

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék



Vadmadarak (főleg sólyomfélék) szűrése
adenovírusokra

Készítette: Czövek Beáta

Témavezető: dr. Kaján Győző László, PhD

Állatorvostudományi Kutatóintézet
tudományos főmunkatárs

Belső konzulens: dr. Forgách Petra, PhD

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
egyetemi adjunktus

Budapest, 2023.

Tartalom

1. Bevezetés	2
1.1 <i>Adenoviridae</i> család	2
1.2 Madár-adenovírusok	4
1.3 Sólyom-adenovírus	7
1.4 A sólymokról általában	8
2. Célkitűzések	10
3. Anyag és Módszer	11
3.1. A minták eredete	11
3.2. DNS kivonása a mintákból	12
3.3. Polimeráz láncreakció (PCR).....	13
3.4. Gélelektroforézis 1%-os agarózgélben	14
3.5. Pozitív minták tisztítása	14
3.6. Szekvenálás.....	14
3.7. Filogenetikai számítások.....	16
4. Eredmények.....	17
5. Megbeszélés	20
6. Összefoglaló	23
7. Summary.....	24
8. Irodalomjegyzék	25
9. Köszönetnyilvánítás	32

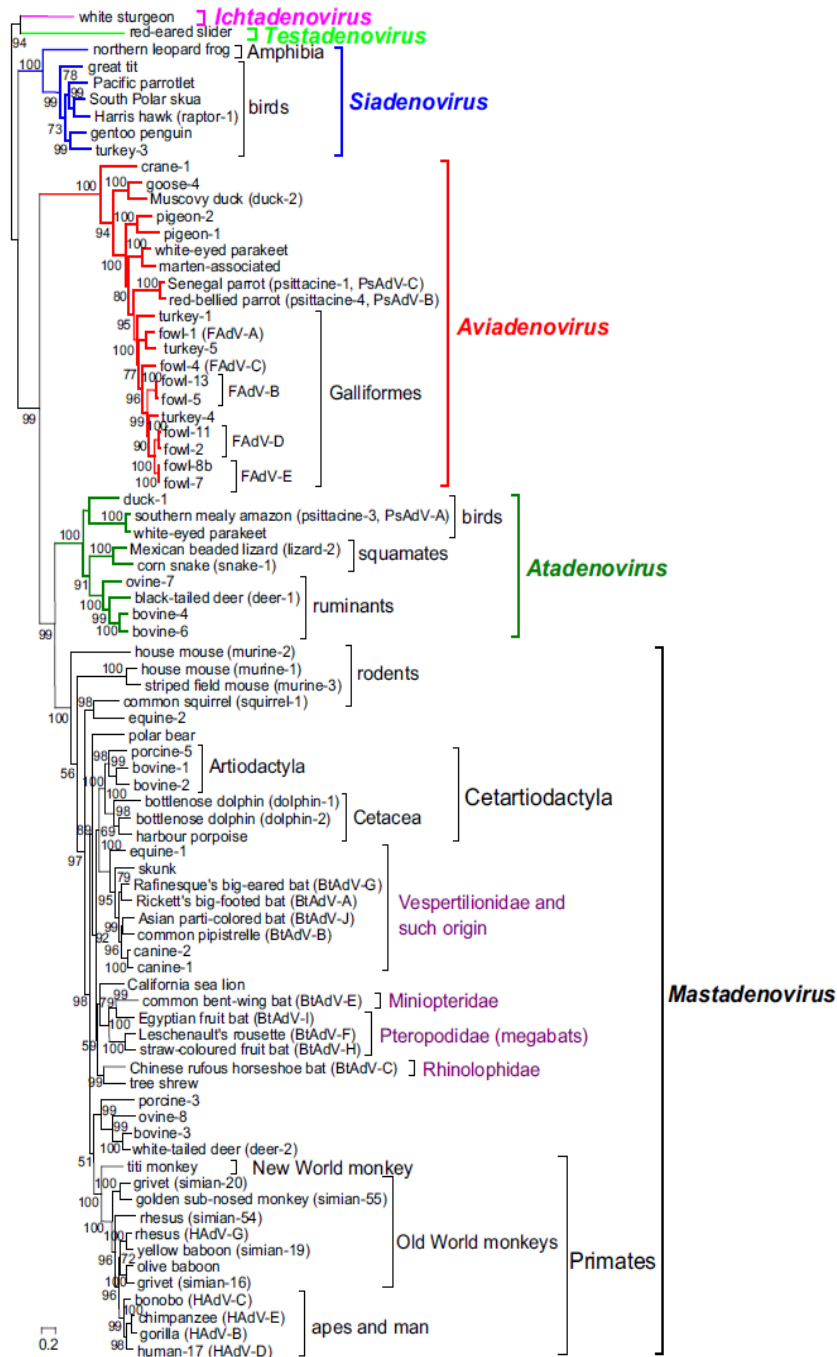
1. Bevezetés

1.1 *Adenoviridae* család

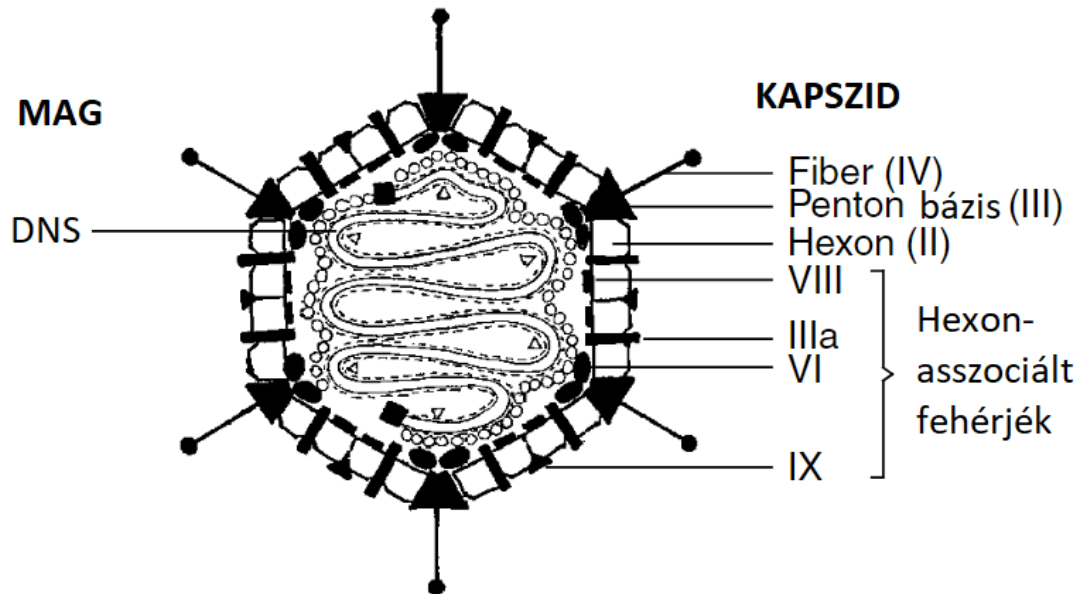
Az *Adenoviridae* család egy olyan víruscsalád, amely minden fajtáig csak gerinces állatokból tudták izolálni [1]. A család hat nemzetségre oszlik [2], nagyjából annak megfelelően, hogy milyen gazdaszervezetből mutatták ki a vírusokat. A *Mastadenovirus* nemzetségben lévő fajokat csak emlősökből, míg az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozókat kizárólag madaraktól izolálták [1]. Az *Ichtadenovirus* nemzetségben egyetlen egy faj található, és ez nem más, mint egy fehér tokból izolált hal-adenovírus [3]. Az *Atadenovirus* nemzetség gazdafajai már diverzebbek: vannak köztük kérődzőkből, madaraktól, pikkelyes hüllőkből izoláltak, továbbá egy faj képviselőit erszényesekből mutatták ki [1]. A *Siadenovirus* nemzetségben olyan vírusfajok találhatók meg, melyek madaraktól, néhány teknős fajból, illetve egyetlen béka fajból lettek kimutatva [1]. Ezért régen úgy vélték, hogy ez utóbbi lesz az a nemzetség melybe be tudják majd sorolni a felfedezésre váró kételtű-adenovírusokat [4]. A legújabb elfogadott nemzetségben csak teknősökből kimutatott vírusok vannak, ezért a *Testadenovirus* nevet kapta. Eddig *in vitro* nem tudtak ilyen vírust izolálni, és egy teljes genomot sem tudtak meghatározni, de a vörösfülű ékszerteknősből kimutatott vírus genomjának nagy része már ismert [1, 5]. Az a tény, hogy az adenovírusok többnyire gazdafaj specifikusak, segít megérteni, hogy a vírusok és gazdafajaik között miként zajlott a közös törzspejlődés (koevolúció). Természetesen idő közben történhettek gazdaváltások. Ezek általában rokon fajok között következtek be, és csak ritkán evolúciósan távoli fajok között [6]. Az adenovírusok törzsfáját az 1. ábrán mutatom be. Az adenovírusoknál a faj alatti taxonómiai egységeket típusoknak, tradicionálisan szerotípusoknak nevezzük.

A virionok morfológiájukat tekintve közepes méretűek (90 nm átmérőjűek), ikozaéder formájú kapsziddal rendelkezők és burok nélküliek. A kapszid 240 hexont és 12 pontot tartalmaz [2]. A pentonok alapjából kiálló szálak, vagy más néven fiberek akár nemzetségben belül is eltérést mutathatnak. Ennek bizonyítéka, hogy az *Atadenovirus* genuson belül leírtak két gént is, melyek két különböző fiber fehérjét kódolnak [7]. Az adenovírusok szerkezetét a 2. ábrán mutatom be. A burok hiánya miatt az *Adenoviridae* családba tartozó vírusok ellenállóak a pH változással szemben, egészen pH 3-ig, és a jodforok ellen is. Hőérzékenységük nemzetségek között változó, de pl. az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozók 56 °C-on 30 percig fertőző képesek maradnak.

A genom lineáris, dupla szálú DNS-ből áll, melynek mérete 25-48 kb közt van. A genom végén megtalálhatók a fordított terminális ismétlődő régiók, melyek 26–721 bp hosszúak, és lehetővé teszik a hatékony replikációt [1, 2]. Ezen kívül a genom központi részén megtalálható egy 16 génből álló kazetta, mely jól megőrzött a nemzetségek között [1, 8].



1. ábra: Filogenetika fa az *Adenoviridae* családról, amely bemutatja a kiválasztott adenovírus fajokon keresztül a lehetséges koevolúciós vonalakat. A fa alapjául a DNS-függő DNS-polimeráz aminosav szekvenciája szolgált a kiválasztott vírusfajokból [1].

