

## Diversity of adenoviruses occurring in turtles

(Autoreferatum and literature review)

Z. L. Tarján\*  
A. Doszpoly

Agrártudományi Kutatóközpont,  
Állatorvos-tudományi Intézet  
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

\*e-mail: tarjan.zoltan@agrar.mta.hu

# Teknősökben előforduló adenovírusok diverzitása (Autoreferátum és bővített irodalmi összefoglaló\*)

Tarján Zoltán László, Doszpoly Andor

\*A munka a Doszpoly et al., *Infect. Genet. Evol.* 17, 106–112 (2013) cikk eredményeinek és a témában közölt újabb publikációknak az ismertetése

## ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányukban a szerzők összefoglalják a teknősök adenovírusos fertőzöttségéről jelenleg rendelkezésre álló ismereteket. Vizsgálataikban édesvízi teknősökből származó minták PCR-es szűrésével olyan új adenovírusokat mutattak ki, amelyek a filogenetikai elemzések szerint az *Adenoviridae* család többi tagjától jól elkülönülő leszármazási vonalat képviselnek. Az újonnan felismert adenovírus-klád besorolására javasolták egy új nemzetség létrehozását a víruscsaládon belül. A teknősök jelenleg még nem pontosan tisztázott törzsfajlásának feltérképezéséhez az adenovírus-gazdafaj koevolúciós elmélet alapján értékes adatokat szolgáltatathat az újonnan felismert víruscsoport további vizsgálata.

## SUMMARY

**Background:** Adenoviruses (AdVs) are common infectious agents of different vertebrates worldwide. The members of the family *Adenoviridae* are currently classified into five genera, of which *Mastadenovirus* and *Aviadenovirus* contain the usually stenoxen pathogens of mammals and birds, respectively. Members of the other two genera, *Atadenovirus* and *Siadenovirus*, seem to be euryxen and capable of infecting representatives of several distant taxa of vertebrates, both of them including birds. The genus *Ichtadenovirus* encompasses the single known fish AdV originating from the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*).

**Objectives:** By reviewing their own results and the international literature, the authors summarize the current knowledge about the AdV infections of turtles.

**Materials and Methods:** Organ samples and cloacal swabs, collected from dead or live fresh water turtles, were processed for DNA extraction and screened by broad-spectrum nested PCRs. The sequences of the PCR products were used in phylogeny reconstructions.

**Results and Discussion:** DNA fragments (of approx. 320 bp and 470 bp) were amplified and sequenced from the DNA-dependent DNA polymerase and the hexon genes, respectively. The presence of a novel type AdV was demonstrated in 14 (29%) of the 48 samples examined. In some cases, the PCR products, obtained from the DNA polymerase gene, proved to be polymorphic. By molecular cloning, several different AdV genotypes were revealed in certain animals. The hexon PCR was positive in 2 samples only, yielding identical sequences. The phylogeny reconstructions, based on the deduced amino acid sequences, showed that the novel turtle adenoviruses form a separate cluster that merits the establishment of a new genus within the family *Adenoviridae*. The authors proposed to name this genus *Testadenovirus*. Similar viruses, also belonging to the new AdV lineage, have been detected in four additional turtle species from the superfamily Testudinoidea. The genetic relationships of the AdVs seemed to be congruent with those assumed for the respective turtle species.

KEDVENCÁLLAT

A teknősök rendje (Testudines) jelenlegi ismereteink szerint 351 fajt foglal magába (45). Az evolúciósan ősbibb gerincesek közé tartozó teknősök a terraristák által kedvelt társállatok. Természetes állományaik hosszú távú fennmaradása eredeti élőhelyükön sok esetben erősen kérdéses különböző okok (illegális állatkereskedelem, élőhelycsökkenés és -fragmentáció, környezetszennyezés, vadászat stb.) miatt. Jelenleg a Földünkön élő teknősfajok a hüllők egyik legveszélyeztetettebb csoportját képezik (8, 30). Ehhez az előzőekben felsoroltakon kívül hozzájárul a teknősök sajátos testfelépítése, életmódja és szaporodása. A Természetvédelmi Világszövetség vörös könyvében (44) jelenleg 251 olyan teknősfaj szerepel, amelynek túlélése valamilyen szintű emberi beavatkozást igényel (43).

**A teknősök a hüllők egyik legveszélyeztetettebb csoportját képezik**

**A behurcolt, invazív teknősfajok nemcsak ökológiai, hanem járványtani szempontból is veszélyesek lehetnek**

Az állatkereskedelem fokozódó intenzitása, valamint az ezzel párhuzamosan kialakult illegális állatbefogás és -szállítás ma már szinte minden földrészen problémát okoz, ugyanúgy, mint a felelőtlen állattartói magatartás, különösen az illegális szabadon engedések. A behurcolt, invazív teknősfajok egy adott terület őshonos faunájára nézve több szempontból is károsak lehetnek. Egyrészt, ökológiai szempontból (táplálékforrás-hasznosítás, populációbiológiai jellemzők stb.) gyakran versenyképesebbek az őshonos fajoknál. Másrészt, potenciális kórokozógazdaként járványtani szempontból is veszélyesek lehetnek a fogékony, endemikus fajokra (10, 11, 28, 29). Ennek jó példája a közönséges ékszerteknős különféle alfajainak (*Trachemys scripta* spp.) eredeti élőhelyükről (az Amerikai Egyesült Államok keleti és középső része, valamint Mexikó egyes államai) emberi hatásra történő szétterjedése, és akár önfenntartó állományok létrejötte a világ jelentős részén (30). Mind a fentiek, mind a terrarisztika széleskörű terjedése miatt elengedhetetlen, különösen a vad- és egzotikus állatok gyógyászatával is foglalkozó állatorvosok számára, hogy a teknősökre vonatkozó ismereteiket folyamatosan bővítsék.

