

Állatorvostudományi Egyetem

Pingvin-eredetű minták szűrése adeno- és CRESS-DNS vírusokra

Készítette: Simon Zita

Témavezető: dr. Kaján Győző

Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, tudományos főmunkatárs

Budapest, 2021

Tartalom

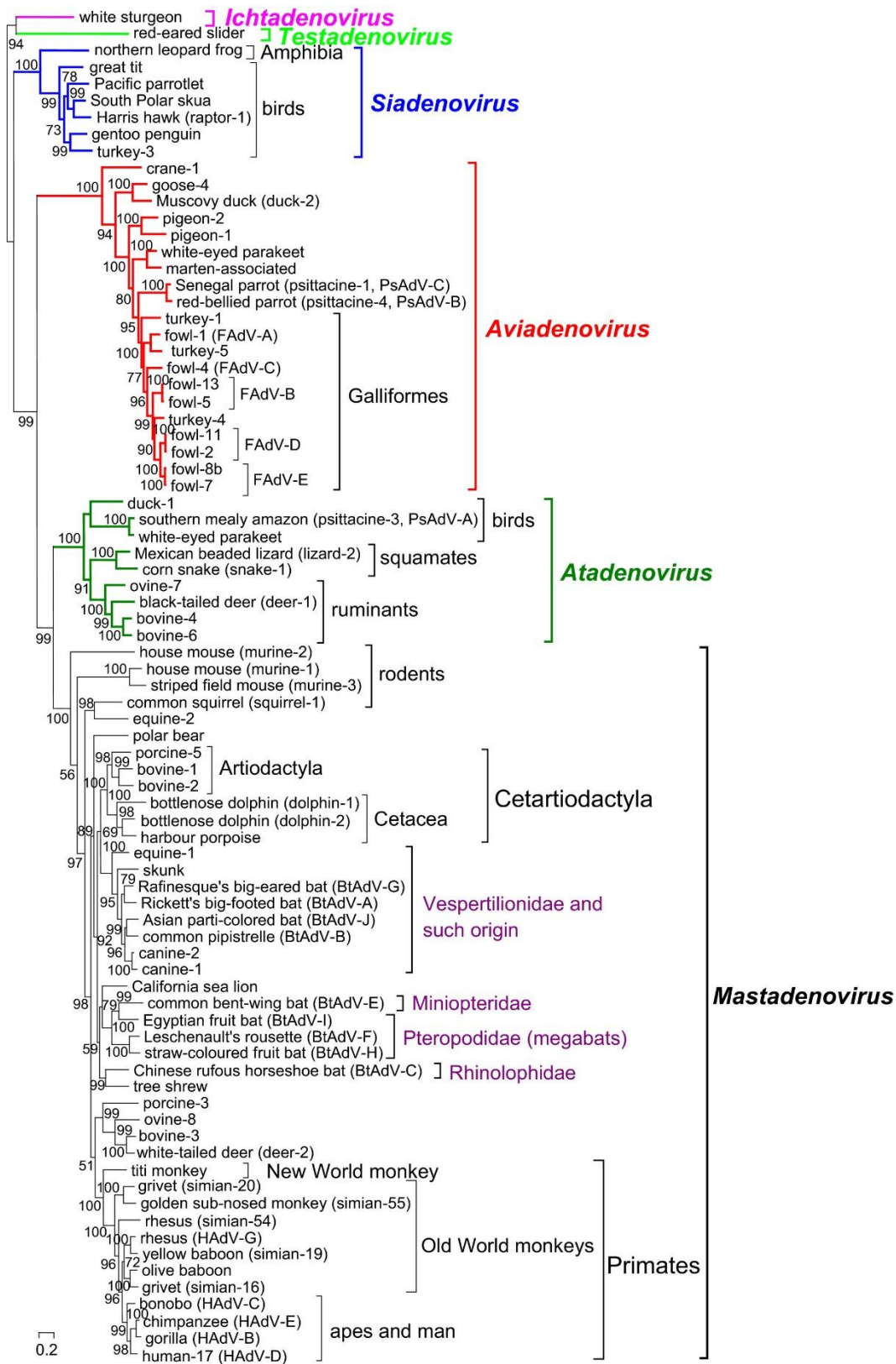
1. BEVEZETÉS	3
1.1. Adenovírusokról általánosságban	3
1.2. CRESS-DNS vírusokról általánosságban	5
1.2.1. Circovírusok	6
1.3. A pingvinek és vírusaik	6
1.3.1. A pingvinekről általánosságban	6
1.3.2. A pingvinek vírusos fertőzéseinek lehetséges forrásai	7
1.3.3. A pingvinek adeno- és circovírusai	8
1.4. Célkitűzések	10
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	11
2.1. A minták származása	11
2.2. DNS kivonása a mintákból	11
2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)	12
2.4. Agaróz gélelektroforézis	13
2.5. PCR-termékek tisztítása szekvenáláshoz	13
2.6. DNS-szekvenálás	13
2.7. Molekuláris klónozás	15
2.8. Bioinformatikai elemzések és filogenetikai számítások	15
3. EREDMÉNYEK	17
3.1. A PCR tesztek eredményei gélelektroforézis alapján	17
3.2. A szekvenálás eredményei	18
3.3. A filogenetikai elemzés eredménye	19
4. DISZKUSSZIÓ	21
4.1. A pozitív minták száma	21
4.2. A fals pozitív minták száma	21
4.3. A pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírusának rendszertani beosztása és feltételezett evolúciója	22
4.4. Példa pingvinek és egyéb vírusok koevolúciójára	24
4.5. A vadvilág virológiai vizsgálatának jelentősége	24
5. ÖSSZEFOGLALÁS	26
6. SUMMARY	27
7. IRODALOM	28
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36

1. BEVEZETÉS

1.1. Adenovírusokról általánosságban

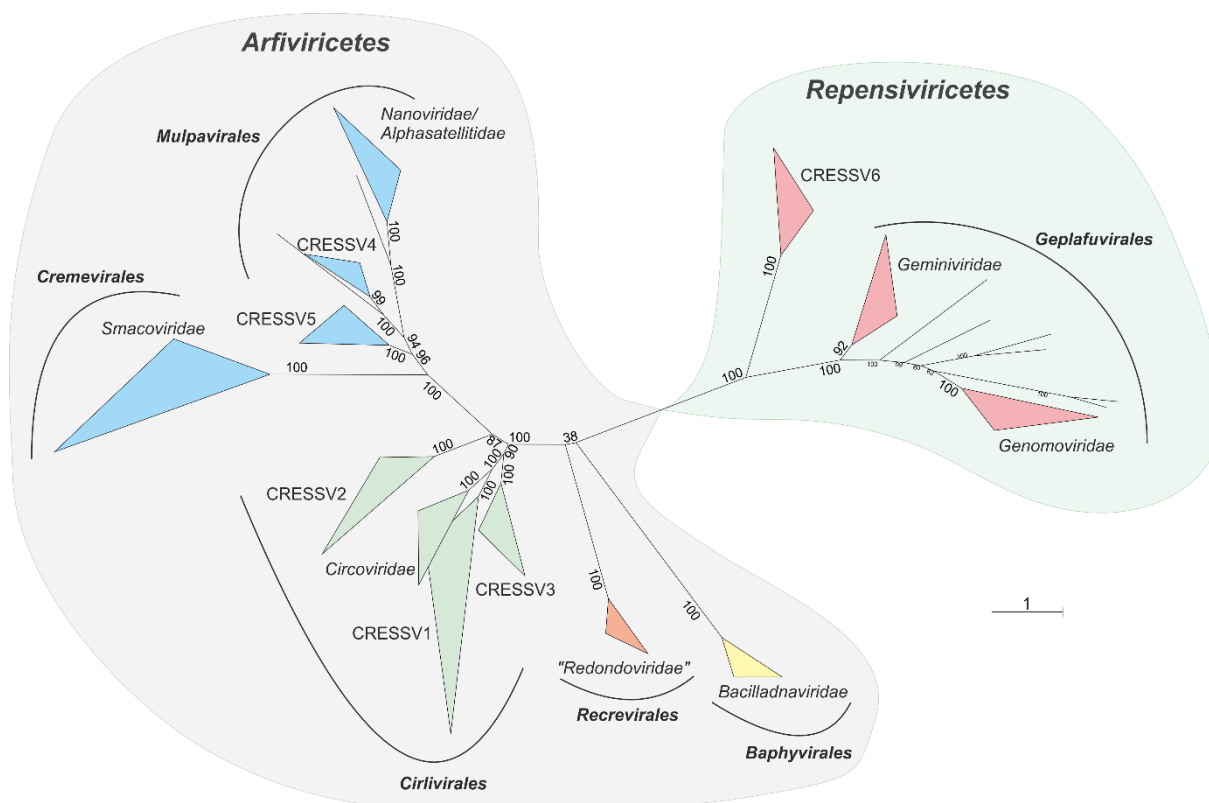
Az adenovírusok (*Adenoviridae* család) buroknélküli, ikozaéder alakú kapsziddal és lineáris, duplaszálú DNS genommal rendelkező (26-45 kbp), közepes méretű (~90 nm átmérő) vírusok. Virionstruktúrájuk jellegzetes elemei a hexonok és a penton bázisok (előbbiek az ikozaéder oldalait, míg utóbbiak a csúcsait alkotják), illetve a fiberek, melyek a penton bázisokon található antenyszerűen kiálló struktúrák, számuk pentononként egytől háromig terjedhet. Gazdaszervezeteik skálája lefedi a gerincesek törzsének osztályait. A családban jelenleg hat hivatalosan elfogadott nemzetség található: a *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Atadenovirus* és *Siadenovirus* nemzetség mellé 2021-ben fogadták el a *Testadenovirus* nemzetséget (1. ábra). A mastadenovírusok emlősöket, az aviadenovírusok madarakat, az egyetlen ismert ichtadenovírus egy tokféle halat, a testadenovírusok pedig teknősöket fertőznek. A maradék két nemzetség gazdaszervezeteinek köre kiterjedtebb: atadenovírusok főleg madarakban és pikkelyes hüllőkben találhatók, továbbá erszényesekben is, míg siadenovírusokat szinte csak madarakban fedeztek fel, de előfordulnak kételtűekben és hüllőkben is. Az adenovírusok okozhatnak megbetegedéseket (pl. légzőszervi, emésztőrendszeri tünetek), de egészséges, nem immunszuppresszált szervezetben általában észrevétlenek maradnak. A molekuláris biológiai vizsgálatok kedvelt modellorganizmusai, hozzájuk kötődik többek közt a splicing mechanizmusának felfedezése, de a génterápiában és a vakcinaiparban is jelentős a szerepük (Harrach és Benkő, 2021).

