

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Madarakban előforduló adenovírusok sokféleségének és
genetikai jellemzőinek feltárása**

PhD értekezés

Ballmann Mónika

2016

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tag:

.....

Prof. Dr. Harrach Balázs

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,

Állatorvos-tudományi Intézet

témavezető

Prof. Dr. Benkő Mária

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,

Állatorvos-tudományi Intézet

témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a(z) ... sz. példány

.....

Ballmann Mónika

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Összefoglalás.....	7
2.1 Summary.....	8
3. Bevezetés.....	9
3.1 Célkitűzések.....	10
4. Irodalmi áttekintés.....	11
4.1 Az adenovírusok általános tulajdonságai.....	11
4.1.1 Rendszertan.....	11
4.1.2 Morfológia.....	12
4.1.3 Genomszerveződés.....	13
4.2 Az adenovírusok fiberei.....	15
4.3 Pulyka-adenovírusok.....	17
4.4 Galamb-adenovírusok.....	18
4.5 Papagáj-adenovírusok.....	19
4.6 Siadenovírusok madarakban.....	20
4.7 Atadenovírusok madarakban.....	21
5. Anyag és módszer.....	22
5.1 A vizsgálati anyagok eredete, származási helye.....	22
5.1.1 Vírus izolátumok.....	22
5.1.2 Posta- és díszgalambokból származó minták.....	22
5.1.3 Vad- és egzotikus madaraktól származó minták.....	23
5.2 A virális DNS tisztítása.....	28
5.2.1 DNS-kivonás szerv mintákból és sejtenyészeti felülúszókból.....	28
5.2.2 DNS-kivonás ürülék mintákból és kloaka tamponokból.....	28
5.3 Adenovírusok kimutatása PCR segítségével.....	29
5.3.1 Általános adenovírus PCR.....	29
5.3.2 Nemzetség-specifikus PCR módszerek.....	30
5.3.3 Genomszakaszok összekötése PCR-rel.....	31
5.3.5 PCR termékek ellenőrzése és tisztítása.....	32
5.3.6 PCR termékek molekuláris klónozása.....	33
5.4 DNS-szekvenálás.....	33
5.4.1 Sanger-féle DNS-szekvenálás.....	33
5.4.2 Új generációs DNS-szekvenálás.....	34
5.5 Bioinformatikai módszerek.....	34
6. Eredmények.....	36

6.1 Pulyka-adenovírusok	36
6.1.1 A TAdV-4 genomszerveződése.....	36
6.1.2 A TAdV-5 genomszerveződése.....	37
6.1.3 A TAdV-4 és -5 filogenetikai helyzete.....	41
6.2 Galamb-adenovírusok	46
6.2.1 Hazai galambállományok szűrése adenovírusok jelenlétére	46
6.2.2 A PiAdV-2a genomrészletének szerveződése.....	49
6.2.3 Az új PiAdV-ok filogenetikai helyzete	51
6.3 A madár-adenovírus fiber gének.....	53
6.4 Egzotikus madár-adenovírusok	55
6.4.1 Papagáj-adenovírusok	55
6.4.2 Egyéb egzotikus madarak adenovírusai.....	56
6.5 Vadon élő madarak adenovírusai	57
7. Megbeszélés	59
7.1 Pulyka-adenovírusok	59
7.2 Galamb-adenovírusok	63
7.3 A madár-adenovírus fiber gének jellemzése	66
7.4 A madár-adenovírusok diverzitása.....	69
8. Új tudományos eredmények	76
9. Irodalomjegyzék	77
10. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények	86
10.1 Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk	86
10.2 Konferencia közlemények és összefoglalók.....	86
10.3 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk	87
11. Köszönetnyilvánítás.....	88
12. Függelék	89
12.1 A filogenetikai számításokhoz felhasznált szekvenciák GenBank-i azonosítói	89

1. Rövidítések jegyzéke

A, T, G, C	adenine, thymine, guanine cytosine	adenin, timin, guanin, citozin
AdV	adenovirus	adenovírus
as	amino acid	aminosav
BAdV	bovine adenovirus	bovin-adenovírus
bp	base pair	bázispár
BuAdV	budegerigar adenovirus	hullámos papagáj-adenovírus
CAR	coxsackie- and adenovirus receptor	coxsackie és adenovírus receptor
DAdV	duck adenovirus	kacsa-adenovírus
DBP	DNA-binding protein	DNS-kötő fehérje
DMSO	dimethyl-sulfoxide	dimetil-szulfoxid
EDSV	egg drop syndrome virus	tojáshozam-csökkenés szindróma vírusa
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
FAdV	fowl adenovirus	tyúk-adenovírus
FÁNK	Budapest Zoo and Botanical Garden	Fővárosi Állat- és Növénykert
GoAdV	goose adenovirus	lúd-adenovírus
GTAdV	great tit adenovirus	széncinege-adenovírus
HAdV	human adenovirus	humán-adenovírus
HR	Croatia	Horvátország
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
ITR	inverted terminal repeat	fordított vég-ismétlődés
JTT	Jones-Taylor-Thornton model	Jones-Taylor-Thornton modell
kb	kilobase	kilobázis
L1	loop 1	hurok 1
MQ	Millipore MilliQ distilled water	Millipore MilliQ ultradesztillált víz
NÉBIH	National Food Chain Safety Office	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
nt	nucleotide	nukleotid
OAdV	ovine adenovirus	ovin-adenovírus
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PiAdV	pigeon adenovirus	galamb-adenovírus
PsAdV	psittacine adenovirus	psittacin-adenovírus
RAdV	raptor adenovirus	ragadozómadár-adenovírus
rpm	revolution per minute	percenkénti fordulatszám
SAdV	simian adenovirus	majom-adenovírus

SPSAdV	South polar skua adenovirus	délsarki halfarkas-adenovírus
TAdV	turkey adenovirus	pulyka-adenovírus
TBE	tris base-boric acid-EDTA	trisz-bórsav-EDTA
THEV	turkey haemorrhagic enteritis virus	pulyka vérzésekés bélgyulladását okozó vírus
TP	terminal protein	terminális fehérje
TR	tandem repeat	egymás utáni ismétlődés
UA	Ukraine	Ukrajna
WAG+I+G	Whelan and Goldman model+invariable sites+gamma distribution	Whelan és Goldman modell+változatlan pozíciók+gamma eloszlás
YPDS	young pigeon disease syndrome	fiatal galambok betegsége

2. Összefoglalás

Az adenovírusok (AdV) családjának (*Adenoviridae*) öt elfogadott nemzetsége közül háromban, az *Aviadenovirus*, az *Atadenovirus* és a *Siadenovirus* nemzetségben található madarakat is fertőző vírusok.

Munkám kezdetekor három, pulykákból származó AdV típus volt ismeretes, melyek közül kettőnek volt elérhető a teljes genomszekvenciája a GenBank-ban. Elvégeztük két újabb pulyka-adenovírus (turkey adenovirus; TAdV), a TAdV-4 és -5 teljes genomjának meghatározását. Genomszerveződésük, illetve az elvégzett filogenetikai számítások eredményei alapján, két új aviadenovírus fajt képviselnek, a TAdV-4 a *Turkey aviadenovirus C*, míg a TAdV-5 a *Turkey aviadenovirus D* fajt.

Hazai galamb állományok AdV-ok jelenlétére irányuló szűrővizsgálata során magas, 50%-os pozitivitást tapasztaltunk és eddig le nem írt avi- és siadenovírusokat mutattunk ki. Leggyakoribbnak egy új galamb-AdV (pigeon adenovirus; PiAdV) típus bizonyult, mely az *Aviadenovirus* nemzetséghez tartozik (PiAdV-2). A korábban publikált PiAdV-1-et csupán egyetlen esetben azonosítottunk. Leírtunk egy további új aviadenovírust is, amely mindössze egy mintából volt kimutatható (PiAdV-3). A három galamb-aviadenovírus típus monofiletikus csoportot alkot a törzsfán, ami a galambokkal való koevolúciójukra utal. Elsőként mutattuk ki galambokban siadenovírusok jelenlétét; a két típus közül a PiAdV-4-et több mintában, míg a PiAdV-5-öt csak egyetlen esetben. A PiAdV-ok kimutatására korábban leírt PCR (polymerase chain reaction; polimeráz láncreakció) módszereket teszteltük és azokat megbízhatatlannak találtuk a PiAdV-1-től különböző AdV-ok diagnosztikájában; helyettük a Wellehan és munkatársai (2004) által közölt általános AdV PCR-t javasoljuk. A primer-sétálás módszerével a PiAdV-2a variáns genomjának kétharmadát sikeresen szekvenáltuk. Megállapítottuk, hogy mind a PiAdV-1-nek, mind a PiAdV-2a-nak két fiber génje van, ám a fiber-1 gén egyikben sem kódol feji alegységet, tehát valószínűleg nem vesz részt a vírus sejtfelszíni receptorokhoz való kötődésében. Feltételezzük, hogy a jelenlegi aviadenovírusok öse 2 fiber génnel rendelkezhetett, melyekből a fiber-1 gént veszítették el a ma már csak egy fiber génnel rendelkező aviadenovírusok, és ugyanennek a gének az elvesztése zajlik most a galamb-aviadenovírusoknál.

Az összesen 131 fajra és 673 egyedre kiterjedő szűrővizsgálatunk során 19%-os AdV pozitivitást tapasztaltunk a vad- és egzotikus madarak körében és megtöbbszöröztük a madaraktól ismert AdV típusok számát. Aviadenovírusokból (beleértve az új PiAdV és TAdV típusokat) 33, siadenovírusokból (az új PiAdV-okkal) 21, míg atadenovírusokból 8 új típust írtunk le és egy új taggal a mastadenovírusok nemzetségét is gyarapítottuk. Európában elsőként mutattuk ki a patogén psittacin-AdV-2-t (PsAdV-2), öt különböző papagájfajban, ezzel tovább bizonyítva kivételes képességét a fajhatár átlépésére.

2.1 Summary

Family *Adenoviridae* comprises five genera out of which three, namely genus *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* and *Atadenovirus* include viruses that can infect birds.

From turkey, three adenovirus (AdV) types were published and only two of them had their full genome sequence available in GenBank. We performed the sequencing and annotation of two further turkey AdV (TAdV) types. According to their genome organization and phylogenetic position, these new viruses constitute two new species within genus *Aviadenovirus*. *Turkey aviadenovirus C* species was established for TAdV-4 and *Turkey aviadenovirus D* for TAdV-5.

Hungarian pigeon lofts were screened for the presence of AdVs with a general AdV PCR (polymerase chain reaction). We observed extremely high, almost 50% positivity and novel avi- and siadenovirus types were detected. The most abundant type was a new pigeon adenovirus (PiAdV) belonging to the genus *Aviadenovirus* (PiAdV-2). The previously published PiAdV-1 could be found in a single sample. A third type of novel aviadenovirus (PiAdV-3) was identified, too. The three pigeon aviadenovirus types constitute a monophyletic group on the phylogenetic tree, which signals their co-evolution with pigeons. We were first to describe the presence of siadenoviruses in pigeons, two novel types; PiAdV-4 was detected frequently, while PiAdV-5 only in a single sample. The PCR methods published earlier for the detection of PiAdVs proved to be unreliable. We managed to sequence and annotate two third of PiAdV-2a genome with primer walking method and observed differences in the genome organization of the left end of PiAdV-1 and -2. Both types have two fiber genes, out of which the first ones are vestigial genes as they miss their knob domain, thus probably these fibers are not able to attach to the host cell receptors. According to the phylogenetic calculations, the ancient aviadenoviruses could have had two fiber genes and the viruses possessing only one fiber gene nowadays, lost their fiber-1 during evolution. We assume the mutation and loss of the fiber-1 gene in PiAdVs is a currently ongoing event.

During the screening of 673 samples originating from 131 wild and exotic bird species 19% AdV-positivity was observed and we multiplied the number of the known bird AdVs. Altogether 33 novel aviadenovirus types (including the new PiAdV and TAdV types), 21 novel siadenoviruses (also including the new PiAdVs) and 8 novel atadenovirus types were described and an additional new mastadenovirus was identified, too. The pathogenic siadenovirus, psittacine adenovirus 2 was detected first time in Europe, in 5 different parrot species confirming its ability to cross the species barrier.

3. Bevezetés

A gazdasági szempontból fontos, intenzíven vizsgált baromfifélék – a házityúk, a pulyka, a házilúd és a házikacsa – voltak az első madárfajok, amelyek képviselőiben AdV-ok jelenlétét leírták. Legtöbbet a házityúk AdV-airól tudunk: eddig 12 tyúk-AdV (fowl adenovirus; FAdV) szerotípust írtak le, melyek 5 fajba sorolhatók (*Fowl aviadenovirus A–E*; FAdV-A–E). Házityúkokban előfordul továbbá az *Atadenovirus* nemzetségbe sorolt kacsa-AdV-1 (duck adenovirus 1; DAdV-1), mely tojáshozam-csökkenést és héjképződési rendellenességeket okoz, illetve a siadenovírusok közé tartozó, pulykákat és fácánokat is megbetegíteni képes TAdV-3.

Munkám kezdetekor a pulykákat fertőző AdV-ok közül három típus volt ismeretes. A TAdV-1 és -2 az aviadenovírusok nemzetségébe tartozik, közülük az utóbbinak csak egy rövid szekvencia részlete ismert. A TAdV-3 a *Siadenovirus* nemzetség tagja, mely súlyos vérzéses bélgyulladás okoz a pulykákban.

A galambok mintegy határmezsgyét képeznek a gazdasági jelentőséggel bíró madárfajok és a hobbiállatok között. Adenovírusok által okozott megbetegedéseikről vannak irodalmi adatok már a nyolcvanas évektől kezdve, de mindössze az általuk okozott tünetek és a mikroszkópos, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján voltak diagnosztizálhatók, ami közel sem mondható megbízható eljárásnak. A klasszikus vírusizolálási módszerekkel csak egyetlen galamb-aviadenovírust sikerült egy német kutatócsoportnak izolálnia, a PiAdV-1-et (Hess et al., 1998a). Molekuláris diagnosztikai módszerek közül a FAdV-ok kimutatására használt PCR módszereket alkalmazták, amik a nagy a szekvencia különbségek miatt nem működtek megbízhatóan. A hazai galamb állományok AdV fertőzöttségéről nem rendelkezünk adatokkal.

Munkám kezdetekor a gazdasági jelentőséggel bíró madárfajok AdV-ain kívül a többféle sólyom fajban is kimutatott sólyom-AdV-1, négy különböző papagáj-AdV, nevezetesen a hullámos papagáj-AdV-1 (budgerigar adenovirus 1; BuAdV-1), a PsAdV-1 és -2, valamint a Meyer papagáj-AdV-1 voltak ismeretesek. A szécinege-AdV-1 (great tit adenovirus 1; GTAdV-1) és a többféle ragadozó madárfajt is fertőző raptor AdV-1 (RAdV-1) leírása hazai kutatások eredménye. A szécinegétől (*Parus major*) eltekintve a felsorolt gazdafajok mindegyike kedvtelésből tartott házi kedvenc, vagy természetvédelmi program keretein belül fogságban tartott és mesterségesen szaporított madár volt. A természetes, vadon élő madárpopulációk AdV-airól nem álltak rendelkezésre adatok sem Magyarországon, sem pedig világ szinten. A nem baromfi eredetű AdV-ok vizsgálatát nehezíti, hogy szigorú gazda- és sejt-specifitásuk miatt hiányoznak az izolálásukhoz szükséges sejtvonalak, így kimutatásuk és tanulmányozásuk nehézkes, de a molekuláris technikák megoldást jelenthetnek.

3.1 Célkitűzések

Célunk két új pulyka-aviadenovírus, a TAdV-4 és -5 genomszerveződésének meghatározása volt, az aviadenovírusok diverzitásának és evolúciójának alaposabb megismerése érdekében.

Tesztelni kívántunk egy általános AdV PCR módszert, illetve korábban mások által használt PCR eljárásokat a PiAdV-ok kimutatásában. Célunk volt a galambokban előforduló AdV-ok azonosítása, előzetes jellemzése, a magyarországi galamb állományok AdV fertőzöttségének felmérése és a leggyakrabban kimutatott PiAdV típus genomjának szekvenálása.

Tanulmányozni kívántuk a madár-AdV-ok fiber génjeinek evolúciós leszármazási viszonyait az eddig mások által közölt aviadenovírusok és az általunk leírt PiAdV-2a, TAdV-4 és TAdV-5 fiber gén szekvenciáinak bevonásával.

Célul tűztük ki a vad- és egzotikus madarak AdV-airól szerzett ismeretek bővítését, az AdV-ok gyakoriságának és diverzitásának felmérését a magyar madárfaunában és a hazai dísz- és egzotikus madárállományokban, valamint tanulmányozni kívántuk a kimutatott AdV-ok egymáshoz viszonyított filogenetikai helyzetét.

4. Irodalmi áttekintés

4.1 Az adenovírusok általános tulajdonságai

Az AdV-ok duplaszálú DNS-sel rendelkező, közepes méretű, burok nélküli vírusok; ikozaéder alakú virionjuk átmérője 70-90 nm. Jellegzetes alakjukat a virion csúcsáról antennaszerűen kitüremkedő fiber fehérjék adják. Nevük a görög „aden” vagyis „mirigy” szóból ered, mivel először kisgyermek mûtétielt eltávolított mandulájából izolálták őket 1953-ban (Rowe et al., 1953). Azóta a gerincesek gyakorlatilag minden osztályából, a halakból (Pisces), a kétélttüekből (Amphibia), a hüllökből (Reptilia), a madarakból (Aves) és az emlősökből (Mammalia) is kimutatták már a jelenlétüket (Kovács et al., 2003; Harrach, 2014). Az AdV-ok többsége nem patogén, bár kivételek ismeretesek mind a humán AdV-ok (HAdV) körében, mind az állatokban előforduló AdV-ok között (Benkő, 2015). Az AdV-ok a sejtmagban szaporodnak, mikroszkópos képeken általában jellegzetes, bazofil sejtmagzárványok láthatók.

4.1.1 Rendszertan

Az AdV-ok családja (Family *Adenoviridae*) öt elfogadott nemzetségre (*Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* és *Ichtadenovirus*) oszlik az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses; Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság) aktuális taxonómiai besorolása szerint (Harrach et al., 2011). A *Mastadenovirus* nemzetség tagjai csak emlősökben található meg. Ebbe a nemzetségbe tartoznak a HAdV-ok is, melyek eddig leírt tagjai hét fajba oszthatók be (*Human mastadenovirus A–G*; HAdV-A–G); a HAdV-B, -C, -E és -G fajok azonban a humán eredetű AdV-ok mellett számos majom-AdV (simian AdV; SAdV) típust is magunkban foglalnak. Kizárólag majmokban származó AdV-ok alkotják a *Simian mastadenovirus A* (SAdV-A) fajt. A *Mastadenovirus* nemzetségbe tartoznak a fent említettek kivül a lóól, kutyából, sertésből, egérből, és a denevérből leírt AdV-ok, illetve a kérődzők AdV-ai közül a *Bovine mastadenovirus A–C* fajok (BAdV-A–C), valamint az *Ovine mastadenovirus A* és -B (OAdV-A és -B) fajok.

A máig leírt aviadenovírusok mindegyike madarakban fordul elő, ám ezt az állatcsoportot másik két AdV nemzetség, az at- és a siadenovírusok bizonyos képviselői is képesek megfertőzni. Az aviadenovírusok közül a házityúk AdV-ai a legintenzívebben kutatottak. Eddig összesen 12 FAdV szerotípust (FAdV-1–7, -8a, -8b, -9–11) publikáltak, melyek genomorganizációjuk és filogenetikai helyzetük alapján öt fajba sorolhatók (FAdV-A–E) (Kaján et al., 2011). Az ICTV korábban a FAdV-okon kívül a *Goose aviadenovirus A* (GoAdV-A), a *Turkey aviadenovirus B* (TAdV-B), valamint a *Falcon aviadenovirus A* fajt fogadta el hivatalos taxonként ezen a nemzetségen belül, habár ennél sokkal több

aviadenovírus létezését bizonyították és publikálták már (Wellehan et al., 2005; Lüschow et al., 2007; Kaján et al., 2010).

Az *Atadenovirus* nemzetséghez tartozó vírusok gazdaspektruma meglehetősen tág az előző két nemzetséghez viszonyítva, megtalálhatóak pikkelyes hüllőkben (Squamata), kérődzőkben, madarakban, sőt egy erszényesben, a közönséges rókakuzuban (*Trichosurus vulpecula*) is leírták már atadenovírus jelenlétét (Harrach et al., 1997; Hess et al., 1997; Dán et al., 1998; Benkő et al., 2002; Thomson et al., 2002; Wellehan et al., 2004). Az eddigi kutatási eredmények alapján, vagyis a vírusok hüllőkben mutatott alacsony patogenitása, kiegyensúlyozott G+C (guanin+citozin) tartalma és a filogenetikai számítások eredményei alapján ez a vírus nemzetség a pikkelyes hüllőktől származhat (Benkő és Harrach, 2003; Farkas et al., 2008). A többi gerinces osztály tagjaiba, így például a madarakba, több gazdaváltási esemény eredményeképpen juthattak át és ezek között a vírusok között patogéneket is találunk (Smyth és McFerran, 1989; Benkő, 2015).

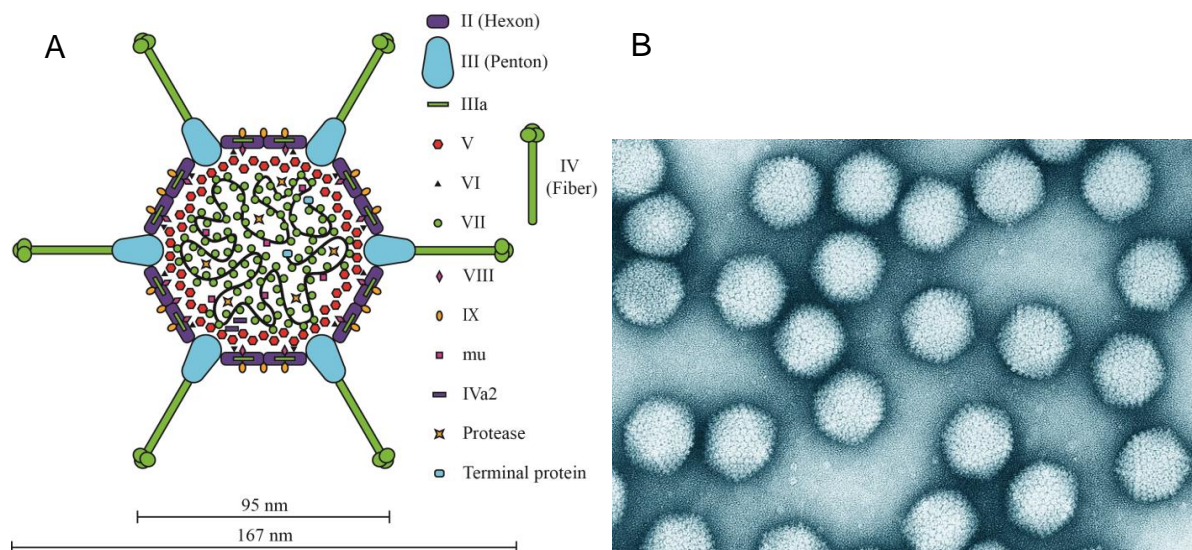
A siadenovírusok szintén szélesebb gazdaspektrummal rendelkeznek, de eredetük egyelőre tisztázatlan. Korábban azt feltételezték, hogy kételtűek lehettek az eredeti gazdáik, de mára ez az elmélet megkérdőjeleződött (Kovács és Benkő, 2011). Egyik képviselőjüket, a béka-AdV-1-et leopárd békából (*Rana pipiens*) írták le (Davison et al., 2000). Egy további patogén siadenovírust elsőként Sulawesi (Rivera et al., 2009), majd később két további teknős fajban azonosítottak (Schumacher et al., 2012). Az összes többi *Siadenovirus* nemzetséghez tartozó vírus típust madaraktól mutatták ki és közöttük több olyat találunk, amely súlyos megbetegedést képes okozni (Pitcovski et al., 1998; Zsivanovits et al., 2006; Kovács és Benkő, 2011; Park et al., 2012).

Az *Ichtadenovirus* nemzetségnek mindössze egy tagja van, a tokhal-AdV-1. Doszpoly és munkatársai 2013-ban teknősökben kimutatott, a fent említett öt nemzetségbe be nem sorolható AdV-okat írták le. A filogenetikai számítások szerint ezek a vírusok egy önálló, monofiletikus csoportot alkotnak (Doszpoly et al., 2013). Az új rendszertani csoportot *Testadenovirus* nemzetség néven kívánják az ICTV számára elfogadásra javasolni és bejegyeztetni.

4.1.2 Morfológia

Az ikozaéder alakú kapszidot 240 db homotrimer szerkezetű hexon fehérje és a virion 12 csúcsán található penton bázis képezi (1. ábra). A csúcsokon a penton bázisba ágyazódva található az antenyszerű fehérjenyúlványok, a homotrimer fiber fehérjék, melyek a gazda sejtmembránjához való kapcsolódás elsődleges elemei. A IIIa fehérje monomerjei, a VI-os és a VIII-as fehérje, valamint a mastadenovírusokban a IX-es fehérje a kapszid belső oldalához kapcsolódik. A VI-os és a VIII-as proteinek kapcsolják össze a magot a kapsziddal. A magban a nukleinsavhoz kötötten található a VII-es, a X-es, valamint

a kizárólag mastadenovírusokban megtalálható V-ös protein. A terminális protein kovalensen kötődik a duplaszálú DNS két 5' végéhez (Harrach et al., 2011). Az atadenovírusokban az V-ös protein kapszid erősítő szerepét az LH3 fehérje tölti be (Gorman et al., 2005).



1. ábra: Az AdV-ok általános szerkezeti felépítése sematikus ábrázolásban (A) és az AdV-ok elektronmikroszkóppal látható képe (B).

Forrás: Saha et al., 2014. és <https://somapps.med.upenn.edu/pbr/portal/hist/F19-adeno.html>

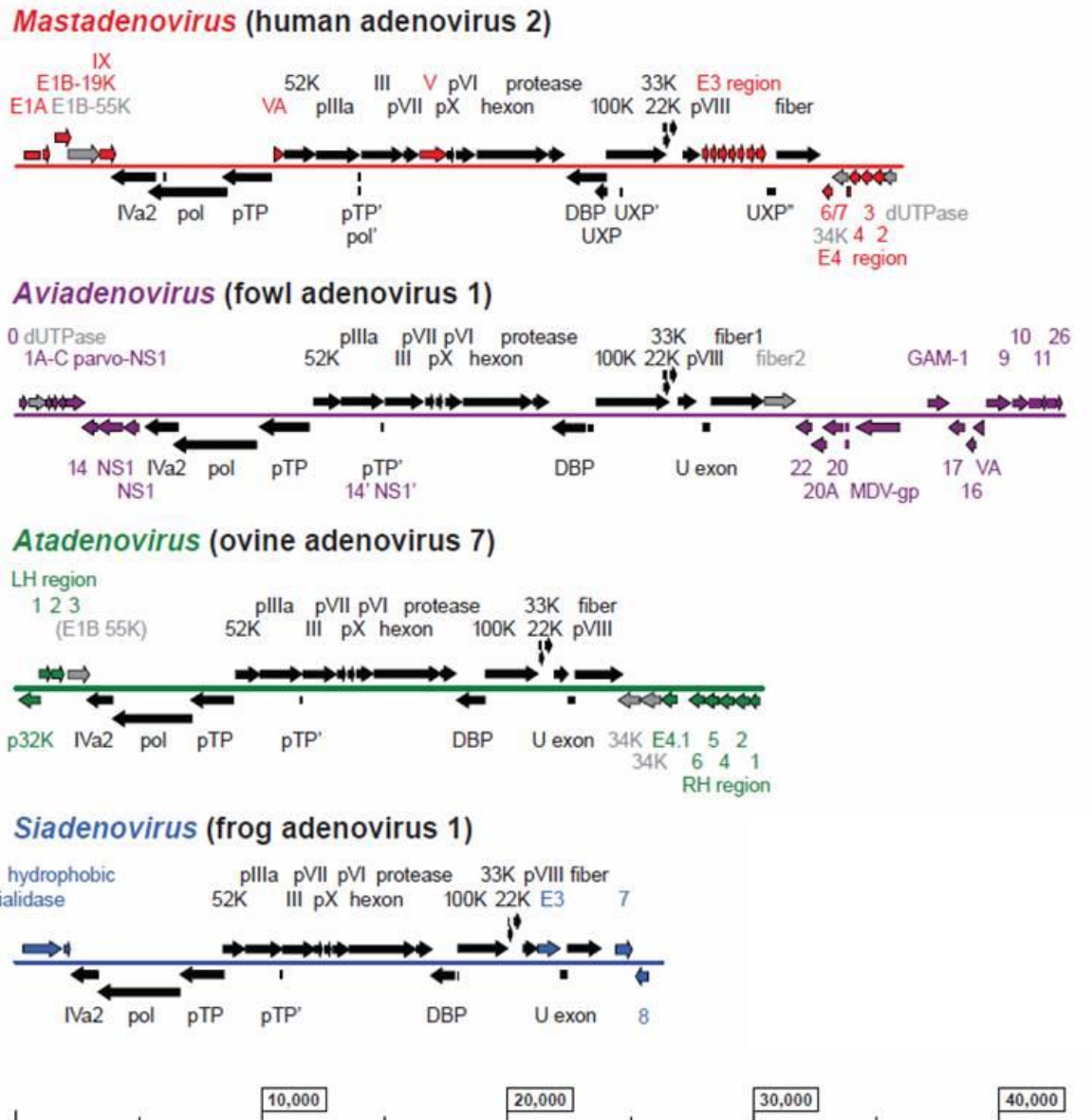
4.1.3 Genomszerveződés

Az eddig leírt AdV genomok mérete ~26 ezer és ~48 ezer bázispár (bp) között változik és a genom hossza jellemző az egyes nemzetségekre (Harrach et al., 2011). A legrövidebb genommal a siadenovírusok rendelkeznek. A béka-AdV-1 genomja mindössze 26.136 bp hosszú (Davison et al., 2000), de a madaraktól származó siadenovírusok genom hosszúsága is alig haladja meg ezt (Kovács és Benkő., 2011; Park et al., 2012; Lee et al., 2016). Az aviadenovírusok genomjának hosszúsága ezzel ellentétben elérheti a 45 ezer bp-os méretet is. Az eddig leírt aviadenovírusok közül a FAdV-5 genomja a leghosszabb, 45.781 bp (Marek et al., 2013). Az AdV genomok G+C tartalma 33,7% és 67,6% között mozog. A legalacsonyabb G+C tartalmú genommal rendelkező vírusokat az *Atadenovirus* nemzetségben találjuk, ezek közül is a nem pikkelyes hüllőkből kimutatott vírusok esetében igaz ez a megállapítás (Harrach et al., 1997; Hess et al., 1997; Péntzes et al., 2014). Az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartoznak a legmagasabb genomi G+C aránnyal rendelkező AdV-ok, a TAdV-1 genomjának G+C tartalma ezek közül is kimagasló, 66,9% (Kaján et al., 2010; Marek et al., 2014b, Marek et al., 2016).

