

# **TDK DOLGOZAT**

**Berta Péter Patrik  
2023**

**Állatorvostudományi Egyetem  
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék**

**Magyar Kutatási Hálózat  
Állatorvostudományi Kutatóintézet**



**Teknősök herpesz- és adenovírusainak kimutatása és genetikai  
összehasonlító vizsgálata**

Detection and comparative genetic characterisation of herpes- and  
adenoviruses in turtles

Készítette:

**Berta Péter Patrik**

Témavezető:

**Dr. Papp Tibor**, PhD, tudományos főmunkatárs  
Magyar Kutatási Hálózat, Állatorvostudományi Kutatóintézet

Belső konzulens:

**Dr. Marosi András**, állatorvos-doktor, PhD, egyetemi adjunktus  
Állatorvostudományi Egyetem, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest, 2023

# Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke.....	2
2	Irodalmi áttekintés.....	3
2.1	A teknősök, mint állatcsoport .....	3
2.2	Adenovírusok.....	4
2.3	Herpeszvírusok .....	7
3	Célkitűzések .....	10
4	Anyag és módszer .....	11
4.1	A minták eredete és gyűjtése .....	11
4.2	DNS-kivonása a mintákból .....	12
4.3	Polimeráz láncreakció (PCR).....	12
4.4	Agaróz gélelektroforézis .....	14
4.5	PCR-termékek tisztítása, előkészítése a szekvenáláshoz.....	15
4.6	DNS-szekvenálás .....	15
4.7	Bioinformatikai és filogenetikai vizsgálatok .....	16
5	Eredmények.....	17
6	Megbeszélés .....	22
6.1	Herpeszvírus kimutatások.....	23
6.2	Adenovírus kimutatások .....	24
7	Összefoglalás.....	30
8	Summary .....	31
9	Irodalomjegyzék.....	32
10	Köszönetnyilvánítás .....	37

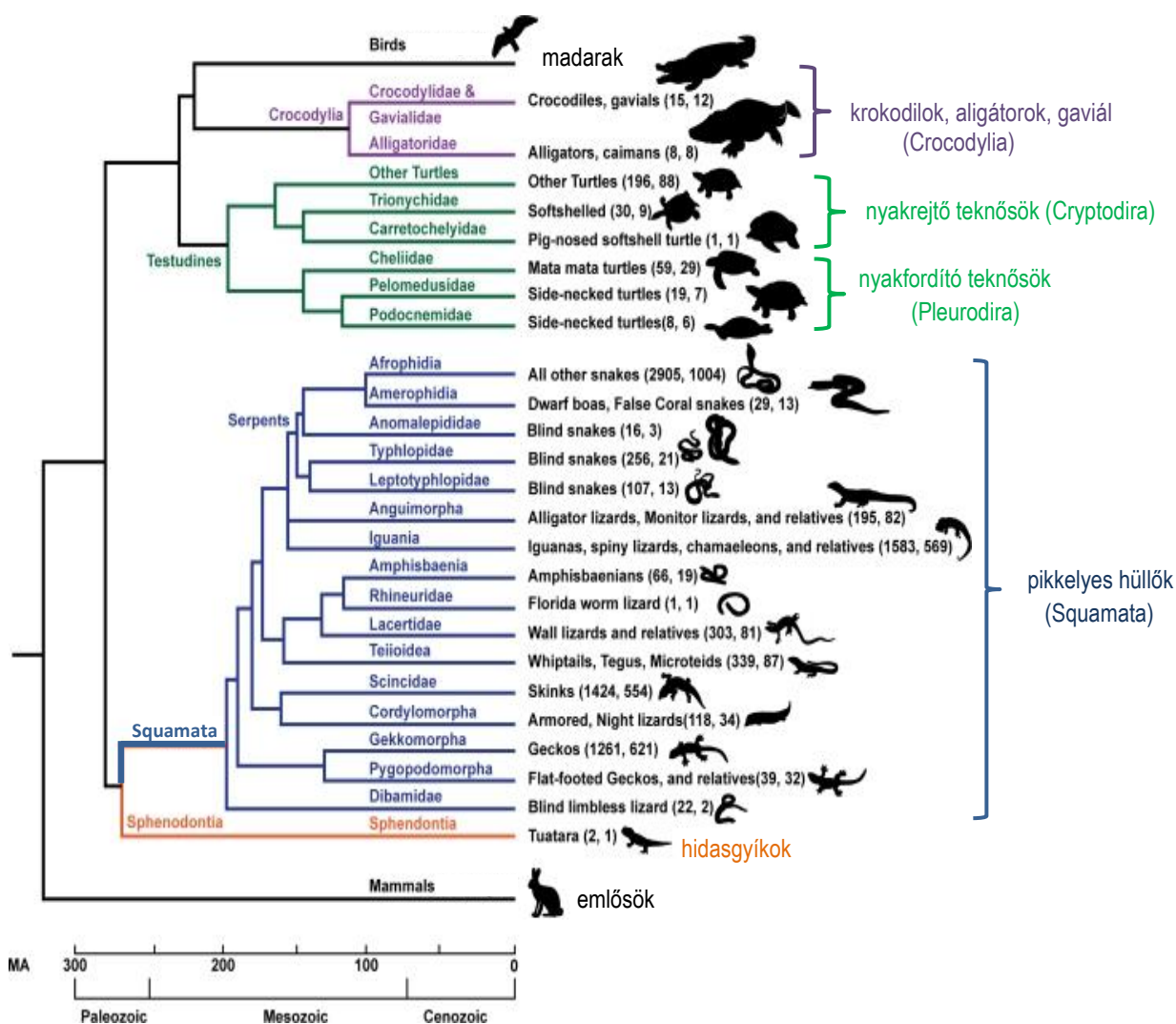
# 1 Rövidítések jegyzéke

AdV	adenovírus
AtAdV	atadenovírus
ÁTKI	Állatorvostudományi Kutatóintézet
bp	bázispár
BoHV-4	szarvasmarha herpeszvírus 4
ChHV	chelonid herpesvirus
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDS	egg drope syndrome
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
IUPAC	Internatinal Union of Pure and Applied Chemistry
kbp	kilobázispár
LAdV	lizard adenovirus
LETD	lung-eye trachea disease
LETV	lung-eye-trachea-disease-associated virus
LGRV	loggerhead genital-respiratory herpesvirus
LOCV	loggerhead orocutaneous herpesvirus
ML	maximum likelihood
NGS	next generation sequencing= új generációs szekvenálás
nm	nanométer
PAdV	porcine adenovirus
PBS	phosphate-buffered saline=foszfáttal pufferolt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction= polimeráz-lánreakció
RESAdV-1	red-eared slider adenovirus 1
rpm	revolutions per minute= percenkénti fordulatszám
SnAdV	snake adenovirus
TAdV-3	pulyka adenovírus 3
TAE	trisz-acetát-EDTA
TeV	testudinid herpesvirus
THEV	turkey hemorrhagic enteritis virus

## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 A teknősök, mint állatcsoport

A teknősök (Testudines) egy evolúciósan és morfológiailag is egyedülálló kládot alkotnak a gerinces állatokon belül [1]. Ősi mivoltuk mellett, a nagy mennyiségben talált, jó állapotban megőrződött fossziliáknak köszönhetően jól ismert csoportnak tekinthetők [2]. A maradványok alapján a ma élő teknősök ősei körülbelül 220 millió évvel ezelőtt jelentek meg, a késő Perm vagy a kora Triász időszakában az első dinoszauruszokkal együtt [3]. A klád korához képest azonban rendkívül alacsony faji diverzitás jellemzi őket [1], s mindössze 356 ma élő faj tartozik a teknősök rendjébe [4] (1. ábra).



**1. ábra:** A klasszikus értelemben vett (nem madár) hüllők - földtörténeti korokra vetített - filogenetikai fája, a „10.000 gerinces genom projekt” kutatói szerint [5]. Az angol nevek utáni számok a ma élő fajokat (2009-es adat) és közülük a projektben mintaként kiválasztottakat jelölik.

Evolúciójuk során meghódították a tengervízi, az édesvízi és a szárazföldi élőhelyeket egyaránt [1, 6]. Antarktikut leszámítva az összes kontinensen megtalálhatók, legnagyobb fajgazdagság Észak-Amerikára és Ázsiára jellemző. Táplálkozásukat tekintve vannak obligát növényevők, obligát húsevők is, de legtöbbjük a mindenevők közé sorolható. Alapvetően ezek a fajok a táplálék szezonális elérhetősége szerint fogyasztanak állati eredetű és növényi eredetű táplálékot is, de csupán növényi részek fogyasztásával is képesek túlélni [7].

A ma élő teknősök két alrendbe oszthatók. A Pleurodira alrend tagjai a fejüket oldalra hajtva képesek azt hátpáncéljuk védelmébe rejteni, míg a Cryptodira csoport képviselői a páncélba visszahúzva helyezik biztonságba fejüket veszély esetén [1, 7].

Testfelépítésük jellegzetessége miatt talán a legkarakterisztikusabb gerinces állatok. Különlegességüket páncélozott testüknek köszönhetik, melyet a carapax (hátpáncél) és a plastron (haspáncél) alkot, a két részt laterálisan a híd köti össze [1]. A páncél jelentős védelmet nyújt a ragadozókkal szemben, fontos szerepe van a termoregulációban és lehetőséget teremt víz, zsír és ásványi anyagok raktározására [8].

A legtöbb teknősfajt veszélyeztetett állatként tartják számon. 2020-ra az összes faj több mint felét fenyegeti a kihalás, az élőhelyük elpusztítása, a termőterületek túlzott kizsákmányolása, állatkereskedelem és a klímaváltozás következtében. Az 1990-es évektől kezdődően létrejöttek a teknősök védelmével foglalkozó szervezetek, tudományos folyóiratok, melyek igyekeznek felmérni és megakadályozni ezt a folyamatot [7, 9].

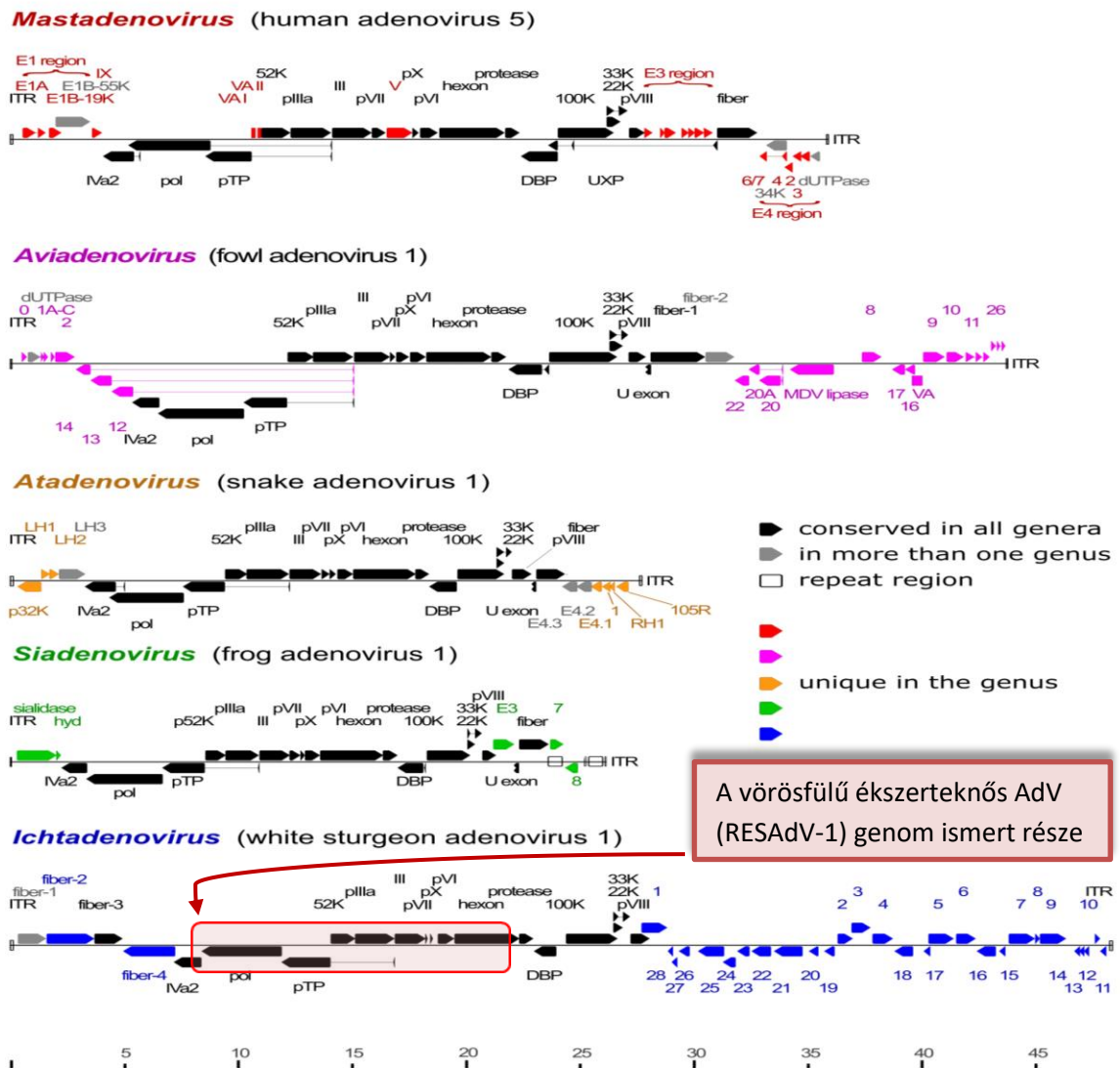
## 2.2 Adenovírusok

Az *Adenoviridae* család tagjai burokkal nem rendelkező ikozahedrális vírusok, melyek gerinces állatok sejtmagjában replikálódnak. Kapszidjuk hexonokból és pentonokból épül fel. A hexon az adenovírusok (AdV) fő szerkezeti fehérjéje, a kapszid lapjait ezekből összesen 240 db határolja. A pentonnak nevezett fehérjeegység a pentonbázisból és az abból antenناسzerűen kinyúló fiberből épül fel, és az ikozaéder 12 csúcsát alkotja. A fiber, a hexon és a penton a három legjelentősebb AdV-ban talált antigén is egyben [10–12]. Virionjaik 90–100 nm-es nagyságúak, örökítőanyaguk lineáris, duplaszálú, 26–45 kilobázispár (kbp) hosszúságú DNS, mely alapján a közepes méretű DNS-vírusok közé sorolhatóak [13].