1. ábra: Az *Adenoviridae* család törzsfája, mely a DNS-polimeráz aminosav-szekvenciáján alapul. Feltüntetésre kerültek a gazdaszervezetek egyes nagyobb kládjai is, így bemutatva az ezek és vírusaik között megfigyelhető koevolúciót. (Forrás: Harrach és Mtsai, 2019)



1.2. CRESS-DNS vírusokról általánosságban

A *Cressdnaviricota* törzsbe tartozó CRESS-DNS vírusok (circular replication associated protein-encoding single-stranded DNA viruses) nevüket cirkuláris, replikációs proteint kódoló, szimplaszálú DNS genomjukról kapták. Ezen buroknélküli, ikozaéderes vírusok kisméretűek (15-38 nm átmérő), genomjuk 1,7-6 kbp terjedelemben mozog. Gazdaszervezeteik az eukarióták széles körében megtalálhatók, mind növényi, mind állati kórokozókként jelentős szerepük van az ökoszisztémában. A gazdaskálához hasonlóan maguk a vírusok is magasfokú diverzitást mutatnak, melyet egyrészt mutációknak, másrészt az igen gyakori egymás közötti rekombinációknak köszönhetnek. Genomjuk eltérő számban tartalmazhat kódoló régiókat, viszont két ORF (open reading frame) régió minden CRESS-DNS vírus genomjában megtalálható: a Rep (replikációs proteint kódoló) illetve a CP (kapszid proteint kódoló) régiók. Míg a CP régióra magas diverzitás és gyakori rekombinációs események jellemzők, addig a Rep egy viszonylag konzerváltabb gén, így utóbbira előszeretettel támaszkodnak filogenetikai elemzésekben, taxonómiai besorolásokban. A *Cressdnaviricota* törzs jelenleg magában foglal két osztályt, hat rendet, hét családot (*Nanoviridae*, *Smacoviridae*, *Circoviridae*,



2. ábra: A *Cressdnaviricota* törzs összefoglaló törzsfája, melyet a Rep fehérje aminosav-szekvenciája alapján származtattak. A közeli rokon vírustörzsek ágait háromszögekké vonták össze, melyeknek oldalhosszai arányosak a kládon belül mért legrövidebb és leghosszabb ághosszal. (Forrás: Krupovic és mtsai, 2020)

Redondoviridae, *Bacilladnaviridae*, *Geminiviridae*, *Genomoviridae*) és 6 további kládot (CRESS1–6), melyeknek taxonómiai besorolási szintje még bizonytalan (Zhao és mtsai, 2019; Krupovic és mtsai, 2020) (2. ábra).

1.2.1. Circovírusok

A *Circoviridae* családban két nemzetség található, a *Circovirus*, illetve a *Cyclovirus*. Ebbe a családba tartoznak a jelenleg ismert legkisebb állati vírusok (1,7-2,1 kbp). Míg a cyclovírusok gerinces és gerinctelen fajokat is fertőznek, addig a circovírusok főleg gerincesek kórokozói. A circovírusok az eddig legátfogóbban tanulmányozott CRESS-DNS vírusok közé tartoznak. Számos esetben jól ismert a patogenitásuk, például sertések circovírus-sal összefüggésbe hozható betegségét (PCVAD=porcine circovirus-associated disease) a sertés circovírus 2 (PCV2=porcine circovirus 2) okozza, míg a papagájok csőr-toll szindrómáját (PBFD=psittacine beak and feather disease) a BFDV (beak and feather disease virus) vírus okozza. Patogenitásuk jelentős gondokat okozhat többek közt a húsiparban, állattenyésztésben (Zhao és mtsai, 2019).

1.3. A pingvinek és vírusaik

1.3.1. A pingvinekről általánosságban

A ma élő összes ismert pingvin fajt a Spheniscidae családba sorolják, ezen belül hat nemzetségük és összesen 18 fajuk található. A legősibb ismert pingvinek hazája Új-Zéland lehetett (Ksepka és mtsai, 2006) napjainkban élőhelyük főként a déli félgömbre korlátozódik (ez alól az egyetlen kivétel a galápagosi pingvin, melynek területei kis mértékben átnyúlnak az Egyenlítőtől északra is). A 18 faj körülbelül kétharmadát érinti a populációméret csökkenésének folyamata, ennél fogva 10 fajt tartanak nyilván sebezhető vagy veszélyeztetett természetvédelmi kategóriával (Hickcox és mtsai, 2019). Természetvédelmi státuszukból adódóan különösen fontos élőhelyük védelme. Hét olyan forrópont található a Földön, amely 4 vagy 5 faj költőhelyéül szolgál, ezek a területek az Antarktiszi-félszigeten, a szubantarktikus szigeteken, illetve Dél-Amerika déli részén találhatók (Hickcox és mtsai, 2019). Előbbi kettő különlegessége, hogy földrajzi elhelyezkedésük és éghajlati sajátosságaik révén meglehetősen elszigeteltek. Az egyes fajok elterjedési területeinek mérete igen változó: míg a császárpingvinek például birtokba veszik az Antarktiszt hatalmas partvidékeit, addig a galápagosi pingvinek a Galápagos-szigetekre, jelentősen kisebb területekre korlátozódnak. Az egyes fajok veszélyeztetettsége illetve szűk elterjedése következtében az esetleges patogén megjelenése nagy veszélyt hordozhat magában.

1.3.2. A pingvinek vírusos fertőzéseinek lehetséges forrásai

Az antarktiszi ökoszisztémának fontos elemei a vírusok. Feltételezhető, hogy az itteni sós vizekben fellelhető vírusoknak nagyobb mikrobiális ökológiai szerepük van, mint a trópusokon vagy mérsékelt övben fellelhetőeknek. A hatalmas, örökjég formájában jelen lévő édesvíz tömeg számos, a tudomány számára új vírust foglalhat magában (Pearce és mtsai, 2003). De ez elmondható azon élőlények populációiról is, melyek számára az Antarktisz élőhelyül szolgál. Az itt található madárfaunából, melynek meghatározó elemei a pingvinek, számos vírust írtak már le, és mivel nem ezek a legintenzívebben kutatott területek, valószínűleg még sok új vírus felfedezésre vár. Antarktiszi és egyéb pingvinpopulációkban kimutatták már az *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Birnaviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae* és *Orthomyxoviridae* családok képviselőit (Lee és mtsai, 2014; Wille és mtsai, 2020; Parsons és mtsai, 2016; Levy és mtsai, 2020a; Morgan és mtsai, 1981; Tuxbury és mtsai, 2020; Fornells és mtsai, 2012; Varsani és mtsai, 2014; Hayer és mtsai, 2020; de Souza és mtsai, 2019; Yinda és mtsai, 2019; Varsani és mtsai, 2015; Nunes és mtsai, 2012; Offerman és mtsai, 2014).

A pingvineket érintő vírusos fertőzésekben számos tényező közrejátszik. Az egyik legfontosabb az antropogén hatás. Gardner és munkatársai (1997) antarktiszi császár- és Adélie pingvineket vizsgálva kimutatták, hogy az emberi tevékenységek közelében leggyakoribb a fertőző burzitisz vírusa elleni szeropozitivitás jelenléte a madarakban. Ez, a pingvinek esetében főként a fiókákra veszélyes baromfivírus, valószínűleg embereknek köszönhetően jelent meg az Antarktison (Gardner és mtsai, 1997). Ugyanez elmondható a szubantarktikus Crozet-szigetcsoporthoz élő királypingvinekről. Az ide tartozó Possession-szigeten található kutatóállomás mellett egy időben baromfiudvar állt és az ott élő több tucat csirke és kacska érintkezett a szigeten jelen lévő vadmadarakkal, például sirályokkal és halfarkasokkal. Ezek aztán továbbadhatták a vírust a királypingvin kolóniának (Gauthier-Clerc, 2002).

A közvetlen antropogén hatásokhoz társulhat a vírusok vadvilágon keresztüli terjedése. Mivel azon madarak, amelyek osztoznak életterükön a pingvinekkel (például a délsarki és barna halfarkasok, a déli óriáshójsza vagy egyes kormorán fajok) időnként hajókon találhatnak táplálékot, az ily módon újonnan szerzett vírusaikat könnyen átadhatják a pingvineknek (Gauthier-Clerc, 2002; Uhart és mtsai, 2020; Gallo és mtsai, 2013). Továbbá maguk a pingvin fajok is terjeszthetik egymás között a kórokozókat, lévén hogy a költési időszakon kívül idejük nagy részét vízben töltik és nagy távolságokra is elvándorolnak, a különböző fajok érintkeznek

egymással, így még a legtávolabbi antarktisi populációk sincsenek teljesen izolálva (Morgan és mtsai, 1981; Gauthier-Clerc és mtsai, 2002).

