

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

MTA Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

**Amerikai hullókben előforduló adenovírusok diverzitásának felmérése élő állatok
szűrővizsgálatával**

Godó Soma

Témavezetők:

Dr. Benkő Mária, Péntes Judit

MTA Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

2014

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
3. Anyag és módszer	8
3.1. Vizsgált minták eredete.....	8
3.2. Minták előkészítése.....	9
3.3. Polimeráz láncreakció (PCR).....	10
3.4. Gélelektroforézis	12
3.5. PCR termék kitisztítása	12
3.6. Szekvenálás	12
3.7. Molekuláris klónozás.....	13
3.8. Adatok elemzése	14
4. Eredmények.....	14
5. Megvitatás.....	20
Összefoglalás.....	24
Summary.....	25
Köszönetnyilvánítás	26
Hivatkozások jegyzéke.....	27

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A+T	adenin és timin
AdV	adenovírus
bp	bázispár
dNTP	deoxinukleotid-trifoszfátok keveréke
EDS	egg drop syndrome (tojáshozam-csökkenés szindróma)
G+C	guanin és citozin
M	mólos
mg	milligramm
Milli-Q	ultratiszta víz
μl	mikroliter
mM	millimólos
PCR	polimeráz láncreakció
pmol	pikomol
rpm	revolutions per minute (fordulatszám)
SnAdV-1	1-es típusú kígyó-adenovírus
TAE	trisz-acetát-EDTA
TE	trisz-EDTA
THEV	turkey hemorrhagic enteritis virus

1.BEVEZETÉS

A kutatócsoport, amelyhez csatlakoztam, évtizedek óta foglalkozik az állati adenovírusok taxonómiájával és filogenetikájával. Szakdolgozati munkám is ezen a területen folyt. Az adenovírusok előfordulását valamennyi főbb gerinces csoportban kimutatták már. Jellegzetességük, hogy általában szűk gazdaspektrummal rendelkeznek, csak ritka esetekben lépik át a faji határokat, ezért valószínűsíthető, hogy a legtöbb adenovírus típus a gazdafajjal együtt fejlődött. A legelső adenovírus izolátumokat emberből és haszonállatokból nyerték több mint 60 évvel ezelőtt. Különböző gazdáiban számos további adenovírus típust mutattak ki különböző szerológiai módszerekkel illetve elektronmikroszkóppal is. A molekuláris módszerek ugrásszerű fejlődése, a PCR valamint a DNS nukleotid-sorrendjének meghatározására kidolgozott, egyre olcsóbb eljárások következtében lehetővé vált a potenciális gazdafajok szélesebb spektrumának vizsgálata is. Ezáltal lehetőség nyílt e vírusok genomjának filogenetikai és taxonómiai elemzésére. Így sikerült az eddig megismert adenovírus-típusokat mára 5 genusba besorolni. Az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozó vírusokat először kérődzőkben, madarakban és egy erszényesben írták le, majd pikkelyes hüllőkben is kimutatták a jelenlétüket. Munkám kiindulási alapjául az a hipotézis szolgált, mely szerint az atadenovírusok az *Adenoviridae* családnak a pikkelyes hüllőkkel (Squamata) együtt fejlődött csoportját képviselik. Ennek alapján, minden nem-hüllő gazdában kimutatott atadenovírusos fertőzöttség gazdaváltás eredménye. Célkitűzéseim között szerepelt, hogy ennek a hipotézisnek a helytállóságát vizsgáljam újabb gazdafajok esetleges atadenovírusainak kimutatásával és jellemzésével. Meg kell azonban jegyezni, hogy bizonyos teknősfajokból nemrégiben leírt adenovírusok a törzsfán egy különálló, az összes eddigi nemzetségtől elkülönülő ágon helyezkednek el. Valószínűsíthető, hogy ez az ág képviseli a teknősökkel együtt fejlődött adenovírus vonalat. Munkám másodlagos célja volt, hogy teknős eredetű minták szűrésével tovább bővítsem a leírt teknős-adenovírusok körét.

Szakdolgozatom tárgyát a hüllőkben előforduló adenovírusok vizsgálata képezte. Ennek keretében teknősökből és pikkelyes hüllőkből származó minták PCR-es szűrését végeztem el. A szűréshez a vírus DNS-polimeráz génjéből egy kb. 300 bp hosszú szakasz felerősítésére alkalmas PCR módszert használtunk. Az így nyert genom fragmentum nukleotid-sorrendjét meghatároztuk, majd filogenetikai számításokat

végeztünk. Az újonnan talált vírusok törzsfán való elhelyezkedéséből próbáltunk az evolúciójukra vonatkozó következtetéseket levonni.

2. Irodalmi áttekintés

Az adenovírusok az *Adenoviridae* családba tartozó, gerinceseket fertőző vírusok (Harrach *et al.*, 2011). Burokkal nem rendelkeznek, méretük kb. 70-90 nm, a vírusok között közepesnek számítanak. Genomjuk mérete, ami lineáris, duplaszálú DNS, azonban ehhez képest nagy, 26-45 ezer bázispár között mozog, 33,7% és 63,8% közötti G+C tartalommal. A kapszid ikozaéder alakú, fő alkotórésze a hexon protein. Az ikozaéder 12 csúcsán (vertex) lévő fehérje-alegységek neve pentonbázis vagy penton-alap. Ezeken helyezkednek el az adenovírusokra jellemző nyúlványok, az úgynevezett fiberek, amelyek által a virionok sejtfelszíni receptorokhoz való elsődleges kötődése létrejön. Az *Aviadenovirus* nemzetség tagjainak sajátossága, hogy vertexenként két fiber-nyúlvánnyal rendelkeznek, melyeket egy vagy két fiber gén kódolhat. Néhány mastadenovírusban szintén előfordul két, eltérő fiber gén, de a virionban ezek külön penton-alapba ágyazva, egyesével épülnek be. Az adenovírus genomok közös tulajdonsága, hogy a középső régiójuk jól megőrzött, míg a genomok végei mind összetételben, mind hosszúságban jellegzetes eltéréseket mutatnak az egyes nemzetségek tagjai között, amint azt az 1. ábra mutatja (Davison *et al.*, 2003; Ursu *et al.*, 2004).

Az adenovírusokat gazdafajuk szerint nevezik el, és az ugyanabból a fajból kimutatott különböző típusokat számmal jelölik (pl. humán adenovírus 1, bovin adenovírus 3). Egy fajba tartoznak azok a vírustípusok, melyeknek homológ szekvenciái között 95% vagy ennél magasabb az azonosság. Külön fajba sorolandók azok, melyeknek szekvenciái között a különbség nagyobb, mint 10%. Ha a vírusok közötti különbség 5 és 10% között mozog, akkor egyéb biológiai tulajdonságok, mint például a szerológiai vizsgálatok eredménye vagy a genom variábilisabb részének szerveződése alapján végezhető el fajba sorolásuk (Benkő *et al.*, 2000). Az egyes típusoknak általában nagyon szűk gazdaspektrumuk van, de egy-egy gazdafaj több, különféle típusú adenovírusal rendelkezhet. Ezért feltételezhető, hogy minden gerinces fajnak lehet saját, vele együtt evolválódott adenovírusa (Benkő & Harrach, 2003). Ez a tulajdonságuk teszi az adenovírusokat alkalmas tárggyá gazda-parazita koevolúciós vizsgálatokhoz. Az eddig leírt adenovírus típusok száma 150 felett van, és ezeket 5

elfogadott nemzetségbe sorolják (Harrach *et al.*, 2011). A *Mastadenovirus* genusban csak emlősök adenovírusai, míg az *Aviadenovirus* genusban csak madarak vírusai találhatóak. A *Siadenovirus* nemzetségbe különféle állatok adenovírusai kerültek. A nemzetség első két tagjának egyike a pulykákban súlyos vérzéses bélgyulladás okozó, de esetenként egyéb madárfajok képviselőiben is betegséget előidéző vírus, melynek a THEV (turkey hemorrhagic enteritis virus) nevet adták (Pitcovsky *et al.*, 1998). A másik siadenovírust egy békából (*Rana pipiens*) izolálták, ezért azt az adenovírus vonalat eleinte a kételtűekkel együtt fejlődött ágak tekintették (Davison *et al.*, 2000). Mára azonban egyre több madárfaj egyedeiben mutatnak ki újabb siadenovírusokat, ezért jelenleg a genus gerinces gazda eredete tisztázatlan. A legújabb *Ichtadenovirus* genusban eddig még csak egy vírus tartozik, amit egy fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izoláltak (Doszpoy *et al.*, 2009), de mint gerinces állatoknak, feltételezhető, hogy a halaknak is vannak fajspecifikus adenovírusaik (Benkő *et al.*, 2002).