Jelen ismertetőben a teknősök adenovírusos fertőzöttségével kapcsolatos szakirodalmi adatokat, köztük saját eredményeinket foglaljuk össze. A legkorábbi közlemény (40) arról számolt be, hogy elektronmikroszkópos vizsgálatokkal herpeszvírus és adenovírus (AdV) együttes jelenlétét valószínűsítették leopárdteknősben (*Geochelone pardalis*). Az elhullással végződő betegség tünetei között testtömegcsökkenés, biliverdinuria és időszakos vérzéses tünetek szerepeltek. Az első molekuláris adatokat is tartalmazó közlés egy bonyolult eset ismertetése által hívta fel a figyelmet az állategészségügyi és járványtani rendszabályok betartásának jelentőségére (31). Az eset vadbefogásból származó, az Amerikai Egyesült Államokba csempészett, de elkobzott szulavézi teknősök (*Indotestudo forstenii*) 105 egyedből álló csoportját érintette. A szállítás során elpusztult 30 példány diagnosztikai vizsgálatához már nem állt rendelkezésre. Az életben maradt teknősöket szétosztották állatkertek, valamint egy állatorvosi klinika és egy rendelő között. Valamennyi helyen lehetőség volt a rossz egészségi állapotban lévő állatok gyógykezelésére. A leggyakoribb tünetek között étvágytalanság, levertség, nyálkahártyafekélyek, orr- és szemfolyás, valamint hasmenés szerepelt. Az elhullott állatok boncolásakor a szájnálkahártya, valamint a vékony- és a vastagbél gyulladást és zsíros májelfajulást lehetett megállapítani. Továbbá elhalásos góccok voltak a májban, a hasnyálmirigyben, a vesékben és a csontvelőben, de tüdőgyulladás és szisztémás érgyulladás is előfordult. A 42 állat mintáján elvégzett, AdV kimutatására alkalmas PCR-rel 41 esetben pozitív eredményt kaptak (38). A szekvenciák alapján megállapították, hogy valamennyi vizsgált teknősben egy, a *Siadenovirus* nemzetségbe sorolható, korábban ismeretlen AdV volt jelen, amelyet szulavézi teknős-adenovírus 1 (STAdV-1) néven írtak le (31). Az antibiotikumából, folyadékpótlásból és esetenként mesterséges táplálásból álló gyógykezelés ellenére a teknősök nagy része 8 héten

belül elhullott, és a teljes állományra vonatkoztatott mortalitás elérte a 82%-ot. Az egyik befogadó helyen később a STAdV-1 jelenlétét két másik teknősfajban, nevezetesen a hátsó-indiai teknős (*Manouria impressa*) két egyedében és egy burmai csillagteknősben (*Geochelone platynota*) is kimutatták (35). A három érintett teknősfaj hasonló típusú élőhelyen él, azonban eredeti elterjedési területük között nincs, vagy minimális az átfedés. A bemutatott esetben a fertőzött szulavézi teknősökkel közös helyiségben, de közvetlen érintkezés lehetősége nélkül tartották az állatokat. A két hátsó-indiai teknős váratlanul, előzetes tünetek nélkül pusztult el két hónappal a szulavézi teknősök bekerülése után. A burmai csillagteknős 19 hónappal a szulavézi teknősök betelepítése után, két hetes étvágytalansággal és levertséggel járó időszakot követően hullott el. Érdekes, hogy mindez már 13 hónappal a vírus behurcolásáért feltehetően felelős szulavézi teknősöknek a gyűjteményből való eltávolítása után történt.

**Az első szialadenovírusokat eredetileg baromfiban mutatták ki**

Az első szialadenovírusokat, amelyeket korábban II. csoportba sorolt madár-adenovírusként tartottak számon, eredetileg baromfiban mutatták ki pulykák vérzéses hasmenése (turkey haemorrhagic enteritis virus = THEV), fácánok márványlépbetegsége, ill. tyúkok lépmegnagyobbodása kapcsán (5). Az eddig egyetlen, békából izolált AdV szintén a *Siadenovirus* nemzetség tagjának bizonyult (15). Az AdV-ok evolúciós múltjának kiderítésére irányuló vizsgálatok során hazai kutatók feltételezték, hogy ez a leszármazási vonal eredetileg a kétéltűekkel együtt fejlődve alakulhatott ki, és baromfiba gazdaváltással juthatott. Ez magyarázhatná a vírus madarakban megfigyelt fokozott kórokozó képességét (7). Az elmúlt évtizedben azonban világszerte a legkülönbözőbb madárrendek képviselőiben találnak egyre gyakrabban újabb szialadenovírusokat. Ugyanakkor célzott vizsgálatokkal sem sikerült egyetlenegy további kétéltűben szialadenovírust kimutatniuk, így ennek a vírusleszármazási vonalnak a gazdaeredetét pillanatnyilag tisztázatlan tekintjük. Az amerikai eset során tapasztalt erős kórokozó hatás miatt valószínűsíthető, hogy az STAdV-1 sem a teknősökkel együtt fejlődött vírus, hanem ebben az esetben is gazdaváltás történt, ahogyan azt szinte valamennyi érintett madárfaj szialadenovírusával kapcsolatban feltételezzük.

**Valószínűsíthető, hogy az STAdV-1 nem a teknősökkel együtt fejlődött vírus**

Magyar kutató közreműködésével adenovírusos fertőzöttséget írtak le Spanyolországban is. Egy magángyűjteményben 3 mór teknős (*Testudo graeca*) hullott el. Az első kettő esetében klinikai tüneteket nem tapasztaltak és diagnosztikai boncolásra sem kerültek. Ezt követően egy 2 éves, rossz kondícióban lévő példány pusztult el, 1 hétig tartó étvágytalansággal és gyengeséggel járó megbetegedés után. Boncolása során száj-, garat- és nyelőcsőgyulladás, valamint bélelzáródást találtak. Kórszövettani vizsgálattal bazofil magzárványokat mutattak ki a garat és a nyelőcső megnagyobbodott hámsajtjeiben. Az elváltozott szervek elektronmikroszkópos vizsgálatával AdV-részecskékre jellemző morfológiájú képleteket figyeltek meg az érintett sejtek megnagyobbodott magjában, ún. parakristályos elrendezésben. PCR segítségével sikerült az AdV genom egy szakaszát felszaporozni, amelynek szekvenciája alapján a jelen lévő vírus az *Atadenovirus* nemzetség új tagjának bizonyult. Az eset érdekessége, hogy az elhullások előtt mintegy két hónappal négy új állat, nevezetesen két görög teknős (*Testudo hermanni*), egy kirgiz (*Testudo horsfieldii*) és egy mór teknős került a gyűjteménybe. Bár a fertőzés pontos eredetét tisztázni nem lehetett, a szerzők azt valószínűsítették, hogy az eredeti állományba újonnan bekerült egyedek valamelyike lehetett a vírus közvetítője (18).

**Mór teknősökben atadenovírusokat is azonosítottak**

Az *Atadenovirus* nemzetség első képviselőinek előfordulását legelőször madarakban és kérődzőkben írták le (4, 6). Ennek a vírusvonalnak a gazdaeredete után kutatva terelődött a figyelem a hüllőkre (19, 20). Célzott vizsgálatokkal sikerült kideríteni, hogy valóban a hüllőkben, pontosabban a pikkelyes

**Hazai kutatócsoportok is azonosítottak teknős-adenovírusokat**

hüllők rendjébe sorolt állatokban (gyíkokban és kígyókban) gyakran található atadenovírusok (26, 37, 38). A hüllők többi rendjének tagjaiban korábban nem találtak atadenovírust.