További lehetséges fertőzésforrást jelenthetnek a pingvinek ektoparazitái. Flavivírusok elleni ellenanyagokat számos fajból, például kék-, royal-, király- és sziklaugró pingvinekből is kimutattak (Morgan és mtsai, 1981; Morgan és mtsai, 1985). A fertőzés forrása valószínűleg az *Ixodes uriae* kullancs faj lehetett, amelyből izolálták a vírust, és amelynek elsődleges gazdaszervezetei a pingvinek (Murray és Vestjens, 1967).

Nagy jelentősége van továbbá az állatkerteknek, rehabilitációs központoknak is. Egyrésről megvan a veszélye, hogy a pingvinek itt addig számukra ismeretlen vírusokkal fertőződnek és azokat a természetes élőhelyükre való visszaengedésük után vadon élő társaik közt elterjesztik (Parsons és mtsai, 2015). Másrészt viszont ilyen folyamatos megfigyelés alatt álló egyedekben sokkal könnyebb detektálni egy esetleges fertőzés tüneteit és megkezdeni az okok felderítését. A spheniscid-alfaherpeszvírus 1 vírust például pápaszem és Humboldt-pingvinekből izolálták két németországi állatkertben (Pfaff és mtsai, 2017). Mivel mindkét esetben az ún. pingvin diftéria-szerű betegség tünetei jelentkeztek, így ezen tünetek vadon élő pingvinekben való mutatkozása esetén már lehet gyanakodni, nem ez a vírus áll-e a betegség hátterében. Hasonló tüneteket észleltek már például vadon élő sárgaszemű pingvinekben is (Alley és mtsai, 2017).

Míg egyes vírusok komoly tünetekkel jelentkeznek és akár jelentős mortalitáshoz is vezethetnek (általában fiókák esetében) (Niemeyer és mtsai, 2013; Alley és mtsai, 2017; Neimeyer és mtsai, 2017; Pfaff és mtsai, 2017; Molini és mtsai, 2020) addig néhány vírus jelenléte általánosnak és veszélytelennek tűnik a pingvinek szervezetében. Az egyik ilyen legjobban dokumentált vírus a madár-avulavírus, melynek számos szerotípusát kimutatták különböző pingvin fajokból, eltérő földrajzi területeken, általában tünetmentesen (Morgan és Westbury, 1981; Morgan és mtsai, 1981; Morgan és mtsai, 1985; Austin és Webster, 1993; Karesh és mtsai, 1999; Travis és mtsai, 2006; Miller és mtsai, 2010; Uhart és mtsai, 2020). A Newcastle-betegséget okozó vírust is kimutatták már több fajból, ám úgy tűnik, széles körben nincs elterjedve a pingvinek között (Morgan és Westbury, 1981).

1.3.3. A pingvinek adeno- és circovírusai

A pingvinekből eddig egy adenovírus és egy circovírus fajt írtak le.

A *Penguin siadenovirus* A faj első típusát állsziás pingvinben fedezték fel, de kimutatták Adélie és számárpingvinben is. Érdekessége, hogy habár a *Siadenovirus* nemzetségbe

sorolható, genomjában nem található meg a nemzetség nevét adó szialidáz gén. Legközelebbi rokonságban a pulyka-adenovírus 3 típussal áll, és feltételezhetően apatogén vírus. (Lee és mtsai, 2014; Lee és mtsai, 2016)

A pingvin-circovírust egy olyan Adélie pingvin egyedben fedezték fel, melyen tollhullatás volt megfigyelhető (3. ábra). Ilyen rendellenességet eddig 4 pingvinfajról jelentettek (császárs-, pápaszemes-, magellán- és Adélie pingvinekről (Kane és mtsai, 2010; Barbosa és mtsai, 2015; Morandini és mtsai, 2019)), ám mivel a továbbiakban ezt a circovírust tüneteket nem mutató egyedekből mutatták ki, így szerepe a betegségben nem igazolt. A pingvin-circovírus a sirály-circovírussal áll legközelebbi rokonságban, eddig Adélie és állszíjas pingvinekben mutatták ki (Morandini és mtsai, 2019; Levy és mtsai, 2020b). A közelmúltban továbbá négy pingvinfajt vizsgálva (király-, Adélie-, állszíjas- és számárpingvineket) kimutattak számos olyan, a tudomány számára eddig ismeretlen szimplaszálú DNS vírust, melyek a *Cressdnaviricota* törzsbe sorolhatók, de nem osztályozhatók egyik jelenleg elfogadott víruscsaládba sem (Levy és mtsai, 2020a).



3. ábra: Példa egy tollhullatást mutató Adélie pingvin fiókáról (Forrás: Morandini és mtsai, 2019)

1.4. Célkitűzések

Szakdolgozatom során célul tűztem ki a pingvin-eredetű mintákban esetlegesen fellelhető adeno- és CRESS-DNS vírusok vizsgálatát. Fókuszáltam a pingvinek és vírusaik koevolúciójának tanulmányozására. Cél volt továbbá a vírusok diverzitásának vizsgálata, rokonsági kapcsolataik felderítése. Valamint, mivel számos bélsár mintával dolgoztunk, volt esély táplálék-eredetű vírusok kimutatására is, amivel nemcsak a pingvinek, de a környezetükben lévő, számukra táplálékkul szolgáló állatok vírusainak vizsgálata is lehetséges.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A minták származása

Az általam vizsgált összesen 24 db minta három pingvinfajtól (Spheniscidae család) származott és magában foglalt 20 db bélsár- és 4 db szerv (máj, vese) eredetű mintát. Közülük 23 különböző állatkertektől származott, egyet pedig egy pingvinrezervátum bocsátott rendelkezésemre. A mintagyűjtést legtöbb esetben az állatkertek munkatársai végezték, majd postai úton juttatták el számomra, illetve egy esetben témavezetőm és én személyesen boncoltuk és mintáztuk az állatokat. A minták négy különböző országból (Chile, Németország, Magyarország, Egyesült Királyság) származtak. A minták eredetét az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Vizsgált mintáink származása és mennyisége

Faj	Ország, település, állatkert	db	Minta	Azonosító
királypingvin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	Chile, Tűzföld, Global Penguin Society	1	máj	LPV004
pápaszemes pingvin (<i>Spheniscus demersus</i>)	Németország, Hannover, Erlebnis Zoo Hannover	1	bélsár	SZ0
	Magyarország, Debrecen, Nagyerdei Kultúrpark	15	bélsár	SZ1-SZ15
	Magyarország, Budapest, Fővárosi Állat- és Növénykert	3	máj, vese	SZ16-SZ18
Humboldt-pingvin (<i>Spheniscus humboldti</i>)	Egyesült Királyság, Winchester, Marwell Zoo	4	bélsár	SZ19-SZ22

2.2. DNS kivonása a mintákból

A bélsár eredetű mintákból a DNS kivonását a NucleoSpin DNA Stool kit (Macherey-Nagel) segítségével, a szerv eredetű mintákból a NucleoSpin RapidLyse kit (Macherey-Nagel) segítségével végeztem a gyártó utasításai szerint. Hogy ki tudjam mutatni az esetleges kivonás közben történő kontaminációt vagy a kivonó kitek kontamináltságát, minden esetben készítettem egy ún. feltárási negatív kontrollt, melyhez mintát nem adtam, de a protokollt

elvégeztem vele. Az 1 db *Aptenodytes patagonicus* májminta esetében már kivont DNS állt rendelkezésemre. A kivont DNS-t a PCR vizsgálatok elvégzéséig -20 °C-on tároltam.

2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

Mind a CRESS-DNS, mind az adenovírusok kimutatása két-körös PCR módszerrel történt. A CRESS-DNS vírusok esetében a replikációért felelős (Rep) gént, míg adenovírusok esetében a DNS-polimeráz gén egy szakaszát kíséreltem meg felerősíteni. Előbbi esetben a Li és munkatársai által 2010-ben, míg utóbbi esetben a Wellehan és munkatársai által 2004-ben leírt PCR-t alkalmaztam. Pozitív kontrollként kacsacircovírus, illetve szarvasmarhamastadenovírus (BAdV-1) eredetű DNS-t használtam. A reakciókhoz DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mixet alkalmaztam. Az egyes reakciók végtérfogata 25 µl volt. A PCR-termékeket ezután +4 °C-on tároltam. A PCR-reakcióelegyek összetétele a 2. táblázatban, a programok protokollja a 3. táblázatban, végül a primerszekvenciák a 4. táblázatban láthatók.

2. táblázat: A CRESS-DNS és adenovírusok kimutatására irányuló PCR reakciók összetétele

	Első és második kör
Milli-Q víz	10,5 µl
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix	12,5 µl
Forward primer (50 µM)	0,5 µl
Reverse primer (50 µM)	0,5 µl
DNS	1 µl
Végtérfogat	25 µl

3. táblázat: A PCR reakciók idő- és hőmérséklet-protokollja

CRESS-DNS vírusok						Adenovírusok		
Első kör			Második kör			Első és második kör		
Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)		Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)		Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	
95	5		95	5		95	5	
95	1	Ismétlés 40x	95	1	Ismétlés 40x	94	0,5	Ismétlés 45x
52	1		56	1		46	1	
72	1		72	1		72	1	
72	10		72	10		72	3	

4. táblázat: A PCR vizsgálatok során használt primerek szekvenciái. A többféle nukleotidot tartalmazó pozíciók, illetve különleges nukleotidok jelölései: I = inozit, N = G/A/T/C, M = A/C, R = A/G, W = A/T, S = C/G, Y = C/T, H = A/C/T, D = A/G/T, B = C/G/T.