Az *Adenoviridae* családon belül jelenleg 6 nemzetséget különítünk el [13]. A *Mastadenovirus* genus tagjai csak emlősállatokban fordulnak elő, hasonlóképpen az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozók csak madarakat fertőznek [14]. Az *Ichtadenovirus* genusba jelenleg az egyetlen ismert hal-adenovírus tartozik, melyet fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) sikerült kimutatni [15]. Két nemzetség tagjai gazdaállatok szélesebb körében, azaz több gerinces osztályban is megtalálhatók. Az *Atadenovirus* nemzetség egyes tagjai kérődző, madár vagy erszényes gazdával rendelkeznek, de legnagyobb számban a pikkelyes hüllők (Squamata) rendjének tagjaiban fordulnak elő. E vírusnemzetség kialakulása a hüllők ezen rendjével koevolúcióban valószínűsíthető, míg a homeotherm gerincesekben történő megjelenésük több korai gazdafajváltás és hosszú adaptáció eredményeként jöhetett létre. A teknősökből történő sporadikusan kimutatott atadenovírusok ugyanakkor valószínűleg közelmúltbeli (recens) gazdaváltás eredményei lehetnek, akár fogságban együtt tartott pikkelyes hüllőktől fertőződve [16, 17]. A *Siadenovirus* genusba főként madarakat fertőző vírusok tartoznak [14], valamint egyik elsőként leírt képviselőjüket leopárdbékából (*Lithobates pipiens*) sikerült kimutatni [18]. E nemzetség esetében ezidáig nem volt kimutatható koevolúciós mintázat egyik gazdacsoporttal sem. Korábban csempészett Forsten-teknősből (*Indotestudo forstenii*) detektáltak egy súlyos patológiai elváltozásokat okozó siadenovírust. A vírus képes volt átterjedni az elkobzott állatokról az ideiglenes befogadónál elhelyezett egyéb teknősfajokra is. A fertőződés a legtöbb esetben az állatok elhullásával járt [14, 19].

A közelmúltban egy új adenovírus leszármazási vonalat fedeztek le magyar és amerikai kutatók, melybe teknős gazdával rendelkező vírusok sorolhatók. Ennek megfelelően egy hatodik, ún. *Testadenovirus* genust is létrehozta az *Adenoviridae* családon belül [20, 21]. Ezek a vírusok nagy valószínűséggel koevolúcióban fejlődtek a *Testudines* rend tagjaival. Patológiai elváltozások nem voltak köthetőek a kórokozó jelenlétéhez, ami szoros, hosszú távú adaptációt feltételez, ezzel is újabb bizonyítékot nyújtva eredetüket illetően. Ezen vírusok *in vitro* izolálására vagy teljes-genomszekvenálására irányuló törekvések azonban még nem vezettek eredményhez. Jelenleg csupán egyetlen elfogadott vírusfaj (*Pond slider testadenovirus A*) van. E fajba a vörösfülű ékszerteknős adenovírus 1 típusa (red-eared slider AdV-1; RESAdV-1) tartozik, melynek IVa2 géntől a hexon génig terjedő mintegy 16 kb-nyi szekvenciája áll rendelkezésre (**2. ábra**), s a *Testadenovirus* genus létesítésére történő javaslat ezen részleges genomszekvencia ismeretében került elfogadásra [14, 21, 22].

Az fentebb felsorolt öt nemzetségre jellemző, ami valószínűleg a hatodik *Testadenovirus* genus tagjai esetében is megfigyelhető lesz majd, hogy a vírusgenom középső részét képező, jól megőrzött (konzervált) sorrendű és funkciójú génektől (lásd a **2. ábrán** feketével jelölve) balra és jobbra, vagyis a genomvégeken, helyeződő régiók génjei sokkal változatosabbak mind számukban, mind szerepüket tekintve. E gének általában nemzetség-specifikusnak tekinthetők (**2. ábra**).



**2. ábra:** Az egyes adenovírus nemzetségekre jellemző genom-szerveződések térképe. A nyilakkal jelölt gének mindkét DNS szálon kódoltak, így lehetnek jobbra (R) vagy balra (L) átíródóak, amint az ábrán is látható. Az egyes gének színe megőrzöttségük fokát jelöli. Fekete nyilakkal jelölték a minden genusban jelen lévőket, szürkével a több, de nem minden nemzetségben előfordulókat, míg színes nyilakkal a nemzetség-specifikus géneket jelölték. Az ábra alján lévő „vonalzó” a genomok hosszát jelzi kbp-ban kifejezve [21]. Az egyetlen, jelenleg teljes génszekvenciával jellemzett testadenovírus (RESAdV-1) már megismert genomrészletét a hal-adenovírus genomra vetítve (halvány piros háttér) jelöltem [22]



Hüllőkben AdV okozta megbetegedést leggyakrabban gyíkfélékben [23, 24], főképp agámákban azonosítják [25, 26], de kígyókban [12, 14, 27, 28], teknősökben [14, 16, 17, 19–21, 29], sőt krokodilokban [12, 30] is időről-időre detektálják. Teknősökben patológiai vizsgálattal multifokális májnekrozist, diffúz májlipidózist, a csontvelőben myeloid nekrozist és heveny nekrotizáló enterocolitist mutattak ki. Kórszövettani vizsgálattal a májsejtek degenerációját, a citoplalmájukban vakuolizációt, piknotikus sejtmagokat és magzárványokat detektáltak [12, 17, 19, 29].

### 2.3 Herpeszvírusok

A herpeszvírusok a *Herpesvirales* rendbe tartozó lineáris duplaszálú, kb. 125-260 kbp DNS genommal rendelkező vírusok. Ikozahedrális nukleokapszidjukat a fertőzött sejt citoplazmatikus membránrendszeréből származó összetett felépítésű burok veszi körül. A herpeszvírusok többnyire a sejtmagban replikálódnak és képesek látenciába kerülni természetes gazdáikban [31].

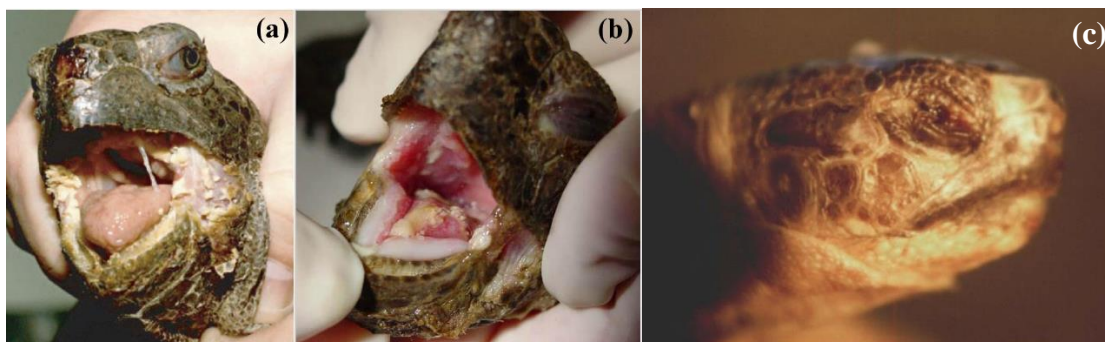
A hüllőket, így a teknősöket fertőző herpeszvírusok az *Orthoherpesviridae* család *Alphaherpesvirinae* alcsaládjába, azon belül a *Scutavirus* genusba tartoznak [31, 32]. A fenti genus jelenleg 2 fajt foglal magában: a *Scutavirus chelonidalpha5*-öt, korábbi ismertebb nevén chelonid alphaherpesvirus 5-öt (ChHV-5) és a *Scutavirus testudinidalpha3*-at, korábbi nevén testudinid alphaherpesvirus 3-at (TeHV-3) [14] (3. ábra). A chelonid alphaherpesvirus 6 (ChHV-6) szintén az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozik, de besorolása jelenleg még bizonytalan [31, 32].

A legismertebb humán alphaherpeszvírus fertőzések kórfejlődése jellegzetes mintát követ. Négy-hat nappal a bőrbe vagy a nyálkahártyába történő behatolása után a vírus szaporodik a hámsejtekben, sejtlízist és gyulladást okozva, mely általában hólyagok képződésével jár. Ezután a vírus az érzőidegeken felfelé haladva eléri a dorzális gyökérganglionokat, s itt alakul ki a látencia. A reaktiváció során a ganglionokban történő replikációt retrográd axonális terjedés követi a perifériás szenzoros idegeken keresztül más bőrfelületekre [19].

A herpeszvírusok közül több állategészségügyi jelentőséggel bíró megbetegedést okoz teknősökben [32, 33]. A chelonid alphaherpesvirus 5-tel kapcsolatban a kutatások rávilágítottak a Cheloniidae családba tartozó tengeri teknősökben előforduló fibropapillomatosis betegséggel való kapcsolatára. A lung-eye-trachea-disease-associated



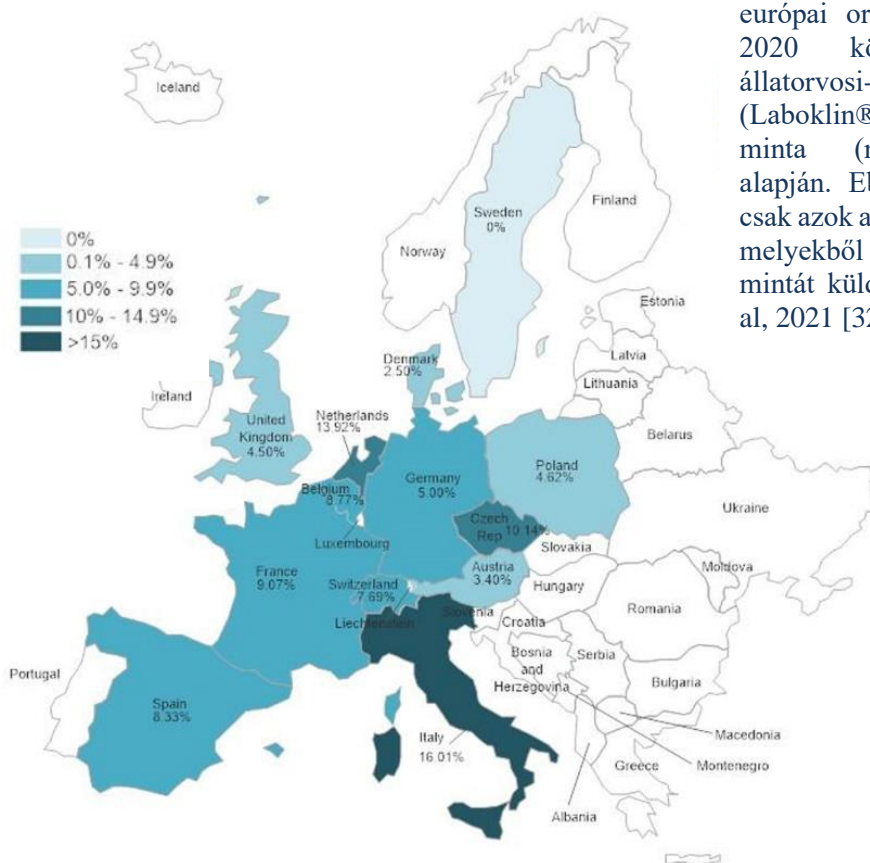
Szárazföldi teknősökben szintén több herpeszvírust leírtak már. Legismertebb közülük a szárazföldi teknősök (Testudinidae) családjába tartozó fajokban kimutatott testudinid alphaherpesvirus 3 (TeHV-3), melynek genomja teljes terjedelmében szekvenálásra került. A TeHV-3-at már sok szárazföldi teknősféléből (Testudinidae) kimutatták [32, 35], például görög teknősből (*Testudo hermanni*) és mór teknősből (*Testudo graeca*). A fertőzött állatokban apátia, anorexia, orrfolyás és orális léziók voltak megfigyelhetőek [32]. Sok más genetikailag megkülönböztethető herpeszvírus is leírásra került szárazföldi teknősökben. Ide sorolható a testudinid herpesvirus 1, 2 és 4 (TeHV-1, -2, és -4), melyek kevésbé kutatottak, mint a TeHV-3. A TeHV-1-et eredetileg Japánból importált résteknősben (*Malacochersus tornieri*) és kirgiz teknősben (*Testudo horsfieldii*) írták le [32, 36]. Ez a vírus Európában kirgiz teknősökből kerül leggyakrabban kimutatásra, de más fajú teknősök megbetegítésére is képes [32, 37]. TeHV-2-t elsőként fogságban tartott kaliforniai üregteknősből (*Gopherus agassizii*) [38], míg a TeHV-4-et csőrösmellű teknősből (*Chersina angulata*) és leopárd teknősből (*Stigmochelys pardalis*) mutattak ki [39, 40].