A dolgozatom szempontjából legfontosabb nemzetség az *Atadenovirus* nevet kapta. A jelenleg ide sorolt vírusok egy részét már régóta ismerték, azonban a genus hivatalos elfogadására hosszú ideig várni kellett (Benkő & Harrach, 1998). Az *Atadenovirus* nemzetség legelső tagjait szarvasmarhából izolálták (Bartha, 1969), majd a tyúkokban világszerte súlyos tojáshozam-csökkenést okozó EDSV (Egg Drop Syndrome Virus) vírust is ide sorolták (Harrach *et al.*, 1997). A jelenlegi taxonómiai besorolás alapjait a modern molekuláris vizsgáló módszerek és filogenetikai számítások elterjedése teremtette meg. Ezt megelőzően az EDSV-t az *Aviadenovirus*, a „rendhagyó” szarvasmarha adenovírusokat pedig a *Mastadenovirus* nemzetségbe sorolták mint kivételeket. Ugyanis ezek a vírusok mind szerológiai tulajdonságaikkal, mind feltűnő kórokozó-képességükkel kitértek a két genus nem rendhagyó tagjai közül (Harrach & Benkő 1998; Dán *et al.*, 1998). A nemzetség nevét e vírusok genom-szekvenciáiban megfigyelt magas A+T arányról kapta.

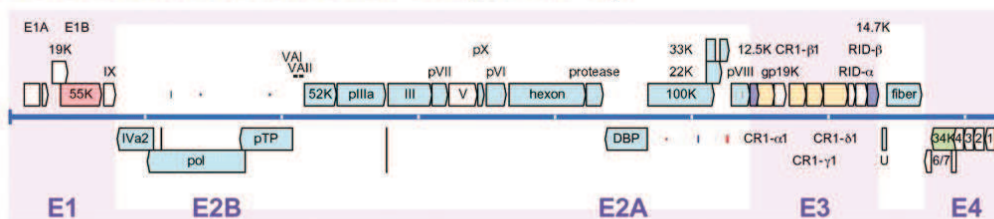
Az atadenovírusoknak az *Aviadenovirus* és *Mastadenovirus* nemzetség tagjaitól mért jelentős filogenetikai távolsága alapján feltételezték, hogy eredetileg egy ősi gerinces osztály tagjaival, esetleg a hüllőkkel fejlődhettek együtt (Harrach, 2000). Ezért megindult az alacsonyabb rendű gerincesekben talált adenovírusok molekuláris vizsgálata (Benkő *et al.*, 2002). A gabonasiklókból (*Pantherophis guttatus*) izolált vírus (kígyó-adenovírus 1, SnAdV-1) teljes genomjának vizsgálata megerősítette, hogy mind a genom szerveződése, mind a vírus törzsfán elfoglalt helye alapján az EDSV és a

rendhagyó szarvasmarha-adenovírusok által alkotott csoportba, azaz az *Atadenovirus* genusba tartozik (Farkas *et al.*, 2008). További célzott vizsgálatokkal, nevezetesen PCR-rel hat gyík faj egyedeiben mutatták ki új atadenovírusok jelenlétét (Wellehan *et al.*, 2004). Meglepő módon azonban a pikkelyes hüllőkben talált adenovírusok DNS-ének A+T és G+C aránya kiegyensúlyozottnak volt tekinthető. További hüllő rendek egyedeiben nem sikerült atadenovírust detektálni, viszont a pikkelyes hüllőkből származó eddig vizsgált összes adenovírus az *Atadenovirus* genusba sorolható. A legújabb elmélet szerint az atadenovírusok eredetileg a pikkelyes hüllőkben (Squamata) alakultak ki és fejlődtek együtt, majd az evolúciós folyamat során legalább három alkalommal gazdaváltás is történt. E gazdaváltások nyomán az atadenovírusok megjelentek a kérődzőkben (Harrach *et al.*, 1997; Harrach & Benkő, 2007), egy erszényes fajban (Thomson *et al.*, 2002) és különféle madarakban (Harrach *et al.*, 2008).

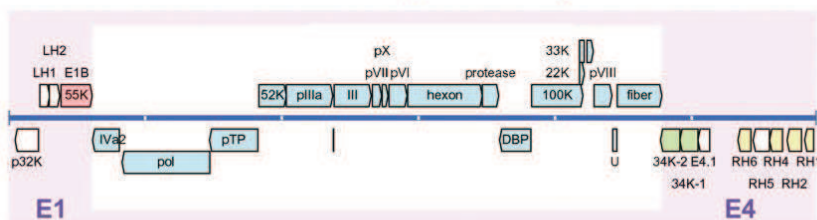
Magyar és amerikai kutatók nemrégiben egy hatodik adenovírus vonal létezését fedezték fel teknősökben. A PCR segítségével két génből nyert szekvenciák alapján készült törzsfákon a teknős adenovírusok ága jól elkülönül a fent leírt valamennyi nemzetségétől, így feltételezhető hogy egy újabb, hatodik genus első képviselői (Dospoly *et al.*, 2013)

Munkám közvetlen előzménye több, az adenovírusok kimutatására irányuló széleskörű szűrővizsgálat volt, amelyeket James Wellehan, Papp Tibor és Péntes Judit végzett állatkertekben és állatkereskedésekben elhullott, vagy állatorvosi vizsgálatra hozott élő, de beteg hüllők és kételtűek mintáin PCR-es módszerrel. A feldolgozott minták Európa és az Egyesült Államok több területéről, javarészt fogságban szaporított és tartott, fiatalon elpusztult egyedből származtak. Az általuk megállapított átlagos prevalencia 10%-os volt a pikkelyes hüllőkre vonatkoztatva.

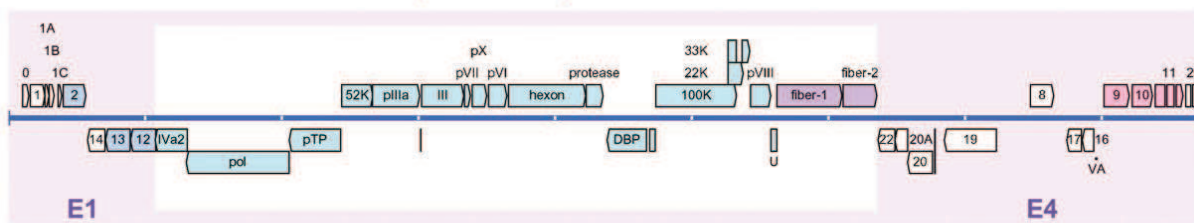
Mastadenovirus: SAdV-25 (HAdV-E)



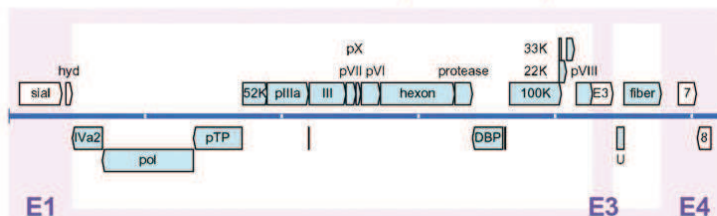
Atadenovirus: OAdV-7 (OAdV-D)



Aviadenovirus: FAdV-1 (FAdV-A)



Siadenovirus: TAdV-3 (TAdV-A)



1. ábra. A 2002-ig elfogadott 4 adenovírus nemzetségre jellemző sematikus genomterképek összehasonlítása (Davison *et al.*, 2003). A IVa2 és a fiber gén közötti, fehér háttérű, erősen megőrzött genomszakasz 16 olyan gént tartalmaz (türkizkék jelöléssel), amely minden nemzetségben megtartott. Az egyéb színek a több genusból előforduló, a fehér nyilak a genus-specifikus géneket jelölik. Az U jelzésű, úgynevezett U-exon valamennyi genusból megtalálható, de csak genusból mutat homológiát.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgált minták eredete

A szakdolgozati munkám során vizsgált minták zöme kloákatampon volt, melyek az USA egyik államából, Arkansasból származtak. Dr. Andrew Goodwin egy nagy halgazdaság területén gyűjtötte be különféle, az összes ott fellelhető hüllőfaj egyedeiből a mintákat és küldte el hozzánk vizsgálatra. Néhány minta a helyi tropikáriumból származott. A mintákat alkoholban tartósították, és így postázták. A befogott egyedek teljesen szabadon éltek, és látszólag egészségesek voltak. Összesen 112 mintát tártam fel és vizsgáltam meg, melyek közül 88 a teknősök (Testudines), 23 pedig a pikkelyes hüllők (Squamata) rendjébe tartozó állatból származott. A kétéltűek osztályát mindössze egyetlenegy béka minta (Anura) képviselte.