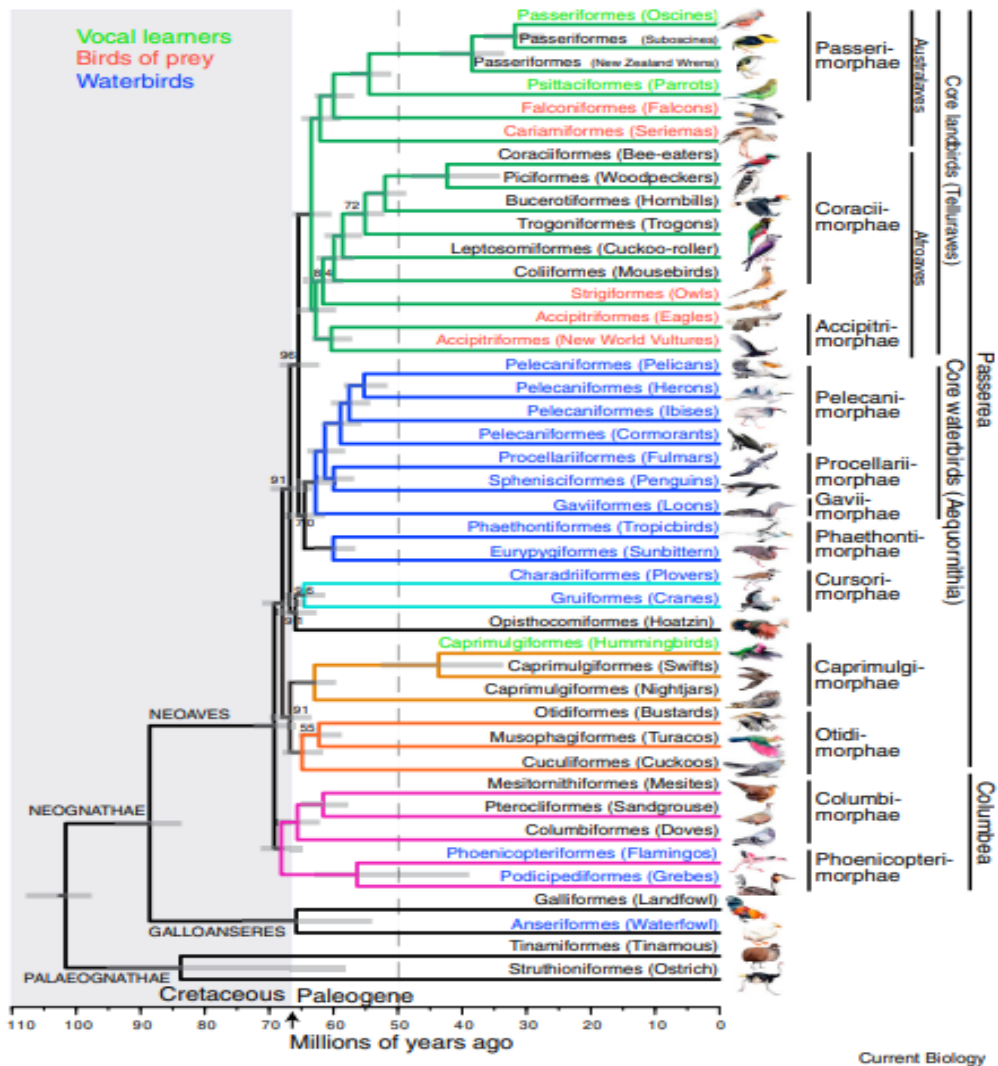


2. ábra: Az adenovírusok szerkezete [9]

1.2 Madár-adenovírusok

A madarakat fertőzni képes adenovírusokat három nemzetségbe sorolhatjuk: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* és *Siadenovirus* nemzetségekbe. Ezek a vírusok genetikailag nagyon különbözők és a fertőzőképességük is nagyon széles határok között mozog. Ennek a nagy változatosságnak az oka feltehetően a madarak hatalmas fajgazdagsága [1].

A madarak osztályát két nagy csoportra oszthatjuk. Az egyik a futómadár-szabásúak, a másik az újmadárszabásúak. Előbbi csoportba sorolhatók a röpképtelen futómadarak és a tinamufélék, míg az utóbbiban megtalálható két öregrend, melynek egyike tartalmazza a tyúk- és lúdalakúakat, a másik pedig az eddig fel nem sorolt összes madárfajt [1, 10–14]. Ezt a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A madarak osztályának családfája [14]

Aviadenovirus nemzetségbe tartozó vírusokat mutattak már ki számos madárfajból. A csoporton belül 16 fajt különítünk el jelenleg. A 12 tyúk-adenovírus szerotípust a tyúk-aviadenovírus A-E jelű fajokba sorolták be, ezek a gazdasági és állategészségügyi szempontból legjelentősebb aviadenovírusok. Ezen vírusok által okozott kórképek felismerése fontos cél az állatorvoslásban. A tyúk-adenovírus 1 zúzógyomor-eróziót okoz a rá fogékony egyedekben. Először a takarmányfelvétel csökkenése és ezáltal lesoványodás, az állomány szétnövése, majd később anémia és toll-képzési zavar is megfigyelhető a fertőzött egyedeknél. Boncoláskor a zúzógyomor falán, a keratinoid réteg leválasztása után fekélyek láthatók [15]. Hasonlóan fontos még a tyúk-adenovírus 4, ami sejtmagzárványos hepatitis-hydropericardium szindrómát okozhat. Ez a kórkép általában a 3-6 hetes brojlersirkéket érinti és magas mortalitással bír. Boncoláskor folyadékgyülem figyelhető

meg a szívburokban, a máj megnagyobbodott, törékeny és foltos az elhalt góccok miatt. Kórszövettani vizsgálat során a májsejtekben sejtmagzárványok figyelhetők meg. A magas mortalitás miatt a vakcinázás lehet az egyik legjobb megoldás. Ehhez használható fertőzött májból készült homogenizátumból formalinnal inaktivált vakcina vagy sejttenyészetekből készült inaktivált vakcinák is [16]. A megbetegedés az utóbbi években jelentős károkat okozott Kínában is [17, 18]. Gyakorlatilag a megbetegedés egy enyhébb változata a sejtmagzárványos májgyulladás, melyet a tyúk-adenovírus 2, 8a, 8b és 11 típusok okozhatnak [19].

Gazdasági haszonállatokból leírtak már továbbá három liba-adenovírust, négy pulyka-adenovírust és két pézsmaréce-adenovírust is [20–22]. A kínai pézsmaréce törzs 91%-ban megegyezik a kacsza-adenovírus 2-vel, kiemelendő azonban, hogy a Kínában izolált vírusnak van egy második fibert kódoló génje [21]. Ezeken a madárfajokon kívül leírták már két papagáj-adenovírus teljes genomszekvenciáját: a papagáj-adenovírus 1 típust szenegáli papagájból, kongópapagájból és rózsás mellű szakállaspapagájból, míg a papagáj-adenovírus 4 típust piros hasú papagájból mutatták ki [23, 24]. A papagáj-adenovírus 1 típussal fertőzött szenegáli papagájban savós-véres bélgyulladást, hasmenést és lesóványodást írtak le. Boncolás után pedig megnagyobbodott, törékeny májat találtak, elhalásos góccokkal [24]. Továbbá mutattak ki szekvenciákat Meyer aranyosvállú papagájából, pávua aratingából [25], humboldt-pingvinből [26], brazil kárókatonából [27], sirályokból [28] és más vadmadarokból is [29]. Futómadár-szabásúak közül eddig csak struccból sikerült adenovírusokat kimutatni, és azt sem az őshonos életterükről származott egyedekből, hanem Európában és Kínában található farmokról gyűjtött mintákból. Az ilyen állatokból leírt adenovírusok megegyeztek a már korábban leírt tyúk-adenovírusokkal [1]. Mindazonáltal 2014-ben struccból először mutatták ki a tyúk-adenovírus 4 szerotípust, ami az adott egyedben hydropericardium szindrómát is okozott [30].

Madár-adenovírusok megtalálhatók még az *Atadenovirus* és a *Siadenovirus* nemzetségekben is. Az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozik a kacsza-adenovírus 1, mely a tyúkok tojásképzési zavarát (egg drop syndrome, EDS) okozza [2]. 1976-ban írták le először tojóttyúkokban [31]. Ez a megbetegedés csirkéket és fűrjeket érint általában, de megtalálható kacsákban és libákban is a vírus. Utóbbi madárfajok természetes gazdaszervezetei ennek a vírusnak. Terjedése mind vertikálisan, mind horizontálisan lehetséges. Vertikálisan a tojáson belül fertőződik az embrió, míg horizontálisan orális úton terjed a fertőzés. A klinikai tünetek először a tojás színének megváltozásában jelentkeznek. A fakó szín után vékony, puha,

érdes, szemcsés héjúak lesznek a tojások, vagy akár héj nélküliek [32]. Ebben a nemzetségben található még a papagáj-adenovírus 3, melyet molnáramazonból izoláltak először [33]. Ezen kívül kéménysarlófecskéből mutattak ki olyan vírust, ami elhalásos mirigygyomor-gyulladást okozott náluk. Ez a betegség étvágytalansággal, kondícióromlással jár makroszkóposan, míg mikroszkóposan a mirigygyomor hámsejtjeinek sejtmag megnagyobbodásával és magzárványokkal [34].

A *Siadenovirus* nemzetségen belül található a pulyka-adenovírus 3, ami a pulykák vérzéses bélgyulladását okozza. Klinikai tünetek a pulykapipéknél jelentkeznek. Ezek közé tartozik a véres hasmenés, a lépmeagnagyobbodás és a következményes elhullás. A tünetek megjelenésének pontos mechanizmusa még nem ismert, de az bizonyos, hogy immunmediált folyamatról van szó. Ebből következik, hogy ez a kórkép megelőzést igényel, így vakcináznak ellen már az 1970-es évek óta [35]. Ebbe a nemzetségbe tartozik még a ragadozómadár-adenovírus 1 is. Ezt a vírust két beteg, elhullott bagolyból és egy Harris-ölyvből mutatták ki először és a teljes genom szekvenciája ismert [36]. Továbbá ebbe a nemzetségbe sorolható a galamb-adenovírus 4 és 5 [37]. Ezen kívül mutattak ki ebből a nemzetségből való vírust délsarki halfarkasból [38], állszíjas pingvinből, számpingvinből [39], valamint verébalakúakból [40–42] is.