**4. ábra:** Testudinid alphaherpesvirus 2 és 3 (TeHV-2, -3) okozta patológias elváltozások [38, 41]  
 (a, b) Vérzéses rhinitis (a) és szájüregi difteriás plakkok (a, b) kaliforniai üregteknősben.  
 (c) Súlyos kötőhártya-gyulladás görög teknősnél. A sűrű váladék nehezíti a szemhéjak kinyitását.

A herpeszvírusok vertikális, horizontális és mechanikai úton egyaránt terjedhetnek a fogékony egyedek között [31, 42, 43]. Tengeri teknősökben gyakran bőrelváltozásokat, például papillomatózus tumoros elváltozásokat vagy szürkés színű papuláris léziókat okoznak [42]. Emellett az LETD-ben szenvedő állatoknál pneumonia, stridor és a szemeken valamint a felső légutakban jelentkező felrakódások figyelhetőek meg [31]. Édesvizekben élő teknősök esetén májnekrozis, proliferatív vagy ulceratív elváltozások voltak láthatók az állatok bőrén és páncélján [44, 45]. Szárazföldi teknősökben ulceratív szájgyulladást, diphteroid és nekrotizáló szájgyulladást (4/a,b. ábra), conjunctivitist (4/c. ábra), glissitist,

rhinitist (**4/a. ábra**), nehézlégzést, illetve a máj és az idegrendszer megbetegedésére utaló tüneteket, letargiát, anorexiát és nyaki ödémát is észleltek már a kutatók. Egyes esetekben a fertőződés halálos kimenetelűnek bizonyult [31, 33, 46, 47]. Ugyanakkor viszonylag nagyarányú (3-15%) tünetmentes PCR-pozitivitás (látens hordozás) volt kimutatható egyes európai országok teknős gyűjteményeiben (**5. ábra**) [32], sajnos Magyarországról nem közöltek sem itt, sem máshol hasonló adatokat.



**5. ábra:** Teknős herpeszvírus-pozitivitási arányok az egyes európai országokból, a 2016 és 2020 között, egy német állatorvosi-diagnosztikai céghez (Laboklin®) beküldött nagyszámú minta (n=4797) eredményei alapján. Ebben az összevetésben csak azok az országok szerepelnek, melyekből 50 vagy annál több mintát küldtek be. Leineweber et al, 2021 [32] publikációjából.

### 3 Célkitűzések

Kutatásom céljaként az ÁTKI Molekuláris Virologiai Témacsoport gyűjteményében lévő, még fel nem boncolt teknős-tetek adenovírusainak és herpeszvírusainak vizsgálatát tűztem ki. Az említett vírusok kimutatása és azok genetikai vizsgálatán keresztül rokonsági kapcsolataik és faji sokszínűségük felderítése tartozott céljaim közé, szem előtt tartva a gazdafaj és vírusa közötti koevolúciós kapcsolatok feltérképezését is.

## 4 Anyag és módszer

### 4.1 A minták eredete és gyűjtése

Különböző fajú, állatkereskedésből származó elhullott, emellett hobbiállatként tartott egyedek, illetve egy természetből befogott állat szolgált mintaként kutatásomhoz. Az elhullott állatok szerveiből (garattájék szervei, tüdő, szív, gyomor, vékony- és vastagbelek, máj, vesék, nemi szervek), élő állatok esetén garat-illetve kloáka-tampon mintákból végeztük a DNS-kivonást. Összesen 33 egyedet vizsgáltunk. A minták állatfajok szerinti csoportosítását az **1. táblázat** ismerteti.

**1. táblázat:** A vizsgálatba vont teknősök taxonómiai besorolása, egyedszáma és a minták laboratóriumi kódja (ez utóbbi a boncolás sorrendjében lett kiosztva).

Al-rend	Család	Latin fajnév	Magyar fajnév	Egyedszám	Labor-kódok
Pleurodira (Nyakfordítók)	Pelo-medusidae	<i>Pelomedusa subrufa</i>	merevmellű sisakteknős	1	BPP7
		<i>Pelusios castaneus</i>	barna sisakteknős	2	BPP30, BPP31
	Chelidae	<i>Emydura subglobosa</i>	vöröshasú huszártknős	1	BPP25
		<i>Phrynops hilarii</i>	világos szegélyű varangyteknős	1	BPP19
Cryptodira (Nyakrejtő teknősök)	Kinosternidae	<i>Kinosternon baurii</i>	csíkos iszapteknős	1	BPP29
	Emydidae (Mocsári teknős-félék)	<i>Chrysemys picta</i>	díszes ékszerteknős	1	BPP24
		<i>Emys orbicularis</i>	mocsári teknős	1	BPP5
		<i>Trachemis scripta elegans</i>	vörösfülű ékszerteknős	1	BPP11
	Testudinidae (Szárzföldi teknős-félék)	<i>Geochelone carbonaria</i>	szenes teknős	2	BPP15, BPP27
		<i>Geochelone elegans</i>	indiai csillagteknős	2	BPP8, BPP32
		<i>Stigmochelys pardalis</i>	leopárdteknős	4	BPP1, BPP9, BPP12, BPP21
		<i>Kinixys homeana</i>	püpos zsanértknős	3	BPP2, BPP3, BPP20
		<i>Testudo graeca</i>	mór teknős	2	BPP17, BPP33
		<i>Testudo hermanni</i>	görög teknős	2	BPP18, BPP28
		<i>Testudo horsfieldii</i>	kirgiz teknős	1	BPP26
	Geoemydidae (Földiteknős-félék)	<i>Mauremys mutica</i>	indokínai víziteknős	2	BPP16A, BPP16B
		<i>Mauremys reevesii</i>	kínai háromélüteknős	6	BPP4A, BPP4B, BPP6, BPP10, BPP22, BPP23

## 4.2 DNS-kivonása a mintákból

A boncolt szervekből kb. 2–5 mm-es darabokat vágunk le, és teknősönként 1-1 Eppendorf csőbe helyeztük a szervmintákat, majd 1 ml foszfáttal pufferolt sóoldatot (PBS) adtunk a mintákhoz. Egy sterilizált csapágygolyó segítségével homogenizáltuk a szerveket. A folyamatot 5 percen át 50 Hz frekvencián végeztük Tissue Lyser II készülék segítségével. Az így kapott homogenizátumot 3 percig, 3000 percenkénti fordulatszám (3000 rpm) mellett centrifugáltuk. A felülúszóból NucleoSpin® DNA RapidLyse kit alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően vontuk ki a DNS-t.

A tamponminták esetén a mintához 1 ml (PBS) hozzáadását követően 15 percig 50 Hz frekvenciával szonikáló vízfürdőbe helyeztük, majd 5 percig 3000 x g fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszóból történő DNS-kivonást szintén a NucleoSpin® DNA Rapid Lyse kit-tel végeztük.

## 4.3 Polimeráz láncreakció (PCR)

A mintákból készített DNS-kivonatokból a DNS-vírusokat kétkörös („nested”) PCR segítségével kíséreltük meg kimutatni. Mind az adenovírusok, mind a herpeszvírusok esetén a reakció a vírusok DNS-polimeráz génjének kimutatására irányult [25, 48]. Adenovírusok esetén a hexon gén kimutatását is megkíséreltük. A PCR-reakcióelegyek összetételei a **2. táblázatban**, a protokolljaik a **3. táblázatban**, a használt primerek szekvenciái a **4. táblázatban** olvashatók. A reakcióelegyek összetételei a reakció első és második köre során megegyeznek. Pozitív kontrollnak az adenovírusoknál a polimeráz gén kimutatása esetén sertés-adenovírus 4 DNS-ét (PAdV-4), a hexon gén kimutatásánál pedig a pulykák vérzéscsillós bélgyulladás vírusának (turkey hemorrhagic enteritis virus, THEV, turkey adenovirus 3), míg a herpeszvírusok kimutatására irányuló PCR-ek esetén kutya herpeszvírust (CHV-1) róka herpeszvírust, és/vagy szarvasmarha herpeszvírus 4 (BoHV-4) DNS-t használtuk pozitív kontrollként.

**2. táblázat:** A PCR reakcióelegyek összetételei

<b>Összetétel:</b>	Adenovírus PCR-ek	Herpesz 1.kör	Herpesz 2. kör
Milli-Q víz	8,5 µl	6,5 µl	7 µl
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix	12,5 µl	10 µl	10 µl
Fwd. primer (50 µM)	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
		0,5 µl	
Rev. primer (50 µM)	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
templát DNS	2 µl	2 µl	2 µl
<b>Végtérfogat:</b>	25 µl	20 µl	20 µl

**3/a, b, c táblázat:** A PCR-ek hőmérsékleti protokolljai

<b>Herpeszvírus PCR</b>	
Hőm.	Idő
94 °C	3 perc
94 °C	30 mp.
46 °C	1 perc
72 °C	1 perc
72 °C	7 perc

45  
x

<b>AdV DNS-polimeráz PCR</b>	
Hőm.	Idő
94 °C	5 perc
94 °C	30 mp.
46 °C	1 perc
72 °C	1 perc
72 °C	7 perc

45  
x

<b>AdV hexon PCR</b>	
Hőm.	Idő
95 °C	5 perc
94 °C	30 mp.
50 °C	30 mp.
72 °C	30 mp
72 °C	5 perc

35  
x

**4. táblázat:** Az alkalmazott PCR primerek nukleotidsorrendjei

Target gén	PCR (termék méret)	Használt primerek és szekvenciájuk	Ref.
Adenovírus	DNS-polimeráz 1. kör (500 bp)	polFouter 5'-TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC-3'	[25]
		polRouter 5'-GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT-3'	
	2. kör (272 bp)	polFinner 5'-GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC-3'	
		polRinner 5'-CCANCCBCDRTRTGNARNGTRA-3'	
Hexon	1. kör (710 bp)	SIHEX FO out 5'-TTYAAAYCAYCAYMRNAAYMGNGG-3'	[20]
		SIHEX RE out 5'-CATYTGNAYNARVHACCARTC-3'	
	2. kör (430 bp)	SIHEX FO in 5'-GARTGGTGGTTYMGNAARGAYCC-3'	
		SIHEX RE in 5'-GGNAVNARNANDCKRTCRTTNCC-3'	
Herpeszvírus	DNS-polimeráz 1. kör (350 bp)	forward primerek: DFA: 5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3' ILK: 5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA-3'	[48]
		reverse primer: KG1: 5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3'	
	2. kör (215 bp)	forward primer: TGV: 5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT-3'	
		reverse primer: IYG: 5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'	

A konszenzus primerek esetében az IUPAC többértelműséget jelölő kódjait (ambiguity codes) használtuk, ahol Y= C vagy T, N= A, C, G, vagy T, R= A vagy G, M= A vagy C, D= A, G, vagy T, S= G vagy C, H= A, T vagy C, B= G, T, vagy C és W= A vagy T

#### 4.4 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis során 1%-os agaróz gélen vizsgáltuk a PCR-reakciók termékét. A gélben 4 µl/100 ml gél koncentrációban GelRed (Biotium Inc, Hayward, USA) festéket használtunk a futtatott termékek megfestésére. GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus-t (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) alkalmaztunk molekulatömeg markerként. Az elektroforézis során 0,5 x TAE (trisz-acetát-EDTA) puffert és 90 V feszültséget használtunk. A folyamat végeztével az eredmények értékeléséhez Kodak 212 Gel Logic rendszer segítségével, UV fényel átvilágítva készítettünk fényképeket.



#### 4.5 PCR-termékek tisztítása, előkészítése a szekvenáláshoz

Az agaróz gélelektroforézis során feltételezhetően pozitívnak bizonyuló minták 2.körös PCR termékeit ExoSAP enzimmel (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent, Thermo Fisher) tisztítottuk meg. A tisztítás során 5 µl PCR-terméket és 2 µl ExoSAP enzimet elegyítettünk, majd 37 °C-on 15 percig, ezután 80 °C-on 15 percig inkubáltuk őket.

Egyes esetekben 2%-os agaróz gélen futattuk meg a 2. körös PCR termékeket, majd UV fény felett gélkivágást végeztünk. A kivágott termékeket ezután a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit-et használva, a gyártó utasításai szerint tisztítottuk.

#### 4.6 DNS-szekvenálás

A tisztított termékek nukleotid-sorrendjének meghatározását Sanger-szekvenálással végeztük. A reakció során a BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, USA) használtunk. A szekvenálás során használt elegy összetétele a következőképpen alakult (**5/a.táblázat**).