Az AdV-ok DNS-ének mindkét szála kódol fehérjéket. A genom középső része a IVa2 fehérjét kódoló géntől a pVIII prekursor proteint kódoló génig nagyon megőrzött (2. ábra). Ezek a gének elsősorban szerkezeti fehérjéket kódolnak. Mind az öt jelenleg elfogadott AdV

nemzetségben ugyanazok a gének találhatóak meg, ugyanabban a sorrendben és irányultságban, kivéve a csak a mastadenovírusok genomjában kódolt V-ös protein génjét. A mast- és a siadenovírusokban a pVIII prekursor proteint kódoló gén és a fiber gén közé ékelődik az E3 régió, mely a mastadenovírusoknál egy hosszabb, több génből álló egység, míg a siadenovírusok esetében mindössze egyetlen gén alkotja. A fiber gén, illetve gének szintén megőrzöttek, minden nemzetség tagjaiban megtalálhatók legalább egy kópiában. A genom bal és jobb vége minden nemzetség tagjaiban nagy variabilitást mutat (2. ábra). A leghosszabb variábilis genomvégi régiókkal az aviadenovírusok rendelkeznek. A genom bal végén több kópiában tartalmaznak a parvovírusok NS1 (non-structural 1, rep protein) génjével homológiát mutató nyitott leolvasási kereteket, melyek a pozitív és a negatív szálon egyaránt megtalálhatók (Corredor et al., 2006). A genom jobb végén több nemzetség-specifikus feltételezett gént találunk, melyek közül csak kevésnek tisztázott a funkciója. Az ORF8 által kódolt antiapoptotikus GAM-1 fehérje az ORF22-nek elnevezett génről átíródó fehérjével együtt kötődik a retinoblasztóma fehérjéhez és aktiválja az E2F sejtciklus szabályozó útvonalat (Chiocca et al., 1997; Lehrmann és Cotten, 1999). A többi feltételezett gén esetleges szerepéről hiányosak az irodalmi adatok. A genom végeket a fordított ismétlődő szekvenciák, az úgynevezett ITR (inverted terminal repeat) szekvenciák zárják. Az ITR-ek hossza vírus típusonként változó, de átlagos hosszuk a nemzetségekre jellemző.

Az mRNS-splicing jelenségét először az AdV-ok esetében figyelték meg (Berget et al., 1977; Chow et al., 1979). A splicing során az éretlen mRNS-ből eltávolítódnak az intronok, az exonok pedig összekapcsolódnak tehát a genetikai információ a transzkripciót követően módosul. A splicingnak köszönhetően egy adott génszakaszból több különböző géntermék is keletkezhet, valamint a genom egymástól távolabb elhelyezkedő exonjairól is fordítható le fehérje. Ezek a szerkesztések konzervált szekvenciákkal rendelkező splice donor és akceptor helyek mentén történnek. A keletkező mRNS-ek szekvenálásával pontosan meghatározhatók a splice donor és akceptor helyek a genomban, ám amennyiben erre nincs lehetőség, úgy bioinformatikai módszerekkel is lehetséges ezek predikciója. Az aviadenovírusok számos fehérjéje keletkezik splice útján: a pTP, az ORF12, -13, -14, -14A, a DBP, a 33K, az ORF20, -20A és 19, valamint a nem minden aviadenovírusban megtalálható ORF11 és -26.



2. ábra: Négy AdV nemzetség genomszerveződése.

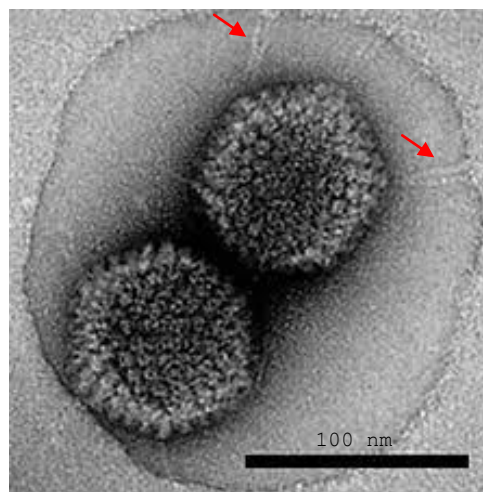
Az ötödik elfogadott AdV nemzetség, az ichtadenovírusok teljes genom szekvenciáját és genomszerveződését még nem publikálták. A fekete nyilak a minden nemzetségben megtalálható géneket jelzik, míg a szürkék azokat, melyek több, mint egy nemzetségben előfordulnak. A színes nyilak a nemzetségre specifikus géneket ábrázolják. Forrás: Harrach et al., 2011.

4.2 Az adenovírusok fiberei

A *Mast-* és az *Atadenovirus* nemzetségben a legtöbb vírus genomja egy fiber gént kódol, de kisebb számban előfordulnak két fiber génnel rendelkezők is. A mastadenovírusok közül az óvilági majmok AdV-ai általában két fiber gént tartalmaznak, de feltételezhetően az ezekről átíródó fehérjék különböző csúcsokon, egyesével helyezkednek el (Podgorski., et al., 2016). Az atadenovírusok közül különleges a két fiber génnel rendelkező gyík-AdV-2, ahol a pentonokon felváltva, egyszerre vagy 3 hosszú, vagy csak egy rövid fiber található (a fiber hármas valószínűleg viriononként csak 2 pentonon fordul elő) (Pénzes et al., 2014). A

Siadenovirus nemzetség az egyetlen, ahol az eddig leírt vírus genomok mindegyike csak egy fiber gént kódol.

Az aviadenovírusok genomjában a fajtoktól függően egy, vagy két fiber gént találunk. A FAdV-B, -D, -E, valamint a DAdV-B fajokhoz tartozó vírusok genomja egyetlen fiber gént kódol, míg a FAdV-A és -C, valamint a GoAdV-A, TAdV-B és a PiAdV-A fajok vírusainak genomjában két fiber gén található (Ojkic és Nagy, 2000; Kaján et al., 2012; Marek et al., 2014b; Marek et al., 2016). A FAdV-ok virionjának felszínén csúcsonként 2-2 fiber fehérje helyezkedik el az elektronmikroszkópos képek alapján (3. ábra), függetlenül attól, hogy genomjuk egy vagy két fiber gént kódol (Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982; Hess et al., 1995), míg a többi aviadenovírus virionjának felszínén található fiber fehérjék számáról nincs irodalmi adat.



3. ábra: A FAdV-D fajba tartozó FAdV-9 elektronmikroszkópos képe.

A FAdV-ok esetében a virionok felszínén csúcsonként egy penton bázisba ágyazottan 2-2 fiber fehérje található (piros nyilak). Forrás: Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982.

A homotrimerikus fiber fehérje, mely felelős a gazdasejthez történő elsődleges kapcsolódásért három szerkezeti egységre osztható. Az amino-terminális farok (tail) domén a virionok csúcsain található kapszomerbe, a penton-alapba ágyazódik. A fiber középső, szár (shaft) része vírus típusonként eltérő hosszúságú lehet a fehérjét alkotó ismétlődő egységek számától függően, és ennek megfelelően flexibilitása is változatos. A teljes fehérje hossza 9 és 77,5 nm közötti az eddig leírt AdV-okban. A fehérje karboxi-terminális vége alkotja a globuláris feji (head) domént, mely felelős a gazdasejthez való kapcsolódásért; aminosav (as) összetétel és méret szempontjából nagy variabilitást mutat. A feji domén szerkezete és az azon található speciális „függelék” határozzák meg a vírus receptor affinitását, sejt tropizmusát (Guardado-Calvo et al., 2007).

Munkám kezdetekor mindössze egyes HAdV-ok és a FAdV-1 (Guardado-Calvo et al., 2007; El Bakkouri et al., 2008) fiber fehérjéinek 3-dimeziós szerkezetéről, működéséről és

receptor affinitásáról voltak adatok az irodalomban. A HAdV-ok leggyakrabban használt sejtfelszíni receptora a CAR (coxsackie- and adenovirus receptor), a desmoglein 2, a CD46/80/86 és a szialinsav (Arnberg et al., 2000, Segerman et al., 2003). A CAR receptort a FAdV-ok is használják, mégpedig a fiber-1 segítségével tudnak hozzá kapcsolódni, míg a fiber-2 egyelőre ismeretlen, valószínűleg egyedi, csak madár sejteken előforduló receptorokhoz kötődik (Tan et al., 2001).

4.3 Pulyka-adenovírusok

Pulykákban eddig avi- és siadenovírusok jelenlétét igazolták. A pulykákat fertőző aviadenovírusok közül a kétezres évek elejéig mindössze két különböző típus volt ismeretes, a TAdV-1 és -2. Mindkét vírust Észak-Írországból izolálták és jellemezték (Adair et al., 1980). A TAdV-1-et kötőhártya gyulladást, nefritist és légzsákgyulladást mutató pulykákból izolálták (Scott és McFerran, 1972), a TAdV-2-t pedig napos pulykákból, amelyek magzárványos májgyulladásban szenvedtek. Kísérletesen bizonyították, hogy a TAdV-2 kelésgyengeséget is okozhat (Guy és Barnes, 1997). Sajnálatos módon az eredeti észak-ír TAdV-1 izolátumnak nyoma veszett és szekvencia adat egyáltalán nem állt belőle rendelkezésre, mindössze a teljes virális genom restriktív enzimes hasítási képe (Guy és Barnes, 1997). A későbbiekben Kaján és munkatársai megszekvenálták egy D90/2 azonosítószámmal rendelkező magyar TAdV izolátumot, melynek virtuális restriktív enzimes hasítási képe eltér mind a két észak-ír izolátumtól (Kaján et al., 2010). Ez volt az első nem házityúk eredetű aviadenovírus, melynek a teljes genomja ismertté vált. Mivel az eredeti észak-ír TAdV-1 izolátumnak nem sikerült a nyomára bukkanni, ezért az a döntés született, hogy a D90/2-es TAdV izolátumot fogják ezentúl TAdV-1-nek nevezni; az ICTV hivatalos nomenklatúrájában is így szerepel. Filogenetikai számítások alapján a TAdV-1 egy külön fajt (TAdV B) képez, mint egyetlen képviselő. A TAdV-2-ből a mai napig csak részleges hexon szekvencia adat áll rendelkezésre (Kaján et al., 2010).

A TAdV-A fajba egyetlen vírus típus tartozik, a TAdV-3, mely a *Siadenovirus* nemzetség tagja. A TAdV-3 közismertebb neve a THEV (turkey hemorrhagic enteritis virus), mely a vírus által okozott vérzéses bélgyulladásos megbetegedés angol nevének rövidítéséből ered (Palya et al., 2007). A TAdV-3 pulykák mellett előfordul házityúkban és fácánban (*Phasianus colchicus*) is, fajoként más-más klinikai tüneteket okozva; házityúkban lépmegnagyobbodást, míg fácánban úgynevezett márványláb betegséget idéz elő (Domermuth et al., 1979; Harrach et al., 2011).

4.4 Galamb-adenovírusok

A galambok adenovírusos megbetegedése régóta ismert. Az első esetet Belgiumban írták le 1984-ben (Coussement et al., 1984), de azóta számos, elsősorban kórszövettani, elektronmikroszkópos és szerológiai metodikával bizonyított esetet közöltek (Goryo et al., 1988, De Herdt et al., 1995; Hess et al., 1998a). A galambokban háromféle, AdV-ok által okozott megbetegedést tartanak számon, ám ezek definiálása nem a megbetegedést okozó AdV-ok típusa szerint történik, hanem a jellemző klinikai tünetek alapján (Vereecken et al., 1998; Raue et al., 2005b).

Az I-es típusú adenovirózis, vagy más néven klasszikus adenovirózis elsősorban a fiatal galambokat érinti. Jellemzően enterális tüneteket okoz, hányást, hasmenést, bélgyulladást, majd ennek következtében testtömeg csökkenést és sejtmagzárványos májgyulladás is megfigyelhető. A II-es típusú adenovirózis (necrotising hepatitis, elhalásos májgyulladás) sporadikusan fordul elő, és nem korlátozódik a fiatal korosztályra, minden életkorú galambnál előfordulhat. Jellemzően inkább légzőszervi tüneteket okoz, ezért terjedhetett el a „szőrösögő szindróma” kifejezés a gyakorló állatorvosok körében. A II-es típusú adenovirózis emellett súlyos elhalásos májgyulladással jár, melynek következtében az érintett galambok a gyors lefolyású betegségben 1-2 napon belül elpusztulnak (Vereecken et al., 1998).

A harmadik betegség típus, melyben AdV-ok szerepét feltételezték, az úgynevezett „fiatal galambok betegsége” (Young Pigeon Disease Syndrome; YPDS). Jellemzően a 4-12 hetes korcsoportot érinti, jellegtelen tüneteket, mint például testtömeg csökkenést, bágyadtságot, hányást okozva. Általában a fiatal galambok kevesebb, mint 20%-a érintett egy-egy állományon belül, de a morbiditás és mortalitás esetenként akár az 50%-ot is elérheti. A YPDS fő kórokozójaként a circovírusokat jelölték meg, de az általuk okozott immunszuppressziós hatás következményeképpen fellépő másodlagos, sok esetben bakteriális fertőzéseknek szintén szerepe van a szindróma kialakulásában (Raue et al., 2005b). Az AdV-ok jelenétét nem erősítették meg a YPDS-ben szenvedő galambok mintáin végzett PCR-es vizsgálatok (Raue et al., 2005b; Freick et al., 2008; Stenzel et al., 2012).

A PiAdV-okat számos esetben próbálták izolálni primer csirke embrió fibroblaszt, máj és vese sejteken. Ezek eredményeként a legtöbb esetben valamilyen FAdV-t, például a FAdV-2, -4, -5, -6, -8, -10, és -11 típusokat (Hess et al., 1998b) sikerült elszaporítani. Az első galambokból származó izolátum is FAdV típus volt, nevezetesen a FAdV-8 (McFerran et al., 1976). Az AdV-ok erős gazda-, szerv-, és sejtspecifitása miatt nehéz őket olyan sejteken izolálni, melyek nem az eredeti gazdafajból származnak. Az első „valódi” PiAdV típust, a PiAdV-1-et 1998-ban izolálták galambokból, szintén csirke eredetű sejteken (Hess et al., 1998a). A szerológiai különbséget később molekuláris módszerrel, a vírus szerotípusát

meghatározó hexon fehérje részleges szekvenciájának meghatározásával is megerősítették és megállapították, hogy a PiAdV-1 az *Aviadenovirus* nemzetségbe sorolható. A vírus galamb eredetét a FAdV-okhoz viszonyított filogenetikai helyzetén kívül alátámasztja az a tény, hogy ezt az AdV-t korábban nem mutatták ki egyetlen baromfiféléből sem. A PiAdV izolátumok száma 1998 óta nem növekedett. Galambokból *Si-* és *Atadenovirus* nemzetségbe tartozó vírusokat nem mutattak ki, sem klasszikus, sem molekuláris technikákkal.

A PiAdV-ok kimutatását számos PCR módszerrel megkísérelték (Raue et al., 2005b; Freick et al., 2008). Ezekben az eljárásokban azonban olyan, elsősorban hexon génre specifikus primer párokat alkalmaztak, melyeknek szekvenciáit az ismert aviadenovírusok, vagyis többnyire a FAdV-ok hexon génjének nukleotid (nt) sorrendjét alapul véve terveztek (Hess, 2000). Raue és munkatársai a PiAdV-1 fiber génje alapján tervezett specifikus PCR módszert publikáltak (Raue et al., 2002). Ez a módszer a PiAdV-1-től eltérő, új PiAdV-ok kimutatására a variábilis fiber génben várható nagy szekvencia különbségek miatt nem alkalmas.

4.5 Papagáj-adenovírusok

Különbéle papagájfajok egyedeiben fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján már a nyolcvanas években leírták az úgynevezett magzárványos májgyulladást, amelyet AdV-ok jelenlétének tulajdonítottak hullámos papagájban (*Melopsittacus undulatus*), nimfapapagájban (*Nymphicus hollandicus*) és feketefejú törpepapagájban (*Agapornis personata*), ám a vírusokat nem izolálták és molekuláris adatokat sem publikáltak (Scott et al., 1986; Pass, 1987; Jacobson et al., 1989; Gómez-Villamandos et al., 1992). Sejtmagzárványokat a májon kívül esetenként a vesében és a bélnyálkahártya sejteiben is megfigyeltek (Gómez-Villamandos et al., 1992). Megjegyzendő azonban, hogy az AdV-ok által okozotthoz hasonló szövettani elváltozások kialakulását eredményezheti a májsejtekben például az 1-es típusú papagáj-herpeszvírus is, tehát a magzárványok jelenléte mai ismereteink szerint önmagában nem kórjelző értékű (Bistyák et al., 2007).

Az elmúlt 10 évben közölt szekvencia adatok ismeretében ma már tudjuk, hogy papagájfajokban mindhárom, madarakat fertőző AdV nemzetség tagjai előfordulhatnak (Lüscho et al., 2007; Wellehan et al., 2009; To et al., 2014). Az első, szekvencia-szinten jellemzett papagáj-AdV-t 2005-ben írták le szenegál papagájokban (*Poicephalus senegalus*) a hexon gén L1 régióját felerősítő PCR segítségével (Raue et al., 2005a). Ezt a PsAdV-1-nek elnevezett aviadenovírust később további papagájfajokban is azonosították és egy valósidejű PCR-en alapuló diagnosztikai eljárást is kidolgoztak (Lüscho et al., 2007). Ugyanebben az évben írták le az Amerikai Egyesült Államokban a Meyer papagáj-AdV-1-et, ami a filogenetikai számítások alapján szintén az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozik

(Wellehan et al., 2005). A PsAdV-1-ből a hexon gén L1 régiójának szekvenciáját, míg a Meyer papagáj-AdV-1-ből a polimeráz gén egy ~300 bp-os szakaszának szekvenciáját határozták meg. Ezek a különböző felerősített szakaszok nem fednek át, ezért e két papagáj-AdV nem összehasonlítható, így azonosságukat sem lehet kizárni.

Az első papagáj siadenovírust, a PsAdV-2-t az Amerikai Egyesült Államokban írták le szilvafejű papagáj (*Psittacula cyanocephala*) és fehérbóbitás kakadu (*Cacatua alba*) egy-egy beteg, de élő példányából (Wellehan et al., 2009). Ugyancsak siadenovírust mutattak ki Japánban, hullámos papagájok lépmegnagyobbodással és elhullással járó megbetegedése kapcsán egy hexon génre irányuló PCR segítségével. A vírus a hullámos papagáj-AdV-1 (budgerigar AdV-1; BuAdV-1) elnevezést kapta (Kato et al., 2009). Megjegyzendő azonban, hogy a BuAdV-1 különbözősége a PsAdV-2-től egyelőre nem tisztázható, mivel a két vírusból nem ugyanakkor a génszakaszok a szekvenciáit ismerjük.

Atadenovírust elsőként Szlovéniában mutattak ki kis sándorpapagájban (*Psittacula krameri*) (Zdravec et al., 2011). Később, 2014-ben egy kínai kutatócsoport molnár amazonokból (*Amazona farinosa*) írt le egy új AdV-t, mely a filogenetikai számítások eredményei és a vírus genomszerveződése alapján szintén az *Atadenovirus* nemzetséghez tartozik. Az új vírus a PsAdV-3 nevet kapta és a teljes genomszekvenciáját is meghatározták (To et al., 2014). A PsAdV-3-at egy zoonotikus, humán megbetegedést is okozó *Chlamydia psittaci* járvány vizsgálata során fedezték fel amazon papagájállományban. Érdekessége, hogy ez volt az első atadenovírus, melyben két fiber gént találtak, ám még ugyan abban az évben leírták a gyík-AdV-2-t (Pénzes et al., 2014), mely szintén két fiber génnel rendelkezik. Magyarországon egyetlen AdV okozta megbetegedésről sem számoltak be papagájok esetében kutatásomat megelőzően.

4.6 Siadenovírusok madarakban

A siadenovírusok döntő többségét madarakban írták le; mindössze egy típus, a béka-AdV-1 ismeretes békából (Davison et al., 2000) és egy másik típus teknősökből (Rivera et al., 2009). Az első leírt siadenovírus a pulykák vérzéssel járó bélgyulladását okozó TAdV-3 volt, melyet a TAdV-ok kapcsán egy korábbi bekezdésben már tárgyaltunk. A ragadozó madárfajokból, két uhufajból (*Bubo sp.*) és harris ölyvből (*Parabuteo unicinctus*) leírt RAdV-1-et szintén komoly patogénként tartják számon (Zsivanovits et al., 2006). A RAdV-1-et izolálni nem sikerült a megfelelő sejtvonal hiánya miatt. Ez volt az első olyan AdV, amelynek teljes genomját a vírus izolálása nélkül, az úgynevezett „primer-sétálás” módszerével sikerült megszekvenálni (Kovács és Benkő, 2011). Érdekes módon azonban a RAdV-1-et a 2004-es járvány után a későbbiekben nem mutatták ki sem az izolálás helyén, sem más földrajzi régióban. A délsarki halfarkas (*Stercorarius maccormicki*) siadenovírusát (South Polar skua adenovirus 1, SPSAdV-1) a madarak tömeges pusztulásával kapcsolatban írták le az

Antarktiszon (Park et. al., 2012). Hasonlóképpen a RAdV-1-hez, a SPsAdV-1 teljes genom szekvenciáját is a vírus izolálása nélkül, a primer-sétálás módszerével határozták meg. Énekesmadárból (Passeriformes) mindössze egyetlen esetben, egy széncinegéből mutattak ki siadenovírust (Kovács et al., 2010). Papagájfajokból eddig két siadenovírust, a PsAdV-2-t és a BuAdV-1-et közölték, melyeket az előző fejezetben bemutatunk.

4.7 Atadenovírusok madarakban

Az *Atadenovirus* nemzetségben mindössze két vírus ismert, melyet madarakból írtak le. A DAdV-1, ismertebb nevén EDSV (egg drop syndrome virus; tojáshozam-csökkenés szindróma vírusa) klinikai tünetet és ezzel nagy gazdasági károkat főként tyúkokban okoz; a tojástermelés csökkenése mellett a vírus súlyos tojáshéj képződési problémákat idéz elő. Az EDSV-t 1976-ban írták le Hollandiában (McFerran, 1979), mára azonban az egész világon elterjedt. Számos madárfajban, mint például fehér gólyában (*Ciconia ciconia*), ezüstsirályban (*Larus argentatus*), pásztorgémekben (*Bubulcus ibis*) házi verébben (*Passer domesticus*), baglyokban (Strigiformes), hattyúkban (Cygnini), vöcsökfélékben (*Podiceps sp.*) és egyéb vízimadárfajokban is leírták szerológiai detekciós módszerekkel az EDSV elleni ellenanyagok jelenlétét (Bartha et al., 1982; Smyth és McFerran, 1989). Molekuláris technikákkal azonban csak házi baromfifélékben, vagyis kacsákban és tyúkokban mutatták ki eddig. A másik madár-atadenovírus a PsAdV-3, melyet az előző fejezetben részletesen ismertettünk.

5. Anyag és módszer

5.1 A vizsgálati anyagok eredete, származási helye

5.1.1 Vírus izolátumok

A D1648-as nyilvántartási számú TAdV-5 izolátumot dr. Palya Vilmostól, a Ceva-Phylaxia Zrt. munkatársától kaptuk további vizsgálatra. A vírust primer csirke embrió fibroblaszt sejteken szaporították el akut felső légúti megbetegedést mutató húspulykákából. A 1277BT jelzésű TAdV-5 törzset az Egyesült Királyságban izolálták pulyka tenyészállományból, majd Dr. Michael Hess és dr. Ana Marek, Bécsi Állatorvostudományi Egyetemen (Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria) dolgozó együttműködőink megkezdték a teljes genomszekvenálását az új generációs Illumina platformon. A molekuláris vizsgálatok során, a genomok szekvenálása közben kiderült, hogy a fent említett két TAdV-5 törzs, vagyis a D1648 és a 1277BT egymással szinte megegyezik, így a munkát, a genomok értelmezését, elemzését és a vírus törzsek filogenetikai vizsgálatát közösen folytattuk. A TNI1 jelzésű TAdV-4 törzset az Egyesült Királyságban izolálták pulykákából és korábban azonosnak hitték az Észak-Írországban TAdV-1 néven azonosított vírus törzssel. A további vizsgálatok után kiderült, hogy ez az új, brit törzs nem egyezik meg egyik korábban leírt típussal sem, különbözik mind az észak-ír TAdV-1-től, mind a nemrégiben Kaján és munkatársai (2010) által közölt TAdV-1 és -2 típustól. A TAdV-4 törzset szintén bécsi partnerünk szekvenálta az Illumina platformon.

5.1.2 Posta- és díszgalambokból származó minták

A Jászság, Budapest és Pest megye, Tatabánya, Hajdúböszörmény és Szeged körzetéből összesen 27 posta- és díszgalamb állományból 97 mintát vizsgáltunk. A Szent Bernát Kisállat-ambulancián dolgozó dr. Berta Krisztián galambspecialista állatorvos közreműködésével 33 galambból máj, tüdő, vese és bél mintákat külön gyűjtöttünk. A galambok a YPDS-hez hasonló klinikai tüneteket mutató egyedek, vagy elhullott példányok voltak. Negyvenhét galambból kizárólag máj mintákat gyűjtöttünk 3 jázsági állomány elhullott példányaiból és a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság munkatársa, dr. Thuma Ákos segítségével további 3 állományból. A beteg galambok kiirtása a kisállat ambulancián, vagy a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságán kivézetéssel történt. Boncolást követően a szerveket -20°C-on tároltuk a további feldolgozásig. A fent említett 80 elhullott, vagy kiirtott példány mellett két olyan jázsági állományból, ahol előzetesen AdV-sal fertőzött, klinikai tüneteket mutató galambokat találtunk, 17, látszólag egészséges galambból ürülék mintákat vettünk.

5.1.3 Vad- és egzotikus madaraktól származó minták

Magyarországon vadon élő énekesmadaraktól, illetve a kistermetű, más madárrendbe tartozó, de függőhálóval befogható fajoktól madárgyűrzési tevékenység közben ürülék mintákat gyűjtöttünk. Ukrajnából (UA) dr. Doszpoly Andor közreműködésével jutottunk élő énekesmadaraktól származó ürülék mintákhoz. A fehér gólyákat, sirályféléket és vörös vércsétet fióka korban a fészekben látják el ornitológiai jelölő gyűrűvel madárvonulás-kutatási célból; így nyílt lehetőségünk fiatal egyedekből kloaka tampon mintákat gyűjteni. Dr. Vlado Savictól egy, a horvátországi (HR) madárinfluenza monitoring során negatívnak talált kloaka tamponokból származó, tisztított DNS minta gyűjteményt kaptunk meg AdV vizsgálatra, mely főként sirály és kárókatona mintákat tartalmazott.