Az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetének Molekuláris és Összehasonlító Virologia Témacsoportjában több évtizede folyik fogságban vagy vadon élő, házi- és vadállatok, többek között teknősök véletlenszerű szűrése a bennük előforduló DNS-vírusok sokféleségének feltárása céljából. Fél százánál több teknős eredetű minta negatív eredményű vizsgálata után, végül 2008-ban sikerült először egy díszállat-kereskedésben elhullott, fiatal, sárgafülű ékszerteknősben (*Trachemys scripta scripta*) AdV jelenlétét kimutatni. Ezzel a felfedezéssel szinte teljesen azonos időben, a floridai egyetemen hasonló AdV-okat találtak egy vörösfülű ékszerteknősben (*Trachemys scripta elegans*), egy résteknősben (*Malacochersus tornieri*) és négy keleti dobozteknősben (*Terrapene carolina carolina*). Nem sokkal később egy másik hazai kutatócsoport is kimutatott egy új AdV-t egy, a normál hibernációs periódus alatt elhullott, kifejezett díszes dobozteknősben (*Terrapene ornata ornata*), amelynek kórtani vizsgálata során zsíros májelfajulást és zárványos májgyulladást diagnosztizáltak. Az AdV mellett mycoplasmák jelenlétét is megállapították, így az állat elhullása és a vírusfertőzés között közvetlen oki kapcsolatot nem lehetett megállapítani (17).

Jelen közlemény azoknak a célzott PCR-vizsgálatoknak az eredményét foglalja össze, amelyek során különböző budapesti teknősmenhelyek sárgafülű és vörösfülű ékszerteknős állományaihoz az új vírus jelenlétét kíséreltük meg kimutatni (16).

A teknősökből kimutatott AdV-ok szövettenyésztésben történő izolálására irányuló kísérletek mindeddig egyetlen esetben sem jártak eredménnyel.

## SAJÁT VIZSGÁLATOK

A vizsgálatok célja teknős eredetű minták kétkörös (nested) PCR-rel történő szűrése volt AdV-ok jelenlétére. További molekuláris adatokat gyűjtöttünk az AdV-ok gazdaspecificitásának vizsgálatához, valamint gerinces gazdáikkal közös evolúciójukra és a feltételezett gazdaváltásokra vonatkozó hipotézisek tesztelése céljából.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Három budapesti menhelyen befogadott, 44 klinikailag egészséges ékszerteknősből, valamint három mocsári (*Emys orbicularis*) és egy görög teknősből kloákatampon-mintákat gyűjtöttünk. Három elhullott vörösfülű ékszerteknős, valamint egy elhullott mocsári teknős béltartalmát és parenchymás szerveit külön is vizsgáltuk. A minták előkészítését és a nukleinsav feltárását a PCR-vizsgálatokhoz a szokásos módszerekkel (a szervhomogenizátumok felülúszóinak proteinázzal történő emésztését követő guanidin-hidrokloridos kezelés, majd a nukleinsav etanollal történő kicsapása), bélsár esetén az E.Z.N.A. Stool DNA Kit (OMEGA Bio-Tek) használatával végeztük. A PCR-termékek nukleotidsorrendjének meghatározásához és a szekvenciaadatok kezeléséhez, valamint bioinformatikai feldolgozásához szintén korábban ismertetett eljárásokat és programokat vettünk igénybe (2). Az NCBI (National Center for Biotechnology Information) génbankjában található homológ fehérjék és a saját vizsgálatainkból származó aminosav szekvenciák pozicionális illesztését a T-Coffee honlapján (<http://www.tcoffee.org/>) elérhető M-Coffee programmal végeztük a következő beállításokkal: i) páros illesztés: Mmafft pair, ii) többszörös illesztés: Mmafft msa. Az adatainkra legjobb

**A szerzők teknősmintákat vizsgáltak adenovírusok kimutatása céljából**

ban illeszkedő evolúciós modell megállapítására a ProtTest 3.3 programot használtuk maximum likelihood kiindulási fát beállítva. A teszt során kapott, legjobb Akaike-féle információs kritérium (AIC) értékkel jellemzett modell használatával kapott törzsfa egyben vezető faként is funkcionált a végső törzsfa elkészítéséhez. A törzsfa-rekonstrukcióhoz az online elérhető (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) PhyML 3.0 programot alkalmaztuk. A filogenetikai fák utólagos szerkesztésére és megjelenítésére a MEGA6 programot használtuk.

