

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Zoológiai Tanszék**

DNS-vírusok keresése és filogenetikai elemzések madarakban és  
emlősökben

Screening and phylogenetic analysis of bird and mammalian DNA-  
viruses

**Kovács Hanna Panna**

Témavezető: Dr. Vidovszky Márton

Állatorvostudományi Kutatóintézet, Molekuláris Virologia Kutatócsoport

Társtémavezető: Surján András

Állatorvostudományi Kutatóintézet, Molekuláris Virologia Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Pásztory-Kovács Szilvia

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék

2024

## Absztrakt

A madarak és denevérek számos közös tulajdonságuk alapján kiváló alanyai a különböző vírusok kimutatásának és tanulmányozásának. Kutatásunk során ezen gazdaszervezetek szerv- és tamponmintáiból igyekeztünk kimutatni különböző DNS-vírusokat, az adott mintagyűjteményekben a legnagyobb valószínűséggel kimutatható víruscsaládok tagjait célozva. A különböző víruscsaládokra specifikus nested PCR módszereket alkalmaztunk, majd a gélelektroforézis alapján pozitívnak tűnő mintákat szekvenáltuk. Egy magántartótól származó japán fürjek (*Coturnix japonica*) két egyedéből sikerült kimutatnunk ugyanazon, a *Siadenovirus* nemzetséghez tartozó adenovírust. A vizsgálataink azt mutatják, hogy a kimutatott vírus a DNS-függő DNS polimeráz részleges génszekvenciája alapján feltételezhetően egy új adenovírus faj első tagja: legközelebbi rokona a pulyka-siadenovírus 3, nukleotid szekvencia esetén 78%-os, aminosav szekvencia esetén 80%-os egyezéssel. Filogenetikai törzsfá-rekonstrukció alapján az általunk talált vírus jól elkülönülő kládot alkot a pulyka- és a pingvin-siadenovírusokkal. A törzsfákon láthatóak a *Siadenovirus* nemzetségre jellemző korai gazdaváltási, és későbbi vírus-gazda koevolúciós folyamatok is, melyek szintén alátámasztják a készített fa megbízhatóságát. Ebből arra következtethetünk, hogy az adenovírusok DNS-polimeráz génszekvenciájának egy rövidebb szakaszából is megfelelő filogenetikai analízist tudunk végezni.

A munkánk során tapasztalt magas negativitási arány szokatlan a kapcsolódó irodalom alapján, azonban sok tényező szabályozhatja a vírusok prevalenciáját egyes populációkban, melyek még kevésbé kutatottak. A megbízhatóbb eredmények érdekében érdemes lenne folytatni a szűréseket, esetleg fejlettebb metagenomikai módszerekkel kiegészítve, a tenyésztett fürjeket pedig állatorvosi és gazdasági szempontból fontos lehet nagyobb arányban szűrni vírusokra.

## Abstract

Birds and bats have several common characteristics that make them ideal subjects for the screening and study of different viruses. The aim of our research was to detect different DNA viruses in the organ and swab samples of these hosts, targeting the members of the virus families most likely to be found in the given sample collections. After using family-specific nested PCRs, we sequenced the samples that appeared positive based on gel electrophoresis. We detected the same adenovirus belonging to the genus *Siadenovirus* in two specimens of Japanese quail (*Coturnix japonica*), obtained from a private quail owner. Our studies show that the detected virus is presumably the first member of a new species, based on the partial DNA-dependent DNA polymerase gene sequence: its closest relative is turkey siadenovirus 3, with a 78% identity for the nucleotide sequence and 80% for the amino acid sequence. Based on phylogenetic tree reconstruction, the virus we found forms a distinct clade with turkey and penguin siadenoviruses. Early host changes and subsequent virus-host co-evolutionary processes typical of the genus *Siadenovirus* can also be seen on the tree, which support its authenticity as well. We can conclude that a reliable phylogenetic analysis can be performed from the partial adenoviral DNA polymerase gene sequence.

The high rate of negativity we experienced in the samples is unusual based on related literature, but many factors may control the prevalence of viruses in some populations, which are, however, poorly researched. In order to obtain more reliable results, it would be ideal to continue the screenings, possibly supplemented by more advanced metagenomic methods, and it may be important from a veterinary and economic point of view to screen a higher proportion of farmed quails for viruses.

## Tartalomjegyzék

<b>Absztrakt</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	6
<b>Bevezetés</b> .....	7
<b>Irodalmi áttekintés</b> .....	9
<b>1. Madarak adenovírusai</b> .....	9
<b>1.1. Siadenovírusok</b> .....	12
<b>1.2. Aviadenovírusok</b> .....	13
<b>1.3. Atadenovírusok</b> .....	14
<b>2. Denevérek vírusai</b> .....	14
<b>2.1. Adenovírusok</b> .....	15
<b>2.2. Poliómavírusok</b> .....	16
<b>2.3. Herpeszvírusok</b> .....	16
<b>2.4. Papillómavírusok</b> .....	17
<b>2.5. Cirkovírusok</b> .....	18
<b>Célkitűzések</b> .....	19
<b>Anyag és módszer</b> .....	20
<b>1. A minták eredete</b> .....	20
<b>2. DNS-kivonás elhullott állati szervekből</b> .....	21
<b>3. PCR (polimeráz láncreakció)</b> .....	22
<b>4. Agaróz gélelektroforézis</b> .....	23
<b>5. DNS izolálása a gélből</b> .....	24
<b>6. Sanger-szekvenálás</b> .....	25
<b>7. Filogenetikai analízis</b> .....	26
<b>Eredmények</b> .....	28
<b>1. Minták pozitivitása</b> .....	28
<b>1.1. Hazai madár-mintagyűjtemény</b> .....	28
<b>1.2. Németországi denevér-mintagyűjtemény</b> .....	28
<b>1.3. Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevér-mintagyűjtemény</b> .....	28
<b>2. Kimutatott új madár-adenovírus</b> .....	28
<b>3. Filogenetikai analízis</b> .....	29
<b>Megbeszélés</b> .....	30
<b>1. Hazai madár-mintagyűjtemény</b> .....	30
<b>2. Németországi denevér-mintagyűjtemény</b> .....	32

<b>3. Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevér-mintagyűjtemény .....</b>	<b>34</b>
<b>Összefoglalás.....</b>	<b>35</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>36</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>41</b>
<b>Függelék .....</b>	<b>42</b>

## Rövidítések jegyzéke

AdV	adenovírus
CV	cirkovírus
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
HV	herpeszvírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
kb	kilo bázispár
MQ	Milli-Q víz
PCR	polimeráz-láncreakció
PV	papillómavírus
PyV	poliómavírus
RNS	ribonukleinsav
TE	Tris-EDTA

## Bevezetés

A vírusok kutatása napjainkban egyre nagyobb jelentőséggel bír, elsősorban a járványkiváltó képességük felismerése miatt. Ez nem csak a COVID-19 világjárvány, hanem az egyéb, haszonállatokat fertőző vírusok (afrikai sertéspestis, madárinfluenza stb.) kártételeinek is az eredménye. Ezek hatására a diagnosztikai módszerek is gyorsan fejlődnek, amely a vírusok gyorsabb azonosítását, valamint az ellenük történő hatékony védekezést teszi lehetővé [1].

A madarak és denevérek hasonló, sajátos életmódjuk miatt hatékony gazdaszervezetek a különböző vírusok számára. Röpképességük és vándorlási szokásuk miatt nagy távolságokat tesznek meg, így hatékonyan terjesztik az általuk hordozott vírusokat. Ezenfelül mind a madarak, mind a denevérek számos faja nagy egyedsűrűségű kolóniákban él, amelyek ideális körülményeket biztosítanak a vírusátadásra az egyedek között fajon belül, vagy akár fajok között is [2, 3].

A madarakban leggyakrabban előforduló vírusok az *Adenoviridae* család tagjai, az adenovírusok (AdV), amelyek világszerte előfordulnak mind háziasított, mind vadmadarakban. Az *Adenoviridae* család hat elfogadott nemzetsége közül háromban, az *Aviadenovirus*, az *Atadenovirus* és a *Siadenovirus* nemzetségekben találhatóak madarakat is fertőző vírusok [4]. A háziasított madarakban előforduló AdV-ok gazdasági okokból jobban kutatottak, mint a vadmadarakban megtalálhatóak, ez azonban hátrányos a vírusok kutatása szempontjából. A vadmadarakban előforduló vírusok nem csak gazdafajajukra jelentenek kockázatot – amelyek gyakran különböző antropogén hatások miatt is veszélyeztetettek –, hanem egyes esetekben gazdaváltással képesek más fajokat is megfertőzni, így a háziasított madarakra áttérjedve komoly gazdasági károkat okozhatnak. Az AdV fertőzés általában tünetmentes, azonban populációk érintkezésekor, gazdaváltáskor, immunhiányos, vagy több vírussal egyszerre fertőződött egyedben légúti és gasztrointesztinális tüneteket, vagy akár halált is okozhat [5, 6]. Újabb kutatás szerint az AdV-ok több tulajdonsága potenciálisan világjárvány okozójává teheti őket: tünetmentes és látens fertőzést alakítanak ki, rekombinációval képesek variánsok kialakítására, illetve nincsenek ellenük hatékony védekezési módok [5].

A denevérek természetes vírusrezervoár szerepéről sok kutatás számol be, azonban pontos háttere máig sem teljesen ismert. Igen változatos vírusokat hordozhatnak, amelyek más emlősfajok megfertőzésére is képesek lehetnek, így fontos rendszertani csoportnak számítanak az új vírusok felfedezése és a zoonózisok nyomon követése szempontjából. Az általuk hordozott vírusok nagy része fajspecifikus, azonban közülük néhány, mint például a koronavírusok,

jelentős aggodalomra adnak okot [8]. Vírusrezervoár szerepük feltételezhetően azzal magyarázható, hogy perzisztens fertőzés alakul ki bennük időszakos fellángolásokkal. A madarakhoz hasonló tulajdonságaik mellett jellemző rájuk a hosszú élettartam és a sajátos immunrendszer, amely korlátozni képes a káros gyulladási reakciókat, és szabályozni tudja a vírus elterjedését a szervezetben. Ezek az egyedi jellemzők kedvezhetnek egyszerre több vírus hordozásának is [1, 8, 9]. A denevérek hasznos szerepet játszanak ökoszisztémáinkban; emberek számára csupán a természetes élőhelyeikre való fokozatos behatolás jelenti a kockázatot, hiszen az egyre gyakoribb érintkezéssel növeljük a vírusok átvitelének kockázatát [9].

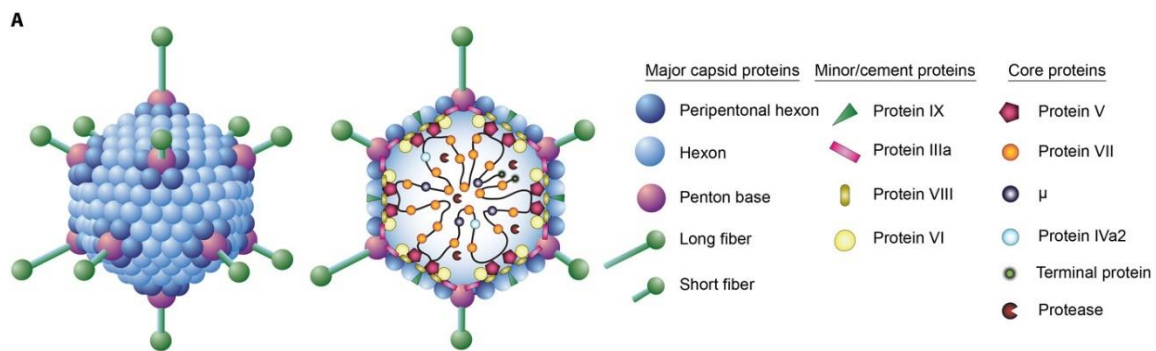
Mindezek által továbbra is szükség van újabb vírusok felfedezésére, illetve leszármazási kapcsolataik felderítésére, hogy ebből kifolyólag megóvhassuk a természetes faunánkat és háziállatainkat a feltörekvő fertőzésektől, növelni tudjuk felkészültségünket újabb járványok ellen, illetve akár alkalmazhassuk ezen vírusokat terápiás vektorokként [10].