Különböző okokból, leggyakrabban mechanikai sérülés (gázolás, vezetéknek ütközés) következtében elhullott vadmadaraktól is vizsgáltunk. Ezeket a mintákat az Aggteleki Nemzeti Park munkatársától, dr. Boldogh Sándortól kaptunk, majd a Magyar Természettudományi Múzeum számára konzerválás céljából továbbítottuk a tetemeteket. A Hortobágyi Madárkórházból dr. Déri Jánosnak köszönhetően mentett (sérült vagy legyengült) madaraktól kloaka tampon, illetve az elhullott egyedekből szerv mintákhoz jutottunk, többek között ragadozó madárfajoktól, gólyaféléktől, daruféléktől, sarlósfecskéktől, és énekesmadaraktól. További elhullott példányoktól származó szerv mintákat kaptunk a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület ornitológus munkatársaitól és a Fővárosi Állat- és Növénykert (FÁNK) klinikájáról, valamint élő egyedekből származó ürülék mintákat az állatkert Élet-Halál Házában ápolt, mentett madaraktól. A budapesti állatkertből a vadmadár mintákon kívül egzotikus fajoktól is kaptunk ürülék mintákat, illetve elhullott példányoktól szerv mintákat. Egzotikus madaraktól származó vizsgálati anyagunk másik részét két magán díszmadártenyésztőtől a Jászságból és Pest megyéből szereztük be. A vizsgált papagájfajok, valamint az egzotikus és vadmadárfajok listáját, a minták típusát és származási helyét az 1., 2., és 3. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: A vizsgált papagájfajok listája, a minták típusa és származási helye.

madárfaj	latin név	vizsgált egyedek száma	máj	ürülék/ kloakt.	szerv keverék	eredet
ararauna	<i>Ara ararauna</i>	2		2		Debreceni Állatkert
barátpapagáj	<i>Myiopsitta monachus</i>	5	4		1	FÁNK
Barnard papagáj	<i>Barnardius barnardi</i>	1	1			FÁNK
Barraband papagáj	<i>Polytelis swainsonii</i>	1		1		Debreceni Állatkert
énekes papagáj	<i>Psephotus haematonotus</i>	2	1		1	Jászapáti, Órbottyán
fénypapagáj	<i>Neophema splendida</i>	1	1			Jászapáti
hegyi/szivárványos lóri	<i>Trichoglossus haematodus</i>	1		1		Debreceni Állatkert
hullámos papagáj	<i>Melopsittacus undulatus</i>	56	56			Jászapáti
inka kakadu	<i>Cacatua leadbeateri</i>	1		1		Debreceni Állatkert
jácintkék ara	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	1	1			FÁNK
jákópapagáj	<i>Psittacus erythacus</i>	1	1			FÁNK
kecskepapagáj	<i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>	2	2			Jászapáti, Kecskemét
nagy sándorpapagáj	<i>Psittacula eupatria</i>	1		1		Debreceni Állatkert
nimfapapagáj	<i>Nymphicus hollandicus</i>	38	38			Jászapáti
őszi amazon	<i>Amazona autumnalis</i>	1	1			FÁNK
pirossapkás lóri	<i>Loriculus philippensis</i>	1	1			FÁNK
rozellapapagáj	<i>Platycercus eximius</i>	4	4			Jászapáti, Órbottyán
sárgabóbitás kakadu	<i>Cacatua galerita</i>	1	1			FÁNK
sárgaoldalú vörösfarkú papagáj	<i>Pyrrhura molinae hypoxantha</i>	1	1			Jászapáti
sziklapapagáj	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	2	1	1		Jászapáti, Debreceni Állatkert
zöldszárnyú ara	<i>Ara chloroptera</i>	1		1		Debreceni Állatkert
összesen	21 faj	124	114	7	2	

2. táblázat: A vizsgált egzotikus madárfajok listája, a minták típusa és származási helye.

madárfaj		vizsgált egyedek száma	máj	ürülék/ kloakat.	szerv keverék	eredet
apáca fütyülőlúd	<i>Dendrocygna viduata</i>	1	1			FÁNK
ausztrál csóka	<i>Gymnorhina tibicen</i>	1			1	Debreceni Állatkert
bajkál réce	<i>Anas formosa</i>	1			1	FÁNK
beó	<i>Gracula ptilogenys</i>	1			1	FÁNK
emu	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	2		2		FÁNK
ezüstarcú szarvascsőrű madár	<i>Bycanistes brevis</i>	1		1		Debreceni Állatkert
fekete hattyú	<i>Cygnus atratus</i>	1			1	FÁNK
rózsás flamingó	<i>Phoenicopterus roseus</i>	8	3	2	3	FÁNK
gould amandina	<i>Chloebia gouldiae</i>	5	1	3	1	FÁNK, Budapest
hóbagoly	<i>Bubo scandiaca</i>	2		1	1	FÁNK
indiai lúd	<i>Anser indicus</i>	1	1			FÁNK
japán sirályka	<i>Lonchura domestica</i>	2	2			Jászapáti
kacagó jancsi	<i>Dacelo novaeguineae</i>	1	1			FÁNK
kanári	<i>Serinus canaria</i>	2	2			Budapest
kínai törpefűj	<i>Coturnix chinensis</i>	1	1			Jászapáti
pápaszemes pingvin	<i>Spheniscus demersus</i>	1	1			FÁNK
peposzaka réce	<i>Netta peposaca</i>	1	1			FÁNK
pusztai sas	<i>Aquila nipalensis</i>	1		1		Debreceni Állatkert
sárga fütyülőlúd	<i>Dendrocygna bicolor</i>	2	2			FÁNK
sisakos kazuár	<i>Casuarus casuarus</i>	2		2		FÁNK
skarlát íbisz	<i>Eudocimus ruber</i>	4	1	1	2	FÁNK
strucc	<i>Struthio camelus</i>	28		28		Recsk, Budapest, Debreceni Állatkert
tarvarjú	<i>Geronticus eremita</i>	3	1	1	1	FÁNK
üstökös kárókatona	<i>Phalacrocorax aristotelis</i>	10			10	HR
vörös ásólúd	<i>Tadorna ferruginea</i>	1	1			FÁNK
ypecaca guvat	<i>Aramides ypecaha</i>	1	1			FÁNK
zebrapinty	<i>Taeniopygia guttata</i>	31	30	1		Jászapáti
összesen	27 faj	115	50	43	22	

3. táblázat: A vizsgált vadmadárfajok listája, a minták típusa és származási helye.

madárfaj	latin név	vizsgált egyedek	máj	bél	ürülék/ kloakat.	szerv keverék	eredet
bakcsó	<i>Nycticorax nycticorax</i>	5		1	4		Tengelic, HR
balkáni gerle	<i>Streptopelia decaocto</i>	3			1	2	Budapest, Jászság
barátposzáta	<i>Sylvia attricapilla</i>	2	2				Budapest
barátréce	<i>Aythya ferina</i>	1				1	FÁNK
barázdabillegető	<i>Motacilla alba</i>	6			6		UA
barna rétihéja	<i>Circus aeruginosus</i>	2			2		Bugyi
batla	<i>Plegadis falcinellus</i>	2	2				FÁNK
bütykös hattyú	<i>Cygnus olor</i>	2	1			1	FÁNK
cigányréce	<i>Aythya nigra</i>	1	1				FÁNK
citromsármány	<i>Emberiza citrinella</i>	2				2	ismeretlen
cserregő nádiposzáta	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	2			1	1	UA, Budapest
csilpcsalpfüzike	<i>Phylloscopus collybita</i>	4	1		3		UA
csonttollú	<i>Bombycilla garrulus</i>	7	7				Budapest
danka sirály	<i>Larus ridibundus</i>	24	4		20		Kiskunlacháza, HR
daru	<i>Grus grus</i>	1	1				Hortobágy
dolmányos varjú	<i>Corvus corone cornix</i>	2	2				Hortobágy
egerészölyv	<i>Buteo buteo</i>	10	3		6	1	Jászkisér, Apaj, FÁNK, Budapest, Hortobágy, UA
énekes nádiposzáta	<i>Acrocephalus palustris</i>	9			9		UA
erdei cankó	<i>Tringa ochropus</i>	1			1		Szalonna
erdei fülesbagoly	<i>Asio otus</i>	2			2		Jászság, Debreceni Állatkert
erdei pinty	<i>Fringilla coelebs</i>	4	1		3		Hortobágy, UA
erdei szalonka	<i>Scolopax rusticola</i>	2			1	1	Csévharaszt
fácán	<i>Phasianus colchicus</i>	12	8	1		3	Budapest
fehér gólya	<i>Ciconia ciconia</i>	35			35		Tápió-vidék, Debrecen, FÁNK, Hortobágy
fekete rigó	<i>Turdus merula</i>	10	9		1		Budapest, FÁNK, Hortobágy, UA
fenyőrigó	<i>Turdus pilaris</i>	1			1		Budapest
függő cinege	<i>Remiz pendulinus</i>	7	7				UA
füsti fecske	<i>Hirundo rustica</i>	9	2		7		Jászság, UA
gyurgyalag	<i>Merops apiaster</i>	3			3		UA
haris	<i>Crex crex</i>	1	1				Aggtelek
házi veréb	<i>Passer domesticus</i>	6	5	1			Jászság
hegyi billegető	<i>Motacilla cinerea</i>	2			2		Szalonna
hegyi fakusz	<i>Certhia familiaris</i>	2	1		1		Budapest, Szalonna
héja	<i>Accipiter gentilis</i>	3			1	2	Budapest, Gyömrő
holló	<i>Corvus corax</i>	1			1		Debreceni Állatkert
jégmadár	<i>Alcedo atthis</i>	5			5		Sumony, Szalonna
karvaly	<i>Accipiter nisus</i>	5	3		2		Budapest
kék cinege	<i>Parus caeruleus</i>	11	9		2		UA
kék vércse	<i>Falco vespertinus</i>	2			2		Hortobágy

3. táblázat: A vizsgált vadmadárfajok listája, a minták típusa és származási helye. (folytatás)

madárfaj	latin név	vizsgált egyedek	máj	bél	ürülék/ kloakat.	szerv keverék	eredet
keresztcsőrű	<i>Loxia curvirostra</i>	1	1				FÁNK
kerti geze	<i>Hippolais icterina</i>	1			1		UA
kerti poszáta	<i>Sylvia borin</i>	2			2		UA
kerti rozsdafarkú	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	5			5		UA
kis fakopáncs	<i>Dendrocopos minor</i>	1	1				Aggtelek
kis légykapó	<i>Ficedula parva</i>	2			2		Szalonna
kis póling	<i>Numenius phaeopus</i>	1			1		Izland
kontyos réce	<i>Aythya fuligula</i>	1	1				FÁNK
nagy kárókatona	<i>Phalacrocorax carbo</i>	17			17		FÁNK, HR
kormos légykapó	<i>Ficedula hypoleuca</i>	3			1	2	Szalonna
kuvik	<i>Athene noctua</i>	2			1	1	FÁNK, Hortobágy
küszvágó csér	<i>Sterna hirundo</i>	1			1		Kiskunfélegyháza
lappantyú	<i>Caprimulgus europaeus</i>	1			1		Hortobágy
macskabagoly	<i>Strix aluco</i>	1			1		Hortobágy
meggyvágó	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	1	1				Jászság
mezei veréb	<i>Passer montanus</i>	9			7	2	UA, Budapest
nádi sármány	<i>Emberiza schoeniclus</i>	3			3		UA
nádirigó	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	1			1		UA
nagy fakopáncs	<i>Dendrocopos major</i>	7	2		5		FÁNK, Szalonna
nyaktekercs	<i>Jynx torquilla</i>	7			7		Szalonna, Sumony FÁNK
réti fülesbagoly	<i>Asio flammeus</i>	1	1				FÁNK, Hortobágy
rétisas	<i>Haliaetus albicilla</i>	2	1		1		FÁNK, Hortobágy
sárgafejű királyka	<i>Regulus regulus</i>	1	1				Jászság
sárgalábú sirály	<i>Larus michahellis</i>	28			28		HR
sarlósfecske	<i>Apus apus</i>	4			3	1	FÁNK, Aggtelek
seregély	<i>Sturnus vulgaris</i>	4	2		1	1	Budapest, Aggtelek, UA Jászság
sordély	<i>Miliaria calandra</i>	1	1				Jászság
szarka	<i>Pica pica</i>	2	1		1		Hortobágy, Jászság
széncinege	<i>Parus major</i>	6	3		3		Budapest, UA
szerencsensirály	<i>Larus melanocephalus</i>	31	1		30		Kiskunfélegyháza
szürke gém	<i>Ardea cinerea</i>	12			12		HR
szürke légykapó	<i>Muscicapa striata</i>	2			2		UA
tengelic	<i>Cardueils carduelis</i>	2	1			1	Jászság
tőkés réce	<i>Anas platyrhynchos</i>	4	4				Jászság
tövisszúró gébics	<i>Lanius collurio</i>	5			5		Szalonna, UA
uhu	<i>Bubo bubo</i>	1			1		Debreceni Állatkert
üstökös réce	<i>Netta rufina</i>	1				1	FÁNK
vándorsólyom	<i>Falco peregrinus</i>	4	1		3		Debreceni Állatkert, Hortobágy
vetési varjú	<i>Corvus frugilegus</i>	1	1				FÁNK
vízityúk	<i>Gallinula chloropus</i>	1				1	FÁNK
vörös vércse	<i>Falco tinnunculus</i>	39	2		32	5	Budapest, Hortobágy, Apaj

3. táblázat: A vizsgált vadmadárfajok listája, a minták típusa és származási helye. (folytatás)

madárfaj	latin név	vizsgált egyedek	máj	bél	ürülék/ kloakat.	szerv keverék	eredet
vörösbegy	<i>Erithacus rubecula</i>	2	2				Jászság
zöld küllő	<i>Picus viridis</i>	1				1	FÁNK
zöldike	<i>Carduelis chloris</i>	3			3		UA
összesen	83 faj	434	98	3	303	30	

5.2 A virális DNS tisztítása

5.2.1 DNS-kivonás szerv mintákból és sejtenyészeti felülúszókból

A szerv mintákból 25-50 mg-ot 1 ml 1X trisz-etilén-diamin-tetraecetsav pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH=7,9) Tissue Lyser LT (Qiagen®, Hilden, Németország) készülék segítségével homogenizáltunk 20 percen át, 50-es amplitúdójú rázással, 4 mm átmérőjű fémgolyókkal. Az így nyert szerv szuszpenziót 5417R (Eppendorf™, Hamburg, Németország) típusú asztali centrifugában 13.000 rpm fordulatszámon, 1 percig centrifugáltuk. Dr. Palya Vilmostól a D1648 jelzésű TAdV-5 törzset szövetenyészeti felülúszó formájában kaptuk meg. A szerv homogenizátumokból és a TAdV-5 szövetenyészeti felülúszójából 100 µl-t egy éjszakán át 55°C-on, 4 µl 20 mg/ml-es proteináz K enzimmel és 10 µl 10%-os sarcosyl oldattal emésztettünk, majd 300 µl guanidin-hidroklorid oldatot (8,5 M) és 20 µl ammónium-acetátot (7,7 M) adtunk az elegyhez és egy órán át, 20 percenként megforgatva inkubáltuk. Az elegyhez ezután 1 ml 96%-os jéghideg etil-alkoholt adtunk, majd a csövek tartalmát forgatással óvatosan megkevertük és 13.000 rpm fordulatszámon, 12 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, a keletkezett pelletet pedig 1 ml 70%-os etil-alkohollal mostuk, majd ismét 13.000 rpm fordulatszámmal, 7 percen át centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a maradék etil-alkohol eltávolítása céljából a mintákat vákuum centrifugában beszárítottuk. A tisztított nukleinsavat 40 µl MQ minőségű vízben oldottuk fel és a további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

5.2.2 DNS-kivonás ürülék mintákból és kloaka tamponokból

Az ürülék mintákból az E.Z.N.A. Stool® DNA Kit (Omega-Bio-Tek, Norcross, GA, USA) segítségével vontunk ki nukleinsavat a gyártó utasításait követve. Azokból a kloaka tamponokból, melyek segítségével sikerült az E.Z.N.A. kit alkalmazásához elegendő mennyiségű ürüléket nyerni, a fent említett kit-et használtuk a gyártó utasításai szerint. Egyéb esetekben a kloaka tamponoknál a szerv mintákból történő DNS-kivonás protokollját követtük. A tamponokat 1 ml 1XTE pufferben áztattuk 2 órán át, majd 3X1 perces vortexszelést követően 100 µl felülúszót használtuk kiindulási anyagként a DNS-kivonás további lépéseire.

5.3 Adenovírusok kimutatása PCR segítségével

5.3.1 Általános adenovírus PCR

Az AdV-ok elsődleges detekcióját két körös („nested” vagy „fészkes”) PCR segítségével végeztük egy korábban publikált módszert követve (Wellehan et al., 2004). A degenerált konszenzus primerek listáját az 4. táblázat mutatja. A reakciók kivitelezéséhez REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (2X) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) terméket használtunk. A kész reakció mixhez (12,5 µl) 0,5-0,5 µl forward és reverse primert (1 µM) és 1µl DNS-templátot adtunk, majd a reakciólegyet 25 µl-re egészítettük ki MQ vízzel. A reakció hőmérsékleti paramétereit a 5. táblázat mutatja be. Az első körben ~500 bp, míg a második körben ~300 bp hosszúságú termékeket vártunk. Korábbi tapasztalataink szerint ez a módszer alkalmas minden eddig leírt AdV kimutatására, ezért a módszert a dolgozatban általános AdV PCR-ként említjük. A PCR-ek végrehajtása T1 Thermocycler vagy Tpersonal (Biometra Ltd., Göttingen, Németország) típusú berendezésekben történt.

4. táblázat: Az általános AdV PCR során használt primerek szekvenciája.

Primer név	Primer szekvencia
1. kör ~500 bp	PolFouter 5'-TNM GNG GNG GNM GNT GYT AYC C-3'
	PolRouter 5'-GTD GCR AAN SHN CCR TAB ARN GMR TT-3'
2. kör ~300 bp	PolFinner 5'-GTN TWY GAY ATH TGY GGH ATG TAY GC-3'
	PolRinner 5'-CCA NCC BCD RTT RTG NAR NGT RA-3'

Degenerált bázis pozíciók: N=A/C/T/G; D=A/G/T; H=A/T/C; B=G/T/C; M=A/C; S=C/G; Y=C/T; K=G/T; W=A/T

5. táblázat: Az általános AdV PCR során alkalmazott PCR program hőmérsékleti paramétereit.

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	94°C	5 perc	1
Denaturáció	94°C	30 mp	
Primer kötődés	46°C	1 perc	44
Szintézis	72°C	1 perc	
Végső szintézis	72°C	5 perc	1

5.3.2 Nemzetség-specifikus PCR módszerek

A polimeráz génre specifikus általános AdV PCR módszer segítségével detektált AdV-ok további szekvencia vizsgálatát nemzetség-specifikus PCR-ek alkalmazásával kíséreltük meg. A korábbi, aviadenovírusok kimutatására tervezett, degenerált primer konstrukciók mind az ismert FAdV-ok hexon szekvenciáit alapul véve születtek (Meulemans et al., 2001; Raue et al., 2005a és 2005b). Ezeket a PCR-eket az újonnan detektált PiAdV-okon teszteltük. A dr. Kovács Endre által tervezett, dr. Doszpoly és munkatársai által leírt, eredetileg a siadenovírusok hexon génjére specifikus két körös PCR módszert a teknősökben előforduló AdV-ok kimutatásával kapcsolatban publikálták (Doszpoly et al., 2013). Ezeket a primereket kipróbáltuk az új galamb- és papagáj-siadenovírusokon, valamint a Gould amandina siadenovírusán is. A szintén kutatócsoportunk munkatársai által mastadenovírusok kimutatására tervezett penton bázis és IVa2 gének szekvenciáira specifikus primereket (Pantó et al., 2015) is felhasználtuk az egymástól távol fekvő genomszakaszok szekvenciáinak kinyerésére a primer-sétálás módszerével szekvenált vírusok (PiAdV-2a és TAdV-5) esetében. Mivel ezek a célgének az egész *Adenoviridae* családon belül megőrzöttek, ezért esélyét láttuk a működésüknek. A kipróbált primerek vonatkozó irodalmi hivatkozásait és a primerek pontos szekvenciáját a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A nemzetség-specifikus PCR-ek hivatkozási listája és a primerek szekvenciája.

Referenciák	Primer szekvenciák
Meulemans et al., 2001	HexonA: 5'-CAARTTCAGRCAGACGGT-3' HexonB: 5'-TAGTGATGMCGSGACATCAT-3' HexonC: 5'-SKCSACYTAYTTTCGACAT-3' HexonD: 5'-TTRTCWCKRAADCCGATGTA-3'
Raue et al., 2005a <i>módosított*</i>	HexL1-s: 5'- ATGGG NKCN ACYTAYTTTCGAYAT-3' HexL1-as: 5'-AARTTRTC NCKRAAN SCGATGTA-3'
Raue et al., 2005b	Hex-s: 5'-CAGGCCCAAYTYCATCGG-3' Hex-as: 5'-GTGATGACGSGACATCAT-5'
Mase et al., 2009	HexF1: 5'-GAYRGYHGGRTNBTGGAYATGGG-3' HexR1: 5'-TACTTATCNACRGCYTGRITCCA-3'
Doszpoly et al., 2013	sihexfoout:5'-TTYAAYCAYCAYMRNAAYMGNGG-3' sihexreout: 5'-CATYTGNAYNARVHACCARTC-3' sihexfoin 5'-GARTGGTGGTTYMGNAARGAYCC-3' sihexrein 5'-GGNAVNARNANDCKRTCRTTNCC-3'
Pantó et al., 2015	IVa2 outfo 5'-CCNNSNCCNGARACNGTNTTYTT-3' IVa2 outre 5'-GGRTTCATRTTRTGNARNACNAC-3' IVa2 info 5'-CCNCARRTNGAYATGATHCCNCC-3' IVa2 inre 5'-TTNSWNGGRAANGCRTGRAARAAYTT-3'
Pantó et al., 2015	penton outfo 5'-ACNCARACNATHAAYTTYGAYGA-3' penton outre 5'-GTRTANACNCCNGGCATNAC-3'

* az eredeti publikációban leírtakhoz képest módosított bázispozíciókat félkövér betűkkel jelöltük

5.3.3 Genomszakaszok összekötése PCR-rel

A teljes genomszekvenálásra kiválasztott vírusok (PiAdV-2a, TAdV-5) további genomszakaszainak felerősítését saját tervezésű primerek segítségével kíséreltük meg. A primerek tervezését a már ismert AdV-ok szekvenciáinak összegyűjtésével, illesztésével és a megőrzöttebb genomi régiók meghatározásával kezdtük. Az illesztésekhez az interneten szabadon hozzáférhető Multalin programot (Corpet, 1988) és a Clustal Omega (Sievers et al., 2011) programcsomagot használtuk. Igyekeztünk olyan ismert vírusok szekvenciáit felhasználni, melyek a legközelebbi rokonságban állhatnak az általunk szekvenálni kívánt vírusokkal, vagyis a PiAdV-2a-val és a TAdV-5-tel. A 18-28 bp hosszú primerek tervezésénél a leginkább megőrzött régiókat választottuk ki és szükség esetén degenerált bázispozíciókat is beépítettünk. A teljes genomok szekvenálására irányuló kísérletekben az első PCR-ek a IVa2, a polimeráz, a penton bázis, a hexon, a 100K és a fiber konzervált, farki régiójára irányultak; majd, ha ezekből sikerült felerősíteni a célzott génszakaszt, akkor ezekre már specifikus primereket tervezhettünk és megkezdhettük ezen genomi DNS-szakaszok PCR-rel történő összekötését és szekvenálását. Ezekhez a kísérletekhez a Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (Finnzyme Ltd., Espoo, Finnország) enzimet használtuk, mely képes a hosszabb, sok esetben problémás génszakaszok felerősítésére is. A PCR elegy összetételét és a PCR program hőmérsékleti paramétereit a 7. és 8. táblázat mutatja. A Phusion® High-Fidelity DNA polymerase termék használata esetén a gyártó a Breslauer módszert javasolja a primerek olvadási hőmérsékletének kiszámításához. A primer-sétálással kivitelezett genomszekvenálások során minden primer párra egyedileg határoztuk meg a primer kötődés hőmérsékleti paramétereit, amelyek a primerek hosszától és G+C tartalmától függően 45 és 72 °C között változtak.

7. táblázat: A PCR elegy összetétele a Phusion® High-Fidelity DNA polymerase alkalmazása esetén.

Összetevők	térfogat (végkoncentráció)
Víz (MQ)	50 µl-ig
5X Phusion High Fidelity Buffer	10 µl (1X)
10 mM dNTP	1 µl (200 µM)
10 µM Forward Primer	2,5 µl (0,5 µM)
10 µM Reverse Primer	2,5 µl (0,5 µM)
DNS-minta	1 µl
DMSO	1,5 µl (3%)
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	0,5 µl (1,0 egység)

8. táblázat: A PCR program hőmérsékleti paramétereit a Phusion® High-Fidelity DNA polymerase alkalmazása esetén.

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusok száma
Kezdeti denaturáció	98°C	30 mp	1
Denaturáció	98°C	10 mp	
Primer kötődés	45-72°C*	10-30 mp	25-30
Szintézis	72°C	15-30 mp/kb	
Végső szintézis	72°C	10 perc	1

* minden primer párra egyedileg határoztuk meg a primer kötődés hőmérsékleti paramétereit a Breslauer-féle módszert követve

5.3.5 PCR termékek ellenőrzése és tisztítása

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen történő elektroforézissel ellenőriztük. A gél készítéséhez 0,5XTBE (Tris-Bórsav-EDTA pH=8) puffert használtunk. A DNS láthatóvá tétele GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA. USA) festékkel történt. Az elektroforézist 70-100 V-on végeztük, majd a gél UV fényel átvilágítva digitális kamerával (Kodak Gel Logic 212 imaging system) felvételeket készítettünk.

A PCR termékek tisztítását kétféle módszerrel végeztük a kapott termék gélkép alapján megítélt homogenitásának függvényében, illetve a későbbi kísérletek igényeit figyelembe véve. Amennyiben nem specifikus termékek jelenlétét is detektáltuk, úgy a megfelelő méretű fragmenst először kivágtuk a gélből, majd ezt követően tisztítottuk ki NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) a gyártó utasításai szerint. Ugyanezt az eljárást követtük a molekuláris klónozásra szánt PCR

termékek tisztításakor. Egyéb esetekben a PCR termékeket közvetlenül a reakció elegyből tisztítottuk a fent említett kereskedelmi forgalomban kapható kittel.

5.3.6 PCR termékek molekuláris klónozása

Azon PCR termékek esetében, ahol az elektroferogramok alapján feltételezni lehetett, hogy a mintában több különböző AdV is jelen lehet, molekuláris klónozással kíséreltük meg a szekvenciák szétválasztását. A PCR termékeket CloneJET™ PCR Cloning kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével a kitben forgalmazott pJET1.2/blunt klónozó vektorba ligáltuk a gyártó utasításai szerint. A ligálást T4 ligáz enzim (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A ligátumokat kémiai úton kompetenssé tett TOP10 *Escherichia coli* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) baktérium törzsbe transzformáltuk hősokkos módszerrel. A pJET1.2/blunt vektorral transzformált baktériumokat ezután ampicillin tartalmú (50 µg/ml) szelektív Luria-Bertani táptalajra szélesztettük és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Másnap a kapott telepeket antibiotikum tartalmú, folyékony Luria-Bertani tápoldatba helyeztük steril pipettahegy segítségével, majd ismét egy éjszakán át, 37°C-on inkubáltuk, ezúttal a baktérium kultúra megfelelő oxigén ellátottsága érdekében rázó inkubátorban, 250 rpm fordulatszámom. A plazmid DNS tisztítását a NucleoSpin Plasmid kittel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) végeztük a gyártó előírásai alapján.

5.4 DNS-szekvenálás

5.4.1 Sanger-féle DNS-szekvenálás

A tisztított, illetve a tisztított és klónozó vektorba ligált PCR termékek szekvenálását a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel (Applied Biosystem Ltd., Warrington, Egyesült Királyság) végeztük. A szekvenálási reakciót a PCR során is használt primerekkel hajtottuk végre. A klónozó vektorba ligált PCR termékek esetén a klónozó vektor szekvenciájára specifikus, a klónozott fragmenstől 5' és 3' irányban lévő pJETFo és pJETRe primerekkel végeztük a szekvenálási reakciót. A 700 bp-nál hosszabb DNS-fragmenteket a primer-sétálás módszerével szekvenáltuk végig, ami azt jelenti, hogy az előző szekvenálási reakció során megismert DNS-szekvencia alapján terveztünk új primereket és indítottunk új szekvenáló PCR-t, így fedve le az egész szekvenálandó DNS-fragmenst lépésről lépésre, ~700 bp-onként. A PCR termékek nátrium-acetátos és etil-alkoholos kicsapását követően a mintákat beszárítottuk és a Szegedi Biológiai Központba küldtük kapilláris gélelektroforézisre, melyet ABI Prism® 3500 Genetic Analyzer DNS-szekvenáló gépen végeztek.

A genomvégek szekvenálását a 5'/3' RACE kit (Roche®, Basel, Svájc) használatával oldottuk meg. A kitben egy terminális-transzferáz enzim található, amely a genom végére poli-A farkat épít. Ezt követően egy, a kitben található, poli-A farokra specifikus oligodT forward primerrel és egy, a genomvéghöz legközelebbi, ismert szekvencia alapján tervezett reverz primerrel PCR-t hajtottunk végre. A termék nt sorrendjét klasszikus Sanger-féle szekvenálással határoztuk meg.

5.4.2 Új generációs DNS-szekvenálás

A TNI jelzésű TAdV-4 és a 1277BT jelzésű TAdV-5 törzs teljes genomjának szekvenálását Illumina HiSeq2000, illetve Illumina Genome Analyzer IIX új generációs szekvenáló platformokon a Bécsi Állatorvostudományi Egyetemen dolgozó együttműködő partnerünk végezte. A vírus törzsek elszaporításához házityúk eredetű sejteket használtak. A madár sejtekből származó genomális DNS által okozott „kontaminációt” a házityúk és *Gallus sonneratii* fajok DNS-szekvenciájához való hasonlítással és a homológ szekvenciák eltávolításával csökkentettük.

5.5 Bioinformatikai módszerek

A Sanger-féle szekvenálással kapott elektroferogramok ellenőrzését és szerkesztését a BioEdit (Hall, 1999) programmal végeztük. A szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisában fellelhető szekvencia adatokhoz hasonlítottuk az online futtatható BLAST homológia kereső programok (Altschul et al., 1997) segítségével.

A teljes TAdV genomok Illumina szekvenálásából származó adatainak feldolgozása a CLC Genomics Workbench v.4.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark) programcsomag segítségével történt *de novo* megközelítéssel, majd további szekvencia illesztéseket végeztünk alapul véve a GenBank adatbázisában található, korábban szekvenált és értelmezett aviadenovírusok genomszekvenciáját.

A PCR és a primer-sétálás technikájával nyert részleges genomszekvenciák összeillesztését a Staden programcsomag (Staden, 1996) illetve a CLC Main Workbench 7.6 (CLC bio, Aarhus, Denmark) program használatával hajtottuk végre.

A gén és ORF predikcióhoz az Artemis (Rutherford et al., 2000) és a JavaScript DNA translator 1.1 (Perry, 2002) programokat használtuk, 40 as, mint minimális ORF-hossz, beállított paraméterrel. A genomokat CLC Main Workbench 7.6 program segítségével vizualizáltuk. A splice akceptor és donor hely predikciókat manuálisan végeztük a korábban publikált, illetve kísérletesen meghatározott splice mintázatokra támaszkodva (Davison et al, 2003). A meghatározott, illetve feltételezett géneknek a más rokon vírusokban fellelhető homológ génekkel megegyező nevet adtuk.

A származtatott as szekvenciák illesztését Clustal Omega (Sievers et al., 2011), illetve a Muscle (Li et al., 2015) programok segítségével hajtottuk végre. A további szerkesztésekhez, mint például az illesztések során keletkezett hézagok kivágásához a GeneDoc 2.7 programot (Nicholas et al., 1997) használtuk.

A filogenetikai számításokat kétféle módszerrel végeztük az analízishez felhasznált, illesztett szekvenciák hosszúságától függően. Azokhoz a számításokhoz, amelyekhez csak rövid szekvenciák (<200 as) álltak rendelkezésünkre a távolsági mátrix analízis módszerét alkalmaztuk, mivel az összetettebb, valószínűség-alapú, vagy Bayesian számításokhoz a rövid szekvencia szakaszok nem szolgáltatottak elegendő adatmennyiséget és az eredményképpen kapott fa felbontása nem volt megfelelő. A filogenetikai számítások előtt a megfelelő modellt (pontozási mátrixot) modell-szelekciós analízissel választottuk ki, melyet a Topali 2.5 programcsomagon (Milne et al., 2004) belül vagy a Prottest szerverén (http://darwin.uvigo.es/software/prottest2_server.html) keresztül futtatunk. A legelterjedtebb aminosav helyettesítési mátrixok például a JTT (Jones-Taylor-Thornton) modell (Jones et al., 1992) és a WAG (Whelan és Goldman) modell (Whelan és Goldman, 2001). Az előbbiekhöz hasonló, ám azoknál több fehérje összehasonlításán alapuló, modernebb pontozási mátrix az LG (Le és Gascuel) modell (Le és Gascuel, 2008). A távolsági mátrix analízishez a párizsi Pasteur Intézet honlapján online futtatható PHYLIP programcsomag Protdist (Fitch, global rearrangement) programját használtuk az alapértelmezett JTT modell alkalmazásával. A hosszabb illesztett szakaszokat alapul vevő számításainkhoz Bayesian algoritmust használtunk, melyet a Topali 2.5 programcsomagon (Milne et al., 2004) belül futtattunk. A törzsfákat a Mega6 programban jelenítettük meg (Tamura et al., 2013). A számításokhoz felhasznált szekvenciák GenBank-i azonosítóit a Függelék 12.1 alfejeztében tüntettük fel.

6. Eredmények

6.1 Pulyka-adenovírusok

A TAdV-4-nek elnevezett TNI1 és a TAdV-5-nek elnevezett 1277BT jelzésű törzs Illumina szekvenálása során a házityúk genomiális szekvenciának kiszűrését követően, a genomok egyes nt pozícióit 6-28.000-szeres lefedettségben kaptunk meg genomrégiónál függően. Voltak olyan szakaszok, például a genom végén található ITR szekvenciák, melyek egyáltalán nem voltak megtalálhatók a kapott adathalmazban. A genomszekvenciák *de novo* összeillesztése során nem sikerült a genomok teljes egészét egy hosszban lefednünk, így áthidaló PCR-ek alkalmazására volt szükség, melyet a hézagok (gap-ek) szélein található ismert szekvenciákra tervezett PCR primerekkel végeztünk el, majd Sanger-féle DNS-szekvenálással állapítottuk meg a genomszakasz pontos nt sorrendjét. A D1648-as TAdV-5 törzs „primer-sétálásos” szekvenálásával a bal ITR-től a pVIII prekurzor proteint kódoló gén feléig 27.931 bp hosszúságú genomszakasz szekvenciáját határoztuk meg.

