

PANNON EGYETEM
GEORGIKON KAR

Festetics Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője

Dr. Anda Angéla, D.Sc.

DOI:10.18136/PE.2018.697

Halainkat károsító egyes nyálkaspórák paraziták és vírusok vizsgálata

PhD disszertáció

Borzák Réka

Témavezető: Dr. Székely Csaba

Társ-témavezető: Dr. Nagy Szabolcs

Intézeti konzulensek: Dr. Molnár Kálmán és Dr. Doszpoly Andor

Keszthely

2018

Halainkat károsító egyes nyálkaspórák paraziták és vírusok vizsgálata

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Festetics Doktori Iskolája keretében

Állattenyésztési tudományok tudományágban

Írta: Borzák Réka

Témavezető: Dr. Székely Csaba, Társ-témavezető: Dr. Nagy Szabolcs

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Székely Csaba
(témavezető)

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Nagy Szabolcs
(társ-témavezető)

A jelölt a doktori szigorlaton %-ot ért el,
Veszprém/Keszthely,

.....
Dr. Bercsényi Miklós PhD
(a Szigorlati Bizottság elnöke)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém/Keszthely,

.....
(a Bíráló Bizottság elnöke)

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....
Veszprém/Keszthely,

.....
(az EDHT elnöke)

TARTALOMJEGYZÉK

Cím oldal	2
Értékelő lap	3
Tartalomjegyzék	4
Rövidítések jegyzéke	6
Kivonat	8
Abstract	9
Abstract	10
Bevezetés	11
A. Nyálkaspórási paraziták	11
A/1. Irodalmi áttekintés	12
A/1.1. Mérföldkövek a Myxozoa kutatásban	12
A/1.2. Fejlődési ciklus és gazdán belüli fertőzésmenet	13
A/1.3. Kórtan és gazda-parazita kapcsolat	16
A/1.4. Rendszertan és filogenetika	17
A/2. Témafelvetés	21
A/2.1. A bodorka szem <i>Myxobolus</i> fertőzöttsége	22
A/2.2. Paduc (<i>Chondrostoma nasus</i>) nyálkaspórási fertőzöttsége	23
A/2.3. Garda (<i>Pelecus cultratus</i>) nyálkaspórási fertőzöttsége	23
A/2.4. <i>Henneguya</i> fajok vizsgálata	23
A/2.5. Ponty parazita <i>Thelohanellus</i> fajok molekuláris vizsgálata	24
A/3. Célkitűzések	25
A/4. Kísérleti rész	25
A/4.1. Anyag és módszer	25
A/4.1.1. Mintagyűjtés	25
A/4.1.2. Morfológiai és szövettani vizsgálatok	27
A/4.1.4.	28
A/4.2. Eredmények	31
A/4.2.1. Bodorka szem vizsgálata	31
A/4.2.3. Garda nyálkaspórási parazitái	38
A/4.2.4. <i>Henneguya</i> fajok vizsgálata	43
A/4.2.5. <i>Thelohanellus</i> fajok vizsgálata	48
A/4.3. Megbeszélés	54

A/4.3.1. Bodorka szem nyálkaspórák fertőzöttsége.....	54
A/4.3.2. Paduc nyálkaspórák parazitái	55
A/4.3.3. Garda nyálkaspórák parazitái	56
A/4.3.5. <i>Thelohanellus</i> fajok vizsgálata	57
B, Vírusok.....	59
B/1. Irodalmi összefoglalás.....	60
B/1.1. Circovírusok	61
B/1.1.2. Circovírusok halakban.....	62
B/1.2. Alloherpeszvírusok.....	66
B/1.2.1. Pontyfélék alloherpeszvírusai	68
B/2. Témafelvetés	70
B/2.1. Circovírusok a balatoni halakban.....	70
B/2.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon	70
B/3. Célkitűzések	70
B/4. Vírusos kutatások:.....	70
B/4.1. Anyag és módszer	70
B/4.1.1. Mintagyűjtés	70
B/4.1.2. Molekuláris vizsgálatok.....	71
B/4.1.3. Statisztikai számítások a qPCR eredmények elemzéséhez	76
B/4.1.4. Vírusizolálás	76
B/4.2. Eredmények.....	77
B/4.2.1. Circovírusok a balatoni halakban.....	77
B/4.2.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon	82
B/4.3. Megbeszélés	84
B/4.3.1. Circovírusok a balatoni halakban.....	84
B/4.3.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon	86
Összefoglalás.....	88
Új tudományos eredmények	90
List of new findings.....	91
Köszönetnyilvánítás	92
Publikációs lista.....	115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

18S rDNS	18S ribosomal RNA coding sequence	18S rRNS-t kódoló szekvencia
18S rRNS	18S ribosomal RNA	18S riboszomális RNS
AIC	Akaike Information Criterion	
as	amino acid	aminosav
ATPáz	Adenosine triphosphatase	Adenozin trifoszfátáz
BarCV	Barbel circovirus	Márna circovírus
BI	Bayesian Inference	
bp	base pair	bázis pár
CCE	Capsid-encoding circular element	Kapszid kódoló cirkuláris elem
CPE	Cytopathic effect	Citopatogén/sejtkárosító hatás
CV	Circovirus	Circovírus
CyHV	Cyprinid herpesvirus	Ponty herpeszvírus
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	Dezoxi-nukleotid-trifoszfát
EcatfishCV	European catfish circovirus	Harcsa circovírus
EeCV	European eel circovirus	Európai angolna circovírus
EF2	Elongation factor 2	Elongációs faktor 2
EK	Eel kidney	Angolna vesesejt
EM	Electronmicroscope	Elektronmikroszkóp
EPC	Epithelioma papulosum cyprini	
EVE	Endogenous viral element	Endogén virális elem
FAM	6-Carboxyfluorescein	6-Karboxyfluoreszcein
GTR model	General Time Reversible model	
HV	Herpesvirus	Herpeszvírus
ICTV	International Comittee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírus Taxonómiai Bizottság
IR	Intergenic region	Intergénikus régió
ITS	Internal transcribed spacer	Belső átíródó elválasztó szakasz
kb	kilo base	ezer bázis

ML	Maximum Likelihood	
MS-222	Tricaine methanesulfonate	
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	Open reading frame	Nyitott leolvasási keret
PCR	Polymerase chain reaction	Polimeráz lánreakció
PCV	Porcine circovirus	Sertés circovírus
PDNS	Porcine dermatitis and nephropathy syndrome	Sertés dermatitisz és nefropátia szindróma
PKD	Proliferative kidney disease	Proliferatív vesebetegség
PMWS	Post weaning multisystemic wasting syndrome	Elválasztott malacok sorvadását okozó szindróma
qPCR	quantitative PCR	kvantitatív PCR
RCA	Rolling circle amplification	Gördülő kör alapú amplifikáció
RCR	Rolling circle replication	Gördülő kör alapú replikáció
RT	Reverse-transcriptase	Reverz-transzkriptáz
SF3	Superfamily III	(protein) Szupercsalád 3
SNP	Single nucleotide polymorphism	Egyedi nukleotid polimorfizmus
SPF	Specified pathogen free	Meghatározott patogéntól mentes
ssDNS	Single stranded DNA	Egyszálú DNS
TAE	Tris-acetate-EDTA	Tris-acetát-EDTA
TAMRA	Tetramethylrodamin	Tetrametilrodamin
TR	Terminal repeat	Terminális ismétlődés

KIVONAT

Halainkat károsító egyes nyálkaspórák paraziták és vírusok vizsgálata

Dolgozatom két terület kutatási eredményeiből íródott. PhD munkám során, egyrészt egy igen fajgazdag, komoly gazdasági károkat is okozni képes parazitacsoporttal a nyálkaspórákakkal foglalkoztam, másrészt a témacsoportban először, a halak virális fertőzéseit is vizsgáltam. 2014-2016 között a Balatonból, Kis-Balatonból, és a Duna több pontjáról gyűjtöttünk mintákat és a detektált nyálkaspórák parazitákat morfológiai és molekuláris módszerekkel faj szinten azonosítottuk. Ennek eredményeképpen a bodorka szaruhártyájából kimutattuk a *Myxobolus fundamentalis*-t, melyet eddig, kizárólagosan kopolyú parazitának ismertünk. Továbbá, három új *Myxobolus* fajt sikerült azonosítanunk paducban, melyből kettő, a kopolyú különböző lokációjában (*Myxobolus arrabonensis*, *Myxobolus szentendrensis*), egy pedig az úszóhólyag falában (*Myxobolus paksensis*) fejlődött. A 2014 nyarán lezajlott nagyarányú balatoni gardapustulást követően két új nyálkaspórák fajt sikerült detektálnunk, egyiket a kopolyúlemezkekben (*Myxobolus peleci*), a másikat a szem retina rétegében (*Myxobolus cultrati*). További balatoni mintavételeink során gyűjtött sügerekéből egy új *Henneguya* fajt sikerült azonosítanunk a halak szájpadlásán fejlődő plazmódiumból, melyet *Henneguya jacsoi*-nak neveztünk el. A mintavételezések alkalmával tapasztalt egyéb *Henneguya* fertőzöttségek alapján a *Henneguya texta* és *H. psorospermica* revízióját javasoltuk. A Kis-Balatonból gyűjtött számos *Branchiura sowerbyi* oligochaetanyálkaspórák fertőzöttségeinek vizsgálata során aurantiactinomyxon, neoactinomyxon és raabeia típusú spórákat azonosítottunk. Egy sikeres ponty fertőzési kísérletet, és a 18S rDNS szekvenciák meghatározását követően, egyezést találtunk több génbanki mintával, köztük a *Thelohanellus kitauei* magyar izolátumával, illetve korábbi gyűjtésekből származó spóra mintákkal. Igazoltuk, hogy a *Thelohanellus nikolskii* tehető felelőssé mind a fiatal pontyok uszonyán, mind a kifejlett halak pikkelyén tavasszal megfigyelhető ciszták kialakításáért. Az egyezések mellett olyan új szekvenciákat is kimutattunk, melyek alapjai lehetnek három új *Thelohanellus* faj leírásának is.

A PhD munkám másik területén az elhullással is járó, közelmúltban kimutatott hal circovírusok (CV) egyre szélesebb körű megjelenése kapcsán felmérést végeztünk a balatoni halállomány CV fertőzöttségét illetően. A 2014-2015 során gyűjtött angolnákból nagyarányban tudtuk kimutatni a korábban már leírt angolna CV (EeCV) genomot. Elsőként határoztuk meg a vírus *cap* génje alapján nyolc angolna szerveinek CV tartalmát kvantitatív PCR módszerrel. Egy angolna és egy garda mintából kimutattunk egy új CV genomot (EeCV-2). Az EeCV-2-ből meghatároztunk egy angolna genom eredetű fragmentet is, mely egyedülálló az eddig meghatározott hal CV között, akárcsak két távolrokon halfajból történő egyazon CV genom kimutatása. Azonosítottunk továbbá a gardából és három angolnából egy CV-szerű szekvenciát is, mely csak *cap* gént tartalmazott, a *rep* gén nem volt jelen a genomban.

2014 őszén, a Dunából fogott, papillómás elváltozásokat mutató ivarérett márnákból meghatároztuk a ponty himlő (*Cyprinid herpesvirus 1*) részleges polimeráz, termináz és helikáz génjeinek egy-egy szakaszát. A herpeszvírus jelenléte mellett, a már ismert márna circovírus (BarCV) szekvenciáját is sikerült kimutatnunk a halakból. Hasonló tüneteket ugyan írtak már le más cyprinida halakból, márnából is, de tudomásunk szerint ez az első eset, hogy a magas gazdaspecifikusságot mutató ponty himlő jelenlétét molekuláris módszerekkel más halfajból is igazolni tudták.

ABSTRACT

Investigations of some Myxozoan parasites and viral infections of freshwater fish in Hungary

My dissertation was written in two research areas of fish pathology. One part is about the new results in Myxozoa research, the other part is about viral infections, which is a new field in our study group. Samples for myxozoa study were collected from different sites of Lake Balaton, Kis-Balaton Reservoir and River Danube, from Hungary. The parasites were identified on species level with morphological and molecular biological methods. As a result of this study, we identified the gill parasite, *Myxobolus fundamentalis* also from the cornea of the roach; three new *Myxobolus* species from the common nase from River Danube, two from the gill (*M. arrabonensis*, *M. szentendrensis*) and one from the wall of the swimbladder (*M. paksensis*). Two new myxozoan species were detected in sibel after a mass mortality event in 2014 in Lake Balaton. One species was identified in the gill lamellae (*M. peleci*), the other one was detected in the retina layer of the eyes (*M. cultrati*). Based on the investigations of myxozoan infections of pike and percid fish, a new *Henneguya* species were identified from the palate of the perch from Lake Balaton (*H. jaczoi*), and taxonomic revision was proposed of *H. texta* and *H. psorospermica*. Oligochaetes (*Branchiura sowerbyi*) were also examined from Kis-Balaton Reservoir, as a result, Aurantiactinomyxon, Neoactinomyxon and Raabeia spore types were detected and used in infection trials with SPF carp fingerlings. Based on the 18S rDNA sequences of the samples, *Thelohanellus kitauei* was identified again in Hungary and three, putatively new *Thelohanellus* species could be described in the future. Moreover, it was proved by molecular results, that the spores from the cysts of the fins and the scales of the carp are representing the same species, *T. nikolskii*.

In the other part of my study, a monitoring program was performed, to define the circovirus (CV) prevalence in different fish species from Lake Balaton. High prevalence of EeCV-1 was detected among the eels, the number of the virus particles in different organs were evaluated by qPCR based on the *cap* gene fragment. New CV genome (EeCV-2) was identified from one eel and one sibel sample, containing an eel host derived gene fragment. Moreover, from one sibel and three eel samples, a CV-like monocistronic genome was detected, containing only the *cap* gene.

In 2014, two barbels were caught in River Danube showing epidermal hyperplasia scattered all over the body and papillomatous lesions close to the mouth and fins. Barbel CV and *Cyprinid herpesvirus 1* was detected from the samples. This is the first time, when the presence of carp pox was proved with molecular methods from a non-carp species.

ABSTRACT

Untersuchung von myxozoischen Parasiten und Virusinfektionen von Süßwasserfischen in Ungarn

Meine Dissertation fasst die Ergebnisse von zwei Forschungsbereichen der Fischpathologie zusammen: einerseits die neuen Resultate der Myxozoa-Forschung, andererseits die Feststellungen der virologischen Untersuchungen, die das diagnostische Repertoire unseres Labors erweiterten.

Proben für Myxozoa-Untersuchungen wurden in Ungarn, aus dem Plattensee, Kleiner Plattensee und verschiedene Stellen der Donau gesammelt. Die Parasiten wurden mit morphologischen und molekularbiologischen Methoden bis auf Artebene identifiziert.

Als Ergebnis dieser Studie wurde der bisher nur als Kiemenparasit gekannte *Myxobolus fundamentalis* auch in der Hornhaut dem Rotaugen nachgewiesen. Weiterhin identifizierten wir drei neue Myxobolus-Arten in der Blaunase aus der Donau, von denen sich zwei in der Kieme (*M. arrabonensis*, *M. szentendrensis*) und einer in der Wand der Schwimmblase (*M. paksensis*) entwickelte. Nach dem Massensterben der Sichlinge im Plattensee in 2014 konnten wir zwei neue Myxozoa-Arten entdecken, *Myxobolus peleci* in den Kiemenlamellen und *Myxobolus cultrati* in der Netzhaut des Auges.

Weitere Probenentnahmen aus Plattensee führten zur Identifizierung einer neuen Henneguya-Arten vom Flussbarsch (*Henneguya jaczoi*). Basierend auf den beobachteten *Henneguya*-Infektionen, schlagen wir eine Revision von *Henneguya texta* und *H. psorospermica* vor.

Vom Kleinen Plattensee wurden auch Oligochaeten (*Branchiura sowerbyi*) untersucht. Als Ergebnis konnten Aurantiactinomyxon-, Neoactinomyxum- und Raabeia-Sporenarten nachgewiesen und in Infektionsversuchen mit SPF-Karpfenfischen verwendet werden.

Analyse der 18S-rDNA Sequenzen führte zu der erneuten Identifizierung von *Thelohanellus kitauei* in Ungarn und zur Entdeckung drei mutmaßlich neue *Thelohanellus*-Arten. Darüber hinaus wurde durch molekulare Ergebnisse bewiesen, dass die Zysten an den Flossen der jungen und an die Schuppen der ausgewachsenen Karpfen ebenfalls durch *T. nikolskii* entstehen.

Im anderen Teil meiner Studie wurde ein Überwachungsprogramm durchgeführt, um die Circovirus (CV) Prävalenz bei verschiedenen Fischarten aus dem Plattensee zu bestimmen. Eine hohe Prävalenz von EeCV-1 wurde unter den Aalen nachgewiesen, die Anzahl der Viruspartikel in verschiedenen Organen wurde aufgrund des cap-Genfragments durch qPCR bestimmt. Ein neues CV-Genom (EeCV-2) wurde aus eine Aal- und eine Sichling-Probe identifiziert, das ein Genfragment vom Genom des Aals auch enthielt. Darüber hinaus wurde aus eine Sichling- und drei Aalproben ein CV-ähnliches monocistronisches Genom nachgewiesen, das nur das cap-Gen enthielt.

In 2014 wurden zwei Barben in der Donau mit epidermaler Hyperplasie am ganzen Körper und papillomatösen Läsionen in der Nähe von Mund und Flossen gefangen. Barbel CV und *Cyprinid herpesvirus 1* wurden aus den Proben nachgewiesen. Das ist das erste Mal, dass das Vorhandensein von Karpfenpocken mit molekularen Methoden von einer anderen Fischart als Karpfen nachgewiesen wurde.

BEVEZETÉS

A halakat az emberiség az ókortól tenyészteti tudatosan. A 19. század közepéig extenzív halgazdálkodás folyt, azaz csak a tó eltartó képességének megfelelő halmennyiséget telepítették. A növekvő népesség eltartása, és a piaci igények kielégítése érdekében megkezdődött a haltermelés egyre intenzívebbé válása. A sűrűbb népesítés, takarmányozás, gyakoribb állatmozgatások miatt megnőtt a betegségek aránya is a gazdaságokban.

A legtöbb halgazdaság kapcsolatban áll valamilyen természetes víztesttel, vizét onnan kapja, illetve abba eresztí vissza, így nagy hangsúlyt kell fektetni mindkét rendszerben élő halállomány kórokozóinak megismerésére. A halak kórokozó vírusok, baktériumok, gombák, és paraziták lehetnek.

2013-ban kapcsolódtam be az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet Halkórtan és parazitológia Témacsoportjának munkájába, ahol a halparaziták vizsgálata, különösen a nyálkaspórák parazitáké nagy múltra tekint vissza. Korábban az Intézet Új kórokozók felderítése Témacsoportjában voltam szakdolgozó, ahol humán rotavírus törzsek genetikai elemzését végeztem, így ezt a tématerületet is megtartva PhD munkám során a halak parazitái mellett néhány virális megbetegedéssel is foglalkoztam. Ennek megfelelően dolgozatomban két részre tagolódik. Az egyik a halak nyálkaspórák parazitáival foglalkozik, ahol a morfológiai módszereket kiegészítő molekuláris vizsgálatokkal több új nyálkaspórák fajt is sikerült leírunk. Ez részben az eddig kevésbé kutatott, természetes vízi pontyfélékből történt (paduc, garda), másrészt a gazdaságilag is fontos sügér, csuka és ponty fajok nyálkaspórák parazitáit érintette.

Dolgozatomban másik részében a halak gyakoribb DNS vírusaival foglalkoztam, úgymint az elmúlt években, hazánkban egyre több halfajból leírásra kerülő új víruscsaláddal, a circovírusokkal, és a halpatogénként már régóta ismert alloherpeszvírusokkal. A kimutatott vírusok molekuláris elemzése mellett a klasszikus sejten történő izolálással is megismerkedtem.

A. Nyálkaspórák paraziták

A nyálkaspórák (Myxozoa) a halak gyakori élősködői, magas fajszámmal és gyakran rendkívüli kórokozó képességgel bírnak, endoparazita életmódot folytatnak. Korábban az egysejtűek (Protista ország) közé sorolták őket, de sejttani és molekuláris genetikai bizonyítékok alapján (Kent et al. 1994, Siddall et al. 1995) mára bizonyossá vált, hogy a csalánozók (Cnidaria) egy korán elkülönült csoportjába tartoznak.

Valószínűsíthetően a törzsfelődés egy korai szakaszában kivált egy csoport a szabadon élő ősi csalánozók közül, és parazita életmódra váltott. A folyamat során csökkent a méret, testszerveződésük egyszerűsödött, és kialakult a ma ismert, összetett életciklusuk. Kétagzadság fejlődésmenet jellemző rájuk, ahol az egyik gazdaszervezet a gerinctelen, a másik a gerinces állatok, leggyakrabban halak közé tartozik (Wolf & Markiw 1984).

Két nagy csoportra oszthatók a nyálkaspórák, Malacosporea-ra és Myxosporea-ra. A Malacosporea egy meglehetősen kevés tagot számláló csoport, itt a gerinces gazdából kiszabaduló spórák mohaállatokat (Bryozoa) fertőznek, majd az ebből kikerülő spórák fertőzik vissza a gerinces gazdát. A jóval fajgazdagabb Myxosporea csoportban a fertőzött halból ürülő myxospórák gyűrűsférgeket (Annelida) fertőznek, majd az ezekből ürülő aktinospórák képesek újra a halakat megfertőzni. Mindkét spóratípusban találhatóak csalánsejtek. A gazda testével érintkezve a csalánsejtekből kicsapódó fonál rögzíti a spórát, a kiszabaduló amőboid sejt bejut a szervezetbe, vándorol, majd a számára megfelelő szövetekben és szövetekben megtelepedve szaporodik. A gerinctelen gazdáknál lezajló meiotikus osztódás miatt tekintjük a gyűrűsférgeket és a mohaállatokat a végső gazdának, míg a gerinces gazdában főleg halakban történő ivartalan szaporodás miatt ezeket tekintjük köztigazdának

(El-Matbouli & Hoffmann 1998; Lom & Dyková 1997; Canning et al. 2000, 2002, 2007; Tops et al. 2005).

Halakban az osztódó nyálkaspórák paraziták akár több centiméternyi kinövéseket, cisztákat is képezhetnek, melyek sok esetben gazdasági károkat is képesek előidézni a fertőzött állományokban, akár a közvetlen fertőzöttség által kiváltott kórképekkel, vagy közvetve, bakteriális felülfertőződés útján, legyengítve a halat és megnyitva a kaput a többi kórokozó előtt.

A különböző nyálkaspórák fajok leírása és azonosítása kezdetben csak morfológiai alapon történt, sokszor szubjektív szempontok szerint, melyek nem minden esetben voltak alkalmasak további fajokkal való összehasonlításra. A myxospórák pontos leírásához szükséges jellegzetes bélyegeket több szerző nyomán (Shulman 1966, 1984; Lom 1969; Lom & Vávra 1961) végül Lom & Arthur (1989) foglalta össze. Az aktinospórák leírásához szükséges képleteket, fejlődési stádiumokat és azok egységes nevezéktanát Lom és munkatársai foglalták össze 1997-ben.

A teljes nyálkaspórák életciklusához tartozó eltérő spóraformák azonosítása ekkor még csak fertőzési kísérletek révén volt megvalósítható. A molekuláris technikák elterjedése ezt nagymértékben megkönnyítette, a riboszóma kis alegységében lévő, a 18S rRNS-t kódoló génszakasz segítségével könnyebben bizonyíthatóvá vált a kimutatott myxospórák és aktinospórák egyazon fajhoz tartozása, illetve rendszertani besorolása (Smothers et al 1994, Kent et al 2001, Fiala 2006).

A/1. Irodalmi áttekintés

A/1.1. Mérföldkövek a Myxozoa kutatásban

A nyálkaspórák kutatása a 19. század elejéig nyúlik vissza. Elsőként Jurine (1825) figyelt meg nyálkaspórák által képzett cisztákat a mára már kihalt fehér maréna (*Coregonus fera*) izomzatában. Az 1840-es években Müller közölt részletes leírást a nyálkaspórák spóra szerkezetéről, „psorospermis”-nek nevezve őket. Dujardin (1845) megállapította, hogy a spórák („psorospermisek”) a plazmódiumon belül alakulnak ki a halgazdában. Lieberkühn leírta (1854, 1855), hogyan szabadul ki a sporoplazma az (aktino)spórából és jellemezte a plazmódium fejlődés menetét. Balbiani figyelte meg az 1860-as években a csúcsi kapszula jelenlétét és a poláris filamentum működését. Az 1880-as években Bütschli (1882) részletesen tanulmányozta a plazmódium kialakulásának különböző stádiumait, a sokmagvú pansporoblasztokat és a spórafejlődés folyamatát, illetve a spórák szerepét a fertőzés továbbításában, továbbá Bütschli nevezte el a csoportot Myxosporidiának (Bütschli, 1881). Thélohan (1892) kezdte meg a csoport spóra morfológián alapuló rendszerezését, több genus első meghatározása is hozzá köthető. Továbbá tanulmányozta a spórák szerepét a fertőzés átvitelében, a halgazdán belüli fejlődési stádiumokat, a csúcsi filamentum kialakulását és általa nyert megállapítást, hogy a spórák több sejtből állnak.

Az első monográfiát 1910-ben Auerbach publikálta erről a parazitacsoportról, több új fajt írt le, és fertőzési kísérleteket is végzett. A következő monográfiát 1919-ben Kudo készítette az összes addig ismert fajról. A spórák többsejtű természete miatt több kutató (Štolc 1899; Emery 1909; Ikeda 1912) már ekkor felvetette a nyálkaspórák átsorolását az egysejtűektől (Protozoa) a többsejtűekhez (Metazoa). 1938-ban Weill rámutatott a csúcsi kapszula és a csalánozók nematocystájának hasonlóságára.

Az elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatok megjelenésének köszönhetően jobban tanulmányozhatóvá vált a spóra szerkezet, a csúcsi kapszula és csúcsi filamentum illetve a sporogóniás szakasz és a csúcsi kapszula kialakulásának folyamata (Lom 1969, Lom & de Puytorac 1965, Lom & Vávra 1965) További EM vizsgálatokkal tanulmányozták a különböző fejlődési stádiumokat és a plazmódium különböző sejtalkotóinak tulajdonságait (Lom &

Dyková, 1992, 1997). Ezzel párhuzamosan egyre több közlemény jelent meg a nyálkaspórák paraziták halakban okozott patológiás elváltozásairól (Molnár 1982), illetve fertőzési kísérletekről, mely során tanulmányozták a patogenitás mértékét és fertőzés átadásának módját (Feist & Longshaw 2006).

A nyálkaspórák gyűrűsférgekben fejlődő alakjait, az actinosporeákat, 1899-ben Štolc írta le először, mint a Myxosporea osztály testvércsoportját. Később Janiszewska (1955, 1957) és Marques (1984) bővítette az aktinospórákról szóló ismereteket további morfológiai, rendszertani és fejlődéstani vizsgálatokkal.

Az elmúlt 35 évben áttörést jelentő eredmények születtek a nyálkaspórák életmenetének és evolúciójának tanulmányozásában. Az 1980-as években Markiw és Wolf fedezte fel, hogy a nyálkaspórák paraziták komplex fejlődésmenettel rendelkeznek, melyben az aktinospórák és myxospórák nem különálló fajokat képviselnek, hanem ugyanannak a fajnak két különböző fejlődési szakaszban megjelenő formáját alkotják (Markiw & Wolf 1983, Wolf & Markiw 1984.)

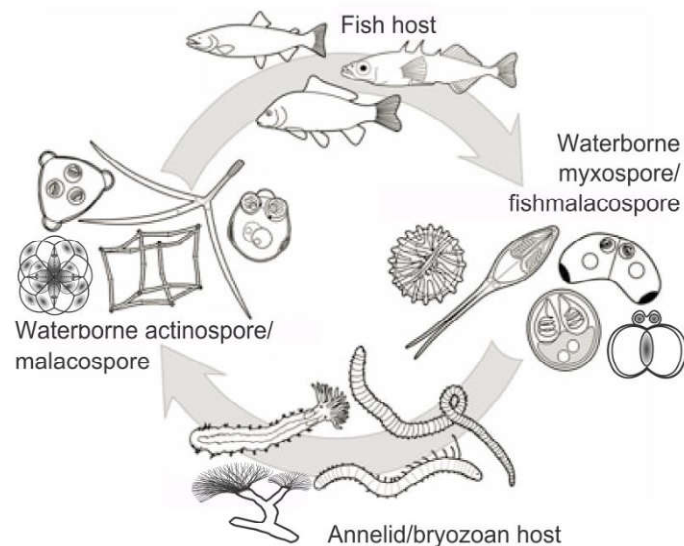
Az 1990-es években felfedezték az első malacosporeát, egy furcsa, zsák alakú, nyálkaspórák parazitát, amint szabadon úszik egy mohaállatka testüregeiben (Canning et al. 1996, Okamura 1996). Pár évvel később felfedezték, hogy ennek egy közeli rokona felelős a lazacok proliferatív vesebetegségének kiváltásáért (Anderson et al. 1999, Feist et al. 2001), ezzel egyszersmind bizonyították, hogy a malacosporeák is összetett életciklussal rendelkeznek, csak ott a hal mellett, a másik köztigazda mohaállatka (Bryozoa).

A nyálkaspórák fejlődési ciklus további vizsgálata során az is nyilvánvalóvá vált, hogy az aktinospóra és malacospóra fejlődési szakaszban megtörténő meiotikus osztódás miatt a gyűrűsférges (Marqués 1987, El-Matbouli & Hoffman 1998), és bryozoák (Canning et al. 2002) tekinthetők a végleges gazdának, annak ellenére, hogy taxonómiaiilag is magasabb rendű halakban jóval könnyebben észlelhető, nagyobb gazdasági kárral járó kórképeket okozhatnak ezek a paraziták.

Újabb elektronmikroszkópos és molekuláris biológiai vizsgálatok is megerősítették a nyálkaspórák rendszertani helyét a Metazoák, többsejtű élőlények között (Desser et al. 1983, Smothers et al. 1994). Sokáig kérdésesnek tűnt, hogy a csalánozók, vagy a laposférgesek tekinthetőek-e a nyálkaspórák legközelebbi rokonainak, de morfológiai és több génen alapuló filogenetikai elemzések alapján bizonyítottnak látszik, a myxozoák a csalánozók törzsébe tartoznak (Siddall 1995, Holland et al. 2011, Shpirer & Chang 2014).

A/1.2. Fejlődési ciklus és gazdán belüli fertőzésmenet

Wolf és Markiw (1984) korszakalkotó felfedezése során, a *Myxobolus cerebralis* kapcsán derült fény a nyálkaspórák két-gazdás fejlődési ciklusára, ahol egy gerinctelen gazda (*T. tubifex* gyűrűsféreg) és egy gerinces gazda (pisztráng) között váltakozott a fejlődésmenet. Ez a felfedezés adott lökést a további fejlődési ciklus vizsgálatoknak világszerte, melyek Eszterbauer és munkatársai (2015) könyvrészletében kerültek összefoglalásra.



1. ábra: Nyálkaspórások életciklusának sematikus ábrája, a hal és a gyűrűsféreg/ mohaállatka közti gazdaváltást bemutatva (Atkinson et al. 2015, Eszterbauer et al. 2015).

Az aktinospórák a gerinctelen gazdában alakulnak ki, melyet definíció szerint a végső gazdának tekintünk (itt történik meg a meiózis a gametocitákon belül) A myxospórák a gerinces (közti) gazdában alakulnak ki (1. ábra).

A Myxosporeák gerinctelen gazdái általában gyűrűsférgek: az édesvizeknek kevésértéjű (oligochaeták), a tengerieknek sokértéjű (polychaeták) gyűrűsférgek, vagy ritkán fecskendőférgek (*Sipunculida*) (Ikeda 1912). A Malacosporeák gerinctelen gazdája a *Phylactolaemata* osztályba tartozó édesvizi mohaállatkák (*Bryozoa*) csoportjából kerül ki, gerinces gazdájuk szintén a hal.

A Myxosporeák gerinces gazdái általában porcos vagy csontos halak (Dyková & Lom 1982), de kétéltűekből, hüllőkből, madaraktól és emlősökből (emberből is) írtak már le nyálkaspórásokat (Eiras 2005; Jirků et al. 2007; Prunescu et al. 2007; Bartholomew et al. 2008; Kawai et al. 2012; Ohnishi et al. 2013; Székely et al. 2015, Hartigan et al. 2016), sőt kivételes esetekben néhány Monogenea, illetve Cephalopoda osztályba tartozó gerinctelen állatban is találtak myxospórákat (Yokoyama & Masuda 2001; Freeman & Shinn 2011).

Ezidáig 53 nyálkaspórák életciklus ismert, amelyből 38 mindkét gazdából származó molekuláris adatokkal is bizonyított. Az 53 ismert ciklusból 42-nél található meg oligochaeta végső gazda, 8-nál polychaeta, és 3-nál bryozoa. Az még ismeretlen, hogy szárazföldi gerincesekben hogyan zajlik a nyálkaspórák fejlődése (Eiras 2005), de a fertőződés feltehetőleg fertőzött oligochaeták (földigiliszták) (Dyková et al. 2011) vagy pókok (Hallett et al. 2015) elfogyasztásával jön létre.

A nyálkaspórák a legszélsőségesebb példái az endoparazitizmussal járó morfológiai egyszerűsödésnek és a testszerveződés néhány sejtre redukálódásának a teljes életcikluson keresztül. A spórák hordozzák a legkarakterisztikusabb vonásokat. Az aktinospórák általában nagyobbak, vékony héjúak, 3 sugaras szimmetriával, 3 csúcsi tokot tartalmaznak, 3 héjsejtből állnak és egy többmagvú sporoplazmát tartalmaznak (Kent et al. 2001; Lom & Dyková 2006; Morris 2010; 2012). A héjsejtek gyakran hosszú kinövéseket képeznek a lebegés elősegítése érdekében. A myxospórák általában 1-4 tokot képző sejtet tartalmaznak, 2-4 héjképző sejtet, és 2-12 egymagvú sporoplazmát (Lom & Noble 1984; Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1995; Bartošová et al. 2013) vagy egy kétmagvú sporoplazmát (Lom & Dyková 1992; Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1994). A tokot képző sejtekből fognak kialakulni a sarki tokok, magukban foglalva a feltekeredett sarki filamentumot.

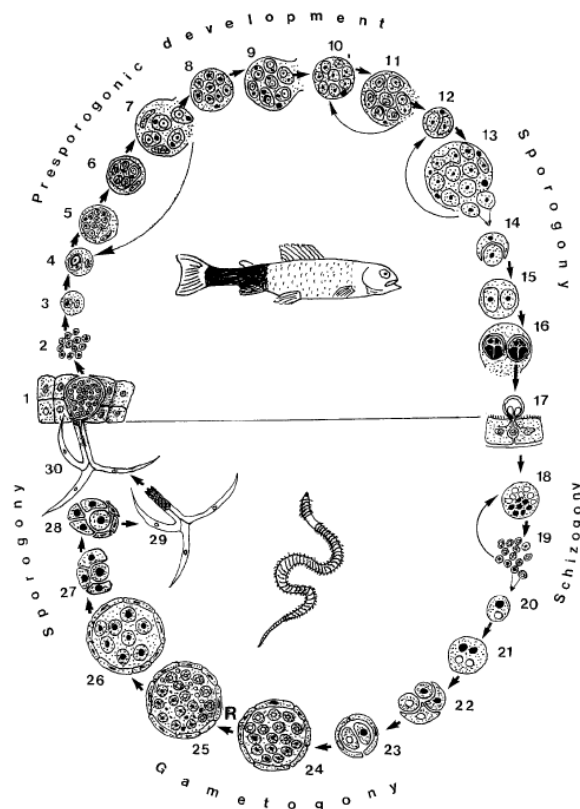
A Malacosporea sejtes összetétele nagymértékben eltér a Myxosporeához képest. A mohaállatka testüregében található Malacospórának 8 hégsejtje van, 4 sarki tokja, és 2 sporoplazmája másodlagos sejtekkel (Canning & Okamura 2004; Feist et al. 2015). A halban fejlődő malacospórának 2 vagy 4 hégsejtje van, 2 sarki tokja, és egy egymagvú sporoplazmája, melyben nem találhatóak másodlagos sejtek (Kent & Hedrick 1986; Kent et al. 2000; Hedrick et al. 2004; Morris & Adams 2008; Feist et al. 2015).

A nyálkaspórások gazdafelismerése a hal nyálkájában lévő inozin molekulán alapul (Kallert et al. 2005, 2011). Az aktinospórák kilövik a sarki filamentumaikat és ezt követően a spóraháj a varrat mentén felnyílik, kiürítve a sporoplazmát a hal nyálka-, vagy epiteliális sejtjeibe (El-Matbouli et al. 1999; Kallert et al. 2011). Miután a sporoplazma bejut a halba, ivartalan osztódások során esik át (presporogén stádiumok), ezalatt eljut a cél szervhez, ahol a sporogónia megtörténik. A nyálkaspórások egyedülálló sejt a sejtben fejlődési módon fejlődnek ki, ahol az elsődleges sejt tartalmaz egy vagy több másodlagos, később harmadlagos sejtet. Az elsődleges sejt felszakad, és kiszabadulnak a másodlagos-harmadlagos sejt kettősök, melyek folytatják a proliferációt (2. ábra).

Kevés információ áll rendelkezésre a nyálkaspórások teljes halon belüli fejlődésmenetéről (El-Matbouli et al. 1995a; Holzer et al. 2003; Morris & Adams 2008; Bjork & Bartholomew 2010). Vérben osztódó formákról csak a Sphaerospora fajok esetében tudunk (Baska & Molnár 1988; Lom et al. 1985; Molnár 1994; Holzer et al. 2003). Más myxosporea fajoknál valószínűbb, hogy a vér csak a spórák szállításában vesz részt a célszövethez, a sporogenezis helyéhez, de a vérben osztódás nem történik (Kent & Hedrick 1985; Moran et al. 1999a, b; Bjork & Bartholomew 2010; Holzer et al. 2013; Holzer et al. 2014). A *Myxobolus cerebralis* (Hofer, 1903) spórái az agy és a gerincvelő porcos részéhez az idegrostok mentén jutnak el, hogy kikerüljék a gazda immunválasztát (El-Matbouli et al. 1995a).

Általánosságban elmondható, hogy a nyálkaspórás sporogónia a célszövetben a plazmódiumon belül indul meg. Ezek a következőképpen csoportosíthatóak: nagy plazmódium (több vegetatív sejt, számos spóra) vagy pszeudoplazmódium (egy vegetatív sejt, 1-2 spóra) (Kent et al. 2001; Canning & Okamura 2004) és lehet hisztocitikus (szöveten belül fejlődő, pl izomban, kopoltyúban, májban, bőrben, vesében, herékben) vagy lehet cöllozoitikus (testüregben/ szervek üregein belül fejlődő, pl vesetubulusokban, húgyvezetőkben, epehólyagban, és epevezetőkben). A sporogóniás sejtek a plazmódiumon belül tovább osztódnak különböző spóráképző sejt típusokká: sarki tokot kialakító sejtek, a héjat kialakító sejtek és a sporoplazmát képző sejtek). A teljesen kifejlődött, érett spórák kiszabadulnak a gerinces gazdából és leülepednek a vízi élettér aljzatára, amíg fel nem veszi őket egy gerinctelen gazda.

Amint a gerinctelen gazda elfogyasztja a myxospórát a poláris fonalak kicsapódnak, hogy rögzítsék a spórát a gazda felületéhez, a hégsejtek a varrat mentén felnyílnak, a sporoplazma kiszabadul és megkezdődik a sejtek proliferációja, hasonlóan, mint a gerinces gazdában. A proliferáció után a haploid sporoplazma osztódik, majd később megtermékenyítődik – pansporociszták termelődnek benne, amelyek haploid α szomatikus sejt és β ivarsejt egyesülnek, hogy 4 vagy gyakran 8 diploid zigótát képezzenek (Morris 2012). További osztódások során kialakulnak a sarki tok-, hég-, és sporoplazma képző sejtek. A sejtosztódás végén 4 vagy 8 aktinospóra alakul ki egy pansporocisztán belül (Kent et al. 2001; Lom & Dyková 2006). A gazda testében különböző helyeken képződhetnek aktinospórák (testfal, Bartholomew et al. 1997, emésztő epithélium, El-Matbouli & Hoffmann 1998, testüregben Rangel et al. 2009). A myxosporeákkal ellentétben, a malacosporeák fejlődése az édesvízi mohaállatka testüregében megy végbe. A spóra-képző stádiumok relatív nagyok és 3 típusuk van: 1. gömbölyű/ majdnem gömbölyű zsák, 2. hosszúkás mozgó állapot és 3. leány –alakú stádium (Hartikainen et al. 2014).



2. ábra: A nyálkaspórák fejlődési ciklusa a *M. cerebralis* alapján (Kent et al. 2001): 1-16: A myxospóra kifejlődése a hal gazdában. 17-30: Az aktinospóra kialakulása a gyűrűsféreg gazdában. 1: Az aktinospóra hozzátapad a halhoz, és kibocsátja a sporoplazmáját. 2: A sporoplazma belső sejtjei endogén úton osztódnak. 3-13: Presporogén vagy extrasporogén vegetatív osztódás. 14-16: Sporuláció: a plazmódiumon belül többsejtű spórák alakulnak ki. 17: A kifejlődött myxospórák kiürülnek a hal-gazdából, az annelid gazdák felveszik őket. 18-20: A gyűrűsféreg bél falában lezajlik a skizogónia (gyors egymás utáni mitotikus osztódás), amely kétmagvú sejteket eredményez. Az α és β sejtmagvakból fognak kialakulni a gaméták a gametogónia végére. 21-26: Gametogónia. A pánsporociszta belső sejtjei 3 mitotikus és 1 meiotikus osztódáson mennek át. 24-25: A kialakult gaméták fuzionálnak 8 zigótává, így alkotva a pánsporocisztát. 27-29: Sporogónia. Többsejtű spórák alakulnak ki, 3 héjjal, 3 csúcsi tokkal, és a sporoplazmával. 29: A kinyílt spórák távoznak a gyűrűsférgek ürülékével, lebegnek a vízben és életciklusukat folytatva, hozzákapcsolódnak a következő hal-gazdához.

A/1.3. Kórtan és gazda-parazita kapcsolat

Néhány nyálkaspórák parazita súlyos bántalmakat, illetve elhullásokat képes okozni a tengeri és édesvizi halak közt világszerte. A leginkább tanulmányozott nyálkaspórák parazita a *Myxobolus cerebralis*, ami a lazacok kergekórját okozza, a koponya porcos állományát károsítja, ennek következtében megnövekszik a nyomás a központi idegrendszerben, és ez vezet végül a rendellenes úszómozgáshoz. A betegség az ivadéokban jelentkezik a csontosodás előtt és magas mortalitást okoz (> 90% a ketreces tartásban nevelt ivadéknak) (Shinn et al. 2015). Másik fontos halpatogén a *Tetracapsuloides bryosalmonae*, amely a proliferatív vesebetegséget (PKD, proliferative kidney disease) okozza a lazacfélékben (Hedrick et al. 1993), és ez a fertőzött halak 85%-nak az elhullásával járhat (Sterud et al. 2007). Az emésztőrendszert megtámadó *Enteromyxum leei*, és *Ceratonova shasta* (syn. *Ceratomyxa*

shasta, Noble 1950) képes 100%-ban elpusztítani a fertőzött állományt (Wales & Wolf 1955; Ching & Munday 1984). A hal heréit megtámadó nyálkaspórások, képesek szaporodásképtelenséget is okozni, pl *Sphaerospora testicularis* a farkassügérben *Dicentrarchus labrax* (Sitjá-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1990; Toledo-Guedes et al. 2012), a *Henneguya testicularis* a *Moenkhausia oligolepis*-ben (Azevedo et al. 1997). A ponty jól ismert kórokozói a *Sphaerospora dykova* és a *Sphaerospora molnari*, melyek úszóhólyaggyulladás és kopoltyú, illetve bőr sphaerosporózist képesek okozni (Kovács-Gayer 1983, Lom et al. 1983), továbbá a *Thelohanellus kitauei*, ami óriás cisztás betegséget okoz a pontyok belében, egyelőre csak a Távols-Keleten (Egusa & Nakajima 1981) fordul elő, olykor a fertőzött halak 40%-a is elpusztul. A *Henneguya ictaluri* a kopoltyú proliferatív betegségét okozza csatornaharcsában (*Ictalurus punctatus*) és kék harcsában (*Ictalurus furcatus*) (Pote et al. 2000). Eddig egy esetben jelöltek meg nyálkaspórás parazitát humán kórokozóként: *Kudoa septempunctata* amelyet nyers hal (*Paralichthys olivaceus*) fogyasztása után gastroenteritises tüneteket mutató betegből izoláltak Japánban (Kawai et al. 2012; Ohnishi et al. 2013; Yahata et al. 2015).