## Irodalmi áttekintés

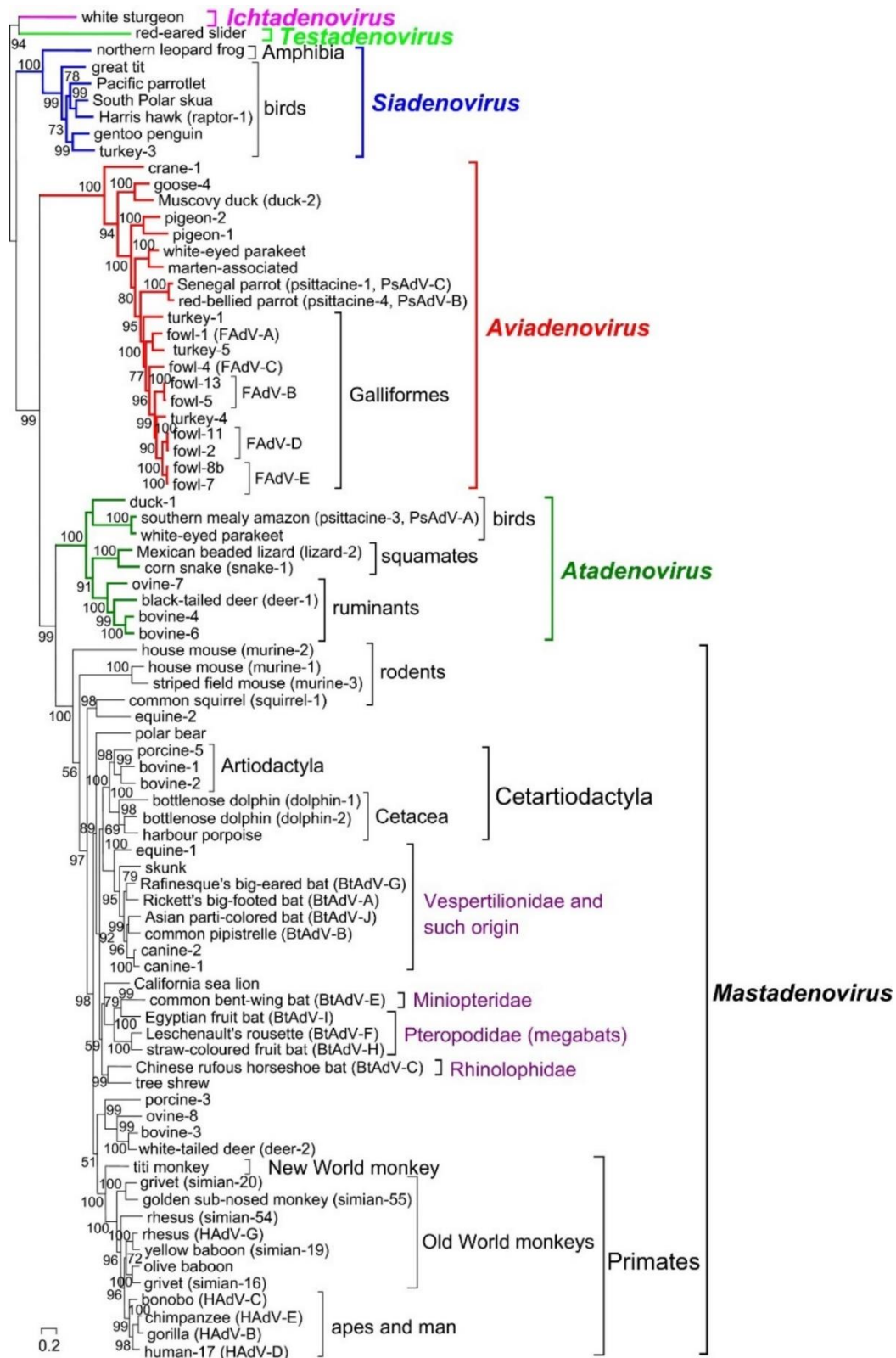
### 1. Madarak adenovírusai

Az *Adenoviridae* családba burok nélküli, 25–48 kb hosszúságú lineáris, kettős szálú DNS genommal rendelkező vírusok tartoznak: az 1. ábra sematikususan mutatja be felépítésüket. A gerincesek minden osztályából ismerünk az adott csoportot fertőző AdV-okat, a halaktól az emberig [11]. Az AdV nemzetségek általános felépítése hasonló, azonban a genomok két szélén több a nemzetség-specifikus rész, amelyek nagyban eltérnek; elsősorban a genom jobb oldali végén nagyobb a variabilitás. A géneket a fertőzés kezdete után a kifejeződésig eltelt idő, valamint a transzkripció módja szerint kategorizáljuk. A korai gének feladata a hatékony DNS-replikáció biztosítása, valamint a kései gének expressziójának elősegítése. Az intermedier IVa2 gén szerepe a transzkripció megindítása, a kései gének feladata pedig elsősorban a szerkezeti fehérjék kódolása, ezáltal pedig a kapszid felépítése [4].

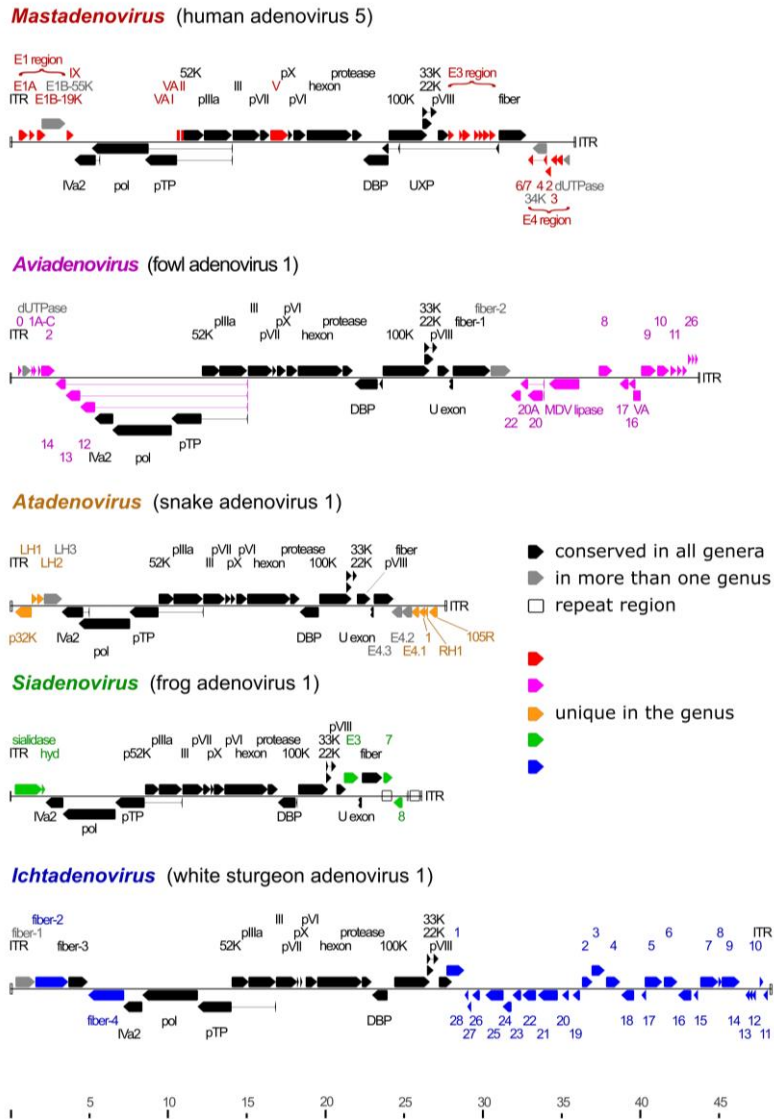


1. ábra. Az AdV általános felépítése és fehérjei [12]. Az ábra „B” részét eltávolítottuk.

A családba hat nemzetség tartozik, amelyek mindegyike bizonyos állatcsoportokban gyakoribb. A jelenleg hivatalosan elismert AdV fajok száma 87. Ezek közül a *Mastadenovirus* nemzetségbe 51 faj tartozik, amelyek tagjai kizárólag emlősöket, az *Aviadenovirus* nemzetség 16 fajába tartozó AdV-ok pedig kizárólag madarakat fertőznek. Az *Atadenovirus* nemzetség 10 fajt tartalmaz: az ide tartozó AdV-ok változatos gazdáknak előfordulhatnak, mint a pikkelyes hüllők, madarak, kérődzők és erszényes állatok. A *Siadenovirus* nemzetségbe jelenleg 8 faj tartozik, melyekben madarak, békák és teknősök vírusai találhatóak. Az *Ichtadenovirus* nemzetség egyetlen fajába a fehér tok AdV-a tartozik, a *Testadenovirus* nemzetségbe pedig eddig szintén csak 1 faj tartozik, melynek egyetlen tagja a vörösfülű ékszerteknős AdV-a. Az egyes nemzetségek leszármazási viszonyait a 2. ábra, tagjaiknak általános genomszerkezetét a 3. ábra szemlélteti. Az egyes fajok elkülönítése legfőképpen a filogenetikai távolságon alapul (>5-15% eltérés a DNS-függő DNS polimeráz gén (pol) aminosavszekvenciáján alapján, hiszen ez az egyik legmegőrzöttebb gén) [3, 11, 13].



2. ábra. Az AdV nemzetségek leszármazási viszonyai [3]. Dólt betűvel szerepelnek az AdV nemzetségek, lila színnel a denevér taxonok, fekete színnel pedig az egyéb taxonómiai csoportok és taxonok.



3. ábra. Genomszerkezetek az egyes AdV nemzetségek fajaiban [3]

Általánosságban igaz, hogy egyes AdV-ok természetes gazdaköre egyetlen gazdafajra (fajspecifitás), vagy evolúciósan közeli rokon fajokra korlátozódik; azonban az is bizonyított, hogy számos AdV képes (akár nagy taxonómiai távolságokat is átívelő) gazdaváltásra. Filogenetikai vizsgálatok is mutatják, hogy ez a jelenség előfordult a legtöbb kórokozó evolúciója során. A hatékonyabban alkalmazkodni képes kórokozónál (pl. RNS vírusok) ez gyakoribb, míg például a kevésbé változékony, duplaszálú DNS genommal rendelkező vírusoknál (amilyenek az AdV-ok is) ritkább. E tulajdonság remek alannyá teszi ezeket a vírusokat a vírus-gazda koevolúció vizsgálatára, hiszen a változások akár évmilliókra is visszakövethetőek. Gazdaváltás akkor következhet be, ha a vírus valamilyen tényező (legtöbbször genetikai mutáció) miatt hatékonyan képes megfertőzni egy olyan új

gazdaszervezetet, amely korábban nem volt kitéve, vagy nem volt fogékony e vírusfertőzésre. A lehetséges gazdaszervezetek fogékonysága jelentősen eltérhet, jellemzően a természetes gazdaszervezet közeli rokonai a legérzékenyebbek. Vírusok sikeres gazdaváltását gyakran az gátolja meg, hogy az ehhez szükséges molekuláris változások a kórokozó más tulajdonságait hátrányosan befolyásolják, például nem képes megfelelően szaporodni [11, 14–16]. Így az AdV DNS-polimeráz teljes aminosav-szekvenciáján alapuló filogenetikai rekonstrukció a családra jellemző általános vírus-gazdaszervezet koevolúciót tükrözi, korábbi fontos gazdaváltásokkal [3].

Az AdV-ok többek között májbetegségeket, vérzéses bélgyulladást, sárgás vizeletet és székletet, súlycsökkenést, felborzolt tollazatot, légúti betegségeket és hirtelen halált okozhatnak madarakban. A klinikai tünetek és az AdV típusok sokfélesége miatt többnyire nem állapítható meg pontos összefüggés a típusok és a specifikus patológiás állapotok között [17]. Jellegzetes azonban a tyúk AdV-4, mely hydropericardium szindrómát okoz csirkékben, valamint a tyúk AdV-1, mely zúzógyomorfekélyt okoz. A kacsza AdV-1 az “egg drop” szindróma okozója (tojáshozam csökkenés), a pulyka AdV-3 pedig vérzéses bélgyulladást okoz. Ez utóbbi a pulykákon kívül más baromfikat is képes fertőzni, gazdaságilag igen jelentős; akár 60%-os elhullást is okozhat be nem oltott állományokban [6, 11].

Sajátunkhoz hasonló magyarországi kutatások eredményeképpen 20%-os [6], illetve 19%-os [18] arányban mutattak ki AdV-t mindhárom madarat is fertőző nemzetségből, így mi is ehhez hasonló eredményt vártunk.

### **1.1. Siadenovírusok**

A siadenovírusok rövidebb genommal rendelkeznek (26-27 kb), G+C arányuk jellemzően alacsony (35-39%). A DNS-polimeráz génszekvencia diverzitása akár 35% is lehet a nemzetségen belül; főként a középső, konzervált régiója hasonlít a többi nemzetségére. A genom két végén nemzetség-specifikus gének találhatóak; a bal oldali végén jellemzően megtalálható a szialidáz gén, melyről a nemzetség a nevét kapta [4]. A siadenovírusok döntő többségét madarakban írták le; az első leírt siadenovírus a pulykák vérzéses bélgyulladását okozó pulyka AdV-3 volt [18]. Hagyományosan feltételezett ezen vírusok kételtű gazdából való eredete, mivel a béka AdV-1 rendelkezik a legrövidebb és legegyszerűbb genommal az AdV-ok közül. Ezt azonban kevés bizonyíték támasztja alá, és további intenzív szűrések után sem sikerült újabb siadenovírust kimutatni kételtűekből. A rendelkezésre álló információk alapján inkább egy nagy gazdaváltási eseményre következtethetünk, melynek során az ősi siadenovírus

egy *Passeriformes* rendbe tartozó gazdáról ugrott át más fajokra a nemzetség korai evolúciója során. Ezt az is alátámasztja, hogy minden eddig vizsgált siadenovírus az A+T felé torzított bázisösszetételű DNS-sel rendelkezik, amely a gazdaváltási események egyik jellemzője [3, 4, 16]. Egy újonnan kimutatott papagáj-siadenovírus genom filogenetikai elemzése nem mutatott szoros evolúciós kapcsolatot a többi siadenovírus típussal; az eredményül kapott fák azt mutatták, hogy az új AdV a béka-siadenovírus kivételével az összes ismert tagnál korábban fejlődött ki, és feltehetőleg a madár siadenovírusok őse [19].