A TAdV-4 genomszekvenciája a teljes genom illesztését követően 42.940 bp hosszúnak, míg a TAdV-5 1277BT törzs genomhossza 43.686 bp-nak bizonyult. A TAdV-4 esetében 48,5%-os, míg a TAdV-5 esetében némileg magasabb, 51,6%-os G+C arányt állapítottunk meg. A TAdV-4 teljes genomjának értelmezett szekvenciája a GenBank adatbázisában a KF477312, míg a 1277BT jelzőszámú TAdV-5 törzs a KF477313 iktatási számot kapta. A D1648-as TAdV-5 törzs meghatározott genomszakaszának szekvenciája a GenBank KF477314 iktatási száma alatt található meg.

6.1.1 A TAdV-4 genomszerveződése

A TAdV-4 genomvégein 62 bp hosszú ITR szekvenciákat találtunk. A genom bal végén, a pozitív szálon egymást követve helyezkedik el az ORF0, az ORF1, a csonka, csak a második exont kódoló ORF1A, az ORF1B és -1C, valamint az ORF2. A negatív szálon találjuk az ORF14A-t, majd tőle jobbra rendre az ORF14, ORF13 és -12 gének következnek (4. ábra).

A genom középső régiójában a IVa2 géntől kezdődően a fiber fehérjét kódoló génig az *Adenoviridae* család képviselőire jellemző géneket találtuk meg. A TAdV-4 esetében egyetlen fiber gént azonosítottunk.

A genom jobb vége tartalmazza az *Aviadenovirus* nemzetség korábban szekvenált tagjaiban leírt, nemzetség-specifikus ORF-eket, nevezetesen az ORF22, -20A, -20, -19, -8 és a -17-et. Ezekon kívül találtunk egy, az ORF19A-val homológ szekvenciát is, mely a genom legvégén helyezkedik el, közvetlenül a jobb ITR előtt. A genom annotálása során két tandem ismétlődő (tandem repeat; TR) szekvencia szakaszt találtunk a genom jobb oldalán

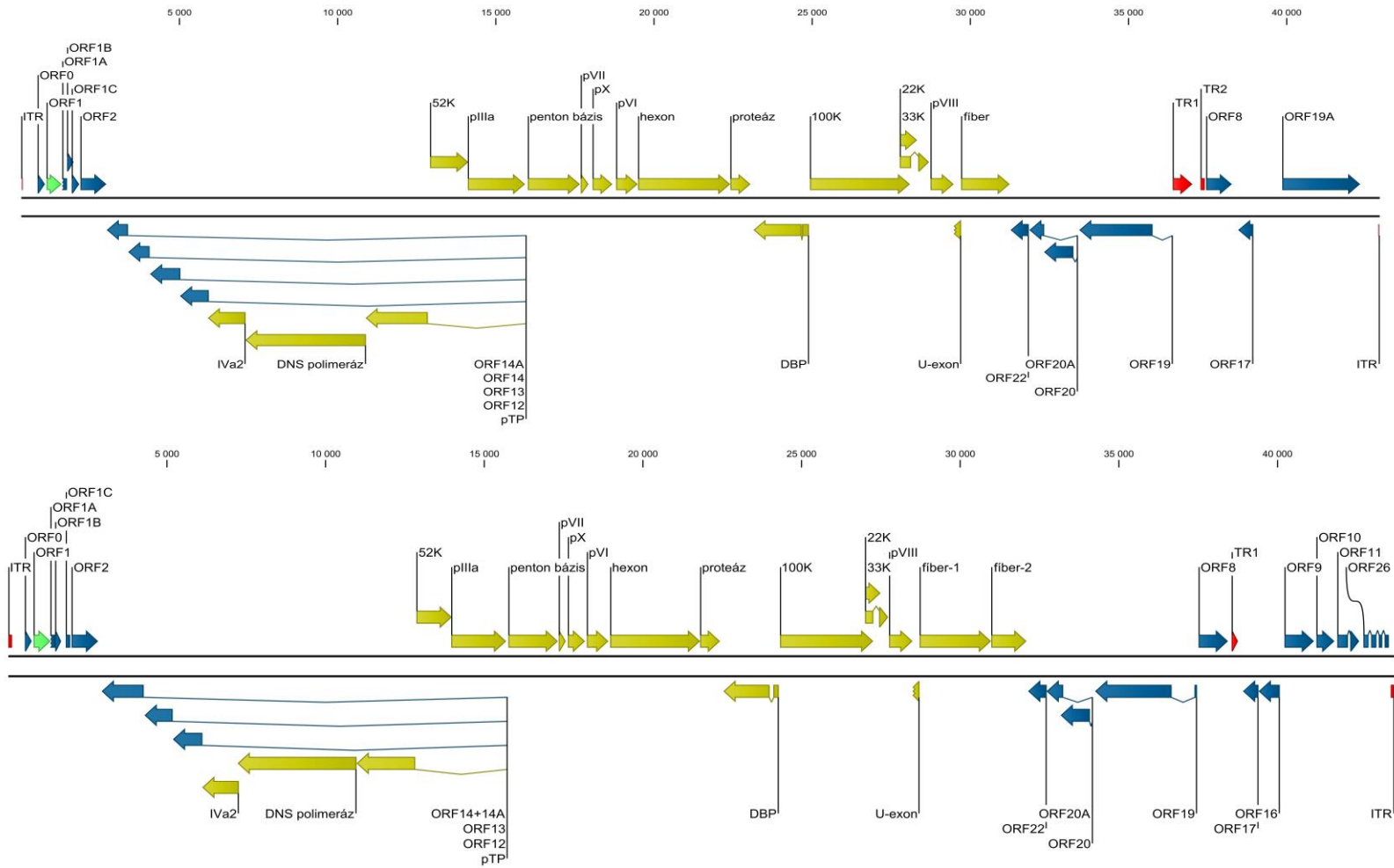
az ORF19 első exonja és az ORF8 között. Az első szakasz (TR1) egy 123 bp-os szakasz (5'- CATTACCTGGTGACGCGCAGGTGCTTTCCCCGCTTAAACATTAACCTGGACTTTGT CCTTTATGTTTACCTGCCATGGCAACGGCTTCCATATATGGAGGTCCGGCTCCGCCTCC GGTTAAC-3') ötszöri, tökéletes ismétlődéséből áll, míg a második szakaszban (TR2) egy rövidebb, 33 bp-os szakasz (5'-TGTCGCTACCCCCCTGTACAGCCGACCACCCCC-3') szintén ötször ismétlődik, de az ismétlődés itt nem tökéletes, mert az utolsó ilyen szakaszban egy nt eltérés mutatkozik. A TAdV-4 génjeinek pontos méretét és azok genomban elfoglalt helyzetét a 9. táblázat foglalja össze.

6.1.2 A TAdV-5 genomszerveződése

A TAdV-5 teljes genomtérképének összeállítását és a genom elemzését a 1277BT elnevezésű TAdV-5 törzs szekvenciája alapján végeztük (4. ábra). A D1648 és a 1277BT jelzésű TAdV-5 törzsek részleges genomszekvenciája között 41 nt (0,15%) eltérést tapasztaltunk a tanulmányozott 27.931 bp hosszú szakaszon. A két TAdV-5 törzs átfedő szakaszának összehasonlító elemzését az 10. táblázatban mutatjuk be.

Az ITR-ek hossza a TAdV-5 esetében 118 bp. A TAdV-5 genom bal végén megtalálható az ORF0, -1, a csonka ORF1A, az ORF1B és -1C és az ORF2. A fent említett ORF-ek mindegyike a pozitív szálon helyezkedik el. A negatív szálon az ORF14 és az ORF14A összeolvadt, ezeket az egybeforrt ORF-eket rendre az ORF13 és -12 követi, szintén a negatív szálon. A genom középső régiójában megtalálhatók az *Adenoviridae* család megőrzött génjei. A TAdV-5 genomja két fiber gént kódol.

A genom jobb végén azonosítottuk az ORF22, a -20A, a -20, a -19, a -8 és a -17 kódú feltételezett géneket, melyek a legtöbb aviadenovírus genomjában fellelhetők. Ezekon kívül számos, a FAdV-1 esetében leírt ORF-et is találtunk az annotáció során, az ORF9, -10, -11, -16 és -26 feltételezett géneket. A TAdV-5 genomjának értelmezésekor egy tandem ismétlődő régiót azonosítottunk, amely egy 99 bp-os szakasz (5'-TCCGGTTAA ACATTAACCCGGAGGGACCGCTCTTCCCTCCCACTTTCTATACGTCACCTTTCGCGACT CCTCCCACTTTACGGACTTAGGAAAATTCCA-3') kétszeri ismétlődéséből áll. A TAdV-5 génjeinek pontos méretét és genomon belüli elhelyezkedését a 9. táblázatban foglaltuk össze.



4. ábra: A TAdV-4 és -5 genomszerveződése.

Sárga nyilakkal jelöltük a genom központi részén található megőrzött géneket, melyek az *Adenoviridae* család minden nemzetségében megtalálhatók és világoszölddel, melyek egynél több nemzetségben fordulnak elő. A csak az *Aviadenovirus* nemzetségre jellemző, genomvégeken található géneket sötétkék nyilak jelzik. Az ismétlődő szekvenciákat piros nyilakkal ábráztuk.

9. táblázat: A TAdV-4 és a TAdV-5 teljes, valamint a PiAdV-2a részleges genomjának szerveződése.

Gén	Szál	TAdV-4		TAdV-5		PiAdV-2a
		Pozíció	as-ak száma	Pozíció	as-ak száma	as-ak száma
ORF0	+	515-745	76	523-735	70	
ORF1	+	802-1272	156	797-1327	176	
ORF1A	+	<1296-1445	49	<1328-1474	48	51
ORF1B	+	1448-1651	67	1477-1665	62	64
ORF1C	+	1596-1829	77	1811-1951	46	-
ORF2	+	1871-2683	270	1994-2824	276	263
ORF14A*	-	2709-3374 15968-15973	223			210
ORF14*	-	3388-4056 15968-15973	224	2949-4268 15733-15738	441	215
ORF13	-	4079-5029 15968-15973	318	4300-5181 15733-15738	295	300
ORF12	-	5025-5927 15968-15973	302	5194-6117 15733-15738	309	309
Iva2	-	5905-7092	395	6118-7266	382	393
polimeráz	-	7089-10895	1268	7232-10975	1247	1176
pTP	-	10892-12850 15968-15973	672	10983-12824 15733-15738	615	613
52K	+	12920-14128	402	12861-13973	370	389
pIIIa	+	14115-15917	600	13960-15684	574	577
penton alap	+	16013-17650	545	15761-17314	517	516
pVII	+	17685-17927	80	17349-17567	72	82
pX	+	18059-18679	206	17634-18170	178	182
pVI	+	18802-19476	224	18234-18905	223	216
hexon	+	19496-22402	968	18968-21796	942	941
proteáz	+	22414-23043	209	21803-22423	206	208
DBP	-	23152-24669 24681-24899	578	22544-23994 24109-24283	541	415
100K	-	24930-28082	1050	24320-27253	977	971
22K	-	27769-28308	180	27000-27485	161	150
33K	-	27769-28126 28352-28689	231	27000-27261 27443-27726	181	186
pVIII	-	28740-29468	242	27757-28491	244	259
U-exon	-	<29475-29708	78	<28500-28718	73	75
fiber-1	+	29707-31236	509	28720-30966	748	141
fiber-2	+			30979-32082	367	552
ORF22	-	31279-31848	189	32147-32725	192	178
ORF20A	-	31872-32333 33378-33398	160	32728-33246 34162-34182	179	
ORF20	-	32337-33257 33378-33398	313	33171-34088 34162-34182	312	
ORF19	-	33450-35759 36388-36399	773	34257-36663 37384-37463	828	
ORF8 GAM-1	+	37452-38258	268	37512-38432	306	
ORF17	-	38473-38943	156	38918-39400	160	
ORF16	-			39412-40071	219	
ORF9	+			40220-41143	307	
ORF10	+			41226-41786	186	
ORF11	+			41884-42220 42292-42557	201	
ORF26	+			42707-42869 42951-43117 43191-43300 43376-43508	190	
ORF19A	+	39860-42313	817			

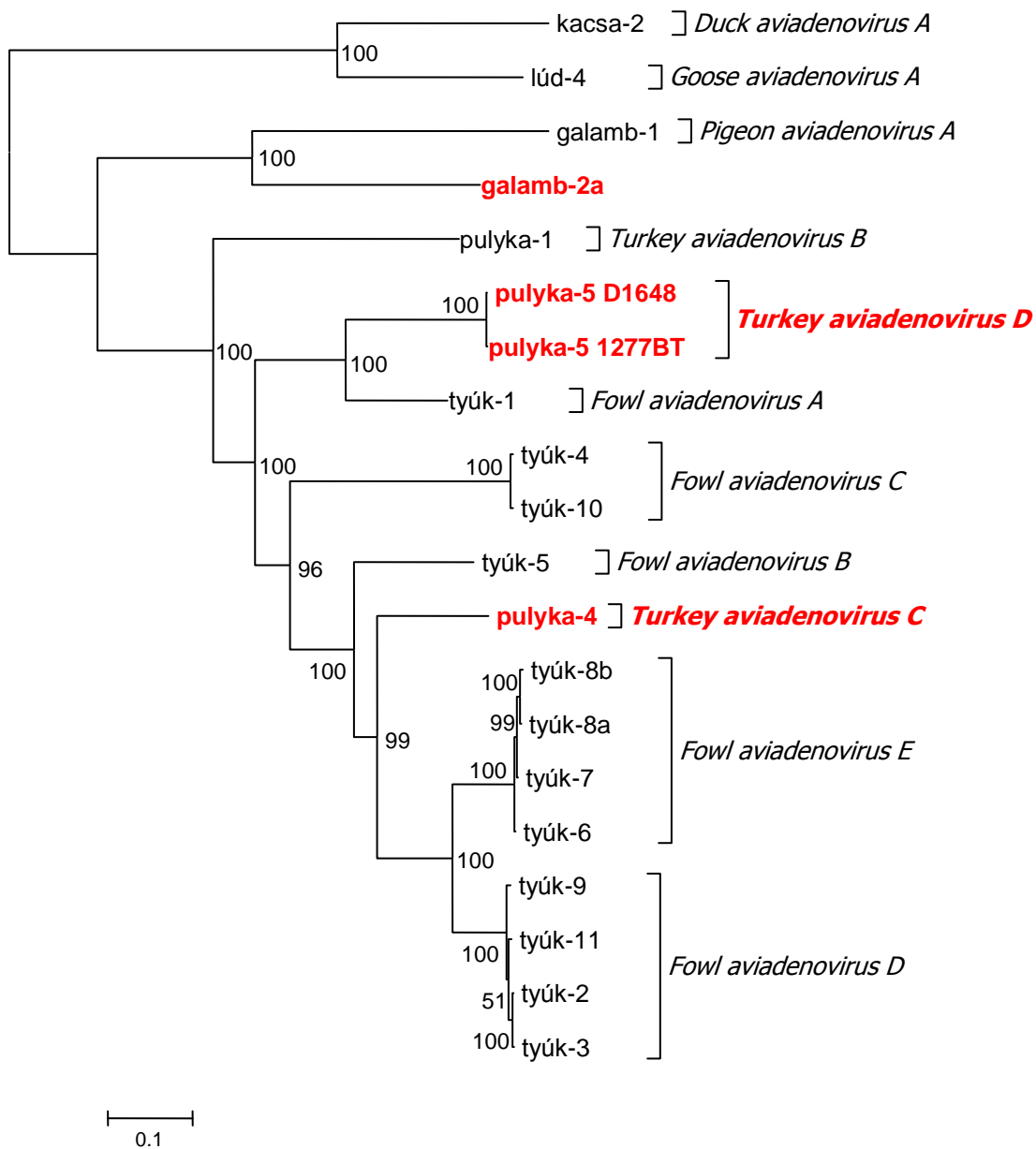
* az ORF14 és ORF14A a TAdV-5-ben összeolvadt

10. táblázat: A 1277BT és a D1648 jelű TAdV-5 törzsek átfedő szakaszainak részletes összehasonlítása.

nt pozíció	nt a 1277BT törzsben	nt a D1648 törzsben	gén	mutáció típusa	as a 1277BT törzsben	as a D1648 törzsben
993	A	G	ORF1	misszensz	Hisztidin	Arginin
1273	C	G	ORF1	misszensz	Aszparaginsav	Glutaminsav
2884	T	C	-	szinonim		
3681	G	C	ORF14	szinonim		
6004	G	A	ORF12	szinonim		
11756	G	T	pTP	szinonim		
12630	G	A	pTP	szinonim		
13630	T	G	52K	misszensz	Valin	Glicin
13892	A	G	52K	szinonim		
17474	T	C	pVII	szinonim		
19760	A	G	hexon	szinonim		
20012	C	G	hexon	szinonim		
20152	G	C	hexon	szinonim		
20374	T	C	hexon	szinonim		
20720	C	T	hexon	szinonim		
20779	A	T	hexon	szinonim		
20980	C	T	hexon	szinonim		
21110	G	A	hexon	misszensz	Valin	Izoleucin
21128	G	A	hexon	misszensz	Alanin	Treonin
21163	T	C	hexon	szinonim		
21211	C	T	hexon	szinonim		
21489	C	A	hexon	misszensz	Treonin	Aszparagin
21928	C	A	proteáz	szinonim		
22362	T	C	proteáz	misszensz	Valin	Alanin
22508	A	G	-	szinonim		
22659	A	G	DBP	misszensz	Metionin	Treonin
23249	G	A	DBP	szinonim		
23611	T	C	DBP	misszensz	Izoleucin	Valin
23707	T	C	DBP	misszensz	Treonin	Alanin
23832	C	T	DBP	szinonim		
24218	G	A	DBP	szinonim		
24623	A	G	100K	misszensz	Arginin	Glicin
24697	C	T	100K	szinonim		
24811	T	A	100K	misszensz	Aszparaginsav	Glutaminsav
24922	A	G	100K	szinonim		
25001	C	T	100K	misszensz	Arginin	Cisztein
25474	G	A	100K	szinonim		
25930	G	A	100K	szinonim		
26154	A	G	100K	misszensz	Aszparagin	Szerin
26650	C	T	100K	szinonim		
27645	A	G	22K	szinonim		

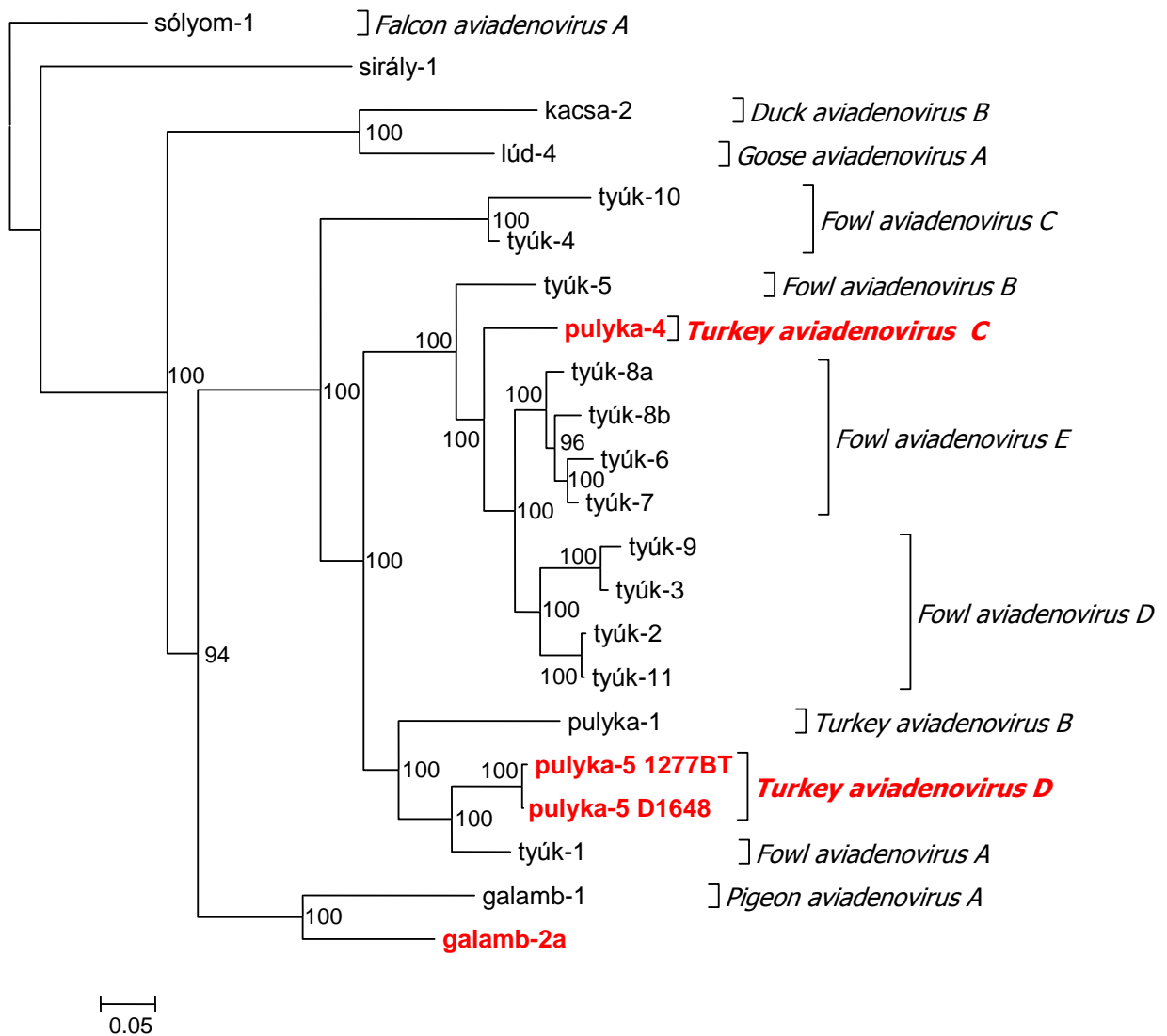
6.1.3 A TAdV-4 és -5 filogenetikai helyzete

Az TAdV-4 és -5 filogenetikai pozícióját négy gén, illetve génszakasz, a teljes DNS-polimeráz gén (5. ábra), a teljes hexon gén (6. ábra) és a hexon gén L1 régiója (7. ábra), valamint a fiber gén részleges szekvenciája (8. ábra) alapján határoztuk meg. A teljes hosszúságú gének esetében a számításokhoz a Bayesian módszert alkalmaztuk, ahol a modell szelekció minden esetben a WAG+G+I modell (Whelan and Goldman model+invariable sites+gamma distribution; Whelan és Goldman modell+változatlan pozíciók+gamma eloszlás) (Whelan és Goldman, 2001) használatát javasolta. A rövidebb hexon L1 és a fiber részleges szekvenciáinak esetében távolsági mátrix analízist hajtottunk végre, JTT (Jones-Taylor-Thornton) modell alkalmazásával. A szekvenciák illesztése során keletkezett hézagokat kivágtuk, így a szerkesztés után a polimeráz gén 1130 as, a hexon gén 885 as, a hexon L1 régió 154 as és a részleges fiber gén 165 as hosszúságú szakaszával végeztük el a filogenetikai számításokat. A TAdV-4 a hexon L1 régiója alapján a TAdV-2-höz áll legközelebb (7. ábra). A többi fán a TAdV-2 nem szerepel, mivel nem ismert a szekvenciája ezeken a szakaszokon. A polimeráz, a teljes hexon és a fiber gén as szekvenciáján alapuló számítások szerint a TAdV-4 minden más vírustól jól elkülönül és a FAdV-ok között helyezkedik el. A TAdV-5 minden számítás alapján a FAdV-1-hez áll legközelebb. A TAdV-5 két izolátuma a teljes hexon gén alapján készített törzsfa-rekonstrukción minimális filogenetikai távolságot mutat egymástól a génszakaszban fellelhető as szekvencia különbségek miatt.



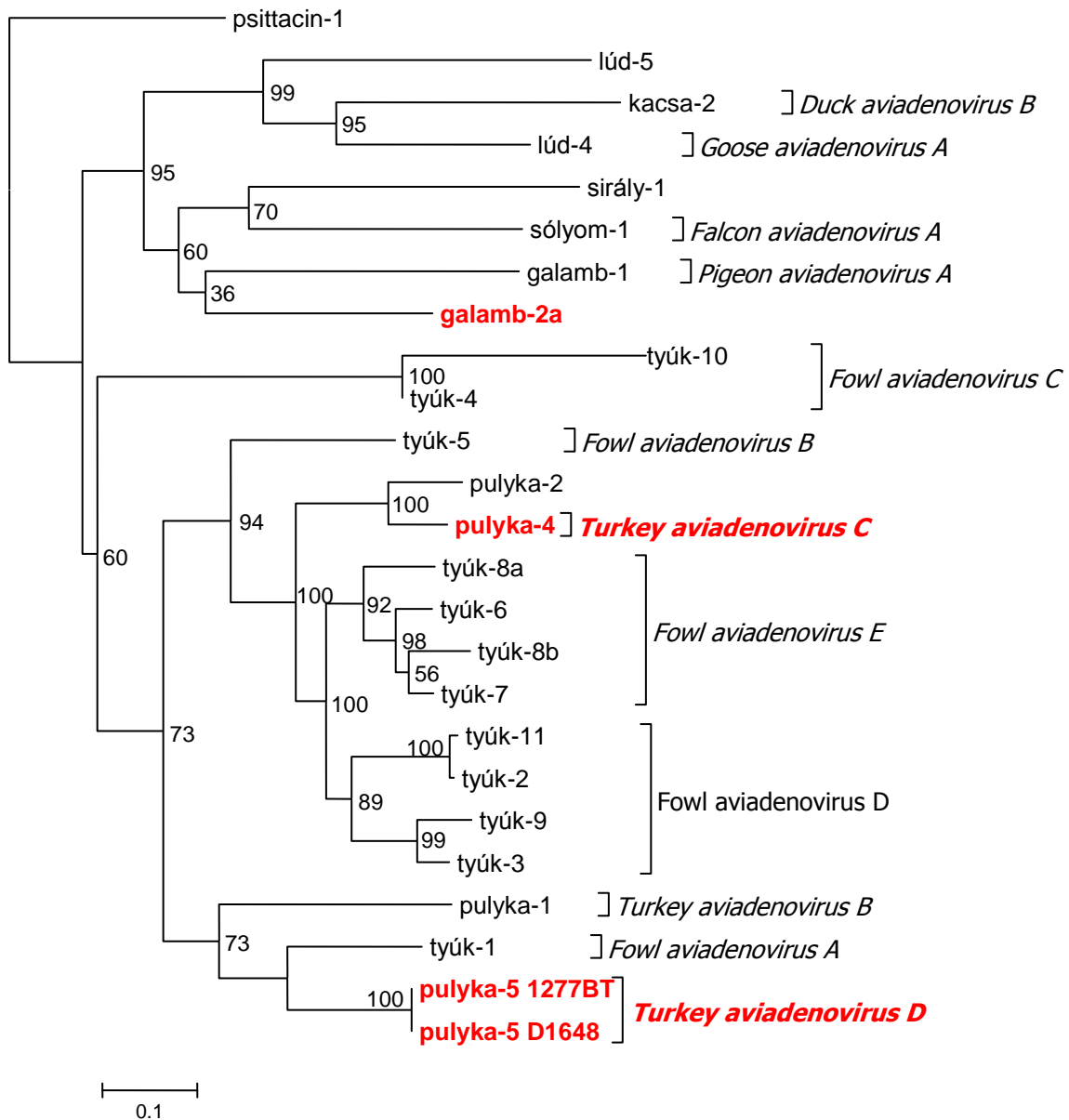
5. ábra: Az aviadenovírusok törzsfa-rekonstrukciója a teljes polimeráz gén származtatott aszekvenciája alapján.

A törzsfa-rekonstrukciós elemzést Bayesian analízissel, WAG+G+I modellel végeztük. A törzsfát a középpontján gyökereztettük a megjelenítéshez. A bootstrap értékek a fa elágazásainál láthatók és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). Az AdV típusokat a fán a gazdaállat nevével és a vírus típuszámával tüntettük fel.



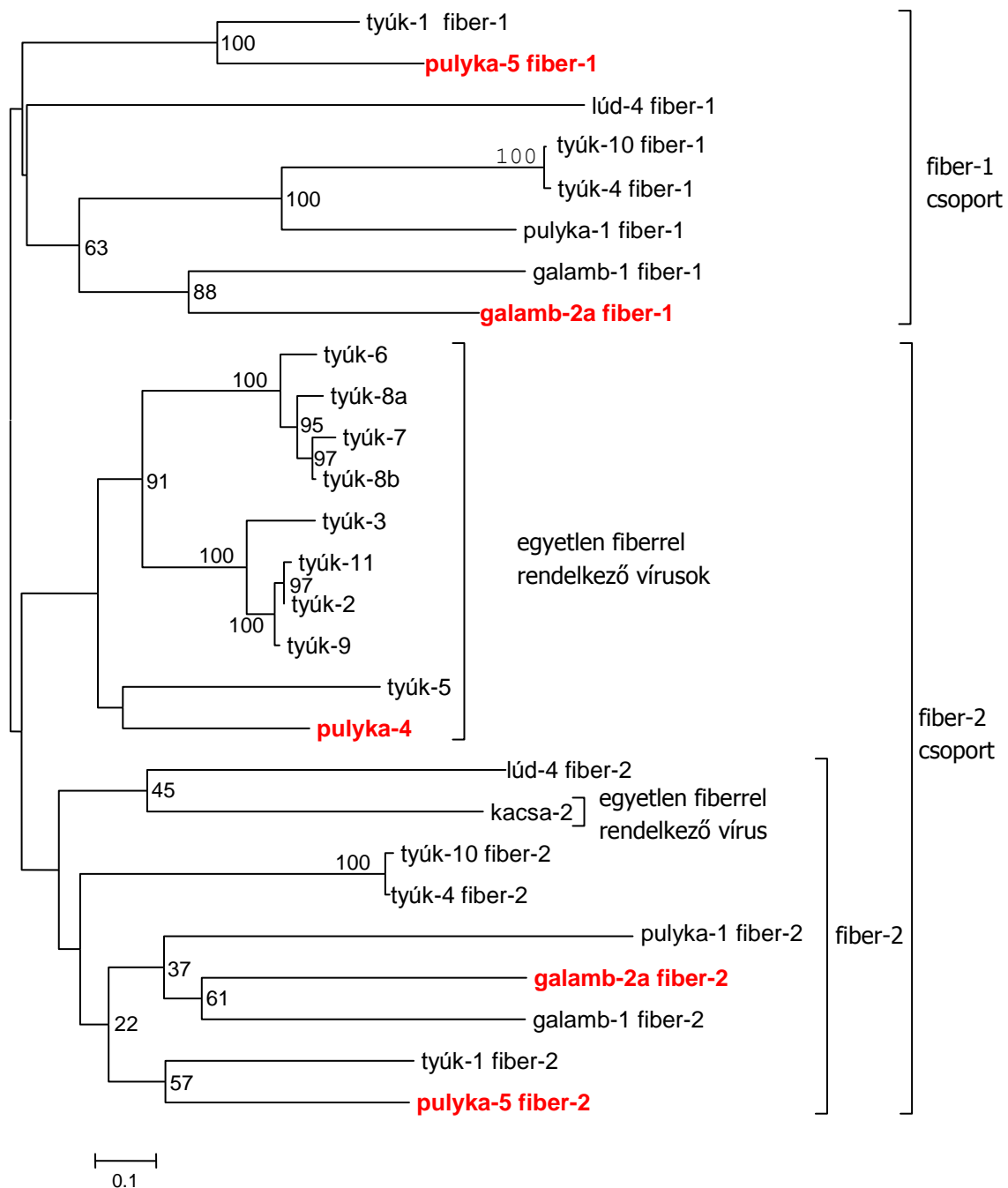
6. ábra: Az aviadenovírusok törzsfa-rekonstrukciója a teljes hexon gén szekvenciájának származtatott as sorrendje alapján.