A minták száma rend és család szerint:

Pikkelyes hüllők (Squamata) 23 db

- siklófélék (Colubridae)
 - vízisikló (*Natrix natrix*) 1db
 - floridai vízisikló (*Nerodia fasciata*) 1db
 - holbrookii királysikló (*Lampropeltis getulus holbrooki*) 2 db
 - nyugati disznóorrú sikló (*Heterodon nasicus*) 1 db
 - vörös gabonasikló (*Pantherophis guttatus*) 5 db
 - kaliforniai királysikló (*Lampropeltis getulus californiae*) 1 db
- pitonfélék (Pythonidae)
 - királpiton (*Python regius*) 9 db *
 - Children-piton (*Antaresia childreni*) 1 db*
- óriáskígyófélék (Boidae)
 - vörösfarkú boa (*Boa constrictor*) 2 db*

Teknősök (Testudines) 88 db

- mocsáriteknős-félék (Emydidae)
 - vörösfülű ékszerteknős (*Trachemys scripta elegans*) 18 db
 - karolinai dobozteknős (*Terrapene carolina carolina*) 5 db
 - háromkarmú dobozteknős (*Terrapene carolina triunguis*) 1 db

- térképteknős (*Graptemys geographica*) 11 db
- alabamai tarajosteknős (*Graptemys nigrinoda*) 1 db
- díszes ékszerteknős (*Chrysemys picta*) 1 db
- Cagle-tarajosteknős (*Graptemys caglei*) 2 db
- ouachitai tarajosteknős (*Graptemys ouachitensis*) 3 db
- sárgafoltos tarajosteknős (*Graptemys flavimaculata*) 1 db
- hieroglifás ékszerteknős (*Pseudemys concinna*) 2 db
- gyémánttekneős (*Malaclemys terrapin*) 3 db
- közönséges tarajosteknős (*Graptemys pseudogeographica*) 1 db
- lágyhéjútekneős-félék (Trionychidea)
 - kínai lágyhéjú tekneős (*Pelodiscus sinensis*) 8 db*
- iszaptekneős-félék (Kinosternidae)
 - fehér iszaptekneős (*Kinosternun leucostomum*) 1 db
 - közönséges pézsmatekneős (*Sternotherus odoratus*) 4 db
 - fedeles pézsmatekneős (*Sternotherus carinatus*) 3 db
 - nagyfejű iszaptekneős (*Claudius angustatus*) 2 db
- aligátortekneős-félék (Chelidridae)
 - aligátortekneős (*Chelydra serpentina*) 1 db
 - keselyűtekneős (*Macrochelys temminckii*) 1 db
- nem meghatározott fajú tekneős 19 db

Farkatlan kétéltűek (Anura)

- Valódi békafélék (Ranidae)
 - afrikai ökörbéka (*Pyxicephalus adspersus*) 1 db*

Csillaggal jelölve a tropikáriumból származó minták.

3.2. Minták előkészítése

A DNS kivonás előtt az alkoholos tamponmintákat 15 percig rázattuk kémcsőkeverőben, majd az így nyert szuszpenzióból 200 µl-t mértünk 1,5 ml-es centrifuga csövekbe. A csöveket Eppendorf 5417C típusú 17,900 g-nek megfelelő sebességen 3 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után az üledéket beszárítottuk, majd 1% TE pufferben újraszuszpendáltuk. Ezután Dán *et al.* (2003) módszerét alkalmazva nyertük ki a nukleinsavat az oldatból. Az emésztést 10 µl 10%-os

Sarcosyl és 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) oldat hozzáadásával végeztük, egy éjszakán át Eppendorf thermomixer compact 5350 típusú thermomixerben 55°C-on és 400 rpm-en inkubálva. Másnap hozzáadtunk 300 µl guanidine HCl (8 M) és 20 µl ammónium-acetát (7,5 M) oldatot, és szobahőmérsékleten tartva egy órán keresztül, 15 percenként megforgattuk a csöveket. A nukleinsav kicsapásához 1 ml jéghideg (-20°C) abszolút etanolt alkalmaztunk, majd Eppendorf 5417C típusú centrifugában 15 percig 17,900 g-nek megfelelő sebességen centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, az üledéket 1 ml 70%-os alkohollal mostuk és 7 percig újra centrifugáltuk változatlan sebességen. A felülúszót leöntöttük, és pár mp további centrifugálást követően a maradék folyadékot pipettával eltávolítottuk. Végül 10 perc szobahőmérsékleten való száradás után a DNS-precipitátumot 50 µl steril Milli-Q vízben szuszpendáltuk. mentettük el

3.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A minták szűrését adenovírusok jelenlétére PCR-rel végeztük, melyhez a Wellehan *et al.* (2004) által leírt kétkörös (nested), konszenzus PCR rendszert használtuk. Ehhez a reakcióhoz az erősen degenerált, úgynevezett konszenzus primereket a vírus DNS-függő DNS-polimeráz enzimének az *Adenoviridae* család valamennyi ismert tagjában megőrzött aminosav motívumaira tervezték. A módszer lehetővé teszi a DNS-polimeráz génből egy kb. 300 bp hosszú fragmentum felsokszorozását.

A pozitív mintákból megkíséreltük a hexon gén egy kb. 400 bp hosszú szakaszának felerősítését is. Itt egy egykörös PCR rendszert alkalmaztunk. A primerek a gén két megőrzött régiójához tapadtak, amik egy variábilis szakaszt fogtak közre, ezért ez a szekvencia kifejezetten alkalmas filogenetikai számításokhoz. Ehhez a laboratóriumunkban tervezett, degenerált primereket használtunk (Pénzes Judit, nem közölt eredmény).

A REDTaq™ DNA Polymerase (Sigma) enzimet a gyártó használati utasítása szerint alkalmaztuk. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy csövenként 25 µl 2x REDTaq Ready Mixet, mely már az enzimet is tartalmazta, 18 µl Milli-Q vizet, a megfelelő primerekből 1-1 µl-t (50 pmol/µl) és 5 µl minta DNS-t tartalmazott. A pozitív és negatív kontroll mellett csak 5 mintát vizsgáltunk a kontamináció elkerülése végett, így általában 7 csőre elegendő úgynevezett master mixet készítettünk. A master mixet először 200 µl úrtartalmú PCR-csövekbe (Axygen) adagoltam, és csak ezután adtam

hozzá a mintákból kivont target DNS-t. A reakció második körének reakcióelegyébe csövenként szintén 5 µl-t tettünk át az első kör elegyéből. A reakciókat T1 Thermocycler (Biometra) típusú PCR gépekben végeztük. A programot az 1. táblázat szemlélteti.

Mindig használtunk a hüllők mintái mellett egy pozitív és egy negatív kontrollt is ellenőrzésképp. A negatív kontroll target DNS helyett Milli-Q vizet tartalmazott, pozitív kontrollként a bovin adenovírus 1 DNS-t használtunk.

1. táblázat. Az adenovírusok DNS-polimeráz génjének egy szakaszára tervezett kétkörös polimeráz láncreakció lépései. Mindkét körben ugyanazt a programot alkalmaztuk. A hexon gén esetében a primertapadási hőmérséklet 41°C volt.

reakció	hőmérséklet	reakcióidő
kezdeti denaturáció	94°C	5 perc
denaturáció	94°C	0,5 perc
primerek tapadása	46°C	1 perc
DNS szintézis	72°C	1 perc
végző szintézis	72°C	3 perc

} 45 ciklus

3.4. Gélelektroforézis

A PCR eredményét, a reakcióelegyet agaróz-gélelektroforézissel vizsgáltuk. Az 1%-os agarózgélt 100 ml TAE puffer és 1 g agaróz felhasználásával készítettük, amihez 4 µl GelRed (Biotium) festéket adtunk. A gél zsebeibe a második kör termékeiből 10 µl-t mértünk. Molekulatömeg-kontrollként GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) nevű, készen kapható markert alkalmaztunk. Az elektroforézist 1X TAE pufferben, 90 V feszültségen 45 percig végeztük. Az UV fényvel átvilágított gélekről az Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 120 (KODAK) rendszer segítségével készítettünk fotókat. A gélfotókat az adott nap dátumával címeztük meg és mentettük el.

3.5 A PCR termék kitisztítása

A pozitívnak bizonyult mintákból a felsokszorozott DNS kivonását, abban az esetben ha a kívánt terméken kívül más, nem sokszorozódott fel a PCR során, a Machery-Nagel NucleoSpin^R Gel and PCR Clean-Up alkalmazásával tettük, a gyártó utasításai szerint. Ha a megfelelő hosszúságú fragmentum mellett más egyéb, aspecifikus, termék is keletkezett, akkor az összes reakcióelegyet agaróz gélen, elektroforézissel szétválasztottuk, és szikével kivágtuk a 300 bp-nak megfelelő DNS-síkot. Ezután a fent említett kit gélből izoláló protokollja szerint kinyertük a DNS-t.

3.6 Szekvenálás

A tisztított DNS nukleotid-sorrendjének meghatározását a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) használatával végeztük a gyártó utasításai szerint, azonban a reakcióelegy mennyisége csak 5 µl volt. A PCR termékek szekvenciáját mindkét szálon meghatároztuk a belső körének primerei használatával. A elkészült szekvenálási reakcióban fluoreszcensen jelölt termékeket automata DNS szekvenálón (ABI Prism® 3100) történő elektroforézisre postán küldtük el a szolgáltató laboratóriumba (MTA Szegedi Biológiai Központ), ahonnan elektronikus levélben kaptuk vissza az elektroforetogramot.