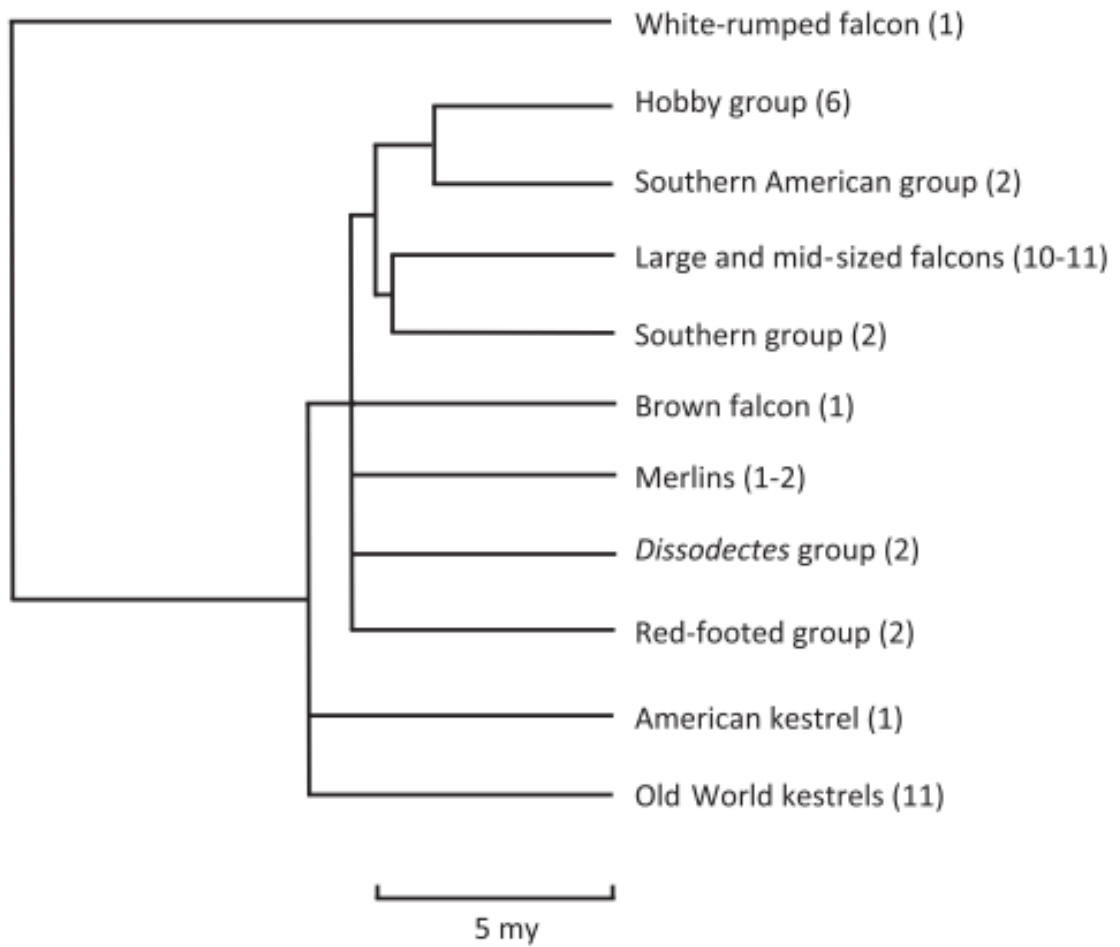
1.3 Sólyom-adenovírus

Sólyomfélékből eddig mindössze egy adenovírust típust ismertünk, mely az *Aviadenovirus* genusba sorolandó sólyom-adenovírus 1, ami a *Falcon aviadenovirus A* fajba sorolható. A típus által okozott járványkitörést először 1996-ban írtak le [43, 44]. Ez a kórokozó az *Aviadenovirus* nemzetségbe tartozik. Legközelebbi rokonai a tyúk-adenovírus 1 és 4 szerotípusok [44], de nem fordul elő a vírus tyúkokban, és nem is a zsákmányállatból kerül át a sólyomba [43]. Továbbá laboratóriumi körülmények között sólyom eredetű sejttenyészet a legoptimálisabb a szaporodásához és a vándorsólymot tartják a gazdaszervezetének és rezervoárjának. Éppen ezért, a hosszútávú koevolúció folyamányaként, ebben a fajban nem okoz klinikai tüneteket a sólyom-adenovírus 1 [43, 45]. A más sólyomfajokban (aplomodosólyom, rozsdásmellű sólyom, taita-sólyom, kis sólyom, északi sólyom és vándorsólyom hibride) megjelenő klinikai tünetek, mint a levertség, hasmenés, kiszáradás, testtömegvesztés és hirtelen elhullás a vándorsólymokban nem jellegzetesek. Ezzel szemben a zárványos májgyulladás, lépmeagnagyobbodás, bélgyulladás már utalhat adenovírus fertőzésre [44]. Ugyanezeket a tüneteket leírták tarka vércséből származó szervmintákban is

nemrég [46]. Szerepet játszik a költési szezon is, ugyanis ebben a periódusban a tojók immunszuppresszált állapotban vannak a megváltozott metabolizmus miatt, amit az oogenezis vált ki, ezért a fertőzés lefutása és kimenetele is másmilyen a tojó és a hím sólymoknál [47]. A gazdasági károk elkerülésére a fogságban tartott egyedeknél legfontosabb a higiénia betartása és a karanténozás. Fertőtlenítésre alkalmazhatók klór tartalmú vegyületek, jódoforok, vagy akár kvaterner ammónium-sók, de klórhexidin nem. Ezeknek az anyagoknak hosszú inkubációs időre van szükségük szobahőmérsékleten, hogy elpusztítsák az összes adenovírust [47].

1.4 A sólymokról általában

A sólymok a madarak osztályán belül a sólyomalakúak rendjébe tartozó ragadozó madarak [48]. Elsősorban füves élőhelyeken, szavannákon fordulnak elő, de egyes fajok bejárják közel az egész világot, vagy erdős területen élnek [49, 50]. Többségüket három nagy csoportra lehet osztani rendszertanilag [50]. Az első a kabasólyom és rokonai alkotta vonal (angol nyelven „hobby”). Ide hat faj tartozik: kabasólyom (*Falco subbuteo*), afrikai kabasólyom (*Falco cuvierii*), keleti kabasólyom (*Falco severus*), ausztrál kabasólyom (*Falco longipennis*), hamvas sólyom (*Falco concolor*) és eleonóra-sólyom (*Falco eleonora*) [51–53]. A második az óvilág vércsési (angolul Old World kestrels), amibe 11 faj tartozik. A harmadik a 10-11 fajt magába foglaló vonal, ahova a nagy- és közepes testű sólyomfélék tartoznak, pl. a vándorsólyom (*Falco peregrinus*) is. Ezen három csoporton kívül kisebb vonalakon még további fajok is elhelyeződnek [48]. Ezt a filogenetika fát a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A sólyomalakúak törzsfája [48]

2. Célkitűzések

Munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam a vadmadarakban, leginkább sólyomfélékben, található adenovírusok sokféleségét és az esetleges koevolúciót a vírusok és gazdaszervezeteik között.

3. Anyag és Módszer

3.1. A minták eredete

Munkám során madár eredetű mintákat vizsgáltam, ezen minták három csoportba voltak sorolhatók: teljes tetem, kloákatampon- illetve bélsárminták. Az elhullott állatok (n=9) az ország több pontján kerültek begyűjtésre. Voltak köztük az Aggteleki Nemzeti Parkból, Emőd külterületéről, Vilmányból, Komlós-kából, Ládbesenyőből, Zomborból, de Pálháza környékéről is érkezett be tetem a laboratóriumba. A vizsgálat előtt minden esetben kiolvastottam az elhullott példányokat, majd mintát vettem a bélcsatornából, a tüdőből, a szívizomból, és a vesékből is. A begyűjtött szervrészeket minden esetben két részre osztottam. Egy kisebb részletet (kb. 40 mg) fém golyóval együtt centrifugacsőbe helyeztem a homogenizálás végett. Egy nagyobb darabot, minden szervből lefagyasztottam, hogy a kísérlet megismételhető legyen.

A kloákatamponminták két helyről származtak. Kisebb részük a Bódva völgyi madárgyűrűző táborból (n=15). A tamponokat a minta levétele előtt PBS pufferrel nedvesítették, a mintázott madarak gyűrűzőtt vadmadarak voltak. De a tamponminták nagyobb része az Egyesült Arab Emírátsokból érkezett (n=121), a mintázott madarak sólyomfélék voltak, egy kakadu kivételével. Utóbbi tamponok nem voltak a mintavétel előtt nedvesítve. Mindkét csoportnál a mintagyűjtő egység tampon végét elszívó fülke alatt, steril eszközökkel eltávolítottam a műanyag pálcáról, és centrifugacsőbe helyeztem.

A bélsárminták szintén az Egyesült Arab Emírátsokból és sólyomfélékből származtak (n=43). A feldolgozásuk során egy kb. borsónyi darabkát egy centrifugacsőbe helyeztem DNS-kivonásra, és egy nagyobb darabot pedig lefagyasztottam, hogy a vizsgálat megismételhető legyen.

Mindent összevetve 188 mintát dolgoztam fel vadmadaraktól, ezeket az 1. táblázatban összefoglalva prezentálom.