A reakcióelegy összetételét a PCR-termékek koncentrációja szerint változtattuk. A koncentrációt agaróz gélen történő futtatás során becsültük meg és annak megfelelően határoztuk meg a PCR-termékek elegybe kerülő mennyiségét. A Milli-Q víz mennyiségét úgy állítottuk ehhez, hogy az elegy végtérfogata minden esetben 5µl maradjon. A kész reakcióelegyeket az enzim gyártójának utasítása szerint inkubáltuk. (**5/b. táblázat**).

**5/a, b táblázat:** A szekvenálási reakciók összetétele és hőmérsékleti protokollja

Összetétel	
Milli-Q víz	0,5-1,7 µl
Big Dye puffer	1 µl
Primer (4µMol)	1 µl
PCR-termék	0,3-1,5 µl
Big Dye MIX	1 µl
<b>Végtérfogat</b>	<b>5 µl</b>

Hőmérséklet	Időtartam	35 x
96 °C	1 perc	
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	
60 °C	4 perc	

A szekvenálási reakciót követően a DNS-t kicsaptuk az oldatból. A mintákhoz 1,5 µl 3M koncentrációjú, 5-ös pH-jú nátrium acetát oldatot, 31 µl 96%-os etanol oldatot és 7,5 µl Milli-Q vizet adtunk, majd szobahőmérsékleten 15 percen át, sötétben inkubáltuk. Ezután 4400 rpm fordulatszámon 45 percig centrifugáltuk SOFT üzemmódban. A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, majd a mintákhoz 70 µl 70%-os etanolt adtunk. Ismét egy centrifugálás következett, 15 percig 4400 rpm fordulaton. A felülúszó újbóli eltávolítását a minták szárítása követte, amely során 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben állni hagytuk őket. A kicsapott termékeket alumínium fóliába csomagolva postai úton juttattuk el a mórahalmi Seqomics Biotechnológiai Kft. munkatársainak, akik elvégezték a kapilláris gélelektroforézist. Az így kapott eredményeket ABI kiterjesztésű fájlok formájában kaptuk meg elektronikus úton.

#### 4.7 Bioinformatikai és filogenetikai vizsgálatok

A kapott nukleotidsorrend megjelenítését BioEdit program 7.2.5-ös verziójával végeztük. A szekvenciák szerkesztésére és javítására a Staden [49], illetve a Genious programot használtuk [50]. Az így kapott, szerkesztett szekvenciákat az NCBI Blast® homológia-összehasonlító program segítségével vetettük össze a GenBank [51] adatbázisában szereplő szekvenciákkal, mind a szekvenciák által meghatározott gének, mind pedig a kódolt fehérjék tekintetében. A filogenetikai számításaink elvégzésére a Phylogeny.fr oldalt vettük igénybe [52] (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>). Az így kapott filogenetikai fák szerkesztését a MEGA11 programban végeztük [53]. A vírusok részleges DNS-polimeráz fehérjéinek és teknős gazdáik citokróm-b fehérjéinek alapján számított maximum-likelihood (ML) fák képezték az alapját a vírusok és gazdáik feltételezett közös evolúciós múltját bemutató tanglegramnak, amit a Dendroscope v3.8.9 program segítségével készítettük el [54].

## 5 Eredmények

A boncolt teknősök jelentős része autolizált állapotú volt, s mindegyiküket fagyasztva tárolták, akár több éven keresztül, így kórszövettani vizsgálatokra nem voltak alkalmasak. A megtartott szervi struktúrákkal jellemezhető hullák között egy olyan volt, ahol jelentősebb makroszkópos elváltozást tapasztaltam a mintavétel során. A BPP32-es kódú állat boncolása során (6. ábra) a szívburok fibrines gyulladását, a máj sárgás elszíneződését, illetve a vesékben diffúzan elhelyezkedő apró, tűszúrásnyi fehér góccokat tapasztaltam.



**6. ábra:** Fibrines pericarditis, más néven a "szőrös szív" (cor villosum) makroszkópos képe, a BPP32 laboratóriumi kódú indiai csillagteknősben (*Geochelone elegans*). A pericardium savós-fibrines gyulladását akár vírus fertőzés is okozhatja. Ebből az állatból testadenovírus került kimutásra.

A mintaként szolgáló 33 állatból elvégzett adenovírus kimutatására irányuló vizsgálataink során összesen 5 egyed bizonyult pozitívnak, 12 állatban hamis (fals) pozitív eredményt kaptunk, míg 16 esetben a vizsgálat negatív eredménnyel zárult. A hamis pozitivitás azt jelenti, hogy az agarózgél-elektroforézis során megfelelő méretűnek ítélt PCR-termékről, annak nukleotid szekvenciája alapján kiderült, hogy nem adenovírus, hanem gazdaállat, baktérium vagy gomba, stb. eredetű DNS amplifikációjának terméke volt (6. táblázat).

6. táblázat: A teknősökből végzett AdV és HV specifikus PCR-szűrések eredményei

Alrend	Család	Fajnév	Labor kód	AdV DNS-pol. PCR	Herpeszvírus PCR	Értékes eredmény
Pleurodira	Pelom.	<i>Pelomedusa subrufa</i>	BPP7			
		<i>Pelisios castaneus</i>	BPP30		pozitív	TeV-1
			BPP31			
	Ch	<i>Emydura subglobosa</i>	BPP25			
		<i>Phrynops hilarii</i>	BPP19			
Cryptodira	KS	<i>Kinosternon baurii</i>	BPP29		pozitív	TeV-1
	Emydidae	<i>Chrysemys picta</i>	BPP24			
		<i>Emys orbicularis</i>	BPP5			
		<i>Trachemis scripta elegans</i>	BPP11			
	Testudinidae	<i>Geochelone carbonaria</i>	BPP15			
			BPP27			
		<i>Geochelone elegans</i>	BPP8	pozitív		testAdV
			BPP32	pozitív		testAdV
		<i>Stigmochelys pardalis</i>	BPP1			
			BPP9	pozitív		testAdV
			BPP12			
			BPP21			
		<i>Kinixys homeana</i>	BPP2			
			BPP3			
			BPP20			
		<i>Testudo graeca</i>	BPP17			
			BPP33		pozitív	TeV-3
	<i>Testudo hermanni</i>	BPP18				
		BPP28		pozitív	TeV-1	
	<i>Testudo horsfieldii</i>	BPP26		pozitív	TeV-1	
	Geoemydidae	<i>Mauremys mutica</i>	BPP16A			
			BPP16B			
		<i>Mauremys reevesii</i>	BPP4A			
			BPP4B			
			BPP6			
			BPP10	pozitív		testAdV
			BPP22	pozitív		siadenovírus
BPP23		pozitív	TeV-1			

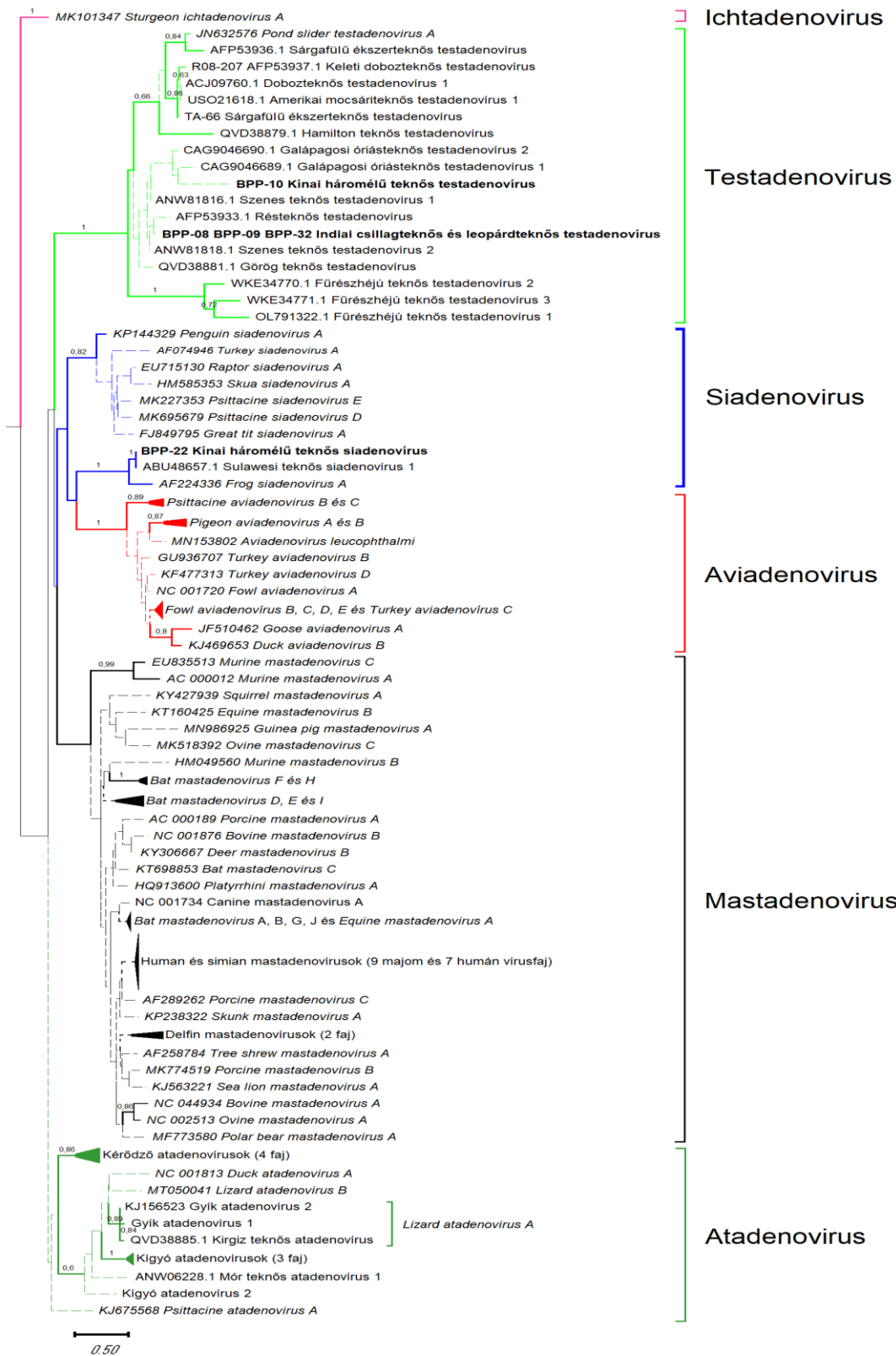
Az azonos háttérszínek a különböző mintákból kimutatott azonos szekvenciájú vírus gén-részleteket jelölnek. Rövidítések: Ch-Chelidae, KS-Kinosternidae, Pelom-Pelomedusidae.

A herpeszvírusok detektálását célzó vizsgálatok során a 33 egyedből 6 bizonyult pozitívnak, míg 3 hamis pozitivitást mutatott, 24 egyed pedig negatív eredményt. A BPP23, BPP26, BPP28, BPP29 és a BPP30-as jelölésű teknősben lévő vírus szekvenciája testudinid alphaherpeszvírus 1-gyel mutatott 99,47% egyezést. A BPP32 kóddal ellátott állatból pedig testudinid alphaherpeszvírus 3-at sikerült kimutatni, mely 97,14%-ban egyezett a génbank szekvenciájával.