3.7 Molekuláris klónozás

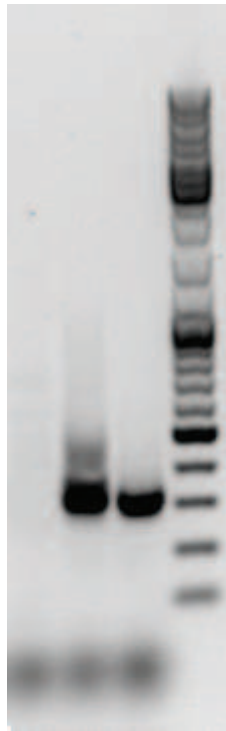
Abban az esetben, ha a PCR termék a szekvencia eredmény alapján nem tűnt homogénnek, feltehetően a specifikus termékekkel azonos méretű mérhető, de nem specifikus termék is keletkezett, a tiszta szekvencia kinyerésének érdekében molekuláris klónozást alkalmaztunk. Ezt CloneJet PCR cloning kit használatával, a gyártó utasításai szerint végeztük. A klónozendó PCR termék felerősítésénél használt Taq polimeráz enzim miatt a DNS fragmentumok végeiről a túlnyúló adenin nukleotidokat el kellett távolítani, amit ugyanezen kit használatával végeztünk. A fragmentumot a pJET1.2/blunt Cloning Vector nevű plazmidba ligáltuk, majd ezt hősokk segítségével juttattuk be kompetens *E. coli* sejtekbe. A baktériumokat folyékony tenyészetben 1 óráig inkubáltuk, majd ampicilin tartalmú agarlemezen szélesztettük. Másnap kolónia PCR próbát végeztük, hogy megbizonyosodjunk a plazmid beépüléséről. A pozitív telepekből vett sejtek tenyésztését további 1 napig folytattuk folyékony tápoldatban. A plazmid DNS tisztítását az úgynevezett alkalikus miniprep módszerrel végeztük. Ehhez 1,5 ml folyékony baktérium tenyészetet centrifugacsőben 1 percre ülepítettük 17,900 g-nek megfelelő sebességen. A felülúszót leöntöttük, és az üledéket 100 µl 1-es oldatban (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM Trisz-HCl) szuszpendáltuk. Alapos vortexelés után 200 µl 2-es oldatot (160 µl MQ, 20 µl SDS (16%), 20 µl NaOH (0,2 M)) adtunk a elegyhez és a csöveket 5 percre jégen inkubáltuk, aztán 150 µl 3-as oldatot (3 M-os K-acetát, 75 ml MQ, pH= 4,8) adtunk hozzá. 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után, az oldatban lévő nukleinsav kicsapásához 800 µl jéghideg (-20°C) 96%-os etanolt adtunk mértünk a csövekbe, majd 10 percre 17,900 g-nek megfelelő sebességen centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után, az üledéket 600 µl 70%-os alkohollal mostuk és 10 percre újra centrifugáltuk változatlan sebességen. A felülúszót leöntöttük, és 5-10 perces vákuumcentrifugálással eltávolítottuk a maradék alkoholt. Ezután 38 µl MQ-t és 2 µl RNáz-t adtunk hozzá, a DNS-sel együtt kivont RNS eltávolítása céljából. A plazmidok méretét gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.8 Szekvencia adatok elemzése

Az elektroforetogramot a BioEdit programmal jelenítettük meg, a szekvenciák illesztését a Staden programcsomaggal (<http://staden.sourceforge.net/>) végeztük. Ezután az újonnan meghatározott szekvenciákat összehasonlítottuk az eddig megismert adenovírus-szekvenciákkal a BLAST homológia kereső programok alkalmazásával (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) a BLASTX segítségével. A származtatott aminosav szekvenciákat a ClustalX2 (multiple alignment) programmal (<http://www.clustal.org/clustal2/>) illesztettük össze. A filogenetikai számításokhoz a PHYLIP v3.67 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>; Felsenstein, 1989) programcsomagot, a ProtTest (<http://darwin.uvigo.es/software/prottest.html>) modellszelekciós alkalmazást és a PhyML3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) internetes programot használtuk. A kapott törzsfákat a FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) programmal jelenítettük meg.

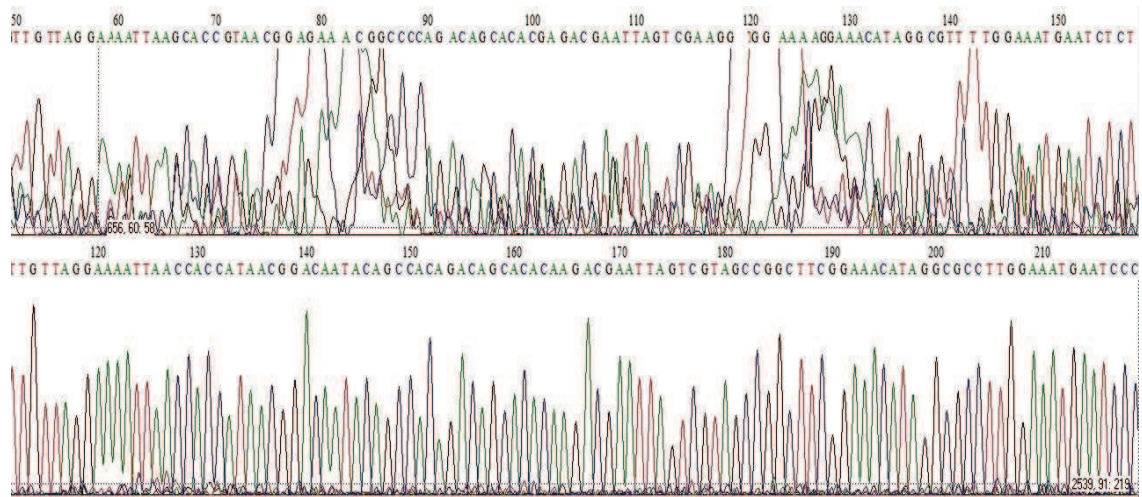
4. Eredmények

A 112 vizsgált mintából, a polimeráz génre irányuló szűrés mindössze két kígyó esetében mutatott pozitívítást, ami 1,79-es prevalenciának felel meg. Ez a pikkelyes hüllő minták számára vonatkoztatva 8,7%-os prevalenciát jelent, ez hozzávetőlegesen megegyezik a fogságban tartott és elpusztult hüllőkben mért értékkel. Azonban az alacsony mintaszám miatt ezt az eredményt óvatosan kell kezelni. Az összesen 88 különféle teknősből származó mintákból és az egyetlen vizsgált békából nem sikerült adenovírust kimutatni. Egy pozitív PCR eredményét mutatja be a 2. ábra.



2. ábra. Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló kétkörös PCR 2. körének eredménye 1%-os agaróz gélen történt elektroforézise után. A minták sorrendje balról jobbra: negatív kontroll, floridai vízisikló mintája, pozitív kontroll, marker.

Egy gabonasikló (*Pantherophis guttatus*) mintájából az 1-es típusú kígyó-adenovírust (SnAdV-1) mutattuk ki. Ennek az adenovírusnak a teljes genomja már ismert (Farkas et al., 2008), és az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozik. A másik pozitív minta egy floridai vízisikló (*Nerodia fasciata*) mintájának esetében kaptuk. A szűrés során meghatároztuk a DNS-polimeráz egy megőrzött szakaszát és a hexon gén egy filogenetikai elemzésre jól használható régiójának a nukleotid-sorrendjét is. A hexon gén kb. 400 bp hosszú szakaszának közvetlen szekvenálására kapott elektroforetogram nehezen volt olvasható, ami arra utalt, hogy a PCR termék nem homogén, ezért molekuláris klónozást végeztünk (3. ábra).



3. ábra. A felső képen a hexon gén egy szakaszának a PCR-es felerősítése után kapott elektroforetogram látható. Jól látszik a sok zaj és a többszörös hullámok, amik miatt a leolvasott nukleotid-sorrend nem megbízható. Az alsó képen a molekuláris klónozás eredménye van, itt minimális a zaj és nincsenek egymást átfedő hullámok, az erről leolvasott nukleotid-sorrend megbízható. A két kép a szekvencia ugyanazon szakaszát ábrázolja.

A homológia-keresés során nem találtunk ezekkel a szekvenciákkal egyező génbanki adatot. A floridai vízisiklóból származó vírus tehát a tudomány számára új AdV, és egyben a legújabb kígyó-adenovírus is (4. ábra).