1. táblázat: A feldolgozott madárminták összefoglalása

Magyar fajnév	Latin fajnév	Minták száma		
		Szerv	Kloákatampon	Bélsár
aplomodo sólyom	<i>Falco femoralis</i>	0	0	1
barátcinege	<i>Poecile palustris</i>	0	2	0
barátposzáta	<i>Sylvia atricapilla</i>	0	4	0
csilpcsálp füzike	<i>Phylloscopus collybita</i>	0	1	0
egerészölyv	<i>Buteo buteo</i>	1	0	0
erdei fülesbagoly	<i>Asio otus</i>	1	0	0
északi sólyom	<i>Falco rusticolus</i>	0	58	4
északi sólyom x kerecsensólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco cherrug</i>	0	2	0
északi sólyom x préri sólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco mexicanus</i>	0	2	0
északi sólyom x sivatagi sólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco peregrinus pelegrinoides</i>	0	1	0
északi sólyom x vándorsólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco peregrinus</i>	0	34	0
fitiszfüzike	<i>Phylloscopus trochilus</i>	0	1	0
gyöngybagoly	<i>Tyto alba</i>	2	0	0
indiai vándorsólyom	<i>Falco peregrinus peregrinator</i>	0	1	0
kakadu	<i>Cacatuidae</i>	0	1	0
kék cinege	<i>Cyanistes caeruleus</i>	0	2	0
kerecsensólyom	<i>Falco cherrug</i>	0	5	0
kerti poszáta	<i>Sylvia borin</i>	0	1	0
kis légykapó	<i>Ficedula parva</i>	0	1	0
kis sólyom	<i>Falco columbarius</i>	0	1	0
kuvik	<i>Athene noctua</i>	2	0	0
macskabagoly	<i>Strix aluco</i>	2	0	0
mezei poszáta	<i>Curruca communis</i>	0	2	0
széncinege	<i>Parus major</i>	0	1	0
uráli bagoly	<i>Strix uralensis</i>	1	0	0
vándorsólyom	<i>Falco peregrinus</i>	0	14	37
nem ismert faj		0	2	1
Összesen		9	136	43

3.2. DNS kivonása a mintákból

A mintákhoz 1 ml PBS oldatot adtam, majd a szervmintákat egy Tyssue Lyser LT berendezés segítségével 5 percig, 50 Hz-en homogenizáltam, míg a tampon- és bélsármintákat vortexeltem.

A homogenizátumokat 5 percig, 10.000 xg gyorsulással centrifugáltam, majd 200 µl felülúszóból vontam ki DNS-t BioExtract SuperBall (BioSella) kit segítségével egy Kingfisher Flex (Thermo Scientific) berendezésen a gyártó utasításai szerint.

Az esetleges kontamináció kiszűrése érdekében egy feltárási negatív kontroll mintát is készítettem. Ebbe nem került minta, csak 200 µl PBS oldat.

3.3. Polimeráz lánreakció (PCR)

Munkám során kétkörös (nested) polimeráz lánreakciót alkalmaztam, mely a virális DNS-függő DNS polimeráz gén egy szakaszát erősítette fel [54, 55]. Az általam használt összetevők mindkét kör során azonosak voltak, kivéve a primereket. Pozitív kontrollként az első 94 minta esetében szarvasmarha-mastadenovírusból, míg a második 94 minta esetében majom-mastadenovírusból kivont örökítő anyagot használtam. Negatív kontrollom ultratiszta víz volt.

Az alkalmazott program mindkét kör esetében ugyanaz volt. Először 94 °C-on, 5 percig zajlott a kezdeti denaturáció. Majd 45 ciklusban a denaturáció 94 °C-on fél percig, a primer tapadása 46 °C-on 1 percig, és az elongáció 72 °C-on 1 percig. Végül következett a végső elongáció 72 °C-on 3 percig. Mindezek egy Mastercycler NexusGradient berendezésen zajlottak.

A reakcióelegyek a 2. táblázatban, az általam használt primerek szekvenciái a 3. táblázatban kerültek feltüntetésre.

2. táblázat: A PCR-reakcióelegy összetétele

<u>Összetétel</u>	<u>1 mintára</u>
Ultra tiszta víz (Milli-Q víz)	10,5 µl
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix	12,5 µl
polFouter/inner primer (50 µM)	0,5 µl
polRouter/inner primer (50 µM)	0,5 µl
DNS	1 µl
Összes térfogat	25 µl

3. táblázat: Az általam használt primerek szekvenciái [54, 55]

Kör	Primer	Szekvencia (5'-3')
Outer (külső)	polFouter polRouter	TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT
Inner (belső)	polFinner polRinner	GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC CCANCCBCDRTRTGNARNGTRA

N = G/A/T/C, M = A/C, R = A/G, W = A/T, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, H = A/C/T, D = A/G/T, B = C/G/T

3.4. Gélelektroforézis

A polimeráz láncrekció után következett a gélelektroforézis. Ennek célja az volt, hogy a felsokszorozott DNS-darabok közül elkülönítsük molekulásúlyuk alapján azokat, amelyek valóban adenovírusoktól származtak, és amelyek nem. A menete az volt, hogy 1 g agarózt adtam 100 ml 0,5x TAE pufferhez, majd forralással beleoldódott a por a folyadékba. Ez után GelRed (Biotium) festéket adtam az elegyhez 4 µl/100 ml gél adagban. Ezután kiöntöttem a tálcára az 1%-os agarózgélét és vártam, hogy megdermedjen.

Ezután az első 94 mintából, a pozitív és a negatív kontrollból 5 µl-t, a molekulásúly markerből (GeneRuler Mix) 2 µl-t, a hígított pozitív kontrollból pedig 3 µl-t vittem fel a géltre. A második 94 mintából, a pozitív és a negatív kontrollból 3 µl-t, a molekulásúly markerből (GeneRuler Mix) 1 µl-t, a hígított pozitív kontrollból pedig 10 µl-t tettem a géltre. Minden minta esetében 100 V feszültséget alkalmaztam 30-40 percig. Az idő lejáta után UV fény alatt, VWR Imager CHEMI Premium gëldokumentációs rendszer használatával fényképeztem le az agarózgëleket.

3.5. Pozitív minták tisztítása

A specifikus terméket eredményező reakciókból a terméket az ExoProStar 1-Step (Cytiva) kit segítségével tisztítottam a gyártó utasításai szerint.

3.6. Szekvenálás

A megtisztított PCR-termékek nukleotidsorrendjének meghatározásához Sanger didezoxi láncterminációs módszerét alkalmaztam. A reakció összetételét a 4. táblázatban mutatom be.

4. táblázat: Szekvenálási reakció összetétele

Összetevő	1 mintára
Ultra tiszta víz (Milli-Q víz)	1 µl
BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	1 µl
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
polF/Rinner primer (5 µM)	1 µl
Tisztított PCR-termék	1 µl
Összes térfogat	5 µl

A BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix polimeráz enzimet, dezoxi-nukleozid-trifoszfátokat és jelölt dideoxi-nukleozid-trifoszfátokat tartalmaz. Ennek a jelölt molekulának az a funkciója, hogy ha beépül a DNS-láncba, akkor a szintézist megállítja, mert nem tud hozzá kötődni a következő dezoxi-nukleozid-trifoszfát. E miatt a reakció folyamán több, eltérő hosszúságú szál keletkezik, melyeknek a vége a helyettesített nukleotidnak megfelelő színreakciót ad [56].

Az általam használt berendezés egy Mastercycler NexusGradient volt. A szekvenálóprogram egy kezdeti denaturációval kezdődött 96 °C-on 1 percre, majd következett 35-ször egy 3 fázisból álló ciklus. Ennek első lépése a denaturáció volt 96 °C-on 10 másodpercig, majd a primer tapadása következett 50 °C-on, 5 másodpercig, és végül lezajlott az elongáció 60 °C-on 4 percre.

A reakcióelegyet alkoholosan kicsaptam, a precipitáló mix összetételét az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat: Precipitáló mix összetétele

Összetevő	1 mintára
3M Na-acetát (pH 4,6)	1,5 µl
96%-os etanol	31 µl
Ultra tiszta víz (Milli-Q víz)	7,5 µl
Összes térfogat	40 µl

A precipitáló mixet rámértem a szekvenálási reakcióelegyre, és ezután 15 percig pihentettem a mintákat sötétben, szobahőmérsékleten. Majd 2100 xg gyorsulással centrifugáltam 45 percig. Miután eltávolítottam a felülúszót, 70 µl 70%-os etanolt mértem minden csőbe. Utána újra 2100 xg gyorsulással centrifugáltam, de most csak 15 percig. Végezetül pedig a felülúszó leöntése után szárítottam a mintáimat szobahőmérsékleten sötétben 10 percig.

Mivel az Állatorvostudományi Kutatóintézetben nem elérhető a kapilláris gélelektroforézishez használt gép, ami lehetővé teszi a jelölt bázisok sorrendben való leolvasását, ezért a mintáimat az alkoholos kicsapás után a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Szekvenáló Platformjának küldtem el.

3.7. Filogenetikai számítások

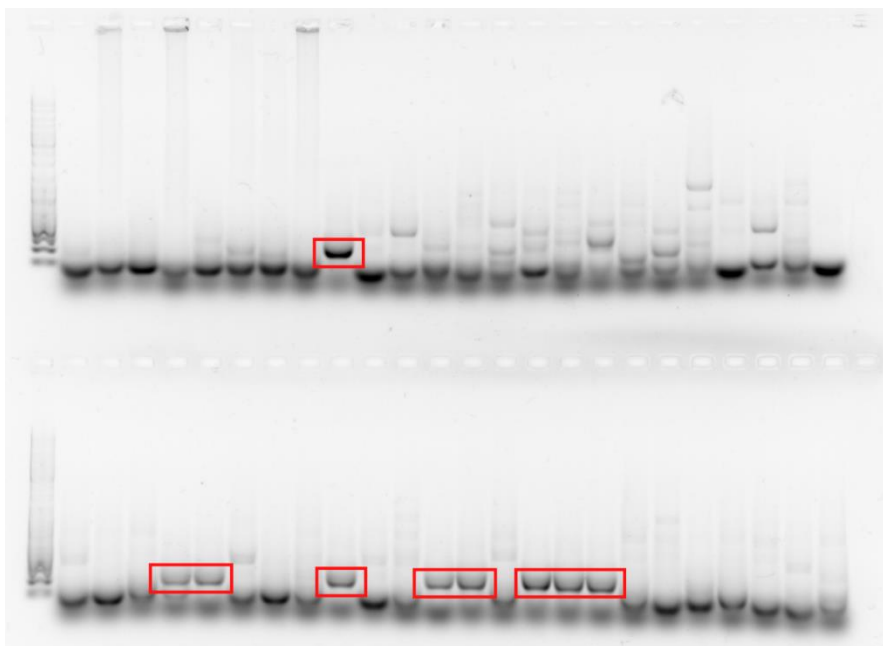
A PCR-termékek nukleotidsorrendjét mindkét szálon meghatároztam, a két szálról származó leolvasásokat illesztettem, majd konszenzust származtattam és aminosavra fordítottam ezeket Geneious szoftverrel. Az aminosav szekvenciákat illesztettem a MAFFT G-INS-i algoritmus segítségével [57], az illesztések szerkesztését pedig manuálisan végeztem. Majd evolúciós modellt prediktáltam a MEGA-X szoftverrel [58], aminek eredményeként LG+I+G modellt alkalmaztam a törzsfarekonstrukciónál. A törzsfát a PhyML 3.3 szoftver segítségével rekonstruáltam [59], ennek megbízhatóságát az SH-aLRT teszttel támasztottam alá [60]. A törzsfát a MEGA-7 szoftverrel jelenítettem meg [61], középen gyökereztettem, és megadtam az SH-aLRT megbízhatósági értékeket százalékban, ha elérték a 75%-ot.