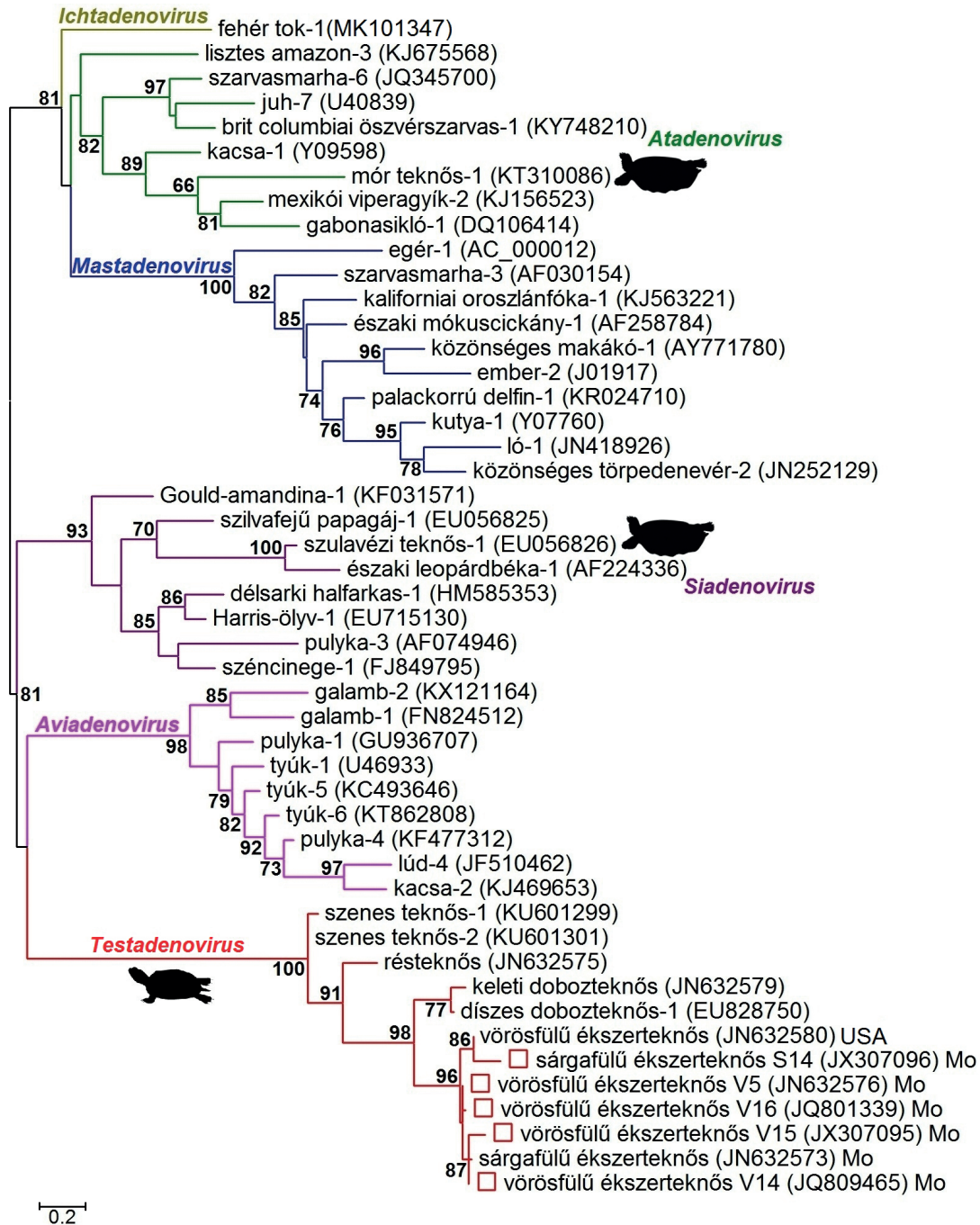
## EREDMÉNYEK

### Vörös- és sárgafülű ékszerteknősben is azonosítottak adenovírusokat

Az adenovírusok DNS-polimeráz génjére irányuló PCR-rel a vizsgált 25 vörösfülű és 22 sárgafülű ékszerteknősből 10, ill. 5 esetben kaptunk pozitív eredményt. A pozitív minták között volt 2 elhullott vörösfülű példány is. A görög és a három mocsári teknős mintája negatívnak bizonyult. A hexon-génből viszont mindössze két esetben, az egyik elhullott vörösfülű ékszerteknős példányból és még egy vörösfülű ékszerteknős mintájából sikerült PCR-terméket kapni. A PCR-termékekből meghatározott, hasznos szekvencia a primerek eltávolítása után a polimeráz (*pol*) gén esetében 275 bp, a hexon-gén esetében 430 bp volt. A *pol*-szekvenciák mindegyike a hazai sárgafülű ékszerteknősben, ill. a Floridában vörösfülű ékszerteknősben talált szekvenciákkal mutatta a legközelebbi rokonságot. A PCR-termékek közvetlen szekvenálása 5 esetben kevert nukleotidsorrendet eredményezett. Az ilyen heterogén PCR-termékek molekuláris klónozása után, több, kissé variálódó szekvencia meglétét lehetett megállapítani. Az egyes variánsok között aminosavsorrend tekintetében 87–100% azonosságot találtunk, míg nukleotidsorrendjük azonossága 77,1–99,7% volt. Az egyes szekvencia-változatokat azonban nem lehetett az egyik vagy másik ékszerteknősalfajhoz rendelni. A hexon-gén esetében a két mintából felerősített szakasz nukleotid- és aminosavsorrendje 100%-ban azonosnak bizonyult. A felerősített DNS-szakaszok G+C aránya a *pol* esetében 51,3–57,1%, míg a hexon-gén esetében 53% volt, ami kiegyensúlyozott bázisösszetételnek tekinthető. A részleges *pol*- és hexon-aminosavszekvenciák alapján számított törzsfarekonstrukciók azt mutatták, hogy a teknősökben talált AdV-ok a hivatalosan elismert öt nemzetségtől határozottan elkülönülő leszármazási csoportot alkotnak az *Adenoviridae* családon belül (1. és 2. ábra). Az ábrákon jól látható, hogy ugyanebbe a kládba tartoznak a Floridában résteknősben és keleti dobozteknyősökben talált AdV-ok, ugyanúgy mint a hazánkban kimutatott díszes dobozteknyős vírusa is (17). A jelen cikkünkben bemutatott számításainkhoz felhasználtuk az eredeti közleményünk (16) megjelenését követően, szintén az Amerikai Egyesült Államokban, szenes teknősből (*Chelonoidis carbonaria*) kimutatott AdV szekvenciákat is, amelyek az NCBI génbankjában a KU601299–601301 elérési számon megtalálhatók (9, nem közölt eredmények). Noha, minden bizonnyal a némileg eltérő adatsor és mintaelemszám miatt, a két génszakasz alapján készült törzsfák topológiája bizonyos eltéréseket mutat, azt egyértelműen megállapíthattuk, hogy az újonnan felfedezett vírusok által képviselt leszármazási vonal az *Adenoviridae* családon belül nemzetség szintű elkülönülést mutat. A kládon belül az egyes vírusok a gazdaeredet szerinti csoportokban jelentek meg, amelyeket feltehetően egy-egy új AdV-fajként lehet majd besorolni. Az AdV-ra pozitívnak talált teknősfajok a Testudinidae vagy az Emydidae családba tartoznak. A teknősgazdák mitokondriális citokróm-b génjének és AdV-aik polimeráz-génjének illesztési alapján készített törzsfák összehasonlítása meglepő hasonlóságot tárt fel (3. ábra).

