

**Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

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

PhD értekezés tézisei

Ballmann Mónika

2016

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

**Prof. Dr. Harrach Balázs**

témavezető

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

**Prof. Dr. Benkő Mária**

témabizottsági tag

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

## Bevezetés

Az adenovírusok (AdV-ok) családjának (*Adenoviridae*) öt elfogadott nemzetsége közül háromban, az *Aviadenovirus*, az *Atadenovirus* és a *Siadenovirus* nemzetségben található madarakat is fertőző vírusok. 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 tojáshozamcsökkenést és héjképződési rendellenességeket okoz, illetve a siadenovírusok közé tartozó, pulykákat és fácánokat is megbetegíteni képes pulyka-AdV-3 (turkey adenovirus 3; 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 bélgyulladást 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. Klasszikus vírusizolálási módszerekkel csak egyetlen galamb-aviadenovírust sikerült egy német kutatócsoportnak izolálnia, a galamb-AdV-1-et (pigeon adenovirus 1; PiAdV-1). 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 sólyom-AdV-1, négy különböző papagáj-AdV, nevezetesen a hullámos papagáj-AdV-1, a psittacin-AdV-1 és -2, valamint a Meyer papagáj-AdV-1 voltak ismeretesek. A széncinege-AdV-1 és a többféle ragadozó madárfajt is fertőző raptor-AdV-1 leírása hazai kutatások eredménye. A széncinegétől (*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 sejtspecifitásuk miatt hiányoznak az izolálásukhoz szükséges sejtvonalak, így kimutatásuk és tanulmányozásuk nehézkes, de a molekuláris technikák megoldást jelenthetnek.

## **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.

# Anyag és módszer

## A vizsgálati anyagok eredete

A teljes genom szinten vizsgált 1277BT jelzésű TAdV-5 és a TAdV-4 törzset az Egyesült Királyságban izolálták pulyka tenyészállományokból. A Magyarországról származó TAdV-5 törzset akut felső légúti megbetegedést mutató húspulykákban mutatták ki és csirke embrió fibroblaszt sejteken szaporították el.

Összesen 27 állományból származó 97 posta- és díszgalamb mintát vizsgáltunk. A galambok a YPDS-hez (young pigeon disease syndrome, fiatal galambok betegsége) hasonló klinikai tüneteket mutató egyedek, vagy elhullott példányok voltak. Az AdV szűréshez különböző szerveket, májat, tüdőt, vesét és bél mintákat, valamint fertőzött állományból származó, de klinikai tüneteket nem mutató galambokból ürülék mintákat használtunk.

Munkám során 21 papagájfaj 124 egyedét, 27 egyéb egzotikus madárfaj 115 egyedét és 83 Magyarországon előforduló vadmadárfaj 434 egyedét vizsgáltuk AdV-ok jelenlétére. A papagáj- és egzotikus fajokból származó kloakatampon, bélsár és szerv mintáink döntő többsége a Fővárosi Állat- és Növénykertből, valamint két magán díszmadártenyészetből származott. Vadmadarokból gyűjtött mintáink szintén vegyesen tartalmaztak kloakatampon, bélsár és szerv mintákat. Vadon élő énekesmadarokból (Passeriformes), fehér gólyák (*Ciconia ciconia*), sirályfélék (Laridae) és vörös vércsék (*Falco tinnunculus*) fiatal egyedeiből madárgyűrűzési tevékenység közben gyűjtöttünk ürülék és kloakatampon mintákat Magyarország és Ukrajna területéről. Egy horvátországi kloakatampon minta gyűjteményből főként sirály és kárókatona (*Phalacrocorax sp.*) mintákat vizsgáltunk AdV-ok jelenlétére. Elhullott, illetve sérült vadmadarokból származó mintáink főként az Aggteleki Nemzeti Park és a Hortobágy területéről származtak. A Fővárosi Állat- és Növénykert klinikáján elhullott egyedekből szerv, valamint az állatkert Élet-Halál Házában ápolt, mentett vadmadarokból további kloakatampon mintákhoz jutottunk.