4. Eredmények

A gélelektroforézis után történő leolvasáskor 188 mintából 50-et ítéltünk meg pozitívnak, ezeket a 6. táblázatban foglaltam össze. Ez azt jelenti, hogy az összes minta pozitivitási aránya 26,6% volt. Mintatípusonként nézve a kilenc szervmintából egy (11,1%), a 136 tamponmintából 29 (21,3%), míg a 43 bélsármintából 20 (46,5%) minta mutatott pozitivitást. Az egyik gélelektroforetogramot az 5. ábrán mutatom be.

6. táblázat: A minták pozitivitása

Magyar fajnév	Latin fajnév	Minták száma					
		Szerv		Kloákatampon		Bélsár	
		+	-	+	-	+	-
aplomodo sólyom	<i>Falco femoralis</i>	0	0	0	0	0	1
barátcinege	<i>Poecile palustris</i>	0	0	0	2	0	0
barátposzáta	<i>Sylvia atricapilla</i>	0	0	0	4	0	0
csilpcsalsp füzike	<i>Phylloscopus collybita</i>	0	0	0	1	0	0
egerészölyv	<i>Buteo buteo</i>	1	0	0	0	0	0
erdei fülesbagoly	<i>Asio otus</i>	0	1	0	0	0	0
északi sólyom	<i>Falco rusticolus</i>	0	0	17	41	3	1
északi sólyom x kerecsensólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco cherrug</i>	0	0	1	1	0	0
északi sólyom x préri sólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco mexicanus</i>	0	0	0	2	0	0
északi sólyom x sivatagi sólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco peregrinus pelegrinoides</i>	0	0	0	1	0	0
északi sólyom x vándorsólyom hibrid	<i>Falco rusticolus x Falco peregrinus</i>	0	0	7	27	0	0
fitiszfüzike	<i>Phylloscopus trochilus</i>	0	0	0	1	0	0
gyöngybagoly	<i>Tyto alba</i>	0	2	0	0	0	0
indiai vándorsólyom	<i>Falco peregrinus peregrinator</i>	0	0	0	1	0	0
kakadu	<i>Cacatuidae</i>	0	0	0	1	0	0
kék cinege	<i>Cyanistes caeruleus</i>	0	0	0	2	0	0
kerecsensólyom	<i>Falco cherrug</i>	0	0	1	4	0	0
kerti poszáta	<i>Sylvia borin</i>	0	0	0	1	0	0
kis légykapó	<i>Ficedula parva</i>	0	0	0	1	0	0
kis sólyom	<i>Falco columbarius</i>	0	0	0	1	0	0
kuvik	<i>Athene noctua</i>	0	2	0	0	0	0
macskabagoly	<i>Strix aluco</i>	0	2	0	0	0	0
mezei poszáta	<i>Curruca communis</i>	0	0	0	2	0	0
széncinege	<i>Parus major</i>	0	0	0	1	0	0
uráli bagoly	<i>Strix uralensis</i>	0	1	0	0	0	0
vándorsólyom	<i>Falco peregrinus</i>	0	0	2	12	17	20
nem ismert faj		0	0	1	1	0	1
Összesen		1	8	29	107	20	23

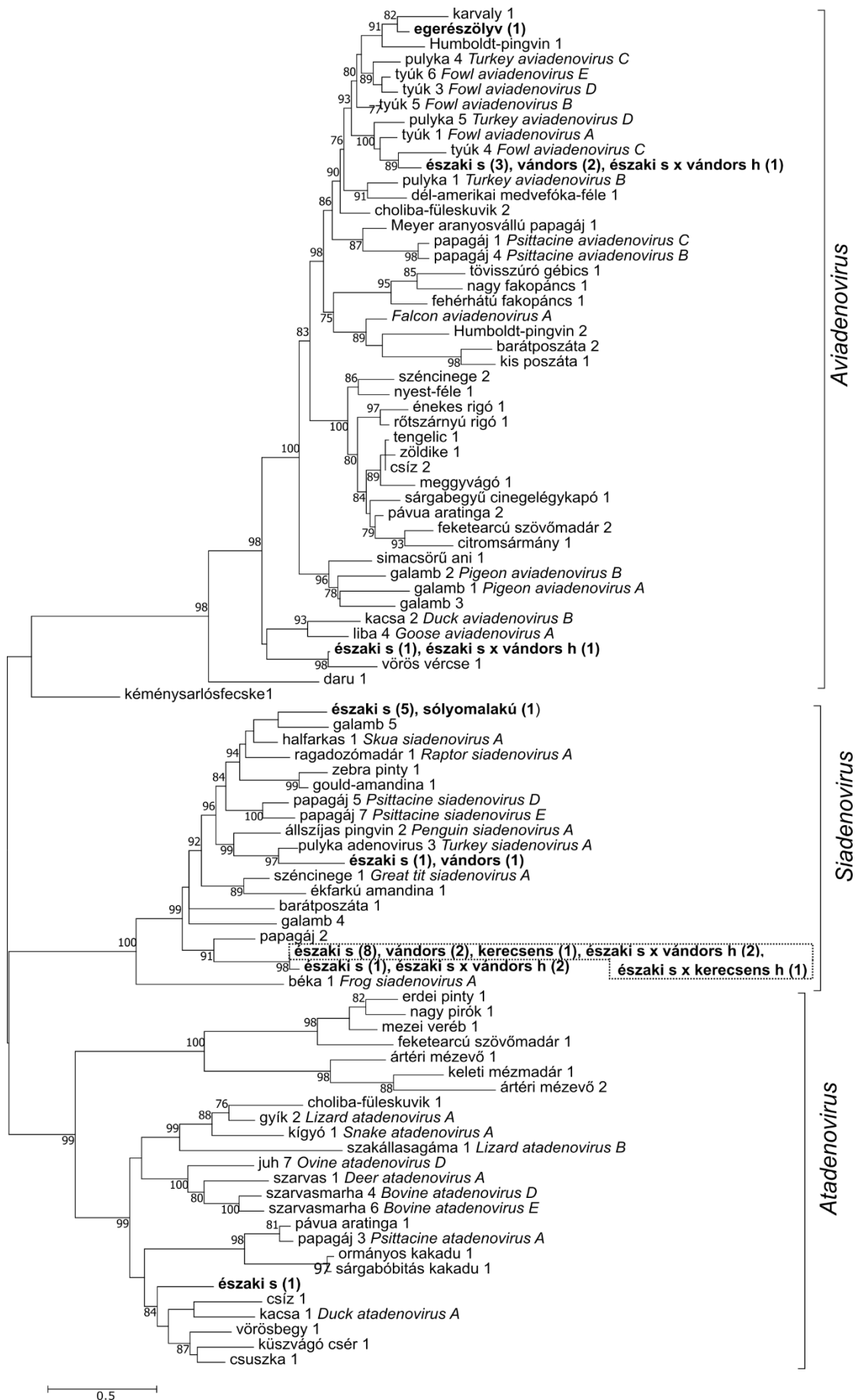


5. ábra: Az első 48 darab minta gélelektroforetogramja. A pozitív mintákat piros keretézéssel jelöltem.

Az 50 PCR-termék közül 36 szekvenciáját határoztam meg, mivel a 20 bélsármintából szelektáltam, és ezek közül csak hat darabot szekvenáltam. Ennek oka az volt, hogy a pozitív bélsárminták mindössze két madárfajból származtak: északi és vándorsólyomból, ezért nagymértékű azonosságot feltételeztem a kimutatott vírusok között. Így véletlenszerűen kiválogattam három-három pozitív mintát a gazdafajoknak megfelelően.

A 36 szekvenált mintából kilenc tartozott az *Aviadenovirus* nemzetségbe, melyen belül három vírustípusra különültek szét. A *Siadenovirus* nemzetségbe sorolható 26 minta közül egy keverék volt, mely legalább két elkülönülő típust tartalmazott, a fennmaradóak négy vírustípusra váltak szét. A maradék egy mintából kimutatott adenovírus pedig az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozik. Az összesen tehát nyolc adenovírus típus közül háromba volt besorolható a fentebb említett hat bélsárminta eredetű vírustörzs. A rekonstruált törzsfát az 6. ábrán foglaltam össze.

A megfigyelhető ághosszak alapján a kimutatott vírustörzsek egyike sem volt korábban ismert adenovírus típusokba vagy fajokba besorolható, az egyetlen eddig ismert sólyom-adenovírus 1 típust nem mutattam ki.



6. ábra: Vadmadár-adenovírusok törzsfarekonstrukciója. Általam vizsgált vírustörzsek: félkövér, zárójelben a pozitív mintaszám. Az adenovírus típusokat a gazdaállat fajneve és a típuszám képviseli. Egy több fajból kimutatott törzs gazdafajait keretezéssel fogtam össze. s – sólyom, h – hibrid

5. Megbeszélés

Egy nemrég publikált kutatás szerint a vadmadarak pozitívítási aránya adenovírusokra 20%-os volt átlagban, a szervminták pozitívítási aránya 27% volt, míg a kloákatampon mintáké 9% [29]. Az munkám során vizsgált szervminták pozitívítási aránya csak 11% volt. Ez azonban feltételezhetően magyarázható a szervminták alacsony számával (n=9). Ezzel ellentétben én jóval magasabb pozitívítási arányt figyeltem meg a kloákatampon minták esetében (21,3%), különösen a sólyomalakú madaraknál. Ez nagy valószínűséggel a vizsgált madarak eltérő méretén alapszik. Harrach és munkatársai többségében kis méretű énekesmadarakat vizsgáltak [29], ahol még a kis méretű mintavevő tampon is túl nagyra bizonyult, ezért csak a kloáka környékéről tudtak mintát begyűjteni. Jelen esetben azonban a sólyomalakúak nagyobb mérete lehetővé tette a szakma szabályainak megfelelő mintavételezést. Így több ürülék került a mintavevő pálcára, ezáltal az egészséges állatokból kisebb mennyiségben ürülő vírusok is kimutatásra kerülhettek.