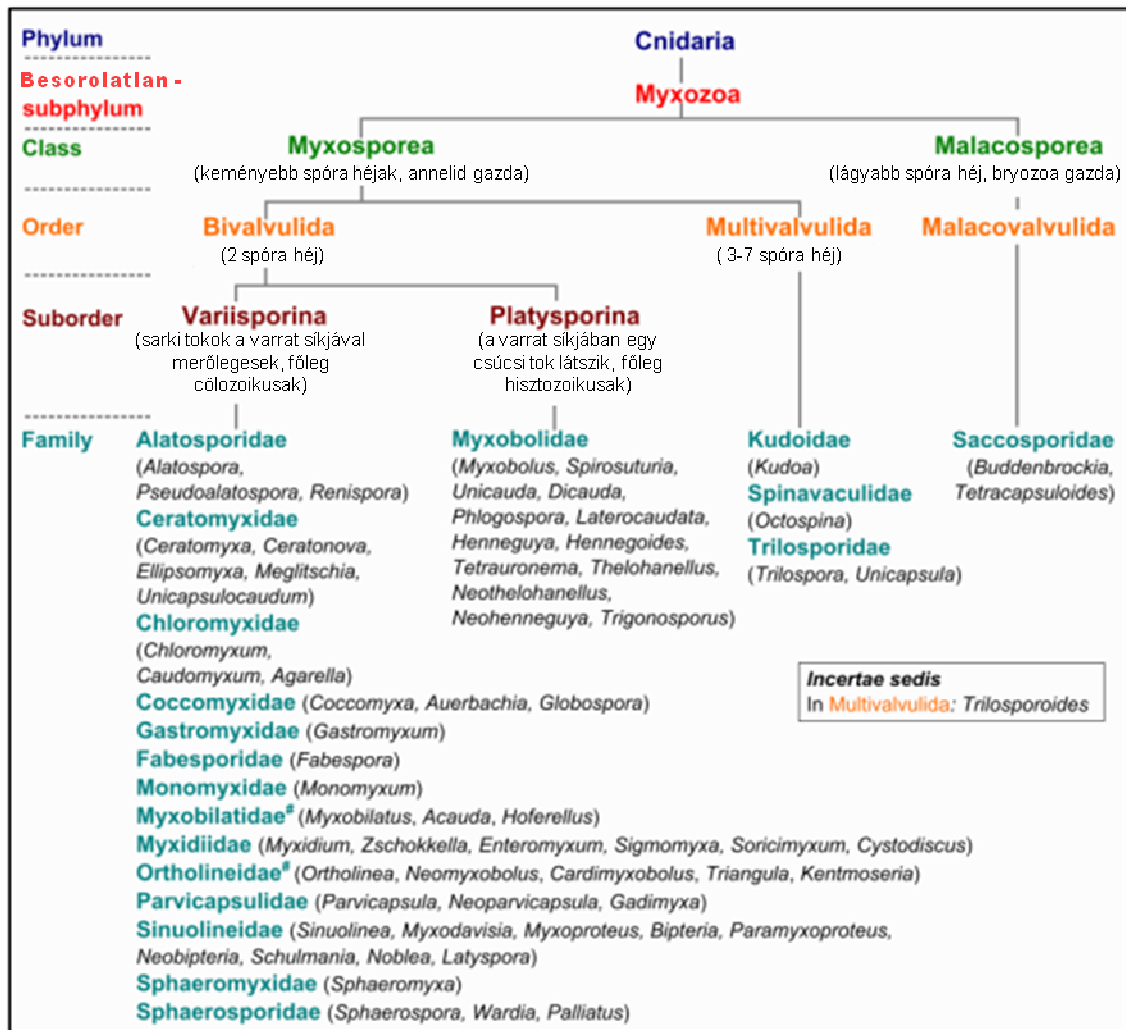
A/1.4. Rendszertan és filogenetika

Amióta felfedezték a nyálkaspórások összetett fejlődésmenetét, a myxospórákat és aktinospórákat (korábban különálló rendszertani csoportok) egymást kiegészítő pároknak ismerik el, melyek az életciklus két különálló fázisát képviselik (Wolf & Markiw, 1984; Kent et al. 1994; Wolf et al. 1986). A Myxozoa törzsön belül a Myxosporea csoportnév maradt meg, míg az Actinosporeat „gyűjtőcsoporttá” minősítették (Kent et al. 1994).

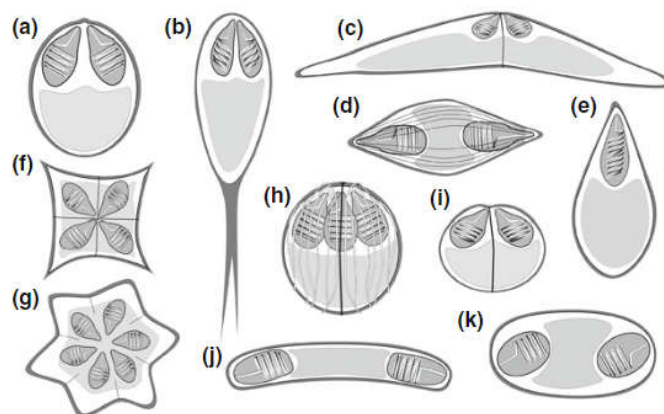
Jelenleg a spóra morfológia és a gerinctelen gazda típusa alapján a Myxozoaakat két osztályba sorolják (Kent et al. 2001), a *Myxosporea*, Bütschli 1881, kemény spóra héjjal, és annelid, gyűrűsféreg végső gazdával; és a *Malacosporea*, Canning, Curry, Feist, Longshaw és Okamura, 2000; puha spórahéjjal és bryozoa (mohaállatka) végső gazdával. Mindkét nyálkaspórás osztályban a gerinctelen, végső gazdában és a gerinces köztigazdában lévő spóraforma nagyban különbözik egymástól.

A Myxosporeák életciklusuk során kétféle spóra típust képeznek, myxospórákat a gerinces közti gazdában és aktinospórákat a gerinctelen végleges gazdában. A Malacosporeáknál csekély számú leírás létezik a halgazdában megtalálható puha falú spórákról, mivel ezeket ritkábban detektálták (Kent & Hedrick 1986; Kent et al. 2000; Hedrick et al. 2004; Morris & Adams 2008; Bartosova-Sojkova et al. 2014). Emiatt a malacosporeák rendszerezése a myxosporeákkal ellentétben főleg a mohaállatkákból származó malacospórák morfológiáján alapul.

A Myxozoa csoport jelenleg 19 család 67 nemzetségét tartalmazza (Lom & Dykova 2006; Fiala et al. 2015a; Freeman & Kristmundsson 2015, Yang et al. 2017), amelyből csak egy család, két genusza tartozik a Malacosporeákhoz (3-4. ábra).

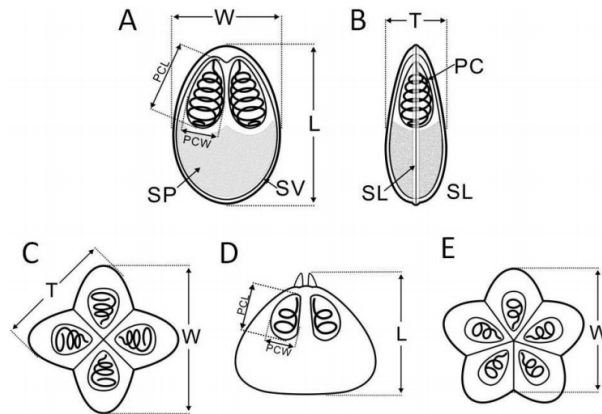


3. ábra: Myxozoa rendszertan sematikus ábrája (Lom & Dyková 2006; Fiala et al. 2015a) alapján, #: Karlsbakk és munkatársai (2017) által javasolt rendszertani változtatások nélkül

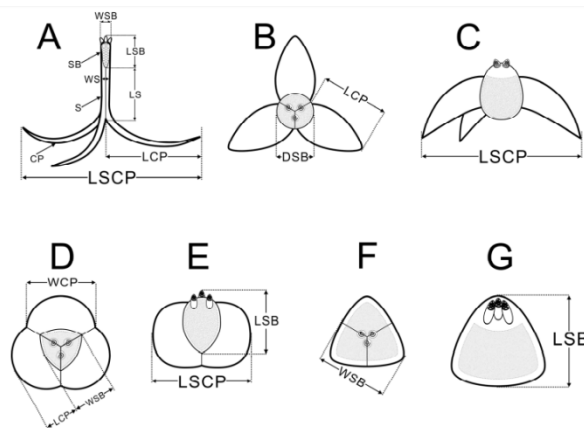


4. ábra: A főbb nyálkaspórás nemzetségek myxospóra típusai. a, *Myxobolus*, b, *Henneguya*, c, *Ceratomyxa*, d, *Myxidium*, e, *Thelohanellus*, f, *Kudoa* (4 spóra héj), g, *Kudoa* (6 spóra héj), h, *Chloromyxum*, i, *Sphaerospora*, j, *Sphaeromyxa*, k, *Zschokkella* (Fiala 2015 alapján)

Kudo (1933) és Tripathi (1948) javasolta az első határozó kulcsot a Myxosporeák rendszerezéséhez. A legjelentősebb rendszertani összefoglalást Shulman (1966) közölte, ami széleskörben elterjedt a mai napig. Lom és Arthur (1989) publikálta az első határozási útmutatót a halakból származó myxosporeák leírásához kiválasztva azokat a fontos morfológiai tulajdonságokat (5-6. ábra) melyek szükségesek egy új faj leírásához: a spóra alakja, mérete, a héjak és a sporoplazma száma, a varrat helyzete és alakja, felszíni kitüremkedések, nyúlványok, szegélyek farki függelékek és a nyálkaburok megléte vagy hiánya, a sarki tokok száma, alakja, mérete, és elhelyezkedése, a sarki fonal csavarodásainak száma a sarki tokon belül, a spóráképző plazmódium tulajdonságai, illetve a fertőzés végső helye.



5. ábra: A bivalvulid (A – szemből nézeti kép, B - oldalnézet) és multivalvulid (C és E – felülnézeti kép, D – oldalnézet) myxospóra típusok sematikus rajza. PC: sarki tok, SP: sporoplazma, SV: spóra héj, SL: varrat, L: spóra hossz, W: spóra szélesség, T: spóra vastagság, PCL: sarki tok hossza, PCW: sarki tok szélesség (Yokoyama et al. 2012 nyomán)



6. ábra: Az aktinospóra típusok sematikus rajza. A: Triactinomyxon, B-C: Aurantiactinomyxon, D-E: Neoactinomyxon, F-G: Tetractinomyxon. B, D, F: felülnézet, C, E, G: oldalnézet. SB: spóra test, LSB: spóra test hossza, WSB: spóra test szélessége, S: spóra nyél, LS: nyél hossza, WS: nyél szélessége, CP: nyúlvány, LCP: nyúlvány hossza, LSCP: nyúlványok legnagyobb távolsága, PC: sarki tok, DSB: spóra test átmérője (Yokoyama et al. 2012 nyomán)

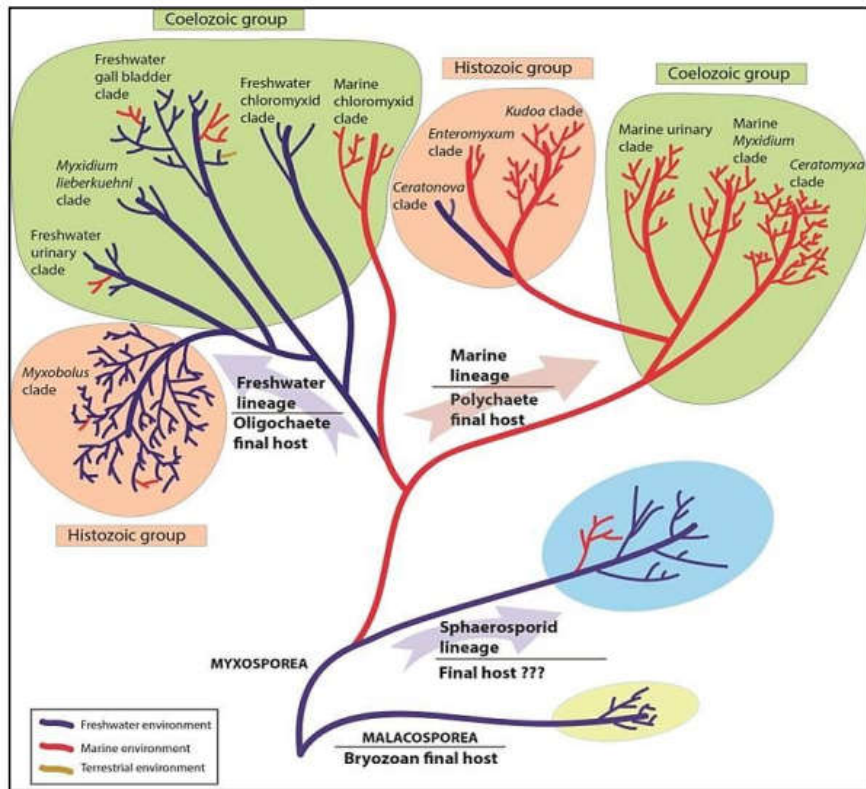
A morfológiai tulajdonságok mellett, ma már egy új faj leírásához elengedhetetlen a riboszóma kis alegységének részét képező, 18S rRNS-t kódoló konzervatív szekvenciát (18S rDNS) is megadni. Amikor az első nyálkaspórák 18S rDNS szekvenciát publikálták az 1990-es években (Smothers et al. 1994), nyilvánvalóvá vált, hogy a filogenetikai leszármazás nem

egyezik meg a hagyományos nyálkaspórás rendszertannal (Holzer et al. 2004, Fiala 2006, Bartosova & Fiala 2011, Rocha et al. 2013, Karslbakk et al. 2017). Jelenleg kb 770 fajt írtak le a 18S rDNS szekvenciája alapján, ami a nyálkaspórások leggyakrabban használt molekuláris azonosítója lett. A legújabb filogenetikai eredmények alapján 15 nemzetség bizonyult para-/polyphiletikusnak, habár számos genusz molekulárisan alulreprezentált; vagy a molekuláris eredmények hiánya miatt, vagy azért, mert csak 1-1 képviselőjükről áll rendelkezésre szekvencia adat. Ugyanakkor, az eddig morfológiai alapon megkülönböztetett, számos taggal rendelkező *Myxobolus* és *Henneguya* nemzetségek is polifiletikus eredetet mutattak a leszármazástani vizsgálatok során. Így felmerült, hogy a morfológiai tulajdonságok helyett más tényezők lehetnek a felelősek a nyálkaspórások rokonsági viszonyainak alakításáért. Néhány biológiai tulajdonság megfelel a filogenetikai csoportosításnak bizonyos fokon:

1. A gazdaszöveten belüli lokalizáció (Holzer et al. 2004; Fiala 2006; Molnár et al. 2010; Shin et al. 2014)
2. A vízi környezet típusa: tenger/ édesvíz/ brakkvíz (Fiala 2006; Bartošová et al. 2013; Aguiar et al. 2017)
3. A gerinctelen gazda típusa: mohaállatka/ soksertéjű gyűrűsféreg/ kevésertéjű gyűrűsféreg (Holzer et al. 2007, Fiala et al. 2015a)
4. A halgazda rendszertani helye (Gunter et al. 2009; Alama-Bermejo et al. 2011; Molnár et al. 2011; Carriero et al. 2013)
5. Sporogenezis (Morris & Adams, 2008)
6. Földrajzi lokáció (Whipps et al. 2003; Henderson & Okamura 2004; Whipps & Kent 2006; Liu et al. 2016).

A 18S rDNS –en alapuló filogenetikai vizsgálatok szerint a myxozoák négy nagy kládba oszthatók, a bazális malacosporea kládra és 3 myxosporea kládra (Sphaerospora klád, tengeri klád, édesvízi klád, 7. ábra) (Fiala 2006, Fiala et al. 2015a).

A 18S rDNS variábilis régióinak nagy változékonysága jelzi a nyálkaspórások gyors evolúcióját (Jiménez-Guri et al. 2007, Evans et al. 2010, Chang et al. 2015). Ez könnyen okozhat problémát a hasonló szekvenciák összehasonlításánál, így potenciális hibát jelenthet a filogenetikai elemzésben. Más molekuláris markerek, mint a riboszóma nagy alegysége (28S rDNS) és az elongációs faktor 2 (EF2) szekvenciája szintén támogatja a 18S rDNS-en alapuló filogenetikai rendszerezést (Bartošová et al. 2009; Fiala & Bartošová 2010; Hartikainen et al. 2014; Atkinson et al. 2015). A meglehetősen változékonny ITS régió 1 (belső átíródó elválasztó szakasz) megfelelő marker ahhoz, hogy faj alatti szinteken meghatározzuk a nyálkaspórások rokonsági viszonyait, pl. különböző földrajzi elterjedésű fajok filogenetikai jellemzésénél (Henderson & Okamura 2004; Whipps & Kent 2006). A 18S rDNS-nél sokkal konzervatívabb a hősokk fehérje 70-t kódoló gén nukleotidszekvenciája, ami megfelelő lenne fajok feletti szerveződési szintek rokonsági viszonyainak feltérképezésére (Andree et al. 1999; Whipps et al. 2004). Sok parafiletikus csoport leszármazási kapcsolatainak tisztázása azonban még mindig várat magára, szükség lenne egy olyan komplex filogenetikai rendszer kidolgozására, ami nem csak spóra morfológián vagy egy gén nukleotidsorrendjén alapul.



7. ábra: A nyálkaspórások több tanulmány alapján feltételezett leszármazási kapcsolatai (Fiala et al. 2015b). Az ágak színe jelzi az egyes paraziták, parazita csoportok számára szükséges életteret: kék ágak - édesvíz, pirosak – tenger, sárga – szárazföld)

A/2. Témafelvetés

PhD munkám során történő fajleírásoknál, a faj feletti szerveződési szinteken követtük a morfológiai alapon létrehozott rendszertani besorolásokat (pl. *Henneguya*, *Myxobolus*). Fajok közti elkülönítésre viszont a morfológiai adatok rögzítése mellett a részleges 18S rDNS szekvenciát (~ 1600 bp) vettük alapul. Az általam vizsgált fajok a *Myxosporidia* osztály, *Bivalvulida* rend, *Platysporina* alrend, *Myxobolidae* családjába tartoztak, azon belül is a három leggyakrabban előforduló nemzetségbe: *Myxobolus*, *Henneguya*, *Thelohanellus*. Ezek morfológiai jellemzése a következő:

Bivalvulida rend (Shulman, 1959): A spóra külső burka két héjből áll, melyeket egy varrat kapcsol össze a spóra körül. Általában 2, néha 4, legritkábban csak egy sarki tokkal rendelkezik.

Platysporina alrend (Kudo, 1919): A sarki tokok (általában kettő, ritkán 1) a kétoldali szimmetriát mutató spóra, varrat felőli síkjában szigorúan a spóra csúcsában helyezkednek el. Édesvízi halakat károsító, hisztozoikus (szöveteket megtámadó) paraziták tartoznak ide.

Myxobolidae család (Thélohan, 1892): A spórák a varrattal párhuzamosan lapítottak, a varrat kiemelkedő gerincet alkot és nyúlványok is képezhet. A két sarki tokból az egyik kisebb lehet, mint a másik, sőt az egyik tok két genusban el is tűnik. A legtöbb fajban megtalálható a jodofil (jóddal festődő) vakuólum. Több spórával együtt nagyméretű szöveti trofozoitokat, „cisztákat” képez, legtöbbször édesvízi halakban fordul elő.

Myxobolus genusz (Bütschli, 1882): A spórák héj felőli nézetben ellipszoid, tojás, vagy köralakúak, varrat felőli nézetben bikonvexek. A héjak felülete sima. Bennük két csepp alakú sarkitok, és egy két magvú sporoplasma (esetenként két egymagvú) helyezkedik el. A spóra átlagos hosszanti mérete 8-16µm. Édesvizi halak, néha tengeriek, ritkán kétéltűek szöveteit támadják meg (Landsberg & Lom, 1991)

Henneguya genusz (Thélohan, 1892): Spóra alakjuk lehet a *Myxobolus* genusz tagjaihoz hasonló, azonban az ismert fajok többsége orsó-alakú; a varrat felől nézve szintén bikonvex. Mindkét héj farki kinövésben folytatódik, ezek néha össze is simulhatnak, és gyakran a spóra hosszának két-háromszorosát is eléri. A héjak felszíne sima. A spórában ugyancsak két sarkitok és egy vagy két sporoplasma található, a tokok gyakran megnyúlt alakúak. Kétmagvú sporoplazmájuk szélén gyakran poliszacharid befűződésesek találhatóak. Szöveti parazitái az édesvizi, ritkán tengeri halaknak (Minchew 1977).

Thelohanellus genusz (Kudo, 1933): Főleg hisztotoikus, szövetekben élősködő paraziták, ritkábban cölotoikus, testüregeket fertőző fajok tartoznak ide. Spórájuk általában csepp-, vagy körte alakú, hasonlít a *Myxobolus* spóra típusra, de a *Thelohanellus* fajok myxospórájában csak egy sarki tok található. A tok alakja szintén csepp vagy körte alakú, benne egy sarki filamentum helyezkedik el. A myxospórát burok veszi körül. Az aktinospóra alakja Auranti- vagy Neoaktinomyxum típusú (Lom & Dyková 2006).

A/2.1. A bodorka szem *Myxobolus* fertőzőtsége

A bodorka (*Rutilus rutilus*) Magyarország természetes vizeinek egyik leggyakoribb halfaja. Nyálkaspórásokkal való fertőzőtsége jól tanulmányozott, és 14 leírt *Myxobolus* fajából 11-nek ismert a részleges 18S rDNS szekvenciája (1. táblázat). A legtöbbjük a bodorka specifikus parazitája, és szerv illetve szövetspecifikusság jellemző rájuk (Molnár et al. 2010, Molnár & Eszterbauer, 2015). A számos ismert nyálkaspórás faj ellenére keveset tudunk a szem fertőzőtségéről. A legismertebb nyálkaspórás szem-parazita a *Thelohanellus oculeucisci*, ami a bodorka szem üvegtestjében fejlődik (Trojan 1909, Lom et al. 1987). Ismertek *Myxobolus* fajok is, melyek számos ponty- és sügérféle szaruhártyáját és ínhártyáját képesek megfertőzni, pl *M. corneus* (kékkopoltyús naphal, *Lepomis macrochirus*, Cone et al., 1990), *M. magnus* (vágódurbincs, *Gymnocephalus cernua*, Awerinzev, 1913), *M. volgensis* (fogassüllő, *Sander lucioperca* Reuss, 1906). Továbbá El-Mansy Egyiptomban (2005), három tilapia faj (*Oreochromis aureus*, *O. niloticus*, *Tilapia zillii*) szaruhártyájából mutatott ki *Myxobolus* fertőzőtséget (*M. heterosporus* Baker, 1963).

Parazitológiai felméréseink során a bodorka kopoltyújáról, uszonyáról és izomzatából kimutatott *Myxobolus* fajok mellett igen ritkán a szem szaruhártyáján is megfigyeltünk fertőzőtséget, és kérdésként merült fel, hogy azt vajon egy újabb, ismeretlen faj okozza-e, vagy pedig egy különös lokációban fejlődő ismert fajról van szó.

1. táblázat: A bodorkát fertőző eddig ismert nyálkaspórás paraziták

*Nem található irodalmi adat a pontosabb kopoltyún belüli lokációról

Faj név	Első leírás	Lokáció	Génbanki referencia
<i>Myxobolus alievi</i>	Gasimagomedov, 1970	Izom	nincs adat
<i>M. chernovae</i>	Landsberg & Lom, 1991	Kopoltyú*	nincs adat
<i>M. diversicapsularis</i>	Slukhai, 1984	Kopoltyú lemezkék	GU968199 (1891 bp)
<i>M. dujardini</i>	Thélohan, 1892	Kopoltyú lemez	DQ439804 (1526 bp)
<i>M. elegans</i>	Kashkovski, 1966	Kopoltyú lemez	JN252485 (1642 bp)

<i>M. feisti</i>	Molnár et al. 2008	Kopoltyú porcos sugara	EU598804 (1331 bp)
<i>M. fundamentalis</i>	Molnár et al. 2010	Kopoltyú ív	GU968200 (1357 bp)
<i>M. intimus</i>	Zaika, 1984	Kopoltyú lemezkék	AY325285 (1583 bp)
<i>M. marginatus</i>	Kulemina, 1969	Koponya csontok	nincs adat
<i>M. mucosus</i>	Liu et al. 2016	Kopoltyú lemez alapja	KP751909 (1735 bp)
<i>M. pseudodispar</i>	Gorbunova, 1936	Izom	AF380145 (1554 bp)
<i>M. rutili</i>	Donec & Tozzyakova, 1984	Kopoltyú lemez	GU968201 (1326 bp)
<i>M. sommervillae</i>	Molnár et al. 2010	Kopoltyú lemez	GU968202 (1321 bp)
<i>M. wootteni</i>	Molnár et al. 2010	Uzony	DQ231157 (1599 bp)

A/2.2. Paduc (*Chondrostoma nasus*) nyálkaspórási fertőzöttsége

A paduc Európa és Anatólia folyóvízeiben honos, cyprinida halfaj, a Leuciscinae alcsalád tagja. A magyarországi gyors sodrású vizek egyik leggyakoribb hala. Gyakorisága ellenére nyálkaspórással való fertőzöttsége kevésbé tanulmányozott. Eddig csak egy izomparazitát írtak le kizárólag erről a halfajról *M. chondrostomi* Donec, 1962 néven (Eiras et al 2005). Morfológiai alapon Donec és Shulman (1984) további 14 olyan nyálkaspórási faj előfordulását is leírja paducról, melyeket korábban más cyprinida halakról mutattak ki, úgymint *M. albovae* Krasilnikova, 1966; *M. bliccae* Donec & Tozzyakova, 1984; *M. bramae* Reuss, 1906; *M. carassii* Klokacewa, 1914; *M. caudatus* Gogebashvili, 1966; *M. circulus* Akhmerov, 1960; *M. cyprini* Doflein, 1898; *M. dispar* The'lohan, 1895; *M. donecae* Kashkovsky 1969; *M. ellipsoides* Thelohan, 1892; *M. exiguus* The'lohan, 1895; *M. lobatus* Dogiel & Bychowsky, 1934; *M. macrocapsularis* Reuss, 1906; és *M. musculi* Keysselitz, 1908.

A nyálkaspórássokra jellemző szigorú faj-, szerv- és szövetspecifikusság miatt (Molnár et al 2004) azonban valószínűsíthető hogy a csak morfológiai alapon, más cyprinida halak parazitáiként azonosított nyálkaspórássok, eddig még le nem írt, új fajokat képviselnek.

A/2.3. Garda (*Pelecus cultratus*) nyálkaspórási fertőzöttsége

A paduchoz hasonlóan szintén a *Leuciscinae* alcsalád tagja, gyakori pontyfélének. A paduccal ellentétben, az álló és lassú folyású vizek lakója; szívesen tanyázik brakkvízben is. Közép-Európától a Kaszpi-tengerig megtalálható; az Aral-tóban is van állománya. Magyarországon a nagyobb folyókban és a Balatonban él, ahol régebben akár 50-300 tonnát is fogtak évente. Mindezek ellenére, nyálkaspórással való fertőzöttsége kevésbé tanulmányozott, csupán egyetlen faj, a *Myxobolus ladogensis*-t (Rumyantsev & Shulman, 1997) írták le eddig erről a halfajról.

2014 júniusában, a Balatonban egy nagymértékű gardaelhullás történt, melynek okát virológiai, bakteriológiai és parazitológiai módszerekkel vizsgálta a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága (NÉBIH ÁDI). A teljeskörű parazitológiai vizsgálatot során nyálkaspórási fertőzöttséget állapítottak meg a kopoltyún és a szemén. A további vizsgálatokat, a nyálkaspórássok faji szintű azonosítását témacsoportunk végezte 15 moribund egyed, majd a későbbiekben számos további garda vizsgálata alapján.

A/2.4. *Henneguya* fajok vizsgálata

A *Henneguya* fajok a csuka (*Esox lucius*, L.) és a sügérfélék leggyakoribb nyálkaspórási parazitái (Táblázat 9.). A csoport típusfaját, a *Henneguya psorospermica*-t Thelohan írta le 1895-ben a csuka és a sügér (*Perca fluviatilis*, L.) kopoltyújából. További

csuka parazita *Henneguya* fajokat írtak le a kopoltyúról (*H. lobosa* Cohn, 1895), a petefészekből (*H. oviperda* Cohn, 1895), az epidermiszből (*H. schizura* Gurley, 1893) és a bélből (*H. periintestinalis* Cépéde, 1906). Sügér kopoltyújából írta le Cohn 1895-ben a *H. texta*-t és a *H. minuta*-t. A pikkelyek alatti epidermiszből írta le Romuk-Wodoracki (1990) a *H. wolinensis*-t. A *H. lobosa* és *H. creplini* (Gurley, 1894) jelenlétét is leírták már sügérből, bár az elsődleges gazdájuk nem ez a halfaj, hanem a csuka, illetve a vágódurbincs (*Gymnocephalus cernua* L.). A *H. creplini*-t, csakúgy mint a *H. acerinae*-t (Schröder, 1906), először vágódurbincs kopoltyúján figyelték meg, a *H. tenuis*-t (Vaney és Conte, 1901) pedig a bélből. A süllő és a kősüllő kopoltyújáról a *H. gigantea*-t (Nemeczek, 1911) és *H. nemeczeki*-t (Tripathi, 1952) írták le, de a *H. creplini* jelenlétét is feljegyezték. Az európai fajok mellett Fantham és munkatársai (1939) Kanadában, a sárga sügérből (*Perca flavescens*, Mitchell) írták le a *H. percae*-t, a *H. dogieli*-t Akhmerov (1960) fedezte fel egy távol keleti sügérfélében, a *Siniperca chuatsi*-ban (Basilewsky).

Magyarországon Jaczó (1940) tanulmányozta először a Balaton halainak nyálkaspórák fertőzöttségét. *Myxobolus* és *Chloromyxum* fajok mellett felfedezett egy *Henneguya* fajt is a sügér szájpaplánján, de a faj leírást nem végezte el. Feltehetőleg vizsgálataink során ugyanezt a nyálkaspórást találtuk meg. Morfológiai adatokat, a specifikus lokációt, és szöveti előfordulást alapul véve és kiegészítve molekuláris biológiai eredményekkel, a sügérből egy új fajt, a *Henneguya jacsoi*-t szeretnénk leírni, továbbá a sügérből származó *H. texta* és a csukában előforduló *H. psorospermica* újra-leírását szeretnénk megtenni.

A/2.5. Ponty parazita *Thelohanellus* fajok molekuláris vizsgálata

Először Achmerov (1955, 1960) írt le ponty parazita *Thelohanellus* fajokat az amúri tőpontyról (*Cyprinus carpio haematoterus*), a *T. nikolskii*-t az úszókról, a *T. amurensis*-t a májból, a *T. dogieli*-t a bőrből és a *T. hovorkai*-t a hasüregből. Hoshina & Hosoda (1957) és Egusa & Nakajima (1981) további két új fajt írt le, a *T. cyprini*-t és a *T. kitauei*-t tenyésztett pontyok úszójáról, és a bélfalból. Ky (1971) Vietnámból a *T. callisporis*-t és a *T. acuminatus*-t azonosította. A kizárólag pontyokat megbetegítő fajok mellett, más fajokból is leírtak *Thelohanellus* fertőzést, melyre a ponty úgyszintén fogékonyak bizonyult (*T. fuhrmanni*, *T. oculeucisci*, *T. pyriformis*; Bauer 1948, Petrushevsky & Bauer 1948, Donec & Shulman 1984, Iskov 1989, Moshu 1993). A spórák és a sarki tokok nagyfokú méret- és alakbeli változatossága alapján Shulman (1962, 1966) és Donec & Shulman (1984) szerint a *T. nikolskii*, *T. hovorkai*, *T. amurensis* és *T. cyprini* a *T. dogieli*-vel megegyező fajok, továbbá a *T. acuminatus*-t és a *T. fuhrmanni* egy fajjá történő összevonását is javasolták. A 20. század végéig ezek a fajok csak a Távol-Keleten voltak ismertek. 1979-ben Jeney tapasztalt először úszókon megjelenő *Thelohanellus* fertőzést hazánkban ponty ivadékon, egyes tiszántúli területeken (Szarvas, Biharugra), melyet először *T. dogieli*-nek azonosított, és feltételezte, hogy az amúri tőponty betelepítésével került Magyarországra. Később Molnár & Kovács-Gayer (1981-1982) a fajt már *T. nikolskii*-ként határozták meg, továbbá a ponty kötőszövetéből leírták a *T. hovorkai* fertőzés megjelenését is. Napjainkban, a *T. nikolskii* fertőzés rendszeresen jelentkezik tavasszal, a szaporodási időszakban a halgazdaságokban és természetes vizekben egyaránt. A *T. hovorkai* fertőzés is általánosan jelen van, de detektálása nehezebb, mivel a kötőszöveteket támadja meg.

Az 1970-es évek végén Japánban mutatták ki először a *T. kitauei*-t (Egusa és Nakajima, 1981), egy nagy patogenitással bíró nyálkaspórák parazitát, mely a pontyok belében okoz óriás cisztás megbetegedést és a legújabb kutatások szerint a bőrben is képes elváltozásokat okozni (Zhai et al. 2016). A parazita jelentős gazdasági károkat képes előidézni a haltelepeken, ahol a fertőzés az esetek 40%-ban elhullással végződik. Megbetegedéseket eddig csak Kelet-Ázsiából (Japán, Korea, Kína) írtak le, Európából, vagy Amerikából még

nem, de a nem megfelelően ellenőrzött globális méretű étkezési- és díszhal-kereskedelem utat nyithat a parazita elterjedésének a többi kontinensen is.

2011-ben, egy hazai monitoring program (Bioklíma) során témacsoportunk kimutatta a *T. kitauei* jelenlétét egy Kis-Balatonból gyűjtött kevéssertéjű oligochaetából (*Branchiura sowerbyi*). A féreg által kibocsájtott aurantiactinomoxon típusú aktinospórák 18S rDNS génje 99,4%-os egyezést mutatott a *T. kitauei* azonos génjének nukleotid szekvenciájával. A ParaFishControl-Horizon 2020, Európai Unió által támogatott projekt keretében célzottan vizsgáltuk *T. kitauei* jelenlétét, gyakoriságát, mind a myxospóra, mind az aktinospóra forma után kutatva. Továbbá, molekuláris módszerekkel megkíséreltük alátámasztani Moshu és Molnár (1997) spóra morfológián, illetve faj-, szerv-, és szövetspecifitáson alapuló rendszerezését. A szerzők három különálló *Thelohanellus* fajt neveztek meg a ponty parazitájaként: *T. nikolskii*, *T. hovorkai* és *T. kitauei*. Kizárólag morfológiai alapon további két fajt ismertek el, a *T. acuminatus*-t és a *T. dogieli*-t. A *T. cyprini*-t, és a *T. callisporis*-t a *T. nikolskii* korai alakjának azonosították, megfigyelésük szerint, a faj fiatal pontyokon az úszón jelenik meg, kifejlett példányoknál a pikkelyek csúcsán képez cisztát.

A/3. Célkitűzések

- Bodorka szem szem nyálkaspórák parazitáltságának vizsgálata
- A paduc nyálkaspórák parazitáinak felmérése
- A 2014-es balatoni garda elhullás kapcsán vizsgált nyálkaspórák paraziták azonosítása, és előfordulási gyakorisága egy éves felmérés során.
- A magyarországi sügérfélék *Hennequya* fertőzöttségének vizsgálata
- A balatoni, kis-balatoni és halgazdaságokból származó pontyok *Thelohanellus* fertőzöttsége, diverzitás felmérése.

A/4. Kísérleti rész

Minden fejezet elején összefoglaltam az adott kísérleti fázisra általánosan alkalmazott módszereinket, majd az egyes eltéréseket külön-külön alfejezetben mutatom be.

A/4.1. Anyag és módszer

A/4.1.1. Mintagyűjtés

Egy-egy halfaj nyálkaspórák fertőzöttségének felmérésekor, általánosan jellemző volt, hogy a kifogott halakat, még élő állapotban, oxigénnel dúsított vízben szállítottuk a laboratóriumba. A halak kéméletes előlése után (túlaltatás MS 222-vel vagy szegfűszegolajjal és a nyaki gerincvelő átvágásával történt), a boncolás során teljes parazitológiai vizsgálatot végeztünk, először makroszkóposan, majd mikroszkóppal részletesen megvizsgálva az egyes szerveket, kóros eltérések, ciszták, plazmódiumok jelenléte után kutatva. Ahol plazmódiumot, vagy myxospórát találtunk, natívan felvettük ezek méreteit, majd a spórák egy részét 70 %-os alkoholban tettük el a további molekuláris vizsgálatokhoz, egy másik részüket glicerin-zselatinos fixáló oldatba helyeztük. A későbbi szövettani vizsgálatokhoz a plazmódiumot illetve spórákat tartalmazó szövetrészletet Bouin oldatban rögzítettük.

A/4.1.1.1. A bodorka szem *Myxobolus* fertőzöttsége

Két mintavételi periódusban zajlott a vizsgálat. Az elsőben, 2012-ben és 2013-ban, tavasztól őszig a Balaton három különböző pontjáról [Tihany (46°54'51.5"N 17°53'34.6"E), Keszthely (46°45'15.3"N 17°14'56.5"E) and Balatonszemes (46°48'36.4"N 17°45'55.9"E)], összesen 230 bodorkát (méret: 9-16 cm) gyűjtöttünk. A második mintavétel során, 2017

augusztusában, összesen 47 bodorkát vizsgáltunk, melyeket két különböző helyről gyűjtöttünk [Balatonberény (46°42'54.7"N 17°19'12.6"E) and Balatonboglár (46°46'41.4"N 17°38'37.1"E)]. A bodorkán kívül, minden évben más halfajok több tucatnyi példányát is általános parazitológiai vizsgálatnak vetettük alá, melyek a Balatonban a bodorka mellett általánosan megtalálhatóak (*Cyprinus carpio*, *Abramis brama*, *Blicca bjoerkna*, *Pelecus cultratus*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Alburnus alburnus*, *Aspius aspius*, *Esox lucius*, *Sander lucioperca*, *Anguilla anguilla*).

A halak kifogásakor, még élő állapotban, ellenőriztük a halak szaruhártyáját, és csak a fertőzött egyedeket szállítottuk a laboratóriumba. A 2017-ben gyűjtött bodorkák szeméből eltávolítottuk a plazmódiumokat és elemeztük a bennük lévő spórákat.

A/4.1.1.2. Paduc nyálkaspórák parazitái

Vizsgálatainkhoz a Duna több szakaszáról gyűjtöttünk mintákat (Győr, Surány, Szentendre, Ercsi, Paks). Összesen 27 egyed vizsgáltunk meg, ezek kifejlett, 2-4 éves halak voltak, teljes testhosszuk 18-42 cm között változott. Győrből 8 db, Szentendréről 7 db, Sződligetről és Ercsiből 4-4 db, illetve Surányból és Paksról 2-2 példányt vizsgáltunk. A nyálkaspórák fertőzöttséget laboratóriumi vizsgálat során mértük fel. A halak nagy részét frissen boncoltuk fel, kisebb részüket lefagyasztottuk és a későbbi vizsgálatok előtt kiolvasztottuk. A NÉBIH munkatársainak előzetes eredményei alapján, a felmérés során leginkább a gardák kopolyú és szem fertőzöttségére fordítottunk különös figyelmet, de emellett néhány minta teljeskörű parazitológiai vizsgálatát is elvégeztük.

A/4.1.1.3. Garda nyálkaspórák parazitái

A NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságától kapott 15 moribund garda alapján, témacsoportunk végezte a NÉBIH munkatársai által kimutatott nyálkaspórák paraziták faji szintű meghatározását. A Balaton több pontjáról a mintavételt ezután egy éven át folytattuk, hogy felmérjük a tapasztalt nyálkaspórák fertőzöttség prevalenciáját a tó garda állományában.

2014 szeptembertől decemberig 34 garda mintát gyűjtöttünk (28-33 cm hosszú, kb 3-5 éves egyedeket), melyekből 20-at még frissen dolgoztunk fel, 14-et fagyasztás után, egy évvel később vizsgáltunk meg. 2015-ben márciustól májusig 47, júliustól szeptemberig további 17 gardát tanulmányoztunk.

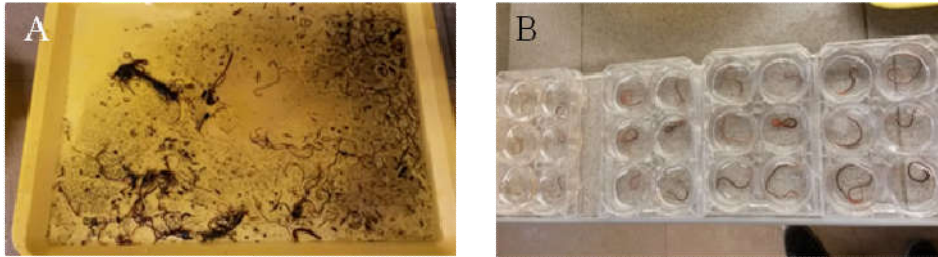
A/4.1.1.4. *Henneguya* fajok vizsgálata

A gazda halak nagy részét Siófoknál gyűjtöttük, a Balaton zsilipjéhez épített hal csapdából, továbbá az elmúlt években, a tó különböző részeiről hálóval is gyűjtöttünk mintákat. Összesen 48 sügért (9-20 cm), 17 süllőt, 7 kősüllőt, 32 vágódurbincset és 8 csukát (33-41 cm) vizsgáltunk meg nyálkaspórák fertőzés után kutatva.

A/4.1.1.5. *Thelohanellus* fajok vizsgálata

2015-2016 során összesen 250 Kis-Balatonból származó, különböző életkorú ponty belének vizsgálata történt meg, amelyek a Balatoni Halászati Nonprofit Zrt. fogásából származtak. A lefagyasztott beleket, hosszanti irányban felvágva, szabad szemmel és tapintással ellenőriztük a teljes szakaszt, óriás ciszták után kutatva. Ahol bármilyen elváltozást tapasztaltunk, mikroszkóppal ellenőriztük a kérdéses területet, és az A/4.1.1. fejezetben már ismertetett módon mintát vettünk további szövettani, illetve molekuláris elemzésekhez. Ezzel párhuzamosan, 2015-2016 között öt alkalommal (Táblázat 10.) gyűjtöttünk oligochaeta mintákat a Kis-Balaton felső iszaprétegéből. Kaparóhálónkkal a

gyűjtés helyszínén a *Branchiura sowerbyi* férgeket az iszaptól kimostuk, mely féreg faj saját korábbi vizsgálatunk alapján a *T. kitauei* oligochaeta gazdája (Zhao et al. 2016), és ezeket Yokoyama és munkatársai (1991) által alkalmazott módszer szerint egyesével, 6-os plate-eken helyeztük el, kevés klórmentes csapvízzel (8. ábra/A-B). A kigyűjtött férgeket 3-7 napig szobahőmérsékleten tartottuk (25 °C) és Zeiss Treval 3 inverz mikroszkóppal rendszeresen ellenőriztük, hogy bocsátottak-e ki aktinospórákat a vízbe. A két év alatt összesen 598 *B. sowerbyi*-t gyűjtöttünk, és vizsgáltunk meg a fenti módszerrel. Az aktinospórák morfológiai adatait rögzítettük Özer & Wootten (2002), Lom & Dyková (2006) és Yokoyama et al. (2012) javaslatai alapján. A spórák egy részét 70%-os etanolban a molekuláris vizsgálatokhoz használtuk fel, a másik részükkel fertőzési kísérletet állítottunk össze.



8. ábra: (A) Iszapmintából *B. sowerbyi* válogatás tálcán, (B) A kiválogatott oligochaeták egyesével a 6-os plate-n

A 7 nap eltelével, a nyálkaspórák fertőzőtséget mutató oligochaetákat egyesével, 100 ml-es műanyag edényekbe helyeztük. Az edényekbe 2 cm vastagon sterilizált iszapot tettünk és klórmentes csapvízzel töltöttük fel (9. ábra). Folyamatos levegőztetés mellett heti kétszer kereskedelmi forgalomban kapható, haltáp granulátummal (Perla Larva, Skretting Italia Spa, Olaszország) biztosítottuk a tápanyagbevitelt. Az így összeállított tárolórendszert 18-24°C közti hőmérsékleten tartottuk, és hetente továbbra is ellenőriztük a vizet, aktinospórák jelenlétére.



9. ábra: *Branchiura sowerbyi* tartóedények, iszappal, levegőztetéssel

A/4.1.2. Morfológiai és szövettani vizsgálatok

A morfológiai és szövettani vizsgálatokat a Molnár és munkatársai (2010) által közölt módon végeztük: A plazmódiumot tartalmazó fertőzött szöveteket először Bouin-oldatban (71% telített pikrinsav-oldat, 24% tömény formalinoldat és 5% jégecet) fixáltuk, alkoholos mosás (80% etanol), majd paraffinba ágyazás után 4-5 µm vastagságú szeleteket vágunk, melyeket hematoxin-eozinnal festettünk meg. A spórák életképességét 0,4%-os urea oldattal ellenőriztük, ha az így kezelt spórák legalább 90%-a kilőtte a poláris fonálait, akkor a plazmódiumot éretnek tekintettük. A fixálatlan spórákat Olympus BH2 mikroszkóppal vizsgáltuk, Nomarski interferencia kontraszt optikával. A fotókat Olympus DP 20 digitális kamerával készítettük. A morfológiai méréseket Lom és Arthur 1989-es cikke alapján végeztük.

A/4.1.3. Fertőzési kísérlet - *Thelohanellus*

Összesen 180 db parazita mentes, SPF (Specified pathogen free, meghatározott patogéntól mentes) ponty (*Cyprinus carpio*) ivadékot (< 1 év) fertőztünk az aktinospórákkal (Ábra 10). Tizennégy kísérleti és egy kontrol csoportot állítottunk össze, mindegyikben 12-12 ivadékot behelyezve egy folyamatosan levegőztetett, 15 literes akváriumba. A kísérleti csoportokat különböző, *Branchiura*-k által kibocsátott aktinospórákkal fertőztük, a kontrol csoportot nem fertőztük. A halakat szoba hőmérsékleten tartottuk 7-23 hónapon keresztül, és naponta egyszer haltáppal etettük (Perla Larva, Skretting Italia Spa, Olaszország). Nem egyenletesen, de átlagosan havonta egy halat vizsgáltunk meg az egyes csoportokból, kíméletes elölés után felboncoltuk, és mikroszkóp segítségével felderítettük az esetlegesen jelen lévő spórákat, plazmódiumokat. A morfológiai adatok rögzítése után, ezeket 80%-os etanolban molekuláris meghatározáshoz tettük félre.