## Adenovírusok PCR-es vizsgálata

A szerv, ürülék és kloakatampon mintákból, valamint a vírusizolátumokból DNS-t vontunk ki. Az AdV-ok elsődleges kimutatását az AdV-ok polimeráz génjére specifikus, két körös, általános AdV PCR módszer segítségével végeztük egy korábban publikált módszert követve, mely tapasztalataink szerint alkalmas minden eddig leírt AdV kimutatására. A kimutatott AdV-ok további DNS-szekvencia vizsgálatát nemzetség-specifikus PCR-ek alkalmazásával kíséreltük meg. A teljes genom szekvenálásra kiválasztott vírusok (PiAdV-2a, TAdV-5) további genomszakaszainak felerősítését saját tervezésű primerek segítségével

végeztük. A 18-28 bázispár hosszú primerek tervezését a már ismert AdV-ok szekvenciáinak összegyűjtésével, illesztésével és a megőrzöttebb genomi régiók meghatározásával kezdtük. Az szekvencia illesztésekhez a MultAlin programot és a Clustal Omega programcsomagot használtuk.

## **DNS szekvenálás és bioinformatika**

Az izolált TAdV-4 és -5 genomszekvenálását új generációs Illumina szekvenálással végezte bécsi együttműködő partnerünk. A magyar TAdV-5 törzs, illetve a nem izolált PiAdV-2a genomszekvenciáját Sanger-féle szekvenálással, az úgynevezett primer-sétálás módszerével határoztuk meg. A részleges genomszekvenciák összeillesztését a CLC Genomics Workbench v.4.0 program és a Staden programcsomag használatával hajtottuk végre. A genomok értelmezése során a gén predikcióhoz és a nyitott leolvasási keretek (open reading frame; ORF) meghatározásához az Artemis és a JavaScript DNA translator 1.1 programokat használtuk. A splice-olt gének esetében a lehetséges donor és akceptor helyeket manuálisan határoztuk meg, megőrzött mintázatokat keresve. A genomokat CLC Main Workbench 7.6 program segítségével vizualizáltuk.

A származtatott aminosav szekvenciák illesztését a Clustal Omega illetve a Muscle programok segítségével hajtottuk végre. A filogenetikai számítások előtt a megfelelő modellt (pontosítási mátrixot) modell-szelekciós analízissel választottuk ki, melyet a Topali 2.5 programcsomagon belül vagy a ProtTest szerverén futtatunk. A filogenetikai számításokat kétféle módszerrel végeztük az analízishez felhasznált, illesztett szekvenciák hosszúságától függően. Azokhoz a számításokhoz, amelyekhez csak rövid szekvenciák (<200 aminosav) álltak rendelkezésünkre a távolsági mátrix analízis módszerét alkalmaztuk. A hosszabb illesztett szakaszokat alapul vevő számításainkhoz Bayesian algoritmust használtunk, melyet a Topali 2.5 programcsomagon belül futtattunk. A törzsfákat a Mega6 programban szerkesztettük és jelenítettük meg.

# Eredmények

## Pulyka-adenovírusok

A TAdV-4 genomszekvenciája a teljes genom illesztését követően 42.940 bázispár (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 guanin+citozin (G+C) arányt állapítottunk meg. A magyar D1648-as TAdV-5 törzs „primer-sétálós” szekvenálásával 27.931 bp hosszúságú genomszakasz szekvenciáját határoztuk meg. A magyar és a brit TAdV-5 törzsek részleges genomszekvenciája között 41 nukleotid (0,15%) eltérést tapasztaltunk a tanulmányozott 27.931 bp hosszú szakaszon. A TAdV-4 genomja egyetlen, míg a TAdV-5 genomja két fiber gént kódol.

A TAdV-4 a teljes polimeráz, a teljes hexon és a fiber gén alapján végzett filogenetikai számítás szerint a FAdV-5, míg a hexon L1 régiója alapján a TAdV-2 legközelebbi rokona. A TAdV-5 minden számítás szerint a FAdV-1-hez áll legközelebb.

## Galamb-adenovírusok

A vizsgált 97 galamb közül 48 (49,5%) egyed találtuk AdV pozitívnak. Harminchárom galamb esetében négyféle szervet, a májat, a tüdőt, a vesét és a vékonybelet külön vizsgáltunk. A 33 galamb közül 22 egyed 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%).