Bayesian analízis, WAG+G+I modell. A törzsfát a megjelenítéshez a sólyom-1-gyel gyökereztettük. A bootstrap értékeket a fa elágazásinál tüntettük fel és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). Az AdV típusokat a fán a gazdaállat nevével és a vírus típuszámával tüntettük fel.



7. ábra: Az aviadenovírusok törzsfá-rekonstrukciója a hexon gén L1 régiójának származtatott as sorrendje alapján.

Távolsági mátrix analízis, JTT modell. A törzsfát a megjelenítéshez a psittacin-1-gyel gyökerelttük. A bootstrap értékeket a fa elágazásánál tüntettük fel és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). Az AdV típusokat a fán a gazdaállat nevével és a vírus típuszámával tüntettük fel.



8. ábra: Az aviadenovírus fiber gének evolúciós viszonyainak vizsgálata. Távolsági mátrix analízis, JTT modell, a fiber gének farki régiójának szekvenciáját felhasználva. A bootstrap értékek a fa elágazásinál láthatók és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). A törzsfát a középpontjánál gyökerezettünk.

6.2 Galamb-adenovírusok

6.2.1 Hazai galambállományok szűrése adenovírusok jelenlétére

A hazai galambállományok AdV fertőzöttségét az általános, virális DNS-polimerázra irányuló PCR (Wellehan et al., 2004) segítségével mértük fel. Ennek keretében összesen 97 galambot vizsgáltunk, melyek közül 48 (49,5%) egyedet találtunk pozitívnak. Harminchárom galamb esetében négyféle szervet, a májat, a tüdőt, a vesét és a vékonybelet külön vizsgáltunk. Ezek közül a galambok közül 22 egyedet találtunk AdV-ra pozitívnak (66,7%), míg a 47, csak máj minta alapján szűrt galamb közül mindössze 17-et (36,2%). Tizenhét, klinikai tüneteket nem mutató galambból csak ürülék mintát vizsgáltunk az általános AdV PCR-rel, s ezek közül 9 tartalmazott AdV-t (52,9%). A szűrővizsgálat eredményeit a 11. táblázatban részletezzük.

11. táblázat: A PiAdV szűrővizsgálat eredményeinek összesítése.

minta sorszáma	vírus típus	máj	tüdő	bél	vese	ürülék/ kloaka tampon
minta 1	PiAdV-1	+	+	+	-	N
minta 2	PiAdV-2	-	+	+	-	N
minta 3	PiAdV-2	-	+	+	+	N
minta 4	PiAdV-2	+	+	-	+	N
minta 5	PiAdV-2	+	+	-	+	N
minta 6	PiAdV-2	-	+	+	-	N
minta 7	PiAdV-2	-	+	+	-	N
minta 8	PiAdV-2	+	-	+	-	N
minta 9	PiAdV-2	-	+	-	+	N
minta 10	PiAdV-2	-	+	-	-	N
minta 11	PiAdV-2	-	-	+	-	N
minta 12	PiAdV-2	+	+	+	+	N
minta 13	PiAdV-2	-	-	+	-	N
minta 14	PiAdV-3	+	+	+	+	N
minta 15	PiAdV-4	-	-	-	+	N
minta 16	PiAdV-4	-	+	-	+	N
minta 17	PiAdV-4	+	+	+	+	N
minta 18	PiAdV-4	+	+	+	+	N
minta 19	PiAdV-4	-	+	+	+	N
minta 20	PiAdV-4	-	+	+	+	N
minta 21	PiAdV-4	+	+	-	+	N
minta 22	PiAdV-5	+	-	-	+	N
minta 23-33	- (11 eset)	-	-	-	-	N
minta 34-50	PiAdV-2 (17 eset)	+	N	N	N	N
minta 51-80	- (30 eset)	-	N	N	N	N
minta 81-84	PiAdV-2 (4 eset)	N	N	N	N	+
minta 85-89	PiAdV-4 (5 eset)	N	N	N	N	+
minta 90-97	- (8 eset)	N	N	N	N	-
aviadenovírus						
PiAdV-1	1					
PiAdV-2	33					
PiAdV-3	1					
siadenovírus						
PiAdV-4	12					
PiAdV-5	1					

+: pozitív; -: negatív; N: nem ellenőrzött

A 48 pozitív mintából származó, általános AdV PCR-rel felerősített termékeket, melyek a virális DNS-függő DNS-polimeráz egy szakszát tartalmazták, szekvenáltuk. Az esetek több mint felében, 35 galambban aviadenovírusok jelenlétét mutattuk ki, míg 13 egyed esetében siadenovírus fertőzöttséget találtunk. A részleges DNS-függő DNS-polimeráz gén szekvenciák alapján 3 aviadenovírus típust különítettünk el. A leggyakoribb,

33 galambban előforduló vírus egy új aviadenovírus, mely a korábban publikált PiAdV-1-től jelentősen, as szinten 23,3%-ban különbözik a vizsgált rövid DNS-polimeráz szakaszon. Ennek az új galamb aviadenovírus típusnak a PiAdV-2 nevet javasoltuk. A PiAdV-2 részleges DNS-polimeráz szekvenciáinak összehasonlítása során további két altípust sikerült elkülöníteni, a PiAdV-2a-t és a PiAdV-2b-t. A gyakoribb PiAdV-2a (22 eset) és a ritkább PiAdV-2b típus (8 eset) as szinten nem különbözik egymástól, ellenben nt szinten 6 szinonim mutáció fordul elő a 272 nt hosszú DNS-polimeráz szakaszon. Három esetben a két altípus szekvenciáinak együttes jelenlétét mutattuk ki, ám az ismételt kísérletek után is feltételezett kontamináció miatt ezeket az adatokat fenntartással kell kezelnünk. A második új aviadenovírus típust, melyet PiAdV-3-nak nevezünk el, mindössze egyetlen esetben mutattuk ki. A PiAdV-3 as szinten 26,7%-ban különbözik a PiAdV-1-től és 27,8%-ban a PiAdV-2-től a vizsgált, 90 as hosszú DNS-polimeráz génszakaszon. Mivel a DNS-polimeráz gén a többi genomi régióhoz képest megőrzött szekvenciával rendelkezik ez nagyon jelentős különbségnek tekinthető. A továbbiakban minden esetben az „új” kifejezést akkor használjuk egy AdV típus esetében, ha a 90 as hosszú DNS-polimeráz szakaszon legalább egy as különbséget tapasztalunk egy másik vírushoz képest. A PiAdV-1-et egyetlen esetben diagnosztizáltuk, míg FAdV-okat egyáltalán nem mutattunk ki a vizsgált galambokban.

A siadenovírusok közül 12 vírus egymással nt szinten teljesen azonosnak bizonyult a vizsgált 272 nt hosszú virális DNS-függő DNS-polimeráz génszakaszon. Ezt az új típust PiAdV-4-nek nevezünk el. Egy esetben mutattunk ki egy ezektől jelentős mértékben eltérő siadenovírust, mely a vizsgált rövid, 90 as hosszúságú szakaszon is 34,4%-os eltérést mutatott (PiAdV-5). Az új PiAdV-ok szekvenciái a GenBank adatbázisban a KX555529–KX555532, KX555534, KX673408 iktatószámokon található meg.

Az általános AdV PCR-rel azonosított aviadenovírusokból négy, a siadenovírusokból pedig öt különböző, hexon génre irányuló PCR segítségével kíséreltünk meg további szekvenciákat kinyerni (12. táblázat).

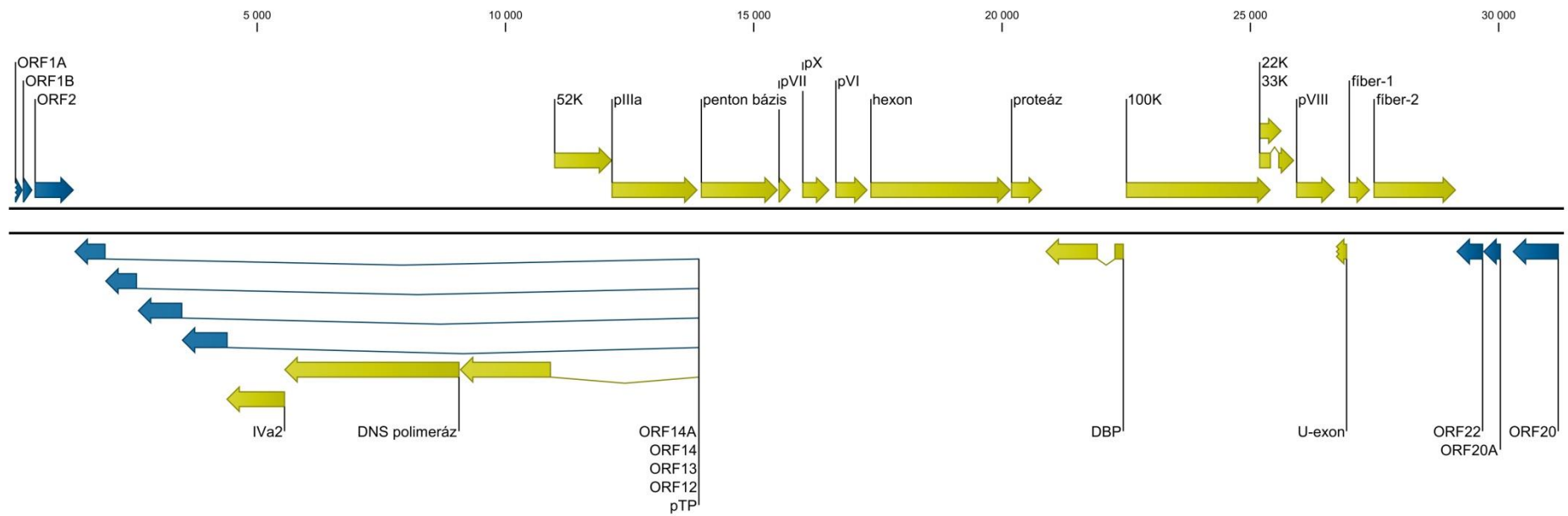
12. táblázat: A PiAdV-ok további genomszakaszainak feltárására irányuló PCR-ek eredményei.

Referenciák	Aviadenovirus				Siadenovirus	
	PiAdV- 1	PiAdV-2a	PiAdV-2b	PiAdV-3	PiAdV-4	PiAdV-5
Meulemans et al., 2001	+	-	-	-	-	-
Raue et al., 2005a <i>módosított</i>	+	+	-	-	-	-
Raue et al., 2005b	+	-	-	-	-	-
Mase et al., 2009	-	+	-	-	-	-
Dospoly et al., 2013	N	N	N	N	+	-

+: pozitív; -: negatív; N: nem ellenőrzött

6.2.2 A PiAdV-2a genomrészletének szerveződése

A PiAdV-2a 31.314 bp hosszúságú részleges genomszekvenciáját a primer-sétálás módszerével, degenerált primer konstrukciókkal, majd specifikus primerek felhasználásával határoztuk meg. A variábilis genomvégek szekvenciáit ezzel a módszerrel sajnos nem sikerült kinyernünk. Ha feltételezzük, hogy a teljes genomhossz a PiAdV-1-éhez hasonló lehet, akkor a genom nagyjából 70%-át sikerült szekvenálnunk. Az első ORF, amelyet a bal oldalon azonosítottunk az ORF1A, majd ezt követi az ORF1B és az ORF2. Ettől jobbra a negatív szálon megtaláltuk az aviadenovírusok ORF14A, -14, -13 és -12 génjeinek homológjait. A genom középső, konzervált szakaszának szerveződése megegyezett a korábban leírt AdV-okéval. A PiAdV-2a esetében két fiber gént azonosítottunk, melyek közül az első mindössze 142 as-ból áll és csak a fehérje farki és a nyél régió egy rövid szakaszát kódoló szekvencia található meg benne. A második teljes hosszúságú, 554 as alkotja és mind a három fő domén, vagyis a farok, a nyél és a feji alegység megőrzött motívumai is fellelhetők. A fiber génektől jobbra a negatív szálon található az ORF22, a -20A és a -20 (9. ábra), bár az utóbbi két ORF első, közös exonja már a szekvenált szakaszon kívülre esik.

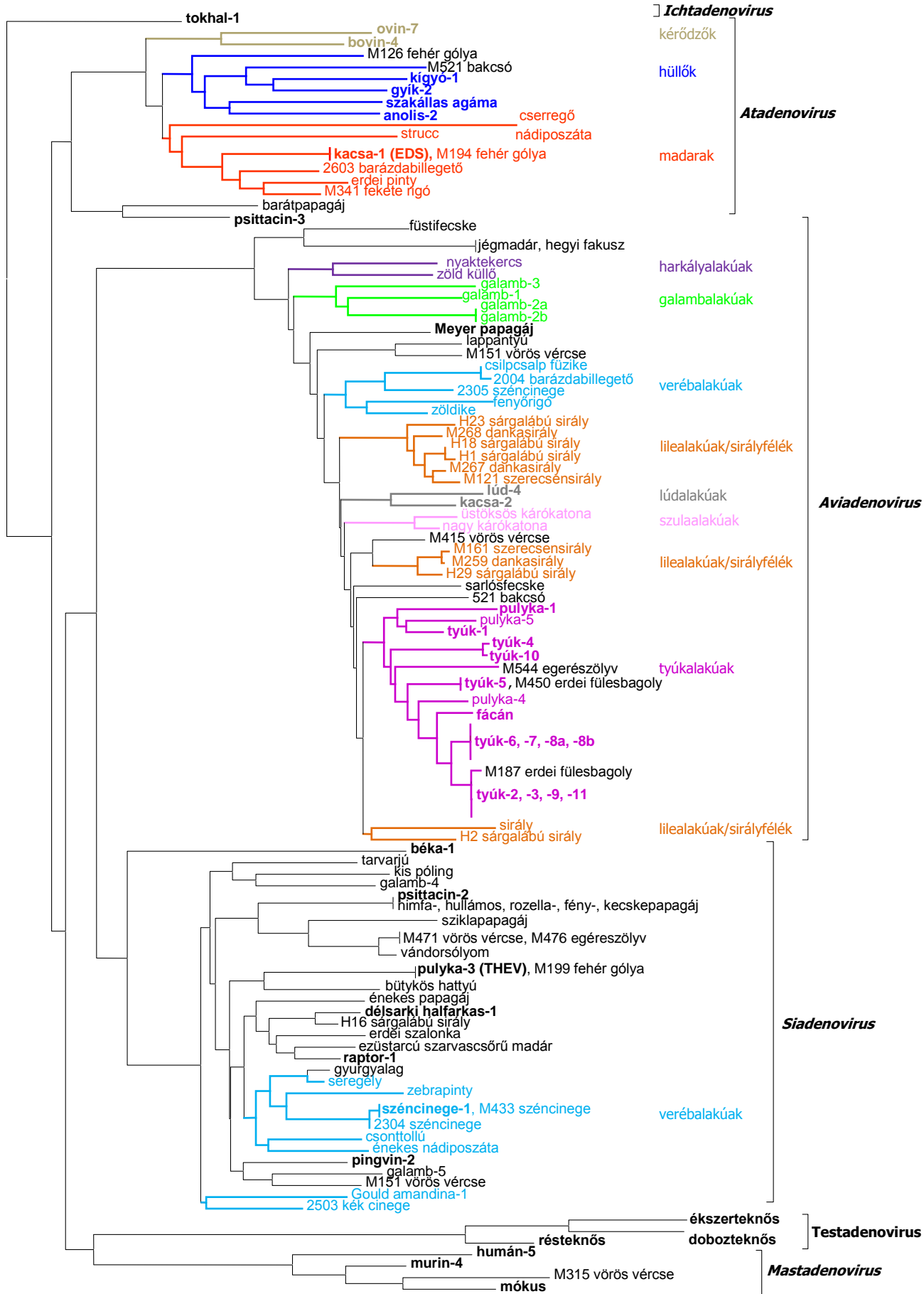


9. ábra: A PiAdV-2a genomrészletének szerveződése.

A megőrzött, minden AdV-ban megtalálható géneket sárga nyilak jelzik. A genom végein elhelyezkedő, csak az *Aviadenovirus* nemzetség tagjaiban előforduló ORF-eket kék nyilakkal ábráztuk.

6.2.3 Az új PiAdV-ok filogenetikai helyzete

Mivel nem minden új PiAdV-ból sikerült hexon szekvenciát felerősítenünk, ezért a filogenetikai számításokat csak az illesztések során keletkezett hézagok kivágásával 87 as hosszúnak adódó DNS-függő DNS-polimeráz gén szekvencia részlete alapján tudtuk elvégezni (10. ábra). A számítások szerint a PiAdV-1, -2 és -3 monofiletikus csoportot alkotnak az *Aviadenovirus* nemzetségen belül. A PiAdV-4 és -5 a siadenovírusok közé esik a törzsfán, ám a számítások szerint egymással nem mutatnak közeli rokonságot. A PiAdV-2a esetében sikerült a teljes polimeráz, a hexon és a két fiber gén szekvenciáját is meghatározni a részleges genomszekvenálás során, így a PiAdV-2a az ezekkel a génekkel végzett számításokba is bekerülhetett (5., 6., 7., 8. ábra). A PiAdV-2a mind a három gén alapján számolt törzsfán a PiAdV-1-gyel alkot monofiletikus csoportot.



0.05

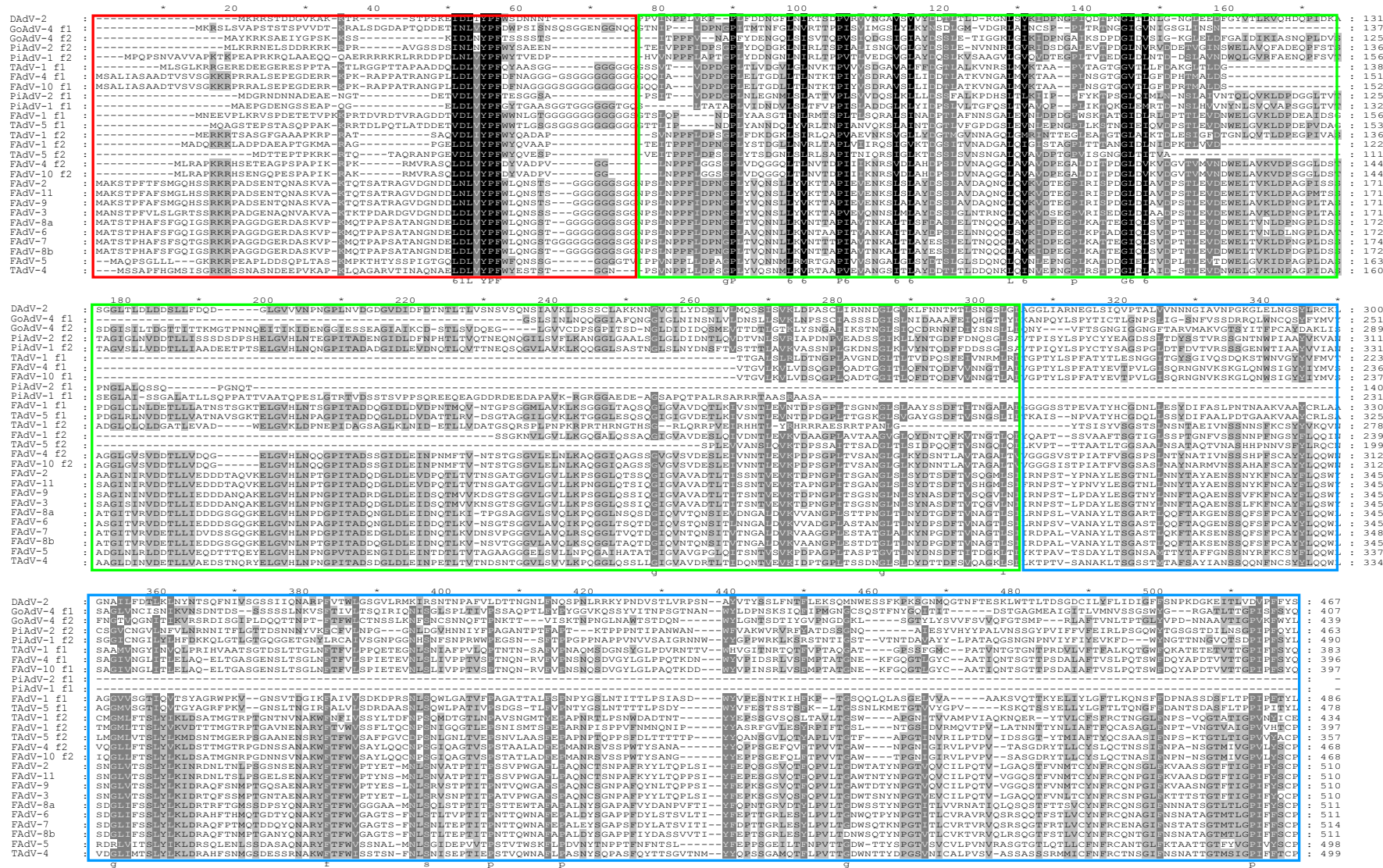
10. ábra: A madár-AdV-ok törzsfája a DNS-függő DNS-polimeráz gén 87 as hosszú szekvencia részlete alapján.

A számítást távolsági mátrix analízissel, JTT modell felhasználásával végeztük. A bootstrap értékeket nem tüntettük fel, mivel az elágazások többségében nagyon alacsony értékeket kaptunk. A törzsfát a tokhal-AdV-nál gyökerezítettük az ábrázoláshoz. Az AdV típusokat a fán a gazdaállat nevével, a vírus típuszámával és amennyiben többféle AdV is előfordult az adott fajban, a minta iktatási számával tüntettük fel. A mások által publikált AdV-ok neveit félkövér betűkkel szedtük. A színezés az AdV-ok csoportosulásainak könnyebb megértését szolgálja. A murin-AdV-4 szekvenciája dr. Vidovszky Márton nem publikált adata, a szemléltetéshez engedélyével felhasználtuk.

6.3 A madár-adenovírus fiber gének

A madár-adenovírus fiber gének szekvencia illesztése során úgy találtuk, hogy bizonyos vírusok, mint például a TAdV-5 és a FAdV-1 fiber-1 génje sokkal többet tartalmaz a nyél régió ismétlődő motívumaiból. Ezeket az ismétlődő részeket, melyek csak egy vagy két vírus esetén voltak megtalálhatók, a könnyebb megjeleníthetőség céljából kivágtuk az ábrázolásban (11. ábra).

A PiAdV-1 genomjában 246, míg a PiAdV-2a-ban mindössze 142 as hosszú fiber-1 gént találtunk. A farok teljes egészében, a nyél régió pedig részben még fellelhető, de a PiAdV-2a esetében a feji domén teljesen hiányzik. A PiAdV-1 fiber-1 génje egy ~100 as méretű, a többi aviadenovírus fiber szekvenciáival homológiát nem mutató szakaszban végződik. Mivel a PiAdV-ok fiber génjei ilyen rövidnek bizonyultak, ezért a többi vírusból is csak ezekkel a rövidebb szakaszokkal homológ régiókat vehettük be a filogenetikai analízisbe (8. ábra). A fiber gének szekvenciabeli variabilitása miatt nem vághattuk ki az összes, illesztés során keletkezett hézagot, mert túlságosan rövid szekvenciák maradtak volna a számításhoz és eltűntek volna azok a jellegzetességek is, amelyek a két fiber csoport közti különbségeket adják. Ezek a szerkesztés során szándékosan bennhagyott hézagok szolgálnak magyarázatul arra a látszólagos ellentmondásra, miszerint a fiber gén szekvenciákkal végzett filogenetikai számításhoz 165 as hosszúságú illesztett szekvenciákat használtunk fel, holott a PiAdV-2a fiber-1 génje mindössze 142 as hosszú. A filogenetikai számítások szerint az egyetlen fiber génnel rendelkező vírusok fiber génjei a két fiber génnel rendelkező vírusok fiber-2 génjével mutatnak közelebbi rokonságot. A fiber-2 monofiletikus csoporton belül megfigyelhető, hogy az egy fibert kódoló vírusok a DAdV-2 kivételével szintén csoportba tömörülnek. A két fibert hordozó vírusok fiber-1 génje egy különálló, monofiletikus csoportot alkot. Ebbe a csoportba tartozik a PiAdV-ok csökevényes fiber génje is.



11. ábra: Az aviadenovírus fibrek származtatott as szekvenciájának illesztése.

A fehérje doménjeit, a farki, a nyél és a feji alegységet különböző színekkel jelöltük (fark – piros; nyél – zöld; fej – kék).

6.4 Egzotikus madár-adenovírusok

6.4.1 Papagáj-adenovírusok

Hazánkban a leggyakoribb díszmadárként tartott papagájfajok a hullámos és a nimfapapagáj. A minták könnyű elérhetősége miatt legnagyobb számban e fajok egyedeit vizsgáltuk, összesen 56 hullámos és 38 nimfapapagájt, de ezeken kívül további 19 papagáj fajból is gyűjtöttünk mintákat. Az általános AdV PCR-rel pozitívnak talált papagájok listáját és a kimutatott vírusok típusát a 13. táblázatban mutatjuk be.

13. táblázat: Az általános AdV PCR-rel kimutatott AdV-ok papagájokban.

madárfaj	AdV-pozitív/vizsgált egyedszám	siadenovírus	atadenovírus
barátpapagáj	1/5		1
énekes papagáj	1/2	1	
fénypapagáj	1/1	1 (PsAdV-2)	
hullámos papagáj	3/56	3 (PsAdV-2)	
kecskepapagáj	1/2	1 (PsAdV-2)	
nimfapapagáj	1/38	1 (PsAdV-2)	
rozellapapagáj	1/4	1 (PsAdV-2)	
sziklapapagáj	1/2	1	
		9 eset	1 eset
	10/110	2 új típus (t.)	1 új t.
		1 ismert t.	

A felmérés során összesen 10 példányban (8,06%) mutattuk ki AdV-ok jelenlétét az általános AdV PCR segítségével. Ezek közül 7 eset PsAdV-2 fertőzésnek bizonyult. A PsAdV-2 jelenlétét egy-egy nimfa-, rozella-, kecske-, és fénypapagájban, valamint hullámos papagájok közül 3 egyedben igazoltuk. A papagájok boncolása során emésztőszervrendszeri elváltozásokat figyeltünk meg. A bélnyálkahártya megvastagodott, kipirult, a tápcsatorna végső szakaszában vörösesbarna, híg folyadékot, más esetekben fekete, kenőcsös konzisztenciájú tartalmat figyeltünk meg egész, emésztetlen magvakkal. Ilyen elváltozást a három hullámos papagáj, a fénypapagáj és legkifejezettebb formában a nimfapapagáj esetében láttunk, melyekben a PsAdV-2 kimutatható volt. A 7 éves fénypapagáj két napig tartó levertség, hasmenés és hirtelen fogyás után hullott el. A boncolás során a zsigeri szerveken (májon, vesén, beleken), szíven, tüdön, a légzsákok falán és a savós hártályokon a vese elégtelen működésére utaló, köszvényes elváltozás volt megfigyelhető. Az egyetlen élő egyed, amelyből kimutattuk a PsAdV-2-t, a kobzásból származó kecskepapagáj volt.

A hét hazai, PsAdV-2-t tartalmazó mintából kinyert, a primer szekvenciák eltávolítása után 269 bp hosszúságú polimeráz génszakasz közül 6 minta szekvenciája nt szinten 100%-

ban azonosnak bizonyult a GenBank adatbázisában található PsAdV-2 szekvenciával. A rozellapapagáj esetében kevert AdV fertőzést igazoltunk a PCR termék molekuláris klónozásával. A két, kissé eltérő szekvencia egy-egy nt eltérést mutatott a GenBank-ban található PsAdV-2-höz képest, mely az egyikben as-változásban is megnyilvánult.

A hexon gén P1 és P2 szakaszának felerősítése négy PsAdV-2-t tartalmazó minta esetében volt sikeres a siadenovírusok kimutatására tervezett primerek segítségével (Doszpoly et al., 2013). A négy mintából kinyert, a primerszekvenciák eltávolítása után 430 bp méretű génszakasz nt szekvenciája egymással 100%-ban azonosnak bizonyult, és nem egyezett meg a GenBank-ban található egyetlen hexon szekvenciával sem. A szakasz G+C tartalma 36,1%-nak adódott. A PsAdV-2-ből kinyert szekvenciák a KC248185-KC248192 iktatási számokon érhetők el a GenBank adatbázisában.

A PsAdV-2-n kívül az általános AdV PCR segítségével kimutattunk egy-egy új siadenovírust énekes- és sziklapapagájból, valamint egy szintén le nem írt atadenovírus típust barátpapagájból.

6.4.2 Egyéb egzotikus madarak adenovírusai

Huszonnyolc egzotikus madárfajból származó 115 minta szűrővizsgálata során 11 esetben siadenovírusokat mutattunk ki az általános AdV PCR segítségével, míg aviadenovírust és atadenovírust mindössze egy-egy esetben diagnosztizáltunk (14. táblázat). Mindegyik fent említett vírus több as-ban eltért a GenBank-ban található szekvenciáktól a vizsgált DNS-polimeráz génszakaszon, így új típusoknak tekinthetők.

14. táblázat: Az általános AdV PCR-rel kimutatott AdV-ok egzotikus madarakban.

madárfaj	AdV- pozitív/vizsgált egyedszám	avi	si-	at-	ismeretlen AdV (kevert fertőzés)
ezüstarcú szarvascsőrű madár	1/1		1		
gould amandina	5/5		5		
strucc	3/28			1	2
tarvarjú	1/3		1		
üstökös kárókatona	1/10	1			
zebrapinty	5/31		4		1
összesen	16/78	1 eset 1 új t.	11 eset 4 új t.	1 eset 1 új t.	3 eset -

Az új típusú aviadenovírust üstökös kárókatonában mutattuk ki, míg a szintén új típusba tartozó atadenovírust egy magyarországi tenyészetből kapott egészséges struccból származó ürülék mintában. További két, ugyaninnen származó mintában, bár a kapott DNS-

polimeráz szekvencia elemzésével kevert fertőzést állapítottunk meg, az elektroferogram gondos vizsgálata alapján valószínűsíthető az előző típussal megegyező vírus jelenléte.