10. ábra: A *B. sowerbyi*-k által eresztett aktinospórákkal végzett fertőzési kísérlet ponty ivadékon

A/4.1.4. Molekuláris vizsgálatok

Az alkoholban fixált spórákból a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével elvégeztük a DNS kivonást. A mintákat 10.000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, majd eltávolítottuk az alkoholos felülúszót. A maradék alkohol eltávolításához 30 percig vákuumcentrifugát használtunk. Ezt követően a száraz spóra-pelletet a gyártó utasításai szerint dolgoztuk fel. Lizis pufferral és proteináz K-val homogenizáltuk, majd a különböző lépéseket követően végül 100 µl oldatban eluáltuk az oszlopról a kivont DNS-t. A 18S rRNS gén egy szakaszának amplifikálását nested PCR reakcióval végeztük. Első körben univerzális eukarióta primereket (ERIB1, ERIB10) használtunk. A primerek szekvenciái a 2. táblázatban találhatóak. A 25 µl-es reakcióelegy az alábbiakat tartalmazta: 14,4 µl nukleáz mentes víz, 2,5 µl 10× DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, Vilnius, Litvánia), 0,1 µl DreamTaq polimeráz (1U, Thermo Scientific), 0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 0,5 µl az egyes primerekből (32,5 µM) és 2 µl kivont DNS, a reakció végtérfogata 25 µl. Az alábbi hőprofil alkalmaztuk a kívánt szakasz felerősítéséhez:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95°C	3 perc	1×
Denaturáció	95°C	1 perc	
Annelláció	55°C	1 perc	40×
Elongáció	72°C	2 perc	
Végső elongáció	72°C	7 perc	1×

Ezt követte a második kör PCR, ahol Myxozoa-specifikus primerekkel (Myx1F, SphR; Hallett & Diamant, 2001; Eszterbauer & Székely, 2004) erősítettük fel az előző reakció végén kapott általános 18S rDNS szakaszt, kizárva így az esetleges kontaminációt a hal, vagy az oligochaeta genomból. A reakcióelegy 50 µl végtérfogatra vonatkoztatva az alábbiakat tartalmazta: 31,8 µl nukleáz-mentes víz, 5 µl 10× DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific), 0,2 µl DreamTaq polimeráz (2U, Thermo Scientific), 0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 1-1 µl a myxozoa specifikus primerekből (32,5 µM) és 1 µl az első körös PCR termékből. A második amplifikációhoz az alábbi hőprofil alkalmaztuk:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95°C	3 perc	1×
Denaturáció	95°C	50 másodperc	
Annelláció	50°C	50 másodperc	35×
Elongáció	72°C	1 perc 40 másodperc	
Végző elongáció	72°C	7 perc	1×

A második körös PCR termékek megjelenítéséhez agaróz gélelektroforézist használtunk. A mintákat 1,0 % -os, 0,24 µg/ml etídium bromidot tartalmazó agaróz gélen 1 % -os TAE pufferben (Tris-acetát-EDTA) 100mV-on futtattuk meg, majd Kodak digitális kamera és Kodak Digital Science 1D 3.0.2. program segítségével képet készítettünk a 302 nm hullámhosszú UV fényvel átvilágított gélről. Molekulasúly markerként a GeneRuler 100 bp Plus DNS létrát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) használtuk. A kívánt méretű (~1600 bp) terméket ezután különböző kitek segítségével kitisztítottuk a PCR elegyből az EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic INC., Kanada) segítségével vagy az agaróz gélből a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) segítségével, ha aspecifikus fragmentek is jelen voltak. A tisztított termék DNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) segítségével megmértük, majd a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) segítségével összeállítottuk a szekvenálási reakciót: 1 µl BigDye enzim, 2 µl BigDye 3.1 Buffer, 1 µl primer (32,5 µM), víz és a tisztított PCR termék. A reakciót úgy állítottuk be, hogy a tisztított termék DNS tartalma 50-100 ng/µl között legyen, illetve a reakció végtérfogatát 10 µl legyen. A gyártó utasításai alapján az alábbi hőprofil alkalmaztuk:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	96°C	1 perc	1×
Denaturáció	96°C	10 másodperc	
Annelláció	50°C	5 másodperc	25×
Elongáció	60°C	4 perc	

A terméket ezután Na-acetátos-etanolos kicsapással tisztítottuk, majd Szegeden az MTA SZBK Szekvenáló Platformnál, ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végezték el a minták szekvenálási sorrendjének leolvasását. A kiértékelést a kapott kromatogramok alapján a BioEdit és MEGA 5.2 programcsomaggal végeztük. A manuális szekvenálási javítás után az átfedő szakaszok pozicionális illesztésével összeállítottuk a vizsgált minta 18S rRNS génjének egy kb. 1600 bp hosszú darabját. Ezt összehasonlítottuk a BLAST program segítségével, a génbanki adatokkal, majd a CLUSTAL W (Thompson et al 1994) szoftverrel a megfelelő pozíciókba rendeztük a szekvenciákat. A páronkénti hasonlósági értékeket a MEGA 5.2 szoftver Maximum Composite Likelihood modelljével számítottuk ki. A

filogenetikai értékelést Maximum Likelihood (ML) módszerrel végeztük. Az adatsor elemzéséhez az Akaike Information Criteria (AIC) által meghatározott, legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modellt a MEGA 5.2 program segítségével határoztuk meg. A ML fa topológia támogatottságát bootstrap értékekkel ellenőriztük, melyeket 1000 újramintavételezés alapján határoztunk meg.

2. táblázat: A PCR reakciók és a szekvenálás során használt primerek szekvenciái

Primer	Szekvencia	Alkalmazás	Referencia
ERIB 1	5'- ACCTGGTTGATCCTGCCAG - 3'	PCR 1. kör	Barta et al. 1997
ERIB 10	5'- CTTCCGCAGGTTACCTACGG - 3'	PCR 1. kör	Barta et al. 1997
Myx1F	5' – GTGAGACTGCGGACGGCTCAG – 3'	PCR 2. kör	Hallett & Diamant, 2001
SphR	5' – GTTACCATTGTAGCGCGCGT – 3'	PCR 2. kör és szekvenálás	Eszterbauer & Székely, 2004
ACT1fr	5' – TTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCC – 3'	szekvenálás	Hallett & Diamant, 2001
MC5	5' – CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA – 3'	szekvenálás	Molnár et al. 2002
MC3	5' – GATTAGCCTGACAGATCACTCCACA – 3'	szekvenálás	Molnár et al. 2002
MB5	5' – ACCGCTCCTGTTAATCATCACC – 3'	szekvenálás	Eszterbauer, 2004
MB3	5' – GATGATTAACAGGAGCGGTTGG – 3'	szekvenálás	Eszterbauer, 2004

A/4.1.4.1. Bodorka szem molekuláris vizsgálata

A filogenetikai elemzéshez kulcsoportnak a *Myxobolus cerebralis*-t (Hofer, 1903) választottuk. Az ML fa elkészítéséhez a az adatokhoz legjobban illeszkedő szubsztitúciós model a GTR+G+I (General Time Reversible model + Gamma distribution + Invariant sites) volt.

A/4.1.4.2. Paduc nyálkaspórák paraziták

A filogenetikai értékelést Maximum Likelihood (ML) és Bayesian Inference (BI) módszerrel is elvégeztük, a pontosabb eredmény érdekében, kulcsoportnak mindkét esetben a *Ceratonova shasta*-t (Noble, 1950) választottuk. Az adatsor elemzéséhez az Akaike Information Criteria (AIC) által meghatározott, legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós model a GTR+G+I volt. A Bayesian Inference számításokat a Topali 2.5 szoftverrel (Milne et al 2004) végeztük MrBayes algoritmussal (Ronquist és Huelsenbeck, 2001). A program itt is meghatározta a legjobban illeszkedő szubsztitúciós modellt, ami szintén a GTR+G+I-nek adódott. A Bayesian fa készítéséhez és a posterior probability (pp) érték becsléséhez MCMCMC (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo) analízist futtatunk 1000000 generáción keresztül, a mintavételi sűrűség 100 volt, a „burn in”-t 25 %-ra állítottuk, 2 független futtatást végeztünk.

A/4.1.4.3. Garda nyálkaspórák parazitái

A szekvenálás során nem minden primer adott kielégítő eredményt, így továbbiakat is felhasználtunk, melyeket a 3. táblázatban ismertettek:

3. táblázat: Kiegészítő primerek a szekvenáláshoz

Primer	Szekvencia (5'- 3')	Alkalmazás	Referencia
CR1 R	GAT YAG ATA CCG TCS TAG T	szekvenálás	Székely et al. (2015)
CR1 F	CGA AGA CGA TCA GAT ACC GTC CTA	szekvenálás	Székely et al. (2015)
NSF573/19	CGC GGT AAT TCC AGC TCC A	szekvenálás	Li et al. (2013)
1700 Rv	GGC ATC ACW GAC CTG YTA T	szekvenálás	Dyková et al. (2008) alapján

A kapott szekvenciákból az A/4.1.4. fejezetben ismertetett módon készítettük el a konszenzus 18S rDNS szekvenciát, és végeztük el a hasonlóságkeresést. A filogenetikai elemzést Maximum Likelihood (ML) és Bayesian inference (BI) modellek alapján készítettük el, a *Ceratonova shasta*-t (Noble, 1950) választva kulcsoportként. Az Akaike Information Criterion (AIC) alapján a leginkább megfelelő nukleotid szubsztitúciós model a GTR+G+I volt. A Bayesian Inference számításokhoz a legjobban illeszkedő model a GTR+G volt, az egyéb beállítások megegyeztek az A/4.1.4.2 fejezetben ismertetett értékekkel.

A/4.1.4.4. *Henneguya* fajok vizsgálata

A filogenetikai analízist a Maximum Likelihood modellel készítettük el, ahol a *Ceratonova shasta*-t (Noble 1950) választottuk kulcsoportnak. Az Akaike Information Criterion (AIC) által legmegfelelőbb model a GTR+G+I volt.

A/4.1.4.5. *Thelohanellus* fajok vizsgálata

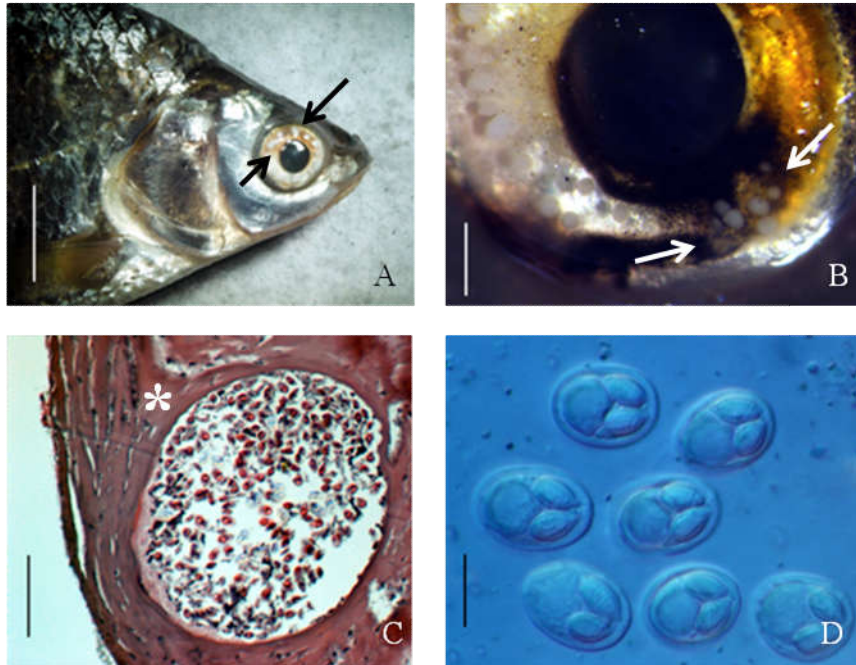
Az aktinospórákból és a myxospórákból is meghatároztuk a 18S rDNS szekvenciákat. A filogenetikai elemzéshez a *Thelohanellus nikolskii*-t (Achmerov 1955) választottuk kulcsoportnak. Maximum Likelihood elemzéshez, (Akaike Information Criterion) AIC alapján a legjobban illeszkedő filogenetikai modelt a K2+G+I volt.

A/4.2. Eredmények

A/4.2.1. Bodorka szem vizsgálata

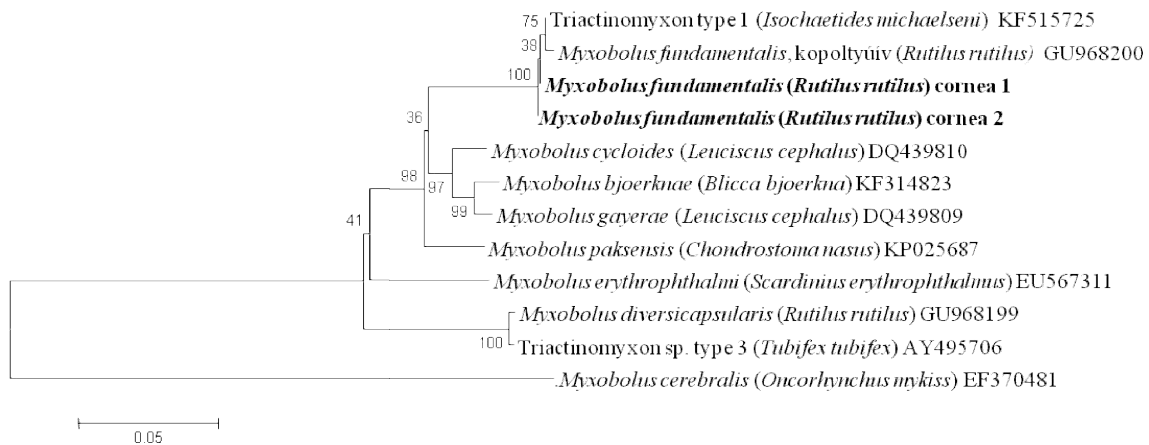
A több halfaj bevonásával végzett felmérés során szemet érintő parazitás fertőzöttséget csak a bodorkák esetében találtunk. Az első mintavételi periódusban a vizsgált 230 bodorkából, csak 3 volt fertőzött (1,3 %), melyekből összesen 5 plazmódiumot mutattunk ki. A fertőzött egyedeket különböző hónapokban (április, szeptember, november), a Balaton eltérő részeiről gyűjtöttük. A 2017. augusztusi mintavétel során jóval nagyobb fertőzöttséget találtunk. A vizsgált 47 bodorkából összesen 9 hal szeme volt fertőzött 1-7 plazmódiummal (19,1 %). A fertőzött halak megoszlása hasonló volt a két mintavételi helyen (Balatonberény: 3/20, 15%; Balatonboglár: 6/27, 22%). Fertőzött halakat egyaránt találtunk a fiatalabb (9-12 cm, 1+ éves) és idősebb (14-16 cm, 2+ és 3+ éves) korosztályban is. A plazmódiumok elhelyezkedése mind a pupillához közeli, mind a szaruhártya perifériás régiójában

megfigyelhető volt (11. ábra/A, B). A lencse alakú ciszták látszólag a szaruhártya felszíni régiójában helyezkedtek el, de a szövettani metszetek tanulmányozása során egyértelművé vált, hogy a plazmódiumok gömb alakúak, átmérőjük 150-500 μm , és mélyebben, a szaruhártya többrétegű, tömötrostos kötőszövetében helyezkednek el (11. ábra/C). A plazmódiumok mindegyike érett spórát tartalmazott (11. ábra/D). A plazmódiumokból gyűjtött spórák alakja és mérete megegyezett a *M. fundamentalis*-szal (Molnár et al. 2010).



11. ábra: *M. fundamentalis* plazmódiumaival fertőzött bodorka szem (A-B). (A) Dr. Csaba György felvétele, a plazmódiumok nyilakkal jelölve, méretarány: 1,5 cm. (B) Natív, sztereomikroszkópos felvétel, a plazmódiumok nyilakkal jelölve, méretarány: 1 mm. (C) Plazmódium a szaruhártya tömötrostos kötőszövetében (*). A sérült epitélium már több helyen lehámlott. Hematoxilin-eozin festés, méretarány: 50 μm . (D) A kiszabadított *M. fundamentalis* spórák a szaruhártya plazmódiumából. Natív felvétel, méretarány: 10 μm .

Két plazmódiumból gyűjtött spóra minta molekuláris elemzése során, egy több mint 1625 bp hosszú szakaszt sikerült felszaporítani fészkes (nested) PCR-el a 18S rDNS génből. A két minta egymással 100%-os azonosságot mutatott, és 99,9%-ban egyezett meg a fent említett *M. fundamentalis*-szal, amit korábban a bodorka kopolyúívének kötőszövetes állományából írtak le és töltötték fel a szekvenciát a Génbankba (Molnár et al. 2010; GU968200). Továbbá, szintén 99,9%-os egyezést mutatott a *Triactinomyxon* 1-es típusú aktinospóra 18S rDNS szekvenciájával, amit az *Isochaetides michaelsoni* oligochaetából gyűjtöttek (Székely et al. 2014) (12. ábra).



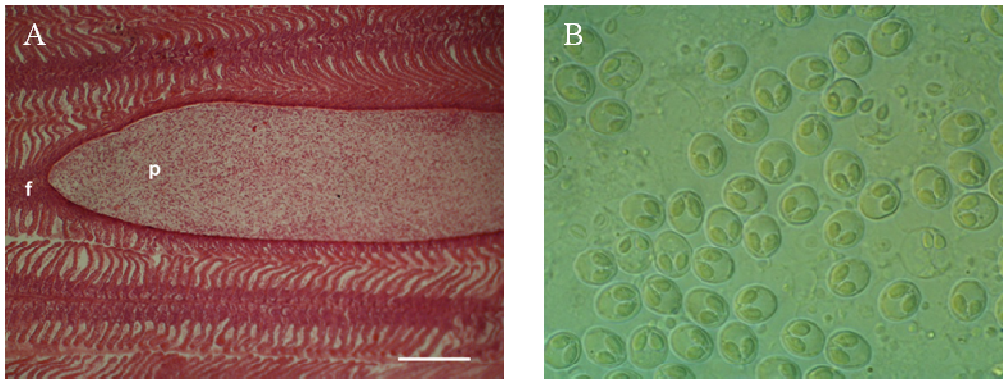
12. ábra: A bodorka (*Rutilus rutilus*) szemből izolált spóra filogenetikai helyzete a 18S rDNS alapján, Maximum Likelihood, GTR+G+I modellel készítve. Kulcsoportnak a *M. cerebrealis*-t használtuk, a bootstrap értékeket az elágazásoknál tüntettük fel. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült száma

A/4.2.2. Paduc nyálkaspórák parazitái

A boncolás során 27-ből 12 hal volt fertőzött valamely *Myxobolus* fajjal. A vizsgált paducokból három eltérő lokációban fejlődő plazmódiumot mutattunk ki. A további spóra morfológiai és molekuláris vizsgálatok megerősítették a kezdeti feltételezést, miszerint új fajokkal állunk szemben. A részletes morfológiai eredmények és szekvenciák elérési helyét adó génbanki referenciák a 4. táblázatban találhatóak.

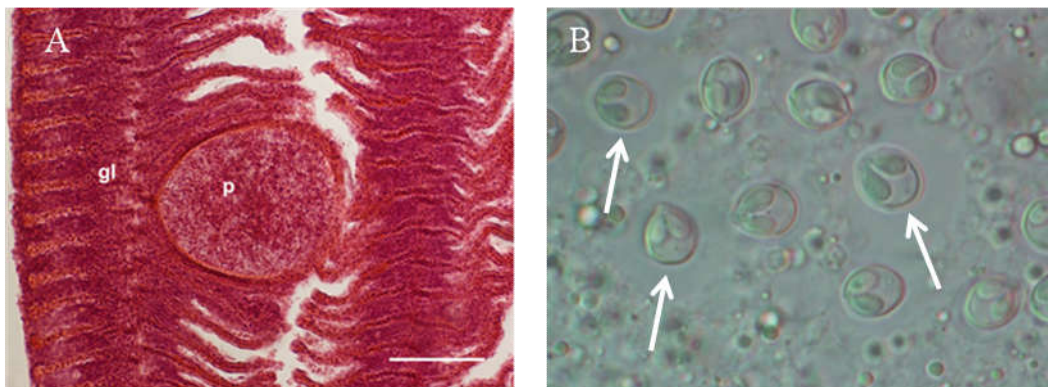
A három különböző lokációban előforduló plazmódiumokból összesen tíz spóra mintát elemeztünk az ismertett molekuláris módszerekkel. Mindegyik esetében sikerült a 18S rDNS gén 1600-1700 bp körüli szakaszát meghatározni. A tíz minta szekvencia eredménye alátámasztotta a morfológiai adatokat, miszerint 3 különböző *Myxobolus* fajt sikerült azonosítani a 27 vizsgált halból. Az ML és BI elemzések közel azonos filogenetikai topológiát adtak eredményül. Egyedül a *M. sitjae* Cech et al. 2012 elhelyezkedése volt vitatott, de a három új faj filogenetikai helyzete mindkét fán megegyezett. Mindhárom spóra típus morfológiailag és molekulárisan is különbözött a közel rokon halfajok hasonló parazitáitól, így ezek a paduc eddig le nem írt, új parazitáinak tekinthetőek. Sajnos az összehasonlításhoz nem állt rendelkezésre szekvencia adat a szintén paduc parazita *M. chondrostomi*-ből. Donec és Shulman (1984) néhány, elsődlegesen más halfajokból leírt nyálkaspórák (*M. bliccae*, *M. bramae*, *M. dispar* és *M. macrocapsularis*) előfordulásáról említést tett paducon is, ezeket szintén feltüntettük a filogenetikai fán, de a számított hasonlósági %-ok alapján egyikük szekvenciája sem egyezik meg a jelen tanulmányban vizsgált három új fajéval.

A *Myxobolus arrabonensis* n. sp. a kopoltyúlemez artériájában képzett nagyméretű plazmódiumot, melyben kisméretű, ellipszoid spórákat találtunk (13., 16. ábra). Négy hal kopoltyú lemezéből gyűjtött spórák szekvenciái egymással 100%-os egyezést mutattak. A hozzájuk leghasonlóbb nyálkaspórák paraziták a *M. sommervillae* (GU968202, 98,5%), *M. bramae* (AF507968, 98,4%), *M. muelleri* (DQ439806, 98,4%) és *M. bliccae* (HM138771, 98,1%) voltak. A köztük lévő 1,5-1,9%-os 18S rDNS szekvencia különbség indokolja, hogy a *M. arrabonensis*-t új fajnak tekintjük (17. ábra).



13. ábra: (A) *M. arrabonensis* nagyméretű plazmódiuma (p) a kopoltyú filamentumban (f). A feltüntetett méretarány 100 μm -nek felel meg. (B) A plazmódiumból kiszabadított myxospórák

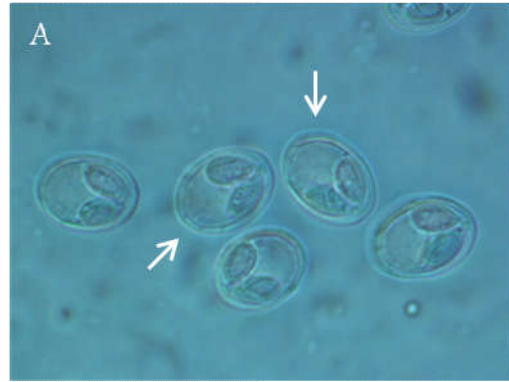
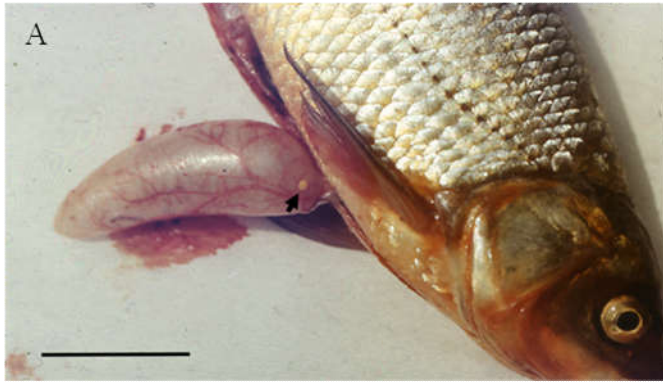
A *Myxobolus szentendrensis* n.sp. plazmódiumát a kopoltyúlemezkén belül képzett kisméretű plazmódiumot, a kiszabadított spórák morfológiailag a bodorka parazita *M. intimus* spóraformájára hasonlítottak (14., 16. ábra).



14. ábra: (A) *M. szentendrensis* kisméretű plazmódiuma (p) a kopoltyú redőben (gl). A feltüntetett méretarány 60 μm . (B) A plazmódiumból kiszabadított spórák (→)

Három különböző, *M. szentendrensis*-nek azonosított spóra, nukleotid szekvenciáját tekintve is azonosnak bizonyult. A génbanki adatok alapján a hozzá leghasonlóbb nyálkaspórák a *Myxobolus* sp. Hungary EE-2003 (AY325283) volt, 96,6 %-os egyezést mutatva. További hasonló paraziták voltak még a *M. intimus* (96,3%; AY325285 és FJ716098), *M. eirasianus* (96,2%; JF311900) és *M. obesus* (96,4% AY325286). A morfológiai hasonlóság ellenére, a több, mint 3%-os nukleotid szekvencia különbség miatt, a *M. szentendrensis* új fajnak tekinthető (17. ábra).

A *Myxobolus paksensis* n. sp. nagyméretű ellipszoid alakú spórái kör alakú plazmódiumot képeztek a paduc úszóhólyagjának felszínén (15., 16. ábra).

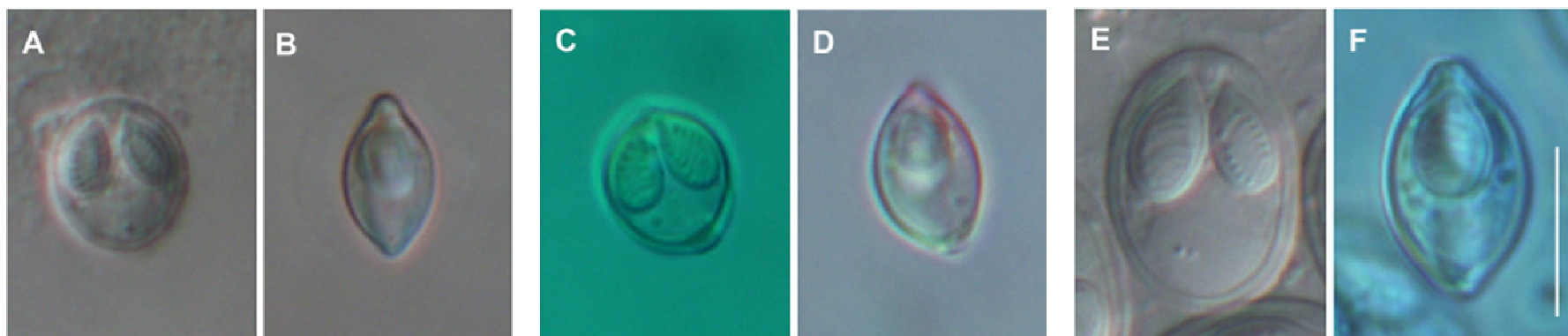


15. ábra: (A) Fekete nyíllal jelölve a *M. paksensis* által képzett plazmódium a paduc úszóhólyagján. A feltüntetett méretarány 5 cm-nek felel meg. (B) A plazmódiumból kiszabadított spórák (→)

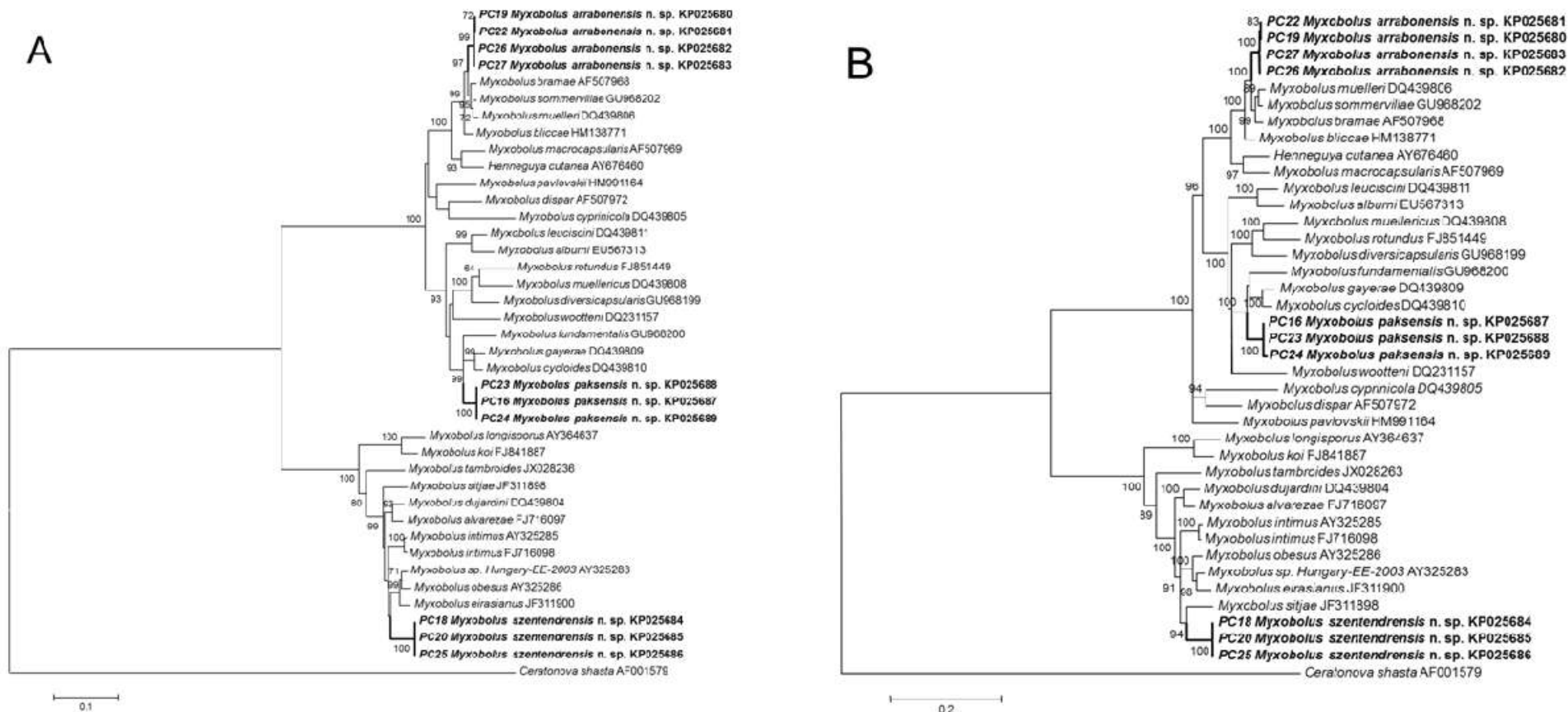
Három különböző hal úszóhólyagjáról gyűjtött spóraminta 18S rDNS szekvencia alapján 100%-os egyezést mutatott. Hozzájuk leghasonlóbbak a génbanki adatok alapján a *M. cycloides* (DQ439810, 96,8%), *M. gayerae* (DQ439809, 96,7%) és *M. fundamentalis* (GU968200, 95,5%). Ebben az esetben is, a szekvencia különbség mértéke igazolta, hogy a vizsgált spórák új fajhoz tartoznak (17. ábra).

4. táblázat: A paducból kimutatott három új faj morfológiai adatai, és a részleges 18S rDNS szekvenciákat tartalmazó génbanki azonosító számok

Faj név	Lokáció	Prevalencia	Spóra hossz (µm)	Spóra szélesség (µm)	Spóra vastagság (µm)	Sarki tokok száma	Sarki tok alakja	Sarki tok hossza (µm)	Sarki tok szélessége (µm)	Génbanki referencia szám
<i>M. arrabonensis</i> (Győr, Szentendre, Surány, Sződliget)	kopoltyú lemez artéria	15 % (4/27)	8,7 ± 0,61 (50 minta)	7,8 ± 0,34 (50 minta)	5,4 – 5,6 (5,5) (12 minta)	2	csepp alakú, közel azonos méretű	4,8 ± 0,44 (50 minta)	2,9 ± 0,12 (50 minta)	KP025680-83
<i>M. szentendrensis</i> (Szentendre, Surány, Győr)	kopoltyú-lemezkén belül	18 % (5/27)	9,2 ± 0,34 (50 minta)	7,9 ± 0,74 (50 minta)	6,4 – 7,1 (6,7) (11 minta)	2	csepp alakú, azonos méretű	5,3 ± 0,29 (50 minta)	3,0 ± 0,17 (50 minta)	KP025684-86
<i>M. paksensis</i> (Paks, Győr, Szentendre)	úszóhólyag felszíne	11 % (3/27)	14,8 ± 0,62 (50 minta)	11,0 ± 0,68 (50 minta)	8,4 – 9,2 (8,7) (14 minta)	2	csepp alakú, azonos méretű	7,0 ± 0,39 (50 minta)	4,3 ± 0,21 (50 minta)	KP025687-89



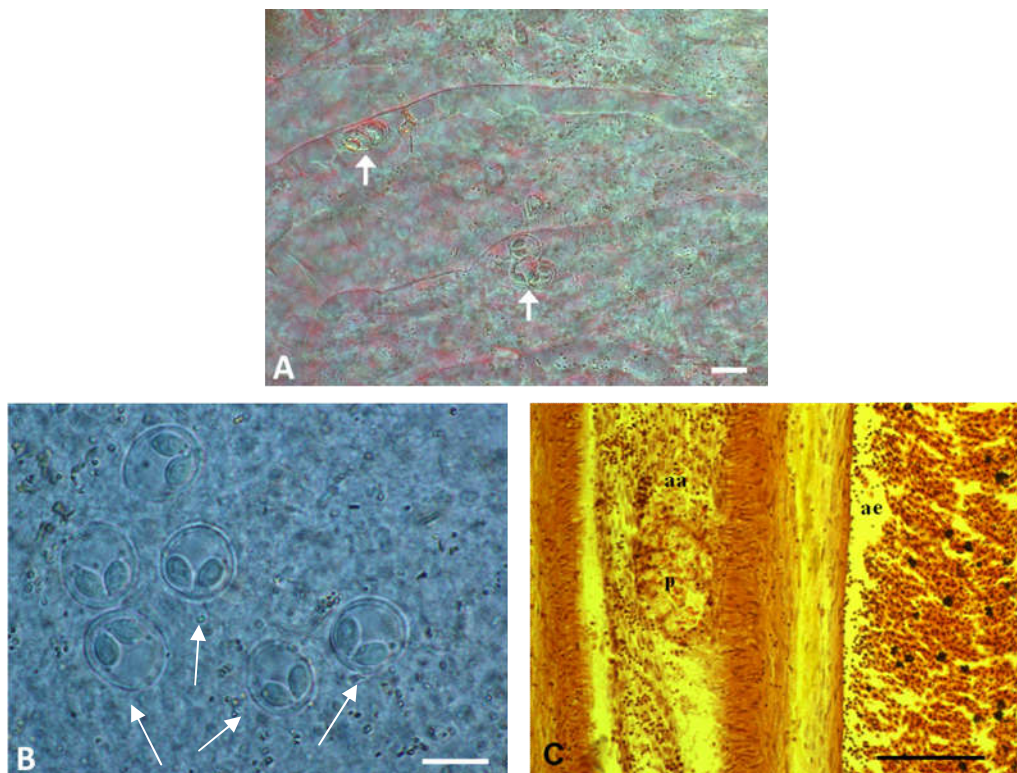
16. ábra: A paducból kimutatott három nyálkaspórák faj mikroszkópos képe, elől- és oldalnézetből. A-B: *M. arrabonensis*, C-D: *M. szentendrensis*, E-F: *M. paksensis*. A feltüntetett méretarány 10 µm-nek felel meg



17. ábra: Paducból kimutatott új *Myxobolus* fajok filogenetikai helyzete a 18S rDNS szekvencia alapján Maximum Likelihood (A) és Bayesian Inference (B) algoritmusokkal vizsgálva. Kulcsoportnak mindkét esetben a *Ceratonova shasta*-t választottuk. A bootstrap (A, 70 % fölött) és a posterior probability (B, >0,7) értékeket az elágazásoknál tüntettük fel. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült számát jelöli

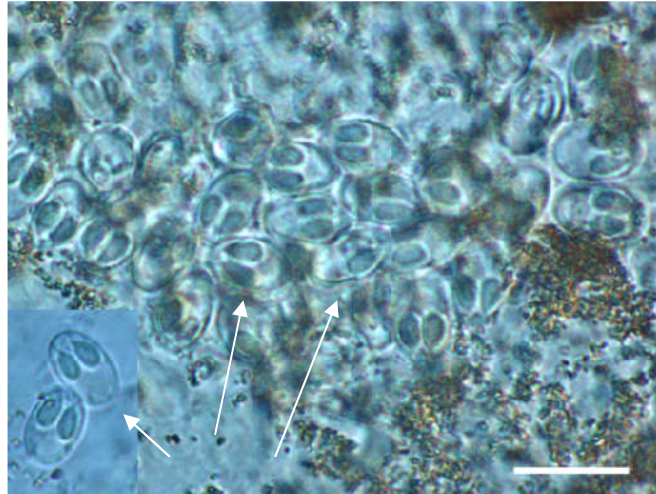
A/4.2.3. Garda nyálkaspórák parazitái

A 2014 nyarán történt gardaelhullás során a moribund gardák és friss tetemek legszembetűnőbb külső tünete az exophthalmia (kidülledő szemek) és a szem bevézése volt. A laboratóriumi vizsgálat a kopoltyúk duzzanatát és vérbőségét mutatta ki, emellett ezeken vastag nyálkaréteg is megtalálható volt. Az üres bélben lévő epitél sejtekre szintén vérbőség volt jellemző. A szemben az írisz megnagyobbodott, és szabad vörösvérsejtek voltak kimutathatóak az üvegtestben. Tizenöt moribund garda parazitológiai vizsgálata során két új *Myxobolus* fajt mutattunk ki. Négy egyedben a kopoltyúredők ereiben kerekded spórákat detektáltunk, melyek a porcos kopoltyúívben futó arteria afferensben megtalált plazmódiumból juthattak az érhálózatba (18. ábra).



18. ábra: (A-B): gardából kimutatott *M. pelecis* spórák a kopoltyúredők ereiben (→), a méretarány 10 μm . (C): A kopoltyúív artéria afferensében (aa) detektált plazmódium (p). A méretarány itt 100 μm -nek felel meg

Két egyed esetében elliptikus spórákat fedeztünk fel a szem retinarétegében, de ez esetben plazmódiumokat nem sikerült kimutatni. Ezek a megnyúlt, elliptikus spórák, melyeket *M. cultrati*-ként írtunk le, a retina réteg pigmentált sejtjei közt nagy csomókban helyezkedtek el (19. ábra). Más szervekből nem mutattunk ki nyálkaspórák fertőzöttséget.



19. ábra: A garda retina rétegéből kimutatott *M. cultrati* elliptikus spórái (→). A feltüntetett méretarány 10 µm-nek felel meg

Az elhullást követően, 2014 őszén vizsgált 20 gardából 10-ben mutattunk ki szórványosan jelenlévő *M. peleci* spórákat a kopoltyú lemezekben, *M. cultrati* spórákat nem detektáltunk. A 2015 márciusában vizsgált 28 gardából kettőben tudtunk szintén szórványosan előforduló spórákat kimutatni a kopoltyú lemezekből. Ugyanakkor májusban, a 19 vizsgált gardából 15 volt fertőzött *M. peleci* spórákkal a kopoltyú lemezekben és a kopoltyúív artéria afferensében, ahonnan három esetben az érett *M. peleci* spórákat tartalmazó plazmódiumot is ki tudtuk mutatni. A plazmódiumok az artéria afferens falában a laza rostos kötőszövetben helyezkedtek el, közel a kopoltyúlemez alapjához (18. ábra/C). A 2014-es szövettani metszetek újra-átnézésekor két esetben ott is hasonló plazmódiumot sikerült megfigyelni. 2015-ben a késő nyári hónapokban a 17 vizsgált gardából 12-ben újra ki tudtuk mutatni a *M. peleci* spórákat a kopoltyú lemezekből, és a kopoltyúívben futó artériákból. Ezekben az egyedekben plazmódiumot nem találtunk, de két halban a kopoltyú artériák körül előregedett spórák konglomerátumait, ún. pszeudocisztákat figyeltünk meg.

A 2014-ben lefagyasztott 14 garda mintát kiolvastottuk, hogy a plazmódium fejlődést jobban tanulmányozhassuk. Nyolc halban találtunk szétszórtan spórákat a kopoltyú lemezekben, és mindegyikben megtalálhatóak voltak szabad spórák az artéria afferensben. Továbbá *M. peleci* előregedett spóráit találtuk meg pszeudocisztákban a kopoltyúívben. *M. cultrati* spórák csak egy esetben voltak jelen. Sem az izomból, sem a májból nem tudtunk *Myxobolus* spórákat kimutatni, habár a vesében, a melanomakrofág centrumokban néhány sérült spórát fedeztünk fel, melyek mérete és alakja megegyezett a kopoltyúban talált *M. peleci* spórákkal. A mintavételi eredmények összefoglalása az 5. táblázatban található.

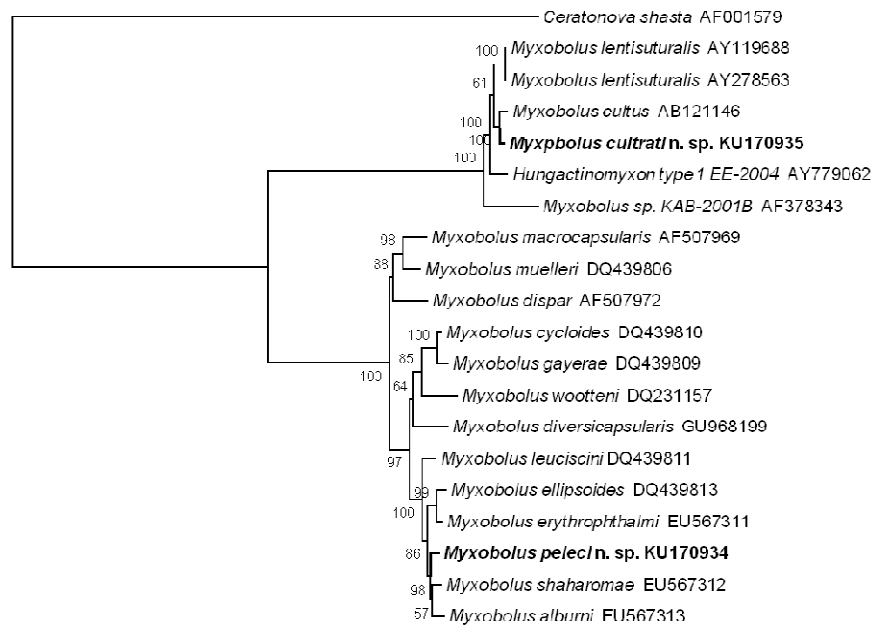
5. táblázat: A 2014 júniusában elhullott vagy moribund gardák nyálkaspóra fertőzöttsége (félkövér betűtípus) és a további egy évben, célzottan vizsgált gardákon előforduló fertőzöttség gyakorisága, és az eredmények összesítése

Év	Hónap	Vizsgált garda egyedek száma	<i>M. pelecii</i> n. sp. –vel fertőzöttek száma	<i>M. pelecii</i> n. sp. fertőzéskor plazmódiu mot tartalmazó egyedek száma	Kiszabadult <i>M. pelecii</i> n. sp. spórák a kopoltyúívben	<i>M. cultrati</i> n. sp. spórával fertőzött garda egyedek száma
2014	Június	15	4	2		2
	Szeptember–December	20	10			
	Szeptember–December (fagyasztott minták)	14	8		8	1
2015	Március	28	2			
	Május	19	15	6		
	Július–Szeptember	17	12		2	
Összesen		113	51	8	10	3

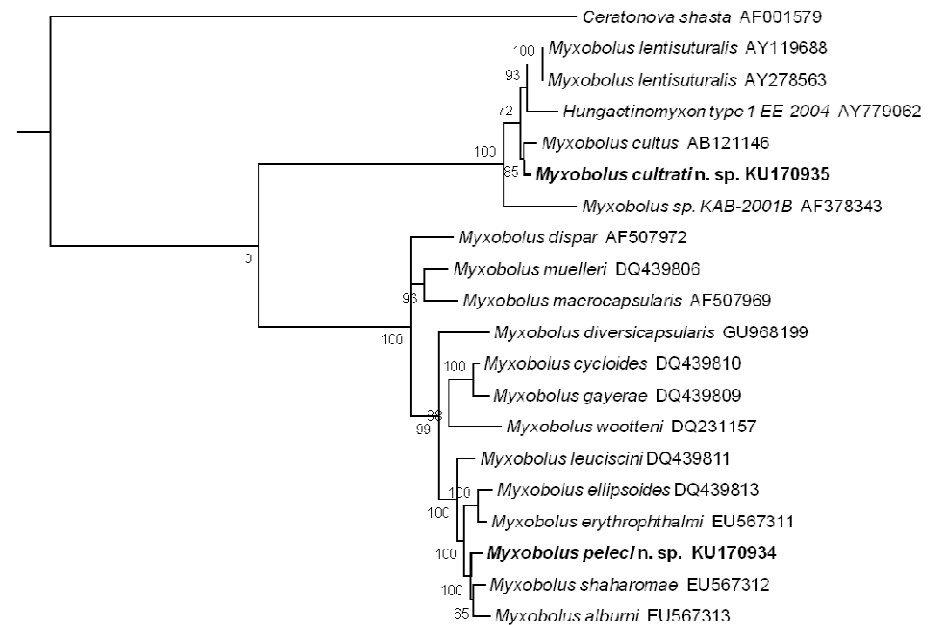
A morfológiai és molekuláris biológiai eredmények alapján, a kopoltyúban és a szemben talált *Myxobolus* fajok, eddig le nem írt, új fajnak tekinthetőek. Morfológiai méréseken és szövettani eredményeken alapuló adataikat a 6. táblázat foglalja össze. A részleges 18S rDNS szekvenciák a megadott génbanki azonosítókhoz elérhetőek. A két faj rokonsági viszonyait a Maximum Likelihood és Bayesian Inference algoritmusok alapján az 20. ábra/A-B-n ábrázoltam. A *M. pelecii* (KU170934) legnagyobb hasonlóságot (96,5%) a szélhajtó kűsz egyik nyálkaspórával, a *M. alburni*-vel mutatta, mely az úszósugarak kötőszövetét fertőzi. A *M. cultrati* (KU170935) 18S rDNS szekvenciája nem mutatott hasonlóságot egyik magyar cyprinida halat fertőző *Myxobolus* fajjal sem, legközelebbi kapcsolatot egy távol-keleti pontyparazitával, a *M. cultus* aktinospóra szekvenciájával mutatta (AB121146, 97,4%), illetve a *M. lentisuturalis*-al, az ezüstkárársz és az aranyhal parazitájához hasonlított (Dyková et al. 2002, AY278563, AY119688, 96,1%).