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 (PiAdV-2). A PiAdV-2 részleges DNS-polimeráz szekvenciáinak összehasonlítása során további két altípust határoztunk meg, a PiAdV-2a-t és a -2b-t. A második új aviadenovírus típust, melyet PiAdV-3-nak nevezünk el, mindössze egyetlen esetben mutattuk ki. A PiAdV-1-et szintén egyetlen esetben diagnosztizáltuk. 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-nevezük el. Egy esetben mutattunk ki egy ezektől jelentős mértékben eltérő siadenovírust (PiAdV-5), mely a vizsgált 90 aminosav hosszúságú szakaszon is 34,4%-os eltérést mutatott. A filogenetikai 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 egymással nem mutatnak közeli rokonságot.

A PiAdV-2a 31.314 bp hosszúságú részleges genom szekvenciáját a primer-sétálás módszerével határoztuk meg. A PiAdV-2a esetében két fiber gént azonosítottunk, melyek közül a fiber-1 csökevényes; a fehérje farki alegysége teljes egészében, a nyél régió pedig részben még fellelhető, a feji domén azonban teljesen hiányzik.

## **A madár-adenovírus fiber gének**

A filogenetikai számítások szerint az egyetlen fiber génnel rendelkező vírusok fiber génje a két fiber génnel rendelkező vírusok fiber-2 génjével mutat 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-2a csökevényes fiber génje is.

## **Papagájok és egzotikus madarak adenovírusai**

A papagáj minták szűrése során 10 példányban (8,06%) mutattuk ki AdV-ok jelenlétét az általános AdV PCR segítségével. Ezek közül 7 eset psittacin-AdV-2 (PsAdV-2) fertőzésnek bizonyult. A PsAdV-2 jelenlétét egy-egy nimfa-, rozella-, kecske-, és fénypapagájban, valamint hullámos papagájok közül 3 egyedben igazoltuk.

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. Siadenovírusok közül 4, eddig le nem írt típust különítettünk el, valamint az avi- és atadenovírus is új, eddig nem publikált vírus típusnak bizonyult.

## **Vadon élő madarak adenovírusai**

Adenovírusok jelenlétére 83 vadmadárfaj 434 egyedét vizsgáltuk. Összesen 102 esetben kaptunk pozitív eredményt, ami 23,5%-os pozitivitást jelent. Leggyakrabban, 59 esetben aviadenovírusokat mutattunk ki, melyek között 28 olyan aviadenovírus típusra bukkantunk, melyeket eddig nem ismert a tudomány. A siadenovírusok szintén nagy diverzitást mutattak, 13 új típusra bukkantunk, míg két további esetben a már leközölt TAdV-3 és széncinege-AdV-1 jelenlétét bizonyítottuk fehér gólyában, illetve széncinegében (*Parus major*). Atadenovírusokat mindössze 7 esetben diagnosztizáltunk, melyek közül 6 mutatkozott új típusnak. A hetedik eset a korábban közölt DAdV-1-gyel teljesen megegyező vírus kimutatása volt fehér gólyában.



# Megbeszélés

## Pulyka-adenovírusok

Oszták kutatókkal együttműködésben, Illumina szekvenálással meghatároztuk és értelmeztük a TAdV-4 és TAdV-5 törzsek teljes genomszekvenciáját, valamint a primer-sétálás módszerével részlegesen egy magyar TAdV-5 törzs genomját is.

A TAdV-4 és TAdV-5 genomok esetében kiegyensúlyozott G+C arányt tapasztaltunk, mely arra utal, hogy ezek a vírusok már hosszú ideje együtt fejlődnek jelenlegi gazdájukkal, amit általánosságban elmondhatunk minden aviadenovírusról. 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. A brit és a magyar TAdV-5 törzs homológ, 27.931 bp hosszú szakaszával végzett összehasonlító analízis során megállapítottuk, hogy a két törzs azonosnak mondható, közös eredetűek lehetnek. A törzseket térben és időben elkülönülten izolálták, ami magyarázat lehet a két vírustörzs minimális szekvencia különbségeire.