Szlovéniai fogságban tartott madarak szűrése 16,3%-os AdV pozitivitást mutatott, melynek nagy része papagáj siadenovírus volt. Mivel egy AdV-t több gazdafajból is kimutattak, a kutatás alapján megállapították, hogy a *Psittaciformes* renden belül gyakran jelenik meg az AdV gazdaváltása [17]. Hasonló kutatást folytattak Magyarországon, amely azonban csupán 5,6%-os arányban mutatta ki a papagáj AdV-2-t. A különbség feltehetőleg a mintavételi módszerek eltéréséből adódhatott: a magyarországi kutatás során mind élő, mind elhullott egyedekből történt a mintavételezés, míg a szlovéniai szűrések esetén csak élő állatokat vizsgáltak [17, 18], azonban nem egyértelmű, hogy ez miért okozott ekkora különbséget.

## 1.2. Aviadenovírusok

Magas genetikai diverzitású nemzetség; a G+C arányban nagymértékű eltérés figyelhető meg a fajok között (34-67%). Konzervált régiójukban két nemzetség-specifikus fiber gén található, melyek a sejthez való kötődést segítik elő. E nemzetséget madárra specifikusnak tartjuk, hiszen bár más élőlénycsoportokból is kimutatták már tagjait, ez általában kontaminációból, vagy prédaállat vírusának kimutatásából fakadt. A daru-AdV 1 esetében a gazdaszervezetekkel való koevolúciót feltételeztük, azonban a madarak leszármazását figyelembe véve itt is feltehetőleg gazdaváltás történt [4, 11, 20].

Három baromfijárványt követően Nagy-Britanniában vizsgálatot végeztek a magas mortalitás okának felderítésére. A kimutatott zúzógyomorfelekély összhangban volt a tyúk-aviadenovírus (FAdV) típusok tünetével, majd ezt a megállapítást megerősítették: a zúzamintákból FAdV-A fajba tartozó FAdV-1 DNS jelenlétét mutatták ki. Egyes esetekben FAdV-8-cal való együttes fertőzést találtak, azonban megállapították, hogy a zúza kóros elváltozásai csak FAdV-1-el való fertőzöttség esetében jelentek meg; ezáltal kizárták a FAdV-8 részvételét a betegség kialakításában [21].

### 1.3. Atadenovírusok

Elnevezésük genomjuk A+T gazdagságából származik (>60%), hiszen az első, szarvasmarhákban azonosított atadenovírusok mind A+T gazdagok voltak. Később azonban számos kiegyensúlyozott bázisstartamú atadenovírust is azonosítottak, és az A+T gazdagság már inkább a gazdaváltás nem túl régi (evolúciós léptékben évezredekben mérhető) eseményére utal. A gazdaváltott vírus bázisaránya később ismét kiegyensúlyozottá válik. A legújabb kimutatások más AdV nemzetségben is találtak már A+T gazdag vírusokat [4].

Változatos fajok tartoznak e nemzetségbe: a távoli rokonok esetében a konzervált DNS-polimeráz génszekvencia sokszor csupán 50%-os homológiát mutat [4]. Mindössze két ide tartozó vírus ismert, melyet madaraktól írtak le. A legelterjedtebb a kacsák tojáshozamcsökkenését okozó kacsza AdV-1, ismertebb nevén az „egg drop” szindróma vírusa [18]. Az összes *Squamata* AdV is ebbe a nemzetségbe tartozik, és kiegyensúlyozott bázisösszetételük megkülönbözteti őket a nemzetségen belül [3]. Eredetileg hulló gazdából származtatták őket, feltételezték a hullókkal való koevolúciójukat, amelyről gazdaváltásokkal juthatott át madár gazdaszervezetekre; mára azonban inkább a *Passeriformes* rend tagjait feltételezzük eredeti gazdáknak. Ezt különböző fehérjeszekvenciákkal történő elemzések is alátámasztották. Ezen vizsgálatokból arra következtethetünk, hogy a gazdaváltás gyakoribb lehet a vírusok körében, mint eddig gondoltuk, és inkább a közeli rokon fajok esetében mehetett végbe koevolúció [4].

Nemrégiben Oroszországban mutatták ki az első csér atadenovírust (csér AdV-1). A genom kifejezetten alacsony G + C tartalommal (33,86%) rendelkezik; ilyen magas A+T tartalom eddig ebben a nemzetségben sem volt ismert, nagyban eltér az ismert képviselőitől. Filogenetikailag legközelebb a kacsza AdV-1-hez áll (53,7% homológia) [22]. Ebből is látszik, hogy milyen keveset tudunk ténylegesen a vírusok diverzitásáról, és mennyire sok új faj felfedezése várható még magára.

### 2. Denevérek vírusai

A denevéreket sok tényező teszi jelentős természetes vírusrezervoárokká; a madarakhoz hasonlóan migrációs tendenciájuk és nagy kolóniáik fontos részei ennek [2, 3, 9]. A repüléskor megemelkedő, lázhoz hasonló testhőmérsékletüknek nagy szerepe van a szervezetükben megtalálható vírusok számának csökkentésében. Pihenő állapotukban (torpor) pedig testhőmérsékletük jelentős mértékben lecsökken (egyfajta hibernációban pihennek), és ekkor ezek a kórokozók ismét fel tudnak szaporodni [8, 23].

Mindezekhez hozzájárulnak immunrendszeri sajátosságaik, amelyekkel kordában képesek tartani az őket fertőző vírusokat. A szervezet vírusfertőzésére válaszul termelődő interferon- $\alpha$ , - $\beta$  és - $\gamma$  útvonalak aktiválási szintje eltérő a denevér és a többi emlős sejtei között. Ezen felül a denevérek adaptív humorális immunválasza is egyedi: bár adott kórokozók ellen antitestek képződnek, ezek körülbelül 3-5 hónap elteltével a kimutatható szint alá csökkennek. A legújabb tanulmányok szerint a denevérek immunválasza a kórokozókhoz alkalmazkodik, és a kóros állapot mérséklésére irányul, amely a vírus szervezetből történő hiányos kiürülését okozza, és a tünetmentes fertőzést segíti elő [8].

Az emberekkel való fokozott érintkezés az élőhelyek megosztása miatt, növeli az általuk hordozott vírusok emberre való átvitelének kockázatát. Ehhez az érintkezés lehetőségén kívül a vírus-gazdaszervezet molekuláris és sejtes kompatibilitására, valamint az új gazdaszervezet megengedő vagy megkerült immunválaszára is szükség van. Ezekből következően viszonylag ritkán következnek be ilyen gazdaváltási események, azonban az eddig megtörtént átadások (veszettség, COVID-19) súlyos következményeiből kiindulva fel kell készülnünk a további hasonló események megakadályozására és hatékony kezelésére [8, 9].

## **2.1. Adenovírusok**

Az AdV-ok általános ismertetése a fentebbi, „1. Madarak adenovírusai” alcím alatt olvasható.

Madarakhoz hasonlóan denevérekből is jelentő számú AdV-t írtak le különböző kutatásokban. Egy Európában (Magyarország és Németország) elvégzett kutatás során közel 350, 28 denevérfajból származó mintát szűrtek AdV jelenlétére, amelyből összességében 51 minta (14,73%) volt AdV pozitív [24]. Egy kameruni kutatás során a 671 minta (37 faj) 14%-ában mutattak ki AdV DNS-t. Összefüggést találtak a nagyobb kolóniákhoz tartozó fajok és az AdV DNS kimutatása között, melyből arra következtettek, hogy a gazda viselkedése és életmódja jobban meghatározza, hogy mely AdV-k találhatóak meg bennük, mint az, hogy e vírusok összességében mely fajok megfertőzésére specializálódtak [25]. Egy hazai kutatás során 18 mintából 6 (33%) lett AdV-ra pozitív; ebből következtethetünk arra, hogy a hazai denevérfauna erősen fertőzött AdV-sal. Eddigi eredmények szerint az emlősállatok egészséges egyedeiben AdV-okat csak kivételes esetekben lehet PCR-rel kimutatni, egészséges madarakban azonban lényegesen többször (kb. ötször gyakrabban) találunk kimutatható AdV-t. A denevérminták szűrésének eddigi eredményei tehát jobban emlékeztetnek a madarakéhoz, mint a többi emlőshöz [2].

Korábbi tanulmányok többnyire alátámasztják a vírus-gazdaszervezet koevolúció jelenségét az AdV-ok esetében, azonban egyre több kutatás mutat rá, hogy ez kevésbé szigorú lehet, mint eddig gondoltuk. Átfogó denevér-AdV törzsfák a gazdaváltott vírusok miatt nem tükrözik tökéletesen a gazdafajok evolúcióját, csupán egyes struktúrái utalnak a vírus-gazdaszervezet koevolúcióra. Mivel a denevérek ismert vírusrezervoárok, valószínűsíthető, hogy számos denevér-AdV esetében gazdaváltás történt, akár a közelmúltban is [25].

## 2.2. Poliómavírusok

A *Polyomaviridae* kisméretű, burok nélküli vírusok családja, körülbelül 5 kb méretű, cirkuláris, duplaszálú DNS genommal. A genom erősen konzervált, és három funkcionális régióra osztható: a korai régióra, mely szabályozó fehérjéket kódol (kis és a nagy tumor antigén); a késői régióra, mely struktúrfehérjéket kódol; valamint a nem kódoló vezérlő régióra, amely a DNS replikáció kezdőpontját, valamint a transzkripciót szabályozó elemeket tartalmazza. A családba nyolc nemzetség tartozik, amelyek tagjai széles gazdakörrel rendelkeznek; főként emlősöket és madarakat fertőznek, de halakból és ízeltlábúakból is kimutatták már őket [16, 26]. A *Polyomaviridae* család gyorsan bővül: egyre több gazdafajból mutatnak ki új típusokat. A poliómavírus (PyV) fertőzés klinikai megnyilvánulásai immunhiányos betegeknél nyilvánvalóak, egészséges egyének azonban gyakran tünetmentesek maradnak, perzisztens fertőzést kialakítva [23].

A rendelkezésre álló szekvenciaadatok azt mutatják, hogy a PyV-ok nem szigorúan gazdaspecifikusak, különösen főemlősök és denevérek esetében. A PyV-vonalak közötti rekombináció új vírushajtásokat hozhat létre, és a gazdaszervezeten belüli molekuláris átalakulások szintén szerepet játszanak a PyV-ok evolúciójában. Mind a pontmutációk, mind a nem kódoló kontrollrégiók átrendeződései kritikusan megváltoztathatják rokon PyV-ok patogenitását, immunogenitását és célszerveit [16, 27]. Már bizonyított a PyV-ok gazdaváltása denevérekben, ami arra enged következtetni, hogy a *Chiroptera* rendben nagyobb a kapacitás a fajok közötti átviteli eseményekre [27].

Magyarországi denevérpopulációkból is mutattak már ki PyV-okat [28], Németországból azonban hiányos adatok állnak rendelkezésünkre.

## 2.3. Herpeszvírusok

A *Herpesvirales* rendbe tartozó vírusok burkosak, és kettős szálú, 125-290 kb méretű, lineáris DNS genommal rendelkeznek. Gerinctelen és gerinces fajokat is fertőzhetnek testnedvek által. Az elsődleges fertőzés során sejt- és szövettropizmusok jellemzőek, majd akár egész életen át



tartó látens fertőzés alakul ki; ekkor a vírusgenom a gazdasejt magjában marad, a génexpresszió pedig korlátozott. A látens vírusok reaktivációját stressz, öregedés vagy a gazdaszervezet immunkompetenciáját csökkentő fertőzések válthatják ki. A herpeszvírusok (HV-ok) nemrégiben nagy taxonómiai átalakításon mentek keresztül, mivel egyre több típusuk kerül felfedezésre, amelyek besorolása kihívást jelent a taxonómusok számára. A rend igen változatos, a Nemzetközi Vírus-Taxonómiai Bizottság (ICTV) három családba sorolja tagjait: *Alloherpesviridae*, *Orthoherpesviridae* és *Malacoherpesviridae* [1, 29]. A HV-okra nagymértékű gazdaszervezetspecifikusság jellemző [1].

Vadon élő és fogságban tartott magyarországi denevérekől származó minták PCR-rel való vizsgálata során két új HV DNS-ét mutatták ki, nilusi repülőkutya (*Rousettus aegyptiacus*) egyedekből [30]. Dél-amerikai denevérekben az *Orthoherpesviridae* családba tartozó HV-ok magas prevalenciáját és sokféleségét figyelték meg; a 71 vizsgált mintából 48 (67,6%) lett pozitív. Az eredmények arra utalnak, hogy a trópusokon élő denevérek sokféle HV-sal rendelkeznek, és legalábbis bizonyos esetekben a denevérfajok vírussközsége erősebben kapcsolódik a gazdaszervezet ökológiai tulajdonságaihoz, mint a taxonómiájához [31].

#### 2.4. Papillómavírusok

A *Papillomaviridae* család tagjai cirkuláris, kettős szálú DNS genommal rendelkeznek, melyek mérete 6,8-8,4 kb. A papillómavírusok (PV-ok) erősen gazda- és szövetspecifikusak; természetes gazdáikban és esetenként rokon fajokban okoznak jóindulatú daganatokat (szemölcsöket és papillómákat). A papillómák a bőrben és nyálkahártyában alakulnak ki, gyakran a test különböző pontjain. Valamennyi PV monofiletikus eredetű, lassabban fejlődnek, mint bármely más víruscsoport, és ismereteink szerint nem rekombinálódnak [32]. Bár a legtöbb emlős PV-fertőzés tünetmentes, egyes eredmények szerint emberben rákos megbetegedéshez is vezethet, amit denevérek esetében is megfigyeltek [9].