6. táblázat: A gardából kimutatott két új nyálkaspóras faj morfológiai adatai, és a 18S rDNS szekvenciákat tartalmazó génbanki azonosító számok

Faj név	Lokáció	Prevalencia	Spóra hossz (µm)	Spóra szélesség (µm)	Spóra vastagság (µm)	Sarki tokok száma	Sarki tok alakja	Sarki tok hossza (µm)	Sarki tok szélessége (µm)	Sarki filamentum	Génbanki referencia szám
<i>M. peleci</i>	kopoltyúív afferens artéria	45 % (51/113)	12,1 ± 0,55 (50 minta)	11,4 ± 1,00 (50 minta)	5,8 ± 0,2 (11 minta)	2	csepp alakú, azonos méretű, enyhén összehajló	5,5 ± 0,28 (50 minta)	3,2 ± 0,21 (50 minta)	4-5 tekercsben lazán feltekeredve	KU170934
<i>M. cultrati</i>	szem retina rétege	2,7 % (3/113)	9,8 ± 0,18 (50 minta)	6,4 ± 0,51 (50 minta)	n. a.	2	megnyúlt alakú, azonos méretű, egymással párhuzamos	4,5 ± 0,35 (50 minta)	2,3 ± 0,18 (50 minta)	tekercek nem látszódtak	KU170935



A 0.2

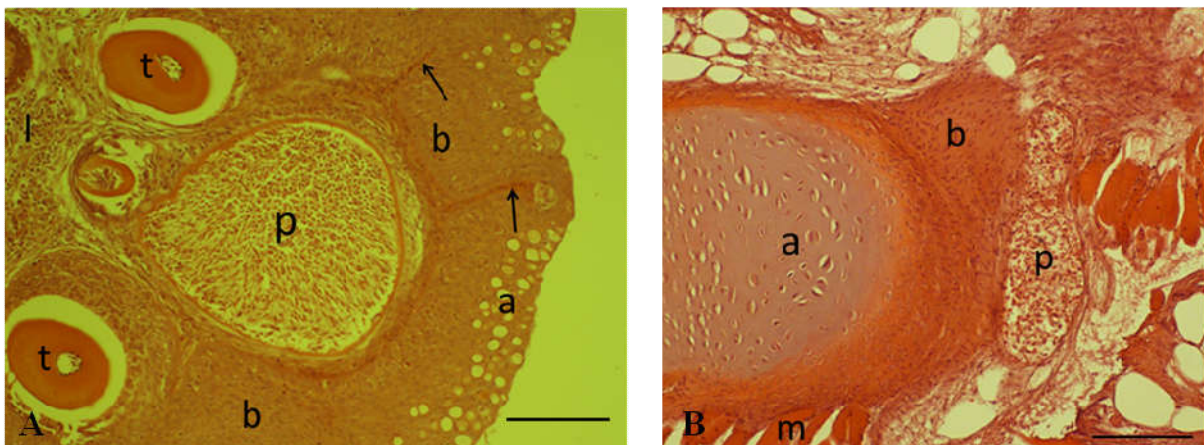


B 0.2

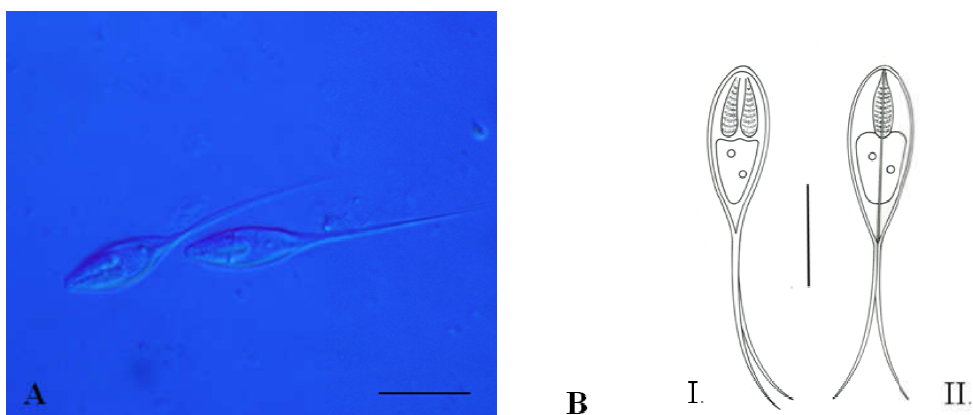
20. ábra: Gardából kimutatott új *Myxobolus* fajok filogenetikai helyzete a 18S rDNS szekvencia alapján Maximum Likelihood (A) és Bayesian Inference (B) algoritmusokkal vizsgálva. Külső csoportnak mindkét esetben a *Ceratonova shasta*-t választottuk. A bootstrap (A) és a posterior probability (B) értékeket az elágazásoknál tüntettük fel. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült számát jelöli

A/4.2.4. *Henneguya* fajok vizsgálata

A vizsgált 48 sügérből 12-ben (13-16 cm testhossz) 1-2 mm nagyságú kerek cisztát mutattunk ki a szájpadráson és a kopolytúívben. A ciszták érett *Henneguya* spórákat tartalmaztak. Fertőzöttséget sem a nagyobb sem a kisebb méretű halakon nem tapasztaltunk. Plazmódiumokat mutattunk ki a szájüreg dorso-caudális részében, a szájpadrás speciális szklerotikus régiójában. Ez a terület jobb és bal-oldalra osztható, a szájüreg megvastagodott része, melyet többrétegű epitélium borít, mely nyálkatermelő kehelysejteket és csontos kis tüskéket tartalmaz (21. ábra/A). Az epitéliumot a tömött rostos kötőszövet támasztja, mely alatt a laza rostos kötőszövet és az izom réteg helyezkedik el. A szájpadrás ezen speciális része magában foglalja a porcos kopolytúív dorzális végét is (21. ábra/B). Két különböző nagyságú plazmódiumot mutattunk ki a szájüreg kaudális részéből. Az egyik típus nagy, 1-2 mm átmérőjű kör alakú ciszta volt a tömött- és laza rostos kötőszövet határán (21. ábra/A). A másik, szabálytalan alakú plazmódiumot a kopolytúívek végén mutattuk ki, ahol az az izomhoz csatlakozott (21. ábra/B).



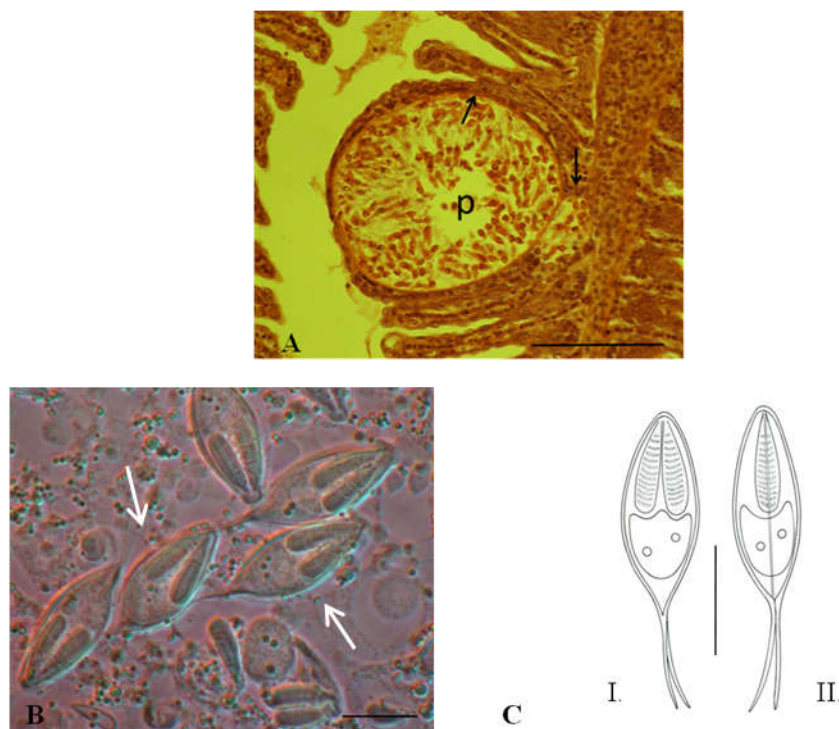
21. ábra: (A) *H. jaczoi*-val fertőzött sügér szájpadrása, a: epitél sejtek és kehelysejtek rétege, b: tömött rostos kötőszövet, p: *H. jaczoi* kör alakú plazmódiuma, t: szálka l: laza rostos kötőszövet, nyilak: vérerek. (B) Szájpadrás területe, a porcos kopolytúív hátsó oldalán; a: a porcos kopolytúív, b: a kopolytúívet fedő tömött rostos kötőszövet, m: kopolytúívhez tapadó izomsejtek, p: *H. jaczoi* szabálytalan alakú plazmódiuma. Szövettani metszet, hematoxilín-eozin festés, méretarány: 100 μ m.



22. ábra: A plazmódiumból kiszabadított *H. jaczoi* myxospórájának natív (A) és sematikus rajza (B), elöl (I.) és oldalnézetből (II.). Méretarány: 10 μ m

A molekuláris vizsgálatok során a fertőzött sügerekből négy, morfológiailag *H. jaczoi*-nak azonosított mintából (22. ábra/A-B, 7. táblázat) végeztük el a részleges 18S rDNS felszaporítását és szekvenálását. A négy mintából kettő (HG4 és HG5) teljesen megegyezett (KY172847), a HG6 (KY172848) és a HG9 (KY172849) ezektől 2 nukleotidban, azaz 0,1%-ban tért el, így azonos nyálkaspórák fajnak tekinthetők. A meghatározott 1674 bp hosszú részleges 18S rDNS gén 94,5% -os hasonlóságot mutatott a *H. texta*-hoz és egy másik génbanki *Henneguya* fajhoz (*Henneguya* sp. ex *Perca fluviatilis*, EU732599), melyeket szintén csapósüger kopolyájából izoláltak. Hasonló arányú egyezést (94,7%) mutattak a *H. jaczoi* spórák a jelen vizsgálataink során süllőkből kimutatott *H. creplini*-szerű spórákkal, és a Génbankba *H. creplini*-ként feltöltött szekvenciákkal (EU732597-98). Ugyanakkor jelen tanulmány során meghatározott *H. jaczoi* szekvenciák (KY172847-49) meglehetősen alacsony egyezést mutattak a csukából izolált *H. psorospermica* fajjal (EU732602) (25. ábra). Hasonló fertőzöttséget egyik másik sügérféléből sem tudtunk kimutatni. A spórák morfológiai adatai, a plazmódiumok speciális lokációja és a spórák 18S rDNS szekvenciája alapján a parazita még le nem írt fajnak bizonyult, mely *Henneguya jaczoi* néven publikálás alatt van.

Sügerekben, a szájpádlás fertőzöttsége mellett, kisméretű, *Henneguya* spórákat tartalmazó plazmódiumot találtunk, 4 hálóval fogott süger kopolyú lemezkéiben (23. ábra/A-C). A spórák méretüket, és alakjukat tekintve is eltértek a *H. jaczoi* spóráitól, és morfológiailag a korábban már leírt *H. texta* spórákra hasonlítottak (7. táblázat).

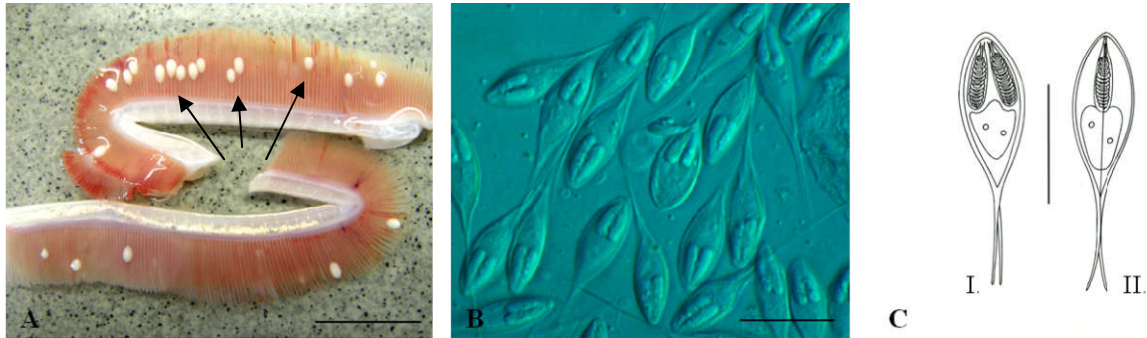


23. ábra: (A) A süger kopolyúlemezkeit fertőző *H. texta* plazmódiuma (p), a nyilak a kapillárisokat jelzik. Szövetteni metszet, hematoxilín-eozin festéssel, méretarány: 100 μ m. (B) A plazmódiumból kiszabadított *H. texta* spórák, natív felvétele és sematikus rajza (C) szemből (I.) és oldalnézetből (II.). Méretarány: 10 μ m

A spórák 18S rDNS szekvenciája teljesen megegyezett a korábban szintén süger kopolyúból izolált nyálkaspórással, a *Henneguya* sp. ex *Perca fluviatilis* (EU732599)-el. Továbbá hasonlóságot (94,9%) mutatott a sárga süger (*Perca flavescens*) kopolyájából leírt *Henneguya doori*-val és a süllőből izolált *H. creplini*-vel (95,6%) és egy aurantiactinomoxon

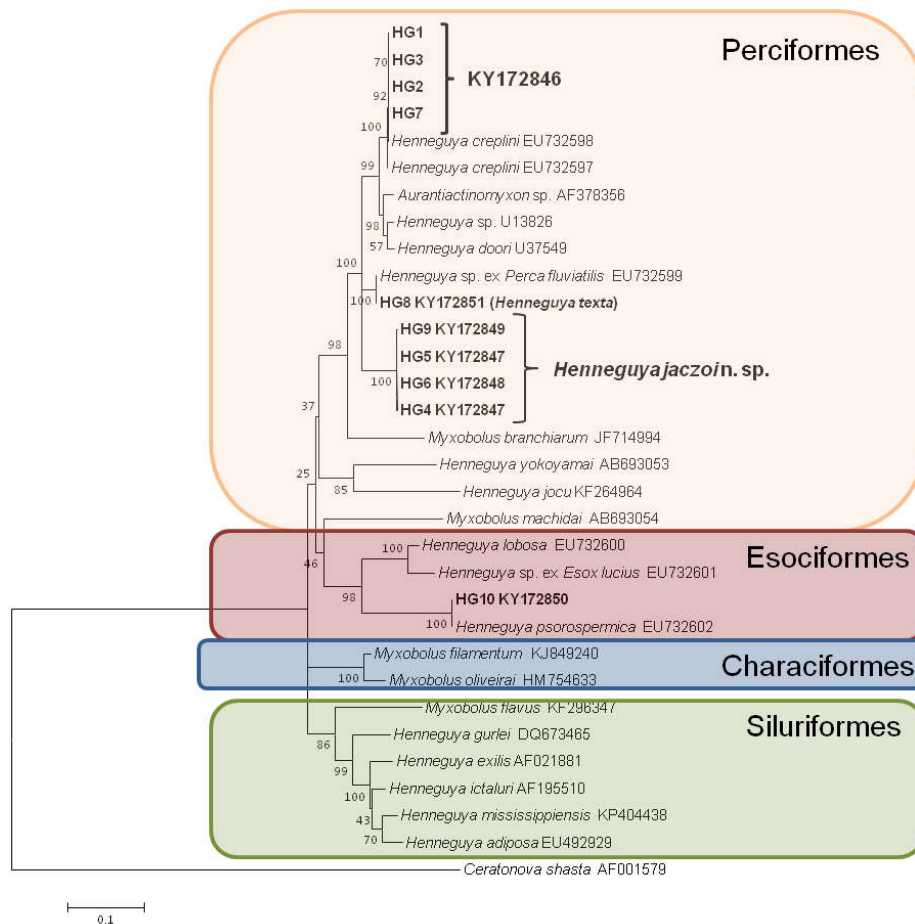
szekvenciával (AF378356, 94,7%). A *H. jaczoi*-hoz való hasonlósága 94,5% -nak adódott (25. ábra).

A nyolc vizsgált csukából kettőben szintén sikerült *Henneguya* fertőzést kimutatni a kopolyú filamentumokból (24. ábra). A plazmódiumokban talált spórák morfológiailag és a 18S rDNS szekvencia alapján is megegyeztek a Génbankba feltöltött, csuka kopolyúból kimutatott, *H. psorospermica* fajjal (7. táblázat, EU732602). Hasonlóságuk más fajokhoz meglehetősen csekély, a szintén csuka parazita *H. lobosa*-hoz (EU732600) 85,9%, egy másik génbanki *Henneguya* fajhoz, melyet szintén csukából izoláltak (EU732601) 85,4% (25. ábra).



24. ábra: (A) *H. psorospermica*-val fertőzött csuka kopolyú (nyíllal jelölve a plazmódiumok), méretarány: 2 cm. A plazmódiumokból kinyert *H. psorospermica* spórák, natív felvétel (B) és sematikus rajz (C) előlnézetben (I.) és oldalnézetben (II.), méretarány: 10 μ m

A vizsgálat során 17 süllő és 2 kősüllő kopolyú filamentumaiban figyeltünk meg *H. creplini*-szerű spórákat tartalmazó, még nem érett cisztákat; de a vágódurbincsokból nem tudtunk sem *Henneguya*, sem *Myxobolus* fertőzést kimutatni, ugyanakkor a vesecsatornácskák rendszeresen *Sphaerospora* fajokkal voltak fertőzöttek.



25. ábra: A *Henneguya jaczoi*, *H. texta*, és *H. psorospermica* filogenetikai helyzete a 18S rDNS gén alapján, Maximum Likelihood algoritmussal számolva. A bootstrap értékeket az elágazásoknál tüntettük fel, kulcsoportnak a *Ceratonova shasta*-t választottuk. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült számát jelöli.

7. táblázat: A tanulmányban részletesen vizsgált *Henneguya* fajok morfológia adatai és génbanki elérhetőségük

Faj név	Lokáció	Prevalencia	Spóra hossz (µm)	Spóra szélesség (µm)	Spóra vastagság (µm)	Sarki tokok száma	Sarki tok alakja	Sarki tok hossz a (µm)	Sarki tok szélessége (µm)	Sarki filamentum	Farki nyúlvány hossza (µm)	Génbanki referencia szám
<i>Henneguya jaczoi</i>	sügér, szájpaddlás, kopoltyúív	25 % (12/48)	14.1 ± 1.1 (50 minta)	6.2 ± 0.64 (50 minta)	5.1 ± 0.19 (11 minta)	2	hosszúkás, azonos v enyhén eltérő méret, hátrafelé elkeskenyedő	6.4 ± 0.83 (50 minta)	2 ± 0.23 (50 minta)	12-13 tekercsben, a tokra merőlegesen, szorosan feltekeredve	24 ± 2.4	KY172847-49
<i>Henneguya texta</i>	sügér, kopoltyúlemez	8.3 % (4/48)	19.7 ± 1.8 (50 minta)	8.3 ± 1 (50 minta)	8 ± 0.9 (11 minta)	2	hosszúkás, azonos v enyhén eltérő méret, hátrafelé elkeskenyedő	9.5 ± 1.4 (50 minta)	2.9 ± 0.4 (50 minta)	12-13 tekercsben, a tokra merőlegesen, szorosan feltekeredve	15 ± 1.4 (rövidebb, mint a spóra hossza)	KY172851
<i>Henneguya psorospermi</i>	csuka, kopoltyúlemez	25 % (2/8)	12.4 ± 1.02 (50 minta)	6.3 ± 0.66 (50 minta)	7.7 ± 0.08 (11 minta)	2	hosszúkás, azonos v enyhén eltérő méret, hátrafelé elkeskenyedő	6.3 ± 0.74 (50 minta)	1.9 ± 0.19 (50 minta)	12-13 tekercsben, a tokra merőlegesen, szorosan feltekeredve	13.8 ± 1	KY172850

A/4.2.5. *Thelohanellus* fajok vizsgálata




A 2015-2016 során átvizsgált 250 ponty bél vizsgálata során nem sikerült *Thelohanellus* cisztát vagy plazmódiumot kimutatnunk (*Myxobolus* cisztát detektáltunk csak). Viszont a féreg-gazdát célzó mintavételek eredményeképpen 14 fertőzött *Branchiura sowerbyi*-t detektáltunk. Az egyes mintavételek részletes eredményeit a 8. táblázatban foglaltam össze. A 14 fertőzött *B. sowerbyi* közül egy bocsájtott ki neoactinomyxon típusú spórát, egy raabeia típusút, a fennmaradó 12 aurantiactinomyxon típust.

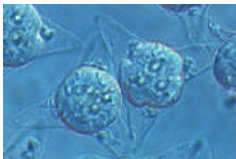








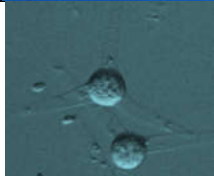
8. táblázat: A gyűjtött *B. sowerbyi* minták vizsgálati eredményei

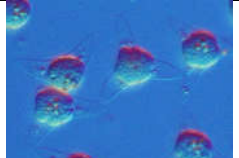
Mintavétel	Gyűjtött <i>B. sowerbyi</i>	Fertőzött <i>B. sowerbyi</i>	Aktinospórák kódja
2015. július 21.	128	10	KB0-4, KB6-7, KB10-12
2015. október 7.	112	1	KBR1
2016. július 5.	143	0	-
2016. augusztus 3.	110	0	-
2016. szeptember 1.	105	3	KBA 2016/1-3

A fertőzési kísérlet egy csoportban sikeres volt, a KB1-es neoactinomyxon mintával fertőzött pontyok közül, a fertőzés után 2-3 hónappal, háromból is sikerült *Thelohanellus* morfológiájú myxospórákat izolálni a hasüregből, melyek nukleotid sorrendje a későbbi molekuláris elemzés során teljes egyezést mutatott a KB1-es aktinospóra szekvenciájával. A többi esetben a kísérlet sajnos eredménytelenül zárult, a halakban sem spórák, sem plazmódium nem jelent meg (9. táblázat).

9. táblázat: A fertőzési kísérlet kivitelezése, és eredményei

Kísérleti csoportok, aktinospóra kód alapján	Aktinospóra morfológia		Kísérlet időtartama (fertőzés dátuma – utolsó boncolás dátuma)	Kísérlet eredménye (sikeresen fertőzött halak/összes)
KB0	Aurantiactinomyxon		2015. június 25.- 2017. november 10.	0/12
KB1	Neoactinomyxon		2015. július 30. – 2016. július 1.	3/12
KB2	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2016. március 1.	0/12

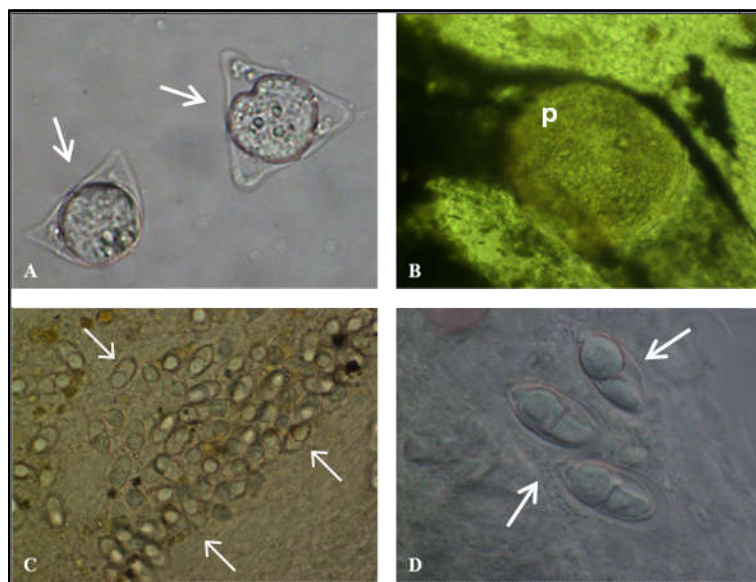
KB3	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2016. november 22.	0/12
KB4	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2016. november 17.	0/12
KB6	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2016. november 22.	0/12
KB7	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2017. március 29.	0/12
KB10	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2016. november 22.	0/12
KB11	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2017. március 29.	0/12
KB12	Aurantiactinomyxon		2015. július 30. – 2017. február 28.	0/12
KBR1	Raabeia		2015. október 7. – 2017. február 28.	0/12
KBA-2016-1	Aurantiactinomyxon		2016. szeptember 7. – 2017. augusztus 17.	0/12
KBA-2016-2	Aurantiactinomyxon		2016. szeptember 7. – 2017. augusztus 17.	0/12

KBA-2016-3	Aurantiactinomyxon		2016. szeptember 7. – 2017. augusztus 17.	0/12
Kontrol csoport	negatív kontrol	-	2016. szeptember 7. - 2017. augusztus 17.	0/12

Az aktinospórák molekuláris vizsgálatának eredményei:

A 14 különböző spóra molekuláris vizsgálata során 10-ből sikerült felszaporítanunk a 18S rDNS egy szakaszát. A filogenetikai vizsgálathoz csak az 1000 bp-on felülieket vettük figyelembe. A jelen kutatásunk és a génbanki adatok mellett, a fán szerepeltettük releváns korábbi eredményeinket is (32. ábra), az elkülöníthető csoportokat, klasztereket különböző színekkel jelöltem, melyek az eredmények bemutatásának alapját is képezik.

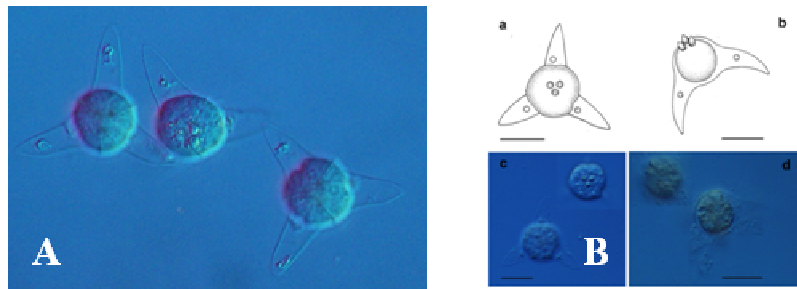
A KB1-es neoactinomyxon és a sikeres fertőzési kísérlet során a halakból izolált KB1-1, KB1-2 és KB1-3 nukleotid szekvenciák 99,9%-ban megegyeztek, így egyazon *Thelohanellus* fajnak tekinthetők (26. ábra). A jelenlegi minták 3 korábbi, szintén Magyarországról gyűjtött *Branchiura sowerbyi* neoactinomyxon szekvenciájával egyeztek meg (DQ231151, DQ231152, KJ152183), és egy szintén hazai, myxospóra mintával is egyezést találtunk (*Thelohanellus* sp. MK2-2006.). Az MK2-2006-os mintát 2006-ban fedezték fel témacsoportunk tagja egy Hortobágyról származó ponty szemüregében. Molekuláris eredmények hiányában, morfológiai alapon meghatározva, akkor *T. hovorkai* spóráként azonosították. A velük legnagyobb hasonlóságot mutató (98,3%) nyálkaspórák egy Japánból származó *T. hovorkai* minta (Niigata-1997). A 18S rDNS nukleotid szekvenciájában tapasztalt, 1%-ot meghaladó különbség, illetve az eltérő aktinospóra forma alapján ezek a minták feltehetően egy új *Thelohanellus* fajt képviselnek (32. ábra).



26. ábra: A *B. sowerbyi*-ből kimutatott KB1 jelű neoactinomyxon (A) és az ezzel végzett fertőzési kísérlet során a pontyokból kimutatott plazmódium a hasüregben (B), és az ebből kiszabadított *Thelohanellus* típusú myxospórák (C, D). Nyilakkal jelölve a spórák.

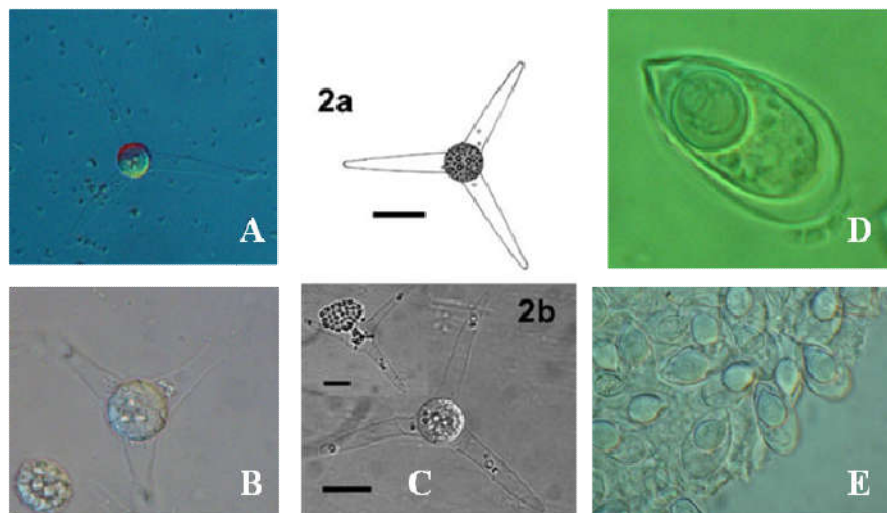
A KBA16-3-as aurantiactinomyxon szekvenciája teljes mértékben megegyezik azzal a *T. kitauei* mintával, amit 2011-ben Magyarországon témacsoportunk tagjai mutattak ki (27.

ábra/A-B, Borkhanuddin 2013 és Zhao et al. 2016). Ez az eredmény megerősíti a *T. kitauei* magyarországi jelenlétéről szóló tudósítást, és a *Branchiura sowerbyi* szerepét a parazita életciklusában.



27. ábra: A jelen felmérés során kimutatott *T. kitauei* aktinospóra (A) és a 2011-ben detektált alak (B)

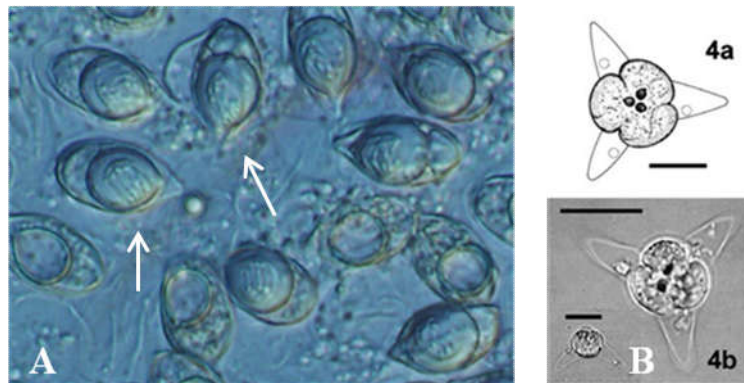
A KB2, KB6, (KB10) és KBA16-1 aurantiactinomyxon szekvenciák megegyeztek néhány Génbankban szereplő, magyarországi aurantiactinomyxon szekvenciával (DQ231155, DQ231153, DQ231154), melyeket *T. hovorkai*-nak azonosítottak korábban. Továbbá megegyeztek még néhány korábbi, morfológiailag *T. hovorkai*-szerű myxospóra 18S rDNS szekvenciájával, melyeket hazai halfarmról származó pontyok hasüregéből gyűjtöttek 2003-ban és 2006-ban (MK1-2006, MK3-2006, MK14-2003) (28. ábra). A génbanki adatok alapján a hozzájuk leghasonlóbb szekvenciával a *T. kitauei* rendelkezik (97,7%), míg az ugyancsak *T. hovorkai* nevet viselő, de távol-keleti mintákat tartalmazó csoporttal, csak 95,7%-os egyezést találunk. Itt felmerül a kérdés, hogy melyik csoport lehet az Achmerov által 1960-ban leírt eredeti *T. hovorkai* szekvenciája, illetve, hogy a földrajzi távolság okozhat-e ekkora eltérést ezen a meglehetősen konzervált génszakaszon (32. ábra).



28. ábra: (A) KB2 és (B) KBA16/1 jelű aurantiactinomyxonok, (C/2a,b) Aurantiactinomyxon A2 típus (Eszterbauer et al. 2006). (D) MK1-2006 és (E) MK3-2006 *T. hovorkai*-szerű myxospórák

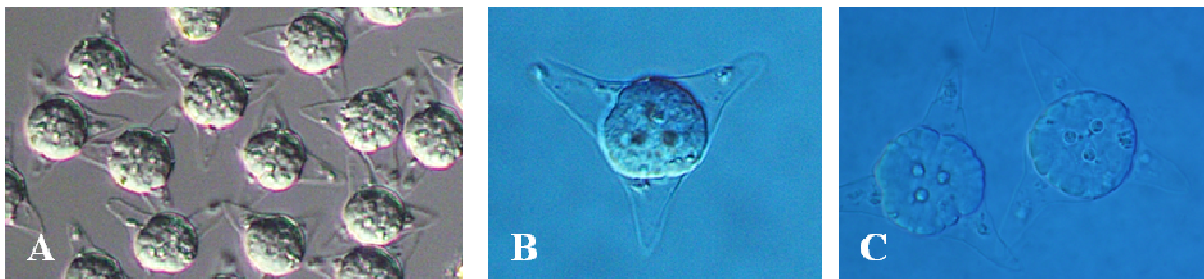
2014-ben egy, a Balaton Sió-zsilipjénél fogott ponty belében myxospórákat detektáltunk (PO4, 29. ábra/A). A 18S rDNS gén megszekvenálása után teljes egyezést találtunk egy, már korábban a Génbankba feltöltött aurantiactinomyxon szekvenciával, melyet Eszterbauer és munkatársai gyűjtöttek 2006-ban egy *B. sowerbyi*-ből, a Tiszából (29. ábra/B/4a,b). Legnagyobb nukleotid egyezést velük a *T. macrovacuolaris* mutatta, 98,6%-al.

Feltehetőleg itt is egy új *Thelohanelles* faj myxo- és aktinospóra párját azonosítottuk (32. ábra).



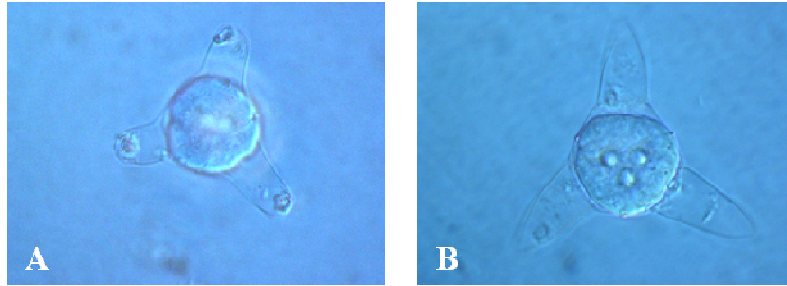
29. ábra: (A) Ponty bélből kimutatott PO4 mintaszámú myxospórák (→) és a 18S rDNS alapján azonosított aktinospóra párjuk, (B/4a,b) Aurantiactinomyxon B2 típus (Eszterbauer et al. 2006)

A KB3, (KB7), KB12 aurantiactinomyxonok (30. ábra/A-C) 2015-ös mintavételből származnak, 18S rDNS szekvenciájuk teljesen megegyezett egy 2014-ben, szintén egy Kis-Balatonból gyűjtött *B. sowerbyi*-ből izolált aurantiactinomyxon szekvenciájával (Bra1). Legnagyobb hasonlóságot (99,2%) a *T. macrovacuolaris*-al mutatták, amit Liu és munkatársai 2016-ban Kínában, egy ponty szájpadról mutattak ki. A Génbankba feltöltött *T. macrovacuolaris* szekvencia (KU160631) azonban kb 300 bp-al rövidebb, mint az általunk meghatározott aurantiactinomyxon szekvenciák, és ez a szakasz tartalmaz egy variábilis régiót is, így a köztük lévő rokonsági kapcsolat még nem teljesen tisztázott (32. ábra).

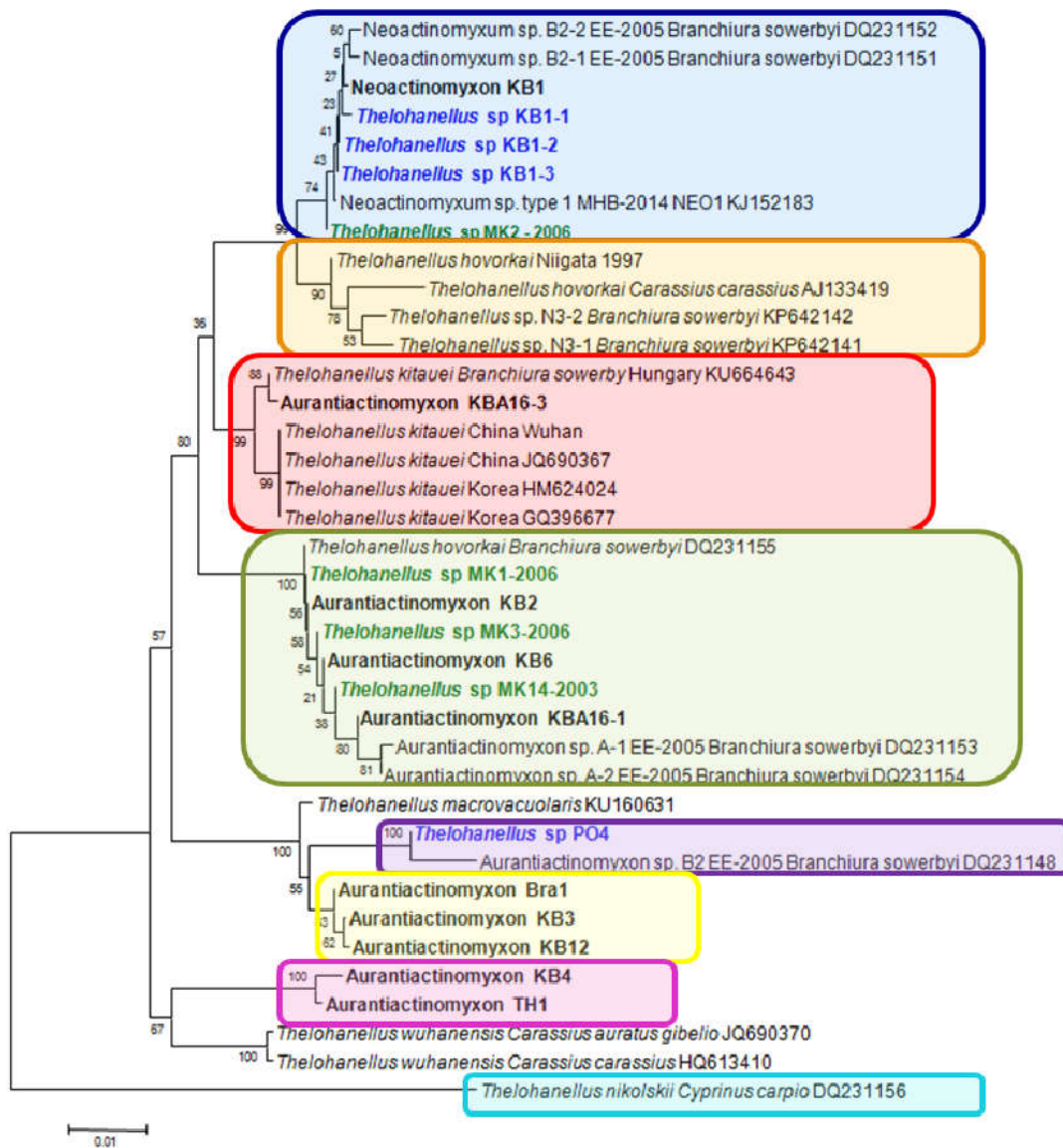


30. ábra: A gyűjtött *B. sowerbyi* oligochaeták által kibocsátott aurantiactinomyxonok, melyek a 18S rDNS szekvencia alapján megegyeznek egymással: (A) KB3, (B) KB7, (C) KB12

A KB4 aurantiactinomyxont 2015-ben, a TH1 aurantiactinomyxont 2014-ben mutattuk ki, mindkét esetben Kis-Balatonból gyűjtött *B. sowerbyi* oligochaetából (31. ábra/A-B). A két minta 18S rDNS szekvenciája egymással 99,7%-os egyezést mutat, viszont bármely más génbanki nyálkaspórák szekvenciától jelentősen eltértek (32. ábra). A legnagyobb hasonlóságot a *T. wuhanensis*-el mutatták (96,7%-ot), melyet Liu és munkatársai (2014) egy ezüstkárász bőréből mutattak ki. A kapott adatok alapján, feltehetőleg ezek az aurantiactinomyxon szekvenciák is új fajt képviselnek.

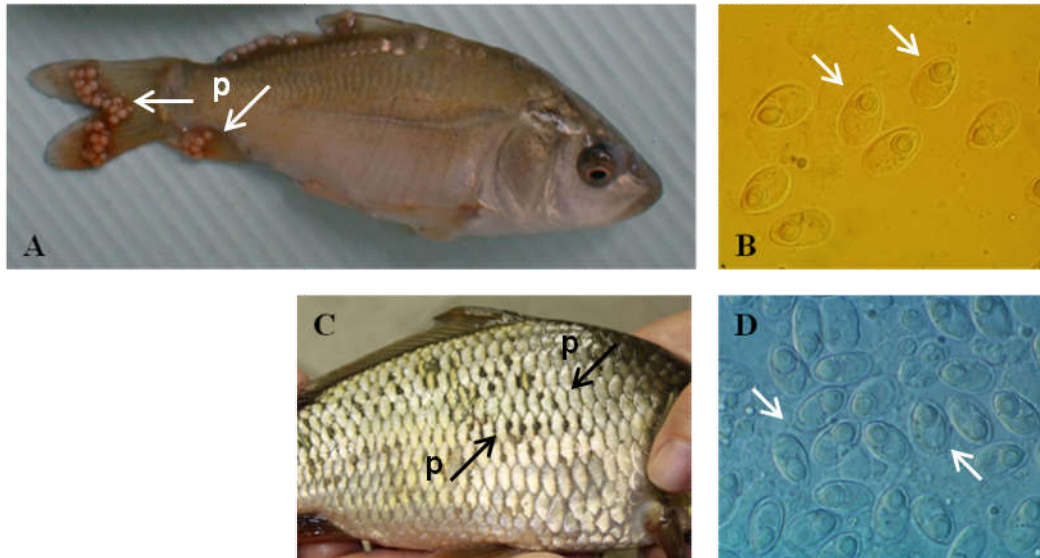


31. ábra: A gyűjtött *B. sowerbyi*-k által kibocsátott aurantiactinomyxonok melyek a 18S rDNS szekvencia alapján megegyeznek egymással: (A) KB4, (B) TH1

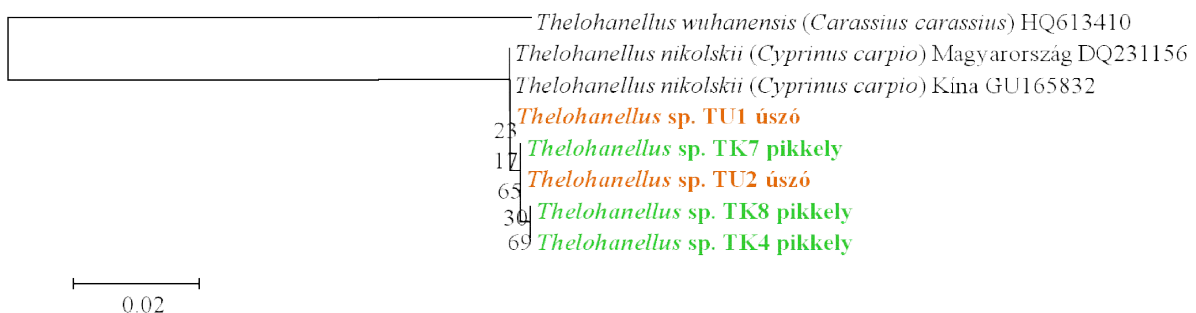


32. ábra: A tanulmány során kimutatott *Thelohanellus* fajokat tartalmazó filogenetikai fa, a minták 18S rDNS szekvenciája alapján. Az elemzés Maximum Likelihood algoritmus alapján történt, a K2+G+I model szerint. Az aktinospóra szekvenciák feketével, a jelen tanulmány során nyert myxospóra szekvenciák kékkel, egy korábbi felmérésből származó minták (2003-2006) zölddel láthatóak. Kulcsoportnak a *T. nikolskii*-t választottuk. A bootstrap értékeket a csomópontoknál feltüntettük. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becült számát jelöli.

A 2015-2016-os időszakban, számos esetben mutattunk ki *Thelohanellus* fertőzést szaporodási időszakban mind a tenyésztett, mind a természetes vízi pontyok pikkelyeiről, és uszonyáról (33. ábra). A spórák morfológiai és molekuláris vizsgálata megerősítette a korábbi feltevést, hogy mindkét lokációban megjelenő plazmódiumot a *T. nikolskii* parazita okozza (34. ábra).



33. ábra: A *T. nikolskii* által képzett plazmódiumok (→, p) és spórák (→) a ponty úszóján (A, B) és pikkelyén (C, D)



34. ábra: A pontyok uszonyán és a pikkelyén megjelenő *Thelohanellus* spórák molekuláris elemzése a 18S rDNS gén alapján. Narancssárgával kiemelve az úszóról, és zölddel a pikkelyről származó mintákat. Az elemzés Maximum Likelihood algoritmus alapján történt, a K2+G+I model szerint. Kulcsoportnak a *T. wuhanensis*-t választottuk. A bootstrap értékeket az elágazásoknál feltüntettük. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült számát jelöli.

A/4.3. Megbeszélés

A/4.3.1. Bodorka szem nyálkaspórák fertőzöttsége

A szem, különösen a szaruhártya *Myxobolus* fertőzöttsége általánosan előforduló jelenség a különböző halfajokban. Ennek ellenére Magyarországon hasonló fertőzést csak a bodorkából tudtunk kimutatni. A fertőzöttség jeleinek feltűnő volta ellenére az első vizsgálati periódusban (2012-2013) csupán sporadikus előfordulást észleltünk. Ezzel szemben 2017-ben, a Balaton két különböző mintavételi pontján is 15%, illetve 22%-os előfordulási gyakoriságot regisztráltunk. Molekuláris biológiai elemzés alapján a szaruhártya

fertőzöttséget a *M. fundamentalis* faj okozta, mely a bodorka egy specifikus parazitája, korábban jelenlétét csak a kopoltyúlemezek alapi részéről, illetve a szomszédos, porcos kopoltyúív kötőszöveti rétegéből írták le. A különböző lokáció ellenére, a fertőzések helye szövettanilag nagyon hasonló szerkezetet mutat. Mindkét szervben a plazmódiumok a többrétegű tömörtrostos kötőszövetben alakultak ki. Molnár (1994) megállapítása szerint, a nyálkaspórások, különösen a *Myxobolus* nemzetség tagjai, meglehetősen szigorú gazda, szerv és szövetspecifikusságot mutatnak. Esetünkben a gazda (bodorka) és a szövet-specifikusság (kötőszövet) továbbra is fennáll, de a plazmódiumok eltérő szervekben fejlődtek. Hasonló lokációbeli egyezést gyanított Moshu és Molnár (1997) a ponty *Thelohanellus nikolskii* fertőzése kapcsán, melyet PhD munkám során molekuláris biológiai adatokkal igazolnunk is sikerült. A parazita plazmódiumai az úszókon is fejlődhetnek, elsősorban ivadékon, míg elsőnyaras, másodnyaras és idősebb halaknál a pikkelyeken, mindkét esetben a kollagénes kötőszöveti állományban. Jelen esetben, a *M. fundamentalis* spórái a szaruhártyában és a kopoltyúívben morfológiailag is megegyeztek, mindkét esetben jól fejlett, érett plazmódiumot találtunk a két lokációban, ami arra enged következtetni, hogy mindkét hely megfelelő a parazita fejlődéséhez.

A kötőszövetekben élősködő parazitákra különösen jellemző a szerv specificitás hiánya. Az Adriano és mtsai által leírt *M. cordeiroi* esetében is a hal (*Zungaro jahu* Ihering, 1898) számos szervében található kötőszöveti részből kimutatták a parazitát (Adriano et al. 2009). Habár a szövet specificitás hasznos eszköz számos nyálkaspórás parazita azonosítására, a kötőszövetben, izomban, és idegek mentén fejlődő plazmódiumok a hal testének különböző részein is megjelenhetnek. Ilyen esetekben a szerv specificitás kevésbé fontos eleme a parazita azonosításának.

Nincs megbízható adat a nyálkaspórások által okozott szaruhártyafertőzés patogenitásában betöltött szerepére halakban. Muzzal (1995) feltételezte, hogy a még fiatal sárga sügér (*Perca flavescens*) egyedek elpusztulhatnak a *M. scleropercae* fertőzésben. Megfigyeléseink szerint önmagában a szaruhártya erős fertőzöttsége nem okozza a gazda pusztulását, vagy a szem szerkezetének általános összeomlását, de az érintett hal látását rontja, és megnöveli az esélyét, hogy ragadozók prédájává váljon.