A TAdV-4 genomszerveződését a FAdV-5 genomszerveződésével találtuk hasonlónak. A TAdV-5 genomszerveződése szinte teljesen megegyezik a FAdV-1-ével. Ezek az eredmények összhangban vannak a filogenetikai számítások eredményeivel.

A genomi jellegzetességek, a házityúktól 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 (International Committee on Taxonomy of Viruses, Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság) mára hivatalosan is elismeri a két új fajt. A TAdV-4 ennek megfelelően a *Turkey aviadenovirus C* faj, míg a TAdV-5 a *Turkey aviadenovirus D* faj egyetlen jelenlegi képviselője.

## Galamb-adenovírusok

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 a PiAdV-2a típus bizonyult, mely az *Aviadenovirus* nemzetséghez tartozik. Megállapítottuk, hogy a PiAdV-1 és a PiAdV-3 ritka aviadenovírus típusok a magyar galambállományokban. A három galamb-aviadenovírus típus (PiAdV-1, -2 és -3) 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 galamb-siadenovírusok nagy

filogenetikai távolságra vannak egymástól, ami arra utal, hogy gazdaváltással kerülhettek a galambokra egymástól független lépésekben.

A PiAdV-ok kimutatására korábban leírt PCR módszereket teszteltünk és azokat megbízhatatlannak találtuk a PiAdV-1-től különböző galamb-AdV-ok diagnosztikájában; helyettük a Wellehan és munkatársai (2004) által közölt általános AdV PCR-t javasoljuk. Megállapítottuk, hogy a mintavételi forrásként használt szervnek a diagnózis kimenetele szempontjából nagy jelentősége van. A tüdő és a vese alkalmasabb mintavételi forrásnak tűnik a PiAdV-ok kimutatása szempontjából, mint a máj. A YPDS-t előidéző kórokozók közül az AdV-okat szinte kizárták és megállapították, hogy a fő szerepet a circovírusok és az *Escherichia coli* baktérium játssza a YPDS-ben. Eredményeink alapján az AdV-ok is nagyon gyakran kimutathatóak az ebben a betegségben szenvedő galambokból. Egészséges példányok ürülék mintáit vizsgálva nagy arányban (52,9%) találtunk vírus-ürítő egyedeket olyan állományokban, ahol korábban YPDS-szerű megbetegedésben az állomány egy része elhullott.

A PiAdV-2a szekvenált genomrészletének G+C tartalma kiegyensúlyozottnak mondható, ami arra utal, hogy ez a vírus régóta a mai gazdájával, vagyis a galambbal fejlődik együtt. A PiAdV-2a genomjában két fiber gén kódolt, ám a fiber-1 gén a PiAdV-1 homológ génjéhez hasonlóan csökevényes, valószínűleg nem vesz részt a vírus sejtfelszíni receptorokhoz való kötődésében. Filogenetikai számítások alapján a PiAdV-2a legközelebbi rokona a PiAdV-1, mely tovább erősíti a galamb eredetű AdV-ok közös származását.

## **A madár-adenovírus fiber gének**

A TAdV-4 esetében egy fiber gént, míg a TAdV-5 és a PiAdV-2a genomjában két fiber gént azonosítottunk. A PiAdV-2a első fiberje a PiAdV-1-éhez hasonlóan csökevényes, valószínűleg már nem funkcionáló fiber gének maradványai lehetnek.

Az aviadenovírusok fiber génjével végrehajtott filogenetikai számítások eredményei alapján arra következtettünk, hogy a két fiber gén jelenléte egy genomon belül nem egy egyszerű megkettőződés következménye, hanem ezek a gének eltérő eredetűek lehetnek; az egyik fiber gént valamilyen más AdV genomjából vehette fel egy ősi aviadenovírus. Azon vírusok fiberjei, 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 eredeti szerepét.

## 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. A legkevesebb leírt madár-AdV az *Atadenovirus* nemzetségből ismert. Az összesen 131 fajra és 673 egyedre kiterjedő szűrővizsgálatunk során 19%-os AdV pozitivitást tapasztaltunk a vad- és egzotikus madarak körében és megtöbbszörítettük 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. A DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges, 87 as hosszú szekvenciáján alapuló törzsfán az avi-, a si- és az atadenovírusok tökéletesen elkülönülnek egymástól.