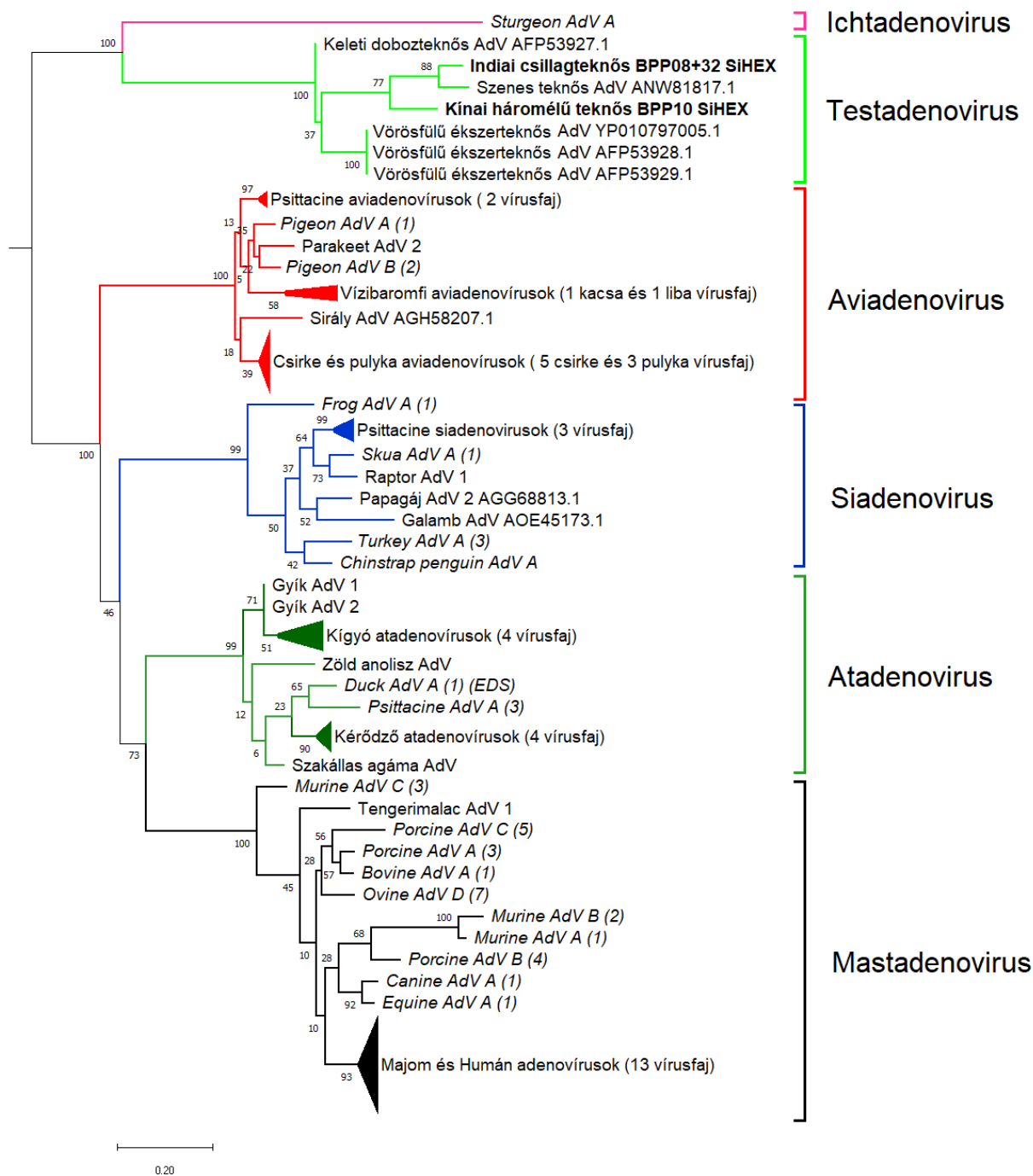
Az adenovírusokat tekintve 3 fajból, összesen 5 egyedből sikerült ebbe a rendszertani csoportba tartozó vírust kimutatni. Ezek közül a BPP8, BPP9 és BPP32 jelölésű állatokban ugyanazt a vírust mutattam ki, amely az NCBI BLAST programban végzett összehasonlítás során 87,34%-os egyezést mutatott a szenes teknős (red footed tortoise) adenovírus 1 szekvenciával, míg a szenes teknős AdV-2-vel 90,18%-os homológiát. A BPP10-es kóddal ellátott állatból szintén egy testadenovírust sikerült kimutatni, melyet az adatbázissal összehasonlítva 72,22%-ban egyezett meg a szenes teknős AdV-1-gyel. A BPP22-vel jelölt teknősben talált szekvencia génbankkal történő összevetése során 99,63% egyezés adódott egy siadenovírus, a Sulawesi teknős AdV-1 DNS-dependens DNS-polimerázának szekvenciájával. Az AdV-ok részleges polimeráz szekvenciáinak számított filogenetikai viszonyait a **7. ábra** mutatja.

Valamennyi olyan mintából, amely a DNS-polimeráz alapú szűrővizsgálatban AdV-pozitívnak bizonyult, megkíséreltem a hexon gén egy részletének felerősítését is egy kétkörös konszenzus primereket használó PCR segítségével. Kísérleteim a testadenovírus tartalmú minták esetében sikerrel jártam, az ezekből nyert szekvenciák alapján készült a **8. ábrán** bemutatott filogenetikai fa.

A testadenovírusok koevolúciós vizsgálata céljából készített tanglegrammon (**9. ábra**), a saját szekvenciáinkat is beleértve, összesen 19 ilyen vírustól ismert részleges polimeráz fehérje szekvencia és a gazdáikat képviselő 15 teknős citokróm-b fehérje szekvencia azonos módszerrel számított filogenetikai fáját vetettük össze. A tanglegrammon sárga vonalak kötik össze a párhuzamos evolúciót bejárt ágvégeket, míg a piros vonallal jelölt keresztezések az ennek nem teljesen megfelelő eredményeket jelölik. A koevolúciós fejlődést jól mutatja, hogy teknősök alrendjeinek és családjainak taxonjai, a testadenovírus filogenetikai fán is jobbra monofiletikus csoportokként ábrázolódnak.

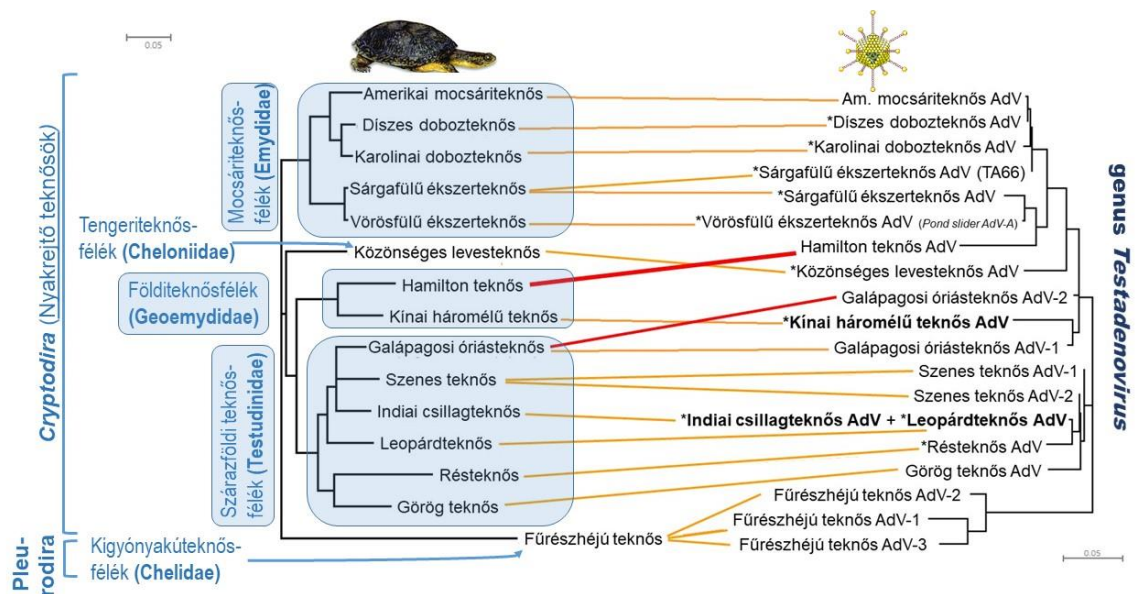


7. ábra: Az adenovírusok származtatott, részleges DNS-polimeráz fehérje szekvenciáiból képzett illesztés (90 as) alapján (maximum likelihood-módszerrel) számított filogenetikai fa. A 60%-os megbízhatósági (bootstrap) érték alatti elágazások szaggatott vonallal ábrázolva. A jobb oldalon a nemzetségek határai láthatók. A vastagon kiemelték a jelen dolgozatban közölt szekvenciák.



**8. ábra:** Az adenovírusok származtatott, részleges hexon fehérje szekvenciáiból képzett illesztés (140 as) alapján (maximum likelihood -módszerrel) számított filogenetikai fa. A megbízhatósági (bootstrap) értékek az elágazások mentén feltüntetésre kerültek. A jobb oldalon a nemzetségek határai. A vastagon kiemelték a jelen dolgozatban szereplő szekvenciák.





**9. ábra:** A testadenovírusok és gazdáik feltételezett közös evolúciós múltját bemutató tanglegram. Az összehasonlító vizsgálatnak a vírusok részleges DNS-polimeráz fehérjéinek és teknős gazdáik teljes citokróm-b fehérjéinek illesztése alapján számított maximum-likelihood (ML) fák képezték az alapját. A vírus-fán vastagon kiemelték a jelen dolgozatban közölt szekvenciák, és csillaggal jelölték az ÁTKI kutatóinak eredményei.

## 6 Megbeszélés

Összesen 15 esetben a szűrésre használt DNS-polimeráz génrészletet detektáló PCR vizsgálatok során, a méretük alapján pozitívnak tűnő terméket megszekvenálva, hamis (fals) pozitív eredményt kaptunk (adenovírus PCR esetén 12, herpeszvírus esetén 3 alkalommal). Ennek oka, hogy erősen degenerált primereket alkalmaztunk a reakciókban, és e primerek képesek voltak akár baktériumok vagy gombák, akár a teknősök testi sejtjeiben azok genomjának egy-egy szakaszához (jellemzően a DNS-polimeráz génjükhöz) is bekötni, amelynek következtében a PCR reakció során ezen genomok szakaszai sokszorozódtak fel.

Ugyanakkor e PCR szűrővizsgálatok során 6 esetben sikerült herpeszvírus, míg 5 állatnál adenovírus jelenlétét igazolni (**6. táblázat**). Ezen eredmények megbeszélését az alábbi alfejezetekben részletezem.



## 6.1 Herpeszvírus kimutatások

Herpeszvírusokat gyakorta mutatnak ki Európa szerte különféle fogságban tartott teknősfajokból, mint ezen állatok egyik legfontosabb fertőző, gyakran életet veszélyeztető megbetegedését okozó patogén ágenseket [35]. Korábbi kutatások Európa szintjén vizsgálva 6,5%-os előfordulási arányt állapítottak meg [32], Spanyolországban különböző fajokból 25% [55], Belgiumban 17% [56], Nagy-Britanniában 8,2% adódott [57], míg esetünkben a vizsgált teknősök 18,18%-a volt pozitív herpeszvírusokra. Ezek alapján megállapítható, hogy az általunk kapott prevalencia érték megfeleltethető a korábban kapott eredményeknek. A szakirodalomban található adatok közötti eltérést az egyedszám, a vizsgált fajok, illetve még a minták típusa és a mintavétel időpontja is befolyásolhatja, különböző évszakokban eltérő lehet a pozitivitási ráta [32]. Leineweber és munkatársai a herpeszvírusra pozitív egyedek 45,83%-ban TeHV-1-et azonosítottak [32], míg esetünkben ez az arány 83,3%-nak adódott. TeHV-3 azonosítására a szakirodalomban a pozitív állatok 49,04%-ban [32], míg a mi kutatásunk esetén 16,7%-ban került sor. Az általunk detektált vírustörzsek mindegyike szinte teljes egyezést mutatott nukleotidsorrendjük tekintetében a már korábban leírt törzsekkel. Rachel Marschang személyes közlése alapján, sajnos magyarországi adatok nem álltak rendelkezésre 2021-es kutatásához, így országunkban ezen vírusok előfordulásáról eddig nem volt adat.

A TeHV-3 okozta necrotizáló stomatitis-rhinitis betegség során tapasztalható elváltozásokat fogságban tartott teknősök esetén már több esetben leírtak görög teknősből, illetve mór teknősből [32]. A tünetek az apátián, takarmány-visszautasításon át az enyhe conjunctivitistól, illetve savós orrfolyástól egészen a mucopurulens orrfolyásig és súlyos stomatitisig terjedhetnek. A conjunctivitis gyakran visszatérő jelleget mutat, érintheti csak az egyik, vagy mindkét oldali szemet. A szájüregben glossitis, sárgás színeződésű, diphteroid plakkok megjelenése is gyakran előfordul. Ugyanakkor az alsó légutak érintettségéből adódó, illetve idegrendszeri tüneteket szintén megfigyeltek, a TeHV-3 vírusra neurotropizmus is jellemző [58, 59]. A tünetek nagyon hasonlítanak a *Mycoplasma agassizii* által okozott felső-légúti tünetekre, azonban ilyen bakteriális eredetű fertőzések esetén gyomor-érintettséget nem figyeltek meg [58]. A vírus ellen ellenanyagok képződtek, azonban ezek nem védenek a klinikai tünetek kialakulásától, illetve az esetleges reinfekciótól sem [58]. A korábbi kutatásokban megfigyelhető faji erőfordulás a mi esetünkben is megerősítést nyert, hiszen nekünk is mór teknősből sikerült kimutatni a vírust.

A TeHV-1 a TeHV-3-mal szemben sokkal ritkábban mutatható ki. Elsőként Japánba importált résteknősben (*Malacochersus tornieri*), illetve kirgiz teknősben (*Testudo horsfieldii*) detektálták, Európában ez utóbbi fajban találták meg az esetek többségében [32, 36, 37]. Emellett sikerült kimutatni görög teknősben is [60]. Kirgiz teknősökben viszonylag alacsony morbiditás és mortalitás jellemzi a TeHV-1-et, tehát az általa okozott betegség kevésbé súlyos. Valószínűleg ez a magyarázata az ebből a fajból történő gyakori kimutatásnak is [60]. Munkánkban kirgiz teknősből, görög teknősből, de a korábbi kutatásokban szereplőktől eltérő fajokban is, mint kínai háromélű teknős, csíkos iszapteknős, és barna sisakteknősből sikerült kimutatni a TeHV-1-et. Mivel az állatok ugyanabból a kereskedésből származnak, valószínűsíthető, hogy így volt lehetősége a vírusnak ennyi különböző fajt megbetegíteni. Ez az eredmény megerősíti a korábbi kutatási eredményeket is, hiszen a kirgiz teknőstől eltérő fajokban is sikerült már korábban kimutatni [12, 61].

A rendelkezésemre bocsátott teknős tetemeken nem állt módunkban a vírus okozta lehetséges elváltozásokat tudományos bizonyossággal megfigyelni, illetve azokból következtetéseket levonni a következő tényezők miatt. A boncolás időpontjához viszonyítva az elhullás évekkorábban történt, illetve a boncolás során sok esetben a testekben a bomlási folyamatok előrehaladott stádiumaival találkoztunk, valószínűsíthetően a kereskedésben az elhullást követő nem megfelelő körülmények közötti tárolás következtében. Emellett a legtöbb esetben az elhullás körülményeiről, illetve az előtte tapasztalható tünetekről sem állt rendelkezésre adat.