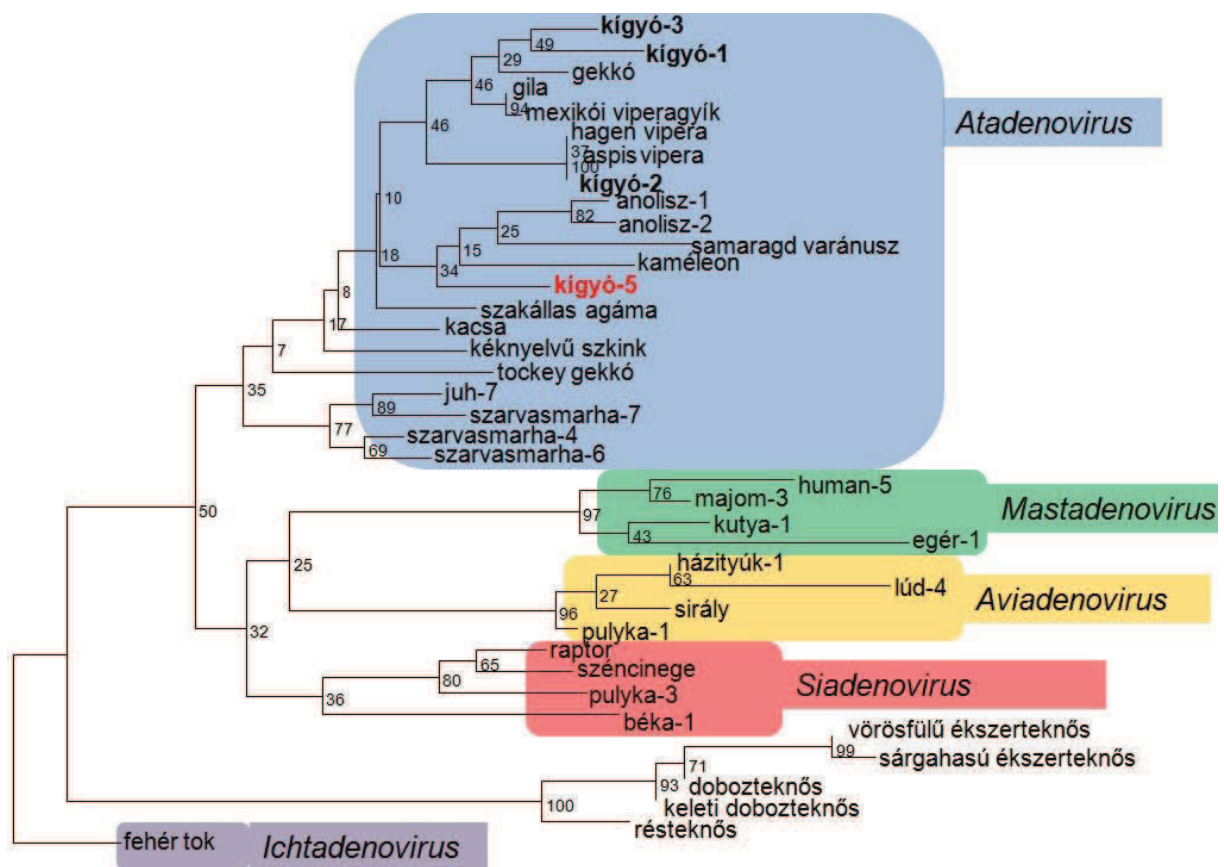
4. ábra. Az eddig ismert kígyó-adenovírusok DNS-polimerázának a vizsgálatban szereplő szakasza. Jól látszik, hogy az új, floridai vízisikló-adenovírus egyikkel sem mutat egyezést. Az is szembetűnik, hogy mennyire különbözőek a kígyó-adenovírusok, még ezen a rövid és nagyon konzervatív fehérje-szakaszon is.

A törzsfa-rekonstrukciót mind a polimeráz (5. ábra), mind a hexon (6. ábra) fehérje ismert szakasza alapján elvégeztük. Amely során mindkét vírus az *Atadenovirus* nemzetségben foglalt helyet. Mindkettő vírus kiegyensúlyozott G+C aránnyal

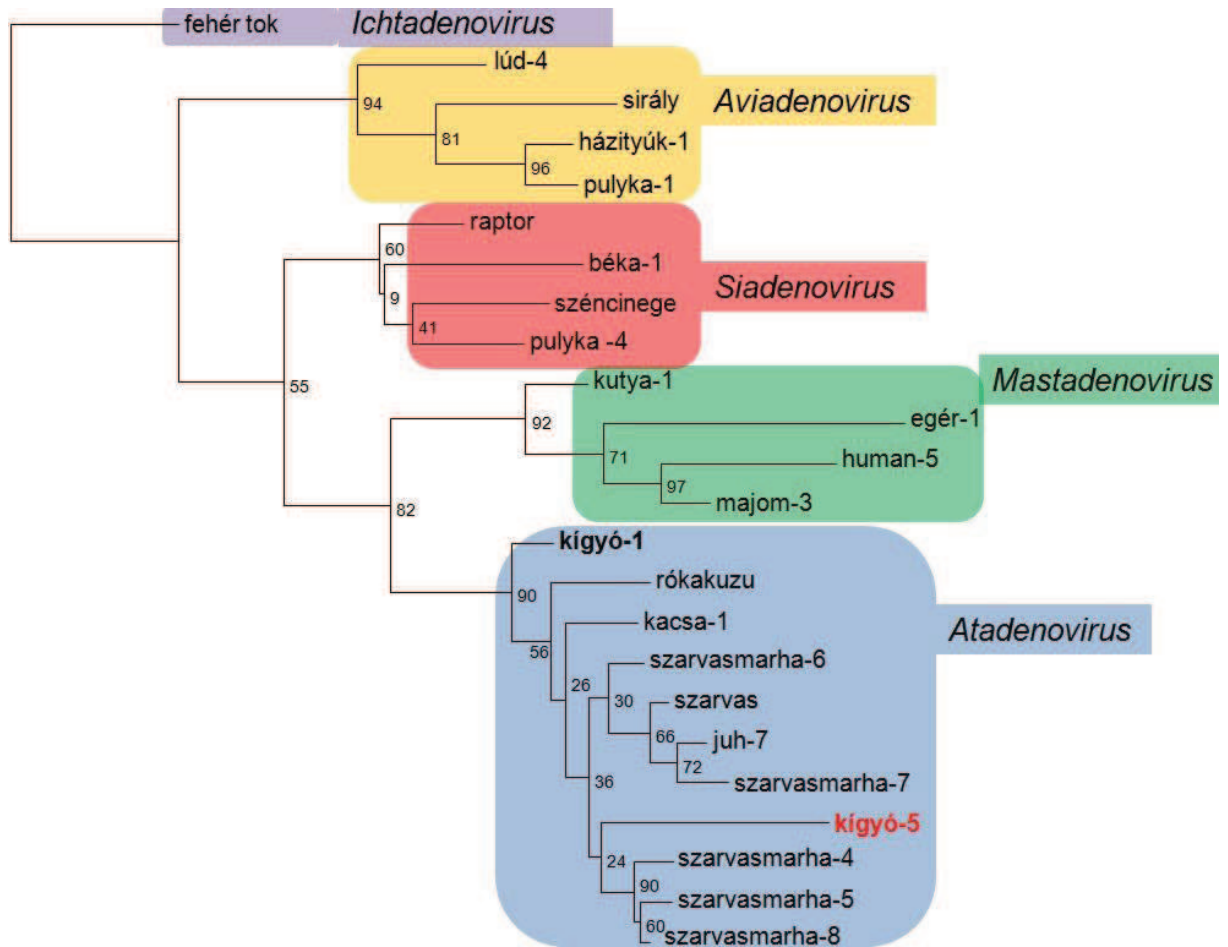
rendelkezik, melyet a 2. táblázat is szemléltet. Az új *Nerodia fasciata* adenovírus esetén ez 48,10%, míg a SnAdV-1 teljes genomjára nézve 49,10% volt, a rövid szakaszon pedig alig több, 49,45%.

2. táblázat. Néhány, a génbankban már szereplő, különböző eredetű atadenovírus genomjának G+C aránya. Aláhúzva az újonnan kimutatott kígyó-adenovírus, zöld betűkkel a hulló-, késsel a nem-hulló eredetű adenovírusok láthatók. A százalékok a vírusok eddig feltárt teljes genomjára vonatkoznak. A csillaggal jelölve azok a vírusok, amiknek a teljes genomja ismert.

vírus	G+C tartalom
Szakállas agáma-AdV	56,27%
Gabonasikló-AdV*	49,10%
Mexikói viperagyík-AdV	46,90%
Gila-AdV	48,10%
Kacsa-AdV-1 (EDSV)*	43%
Ovin-AdV-7*	34,60%
Rókakuzu-AdV	38,70%
<u>Floridai vízisikló-AdV</u>	48,10%



5. ábra: A részleges aminosav szekvenciák alapján maximum likelihood módszerrel számított törzsfarekonstrukció. Jól látható az 5 genus, valamint az új teknős-adenovírus vonal elkülönülése.



6. ábra. A hexon fehérje kb. 130 aminosavból álló szakasza alapján számított törzsfá. Ezen a fán is jól elkülönül az 5 adenovírus genus, és megerősíti, hogy a floridai vízisiklóban talált vírus (kígyó-5) az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozik.