Egy újabb tanulmány a PV filogeográfiáját vizsgálta vadon élő állatokban. Eredményeik azt mutatták, hogy az északi féltekén gyakoribbak a PV-fertőzések vadon élő emlősökben, denevérekől pedig legfőképp Ázsiában és Észak-Amerikában mutatták ki a vírusszalád tagjait. Fontos következtetés, hogy a vadon élő állatok PV-fertőzöttsége az ökoszisztéma egészségére, valamint a környezetszennyezés és az antropogén hatások vadállatokra való hatásaira biztosítható rálátást [33].

## 2.5. Cirkovírusok

A *Circoviridae* család tagjai burok nélküli, egyszálú, cirkuláris genommal rendelkező DNS-vírusok, körülbelül 2,0 kb nagyságú genommal. Két gént tartalmaznak, amelyek a replikációhoz kapcsolódó (Rep) és a kapszid (Cap) fehérjéket kódolják. Az egyes cirkovírus (CV) fajok gazdaspecifikusak, vagy szűk gazdakörrel rendelkeznek, és az ismert vírusok többsége madarakat fertőz. Főként széklettel terjednek a fertőzések, de a vertikális terjedést is kimutatták. A CV fertőzések általában immunszuppresszívek [16, 34]. Egyes szerzők szerint a különböző gazdafajokban szaporodó CV-ok szoros filogenetikai rokonsága a fajok közötti átvitel jele lehet, azonban ez még nem tisztázott [16].

Egy ideje ismert, hogy CV-ok denevérekben is megtalálhatóak. Olaszországi hosszúszárnyú denevérek (*Miniopterus schreibersii*) székletmintáiból új CV-t azonosítottak (8.7% pozitívítási aránnyal); ez az első jelentés CV-ról európai denevérekben [35]. Az egyik legújabb tanulmányban 4 kontinens 8 országából több, mint 80 denevér CV-t mutattak ki [36].

## Célkitűzések

Kutatásunk célja az volt, hogy felmérjük a hazai madárfauna, valamint a németországi Robert Koch Intézetből és a Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevérek vírusfertőzöttségét a rendelkezésre álló mintagyűjteményeink segítségével. A hazai madármintákat AdV-okra szűrtük PCR-rel, hiszen a magyarországi madárfaunában ezen víruscsalád tagjainak kiemelkedő elterjedtségéről több kutatás számol be [6, 18]. Németországi denevérmintagyűjteményünket PyV-okra szűrtük PCR-rel, hiszen egyrészt ezeket már vizsgálták korábban AdV-ra, számos pozitív eredményt adva [24]; másrészt Németországból nem áll rendelkezésünkre nagyszámú adat a denevérfauna PyV-fertőzöttségéről [28]. Miután hazai denevérminták szűrése során több új PyV-t is leírtak már [24, 37], más európai mintákat is fontosnak tartottunk megvizsgálni. Mindezekon kívül a Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevér-mintagyűjteményt szűrtük PCR-rel mind AdV-ra, mind pedig PyV-ra, HV-ra, PV-ra és CV-ra. Azért voltunk mindezekre kíváncsiak, mert ugyan ezek a minták Magyarországról származtak, a levélorrú denevérek családjába (*Phyllostomidae*) tartozó *Phyllostomus discolor* faj Dél-Amerikában honos, ahonnan azonban nem ismerünk adatokat e faj vírusfertőzöttségéről. Ez a következő kérdést vetette fel: amennyiben találunk a gyűjteményben vírusokat, ezek a magyar faunában megtalálható, vagy pedig a dél-amerikai fauna jellemző vírusai lesznek?

A szűrések után célunk volt az esetleges pozitív minták kitisztítása és adott génszakaszok szekvenálása már ismert, vagy esetleg a tudomány számára új fajok megtalálása érdekében. Ezt követően a talált vírusok szekvenciaszintű elemzését, más fajokkal való összevetését tűztük ki célunk filogenetikai számítások által, hogy megvizsgálhassuk rokonsági viszonyait, evolúciós fejlődésük menetét. A pozitív eredmények alapján javaslatot is tehetünk új fajok leírására és elfogadására, illetve nemzetségbe való hivatalos besorolására.

## Anyag és módszer

### 1. A minták eredete

Munkánkhoz a mintákat különböző forrásokból gyűjtöttük. A német eredetű mintákat kész, kivont DNS formájában kaptuk meg a Robert Koch Institute-tól (n=74), elhullott állatok szerveiből kivonva: ezt a máj, lép és vese együttes homogenizálásával („poolozásával”), és abból történő DNS kitisztítással végezték el. A többi denevérmintát a Fővárosi Állat- és Növénykerttől kaptuk (n=28), ez esetben elhullott állati tetemekként. Összesen tehát 102 denevérmintát dolgoztam fel, ezeket az 1. táblázatban foglaltam össze.

#### 1. táblázat. Feldolgozott denevérminták

Magyar fajnév	Latin fajnév	Darabszám	Minta típusa
bajuszos denevér	<i>Myotis mystacinus</i>	4	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
barna hosszúfülű-denevér	<i>Plecotus auritus</i>	2	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
durvavitorlájú törpedenevér	<i>Pipistrellus nathusii</i>	4	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
északi késeidenevér	<i>Eptesicus nilssonii</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
fehérszélű törpedenevér	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
fehértorkú denevér	<i>Vespertilio murinus</i>	4	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
halvány vámpírdenevér	<i>Phyllostomus discolor</i>	28	máj és vese pool (saját kivonás)
közönséges késeidenevér	<i>Eptesicus serotinus</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
közönséges törpedenevér	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	11	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
rőt koraidenevér	<i>Nyctalus noctula</i>	43	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
szoprán törpedenevér	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
szőröskarú koraidenevér	<i>Nyctalus leisleri</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
vízi denevér	<i>Myotis daubentonii</i>	1	máj, lép és vese pool (kész kivont DNS)
<b>Összesen</b>		<b>102</b>	

A madárminták fő részét (n=100) a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesülettől kaptuk Győr-Moson-Sopron megye területéről kész, kivont DNS formájában, kloaka- és

légső-tamponmintákból kivonva. A maradék madármintát (n=7) egy magántartótól kaptuk, levágás után. Így összesen 107 madár mintát dolgoztam fel, ezeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

## 2. táblázat. Feldolgozott madárminták

Magyar fajnév	Latin fajnév	Darabszám	Minta típusa
billegető cankó	<i>Actitis hypoleucos</i>	2	tamponminta
böjti réce	<i>Anas querquedula</i>	2	tamponminta
bütykös hattyú	<i>Cygnus olor</i>	5	tamponminta
csörgőréce	<i>Anas crecca</i>	61	tamponminta
füstös cankó	<i>Tringa erythropus</i>	4	tamponminta
guvat	<i>Rallus aquaticus</i>	1	tamponminta
japán fürj	<i>Coturnix japonica</i>	7	szerv (saját kivonás)
pajzsoscankó	<i>Calidris pugnax</i>	1	tamponminta
parti lile	<i>Charadrius hiaticula</i>	1	tamponminta
szárszalonka	<i>Gallinago gallinago</i>	21	tamponminta
vörös vércse	<i>Falco tinnunculus</i>	2	tamponminta
<b>Összesen</b>		<b>107</b>	

## 2. DNS-kivonás elhullott állati szervekből

A Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevérmintákkal és a fürjmintákkal végeztük el ezt a módszert. A fagyasztott denevértetemeket kiolvasztottuk, majd szike és olló segítségével bevágást ejtettünk a hasfalra. Felnyitottuk a hasfalat és eltávolítottuk a máj egy darabját, illetve a vesét. Minden minta között sterilizáltuk a bonceszközöket 70%-os alkohollal és hővel a kontamináció elkerülése végett. A kiműtött májból és veséből, valamint a készen kapott fürjszervekből apró szövetmintákat vettünk, majd a Macherey-Nagel NucleoSpin „DNA RapidLyse” (Thermo Fisher Scientific, USA) készletét használtuk a minták feloldására, a gyártó által javasolt protokoll szerint. Elsőként a minták homogenizálását végeztük el: a mintát 2 ml-es centrifugacsőbe helyeztük egy csapágygolyóval, majd hozzáadtunk 400 µl TE (Tris-EDTA) puffert, és ezeket 10 percig ráztuk 50 Hz frekvenciával. Következő lépésként a mintákhoz hozzámértünk 120 µl RLE (Elution Buffer) és 20 µl RLB (Binding Buffer) puffereket, valamint 10 µl proteináz K enzimet. Ezután rázótermosztátba helyeztük a csöveket,

és 1 óráig, 1400 rpm-en rázattuk őket. Ezt követően további 420 µl RLB puffert mértünk az egyes mintákhoz, és ezeket röviden rázattuk, majd 11.000 x g-n 5 másodpercig centrifugáltuk. Ezután következett a DNS-megkötés: 500 µl homogenizátumot töltöttünk a NucleoSpin „DNA RapidLyse” oszlopára, melyet 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztünk, majd ezeket centrifugáltuk 11.000 x g-n 1 percig. A RapidLyse oszlopot új gyűjtőcsőbe helyeztük. A következő lépés a membrán átmosása volt, hogy eltávolítsuk a maradék szennyeződések: 500 µl RLW (Wash Buffer) puffert mértünk a RapidLyse oszlopra, és 11.000 x g-n centrifugáltuk a csöveket 1 percig. Ezt a lépést még egyszer megismételtük, majd az üres csöveket is ugyanígy centrifugáltuk a membrán megszáritásához. Az utolsó lépés a DNS leoldása volt a membránról, ehhez a RapidLyse oszlopokat új, 1.5 ml-es Eppendorf csövekbe tettük át, majd 100 µl RLE (Elution Buffer) puffert mértünk rájuk, és így centrifugáltuk őket 11.000 x g-n 1 percig. Végeredményül tiszta, oldott össz-DNS-t kaptunk, amelyeket -20°C-on tároltunk.

### 3. PCR (polimeráz láncreakció)

Mindegyik vizsgált víruscsalád tagjainak kimutatását PCR-rel végeztük; kétkörös, „nested” eljárást alkalmazva (kivéve a papillómavírusoknál, ahol egykörös programot használtunk), degenerált primerek felhasználásával. Az egyes vírusokhoz tartozó primereket a 3. táblázat és a Függelék 1-4. kiegészítő táblázata foglalja össze.

**3. táblázat.** Az AdV-ok kimutatására használt PCR során alkalmazott primerek szekvenciái; ezek a vírus DNS-függő DNS-polimeráz génjét amplifikálják [38]

Külső „forward” primer: Polout FO	5'-TNM GNG GNG GNM GNT GYT AYC C-3'
Külső reverz primer: Polout RE	5'-GTD GCR AAN SHN CCR TAB ARN GMR TT-3'
Belső „forward” primer: Polin FO	5'-GTN TWY GAY ATH TGY GGH ATG TAY GC-3'
Belső reverz primer: Polin RE	5'-CCA NCC BCD RTT RTG NAR NGT RA-3'

A készített „master mix” (PCR folyamatokhoz szükséges reakcióelegy) összetétele az egyes vizsgált vírusok esetében hasonló, apróbb mennyiségi különbségekkel: ezeket a 4. táblázat és a Függelék 5-8. kiegészítő táblázata tartalmazza. A PCR-hez szükséges összetevők java részét a DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) termék közvetlenül tartalmazza: ebben található DNS-polimeráz, Magnézium-klorid, dNTP, puffer és a későbbi gélfuttatáshoz szükséges „loading” festék is. A primereket 50 pikomólos koncentrációban alkalmaztuk.

A PCR reakciót 7-12 mintára végeztük el egyszerre, negatív kontrollként ultratiszta vizet, pozitívként pedig rendre szarvasmarha-adenovírus (bovin AdV-1) DNS-t (AdV PCR-hez), libák vérzéses vese- és bélgyulladását okozó poliómavírus DNS-t (PyV PCR-hez), kutya-herpeszvírus DNS-t (HV PCR-hez), őz-papillómavírus-DNS-t (PV PCR-hez), valamint kacsa-cirkovírus DNS-t (CV PCR-hez) alkalmaztunk. PCR csövekbe mértük az elkészített reakcióelegyet, majd belemértük a szükséges mennyiségű DNS-t, illetve a negatív és pozitív kontrollokhoz a vizet, valamint a vírusra pozitív DNS-t. A mintákat tartalmazó csöveket a gépbe helyezés előtt röviden rázattuk, majd centrifugáltuk az összetevők megfelelő eloszlása érdekében. Végül a csöveket a PCR gépbe helyeztük: ehhez egy Eppendorf Mastercycle, T100 (BioRAD, USA) gépet használtunk. A PCR program lépései valamennyi vírus esetében hasonlóak voltak, apróbb különbségekkel; ezeket az 5. táblázat és a Függelék 9-12. kiegészítő táblázata foglalja össze.