A törzsek  
egy elkülönülő  
leszármazási  
csoportot alkottak az  
*Adenoviridae*  
családon belül



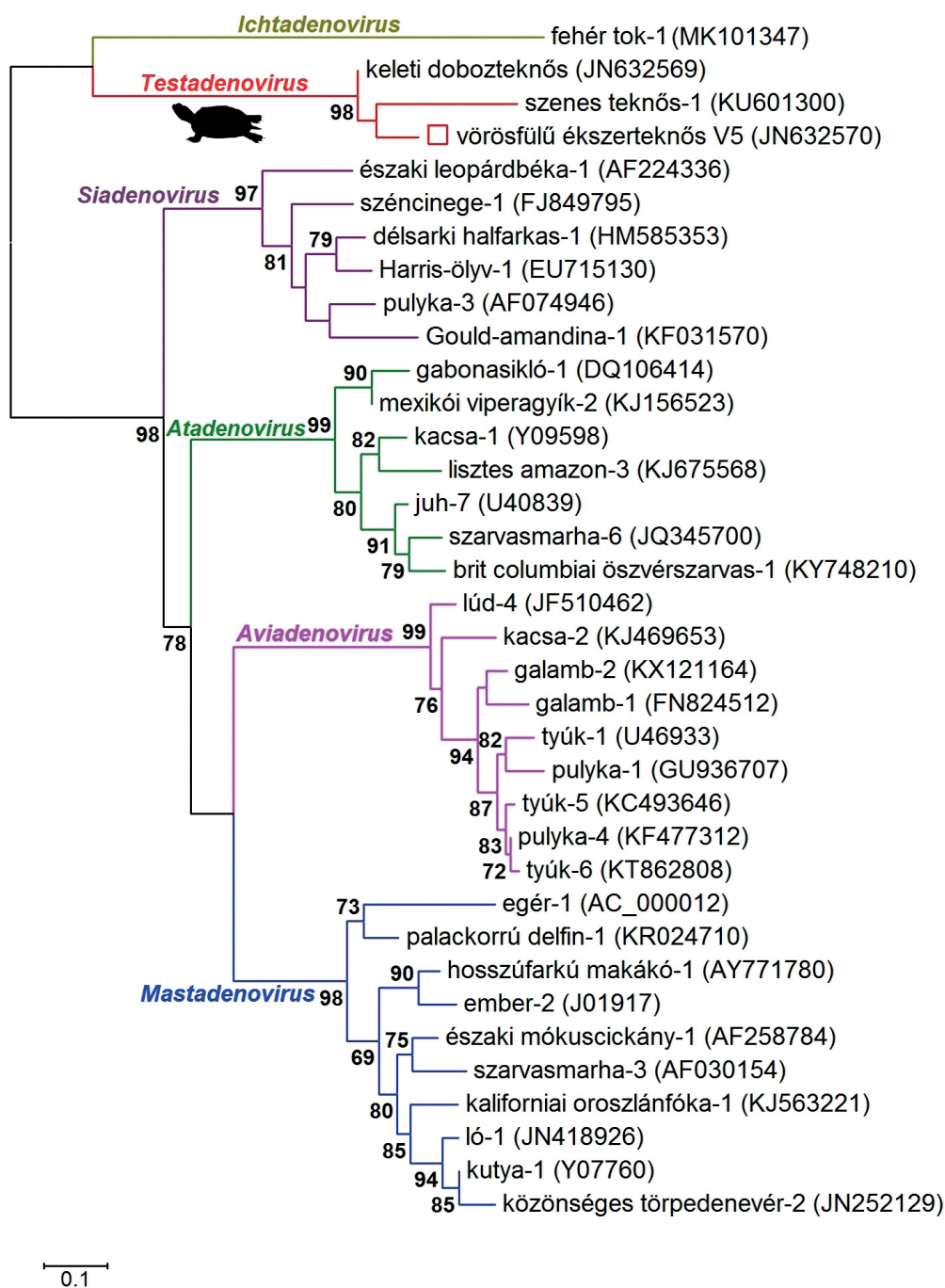


**1. ÁBRA.** Az adenovírusok DNS-polimeráz génjének 91 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer, LG+I+G modell)

Az egyes vírusokat gazdafajuk neve, a szerotípust a szám jelöli. Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio teszttel vizsgáltuk. A teknősökből kimutatott adenovírusok mellett teknős sziluett található. Saját mintáinkat piros négyzetek jelölik. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciónkénti számát mutatja

**FIGURE 1.** Midpoint rooted phylogenetic tree reconstruction calculated on a 91 amino acid-long multiple alignment of the DNA-polymerase gene (maximum likelihood method, LG+G model)

Adenoviruses are represented by the host name and type number. The reliability of the nodes was tested using the Shimodaira–Hasegawa-like approximate likelihood-ratio test. Adenoviruses detected in turtles are signed with silhouettes. Our samples are signed by red squares. The scale bar indicates the number of amino acid substitutions per site

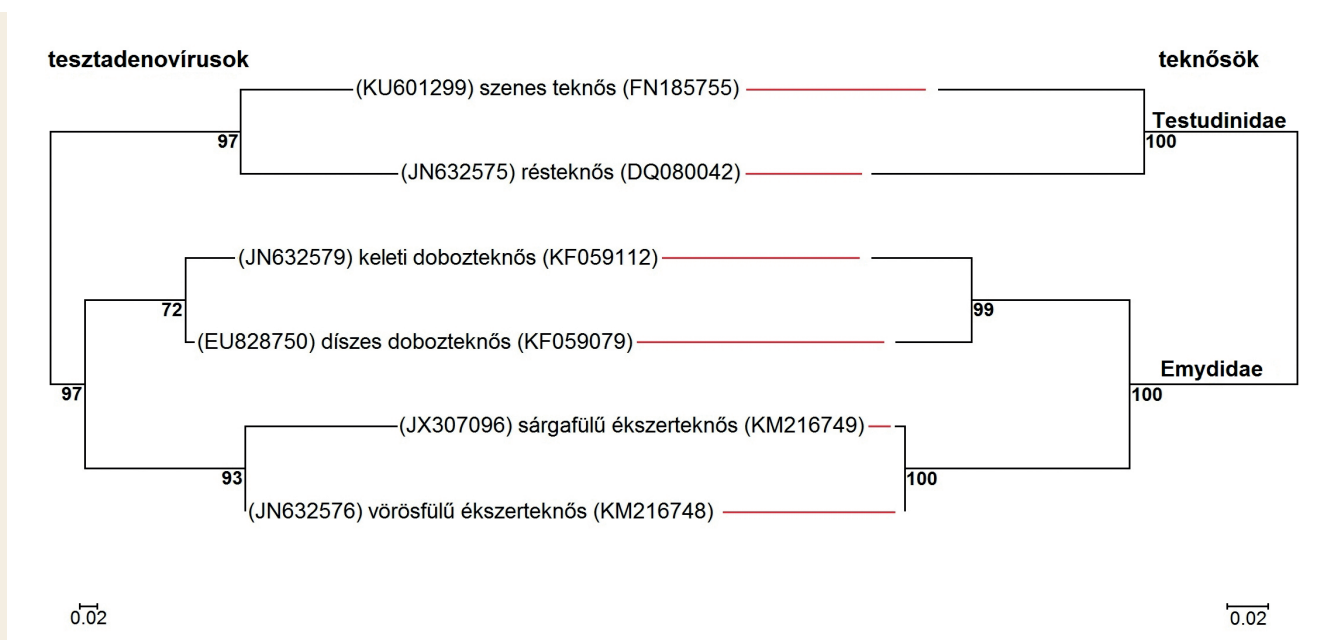


**2. ÁBRA.** Az adenovírusok hexon-génjének 143 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfa-rekonstrukció (maximum likelihood módszer, LG+G modell)