5. Megvitatás

A hulló és kétéltű fajok nagy hányada a veszélyeztetett fajok folyamatosan bővülő listáján van (Rohr & Palmer, 2013). Ebből adódóan életmódjuk, elterjedésük, szaporodásuk, valamint kórokozóik megismerése és tanulmányozása elengedhetetlen, a két csoport diverzitásának fennmaradásához. Vadon élő és egészséges hullóket ezelőtt nem vetettek alá olyan szűrővizsgálatnak, amely kifejezetten az adenovírusokra irányult volna. Saját vizsgálataim voltak tehát az elsők ezen a területen, ahol eddig - adenovírusok esetében - nem találtunk eltérést az elpusztult állatok esetén tapasztalt prevalencia értékekhez képest.

A molekuláris szintű diagnosztikai módszerek széleskörű elterjedése után a PCR alapú módszereket úgy tervezték, hogy a szerológiai vizsgálatok során legmeghatározóbb fehérjének bizonyult hexon génjét lehessen kimutatni velük. Az első, atadenovírus kimutatására képes eljárást az EDS vírus (kacsa-AdV-1) hexon génjére tervezték (Raue & Hess, 1998). Azonban ezek a módszerek nem voltak elég hatékonyak, mert egy adott PCR rendszer csak egy genusban működött megfelelően. Emiatt nagy problémát okozott különösképpen a madarak adenovírusainak a kimutatása, melyek 3 különböző nemzetséghez is tartozhatnak. Az első, különböző nemzetségekbe tartozó adenovírusok kimutatására is képes PCR rendszer változtatott a koncepción, és a hexon gén helyett a sokkal konzervatívabb DNS-polimeráz génre irányult. Mivel az összes addig ismert nemzetségbe tartozó adenovírus kimutathatósága volt a cél, erősen degenerált, konszenzus primereket használtak. Az első jelentős siker egy új adenovírus kimutatása volt egy erszényesből, a rókakuzuból (*Trichosurus vulpecula*), melyről megállapították, hogy atadenovírus (Thomson *et al.*, 2002). További nagy lépés volt az eddigi egyetlen halból kimutatott adenovírus leírása is (Benkő *et al.*, 2002). A primerek további pontosítása és a kétkörös rendszer bevezetése után feltételezték, hogy a DNS-polimeráz génre irányuló finomított módszerrel már minden adenovírus kimutatható (Wellehan *et al.*, 2004). Az érzékenység növekedésével azonban a specifikusság csökkent. A PCR primerek nagyobb degeneráltsága miatt nagyobb a valószínűsége annak, hogy a reakciók során a DNS-polimeráz szakaszán kívül más aspecifikus fragmentek is felerősödnek.

A vizsgálataimban szereplő 112 minta mindegyikét ezzel a módszerrel szűrtük és bebizonyosodott, hogy a Wellehan és munkatársai (2004) által publikált PCR rendszer alkalmas a pikkelyes hullókben adenovírusok kimutatására. Ugyanakkor a teknősök

esetében az általam kapott negatív eredmények körültekintésre adnak okot a diagnosztikai módszer hatékonysága szempontjából. Amennyiben a teknősök (*Testudines*) adenovírusai egy új genust alkotnak (Dospoly *et al.*, 2013), mely nem létezett a primerek tervezésekor, felmerül a jogos kérdés, hogy e vírusok megbízhatóan kimutathatóak-e. A válasz a diagnosztikai módszerek finomítását igényelheti.

Ezzel szemben a pikkelyes hüllők (nagyreszt kígyók) fertőzöttségi aránya megegyezett az elpusztult állatok esetében tapasztaltakkal. Ez az eredmény jelentős bizonyíték az atadenovírusok Squamata eredete mellett. Úgy tűnik ugyanis, hogy az atadenovírusok a pikkelyes hüllőkben csak fakultatív kórokozók. Megbetegedést, tüneteket csak a fiatal, stressz alatt vagy rossz általános kondícióban lévő állatokban okoznak (Pénzes & Dospoly, 2011). Ez a jelenség az immunrendszer és a vírus hosszú, közös evolúciós múltjára enged következtetni. Ezzel szemben a nem hüllőkben atadenovírusok mindig valamilyen jól körülírható, komoly kórkép kapcsán izolálták, pl. a tyúkok tojáshozam-csökkenés szindrómáját okozó EDSV-t, hivatalosa nevén kacsá-AdV-1-et, amelyről feltételezhető hogy napjainkban a vízi madarokról került át a tyúkokra (McFerran & Smith, 2000). Elképzelhető, hogy ezekben az esetekben, hogy a gazdaváltást követett vírus még nem adaptálódott megfelelően az új gazdafajokhoz.

Vizsgálataim eredményeit figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a mai napig nem azonosítottak olyan pikkelyes hüllőt fertőző adenovírust, mely ne lett volna atadenovírus. Az általam kimutatott új kígyó vírus, az 5. kígyókat fertőző adenovírus típus (a megfelelő evolúciós távolság alapján külön típusnak javasoljuk, és a snake adenovirus 5 elnevezést ajánljuk.) A többi Squamata atadenovírushoz hasonlóan kiegyensúlyozott G+C aránnyal rendelkezik.

Az *Atadenovirus* nemzetség mellett más adenovírus nemzetségben is megfigyelhető hasonló tendencia. A szintén komoly tüneteket okozó siadenovírusokra is A+T gazdagság a jellemző, és – ugyan az eredeti gazdafajaikat még nem ismerjük – jelenlétük a ma ismert gazdáiban feltételezhetően szintén gazdaváltás eredménye (Pitcovsky *et al.*, 1998, Davison *et al.*, 2000, Kovács & Benkő 2009, Rivera *et al.*, 2009, Wellehan *et al.*, 2009, Kovács *et al.*, 2010). Arra azonban, hogy egy új gazdához való adaptáció során a vírusgenomjának G+C tartalma csökkenhet, a legjobb bizonyítékot egy RNS-vírussal, a macskákat fertőző felin lentivírussal végzett kísérletek szolgáltatták (Poss *et al.*, 2006). Mivel a retrovírusok mutációs rátája, – és ezen keresztül evolúciója is – extrém gyors a DNS vírusokéhoz képest, a kísérlet során sikerült megfigyelni valós időben az új gazdaszervezet fertőzésekor bekövetkező G+C tartalom csökkenést.

Amennyiben ez a tendencia az adenovírusokra is igaz, eredményeim ismét igazolják az atadenovírusok pikkelyes hüllő eredetét.

A kígyókban eddig talált négy adenovírust nem a gazdafaj angol neve után nevezték el, mint a legtöbb emlős AdV-t, hanem általánosságban a „snake” azaz „kígyó” elnevezést kapták. Ennek oka, hogy a fertőzöttség általában nem köthető pusztán egyetlen fajhoz. A kígyók 1-es típusú adenovírusát eredetileg gabonasiklóból (*Pantheropsis guttatus*) (Juhász & Ahne, 1993; Farkas *et al.*, 2008) és királypítóból (*Python regius*) izolálták (Ogawa *et al.*, 1992), de jelenlétét kimutatták vörösfarkú boából (*Boa constrictor*) (Ramis *et al.*, 2000) is. A 2-es típusú kígyó-adenovírust elsőként kaliforniai királlysiklóból (*Lampropeltis getulus californiae*) mutatták ki (Garner *et al.*, 2008), de azóta Hagen üregi viperában (*Trimeusurus hageni*) és egy homoki viperában (*Vipera aspis aspis*) is megfigyelték előfordulását (Farkas & Gál, 2008; Papp *et al.*, 2009). Egy harmadik típusú kígyó adenovírus PCR-rel nyert polimeráz gén szekvenciáját Garner és munkatársai sárga bikasiklóból (*Pituophis catenifer*) nyerte ki, és 3-as típusként helyezte el a génbankban (FJ012164.1). Tudomásunk van egy negyedik típusú kígyó adenovírus hasonló PCR-es detektálásáról is (Wellehan, személyes közlés). Mivel ez nem publikált eredmény, a szekvenciát és a törzsfán való elhelyezkedését nem mutatható be. A fenti négy kígyó adenovírus jelölthöz képest az általam kimutatott vírusnak a SnAdV-5 elnevezés ajánlható. Érdekes még megemlíteni, hogy az általam talált vírus az eddig nem közölt 4-es típusú kígyó-adenovírussal közös ágon helyezkedik el.

Egyelőre nincs magyarázat egyes SnAdV-ok az adenovírusnál a megszokottnál szélesebb gazdaspektrumára, lehetséges, hogy a kígyók gyors evolúciója játszott közre, de az is elképzelhető, hogy a megoldás a hüllők immunrendszerének eltérő működésében keresendő. Mindenesetre a fertőzés nem tűnik új keletűnek, mely szintén az atadenovírusok pikkelyes hüllő eredetét támasztja alá.