Siadenovírusok közül 4, eddig le nem írt típust különítettünk el Gould amandina pintyekből, zebra pintyekből, ezüstartú szarvascsőrű madárból és tarvarjúból az általános AdV PCR segítségével. A Gould amandina pintyekben kimutatott vírust egy időben találtuk meg egy amerikai kutatócsoporttal. Az amerikai kutatók a patológiai háttér tanulmányozásával járultak hozzá az új vírus megismeréséhez, mi pedig szekvencia szinten igyekeztünk tovább vizsgálni. Az Egyesült Államokban egyetlen esetben mutatták ki a Gouldian finch AdV-1 (GFAdV-1) névre keresztelt vírust, míg mi 3 független tenyészet 5 példányából. A polimeráz gén egy részéből, valamint a pTP gén teljes második exonjából, illetve az 52K gén első feléből egy egybefüggő 3943 bp hosszúságú szakaszt sikerült szekvenálnunk, továbbá a hexon gén L1 régiójából egy 430 bp-os szakasz nt sorrendjét határoztuk meg. A szekvenciák a GenBank-ban a KF031569 és a KF031570 iktatószámokon érhetők el. A kimutatott vírusok filogenetikai viszonyait 10. ábra szemlélteti.

6.5 Vadon élő madarak adenovírusai

AdV-ok jelenlétére 83 vadmadárfaj 434 egyedét vizsgáltuk. Összesen 102 esetben kaptunk pozitív eredményt, ami 23,5%-os pozitivitást jelent. A vadmadarak körében végzett AdV szűrővizsgálat eredményeit a 15. táblázat foglalja össze. Leggyakrabban, 59 esetben aviadenovírusokat detektáltunk, melyek közül 28 olyan aviadenovírus típusra bukkantunk, melyeket eddig nem ismert a tudomány. Két erdei fülesbagolyból két FAdV típust, nevezetesen egy, a FAdV-5-tel teljesen megegyező és egy, a FAdV-D fajba sorolható vírust mutattunk ki. A siadenovírusok szintén nagy diverzitást mutattak, 13 új típusra bukkantunk, míg két további esetben a már publikált THEV és GTAdV-1 jelenlétét bizonyítottuk fehér gólyában, illetve széncinegében. Atadenovírusokat mindössze 7 esetben diagnosztizáltunk, melyek közül 6 mutatkozott új típusnak. A hetedik eset a korábban közölt EDSV-sal teljesen megegyező vírus kimutatása volt fehér gólyában. Tizenöt pozitív minta esetében a kapott elektroferogram többszörös fertőzésre utalt. Néhány esetben a szennyező szekvencia nem egy másik AdV-tól, hanem baktériumtól, vagy a gazdafajtól származott, de az AdV-októl származó szekvencia is világosan kivehető volt a nem specifikus szekvenciák mellett. Ezekben az esetekben megkíséreltük a PCR termékek molekuláris klónozását, ami azonban nem vezetett a kívánt eredményre, így a vírusok pontos szekvenciáit nem tudtuk meghatározni.

15. táblázat: Az általános AdV PCR-rel kimutatott AdV-ok vadmadarakban.

madárfaj	AdV-pozitív/ vizsgált egyedszám	avi-	si-	at-	mast-	ismeretlen AdV (kevert fertőzés)
bakcsó	2/5	1		1		
barázdabillegető	2/6	1		1		
bütykös hattyú	1/2		1			
cserregő nádiposzáta	1/2			1		
csilpcsalpfüzike	1/4	1				
csonttollú	1/7		1			
danka sirály	4/24	2+1+1				
egerészölyv	7/10	2	1*			4
énekes nádiposzáta	1/9		1			
erdei fülesbagoly	2/2	1 (FAdV-5) +1 (FAdV-D)				
erdei pinty	1/4			1		
erdei szalonka fácán	1/2 2/12		1			
1+1						
fehér gólya	3/35		1 (THEV)	1 + 1 (EDS)		
1				1		
fekete rigó	1/10					
fenyőrigó	1/1	1				
füsti fecske	1/9	1				
gyurgyalag	1/3		1			
hegyi fakusz	1/2	1 [@]				
jégmadár	1/5	1 [@]				
kék cinege	1/11		1			
kék vércse	2/2					2
kis póling	1/1		1			
nagy kárókatona	7/17	7				
lappantyú	1/11	1				
nyaktekercs	3/7	3				
sárgalábú sirály	12/28	3+1+1+2+1	1			3
sarlósfecske	1/4	1				
seregély	1/4		1			
széncinege	4/6	1	1+ 1 (GTAdV-1)			1
szerecsensirály	5/31	3+1				1
vándorsólyom	2/4		1			1
vörös vércse	25/39	14+1	1+1*		5	3
zöld küllő	1/1	1				
zöldike	1/3	1				
		59 eset	16 eset	7 eset	5 eset	15 eset
összesen	102/323	28 új t. 2 ismert t. 1 dupla [@]	13 új t. 2 ismert t. 1 dupla *	6 új t. 1 ismert t.	1 új t. -	- -

„+ számokkal” az eltérő típusok esetszámát adtuk meg

* ugyanaz a siadenovírus egerészölyvben és vörös vércsében

@ ugyanaz az aviadenovírus jégmadárban és hegyi fakuszban

7. Megbeszélés

7.1 Pulyka-adenovírusok

Együttműködésben, Illumina szekvenálással meghatároztuk és értelmeztük a TNI1 és 1277BT jelzésű TAdV-4 és TAdV-5 törzsek teljes genomszekvenciáját, valamint a primer-sétálás módszerével részlegesen a D1648 jelzőszámú magyar TAdV-5 törzs genomját is. Az új generációs szekvenálás egyértelműen gyorsabbnak bizonyult, mint a Sanger-féle módszer. Az Illumina szekvenálással 6-28.000-szeres lefedettségben megkaptuk a genom 90%-át, de a genomvégek, valamint a genomok középső régióiban két-két szakasz szekvenciája csak a további PCR-ek és Sanger-féle szekvenálás segítségével lett teljes. A nehézségek annak tulajdoníthatók, hogy a kísérletek elvégzésekor az Illumina platform még bevezetés alatt állt a bécsi egyetemen, illetve a hozzá fejlesztett szoftverek sem voltak minden tekintetben megbízhatók. Ennek ellenére azt gondoljuk, hogy az izolált vírusok genomszekvenciáinak meghatározásához az új generációs módszerek használata a célravezetőbb. A nem izolált, vagy nem izolálható vírusok szekvenálásához azonban egyelőre még mindig csak a primer-sétálás technikája áll rendelkezésünkre. Tipikusan ez az eset áll fenn a vad- és egzotikus madarak esetében, melyekből nincsenek folyamatos sejtvonalak és az állatok védettsége, vagy nehéz hozzáférhetősége miatt primer sejttenyésztet nem készíthető, így ezek a vírusok nem vagy csak nehezen izolálhatók.

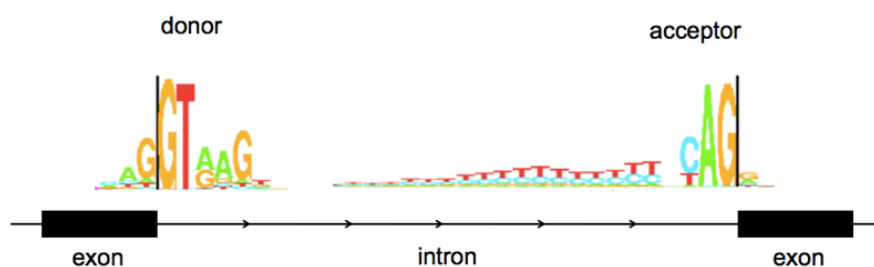
A TAdV-4 és TAdV-5 genomok esetében kiegyensúlyozott, 48,5% és 51,6%-os G+C arányt tapasztaltunk. Az alacsony G+C arány azokra az AdV-okra jellemző, melyek evolúciós léptékben aránylag később kerültek egy új gazdafajba. A TAdV-4 és -5 esetében a kiegyensúlyozott G+C arány arra utal, hogy ezek a vírusok már hosszú ideje együtt fejlődnek jelenlegi gazdájukkal, amit általánosságban elmondhatunk minden aviadenovírusról. Ez is alátámasztja azt az elméletünket, hogy a madarakban előforduló AdV-ok közül az aviadenovírusok lehetnek a velük együtt fejlődött vírusvonal, míg az alacsony G+C tartalmú at- és siadenovírusok csak később kerülhettek át ezekre a gazdákra (Benkő és Harrach, 2003). Ezt a korábbi feltételezést tehát a mostani genom szekvenálásaink is megerősíteni látszanak (lásd még később a PiAdV-2a genom tárgyalását).

Az aviadenovírusok (így a most tárgyalt TAdV-4 és -5) genomjának a bal és a jobb végét – ami körülbelül az első 6000 és az utolsó 12.000 bp-t jelenti – nemzetségre jellemző, egyedi gének alkotják, melyeknek más AdV nemzetségekben nincsenek homológjai (Harrach et al., 2011). A TAdV-4 genomszerveződését a FAdV-5 (Marek et al., 2013) genomszerveződésével találtuk hasonlónak, az egyetlen különbséget az ORF1C megléte jelentette a FAdV-5 genomjához képest. A TAdV-5 genomszerveződése szinte teljesen megegyezik a FAdV-1-ével, eltérés mindössze a genom jobb végén tapasztalható az ORF11

és -26 értelmezésében (4. ábra). Az ORF1A mind a TAdV-4-ben, mind a TAdV-5-ben csonka, annak első exonja nem volt fellelhető a genomok térképezésekor. Ez nem egyedi jelenség, hiszen az eddig leírt aviadenovírusok közül eddig csak a FAdV-8 esetében írták le a teljes gént, ahol viszont az ORF1A az ORF1B-vel összeforrt és az ORF1A/B nevet kapta. Egy elmélet szerint ez az összeolvadás egy leolvasási keret eltolódást okozó (frameshift) mutáció eredményeként jöhetett létre, egy másik elképzelés szerint viszont az ősi vírusokban ez a két ORF egyben volt jelen és egy mutáció hatására vált ketté (Corredor et al., 2006). Elképzelésünk szerint a FAdV-okban az ORF1A-nak azért hiányozhat az első exonja, mert mint már nem funkcionáló gén, mutációkkal tönkrement, és/vagy kiesett az ORF első fele. Ezt az elméletet az is alátámasztja, hogy ezek a genom bal oldalán található feltételezett gének, vagy gén-maradványok kiüthetők anélkül, hogy a vírus életképessége csökkenne (Corredor és Nagy, 2010). Ez a génterápiában, vagy vakcinaként használt aviadenovírus alapú rekombináns vektorok tervezésénél jól kihasználható, ugyanis ezen szakaszok eltávolításával helyet nyerhetünk nagyobb transz gének beültetésére. A mesterségesen előállított AdV-ok genomhossza ugyanis nem lehet sokkal nagyobb, mint a vad típusú vírusé, mert nem kapunk életképes rekombináns (Corredor és Nagy, 2010). A mindkét új TAdV-ban megtalálható ORF2 gén az eddig leírt aviadenovírusok homológ génjéhez hasonlóan, nagy hasonlóságot mutat a parvovírusok NS1 génjével (Chiocca et al., 1996), mely a vírus replikációban játszhat szerepet. A negatív szálon helyezkedik el az ORF14 és -14A, melyek a TAdV-5 esetében összeforrtak, a TAdV-4 genomjában pedig különálló ORF-eket alkotnak. Ettől jobbra a valószínűleg az ORF2 duplikálásával keletkezett, ORF13 és -12 feltételezett gének találhatóak, mind a TAdV-4, mind pedig a TAdV-5 esetében. Ezek a gének (ORF2, -14, -14A, -13, -12) a szekvenciájukban található megőrzött Walker A motívum alapján mind a III-as típusú helikázok családjába tartoznak és feltehetőleg a DNS-replikációban játszhatnak szerepet (Washietl és Eisenhaber, 2003). A legújabb kutatási eredmények szerint ezekben az ORF14, -14A, illetve -24 fehérjékben jelen vannak olyan speciális (BC-box) motívumok is, melyek a mastadenovírusok E4 ORF6, illetve az atadenovírusok 34K fehérjével mutatnak homológiát. Ezek a fehérjék a mast- és atadenovírusokban az E1B 55K, illetve az atadenovírusok esetében az LH3 fehérjével közösen, úgynevezett cullin alapú ubiquitin ligáz komplexet képeznek, melyek a gazdasejt vírus elleni védekezésében résztvevő egyes fehérjék lebontását végzik. Hasonló cullin kötési képességet tételezünk fel az aviadenovírusok, így a TAdV-4 és -5, valamint a PiAdV-2a ORF14 és -14A génjei esetében is (Gilson et al., 2016).

A TAdV-4 és -5 genomok középső régiója a IVa2 géntől kezdődően a pVIII-ig bezárólag megőrzött, ami nem csak az *Aviadenovirus* nemzetségre jellemző, de az *Adenoviridae* család összes eddig leírt tagjára is.

A fibert, illetve a TAdV-5 esetében a fibereket követően az ORF22-től az ORF17-ig az aviadenovírusokra jellemző gének követik egymást mind a TAdV-4 mind a TAdV-5 genomjában. A TAdV-4 esetében a TR1-nek elnevezett ismétlődések a FAdV-5-ben leírt hasonló ismétlődések szekvenciáival mutatnak homológiát (Marek et al., 2013). A TAdV-5 genomjában is találtunk ismétlődő szakaszokat az ORF8 és a -17 között. Ezek az ismétlődő régiók korábbi tanulmányok szerint szintén nélkülözhetők a vírus túléléséhez és replikációjához (Ojkic és Nagy, 2000) és a rekombináns vírus vektorok tervezésénél szintén a transz gének beépítési helyéül szolgálhatnak. A TAdV-5 genom esetében az ORF19 annotációja sajnos nem tekinthető teljesen megbízhatónak, mivel az első és a második exon közötti splice lehetőségek közül többet is elképzelhetőnek tartottunk a bioinformatikai elemzés során. A splice donor hely szekvenciájában az egymást követő G (guanin) és T (timin) nt-ok nagyon megőrzött módon mindig jelen vannak, ám az ezt megelőző és ezt követő szekvencia részletekben már megfigyelhető variabilitás (12. ábra). A splice akceptor helyek megtalálását a legkonzerváltabb AG (adenin-guanin) nukleotidpároson kívül a jellegzetes T-gazdag szekveciarészlet segíti ugyan, ám ennek a régióknak a hossza változó, esetenként csak néhány nt alkotja, így felismerése nehéz lehet. Sajnos a GenBank-ban sem minden aviadenovírus ORF19 feltételezett génje rendelkezik megbízható annotációval, vagyis nem kísérletesen, hanem bioinformatikai predikciós módszerekkel határozták meg a splice mintázatunkat (amennyiben ez egyáltalán megtörtént). Sajnos emiatt ezekre az adatokra sem támaszkodhattunk a genomszekvenciák értelmezése során. Annotációnkban így az általunk legvalószínűbbnek tartott lehetőségeket adtuk meg a spliceolt gének esetében, de amíg mRNS vizsgálat nem történik a génexpresszió pontos feltárása céljából, addig sajnos ezek az értelmezések feltételesek maradnak.



12. ábra: A splice donor és akceptor helyek szekvenciájának megőrzöttsége (Stephens and Schneider, 1992).

Az ORF9, -10 és -11 feltételezett gének csak a TAdV-5 genomjában voltak fellelhetők. Ugyanezeket az ORF-eket a FAdV-1 genomjában is megtaláljuk. A bioinformatikai elemzések szerint ez a három feltételezett gén azonos, immunoglobulin-szerű domént tartalmaz és egy, a házi tyúk genomjában talált génnel mutatott nagyfokú homológia alapján feltételezik, hogy a gazdaállattól vette fel a FAdV-1 ezt a gén együttest (Washietl és

Eisenhaber, 2003). A TAdV-5 törzsfán elfoglalt helyzete és genom szerveződése, melyek a FAdV-1-gyel való közeli rokonságra utalnak, valamint az ORF9, -10 és -11 feltételezett gének tyúk-eredete arra utalhat, hogy ennek a vírusnak az őse a közeli rokon, szintén Galliformes rendbe tartozó tyúkból kerülhetett át a pulykákba. A TAdV-5 további evolúciója pedig már önállóan zajlott az új gazdaállat fajban és a genomszerveződés megtartása mellett olyan filogenetikai értelemben vett távolságra került a mai FAdV-októl, hogy már nem is sorolhatók egy fajba. Az ORF11 és -26 értelmezésünk némileg eltér a FAdV-1-ben leírtaktól. A FAdV-1 esetében az ORF11 és a -26 3-3 exonból áll, míg a TAdV-5 annotálása során mi úgy találtuk, hogy az ORF11 utolsó exonja inkább az ORF26-hoz tartozhat, annak az első exonját alkotva. Így feltételezéseink szerint az ORF11 csak kettő, míg az ORF26 négy exonból áll a TAdV-5 esetében. Ezeket a feltételezéseket a virális genomról átíródott mRNS-ek vizsgálatával lehetne alátámasztani, hasonlóképpen az előző bekezdésben tárgyalt ORF19 esetéhez.

A 1277BT jelzőszámú brit és a primer-sétálás módszerével szekvenált D1648 jelzőszámú magyar TAdV-5 törzs homológ, 27.931 bp hosszú szakaszával végzett összehasonlító analízis során megállapítottuk, hogy a két törzs azonosnak mondható. A genomszerveződést és a nt sorrendet tekintve is szinte teljesen megegyeznek. A két törzs mindössze 41 nt-ban (0,15%) tér el egymástól. Az eltérések közül csak 14 nt (0,05%) misszensz mutáció, ami azt jelenti, hogy ennyi pontmutáció okoz as szekvencia különbséget, a többi 27 nt (0,1%) differencia szinonim, vagyis a nt csere nem okoz as változást (10. táblázat). Nonszensz és leolvasási keret eltolódást okozó mutációkat nem találtunk. Aránylag sok eltérést tapasztaltunk a hexon fehérjét kódoló gén esetében. A kapszidot alkotó fő felszíni fehérje, a hexon, annak is különösen a virion külső felszínén található hurkai intenzíven változnak, mutálódnak a gazdaszervezet immunválaszának szelekciós nyomására. Ez a fehérje szakasz a vírus legfőbb antigénje, ezáltal a szerotípus meghatározója (Walsh et al., 2009). További különbségeket figyeltünk meg a két törzs szekvenciájában a DBP és a 100K gének esetében is. A 1277BT és a D1648 jelzőszámú brit és magyar TAdV-5 törzseket térben és időben elkülönülten izolálták, ami magyarázat lehet a két vírustörzs szekvencia különbségeire, ám így is meglepő a nagymértékű hasonlóságuk. Ennek oka a két törzs közös eredete lehet, amiben feltételezhetően szerepe van a tenyészpulykaállományok világszerte történő kereskedelmi forgalmának.

A genomszerveződéssel kapcsolatos, feljebb taglalt megfigyelések összhangban vannak a filogenetikai számítások eredményeivel is (5., 6., 7., és 8. ábra). A teljes polimeráz, a teljes és a részleges hexon, valamint a részleges fiber gén alapján készített törzsfákon a TAdV-5-nek a FAdV-1 a legközebbi rokona; mind a négy esetben monofiletikus csoportot képeznek. A TAdV-4 a hexon gén L1 szekvenciáján alapuló számítás szerint a TAdV-2-vel alkot monofiletikus csoportot (7. ábra). Mivel a TAdV-2-nek nem ismert sem a polimeráz,

sem a fiber, sem pedig a teljes hexon szekvenciája, ezért ez a vírus sajnos nem kerülhetett rá ezekre a törzsfákra. A hexon gén L1 szekvenciáján alapuló számítás szerint a TAdV-2 és a TAdV-4 valószínűleg azonos fajba tartozik, de a pontos besoroláshoz szükséges a TAdV-2 teljes genomsekvenciájának ismerete. A teljes polimeráz és hexon gén as sorrendjén alapuló filogenetikai analízisek eredményeképpen a TAdV-4 a FAdV-D és -E fajokkal alkot monofiletikus csoportot, ám az evolúciós távolság a TAdV-4 és az ősiabbnak látszó FAdV-5 között kisebb, mint a TAdV-4 és a FAdV-D és -E fajok tagjai között (5., 6. ábra). A TAdV-4 egyetlen fiber génnel rendelkezik, melynek as sorrendje alapján ismét a FAdV-5-höz áll legközelebb (8. ábra). A 10. ábrán látható, hogy a virális DNS-polimeráz gén 87 as hosszúságú szekvenciáján alapuló törzsfán a pulyka-aviadenovírusok a FAdV-ok között szétszórtan helyezkednek el. Tehát a Galliformes madárrend (melybe a tyúkfélék és a pulykák is tartoznak) aviadenovírusai a koevolúcióra utalóan monofiletikus csoportot képeznek. Azon belül viszont már nem látunk fajok szerinti elkülönülést, tehát a közeli Galliformes fajok között történhetek a régmúltban gazdaváltások is.

A fent ismertetett genomi jellegzetességek, a háziyúktól eltérő gazdafaj, illetve a 3 különböző gén szekvenciáját figyelembe vevő filogenetikai számítások eredményei alapján, mind a TAdV-4, mind pedig a TAdV-5 számára új aviadenovírus faj létrehozását javasoltuk és az ICTV mára hivatalosan is elismeri a két új fajt (Adams et al., 2015). A TAdV-4 ennek megfelelően a *Turkey aviadenovirus C* faj, míg a TAdV-5 a *Turkey aviadenovirus D* faj egyetlen jelenlegi képviselője.

7.2 Galamb-adenovírusok

A hazai galambállományok körében végzett, AdV-ok jelenlétére irányuló szűrővizsgálatunk során rendkívül magas (49,5%-os) pozitivitást tapasztaltunk; a vizsgált 27 tenyészetből származó 97 galambból 48 bizonyult AdV-sal fertőzöttnek. Bizonyítottuk, hogy a már leírt PiAdV-1-nél sokkal gyakrabban előforduló PiAdV típusok is léteznek; két új galamb-aviadenovírus típusra bukkantunk (PiAdV-2 és -3), illetve elsőként sikerült siadenovírusokat is kimutatnunk galambokból, két egymástól eltérő típust (PiAdV-4 és -5).

Eredményeink szerint a galambok AdV fertőzése tehát nagyságrendekkel gyakoribb, mint azt a korábbi molekuláris szűrővizsgálatok eredményei alapján feltételezték. A PiAdV-ok kimutatására tervezett (Raue et al., 2005b) és gyakran használt (Freick et al., 2008; Stenzel et al., 2012) primereket FAdV szekvenciák alapján tervezték és a PiAdV-1 kimutatására alkalmasnak találták. A Raue és munkatársai által a PsAdV-1 kimutatására fejlesztett HexL1-s és HexL1-as (Raue et al., 2005a) primereket az azóta megismert aviadenovírusok szekvenciáinak figyelembe vételével további degenerált bázis pozíciók beiktatásával módosítottuk (6. táblázat). Ez a PCR alkalmasnak bizonyult a PiAdV-1-en kívül az általunk leggyakoribbnak talált PiAdV-2a kimutatására is, ám a többi új vírusból ennek segítségével

nem sikerült hexon szekvenciát felerősíteni. A Mase és munkatársai által a FAdV-ok, a TAdV-3 és a DAdV-1 kimutatására megalkotott HexF1 és HexR1 primerek (Mase et al., 2009), melyeknek elméletben mind a három madarakat fertőző AdV nemzetségen kellene működniük, kizárólag a PiAdV-2a, míg a Meulemans- és Raue-féle primerek (Meulemans et al., 2001; Raue et al., 2005b) csak a PiAdV-1 szakaszait sokszorozták fel (12. táblázat). A PiAdV-1 specifikus kimutatására fejlesztett PCR-rel (Raue et al., 2002) nem végeztünk kísérleteket, mivel a nagyon variábilis fiber gén szekvenciája alapján tervezett primerek valószínűleg nem képesek a PiAdV-1-től nagymértékben különböző vírusok szekvenciáin megtapadni. A galambokban detektált siadenovírusok esetében egy direkt a siadenovírusok kimutatására tervezett PCR-rel (Dospoly et al., 2013) próbáltuk meg a hexon szekvencia kinyerését. Ez csak a gyakoribb típusnál, vagyis a PiAdV-4-nél járt sikerrel, a mindössze egyetlen esetben kimutatott PiAdV-5 hexon szekvenciáját nem voltunk képesek ezzel a módszerrel sem felerősíteni. A hexon régióból mindössze a PiAdV-1, a PiAdV-2a és a PiAdV-4 esetében sikerült szekvenciát kinyerni.

Az eredmények alapján tehát egyik korábban fejlesztett PCR módszer sem alkalmas a PiAdV-ok általános kimutatására, ezek helyett az általános AdV PCR (Wellehan et al., 2004) javasolható. Ezt a PCR-t eredetileg hulló-AdV-ok diagnosztikájára fejlesztették, de mivel a polimeráz gén egy nagyon megőrzött szakaszán tapadnak a primerek, ezért alkalmasnak bizonyult gyakorlatilag minden eddig leírt AdV kimutatására. Eredményeink alapján igaz ez a négy, általunk leírt új PiAdV-ra, valamint a korábban leírt PiAdV-1-re is.

A YPDS-t előidéző kórokozók közül az AdV-okat szinte kizárták, hiszen vagy egyáltalán nem, vagy pedig nagyon kis arányban mutatták ki őket a klinikai tüneteket produkáló példányokból a fent felsorolt PCR módszerekkel (Raue et al., 2005b, Freick et al., 2008). Raue és munkatársai bizonyították, hogy a fő szerepet a circovírusok és a másodlagos fertőzést okozó *Escherichia coli* baktériumok játsszák a YPDS-ben (Raue et al., 2005b), ám eredményeink alapján az AdV-ok is nagyon gyakran kimutathatóak az ebben a betegségben szenvedő galambokból. A galambok circovírus fertőzöttségét munkám során magam is vizsgáltam és a PCR-es szűrővizsgálatok eredményéből arra a következtetésre jutottunk, hogy gyakorlatilag az összes AdV-ra vizsgált állomány circovírussal is fertőzött. Feltehetően azért is találtunk kiugróan magas AdV pozitivitást, mert a jelenlévő circovírusok az állományok egyedeire immunosuppresszív hatással voltak, így fogékonyá téve őket a másodlagos fertőzésekre.

Harminchárom galamb esetében több szervből (májból, tüdőből, bélből és veséből) vettünk mintát, melyeket külön vizsgáltunk annak érdekében, hogy a PiAdV-ok szerv tropizmusáról nyerjünk adatokat. Feltételezzük, hogy az egyes PiAdV típusok – más AdV típusokhoz hasonlóan – eltérő hatékonysággal képesek a különböző szervekben, sejttípusokban replikálódni. A PiAdV-1, -3, és -5 esetében tapasztalható alacsony esetszám

miatt adatsorunk statisztikai analízisre még nem alkalmas, de a 11. táblázatban látható eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a mintavételi forrásként használt szervnek a diagnózis kimenetele szempontjából nagy jelentősége van. Mivel baromfi-AdV-ok gyakran okoznak hepatitist, elhalásos májgyulladást, ezért legtöbbször a májból vesznek mintát molekuláris vizsgálatok céljából is. Eredményeink alapján azonban a tüdő és a vese alkalmasabb mintavételi forrásnak tűnik a PiAdV-ok kimutatása szempontjából, különösen a siadenovírusal fertőzött galambok esetében.

Érdeemes megemlíteni, hogy egészséges példányok ürülék mintáit vizsgálva nagy arányban (52,9%) találtunk vírus-ürítő egyedeket. Ezek a galambok olyan állományokból származtak, ahol korábban YPDS-szerű megbetegedésben az állomány fiatal galambjainak egy része elhullott. Az AdV-ok általában perzisztens fertőzést okoznak, de a vírusürítés nem folyamatos, így a fertőzött példányok is produkálhatnak hamis negatív PCR eredményt. Különböző stressz faktorok, mint a zsúfoltság, szállítás, és a versenygalambok esetében a röptetés, vagy más kórokozók, mint például a galamb-circovírus hatására azonban az AdV fertőzés újra aktívvá válhat és az AdV-ok PCR-es kimutatása ezáltal újból lehetővé válik.

Az általános AdV PCR segítségével felerősített ~300 bp-os szakasz a DNS-függő DNS-polimeráz génből összehasonlító elemzésekre is alkalmas, hiszen ez a szekvencia részlet ismert a legtöbb publikált AdV-ból (Wellehan et al., 2004; Kaján et al., 2011; Vidovszky et al., 2015). A polimeráz gén részleges szekvenciája alapján végzett filogenetikai vizsgálatok eredménye szerint a PiAdV-2 és -3 az *Aviadenovirus* nemzetséghez tartozik, míg a PiAdV-4 és -5 a *Siadenovirus* nemzetség tagja (10. ábra). Atadenovírusokat galambokban nem találtunk. Nemrégiben metagenomikai elemzések során galamb ürülékben mások is leírták avi- és siadenovírusok jelenlétét (Phan et al., 2013), azonban ezekből a vírusokból egyáltalán nem közöltek szekvencia adatokat, így ezekkel nem tudtuk az általunk kimutatott AdV-okat összehasonlítani. A DNS-polimeráz gén 87 as hosszú szakasza alapján készített törzsfán a PiAdV-1, -2 és -3 monofiletikus csoportot alkot, ami a galambokkal való koevolúciójukra utal (10. ábra). A galamb-aviadenovírusok monofiletikus csoportja a FAdV-októl nagy evolúciós távolságra található, továbbá galambokban molekuláris módszerrel egyetlen FAdV-t sem mutattunk ki és tudomásunk szerint más kutatócsoportok sem. Ez arra utalhat, hogy a korábban csirke eredetű sejteken, galamb mintákból izolált FAdV-ok (McFerran et al., 1976; Hess et al., 1998b) az elszaporításra használt primer sejtekből származó kontaminációk lehettek. A törzsfán megfigyelhető ághosszúságok szerint a PiAdV-1, -2 és -3 olyan nagy filogenetikai távolságra van egymástól, hogy minden bizonnyal nem lesznek besorolhatók a PiAdV-1 számára alapított PiAdV-A fajba, hanem külön fajként kell majd kezelniük őket. A galamb-siadenovírusok nagy filogenetikai távolságra vannak egymástól, ami arra utal, hogy gazdaváltással kerülhettek a galambokra két egymástól független lépésben. Eszerint a PiAdV-4-et és a PiAdV-5-öt két külön fajhoz kellene sorolni.

További következtetések levonásához, illetve a vírusfajok hivatalos, ICTV által történő bejegyzéséhez azonban az újonnan leírt vírusok teljes genom szekvenciáira lenne szükség.