Vírus		Primerszekvenciák
CRESS-DNS vírusok	első kör	CV-F1 5'-GGIAYICCICAYYTICARGG-3'
		CV-R1 5'-AWCCAICCRTARAARTCRTC-3'
	második kör	CV-F2 5'-GGIAYICCI CAYYTICARGGITT-3'
		CV-R2 5'-TGYTGYTCRTAICCRTCCCACCA-3'
Adenovírusok	első kör	poloutfo 5'-TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC-3'
		poloutre 5'-GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT-3'
	második kör	polinnfo 5'-GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC-3'
		polinnre 5'-CCANCCBCDRTTTRTGNARNGTRA-3'

2.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR vizsgálatok pozitivitásának ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt a keletkezett PCR-termékek mérete alapján. Ehhez GelRed (Biotium) festéket tartalmazó (4 µl/100 ml) 1,5 %-os agaróz gélét használtam. A mintákból, illetve pozitív és negatív kontrollokból 5 µl-t, molekulatömeg markerből (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) 2 µl-t vittem fel a gélre. A futtatás 0,5x TAE (trisz-(hidroximetil)-amino-metán, ecetsav, etilén-diamin-tetraecetsav) pufferben zajlott 90 V feszültségen 15-30 percig.

2.5. PCR-termékek tisztítása szekvenáláshoz

A gélelektroforézis eredménye alapján pozitívnak ítélt minták PCR-termékeit szekvenáláshoz tisztítottam. Amennyiben csak specifikus termék keletkezett, azt a reakcióelegyből tisztítottam ExoProStar 1-Step (Cytiva) kit alkalmazásával. Amennyiben nem-specifikus termékek is keletkeztek, úgy a megfelelő méretűt elektroforézis után gélből tisztítottam NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) segítségével.

2.6. DNS-szekvenálás

A tisztított PCR-termékek szekvenciáját mindkét szálon meghatároztam BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit használatával. A szekvenáló primerek a PCR reakciók során használt belső körös primerek voltak, 5 µM hígításban. A reakciót 200 µl-es Eppendorf csövekben végeztem. Ezt követően a szekvenálási reakciókat alkoholosan precipitáltam. A kicsapás a következőképpen történt: 40 µl kicsapó mixet mértem minden tisztított termékre, majd a

csöveket keverés után 15 percig letakarva szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután 2100 xg gyorsulással 45 percig centrifugáltam szobahőmérsékleten, majd eltávolítottam róluk a felülúszót. Ezt követően az egyes termékekre 70 µl 70%-os etanolt mértem, majd ismét 2100 xg gyorsulással 15 percig centrifugáltam a csöveket szobahőmérsékleten. A felülúszó újbóli eltávolítása után a csöveket nyitva hagyva 10 percig sötétben szobahőmérsékleten szárítottam. A kapilláris gélelektroforézist a Szegedi Biológiai Kutatóközpont szolgáltatólaborjában végezték el. A szekvenálási reakció összetételét, illetve idő- és hőmérsékletparamétereit az 5. és 6. táblázat, a kicsapó mix összetételét a 7. táblázat mutatja.

5. táblázat: A szekvenálási reakció összetétele

Milli-Q víz	1 µl
BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	1 µl
Primer (5 µM)	1 µl
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
Minta	1 µl
Végtérfogat	5 µl

6. táblázat: A szekvenálási reakció idő- és hőmérsékletprotokollja

Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	
96	60	
96	10	Ismétlés 35x
50	5	
60	240	

7. táblázat: A kicsapó mix összetétele

3M Na-acetát (pH 4,6)	1,5 µl
96%-os etanol	31 µl
Milli-Q víz	7,5 µl
Végtérfogat	40 µl

2.7. Molekuláris klónozás

Azon minták esetében, amelyeknél az eredményül kapott szekvenciák keveréknek tűntek, ezeket molekuláris klónozással különítettem el egymástól. A PCR-termékeket plazmid vektorba ligáltam a Clone JET PCR Cloning Kit használatával, majd a plazmidokat One Shot TOP10 Chemically Component *Escherichia coli* baktériumokba transzformáltam. A ligálást szobahőmérsékleten végeztem el, 1 µl PCR-termék felhasználásával a gyártó utasításai szerint. Ezt követően hűtött pipettaheggyel 2 µl ligátumot adtam 25 µl baktériumhoz. Jégen való 30 perces inkubálást követően 90 másodpercre 42 °C-os vízfürdőbe, majd újból 1-2 percre jégre helyeztem a transzformátumot. Ezután hozzáadtam 250 µl SOC tápfolyadékot, majd 45 percig 37 °C-on inkubáltam a transzformátumot folyamatos rázatás közben. Mivel a plazmidok ampicillin-rezisztencia gént tartalmaztak, ezért a transzformátumokat ampicillines táptalajra oltottam. Ennek előállításához 50 µl 50 mg/ml koncentrációjú ampicillin oldatot szélesztettem egyenletesen petricsészében lévő LB agarra. A transzformátumokból 20 és 200 µl-t szélesztettem az így előkészített táptalajra, majd ezeket 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltam. A szilárd táptalajon nőtt telepekből 5-5 darabot átoltottam ampicillines (100 µg/ml) folyékony LB tápfolyadékba, majd ezeket ismét 37 °C-on egy éjszakát inkubáltam.

A plazmid DNS kinyerését miniprep eljárással végeztem a NucleoSpin Plasmid Mini kit (Macherey-Nagel) segítségével, majd a kinyert DNS-t szekvenáltam. A szekvenálási reakció összetételét a 8. táblázat mutatja. Az alkoholos kicsapás a 2.6. fejezetben leírt módon zajlott.

8. táblázat: A szekvenálási reakció összetétele plazmidok esetében

Milli-Q víz	1,5 µl
BigDye Terminator v1.1 &v3.1 5X Sequencing Buffer	1 µl
pJET 1.2 Forward primer (10 µM)	0,5 µl
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
Minta	1 µl
Végtérfogat	5 µl

2.8. Bioinformatikai elemzések és filogenetikai számítások

A szekvenálási kromatogramokat elektronikus formában továbbították számomra, ezek megtekintésére a BioEdit programot használtam. Az NCBI BLASTx szolgáltatásának segítségével hasonlítottam össze őket a GenBankban megtalálható szekvenciákkal és

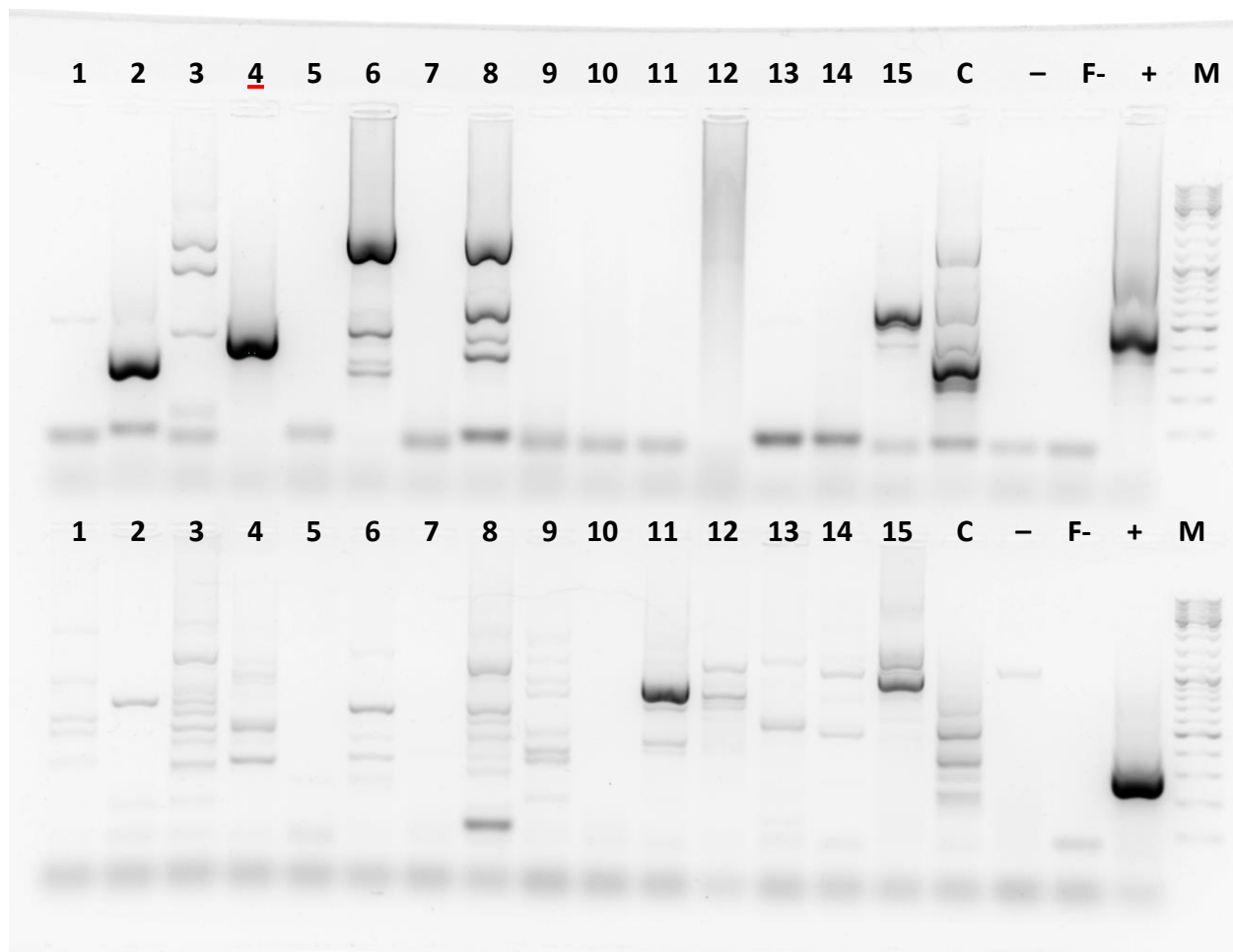
megvizsgáltam, melyekkel mutatják a legnagyobb azonosságot (Altschul és mtsai, 1997). A Geneious segítségével eltávolítottam a primereket és nem megfelelően leolvasható szekvenci részeket, illesztettem a kétoldalról leolvasott szekvenciákat, és konszenzust, majd aminosav-szekvenciát származtattam a nukleotidszekvenciákból a megfelelő leolvasási keretben. Többszörös illesztést készítettem a MAFFT szoftver segítségével (Katoh & Standley, 2013), referencia szekvenciaként a GenBankban elérhető CRESS-DNS vírus szekvenciákat használtam úgy, hogy lefedjem a *Cressdnaviricota* törzs *Arfiviricetes* osztályának minden jelenleg elfogadott vagy javasolt kládját (Kazlauskas és mtsai, 2018). A magas pontozású BLASTx találatokat is szerepeltettük az elemzésben, és két, pingvinekből kimutatott CRESS-DNS vírust is (Levy és mtsai, 2020). A törzsfarekonstrukciót a RAxML szoftverrel végeztem (Kozlov és mtsai, 2019). A megfelelő evolúciós modell kiválasztásához a MEGA X programot használtam (Kumar és mtsai, 2018).