A törzsfa-rekonstrukció során mindenesetre bebizonyosodott, hogy a rövid DNS-polimeráz szakasz alkalmas az adenovírusok evolúciójának genus szintű vizsgálatára. Mint már korábban említettem, az új floridai vizisikló-adenovírus is az *Atadenovirus* nemzetség monofiletikus ágára került, akárcsak az eddigi összes pikkelyes hüllő-adenovírus. Noha a genus alatti, finomabb felbontású evolúciós következtetésekkel óvatosan kell bánni ilyen rövid szekvenciák elemzése esetén, az mégis egyértelműen látszik, hogy a kígyó-AdV-ok nem alkotnak monofiletikus csoportot. Valószínűsíthető,

hogy e vírusok különböző, sokszor egymástól távoli, gazdafajokban alakulhattak ki és kerültek a mai gazdáikba.

Eredményeim tehát egy újabb kígyó-adenovírus típusal gyarapították eddigi ismereteinket a hüllőket fertőző vírusokat illetően. Az, hogy ismét sikerült kimutatni a kígyók 1-es típusú AdV-át, újabb bizonyíték arra, hogy milyen széles körben elterjedt ez a vírus. Mivel ezúttal egy vadon élő állatból történt a kimutatás, elvethetjük az eddigi feltételezést, miszerint a gabonasiklóknban a vírus csupán a fogságban tartás mesterséges körülményei között, esetleg a vörösfarkú boákkal való érintkezés eredménye. Természetesen a fogságban tartott példányok esetében azonban nem zárható ki ez az út sem. Eredményeim további jelentősége, hogy ez az első, vadon élő állatokon végzett, hüllőkkel kapcsolatos szűrővizsgálat adenovírusok jelenlétére. Fontosnak tartom vizsgálataim folytatását, mivel szemmel láthatóan így kapjuk a leghitelesebb képet egy víruscsalád evolúciójára vonatkozóan. Ezen felül további vizsgálatot igényelnek a teknősökből származó minták, valamint a másik két hüllő rend (Crocodylia, Rhynchocephalia) alapos vizsgálata is. Elképzelhető, hogy ezekben az állatokban olyan adenovírusok fordulnak elő, amelyek kimutatására az általunk használt PCR rendszer nem megfelelő. A jövőben, a sokkal finomabb felbontású evolúciós következtetések levonása céljából, további génszakaszok vizsgálatát is tervezzük, ám ez újabb primerek tervezését, és az új vírus esetleges szövettenyészetben való izolálását igényelheti majd.

Összefoglalás

Amerikai hullőkben előforduló adenovírusok diverzitásának felmérése élő állatok szűrővizsgálatával

Az adenovírusok (AdV-ok; *Adenoviridae*) ikozaéder alakú, közepes méretű, burok nélküli virionnal és duplaszálú DNS genommal rendelkező vírusok. Jelenlétüket minden főbb gerinces osztály képviselőjében kimutatták, ennek megfelelően igen változatosak. Az egyes típusok ritkán lépik át a gazdafaji határokat, így jó modellek koevolúciós vizsgálatokhoz. Az AdV-okat jelenleg 5 genusba sorolják. Ezek közül az *Atadenovirus* genus tagjait először kérődzőkben, majd madarakban és egy erszényesben írták le. Gazda-eredetük után kutatva az ősbibb gerinces osztályokra terelődött a figyelem. A hal, kételtű és hulló adenovírusok molekuláris genetikai vizsgálat tisztázta, hogy a pikkelyes hullók adenovírusai egyértelműen ugyanebbe a genusba sorolhatók. A molekuláris biológiai módszerek elterjedése és egy hatékony PCR módszer kidolgozása lehetővé tette a széleskörű felmérő vizsgálatokat. Célzott szűrővizsgálatok eredményei is megerősítették, hogy a fogságban tartott, elpusztult pikkelyes hullőkben gyakori (10% körüli) az AdV fertőzöttség. A filogenetikai elemzések megerősítették a pikkelyes hulló-eredetet. Érdekes módon a legújabban felfedezett teknős-eredetű AdV-ok egy különálló ágon helyezkednek el a törzsfán, feltehetőleg egy újabb nemzetség képviselői.

A jelen munka elsődleges célja további hulló-eredetű minták vizsgálata volt az adenovírusos fertőzöttség kimutatása, az újonnan talált vírusok diverzitásának felmérése, és esetleg további teknős-AdV-ok felderítése céljából. Mivel az AdV diverzitás és abundancia szempontjából eddig még nem végeztek felméréseket szabadon élő, egészséges állatokban, ez is munkám célkitűzései között szerepelt.

Egy amerikai egyesült államokbeli halgazdaságban szabadon élő, látszólag egészséges hullók mintáinak PCR-es szűrését végeztük el. A DNS-t alkoholban tartósított kloátamponokból izoláltuk. A kétkörös, konszenzus primereket alkalmazó PCR során kapott termékeket szekvenáltuk, majd törzsfá-rekonstrukciót végeztünk.

Összesen 113 mintát szűrtem, melyek közül 88 származott különböző teknős fajokból de ezek mind negatív eredményt adtak, ugyanúgy mint az egyetlen kételtű-eredetű minta. Az eddig vizsgált 23 pikkelyes hulló mintában két esetben mutattunk ki adenovírusos fertőzöttséget, ami ezen a gazda csoporton belül 8.7 %-os prevalenciát jelent. Egy gabonasikló (*Pantherophis guttatus*) mintájában az 1-es típusú kígyó-adenovírust azonosítottuk (SnAdV-1), aminek már a teljes genom-szekvenciája ismert. Egy, a tudomány számára új AdV-t mutattunk ki floridai vízisiklóból (*Nerodia fasciata*). A virális DNS-polimeráz génből kinyert, 300 bp hosszú szakasz, és a hexon génből származó 400 bp hosszú szekvencia alapján ez is az *Atadenovirus* nemzetségbe sorolható be, hasonlóan az eddig kimutatott minden pikkelyes hulló AdV-hoz.

Figyelembe véve az élő állatokban megállapított prevalencia adatokat, a pikkelyes hullőkben az atadenovírusok valószínűleg csupán fakultatív kórokozók, ellentétben a madarakat és emlősöket fertőző, komoly megbetegedéseket okozó atadenovírusokkal. Ez tovább bizonyítja a nemzetség pikkelyes hulló eredetét.

Summary

Survey on the diversity of adenoviruses occurring in American reptiles by screening live animals

Adenoviruses (AdV) are non-enveloped, icosahedral, medium-sized viruses with linear, double-stranded DNA genome. AdVs have been derived from members of all major vertebrate classes, however, the different AdV types possess quite narrow host spectrum, and each animal species may have its own adenovirus. Therefore AdVs make a suitable model for investigating co-evolution. Out of the five presently approved genera of the family *Adenoviridae*, the genus *Atadenovirus* is supposed to be the lineage that has co-evolved with the Squamata although its first members were found in ruminants, birds, and in a marsupial. Following the widespread usage of molecular methods in virology, the Squamata-origin of the genus was supported by the detection of novel reptilian atadenoviruses and by the first full genome analysis of snake adenovirus 1. Previous surveys have demonstrated approximately 10% prevalence in samples of captive snakes and lizards, whereas phylogeny inference reinforced the Squamata-origin of atadenoviruses. Interestingly, a novel AdV lineage, most likely corresponding to a sixth genus, has been discovered in different testudinoid turtles recently.

The primary objective of this work was to examine further samples of reptilians in order to detect adenoviral infection, to explore the diversity of the newly detected viruses, and to find perhaps additional novel testudine AdVs. As no foregoing studies, concerning the infection rate in healthy animals from their natural habitat had been performed, this was a principal aim of this work as well.

Cloacal swabs, collected from apparently healthy wild-living animals on a fish farm in the United States, were screened by a consensus nested PCR system. The swabs were preserved in ethanol. The PCR products were sequenced and submitted to phylogenetic analysis.

To date, 113 samples were screened in total, from which 88 originated from turtles, and 23 from scaled reptilians and one from an amphibian. No AdV was detected in turtles or in the frog. The only two positive swabs were from scaled reptiles. This corresponds to prevalence value of 8.7% among Squamata. In one sample originating from a corn snake (*Pantherophis guttatus*) a sequence identical to that of snake adenovirus 1 was obtained. In another sample from a southern water snake (*Nerodia fasciata*), a novel sequence implying the presence of a hitherto unknown snake adenovirus was derived. Based on the results of phylogeny reconstruction with the 300-bp-long DNA-polymerase gene fragment and the 400-bp-long hexon gene fragment, both viruses belong clearly to the genus *Atadenovirus*.

The prevalence data indicate that atadenoviruses in reptiles might be facultative pathogens. To the contrary, in the non-reptilian hosts, atadenoviruses were found often to cause serious diseases. Considering this and the results of the phylogenetic reconstruction, the Squamata-origin of atadenoviruses has been verified.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Benkő Máriának, és társtémavezetőmnek, Péntes Juditnak, hogy lehetővé tették, hogy az érdeklődésem középpontjában lévő molekuláris biológia témában dolgozhattam. Köszönöm nekik a rengeteg segítséget, amit nyújtottak a laborban való munkámhoz, a technikák elsajátításához és az elméleti háttér megértéséhez.