Vad- és egzotikus madaraktól leggyakrabban, 60 esetben, aviadenovírusokat mutattunk ki. 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. Az aviadenovírusok gazdafaj-specifitása erős, az egyes aviadenovírus típusok csak egyféle madárfajban fordulnak elő. A lilealakúak (Charadriiformes) rendjébe tartozó sirályfélékben rendkívüli aviadenovírus-diverzitást tártunk fel, összesen 10 típust különböztettünk meg három sirályfajban. Megállapítottuk, hogy előfordulhat egy gazdafajban több különböző AdV típus is. Bizonyítottuk, hogy egy példány egyszerre többféle, akár eltérő nemzetségekhez tartozó AdV-sal is fertőzött lehet.

A vad- és egzotikus madarak körében végzett szűrővizsgálat során 36 esetben siadenovírusokat detektáltunk és összesen 19 új 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. Korábban a siadenovírusok eredeti gazdáinak a kétélűeket gondolták, de ez az elmélet megdőlt, mivel további vírusokat nem sikerült leírni ebből az állatcsoportból. A *Siadenovirus* nemzetség határozottan elkülönül a többi génusztól, azonban a nemzetségen belül sokkal kevésbé figyelhető meg a vírusok gazdafajok szerinti csoportosulása, mint azt az aviadenovírusoknál láthattuk. A Gould amandina pinty új siadenovírusát velünk párhuzamosan egy amerikai kutatócsoport is kimutatta. Nagyon alacsony, 34,7% G+C arányt állapítottunk meg, mely a *Siadenovirus* nemzetségben megszokott, és evolúciós értelemben vett nem túl régi gazdaváltási eseményre utal. A siadenovírusok általában patogénebbek és könnyebben lépik át a fajhatárt, mint az aviadenovírusok. A siadenovírusok fajhatár-átlépésének elméletét további eredményekkel mi is alátámasztottuk. Elsőként mutattuk ki a THEV-t házi baromfitól eltérő gazdafajban, egy fehér gólyában. Európában elsőként mutattuk ki a patogén, szintén a *Siadenovirus* nemzetségbe tartozó PsAdV-2-t, öt különböző papagájfajban, ezzel tovább

bizonyítva kivételes képességét a fajhatár átlépésére. Vizsgálatunk során arra a következtetésre jutottunk, hogy a siadenovírusok sokkal kevésbé mutatnak koevolúciót a gazdáival, 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. A siadenovírusok eredete máig ismeretlen, ám feltételezzük, hogy az eredeti gazdák nem a madarak lehettek.

Az atadenovírusok nemzetségébe tartozó kérődző, pikkelyes hüllő és madár eredetű AdV-ok majdnem tökéletesen elkülönülnek, három monofiletikus csoportot alkotva. Az atadenovírusok a madarak csak egy korlátozott csoportjában lelhetők fel, ami arra enged következtetni, hogy a valószínűleg pikkelyes hüllő eredetű atadenovírusok csak később és nem minden madárcsoportra ugrottak át. Elméletünk szerint az atadenovírusok valószínűleg több lépésben ugrottak a strucc-, a papagáj- és a verébalakúak rendjének tagjaira, valamint a lúd- és tyúkalakúakat magában foglaló Galloanserae öregrendjének tagjaira.

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 törzsféjlődésének 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.

## 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 madaraktól ismert adenovírus típusok számát, összesen 62 eddig le nem írt típust azonosítottunk (33 aviadenovírust, 21 siadenovírust és 8 atadenovírust). Madarakban rendkívül magas, 19%-os adenovírus pozitívítást tapasztaltunk.

## A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

### 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., 64. 514-528, 2016. 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**, Magyar Állatorv. Lapja, 135. 73-80, 2013. IF: 0,185

### 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.

## **A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk**

- Gilson, T., Blanchette, P., Ballmann M.Z., Papp T., Péntes 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
- 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
- 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., 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
- 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

## Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Harrach Baláznak 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, dr. 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 a 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 Jászvári 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.