3. EREDMÉNYEK

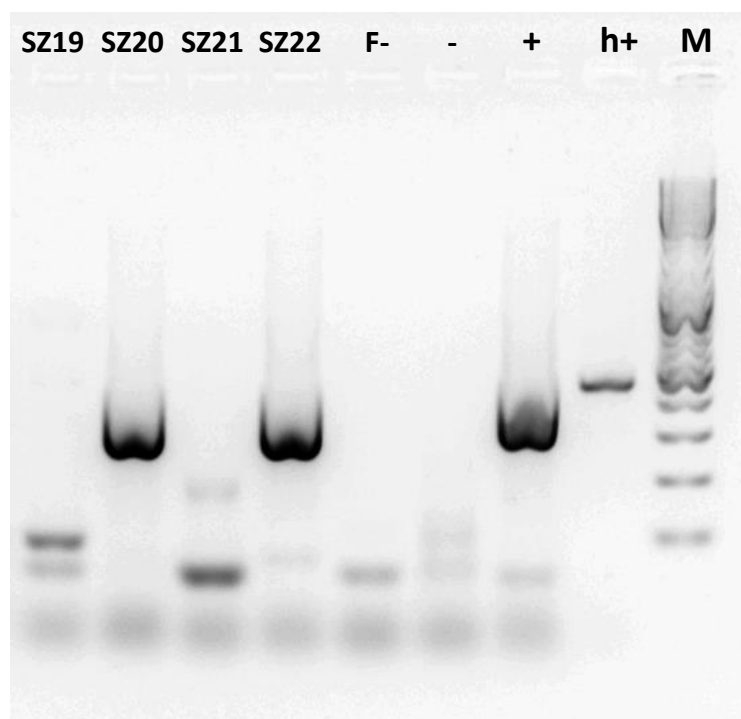
3.1. A PCR tesztek eredményei gélelektroforézis alapján

A gélelektroforézis alapján az adenovírusokra tesztelt 23 db minta mindegyike egyértelműen negatívnak bizonyult. A CRESS-DNS vírusokra tesztelt 24 db minta esetében 15 egyértelműen negatív és 9 pozitívnak látszó eredményt kaptam (pl. ld. 5. ábra).

4. ábra: A CRESS-DNS vírusra pozitív SZ4-es minta (aláhúzva) gélfotója. 1-15: minták (SZ1-15), -: PCR negatív kontroll, F-: feltárási negatív kontroll, +: pozitív kontroll, M: molekulatömeg marker, C: Chalupa Réka egyéb mintája. A felső sorban CRESS-DNS-, az alsó sorban adenovírus PCR reakciók elektroforetogramja látható.



5. ábra: Egy fals pozitív CRESS-DNS vírus PCR reakció gélfotója. SZ19–22: minták, F-: feltárási negatív kontroll, -: PCR negatív kontroll, +: PCR pozitív kontroll, h+: hígított pozitív kontroll, M: molekulatömeg marker



3.2. A szekvenálás eredményei

Mivel a PCR reakciók során előfordulhat nem-specifikus genomrészek felerősödése, így a szekvenálás után az általam kapott szekvenciákat összehasonlítottam a GenBankban megtalálható szekvenciákkal. Ennek eredményeképp a 9 pozitívnak ítélt mintából 8 mintáról megállapítottam, hogy nem-specifikus PCR-terméket tartalmazott (pl. bakteriális vagy pingvingenom-eredetűt). Egy esetben kaptunk valós pozitív eredményt. Az SZ4 jelzésű mintából, amely egy, a debreceni Nagyerdei Kultúrparkból származó pápaszemes pingvin bélsárminta volt, egy CRESS-DNS vírust mutattam ki. A kapott szekvencia jó minőségű volt, így alkalmazni tudtam törzsfarekonstrukciós elemzésben. A szűrővizsgálat eredményét a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat: A szűrővizsgálatok eredményeinek összefoglalása

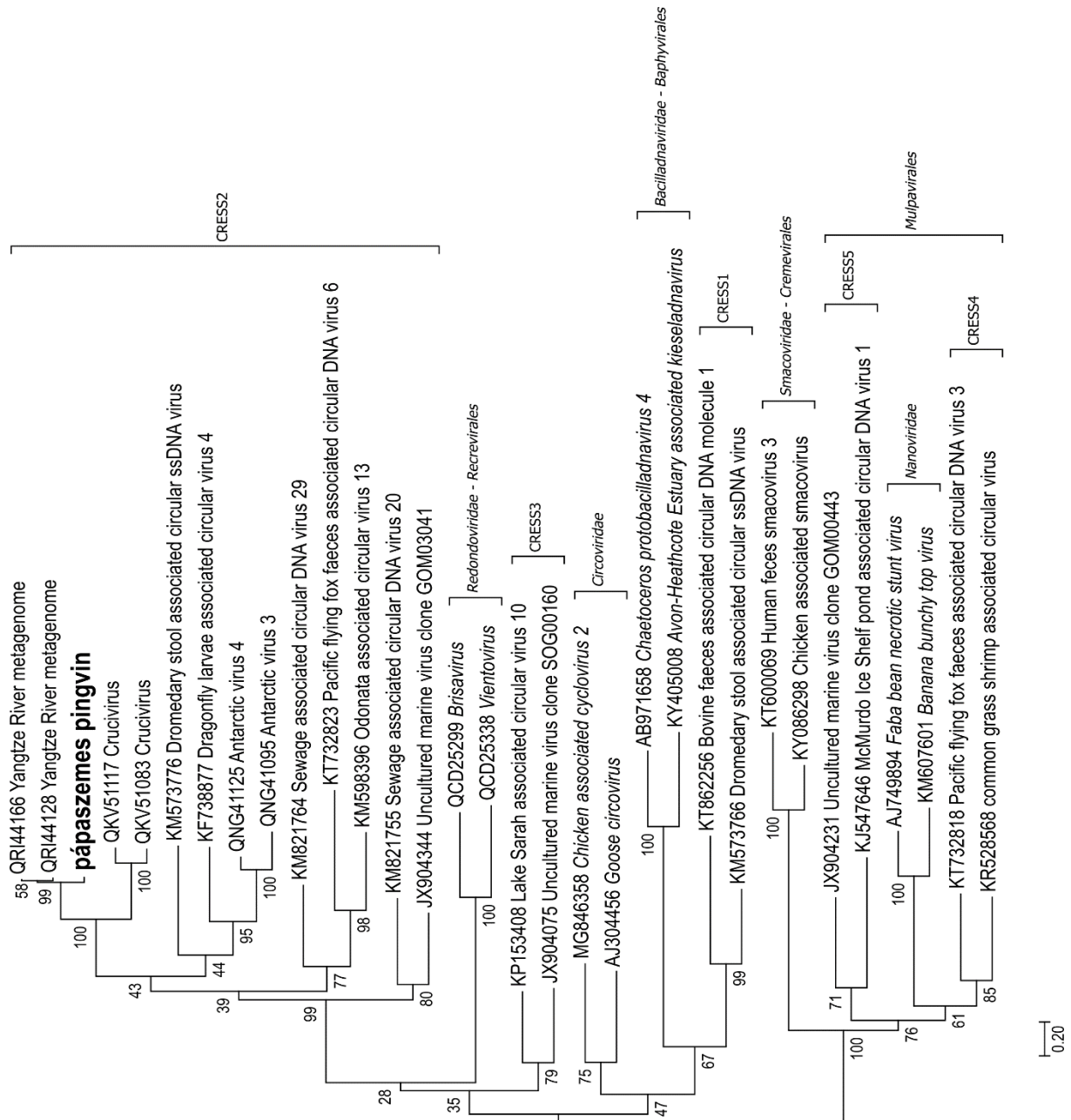
Faj	Ország, település, állatkert	Azonosító	Adenovírus	CRESS-DNS vírus
királypingvin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	Chile, Tüzföld, Global Penguin Society	LPV004	-	fals pozitív
pápaszemes pingvin (<i>Spheniscus demersus</i>)	Németország, Hannover, Erlebnis Zoo Hannover	SZ0	negatív	fals pozitív
	Magyarország, Debrecen, Nagyerdő Kultúrpark	SZ1	negatív	negatív
		SZ2	negatív	fals pozitív
		SZ3	negatív	negatív
		SZ4	negatív	pozitív
		SZ5	negatív	negatív
		SZ6	negatív	negatív
		SZ7	negatív	negatív
		SZ8	negatív	negatív
		SZ9	negatív	negatív
		SZ10	negatív	negatív
		SZ11	negatív	negatív
		SZ12	negatív	negatív
		SZ13	negatív	negatív
		SZ14	negatív	negatív
		SZ15	negatív	negatív
	Magyarország, Budapest, Fővárosi Állat- és Növénykert	SZ16	negatív	fals pozitív
		SZ17	negatív	fals pozitív
		SZ18	negatív	fals pozitív
Humboldt-pingvin (<i>Spheniscus humboldti</i>)	Egyesült Királyság, Winchester, Marwell Zoo	SZ19	negatív	negatív
		SZ20	negatív	fals pozitív
		SZ21	negatív	negatív
		SZ22	negatív	fals pozitív

3.3. A filogenetikai elemzés eredménye

Az NCBI BLASTx eredménye alapján az általam talált pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírus Rep génje a származtatott aminosav-szekvencia szintjén 95% szekvenciaazonosságot mutatott két, környezeti mintából származó CRESS-DNS vírus homológ génjével. A találati lista következő három eleme crucivírus volt, ezekkel 43,84-52,71% volt a szekvenciaazonosság.