Jelen munkánk során a spórák 18S rDNS vizsgálatával ismertté vált, hogy ez az élősködő azonos a Molnár és munkatársai által 2010-ben a kopoltyúívből leírt *M. fundamentalis* fajjal, amellyel a spórák DNS szekvenciája 100 %-ban megegyezik. Az eltérő lokációt magyarázza, hogy a fajt a tömört-rostos kötőszövetben való fejlődés jellemzi. Ez a szövet a kopoltyúív ereinek adventitiájában és a szaruhártyában is fontos alkotóelem.

A/4.3.2. Paduc nyálkaspórás parazitái

Andree és munkatársai (1999) hasonlították össze először számos *Myxobolus* faj 18S rDNS szekvenciáját, így új módszert dolgozva ki a morfológiailag nagyon hasonló, ám különböző fajokat fertőző nyálkaspórások elkülönítésére (Eszterbauer 2002). Ezzel a módszerrel, a szekvenciák különbségeit összehasonlítva, gyorsabban meghatározhatóvá vált egy-egy új faj. Lazac- és pontyféléken végzett kutatások egyaránt feltártak relatív tág vagy akár nagyon szűk gazdaspecifikusságot mutató *Myxobolus* fajokat. A *M. cerebralis* képes akár lazacfélék különböző nemzetségeibe tartozó halakat is megfertőzni (El.Matbouli et al. 1999, Hedrick et al. 2001, Ferguson et al. 2008). Hasonlóképpen a *M. pseudodispar* fertőzést is leírták már különböző alcsaládba tartozó pontyfélékből (Molnár et al. 2002). Más *Myxobolus* fajok ugyanakkor rendkívül szigorú gazdaspecifikusságot mutatnak vagy csak közel rokon pontyféléket képesek fertőzni (Molnár és Eszterbauer 2011, Cech et al. 2012). A paduc (*Chondrostoma nasus*) a Leuciscinae alcsaládba tartozik, de száj szerkezetében és táplálkozási szokásaiban különbözik az alcsalád többi tagjától. A spóra morfológia, a plazmódiumok elhelyezkedése alapján és a paducból kimutatott 18S rDNS szekvenciák

hasonlósága szoros rokonságot mutat a *Leuciscinae* alcsalád jobban kutatott tagjainak parazitáival, de a szekvenciák közti különbségek a közeli rokonság ellenére is indokolják, hogy különálló, új fajnak írjuk le őket.

A kétféle filogenetikai algoritmus (ML és BI) nagyon hasonló topológiát eredményezett, a különbségek, csak az alacsony támogatottsággal rendelkező elágazásoknál (70 alatti bootstrap és posterior probability értékeknél) mutattak különbséget. A három új faj az azonos szövetspecifikusságot mutató, morfológiailag hasonló fajokkal együtt csoportosult a filogenetikai fán. A legnagyobb különbség a *M. sitjae* helyzetében adódott, ami a Bayesian Inference algoritmus alapján a *M. szentendrensis* testvércsoportjaként jelent meg, míg Maximum Likelihood algoritmussal bazális helyzetbe került a *M. szentendrensis*, és a hozzá hasonló fajok (*M. intimus*, *M. alvarezae*, *M. dujardini*, *M. obesus* és *M. eirasianus*) alkotta ágak mellett.

A vizsgálat során nyert adatok alapján három új *Myxobolus* faj került leírásra. Habár a 18S rDNS szekvenciákban található különbségek egyértelműen alátámasztják az új fajok gazda-specifikusságát, a genetikailag közel rokon halakban, azonos lokációban fejlődő nyálkaspórák paraziták morfológiailag hasonló spórái a közös filogenetikai eredetet is jelzik. Vagyis, a közelrokon halak, hasonló szöveteiben, közelrokon nyálkaspórák fejlődnek.

A/4.3.3. Garda nyálkaspórák parazitái

A balatoni garda pusztulás kapcsán, két új, eddig ismeretlen *Myxobolus* fajt mutattunk ki a NÉBIH ÁDI munkatársaival együttműködve. Az általunk végzett kiterjesztett vizsgálatok alapján egyik sem játszott szerepet a halak elhullásában. Ugyanakkor az eset ráirányította a figyelmet a gardára, a gyakori, ám kevésbé tanulmányozott cyprinida halunkra, és nyálkaspórák parazitáira, melyek akár intenzív fertőzöttséget is okozhatnak. A gardából eddig egyetlen *Myxobolus* faj volt ismert, a *M. ladogensis* (Rumyantsev és Shulman, 1997). Amikor Donec és Shulman (1984) felmérte a volt Szovjetunió nyálkaspórák parazita faunáját, 12 más halfajokban is megjelenő *Myxobolus* faj előfordulását írta le gardából: (*M. carassii* Klokaceva, 1914; *M. chondrostomi* Donec, 1962; *M. dispar* Thélohan, 1895; *M. dogieli*, Bykhovskaya-Pavlovskaya & Bykhovsky, 1940; *M. dujardini* (Thélohan, 1892); *M. exiguus* Thélohan, 1895; *M. gigas*, Auerbach, 1906; *M. kuleminae* Donec, 1984; *M. macrocapsularis* Reuss, 1906; *M. muelleri*, *M. musculi* Keysselitz, 1908; *M. rotundus* Nemeček, 1911). A felsorolás feltehetőleg olyan tévesen azonosított fajokat is tartalmaz, melyek a garda specifikus kórokozói lehetnek, így a jövőben molekuláris módszerekkel is vizsgálva, várható még fajok leírása gardából.

A jelen vizsgálat során kimutatott spórák morfológiájának tanulmányozása, valamint azok 18S rDNS szekvenciái alapján megállapítottuk, hogy a spórák mind alakjuk, mind pedig szekvenciáik alapján különböznek a pontyfélékből eddig leírt fajoktól. A kopoltyúban fejlődő spórák *Myxobolus peleci*-ként, a szem retina rétegében fejlődő nyálkaspórák paraziták *Myxobolus cultrati*-ként írtuk le.

Azonban a parazitás fertőzést az azóta nem jelentkező elhullással összefüggésbe hozni nem tudtuk. A 2014 júniusától 2015. szeptemberig tartó kiterjesztett parazitológiai vizsgálatok során 113 egészségesnek látszó garda egyedből 35 esetben ismét sikerült kimutatni a *M. peleci* és 3 esetben a *M. cultrati* spóráit. Így az elhullás pontos oka továbbra is ismeretlen maradt.

A/4.3.4. *Henneguya* fajok vizsgálata

A *Henneguya*, a *Myxobolus* után a második legnépesebb nyálkaspórák genusz (Eiras 2002, Eiras & Adriano 2012), mely legalább 195 fajt számlál. Napjainkban a fajleírások pontos morfológiai leírásokat tartalmaznak, melyeket szövettani és molekuláris

eredményekkel is alátámasztanak (Székely et al. 2009, Ye et al. 2012, Yokoyama et al. 2012, Carriero et al. 2013, Rocha et al. 2014). De számos faj esetén, melyeket akár több, mint száz éve írtak le először, sokszor hiányos morfológiai adatokkal, pontatlanul meghatározott lokációval és több mint egy gazdafaj megjelölésével találkozunk. Nagyon gyakran rendszertanilag távoli halfajokat is megneveztek egy parazita gazdájaként, ami arra enged következtetni, hogy a szerzők tévesen azonosították a parazitát. Pl. Thélohan (1895) csukából és sügérből is leírta a *H. psorospermica*-t, de Dyková és Lom (1978) szövettani vizsgálatok alapján már leírja, hogy a nyálkaspórák parazita csukában nagy méretű plazmódiumot képez a kopolyú filamentum artériájában, míg sügérben kis plazmódiumok alakulnak ki a kopolyú lemezek közötti térben. Hasonló módon Donec és Shulman (1984) a *H. psorospermica*-val megegyező fajnak azonosítják a *H. texta*-t. Nyilvánvalóan, az említett szerzők két külön faj plazmódiumával találkoztak, *H. psorospermica*-val a csukákban és *H. texta*-val a sügerekben. Kudo (1919) és Donec és Shulman (1984) munkái alapján, a sügérféléket és csukát fertőző európai *Henneguya* fajok adatait a Táblázat2?-ben gyűjtöttük össze.

Jól látszik, hogy a hiányosan leírt fajok felülvizsgálatra szorulnak, főleg a pontos lokáció megnevezése, a szövet specificitás meghatározása lenne elsődleges. Az elkülönítésben a molekuláris módszerek is nagy szerepet játszanak, hiszen a *Henneguya* fajok közti morfológiai különbségek sokszor csak a farki nyúlvány hosszára terjednek ki. A csukát és sügérféléket fertőző *Henneguya*-k alakja sokszor hasonlít egymásra, nem úgy, mint a pontyféléket és sügérféléket fertőzők. A dévérkeszeg uszonyáról kimutatott *H. cutanea* a *Myxobolus*-okra emlékeztető széles spóratesttel rendelkezik. Számos szerző szerint (Eszterbauer et al. 2005, Fiala & Bartosová 2010, Carriero et al. 2013) a *Henneguya*-k polifiletikus csoportot alkotnak, melyet molekuláris eredmények is alátámasztani látsznak. Pl. a *Henneguya cutanea* kizárólag *Myxobolus* fajokkal alkot egy filogenetikai kládot.

A *H. jaczoi* morfológiailag hasonlít a többi csukát, és sügérét fertőző *Henneguya* fajra, különösen a *H. texta*-ra. De a plazmódium fejlődés speciális helye miatt (szájpadlás) könnyen elkülöníthető a többi kopolyút fertőző fajtól (pl. *H. texta*, *H. creplini*). Szövettani és molekuláris eredmények is alátámasztják a *H. jaczoi* új fajként való leírását.

Alapvetően szükséges a csukát és sügérféléket fertőző nyálkaspórák parazita fajok felülvizsgálata. A *Myxobolus*-ok közé tartozó parazitákról már többször bebizonyosodott, hogy egy faj csak egy halgazdát vagy csak közel rokon halfajokat képes fertőzni (Molnár 1994, Lom & Dyková 2006, Cech et al. 2012). Olyan filogenetikailag távol eső halakat, mint a csuka és a sügérfélék, nem fertőzhet ugyanaz a nyálkaspórák parazita. Ez azonban nem zárja ki, hogy több, morfológiailag hasonló faj is fertőzheti a sügérfélék azonos szerveit. Ilyen esetekben a molekuláris vizsgálatok, a fejlődésmenetbeli különbségek és a szerveken belüli eltérő szövetspecificitás segíthet az elkülönítésben.

Egyik problémás faj a *H. creplini*, melyet Gurley eredetileg vágódurbincsok kopolyújából írt le (1894). A rendszeres halegészségügyi vizsgálatok ellenére a balatoni vágódurbincsokból *Henneguya* fertőzést még nem sikerült kimutatni (Molnár 1966, 1991, Molnár et al. 2001). Ugyanakkor *H. creplini*-szerű spórákkal a balatoni süllőállomány nagy arányú fertőzöttséget mutat (Molnár 1998), de Lom és Dyková (1992) is leírta, feltehetőleg tévesen a *H. creplini* parazita jelenlétét süllőkből. Kevésbé tűnik valószínűnek, hogy ugyanazon az élőhelyen, a vágódurbincs parazitája csak a süllőt fertőzze, a durbincsot egyáltalán nem. Feltehetőleg a süllőkből eddig *H. creplini*-ként azonosított faj a *Henneguya nemeczeki*-nek (Tripathi, 1952) feleltethető meg, de molekuláris eredmények hiányában, ennek bizonyítása további kutatásokat igényel.

A/4.3.5. *Thelohanellus* fajok vizsgálata

Morfológiai alapon könnyen elkülöníthetőek a *Thelohanellus* genusz tagjait a többi nyálkaspórák parazitától, azonban a faj szintű azonosításhoz a spóra morfológia, vagy a

parazita gazda-, szerv- és szövetpreferenciája sokszor nem ad biztos támpontot. Jelen felmérésből egyértelműen kiderült, hogy a *Thelohanellus* fajok diverzitása Magyarországon sokkal nagyobb, mint azt a vizsgálat kezdetén feltételeztük. Munkánk eredményeképpen, feltehetően három új *Thelohanellus* faj is leírásra kerülhet a jövőben, vagy megfeleltethető lehet korábban csak morfológiai bélyegek alapján leírt fajokkal.

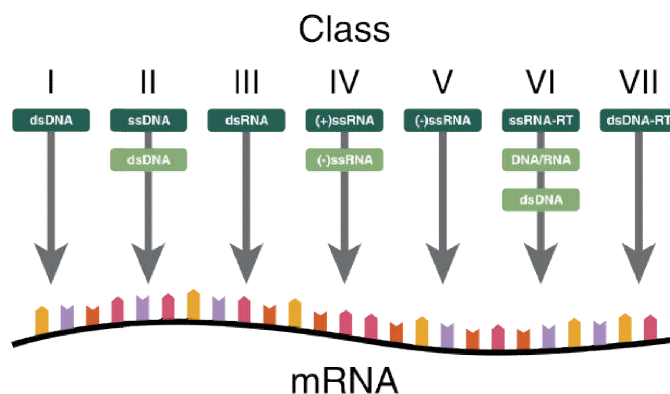
A kutatás fő célja a *T. kitauei* jelenlétének vizsgálata, illetve előfordulási gyakoriságának meghatározása volt. Közel 600 *B. sowerbyi* és 250 ponty bél vizsgálata során csak egy oligochaeta egyedben detektált aktinospóra egyezett meg a témacsoportunk által már 2011-ben is kimutatott *T. kitauei* szekvenciájával. Jóllehet az Ázsiában nagy gazdasági károkat, és látványos tüneteket okozó parazita myxospóráit pontyból nem sikerült izolálnunk, de a magyar aktinospóra és ázsiai aktino- és myxospóra izolátumok 18S rDNS szekvenciái közt lévő 0,4%-os nukleotid különbség jelez egy bizonyos különbséget a két populáció között, ami akár együtt járhat az eltérő patogenitással is. Lehetséges, hogy a magyar *T. kitauei* izolátum egy új fajt, vagy alfajt képvisel, melyre a hazai ponty populáció kevésbé érzékeny. Ahhoz, hogy az ázsiai és magyar izolátumok patogenitásbeli különbségének okai felfedhetőek legyenek, keresztfertőzési kísérletek és további molekuláris elemzések szükségesek. A keresztfertőzés során ázsiai, *T. kitauei*-ra fogékony pontyokat lenne érdemes fertőzni a magyar izolátummal, és fordítva, így a gazdák eltérő érzékenységét a parazitára, vagy a környezeti különbségek hatását a patogenitásra könnyebben meg lehetne állapítani, azonban ezek a kísérletek csak zárt térben a megfelelő hatósági engedélyek beszerzése után lennének kivitelezhetőek. További molekuláris biológiai vizsgálatokkal, pedig a paraziták közti különbségeket lehetne pontosabban meghatározni, pl a 18S rDNS génnél jóval variábilisabb ITS1 (internal transcribed spacer 1) régió és virulencia gének bevonásával. Az ITS1 régió vizsgálata nyálkaspóráknál gyakori az alfaj szintű biogeográfiai származástani vizsgálatokban (Henderson & Okmura, 2004, Whipps & Kent 2006). A virulencia faktoroknak, pl proteázoknak nagy szerepük van a parazita gazda elleni támadásának sikerességében, és a gazdán belüli elszaporodásában. A proteáz gének különbségei, illetve expressziójuk szintje, befolyásolhatja a fertőzés kimenetelét (Gómez et al. 2014).

B, Vírusok

A vírusok mikroszkópikus méretű, biológiai organizmusok. Nem sejtes szerveződésűek, csak más élőlények sejtjeiben képesek szaporodni, így obligát sejtparazitának is tekinthetők. Minden élő szervezetnek, növényeknek, állatoknak, gombáknak, egyszéjtűeknek és baktériumoknak is megvannak a saját vírusaik (Koonin et al. 2006).

A vírusokat a 19. század végén (1892) Dmitrij Ivanovszkij fedezte fel, a dohány mozaikos betegségét vizsgálva, bár ő még ekkor a baktériumok toxinjának gondolta a szűrlettel is terjedő kórokozót. 1898-ban Martinus Beijerinck megismételte Ivanovszkij kísérleteit, és a latin mérge szó alapján, vírusnak nevezte a szűrőn is áthaladó, kisméretű fertőző ágenszt. Sejten kívül a vírusok virion formájában léteznek, általában valamilyen szimmetrikus szerkezet jellemző rájuk. A vírusrészecskék belsejében található a genetikai információt hordozó egyszálú, vagy duplaszálú DNS vagy RNS, melyet kívülről egy fehérjeburok, a kapszid vesz körül. Néhány esetben ezt egy lipidburok is boríthatja. Méretük 20-1500 nm közt változhat, így szerkezetüket csak elektronmikroszkóppal lehet megfigyelni.

Rendszerezésük a genetikai információt hordozó nukleinsav típusán és a virális mRNS képzésének módján alapul. Ezt a csoportosítást David Baltimore írta le 1971-ben, és a mai napig a vírusok besorolása részben ezen alapul (35. ábra). Az 1973-ban az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, Nemzetközi Vírus Taxonómiai Bizottság) a Baltimore rendszerrel összefüggésben megalkotta a ma elfogadott, vírustaxonómiai rendszert, ami rend-család-nemzetség-faj alapon sorolja be a vírusokat.



35. ábra: A Baltimore-féle vírus osztályozási rendszer (Baltimore, 1971)

Az esetleges fertőzések diagnózisa a sokszor összetéveszthető klinikai tüneteken kívül a hagyományos vírusizoláló technikák, szerológiai módszerek és molekuláris alapon történő vírus nukleinsav meghatározáson alapul.

A második generációs szekvenáló módszerek megjelenésével rohamosan megnőtt a különböző vírusszekvenciák száma. Ezek jelentős hányada tartozik az ún. CRESS-DNA (circular Rep-encoding single stranded DNA) vírusok közé, melyeket egyszálú cirkuláris DNS genom jellemez, és egy jól megőrzött RCR fehérjét (rolling circle replication, gördülő kör alapú replikációért felelős fehérje) kódolnak. Ezek közé tartozik a növényi kórokozó *Geminiviridae* és *Nanoviridae* család tagjai, és az állatokat fertőző *Anelloviridae* és *Circoviridae* víruscsaládok (Carstens 2010, Fauquet et al. 2005). Ezek az egyszálú DNS-t tartalmazó vírusok a legkisebb ismert kapszidot is kódoló patogének, melyek eukarióta élőlényeket fertőznek. Magas rekombinációs (Lefeuvre et al. 2009, Martin et al. 2011), és mutációs ráta ($1,2 \times 10^3$ kicserélődés/hely/év; Firth et al. 2009) jellemzi őket, melyhez

hasonlót eddig csak az RNS vírusoknál figyeltek meg (Duffy et al. 2008, Firth et al. 2009, Grigoras et al. 2010, Streck et al. 2011). Valószínűleg ez a magas evolúciós potenciál tette lehetővé az ssDNS vírusok megjelenését és gyors szétterjedését a világban. Az agrárszektorban fontos kórokozónak számítanak, hiszen a circo- és gyrovírusok a haszonállatokat támadják meg, a gemini- és nanovírusok pedig a termesztett növényeket.

Halaknál először Weissenberg vetette fel a lymphocystis betegség vírusos voltát 1914-ben. Ezután az 1950-es évekig hat vírusos megbetegedést azonosítottak, 10 évvel később már 17-et ismertek (Wolf, 1988), napjainkban pedig már több mint 125 vírust írtak le halakból (Noga 2010). Bár a halak vírusai a legkülönbözőbb genetikai és kórtani jellemzőkkel bírnak, néhány általános jellemző csaknem mindegyikről elmondható, mint a hőmérséklet-függő patogenitás, illetve sok vírusra jellemző a gazda-specifikusság, és a fiatalabb halak nagyobb fogékonysága a fertőzésekre.

A világ halászati fogása az 1980-as évek végétől elérte azt a maximális szintet, ami tovább már nem fokozható, a készletek nagy részét már teljes mértékben kiaknázták. A világ akvakultúrák termelése ugyanakkor jelentősen megnövekedett az elmúlt néhány évtizedben. A nem megfelelő tartási körülmények, és az ellenőrizetlen kereskedelem miatt, azonban megnőtt a kórokozók előfordulása, és gyakorivá vált az országokon átívelő járványok kialakulása is, mely jelentős gazdasági károkat okozott. Az ellenőrizetlen élő hal, illetve késztermékek szállításával járó kedvezőtlen társadalmi, gazdasági és környezeti változások felhívták a figyelmet az ezzel kapcsolatos szabályrendszerek kidolgozásának szükségességére. Elengedhetlenné vált az állatok egészségügyi státuszának igazolása, és a tenyésztéssel, kereskedelemmel járó járványügyi kockázatot csökkentő eljárások bevezetése. Az Állategészségügyi Világszervezet (OIE, World Organisation for Animal Health) 1960-ban megalapította a Halbetegségek Bizottságát (FDC, Fish Diseases Commission), mely célzottan foglalkozik a világszerte növekvő akvakultúrák termelést érintő kórokozókcal. A bizottság naprakész információt szolgáltat a napjainkban nagy kockázatot jelentő vízi kártevők diagnosztikájával, kezelésével és megelőzésével kapcsolatban. Az általuk évente közzétett listán számos olyan vírus is szerepel, melyeknek mind a tógazdaságokban, mind a nemzetközi kereskedelemben fontos járványtani jelentőségük van. Az Európai Unió Bizottsága ezek alapján határozza meg a tagországoknak előírt, bejelentési kötelezettség alá tartozó betegségek listáját. Hazánkban jelenleg az EHN (Epizootic haematopoietic necrosis, Járványos vérképzőszervi elhalás), a VHS (Viral haemorrhagic septicaemia, Pisztrángok vírusos vérfertőzése), az IHN (Infectious haematopoietic necrosis, Pisztrángfélék fertőző vérképzőszervi elhalása), a KHV (Koi herpes virus disease, Koi herpesz vírus betegség) és az ISA (Infectious salmon anaemia, Lazacok fertőző vérszegénysége) tartozik az Európai Unió Bizottságának és a tagállamoknak jelentendő állatbetegségek közé a 113/2008. (VIII. 30.) FVM rendelet 2. számú melléklete alapján. Az SVC (Spring viraemia of carp, Pontyok tavaszi virémiája) már lekerült az Európai Unió Bizottsága által meghatározott listás betegségek közül, de a 113/2008. (VIII. 30.) FVM rendelet 1. számú melléklete alapján Magyarországon továbbra is a bejelentési kötelezettség alá tartozik.

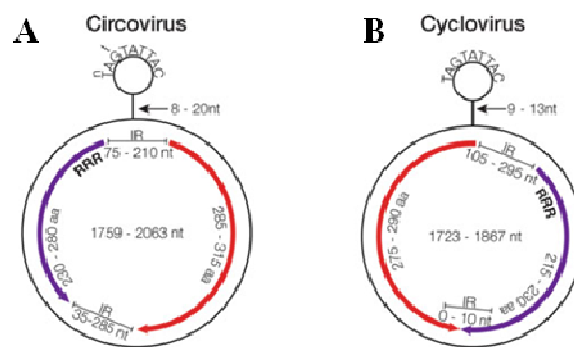
Témacsoportunkban a halparazitológiai kutatás nagy múltra tekint vissza, de a haltenyésztés magyarországi fejlődésével párhuzamosan felmerült az igény a diagnosztikát kiegészítő, hal vírusokat, illetve bakteriális fertőzéseket vizsgáló alap kutatásokra is. Az Intézet (MTA ATK ÁOTI), az Állatorvosi Egyetem és a NÉBIH ÁDI hasonló tématerülettel foglalkozó munkatársai részéről kaptam segítséget, hogy témacsoportunkban is megkezdődhessenek a hal vírusokat célzó vizsgálatok.

PhD munkám során a hazánkban egyre gyakrabban felbukkanó hal circovírusokkal, illetve egy tumoros eset kapcsán a herpeszvírusokkal foglalkoztam.

B/1. Irodalmi összefoglalás

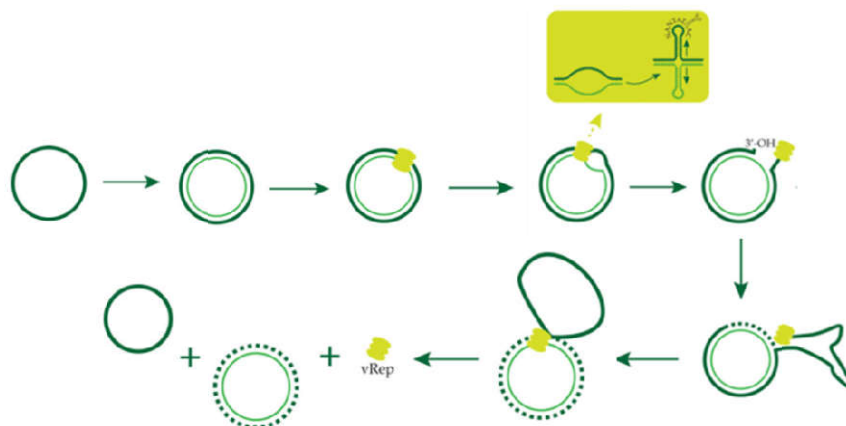
B/1.1. Circovírusok

A circovírusok a *Circoviridae* családba tartoznak, kisméretű (12-27 nm), burokkal nem rendelkező vírusok. Az ikozahedrális kapszidban található a rövid, egy szálú, kovalensen kötött DNS genom, melynek mérete 1.3 – 2.3 kb. Első képviselőjét, a sertés circovírust (porcine circovirus – PCV) egy sertés sejtvonalból írták le (Tisher et al 1974, 1982). Az első leírást követően gyorsan gyarapodott a hasonló karakterisztikával rendelkező vírusok száma, nagyrészt a gyorsan fejlődő molekuláris technikáknak köszönhetően. A család jelenleg két nemzetségre osztható, *Circovirus* és *Cyclovirus* genuszra az ICTV legújabb közleménye alapján (Breitbart & Varsani, 2015). A család mindkét nemzetségére az ambiszenz genomszerveződés a jellemző, két fő gént kódolnak, a *rep* és a *cap* gént, melyek ellentétes irányban helyezkednek el (36. ábra). A *rep* gén kódolja a Rep fehérjét, mely a vírusreplikációt irányítja, a *cap* gén pedig a kapszid fehérjét (Cap) kódolja, mely az N-terminális részen általában egy arginin gazdag régióval rendelkezik. A circovírusoknál a *rep* gén a nonanukleotid motívummal megegyező irányban helyezkedik el, a cyclovírusoknál azzal ellentétesen.



36. ábra: A *Circo*- és *Cyclovirus* nemzetségek genom szerveződése (A, B). A szárhurok szerkezetén jelölve a jellemző nonanukleotid motívum szekvenciáját. Piros: *rep* gén, lila: *cap* gén, RRR: arginin gazdag régió, IR: intergenic region, gének közti szakasz hossza (Rosario et al. 2012)

A vírusreplikáció a sejtmagban történik, rolling circle replikációs modell szerint (Mankertz et al 1998, Cheung, 2004), egy cirkuláris, dupla szálú, replikálódó DNS közti termék segítségével. Sejtes eredetű DNS polimerázok vesznek részt a duplaszálú intermedier kialakításában a sejtosztódás S fázisában. Az összetett replikációs folyamatot a PCV alapján írta le Cheung 2003-ban, és valószínűsíthető, hogy ez a többi circovírusban is hasonlóan zajlik le (37. ábra).



37. ábra: A rolling circle replikáció (gördülő kör replikáció) sematikus rajza, Rosario et al. 2012 nyomán

Habár az első azonosított circovírus sertés eredetű volt, a legtöbb patogén circovírust eddig madaraktól írták le. A betegség jelentős károkat okoz a galamb állományokban (*Columbidae*), ahol az ún. fiatal galamb betegség szindróma kialakításáért felelősek. A versenyeztetés céljából tartott állatok teljesítménye leromlott, fogékonyabbá váltak másodlagos fertőzésekre, étvágytalanok lettek, továbbá légzőszervi-, illetve hasmenéses tünetek is megjelentek bennük (Cságola et al. 2012). A papagájoknál (*Psittacidae*) főleg csőrelváltozásokat és tollasodási zavart lehetett megfigyelni (Ha et al. 2007, Parrish 2011). Emellett számos vízimadárból, főleg récefélékből (*Anatidae*) is azonosítottak CV-okat (Halami et al. 2008, Zhang et al. 2009, Soike et al. 2004).

Az elsőként detektált, de tüneteket nem okozó sertés CV mellett már kifejezetten patogén formákat is kimutattak, melyek jelentős gazdasági károkat okoztak a sertés tenyésztésben. A PCV-2 tehető felelőssé az elválasztott malacok sorvadását okozó szindrómáért (PMWS), a sertés dermatitisz és nephropátia szindrómáért (PDNS), illetve gyakran légúti tünetek és szaporodási zavar is megjelenhet (Allan et al. 1998, Segales et al. 2005, Opriessnig et al. 2007). A közelmúltban azonosított PCV-3 is hasonlóan a PCV-2-höz, több szervet érintő megbetegedést is képes okozni, kiválthatja a PDNS-t is és szaporodási zavarokat is képes előidézni (Phan et al. 2016, Palinski et al. 2017).

A diagnosztikai módszerek fejlődésével, a fenti, kifejezetten patogén esetek mellett számos környezeti mintából (tisztított víz, szennyvíz, tengervíz) is azonosítottak CV szekvenciákat, mellyel nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a vírusok sokkal szélesebb körben elterjedtek, mint azt korábban gondolták (Rosario et al. 2009a, b; Blinkova et al. 2010, Delwart & Li, 2012).

B/1.1.2. Circovírusok halakban

Az első hal circovírust mára ivadékból mutatták ki egy magyarországi halgazdaságban (BarCV, barbel CV, Lőrincz et al. 2011). A BarCV-vel fertőzött ikrából kikelő lárvák nem sokkal a kelés után elpusztultak. A nagyarányú elhullása kapcsán végzett teljeskörű diagnosztikai vizsgálat során, sem más ismert vírust, baktériumot, vagy parazitát; sem toxikus anyagot nem tudtak kimutatni, de a CV szekvenciát minden elhullott egyedből azonosítani tudták. Ugyanabban az évben, a Balatonon, a kimerítő ívási időszakot követően, nagyarányú lesőharcsa elhullást tapasztaltak, mely csak a kifejlett, ivarérett korosztályt érintette (6-50 kg egyedek). A rutin diagnosztikai módszerek itt sem vezettek eredményre, ugyanakkor PCR módszerrel egy újabb circovírust sikerült kimutatni belőlük (EcatfishCV, European catfish circovirus, Lőrincz et al. 2012). Nincs egyértelmű bizonyíték, hogy a márna

vagy harcsa elhullásokért az említett új vírusok a felelősek, de mindkét eset nagyon hasonló ahhoz, amit sertéseknél, vagy madaraknál tapasztaltak, ahol a fiatal életkor vagy a kimerültség voltak a legfontosabb hajlamosító tényezők, melyek a circovírus indukált betegségek megjelenését elősegítették.

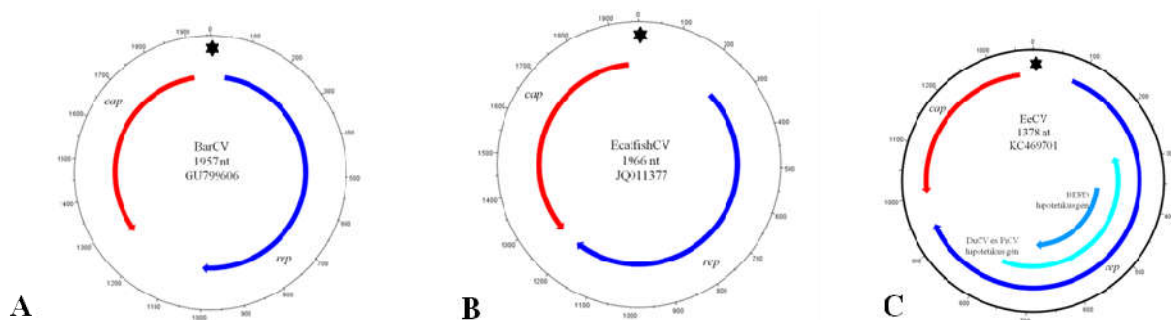
Gazdafajtól függetlenül, a CV-okra jellemző egyszerű genomszerveződés (2 fő ORF jelenléte) és a virion szerkezete miatt, a vírus a fertőzött sejt replikációs rendszerére van utalva, és ezzel egyidőben a főleg a Cap proteint célzó humorális és sejtes immunválaszt is el kell kerülnie. A circovírusok csak az osztódó sejtekben képesek replikálódni, ezért fiatal állatokban nagyobb eséllyel fejlődik ki a betegség. Osztódó sejtek az aktivált immunrendszerben is folyamatosan jelen vannak, kiváló környezetet biztosítva a vírusnak, amely így, a gazda védekező rendszerét alapjaiban megtámadva, általános immunszuppressziót képes kiváltani a szervezetben (Todd, 2000).

A harmadik hal circovírust egy Balatonban fogott, karfiolbetegség tüneteit mutató kifejlett angolnából (*Anguilla anguilla*) írták le (EeCV, eel circovirus, angolna CV; Doszpoly et al. 2014). Az állatból más ismert kórokozót nem tudtak kimutatni.

Ezt követően hazánkban felmérés indult más hal, illetve kételtű CV-ok kimutatására is. Ennek eredményeképpen új circovírusok részleges *rep* szekvenciáit sikerült felszaporítani PCR segítségével egészségesnek látszó bodorkából (*Rutilus rutilus*), dévérkeszeggéből (*Abramis brama*), balinból (*Aspius aspius*), és feketeszájú gébből (*Neogobius melanostomus*), de egyik esetben sem sikerült meghatározni a vírusok teljes genomját (Tarján et al. 2014). Szintén PCR módszerrel további *rep* szekvenciákat sikerült kimutatni indiai cyprinid halakból (*Labeo rohita* és *Catla catla*), de érdekes módon a kapott szekvenciák felhasználásával itt sem tudták a teljes genom szekvenciát előállítani, illetve ahol sikerült nagyobb szakaszt meghatározni, ott nem tudták a teljes *rep* és *cap* géneket meghatározni. Számos pont mutáció és indel mutáció (inszerció vagy delécio) volt megfigyelhető a kódoló régióban, ezzel ún frameshift – leolvasási keret eltolódásával járó mutációt és stop kodon beépülését okozva. A szerzők szerint ezek a virális elemek integrálódhattak a hal genomba, mely az eredeti vírus szekvencia torzulásával is járt (Fehér et al. 2013).

B/1.1.2.1. Hal circovírusok felépítése

Jelen tudásunk a hal circovírusokról főleg a genetikai tanulmányokon alapul. A márna, harcsa és angolna circovírusok teljes genom szekvenciája, és a Tarján és munkatársai (2014) által kimutatott részleges CV szekvenciák meghatározása hagyományos, PCR alapú módszerrel történt. A szekvenciákat összehasonlítva megállapítható, hogy a hal circovírusok virion szerkezete megfelel az általános CV genomszerveződésnek, ahol az egyszálú cirkuláris genomot a Cap fehérje veszi körül (Biagini et al. 2011). A három eddig felfedezett teljes genommal rendelkező hal circovírus genomszerveződése (BarCV, EcatfishCV, EeCV) a 38. ábrán látható.



38. ábra: A (A) márna-, (B) harcsa-, és (C) angolna CV-ok genomszerveződése. Késsel jelölve a rep gén, pirossal a cap gén elhelyezkedését. Az EeCV-ből kimutatott két további feltételezett ORF-t feltüntettük az ábrán (C)

B/1.1.2.1.1. Márna CV genomszerveződése (38. ábra/A)

Két teljes circovírus genom szekvenciát (BarCV1 és BarCV2) sikerült kimutatni márnákból. Mindkét genom mérete 1957 nt volt, egy egyszálú, cirkuláris DNS (ssDNS) molekulába rendeződve. A két vírus nukleotid szekvenciája 94,7 %-ban megegyezett, kis fokú eltérést mutatott. A két fő ORF egymással ellentétes irányban helyezkedik el, ahogy a többi circovírusnál általában. A hosszabb, Rep fehérjét kódoló ORF (ORF1) pozitív irányultságú és a 48. és 1005. nt közt helyezkedik el, standard kezdőkodonnal kezdődik (ATG) de a 9. nukleotidtól van egy alternatív kezdőkodon is (CTG), így ez az ORF 332 vagy 319 aminosavat kódol. A negatív irányba elhelyezkedő, Cap fehérjét kódoló ORF (ORF2) esetében a TTG kezdőkodont azonosították az 1905. nt pozícióban, mely az 1264. nt. –ig terjed, 214 aminosavat kódolva. Ha összehasonlítjuk a BarCV1 és BarCV2 becsült aminosav szekvenciáit, az ORF1 esetében 97,5 %-os hasonlóságot találunk, az ORF 2 esetében pedig 95,3%-t.

Az ORF1 feltételezett fehérjéjéhez leghasonlóbb (51% -ban), egy humán eredetű, feceszből kimutatott circovírus Rep fehérjéje (NG13, HuACV, Human associated CV, Li et al 2010) volt, de sertés és madár eredetű circovirális Rep fehérjékkel is 44-50%-os hasonlóságot mutatott.

B/1.1.2.1.2. Harcsa CV genomszerveződése (38. ábra/B)

A márnához hasonlóan, két különböző circovírust mutattak ki PCR módszerrel harcsából (Lőrincz et al 2012), mindkét genom mérete 1966 nt, vmivel nagyobb, mint a márna circovírusoké. A két EcatfishCV szekvencia 99,4% -ban megegyezett, és ugyanúgy ellentétes irányban helyezkedik el rajta a két fő ORF. A Rep-et kódoló ORF1 a 251. nt és a 1193. nt közt található, és potenciálisan 314 aminosavat kódol. A Cap-t kódoló ORF2 az 1934. nt és 1253. nt közt helyezkedik el, és 227 aminosavat kódol. A márna circovírustól eltérően a harcsa CV ORF2-je rendelkezik a standard ATG kezdőkodonnal. Két további ORF található még a genomban, az ORF3 (157 as) és az ORF4 (136 as), de ezek funkciója, vagy más virális génekhez köthető hasonlóságát nem sikerült azonosítani.

BLAST programmal történő aminosav szintű összehasonlítás alapján a harcsa CV Rep fehérjéje legnagyobb hasonlóságot szintén a humán eredetű NG13 Rep-jével mutatta (55%), a márna, illetve a többi ismert circovírus Rep-hez alacsonyabb százalékban hasonlított (49-52%). A Cap fehérje aminosav sorrendjének Blast programmal való összehasonlítása itt is legmagasabb százalékban az NG13 Cap szekvenciáját eredményezte (35%). A márna CV Cap-jéhez csak 28%-ban mutatott hasonlóságot.

B/1.1.2.1.3. Angolna CV genomszerveződése (38. ábra/C)

A számos közös vonás ellenére, az EeCV meglehetősen különbözik a márna- és harcsa CV-tól. A legszembetűnőbb különbség a genom mérete, az EeCV csak 1378 nt hosszú. Az EeCV is két fő ORF-t tartalmaz, melyek ellenkező irányban helyezkednek a genomban. A Rep fehérjét kódoló ORF1 286 aminosavat kódol. A fehérjében megtalálható a konzervált RNS helikáz domént is, mint a harcsa és márna CV-k esetében egyaránt. A feltehetőleg Cap proteint kódoló ORF3 csupán 114 as-t kódol, mely szignifikánsan rövidebb, mint más circovírusokban, ezért az ICTV még nem fogadta el az EeCV-t önálló vírus fajnak, kétséges, hogy ilyen kis méret esetében is funkcionális Cap fehérje fejeződhet ki.

A Rep fehérjéhez nagyobb hasonlóságot a harcsa CV Repje mutatott (51%). A feltételezett Cap aminosav szekvenciája nem mutatott számottevő homológiát a Génbankban található egyik fehérjével sem, viszont megtalálható rajta a circovírusokra jellemző arginin gazdag régió az N-terminális részen. A genomban a két fő ORF-en kívül még további kettőt azonosítottak, melyek átfedtek az ORF1 szakaszával. Az ORF2 meglehetősen hosszú, és a kikövetkeztett aminosav szekvenciája alapján a galamb és kacsacircovírusok egyik feltételezett fehérjéjével mutatott homológiát (Mankertz et al 2000, Chen et al 2006). Az ORF4 által kódolt aminosav szekvencia más circovírusok (csőr és toll betegség) fehérjéjével mutatott homológiát (Niagro et al. 1998).

A teljes hal circovírus genomok elemzése számos közös tulajdonságra rávilágított. Mindhárom cirkuláris genom kódol egy Rep és egy Cap fehérjét, melyek egymással ellentétes irányban helyezkednek el. A fehérje kódoló szakaszokat egy-egy intergénikus régió (IR) választja el az 5' és 3' végeken egyaránt. Az IR szakaszok hossza eltér a különböző hal circovírusokban, márna CV esetében 100 és 259 nt, harcsa CV –nél 282 és 60 nt, EeCV-nél 107 és 65 nt az 5' és 3' végeken. Mindhárom vírus genom tartalmaz egy konzervált nonanukleotid, azaz 9 nukleotidból álló szakaszt 5'- TAGTATTAC-3', hasonlóan a *Circoviridae* család számos tagjához. Ez a szakasz a szár-hurok (stem loop) szerkezetben található, ami a *rep* és *cap* gének közti 5' IR-ban található. A *Circovirus* genuszon belül előforduló konzervált nonanukleotid szekvenciákat a Táblázat 10.-ben tüntettem fel.

10. táblázat: A circovírusoknál előforduló nonanukleotid szekvenciák (Lőrincz et al. 2011.) (PiCV – pigeon CV – galamb CV, GuCV – gull CV- sirály CV, FiCV – finch CV – pinty CV, CaCV – canary CV – kanári CV, StCV – starling CV – seregély CV, RaCV – raven CV – holló CV)

Nonanukleotid szekvencia (5'-3')	Vírus
TAGTATTAC	PCV-1, PiCV, GuCV, FiCV
TAGTATTAC	BarCV, EcatfishCV, EeCV
AAGTATTAC	PCV-2
CAGTATTAC	CaCV, StCV
GAGTATTAC	RaCV
TATTATTAC	Lúdalakúak CV-ai

A szár-hurok szerkezet a genom nélkülözhetetlen része, melynek a replikáció iniciációjában van fontos szerepe. A duplaszálú szár-szakasz hossza 15 bp és 12 bp a márna és angolna CV-nél, de csak 9 bp a harcsa CV-nál, ami rövidebb, mint a CV-k átlagos szár-hossza, viszont hasonlít cyclovírusoknál leírt méretre (Liu et al 2010).

A hal circovírus genomok vizsgálata során megállapítható volt, hogy a BarCV, EcatfishCV és EeCV vírusok egyértelműen a *Circovirus* genusz tagjai. A márna és harcsa CV-hez a legközelebbi rokon szekvencia az HuACV (Human associated circovirus, korábbi nevén HufaCV, NG13), melyet gyermekek ürülékéből detektáltak (Li et al 2010). Habár

alacsony a hasonlóság az NG13 és a márna, illetve harcsa circovírusok között, de ez nem csak a teljes genom vizsgálatokkor volt kimutatható, hanem a Cap fehérje aminosav szekvenciája alapján is, ami viszonylag szoros kapcsolatot jelez a vírusok között. Lőrincz és munkatársai (2012) szerint a hasonlóság feltehetően abból fakad, hogy az NG13-as széklet minta kialakulásában hal fogyasztás is szerepet játszott, vagy a vírusoknak közös, eddig ismeretlen eredete van. A vírusok közös eredetét alátámasztja az NG13 szár hurok szerkezetében található nonamer szekvencia is. A genomszerveződés alapján az EeCV is a *Circovirus* genusba tartozik, de nem alkot monofiletikus csoportot a harcsa vagy a márna circovírusokkal, bár az ismert szekvenciák közül legjobban az EcatfishCV-re hasonlít (Dospoly et al 2014).

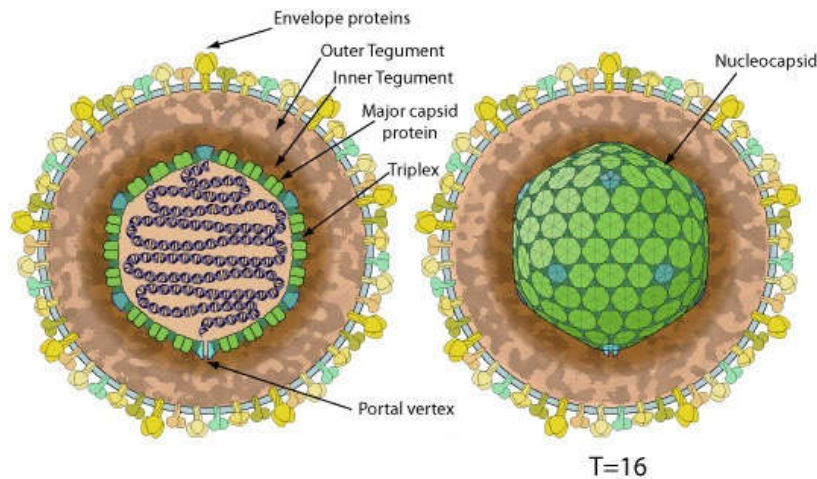
B/1.1.2.2. Részleges *rep* szekvenciák

A Tarján és munkatársai (2014) által kimutatott részleges *rep* szekvenciák vizsgálata során, egy dévérkeszgeből származó minta nagyfokú hasonlóságot mutatott a márna CV-vel (64-65%), és három, eddig ismeretlen circovírus szerű szekvencia került azonosításra bodorkából (*Rutilus rutilus*), balinból (*Aspius aspius*) és feketeszájú gébből (*N. melanostomus*). A bodorkából és a balinból kimutatott CV-szerű szekvenciák csekély mértékben ugyan (46-51%), de legjobban szennyvízből és tengervízből származó környezeti mintákból azonosított CV szekvenciákra hasonlítottak. A gébből kimutatott szekvencia 44%-ban egyezett meg a harcsa CV-ok Rep fehérjéjével, egy zooplanktonból és egy szennyvízmintából azonosított CV-al. A kimutatásra került részleges *rep* gén szekvenciák rövidege miatt, azonban messzemenő következtetést a hasonlósági adatokból még nem lehet levonni.

B/1.2. Alloherpeszvírusok

A herpeszvírusok egy meglehetősen diverz csoportját képezik a nagyméretű DNS genommal rendelkező vírusoknak. Genetikai vizsgálatok alapján a *Herpesvirales* rend három családra különíthető el: *Herpesviridae* családba tartozó vírusok hüllőket, madarakat és emlősöket fertőznek, a *Malacoherpesviridae* család tagjai puhatestűeket, és az *Alloherpesviridae* családba tartozó vírusok halakat és kétélűtűeket betegítenek meg (Davison et al. 2009, McGeoch et al. 2006, Waltzek et al. 2009a, b).