Az általunk kimutatott leggyakoribb variánst, a PiAdV-2a-t dr. Kecskeméti Sándor laboratóriuma kísérlete meg csirke embrió májsejteken izolálni, de nem jártak sikerrel, így az új generációs szekvenálási módszerek használatára nem nyílt lehetőségünk. A PiAdV-2a genomjából egy egybefüggő 31.314 bp hosszú szakasz bázissorrendjét sikerült meghatároznunk a primer-sétálás módszerével. A genom G+C tartalma kiegyensúlyozottnak mondható, 48,85%. Ez arra utalhat, hogy a PiAdV-2a régóta a mai gazdájával, vagyis a galambbal fejlődik együtt. Az első ORF, melynek második exonja teljes hosszában megtalálható volt, az ORF1A. Ez a gén az aviadenovírusok többségéhez hasonlóan itt is csökevényes. Az ORF1C-nek megfelelő homológ ORF-et nem találtunk. Megjegyzendő, hogy a PiAdV-1 esetében az ORF1A, -B és -C is hiányzik. Ez a megfigyelés is alátámasztja a TAdV-okat tárgyaló fejezetben leírt feltételezést, miszerint ezek a gének ma már nem bírnak nélkülözhetetlen funkcióval, ezért egyes vírusokban teljesen eltűntek, másokban pedig még jelen vannak, de csak csökevényes formában. A PiAdV-2a genom középső régiója megőrzött, az AdV-okra jellemző gének a megszokott sorrendben követik egymást. Megjegyzendő, hogy a PiAdV-2a génjeinek hosszát a PiAdV-1 génhosszaival összevetve arra a következtetésre jutottunk, hogy a PiAdV-2a majdnem minden génje rövidebb; ez a különbség néhol a 10%-ot is eléri. Ez alól csak az ORF13 és a pVIII prekursor proteint kódoló gén a kivétel, melyek hossza teljesen megegyezik a PiAdV-1 genomjában megfigyelt méretekkel. Sajnos ennek a jelenségnek nem bukkantunk a magyarázatára az irodalomban. Nem tudjuk, hogy a PiAdV-2a génjei rövidültek-e meg, vagy a PiAdV-1 génjei lettek-e hosszabbak az evolúció során. A vírus számára talán előnyös lehet, ha rövidebb genommal rendelkezik, hiszen ez könnyebben pakolódhat be a virionba.

A PiAdV-2a genomjában két fiber gén kódolt, melyeknek részletes elemzését a következő fejezetben tárgyaljuk. A teljes polimeráz, valamint a teljes és részleges hexon gén as szekvenciáját figyelembe vevő filogenetikai számítások alapján a PiAdV-2a legközelebbi rokona a PiAdV-1 (5., 6. és 7. ábra), mely tovább erősíti a galamb eredetű AdV-k közös származását és a tyúkalakúak rendjébe tartozó madarakkal együtt fejlődött AdV-októl való korábbi elválást. Habár a genom szekvencia még nem teljes hosszúságú, de így is találtunk genom szerveződési különbségeket és ismerjük a teljes DNS-polimeráz gént, mely az egyik alapja a fajok elkülönítésének, így javasolni lehetne az ICTV számára a *Pigeon aviadenovirus B* faj megalapítását a PiAdV-2a számára.

7.3 A madár-adenovírus fiber gének jellemzése

A teljes genomi szinten tanulmányozott TAdV-4 esetében egy fiber gént, míg a TAdV-5 genomjában kettőt, egy hosszabbat (fiber-1) és egy rövidebbet (fiber-2) találtunk. Ezeknek

a fehérjéknek minden doménje azonosítható volt az as szekvencia megőrzött motívumai alapján.

A PiAdV-2a genomjában két fiber génre bukkantunk, ám közülünk az első nagyon rövid, mindössze a fark és a nyél régió egy részének megőrzött as motívumai lelhetők fel az as szekvenciában. Ugyanez figyelhető meg a korábban leírt PiAdV-1 fiberei esetében is, ahol a fiber-1 feji régiója szintén hiányzik, míg a fiber-2 teljes hosszúságú. A 11. ábrán a PiAdV-2a szekvenciájában látható, hogy a nyél jellegzetes, ismétlődő régiója egyszerre csak véget ér. Ezt a szakaszt egy új PCR során felerősítettük és újra szekvenáltuk, hogy a szekvenálási hiba lehetőségét kizárjuk. További megerősítésként szolgál, hogy a PiAdV-1 esetében látszólag ugyanebben a régióban történhetett egy mutáció, és ennek következtében leolvasási keret eltolódás, mert ettől a ponttól kezdve a következő szakasz láthatóan semmilyen homológiát nem mutat a többi vírus fiberével. Ezt a ~100 as hosszúságú szakaszt a Muscle programmal történő illesztést követően manuálisan is próbáltuk „helyére illeszteni”, de sem a nyél további részében, sem pedig a feji doménben nem találtunk ehhez a szakaszhoz hasonló szekvenciát, holott a többi aviadenovírus szekvenciájában a feji domén is tartalmaz megőrzöttebb, minden vírusban fellelhető motívumokat. A PiAdV-1 esetében vagy egy nagyon érdekes, a többi aviadenovírus fiber feji doménjével semmilyen homológiát nem mutató, ám mégis feji alegységként működő fehérjerészről van szó, vagy pedig egy leolvasási keret eltolódás miatt keletkezett értelmetlen, funkcióképtelen szakaszról. A fiber legfontosabb feladatát, vagyis a gazdasejthez történő elsődleges kapcsolódást a feji alegység látja el. Feltételezzük, hogy ilyen súlyos hiányossággal, mely a PiAdV-ok első fiberei esetében megfigyelhető, ezek már nem funkcionáló fiber gének maradványai lehetnek, amelyek eltűnőben vannak a genomból.

Az aviadenovírusok fiber génjével végrehajtott filogenetikai számításokat a PiAdV-1 és a PiAdV-2a csökevényes, első fiberei miatt csak a fehérjék farki és részleges nyél régiójának származtatott, 165 as hosszú szekvenciája alapján végezhetjük el (8. ábra). A számítások eredményei alapján arra következtettünk, hogy a két fiber gén jelenléte egy genomon belül nem egy mostában lezajlott, egyszerű duplikálódás következménye, hanem ezek a gének eltérő eredetűek lehetnek; az egyik fiber gént valamilyen más AdV genomjából vehette fel egy ősi aviadenovírus. Azon vírusok fiberei, amelyek egyetlen fiber génnel rendelkeznek a két fiber génnel rendelkező vírusok fiber-2-jével mutatnak nagyobb hasonlóságot és velük alkotnak monofiletikus csoportot. Elképzelhető, hogy a ma egyetlen fiber génnel rendelkező aviadenovírusok genomja is két fiber gént kódolt valaha, az egyiket azonban az evolúció során elveszíthették és ma már csak egy fiber génnel rendelkeznek. A filogenetikai számítások eredményei szerint az elveszett gén a fiber-1 lehetett, ami összhangban van a PiAdV-okban megfigyelt jelenséggel, ahol a fiber-1 mára szintén elveszthette funkcióját, ezért csökevényes. Ezt az elméletet támogatja, hogy a FAdV-1

egyes- és kettes-számú fibereit vizsgálva Tan és munkatársai (2001) arra a következtetésre jutottak, hogy a két fiber közül a kettes-számú az, amely nélkülözhetetlen a vírus számára. A fiber-2 mutációval történő működésképtelenné tétele következtében egyáltalán nem keletkeztek életképes virionok, vagyis a fiber-2 gén kiütése végzetes a FAdV-1 számára. A fiber-1 kiiktatása esetében azonban kaptak életképes FAdV-1 virionokat sőt, az így létrejött vírus képes volt a csirke sejtekbe belépni. Ezzel ellentétben az emlős sejtek megfertőzése, mely a vad típusú FAdV-1 esetében a CAR receptoron keresztül történne, sikertelen volt. Tehát a FAdV-1 fiber-1 génje nélkülözhető a vírus számára és a fiber-2, mely valószínűleg egyedi, madár sejteken található receptorokhoz kötődik, önmagában is elég a vírus szaporodásához (Tan et al., 2001).

A TAdV-1 esetében is megfigyelték az egyik fiber gén degenerációját (Kaján et al., 2010), ám ott a fiber-2 gént szakítja meg egy leolvasási keret eltolódást okozó mutáció, vagyis teljes és funkcióképes fehérje valószínűleg csak a fiber-1 génjéről keletkezik. Ez a kereltolódás azonban egyetlen nt-többletnek az eredménye, nem pedig egy egész génszakasz eltűnéséről van szó, mint ahogyan a galamb fiberek esetében látjuk. A TAdV-1 fiber-2 génjében történt pontmutáció egy evolúciós értelemben nagyon új keletű esemény lehet. Ha bioinformatikai módszerrel ezt az egy mutációt „kiküszöböljük”, akkor visszanyerjük a teljes, kereltolódás nélküli, mindhárom alegységet tartalmazó fiber gént. Az is lehetséges, hogy a vírus szaporítása során, a homogén sejt kultúrán a TAdV-1-nek egyszerűen nem volt szüksége a fiber-2 fehérjére, mert az adott sejtfeleséghez csak a fiber-1-gyel kapcsolódott és néhány passzázs után a fiber-2 génszakaszban keletkezett véletlen mutációra nem nehezedett szelekciós nyomás, így az fennmaradhatott. Hasonlót figyeltek meg a murin AdV-3 esetében, ahol a sejt kultúrában felszaporított vírus E1B 19K génjében bekövetkezett mutáció a vírus nem-izolált, terepi mintából származó változatában még nem volt jelen (Hemmi et al., 2011). Az itt említett két esetet, vagyis a homogén sejt kultúrán való szaporítás hatására bekövetkezett pontmutációkat és gének kiesését kísérletesen nem bizonyították. Az általunk szekvenált PiAdV-2a-t sejttenyészetben nem szaporítottuk, ezért ebben az esetben kizárható, hogy a vírusnak a homogén sejt kultúrához való, több passzázsra át történő adaptációja miatt veszett volna el a fiber-1 nyél- és feji régiója. A PiAdV-1-et, bár ilyen módon, primer csirke sejteken izolálták, de a PiAdV-2a-hoz nagyon hasonló jelenség miatt ennél a vírussal is kizárhatjuk, hogy a fiber-1 gén a passzázsok során csonkult volna mutációk, majd deléción eredményeként.

7.4 A madár-adenovírusok diverzitása

A madarakban kimutatott AdV-ok többsége az *Aviadenovirus* nemzetséghez tartozik, ám az utóbbi évtizedben a siadenovírusok listája is jelentősen gyarapodott madaraktól azonosított típusokkal (Park et al., 2012; Lee et al., 2016). Legkevesebb leírt madár-AdV az *Atadenovirus* nemzetségből ismert (To et al., 2014).

A magyar és közép-európai faunában megtalálható, valamint az állatkertekben és magántenyészetekben fogva tartott egzotikus madarak széles körű, összesen 131 fajra és 673 egyedre kiterjedő szűrővizsgálata során eddig más gazdaállat csoportokban nem tapasztalt 19%-os AdV pozitivitást állapítottunk meg. A példányszám az egyes fajokon belül nem egyenletesen oszlott meg, legnagyobb (20 egyed fölötti) mintaelemszámmal a fehér gólyák, a vörös vércsék, a sirályfélék, a struccok, a zebrapintyek, valamint a hullámos és nimfapapagájok esetében dolgoztunk, mivel ezekből a fajokból jutottunk a legtöbb vizsgálati anyaghoz. Munkánk során megtöbbszöröztük a madaraktól ismert AdV típusok számát. Aviadenovírusokból (beleértve az új PiAdV és TAdV típusokat is) 33, siadenovírusokból (szintén beleértve a két új PiAdV típust) 21, míg atadenovírusokból 8 új típust írtunk le, de egy új képviselővel a mastadenovírusok nemzetségét is gyarapítottuk.

A DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges, 87 as hosszú szekvenciáján alapuló törzsfán a madarakban előforduló 3 AdV nemzetség, vagyis az avi-, a si- és az atadenovírusok tagjai tökéletesen elkülönülnek egymástól (10. ábra). A fára az összes eddig közölt, madaraktól származó és külön típusnak vehető AdV felkerült — így a házi szárnyasokból, illetve a galambokból kimutatott AdV-ok is — annak érdekében, hogy átfogó képet kapjunk a madarak AdV-ainak diverzitásáról és evolúciójáról. Az általunk kimutatott vírusok közül egy fácánból származó aviadenovírusnak nem volt teljes a szekvenciája, ezért ez nem kerülhetett be a filogenetikai számításba. Sajnos a rövid polimeráz gén szekvencia nem teszi lehetővé a modernebb algoritmusokat használó Bayesian, vagy legnagyobb valószínűségen alapuló módszerek használatát, illetve a távolsági mátrix alapú fa sem teljesen megbízható a kapott alacsony bootstrap értékek alapján. A madarakban fellelhető AdV-ok diverzitását és nemzetségekhez való tartozását azonban ez a kép is hűen szemlélteti. A későbbiekben, ha ezekből a vírusokból elérhető lesz a teljes polimeráz, vagy a teljes hexon gén szekvencia, sokkal pontosabb képet kaphatunk a vírusok leszármazási viszonyairól.

Vad- és egzotikus madaraktól leggyakrabban, 60 esetben, aviadenovírusokat mutattunk ki, tehát volt olyan vírus típus, melyet egyazon faj több egyedében is megtaláltunk. Az *Aviadenovirus* nemzetség kizárólag madár eredetű AdV-okat foglal magába. Ez az a génusz, amely valószínűleg együtt fejlődött a madarakkal, és amelyben legjobban tetten érhető a koevolúció a gazdafaj és AdV-ai között, habár itt sem tökéletesen. Az

aviadenovírusok gazdafaj-specifitása erős, az egyes aviadenovírus típusok csak egyféle madárfajban fordulnak elő. Erre egy kivételt találunk a törzsfán, ahol egy jégmadárból és egy fakuszból ugyanazt a vírust mutattuk ki. Ez az egybeesés nagy valószínűséggel kontamináció eredménye lehet. Az ürülék mintákat sorszámuk alapján közvetlenül egymás után gyűjtötték a terepi madarászok, így történhetett meg a minták beszenyeződése. Mivel azonban nem tudjuk, hogy melyik madár mintájában volt eredetileg jelen a vírus, ezért mindkét fajt feltüntettük.

A tyúkfélék aviadenovírusai, melybe a FAdV-ok, a TAdV-ok és a fácánból kimutatott vírusok tartoznak, jól elkülönülő, monofiletikus csoportot alkotnak, ám a csoporton belül a gazdafajok különböző vírusai már keverten fordulnak elő. Ennek ellenére a tyúkok aviadenovírusait soha nem mutatták ki pulykákban és ez fordítva is igaz, tehát az aviadenovírusokra valószínűleg nem jellemző a fajhatár átlépése. Az ebbe a monofiletikus csoportba keveredő, ragadozó életmódot folytató egerészölyvből és erdei fülesbaglyokból kimutatott aviadenovírusokat mind sérült, fogságban tartott és napos csibével táplált egyedekből azonosítottuk, így valószínűleg a táplálékállataik vírusait detektáltuk.

A lilealakúak (Charadriiformes) rendjébe tartozó sirályfélékben rendkívüli aviadenovírus-diverzitást tártunk fel, összesen 10 típust különböztettünk meg három fajban, danka-, sárgalábú és szerecsensirályban. Megállapítottuk, hogy a tyúkokhoz hasonlóan a sirályfélékben is előfordulhat egy gazdafajban több különböző AdV típus is. A sirály-AdV-ok azonban, a FAdV-okkal ellentétben, nem alkotnak monofiletikus ágat a törzsfán, sőt, egymástól nagy filogenetikai távolságra helyezkednek el, három csoportban. Sárgalábú sirályokban ötféle aviadenovírust mutattunk ki, melyek közül az egyik a Hollandiában, ezüstsirályban (*Larus argentatus*) és heringsirályban (*Larus fuscus*) leírt sirály-AdV-1 (Bodewes et al., 2013) legközelebbi rokonaként tűnik fel a törzsfán. A sirály-AdV-ok nagy diverzitásának magyarázata lehet, hogy ezek a madárfajok közös fészektelepeken költenek, egymástól mindössze néhány méternyi távolságra; sokszor egy behatárolt szigeten több száz, vagy ezer pár is élhet. Ezek a telepek kiváló lehetőséget kínálnak a kórokozók terjedésének. Azon kívül a sirályfélék, bár nem vonuló madarak, a költési időszakon kívül, több ezer km-es is távolságokra elkóborolnak, elősegítve az egyes madár-populációk között a különböző vírus típusok kicserélődését. Színes jelölőgyűrűvel, illetve rádióadóval ellátott sirályok mozgásáról részletes adatok érhetők el például az alábbi honlapon: <http://www.euring.org/research>. A sárgalábú sirályok mindegyike Horvátországból, a szerecsensirályok Magyarországról származtak, míg a dankasirályok vegyesen a két országból. A mintagyűjtés helyszínén a madarak klinikai tüneteket nem mutattak és onnét később sem jelentettek tömeges pusztulást. Feltételezzük, hogy ezek a vírusok nem okoznak megbetegedést, illetve immunszuppressziót az egyébként egészséges gazdáikban.

A verébalakúak rendjébe tartozó madarak aviadenovírusai egy népesebb és egy kisebb, mindössze 2 vírust számláló csoportba tömörülnek. A harkály- (Piciformes), a galamb- (Columbiformes), a lúd- (Anseriformes) és a szulaalakúak (Suliformes) AdV-ai, melyek a PiAdV-ok kivételével mind csak 2-2 típussal képviseltetik magukat a törzsfán, szintén különálló monofiletikus ágakat képviselnek, támogatva a koevolúciós hipotézist. Azok a rendek, amikben mindössze egy-egy aviadenovírust mutattunk ki, vagy mutattak ki korábban mások, mint például a gödényalakúak (Pelecaniformes; bakcsó), a papagájalakúak (Psittaciformes; Meyer papagáj), vagy a nevével ellentétben a valódi fecskeféléktől (Hirundinidae) nagyon távol álló sarlósfecske-alakúak (Apodiformes; sarlósfecske) általában egyesével, különálló ágon helyezkednek el. Ez alól kivételt képez a lappantyú-AdV, mely a vörös vércséből 14 esetben kimutatott aviadenovírossal alkot csoportot. Ezek az egyesével álló ágak akkor szolgálhatnak további információval, ha rokon madárfajokból, vagyis a lappantyúalakúakból, a papagájalakúakból, a sarlósfecske-alakúakból, illetve a gödényalakúakból, ezen belül gémfélékből (Ardeidae) is sikerülne AdV-okat kimutatni.

A vörös vércsékben kétféle aviadenovírust is találtunk, melyek egymástól távol esnek a törzsfán. A gyakoribb vírust a 3 elhullott mellett, 11 egészséges példányból vett kloaka tampon mintában is kimutattuk, ezért feltételezzük, hogy ez a vírus nem okoz megbetegedést, a gazdafajhoz jól adaptálódott, vele együtt fejlődő vírusról van szó. Az M151-es azonosító számmal ellátott vörös vércsében avi- és siadenovírus kettős fertőzést találtunk, mely bizonyítja, hogy egy példány egyszerre többféle, akár eltérő nemzetségekhez tartozó AdV-sal is fertőzött lehet.

A vad- és egzotikus madarak körében végzett szűrővizsgálat eredményeként 19 új siadenovírus típust írtunk le, melyhez még hozzászámolandó a galambokban talált PiAdV-4 és -5. Munkánknak köszönhetően a *Siadenovirus* nemzetség tagjainak száma a 10 leírt típusról így 31-re emelkedett (a PiAdV-4 és -5-öt is beleértve). A csoportban a béka-AdV-1 és a Sulawesi teknős AdV-1 kivételével minden vírust madaraktól írtak le. Korábban a siadenovírusok eredeti gazdáinak a kétélűeket gondolták, de ez az elmélet megdőlt, mivel további vírusokat nem sikerült leírni ebből az állatcsoportból. A 10. ábrán látható törzsfá alapján elmondható, hogy a *Siadenovirus* nemzetség határozottan elkülönül a többi gúnusztól, azonban a nemzetségen belül sokkal kevésbé figyelhető meg a vírusok gazdafajok szerinti csoportosulása, mint azt az aviadenovírusoknál láthattuk. Az énekesmadarak siadenovírusainak többsége egy monofiletikus csoportot alkot, bár ebbe a csoportba is keveredik egy vírus, melyet egy, a szalakótaalakúak (Coraciiformes) közé tartozó madárfajból, gyurgyalagból mutattunk ki. Egy kisebb létszámú, nagyobb filogenetikai távolságra található, mindössze Gould amandina pinty és a kék cinege siadenovírusát tartalmazó csoport is látható a fán. A Gould amandina pinty új siadenovírusát velünk párhuzamosan egy amerikai kutatócsoport is kimutatta egy azonos fajú egyedben, melynek

nt szekvenciája a vizsgált 272 bp hosszú polimeráz gén szakaszon 100%-ban megegyezett a miénkkel. A részleges polimeráz, a pTP, az 52K és a hexon szakaszok szekvenciáit kielemezve nagyon alacsony, 34,7% G+C arányt állapítottunk meg, mely a *Siadenovirus* nemzetségben megszokott és evolúciós értelemben vett nem túl régi gazdaváltási eseményre utal. Az amerikai kutatócsoport az elhullott pinty szövettani vizsgálatai során bazofil sejtmagzárványokat írt le a vesében, majd ezeket elektronmikroszkóppal tovább vizsgálva az AdV-okra jellemző, ikozahedrális virionokat találtak. A magyarországi 5 példány közül csak 3 hullott el, a másik két példány klinikai tüneteket nem mutatott. Valószínűnek tartjuk, hogy ez a vírus patogén, azonban önmagában, más kórokozók jelenléte nélkül, egészséges gazdában nem feltétlenül okoz elhullást. Széncinegében kétféle siadenovírust mutattunk ki, melyek közül az egyik nt szinten megegyezett a korábban közölt széncinege-AdV-1-gyel (GTAdV-1). A másik vírus is nagyon közel található a törzsfán a GTAdV-1-hez és bár ez a rövid szekvencia részlet ennek eldöntésére nem elég, valószínűleg ezt a vírust is a *Great tit Siadenovirus A* fajba lehet majd sorolni.

További kisebb egybetartozó csoportot alkotnak a ragadozó madarakból kimutatott siadenovírusok, azonban itt is találunk egy, a csoporttól távol eső, vörös vércséből kimutatott típust. Egy másik vörös vércsében és egy egerészölyvben is szinten tökéletesen megegyező, ám nt szinten 5,9% eltérést mutató siadenovírust detektáltunk. Mindkét egyed sérült, a Hortobágyi Madárkórházban ápolt példány volt. Az ebbe a nemzetségbe tartozó THEV és a RAdV-1 esetében megfigyelték, hogy, többféle, akár egymással távoli rokon fajok megbetegítésére is képesek. A RAdV-1 két bagolyfajban, illetve egy ölyvfélében (Zsivanovits et al., 2006), míg a THEV különböző tyúkfélékben (házityúkban, fácánban és pulykában) okoz megbetegedést, illetve elhullást (Domermuth et al., 1979; Palya et al., 2007; Benkő, 2015). A fenti adatok arra utalnak, hogy a siadenovírusok általában patogénebbek és könnyebben lépik át a fajhatárt, mint az aviadenovírusok, így elképzelhetőnek tartjuk, hogy a vércse és az ölyv esetében is ez történhetett, vagyis a fogva tartott, legyengült madarak a kórházi környezetben egyszerűen átadták egymásnak a vírust. Ennek viszont ellentmond a vírusok szekvenciájában található 16 nt különbség, ami egy korábbi gazdaváltásra enged következtetni. A THEV esetében megfigyelhető, hogy a földrajzilag egymástól távol eső és különböző fajokból izolált törzsek is viszonylag homogének, vagyis kevés szekvenciabeli eltérést lehet felfedezni köztük.

A siadenovírusok fajhatár-átlépésének elméletét további eredményekkel mi is alátámasztottuk. Elsőként mutattuk ki a THEV-t házi baromfitól eltérő gazdafajban, egy fehér gólyában. A szintén a *Siadenovirus* nemzetségbe tartozó PsAdV-2-t az Egyesült Államokban leírt két gazdafajon túl mi további öt különböző faj 7 egyedében, nevezetesen hullámos, nimfa-, rozella-, kecske- és fénypapagájban is kimutattuk. A kecskepapagáj kivételével minden egyed egy tenyésztőből származott és mind vese- és emésztő-szervrendszeri

megbetegedésben pusztult el. A felsorolt fajok közül korábban egyikben sem írták még le a PsAdV-2 előfordulását. Papagájfélékben két további siadenovírus típust is találtunk, melyek közül a sziklapapagájban kimutatott esik közelebb a PsAdV-2-höz, míg az énekes papagájban detektált vírus ezekről távolabbi ágon helyezkedik el.

A további, fentiek közt nem említett, tarvarjúban, kis pólingban, vándorsólyomban, bütykös hattyúban, sárgalábú sirályban, erdei szalonkában, ezüstarcú szarvascsőrű madárban, valamint a korábban mások által délsarki halfarkasban és állszíjas pingvinben kimutatott siadenovírusok arra utalnak, hogy ez a vírus nemzetség a madarak nagyon széles körében előfordul, bár gyakoriságuk nem olyan magas, mint az aviadenovírusoké. Vizsgálatunk során arra a következtetésre jutottunk, hogy a siadenovírusok sokkal kevésbé mutatnak koevolúciót a gazdával, mint az aviadenovírusok, vagyis a madarakban talált siadenovírusok valószínűleg több, egymástól független gazdaváltási esemény következtében kerülhettek át mai gazdáikra. Ezt a magas patogenitás és a leírt genomok alacsony G+C tartalma is alátámasztja (Park et al., 2012; Lee et al., 2016). A siadenovírusok eredete máig ismeretlen, ám feltételezzük, hogy a valódi gazdák nem a madarak lehettek.

Az atadenovírusok nemzetségébe tartozó kórózdó, pikkelyes hüllő és madár eredetű AdV-ok majdnem tökéletesen elkülönülnek, három monofiletikus csoportot alkotva (10. ábra). Ez alól a PsAdV-3 és a vele egy ágon elhelyezkedő, általunk szintén papagájból kimutatott típus képez kivételt, melyek egy nagyon ősi leszármazási vonalnak tűnő csoportot alkotnak. Ezt a papagájfélékre való átlépést mindenképpen egy külön gazdaváltási lépésnek véljük. A madarak atadenovírus csoportjában, az EDSV-vel közös ágon találjuk az általunk kimutatott énekesmadarakat és struccot fertőző vírusokat.

Fehér gólyák egészséges, fiatal egyedinek kloaka tampon mintáiban kétféle atadenovírus jelenlétét bizonyítottuk. A házi baromfifélékben leírt EDSV jelenléte ebben a fajban és más vízimadarakban sem ismeretlen, a 80'-as években szerológiai vizsgálatok alapján ezekről már tettek említést (Bartha et al., 1982; Smyth és McFerran, 1989), ám ezt molekuláris módszerekkel eddig még nem bizonyították. Az EDSV az erősen patogén AdV-ok közé tartozik, és mint ilyen, a fajhatárt is könnyen átlépi, tehát nem tartjuk kizártnak, hogy a fehér gólyában is képes szaporodni és nem csak transziens vírusként volt jelen a gólyában. A másik elméletünk szerint az EDSV táplálék eredetű is lehet a fehér gólyában. Ezt az elméletet támogatja az a tény, a vírust egészséges gólya fióka kloaka tampon mintáiban mutattuk ki. Hasonlóan táplálék állat elmélettel magyarázható a fehér gólyában kimutatott, M126-os iktatószámmal jelzett új atadenovírus filogenetikai pozíciója is, mely a törzsfán egyértelműen a hüllők atadenovírusai közé esik. Ez mondható el a bakcsóban talált atadenovírusról is, mely szintén a hüllő eredetű atadenovírusokkal csoportosul. Mind a fehér gólya, mind a bakcsó fő táplálékforrásai hüllők. Az M126-os számmal jelzett fehér gólyából és a bakcsóból kimutatott vírusokat tehát hüllő-atadenovírusként kezeljük. A talált vírusokkal

teljesen megegyező vírusokat még nem közöltek ugyan, de a hazai hulló fauna AdV fertőzöttségéről csak korlátozott adatmennyiséggel rendelkezünk.

Az atadenovírusok tehát a madarak csak egy korlátozott csoportjában lelhetők fel, ami arra enged következtetni, hogy a valószínűleg pikkelyes hulló eredetű atadenovírusok csak később és nem minden madárcsoportra ugrottak át. Felmérésünk kezdetekor az EDSV-n kívül atadenovírusokat csak énekesmadarakban, a madarak legfiatalabb és egyben legfajgazdagabb fejlődési ágában találtunk. Ezért azt feltételeztük, hogy az atadenovírusok csak akkor léptek át az énekesmadarakba, mikor ez az ág már levált a többi madárvonaltól. Ezt az elméletet megkérdőjelezték további eredményeink, mint például a strucc-AdV megtalálása. A strucc a futómadár-szabásúak (*Paleognathae*) öregrendjének, a ma élő madarak legősibb csoportjának a tagja. Ez arra utalhatna, hogy az atadenovírusok már nagyon korán átkerülhettek a madarakra, azonban ezen az egy eseten kívül más ennyire ősi madár-atadenovírust nem ismerünk és a papagájokon, valamint a kacsza és tyúkféléken kívül más madárcsoportból sem írtak le atadenovírusokat. Amennyiben a struccban már régóta jelen lenne és az *Atadenovirus* nemzetség egyszeri átlépést követően és a madarakkal együtt fejlődött volna az evolúció során, akkor sokkal több madár taxon példányaiban meg kellene, hogy találjuk ennek a génusznak a képviselőit. Elméletünk szerint ezért az atadenovírusok evolúciós értelemben csak később ugorhattak át a madarakra és azoknak nem is minden fejlődési ágára, csak, valószínűleg több lépésben, a strucc-, a papagáj- és a verébalakúak rendjére, valamint a lúd- és tyúkalakúakat magában foglaló Galloanserae öregrendjére. Ezt az elméletet természetesen további atadenovírusok felfedezése még módosíthatja, mint ahogyan a korábbi hipotézisünket is továbbfejlesztettük mára, de a jelenlegi eredmények alapján ez tűnik legvalószínűbbnek.

Táplálékállat-eredettel magyaráztuk az egy fészekaljhoz tartozó vörös vércsék 5 egyedének kloaka tampon mintájában kimutatott mastadenovírus jelenlétét. Az új vírus egy törzsfán a rágcsálók AdV-aihoz esik közel (ezt a fát nem mutatjuk a dolgozatban, mert laboratóriumunk munkatársai által még nem publikált típusokat tartalmaz). A vércseszülők a zsákmányt – mely általában valamilyen rágcsáló – a fészekbe érkezve tépik szét és osztják el a fiókáik között, ezért fordulhat elő, hogy mind az 5 fiatal madárban kimutattuk ugyanazt a mastadenovírust. Több bizonyítékunk is van tehát arra, hogy az AdV-ok nukleinsav-maradványai a tápcsatornán áthaladva is viszonylag épek maradnak, ami megzavarhatja az adott madárfaj ürülékének PCR-rel történő szűrővizsgálatát. Ez főként a ragadozó-, más madarakkal és kisméltősökkel táplálkozó, valamint a hullókat is fogyasztó gázlómadárfajok esetén jelent problémát, ezeknél tehát a kimutatott AdV-ok valódi eredetét fenntartásokkal érdemes kezelni.

Széles körben végzett szűrővizsgálatunk megmutatta, hogy a madarak, melyek a gerincesek közül a második legnépesebb osztályt alkotják közel tízezer fajjal, szinte

kimeríthetetlen tárházai az új AdV-ok felfedezésének. Habár a kapott adatok értelmezése a rendelkezésre álló rövid szekvencia részletek miatt egyelőre nagy kihívást jelent, azt eredményeink alapján mégis megállapíthatjuk, hogy a madár-AdV-ok diverzitása lenyűgöző mértékű és még ezek a rövid szakaszok is segítik az AdV-ok törzspejlődésének felderítését. A feltételezett gazdaváltások arra is figyelmeztetnek, hogy a jövőben nem zárható ki újabb, a vadmadarokról baromfira történő AdV-átugrás, majd az új gazdában pusztulásokat okozó járványok kialakulása.