Az egyes vírusokat a gazdafajuk neve, a szerotípust a szám jelöli. Az elágazások megbízhatóságának vizsgálatára Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio tesztet alkalmaztunk. A teknősökből kimutatott adenovírusok mellett teknős sziluett látható. A saját mintánkat piros négyzet jelöli. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciónkénti számát mutatja

**FIGURE 2.** Midpoint rooted phylogenetic tree reconstruction calculated on a 143 amino acid-long multiple alignment of the hexon gene (maximum likelihood method, LG+I+G model)

Adenoviruses are represented by the host name and type number. The reliability of the nodes was tested using the Shimodaira–Hasegawa-like approximate likelihood-ratio test. Our samples are signed by red square. Adenoviruses from turtles are signed using a silhouette. The scale bar on the bottom left represents 10% amino acid composition difference



**3. ÁBRA.** A tesztadenovírusok (balra) és gazdafajaik (jobbra) filogenetikai kapcsolatait ábrázoló törzsfá-rekonstrukciók. A teknősök középpontban gyökereztetett filogenetikai fája a mitokondriális citokróm-b gén 1086 nukleotid hosszúságú illesztett szakasz alapján készült (maximum likelihood módszer, GTR+G modell). Az elágazások megbízhatóságának vizsgálatára Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio tesztet alkalmaztunk. Az ágvégek találkozásainál a gazdafajok neve és piros vonal jelzi a kapcsolatot. A nevek előtt és után a vírus és a gazdafaj szekvenciák génbanki azonosító számát tüntettük fel. A teknősök törzsfája alatt található lépték a nukleotid szubsztitúciók pozíciónkénti számát mutatja.

**FIGURE 3.** Comparison of the phylogenetic trees of testadenoviruses (left) and turtle hosts (right)

Midpoint rooted phylogenetic tree reconstruction of turtle hosts calculated on 1086 nucleotide-long multiple alignment of the mitochondrial cytochrome b genes (maximum likelihood method, GTR+G model). The reliability of the nodes was tested using the Shimodaira–Hasegawa-like approximate likelihood-ratio test. The scale bar at the tree of turtle hosts indicate the number of nucleotide substitutions per site.

## MEGVITATÁS

### A teknősök leszármazása máig sem teljesen tisztázott

A gerinces állattan egyik máig sem teljesen tisztázott kérdése éppen a teknősök (*Testudines*) leszármazásával kapcsolatos (12, 13, 21, 22, 23, 39, 42). A zoológiai és paleontológiai vizsgálatok korábban a legősibb hüllővonalnak (*Anapsida* fejlődési ág) gondolták, azonban a modern molekuláris vizsgálatok eredményei alapján alkotott vélemények szerint a *Diapsida* fejlődési irányhoz tartozó csoport (23, 34, 41), és jelenleg biztosnak tűnik, hogy a krokodilokat és madarakat is magába foglaló *Archosauria* klád testvércsoportja (12; 36), amellyel együtt alkotja az *Archelosauria* kládot (13). Mindenesetre a paleontológiai adatok alapján jelenlegi tudásunk szerint a teknősök legkorábbi képviselői mintegy 220–260 millió évvel ezelőtt már léteztek és feltételezhetően szárazföldi életmódot folytattak (22, 24, 32, 33). Ez egyben megadja az AdV-okkal feltételezett közös fejlődésük időbeli felső határát is.

Ennek a specializálódott testfelépítésű, viszonylag kis fajszerű állatcsoportnak legtöbb képviselője védelemre szorul. Ezért az esetlegesen előforduló vírusfertőzések felderítése, és ennek függvényében a megfelelő óvintézkedések (karantén, állatkerti fajvédelmi és szaporítási programok, élőhelyvédelem, esetleges vakcinázás stb.) bevezetése az önfenntartó teknős-állományok hosszú távú megmaradásában is fontos szerepet játszhat.



Különböző teknősfajokban napjainkig számos DNS- és RNS-vírus előfordulását írták le (1, 25). Annak eldöntése, hogy az adott vírusnak csak átmeneti, passzív hordozója egy állat, vagy aktívan megfertőződő, tényleges gazdája, mind a kutatók, mind a gyakorló állatorvosok számára fontos kérdés lehet. A gazdaspecificitással és a feltételezett gazdaváltással kapcsolatos események nyomaira több víruscsalád (pl. *Herpesviridae*), ill. nemzetség (pl. *Ranavirus*, *Novirhabdovirus*) tagjainak esetében is véltek bizonyítékokat felfedezni (3).

Az *Adenoviridae* család gazdaspektruma széles, így AdV-ok a ma ismert főbb gerinces csoportok legtöbb képviselőjében megtalálhatók. Feltételezésünk szerint az AdV-ok ma látható változatossága alapvetően a gazdával történt koevolúció során alakult ki (7). Ezt alátámasztja az adenovírusok és gazdafajaik törzsfái közötti feltűnő topológiai hasonlóság (19, 27).

Az AdV-ok többségére általában jellemző a szigorú gazdafaj-specifitás, azonban ismerünk olyan AdV-okat is, amelyek több, evolúciós szempontból közeli, vagy ritkábban távolabbi gazdafaj egyedeit is képesek megfertőzni (5). Már több állatcsoport, elsősorban a madarak és kérődzők esetében kimutatták, hogy egyedeik eltérő nemzetségbe tartozó AdV-okkal is fertőződhetnek. Házityúkban például a madarakkal végig együtt fejlődött leszármazási vonalnak tartott aviadenovírusok mellett az *Atadenovirus* és *Siadenovirus* nemzetségbe sorolt vírusok is előfordulhatnak. Kutatócsoportunk elképzelése szerint a két utóbbi vírusnemzetség tagjai gazdaváltással juthattak madarakba, és adaptációjuk eredményeként napjainkra már több madárfaj sikeres fertőzésére is képessé váltak. A gazdaváltáson átesett AdV-ok az új gazdában általában súlyosabb, klinikai betegségben is megnyilvánuló fertőzést okoznak (5, 7, 14). Feltételezzük, hogy a vörösfülű és sárgafülű ékszerteknősökből kimutatott új vírusok az ékszerteknősök saját AdV vonalát képviselik, amelyek hosszú távú, közös evolúció eredményeként alkalmazkodtak e gerinces gazdákhhoz. Ezt a feltételezést támasztja alá az eddig felfedezett tesztadenovírusok és gazdáik filogenetikai rekonstrukciójának nagyfokú hasonlósága is (3. ábra).