Bár az említett víruscsaládok közt nincs megegyező, konzervatív szekvenciát tartalmazó régió, szerkezeti és biológiai hasonlóságok megtalálhatóak. Szerkezetüket tekintve a herpeszvírus virion lineáris duplaszálú DNS genomot tartalmaz egy ikozahedrális nukleokapszidba csomagolva (kapszid átmérő ~100nm), amit egy fehérjetermészetű tegument réteg és egy gazdából származó, sejthártya eredetű burok vesz körül (Minson et al. 2000). A kapszid 162 kapszomerből áll (150 hexon és 12 penton) és mindegyik kapszomer rendelkezik egy kürtő-szerű kitüremkedéssel, melynek a közepén tengelyirányban csatorna helyezkedik el. A sejthártya eredetű burok miatt a pleomorf, intakt burok átmérője 150-200 nm. A burok számos glikoproteint tartalmaz, melyeknek a sejt-vírus kölcsönhatásokban (adszorpció, penetráció), illetve az immunogenitásban van fontos szerepe (Booy et al. 1996, Davison et al. 2005) (39. ábra).



39. ábra: Allohpesviridae víruscsalád általános szerkezeti felépítése, ViralZone 2017, Swiss Institute of Bioinformatics, https://viralzone.expasy.org/528?outline=all_by_species

Az említett herpeszvírus családok közt az egyetlen gén, ahol egyértelmű homológiát sikerült kimutatni, az a termináz ATPáz alegysége, a virion összeépülése során, a vírus genom kapszidba csomagolásában játszik szerepet (Davison 2002, Davison et al 2005, 2009).

Az *Allohpesviridae* családon belül viszont már 12 jól megőrzött gén található (40. ábra) (van Beurden et al 2010), melyek jól használhatóak a diagnosztikában és a filogenetikai vizsgálatokban egyaránt (Hanson et al 2006, Kelley et al 2005, Waltzek et al 2009a). A DNS polimeráz és a termináz gén ATPáz alegységének részleges szekvenciájának alapján határozták meg Waltzek és munkatársai (2009a) 13 hal és kételtű herpeszvírus filogenetikai helyzetét. Ez alapján az *Allohpesviridae* család két monofiletikus kládra osztható: az egyikben az *Anguillid herpesvirus 1* (AngHV-1) és a cyprinid herpeszvírusok (CyHV-1,-2,-3), a másik kládba az ictalurid herpeszvírusok (IcHV-1-2), az acipenserid herpeszvírusok (AciHV-1,-2) a salmonid herpeszvírusok (SalHV-1,-2,-3) és a ranid herpeszvírusok (RaHV-1,-2) tartoznak. Egy későbbi tanulmány, különbözőségük miatt, a ranid herpeszvírusok külön csoportba sorolását javasolta (Doszpoly et al 2011a). Jelenleg az ICTV a következő nemzetségeket fogadja el, a hozzá tartozó fajokkal: *Batrachovirus* (RaHV-1 és RaHV-2), *Cyprinivirus* (CyHV-1, CyHV-2, CyHV-3 és AngHV-1), *Ictalurivirus* (IcHV-1, IcHV-2 és AciHV-2) és *Salmonivirus* (SalHV-1, SalHV-2, SalHV-3) genuszokat (ICTV, 2014).

Az allohpeszvírus genomok általában több mint 70 gént tartalmaznak. A legkisebb leírt herpeszvírus az *Ictalurid herpesvirus 1*, amely 134 kb-ból áll és 76 feltételezett gént tartalmaz (Davison 1992). A legnagyobb, a *Cyprinid herpesvirus 3*, 295 kb-ból áll, és 155 gént kódol (Aoki et al 2007, Davison et al 2013). A genomok végein terminális ismétlődések (terminal repeat, TR) találhatóak. A virális DNS mindkét szála kódol, szenz, és ambisenz irányban is megtalálhatóak a gének. A kódolt fehérjéknek csak kis hányada struktúrprotein, nagyobb részüknek a vírus replikációjában van szerepe.

A herpeszvírusok egyik közös jellemzője, hogy az elsődleges fertőződés után, képesek látens, alvó állapotban a gazdában maradni, miközben fertőző vírus partikula nem termelődik, nagyon kevés vírus fehérje még expresszálódik. A látens vagy aktív víruszaporodást szabályozó tényezők a gazda állapotával vannak összefüggésben. Ezek a vírusok gyakran gazdaspecifikusak, más gazdát nem, vagy csak csekély mértékben fertőznek, ugyanakkor egy sikeres gazdafajváltás elhullással is járhat. A herpeszvírusok által kiváltott tünetek, és az okozott betegség kimenetele sokszor attól is függ, hogy a fertőződés elsődleges, látens állapotú vagy éppen kiújuló stádiumban van. Az első fertőzésnél a betegség kimenetele gyakran a vírusrészlet mennyiségétől, és a gazda immunstátusától függ. A természetes gazdában az elsődleges fertőződés gyakran csak enyhe megbetegedéssel és a populációban való

elterjedéssel jár. De optimális körülmények között gyakran bukkan fel nagy egyedsűrűségű haltelepeken, ahol számos alloherpeszvírus képes magas mortalitással és magas morbiditással járó járványok kiváltására. Elsődleges herpeszvírus fertőződésnél tipikus tünetként az epithél sejtek proliferációja figyelhető meg a bőrön és a kopoltyún, valamint vérzések, és hasúri folyadék gyűlhet fel, továbbá vese és máj nekrozis jelenhet meg. A kiújuló vírusfertőzés leggyakoribb manifesztációja a dermális, vagy epidermális sejtproliferáció. Ezek a proliferatív elváltozások gyakran undort keltőek, de csak ritkán halálosak. Az alábbi sejtes elváltozások a leggyakrabban megfigyelhetők az alloherpeszvírusok okozta fertőzéseknél: a sejtek megnövekedése (hypertrófia), a sejtmag megnagyobbodása (kariomegalia), és a kromatin állomány marginációja eozinofil vagy világos festődésű intranukleáris befűződésekkel.

B/1.2.1. Pontyfélék alloherpeszvírusai

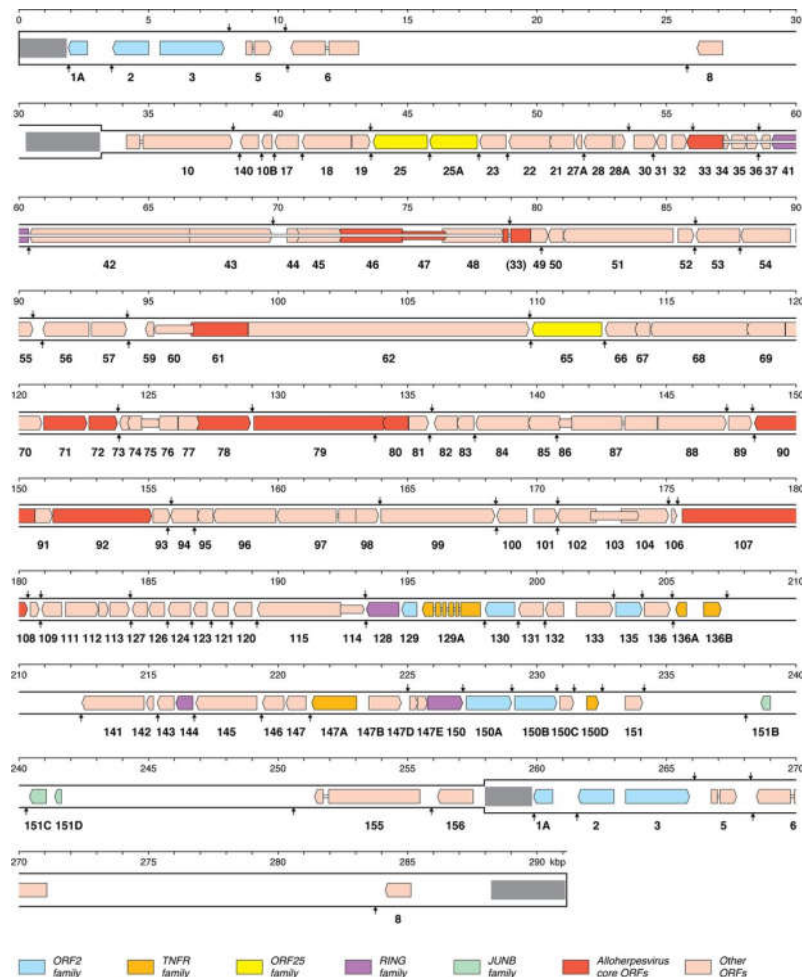
Az ICTV jelenleg 3 különböző ponty herpeszvírust fogad el, melyek számottevő gazdasági kárt képesek okozni a haltenyésztésben és a trópusi halak kereskedelmében. Ezek a *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV1, ponty himlő), *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV2, aranyhalak vérképzőszervi elhalását okozó vírus) és a *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV3, koi herpeszvírus, KHV). Mindhárom a *Cyprinivirus* genuszba tartozik, és egymással szoros rokonságot mutat szekvencia illetve genomszerveződés szintjén is (Davison et al. 2013, Waltzek et al. 2005, 2009a,b). Mindhárom vírus teljes genomszekvenciája ismert, méretük 290 kb fölött van, és a CyHV3 a leghosszabb ismert herpeszvírus genom 295 kb hosszúsággal (Aoki et al., 2007; Davison et al., 2013). Nagyon szűk gazdaspektrummal rendelkeznek, a CyHV1 és CyHV3 csak pontyokban (*Cyprinus carpio*) okoz megbetegedést, a CyHV2 is csak aranyhalakból (*Carassius auratus*) és a közel rokon ezüstkárászból (*Carassius gibelio*) került eddig leírásra (Danek et al. 2012, Doszpoly et al. 2011b). Sejtkultúrában mindhárom nehezen tenyészthető, ha mégis replikálódik, akkor a citopatogén hatás (CPE) lassan alakul ki.

A közelmúltban egy feltehetőleg új cyprinid herpeszvírust (CyHV4) mutattak ki gardából (*Pelecus cultratus*) (Doszpoly et al. 2015). A Balatonban, 2014 nyarán, csak a gardákat érintő, nagyarányú elhullást követően azonosították a vírust. A filogenetikai elemzés során a cyprinid herpeszvírusok közeli rokonaként jelent meg, ugyanakkor egyértelműen új fajnak tűnik (Doszpoly et al 2015).

B/1.2.1.1. *Cyprinid herpesvirus 1*

A vírus okozta betegség ponty himlőként már régóta ismert, jóindulatú sejtburjánzást okoz a pontyon. Hazánkban Békési és munkatársai már 1979-ben, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján, leírták a pontyhimlő feltételezhető herpeszvírusos eredetét (Békési et al. 1979), de izolálniuk nem sikerült a vírust. Ez elsőként Sano és munkatársainak sikerült, akik a fertőző ágenszt már egyértelműen herpeszvírusként azonosították (Sano et al 1985a, b). Későbbi vizsgálatok alapján kimutatták, hogy a CyHV1, ivadéokban magas mortalitással járó szisztémás megbetegedést is képes kiváltani (Sano et al 1991). A fertőzött halak abnormálisan úsznak, a hasüregük felfúvódik, exophthalmia jellemző rájuk, illetve a bőr sötétebb pigmentációja és bevérzések figyelhetők meg a kopoltyúfedőn, illetve az egész testen. A haldokló ivadékon a máj, vese, bél elhalása illetve számos sejtben Cowdry A típusú zárványok megjelenése figyelhető meg. Az amúr (*Ctenopharyngodon idella*), széles kárász (*Carassius carassius*) és a japán *Gnathopogon caerulescens* (willow shiner) rezisztensek a fertőzésre. A hőmérsékletnek egyértelmű hatása volt a vírusreplikációra és a kórokozó képességre. Sejttenyészetben vizsgálva a vírust 10°C, 15°C, 20°C, 25°C és 30°C-on, a legmagasabb vírusreplikáció 15°C és 20°C-on volt megfigyelhető, közepes volt 10°C és 25°C-on és kimutathatalan 30°C-on. Fertőzési kísérletben a legmagasabb elhullás 15°C-on volt tapasztalható, közepes elhullás 20°C-on, és nem történt mortalitás 25°C-on. A

fürdetéses fertőzési kísérletet túlélő egyedek, és a CyHV1-el oltott kifejlett példányokon egyaránt magas százalékban alakultak ki papillómás kinövések. Ezek az epidermális proliferációk csak hónapokkal az elsődleges fertőzés után jelennek meg és tenyésztethető vírus nyerhető ki belőlük, illetve IFA (Immunfluorescence Antibody assay, immunfluoreszcens antigén kimutatás) festéssel virális antigénre pozitívnak bizonyultak (Sano et al 1991). A kísérletesen fertőzött halakban papillómák fejlődtek ki, melyek 15°C-on perzisztáltak, 20°C-on és 25°C-on kifejlődtek, de vissza is húzódtak. A CyHV-1 teljes genomszekvenálása során azonosították a JUNB onkogént, ami részben felelőssé tehető a tumorok kialakulásáért (Ábra 40, Davison et al 2013). A betegség az egész világon elterjedt, hatását a kereskedelmi akvakultúrára nehéz felbecsülni. A tumorok undort keltőek, így befolyásolják a halak értékesíthetőségét. A CyHV-1 fertőzés vélelmezett diagnózisa a pontyon lévő papillómák megfigyelésén alapulhat, melyek magasabb hőmérséklet hatására visszahúzódnak. A diagnózis megerősíthető a fertőzött szövetek indirekt fluoreszcens antigén (IFA) –en, vagy PCR módszerrel történő vizsgálatával (Viadanna et al in submission). A vírust nem egyszerű sejten izolálni, de KF-1 (koi fin, koi uszony), EPC (epitelioma papillosum cyprini) és FHM (fathead minnow) sejtvonalakon 20°C-on kivitelezhető volt, körülbelül az inokulációt követő 5. napon CPE jelent meg a sejtek vakuolizációjával és lekerekedésével (Dixon 2008, Sano et al 1991).



40. ábra: A CyHV-1 teljes genom térképe, a terminális ismétlődő régiók vastagabb sávval kiemelve a genom 5' és 3' végén. Az alloherpeszvírusokra jellemző 12 konzervált gén pirossal, a JUNB onkogének zölddel jelölve találhatóak meg a térképen (Davison et al. 2013.) nyomán

B/2. Témafelvetés

B/2.1. Circovírusok a balatoni halakban

A közelmúltban felbukkanó hal circovírusok indokolták hazánk legnagyobb természetes víztestjének, a Balaton halpopulációinak circovírusokkal való fertőzöttségének felmérését. A harcsa és angolna CV-ok (Ecatfish CV, EeCV) megjelenése egyaránt ehhez a tóhoz köthető, és feltehetően az Ecatfish CV szerepet játszott a 2011-ben lezajlott nagyarányú lesőharcra pusztulásban. Az angolnák esetében felmerült, hogy vajon az akár több évtizede elzártan a Balatonban lévő angolnapopulációban milyen arányban fordul elő a vírus jelenléte, és a már leírt karfiolbetegség gyakran társul-e CV fertőzöttséggel.

B/2.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

A márna (*Barbus barbus*) hazánkban kedvelt étkezési és sporthal, mégis keveset tudunk betegségeiről. Csupán néhány, paraziták által okozott bántalom (pl a *Pomphorhynchus laevis* okozta buzogányfejű férgesség, és a *Myxobolus musculi* izom parazita), illetve vírusfertőzés (circovírus, rhabdovírus) ismert a szakirodalomból (Thielen et al. 2004; Molnár et al. 2012; Lőrincz et al. 2011; Vicenova et al. 2011). Azonban a 20. század végétől kezdődően egyre több helyről írtak le azonosítatlan kórokkal tumoros elváltozásokat Európa vadon élő márna populációiból. Dél-Angliában a Lee folyóból fogott márnákon nagy számban találtak bőrt, kopoltyúfedőt, uszonyokat érintő hiperpláziát és papillómás elváltozást (Barnes et al. 1993), Csehországban az Ohre folyóból kerültek leírásra a bőrt- és a gonádokat érintő tumoros elváltozások (Palikova et al. 2007). Észak-Olaszországban egy, az Adige folyóból kifogott egyedén pedig a kopoltyúív csontszöveti állományának elfajulását figyelték meg (Manera & Biavati, 1999). Az elmúlt években, hazánkban is egyre több tumoros elváltozást mutató ivarérett márna került kifogásra a Dunából. Főleg a Duna Budapesthez közeli szakaszain, a késő őszi időszakban figyeltek meg daganatos elváltozásokat a kifogott márnákon. A testszerte jelentkező tumorok világos rózsaszín, bevonatszerű, illetve papillómás kinövések voltak a pikkelyeken, uszonyokon és a szájnyílás közelében. A tünetek nagyon hasonlóak voltak, mint amit a Barnes és munkatársai a dél-angliai márnákon tapasztaltak. Bár vírus részecskéket nem tudtak kimutatni, Dixon egyértelműen felveti a lehetőségét, hogy az elváltozásokat a ponty himlő okozhatta (Dixon 2008).

B/3. Célkitűzések

- A közelmúltban Magyarországon megjelent hal circovírusok kapcsán a balatoni halállomány circovírusos fertőzöttségének felmérése
- Dunából származó papillómás kinövéseket hordozó márnák vizsgálata, esetleges vírusos eredet után kutatva

B/4. Vírusos kutatások:

B/4.1. Anyag és módszer

B/4.1.1. Mintagyűjtés

B/4.1.1.1. Circovírusok a balatoni halakban

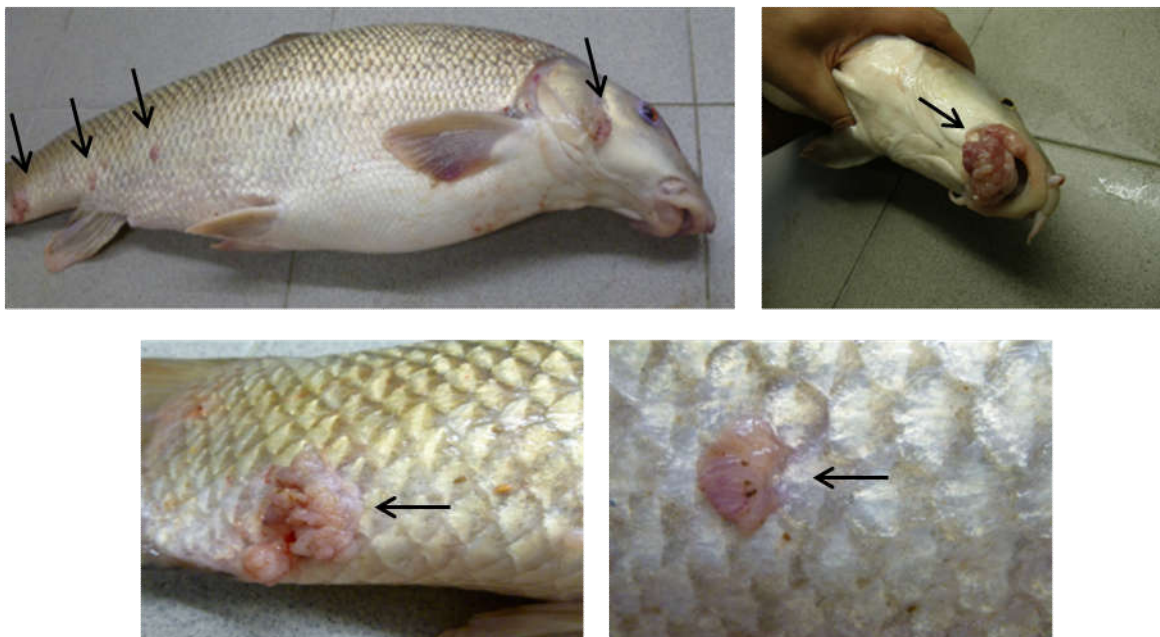
A felmérés során 2014-ben, egy éven át történt mintavétel, több különböző helyről (Siófok, Balatonszemes, Tihany). Összesen 14 különböző fajhoz tartozó, 163 egyedet vizsgáltunk meg circovírus jelenlétére. A halakat vízben, oxigénnel dúsított zsákokban, élve szállítottuk a laboratóriumban. MS-222-vel történő túllaltatást követően kezdtük meg a

boncolást. A szervekből (kopoltyú, máj, lép, vese, bél, agy és egy szervkeverék pool halanként a gyors PCR-es detektáláshoz) egyaránt mintát vettünk a molekuláris vizsgálatokhoz, illetve a sejten történő izoláláshoz.

A hal circovírusok sejten történő tenyésztése nem megoldott jelenleg, így a szakirodalomban is általánosan használt PCR módszert használtuk a CV kimutatásra, és az így kimutatott pozitív mintákon kíséreltük csak meg a vírusizolálást.

B/4.1.1.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

2014 novemberében, két kifejlett, tumoros kinövéseket mutató márna (70 cm, 4 kg) érkezett az intézetünkbe, melyeket a Duna Budapesthez közeli szakaszairól fogtak horgászok. Világos rózsaszín, bevonatszerű, illetve papillómás elváltozások a pikkelyeken, uszonyokon, és szájnyílás közelében egyaránt megfigyelhetőek voltak (41. ábra). Boncolást követően a szervekből (kopoltyú, máj, lép, vese, bél, agy) és az érintett tumoros területből is mintát vettünk molekuláris vizsgálatokhoz, illetve vírusizoláláshoz.



41. ábra: A két vizsgált márna makroszkópos felvételei, nyilakkal jelölve a főbb elváltozásokat.

B/4.1.2. Molekuláris vizsgálatok

A balatoni hal mintákból, illetve a Dunából gyűjtött márnák molekuláris vizsgálata részben hasonló módon zajlott. A szervekből történő DNS kivonás, a CV kimutatás és genom meghatározás, illetve a PCR termékek tisztítása, szekvenálása, filogenetikai elemzése is hasonló módszer szerint történt. Az egyes különbségeket külön jelöltem.

B/4.1.2.1. DNS kivonás

A kigyűjtött szövetek megközelítőleg 25 mg –jából történt a DNS kivonás a DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint.

B/4.1.2.2. PCR, polimeráz láncreakció

B/4.1.2.2.1. Circovirális DNS kimutatása

A circovirális DNS jelenlétét széles spektrumú nested (fészkes) PCR módszerrel végeztük (Halami és mtsai, 2008), a *rep* gén egy 350 nt nagyságú részét célozva. A PCR-t 25 µl-es végtérfigatban végeztük, DreamTaq DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific, USA), 10× DreamTaq puffer (20 mM MgCl₂-t tartalmaz), 0,2 mM dNTP, 0,2 µM-t az egyes primerekből (a felhasznált primerek szekvenciáit a Táblázat 11. tartalmazza), nukleázmentes vizet, és ehhez adtuk hozzá végül a 2 µl kivont DNS-t a mintából. A reakciót a Thermal Cycler Applied Biosystem 2720 (Thermo Fisher Scientific, USA) gépen futtatuk az alábbi hőprofilon:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	95°C	5 perc	1×
Denaturáció	94°C	30 másodperc	
Annelláció	46°C	1 perc	45×
Elongáció	72°C	1 perc	
Végső elongáció	72°C	5 perc	1×

A fészkes (nested) PCR második körét hasonló módon állítottuk össze, és futtattuk le, azzal a különbséggel, hogy ott az annelációs hőmérséklet 56°C volt.

B/4.1.2.2.2. CV genom meghatározás

A cirkuláris genom további részeinek meghatározásához szekvencia specifikus inverz nested PCR-t használtunk (Primerek a Táblázat 11.-ben). A reakcióelegy 10 µM-t tartalmazott az egyes primerekből, 1× PrimeSTAR Max Premixet (Takara Bio, Otsu, Japán), nukleáz mentes vizet (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), és 2 µl DNS-t, így a 50 µl-es végtérfigatot kaptunk. A reakció kivitelezésére ugyanazt a PCR gépet használtuk, mint a kezdeti *rep* szekvencia felerősítésére. A hőprofil az alábbiak szerint módosult:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc	1×
Denaturáció	98°C	10 másodperc	
Annelláció	55°C	15 másodperc	45×
Elongáció	72°C	10 másodperc	
Végső elongáció	72°C	3 perc	1×

Ha az inverz nested PCR sikertelen volt, ún. rolling circle amplifikációt végeztünk (RCA) hogy a genom hiányzó részeit fel tudjuk szaporítani. Ehhez a TempliPhi 100 Amplification Kit-et használtuk (GE Healthcare, Németország) a gyártó utasításai szerint. Az ily módon felamplifikált terméket SmaI restrikciós endonukleáz enzimmal hasítottuk, és kompetens *E. coli* sejtekbe juttattuk be a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével.

11. táblázat: Cirovírus kimutatásra, genom meghatározásra és vírusmennyiség meghatározásra használt primerek szekvenciái, a vizsgálatok során nyert genom szekvenciák génbanki azonosító számával

Nested PCR	PCR körök	Primer forward (5'-3')	Primer reverz (5'-3')	Referencia
Minden mintára – CV kimutatás	1	AGAGGTGGGTCTTCACNHTBAAYAA	AAGGCAGCCACCCRTARAARTCRTC	Halami és mtsai. 2008.
	2	AGCAAGGAACCCCTCAYYTBCARG G	ACGATGACTTCNGTCTTSMARTCACG	
Nested inverz PCR (db/ azonosító)				Génbanki genom szekvencia/Referencia
Bodorka CV (3)	1	TTGACGTGGCGAAAGAATCC	G TTCCTCGCTCTCTCTTTGC	-
	2	GTGATTATGTGAACGTGATG	TTCTTTGGTGCAGTACTCGT	
Dévérkeszeg CV (CN15)	1	ACATACCTTCGAGTTGGAACG	CTTCGTCAGATCCCACAGCA	-
	2	ATATAATGTTTCGGGCGTGCC	CCAGGTTCTCTTCAAGGGCA	
Dévérkeszeg CV (DK5)	1	CCAGGAAGCGATTTCAGGGA	TCATTGCGTTTGGCCCTGTC	-
	2	TGCGAGGCTCCCAATG	ACCGAGGAATCAAGGAGTAT	
EeCV-szerű angolna minták (10)	1	GCGCTTGAGGATTCTCATTC	CAGATCGTTCCTCTTCCCTT	KU951578-9
	2	GACTTTGGATGGAAGAAGCC	CCTTGTTATGCTGGTCGTTG	
Egyéb angolna (3) és garda (1) minták	1	GCGCTTGAGGATTCTCATGC	CAGATCGTTCCTCTTCCCTT	KU951580
	2	GACTTCGGATGGAAGAAGGA	CCTTGTTATGCTGGTCGTTG	
Inverz PCR				
Tumoros márnák (2)	1	GTGATTACGCCAACGTGATG	GCCCTTTGTGCAGTATTCGT	Lórinéz et al. 2011
qPCR	Próba (5'-FAM - - TAMRA -3')			
EeCV-szerű minták	CCGTGCTACCTTGGAAGGCTTCC	GGGACCTGTGAAGGAGTGG	AACATACAGCCGGTTTAGCC	KU951578-9
Cirkuláris cap	TTCATTTGAACATCGCCTTGAGCAA	CTCGGTTTCATCGCTTCACTA	CCAATACCAAACCAAGGTC	KU951581

B/4.1.2.2.3. Herpesz-, irido-, poxvírus kimutatás márnából

A kivont DNS-t különböző vírusok jelenlétére teszteltük PCR módszer segítségével. A Circovírus kimutatás és genom meghatározás mellett (B/4.1.2.2.1. és B/4.1.2.2.2.), egy széles spektrumú, herpesz-, irido-, és poxvírusok DNS polimerázát is kimutató próbát végeztünk el, melyet Hanson és munkatársai írtak le (2006). Az alábbi PCR mix-et állítottuk össze: 5 µl 10× DreamTaq Buffer, 4 µl 10 mM dNTP, 1,5 µl MgCl₂, 20 pmol az egyes primerekből, 2,5 U DreamTaq polimeráz, nukleáz mentes víz, 3 µl kivont DNS tettünk az 50 µl végtérfogat eléréséhez. A reakcióban használt primer szekvenciákat a 12. táblázatban tüntettem fel. Az alábbi hőprofil alkalmaztuk:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	93°C	1 perc	1×
Denaturáció	93°C	30 másodperc	
Annelláció	45°C	2 perc	45×
Elongáció	72°C	3 perc	
Végső elongáció	72°C	4 perc	1×

B/4.1.2.2.4. Herpeszvírus több génjének részleges meghatározása márnából

Herpeszvírus pozitív minták esetén megkíséreltük meghatározni a DNS polimeráz gén egy nagyobb szakaszát, illetve a termináz és helikáz gének egy-egy fragmentjét a Doszpoly és munkatársai által közölt PCR módszerrel (Doszpoly et al. 2015). Itt a PCR mixhez 34 µl nukleáz mentes vizet, 10 µl Phusion® 5X HF puffert, 1,5 µl dNTP-t (10 mM), 1 µl-t az egyes primerekből (50 pM), 0,5 µl Phusion® High-Fidelity DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific) és 2 µl kivont DNS-t mértünk össze egy reakcióhoz. A primerek szekvenciái a Táblázat 12-ben találhatóak). Mindhárom primer párhoz az alábbi hőprofil alkalmaztuk:

Szakaszok	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	98°C	3 perc	1×
Denaturáció	98°C	10 másodperc	
Annelláció	56°C	30 másodperc	45×
Elongáció	72°C	1 perc	
Végső elongáció	72°C	3 perc	1×

12. táblázat: A PCR-ekhez és szekvenálásokhoz használt primerek és szekvenciáik (A degenerált primerekben szereplő kevert bázisok: Y=C/T, W=A/T, R=A/G, S=G/C, K=G/T, N=A/C/T/G)

Kimutatni kívánt vírus/(gén)	Primerszekvenciák (5'-3')	Termék várható mérete	Referencia
HerpeszV/, IridoV/, PoxV/(DNS polimeráz)	F: cggaaattctaGAYTTYGCNWSNYTNTAYCC R: cccgaattcagatcTCNGTRTCNCCRTA	400 - 700 bp	Hanson et al. 2006.
Alloherpesviridae, Cyprinivirus genusz			
DNS polimeráz	F: GGN GCN ATG GTN CAR WSN ACN AA R: ACN GTN GCN GTR TTY TCR TAN GC	1100 bp	
Termináz	F: GCG CTG AGK ATG TCG TCY TTG R: YGA CAT CTA CAA GCC CGA CCA	1100 bp	Doszpoly et al. 2015
Helikáz	F: GTN GGN WSN GTN ACN CAR YT R: CCY TGR CAR AAR TAN GTR TTC AT	700 bp	

B/4.1.2.2.5. Kvantitatív, real-time PCR a balatoni CV felmérés során

Ahhoz, hogy információt nyerjünk a vírus esetleges szerv tropizmusáról, illetve a halak esetleges virémiás állapotáról, real-time PCR-t terveztük, úgy hogy egy kb 100 nt hosszú szakaszt erősítsen fel a *cap* génből, hogy meg tudjuk határozni az egyes szervek (kopolyú, máj, lép, vese, bél, agy) vírustartalmát. NanoDrop 2000 spektrofotométerrel meghatároztuk a szervminták DNS tartalmát a nukleinsav kivonást követően, és nukleázmentes vízzel történő hígítással mindegyiket 100 ng/μl koncentrációra állítottuk be. A primereket és a próba szekvenciáját Primer3 szoftverrel terveztük meg (Untergasser et al. 2012), ezek szintén a 11. táblázatban találhatóak. A reakciót az Applied Biosystem® StepOnePlus™ Real-Time PCR System gépével végeztük (Thermo Fisher Scientific). A reakcióelegy az alábbiakat tartalmazta: 1× Xceed qPCR Probe Mix (Institute of Applied Biotechnologies, Csehország), 0,4 μM az egyes primerekből, 0,2 μM a próbából, nukleázmentes víz (Thermo Fisher Scientific) és 100 ng kivont DNS-t tettünk 20 μl végtérfogatban. A hőprofil a gyártó utasításai és a primer szekvenciák alapján az alábbira állítottuk be: első lépésként az egyszálú DNS-t duplaszálúsítottuk az alábbi programmal: 70°C 5 perc, 60°C 30 másodperc, 72°C 5 perc, majd az amplifikációhoz az alábbiakat követtük: 95°C 3 perc, 40 cikluson keresztül: 95°C 5 másodperc, 60°C 20 másodperc. Az eredményeket a StepOne Software v2.1-el (Thermo Fisher Scientific) elemeztük. A standard görbe elkészítéséhez a *cap* gén egy 507 nt hosszú szakaszát erősítettük fel, mely tartalmazta real-time PCR cél-szekvenciáját. A terméket kitisztítottuk, és NanoDrop spektrofotométer segítségével meghatároztuk a DNS koncentrációt. A fragment molekulatömege és az Avogadro szám alapján meghatároztuk a *cap* fragment darabszámát 1 μl tisztított oldatra vetítve. Ebből készítettünk tízszeres hígítási sort, és ennek tagjait használtuk standerdként qPCR-ben.

B/4.1.2.2.6. Szekvenálás és szekvencia analízis

A B/4.1.2.2.1-4. során elkészült PCR termékeket 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd a megfelelő méretűeket kitisztítottuk a Gel/PCR Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) segítségével. A kitisztított fragmenteket a belső, 2. körös primerekkel megszekvenáltuk. Az RCA reakció segítségével nyert beklónozott fragmentekhez, a CloneJet Kit (Thermo Fisher Scientific) primereit használtuk.

A szekvenáló reakciót a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával állítottuk össze. A kapilláris elektroforézist az MTA SZBK Szekvenáló Platform munkatársai végezték ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific) segítségével. Az így nyert nukleotid szekvenciákat kijavítottuk, és összeillesztettük a MEGA5.2 szoftverrel (Tamura et al 2011).

B/4.1.2.2.6.1. Circovírusok a balatoni halakban

Az ORF-eket az NCBI honlapján található ORF Finder grafikai elemző programmal azonosítottuk. Az azonosított ORF-ek méretét és irányultságát, illetve a lehetséges virális géneket a Softberry portálon található online elemző programmal azonosítottuk: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfindv>.

A génbanki homológok keresését az NCBI szerverén található különböző BLAST algoritmusokkal (BLASTn, BLASTx) végeztük el. A nukleotid és aminosav alapú páronkénti távolságbecsléseket a MEGA5.2 szoftveren belül elérhető Maximum Composite Likelihood és p-distance algoritmusokkal végeztük.

B/4.1.2.2.6.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

A kimutatott CV filogenetikai vizsgálatához a teljes rep gén származtatott aminosav sorrendjét használtuk (275 as). Az AIC számítás alapján a legjobban illeszkedő Maximum

Likelihood aminosav szubsztitúciós model a WAG+I (WAG aminosav szubsztitúciós model, Whelan & Goldman, 2001 + Invariant sites). A bootstrap értékeket 1000 újra-mintavételezés alapján számítottuk, melyeket az elágazásoknál tüntettünk fel. Kulcsoportnak a PCV-1-t választottuk.

A márnákból kimutatott herpeszvírus részleges polimeráz-termináz-helikáz génszakaszait egymás után fűzve, egyben értékeltük ki, hogy egyszerre minél nagyobb fragmentet hasonlíthassunk össze a referencia szekvenciákkal. A nukleotid szekvenciák alapján kikövetkeztetett aminosav sorrendet használtuk az analízishez. A MEGA5.2 szoftvercsomaggal végzett elemzés szerint az Akaike Information Criterion (AIC) alapján a legjobban illeszkedő model a WAG+G (WAG+Gamma eloszlás) volt. Kulcsoportnak az *Ictalurid herpesvirus 2* megfelelő génszakaszait választottuk, az elágazások valószínűségét bootstrap módszerrel ellenőriztük 1000 újra-mintavételezés alapján.

B/4.1.3. Statisztikai számítások a qPCR eredmények elemzéséhez

A statisztikai szignifikancia vizsgálatokat a GraphPad Prism 4.00 programcsomag használatával készítettük el a Student-féle t-tesztet használva. 0.05, vagy annál kisebb p értéknél tekintettük az eltérést szignifikánsnak. Minden bemutatott qPCR eredmény legalább három párhuzamos mérés összesítéséből származik. A hibasávok az átlagtól vett standard eltérést mutatják (standard deviation, SD).

B/4.1.4. Vírusizolálás

A vírusizolálást Doszpoly és munkatársai (2014) által leírt módon végeztük mindkét esetben, melyet röviden ismertetek. Az izoláláshoz eltett szerv mintákat sterilizált homokkal és dörzsmozsárral homogenizáltuk. Sejtenyészítő medium felhasználásával 10% (w/v%) –ra hígítottuk, és 3% penicillin-streptomycin antibiotikummal (penicillin 300U/ml, streptomycin 300µg/ml) egészítettük ki. A szuszpenziót centrifugáltuk 2000×g –n 10 percig, majd a felülúszót 0,45 µm-es fecskendőszűrőn átszűrtük. A szűrlettel történő inokulációt követően a sejteket több különböző hőmérsékleten inkubáltuk és naponta ellenőriztük a sejtpusztító hatás (CPE, cytopathic effect) esetleges megjelenését. Egy hét elteltével átpasszáltuk a fertőzött sejteket és szintén naponta ellenőriztük a CPE megjelenését. Negatív kontrolnak az adott sejtvonal médiumával is elvégeztük az inokulációt.

B/4.1.4.1. Circovírusok a balatoni halakban

A vírusizoláláshoz EK-1 sejteket (eel kidney, angolna vese sejtvonal, Chen et al 1982) és L-15 médiumot használtunk. A szűrlettel három párhuzamos inokulációt végeztünk 80%-ban konfluens sejteken, 24-es sejtenyészítő lemezen (200 µl szuszpenzió per lyuk). A lemezeket három különböző hőmérsékleten inkubáltuk (15°C, 19°C és 22°C-on).

B/4.1.4.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

A PCR eredmények alapján feltételezhető volt herpesz, illetve circovírus jelenléte is, ezért megkíséreltük a vírusizolálást márna szervkeverékből (máj, lép, vese) EPC (epithelioma papillosum cypini) sejtvonalon. A szerveket a homogenizálás után EMEM médiummal hígítottuk, az antibiotikumok mellett, antimikotikum hozzáadásával is (Amphotericin B 0,75 µg/ml). A szűrlettel két párhuzamos fertőzést végeztünk, 1× és 10× -es hígításban inokuláltuk

a 25 cm²-s, 80 %-os borítottságú, EPC flaskákat. A flaskákat két különböző hőmérsékleten inkubáltuk (17°C és 20°C).

B/4.2. Eredmények

B/4.2.1. Circovírusok a balatoni halakban

B/4.2.1.1. CV detektálás

A 163 vizsgált halból, circovírus szerű szekvenciát mutattunk ki három bodorkából, két dévérkeszgeből, 20 angolnából és egy gardából. Teljes genom szekvenciát azonban csak 11 angolnából és egy gardából tudtunk meghatározni, így végső soron csak ezeket tekintettük CV pozitív mintáknak (6%-os (1/17) és 35,5%-os (11/31) előfordulást jelentett gardában és angolnában), a többi szekvenciát endogén virális elemnek (EVE) tekintettük korábbi irodalmi adatok alapján (Fehér et al. 2013, Marton et al. 2015). Továbbá, három angolna és a garda mintában RCA módszerrel, ezen felül egy kisebb, cirkuláris DNS szekvenciát mutattunk ki (CCE, Capsid-encoding Circular Element, kapszid kódoló cirkuláris elem), mely CV-szerű *cap* gént tartalmazott, de *rep* gént nem. A CV-szerű szakaszokat tartalmazó mintákról részletes információk találhatóak a 13-15. táblázatban.

13. táblázat: A gyűjtött minták halfajok és a gyűjtés időpontja szerint, zárójelben a CV pozitív eredmények szerepelnek (*rep+*), illetve a meghatározott genomszekvenciák (EeCV-1: angolna CV-1, EeCV-2: angolna CV-2, CCE – Capsid encoding Circular Element – kapszid kódoló cirkuláris elem)

2014	Március	Április	Május	Június	Szeptember
Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>)	2		4		3
Dévérkeszeg (<i>Abramis brama</i>)	3	4 (1 <i>rep+</i>)	2	3	11 (1 <i>rep+</i>)
Garda (<i>Pelecus cultratus</i>)	3 (1 EeCV-2 + CCE)		5	1	8
Karikakeszeg (<i>Blicca bjoerkna</i>)	3	2	3	-	1
Süllő (<i>Sander lucioperca</i>)	6	3	3	-	-
Kősüllő (<i>Sander volgensis</i>)	1	-	6	-	-
Ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)	2	-	1	-	3
Compó (<i>Tinca tinca</i>)	1	-	-	-	-
Balin (<i>Aspius aspius</i>)	2	-	2	-	1
Ezüstkárász (<i>Carassius gibelio</i>)	1	-	10	-	2
Angolna (<i>Anguilla anguilla</i>)	15 (3 EeCV-1) (3 <i>rep+</i>)	-	-	-	16 (7 EeCV-1 + 2 CCE) (1 EeCV-2 + CCE) (6 <i>rep+</i>)
Bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)	-	1 (1 <i>rep+</i>)	-	-	15 (2 <i>rep+</i>)
Szélhajtó kűsz (<i>Alburnus alburnus</i>)	-	3	-	2	-
Törpeharcsa (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	-	-	5	-	4

14. táblázat: Részletes információk a tanulmány során kimutatott részleges *rep* szekvenciákról. A nukleotid szekvencián alapuló hasonlóságok a már ismert hal CV-hoz zárójelben találhatóak

2014 / <i>rep</i> +	Március	Április	Szeptember
Dévérkeszeg (<i>Abramis brama</i>)		1 (99 % bodorka circo-szerű seq, Tarján et al. 2014, KF358278)	1 (98% hattyú CV (SwCV), Halami et al. 2008, EU056310)
Angolna (<i>Anguilla anguilla</i>)	<u>3</u> 2 (100% EeCV-2) 1 (69% BarCV; 70% ponty genom)		<u>6</u> 1 (99% EeCV-1) 4 (98% EeCV-2) 1 (97% EeCV-2; 95% EeCV-1)
Bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)		1 (69% BarCV, 70% ponty genom)	2 (69% BarCV; 70% ponty genom)

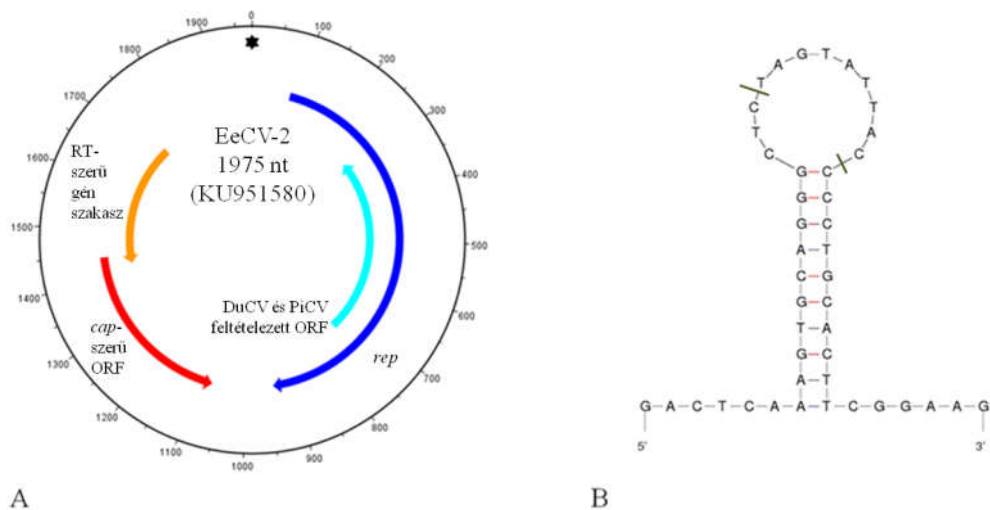
15. táblázat: A Rep fehérje megőrzött szakaszai, és irányultsága a hal circovírusoknál, Rosario et al. (2012) alapján. U= I, L, V, M, F, Y, W aminosavak. Jelen tanulmány eredményei csillaggal jelölve (*)

	Nonanukleotid szekv.	Rep irányultsága	RCR motívum			SF3 motívum		
			I	II	III	Walker-A	Walker-B	Motif-C
Circovirus	n t TAGTATTAC	+ szál	V I CFTLNN	PHLQG	S YCxK	PG GPSCxGKS	I VM I LDDF	UTSN
Cyclovirus	TAGTATTAC	- szál	C W VFTLNN	P xHLQG	S YCxK	PP GxtGxGKS	I I VUDDF	N UTSe
BarCV	TAGTATTAC	+	CFTLNN	PHLQG	YCTK	GDPGCSKS	IVDDF	VTSN
EcatfishCV	TAGTATTAC	+	VFTLNN	PHLQG	YCSK	GPPGCGKS	ILDDF	ITSN
Eel CV (EeCV-1)	TAGTATTAC	+	CFTLNN	PHSQG	YCSK	GIPGCGKS	ILDDF	ITSN
Angolna minták*	TAGTATTAC	+	CFTLNN	PHSQG	YCSK	GIPGCGKS	ILDDF	ITSN
Angolna (AN24) és garda minta*	TAGTATTAC	+	CFTLNN	PHLQG	YCSK	GIPGCGKS	IVDDF	ITSN

B/4.2.1.2. A genom szekvenciák elemzése

Tíz vizsgált angolnából sikerült meghatározni egy 1378 nt hosszú CV genomot, mely 99,9%-ban megegyezett nukleotid szinten és genomszerveződést tekintve is a korábban már leírt angolna circovírussal (EeCV, Doszpoly et al. 2014).