A kisebb méretű madaraktól ezért is lehetne célravezetőbb orális úton tampon mintát venni. Azonban ennek következménye az lenne, hogy az így kinyert vírusok nagy része inkább a légzőszerveket érintené, mintsem az emésztőtraktust. Ennek egyik oka, hogy a madarak nem rendelkeznek lágy szájpadal [62], ezáltal az orrüregben szaporodó vírusok nagy mennyiségben ürülnek a szájüregbe is. Továbbá az alsóbb légutakban szaporodó vírusok is a szájüreg felé ürülnek elsősorban. Míg az emésztőtraktust érintő vírusok általában a bélcsatornában szaporodnak, így kimutatásukra a kloákából történő mintavétel alkalmas.

Egy másik tanulmány szerint a madár minták átlagos adenovírus pozitívítási aránya 10% feletti [1]. Az általam mért, ennél jóval magasabb pozitívítási arány azért is váratlan, mert a minták többsége - az összes sólyom minta - egészséges, klinikai tüneteket nem mutató állatokból származott. Ez azt látszik alátámasztani, hogy a kimutatott adenovírus törzsek virulenciája mérsékelt. Az adenovírusok többsége ugyanis általában enyhe tüneteket okoz a nem-immunszuppresszált egyedekben [6].

Sólyom félekből eddig mindössze egy adenovírus típust ismertünk, mely az *Aviadenovirus* genusba sorolandó sólyom-adenovírus 1 [44]. A most kimutatott vírustörzsek egyike sem volt se ebbe, se bármilyen már leírt adenovírus típusba sorolható. A kimutatott nyolc vírustípusból három az *Avi*-, négy a *Si*-, egy pedig az *Atadenovirus* genusba volt osztályozható. A vadmadárminták vizsgálata során már jól ismert a jelenség, hogy szinte az összes kimutatott vírus még új a tudomány számára, nem ismert [29]. A Harrach és

munkatársai által leírt 14 vadmadár adenovírus típusból mindössze három volt ismert korábban. Ez is alátámasztja, hogy a vadmadarak, különösen a sólyom félék vírusainak vizsgálata mennyire kevésbé kutatott tudományterület. Az adenovírusok fő fajdemarkációs kritériuma a teljes DNS-polimeráz aminosav-szekvencián alapszik [2], mely jelen esetben nem áll rendelkezésünkre. Ennek ellenére, az általunk kimutatott nyolc új típus feltételezhetően hét új fajt képvisel. Ezt a filogenetikai törzsfá-rekonstrukción megfigyelhető ághosszúságokra alapozhatjuk. A *Siadenovirus* nemzetségen belül megfigyelhető két közel rokon sólyom-adenovírus típus nagy valószínűséggel egy fajba osztható, azonban ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

Az összes vizsgált vírustörzset ragadozó madárból mutattam ki. Ilyen esetben fennáll a veszélye, hogy zsákmányállat eredetű adenovírust is kimutathatunk [63]. Az itt tipizált vírustörzsek egyike sem mutatott nagy fokú hasonlóságot már ismert zsákmányállat adenovírusokkal, de nem zárhatjuk ki, hogy ezek csak a jövőben kerülnek majd leírásra. A zsákmányállatok vírusaitól való elkülönítésben segíthet, ha koevolúciót tudunk leírni a vírusok és gazdáik között. Például jól megfigyelhető, hogy az egyetlen kimutatott atadenovirus törzs más madár-atadenovírusokkal monofiletikus. Így nagy biztonsággal állíthatom, hogy a kimutatott vírustörzs nem rágcsáló vagy hüllő eredetű. További vizsgálatokat igényel azon kérdés megválaszolása, hogy ez a törzs az északi sólymot vagy esetleg ennek egy zsákmánymadarát fertőzhette.

A madarakat fertőző adenovírusok legrégebben leírt nemzetsége az *Aviadenovirus* nemzetség, míg a *Siadenovirus* genust – az egyik első kimutatás alapján - eredetileg a kétélűekkel együtt fejlődőnek gondolták [4]. Ez az elmélet azóta a nagyszámú madár-siadenovírus kimutatásának hatására már többször megkérdőjeleződött. Mi is kimutattunk aviadenovírusokat is, de a tipizált törzsek túlnyomó többsége (71%) siadenovírus. Az egyik kimutatott sólyom-siadenovirus vonalba 17 vírustörzset sorolhatunk be, mely három különböző sólyomfajt és ezek hibridjeit fertőzi. Ez az adenovírus vonal a nagy számú kimutatás és a több gazdafajra alapozva szinte biztosan a sólyomalakúakkal fejlődött együtt, nem táplálék eredetű.

Az európai és az észak-amerikai madárpopulációk egyre csökkenő méretét figyelték meg az elmúlt évtizedekben [64, 65]. Legfőbb okának tekintik az emberi tevékenységet, és az ezzel járó klímaváltozást [64]. Mindemellett a madarak adenovírusai a mai napig kevésbé vizsgáltak, így nem zárható ki az a feltételezés, hogy ezek a kórokozók is hozzájárulnak a

madárpopulációk egyedszámának csökkenéséhez, és egyes fajok veszélyeztetéséhez. Ezért is lenne fontos, hogy ezen tudományterület számára minél több erőforrást biztosítsanak, és több figyelmet szenteljenek ezen vírusok koevolúciójának és biodiverzitásának. Ezt igazolja az általam elvégzett szűrővizsgálat eredménye. Ez azt mutatja, hogy az eddig ismert egy vírustörzs, mely a sólyomféléket fertőzni képes nincs egyedül. A megismert vírusok hatását még nem ismerjük hosszú távon, és további vizsgálatok szükségesek ezek felderítésére.

6. Összefoglaló

Munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam a vadmadarakban, leginkább sólyomfélékben, található adenovírusok sokféleségét és az esetleges koevolúciót a vírusok és gazdaszervezeteik között.

Sólyomfélékből eddig mindössze egyetlen adenovírust írtak le, a sólyom-adenovírus 1 típust (*Falco aviadenovirus A* faj). A vírus elhullásokat okozhat aplomado- (*Falco femoralis*), rozsdásmellű (*Falco deiroleucus*), kis (*Falco columbarius*) és taita-sólyomban (*Falco fasciinucha*), továbbá az északi (*Falco rusticolus*) és a vándorsólyom (*Falco peregrinus*) hibridjében. A vándorsólymot tartják a típus gazdafajának és rezervoárjának, a hosszútávú koevolúció folyamányaként ebben a fajban nem okoz klinikai tüneteket.

Összesen 188 – túlnyomó többségében sólyomfélékből származó – mintát szűrtem adenovírusokra polimeráz láncreakció segítségével.

Az agarózgél-elektroforézis alapján 50 mintát ítéltam pozitívnak, melyek közül 49 sólyomféle volt. Mintatípusonként nézve a kilenc szervmintából egy (11,1%), a 136 tamponmintából 29 (21,3%), míg a 43 bélsármintából 20 (46,5%) minta mutatott pozitívítást. 36 törzs esetében meghatároztam a tisztított PCR-termékek nukleotid sorrendjét, és a származtatott részleges DNS-polimeráz aminosavszekvenciák alapján rekonstruáltam a vírusok törzsfáját. Ezen vírustörzsek közül kilenc az *Aviadenovirus*, 26 a *Siadenovirus*, míg egy az *Atadenovirus* nemzetségbe volt sorolható; a vírustörzsek három avi-, négy si- és egy atadenovirus típust alkottak. Az egyetlen eddig ismert sólyom-adenovírus 1 típus vizsgált mintákban nem volt detektálható. Az általam kimutatott nyolc új adenovírus típus feltételezhetően hét új faj képvisel, ezek egyike sem volt ismert korábban. Eredményeim, a sólyomfélékből kimutatott siadenovírus törzsek nagy száma és változatossága, alátámasztják továbbá, hogy a *Siadenovirus* nemzetség a madarak osztályával már hosszabb ideje együtt fejlődik.

A vadmadarak adenovírusait a mai napig kevésbé vizsgálják, így nem zárható ki az a feltételezés, hogy ezek a korokozók is hozzájárulnak a madárpopulációk egyedszámának csökkenéséhez, és egyes fajok veszélyeztetéséhez. Ezért is lenne fontos, hogy ezen tudományterület számára minél több erőforrást biztosítsanak. Az általam kimutatott sólyom-adenovírusok okozta fertőzések egyedi következményeinek, valamint ezek ragadozómadárpopulációkra gyakorolt hosszútávú hatásának felméréséhez további vizsgálatok szükségesek.

7. Summary

The aim of my work was to investigate the diversity of adenoviruses in wild birds, mainly falconids, and the possible coevolution between viruses and their hosts.

Up to now, a single adenovirus type has been described from falcon species already, falcon adenovirus 1 (species *Falcon aviadenovirus A*). The virus may cause mortality in aplomado falcon (*Falco femoralis*), orange-breasted falcon (*Falco deiroleucus*), merlin (*Falco columbarius*) and taita falcon (*Falco fasciinucha*), as well as in the hybrid of gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and peregrine falcon (*Falco peregrinus*). Peregrine falcons are considered to be the natural host and reservoir species for this virus, and as a consequence of the long-term virus-host coevolution, the infection is usually asymptomatic in them.

In this study, a total of 188 samples, predominantly from falconids, were screened for the presence of adenoviruses using the polymerase chain reaction. Based on agarose gel electrophoresis, 50 samples were considered positive. By sample type, one of nine organ samples (11.1%), 29 of 136 swab samples (21.3%) and 20 of 43 faecal samples (46.5%) were positive. The nucleotide sequences of 36 purified PCR products were determined and a phylogenetic tree was reconstructed based on the derived partial DNA polymerase amino acid sequences. Of the typed strains, nine were of the genus *Aviadenovirus*, 26 of the genus *Siadenovirus* and one of the genus *Atadenovirus*; and the virus strains were classified into three avi-, four si- and one atadenovirus types. The type falcon adenovirus 1, only falcon adenovirus type known to date, was not detected.

The eight new adenovirus types described first in this study are thought to represent seven species. The high positivity rate and diversity of falcon siadenoviruses further support the theory that the genus *Siadenovirus* has been co-evolving with the avian class for a considerable time.

To date, adenoviruses of wild birds have been poorly studied, therefore by the restricted information available, the hypothesis that these pathogens contribute to the decline in bird populations cannot be excluded. The results of my study confirm, that more financial resources are needed for the investigations focusing on the coevolution and biodiversity of these viruses. The long-term impact of the falcon adenoviruses at individual and at population levels is unknown yet, therefore the adenovirus infections of predatory birds should be investigated further.