**4. táblázat.** „Master mix” összetétele AdV-ra való PCR-szűrés esetében

	<b>1. kör</b>	<b>2. kör</b>
<b>DreamTaq Mix</b>	12,5 µl	12,5 µl
<b>MQ</b>	8,5 µl	8,5 µl
<b>Primer 1 („forward”)</b>	1 µl	1 µl
<b>Primer 2 (reverz)</b>	1 µl	1 µl
<b>DNS</b>	2 µl	2 µl
<b>Összesen</b>	25 µl	25 µl

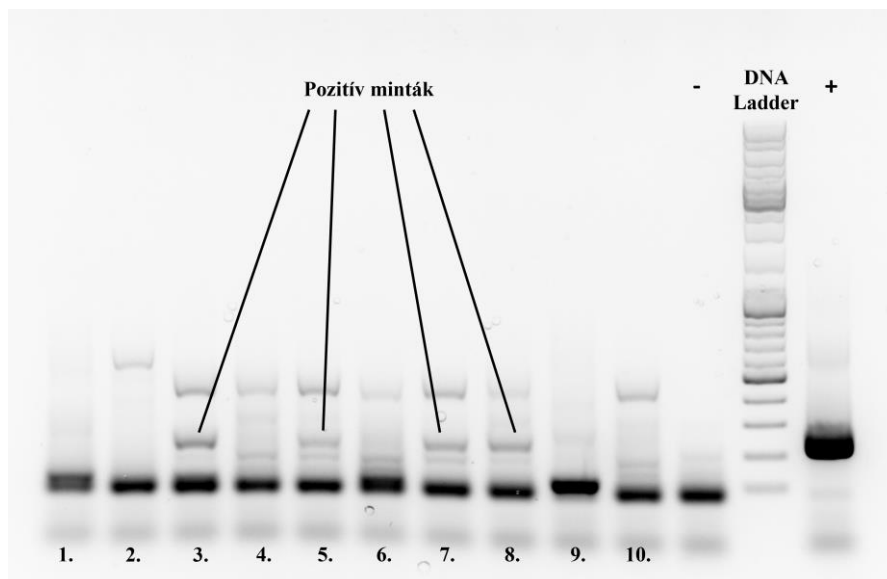
**5. táblázat.** A PCR program lépései az AdV-ra való szűrés esetében

<b>1. kör</b>		<b>2. kör</b>		
94°C	5 perc	94°C	5 perc	
94°C	30 mp	94°C	30 mp	
46°C	1 perc	46°C	1 perc	45 x ismétlés
72°C	1 perc	72°C	1 perc	
72°C	5 perc	72°C	5 perc	

**4. Agaróz gélelektroforézis**

A PCR segítségével felszaporított DNS-termékek láthatóvá tevésére szolgál a gélelektroforézis. Ehhez 1%-os agaróz gélét készítettünk: 0,5x TAE pufferben forralással feloldottuk az agaróz port, majd enyhe lehűlés után GelRed (Biotium) festéket adtunk hozzá (100 ml oldathoz 4 µl-t). Ezután gélfutató kádba öntöttük a gélét, majd megszilárdulás után a zsebekbe 5-5 µl-t

adagoltunk az egyes mintákból, illetve a pozitív és negatív kontrollokból. Egy szabadon hagyott zsebbe 3 µl GeneRuler DNA Ladder Mix-et (ThermoFisher Scientific, USA) töltöttünk; ez szolgált molekulatömeg-markerünként. A futtatás 60 percen keresztül, 100 V-on történt. Ezek után UV transzilluminátorral és az Imager CHEMI Premium (VWR) géldokumentációs rendszerével készítettünk digitális felvételeket, amelyeken megállapítottuk, mely minták lehetnek pozitívak a keresett vírusra. Ezt a pozitív kontrollnál látható csík és a molekulatömeg-marker segítségével dönthettük el. A 4. ábrán látható, hogy ebben az esetben a 3., 5., 7. és 8. minta tűnik PyV-ra pozitívnak.



4. ábra. PyV minták agaróz gélelektroforézise után készült felvétel

## 5. DNS izolálása a gélből

Az első gélfuttatás után a vírusra pozitívnek ítélt minták teljes megmaradt PCR termék mennyiségét felvittük új, 2%-os agaróz gélre. 100 V-on, 60 perc futtatás után UV-fény felett, védő plexi viselete közben szikével kivágtuk a gélből a megfelelő csíkokat. A kivágott DNS-csíkot felvágtuk, majd 1,5 ml-es Eppendorf csőbe töltöttük. Az ezután következő tisztításhoz a Macherey-Nagel NucleoSpin „Gel and PCR Clean-up XS” (ThermoFisher Scientific, USA) készletét használtuk a javasolt protokoll szerint. Elsőként egyenként megmértük a kivágott gélcsíkok tömegét (üres Eppendorf cső tömegéhez viszonyítva), majd ehhez a tömeghez szükséges mennyiségű NTI (Binding Buffer) puffert mértünk a gél darabokra: 100 mg gélhez 200 µl puffert adtunk. Ezt 10 percig 50°C-on inkubáltuk Eppendorf Thermomixer Comfort 5355 termomixer segítségével, folyamatosan 1400 rpm sebességen rázatva. Ezek után az oldatokat NucleoSpin „DNA RapidLyse” oszlopokra mértük, melyeket gyűjtőcsövekbe helyeztünk: egyszerre maximum 500 µl mérhető az oszlopokra, így ennél nagyobb mennyiségű



oldat esetén a maradékot egy következő körben mértük rá. 11.000 x g-n centrifugáltuk a csöveket 60 másodpercig, majd a gyűjtőcsöveket kiürítettük. A DNS membránon való megkötése után kétszer töltöttünk az oszlopokra 500 µl NT3 (Wash Buffer) mosópuffert és centrifugáltuk a csöveket 11.000 x g-n 60 másodpercig, majd ürítettük ki a gyűjtőcsöveket. Végző lépésünk a DNS leoldása volt a membránról; a RapidLyse oszlopokat új, 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük át, majd 20 µl NE (Elution Buffer) eluáló puffert mértünk közvetlenül a membránokra. 1 percig inkubáltuk a csöveket szobahőmérsékleten, majd 11.000 x g-n centrifugáltuk őket 1 percig. A centrifugálást újból elvégeztük úgy, hogy az Eppendorf csövekben összegyűlt folyadékot ismét ráértük a membránokra. Eredményül magas koncentrációjú virális DNS-oldatot kaptunk.

## 6. Sanger-szekvenálás

A gélből való kitisztítás után a kapott DNS-t szekvenáltuk, ennek protokollja a 6. táblázatban található. A szekvenálási folyamatot mi végeztük el, majd precipitáció után a kicsapott DNS-t a Seqomics Biotechnológia Kft.-nek küldtük, ahonnan digitálisan visszaküldték a kapilláris gélelektroforézis kapott eredményét.

**6. táblázat.** Szekvenáló oldat összetétele

<b>MQ</b>	1 µl
<b>BigDye puffer</b>	1 µl
<b>Primer</b>	1 µl
<b>DNS</b>	1 µl
<b>BigDye Mix</b>	1 µl

A szekvenáláshoz a BigDye Terminator v3.1 „Cycle Sequencing Kit” (ThermoFisher Scientific, USA) készletet használtuk a javasolt protokoll szerint. Steril PCR csövekbe töltöttünk 1-1 µl-t az összetevőkből: elsőként vizet, majd a puffert, a primert (4 pikomol/µl hígításban), a kitisztított DNS-t, és végül az enzim mixet, melyet fény- és hőérzékenysége miatt alufóliában és jégen tartottunk. A szekvenálási PCR protokoll a 7. táblázatban látható.

## 7. táblázat. Szekvenálási PCR program lépései

96°C	1 perc	
96°C	10 mp	
50°C	5 mp	35 x ismétlés
60°C	4 perc	

A szekvenálás után a kapott mintákat precipitáltuk, hogy így küldjük tovább a Seqomics Kft.-nek. Minden mintához 1,5 µl 3 M-os nátrium-acetátot, 31 µl 96%-os etanolt és 7,5 µl MQ-t adtunk, pöcögtetéssel elkevertük, majd 15 percig sötétben állni hagytuk őket. Ezután 45 percig centrifugáltuk a csöveket 4400 rpm-en, a „soft” üzemmód beállítása mellett. Az idő leteltével a csöveket nyitva és felfordítva 2 ml-es gyűjtőcsövekbe helyeztük át, és röviden, csupán 700 rpm-re állítva a centrifugát, néhány másodpercig hagytuk pörgetni. Következő lépésként 70 µl 70%-os, -20°C-ra hűtött etanolt mértünk a csövekbe, majd további 15 percre visszaraktuk őket a centrifugába, ugyanúgy 4400 rpm-en, „soft” üzemmódban. Az idő leteltével újból megfordítottuk a csöveket és néhány másodpercig centrifugáltuk őket. Mindezek után a felülúszó oldat nagy része már kiürült a csövekből; a precipitált DNS szárításához még 10 percig hagytuk a csöveket sötétben, nyitva állni, a maradék alkohol elpárologtatása céljából. Végül alufóliába csomagolva elküldhettük a mintáinkat a szekvenáló laborba, ahol automata szekvenáló készülékkel (ABI Prism 310) elvégezték a kapilláris gélelektroforézist.

### 7. Filogenetikai analízis

A visszaérkezett kész DNS-szekvenciákat elsőként a BioEdit Sequence Alignment Editor programmal [39] tudtuk elemezni, megállapíthattuk a szekvencia minőségét. Amennyiben nagyrészt megfelelően elkülönülő hullámvonalakat, ezáltal pedig egyértelműen elkülöníthető nukleotidokat láttunk, a szekvenciát az NCBI GenBank BLAST blastx homológiaereső funkciójával vizsgáltuk tovább. A találatokból láthattuk, hogy a kapott szekvencia valóban az volt-e, amit kerestünk, valamint, hogy hány százalékban egyezett az aminosavsorrendje más, már leírt vírusokéval. Az aminosavsorrend használata megbízhatóbb volt az elemzések során, hiszen ezáltal a csendes mutációk (pontmutációk a tripleteken belül, melyek azonban nem változtatják meg a kódolt aminosavat) zavaró hatását kiküszöbölhettük.

Amennyiben eredményül valóban a keresett vírusszalád tagját kaptuk, a szekvenálást a másik primerrel is elvégeztük (elsőként a reverz primerrel szekvenáltunk, így ez esetben a „forward” primert használtuk második körben). Ezt követően összevetettük a két szekvenciát, a

primerszekvencia maradványokat a szekvenciaszakasz két végéről eltávolítottuk, és manuálisan kijavítottuk a szekvencia leolvasása során hibásan megállapított nukleotidokat, ezáltal a valódi szekvenciasorrendet létrehozva. Az NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank adatbázisából kerestük ki más releváns vírusok szükséges génszekvenciáit a törzsfá elkészítéséhez: a többi ismert siadenovírust, valamint kulcsoportnak egy másik nemzetségbe (*Testadenovirus*) tartozó vírusfajt, az ékszerteknős AdV-t vettük bele. Ezután a MAFFT program segítségével [40], többszörös összerendezéssel (multiple alignment) összeillesztettük ezeket a szekvenciákat. A MEGA 11 [41] programban a nagyobb nem illeszkedő részeket, inzerciókat, deléciókat kivágtuk a szekvenciákból, illetve levágtuk a végükről, hogy csak a számításhoz releváns régiók maradjanak meg. Az illesztés szerkesztés utáni hossza 98 aminosav volt. Ezek után a PhyML programban [42] végeztük el a további lépéseket a törzsfákészítésben: vírusok esetében ez az általunk optimálisnak talált program. Elsőként „Smart Model Selection” funkcióval kiválasztottuk a legideálisabb aminosav szubsztitúciós modellt, a legkisebb BIC érték alapján. LG+G+I szubsztitúciós modellt alkalmaztunk, amely a DNS-vírusok esetén legtöbbször alkalmazott modell; ez az invariáns és variáns régiók váltakozását feltételezi [43]. A törzsfaszámítást Maximum Likelihood módszerrel végeztük el, a Smart Model Selection pontos paraméterei alapján, majd SH-like aLrt módszerrel ellenőriztük az ágak megbízhatóságát. Ez az módszer a topológiákat teszteli; nem módosítja az alap adathalmazt, szekvenciákat és számolja újra a törzsfát, mint a klasszikus „bootstrap” módszer. Ehelyett a Maximum Likelihood módszerrel már kiszámolt lehetséges fák topológiáját veti össze egymással statisztikai módon [44]. Végül a MEGA 11 programban szerkesztettük a törzsfát igényeink szerint.

## Eredmények

### 1. Minták pozitivitása

#### 1.1. Hazai madár-mintagyűjtemény

A 107 hazai madármintát vizsgálva, a várthoz képest sok fals pozitív eredményt kaptunk a PCR utáni gélelektroforézis során: a víruscsaládokra kifejlesztett „diagnosztikai” PCR-ek során jellemzően degeneratív primereket használunk alacsony primer-kötődési hőmérséklettel. Ez azt eredményezi, hogy számos, úgynevezett aspecifikus termék képződhet a primerek nem megfelelő DNS-re történő bekötődése miatt. Ezek az aspecifikus termékek legtöbbször más mérettartományba esnek a gélképen, ritkább esetekben azonban éppen az általunk keresett méretű DNS szakasz képződik, fals pozitív eredményt adva [45]. Emiatt fontos minden esetben a PCR eredmény utáni DNS szekvenálás, hogy el tudjuk különíteni a valós pozitív mintákat a fals pozitívaktól. A fals pozitív eredmények jellemzően a mintákból kivont össz-DNS-ben található bakteriális, gomba eredetű, vagy a vizsgált gazdafaj mitokondriális eredetű DNS-éből származtak, a visszaérkezett szekvenciák alapján. Ebben a mintagyűjteményben azonban 2 minta ténylegesen pozitívnak bizonyult AdV-ra (1,9% pozitivitás), és e szekvenciákat sikerült tisztán, kevert szekvenciák nélkül meghatározni. A vizsgált 11 faj közül csupán egy faj képviselőiben találtunk vírust: ez mindkét pozitív eredmény esetében a magántartótól származó japán fűrj mintákból történt. Az így kapott pozitivitási arány a fajhoz tartozó mintákon belül 28,6%. Ez tehát azt jelenti, hogy a vadmadár minták között nem találtunk AdV-ra pozitívat, és az összes madárminta közül egyedül a szervből kivont DNS-minták esetében tudtunk pozitív eredményt kimutatni.