A törzsfarekonstrukciós elemzés eredménye alapján az általam talált vírus a CRESS-DNS vírusok *Arfiviricetes* osztályának CRESS2 víruskládjába sorolódik (4. ábra).

4. ábra: Az Arfiviricetes osztály (*Cressdnaviricota* törzs) filogenetikáját bemutató törzsfá
A *Rep* gén származtatott aminosav-szekvenciája alapján rekonstruált törzsfá, amely bemutatja az Arfiviricetes osztály már elfogadott, illetve hivatalosan még el nem fogadott kládjait is. A törzsfát a középpontján gyökereztettem, a pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírusát kiemelttem. A referencia-vírustörzseket génbanki azonosítójuk, valamint faj (dőlt betűvel) vagy törzsnevük képviseli.



4. DISZKUSSZIÓ

4.1. A pozitív minták száma

Kutatásom során az adenovírusokra tesztelt 23 db mintánk 0%-a, a CRESS-DNS vírusokra tesztelt 24 db minta 4,2%-a hozott pozitív eredményt. Utóbbi esetben a szervminták 0%-a, míg a bélsárminták 5%-a volt pozitív. Az vizsgált bélsárminták jó fizikai kondícióban lévő, egészséges, kifejlett egyedektől származtak, a szervminták esetében az elhullás nem volt összefüggésbe hozható vírusos fertőzéssel. Korábbi tanulmányokban pingvinek adenovírusokra való PCR tesztelése esetében az egyedek 28,2%-a, illetve 80%-a mutatott pozitivitást, bár ezen tanulmányok egyike sem az általunk vizsgált fajokra irányult, illetve eltérő primereket alkalmaztak, és kizárólag szervmintákkal dolgoztak (Lee és mtsai, 2014; Lee és mtsai, 2016). Ugyanakkor az alkalmazott primerek specifitása nem okozhatott gondot, hisz az alkalmazott módszer minden ismert adenovírust kimutat (Kaján, 2016).

CRESS-DNS vírusokra való PCR tesztelés esetében korábbi tanulmányokban 12%, illetve 2,7% pozitivitás volt megfigyelhető, szintén az általunk vizsgáltaktól eltérő fajokban, eltérő primerek használatával, illetve kloáka tamponminták szűrésével (Morandini és mtsai, 2019; Levy és mtsai, 2020a). A kutatásom során alkalmazott CRESS-DNS vírusokat kimutató primerek segítségével Kapitány Szilvia szakdolgozati munkája keretein belül denevér eredetű minták szűrésekor bélsárminták esetén 12,84%-os, szervminták esetén pedig 9,38%-os pozitivitást tapasztalt (Kapitány, 2017). Immunszupresszált állapotban lévő, esetleg hosszabb ideje tartó betegeskedésben elhullott állatokból feltehetőleg nagyobb valószínűséggel lehetett volna sikeresen vírusokat kimutatni. Pingvinek esetében ráadásul számos tanulmány rávilágít, hogy a fiókák sokkal érzékenyebbek a vírusos fertőzésekre, mint a kifejlett egyedek. A pozitív minták alacsony száma valószínűleg ezen tényezők együttesének volt köszönhető.

4.2. A fals pozitív minták száma

Mintáim adenovírusokra való PCR tesztelése során nem adódott fals pozitív eredmény. A CRESS-DNS vírusokra való tesztelés esetében azonban a vizsgált minták 33,3%-ánál nem-specifikus DNS szakasz erősödött fel a PCR során, a keletkezett PCR-termékek mérete pedig megegyezett a várt termékével, így fals pozitív eredmény született. A bélsárminták között 20%, míg a szervminták között 100% volt a fals pozitív eredmények aránya. Ezen esetekben vagy bakteriális vagy pingvingenom-eredetű DNS szakaszok erősödtek fel.

A vizsgálat során mindkét PCR módszer esetében alacsony annealing hőmérsékletet (3. táblázat), valamint degenerált primereket (4. táblázat) alkalmaztam. Utóbbi jelentése, hogy az egyes primerek több, egymáshoz hasonló, de szekvenciájukban eltérő keverékként vannak jelen. Attól függően, hogy hány nukleotid pozícióban, milyen mértékű variabilitás figyelhető meg, kifejezhető a degeneráltság mértékét. A CRESS-DNS vírusok detektálására szolgáló négy primer degeneráltsága 8-, 16-, 16-, illetve 32-szeres. Mind az alacsony annealing hőmérséklet, mind a degenerált primerek növelik a primerek nem-specifikus kötődésének, azaz a fals pozitívnak az esélyét. Ez nehézségeket okozhat, viszont ezen PCR módszerek széles körű detektálási spektruma mégis nagy előnyt jelent a vizsgálatok során. Az adenovírusok detektálására használt primerek alkalmasak például a tudomány számára új vírusok detektálására. Segítségükkel kimutattak már mast- (Lange és mtsai, 2019), avi- (Ivanics és mtsai, 2010), at- (Ball és mtsai, 2012), si- (Rivera és mtsai, 2009), valamint testadenovírusokat (Salzmann és mtsai, 2021) is. A CRESS-DNS vírusokra irányuló primerek célspektruma az eredeti tanulmányban nem teljesen tisztázott, a circovírusokon túl egyéb CRESS-DNS vírusok kimutatására is alkalmasak (Li és mtsai, 2010). A széles detektálási spektrum következtében megnövekedett fals pozitívnak viszont még inkább hangsúlyossá teszi a szekvenálás jelentőségét, hiszen csak ennek segítségével tehető egyértelművé, melyek a specifikus termékek, azaz a valóban vírust tartalmazó minták.

4.3. A pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírusának rendszertani beosztása és feltételezett evolúciója

A pápaszemes pingvinből kimutatott CRESS-DNS vírus a CRESS-DNS vírusok *Arfiviricetes* osztályának egy nemrégiben létrehozott víruskládjába sorolódott. Ezt a kládot ideiglenesen CRESS2 kládnak nevezték el, se rendszertani szintje nem eldöntött még, se a gazdafajok körét nem sikerült körülhatárolni (Kazlauskas és mtsai, 2018). Tagjait gyakran környezeti mintákból mutatják ki. Ilyen eredetűek a pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírussal legmagasabb szekvenciaazonosságot mutató vírustörzsek is: a két legközelebbi rokonságban álló vírustörzset a Jangce-folyó vizéből mutatták ki (Lu és mtsai, 2020), míg a kevésbé hasonló crucivírusokat franciaországi tavakból (de la Higuera és mtsai, 2020). [A crucivírusok a CRESS-DNS vírusok közé tartozó kiméra vírusok: replikációs fehérjéjük a CRESS-DNS vírusokra jellemző, míg kapszid fehérjéjük feltehetően horizontális géntranszfer eredménye egy RNS-vírustól a *Tombusviridae* családból (Diemer és Stedman, 2012.; de la Higuera és mtsai, 2020).]

De a vizsgált vírustörzs filogenetikai közelségében megtalálható két pingvinből származó törzs is, melyet leírói óvatosan csak Antarctic virus 3, illetve 4 néven illettek. Az egyik királypingvin, a másik állsziyas pingvin kloákatamponjából került kimutatásra, de mutattak ki hasonló vírust Adélie- és számpingvinekből is. Az állatokat az Antarktiszon és ahhoz közeli szigeteken, természetes élőhelyükön mintázták (Levy és mtsai, 2020b). A pápaszemes pingvinből kimutatott CRESS-DNS vírus eredetének vizsgálatakor ezért könnyen felmerülhet a hipotézis, hogy a CRESS-DNS vírusok ezen kis ága, hosszabb ideje együtt fejlődhet a pingvinekkel mint gazdafajokkal. Ezt erősítheti meg, hogy a pápaszemes pingvinek és a fent említett négy antarktiszi faj földrajzi lokalizációja igen eltérő, az általunk vizsgált minta ráadásul egy magyar állatkertből származik, ami a természetes élőhelyektől még távolabb esik. Ezen öt fajból kimutatott vírus filogenetikailag közeli egymáshoz. Ehhez társul a tény, hogy a vírusokat jó fizikai kondícióban lévő kifejlett egyedekből mutatták ki, amelyek betegség tüneteit nem mutatták. A CRESS-DNS vírusok eltérő pingvin fajokban való jelenléte, a nagy földrajzi távolság és a valószínűsíthető apatogenitás az evolúciós fejlődés régóta tartó összefonódására utal a pingvinek és az újonnan felfedezett CRESS-DNS vírusklád között (Kaján és mtsai, 2020). Eredményem, az első kimutatott pápaszemes pingvin CRESS-DNS vírus, megerősíti ezt a feltételezést.