Egyelőre nem bizonyított, de rendszeresen megfigyelhető jelenség, hogy a feltételezett gazdaváltáson átesett AdV-ok genomiális DNS-ének bázisösszetétele erősen eltolódik az A+T gazdagság irányába. Ezt tükrözi az *Atadenovirus* genus elnevezése, ugyanis e nemzetség első, alapító képviselőinek, a korábban kettes alcsoportba elkülönített bovin adenovírusoknak, valamint a szárnyasokban patogén EDS-vírusnak a DNS-ében a G+C nukleotidok aránya alig éri el az egyharmadot. Kutatóink hipotézisének megfelelően sikerült feltárni, hogy az ebbe a leszármazási vonalba tartozó AdV-ok valóban a pikkelyes hullőkben gyakoriak, és bázisösszetételük ezekben a gazdáknak kiegyensúlyozott. Az újonnan javasolt *Testadenovirus* nemzetség provizórikus tagjaiból nyert genomiális DNS-szekvenciákban szintén kiegyensúlyozott (45–55% körüli) a G+C arány. Az amerikai adatokat is figyelembe véve megállapítható, hogy két, földrajzilag jól elkülönülő ékszerteknős-állományból kimutatott AdV-ok azonos fejlődési ághoz tartoznak, ami tovább bizonyítja, hogy ez az édesvízi teknősökkel együtt fejlődő leszármazási vonal. A vizsgált egyedek többsége klinikailag egészségesnek látszott, mindössze három minta származott elhullott állatból, de ezek esetében sem lehetett a bennük kimutatott AdV-ok kóroktani hatását bizonyítani. Valószínűbb, hogy az állatok elhulláshoz az AdV mellett más kórokozóval történő felülfertőződés, vagy az immunműködést károsító környezeti hatások vezettek. Az egy-egy egyedben megfigyelt genomvariánsok egyidejű jelenléte az AdV-ok esetén gyakran megfigyelt idült (perzisztens) fertőzés fennállására utalhat.

A korábban leírt sziaadenovírus (STAdV-1) és atadenovírus feltételezésünk szerint gazdaváltás útján jutott a teknősökbe, amelyek azután súlyos tünetek kíséretében megbetegedtek, ill. elhullottak (18, 31). Megjegyzendő, hogy a DNS

**A gazdaváltáson átesett AdV-ok az új gazdában általában súlyosabb megbetegedést okoznak**

**A tesztadenovírusok nagy valószínűséggel együtt fejlődtek a teknősökkel**

**Ezt támasztja alá gazdafajaik filogenetikai viszonyainak nagyfokú hasonlósága is**

**A korábban leírt sziaadenovírus és atadenovírus feltételezhetően gazdaváltás útján jutott a teknősökbe**

**A szerzők javasolták egy új, Testadenovirus nevű adenovírus-nemzetség kialakítását**

kis G+C-tartalma az eddig teljesen vagy részlegesen szekvenált valamennyi sziadenovírus esetén megfigyelhető volt. Ez érvényes a pulykák vérzéscsillapítóját okozó THEV-re, a békából izolált AdV-ra, és számos, vadmadárból nyert teljes vagy részleges sziadenovírus-genomra is. Helytállóan tűnik a feltételezés, hogy ennek az AdV-vonalnak az eredete nem a jelenleg ismert gazdáiban keresendő.

A részleges szekvenciák és törzsfa-rekonstrukciók alapján megállapítottuk, hogy az újonnan felismert vírusok a jelenleg hivatalosan elfogadott öt AdV nemzetségtől világosan elhatárolódó csoportot alkotnak, amelynek fajszintű elkülönítése indokolt. Javaslatot tettünk egy új, hatodik nemzetség megalapításra az *Adenoviridae* családon belül *Testadenovirus* névvel (16). A név utal az ide sorolható vírusok gazdáinak rendszertani csoportjára, nevezetesen a Testudinoidea szuper családra. Az új AdV nemzetség hivatalos jóváhagyásához azonban szükséges lenne legalább egy képviselőjük teljes genomjának nukleotidszortírozását meghatározni. Mivel az újonnan kimutatott AdV-ok egyikét sem sikerült sejtenyészetben izolálni, jelenleg a PCR-rel nyert fragmentumok szekvenciáiból tervezett, specifikus primerek használatával törekszünk a teljes genom megismerésére. A javasolt új genuson belül legalább négy új AdV-faj kialakítása is időszerű lesz, az ékszerteknősök, dobozteknősök, résteknősök és szenes teknősök vírusai számára (1. ábra). A Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) *Adenoviridae* munkacsoportjának ajánlása szerint az AdV-fajok elkülönítéséhez több feltétel figyelembe vétele, és lehetőleg minél hosszabb genomszakaszok, ideális esetben teljes gének szekvenciájának ismerete szükséges. Tehát a teknős AdV fajok kialakításának javaslatához is további szekvenciák meghatározására lesz szükség.

Hazánk egyetlen őshonos teknősfajában, a mocsári teknős egyedekben AdV-os fertőzöttség előfordulását még nem mutatták ki, noha az invazívnak nyilvánított ékszerteknősökkel együtt az Emydidae családba tartozik. Az általunk használt diagnosztikai módszerekkel a jövőben érdemes az állatorvosi vizsgálatra kerülő mocsári teknős egyedek alkalomszerű szűrése.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás anyagi háttérét részben az NN128309 pályázati támogatása biztosította.