Külön köszönetem Dr. Harrach Baláznak, aki sok tanáccsal, ötlettel és magyarázattal látott el a munkám alatt. És köszönet illeti a kutatócsoport többi tagját is, akik mindig segítettek, ha kérdésem támadt, név szerint: Ballmann Mónika, Tarján Zoltán, Doszpoly Andor, Vidovszky Márton, Papp Tibor, Kaján Győző, Kovács Endre. Ezen kívül hálásak vagyunk Dr. Andrew Goodwin-nek, az Arkansasi Egyetem oktatójának a mintákért.

Végül, és nem utolsó sorban köszönöm Szüleimnek a sok türelmet és támogatást, amit a munkám alatt nyújtottak.

A kísérletek anyagi feltételeit az OTKA K100163 számú pályázat biztosította.

Hivatkozások jegyzéke

- Abbas M.D., Marschang,R.E., Schmidt,V., Kasper,A. and Papp,T. (2011) A unique novel reptilian paramyxovirus, four atadenovirus types and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany *Vet. Microbiol.* 150, 70-79
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 1403-1410
- Bartha A (1969) Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Vet Hung* 19, 319-321
- Benkő M, Harrach B (1998) A proposal for establishing a new (third) genus within the *Adenoviridae* family. *Arch Virol* 143, 829-837
- Benkő M, Harrach B (2003) Molecular evolution of adenoviruses. In: Doerfler W, Bohm P (eds): *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus Host Interactions*. Springer, Berlin vol 272 pp 3-35
- Benkő M, Élő P, Ursu K, Ahne W, LaPatra SE, Thomson D, Harrach B (2002) First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* 76, 10056–10059
- Benkő M, Harrach B, Russell WC (2000) Family *Adenoviridae*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, pp 227-238
- Davison AJ, Benkő M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84, 2895-2908
- Davison AJ, Wright KM, Harrach B (2000) DNA sequence of frog adenovirus. *J Gen Virol* 81, 2431-2439
- Dán Á, Molnár T, Biksi I, Glávits R, Shaheim M, Harrach B (2003) Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases. *Acta Vet Hung* 51, 551-562
- Dán Á, Ruzsics Z, Russel WC, Benkő M, Harrach B (1998) Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*). *J Gen Virol* 79, 1453-1460

- Doszpoly A, Harrach B, Benkő M (2009) Genome analysis of fish adenovirus seems to point to a need of establishing the fifth adenovirus genus. In: 8th International Congress of Veterinary Virology: 20 years of ESVV: Integrating classical and molecular virology; Programme and Proceedings, p142
- Doszpoly A, Wellehan Jr JFX, Childress AL, Tarján ZL, Kovács ER, Harrach B, Benkő M. (2013) Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection, Genetics and Evolution* 17, 106-112
- Farkas SL, J Gál (2008) First Hungarian report of inclusion body hepatitis associated with adenovirus and secondary parvovirus infection in an Indonesian pit viper (*Parias (Trimeresurus) hageni*). *Magyar Állatorvosok Lapja* 130, 775-761
- Farkas SL, Benkő M, Élő P, Ursu K, Dán Á, Ahne W, Harrach B (2002) Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply common origin with the members of the proposed new genus *Atadenovirus*. *J Gen Virol* 83, 2403-2410
- Farkas SL, Harrach B, Benkő M (2008) Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus*. *Virus Res* 132, 132-139
- Felsenstein J (1989) PHYLIP-Phylogeny inference package. *Cladistics* 5, 164-166
- Garner MM, Wellehan JFX, Nordhausen RW Barr B (2008) Characterization of enteric infections associated with two novel atadenoviruses in colubrid snakes. *J Herpetol Med Surg* 18, 86-94
- Hanson LA, Rudis MR, Vasquez-Lee M, Montgomery (2006) A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virology* 3. 28
- Harrach B (2000) Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Vet Hung* 48, 485-490
- Harrach B, Benkő M (1998) Phylogenetic analysis of adenovirus sequences; proof of the necessity of establishing a third genus in the *Adenoviridae* family. In: Wold WSM (ed) *Adenovirus Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine* 21, Humana Press, Totowa pp 309-339
- Harrach B, Benkő M (2007) Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. In: Wold WSM, Tollefson AE (eds) *Adenovirus Methods and Protocols. Second Edition, vol. 2: Ad Proteins, RNA, Lifecycle, Host Interactions, and Phylogenetics. (Methods in Molecular Medicine, Vol. 131)* Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA pp 299-334

- Harrach B, Benkő M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, Jones MS, Kajon A, Lehmkuhl HD, Mautner V, Mittal SK, Wadell G (2011) Family *Adenoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (szerk.) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego pp 125-141
- Harrach B, Meehan BM, Benkő M, Adair BM, Todd D (1997) Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 229, 302-306
- Harrach B, Vidovszky M, Jánoska M, Kaján Gy, Bakonyi T, Ursu K, Weissenböck H, Ejdersund A, Benkő M (2008) PCR screening of recycled avian samples reveals an amazing wealth of different adenovirus types and species in the wildlife. In: XIV. International Congress of Virology, Istanbul, Törökország, aug. 10-15
- Juhász A & Ahne W (1993) Physicochemical properties and cytopathogenicity of an adenovirus-like agent isolated from corn snake (*Elaphe guttata*). *Archives of Virology* 130, 429-439
- Kovács ER, Benkő M (2009) Confirmation of a novel siadenovirus species detected in raptors: partial sequence and phylogenetic analysis. *Virus Res* 140, 64-70
- Kovács ER, Jánoska M, Dán Á, Harrach B, Benkő M (2010) Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit. *J Virol Methods* 163, 262-268
- McFerran JB, Smyth JA (2000) Avian adenoviruses. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 19, 589-601
- Ogawa M, Ahne W & Essbauer S (1992) Reptilian viruses: adenovirus-like agent isolated from royal python (*Python regius*). *Journal of Veterinary Medicine* B39, 732-736
- Papp T, Fledelius B, Schmidt V, Kajan GL, Marschang, (2009) PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus. *J Vet Microbiol* 134, 233-240
- Pénzes J, Doszpoly A (2011) Adenovírusos fertőzöttség kimutatása szakállas agámákban (*Pogona vitticeps*) Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 133, 432-437
- Pitcovski J, Mualem M, Rei-Koren Z, Krispel S, Shmueli E, Peretz Y, Gutter B, Gallili GE, Michael A, Goldberg D (1998) The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249, 307-315

- Poss M, Ross HA, Painter SL, Holley DC, Terwee JA, Vandewoude S, Rodrigo A (2006) Feline lentivirus evolution in cross-species infection reveals extensive G-to-A mutation and selection on key residues in the viral polymerase. *J Virol* 80, 2728-2737
- Raue R, Hess M (1998) Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J Virol Methods* 73, 211-217
- Ramis A, Fernández-Bellon H, Majó N, Martínez-Silvestre A, Latimer K, Campagnoli R (2000) Adenovirus hepatitis in a boa constrictor (*Boa constrictor*). *J Vet Diagn Invest* 12, 573-576
- Rivera S, Wellehan JF, McManamon R, Innis CJ, Garner MM, Raphael BL, Gregory CR, Latimer KS, Rodriguez CE, Diaz-Figueroa O, Marlar AB, Nyaoke A, Gates AE, Gilbert K, Childress AL, Risatti GR, Frasca S (2009) Systemic adenovirus infection is Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *J Vet Diagn Invest* 21, 415-426
- Rohr JR, Palmer BD (2013) Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. *Conservation Biology* 20, 741-751
- Thomson D, Meers J, Harrach B (2002) Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res* 83, 189-195
- Ursu K, Harrach B, Matiz K, Benkő M (2004) DNA sequencing and analysis of the right-hand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10. *J Gen Virol* 85, 593-601
- Wellehan JFX, Childress AL, Marschang RE, Johnson AJ, Lamirande EW, Roberts JF, Vickers ML, Gaskin JM, Jacobson ER (2009) Consensus nested PCR amplification and sequencing of diverse reptilian, avian, and mammalian orthoreoviruses. *Vet Microbiol* 133, 34-42
- Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkő M, Pessier AP, Johnson CM, Garner MM, Childress A, Jacobson ER (2004) Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol* 78, 13366-13369

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Benkő Mária kijelentem, hogy Godó Soma „Amerikai hullókben előforduló adenovírusok diverzitásának felmérése élő állatok szűrővizsgálatával.” c. szakdolgozatának tartalmát ismerem, az abban foglaltakkal egyetértek, és a dolgot benyújtásra, illetve védelemre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2014. április 28.

Dr. Benkő Mária
egyetemi magántanár, MTA doktora, tud. tanácsadó
MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Godó Soma

Elérhetőség (e-mail cím): soma.godo@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Amerikai hullőkben előforduló adenovírusok diverzitásának felmérése élő állatok szűrővizsgálatával.

A mű megjelenési adatai: Budapest, 2014

Az átadott fájlok száma: 1 db

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2014 év április 22.

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A **HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive** a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A **HuVetA** a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

*A **SZIA Szent István Archívum** a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*