8. Irodalomjegyzék

1. 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>
2. 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. *Journal of General Virology* 103:001721. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
3. 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*. *Infection, Genetics and Evolution* 75:103976. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103976>
4. Benkő M, Harrach B (2003) Molecular Evolution of Adenoviruses. In: *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interaction*. pp 3–35
5. 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. *Infection, Genetics and Evolution* 17:106–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>
6. Kaján GL, Doszpoly A, Tarján ZL, Vidovszky MZ, Papp T (2020) Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *J Mol Evol* 88:41–56. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09913-4>
7. Péntes 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:. <https://doi.org/10.1128/jvi.00306-14>
8. Davison AJ, Benkő M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* 84:2895–2908
9. Volpers C, Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6:S164–S171. <https://doi.org/10.1002/jgm.496>
10. Jarvis ED, Mirarab S, Aberer AJ, Li B, Houde P, Li C, Ho SYW, Faircloth BC, Nabholz B, Howard JT, Suh A, Weber CC, da Fonseca RR, Li J, Zhang F, Li H, Zhou L, Narula N, Liu L, Ganapathy G, Boussau B, Bayzid MdS, Zavidovych V, Subramanian S, Gabaldón T, Capella-Gutiérrez S, Huerta-Cepas J, Rekepalli B, Munch K, Schierup M, Lindow B, Warren WC, Ray D, Green RE, Bruford MW, Zhan X, Dixon A, Li S, Li N, Huang Y, Derryberry EP, Bertelsen MF, Sheldon FH, Brumfield RT, Mello C v., Lovell P v., Wirthlin M, Schneider MPC, Prosdocimi F, Samaniego JA, Velazquez AMV, Alfaro-Núñez A, Campos PF, Petersen B, Sicheritz-Ponten T, Pas A, Bailey T, Scofield P, Bunce M, Lambert DM, Zhou Q, Perelman P, Driskell AC, Shapiro B, Xiong Z, Zeng Y, Liu S, Li Z, Liu B, Wu K, Xiao J, Yinqi

- X, Zheng Q, Zhang Y, Yang H, Wang J, Smeds L, Rheindt FE, Braun M, Fjeldsa J, Orlando L, Barker FK, Jönsson KA, Johnson W, Koepfli K-P, O'Brien S, Haussler D, Ryder OA, Rahbek C, Willerslev E, Graves GR, Glenn TC, McCormack J, Burt D, Ellegren H, Alström P, Edwards S v., Stamatakis A, Mindell DP, Cracraft J, Braun EL, Warnow T, Jun W, Gilbert MTP, Zhang G (2014) Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science* (1979) 346:1320–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1253451>
11. Jetz W, Thomas GH, Joy JB, Hartmann K, Mooers AO (2012) The global diversity of birds in space and time. *Nature* 491:444–448. <https://doi.org/10.1038/nature11631>
 12. Zhang G, Li C, Li Q, Li B, Larkin DM, Lee C, Storz JF, Antunes A, Greenwold MJ, Meredith RW, Ödeen A, Cui J, Zhou Q, Xu L, Pan H, Wang Z, Jin L, Zhang P, Hu H, Yang W, Hu J, Xiao J, Yang Z, Liu Y, Xie Q, Yu H, Lian J, Wen P, Zhang F, Li H, Zeng Y, Xiong Z, Liu S, Zhou L, Huang Z, An N, Wang J, Zheng Q, Xiong Y, Wang G, Wang B, Wang J, Fan Y, da Fonseca RR, Alfaro-Núñez A, Schubert M, Orlando L, Mourier T, Howard JT, Ganapathy G, Pfenning A, Whitney O, Rivas M v., Hara E, Smith J, Farré M, Narayan J, Slavov G, Romanov MN, Borges R, Machado JP, Khan I, Springer MS, Gatesy J, Hoffmann FG, Opazo JC, Håstad O, Sawyer RH, Kim H, Kim K-W, Kim HJ, Cho S, Li N, Huang Y, Bruford MW, Zhan X, Dixon A, Bertelsen MF, Derryberry E, Warren W, Wilson RK, Li S, Ray DA, Green RE, O'Brien SJ, Griffin D, Johnson WE, Haussler D, Ryder OA, Willerslev E, Graves GR, Alström P, Fjeldså J, Mindell DP, Edwards S v., Braun EL, Rahbek C, Burt DW, Houde P, Zhang Y, Yang H, Wang J, Jarvis ED, Gilbert MTP, Wang J, Ye C, Liang S, Yan Z, Zepeda ML, Campos PF, Velazquez AMV, Samaniego JA, Avila-Arcos M, Martin MD, Barnett R, Ribeiro AM, Mello C v., Lovell P v., Almeida D, Maldonado E, Pereira J, Sunagar K, Philip S, Dominguez-Bello MG, Bunce M, Lambert D, Brumfield RT, Sheldon FH, Holmes EC, Gardner PP, Steeves TE, Stadler PF, Burge SW, Lyons E, Smith J, McCarthy F, Pitel F, Rhoads D, Froman DP (2014) Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* (1979) 346:1311–1320. <https://doi.org/10.1126/science.1251385>
 13. LIVEZEY BC, ZUSI RL (2007) Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zool J Linn Soc* 149:1–95. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00293.x>
 14. Brusatte SL, O'Connor JK, Jarvis ED (2015) The Origin and Diversification of Birds. *Current Biology* 25:R888–R898. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.003>
 15. Kecskeméti S, Bistyák A, Matiz K, Glávits R, Kaján GL, Benkő M (2012) Megfigyelések csirkék adenovírus okozta zúzógyomorfekélyével kapcsolatban. *Magy Allatorvosok Lapja* 134:145–149
 16. Balamurugan V, Kataria JM (2004) The Hydropericardium Syndrome in Poultry – A Current Scenario. *Vet Res Commun* 28:127–148. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000012115.86894.1e>

17. Li H, Wang J, Qiu L, Han Z, Liu S (2016) Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium syndrome in chickens in China. *Infect Genet Evol* 45:230–241. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.006>
18. Pan Q, Liu L, Gao Y, Liu C, Qi X, Zhang Y, Wang Y, Li K, Gao L, Wang X, Cui H (2017) Characterization of a hypervirulent fowl adenovirus 4 with the novel genotype newly prevalent in China and establishment of reproduction infection model of hydropericardium syndrome in chickens. *Poult Sci* 96:1581–1588. <https://doi.org/10.3382/ps/pew431>
19. Schachner A, Grafl B, Hess M (2021) Spotlight on avian pathology: fowl adenovirus (FAdV) in chickens and beyond—an unresolved host-pathogen interplay. *Avian Pathology* 50:2–5
20. Kaján GL, Davison AJ, Palya V, Harrach B, Benkő M (2012) Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4. *Journal of General Virology* 93:2457–2465. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042028-0>
21. Zhang X, Zhong Y, Zhou Z, Liu Y, Zhang H, Chen F, Chen W, Xie Q (2016) Molecular characterization, phylogeny analysis and pathogenicity of a Muscovy duck adenovirus strain isolated in China in 2014. *Virology* 493:12–21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.004>
22. Marek A, Ballmann MZ, Kosiol C, Harrach B, Schlötterer C, Hess M (2014) Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus *Aviadenovirus*. *Journal of General Virology* 95:156–170. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057711-0>
23. Das S, Fearnside K, Sarker S, Forwood JK, Raidal SR (2017) A novel pathogenic aviadenovirus from red-bellied parrots (*Poicephalus rufiventris*) unveils deep recombination events among avian host lineages. *Virology* 502:188–197. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.031>
24. Milani A, Zamperin G, Fusaro A, Salviato A, Bano L, Zandonà L, Brunetta R, Monne I (2018) Complete Genome Sequence of Psittacine Adenovirus 1, Identified from *Poicephalus senegalus* in Italy. *Microbiol Resour Announc* 7:e0103718. <https://doi.org/10.1128/MRA.01037-18>
25. A. Duarte M, F. Silva JM, R. Brito C, S. Teixeira D, L. Melo F, M. Ribeiro B, Nagata T, S. Campos F (2019) Faecal Virome Analysis of Wild Animals from Brazil. *Viruses* 11:803. <https://doi.org/10.3390/v11090803>
26. Cortes-Hinojosa G, Adkesson MJ, Cárdenas-Alayza S, Seguel M, Pavés H, Wellehan Jr. J (2016) Effect of El Niño event on adenoviral diversity on South American fur seals (*Arctophoca australis*) and Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). In: 47th Annual IAAAM Meeting & Conference
27. Verdugo C, Pinto A, Ariyama N, Moroni M, Hernandez C (2019) MOLECULAR IDENTIFICATION OF AVIAN VIRUSES IN NEOTROPIC CORMORANTS

- (PHALACROCORAX BRASILIANUS) IN CHILE. J Wildl Dis 55:105. <https://doi.org/10.7589/2017-10-256>
28. Bodewes R, van de Bildt MW, Schapendonk CM, van Leeuwen M, van Boheemen S, de Jong AA, Osterhaus AD, Smits SL, Kuiken T (2013) Identification and characterization of a novel adenovirus in the cloacal bursa of gulls. *Virology* 440:84–88. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.011>
 29. Harrach B, Megyeri A, Papp T, Ursu K, Boldogh SA, Kaján GL (2022) A screening of wild bird samples enhances our knowledge about the biodiversity of avian adenoviruses. *Vet Res Commun*. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09931-6>
 30. Changjing L, Haiying L, Dongdong W, Jingjing W, Youming W, Shouchun W, Jida L, Ping L, Jianlin W, Shouzhen X, Shangjin C, Yi Z, Yanbo Y (2016) Characterization of fowl adenoviruses isolated between 2007 and 2014 in China. *Vet Microbiol* 197:62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.005>
 31. van Eck JHH, Davelaar FG, van den Heuvel-Plesman TAM, van Kol N, Kouwenhoven B, Guldie FHM (1976) Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. *Avian Pathology* 5:261–272. <https://doi.org/10.1080/03079457608418195>
 32. Roberts JR, Souillard R, Bertin J (2011) Avian diseases which affect egg production and quality. In: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*. Elsevier, pp 376–393
 33. To KKW, Tse H, Chan W-M, Choi GKY, Zhang AJX, Sridhar S, Wong SCY, Chan JFW, Chan ASF, Woo PCY, Lau SKP, Lo JYC, Chan K-H, Cheng VCC, Yuen K-Y (2014) A Novel Psittacine Adenovirus Identified During an Outbreak of Avian Chlamydiosis and Human Psittacosis: Zoonosis Associated with Virus-Bacterium Coinfection in Birds. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3318. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003318>
 34. Needle DB, Wise AG, Gregory CR, Maes RK, Sidor IF, Ritchie BW, Agnew D (2019) Necrotizing Ventriculitis in Fledgling Chimney Swifts (*Chaetura Pelagica*) Associated With a Novel Adenovirus, Chimney Swift Adenovirus-1 (CsAdV-1). *Vet Pathol* 56:907–914. <https://doi.org/10.1177/0300985819861717>
 35. Beach NM, Duncan RB, Larsen CT, Meng X-J, Sriranganathan N, Pierson FW (2009) Comparison of 12 turkey hemorrhagic enteritis virus isolates allows prediction of genetic factors affecting virulence. *Journal of General Virology* 90:1978–1985. <https://doi.org/10.1099/vir.0.010090-0>
 36. Kovács ER, Benkő M (2011) Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 11:1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.03.021>
 37. Ballmann MZ, Harrach B (2016) Detection and partial genetic characterisation of novel avi- and siadenoviruses in racing and fancy pigeons (*Columba livia domestica*). *Acta Vet Hung* 64:514–528. <https://doi.org/10.1556/004.2016.047>

