives of Virology* 145, 1-11

MANKERZ A., PERSSON F., MANKETZ J., BLAESS G., BUHK H-J. (1997) Mapping and characterization of the origin of replication of porcine circovirus DNA. *Journal of Virologogie* 71, 2562-2566

MARLIER D., VINDEVOGEL H. (2006) Viral Infections in pigeons. *The Veterinary Journal* 172, 40-51

PARÉ J. A., BRASH M. L., HUNTER B., HAMPSON R. J. (1999) Observations on pigeon circovirus infection in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal* 40, 659-662

PHENIX K. V., WESTON J. H., YPLAAR I., LAVAZZA A., SMYTH J. A., TODD D., WILCOX G. E., RADIAL S. R. (2001) Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. *Journal of General Virology*

PRINGLE C. R. (1999) Virus taxonommy at the XI th International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Archives of Virology* 144, 2065-2070

RAUE R., SCHMIDT V., FREICK M., REINHARDT B., JOHNE R., KAMPHAUSEN L., KALETA E. F., MÜLLER H., KRAUTWALD-JUNGHANNS M-E. (2005) A disease complex associattted with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology* 34(5), 418-425

ROZEN S., SKALETSKY H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386*

SCHMIDT V., SCHLÖMMER J., LÜKEN C., JOHNE R., BIERE B., MÜLLER H., KRAUTWALD-JUNGHANNS M-E. (2008) Experimental infection of domestic pigeons with pigeon circovirus. *Avian Diseases* 52(3), 380-386

SCULLION F. T., SCULLION M. G. (2007) Patologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with 'young bird sickness'. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 21, 1-7

SHANG S. B., JIN Y-L., JIANG X-T., ZHOU J-Y., ZHANG X., Xing G., He J. L., YAN Y. (2009) Fine mapping of antigenic epitopes of capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus Type 2. *Molecular Immunology* 46, 327-334

SHIVAPRASAD H. L., HILL D., TODD D., SMYTH J. A. (2004) Circovirus infection in a golden finch (*Coccothraustes vespina*). *Avian Pathology* 33, 525-529

SMYTH J. A., CAROLL B. P. (1995) Circovirus infection in European racing pigeons. *Veterinary Record* 136, 173-174

SMYTH J., WESTON J., MOFFETT D., TODD D. (2001) Detection of circovirus infection in pigeons by in situ hybridization using cloned DNA probes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 475-482

SOIKE D. (1997) Circovirusinfektion bei Trauben. *Tierärztliche Praxis* 25, 52-54

SOIKE D., HATTERMANN K., ALBRECHT K., SEGALÉS J., DOMINGO M., SCHMITT C., MANKERTZ A. (2001) A diagnostic study on columbid circovirus infection. *Avian Pathology* 30, 605-611

SOIKE D., KOHLER B., ALBRECHT K. (1999) A circovirus-like infection of geese related to a runting syndrome. *Avian Pathology* 28, 199-202

TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR. S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599

TARAS L., KUBICEK O., JURANOVA R., JURJDA V. (2003) The first demonstration of pigeong circovirus in the Czech Republic based on histology and nested PCR. *Acta Veterinaria Brno* 72, 577-582.

TISCHER I., GELDERBLOM H., VETTERMAN W., KOCH M. A. (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64-66

TISCHER I., RAISCH R., TOCHTERMANN G. (1974) Characterisation of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zbl. Bakteriologie A* 226, 153-167

Todd D. (2004) Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMVS. *Veterinary Microbiology* 98, 169-174

TODD D., DUCHATEL J. D., BUSTIN J. C., SCULLION F. T., SCULLION M. G., SCOTT A. N. J., CURRY A., BALL N. W., SMYTH J. A. (2006) Detection of pigeon circovirus in cloacal swabs: Implications for diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Record* 159, 314-317

TODD D., DUCHATEL J. P., WESTON J. H., BALL N. W., BORGHMANS B. J., MOFFETT D. A., SMYTH J. A. (2002) Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infections. *Veterinary Microbiology* 89, 1-16

TODD D., FRINGUELLI E., SCOTT A. N. J., BORGHMANS B. J., DUCHATEL J. P., SHIVAPRASAD H. L., RADIAL S. R., ABADIE J. X., FRANCIOSINI M. P., SMYTH J. A. (2008) Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science* 84, 311-319

TODD D., MCNULTY, M. S., MANKERTZ A., LUKERT P. D., DALE J. L., RANGLES J. W. (2000) Family Circoviridae. *Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S.*

A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Proceedings of the Seventh Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York 299-303

TODD D., SCOTT A. N. J., FRIGUELLI E., SHIVAPRASAD H. L., GAVIER -WIDEN D., SMYTH J. A. (2007) Molecular characterisation of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathology* 36, 75-81

TODD D., WESTON J. H., SOIKE D., SMYTH J. A. (2001) Genome Sequence Determinations and Analyses of Novel Circoviruses from Goose and Pigeon. *Virology* 286, 354-362

TWENTYMAN C. M., ALLEY M. R., MEERS J., COOKE M. M., DUIGNAN P. J. (1999) Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (*Larus dominicanus*). *Avian Pathology* 28, 513-516

WOODS L. W., LATIMER K. S., BARR B. C. (1993) Circovirus-like infection in a pigeon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 609-612

WOODS L. W., LATIMER K. S., NIGARO F. D., RIDELL C., CROWLEY A. M., ANDERSON M. L., DAFT B. M., MOORE J. D., CAMPAGNOLI R. P., NORDHAUSEN R. W. (1994) A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 156-164

WOODS L., SHIVAPRASAD H. L. (1997) "*Diseases of Poultry, 10th ed.*" (B. W. Calnek, ED.) Iowa State University Press Ames, IA. 1050-1053

YU X.P., ZHU C., ZHENG X. T., MU A. X., YU H. T. (2009) Cloning and analysis of the complete genomes of pigeon circovirus from Zhejiang Province. *Bing Du Xue Bao* 25(5), 355-361