Ugyanakkor a CRESS-DNS vírusok talán legjobban ismert és jellemzett nemzetsége az *Arfiviricetes* osztály, *Cirlivirales* rendjének, *Circoviridae* családjába tartozó *Circovirus* nemzetség, melybe jelentős számban osztályoznak madár-circovírusokat (pl. kanári-, kacsa-, galamb-circovírus stb.), és ezeket a vírusokat épp a közelmúltban írták le pingvinekből is (Morandini és mtsai, 2019; Levy és mtsai, 2020a). A biztosan ismert gazdafajok nagy száma egyértelművé teszi, hogy a CRESS-DNS vírusok ezen vonala hosszabb ideje együtt fejlődik a madarakkal, hisz circovírus sok emlősből, sőt halból is kimutatható (Breitbart és mtsai, 2017).

Persze nem zárható ki, hogy a CRESS-DNS vírusok két leszármazási vonala is együtt fejlődött volna a pingvinekkel. A *Cressdnaviricota* törzs hatalmas varianciája és széles gazdaspektruma lehetővé tenné, hogy egy gazdaváltás után a pingvinekkel akár két vírusvonal is együtt fejlődjön. De ha megvizsgáljuk a pingvinek egymáshoz hasonló táplálkozását és vízhez közeli életterét, valamint, hogy a CRESS2 vírusokat sokszor vagy (pingvinektől független) vizes élőterek metagenomikai vizsgálatából vagy vízhez köthető ízeltlábúakból mutatják ki (Dayaram és mtsai, 2015; Kraberger és mtsai, 2015; Bistolas és mtsai, 2017), könnyen elbizonytalanodunk elméletünk helyességében. Persze a vizes életteréhez kapcsolt gazdát se

vehetjük biztosra a CRESS2 klád esetében, különösen hogy az Egyesült Arab Emírátsokban élő egypúpú teve bélsarából is kimutatásra került már ilyen vírus (Woo és mtsai, 2014).

A vírus pontos gazdafaja tehát további vizsgálatokat igényel, azonban a befoglaló klád feltételezhetően egy új rendet vagy családot fog képviselni az *Arfiviricetes* osztályon belül.

4.4. Példa pingvinek és egyéb vírusok koevolúciójára

Vírusok és gazdaszervezeteik közötti koevolúció számos esetben megfigyelhető, ez alól a pingvinek és vírusaik sem képeznek kivételt. Ezen madarak esetében egy igen átfogóan kutatott csoport a *Paramyxoviridae* családba tartozó paramyxovírusok csoportja. A madár avulavírust (más néven madár paramyxovírust) számos esetben kimutatták különböző pingvin fajokban. Szerológiai módszerekkel vizsgálva a hat pingvin nemzetségből ötben kimutatták különböző szerotípusait, általában tüneteket nem mutató egyedekből, ezen kívül royal-, király-, Adélie-, számár-, sziklaugró- és magellán pingvinekből több szerotípust sikeresen izoláltak is. A paramyxovírusok ilyen mértékű és ilyen széleskörű tünetmentes jelenléte pingvinekben utalhat a koevolúció jelenségére, valamint rávilágít, hogy ezen madarak kulcsfontosságú szerepet tölthetnek be a paramyxovírusok életciklusa és terjedése szempontjából. (Morgan és mtsai, 1981; Morgan és Westbury, 1981; Morgan és mtsai, 1985; Alexander és mtsai, 1989; Austin és Webster, 1993; Karesh és mtsai, 1999; Smith és mtsai, 2008; Miller és mtsai, 2010; Fornells és mtsai, 2012; Parsons és mtsai, 2016; Wille és mtsai, 2019; Uhart és mtsai, 2020; Wille és mtsai, 2020)

4.5. A vadvilág virológiai vizsgálatának jelentősége

Mivel számos tanulmány rámutat, hogy egészséges pingvinek vírusok széles skálájával lehetnek fertőzöttek, így ezen organizmusok minél átfogóbb ismerete hasznos lehet a vadon élő állatvilág védelme szempontjából. A vírusokkal szembeni ellenállóképesség és a vándorló életmód ideális rezervoárokká teszi a pingvineket, akik így jelentős szerepet játszhatnak esetleges patogének más madár fajoknak való átadásában (Wille és mtsai, 2019). A pingvinekkel összefüggésbe hozható CRESS-DNS vírusokról jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre, ám ismeretesek olyan megbetegedések más madár fajokban, amelyeket CRESS-DNS vírusok okoznak, például a papagájok csőr-toll szindrómája. Ennél fogva az általam pápaszemes pingvinből, illetve az egyéb pingvin fajokból kimutatott CRESS-DNS vírusok epizootológiai vizsgálata új potenciális patogének felfedezésének lehetőségét is magában hordozhatja. Ezen kívül olyan vírusok észlelése vadmadár populációkban, amelyek

potenciálisan a baromfiállományokban okoznak megbetegedéseket, felhívhatja a figyelmet arra, hogy az emberi behatásoknak minél körültekintőbbnek kell lenniük, hogy megakadályozzuk a vadmadárvírusok gazdasági károkozását. De szintén könnyen átadhatjuk házasított madaraink kórokozóit akár pingvineknek, akár más veszélyeztetett vadon élő fajoknak, amivel komoly károkat tehetünk az ökoszisztémában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Spheniscidae családba tartozó pingvinek a déli félteke különleges, röpképtelen vízi madarai. Különböző pingvin fajokból számos vírust mutattak már ki, ám ezek között igen kevés adeno- és CRESS-DNS vírus (circular replication associated protein-encoding single-stranded DNA virus; cirkuláris, replikációs fehérjét kódoló, szimplaszálú DNS vírus) található. Kutatásom célja a pingvinek saját, illetve esetlegesen táplálék eredetű adeno- és CRESS-DNS vírusainak kimutatása és filogenetikai jellemzése volt. Vizsgálni terveztem továbbá a pingvinek és vírusaik közötti koevolúciót, hogy kimutathatók-e olyan vírusvonalak, melyek evolúciós fejlődése hosszabb ideje összefonódott gazdaszervezeteikével. Kutatásom során összesen 24 db bélsár, illetve szerv eredetű mintát dolgoztam fel, melyek különböző állatkertekből, illetve egy chilei pingvinrezervátumból származtak. Az általam vizsgált három faj a király- (*Aptenodydes forsterii*), a pápaszemes (*Spheniscus demersus*), valamint a Humboldt-pingvin (*Spheniscus humboldtii*) volt. A vírusok detektálására mindkét esetben kétkörös PCR módszert alkalmaztam. A gélelektroforézist követően a pozitívnak ítélt PCR-termékek nukleotidsorrendjét meghatároztam. Ez alapján elsőnek mutattam ki pápaszemes pingvinből CRESS-DNS vírust, valamint nyolc fals pozitív (bakteriális vagy pingvingenom eredetű) minta is volt. A kimutatott vírustörzs a filogenetikai elemzések alapján a *Cressdnaviricota* törzs *Arfiviricetes* osztályába sorolható. Ezen belül a nemrégiben leírt, ideiglenesen CRESS2-nek elnevezett, rendszertani kategóriájában még bizonytalan víruskládba tartozik. A klád tagja több, szintén pingvin fajokból kimutatott CRESS-DNS vírus is. Ez a gazdadiverzitás, a kimutatások nagy földrajzi távolsága és a valószínűsíthető apatogenitás az evolúciós fejlődés régóta tartó összefonódására utal a Spheniscidae család és a CRESS2 vírusok egy ága között. Ám annak lehetőségét sem zárhatjuk ki, hogy a CRESS2 klád vírusainak esetleges vizes élőhelyekhez való kötődése miatt tudtuk kimutatni egy tagját pápaszemes pingvinből.

6. SUMMARY

Screening of penguin samples for adeno- and CRESS DNA viruses

Penguins (family Spheniscidae) are flightless seabirds, living in the Southern Hemisphere. Numerous different viruses were detected already in penguin species, but only a scarce number of adenoviruses or CRESS DNA viruses (circular replication-associated protein-encoding single-stranded DNA virus). The goal of the study was to evaluate the diversity of these viruses in penguins and their prey animals and to investigate the coevolution between certain viral lineages and their penguin hosts, that is, to detect viruses whose evolutionary development intertwined with their hosts' for a long time. Faecal and organ samples were obtained from different zoos and a penguin reserve in Chile. The 24 samples originated from three species: king (*Aptenodytes forsterii*), African (*Spheniscus demersus*) and Humboldt-penguin (*Spheniscus humboldtii*). Both virus clades were targeted using nested PCR systems. After gel electrophoreses, PCR products were sequenced. An African penguin CRESS DNA virus was detected for the first time, and further eight false positivities too, originating from bacterial or penguin genomes. According to the phylogenetic analysis, the detected virus is a member of the phylum *Cressdnaviricota*, class *Arfiviricetes*, and falls into a recently described viral clade. The clade was numbered as CRESS2 temporarily, and even its exact taxonomic level is uncertain yet. The clade encompasses several further penguin CRESS DNA viruses. This host diversity, the high geographic distances of the detections and the hypothesized apathogenicity might support the presumed coevolution of the family Spheniscidae and this lineage of the CRESS2 clade. However, we cannot rule out the possibility that we were able to detect a member of the CRESS2 clade in the African penguin because of the clade's possible connection to aquatic habitats.

7. IRODALOM

Alexander, D. J., Manvell, R. J., Collins, M. S., Brockman, S. J., Westbury, H. A., Morgan, I., & Austin, F. J., 1989: Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976–1979. *Archives of virology*, 109. 1. p. 135-143.

Alley, M. R., Suepaul, R. B., McKinlay, B., Young, M. J., Wang, J., Morgan, K., Hunter, S. A., & Gartrell, B. D., 2017: Diphtheritic stomatitis in Yellow-eyed penguins (*Megadyptes antipodes*) in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases*, 53. 1. p. 102-110.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25. 17. p. 3389–3402.