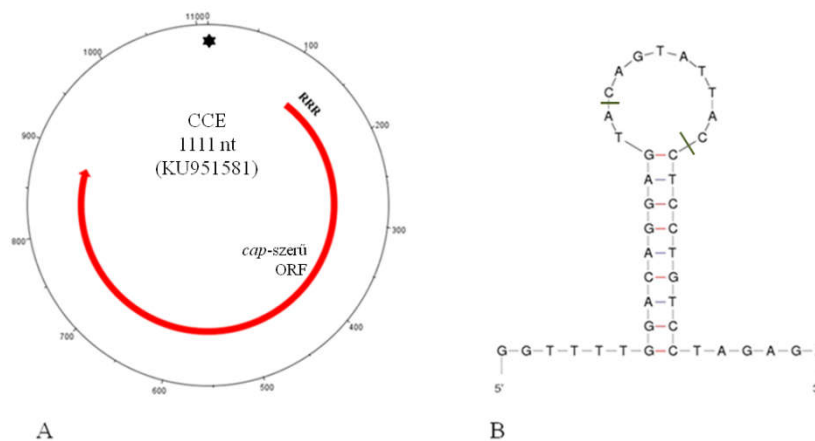
Egy angolna és egy garda mintában ugyanazt a genom szekvenciát detektáltuk (EeCV-2), mely mérete 1975 nt hosszúságú volt, átlagos G+C tartalma 47,2%. Ambiszenz genom szerveződést figyeltünk meg, a két fő ORF, melyek a Rep és Cap fehérjét kódolják, egymással ellentétes irányban helyezkedett el (42. ábra/A). A CV pecifikus szár-hurok szerkezet ugyancsak megtalálható volt rajta, 10 bp hosszú szárral és 12 nt hosszúságú hurokkal, mely az alábbi jól megőrzött nonanukleotid szekvenciát tartalmazta: 5'-TAGTATTAC-3' az 5' intergenikus régióban (42. ábra/B), mely sokkal hosszabb szakasznak adódott (~600 nt), mint amit az eddig felfedezett CV genomokból leírtak (29-207 nt) (Delwart & Li, 2012). Hasonlóan az EeCV-1-hez, a Rep fehérje 286 aminosavból áll, és tartalmazza a rolling circle replikációért felelős és az SF3 (superfamily III) virális helikáz konzervált doménjeit (Táblázat 15). A Rep fehérje a legnagyobb hasonlóságot az EeCV-1 Rep-jéhez mutatta, 85% aminosav szekvencián alapuló hasonlósággal. A 123 aminosav kódolta, vélhetően Cap fehérjét kódoló szekvencia 39% és 35% aminosav hasonlóságot mutatott egy humán fécészből azonosított CV-hez (HuACV, korábban NG13) és a harcsa CV-hez (EcatfishCV) (Li et al. 2010, Lőrincz et al. 2012), de nem mutatott homológiát az EeCV-1-ben található Cap-el. További két ORF-t azonosítottunk, a *cap* génnel megegyező orientációban. Az egyik ORF 468 nt hosszú, átfed a *rep* génnel, és homológiát mutat egy galamb és kacsza CV feltételezett génjével (Mankertz et al 2000, Chen et al 2006). A másik ORF 312 nt hosszú, és az 5' intergenikus régióban helyezkedik el. A szekvenciája megegyezett egy, az angolna genomból származó reverz-transzkriptáz gén darabbal (AZBK01506574), így azt feltételezzük, hogy ez egy, a gazda genomból származó fragmentum. Ez az első leírás egy olyan feltételezett génről a CV genomban, ami gazdaeredetre utal.



42. ábra: (A) Az EeCV-2 genom szerveződése, a szár-hurok szerkezet csillaggal jelölve, (B) a szár-hurok szerkezet nukleotid összetétele, zöld vonalakkal jelölve a nonanukleotid motívum kezdő- és végpontját

Továbbá, az EeCV-2-t tartalmazó garda és angolna mintában, illetve még két másik EeCV-1-t tartalmazó angolnából egy további cirkuláris DNS szekvenciáját is kimutattuk

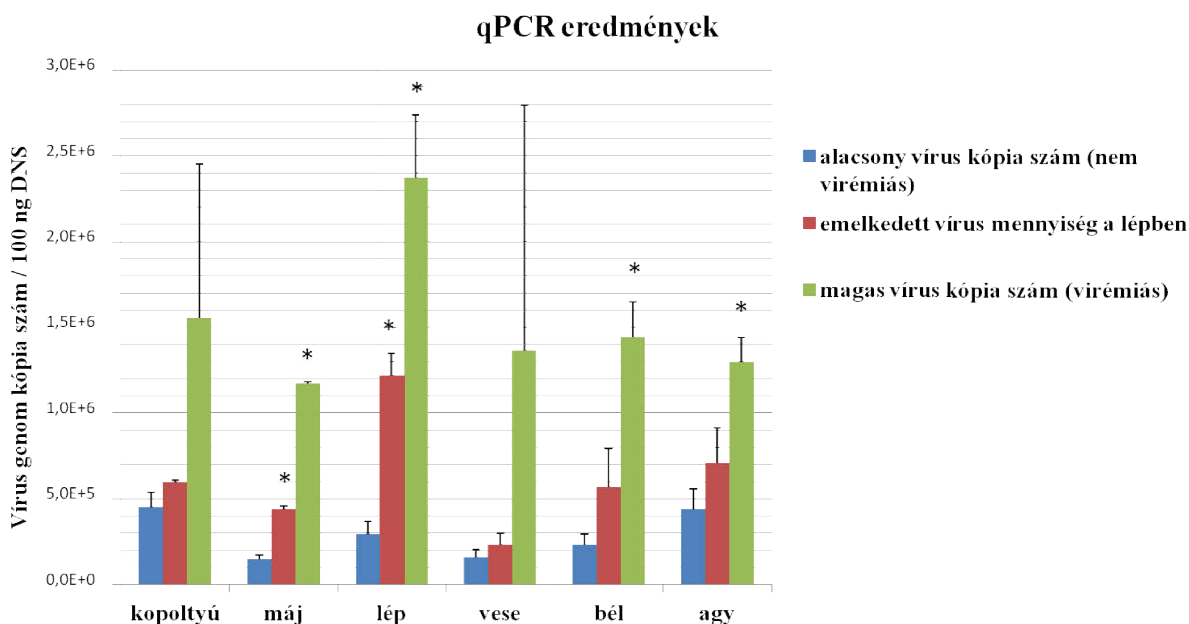
(CCE, Capsid-encoding Circular Element). A genom 1111 nt hosszú, G+C tartalma 43,7% (43. ábra/A). CV-okra jellemző szárhurok szerkezetet azonosítottunk, amely 9 bp hosszú szár és 11 nt hosszú hurok szakaszból áll, tartalmazva a megőrzött nonanukleotid motívumot (5'-CAGTATTAC-3') (43. ábra/B). A szekvencia nem tartalmazta a *rep* gént, habár azonosítottunk egy valószínűleg kapszid fehérjét kódoló gént, amely 255 aminosavat kódol. Az N terminális végén pedig megtalálható a CV-ra jellemző 23 as hosszú arginin gazdag régió (1-23as: MRRTVTEDGPPARRARPNSASRR). Az ehhez leginkább hasonlító fehérjék 29% és 26%-al vízi gerinctelenek (*Paphies subtriangulata*, *Penaeus monodon*) ssDNS vírusainak feltételezett Cap fehérjéi voltak (Dayaram et al. 2015, Pham et al. 2014). A teljes genom szekvenciák és a CCE szekvenciája a Génbankban az alábbi számokon elérhető: KU951578-81.



43. ábra: (A) A CCE genom szerveződése, jelölve a Cap kódoló gén arginin gazdag régióját (RRR) és a szár-hurok szerkezet elhelyezkedését (*). (B) A szár-hurok szerkezet nukleotid összetétele, zöld vonalakkal jelölve a nonanukleotid szekvencia kezdő- és végpontját

B/4.2.1.3. Kvantitatív PCR

Azokból az angolna mintákból, ahonnan a teljes EeCV-1 genomot ki tudtuk mutatni, az egyes szerveken (kopolyú, máj, lép, vese, bél, agy) elvégeztük a vírus genom mennyiségének abszolút meghatározását. A vizsgált nyolc angolna mindegyik szervében ki tudtuk mutatni a vírus jelenlétet (a kimutatási határ 6 kópia volt 20 μ l-es térfogatban). A különböző szervekben detektált vírusrészlet alapján három csoportot tudtunk elkülöníteni (44. ábra). Három angolna szerveiből egységesen alacsony kópiaszámot mutattunk ki ($10^5 - 5 \times 10^5/100$ ng DNS). A második csoportba két angolnát soroltunk, itt a többi szervhez képest a lépből szignifikánsan magasabb kópia számot mutattunk ki ($1,2 \times 10^6/100$ ng DNS). A harmadik csoportba három angolna került, itt a mindegyik vizsgált szervből meglehetősen magas vírusrészletet mutattunk ki ($1,2 \times 10^6 - 2,4 \times 10^6/100$ ng DNS).



44. ábra: Az EeCV-1 vírusrészecskéinek megoszlása a vizsgált szervek között, kvantitatív PCR alapján. A kimutatott vírusrészecske mennyiség alapján az egyedek három csoportba oszlottak, az egyikben mindegyik szervből alacsony vírus kópia számot mutattunk ki (kék, $<5 \times 10^5$ kópia/100 ng DNS, 3 egyed), a másodikban emelkedett vírusrészecske mennyiség volt megfigyelhető a lépben (piros, 2 egyed), a harmadik csoportban a vizsgált szervek mindegyikéből magas vírusrészecske számot detektáltunk (zöld, $>10^6$ kópia/100 ng DNS, 3 egyed). A csoportosított értékek átlagát és szórását jelenítettük meg a diagrammon, átlag \pm szórás értékeket Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze, *-al jelöltük, ahol $P < 0,001$

B/4.2.1.4. Vírusizolálás

Az EK-1 sejteken nem sikerült a vírus izolálása. Nem sikerült CPE-t kimutatni 14 nap után sem az első, sem a második passzázsban. Kvantitatív PCR segítségével ellenőriztük a kiindulási anyag és az egyes passzázsok CV tartalmát. Mindegyik passzázs után 10-szeres csökkenés volt tapasztalható a vírus kópia számában, ami megerősítette, hogy vírus szaporodás nem történt a sejteken.

B/4.2.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

B/4.2.2.1. CV detektálás és genomanalízis

A circovírust a márnák minden vizsgált szervéből ki tudtuk mutatni, a teljes genom szekvenciát is sikerült felamplifikálni, ami 99,9%-ban megegyezik a Lőrincz és munkatársai által leírt BarCV-1-el (2011). Mindkét szekvencia 1957 nt hosszúságú volt, és csupán 6 nukleotid eltérést találtunk a BarCV-1 és a jelenleg vizsgált szekvenciák között. A nukleotid cserékből 4 a *rep* gént érintette, 1 a *cap* gén, de ezek egyike sem járt aminosavsorrend változással.

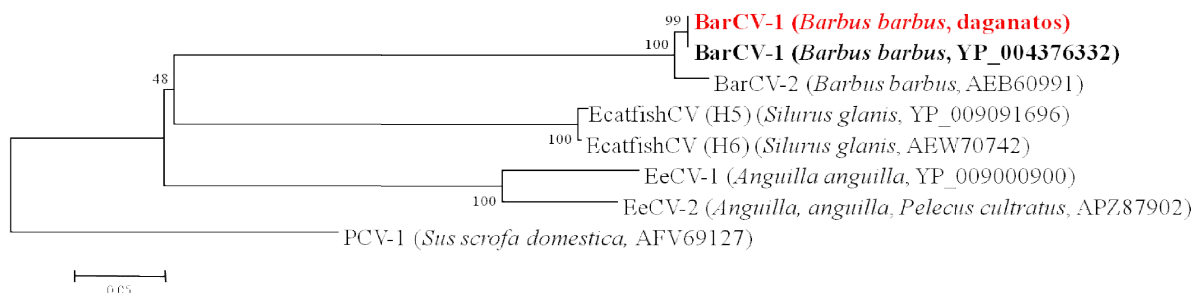
B/4.2.2.2. Herpeszvírus kimutatás és elemzés

A Hanson és munkatársai által leírt széles spektrumú dsDNS kimutatási módszerrel sikerült a *Cyprinid herpesvirus-1* (CyHV-1) szekvenciáját kimutatni az egyik márná veséjéből. Továbbá, már célzott vizsgálatokkal sikerült felszaporítanunk a virális polimeráz, termináz és helikáz génekből is egy-egy nagyobb szakaszt. A DNS polimeráz génből egy 787

bp hosszú fragmentet kaptunk, ami 99%-ban megegyezett a Génbankban található CyHV-1 DNS polimeráz gén (AY939868) megegyező szakaszával. Nyolc nukleotid különbséget tapasztaltunk a két szekvencia között, de egyik sem okozott aminosavsorrendbeli különbséget. A termináz génjéből 942 bp hosszú szekvenciát sikerült felszaporítanunk, mely 98%-os egyezést mutatott egy génbanki CyHV-1 izolátum azonos szakaszával (EU349288). A két gén közt 18 nukleotid eltérést tapasztaltunk, melyekből egy okozott aminosav változást is. A teljes fehérjét tekintve, az 508. as –ban volt eltérés, itt egy hisztidin helyett a márnában arginint találtunk. A helikáz génből egy 564 bp hosszú szakaszt határoztunk meg, mely 99%-bn megegyezett a CyHV-1 helikáz génjének génbanki szekvenciájával (AY939858). A szekvenciák közt mindössze 5 nukleotid különbséget mutattunk ki, melyek egyike sem okozott aminosav sorrendbeli eltérést.

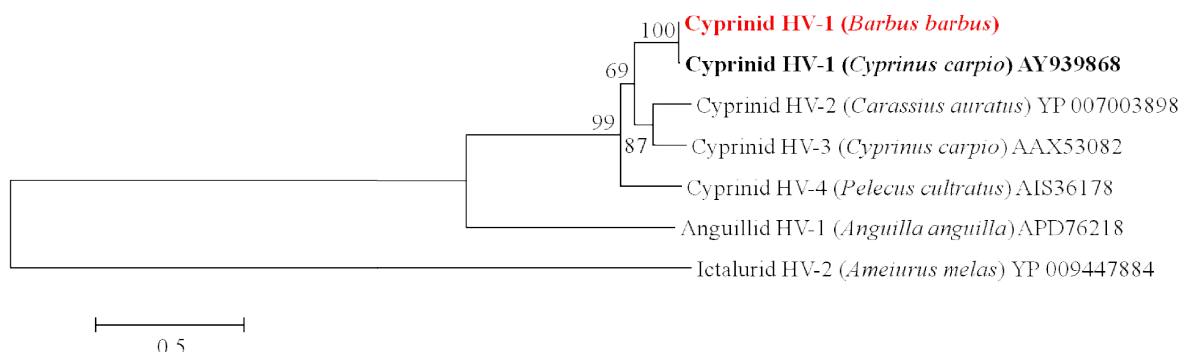
B/4.2.2.3. Filogenetikai analízis

A márnákból kimutatott CV rep génjének feltételezett aminosav szekvenciáját összevetettük a Génbankban fellelhető egyéb hal circovírusok hasonló szakaszával (275 as; 45. ábra). A tumoros márnából kimutatott Rep fehérje 99,9%-os as egyezést mutatott a Lőrincz és munkatársai (2011) által kimutatott BarCV Rep fehérjével.



45. ábra: Hal circovírusok filogenetikai fája a Rep fehérje alapján (275 as, WAG+I model). Külső csoportnak a PCV-1-t választottuk, a bootstrap értékeket az elágazásoknál tüntettük fel. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült száma

A kimutatott pontyhimlő részleges polimeráz, termináz és helikáz fragmentjeit egymás után fűzve 848 as hosszú szakaszt elemeztünk. Az analízis eredményét a 46. ábrán mutatom be. A márnából kimutatott összefűzött részleges polimeráz-termináz-helikáz fehérjék aminosavsorrendje 99,8%-os egyezést mutatott az eredeti, pontyokból leírt CyHV-1 megegyező szakaszaival.



46. ábra: A cyprinid herpesvírusok topológiája a részleges DNS polimeráz, termináz és helikáz egyesített aminosav szekvenciái alapján (848 aminosav, WAG+G modell). Külső csoportnak az Ictalurid herpesvirus 2-t használtuk, a bootstrap értékeket az elágazásoknál tüntettük fel. A méretarány az egy nukleotidra jutó szubsztitúciók becsült száma

B/4.2.2.4. Vírusizolálás

Az inokulálást követően nem tapasztaltuk CPE megjelenését az EPC sejtvonalon sem 17°C sem 20°C-on. Feltételezhetően sem a márna CV-t sem a CyHV-1-t nem sikerült izolálni a kísérlet ideje alatt.

B/4.3. Megbeszélés

Ezidáig a legtöbb halakból kimutatott vírus a tenyésztésbe vont fajokból került leírásra. A növekvő piaci igények miatt az akvakultúra fejlődésével egyre inkább előtérbe kerültek a hagyományos tógazdasági technológiákkal szemben az intenzív, szuperintenzív rendszerek, ahol a zsúfolt tartás, kezelési stressz, a vadon élő halakkal, vagy természetes vizekkel való érintkezés kedvezett a fertőzések felbukkanásának és a betegségek elterjedésének. Az új halfajok termelésbe vonásával, azok átvehetik a közelrokon fajok vírusait, illetve a saját, szórványosan megjelenő betegségeik felerősödhetnek, járványokat indíthatnak el, ezzel sokszor nagy gazdasági károkat is okozva. PhD munkám során a természetes vizekből származó, még nem tenyésztésbe vont halfajok virológiai vizsgálatait végeztük el, mely során a circovírusok széles körben való elterjedtségét és a pontyhímlő esetleges gazdaváltását figyeltük meg. Kutatási eredményeink alapján érdemes figyelemmel kísérni a természetes vizek halállományainak vírusfertőzöttségét, hiszen sokszor a haltenyésztő telepeken a beltenyésztettség okozta leromlás ellen, különböző tájegységekek természetes vizeiről begyűjtött anyagokkal is végzik a szaporítást. Egy ily módon behurcolt vírus nagy gazdasági károkat okozhat a tenyésztésben.

B/4.3.1. Circovírusok a balatoni halakban

Kutatómunkánk során a balatoni angolna populáció nagyfokú fertőzöttségét (35,5%-os prevalencia) tapasztaltuk EeCV-1-el. Továbbá, egy feltehetőleg új hal CV teljes genom szekvenciáját is azonosítottuk (EeCV-2) és kimutattunk egy ezektől eltérő, Cap proteint kódoló, cirkuláris ssDNS szekvenciát (CCE) is két eltérő halfajból (európai angolna, garda). Annak ellenére, hogy hal CV-t eddig tömeges elhullások kapcsán mutattak ki (márna és harcsa CV) (Lőrincz et al 2011, 2012), illetve az EeCV-1-t is egy karfiolbeteg angolnában detektáltak elsőként, a mostani felmérés során vizsgált egyedek semmilyen makroszkópikus patológiás elváltozást nem mutattak (Dospoly et al. 2014). A CV-okat immunszuppressziót okozó vírusokként írták le, de az eddig feltárt eseteknél sem tudtak közvetlen kapcsolatot kimutatni a megbetegedések és a CV jelenléte közt. Ugyanakkor a CV-ok jelenléte fokozza a gazdafaj más kórokozókra való fogékonyságát, így számos különböző klinikai tünetet képesek kiváltani (Todd 2004).

Tíz angolnából mutattunk ki EeCV-1-hez hasonló genom szekvenciákat, melyek csak 1-2 nukleotidban különböztek a Dospoly és munkatársai által vizsgált, 2009-ben szintén a Balatonból fogott angolnában detektált EeCV-1 genomtól. Habár ezek az egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP, single nucleotide polymorphisms) a Rep és Cap fehérjében is okoztak aminosav változásokat, a konzervált régiók (szár-hurok szerkezet, RCR, SF3) változatlanok maradtak. A nukleotid cserék száma meglehetősen alacsony volt ($1,45-2,9 \times 10^{-4}$ nukleotid csere/hely/év), figyelembe véve az 5 évnyi különbséget az első CV-os angolna és a jelenlegiek gyűjtése között. A PCV-2-nél az átlagos báziscserélődési arány az egész genomra vetítve $1,21 \times 10^{-3}$ nukleotid csere/hely/év volt (Firth et al 2009).

Angolna mintákban meghatároztuk az EeCV-1 DNS eloszlását a különböző szervek között. Korábbi tanulmányokban (sertés és hal CV-k) a vírustartalom meghatározásához a *rep* gén szekvenciáját vették alapul (McIntosh et al. 2008, Dospoly et al. 2014). De az utóbbi időben számos gerinces és gerinctelen gazdából kimutatott, gazda genomba integrálódott circovirális *rep*-szerű szakaszok miatt (Belyi et al., 2010; Fehér et al., 2013; Marton et al.,

2015), a vírusrészecske meghatározásához a *cap* gént vettük alapul. Az eltérő víruskópia számok alapján 3 csoportra különültek a minták. Az első csoportba három angolna tartozott, itt alacsonyabb kópiaszámokat detektáltunk az összes vizsgált szervben ($10^5 - 5 \times 10^5/100$ ng DNS), a magasabb értékeket a kopolyú, agy és lép mintákból kaptuk. A második csoportban szignifikánsan magasabb vírusrészecske mennyiséget mértünk a lépben két angolnánál ($1,2 \times 10^6/100$ ng DNS). Csontos halaknál (Osteichthyes) a lép az egyik fő nyirokszerv, mely ellipszoid rendszerből, melanomakrofág központokból és nyirokszövetből áll. Az ellipszoid rendszer fő feladata a gazdába jutott antigének elfogása és csapdázása (Ellis 2001, Uribe et al. 2011). A lépben megjelenő magasabb vírusrészecske mennyiség egy esetlegesen folyamatban lévő fertőzöttséget vagy akár virémiás állapotot is jelezhet, ha a többi szervben is hasonlóan magas vírusrészecske koncentráció mutatható ki. Az agyból kimutatott magas vírusrészecske tartalom jelezheti, hogy a vírus hathat a hal központi idegrendszerére, viselkedésbeli változásokat okozva. Amikor a harcsa CV-t kimutatták 2011-ben, harcsa ivadékokkal fertőzési kísérletet is összeállítottak. Néhány hónap után a legtöbb fertőzött hal abnormálisan kezdett úszni, pl. pörögtek a tengelyük körül, de a circovírust nem lehetett újra kimutatni belőlük (nem publikált eredmények). A harmadik csoportba három angolna került, melyeknél minden szervben magas vírusrészecske mennyiséget (több mint $10^6/100$ ng DNS) detektáltunk, a legmagasabbat a lépben ($2,4 \times 10^6/100$ ng DNS). Ezek az egyedek feltehetőleg virémiás állapotban voltak a gyűjtéskor.

A circovírusokat gazdaspecifikus, vagy szűk gazdasepektrumú vírusoknak ismertük eddig (Todd et al, 2007). Ennek ellenére egy feltehetőleg új CV-t (EeCV-2) mutattunk ki 100%-os azonossággal egy angolnából és egy gardából, melyeket az év során különböző időpontokban gyűjtöttünk és dolgoztunk fel. Amennyire tudjuk, ez az első leírás, hogy ugyanazt a circovírus genomot sikerült izolálni két távolrokon halfajból (különböző öregrendbe tartozó fajok). Az új CV *rep* génje 85% nukleotid egyezést mutat az EeCV-1-el, de érdekes módon a *cap* génnel semmilyen homológiát nem találtunk.

A nonanukleotid motívum, a *rep* gén irányultsága, és a Rep fehérje megőrzött szakaszainak aminosav összetétele alátámasztja az új CV helyét a *Circovirus* genuszon belül. A Walker-A és -B motívum minden hal CV-ban kicsit eltér a nem-hal gazdából származó circo- és cyclovírusokétól (Rosario et al. 2012). Hasonlóan az EeCV-1 megegyező régiójához, az EeCV-2 Cap fehérjéje is viszonylag rövid, 123 as-ból áll, habár szekvencia hasonlóságot nem sikerült felfedezni a két vírusfehérje közt. Továbbá, a CV-okra jellemző arginin gazdag szakaszt sem sikerült azonosítani a gén N-terminális részén. Mégis sikerült 39% és 35% -os aminosav egyezést találni a HuACV és az Ecatfish CV megfelelő szakaszaival. Ez az eredmény megegyezik egyrészt a korábbi feltételezéssel, miszerint a hal circovírusok és a HuACV közeli rokonságban állnak (Dospoly et al. 2014), másrészt a legújabb ICTV közleménnyel is (2014.006a,hD), mely szerint elkülönülnek a többi CV-tól. Az EeCV-2 szokatlanul hosszú 5' intergenikus szakasza tartalmaz egy részleges reverz-transzkriptáz (RT)-szerű gén fragmentet is, mely 99%-os szekvencia azonosságot mutat az angolna RT génjével. Ez a felfedezés valószínűsíti a vírus angolna eredetét, és ezt követően a gardára történő gazdaváltást. Az ssDNS vírusok és gazdáik közt már mindkét irányba leírták a genetikai anyag rekombinációval történő átjutását (Martin et al 2011). A CV-oknál a virális elemek gazda genomba épülése gyakori eseménynek számít (Belyi et al. 2010, Fehér et al. 2013, Marton et al. 2015), ugyanakkor ez az első leírás egy gazdából származó szekvencia darab CV genomba épülésének. Az EeCV-1 és az új CV teljes genomjai egymással 74,8%-os nukleotid egyezést mutatnak, de a Cap szekvenciák hasonlósága kevesebb, mint 15%. Ezek alapján az új CV teljesíti az ICTV circovírusokra vonatkozó faj elkülönülés feltételeit, így javasoljuk az EeCV-2 (*European eel circovirus 2*, angolna CV-2) elnevezést az újonnan felfedezett vírus genomnak. Az EeCV-1-t az ICTV még nem fogadta el vírus fajnak a Cap protein rövidege miatt (114 as), kétségek merültek fel, hogy ebből működőképes kapszid

tudjon összeépülni. Az EeCV-2 hasonlóan rövid *cap* génnel rendelkezik (123 as). Így további kutatások célja lehet olyan expressziós rendszerek kifejlesztése, mely segítségével a két vírus kapszid fehérjéje kifejeztethető.

RCA módszerrel kimutattunk egy cirkuláris, monocisztronos, megfelelő méretű Cap fehérjét (255 as) kódoló ssDNS genomot, melyet CCE-nek (Capsid-encoding Circular Element), kapszid kódoló cirkuláris elemnek neveztünk. A szár-hurok szerkezetében található nonanukleotid motívum nagy hasonlóságot mutat egyes madár és környezeti CV-k hasonló szakaszával (Phenix et al., 2001; López-Bueno et al. 2009; Rosario et al. 2009a), és a feltételezett Cap protein hasonlóságot mutat vízi gerinctelenek CV-aihoz. A CV-kra jellemző arginin gazdag szakasz is megtalálható rajta a fehérje N terminális részén. A CV-vel mutatott hasonlóságok ellenére a cirkuláris elem mérete és szerkezete alapján a növényeket fertőző nanovírusokra hasonlít. Ezek szintén egyszálú DNS vírusok, genomjuk több cirkuláris részre osztott, melyek egyenként nagyjából 1 kb hosszúak, részenként egy-egy gént kódolnak (Gronenborn 2004). A felfedezés felveti a lehetőségét a több alegységből álló circo-szerű vírusok jelenlétének, melyek akár egy új víruscsalád tagjaként a hiányzó kapcsot jelenthetik a CV-k és nanovírusok között (Rosario et al. 2012).

Miután mindkét EeCV genom kisméretű Cap proteint kódol, felmerült a gyanú, hogy megfelelő Cap-et kódolva a CCE szolgál az EeCV-k kiegészítő részeként, együtt alkotva egy több alegységből álló vírust. Azonban a CCE-t csak 4 mintából sikerült kimutatnunk (az EeCV-2-t tartalmazó garda és angolna mintákból, illetve két EeCV-1-el fertőzött angolnából). Továbbá, a több alegységből álló vírusoknál a genomkomponensek nem kódoló régiói ugyanazt a szár-hurok szekvenciát tartalmazzák (Katul et al 1997), ilyen közös szekvenciaszakaszt nem találtunk a CCE-vel. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy bár ezek a cirkuláris elemek nem alkotnak közösen egy vírust az EeCV-1-el vagy EeCV-2-vel, de funkcionálhatnak szatellit vírusként, melyek az EeCV-1-t és EeCV-2-t helper vírusként használják.

B/4.3.2. Papillómás elváltozások dunai márnákon

A halak alloherpeszvírusai sok fontos megbetegedésért felelősek az akvakultúrában. Látens fertőzőként perzisztálnak az érintett populációban és naiv gazdákat fertőzhetnek meg a betegség kiújulásakor, vagy vertikális transzmisszió során az utódokba is átkerülhet a vírus. Az herpeszvírusok által okozott betegségek gyakran speciális hőmérséklethez és kiváltó stresszhelyzethez kötődnek. A betegségek kezelése alapvetően a vírus hordozó halak eltávolításán, illetve a stressz minimalizálásán múlik (pl. a népesítés minimalizálása a legfogékonyabb korosztályban és hőmérsékleten). A látens alakot nehéz kimutatni és sok alloherpeszvírus esetében nehézkes a sejtenyészeten történő izolálás. Kimutatásuk kihívás a diagnosztikai laboratóriumoknak. A megőrzött gének azonosítása és a degenerált PCR módszerek használata lehetővé teszi a vírusok minél gyorsabb, pontosabb kimutatását. Így a herpeszvírusok esetében különösen fontos a diagnosztikai módszerek fejlesztése.

A márnából általunk kimutatott herpeszvírus részleges polimeráz, termináz és helikáz fehérjei együttesen, csaknem 100% -os aminosav sorrend egyezést mutattak a *Cyprinid herpesvirus 1* megegyező szakaszával. A márnákon megfigyelt elváltozások megjelenési formája és szezonális jellege szintén jellemző volt a klasszikus pontyhimlőre.

Az eset érdekessége, hogy a CyHV-1-t eddig szigorú gazdaspecifikusságot mutató vírusként ismertük, ami a pontyon kívül nem fertőz más halfajt. Azonban, a márnákból egyidejűleg kimutatott CV fertőzöttség okozhatta az immunrendszer oly mértékű csökkent működését, ami kedvezett a márnák pontyhimlővel való fertőződésének, és a tumorok kifejeződésének.

Néhány esetben pontyhimlőhöz hasonló tüneteket már más cyprinid halfajokon is észleltek, pl. dévérkeszeg, bodorka, compó (Mawdesley-Thomas & Bucke, 1967, 1968) de

vírus jelenlétét nem igazolták a mintákból. Mawdesley-Thomas és Fraser (1972) szerint a hámsérülések is növelhetik a tumorok kialakulásának kockázatát. Az aljazaton táplálkozó halaknál gyakran figyelték meg a száj, mellúszók, bajusz képletek neopláziás elváltozását. Feltételezésük szerint a sérüléseken keresztül a rákkeltő vegyszerek, illetve az onkogén vírusok könnyebben utat találnak a szervezetbe, mint a sértetlen hámfelületen keresztül. Barnes és munkatársai (1993) megfigyelése szerint az úgymond bolygatott, gyakran dörzsölődő testfelszíneken az elváltozások epidermális hiperpláziaként jelennek meg, viszont a védettebb területeken, ahol nem dörzsölődnek le, az elváltozások képesek papillómává fejlődni. Az általunk vizsgált márnákon a tumorok előfordulása inkább a Mawdesley-Thomas és Fraser által leírt elhelyezkedésnek felelt meg. Papillómákat a kopolyúfedőnél, illetve a szájnyílás és a faroknyél alsó részén figyeltünk meg, hiperplázia testszerte, szórványosan fordult elő, a dörzsölődésnek kevésbé kitett részeken.

A vírusfertőzések mellett a vízszennyezés szerepét sem lehet kizárni a daganatok kialakulásában, ugyanakkor ez az első eset, hogy halakban, CV fertőzöttség mellett más vírus jelenléte is kimutatható volt, patológiás elváltozásokat is okozva az állaton.

ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám során megismerkedhettem a nyálkaspórák paraziták Magyarországon leggyakrabban előforduló taxonómiai egységeivel. Eközben olyan kevésbé kutatott, ám gyakori halfajok myxozoa faunáját is mélyrehatóan vizsgáltuk, melyekről eddig nagyon kevés információ állt rendelkezésünkre, sokszor csak egy-egy 20. század eleji, kizárólag spóra morfológián alapuló, külföldi fajleírás. Így, hiánypótló munkaként tanulmányoztuk egy gyakori folyóvízi halfajt, a paduc és egy állóvizekben gyakori, ikonikus halunk, a garda nyálkaspórák parazitáit. A felmérésnek köszönhetően paducból három, gardából két új *Myxobolus* faj került leírásra. A gardával kapcsolatban külön említésre méltó, hogy egy balatoni halpusztulás kapcsán fedeztük fel a szem retina rétegét és a kopolyúív afferens artériáját fertőző két fajt. A következő egy évben lezajló folyamatos monitoring vizsgálatok viszont arra is rávilágítottak, hogy az elhullásért ezek a paraziták nem tehetők felelőssé.

A bodorka nyálkaspórák fertőzöttsége ugyan jól tanulmányozott, de eddig erről a halról nem írtak le a szaruhártyát érintő megbetegedést. Az eset érdekessége, hogy a myxozoaéknál általánosan jellemző gazdafaj, szerv és szövetspecifitás itt csak részlegesen valósult meg. A szemből ugyanazt a *Myxobolus fundamentalis* fajt mutattuk ki, mint amit eddig csak a kopolyúív kötőszövetes állományából írtak le. A plazmódiumok a szaruhártyának szintén a tömött rostos kötőszöveti részében helyezkedtek el, akárcsak a kopolyúívben, ami jól jelzi a szövetspecifitás elsőbbségét a szervspecifitással szemben.

Ugyanezt tapasztaltuk a meglehetősen gyakori *Thelohanellus nikolskii* fertőzéseknél is. Itt a parazita az uszony és a pikkely kollagénes porcos részében egyaránt képzett jól látható plazmódiumokat. Ivadék korban általában az uszony-forma a domináns, kifejlett korban a pikkelyeken fejlődő alak. A *Thelohanellusok* vizsgálata során három lehetséges új fajt is azonosítottunk, így jócskán növelve az eddig hazánkban előforduló *Thelohanellus* fajok diverzitását. Az új fajok mellett újra kimutattuk a Kis-Balatonból a *T. kitauei* aktinospóra alakját, de a halakon megjelenő fertőzöttséget a célzott fertőzési kísérlet ellenére sem találtunk, sem a kísérletben, sem a kis-balatoni területéről származó halakon.

Emellett, sügerek szájpaddlásáról leírtunk egy új *Henneguya* fajt, a *H. jaczoi*-t, továbbá már ismert fajok revízióját javasoltuk. A *H. psorospermica*-t eddig tévesen csuka, és sügér kopolyúból is leírták, a morfológia- és lokációbeli különbségek ellenére. A 18S rDNS-en alapuló molekuláris módszerek segítettek egyértelmű különbséget tenni az eltérő gazdáiban fejlődő nyálkaspórák fajok között. Munkánk során megállapítást nyert, hogy a csuka kopolyú filamentumát fertőző faj továbbra is a *H. psorospermica*, míg a sügér kopolyúlemezkéi közül izolált parazita a *H. texta*-nak feleltethető meg.

A PhD dolgozat alapját képező kutatásokban egyértelmű szerepet kaptak a molekuláris módszerek. Használatukkal biztosabban eldönthető az adott parazitáról, hogy megegyezik-e már korábban leírt fajokkal, vagy új fajt sikerült kimutatnunk. Továbbá az aktinospóra-myxospóra párok azonosítását is lényegesen megkönnyíti, akár több év elteltével, eltérő helyről gyűjtött spórák is megegyezhetnek, ugyanakkor a morfológiailag nagy hasonlóságot mutató spórák is tartozhatnak eltérő fajhoz. A kérdéses esetekben, több gén bevonásával végzett vizsgálatok tovább finomíthatják a kapott eredményt, akár patogenitásbeli különbségekre is választ kaphatunk.

A dolgozatban szereplő vírusos kutatásokban is fő szerepet játszottak a PCR alapú molekuláris módszerek. A klasszikus, sejten történő izolálással összehasonlítva, jóval gyorsabb eredményt kaphatunk célzott primerek használatával. A módszer további előnye, hogy akár kis mennyiségű vírus jelenléte is detektálható az adott mintából.

Az egyre nagyobb számban kimutatott egyszerű, cirkuláris DNS vírusok fertőzésekben betöltött szerepe a mai napig nem minden esetben tisztázott. Ennek megismeréséhez kulcsfontosságú prevalenciájuk felmérése, az egészségesnek látszó egyedekben is, és a bizonytalan kóroktanú megbetegedések kapcsán egyaránt.

A balatoni halállomány circovírusokat célzó felmérése kapcsán az angolna CV (EeCV-1) meglehetősen gyakori előfordulását figyeltük meg. Azonban, a vírus első kimutatásával ellentétben, ezeken az állatokon patológiás elváltozás nem volt megfigyelhető, még a magas vírus mennyiséget hordozó angolnák esetében sem. Emellett egy, az angolna CV-hoz hasonló cirkuláris genomot (EeCV-2) is kimutattunk egy angolna és egy garda mintából egyaránt. A vírus tartalmazott egy angolna genom eredetű génszakaszt is, így nagy valószínűséggel a vírus eredeti gazdája az angolna lehetett, és gazdaváltás útján került a gardába. Az EeCV-1 és EeCV-2 pozitív minták egy részéből egy további cirkuláris genomot is kimutattunk, mely csupán egy *cap* gént tartalmazott, *rep*-et nem. Ennek szerepe még tisztázatlan, hasonló genomszerveződést eddig csak növényi vírusoknál figyeltek meg.

A CV-ok jellemzően immunszuppressziót okoznak a fertőzött egyedekben, így azok általánosan fogékonyabbá válnak a többi kórokozóra. Ez a jelenség segíthette a márnák fertőződését az eddig alapvetően ponty-specifikusnak ismert *Cyprinid herpesvirus 1*-el. A sejtburjánzással járó elváltozásokat már több halfaj esetében is leírták, de ez az első eset, hogy a herpeszvírus jelenléte, molekuláris módszerekkel egyértelműen bizonyított.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A kopoltyúparazitának ismert *Myxobolus fundamentalis* kimutatása a bodorka szaruhártyájából is (Acta Vet Hung, 2018, 66:250-257)
2. Paducból három új nyálkaspórási parazita faj leírása (*Myxobolus arrabonensis*, *M. szentendrensis* és *M. paksensis*)
3. Gardából két új nyálkaspórási faj kimutatása (*Myxobolus peleci* és *M. cultrati*) (Syst Parasitol, 2016, 93:667-677)
4. Sügérből egy új nyálkaspórási faj leírása (*Henneguya jaczoi*) és két, már ismert parazita revíziója (*H. psorospermica*, *H. texta*) (Acta Vet Hung, bíráló alatt)
5. A magyarországi *Thelohanellus* fajok diverzitás felmérése során, három, eddig nem detektált *Thelohanellus* faj kimutatása molekuláris módszerekkel (benyújtás alatt)
6. Egy új circovírus (EeCV-2) kimutatása és teljes genomjának megszekvenálása angolnából, és detektálása egy távol rokon halfajból (garda) (Acta Vet Hung, 2017, 65:262-277)
7. Egy monocisztronos, eddig ismeretlen, csak kapszid fehérjét kódoló cirkuláris genom azonosítása garda és angolna mintából (Acta Vet Hung, 2017, 65:262-277)
8. *Cyprinid herpesvirus 1* jelenlétének igazolása molekuláris módszerekkel pontytól eltérő halfajból (benyújtás alatt)

LIST OF NEW FINDINGS

1. Detection of the gill parasite *Myxobolus fundamentalis* also from the cornea of the roach (Acta Vet Hung, 2018, 66:250-257)
2. Description of three new *Myxobolus* species from common nase (*M. arrabonensis*, *M. szentendrensis* and *M. paksensis*) (Syst Parasitol, 2015, 92:101-111)
3. Description of two new myxozoan species from sichel (*Myxobolus peleci*, *M. cultrati*) (Syst Parasitol, 2016, 93:667-677)
4. Detection of a new *Henneguya* species from perch (*H. jaczoi*) and the revision of two, already described species (*H. texta*, *H. psorospermica*) (Acta Vet Hung, under revision)
5. During the diversity survey of *Thelohanellus* species in Hungary, three unidentified *Thelohanellus* species were detected with molecular methods (under submission)
6. Detection and whole genome sequencing of a new circovirus (EeCV-2) from an eel and a sichel sample (Acta Vet Hung, 2017, 65:262-277)
7. Description of a new, monocistronic, CV-like genome from a sichel and three eel samples, coding only a capsid protein (Acta Vet Hung, 2017, 65:262-277)
8. The presence of *Cyprinid herpesvirus 1* was proved first time with molecular methods from a non-carp species (under submission)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Székely Csabának, hogy mindig bízott bennem, egyengette a kutatói pályafutásomat, és lehetővé tette számomra a részvételt rengeteg belföldi- és külföldi tanulmányúton, konferencián, hogy szélesíthessem látókörömet és elmélyíthessem a már meglévő tudásomat. Szeretném megköszönni társ-témavezetőmnek, Dr. Nagy Szabolcsnak, hogy bármilyen problémával fordultam hozzá, mindig számíthattam a segítségére.

Köszönöm továbbá Dr. Molnár Kálmánnak, hogy fáradhatatlanul igyekezett átadni azt a rengeteg tudást, amit ő az évek során összegyűjtött. Köszönöm Dr. Doszpoly Andornak, hogy minden lehetséges segítséget megadva, lehetővé tette számomra, hogy foglalkozni tudjak hal virológiával.

Köszönet illeti továbbá témacsoportunk volt, és jelenlegi munkatársait, Dr. Cech Gábort, Dr. Sellyei Boglárkát, Sándor Dianát, Varga Ádámot, Dr. Egyed Lászlót, Dr. Varga Zsuzsát, Dr. Muhammad Hafiz Borkhanuddint, és Ostoros Györgyit, akik szakmai és baráti támogatására mindig számíthattam.

Továbbá köszönönettel tartozom a Pannon Egyetem, az MTA ATK ÁOTI, a NÉBIH ÁDI, és az Állatorvostudományi Egyetem minden olyan volt és jelenlegi munkatársának, aki bármilyen formában segítette a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni szüleimnek, testvéremnek és férjemnek, hogy mindig mellettem álltak és támogattak, ezen a kihívásokkal teli pályán.

A disszertációban szereplő kutatások nem valósulhattak volna meg a KTIA-AIK-12-1-2013-0017 (Bioklíma), az OTKA K 100132, Horizon2020 – ParaFishControl és az OTKA PD 104315 pályázatok nélkül.

A mintavételek és halkórtani vizsgálatok elvégzéséhez szükséges engedélyek száma: EHVF/121-1/2014, HHgF/110-4/2016 és VA/KTF02/1977-7/2016.

Hivatkozások jegyzéke

- Adriano EA, Arana S, Alves AL, Silva MR, Ceccarelli PS, Henrique-Silva F., Maia AAM (2009) *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny and histopathology. *Vet Parasitol* 162:221-229.
- Aguiar JC, Adriano EA, Mathews PD (2017) Morphology and molecular phylogeny of a new *Myxidium* species (Cnidaria: Myxosporea) infecting the farmed turtle *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in the Brazilian Amazon. *Parasitol Int* 66:825–830.
- Alama-Bermejo G, Raga JA, Holzer AS (2011) Host-parasite relationship of *Ceratomyxa puntazzi* n. sp (Myxozoa: Myxosporea) and sharpnose seabream *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) from the Mediterranean with first data on ceratomyxid host specificity in sparids. *Vet Parasitol* 182:181–192.
- Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C (1998) Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142:467–468.
- Anderson CL, Canning EU, Okamura B (1999) Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology* 119:555–561.
- Andree KB, El-Matbouli M, Hoffman RW, Hedrick RP (1999) Comparison of 18S and ITS-1 rDNA sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis*. *Int J Parasitol* 29:771–775.
- Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP (2007) Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J Virol* 81:5058–5065.
- Atkinson SD, Bartošová-Sojtková P, Whipps CM, Bartholomew JL (2015) Approaches for Characterising Myxozoan Species. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Cham, p 111–123.
- Auerbach M (1910) Die Sporenbildung von *Zschokkella* und das System der Myxosporidien. *Zool Anz* 35:240-256.
- Awerinzew S (1913) *Myxobolus magnus* nov. sp. *Zool Anzeig* 42:75-76.
- Azevedo C, Corral L, Matos E (1997) Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. *Syst Parasitol* 37:111–114.
- Balbani EG (1860) Note sur un cas de parasitisme improprement pris pour un mode de reproduction des Infusiores ciliés. *C R Acad Sci* 51:319-322.
- Baltimore D (1971) "Expression of animal virus genomes". *Bacteriol Rev* 35:235–41.

- Barnes A, Owen AG, Feist SW, Bucke D (1993) An investigation into the occurrence of epidermal hyperplasia and papilloma in barbel (*Barbus barbus* L.) from a river in southern England. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 13:115-118.
- Barta JR, Martin DS, Libetator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 83:262–271.
- Bartholomew JL, Atkinson SD, Hallett SL, Lowenstine LJ, Garner MM, Gardiner CH, Rideout BA, Keel MK, Brown JD (2008) Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int J Parasitol* 38:1199–1207.
- Bartholomew JL, Whipple MJ, Stevens DG, Fryer JL (1997) The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *J Parasitol* 83:859–868.
- Bartošová P, Fiala I, Hypša V (2009) Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol* 53:81–93.
- Bartošová P, Fiala I, Jirků M, Cinková M, Caffara M, Fioravanti ML, Atkinson SD, Bartholomew JL, Holzer AS (2013) *Sphaerospora sensu stricto*: Taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Mol Phylogenet Evol* 68:93–105.
- Bartošová-Sojtková P, Hrabcová M, Pecková H, Patra S, Kodádková A, Jurajda P, Týmľ T, Holzer AS (2014) Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *Int J Parasitol* 44:565–577.
- Baska F, Molnár K (1988) Blood stages of *Sphaerospora* spp. (Myxosporea) in cyprinid fishes. *Dis Aquat Org* 5:23–28.
- Beijerinck MW (1898) "Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter". *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam (in German)*. 65: 1–22. Translated into English in Johnson, J., Ed. (1942) *Phytopathological classics*. (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) 7:33–52.
- Békési L, Rátz F, Szabó E (1979) Adatok az ún. pontyhímlő (epithelioma papulosum) oktatához. *Magy Allatorvosok* 34:101-104.
- Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM (2010) Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: the parvoviridae and circoviridae are more than 40 to 50 million years old. *J Virol* 84:12458–12462.
- Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo CG, Todd D (2011) Family *Circoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Fields BS, Lefkowitz EJ (Eds.), *Virus Taxonomy. IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier, London, pp. 99–123.
- Bjork SJ, Bartholomew JL (2010) Invasion of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) and comparison of migration to the intestine between susceptible and resistant fish hosts. *Int J Parasitol* 40:1087–1095.