## 6.2 Adenovírus kimutatások

Pikkelyes hüllőkből újabban már rendszeresen mutatnak ki adenovírusokat, azonban teknősökben e vírusokat és az általuk okozott megbetegedések tüneteit már jóval kevesebbszer sikerül azonosítani [16]. Farkas és Gál keleti dobozteknősből adta egyik első leírását az új nemzetségbe (*Testadenovirus*) sorolandó vírusoknak [29]. Doszpoly és munkatársai ezzel közel egyidőben mutattak ki egyetlen teknősfaj két alfajából, vörösfülű- és sárgafülű ékszerteknősökből hasonló vírusokat, előbbi alfaj esetén 31.8%-os, míg utóbbi esetén 22,7%-os előfordulási gyakorisággal. Továbbá keleti dobozteknősben, résteknősben is ők találtak ebbe a nemzetségbe sorolható vírusokat [20]. A vörösfülű ékszerteknős adenovírus, a red eared slider AdV-1; RESAdV-1 nem hivatalos nevet kapta ekkor. Tarján

Zoltán 2021-ben védett PhD dolgozatában a RESAdV-1 primer-séta módszerével végzett részleges-genom szekvenálásának eredményeit mutatta be (**2. ábra**). Tarján továbbá, összesen 148 teknősből származó, döntő részben kloáka tampont is vizsgált szűrő-PCR-el [22]. A minták bő felét adó (n=79) fentebb is említett két ékszerteknős alfaj egyedeiben talált csupán a *Testadenovirus* nemzetségbe sorolható vírusokat, ezen egyedek 25%-ban (n=19). A további 22 vizsgált teknősfaj egyedei negatívnak bizonyultak AdV-ra. Az ékszerteknősökben kimutatott DNS-polimeráz szekvenciák meglehetősen különböztek, de azért még közös vírusfajba tartozónak bizonyulhatnak majd. Salzman és munkatársainak 2021-ben publikált szakcikke, egy nagy németországi diagnosztikai céghez (Laboklin®) Európa több országából másfél év leforgása alatt beérkezett összesen 949, döntő részt orális tampon (n=902), minta eredményeit közli [16]. A velünk azonos protokollt alkalmazó PCR-es szűrővizsgálataik során, a minták 2,3%-ában (n=22) sikerült adenovírusokat kimutatniuk, ezek közül 16 esetben testadenovírust, míg 6 esetben atadenovírust. A testadenovírus-szekvenciák között több egymással azonos vagy nagyon (>98%) hasonló volt, s lényegileg 6 különböző szekvencia-típust képviseltek. A 6 kimutatott atadenovírus alapvetően 3 különböző szekvencia-típusba volt sorolható, amelyek mindegyike megfeleltethető volt egy korábban már leírt pikkelyes hüllő AtAdV szekvenciának (SnAdV-1 és -2, LAdV-2). Tóth Alexandra szakdolgozatában az általa vizsgált 96 egyedből csupán egyben, egy sárgafülű ékszerteknősben talált testadenovírust. Érdekesség, hogy közben egy kínai háromélű teknősben és egy vöröshasú huszárteknősben „zsákmányállat” eredetű siadenovírust, a pulykák vérzéscsillaggyulladását okozó TAdV-3-at detektált, ezt valószínűleg az etetésükhöz használt pulykahús tartalmazta [62]. Brown és munkatársai szenes teknősben (GenBank-i azonosítók: KU601301, KU601299), galápagosi óriásteknősökből (OU508386, OU508387) [63], míg Adamovicz és munkatársai amerikai mocsáriteknősből (MW561636), továbbá Okoh és munkatársai pedig ezidáig egyetlen Pleurodira alrendbe sorolt fajban, fűrészhéjú teknősben mutattak ki egymástól jelentősen eltérő testadenovírus szekvenciákat [64]. A fentebb felsorolt szekvenciák mindegyikét bevettem az összehasonlító filogenetikai vizsgálataimba (**7. és 9. ábra**).

Kutatásom során a vizsgált egyedek 12,12%-ból (4 egyedből) sikerült testadenovírust kimutatnunk. Két indiai csillagteknős (BPP8, -32), egy leopárdteknős (BPP9) és egy kínai háromélű teknős (BPP10) bizonyult pozitívnak. A kínai háromélű teknős kivételével a másik két fajban eddig még nem mutattak ki ilyen vírusokat. Az általam kimutatott szekvenciák, korábban még mások által le nem írt kétféle szekvenciatípust képviseltek. Az egyik típust az egymással közeli rokon (korábban azonos nemzetségbe sorolt szárazföldi teknős fajokból) a

leopárdteknős és a csillagteknős mintákból mutattuk ki, míg a másik típusú testadenovírust a földiteknősfélékhez tartozó kínai háromélű teknősben találtuk.

A fentebb idézett, mások által leírt vírus törzsszekvenciák mindegyike szerepel a **7. ábrán**, s jó megbízhatósági értékkel (100%) támogatott monofiletikus csoportként mutatja a *Testadenovirus* genust. Az általam kimutatott négy egyedből származó két vírustípus is ebbe nemzetségbe esett. Az ágvégeken viszonylag nagy távolságok figyelhetőek meg az egyes törzsek között, a többi nemzetségben megfigyelhető ághosszokhoz hasonlítva ezeket valószínűsíthető, hogy a jövőben új vírusfajokba fogják majd sorolni ezeket az újonnan kimutatott testadenovírusokat. Általánosságban elmondható, hogy egy adott vírustörzs csupán egy-egy adott teknősfajban figyelhető meg. Ez alól kivételt képez az általam a BPP8, BPP9, BPP32 kódú állatokból kimutatott törzs, amiről fentebb is írtam, hogy két közel-rokon teknősfajban is megtaláltuk. Valószínűsíthető az is, hogy ezeket az egyedeket együtt tartották.

A testadenovírusok patogenitása, illetve elsődleges kórokként betegségkókozó szerepük még tisztázásra vár. A legtöbb klinikai esetben, ahol ilyen vírusokat mutattak ki, számos kofaktor is szerepet játszott a tünetek és az elváltozások kialakításában, mint például stressz, immunszuppresszió, illetve bakteriális vagy vírusos koinfekció. Egyes esetekben a fertőzés teljesen tünetmentesen zajlott, azonban súlyos, szisztémás tünetekkel is összefüggésbe hozták már őket (pl.: biliverdinuria, kóros lesóványodás, súlyos vérzések). Az ilyen esetekben magas mortalitás is megfigyelhető volt [64].

Az általunk vizsgált teknős-hullákból történő mintavétel során nem készültek szabályos boncolási jegyzőkönyvek, hiszen valamennyi állatot fagyasztva tárolták, akár több évig, mielőtt hozzám kerültek, s jó részük autolizált állapotú volt. Azonban néhány jelentősebb elváltozást mégis tapasztaltunk. A BPP32-es kódú állat boncolása során (**6. ábra**) a szívburok fibrines gyulladását, a máj sárgás elszíneződését, illetve a vesékben diffúzan elhelyezkedő apró, tűszúrásnyi fehér gócot tapasztaltam. Mikroszkópos vizsgálatra nem került sor. A vírus pontos szervi lokalizációjának meghatározásáról nem áll rendelkezésre adatunk, mert a szervekből történő mintavétel, majd a szűrővizsgálat ezek összekeverésével ún. „poolozva” történt. Ugyanakkor ennek a mintának az esetében megfontolandó *in situ* hibridizáció megkísérlése, amennyiben a szív mikroszkópos szerkezete kellően megtartott. A hexon-gén PCR-rel történő felerősítése, és a termékek szekvenálása a testadenovírusokat tartalmazó mintáink esetén sikerrel járt. A DNS-polimeráz génrészleteikben azonos minták (BPP8, -9 és -32) hexon génrészlete is egymással azonos bázissorrendű volt. A **8. ábrán** ábrázolt származtatott hexon fehérje alapú filogenetikai fa elágazódási mintázata is

megfeleltethető a **7. ábrán** megjelenített DNS-polimeráz fának, annyi különbséggel, hogy sokkal kevesebb hexon szekvencia állt rendelkezésre, így kevesebbet tudunk megjeleníteni ezen fán, a polimeráz fához képest. E megfigyelés egyben azt is sugallja, hogy valószínűleg nem történt rekombináció az azonos elágazási mintázatot mutató vírustípusok vizsgált génrégióiban. Azoknál a vírusoknál, ahol mindkét szekvencia rendelkezésünkre áll, ezekre specifikus primereket tervezve, lehetőség adódik a két gén közötti genomrészlet felerősítésére, mely így egy jövőbeni kutatás témáját képezheti a fenti mintáimmal. Sajnos a dolgozat írásának időpontjáig erre nekem már nem volt lehetőségem. Vizsgálataim korai szakaszában megkíséreltem az akkor a PCR eredmény alapján legfertőzöttebbnek ítélt egyedből (BPP8) származó minta új generációs (NGS) genomszekvenálását is (Illumina paired-end”módszerrel) Gellért Ákos és munkatársai által használt protokoll alapján[65], azonban sikertelenül. A kapott adatokból („read”-ekből) több módszerrel sem sikerült a testadenovírusnak megfelelő szekvenciát nyerni, még PCR-rel korábban felerősített szakaszt sem sikerült köztük fellelni. A későbbiekben pozitívként azonosított BPP32-es jelölésű állatból vett minta NGS szekvenálását is érdemes lenne megkísérelni, hiszen abban az állatban jelentős patológiás elváltozásokat tapasztaltunk.

Az adenovírusok érdekes modellként szolgálhatnak a gazdafaj és vírusa közötti koevolúció kutatásában [13, 66]. A **7. ábrán**, a testadenovírusok csoportját vizsgálva is feltűnik, hogy a nyakfordító teknős (Pleurodira) eredetű vírusszekvenciák jelentősen elkülönülnek a számos nyakrejthő teknősfajból (Cryptodyra) kimutatott DNS-polimeráz szekvenciáktól. Ez utóbbiak között is közelebbi elhelyezkedésűek az azonos családba sorolt teknősök vírusai. Ezért a koevolúciós vizsgálat céljából tanglegrammot készítettünk csak a testadenovírusok és gazdafajaik reprezentáns szekvenciáit alapul véve (**9. ábra**). A tanglegrammon összevetettük a részleges polimeráz fehérje szekvenciák alapján szerkesztett virális filogenetikai fát, és a teknősfajok mitokondriális citokróm-b fehérje szekvenciái alapján szerkesztett filogenetikai fát. A kapott citokróm-b fát kellően megbízhatónak tekintettük, mert összevetve Thomson és munkatársai 2021-es komplex filogenetikai vizsgálatának eredményével [1], jól reprezentálta a teknősök evolúciós leágazási vonalait. A tanglegrammon sárga vonalak kötik össze a párhuzamos evolúciót bejárt ágvégeket, míg a piros vonallal jelölt keresztezések az ennek nem teljesen megfelelő eredményeket jelölik. A teknősök alrendjeinek és családjainak taxonjai az adenovírus filogenetikai fán is jobbra monofiletikus víruscsoportokként rendeződnek. Ez alól a Hamilton teknős, és a galápagosi óriásteknős 2-es AdV képez csak kivételt. Utóbbi esetben az eltérés abból a bizonytalanságból adódik, hogy a vírus szekvenciák esetén nagyon rövid, összesen 90

aminosav-hosszúságú szakaszokkal történt a számítás. Az egymástól csak csekély eltérést mutató szekvenciák (galápagosi óriásteknős AdV-ok és kínai háromélű teknős AdV) különböző algoritmusokkal történő filogenetikai összevetése nem kellően megbízható és kongruens eredményt ad. Az előbb említett két eltérés a filogenetikai számítások bizonytalansága miatt is lehetséges. A Hamilton teknős adenovírus esetén ugyanakkor bármely algoritmust alkalmazva, jó megbízhatósági értéket mutatóan (7. ábra, 66%), a vírusszekvencia a mocsári teknősöfélekből származó AdV-okkal klasztereződött egy csoportba, s nem a másik földiteknősféle, a kínai háromélű teknősből származó AdV szekvenciánkkal mutatkozott leghasonlóbbnak, ahogy ezt a koevolúciós elmélet szerint várnánk. Érdeemes megjegyezni, hogy a Hamilton teknős AdV-ból származó részleges polimeráz szekvencia viszonylag magas A+T aránnyal (57%) rendelkezik, szemben a többi eddig megismert testadenovírusal (30-50%). A recens gazdaváltásokkal gyakran jár együtt a genom A+T arányának növekedése [13], amint ezt az elsőként szekvenált atadenovírusok esetében is kimutatták, s ahonnan ez a nemzetség a nevét is (AT gazdag AdV-ok) kapta [21]. Természetesen az is elképzelhető, hogy a szintén vízi életmódú Hamilton teknős egyed amelyből az AdV-t kimutatták terráriumi körülmények között volt valamely mocsári teknős fajjal együtt tartva, erről az eredeti közlemény nem közöl adatokat [16].