#### 1.2. Németországi denevér-mintagyűjtemény

A németországi mintagyűjteményünk 72 egyed szerveiből kivont DNS-mintából állt, melyeket PyV-ra szűrtünk PCR-rel. A szűrések több fals pozitív eredményt adtak, és csupán ezen minták szekvenálása után vált egyértelművé a felerősített DNS szakaszok valódi, nem virális eredete.

#### 1.3. Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevér-mintagyűjtemény

A 28 egyed szerveiből általunk kivont DNS-mintákat AdV-ra, PyV-ra, HV-ra, PV-ra és CV-ra is szűrtük PCR-rel. Ezen minták esetében kevesebb fals pozitív eredményt kaptunk, azonban ténylegesen pozitív mintát itt sem találtunk a keresett vírusokra.

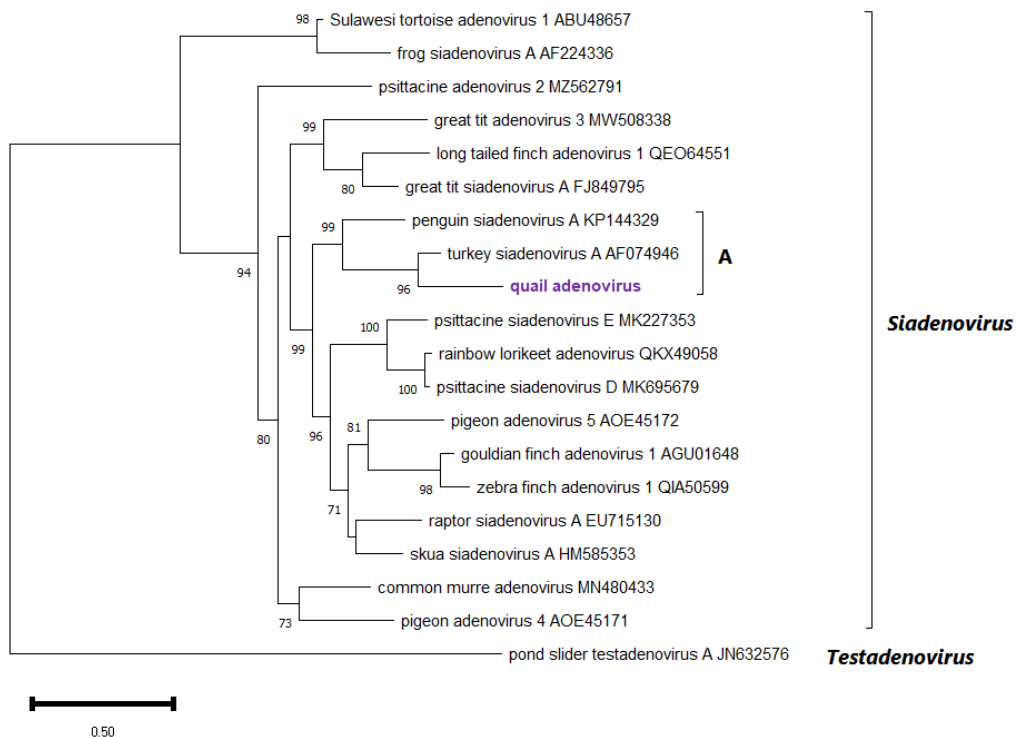
### 2. Kimutatott új madár-adenovírus

A kimutatott vírus mindkét mintában ugyanaz, a *Siadenovirus* nemzetségbe sorolható AdV volt. Az eddigi eredmények alapján feltételezzük, hogy ez az eddig ismeretlen AdV új vírusfajba

sorolható a későbbiekben, a teljes genomszekvencia ismerete alapján. Az új vírustípust quail adenovirus-nak neveztük el, a vírus számára a későbbiekben alapítandó fajnak pedig a *Siadenovirus coturnicis* nevet javasoljuk. Az általunk két irányból szekvenált és összeillesztett rövid DNS-polimeráz szekvencia 273 nukleotid, 91 aminosav hosszúságú. Vírusunk a génbankban megtalálható aminosavszekvenciák közül a pulyka AdV-3-mal (génbanki azonosító: AF074946) mutatta a legnagyobb százalékos azonosságot: nukleotid-szekvencia alapján 78%, aminosav-szekvencia alapján 80%.

### 3. Filogenetikai analízis

A törzsfarekonstrukció a génbankban elérhető legközelebbi rokon AdV-ok homológ DNS-polimeráz génszekvenciái alapján történt. A felhasznált vírusok génbanki azonosító számait (accession number) feltüntettük a törzsfán. A törzsfán a különböző siadenovirus fajok képviselői megfelelő módon különülnek el, magas megbízhatósági értékekkel. Az új fűrj-adenovirus a pulyka és a pingvin siadenovirusokkal alkot egy jól elkülönülő kládot, amelyet az 5. ábrán „A” betűvel jeleztünk.



5. **ábra.** Siadenovirusok Maximum Likelihood módszerrel származtatott filogenetikai törzsfarekonstrukciója. A törzsfát az általunk is kimutatott DNS-polimeráz gén szekvenciaszakasza alapján számoltuk. Az általunk talált fajt vastag betűvel és lila színnel emeltük ki. A nóduszokon az SH-like aLrt módszerrel kiszámolt megbízhatósági értékek szerepelnek, az ághosszak pedig az átlag nukleotidsubstitúcióra utalnak helyenként.

## Megbeszélés

### 1. Hazai madár-mintagyűjtemény

Átfogó vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a madarak és a denevérek a leggazdagabb AdV-hordozók az állatvilágban: random mintavételezés esetén 10% feletti PCR-pozitivitást mutatnak. Ennek egyik lehetséges magyarázata a sajátos életmódjuk: a napi és szezonális vándorlás lehetővé teszi a nagy távolságok megtételét, ezáltal pedig messzire képesek hordozni kórokozóikat. Emellett a magas fajsúlyuk, a sűrű populációik és a gyakran zsúfolt fészkelő- és pihenőhelyeik is hozzájárulnak a különböző mikroorganizmusok, köztük az AdV-ok könnyű átadásához [2, 3, 9].

Az általunk a ürj szervmintákból kimutatott vírust egy új faj képviselőjének feltételezzük, hiszen megfelelően nagy genetikai távolságban van a legközelebbi rokonától, a pulyka AdV-3-tól. Ez jelentős eredmény, hiszen bár japán ürjből (*Coturnix japonica*) már mutattak ki kacsa, illetve baromfi AdV-t [46, 47], a fajban ismereteink szerint siadenovírust még nem sikerült találni. Az új AdV a törzsfán is magas megbízhatósági értékkel különül el a család többi tagjától, a már ismert vírusok topológiája pedig hasonlít az irodalomban leírt törzsfákéhoz [4, 6, 17, 19], így kellően megbízhatónak tartjuk az eredményeinket. Ebből arra is következtethetünk, hogy rövid DNS-polimeráz szekvenciák alapján is megfelelő filogenetikai vizsgálatokat végezhetünk új vírusok besorolására, így ez a módszer a következőkben is megbízhatóan alkalmazható. Fontos kiemelni, hogy az általunk kimutatott ürj siadenovírus a pulyka AdV-3-mal mutatja a legnagyobb hasonlóságot, amely az ismert legmagasabb patogenitású AdV a madarak között: a pulykák vérzéses bélgyulladását okozza, valamint más baromfi fajok képviselőiben is előfordul [18]. A hasonlóság az új AdV részletesebb vizsgálatát és megismerését teszi szükségessé, amely a továbbiakban számos fontos információt adhat, és segítheti az eddig leírt legnagyobb kórokozó képességgel rendelkező madár AdV jobb megismerését.

Az AdV-ok körében a gazdaváltási események jelentőségét egyre több kutatás támasztja alá. A fennálló hipotézis az, hogy bár vírussaládonként eltérő gyakorisággal, de gazdaváltási események viszonylag gyakran fordulnak elő a vírusok evolúciója során. Mivel a gazdaváltott vírusok később jellemzően a közeli rokon fajokra ugranak át, ezen filogenetikai leszármazási ágakon figyelhető meg gyakran a koevolúció jelensége [4, 11, 14–16]. Ezek alapján az RNS vírusoknál szinte alig követhető a koevolúciós fejlődés, a sokkal stabilabb és genetikai változásokra kevésbé hajlamos genommal rendelkező DNS vírusoknál pedig erre nagyobb az esély. A DNS vírusokon belül is az AdV-ok kiválóan alkalmasak a koevolúció vizsgálatára. A siadenovírusok esetében a korábban feltételezett kételtű eredet helyett, az egyre több

filogenetikai bizonyíték jelenleg egy nagyobb gazdaváltási eseményre utal, ahol ismereteink szerint egy *Passeriformes* taxonba tartozó gazdáról válthatott az ősi vírus kétéltű-, illetve egyéb madár gazdákra [3, 4, 16]. Az általunk készített törzsfán látható ezen megállapításokkal összhangban a hüllő és kétéltű gazdákból kimutatott siadenovírusok figyelemre méltóan nagyobb filogenetikai távolsága a nemzetség többi (madaraktól kimutatott) tagjától [3, 4, 16]. A papagáj AdV-2 (psittacine AdV-2) is a többi madár siadenovírus által alkotott monofiletikus ágon kívül helyezkedik el [19]. A monofiletikus kládban, amelybe a fürj AdV is tartozik, valamint a törzsfá nagyobb részén megfigyelhető a koevolúció: a gazdafajok rokonsági viszonyban állnak egymással, és vírusaik kellő mértékű evolúciós távolságot mutatnak egymástól, összhangban az eddigi szakirodalmi eredményekkel [4, 11, 14–16].

Miután a vizsgált fürjkekből egy új AdV fajba sorolható típust sikerült kimutatnunk, ami az eddig ismert legnagyobb kórokozó képességgel rendelkező madár-AdV-hoz hasonlít a legjobban, a jövőben érdemes lenne tenyésztett fürjket nagyobb számban szűrni mind AdV-ra, mind egyéb víruscsaládok képviselőire. Bár a siadenovírusokon kívül a többi, madaraktól fertőző AdV-ok között is vannak állatorvosi szempontból jelentős fajok [46, 48, 49], és az említett pulyka AdV-3-mal való hasonlóság miatt az általunk kimutatott AdV mélyebb vizsgálata javasolt, az új fürj-AdV kórokozó szerepéről eddig nincsenek ismereteink. Bár a magántartó által levágott egyes fürjek lábízületein duzzadt elváltozások voltak láthatóak, az elváltozás és a kimutatott AdV között nem mutatható ki egyértelmű összefüggés, és mint a legtöbb AdV-nál, itt is AdV-perzisztencia feltételezhető. Fontos lenne tehát a fajhoz tartozó egyedek további vizsgálata, és jelentős eredményt jelentene az AdV izolálása. A mintáinkban megjelenő 28,6%-os AdV előfordulási arány alapján arra következtethetünk, hogy igen fertőzőképes lehet, és viszonylag könnyen terjedhet. Amennyiben sikerülne az AdV izolálása, egy fertőzési kísérlettel a kimutatott AdV-hoz köthető esetleges patogenitás is megfigyelhető lenne, ezáltal pedig a gazdasági károkat okozó képességéről is nyerhetünk információt.

Meglepő eredmény volt számunkra, hogy a vadmadár-mintákból nem tudtunk kimutatni AdV-t, hiszen hazai vizsgálatok alapján magas prevalenciájú az AdV-fertőzés a vadmadár faunánkban [6, 18]. Azonban fontos megemlíteni, hogy bár az irodalomban ez a tendencia figyelhető meg, ismereteink szerint a teljesen negatív szűrésekre is vannak példák, a sajátunkhoz hasonlóan; ezek általában nem kerülnek leközlésre, így a pozitív eredmények kerülnek túlsúlyba a szakirodalomban, amely más tudományágakban is megfigyelhető tendencia. Több oka lehet az ilyenfajta, vírusra negatív mintagyűjteményeknek: míg egyes populációk fertőzöttek adott vírusra, mások lehetnek kevésbé érzékenyek rá. Gazdafajoktól,

évszakoktól és az egyes egyedek egészségi állapotától is függ, hogy milyen mértékben képes egy vírus fertőzni a populációt [49, 50]. Ezen tényezőkről kevés kutatás számol be, hiszen adott populációk hosszútávú vizsgálatára van szükség hozzá. Mindezekon kívül egyes mintagyűjteményekben, ahogy a miénkben is, több fajból kevés számú minta áll rendelkezésre, így azok között kisebb lehet az esély a pozitivitásra.