- Blinkova O, Victoria J, Li Y, Keele B, Sanz C, Ndjanga JB, Peeters M, Travis D, Lonsdorf EV, Wilson ML, Pusey AE, Hahn BH, Delwart EL (2010) Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *J Gen Virol* 91:74–96.
- Booy FP, Trus BL, Davison AJ, Steven AC (1996) The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus. *Virology* 215:134–141.
- Borkhanuddin MH (2013) Studies on fish parasitic myxozoans in Lake Balaton, Hungary and in freshwater and marine biotopes in Malaysia [egyetemi doktori disszertáció]. Pannon Egyetem, Keszthely.
- Breitbart M, Varsani A (2015): Establish the genus Cyclovirus in the family Circoviridae; creating 28 new species in the family (2014.006b-eD). ICTV Taxonomy History for Cyclovirus, Virus Taxonomy: 2015 Release, EC 47, London, UK
- Briolay J, Galtier N, Brito RM, Bouvet Y (1998) Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9:100–108.
- Bütschli O (1881) Myxosporidien. *Zoologischer Jahresbericht für 1880* 1:162–164.
- Bütschli O (1882) Myxosporidia. *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreiches*. Protozoa 1:590-603.
- Canning EU, Curry A, Feist SW, Longshaw M, Okamura B (2000) A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J Eukaryot Microbiol* 47:456-468.
- Canning EU, Curry A, Hill SLL, Okamura B (2007) Ultrastructure of *Buddenbrockia allmani* n. sp. (Myxozoa, Malacosporea), a parasite of *Lophopus crystallinus* (Bryozoa, Phylactolaemata). *J Eukaryot Microbiol* 54:247-262.
- Canning EU, Okamura B (2004) Biodiversity and evolution of the myxozoa. *Adv Parasitol* 56:43–131.
- Canning EU, Okamura B, Curry A (1996) Development of a myxozoan parasite *Tetracapsula bryozoides* n.g., n.sp. in the body cavity of *Cristatella mucedo* (Bryozoa, Phylactolaemata). *Folia Parasitol* 43:249–261.
- Canning EU, Tops S, Curry A, Wood TS, Okamura B (2002) Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn, *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *J Eukaryot Microbiol* 49:280-295.
- Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PS, Maia AAM (2013) Molecular Phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* Genera with Several New South American Species. *PLoS One* 8.
- Carstens E (2010) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch Virol* 155:133–146.
- Cech G, Borzák R, Molnár K, Székely Cs (2015) Three new species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxobolidae) infecting the common nase *Chondrostoma nasus* (L.) in the River Danube. *Syst Parasitol* 92:101-111.

- Cech G, Molnár K, Székely Cs (2012) Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjæ* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitol* 57:354–366.
- Chang ES, Neuhof M, Rubinstein ND, Diamant A, Philippe H, Huchon D, Cartwright P (2015) Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:14912–14917.
- Chen CL, Wang PX, Lee MS, Shien JH, Shien HK, Ou SJ, Chen CH, Chang PC (2006) Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus. *Avian Dis* 50:92–95.
- Chen SN, Ueno Y, Kou GH (1982) A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) kidney. *Proc Natl Sci Counc POC* 6:93–100.
- Cheung AK (2003) Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and non-pathogenic circoviruses. *Virology* 310:41–49.
- Cheung AK (2004) Palindrome regeneration by template strand switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. *J Virol* 8:9016–9029.
- Ching H, Munday D (1984) Geographic and seasonal distribution of the infectious stage of *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950, a myxozoan salmonid pathogen in the Fraser River system. *Can J Zool* 62:1075–1080.
- Cohn L (1895) Über die Myxosporidien von *Esox lucius* and *Perca fluviatilis*. Inaugural Dissertation, Albertus Universität, Königsberg, 48 pp.
- Cone DK, Horner RW, Hoffman GL (1990) Description of *Myxobolus corneus* (Myxosporidia): a new species from the eyes of Bluegill from Illinois. *J Aquat Anim Health* 2:132-134.
- Cságola A, Lőrincz M, Tombácz K, Wladár Z, Kovács E, Tuboly T (2012) Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes* 44:75–79.
- Danek T, Kalous L, Vesel T, Krasova E, Reschova S, Rylkova K, Kulich P, L MP, Pokorová D, Knytl M (2012) Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). *Dis Aquat Organ* 102:87–95.
- Davison AJ (1992) Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* 186:9–14.
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 154:171–177.
- Davison AJ, Kurobe T, Gatherer D, Cunningham C, Korf I, Fukuda H, Hedrick RP, Waltzek TB (2013) Comparative genomics of carp herpesviruses. *J Virol* 87:2908–2922.
- Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86:41–53.

- Dayaram A, Goldstien S, Argüello-Astorga GR, Zawar-Reza P, Gomez C, Harding JS, Varsani A (2015) Diverse small circular DNA viruses circulating amongst estuarine molluscs. *Infect Genet Evol* 31:284–295.
- Delwart E, Li L (2012) Rapidly expanding genetic diversity and host range of the *Circoviridae* viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res* 164:114–121.
- Desser SS, Molnar K, Weller I (1983) An ultrastructure study of the myxosporeans, *Sphaerospora angulata* and *Sphaerospora carassi*, in the common carp, *Cyprinus carpio*. *J Parasitol* 69:415–422.
- Dixon PF (2008) Virus diseases of cyprinids. In: *Fish Diseases* (ed. by J.C. Eiras, H. Segner, T. Wahli & B.G. Kapoor), Science Publishers, Enfield, NH, USA pp. 87–184.
- Donec ZS, Shulman SS (1984) Knidosporidii (Cnidosporidia). In: O. N. Bauer (Ed.), *Key to the determination of parasites of freshwater fishes of the USSR* 1:88–251. Leningrad: Nauka (in Russian).
- Doszpoly A, Benko M, Bovo G, Lapatra SE, Harrach B (2011a) Comparative analysis of a conserved gene block from the genome of the members of the genus *Ictalurivirus*. *Intervirology* 54:282–289.
- Doszpoly A, Benko M, Csaba G, Dan A, Lang M, Harrach B (2011b) Introduction of the family *Alloherpesviridae*: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. *Magy Allatorvosok Lapja* 133:174–181.
- Doszpoly A, Papp M, Deákné PP, Glávits R, Ursu K, Dán Á (2015) Molecular detection of a putatively novel cyprinid herpesvirus in sichel (*Pelecus cultratus*) during a mass mortality event in Hungary. *Arch Virol* 160:1279–1283.
- Doszpoly A, Tarján Z, Glávits R, Müller T, Benkő M (2014) Full genome sequence of a novel circo-like virus detected in an adult European eel *Anguilla anguilla* showing signs of cauliflower disease. *Dis Aquat Organ* 109:107–115.
- Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9:267–276.
- Dujardin MF (1845) *Historie naturelle des Helminthes ou vers intestinaux*. Paris, p 644.
- Dyková I, Lom J (1978) Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneguya*. *J Fish Biol* 12:197–202.
- Dyková I, Lom J (1982) *Sphaerospora renicola* n. sp., a myxosporean from carp kidney, and its pathogenicity. *Z Parasitenkd-Parasitology Res* 68:259–268.
- Dyková I, Pecková H, Kostka M (2008) Introduction of *Mayorella gemmifera* Schaeffer, 1926 into Phylogenetic Studies of Amoebozoa. *Acta Protozoologica* 47:205–210.
- Dyková I, Tysl T, Kostka M (2011) Xenoma-like formations induced by *Soricimyxum fegati* (Myxosporidia) in three species of shrews (Soricomorpha: Soricidae), including records of new hosts. *Folia Parasitol* 58:249–256.

- Egusa S, Nakajima K (1981) A new Myxozoa *Thelohanellus kitauei*, the cause of intestinal giant cystic disease of carp. *Fish Pathol* 15:213-218.
- Eiras JC (2002) Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 52:43–54.
- Eiras JC (2005) An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles. *Acta Parasitol* 50:267–275.
- Eiras JC, Adriano EA (2012) A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Syst Parasitol* 83:95–104.
- Eiras JC, Molnár K, Lu YS (2005) Synopsis of the genus *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 61:1-46.
- Eiras JC, Zhang JY, Molnár K (2014) Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Syst Parasitol* 88: 11–36.
- Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25:827–839.
- El-Mansy A (2005) Revision of *Myxobolus heterosporus* Baker, 1963 (syn. *Myxosoma heterospora*) (Myxozoa: Myxosporidia) in African records. *Dis Aquat Org* 63:205-214.
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1998) Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporidian stage in *Tubifex tubifex*. *Int J Parasitology* 28:195-217.
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1999) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporidian stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 35:1–12.
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J Fish Biol* 46:919–935.
- Emery C (1909) I missosporidii sono Protozoi? *Monit Zool Ital* 22:247.
- Eszterbauer E (2002) Molecular biology can differentiate morphologically indistinguishable myxosporean species: *Myxobolus elegans* and *M. hungaricus*. *Acta Vet Hung* 50:59–62.
- Eszterbauer E (2004) Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporidia) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. *Dis Aquat Org* 58:35–40.
- Eszterbauer E, Kallert DM, Székely Cs, Molnár K (2005) The phylogeny of the genus *Henneguya* (Myxosporidia: Bivalvulida) on the basis of 18S rDNA sequences. 12th EAFP International Conference on ‘Diseases of Fish and Shellfish’, 11th–16th September 2005, Copenhagen, Denmark.

- Eszterbauer E, Marton S, Rácz OZ, Letenyi M, Molnár K (2006) Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification. *Syst Parasitol* 65:97-114.
- Eszterbauer E, Székely Cs (2004) Molecular phylogeny of the kidney parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp. from goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Acta Vet Hung* 52:469-478.
- Evans NM, Holder MT, Barbeitos MS, Okamura B, Cartwright P (2010) The phylogenetic position of Myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. *Mol Biol Evol* 27:2733-2746.
- Fantham HB, Porter A, Richardson LR (1939) Some Myxosporidia found in certain fresh water fishes in Quebec Province. Canada. *Parasitol* 31:1-77.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) *Virus Taxonomy: eighth report of the international committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego.
- Fehér E, Székely C, Lőrincz M, Cech G, Tuboly T, Singh HS, Bányai K, Farkas SL (2013) Integrated circoviral rep-like sequences in the genome of cyprinid fish. *Virus Genes* 47:374-377.
- Feist SW, Longshaw M (2006) Phylum Myxozoa. In: Woo PTK (ed) *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*, vol 42, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, pp 230-296.
- Feist SW, Longshaw M, Canning EU, Okamura B (2001) Induction of Proliferative Kidney Disease (PKD) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Richardson) via the bryozoan *Fredericella sultana* (Blumenbach, 1779), infected with *Tetracapsula bryosalmonae* Canning, Curry, Feist, Longshaw & Okamura, 1999. *Dis Aquat Org* 45:61-68.
- Feist SW, Morris DJ, Alama-Bermejo G, Holzer AS (2015) Cellular Processes in Myxozoans. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Cham, p 139-154.
- Ferguson JA, Atkinson SD, Whipps CM, Kent ML (2008) Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *J Parasitol* 94:1322-1334.
- Fiala I (2006) The phylogeny of *Myxosporea* (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int J Parasitol* 36:1521-1534.
- Fiala I, Bartošová P (2010) History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *Bmc Evol Biol* 10:13.
- Fiala I, Bartošová-Sojtková P, Okamura B, Hartikainen H (2015b) Adaptive Radiation and Evolution Within the Myxozoa. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Cham, p 69-84.
- Fiala I, Bartošová-Sojtková P, Whipps CM (2015a) Classification and Phylogenetics of Myxozoa. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Cham, p 85-110.

- Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC (2009) Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J Virol* 83:12813–12821.
- Freeman MA, Kristmundsson A (2015) Histozoic myxosporeans infecting the stomach wall of elopiform fishes represent a novel lineage, the Gastromyxidae. *Parasit Vectors* 8.
- Freeman MA, Shinn AP (2011) Myxosporean hyperparasites of gill monogeneans are basal to the Multivalvulida. *Parasit Vectors* 4
- Goia I, Cordeiro NDS, Artigas PDT (1986) *Henneguya intracornea* new species (Myxozoa, Myxosporea) of eye parasite of *Astyanax scabripinis* Jenyns, 1842 (Osteichthyes, Characidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 81:474-478.
- Gómez D, Bartholomew J, Sunyer JO (2014) Biology and Mucosal Immunity to Myxozoans. *Dev Comp Immunol*, 43:243–256.
- Grigoras I, Timchenko T, Grande-Perez A, Katul L, Vetten HJ, Gronenborn B (2010) High variability and rapid evolution of a nanovirus. *J Virol* 84:9105–9117.
- Gronenborn B (2004) Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet Microbiol* 98:103–109.
- Gunter NL, Whipps CM, Adlard RD (2009) *Ceratomyxa* (Myxozoa: Bivalvulida): Robust taxon or genus of convenience? *Int J Parasitol* 39:1395–1405.
- Gurley RR (1894) The Myxosporidia or Sporosperms of fishes and the epidemics produced by them. *Rep U S Fish Comm* 26:65–304.
- Ha HJ, Anderson IL, Alley MR, Springett BP, Gartrell BD (2007) The prevalence of beak and feather disease virus infection in wild populations of parrots and cockatoos in New Zealand. *N Z Vet J* 55:235–238.
- Haaparanta A, Tellervo-Valtonen E, Hoffman RW (1994) Pathogenicity and seasonal occurrence of *Henneguya creplini* (Protozoa, Myxosporea) on the gills of perch *Perca fluviatilis* in Central Finland. *Dis Aquat Org* 20:15–22.
- Halami MY, Nieper H, Muller H, Johne R (2008) Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res* 132:208–212.
- Hallett S, Atkinson S, Bartholomew J, Székely C (2015) Myxozoans Exploiting Homeotherms. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Cham, p. 125-135.
- Hallett SL, Diamant A (2001) Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Dis Aquat Org* 46:197–212.
- Hanson LA, Rudis MR, Vasquez-Lee M, Montgomery RD (2006) A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virol J* 3:28.

- Hartigan A, Wilkinson M, Gower DJ, Streicher JW, Holzer AS, Okamura B (2016) Myxozoan infections of caecilians demonstrate broad host specificity and indicate a link with human activity. *Int J Parasitol* 46:375–381.
- Hartikainen H, Gruhl A, Okamura B (2014) Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Mol Phylogenet Evol* 76:261–269.
- Hedrick RP, Baxa DV, Kinkelin PD, Okamura B (2004) Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitol Res* 92:81–88.
- Hedrick RP, MacConnell E, Kinkelin PD (1993) Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annu Rev Fish Dis* 3:277–290.
- Hedrick RP, McDowell TS, Mukkatira K, Georgiadis MP, MacConnell E (2001) Susceptibility of three species of anadromous salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J Aquat Anim Health* 13:43–50.
- Hemananda T, Mohilal N, Bandyopadhyay PK, Mitra AK (2009) Two new Myxosporidia (Myxozoa: Myxosporidia) of the genus *Myxobolus* Bütschli, 1882 from cornea of *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) caught from a fish farm in India. *North-West J Zool* 5:165–169.
- Henderson M, Okamura B (2004) The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proc Biol Sci* 271:1729–1736.
- Holland JW, Okamura B, Hartikainen H, Secombes CJ (2011) A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proc Biol Sci* 278:546–553.
- Holzer AS, Hartigan A, Patra S, Pecková H, Eszterbauer E (2014) Molecular fingerprinting of the myxozoan community in common carp suffering Swim Bladder Inflammation (SBI) identifies multiple etiological agents. *Parasit Vectors* 7:398.
- Holzer AS, Pecková H, Patra S, Brennan NP, Yanes-Roca C, Main KL (2013) Severe glomerular disease in juvenile grey snapper *Lutjanus griseus* L. in the Gulf of Mexico caused by the myxozoan *Sphaerospora motemardini* n. sp. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2:124–130.
- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2003) Tracing the route of *Sphaerospora truttae* from the entry locus to the target organ of the host, *Salmo salar* L., using an optimized and specific in situ hybridization technique. *J Fish Dis* 26:647–655.
- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2004) Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporidians and actinosporidians based on their 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 34:1099–1111.
- Holzer AS, Wootten R, Sommerville C (2007) The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa. *Int J Parasitol* 37:1281–1295.
- ICTV, 2014. Virus Taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses. <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>.

- Ikeda I (1912) Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of a new actinomyxidian *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Arch für Protist* 25:240–272.
- Iwanowski D (1892) "Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze". *Bulletin Scientifique publié par l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Pétersbourg / Nouvelle Serie III* (in German and Russian). St. Petersburg. 35:67–70. Translated into English in Johnson, J., Ed. (1942) *Phytopathological classics* (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) 7:27–30.
- Jaczó I (1940) Vizsgálatok a Balaton halainak Myxosporidiáin I. *Magyar Biol Kut Munk* 12:227-285.
- Janiszewska J (1957) Actinomyxidia II. New systematics, sexual cycle, description of new genera and species. *Zoologica Pol* 8:3-34.
- Janiszewska J (1955) Actinomyxidia. Morphology, ecology, history of investigations, systematics, development. *Acta Parasitol Pol* 2:405-443.
- Jeney G (1979) The Occurrence of *Thelohanellus dogieli* Achmerov, 1955 (Myxosporidia) on Carp (*Cyprinus carpio*) in Fish Ponds in Hungary. *Parasit Hung* 12:19-21.
- Jiménez-Guri E, Philippe H, Okamura B, Holland PWH (2007) *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. *Science* 317:116–118.
- Jirků M, Fiala I, Modrý D (2007) Tracing the genus *Sphaerospora*: rediscovery, redescription and phylogeny of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporidia, Sphaerosporidae), with emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology* 134:1727–1739.
- Jurine LL (1825) *Historie des poissons du lac Lemman. Mem. Soc. Phys. His. Nat., Vol. 3.*
- Kallert DM, Bauer W, Haas W, El-Matbouli M (2011) No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish. *Int J Parasitol* 41:271–276
- Kallert DM, El-Matbouli M, Haas W (2005) Polar filament discharge of *Myxobolus cerebralis* actinospores is triggered by combined non-specific mechanical and chemical cues. *Parasitology* 131:609–616.
- Karlsbakk E, Kristmundsson A, Albano M, Brown P, Freeman MA (2017) Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. comb. (Myxosporidia), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina. *Parasitol Int* 66:952–959
- Katul L, Maiss E, Morozov SY, Vetten HJ (1997) Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* 233:247–259.
- Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T (2012) Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin Infect Dis* 54:1046–1052.

- Kelley GO, Waltzek TB, McDowell TS, Yun SC, Lapatra SE, Hedrick RP (2005) Genetic relationships among herpes-like viruses isolated from sturgeon. *J Aquat Anim Health* 17:297–303.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshow M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C (2001), Recent Advances in Our Knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48:395-413.
- Kent ML, Hedrick RP (1985) PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in pacific salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa. *J Protozool* 32:254–260.
- Kent ML, Hedrick RP (1986) Development of the PKX myxosporean in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis Aquat Org* 1:169–182.
- Kent ML, Khattra J, Hedrick RP, Devlin RH (2000) *Tetracapsula renicola* n. sp (Myxozoa : Saccosporidae); The PKX myxozoan - The cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *J Parasitol* 86:103–111.
- Kent ML, Margolis L, Corliss JO 1994. The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grasse, 1970, *Can J Zool* 72:932-937.
- Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV (2006) The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct* 1:29.
- Kovács-Gayer E (1983) Histopathological studies on protozoan swim bladder inflammation of common carp fry. *Parasitol Hung* 16:39–46.
- Kudo R (1919) Studies on Myxosporidia: A synopsis of genera and species of Myxosporidia. III: *Biol. Monograf* 5:1-256.
- Kudo R (1933) A taxonomic consideration of Myxosporidia. *Trans Am Microsc* 52:195–216.
- Landsberg JH, Lom J (1991) Taxonomy of the genera of the *Myxobolus/Myxosoma* group (Myxobolidae: Myxosporia), current listing of species and revision of synonyms. *Syst Parasitol* 18:165–186.
- Lefevre P, Lett JM, Varsani A, Martin DP (2009) Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J Virol* 83:2697–2707.
- Li L, Desser SS (1985) The protozoan parasites of fish in two lakes of Algonquin Park, Ontario. *Can J Zool* 61:1846-1858.
- Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjanga JB, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E (2010) Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol* 84:1674–1682.
- Li YC, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporia: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus spp.*) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicas*). *Parasitol Res* 112:1991-2003.

- Lieberkühn L (1854) Notice sur les psorospermies. Bull Acad Roy Belg 21:21-23.
- Lieberkühn L (1855) Les psorospermies des Poissons, Mem. Cour. Et mem, sav, etrang. Tbid 26:36-38.
- Liu XH, Batueva MD, Zhao YL, Zhang JY, Zhang QQ, Li TT, Li AH (2016) Morphological and molecular characterisation of *Myxobolus pronini* n. sp (Myxozoa: Myxobolidae) from the abdominal cavity and visceral serous membranes of the gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in Russia and China. Parasit Vectors 9:562.
- Liu XH, Voronin VN, Dudin AS, Zhang JY (2016) Morphological and molecular characterization of *Myxobolus mucosus* sp n. (Myxosporea: Myxobolidae) with basifilamental sporulation in two cyprinid fishes, *Rutilus rutilus* (L.) and *Leuciscus leuciscus* (L.) in Russia. Parasitol. Res 115:1297-1304.
- Liu Y, Whipps CM, Nie P, Gu ZM (2014) *Myxobolus oralis* sp. n. (Myxosporea: Bivalvulida) infecting the palate in the mouth of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Cypriniformes: Cyprinidae). Folia Parasitol 61:505–511.
- Liu Y, Yuan J, Huang M, Zhou Z, Gu Z (2014) Supplemental description of *Thelohanellus wuhanensis* Xiao & Chen, 1993 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the skin of *Carassius auratus gibelio* (Bloch): ultrastructural and histological data. Parasitol Int 63:489-491.
- Lom J & Vávra J. (1961) Mucous envelope as a taxonomic character in cnidosporidian spores. J Protozool 8:18.
- Lom J (1969) On a new taxonomic character in myxosporidia, as demonstrated in description of two new species of *Myxobolus*. Folia Parasitol 16:97-103.
- Lom J, Arthur JR (1989) A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. J Fish Dis 12:151-156.
- Lom J, de Puytorac P (1965) Studies on the myxosporidian ultrastructure and polar capsule development. Protistologica 1:53–65.
- Lom J, Dyková I (1992) Chapter 7 Myxosporidia (Phylum Myxozoa). In: Lom J, Dyková I (eds) Protozoan parasites of fishes. Developments in aquaculture and fisheries sciences, Elsevier, Amsterdam 26:159–235.
- Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol 53:1–36.
- Lom J, Dyková I, Pavlásková M, Grupcheva G (1983) *Sphaerospora molnari* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), an agent of gill, skin and blood sphaerosporosis of common carp in Europe. Parasitology 86:529–535.
- Lom J, Dyková I. 1997, Ultrastructural features of the actinosporean stagephase of Myxosporea (Phylum Myxozoa): a comparative study. Acta Protozool 36:83-103.
- Lom J, McGeorge J, Feist SW, Morris D, Adams A. (1997) Guidelines for the uniform characterisation of the actinosporean stages of parasites of the phylum Myxozoa. Dis Aquat Org 30:1-9.

- Lom J, Noble ER (1984) Revised classification of the class Myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Parasitol* 31:193–205.
- Lom J, Pavlásková M, Dyková I (1985) Notes on kidney infecting species of the genus *Sphaerospora* Thélohan (Myxosporea), including a new species *S. gobionis* sp. nov., and on myxosporean life cycle stages in the blood of some freshwater fish. *J Fish Dis* 8:221–232.
- Lom J, Pavlasková M, Dyková I (1987) Brain thelohanellosis due to *Thelohanellus oculileucisci* (Myxozoa, Myxosporea) in *Gobio gobio*. *Folia Parasitol* 34:375–377.
- Lom J, Vavra J (1965) Notes on the morphogenesis of the polar filament in *Henneguya* (Protozoa: Cnidosporidia). *Acta Protozool* 3:57–60.
- López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A (2009) High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science* 326:858–861.
- Lőrincz M, Cságola A, Farkas SL, Székely C, Tuboly T (2011) First detection and analysis of a fish circovirus. *J Gen Virol* 192:1817–1821.
- Lőrincz M, Dán Á, Láng M, Csaba G, Tóth GÁ, Székely C, Cságola A, Tuboly T (2012) Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*). *Arch Virol* 157:1173–1176.
- Manera M, Biavati S (1999) Branchial osteogenetic neoplasm in barbel *Barbus barbus plebejus*. *Dis Aquat Org* 37:231–236.
- Mankertz A, Hattermann K, Ehlers B, Soike D (2000) Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145:2469–2479.
- Mankertz J, Bulk HJ, Blaess G, Mankertz A (1998) Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16:267–276.
- Markiw ME, Wolf K (1983) *Myxosoma cerebri* (Myxozoa: Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J Protozool* 30:561–564.
- Marquès A (1984) Contribution à la connaissance des Actinomyxidies: ultrastructure, cycle biologique, systématique. PhD. Thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 218. pp.
- Marquès A (1987) La sexualité chez les Actinomyxidies: étude chez *Neoactinomyxon eiseniellae* (Ormières et Frézil, 1969), Actinosporea, Noble, 1980; Myxozoa, Grassé, 1970. *Ann Sci Nat Zool Paris* 8:81–101.
- Martin DP, Biagini P, Lefeuvre P, Golden M, Roumagnac P, Varsani A (2011) Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 3:1699–1738.
- Marton S, Eszterbauer E (2011) The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore. *Folia Parasitol* 58:157–163.
- Marton S, Ihász K, Lengyel G, Farkas SL, Dán Á, Paulus P, Bányai K, Fehér E (2015) Ubiquiter circovirus sequences raise challenges in laboratory diagnosis: the case of honey bee and bee mite, reptiles, and free living amoebae. *Acta Microbiol Immunol Hung* 62:57–73.
- Mawdesley-Thomas LE, Bucke D (1967) Fish pox in the roach (*Rutilus rutilus* L.). *Vet Rec* 81:56.

- Mawdesley-Thomas LE, Bucke D (1968) A lipoma in a bream (*Abramis brama* L.). *Vet Rec* 82:673-674.
- Mawdesley-Thomas LE, Fraser WD (1972) The conservation of fish. *Br Vet J* 128:337-346.
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117:90–104.
- McIntosh KA, Harding JC, Parker S, Krakowka S, Allan G, Ellis JA (2008) Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *Can Vet J* 49:1189–1194.
- Milne I, Wright F, Rowe G, Marshal DF, Husmeier D, McGuire G (2004) TOPALi: Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20:1806–1807.
- Minchew CD (1977) Five New Species of *Henneguya* (Protozoa: Myxosporida) from Ictalurid Fishes. *J Eukaryot Microbiol* 24:213-220.
- Minson A, Davison A, Eberle R, Desrosiers R, Fleckenstein B, McGeoch DJ, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ (2000) Family *Herpesviridae*. *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, pp 203–225.
- Molnár K (1966) Untersuchungen über die jahreszeitlichen Schwankungen in der Parasitenfauna des Kaulbarsches und des Zanders in Balaton mit besonderer Berücksichtigung der Gattung *Proteocephalus*. *Angew Paras* 7:65–77.
- Molnár K (1982) Biology and histopathology of *Thelohanellus nikolskii* Akhmerov, 1955 (Myxosporea, Myxozoa), a protozoan parasite of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Zeitschr Parasitenkde* 68:269–277.
- Molnár K (1991) *Sphaerospora danubialis* sp. n. (Myxosporea: Sphaerosporidae) from the kidney of freshwater percid fishes. *Parasit Hung* 24:53–58.
- Molnár K (1994) Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. *Parasitol Hung* 27:5–20.
- Molnár K (1998) Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini* (Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton. *Folia Parasitol* 45:261–269.
- Molnár K, Eszterbauer E (2015) Specificity of infection sites in vertebrate hosts. in: B. Okamura, A. Gruhl, J.L. Bartolomew (eds.). *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer, Cham Heidelberg New York Dordrecht London. pp. 441.
- Molnár K, Eszterbauer E, Marton S, Székely C, Eiras JC (2012) Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal. *Dis Aquat Org* 100:231–248.
- Molnár K, Eszterbauer E, Marton Sz, Székely Cs, Eiras JC (2012) Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal. *Dis Aquat Org* 100:231-248.

- Molnár K, Eszterbauer E, Székely C, Dán Á, Harrach B (2002) Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *J Fish Dis* 25:643–652.
- Molnár K, Kovács-Gayer É (1981–1982) Occurrence of two species of *Thelohanellus* (Myxosporidia: Myxozoa) of Far-East origin in common carp populations of the Hungarian fish farms. *Parasit Hung* 14:51–55.
- Molnár K, Kovács-Gayer E (1985) The pathogenicity and development within the host fish of *Myxobolus cyprini* Doflein, 1898. *Parasitology* 90:549–555.
- Molnár K, Marton S, Eszterbauer E, Székely C (2006) Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of *M. muellericus* sp. n. *Dis Aquat Org* 73:49–61.
- Molnár K, Marton S, Eszterbauer E, Székely C (2007) Description of *Myxobolus gayerae* n. sp. and redescription of *Myxobolus leuciscine* infecting the European chub from the Hungarian stretch of the river Danube. *Dis Aquat Org* 78:147–154.
- Molnár K, Marton S, Székely C, Eszterbauer E (2010) Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary. *Parasitol Res* 107:1137–1150.
- Molnár K, Marton Sz, Székely Cs, Eszterbauer E (2010) Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary. *Parasitol Res* 107:1137–1150.
- Molnár K, Székely Cs, Csaba Gy, Láng M, Majoros G (2001) Results of veterinary-pathological research of Lake Balaton fishes. (Balatoni halak kórtani kutatásának állategészségügyi eredményei). In: Results of Balaton-research in 2000. (A Balaton kutatásának 2000. évi eredményei). Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 158–166.
- Molnár K, Székely Cs, Csaba Gy, Láng M, Majoros G (2002) Results of veterinary-pathological research of Lake Balaton fishes. (Balatoni halak kórtani kutatása és állategészségügyi problémái II). In: Results of Balaton-research in 2001. (A Balaton kutatásának 2001. évi eredményei). Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, 160–169.
- Molnár K, Székely Cs, Guti CsF, Eszterbauer E (2014) Two new *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) from white bream, *Blicca bjoerkna* (Linnaeus, 1758) developing in basifilamental location of gills. *Acta Protozool* 53:277–285.
- Molnár K, Cech G, Székely C (2011) Histological and molecular studies of species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia) in the gills of *Abramis*, *Blicca* and *Vimba* spp. (Cyprinidae), with the redescription of *M. macrocapsularis* Reuss, 1906 and *M. bliccae* Donec & Tozzyakova, 1984. *Syst Parasitol* 79:109–121.
- Moran JDW, Margolis L, Webster JM, Kent ML (1999a) Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporidia) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. *Dis Aquat Organ* 37:185–193.
- Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML (1999b) Natural and laboratory transmission of the marine myxozoan parasite *Kudoa thyrsites* to Atlantic salmon. *J Aquat Anim Health* 11:110–115.

- Morris DJ (2010) Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. *Proc R Soc B-Biological Sci* 277:2565–2570.
- Morris DJ (2012) A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor. *Int J Parasitol* 42:829–840.
- Morris DJ, Adams A (2008) Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitol* 135:1075–1092.
- Moshu A, Molnár K (1997) *Thelohanellus* (Myxozoa: Myxosporea) infection of the scales in the European wild carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org* 28:115-123.
- Muzzal PM (1995) Distribution of *Myxobolus scleroperca* (Myxobolidae, Myxosporea) in yellow perch (*Perca flavescens*) in the great-lakes. *J Parasitol* 81:498-499.
- Müller J (1841) Über Psorospermien. *Arch Anat Physiol Uwissensch Med* 5:477-496.
- Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD (1998) Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 143:1723–1744.
- Noga EJ (2010) *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog Dis* 10:137–142.
- Okamura B (1996) Occurrence, prevalence, and effects of the myxozoan *Tetracapsula bryozoides* Canning, Okamura and Curry, 1996, parasitic in the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* Cuvier (Bryozoa, Phylactolaemata). *Folia Parasitol* 43:262–266.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19:591–615.
- Özer A, Wootten R (2002) Biological characteristics of some actinosporeans. *J Nat Hist* 36:2199–2209.
- Palikova M, Navratil S, Svoboda Z, Tichy F, Recek L, Pikula J (2007) Skin and gonadal tumours in a barbel (*Barbus barbus*) – a case report. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 27:234-238.
- Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM (2016) A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol* 91:e01879-1816. doi: 10.1128/JVI.01879-16.
- Parrish CR (2011) Parvoviridae In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ (eds.): *Fenner's Veterinary Virology*, 4th edition. Elsevier Inc, Academic Press, London, U.K.
- Pham HT, Yu Q, Boisvert M, Van HT, Bergoin M, Tijssen P (2014) A circo-like virus isolated from *Penaeus monodon* shrimps. *Genome Announc* 2:e01172-13

- Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson TP, Li L, Deng X, Resende T, Vannucci F, Delwart E (2016) Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J* 13:184. doi: 10.1186/s12985-016-0642-z.
- Phenix KV, Weston JH, Ypelaar I, Lavazza A, Smyth JA, Todd D, Wilcox GE, Raidal SR (2001) Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol* 82:2805–2809.
- Pote LM, Hanson LA, Shivaji R (2000) Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea). *J Aquat Anim Health* 12:230–240.
- Prunescu C-C, Prunescu P, Pucek Z, Lom J (2007) The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). *Folia Parasitol* 54:159–164.
- Rangel LF, Santos MJ, Cech G, Székely C (2009) Morphology, molecular data, and development of *Zschokkella mugilis* (Myxosporea, Bivalvulida) in a polychaete alternate host, *Nereis diversicolor*. *J Parasitol* 95:561–569.
- Reuss R (1906) Neue Myxoboliden von Susswasserfischen. *Bul L'Acad Imp Sci* 25:199-205.
- Rocha S, Casal G, Garcia P, Matos E, Al-Quraishy S, Azevedo C (2014) Ultrastructure and phylogeny of the parasite *Henneguya carolina* sp. nov. (Myxozoa), from the marine fish *Trachinotus carolinus* in Brazil. *Dis Aquat Org* 112:139–148.
- Romuk-Wodoracki D (1990) *Henneguya wolinensis* n. sp. (Myxosporea) from perch *Perca fluviatilis* L. from Szczecin Firth, Poland. *Acta Ichthyol Pisc* 20:91–96.
- Rosario K, Duffy S, Breitbart M (2009a) Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *J Gen Virol* 90:2418–2424.
- Rosario K, Duffy S, Breitbart M (2012) A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Arch Virol* 157:1851–1871.
- Rosario K, Nilsson C, Lim YW, Ruan Y, Breitbart M (2009b) Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ Microbiol* 11:2806–2820.
- Rumyantsev EA, Shulman BS (1997) *Myxobolus ladogensis* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) - A parasite of cyprinid fishes (Cyprinidae). *Parazitologiya*, 31:179-180.
- Sano T, Fukuda H, Furukawa M (1985a) *Herpesvirus cyprini*: biological and oncogenic properties. *Fish Pathol* 20:381–388.
- Sano T, Fukuda H, Furukawa M, Hosoya H, Moriya Y (1985b) A herpesvirus isolated from carp papilloma in Japan. In: Ellis AE (Ed.), *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, London, pp. 307–311.
- Sano T, Morita N, Sima N, Akimoto M (1991) *Herpesvirus cyprini*: lethality and oncogenicity. *J Fish Dis* 14:533-543.
- Segalés J, Allan GM, Domingo M (2005) Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6:119–142.

- Shin SP, Nguyen VG, Jeong JM, Jun JW, Kim JH, Han JE, Baeck GW, Park SC (2014) The phylogenetic study on *Thelohanellus* species (Myxosporea) in relation to host specificity and infection site tropism. *Mol Phylogenet Evol* 72:31–34.
- Shinn AP, Pratoomyot J, Bron JE, Paladini G, Brooker EE, Brooker AJ (2015) Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology* 142:196–270.
- Shpirer E, Chang E (2014) Diversity and evolution of myxozoan minicollagens and nematogalectins. *BMC Evol Biol* 14:1–14.
- Shulman SS (1966) Myxosporidia of the Fauna of the USSR. „Nauka”, Moscow & Leningrad (In Russian), pp 631.
- Shulman SS (1984) Parasitic Protozoa. In: Key to Determination of the Parasites of Freshwater Fish of the USSR, Vol. 1 (ed. by O. N. Bauer). „Nauka”, Leningrad (In Russian) pp 251.
- Siddall ME, Martin DS, Bridge D, Desser SS, Cone DK 1995. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. *J Parasitol* 81:961-967.
- Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P (1990) *Sphaerospora testicularis* sp. nov. (Myxosporea: Sphaerosporidae) in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. *J Fish Dis* 13:193–203.
- Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P (1994) Revised classification and key species of the genus *Sphaerospora* Davies, 1917 (Protozoa: Myxosporea). *Res Rev Parasitol* 54:67–80.
- Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P (1995) Light and electron microscopic description of *Polysporoplasma* n. g. (Myxosporea: Bivalvulida), *Polysporoplasma sparis* n. sp. from *Sparus aurata* (L.), and *Polysporoplasma mugilis* n. sp. from *Liza aurata* L. *Eur J Protistol* 31:77–89.
- Smothers JF, von Dohlen CD, Smith LH, Spall RD (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 26:1719–1721.
- Soike D, Albrecht K, Hattermann K, Schmitt C, Mankertz A (2004) Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *Vet Rec* 154:792–793.
- Sterud E, Forseth T, Ugedal O, Poppe TT, Jorgensen A, Bruheim T, Fjeldstad HP, Mo TA (2007) Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Dis Aquat Organ* 77:191–198.
- Štolc A (1899) Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaaires parent des Myxosporidies. *Bull Intl Acad Sci Boheme* 22:1-12.
- Streck AF, Bonatto SL, Homeier T, Souza CK, Gonçalves KR, Gava D, Canal CW, Truyen U (2011) High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *J Gen Virol* 92:2628–2636.
- Székely C, Cech G, Atkinson SD, Molnár K, Egyed L, Gubányi A (2015) A novel myxozoan parasite of terrestrial mammals: description of *Soricimyxum minuti* sp. n.(Myxosporea) in pygmy shrew *Sorex minutus* from Hungary. *Folia Parasitol* 62:1-5.

- Székely Cs, Borkhanuddin MH, Cech G, Kelemen O, Molnár K (2014) Life cycles of three *Myxobolus* spp. from cyprinid fishes of Lake Balaton, Hungary involve triactinomyxon-type actinospores. *Parasitol. Res* 113:2817–2825.
- Székely Cs, Láng M, Molnár K (2010) Role of the copepod parasite *Tracheliastes maculatus* Kollar, 1836 (Lernaeopodidae) in the common bream (*Abramis brama*) mortality occurring in Lake Balaton, Hungary. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 30:170-176.
- Székely Cs, Shaharom-Harrison F, Cech G, Ostoros G, Molnár K (2009) Myxozoan infections in fishes of the Tasik Kenyir Water Reservoir, Terengganu, Malaysia. *Dis Aquat Org* 83:37–48.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Tarján Z, Péntzes J, Tóth R, Benkő M (2014) First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes. *Acta Vet Hung* 62:134–144.
- Thélohan P (1892) Observation sur les myxosporidies et essai de classification de ces organismes. *Bull De la Soc Phil De Paris* 4:165-178.
- Thélohan P (1895) Recherches sur les Myxosporidies. *Bull Sci Fr Bel* 26:100–394.
- Thielen F, Zimmermann S, Baska F, Taraschewski H, Sures B (2004) The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environ Pollut.* 129:421-429.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680.
- Tischer I, Gelderblom H, Vetterman W, Koch MA (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64–66.
- Tischer I, Rasch R, Tochtermann G (1974) Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 226:153–167.
- Todd D (2000) Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 29:373–394.
- Todd D (2004) Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet Microbiol* 98:169–174
- Todd D, Scott AN, Fringuelli E, Shivraprasad HL, Gavier-Widen D, Smyth JA (2007) Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol* 36:75–81.

- Toledo-Guedes K, Sanchez-Jerez P, Mora-Vidal J, Girard D, Brito A (2012) Escaped introduced sea bass (*Dicentrarchus labrax*) infected by *Sphaerospora testicularis* (Myxozoa) reach maturity in coastal habitats off Canary Islands. *Mar Ecol-Evol Persp* 33:26–31.
- Tops S, Curry A, Okamura B (2005) Diversity and systematics of the Malacosporaea (Myxozoa). *Inv Biol* 124:285-295.
- Tripathi YR (1948) Some new myxosporidia from Plymouth with a proposed new classification of the order. *Parasitology* 39:110–119.
- Trojan E (1909) Ein *Myxobolus* im Auge von *Leuciscus rutilus*. *Zool Anzeig Leipzig* 34:679-682.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces *Nucleic Acids Res* 40:115.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56:486–503.
- van Beurden SJ, Bossers A, Voorbergen-Laarman MH, Haenen OL, Peters S, Abma-Henkens MH, Peeters BP, Rottier PJ, Engelsma MY (2010) Complete genome sequence and taxonomic position of Anguillid herpesvirus 1. *J Gen Virol* 91:880–887.
- Viadanna PHO, Miller-Morgan T, Peterson T, Way K, Stone DM, Marty GD, Pilarski F, Hedrick RP, Waltzek TB (2017) Development of a PCR assay to detect cyprinid herpesvirus 1 in koi and common carp. *Dis Aquat Org* 123:19-19-27.
- Vicenova M, Reschova S, Pokorova D, Hulova J, Vesely T (2011) First detection of pike fry rhabdovirus in barbel and spring viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic. *Dis Aquat Org* 95:87-95.
- Wales JH, Wolf H (1955) Three protozoan diseases of trout in California. *Calif Fish Game* 41:183–187.
- Waltzek TB, Kelley GO, Alfaro ME, Kurobe T, Davison AJ, Hedrick RP (2009a) Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis Aquat Org* 84:179–194.
- Waltzek TB, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H, Hirono I, Aoki T, Davison AJ, Hedrick RP (2005) Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J Gen Virol* 86:1659–1667.
- Waltzek TB, Kurobe T, Goodwin AE, Hedrick RP (2009b) Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. *J Aquat Anim Health* 21:60–67.
- Wegener G (1909) Die Ectoparasiten der Fische Ostpreussens. Inaugur.-Dissert. Königsberg, p 72–90.
- Weill R (1938) L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses cuninides. *Trav Stat Zool Wimer* 13:727–744.

Weissenberg R (1914) Über infektiöse Zellhypertrophie bei Fischen (Lymphocystiserkrankung). Sitzungsber Kgl Preuss Akad Wiss Berlin, Sitz Physik-Math Classe 1914:792-804.

Whelan S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum likelihood approach. *Mol Biol Evol* 18:691-699.

Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Lester RJG, Findlay V, Kent ML (2003) First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrssites* from Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrssites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). *J Eukaryot Microbiol* 50:215–219.

Whipps CM, El-Matbouli M, Hedrick RP, Blazer V, Kent ML (2004) *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe. *Dis Aquat Organ* 60:105–108.

Whipps CM, Kent ML (2006) Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrssites* (Myxozoa: Myxosporidia). *J Eukaryot Microbiol* 53:364–373.

Wolf K (1988) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Ithaca: Cornell University Press, 1988. D, ISBN: 0801412595

Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa, new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225:1449-1452.

Wolf K, Markiw ME, Hiltunen JK (1986) Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle. *J Fish Dis* 9:79–81.

Yahata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Toyokawa T, Nakamura N, Taniguchi K, Okabe N (2015) *Kudoa septempunctata* - Induced gastroenteritis in humans after Flounder Consumption in Japan: a case - controlled study. *Jpn J Infect Dis* 68:119–123.

Yang CZ, Zhou Y, Zhao YJ, Huang W, Huang C (2017) Erection of *Unicapsulocaudum mugilum* gen. et sp nov (Myxozoa: Ceratomyxidae) based on its morphological and molecular data. *J Nat Hist* 51:457–467.

Ye LT, Li WX, Wu SG, Wang GT (2012) Supplementary studies on *Henneguya doneci* Schulman, 1962 (Myxozoa: Myxosporidia) infecting the gill filaments of *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China: histologic, ultrastructural, and molecular data. *Parasitol Res* 110:1509–1516.

Yokoyama H, Grabner D, Shirakashi S (2012) *Transmission Biology of the Myxozoa*, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, Online elérhetőség: <https://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/transmission-biology-of-the-myxozoa>.

Yokoyama H, Masuda K (2001) *Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific giant octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 21:266–268.

Yokoyama H, Ogawa K, Wakabayashi H (1991) A new collection method of actinosporeans - a probable infective stage of myxosporidia to fishes - from tubificids and experimental infection of goldfish with the actinosporean, *Raabeia* sp. *Fish Pathol* 26:133-138.

Zardoya R, Doadrio I (1999) Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *J Mol Evol* 9:227–237.

Zhai Y, Gu Z, Guo Q, Liu Y (2016) New type of pathogenicity of *Thelohanellus kitauei* Egusa & Nakajima, 1981 infecting the skin of common carp *Cyprinus carpio* L.. *Parasitol Int* 65:78-82.

Zhang X, Jiang S, Wu J, Zhao Q, Sun Y, Kong Y, Li X, Yao M, Chai T (2009) An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China. *Vet Microbiol* 133:252–256.

Zhao D, Borkhanuddin MH, Wang W, Liu Y, Cech G, Zhai Y, Székely C (2016) The life cycle of *Thelohanellus kitauei* (Myxozoa: Myxosporea) infecting common carp (*Cyprinus carpio*) involves aurantiactinomyxon in *Branchiura sowerbyi*. *Parasitol Res* 115:4317–4325.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapjául szolgáló tudományos közlemények:

1. Székely C, Borzák R, Molnár K (2018) Description of *Henneguya jaczoi* sp. n. (Myxosporea, Myxobolidae) from *Perca fluviatilis* (L.) (Pisces, Percidae) with some remarks to the systematics of *Henneguya* spp. of European fishes. Acta Vet Hung (bírálat alatt)
2. Borzák R, Molnár K, Cech G, Székely Cs (2018) *Myxobolus* infection in the cornea of the roach (*Rutilus rutilus*) in Lake Balaton. Acta Vet Hung 66:250-257. IF: 1,042
3. Borzák R, Sellyei B, Székely C, Doszpoly A (2017) Molecular detection and genome analysis of circoviruses of European eel (*Anguilla anguilla*) and sichel (*Pelecus cultratus*). Acta Vet Hung 65:262-277. IF: 1,042
4. Borzák R, Molnár K, Cech G, Papp M, Deák-Paulus P, Székely C (2016) Description of two new species of *Myxobolus* Bütschli, 1892, *M. peleci* n. sp. and *M. cultrati* n. sp., detected during an intensive mortality of the sichel, *Pelecus cultratus* (L.) (Cyprinidae), in Lake Balaton, Hungary. Syst Parasitol 93:667-677. IF: 1,181
5. Cech G, Borzák R, Molnár K, Székely C (2015) Three new species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxobolidae) infecting the common nase *Chondrostoma nasus* (L.) in the River Danube. Syst Parasitol 92:101-111. IF: 1,181

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó további közlemények:

1. Borzák R, Haluk T, Bartha D, Doszpoly A (2018) Complete genome sequence and analysis of ictalurid herpesvirus 2. Arch Virol 163:1083-1085. IF: 2,16
2. Borzák R, Sellyei B (2016) Irodalmi áttekintés a süllő és sügér esetében előforduló vírusos és baktériumok okozta betegségekről. Halászat-Tudomány 109:23-26. (lektorált folyóirat)
3. Székely C, Cech G, Chaudhary A, Borzák R, Singh HS, Molnár K (2015) Myxozoan infections of the three Indian major carps in fish ponds around Meerut, UP, India, with descriptions of three new species, *Myxobolus basuhaldari* sp. n., *M. kalavatieae* sp. n. and *M. meerutensis* sp. n., and the redescription of *M. catlae* and *M. bhadrensis*. Parasitol Res 114:1301-1311. IF: 2,329