Siadenovirust teknősben először Rivera és munkatársai mutattak ki a veszélyeztetett természetvédelmi státuszú Forsten teknősből (*Indotestudo forstenii*; Sulawesi tortoise AdV-1). Összesen 105 teknőst vizsgáltak, amelyekből 41 egyedben, vagyis az állatok 39%-ban sikerült többféle módszerrel (PCR, *in situ* hibridizáció, elektronmikroszkópia) kimutatni, és elsőként leírni ezt a vírust [19]. A vírus azonban nem csak az előbb említett egyedekben okozott elhullást, de azon állatkertek más fajú teknőseiben is, amelyek befogadták a mentett állatokat. Három éven belül az együtt tartott két másik délkelet-ázsiai szárazföldi teknősféleiben: a hátsó-india teknősben (*Manouria impressa*) és burmai csillagteknősben (*Geochelone platynota*) is elhullással járó megbetegedést okozott és kimutatható volt a fenti módszerekkel a vírus [67]. Rivera és munkatársai az elhullott egyedekben máj-és lépmeagnagyobbodást, a vastagbélben fibrinonekrotikus álhártyákat, oronasalis fistulákat, a nyelven és a száj nyálkahártyáján kimaródásokat tapasztaltak [19]. Mikroszkópos vizsgálat során a májsejtek nekrozisát, a hepatociták sejtmagjának megnagyobbodását és bennük változatos alakú, bazofil vagy amfofil zárványokat figyeltek meg. A csontvelőben myeloid nekrozis volt tapasztalható. Az intenzív kezelés segítségével a betegséget hosszabb ideig túlélő állatok esetén más szervekben, például a belső nemi szervekben, vesében, légutakban és a központi idegrendszerben is találtak elváltozásokat [19].

Mi, a kutatásunk során az összes megvizsgált teknős 3%-ban (1 egyedben), egy kínai háromélű teknősben mutattunk ki – a rövid DNS-polimeráz szekvencia tanulsága szerint – ugyanezt a siadenovírust. Ez a tény ismét bizonyítja, hogy a Sulawesi tortoise AdV-1 könnyedén képes áttörni a faji határokat. S az az adat, hogy immár más családbeli teknősfajból is kimutatható volt, szintén alátámasztja Schumacher és munkatársai megállapítását e vírustípus gazdafajok közötti terjedésének képességéről [67]. Patológiás elváltozásokat a boncolás során mi nem tapasztaltunk, ám kórszövetten itt sem készült. Sajnos a vírus hexon génjét célzó PCR-es kísérleteim itt nem jártak sikerrel. Ugyanakkor e siadenovírus genomjának további vizsgálata célszerű lenne, hiszen egy nagy patogenitású víusról lévén szó, szükség lehet egy megbízható szűrővizsgálati- kimutatási módszer kidolgozására, s e mellett a teljes genom megismerésekor, esetleges új, eddig ismeretlen típusú patogenitásért felelős gének is felbukkanhatnak. Mivel ez a vírusdetektálás is csak későbbi munkám eredménye, és nem állt rendelkezésre a minta a végzett újgenerációs szekvenálás idején, így azzal nem adódott lehetőségem megkísérelni e vizsgálat elvégzését.

## 7 Összefoglalás

A teknősök vírusainak vizsgálata még mindig marginális területnek számít. A védett fajokat is gyakran tizedelő herpeszvírusok e rend fajainak legfontosabb kórokozói, s mellettük adenovírusok is számos kórképben felbukkantak. A leírt vírusok mindössze kis százalékában határozták meg azok teljes genom szekvenciáját; a több mint tucatnyi adenovírus-kimutatás esetében például még egyszer sem. Ennek dacára mégis lehetséges volt új nemzetséget létrehozni a teknősök (*Testudines*) saját adenovírusai számára (*Testadenovirus*). Kutatásunk célja volt, hogy a rendelkezésemre bocsátott, kereskedésben elhullott, 17 faj képviselő, 33 teknős egyedből herpesz- és adenovírusokat mutassunk ki, s ezek további genetikai jellemzését elvégezzük, utóbbiak esetében törekedve a teljes-genom meghatározás előkészítésére. Az egyedeket felboncoltam, majd a belső szervekből vett mintákból kivont DNS-ből kétkörös-PCR-ek segítségével kíséreltem meg az említett vírusok kimutatását. A szűrés mindkét víruscsoport esetén a DNS-polimeráz gén egy-egy szakaszára irányult; a megfelelő méretű PCR termékeket megszekvenáltam. A kapott nukleotid szekvenciákat összevetettük az NCBI adatbázisában lévőkkel. Herpeszvírusra pozitívnak bizonyult egy kínai háromélű teknős (*Mauremys reevesii*), egy kirgiz teknős (*Testudo horsfieldii*), egy görög teknős (*Testudo hermanni*), egy csíkos iszapteknős (*Kinosternon baurii*), egy barna sisakteknős (*Pelusios castaneus*) és egy mór teknős (*Testudo graeca*). Megállapítottuk, hogy a mór teknősben talált vírus a GenBank-i testudinid alphaherpeszvírus 3 szekvenciával mutat 97%-os nukleotid egyezést, míg a többi egyedből származó szekvenciák a testudinid alphaherpeszvírus 1-gyel voltak 99,5%-ban azonosak. Adenovírusra pozitívnak bizonyult két indiai csillagteknős (*Geochelone elegans*), egy leopárdteknős (*Stigmochelys pardalis*) és két kínai háromélű teknős. A *Testadenovirus* nemzetségbe sorolható, két eddig ismeretlen vírustörzset találtunk a fentiekből négy esetben: két csillagteknős és a leopárdteknős esetén az egyiket, egy háromélű teknősben pedig a másik törzset. Egy másik kínai háromélű teknősben pedig egy *Siadenovirus* nemzetségbe sorolt, a súlyosan veszélyeztetett sulawesi teknősökben korábban komoly veszteségeket okozó tünetegyüttes egyik kórokaént leírt vírus volt kimutatható. Egyik testadenovírus-tartalmú minta Illumina módszerrel történő teljes-genom meghatározását is megkíséreltem, sajnos sikertelenül. Ugyanakkor sikeresek voltak a testadenovírusok hexon-génjét célzó PCR-jeim és ezek termékeinek szekvenálása. Továbbá sikerült összehasonlító filogenetikai vizsgálattal (tanglegram) megerősítenem kutatócsoportunk hipotézisét, hogy *Testadenovirus* nemzetség ismert tagjai (jelenlegi számuk 19) és gazdafajaik (15) párhuzamos evolúciós (koevolúciós) utat jártak be.



## 8 Summary

Research of chelonid (i.e., turtle) viruses is still a marginal field. Their most important pathogens belong to the family *Orthoherpesviridae*, which often decimate protected species; yet members of *Adenoviridae* have also been found in such disease outbreaks. Only a small percentage of the described viruses have their complete genome sequences determined, e.g., from the over a dozen adenovirus types, not even one. Despite this, it was still possible to create a new genus (*Testadenovirus*) for the adenoviruses of turtles (Testudines). The aim of our study was to detect herpesviruses and adenoviruses from 33 specimens died in pet shops, representing 17 species of turtles. In positive cases, we genetically characterised the viruses, and attempted the full genome characterisation of one of the adenoviruses. The carcasses were dissected, and DNA extracted from samples of internal organs was then subjected to degenerate nested PCRs targeting the DNA polymerase gene for both kinds of viruses. Specific-size PCR products were sequenced and the sequences were subjected to BLAST homology searches against the NCBI database. A Chinese pond turtle (*Mauremys reevesii*), a Russian tortoise (*Testudo horsfieldii*), a Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*), a striped mud turtle (*Kinosternon baurii*), a West African mud turtle (*Pelusios castaneus*) and a Greek tortoise (*Testudo graeca*) tested positive for herpesvirus. The virus found in the Greek tortoise showed 97% nucleotide identity with the GenBank testudinid alphaherpesvirus 3 sequence, while the sequences from the other individuals were 99.5% identical to testudinid alphaherpesvirus 1. Two Indian star tortoises (*Geochelone elegans*), one leopard tortoise (*Stigmochelys pardalis*) and two Chinese pond turtles tested positive for adenovirus. Two previously unknown viruses, belonging to the genus *Testadenovirus*, were found in four of the above cases: one in the two Indian star tortoises and the leopard tortoise, and the other one in a Chinese pond turtle. Furthermore, in another Chinese pond turtle, a virus belonging to the genus *Siadenovirus*, described earlier as a major cause of severe disease in the critically endangered Sulawesi tortoise, was detected. An attempt was also made to determine the whole-genome of one of the testadenoviruses using the Illumina method, but unfortunately without success. However, PCRs targeting the hexon gene of testadenoviruses and sequencing of their products were successful. Furthermore, I was able to confirm the hypothesis of our research group, by comparative phylogenetic analysis (tanglegram), that known members of the genus *Testadenovirus* (current number is 19) and their host species (15) have followed a parallel evolutionary (coevolutionary) pathway.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Thomson RC, Spinks PQ, Bradley Shaffer H (2021) A global phylogeny of turtles reveals a burst of climate-associated diversification on continental margins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012215118>
2. Shaffer HB, McCartney-Melstad E, Near TJ, Mount GG, Spinks PQ (2017) Phylogenomic analyses of 539 highly informative loci dates a fully resolved time tree for the major clades of living turtles (Testudines). *Mol Phylogenet Evol* 115:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.006>
3. Gaffney ES, Meeker LJ (1983) Skull morphology of the oldest turtles: a preliminary description of *Proganochelys quenstedti*. *J Vertebr Paleontol* 3:25–28. <https://doi.org/10.1080/02724634.1983.10011953>
4. Rhodin AGJ, Iverson JB, Bour R, Fritz U, Georges A, Shaffer HB, van Dijk PP (2017) Introduction. In: Rhodin AGJ, Iverson JB, van Dijk PP, Saumure RA, Buhlmann KA, Pritchard PCH, Mittermeier RA (eds) *Turtles of the world: annotated checklist and atlas of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status* (8th Ed.), 8th ed. Chelonian Research Foundation & Turtle Conservancy, New York, pp 9–10
5. Scientists G 10K C of Genome 10K (2009): A Proposal to obtain whole-genome sequence for 10 000 vertebrate species. *J Hered* 100:659–674
6. Jaffe AL, Slater GJ, Alfaro ME (2011) The evolution of island gigantism and body size variation in tortoises and turtles. *Biol Lett* 7:558–561. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.1084>
7. Lovich JE, Gibbons W (2021) Introduction. In: Mustafi I, Sayers J, Bentley J, Earle C (eds) *Turtles of the World*. Princeton University Press, Princeton, pp 29–31
8. Lyson TR, Bever GS (2020) Origin and evolution of the turtle body plan. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 51:143–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024746>
9. Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS, Greene JL, Mills T, Leiden Y, Poppy S, Winne CT (2000) The global decline of reptiles, déjà vu amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climatic change. *BioScience* 50:653–666. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0653:TGDORD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2)
10. Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N, San Martín C (2021) Adenovirus structure: What is new? *Int J Mol Sci* 22:5240. <https://doi.org/10.3390/ijms22105240>
11. Kulanayake S, Tikoo S (2021) Adenovirus core proteins: Structure and function. *Viruses* 13:388. <https://doi.org/10.3390/v13030388>
12. Marschang RE (2011) Viruses infecting reptiles. *Viruses* 3:2087–2126. <https://doi.org/10.3390/v3112087>
13. Davison AJ, Benkő M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84:2895–2908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>
14. Harrach B, Tarján ZL, Benkő M (2019) Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS Lett* 593:3660–3673. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13687>

15. Doszpoly A, Harrach B, LaPatra S, Benkő M (2019) Unconventional gene arrangement and content revealed by full genome analysis of the white sturgeon adenovirus, the single member of the genus *Ichtadenovirus*. *Infect Genet Evol* 75:103976. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103976>
16. Salzmann E, Müller E, Marschang RE (2021) Detection of testadenoviruses and atadenoviruses in tortoises and turtles in Europe. *J Zoo Wildl Med* 52:. <https://doi.org/10.1638/2020-0078>
17. Garcia-Morante B, Péntzes JJ, Costa T, Martorell J, Martínez J (2016) Hyperplastic stomatitis and esophagitis in a tortoise (*Testudo graeca*) associated with an adenovirus infection. *J Vet Diagnostic Investig* 28:579–583. <https://doi.org/10.1177/1040638716659903>
18. Davison AJ, Wright KM, Harrach B (2000) DNA sequence of frog adenovirus. *J Gen Virol* 81:2431–2439. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2431>
19. Rivera S, Wellehan JFX, McManamon R, Innis CJ, Garner MM, Raphael BL, Gregory CR, Latimer KS, Rodriguez CE, Diaz-Figueroa O, Marlar AB, Nyaoke A, Gates AE, Gilbert K, Childress AL, Risatti GR, Frasca S (2009) Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forstenii*) caused by a novel siadenovirus. *J Vet Diagnostic Investig* 21:415–426. <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>
20. Doszpoly A, Wellehan JFX, Childress AL, Tarján ZL, Kovács ER, Harrach B, Benkő M (2013) Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infect Genet Evol* 17:106–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>
21. Benkő M, Aoki K, Arnberg N, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, Jones MS, Kaján GL, Kajon AE, Mittal SK, Podgorski II, San Martín C, Wadell G, Watanabe H, Harrach B (2022) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Adenoviridae* 2022. *J Gen Virol* 103:. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
22. László TZ (2021) Ósibb gerincesek különféle vírusainak genetikai vizsgálat, biodiverzitása és filogenetikája. PhD értekezés, Állatorvostudományi Doktori Iskola, Budapest
23. Péntzes JJ, Menéndez-Conejero R, Condezo GN, Ball I, Papp T, Doszpoly A, Paradela A, Pérez-Berná AJ, López-Sanz M, Nguyen TH, van Raaij MJ, Marschang RE, Harrach B, Benkő M, San Martín C (2014) 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00306-14>
24. Ball I, Behncke H, Schmidt V, Papp T, Stöhr AC, Marschang RE (2014) Partial characterisation of new adenoviruses found in lizards. *J Zoo Wildl Med* 45:287–297. <https://doi.org/10.1638/2013-0143.1>
25. Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkő M, Pessier AP, Johnson CM, Garner MM, Childress A, Jacobson ER (2004) Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol* 78:13366–13369. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.13366-13369.2004>
26. Péntzes JJ, Szirovicza L, Harrach B (2020) The complete genome sequence of bearded dragon adenovirus 1 harbors three genes encoding proteins of the C-type lectin-like domain superfamily. *Infect Genet Evol* 83:104321. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104321>
27. Jacobson ER, Gaskin JM, Gardiner CH (1985) Adenovirus-like infection in a *Boa constrictor*. *J Am Vet Med Assos* 187:1226–1227