Bár kutatásunk során csak szervmintából sikerült kimutatni AdV-t, tapasztalataink szerint a minták típusa nagymértékben befolyásolhatja az AdV pozitivitást. Míg bélsár vagy vizelet mintából jellemzően gyakoribb a víruskimutatás, számos esetben kontaminációval kell számolnunk, hiszen ezen minták nagyban kitéttek a környezetnek, valamint sokszor a táplálékként elfogyasztott organizmusok vírusait mutatják ki. Az ilyen eredmények kezelésekor nagyon körültekintően kell eljárni, ezek utólagos beazonosítása igen komplikált, gyakran téves információkat tartalmazó publikációkat eredményezve. A szervmintákból kimutatott vírusok között sokkal kevésbé jellemző a kontamináció, itt legtöbbször ténylegesen a vizsgált gazdát fertőző vírusok mutathatóak ki, a pozitivitási arány azonban jellemzően alacsonyabb. Tamponminták esetében nehezebb kimutatni az előforduló vírusokat, hiszen ez csak akkor lehetséges, ha a vizsgált egyed nagy mennyiségben üríti a vizsgált kórokozót, ami egészséges egyedeknél viszonylag ritka. Szlovéniai kutatás során azonban éppen ennek ellenkezőjét figyelték meg [17, 18], az erre vonatkozó magyarázat a vizsgált madárpopuláció aktuális erős vírusfertőzése lehetett. A PCR ugyan egy hatékony és elterjedt módszer vírusok kimutatására, egy kutatásban megállapították, hogy akkor a legátfogóbb a szűrési folyamat, ha mind PCR-rel, mind metagenomikai módszerekkel együttesen detektáljuk a vírusokat, hiszen ezek kiegészítik egymást. Egy kutatás során PCR-rel kimutatott vírusokat nem tudták detektálni metagenomikai módszerekkel, és a metagenomikai módszerekkel kimutatott vírusokat sem tudták mindig detektálni PCR-rel [51].

Végül fontos megemlíteni, hogy ugyan az AdV a leggyakoribb, több másik vírusszalád tagjai is előfordulhatnak madarakban (*Coronaviridae*, *Circoviridae*, *Orthomyxoviridae*) [48, 52, 53]. Érdeemes lehet a továbbiakban az említett vírusszaládokra is szűrni a mintákat, hiszen valószínűsíthetően egy részük pozitív lenne, és akár eddig ismeretlen vírusokat is kimutathatnánk.

## **2. Németországi denevér-mintagyűjtemény**

A denevérek a természet egyik legjelentősebb vírusrezervoár szervezetei: ehhez hozzájárul mind a madarakhoz hasonló migrációs és kolóniaképző tendenciájuk, mind a repüléskor



megemelkedő, torpor állapotban pedig lecsökkenő testhőmérsékletük. Fontosak ezeken kívül az immunrendszeri sajátosságaik, melyekkel szabályozzák a vírus elterjedését szervezetükben, és lehetővé teszik a perzisztens fertőzés kialakulását [2, 3, 8, 9, 23]. Vírusaik emberre történő átadásának kockázata napjainkban megnövekedett, hiszen az ember egyre inkább behatol természetes élőhelyeikre, és ezáltal a denevérek közelségbe kényszerülnek velük [8, 9].

PCR-szűréseink során magas számú fals pozitív eredményt kaptunk, azonban PyV-ra ténylegesen pozitív mintát nem találtunk a gyűjteményben. A fals pozitív eredmények a degenerált primerekkel magyarázhatóak: ahhoz, hogy családszinten mindegyik PyV-típust képesek legyenek felerősíteni, olyan szintű degeneráltságra és alacsony primer kötődési hőmérsékletre van szükség, hogy a primerek gyakran bekötődnek más eredetű DNS-szakaszokra is [45]. A hibásan felerősített termékek legtöbbször bakteriális eredetűek voltak.

Miután Németországból nem ismerünk adatokat a denevérfauna PyV-fertőzöttségére vonatkozóan, többféleképpen értelmezhetjük a pozitív eredmények hiányát. Első és leginkább valószínű hipotézisünk az, hogy az észak-németországi denevérfauna nem tartozik a PyV család természetes földrajzi előfordulási területébe. Ezzel párhuzamos másik hipotézisünk, miszerint a *Rhinolophus* nemzetség (Patkósdenevérek) tagjai adhatnák át a *Vespertilionidae* (Simaorrú denevérek) család tagjainak ezen vírusokat. Ezt alátámasztja, hogy patkósdenevér fajokból már sikeresen kimutatták e víruscsalád tagjait Európában, azonban ezen fajok előfordulási területe nem fed át a mintavételi területtel, amely Észak-Németországban található [28, 54]. Lehetséges ökológiai magyarázat erre az, hogy a mintavételi területen az óceáni és kontinentális éghajlatok keveredése figyelhető meg, Közép-Európa nagy részével ellentétben, ahonnan sok vírus ismert patkósdenevér fajokból [55]. Miután a patkósdenevérek a melegebb éghajlatokat kedvelik, csupán kis számban fordulnak elő Észak-Németországban [56]. Hipotéziseinket egy dél-brazíliai kutatás is alátámasztja, melynek során AdV-okat és PV-okat kerestek, azonban a prevalencia jóval alacsonyabb volt, mint más régiókban: csupán 1%. Azt a következtetést vonták le, hogy mivel nem valószínű, hogy a vírusdiverzitás nagy mértékben eltér a denevérfajok között, feltételezhetően a környezeti jellemzők, a földrajzi elterjedtség és a más denevérfajokkal való érintkezés okozhatta az eltérő eredményeket [9]. Egy másik kutatás során megfigyelték, hogy a nagyobb kolóniákban élő fajok egyedeiből nagyobb arányban mutattak ki vírusokat, melyből szintén arra következtettek, hogy a gazda életmódja határozza meg legnagyobb mértékben a bennük előforduló vírusokat, nem pedig a vírus fertőzőképessége az adott gazdaszervezetben [25].

Végső soron pedig felmerül a lehetőség, hogy a minták, melyek eredete 2007-2009-re vezethető vissza, túl régiek voltak a DNS kimutatásához: esetlegesen a tárolócsövekbe került kontamináció (külső DNS vagy nukleáz) károsíthatta, vagy akár a szűrés során elnyomhatta az eredeti DNS-tartalmat. Mindezek által további szűrésekre van szükség a németországi denevérfauna vírusfertőzöttségének felmérésére.

### **3. Fővárosi Állat- és Növénykertből származó denevér-mintagyűjtemény**

Az állatkerti minták sem tartalmaztak az általunk keresett vírusokhoz (AdV, PyV, HV, PV, CV) tartozó DNS-t. Ez ugyan a többi denevér vírusszűrés eredményei alapján meglepő, valójában nem rendelkezünk ismeretekkel a *Phyllostomus discolor* faj vírusdiverzitásáról, így nem volt konkrét elvárásunk az eredményeket illetően, csupán feltételezéseink a denevérekben megtalálható általános vírusdiverzitás alapján. Összesen 28 minta állt rendelkezésünkre, amely viszonylag kevés, tehát a kimutatás valószínűsége is alacsonyabb volt. Másik hipotézisünk, hogy mivel ezek az állatok fogságban voltak tartva az állatkertben egész életük során, kevés lehetőségük volt más fajok egyedeivel érintkezni és általuk megfertőződni. A továbbiakban érdekes lenne a természetes elterjedési területükön, Dél-Amerikában vizsgálni a faj egyedeinek vírusfertőzöttségét, hiszen az több információval szolgálhat, mint a fogságban tartott egyedek vizsgálata.

## Összefoglalás

Mind humán, mind állategészségügyi szempontból kulcsfontosságú napjainkban az új vírusok keresése, kimutatása és vizsgálata; ehhez szerettünk volna hozzájárulni kutatásunk által is. 100 hazai vadmadárból származó tamponmintát, 7 tenyésztett japán fűrj (*Coturnix japonica*) szervmintáit, 74 németországi denevér szerveiből kivont DNS-mintát, valamint 28, a Fővárosi Állat- és Növénykertből származó levélorrú denevér (*Phyllostomus discolor*) szervmintáit dolgoztunk fel, illetve szűrtünk PCR módszerrel különböző vírusokra. A németországi denevérmintákat csak PyV-ra, a madármintákat csak AdV-ra, az állatkerti denevérmintákat pedig AdV-ra, PyV-ra, HV-ra, PV-ra és CV-ra is szűrtük.

A denevérminták között nem találtunk egyik vírusra sem pozitív mintát, a madármintagyűjteményben azonban japán fűrjeből sikerült AdV-t kimutatni. A magas arányú negativitásra több lehetséges magyarázat van, azonban a biztosabb eredmények érdekében fontos volna folytatni a szűréseket, esetleg fejlettebb metagenomikai módszerekkel kiegészítve.

Mindkét pozitív mintában ugyanazon siadenovírust találtuk, és filogenetikai vizsgálatok által megállapítottuk, hogy a talált AdV megfelelő genetikai távolságban áll a legközelebbi rokonaitól ahhoz, hogy a teljes genom szekvenálását követően új faj képviselőjeként lehessen elfogadtatni. Az általunk készített törzsfán látható, hogy jól elkülönül a hozzá legközelebb eső siadenovírusoktól, valamint a törzsfán megfigyelhetőek gazdaváltási események, és – ahogy az általunk kimutatott új adenovírus kládja esetében is – a vírus-gazda koevolúció folyamata. Ezekből következtetünk rá, hogy a DNS-dependens DNS-polimeráz gén részleges szekvenciája is megfelelő az AdV-ok megbízható filogenetikai vizsgálatához.

Eredményeink alapján a továbbiakban állatorvosi és gazdasági szempontból érdemes lenne tenyésztett fűrjeket szűrni AdV-okra, illetve megvizsgálni a bennük előforduló vírusok kórokozó képességét, az általuk esetleg okozott tüneteket, és ezek alapján vizsgálni a lehetséges megelőzési módokat. A denevérekre tekintettel folytatni kellene a németországi fauna PyV szűrését az eredményeink és következtetéseink alátámasztásához, illetve a *Phyllostomus discolor* faj vírusdiverzitásának természetes élőhelyen történő vizsgálatát.

## Irodalomjegyzék

1. Méndez-Rodríguez A, Horta P, Zarza H, Constante-Pérez LG, Salgado-Mejia F, López-Wilchis R, Juste J (2024) Surveying Bat-Hosted Adenoviruses and Herpesviruses: A Comprehensive Analysis. *Diversity* 16:46. <https://doi.org/10.3390/d16010046>
2. Zoltán VM, Boldogh S (2011) Detection of adenoviruses in the Northern Hungarian bat fauna. *Magy Allatorvosok Lapja* 133:747–753
3. 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>
4. Athukorala A, Helbig KJ, Mcsharry BP, Forwood JK, Sarker S (2022) Adenoviruses in Avian Hosts: Recent Discoveries Shed New Light on Adenovirus Diversity and Evolution. *Viruses* 14:1767. <https://doi.org/10.3390/v14081767>
5. Fitzgerald SD, Rautenschlein S, Mahsoub HM, Pierson FW, Reed WM, Jack SW (2020) Adenovirus Infections. In: *Diseases of Poultry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 321–363
6. Harrach B, Megyeri A, Papp T, Ursu K, Boldogh SA, Kaján GL (2023) A screening of wild bird samples enhances our knowledge about the biodiversity of avian adenoviruses. *Vet Res Commun* 47:297–303. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09931-6>
7. Kremer EJ (2021) What is the risk of a deadly adenovirus pandemic? *PLOS Pathog* 17:e1009814. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009814>
8. Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ (2020) Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat Rev Microbiol* 18:461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
9. Finoketti F, Santos RN dos, Campos AAS, Zani AL da S, Barboza CM, Fernandes MES, Souza T de CP de, Santos DD dos, Bortolanza GW, Filho HO, Roehle PM, Franco AC, Batista HB de CR (2019) Detection of adenovirus, papillomavirus and parvovirus in Brazilian bats of the species *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium*. *Arch Virol* 164:1015. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04129-1>
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. 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, ICTV Report Consortium (2022) ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. *J Gen Virol* 103:. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
12. Rafie K, Lenman A, Fuchs J, Rajan A, Arnberg N, Carlson L-A (2021) The structure of enteric human adenovirus 41—A leading cause of diarrhea in children. *Sci Adv* 7:eabe0974. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0974>
13. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. <https://ictv.global/taxonomy>. Accessed 26 Mar 2024

14. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park E-C, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P (2008) Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:457–470.  
<https://doi.org/10.1128/mmmbr.00004-08>
15. Longdon B, Brockhurst MA, Russell CA, Welch JJ, Jiggins FM (2014) The Evolution and Genetics of Virus Host Shifts. *PLOS Pathog* 10:e1004395.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>
16. 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>
17. Zadavec M, Račnik J, Slavec B, Ballmann MZ, Kaján GL, Doszpoly A, Zorman-Rojs O, Marhold C, Harrach B (2022) Novel adenoviruses from captive psittacine birds in Slovenia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 90–91:101902.  
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101902>
18. Mónika B Madarakban előforduló adenovírusok sokféleségének és genetikai jellemzőinek feltárása
19. Athukorala A, Phalen DN, Das A, Helbig KJ, Forwood JK, Sarker S (2021) Genomic Characterisation of a Highly Divergent Siadenovirus (Psittacine Siadenovirus F) from the Critically Endangered Orange-Bellied Parrot (*Neophema chrysogaster*). *Viruses* 13:1714.  
<https://doi.org/10.3390/v13091714>
20. Kaján GL, Davison AJ, Palya V, Harrach B, Benkő M (2012) Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4. *J Gen Virol* 93:2457–2465.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.042028-0>
21. Grafl B, Garcia-Rueda C, Cargill P, Wood A, Schock A, Liebhart D, Schachner A, Hess M (2018) Fowl aviadenovirus serotype 1 confirmed as the aetiological agent of gizzard erosions in replacement pullets and layer flocks in Great Britain by laboratory and in vivo studies. *Avian Pathol* 47:63–72. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1367364>
22. Matsvay A, Dyachkova M, Mikhaylov I, Kiselev D, Say A, Burskaia V, Artyushin I, Khafizov K, Shipulin G (2022) Complete Genome Sequence, Molecular Characterization and Phylogenetic Relationships of a Novel Tern Atadenovirus. *Microorganisms* 10:31.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10010031>
23. Hibernate or Migrate - Bats (U.S. National Park Service).  
<https://www.nps.gov/subjects/bats/hibernate-or-migrate.htm>. Accessed 30 Mar 2024
24. Vidovszky M, Kohl C, Boldogh S, Görföl T, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B (2015) Random sampling of the Central European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses. *Acta Vet Hung* 63:508–525.  
<https://doi.org/10.1556/004.2015.047>
25. Ntumvi NF, Diffo JLD, Tamoufe U, Ndze VN, Takuo J-M, Mouiche MMM, Nwobegahay J, LeBreton M, Gillis A, Rimoin AW, Schneider BS, Monagin C, McIver DJ, Joly DO, Wolfe ND, Rubin EM, Lange CE (2021) Evaluation of bat adenoviruses suggests co-