## IRODALOM

- ARIEL, E.: Viruses in reptiles. *Vet. Res.*, 2011. 42. 100.
- BALLMANN M. Z. – VIDOSZKY M. Z.: Tág gazdaspektrumú psittacin adenovírus (PsAdV-2) kimutatása különböző papagájfajok hazai egyedekben. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2013. 135. 78–84.
- BANDÍN, I. – DOPAZO, C. P.: Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates. *Vet. Res.*, 2011. 42. 67.
- BARTHA, A.: Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1969. 19. 319–321.
- BENKŐ M.: Az adenovírusok megújult rendszertana az evolúciós viszonyokat tükrözi (Irodalmi áttekintés). *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2004. 126. 205–211.
- BENKŐ, M. – HARRACH, B.: A proposal for a new (third) genus within the family *Adenoviridae*. *Arch. Virol.*, 1998. 143. 829–837.
- BENKŐ, M. – HARRACH, B.: Molecular evolution of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2003. 272. 3–35.
- BÖHM, M. – COLLEN, B. et al.: The conservation status of the world's reptiles. *Biol. Conserv.*, 2013. 157. 372–385.
- BROWN, L. C. – KRAUSE, K. J. et al.: Characterization of a novel testadenovirus in a red-footed tortoise (*Chelonoidis carbonaria*). Nem közölt eredmények. Génbanki elérhetőség: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU601299.1>)
- CADI, A. – DELMAS, V. et al.: Successful reproduction of the introduced slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) in the South of France. *Aquat. Conserv.*, 2004. 14. 237–246.
- CADI, A. – JOLY, P.: Competition for basking places between the endangered European pond turtle (*Emys orbicularis galloitalica*) and the introduced red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Can. J. Zool.*, 2003. 81. 1392–1398.
- CHIARI, Y. – CAHAIS, V. et al.: Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biol.*, 2012. 10. 65.
- CRAWFORD, N. G. – PARHAM, J. F. et al.: A phylogenomic analysis of turtles. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2015. 83. 250–257.

14. DAVISON, A. J. – BENKŐ, M. – HARRACH, B.: Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.*, 2003. 84. 2895–2908.
15. DAVISON, A. J. – WRIGHT, K. M. – HARRACH, B.: DNA sequence of frog adenovirus. *J. Gen. Virol.*, 2000. 81. 2431–2439.
16. DOSZPOLY, A. – WELLEHAN, J. F. X. 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.*, 2013. 17. 106–112.
17. FARKAS, S. L. – GÁL, J.: Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. *Vet. Microbiol.*, 2009. 138. 169–173.
18. GARCIA-MORANTE, B. – PÉNZES, J. J. et al.: Hyperplastic stomatitis and esophagitis in a tortoise (*Testudo graeca*) associated with an adenovirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2016. 28. 579–583.
19. HARRACH, B.: Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Vet. Hung.*, 2000. 48. 485–490.
20. HARRACH B. – BENKŐ M.: Miért provokálnak vitát még ma is az Áldásy által több mint 30 éve izolált adenovírusok? *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1998. 120. 650–651.
21. HEDGES, S. B.: Amniote phylogeny and the position of turtles. *BMC Biol.*, 2012. 10. 64.
22. JOYCE, W. G. – GAUTHIER, J. A.: Palaeoecology of triassic stem turtles sheds new light on turtle origins. *Proc. Biol. Sci.*, 2004. 271. 1–5.
23. LEE, M. S.: Palaeontology: turtles in transition. *Curr. Biol.*, 2013. 23. R513–515.
24. LI, C. – WU, X. C. et al.: An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature*, 2008. 456. 497–501.
25. MARSCHANG, R. E.: Viruses infecting reptiles. *Viruses*, 2011. 11. 2087–2126.
26. PAPP, T. – FLEDELIUS, B. – SCHMIDT, V. – KAJÁN, G. L. – MARSCHANG, R. E.: PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus. *Vet. Microbiol.*, 2009. 134. 233–240.
27. PODGORSKI, I. I. – PANTÓ, L. – FÖLDES, K. – DE WINTER, I. – JÁNOSKA, M. – SÓS, E. – CHENET, B. – HARRACH, B. – BENKŐ, M.: Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus-host co-evolution. *Acta Vet. Hung.*, 2018. 66. 474–487.
28. POLO-CAVIA, N. – LÓPEZ, P. – MARTÍN, J.: Aggressive interactions during feeding between native and invasive freshwater turtles. *Biol. Invasions*, 2011. 13. 1387–1396.
29. PUPINS, M.: First report on recording of the invasive species *Trachemys scripta elegans*, a potential competitor of *Emys orbicularis* in Latvia. *Acta Univ. Latv.*, 2007. 723. 37–46.
30. RHODIN, A. G. J. – STANFORD, C. B. et al.: Global conservation status of turtles and tortoises (order Testudines). *Chelonian Conserv. Bi.*, 2018. 17. 135–161.
31. RIVERA, S. – WELLEHAN, J. F. X. JR. et al.: Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2009. 21. 415–426.
32. SCHEYER, T. M. – SANDER, P. M.: Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles. *Proc. Biol. Sci.*, 2007. 274. 1885–1893.
33. SCHOCH, R. R. – SUES, H. D.: A Middle Triassic stem-turtle and the evolution of the turtle body plan. *Nature*, 2015. 523. 584–587.
34. SCHOCH, R. R. – SUES, H. D.: The diapsid origin of turtles. *Zoology*, 2016. 119. 159–161.
35. SCHUMACHER, V. L. – INNIS, C. J. et al.: Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*). *J. Zoo. Wildlife Med.*, 2012. 43. 501–510.
36. SHAFFER, H. B. – MCCARTNEY-MELSTAD, E.: Phylogenomic analyses of 539 highly informative loci dates a fully resolved time tree for the major clades of living turtles (Testudines). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2017. 115. 7–15.
37. SZIROVICZA, L. – LÓPEZ, P. – KOPENA, R. – BENKŐ, M. – MARTÍN, J. – PÉNZES, J. J.: Random sampling of squamate reptiles in Spanish natural reserves reveals the presence of novel adenoviruses in lacertids (Family Lacertidae) and worm lizards (Amphisbaenia). *PLoS One*, 2016. 11. e0159016.
38. WELLEHAN, J. F. X. – JOHNSON, A. J. – HARRACH B. – BENKŐ M. et al.: Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J. Virol.*, 2004. 78. 13366–13369.
39. WERNEBURG, I. – SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R.: Timing of organogenesis support basal position of turtles in the amniote tree of life. *BMC Evol. Biol.*, 2009. 9. 82.
40. WILKINSON, R.: Clinical pathology. In: McARTHUR, S. – WILKINSON, R. – MEYER, J. (Eds.), *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell Press. Oxford, UK, 2004. 141–186.
41. ZARDOYA, R. – MEYER, A.: Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95. 14226–14231.
42. ZARDOYA, R. – MEYER, A.: The evolutionary position of turtles revised. *Naturwissenschaften*, 2001. 88. 193–200.
43. [http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/summarystats/2018-1\\_Summary\\_Stats\\_Page\\_Documents/2018-1-RL-Stats\\_Table\\_4a.pdf](http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/summarystats/2018-1_Summary_Stats_Page_Documents/2018-1-RL-Stats_Table_4a.pdf)
44. <http://www.iucnredlist.org>
45. <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>

Közlésre érkk.: 2019. júl. 9.