28. Farkas SL, Benkő M, Élő P, Ursu K, Dán Á, Ahne W, Harrach B (2002) Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus Atadenovirus. *J Gen Virol* 83:2403–2410. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2403>
29. Farkas SL, Gál J (2009) Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. *Vet Microbiol* 138:169–173. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.016>
30. Pfitzer S, Boustead KJ, Vorster JH, Du Plessis L, La Grange LJ (2019) Adenoviral hepatitis in two Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) hatchlings from South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 90: e1-e4. <https://doi.org/10.4102/jsava.v90i0.1987>
31. Okoh GR, Horwood PF, Whitmore D, Ariel E (2021) Herpesviruses in reptiles. *Front Vet Sci* 8: 642894 <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.642894>
32. Leineweber C, Müller E, Marschang RE (2021) Herpesviruses in captive chelonians in Europe between 2016 and 2020. *Front Vet Sci* 8: 733299 <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.733299>
33. Wilkinson R (2004) Clinical pathology. In: McArthur S, Wilkinson R, Jean M (eds) *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK, pp 177-183.
34. Lovstad JN, Ossiboff RJ, Kinsel MJ, Gamble KC (2019) Novel herpesvirus associated with oropharyngeal squamous cell carcinoma in Smooth green snakes (*Ophedryx vernalis*). *Vet Pathol* 56:630–635. <https://doi.org/10.1177/0300985819837722>
35. Marschang RE, Origi FC, Stenglein MD, Hyndman TH, Wellehan JFX, Jacobson ER (2020) Viruses and viral diseases of reptiles. In: Jacobson ER, Garner MM (eds) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, pp 575–704
36. Une Y, Murakami M, Uemura K, Fujitani H, Ishibashi T, Nomura Y (2000) Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of herpesvirus in tortoises. *J Vet Med Sci* 62:905–907. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.905>
37. Kolesnik E, Obiegala A, Marschang RE (2017) Detection of Mycoplasma spp., herpesviruses, topiviruses, and ferlaviruses in samples from chelonians in Europe. *J Vet Diagnostic Investig* 29:820–832. <https://doi.org/10.1177/1040638717722387>
38. Johnson AJ, Pessier AP, Wellehan JFX, Brown R, Jacobson ER (2005) Identification of a novel herpesvirus from a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Vet Microbiol* 111:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.09.008>
39. Bicknese EJ, Childress AL, Wellehan JFX (2010) A novel herpesvirus of the proposed genus Chelonivirus from an asymptomatic Bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *J Zoo Wildl Med* 41:353–358. <https://doi.org/10.1638/2009-0214R.1>
40. Kolesnik E, Mittenzwei F, Marschang RE (2016) Nachweis von Testudinid-Herpesvirus Typ 4 bei einer Pantherschildkröte (*Stigmochelys pardalis*). *Tierärztliche Prax Ausgabe K Kleintiere / Heimtiere* 44:283–286. <https://doi.org/10.15654/TPK-150843>
41. Origi FC (2006) Herpesviruses in Reptiles. In: Mader DR (ed) *Reptile Medicine and Surgery*, 2nd edition. Saunder, Saint- Louis MO, USA pp 814–821
42. Jones K, Ariel E, Burgess G, Read M (2016) A review of fibropapillomatosis in Green turtles (*Chelonia mydas*). *Vet J* 212:48–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.041>

43. O'Rourke DP, Lertpiriyapong K (2015) Biology and Diseases of Reptiles. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT (eds) *Laboratory Animal Medicine*. Elsevier, London, pp 967–1013
44. Cowan ML, Raidal SR, Peters A (2015) Herpesvirus in a captive Australian Krefft's river turtle (*Emydura macquarii krefftii*). *Aust Vet J* 93:46–49. <https://doi.org/10.1111/avj.12290>
45. Široký P, Frye FL, Dvořáková N, Hostovský M, Prokop H, Kulich P (2018) Herpesvirus associated dermal papillomatosis in Williams' mud turtle *Pelusios williamsi* with effects of autogenous vaccine therapy. *J Vet Med Sci* 80:1248–1254. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0126>
46. Hunt CJG (2006) Herpesvirus Outbreak in a Group of Mediterranean Tortoises (*Testudo* spp). *Vet Clin North Am - Exot Anim Pract* 9:569–574. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2006.05.018>
47. Hervás J, Sánchez-Cordón PJ, Chacón de Lara F, Carrasco L (2002) Hepatitis associated with herpes viral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*). *J Vet Med Ser B* 49:111–114. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00522.x>
48. VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM (1996) Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34:1666–1671. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.7.1666-1671.1996>
49. Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden Package, 1998. *Methods Mol Biol* 132: Bioinforma Methods Protoc 115–130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
50. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
51. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
52. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
53. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
54. Huson DH, Scornavacca C (2012) Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst Biol* 61:1061–1067. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys062>
55. Salinas M, Francino O, Sánchez A, Altet L (2011) Mycoplasma and herpesvirus PCR detection in tortoises with rhinitis-stomatitis complex in Spain. *J Wildl Dis* 47:195–200. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.195>
56. Martel A, Blahak S, Vissenaekens H, Pasmans F (2009) Reintroduction of clinically healthy tortoises: The herpesvirus trojan horse. *J Wildl Dis* 45:218–220. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.218>

57. Soares JF, Chalker VJ, Erles K, Holtby S, Waters M, McArthur S (2004) Prevalence of *Mycoplasma agassizii* and Chelonian herpesvirus in captive tortoises (*Testudo* sp.) in the United Kingdom. *J Zoo Wildl Med* 35:25–33. <https://doi.org/10.1638/02-092>
58. Origgi FC, Romero CH, Bloom DC, Klein PA, Gaskin JM, Tucker SJ, Jacobson ER (2004) Experimental transmission of a herpesvirus in greek tortoises (*Testudo graeca*). *Vet Pathol* 41:50–61. <https://doi.org/10.1354/vp.41-1-50>
59. Gandar F, Wilkie GS, Gatherer D, Kerr K, Marlier D, Diez M, Marschang RE, Mast J, Dewals BG, Davison AJ, Vanderplasschen AFC (2015) The genome of a tortoise herpesvirus (Testudinid Herpesvirus 3) has a novel structure and contains a large region that is not required for replication *in vitro* or virulence *in vivo*. *J Virol* 89:11438–11456. <https://doi.org/10.1128/JVI.01794-15>
60. Kolesnik E, Obiegala A, Marschang RE (2017) Detection of *Mycoplasma* spp., herpesviruses, topiviruses, and ferlaviruses in samples from chelonians in Europe. *J Vet Diagnostic Investig* 29:820–832. <https://doi.org/10.1177/1040638717722387>
61. Stöhr AC, Marschang RE (2010) Detection of a tortoise herpesvirus type 1 in a Hermann's tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*) in Germany. *J Herpetol Med Surg* 20:61. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-20.2.61>
62. Tóth A (2022) Teknős eredetű minták szűrése adeno- és cirilvírusokra. Szakdolgozat. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
63. Nieto-Claudin A, Esperón F, Apakupakul K, Peña I, Deem SL (2022) Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises. *Transbound Emerg Dis* 69:. <https://doi.org/10.1111/tbed.14391>
64. Okoh GR, Ariel E, Wirth W, Whitmore D, Horwood PF (2023) Molecular detection of novel herpesviruses and adenoviruses in two species of Australian freshwater turtles. *Eur J Wildl Res* 69:84. <https://doi.org/10.1007/s10344-023-01714-x>
65. Gellért Á, Benkő M, Harrach B, Peters M, Kaján GL (2022) The genome and phylogenetic analyses of tit siadenoviruses reveal both a novel avian host and viral species. *Infect Genet Evol* 103:105326. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105326>
66. Harrach B, Benkő M (2003) Molecular evolution of adenoviruses. In: Doerfler W, Böhm P (eds) *Adenoviruses: model and vectors in virus host interactions*. Springer, Berlin, pp 3–35
67. Schumacher VL, Innis CJ, Garner MM, Risatti GR, Nordhausen RW, Gilbert-Marcheterre K, Wellehan JFX, Childress AL, Frasca S (2012) Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two Impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*). *J Zoo Wildl Med* 43:501–510. <https://doi.org/10.1638/2011-0228R.1>

## 10 Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Papp Tibornak** a rengeteg segítséget, kitartást és türelmet melyet irányomba tanúsított és a sok időt melyet rám áldozott. Nélküle dolgozatom biztosan nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom **Dr. Marosi Andrásnak**, amiért egyetemi belsős konzulensként lehetővé tette, hogy a dolgozattal részt vehessek a Tudományos Diákköri Konferencián, illetve a hasznos tanácsokért, mellyel segítette dolgozatom létrejöttét.

Továbbá köszönettel tartozom az Állatorvostudományi Kutatóintézet Molekuláris virológia témacsoport munkatársainak, amiért a felmerülő kérdéseimmel bátran fordulhattam hozzájuk, külön köszönet **Prof. Dr. Harrach Baláznak**, aki bölcs iránymutatásával segítette és észrevételeivel látta el dolgozatomat.

Külön köszönet illeti a **Kis Teki Terrarisztikai Szakkereskedés** munkatársait és a többi terraristát az elhullott teknősök tetemeiért.

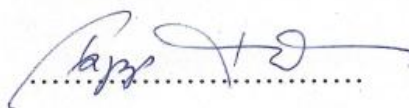
Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak**, különösképp szüleimnek, és **barátaimnak (Horváth Andrásnak, Eszes Petrának és Maróthy Róbert Dánielnek)** a sok segítséget és támogatást.

A vizsgálatok anyagi fedezetét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal **OTKA NN140356** pályázat biztosította.

## Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

Alulírott, Dr. Papp Tibor (HUN-REN, ÁTKI, tudományos főmunkatárs), mint témavezető nyilatkozom, hogy Berta Péter Patrik, 6. évfolyamos hallgató „Teknősök herpesz- és adenovírusainak kimutatása és genetikai összehasonlító vizsgálata” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023 év. *október* hó *20* nap.



témavezető



## Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

Alulírott DR. MAROSI ANDRÁS....., mint témavezető nyilatkozom, hogy (név) BERTA PÉTER PATRIK 6. évfolyamos hallgató „TEKNŐSÖK HERPESZ- ÉS ADENOVÍRUSAINAK KIMUTATÁSA ÉS”  
GENETIKAI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételeit támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. . évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023 év.....10.....hó 20 nap.



témavezető



**Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére**

A hallgató neve: Berta Péter Patrik

Neptun-kódja: BDNGJW

A témavezető neve és beosztása: Dr. Marosi András, egyetemi adjunktus

Külsős témavezető: Dr. Papp Tibor, tudományos főmunkatárs, ÁTKI

Tanszék: Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: **Teknősök herpesz- és adenovírusainak kimutatása és genetikai összehasonlító vizsgálata**

**Konzultáció - 1. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	02	08	Téma pontosítása	
2.	2023	03	21	Részeredmények konzult.	
3.	2023	04	17	Részeredmények konzult.	
4.	2023	04	19	További kísérletek megbesz.	
5.	2023	06	05	Eredmények értékelése	

Érdemjegy az első félév végén: ..... **5** .....

**Konzultáció - 2. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	08	22	Eredmények értékelése	
2.	2023	08	25	Eredmények értékelése	
3.	2023	09	07	Dolgozat szerkezet koncepc.	
4.	2023	10	09	Dolgozatírás konzult.	
5.	2023	10	28	Dolgozatírás konzult.	

Érdemjegy a második félév végén: ..... **5** .....

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: Bata Péter Péter

témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: Juhász J. Anna Átvétel dátuma: 2023.10.23.

## NYILATKOZAT

Alulírott Berta Péter Patrik nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe „Teknősök herpesz- és adenovírusainak kimutatása és genetikai összehasonlító vizsgálata” tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.04.

BERTA PÉTER PATRIK Berta Péter Patrik

a hallgató neve és aláírása