38. Park YM, Kim J-H, Gu SH, Lee SY, Lee M-G, Kang YK, Kang S-H, Kim HJ, Song J-W (2012) Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica. *Virology* 422:144–150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.008>
39. Lee S-Y, Kim J-H, Seo T-K, No JS, Kim H, Kim W-K, Choi H-G, Kang S-H, Song J-W (2016) Genetic and Molecular Epidemiological Characterization of a Novel Adenovirus in Antarctic Penguins Collected between 2008 and 2013. *PLoS One* 11:e0157032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157032>
40. Rinder M, Schmitz A, Baas N, Korbel R (2020) Molecular identification of novel and genetically diverse adenoviruses in Passeriform birds. *Virus Genes* 56:316–324. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01739-3>
41. Kovács ER, Jánoska M, Dán Á, Harrach B, Benkő M (2010) Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit. *J Virol Methods* 163:262–268. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.007>
42. 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. *Infection, Genetics and Evolution* 105326. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105326>
43. Oaks JL, Schrenzel M, Rideout B, Sandfort C (2005) Isolation and Epidemiology of Falcon Adenovirus. *J Clin Microbiol* 43:3414–3420. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3414-3420.2005>
44. Schrenzel M, Oaks JL, Rotstein D, Maalouf G, Snook E, Sandfort C, Rideout B (2005) Characterization of a New Species of Adenovirus in Falcons. *J Clin Microbiol* 43:3402–3413. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3402-3413.2005>
45. Kaján GL, Doszpoly A, Tarján ZL, Vidovszky M, Papp T (2020) Virus–host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses. *J Mol Evol* 88:41–56. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09913-4>
46. Gagnon CA, Provost C, Lair S (2022) Coding-Complete Genome Sequence of a *Falcon aviadenovirus A* Strain Associated with Necrotizing Hepatitis in an American Kestrel (*Falco sparverius*). *Microbiol Resour Announc* 11:. <https://doi.org/10.1128/mra.00009-22>
47. Dean J, Latimer KS, Oaks JL, Schrenzel M, Redig PT, Wünschmann A (2006) Falcon Adenovirus Infection in Breeding Taita Falcons (*Falco Fasciinucha*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18:282–286. <https://doi.org/10.1177/104063870601800310>
48. Wilcox JJS, Boissinot S, Idaghdour Y (2019) Falcon genomics in the context of conservation, speciation, and human culture. *Ecol Evol* 9:14523–14537. <https://doi.org/10.1002/ece3.5864>
49. Sólyom (*Falco Linn.*). <http://mek.oszk.hu/03400/03408/html/1508.html>. Accessed 11 Oct 2022

50. Fuchs J, Johnson JA, Mindell DP (2015) Rapid diversification of falcons (Aves: Falconidae) due to expansion of open habitats in the Late Miocene. *Mol Phylogenet Evol* 82:166–182. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.010>
51. Helbig AJ, Seibold I, Bednarek W, Gaucher P, Ristow D, Scharlau W, Schmidl D, Wink M (1994) Phylogenetic relationship among Falcon species (genus *Falco*) according to DNA sequence variation of the cytochrome b gene. In: Meyburg B-U, Chancellor RD (eds) *Raptor Conservation Today*. WWGBP & Pica Press, Berlin & Mountfield, pp 593–599
52. Hobby. <https://www.britannica.com/animal/hobby-bird>. Accessed 11 Oct 2022
53. Debus SD, Olsen J, Trost S, Judge D (2020) Diet of the Australian Hobby Falco longipennis breeding in Canberra, Australian Capital Territory, in 2002–2004 and 2005–2008. *Australian Field Ornithology* 37:174–183. <https://doi.org/10.20938/afo37174183>
54. Kaján G, Sameti S, Benkő M (2011) Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: A reference panel for a general diagnostic PCR in poultry. *Acta Vet Hung* 59:279–285. <https://doi.org/10.1556/avet.2011.006>
55. 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>
56. BIOinformatika. <http://www.bioinfo.pte.hu/f2/f27.htm>. Accessed 11 Oct 2022
57. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
58. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
59. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
60. Anisimova M, Gil M, Dufayard J-F, Dessimoz C, Gascuel O (2011) Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes. *Syst Biol* 60:685–699. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041>
61. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

62. ANATOMY OF BIRDS. <https://univet.hu/wp-content/uploads/2021/04/Bird-anatomy-scelatal-muscular-digestive-system.pdf>. Accessed 11 Oct 2022
63. Jejesky de Oliveira AP, Valdetaro Rangel MC, Z. Vidovszky M, Rossi JL, Vicentini F, Harrach B, L. Kaján G (1988) Nursing organizations propose solutions to the shortage. *Mich Nurse* 61:3–4
64. Lehkoinen A, Brotons L, Calladine J, Campedelli T, Escandell V, Flousek J, Grueneberg C, Haas F, Harris S, Herrando S, Husby M, Jiguet F, Kålås JA, Lindström Å, Lorrillière R, Molina B, Pladevall C, Calvi G, Sattler T, Schmid H, Sirkiä PM, Teufelbauer N, Trautmann S (2019) Declining population trends of European mountain birds. *Glob Chang Biol* 25:577–588. <https://doi.org/10.1111/gcb.14522>
65. Rosenberg K v., Dokter AM, Blanche PJ, Sauer JR, Smith AC, Smith PA, Stanton JC, Panjabi A, Helft L, Parr M, Marra PP (2019) Decline of the North American avifauna. *Science* (1979) 366:120–124. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1313>

9. Köszönetnyilvánítás

Rengeteg hálával tartozom témavezetőmnek, dr. Kaján Győző Lászlónak, aki mindig segített bármilyen problémába is ütköztem dolgozatom elkészítésének ideje alatt. Köszönettel tartozom türelméért, azért, hogy laboratóriumi munkám során precizításra tanított, és azért, hogy bármilyen kérdés merült fel bennem mindig próbálta legjobb tudása szerint megválaszolni azt.

Köszönettel tartozom még dr. Harrach Balázsnak és dr. Benkő Máriának, akik nagy odafigyeléssel voltak irántam, és bármilyen problémával, vagy elmélettel felkereshettem őket, mindig szívesen láttak irodájukban egy kis eszmecsere. Rengeteget tanultam tőlük, de nem csak a vírusok világáról, hanem az állatorvosi lét szépségeiről is.

Köszönettel tartozom még dr. Doszpoly Andornak és dr. Marko Zadravecnek a sólyommintákért.

Hálás vagyok a labor minden dolgozójának azért, hogy segítséget nyújtottak elakadásaim során. E mellett azért a kedvességért és baráti beszélgetésekért, ami minden alkalommal a munkánk része volt. Egy élmény volt besétálni a kapun, és elkezdni a munkanapot ilyen emberek mellett.

Hálával tartozom dr. Forgách Petrának, hogy belső konzulensként segítette munkámat és dolgozatom elkészülését.

Köszönettel tartozom drága családomnak és barátaimnak, hogy mindig támogattak az elmúlt években.

A kutatás részben az OTKA NN140356 pályázat támogatásával valósult meg, részben pedig a TKP2021-EGA-01 projekt keretében. A TKP2021-EGA-01 azonosítószámú „Diagnosztikai és védekezési eljárások fejlesztése házi és vadonélő madárfajok kiemelt gazdasági és közegészségügyi kockázattal járó fertőző megbetegedéseire” elnevezésű projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium (jogutód: Kulturális és Innovációs Minisztérium) Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által kibocsátott támogatói okirat alapján valósul meg 343 126 000 Ft összegben.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott dr. Kaján Győző László, dr. Forgách Petra, mint témavezető nyilatkozom, hogy Czövek Beáta állatorvostan-hallgató „Vadmadarak (főleg sólyomfélék) szűrése adenovírusokra” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. 09. 30.


.....

témavezető


.....

belső konzulens

NYILATKOZAT

Alulírott CZÓVEK BÉLA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Vadmadarak (főleg olyau félék) röhke aduochu-ora..... tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022..... évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 10. 19......


.....
CZÓVEK BÉLA

a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Czövek Beáta

Neptun-kódja: FILBC1

A témavezető neve és beosztása: dr. Kaján Győző, tud. főmts.

Tanszék: Állatorvostudományi Kutatóintézet

Belső konzulens: dr. Forgách Petra, egyetemi adjunktus

Tanszék: Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Vadmadarak (főleg sólyomfélék) szűrése adenovírusokra

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021.	09.	30.	Minták áttekintése	dr. Kaján U
2.	2021.	10.	12.	Módszertan megbeszélése	dr. Kaján U
3.	2021.	10.	27.	DNS kivonás	dr. Kaján U
4.	2021.	11.	09.	1. plate PCR 1. kör	dr. Kaján U
5.	2021.	12.	01.	1. plate PCR 2. kör, agaróz gélen futtatás	dr. Kaján U

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022.	02.	25.	2. plate PCR 1. kör	dr. Kaján U
2.	2022.	03.	30.	2. plate PCR 2. kör, agaróz gélen futtatás	dr. Kaján U
3.	2022.	04.	08.	PCR termékek tisztítása, szekvenálás	dr. Kaján U
4.	2022.	05.	17.	Filogenetikai elemzés	dr. Kaján U
5.	2022.	09.	05.	TDK előadás gyakorlása	dr. Kaján U

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, védeésre alkalmasnak találtam.

dr. Nagy M

.....
témavezető aláírása

RM R

.....
belső konzulens

Hallgató aláírása:

[Handwritten signature]

Tanszéki előadó aláírása:

János K. Varga

Átvétel dátuma:

2023. Okt. 19