- evolution and host roosting behaviour as drivers for diversity. *Microb Genomics* 7:000561. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000561>
26. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Verschoor EJ, Ehlers B, ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol* 98:1159–1160. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839>
  27. Gonzalez G (2020) Bat Polyomaviruses: A Challenge to the Strict Host-Restriction Paradigm within the Mammalian Polyomaviridae. pp 87–118
  28. Bat-borne polyomaviruses in Europe reveal an evolutionary history of intrahost divergence with horseshoe bats distributed across the African and Eurasian continents | Microbiology Society. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001467>. Accessed 10 Mar 2024
  29. Gatherer D, Depledge DP, Hartley CA, Szpara ML, Vaz PK, Benkő M, Brandt CR, Bryant NA, Dastjerdi A, Doszpoly A, Gompels UA, Inoue N, Jarosinski KW, Kaul R, Lacoste V, Norberg P, Origi FC, Orton RJ, Pellett PE, Schmid DS, Spatz SJ, Stewart JP, Trimpert J, Waltzek TB, Davison AJ (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J Gen Virol* 102:001673. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001673>
  30. Jánoska M, Vidovszky M, Molnár V, Liptovszky M, Harrach B, Benkő M (2011) Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet J* 189:118–121. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>
  31. Moreira Marrero L, Botto Nuñez G, Malta L, Delfraro A, Frabasile S (2021) Ecological and Conservation Significance of Herpesvirus Infection in Neotropical Bats. *EcoHealth* 18:123–133. <https://doi.org/10.1007/s10393-021-01530-2>
  32. Papillomaviridae | ICTV. [https://ictv.global/report\\_9th/dsDNA/Papillomaviridae](https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Papillomaviridae). Accessed 9 Mar 2024
  33. Frias-De-Diego A, Jara M, Escobar LE (2019) Papillomavirus in Wildlife. *Front Ecol Evol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00406>
  34. Circoviridae | ICTV. [https://ictv.global/report\\_9th/ssDNA/Circoviridae](https://ictv.global/report_9th/ssDNA/Circoviridae). Accessed 9 Mar 2024
  35. Lecis R, Mucedda M, Pidinchredda E, Zobba R, Pittau M, Alberti A (2020) Genomic characterization of a novel bat-associated Circovirus detected in European *Miniopterus schreibersii* bats. *Virus Genes* 56:325–328. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01747-3>
  36. Vidovszky MZ, Kapitány S, Gellért Á, Harrach B, Görföl T, Boldogh SA, Kohl C, Wibbelt G, Mühldorfer K, Kemenesi G, Gembu G-C, Hassanin A, Tu VT, Estók P, Horváth A, Kaján GL (2023) Detection and genetic characterization of circoviruses in more than 80 bat species from eight countries on four continents. *Vet Res Commun* 47:1561–1573. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10111-3>
  37. Surján A, Gonzalez G, Gellért Á, Boldogh S, Carr MJ, Harrach B, Vidovszky MZ (2023) First detection and genome analysis of simple nosed bat polyomaviruses in Central Europe. *Infect Genet Evol* 112:105439. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105439>

38. 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>
39. Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
40. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
41. Koichiro Tamura, Glen Stecher, and Sudhir Kumar (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
42. 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>
43. Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25:1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
44. 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>
45. Li D, Zhang J, Li J (2020) Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics* 10:7150–7162. <https://doi.org/10.7150/thno.47649>
46. Baer J, Lansford R, Cheng K (2015) Chapter 22 - Japanese Quail as a Laboratory Animal Model. In: Fox JG, Anderson LC, Otto GM, Pritchett-Corning KR, Whary MT (eds) *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*. Academic Press, Boston, pp 1087–1108
47. Quail Bronchitis - Poultry. In: MSD Vet. Man. <https://www.msdsvetmanual.com/poultry/quail-bronchitis/quail-bronchitis>. Accessed 28 Mar 2024
48. Rahman MdM, Talukder A, Chowdhury MMH, Talukder R, Akter R (2021) Coronaviruses in wild birds – A potential and suitable vector for global distribution. *Vet Med Sci* 7:264–272. <https://doi.org/10.1002/vms3.360>
49. Hall JS, Dusek RJ, Nashold SW, TeSlaa JL, Allen RB, Gear DA (2020) Avian influenza virus prevalence in marine birds is dependent on ocean temperatures. *Ecol Appl* 30:e02040. <https://doi.org/10.1002/eap.2040>
50. Graziosi G, Catelli E, Fanelli A, Lupini C (2022) Infectious bursal disease virus in free-living wild birds: A systematic review and meta-analysis of its sero-viro-prevalence on a global scale. *Transbound Emerg Dis* 69:2800–2815. <https://doi.org/10.1111/tbed.14433>

51. Kohl C, Brinkmann A, Radonić A, Dabrowski PW, Mühldorfer K, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A (2021) The virome of German bats: comparing virus discovery approaches. *Sci Rep* 11:7430. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86435-4>
52. Kaszab E, Lengyel G, Marton S, Dán Á, Bányai K, Fehér E (2020) Occurrence and genetic diversity of CRESS DNA viruses in wild birds: a Hungarian study. *Sci Rep* 10:7036. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63795-x>
53. Li J, Zhang C, Cao J, Yang Y, Dong H, Cui Y, Yao X, Zhou H, Lu L, Lycett S, Wang X, Song H, Liu W, Gao GF, Shi W, Bi Y (2021) Re-emergence of H5N8 highly pathogenic avian influenza virus in wild birds, China. *Emerg Microbes Infect* 10:1819–1823. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1968317>
54. Drexler J, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman V, Muth D, Göttische M, Seebens-Hoyer A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Müller M, Deng H, Herrler G, Drosten C (2010) Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences. *J Virol* 84:11336–49. <https://doi.org/10.1128/JVI.00650-10>
55. Németszág-Főoldal. <https://meilong.web.elte.hu/uv/nemetszag.html>. Accessed 14 Apr 2024
56. UNEP/EUROBATS | Agreement on the Conservation of Populations of European Bats. <https://www.eurobats.org/>. Accessed 14 Apr 2024
57. Johne R, Enderlein D, Nieper H, Müller H (2005) Novel Polyomavirus Detected in the Feces of a Chimpanzee by Nested Broad-Spectrum PCR. *J Virol* 79:3883–3887. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3883-3887.2005>
58. 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>
59. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Göran Hansson B (1999) A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 80:2437–2443. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2437>
60. Halami MY, Nieper H, Müller H, Johne R (2008) Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res* 132:208–212. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.001>



## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom elsőként témavezetőimnek, Dr. Vidovszky Mártonnak és Surján Andrásnak, hogy bevezettek a laboratóriumi munka világába, megtanították a használt módszereket, és minden kérdésemet és problémámat segítőkészen fogadták, még szabadidejükben is. Az ÁTKI többi munkatársának is szeretnék köszönetet mondani, különösképpen Dr. Harrach Balázsnak és Dr. Kaján Győzőnek, amiért kötelezettségükön felül is segítséget nyújtottak nekem, többek között a további minták beszerzésében.

Végül pedig köszönettel tartozom belső konzulensemnek, Dr. Pásztory-Kovács Szilviának, amiért segített összehangolni a munkámat a követelményekkel, és hasznos tanácsokkal mutatott utat a továbbhaladásban.

## Függelék

- 1. táblázat.** A PyV-ok kimutatására használt PCR során alkalmazott primerek szekvenciái: ezek a vírus VP1 génjét amplifikálják [57]

Külső „forward” primer: VP1-1FO	5'-CCA GAC CCA ACT ARR AAT GAR AA-3'
Külső reverz primer: VP1-1RE	5'-AAC AAG AGA CAC AAA TNT TTC CNC C-3'
Belső „forward” primer: VP1-2FO_short	5'-ATG AAA ATG GGG TTG GCC CNC TNT G-3'
Belső reverz primer: VP1-2RE	5'-CCC TCA TAA ACC CGA ACY TCY TCH ACY TG-3'

- 2. táblázat.** A HV-ok kimutatására használt PCR során alkalmazott primerek szekvenciái: ezek a vírus DNS-függő DNS-polimeráz génjét amplifikálják [58]

Külső „forward” primer 1: DFA	5'-GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC-3'
Külső „forward” primer 2: ILK	5'-TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A-3'
Külső reverz primer: KG1	5'-GTC TTG CTC ACC AGN TCN ACN CCY TT-3'
Belső „forward” primer: TGV	5'-TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT-3'
Belső reverz primer: IYG	5'-CAC AGA GTC CGT RTC NCC RTA NAT-3'

- 3. táblázat.** A PV-ok kimutatására használt PCR során alkalmazott primerek szekvenciái: ezek a vírus L1 génjét amplifikálják [59]

„Forward” primer: FAP54	5'- TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT – 3'
Reverz primer: FAP64	5'- CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC –3'

- 4. táblázat.** A CV-ok kimutatására használt PCR során alkalmazott primerek szekvenciái: ezek a vírus Rep génjét amplifikálják [60]

Külső „forward” primer: Cv-s	5'-AGA GGT GGG TCT TCA CNH TBA AYA A-3'
Külső reverz primer: Cv-as	5'-AAG GCA GCC ACC CRT ARA ART CRT C-3'
Belső „forward” primer: Cn-s	5'-AGC AAG GAA CCC CTC AYY TBC ARG G-3'
Belső reverz primer: Cn-as	5'-ACG ATG ACT TCN GTC TTS MAR TCA CG-3'

5. táblázat. „Master mix” összetétele PyV-ra való PCR-szűrés esetében

	1. kör	2. kör
DreamTaq Mix	12,5 µl	12,5 µl
MQ	8,5 µl	8 µl
Primer 1 („forward”)	1 µl	1 µl
Primer 2 (reverz)	1 µl	1 µl
DNS	2 µl	2,5 µl
Összesen	25 µl	25 µl

6. táblázat. „Master mix” összetétele HV-ra való PCR-szűrés esetében

	1. kör	2. kör
DreamTaq Mix	12,5 µl	12,5 µl
MQ	8,5 µl	8 µl
Primer 1.1 („forward”)	1 µl	1 µl
Primer 1.2 („forward”)	1 µl	-
Primer 2 (reverz)	1 µl	1 µl
DNS	1 µl	2,5 µl
Összesen	25 µl	25 µl

7. táblázat. „Master mix” összetétele PV-ra való PCR-szűrés esetében

	1. kör
DreamTaq Mix	12,5 µl
MQ	6 µl
Primer 1 („forward”)	2 µl
Primer 2 (reverz)	2 µl
DNS	2,5 µl
Összesen	25 µl

8. táblázat. „Master mix” összetétele CV-ra való PCR-szűrés esetében

	1. kör	2. kör
DreamTaq Mix	12,5 µl	12,5 µl
MQ	10,5 µl	9 µl
Primer 1 („forward”)	0,5 µl	0,5 µl
Primer 2 (reverz)	0,5 µl	0,5 µl
DNS	1 µl	2,5 µl
Összesen	25 µl	25 µl

**9. táblázat.** A PCR program lépései az AdV-ra való szűrés esetében

1. kör		2. kör		
94°C	2 perc	95°C	5 perc	
94°C	30 mp	94°C	30 mp	
46°C	1 perc	56°C	30 mp	45 x ismétlés
72°C	1 perc	72°C	1 perc	
72°C	1 perc	72°C	1 perc	

**10. táblázat.** A PCR program lépései az HV-ra való szűrés esetében

1. kör		2. kör		
95°C	5 perc	95°C	5 perc	
95°C	30 mp	95°C	30 mp	
46°C	1 perc	46°C	1 perc	45 x ismétlés
72°C	1 perc	72°C	1 perc	
72°C	5 perc	72°C	5 perc	
10°C	tárolás	10°C	tárolás	

**11. táblázat.** A PCR program lépései az PV-ra való szűrés esetében

1. kör		2. kör		
94°C	5 perc	94°C	5 perc	
94°C	15 mp	94°C	15 mp	
45°C	1 perc	47°C	1 perc	35 x ismétlés
72°C	20 mp	72°C	20 mp	
72°C	1 perc	72°C	5 perc	

**12. táblázat.** A PCR program lépései az CV-ra való szűrés esetében

<b>1. kör</b>		<b>2. kör</b>		
95°C	5 perc	95°C	5 perc	
95°C	30 mp	95°C	30 mp	
46°C	1 perc	56°C	1 perc	45 x ismétlés
72°C	1 perc	72°C	1 perc	
72°C	5 perc	72°C	5 perc	
10°C	tárolás	10°C	tárolás	

## Belső konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Pásztory-Kovács Szilvia, mint belső konzulens nyilatkozom, hogy Kovács Hanna Panna, BSc III. évfolyamos hallgató „DNS-vírusok keresése és filogenetikai elemzések madarakban és emlősökben” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, beadásra és védésre alkalmasnak tartom. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött szakdolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2024. április 25.



.....  
belső konzulens