8. Új tudományos eredmények

1. Együtműködésben meghatároztuk és elemeztük a pulyka-adenovírus 4 és a pulyka-adenovírus 5 teljes genomszekvenciáját, valamint filogenetikai helyzetét.
2. Megállapítottuk, hogy a hazai posta- és díszgalamb állományokban az adenovírus pozitívitas majdnem eléri az 50%-ot.
3. Bizonyítottuk, hogy a már leírt galamb adenovírus 1-nél sokkal gyakrabban előforduló galamb-adenovírusok is léteznek; két új galamb-aviadenovírus típusra bukkantunk (PiAdV-2 és -3), illetve elsőként sikerült siadenovírusokat is kimutatnunk galambokból, két egymástól eltérő típust (PiAdV-4 és -5).
4. Meghatároztuk és elemeztük a galamb-adenovírus 2a variáns genomszekvenciájának kétharmad részét.
5. Madár-aviadenovírusok fiber génjeit tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy a jelenlegi aviadenovírusok őse 2 fiber génnel rendelkezhetett, melyekből a fiber-1 gént veszíthették el a ma már csak egy fiber génnel rendelkező aviadenovírusok. Valószínűleg ugyanennek a gének az elvesztése zajlik most a galamb-aviadenovírusoknál.
6. Elsőként mutattuk ki a patogén papagáj-adenovírus 2-t Európában. A vírus jelenlétét öt olyan papagájfajban írtuk le, melyekből eddig nem közölték a vírus előfordulását, további bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy a papagáj-adenovírus 2 könnyen átlépi a fajhatárt.
7. Megtöbbszöröztük a madarakból ismert adenovírus típusok számát, összesen 62 eddig le nem írt típust azonosítottunk (33 aviadenovírust, 21 siadenovírust és 8 atadenovírust). Vad- és egzotikus madarakban rendkívül magas, 19%-os adenovírus pozitívítást tapasztaltunk.

9. Irodalomjegyzék

- Adair, B.M., McFerran, J.B., Calvert, V.M.: **Development of a microtitre fluorescent antibody test for serological detection of adenovirus infection in birds**, Avian Pathol., 9. 291-300, 1980.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Carstens, E.B.: **Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses**, Arch Virol., 160. 1837-1850, 2015.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**, Nucleic Acids Res., 25. 3389-3402, 1997.
- Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., Wadell, G.: **Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor**, J. Virol., 74. 42-48, 2000.
- Bartha A., Mészáros J., Tanyi J.: **Antibodies against EDS-76 avian adenovirus in bird species before 1975**, Avian Pathol., 11. 511-513, 1982.
- Benkő M.: **Adenoviruses: Pathogenesis**. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Szerk.: Caplan, M., Mitchell, R., Bradshaw, R., McManus, L., Amsterdam: Elsevier, p.10, 2015.
- Benkő M., Élő P., Ursu K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach B.: **First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses**, J. Virol. 76. 10056-10059, 2002.
- Benkő M., Harrach B.: **Molecular evolution of adenoviruses**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272. 3-35, 2003.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A.: **Spliced segments at 5' terminus of adenovirus 2 late messenger-RNA**, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74. 3171-3175, 1977.
- Bistyák A., Kecskeméti S., Glávits R., Tischler I., Nagy S.T., Kardos G., Kiss I.: **Pacheco's disease in a Hungarian zoo bird population: a case report**, Acta Vet. Hung., 55. 213-218, 2007.
- Bodewes, R., van de Bildt, M.W., Schapendonk, C.M., van Leeuwen, M., van Boheemen, S., de Jong, A.A., Osterhaus, A.D., Smits, S.L., Kuiken, T.: **Identification and characterization of a novel adenovirus in the cloacal bursa of gulls**, Virology, 440. 84-88, 2013.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L.A.: **Predicting DNA duplex stability from the base sequence**, Proc. Natl. Acad. Sci., 83. 3746-3750, 1986.

- Chiocca, S., Baker, A., Cotten, M.: **Identification of a novel antiapoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus**, J. Virol., 71. 3168-3177, 1997.
- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., Cotten, M.: **The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO**, J. Virol., 70. 2939-2949, 1996.
- Chow, L.T., Broker, T.R., Lewis, J.B.: **Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2**, J. Mol. Biol., 134. 265-303, 1979.
- Corpet, F.: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, Nucleic Acids Res., 16. 10881-10890, 1988.
- Corredor, J.C., Nagy É.: **The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement**, Virus Res., 149. 167-174, 2010.
- Corredor, J.C., Krell, P.J., Nagy E.: **Sequence analysis of the left end of fowl adenovirus genomes**, 33. 95-106, 2006.
- Coussement, W., Ducatelle, R., Lemahieu, P., Froyman, R., Devriese, L.A., Hoorens, J.: **Pathologie van adenovirus infecties bij duiven**, Vleems Diergeneeskundig Tijdschrift, 53. 227-283, 1984.
- Dán Á., Ruzsics Zs., Russell, W.C., Benkő M., Harrach B.: **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, 1998.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, J. Gen. Virol., 81. 2431-2439, 2000.
- Davison, A.J., Benkő M., Harrach B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, J. Gen. Virol., 84. 2895-2908, 2003.
- De Herdt, P., Ducatelle, R., Lepoudre, C., Charlier, G., Nauwynck, H.: **An epidemic of fatal hepatic necrosis of viral origin in racing pigeons (*Columba livia*)**, Avian Path., 24. 475-483, 1995.
- Domermuth, C.H., Harris, J.R., Gross, W.B., Dubose, R.T.: **A naturally occurring infection of chickens with a hemorrhagic enteritis/marble spleen disease type of virus**, Avian Dis., 23. 479-484, 1979.
- Doszpoly A., Wellehan, J.F. Jr., Childress, A.L., Tarján Z.L., Kovács E.R., Harrach B., Benkő M.: **Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles**, Infect. Genet. Evol., 17. 106-112, 2013.
- El Bakkouri, M., Seiradake, E., Cusack, S., Ruigrok, R.W., Schoehn, G.: **Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre**, Virology, 169-176, 2008.

- Farkas S.L., Harrach B., Benkő M.: **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, 2008.
- Freick, M., Müller, H., Raue, R.J.: **Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR**, *Viol. Meth.*, 148. 226-231, 2008.
- Gelderblom, H., Maichle-Lauppe, I.: **The fibers of fowl adenoviruses**, *Arch. Virol.*, 72. 289-298, 1982.
- Gilson, T., Blanchette, P., Ballmann M.Z., Papp T., Péntzes J.J., Benkő M., Harrach B., Branton, P.E.: **Using the E4orf6-based E3 ubiquitin ligase as a tool to analyze the evolution of adenoviruses**, *J. Virol.*, 90. 7350-7367, 2016.
- Gómez-Villamandos, J.C., Mozos, E., Sierra, M.A., Pérez, J., Mendez, A.I.: **Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the intestine of a psittacine bird affected by inclusion body hepatitis**, *J. Wildl. Dis.*, 28. 319-322, 1992.
- Gorman, J.J., Wallis, T.P., Whelan, D.A., Shaw, J., Both, G.W.: **LH3, a “homologue” of the mastadenoviral E1B 55-kDa protein is a structural protein of atadenoviruses**, *Virology*, 342. 159-166, 2005.
- Goryo, M., Ueda, Y., Umemura, T., Haruna, A., Itakura, C.: **Inclusion body hepatitis due to adenovirus in pigeons**, *Avian Path.*, 17. 391-401, 1988.
- Guardado-Calvo, P., Llamas-Saiz, A.L., Fox, G.C., Langlois, P., van Raaij, M.J.: **Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 long fiber**, *J. Gen. Virol.*, 88. 2407-2416, 2007.
- Guy, J.S., Barnes, H.J.: **Characterization of an avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis in day-old turkeys**, *Avian Dis.*, 41. 726-731, 1997.
- Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41. 95-98, 1999.
- Harrach, B.: **Adenoviruses: General features**. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Szerk.: Caplan, M., Mitchell, R., Bradshaw, R., McManus, L. Amsterdam: Elsevier, p.10, 2014.
- Harrach B., Benkő M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. In: *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Szerk.: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. Oxford: Elsevier, Academic Press, pp.125-141, 2011.
- Harrach B., Meehan, B.M., Benkő M., Adair, B.M., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, *Virology*, 229. 302-306, 1997.

- Hemmi, S., Vidovszky M.Z., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Greber, U.F., Harrach B.: **Genomic and phylogenetic analyses of murine adenovirus 2**, Virus Res., 160. 128-135, 2011.
- Hess, M.: **Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review**, Avian Pathol., 29. 195-206, 2000.
- Hess, M., Blocker, H., Brandt, P.: **The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses**, Virology, 238. 145-156, 1997.
- Hess, M., Cuzange, A., Ruigrok, R.W.H., Chroboczek, J., Jacrot, B.: **The avian adenovirus penton: two fibres and one base**, J. Mol. Biol., 252. 379-385, 1995.
- Hess, M., Prusas, C., Monreal, G.: **Growth analysis of adenoviruses isolated from pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates**, Avian Pathol., 27. 196-199, 1998a.
- Hess, M., Prusas, C., Vereecken, M., De Herdt, P.: **Isolation of fowl adenoviruses serotype 4 from pigeons with hepatic necrosis**, Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 111. 140-142, 1998b.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C., Clubb, S.: **Adenovirus-like infection in white-masked lovebirds (*Agapornis personata*)**, J. Ass. Avian Vet., 1. 32-34, 1989.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M.: **The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences**, Comput. Appl. Biosci., 8. 275-282, 1992.
- Kaján G.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Benkő M.: **Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4**, J. Gen. Virol., 93. 2457-2465, 2012.
- Kaján G.L., Sameti, S., Benkő M.: **Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: a reference panel for a general diagnostic PCR in poultry**, Acta Vet. Hung., 59. 279-285, 2011.
- Kaján G.L., Stefanicsik R., Ursu K., Palya V., Benkő M.: **The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1**, Virus Res., 153. 226-233, 2010.
- Katoh, H., Ohya, K., Kubo, M., Murata, K., Yanai, T., Fukushi, H.: **A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of siadenovirus**, Virus Res., 144. 294-297, 2009.
- Kovács E.R., Benkő M.: **Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses**, Infect. Genet. Evol., 5. 1058-1065, 2011.
- Kovács E.R., Jánoska M., Dán Á., Harrach B., Benkő M.: **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. Meth., 163. 262-268, 2010.
- Kovács G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., Benkő M.: **Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus.** Virus Res., 98. 27-34, 2003.
- Le, S.Q., Gascuel, O.: **An improved general amino acid replacement matrix,** Mol. Biol. Evol., 25. 1307-1320, 2008.
- Lee, S.Y., Kim, J.H., Seo, T.K., No, J.S., Kim, H., Kim, W.K., Choi, H.G., Kang, S.H., Song, J.W.: **Genetic and molecular epidemiological characterization of a novel adenovirus in Antarctic penguins collected between 2008 and 2013,** PLoS ONE, 11. e0157032, 2016.
- Lehrmann, H., Cotten, M.: **Characterization of CELO virus proteins that modulate the pRb/E2F pathway,** J. Virol., 73. 6517-6525, 1999.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R.: **The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework,** Nucleic Acids Res., 43. doi:10.1093/nar/gkv279, 2015.
- Lüschow, D., Prusas, C., Lierz, M., Gerlach, H., Soike, D., Hafez, H.M.: **Adenovirus of psittacine birds: investigations on isolation and development of a real-time polymerase chain reaction for specific detection,** Avian Pathol., 36. 487-494, 2007.
- Marek, A., Kaján G.L., Kosiol, C., Benkő M., Schachner, A., Hess, M.: **Genetic diversity of species *Fowl aviadenovirus D* and *Fowl aviadenovirus E*,** J. Gen. Virol., doi: 10.1099/jgv.0.000519, 2016. [megjelenés alatt]
- Marek, A., Kaján G.L., Kosiol, C., Harrach B., Schloetterer, C., Hess, M.: **Complete genome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus *Aviadenovirus*,** Virology. 462-463. 107-114, 2014b.
- Marek, A., Kosiol, C., Harrach B., Kaján G.L., Schlötterer, C., Hess, M.: **The first whole genome sequence of a *Fowl adenovirus B* strain enables interspecies comparisons within the genus *Aviadenovirus*,** Vet. Microbiol., 166. 250-256, 2013.
- Mase, M., Mitake, H., Inoue, T., Imada, T.: **Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene,** J. Vet. Med. Sci., 71. 1239-1242, 2009.
- McFerran, J.B.: **Egg drop syndrome, 1976 (EDS'76),** Vet. Quarterly, 1. 176-180, 1979.
- McFerran, J.B., Connor, T.J., McCracken, R.M.: **Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than domestic fowl,** Avian Dis., 20. 519-524, 1976.

- Meulemans, G., Boschmans, M., Berg, T.P., Decaesstecker, M.: **Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses**, Avian Pathol., 30. 655-660, 2001.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D., McGuire, G.: **TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments**, Bioinformatics, 20. 1806-1807, 2004.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr, Deerfield, D.W.: **GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation**, Embnew News, 4. 1-4, 1997.
- Ojkic, D., Nagy É.: **The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8**, J. Gen. Virol., 81. 1833-1837, 2000.
- Palya V., Nagy M., Glávits R., Ivanics É., Szalay D., Dán Á., Süveges T., Markos B., Harrach B.: **Investigation of field outbreaks of turkey haemorrhagic enteritis in Hungary**, Acta Vet. Hung., 55. 135-149, 2007.
- Pantó L., Podgorski, I., Jánoska M., Márkó O., Harrach B.: **Taxonomy proposal for Old World monkey adenoviruses: characterisation of several non-human, non-ape primate adenovirus lineages**, Arch. Virol., 160. 3165-3177, 2015.
- Pass, D.A.: **Inclusion bodies and hepatopathies in psittacines**, Avian Pathol., 16. 581-597, 1987.
- Park, Y.M., Kim, J.H., Gu, S.H., Lee, S.Y., Lee, M.G., Kang, Y.K., Kang, S.H., Kim, H.J., Song, J.W.: **Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica**, Virology, 422. 144-150, 2012.
- Pénzes J.J., Menéndez-Conejero, R., Condezo, G.N., Ball, I., Papp T., Doszpoly A., Paradela, A., Pérez-Berná, A.J., López-Sanz, M., Nguyen, T.H., van Raaij, M.J., Marschang, R.E., Harrach B., Benkő M., San Martín, C.: **Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes, and the first adenovirus with either one short or three long fibers per penton**, J. Virol., 88. 11304-11314, 2014.
- Perry, W.L.: **JavaScript DNA translator: DNA-aligned protein translations**, Biotechniques, 33. 1318-1320, 2002.
- Phan, T.G., Vo, N.P., Boros Á., Pankovics P., Reuter G., Li, O.T.W., Wang, C., Deng, X., Poon, L.L.M., Delwart, E.: **The viruses of wild pigeon droppings**, PLoS ONE, 8. e72787, 2013.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Schmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G.E., Michael, A., Goldberg, D.: **The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenoviruses, haemorrhagic enteritis virus**, Virology, 249. 307-315, 1998.

- Podgorski, I.I., Pantó L., Papp T., Harrach B., Benkő M.: **Genome analysis of four Old World monkey adenoviruses supports the proposed species classification of primate adenoviruses and reveals signs of possible homologous recombination**, J. Gen. Virol., 97. 1604-1614, 2016.
- Raue, R., Hafez, H.M., Hess, M.: **A fiber gene-based polymerase chain reaction for specific detection of pigeon adenovirus**, Avian Pathol., 31. 95-99, 2002.
- Raue, R., Gerlach, H., Muller, H.: **Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV)**, Arch. Virol., 150. 1933-1943, 2005a.
- Raue, R., Schmidt, V., Freick, M., Reinhardt, B., Johne, R., Kamphausen, L., Kaleta, E.F., Müller, H., Krautwald-Junghanns, M.E.: **A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome**, Avian Pathol., 34. 418-425, 2005b.
- Rivera, S., Wellehan, J.F. Jr., McManamon, R., Innis, C.J., Garner, M.M., Raphael, B.L., Gregory, C.R., Latimer, K.S., Rodriguez, C.E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A.B., Nyaoke, A., Gates, A.E., Gilbert, K., Childress, A.L., Risatti, G.R., Frasca, S. Jr.: **Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus**, J. Vet. Diagn. Invest., 4. 415-426, 2009.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G.: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture**, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84. 570-573, 1953.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B.: **Artemis: sequence visualization and annotation**, Bioinformatics, 16. 944-945, 2000.
- Saha, B., Wong, C.M., Parks, R.J.: **The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion**, Viruses, 6. 3563-3583, 2014.
- Schumacher, V.L., Innis, C.J., Garner, M.M., Risatti, G.R., Nordhausen, R.W., Gilbert-Marcheterre, K., Wellehan, J.F. Jr., Childress, A.L., Frasca, S. Jr.: **Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*)**, J. Zoo Wildl. Med., 43. 501-510, 2012.
- Scott, M., McFerran, J.B.: **Isolation of adenoviruses from turkeys**, Avian Dis., 16. 413-420, 1972.
- Scott, P.C., Condron, R.J., Reece, R.L.: **Inclusion body hepatitis associated with adenovirus-like particles in a cockatiel (Psittaciformes; *Nymphicus hollandicus*)**, Aust. Vet. J., 63. 337-338, 1986.
- Segerman, A., Atkinson, J.P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., Arnberg, N.: **Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor**, J. Virol., 77. 9183-9191, 2003.

- Singh, A.K., Ballmann M.Z., Harrach B., Benkő M., van Raaij, M.: **Crystallization of the C-terminal head domain of the fibre protein from a siadenovirus, turkey adenovirus 3**, *Acta Cryst. F.*, 69. 1135-1139, 2013.
- Singh, A.K., Berbís, M.Á., Ballmann M.Z., Kilcoyne, M., Menéndez, M., Nguyen, T.H., Joshi, L., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., Benkő M., Harrach B., van Raaij, M.J.: **Structure and sialyllactose binding of the carboxy-terminal head domain of the fibre from a siadenovirus, turkey adenovirus 3**, *PLoS ONE*, 10. e0139339, 2015.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.: **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**, *Mol. Syst. Biol.*, 7. 539, 2011.
- Smyth, J.A., McFerran, J.B.: **Egg Drop Syndrome**, *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.*, 5. 83-108, 1989.
- Staden, R.: **The Staden sequence analysis package**, *Mol. Biotechnol.*, 5. 233-241, 1996.
- Stenzel, T.A., Pestka, D., Tykalowsky, B., Smialek, M., Koncicki, A.: **Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland**, *Vet. Rec.*, 171. 562, 2012.
- Stephens, R.M., Schneider, T.D.: **Features of spliceosome evolution and function inferred from an analysis of the information at human splice sites**, *J. Mol. Biol.*, 228. 1124-1136, 1992.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, A.: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**, *Mol. Biol. Evol.*, 30. 2725-2729, 2013.
- Tan, P.K., Michou, A., Bergelson, J.M., Cotten, M.: **Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins**, *J. Gen. Virol.*, 82. 1465-1472, 2001.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus upecula*)**, *Virus Res.*, 83. 189-195, 2002.
- To, K.K.W., Tse, H., Chan, W.M., Lau, P.I.T., Luk, G., Graydon, R., Choi, G., Chan, J.F.W., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Yuen, K.Y.: **A novel psittacine adenovirus identified during an outbreak of avian chlamydiosis and human psittacosis: zoonosis associated with virus-bacterium coinfection in birds**, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8. e3318, 2014.
- Vereecken, M., De Herdt, P., Ducatelle, R.: **Adenovirus infections in pigeons: A review**, *Avian Pathol.*, 27. 333-338, 1998.
- Vidovszky M.Z., Kohl, C., Boldogh S., Görföl T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach B.: **Random sampling of the European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenovirus**, *Acta Vet. Hung.*, 63. 508-525, 2015.

- Walsh, M.P., Chintakuntlawar, A., Robinson, C.M., Madisch, I., Harrach B., Hudson, N.R., Schnurr, D., Heim, A., Chodosh, J., Seto, D., Jones, M.S.: **Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis**, PLoS ONE, 4. e5635, 2009.
- Washietl, S., Eisenhaber, F.: **Reannotation of the CELO genome characterizes a set of previously unassigned open reading frames and points to novel modes of host interaction in avian adenoviruses**, BMC Bioinformatics, 4. doi:10.1186/1471-2105-4-55, 2003.
- Whelan, S., Goldman, N.: **A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach**, Mol. Biol. Evol., 18. 691-699, 2001.
- Wellehan, J.F.X., Greenacre, C.B., Fleming, G.J., Stetter, M.D., Childress, A.L., Terrell, S.P.: **Siadenovirus infection in two psittacine bird species**, Avian Pathol., 38. 413-417, 2009.
- Wellehan, J.F.X., Johnson, A.J., Harrach B., Benkő M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R.: **Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of reptilian origin for the atadenoviruses**, J. Virol., 78. 13366-13369, 2004.
- Wellehan, J.F.X. Jr., Johnson, A.J., Latimer, K.S., Bischoff, K., Lafortune, M., Jacobson, E.R.: **Identification and initial characterization of an adenovirus associated with fatal hepatic and lymphoid necrosis in a Meyer's parrot (*Poicephalus meyeri*)**, J. Avian Med. Surg., 19. 191-197, 2005.
- Zadravec, M., Račnik, J., Slavec, B., Ballmann M., Marhold, C., Harrach B., Zorman Rojs, O.: **Detection of new adenoviruses in psittacine birds in Slovenia**. In: Proceedings of IX Symposium Poultry Days. Szerk.: Mirta, B. Sibenik, pp. 131-134, 2011.
- Zsivanovits, P., Monks, D.J., Forbes, N.A., Ursu K., Raue, R., Benkő M.: **Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*)**, J. Avian Med. Surg., 20. 105-112, 2006.

10. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

10.1 Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

- Ballmann M.Z., Harrach B.: **Detection and partial genetic characterisation of novel avi- and siadenoviruses in racing and fancy pigeons (*Columba livia domestica*)**, Acta Vet. Hung., 2016. (közlésre elfogadva) IF: 0,871
- Marek, A.*, Ballmann M.Z.*, Kosiol, C., Harrach B., Schlötterer, C., Hess, M.: **Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus *Aviadenovirus***, J.Gen. Virol., 95. 156-170, 2014. IF: 3,183
*megosztott első szerzőség
- Joseph, H.M., Ballmann M.Z., Garner, M.M., Hanley, C.S., Berlinski, R., Erdélyi K., Childress, A.L., Fish, S.S., Harrach B., Wellehan, J.F.X. Jr.: **A novel siadenovirus detected in the kidneys and liver of Gouldian finches (*Erythura gouldiae*)**, Vet. Microbiol., 172. 35-43, 2014. IF: 2,511
- Ballmann M.Z., Vidovszky M.Z.: **Széles gazdaspektrumú psittacin adenovírus (PsAdV-2) kimutatása különböző papagájfajok hazai egyedeiben. (Detection of broad host range psittacine adenovirus (PsAdV-2) in different parrot species)**, Magy. Állatorv. Lapja, 135. 73-80, 2013. IF: 0,185

10.2 Konferencia közlemények és összefoglalók

- Ballmann M.Z., Harrach B.: **Novel adenoviruses detected in racing pigeons**, XVIth International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014.
- Ballmann M.Z., Vidovszky M.Z., Doszpoly A., Kaján G.L., Harrach B.: **Detection and phylogenetic analysis of atadenoviruses of wild birds**, XIth International Adenovirus Meeting, San Diego, California, USA, 2014.
- Ballmann M., Harrach B.: **Partial genome analysis of a novel aviadenovirus detected in racing pigeons**, IXth International Congress of Veterinary Virology, Madrid, Spain, 2012.
- Ballmann M., Harrach B., Vidovszky M.Z.: **Detection of new adenoviruses in birds**, Acta Microbiol. Immunol. Hung., 58. 6-7, 2011.
- Ballmann M., Vidovszky M., Morandini P.: **Adenovírusok kimutatása Budapesten költő vörös vércsékben (*Falco tinnunculus*)**, Magyar Vad- és Állatkerti Állatorvosok Társasága (MVÁÁT), és a Fővárosi Állat- és Növénykert (FÁNK) konferenciája, Budapest, 2011.

10.3 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

- Nguyen, T.H., Ballmann M.Z., Do, H.T., Truong, H.N., Benkő M., Harrach B., van Raaij, M.J.: **Crystal structure of raptor adenovirus 1 fibre head and role of the beta-hairpin in siadenovirus fibre head domains**, Virol. J., 13. 106, 2016. IF: 2,362
- Gilson, T., Blanchette, P., Ballmann M.Z., Papp T., Péntzes J.J., Benkő M., Harrach B., Branton, P.E.: **Using the E4orf6-based E3 ubiquitin ligase as a tool to analyze the evolution of adenoviruses**, J. Virol., 90. 7350-7367, 2016. IF: 4,606
- Singh, A.K., Berbís, M.Á., Ballmann M.Z., Kilcoyne, M., Menéndez, M., Nguyen, T.H., Joshi, L., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., Benkő M., Harrach B., van Raaij, M.J.: **Structure and sialyllactose binding of the carboxy-terminal head domain of the fibre from a siadenovirus, turkey adenovirus 3**, PLoS ONE, 10. e0139339, 2015. IF: 3,057
- Nguyen, T.H., Vidovszky M.Z., Ballmann M.Z., Sanz-Gaitero, M., Singh, A.K., Harrach B., Benkő M., van Raaij, M.J.: **Crystal structure of the fibre head domain of bovine adenovirus 4, a ruminant atadenovirus**, Virol. J., 12. 81, 2015. IF: 2,362
- Singh, A.K., Ballmann M.Z., Harrach B., Benkő M., van Raaij, M.: **Crystallization of the C-terminal head domain of the fibre protein from a siadenovirus, turkey adenovirus 3**, Acta Cryst. F., 69. 1135-1139, 2013. IF: 0,568

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Harrach Balázsnak a lehetőséget, hogy a témacsoportjában végezhettem kedvenc állatcsoportom adenovírusairól szóló doktori tanulmányaimat. Hálásan köszönöm a gyakorlati munkám és a publikációk megírása során nyújtott segítséget Dr. Benkő Máriának is. Mindkettőjüknek nagyon köszönöm, hogy bátorítottak a külföldi tapasztalatszerzésre, amivel új világok nyílhattak ki előttem. Köszönöm az Összehasonlító és Molekuláris Virologia témacsoportok minden tagjának a sok elméleti és gyakorlati segítséget és a vidám légkört.

A PhD témámhoz szorosan nem voltak köthetők, de mindenképpen nagyon nagyban befolyásolták pályám alakulását a külföldi laborokban töltött hónapok és évek. Köszönet illeti ezért dr. Angélique Lemckert holland csoportvezetőmet a Batavia Biosciences cégtől, dr. Mark van Raaijt a madridi Nemzeti Biotechnológiai Központból, valamint dr. Marko Zadavec állatorvost a Ljubljana-i Állatorvosi Egyetemről.

Köszönöm Dr. Michael Hess és dr. Ana Marek bécsi kollégáink segítségét és közreműködését. Egy széleskörű virológiai szűrővizsgálat lehetetlen megfelelő minták nélkül. Hálás köszönet illeti a vizsgálati anyagok rendelkezésünkre bocsátásáért Morandini Pál, Boldogh Sándor, Benei Béla és Benei Zsolt hivatásos, vagy hobbijukat profiként űző ornitológus szakembereket, dr. Molnár Viktor és dr. Sós Endre állatkerti állatorvosokat, továbbá dr. Dán Ádámot, dr. Déri Jánost, a Hortobágyi Madárkórház állatorvosát és a Debreceni Állatkert munkatársait. Köszönöm dr. Doszpoly Andornak az ukrán és dr. Vlado Slavicnak horvát mintákat. Köszönettel tartozom dr. Palya Vilmosnak a pulyka-adenovírus izolátum rendelkezésünkre bocsátásáért, illetve dr. Kecskeméti Sándornak, amiért megkísérelte a galamb-adenovírus izolálását. A galamb mintákért köszönet illeti dr. Berta Krisztiánt és dr. Thuma Ákost, akiktől nem pusztán mintákat, de hasznos háttér információkat is kaptam az egyes esetekről. Köszönöm a rengeteg vizsgálati anyagot a Jászszági postagalambászoknak, közülük is a leglelkesebbnek, Pitének.

Hálásan köszönöm Anyukámnak és Apukámnak, hogy mindig engedték, hogy azzal foglalkozzam, ami igazán érdekel. Köszönöm, hogy nyugodt családi háttérrel biztosítva, mindvégig támogattak és bíztattak, ami különösen a PhD munka utolsó fázisában volt elengedhetetlen. Köszönöm a lelkesítést páromnak, Rubennek és az öcsikémnek, Marcinak. Köszönöm kedves barátnőimnek Sziszkónak, Pirosnak, Barinak, Katóknak, Eszternek, Vörös és Kicsi Reninek a lelki támaszt és a rengeteg vidámságot! Pirost (álnevén dr. Fehér Enikőt) külön köszönet illeti a dolgozat gondos átolvasásáért és hasznos tanácsaiért.

A munka anyagi háttérét az OTKA NN107632 számú pályázata biztosította.

12. Függelék

12.1 A filogenetikai számításokhoz felhasznált szekvenciák GenBank-i azonosítói

AdV	GenBank-i iktatószám	AdV	GenBank-i iktatószám	AdV	GenBank-i iktatószám
anolis-2	KC544016	lúd-4	JF510462	sólyom-1	AY683541
béka-1	AF224336	lúd-5	JQ178217	szakállas agáma	AY576678
bovin-4	AF036092	Meyer papagáj	AY644731	széncinege-1	FJ849795
délsarki halfarkas-1	HM585353	mókus	GU735083	tokhal-1	AY082701
dobozteknős	EU828750	ovin-7	U40839	tyúk-1	AC000014
galamb-1	FN824512	pingvin-1	KP144329	tyúk-2	KT862806
galamb-2a	KX673408	psittacin-1	EF442329	tyúk-3	KT862807
galamb-2b	KX555529	psittacin-2	EU056825	tyúk-4	GU188428
galamb-3	KX555530	psittacin-3	KC248187- KC248190	tyúk-5	KC493646
galamb-4	KX555531	pulyka-1	KJ675568	tyúk-6	GU936707
galamb-5	KX555532	pulyka-2	GU936708	tyúk-7	KT862809
Gould amandina-1	KF031569	pulyka-3	AC000016	tyúk-8a	KT862810
gyík-2	KJ156523	pulyka-4	KF477312	tyúk-8b	KT862811
humán-5	AC000008	pulyka-5	KF477313; KF477314	tyúk-9	AC000013
kacsa-1	AC000004	raptor-1	NC015455	tyúk-10	U26221
kacsa-2	KJ469653	résteknős	JN632575	tyúk-11	KT862812
kígyó-1	DQ106414	sirály	KC309438	vörösfülű ékszerteknős	JN632580