Austin, F. J., & Webster, R. G., 1993: Evidence of ortho-and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*, 29. 4. p. 568-571.

Ball, I., Stöhr, A. C., Abbas, M. D., & Marschang, R. E., 2012: Detection and Partial Characterization of an Atadenovirus in a Common Agama (*Agama agama*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 22. 1-2. p. 12-16.

Barbosa, A., Colominas-Ciuró, R., Coria, N., Centurión, M., Sandler, R., Negri, A., & Santos, M., 2015: First record of feather-loss disorder in Antarctic penguins. *Antarctic Science*, 27. 1. p. 69-70.

Bistolas, K. S. I., Jackson, E. W., Watkins, J. M., Rudstam, L. G., Hewson, I., 2017: Distribution of circular single-stranded DNA viruses associated with benthic amphipods of genus *Diporeia* in the Laurentian Great Lakes. *Freshwater Biology*, 62. 7. p. 1220– 1231.

Breitbart M., Delwart E., Rosario K., Segalés J., Varsani A., 2017: Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *J Gen Virol*. 98. 8. p. 1997-1998.

Dayaram A., Potter K. A., Pailles R., Marinov M., Rosenstein D. D., Varsani A., 2015: Identification of diverse circular single-stranded DNA viruses in adult dragonflies and damselflies (Insecta: Odonata) of Arizona and Oklahoma, USA. *Infection, Genetics and Evolution*, 30. p 278-287.

de la Higuera, I., Kasun, G. W., Torrance, E. L., Pratt, A. A., Maluenda, A., Colombet, J., Bisseux, M., Ravet, V., Dayaram, A., Stainton, D., Kraberger, S., Zawar-Reza, P., Goldstein, S., Briskie, J. V., White, R., Taylor, H., Gomez, C., Ainley, D. G., Harding, J. S., Fontenele, R.

S., Schreck, J., Ribeiro, S. G., Oswald, S. A., Arnold, J. M., Enault, F., Vaesani, a., & Stedman, K. M., 2020: Unveiling Crucivirus Diversity by Mining Metagenomic Data. *mBio*, 11. 5.

de Souza, W. M., Fumagalli, M. J., Martin, M. C., de Araujo, J., Orsi, M. A., Sanfilippo, L. F., Modha, S., Durigon, E. L., Proenca-Módena, J. L., Arns, C. W., Murcia, P. R., & Figueiredo, L. T. M., 2019: Pingu virus: A new picornavirus in penguins from Antarctica. *Virus evolution*, 5. 2.

Diemer, G. S., & Stedman, K. M., 2012: A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses. *Biology direct*, 7. 1. p. 1-14.

Fornells, L. A. M., Silva, T. F., Bianchi, I., Travassos, C. E., Liberal, M. H., Andrade, C. M., Petrucci, M. P., Veiga, V. F., & Couceiro, J. N. S., 2012: Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. *Veterinary microbiology*, 156. 3-4. p. 429-433.

Gallo, L., Quintana, F., & Uhart, M., 2013: Serosurvey for selected infectious agents in two sympatric species of cormorants (*Phalacrocorax atriceps* and *Phalacrocorax magellanicus*) from coastal Patagonia, Argentina. *Journal of wildlife diseases*, 49. 3. p. 492-500.

Gardner, H., Kerry, K., Riddle, M., Brouwer, S., & Gleeson, L., 1997: Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature*, 387. 6630. p. 245-245.

Gauthier-Clerc, M., Eterradossi, N., Toquin, D., Guittet, M., Kuntz, G., & Le Maho, Y., 2002: Serological survey of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*, in Crozet Archipelago for antibodies to infectious bursal disease, influenza A and Newcastle disease viruses. *Polar Biology*, 25. 4. p. 316-319.

Harrach, B., Benkő, M., 2021: Adenoviruses (*Adenoviridae*). In: Bamford, D. H., Zuckerman, M.: *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*. Academic Press. p. 3-16.

Harrach, B., Tarján, Z. L., & Benkő, M., 2019: Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS letters*, 593. 24. p. 3660-3673.

Hayer, J., Wille, M., Font, A., González-Aravena, M., Norder, H., & Malmberg, M., 2020: Four novel Picornaviruses viruses detected in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in Chile. *bioRxiv*.

- Hickcox, R. P., Jara, M., Deacon, L. A., Harvey, L. P., & Pincheira-Donoso, D., 2019: Global terrestrial distribution of penguins (Spheniscidae) and their conservation by protected areas. *Biodiversity and Conservation*, 28. 11. p. 2861-2876.
- Ivanics, É., Palya, V., Markos, B., Dán, Á., Ursu, K., Harrach, B., Kaján, Gy., & Glávits, R., 2010: Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58. 1. p. 47-58.
- Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z. L., Vidovszky, M. Z., & Papp, T., 2020: Virus–host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses. *Journal of molecular evolution*, 88. 1. p. 41-56.
- Kaján Gy., 2016: Poultry adenoviruses. in: Dongyou L. (ed.): *Molecular detection of animal viral pathogens*. Boca Raton (FL), Amerikai Egyesült Államok, CRC Press – Taylor and Francis Group. p. 735-746.
- Kane, O. J., Smith, J. R., Boersma, P. D., Parsons, N. J., Strauss, V., Garcia-Borboroglu, P., & Villanueva, C., 2010: Feather-loss disorder in African and Magellanic penguins. *Waterbirds*, 33. 3. p. 415-421.
- Kane, O. J., Uhart, M. M., Rago, V., Pereda, A. J., Smith, J. R., Van Buren, A., Clark, J. A., & Boersma, P. D., 2012: Avian pox in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of wildlife diseases*, 48. 3. p. 790-794.
- Kapitány, Sz., 2017: Denevér eredetű cirkovírusszerű vírusok diverzitása. Budapest
- Karesh, W. B., Uhart, M. M., Frere, E., Gandini, P., Braselton, W. E., Puche, H., & Cook, R. A., 1999: Health evaluation of free-ranging rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocomes*) in Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30. 1. p. 25-31.
- Katoh, K., Standley, D. M., 2013: MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30. 4. p. 772–780.
- Kazlauskas, D., Varsani, A., Krupovic, M., 2018: Pervasive chimerism in the replication-associated proteins of uncultured single-stranded DNA viruses. *Viruses*, 10. 4. p. 187.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., Stamatakis, A., 2019: RAxML-NG: A fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35. 21. p. 4453-4455.

- Kraberger S., Argüello-Astorga G. R., Greenfield L. G., Galilee C., Law D., Martin D. P., Varsani A., 2015: Characterisation of a diverse range of circular replication-associated protein encoding DNA viruses recovered from a sewage treatment oxidation pond. *Infection, Genetics and Evolution*, 31. p. 73-86.
- Krupovic, M., Varsani, A., Kazlauskas, D., Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Yutin, N., Wolf, J. I., Harrach, B., Zerbini, F. M., Dolja, V. V., Kuhn, J. H., & Koonin, E. V., 2020: Cressdnaviricota: a virus phylum unifying 7 families of Rep-encoding viruses with single-stranded, circular DNA genomes. *Journal of virology*.
- Ksepka, D. T., Bertelli, S., & Giannini, N. P., 2006: The phylogeny of the living and fossil Sphenisciformes (penguins). *Cladistics*, 22. 5. p. 412-441.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35. 6. p. 1547–1549.
- Lange, C. E., Niama, F. R., Cameron, K., Olson, S. H., Nina, R. A., Ondzie, A., Bounga, G., Smith, B. R., Pante, J., Reed, P., Tamufe, U., Laudisoit, A., Goldstein, T., MPassi, R. B., & Joly, D. O., 2019: First evidence of a new simian adenovirus clustering with Human mastadenovirus F viruses. *Virology journal*, 16. 1. p. 1-6.
- Lee, S. Y., Kim, J. H., Park, Y. M., Shin, O. S., Kim, H., Choi, H. G., & Song, J. W., 2014: A novel adenovirus in Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) in Antarctica. *Viruses*, 6. 5. p. 2052-2061.
- Lee, S. Y., Kim, J. H., Seo, T. K., No, J. S., Kim, H., Kim, W. Kim., 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. 6.
- Levy, H., Fiddaman, S. R., Djurhuus, A., Black, C. E., Kraberger, S., Smith, A. L., Hart, T., & Varsani, A., 2020a: Identification of Circovirus Genome in a Chinstrap Penguin (*Pygoscelis antarcticus*) and Adelie Penguin (*Pygoscelis adeliae*) on the Antarctic Peninsula. *Viruses*, 12. 8. p. 858.
- Levy, H., Fontenele, R. S., Harding, C., Suazo, C., Kraberger, S., Schmidlin, K., Djurhuus, A., Black, C. E., Hart, T., Smith, A. L., & Varsani, A., 2020b: Identification and Distribution of Novel Cressdnaviruses and Circular Molecules in Four Penguin Species in South Georgia and the Antarctic Peninsula. *Viruses*, 12. 9. p. 1029.

- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O. S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M. A., Wilson, M. L., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Gross-Camp, N. D., Muller, M. N., Hahn, B. H., Wolfe, N. D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S. Z., & Delwart, E., 2010: Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of virology*, 84. 4. p. 1674-1682.
- Lu, J., Shen, O., Yang, S., Zhang, W., Viral genomes from river ports along the Yangtze River in China. Még nem publikált. NCBI Protein katalógusszám: QRI44128, QRI44166
- Miller, P. J., Afonso, C. L., Spackman, E., Scott, M. A., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Brown, J. D., Fuller, C. M., Uhart, M. M., Karesh, W. B., Brown, I. H., Alexander, D. J., & Swayne, D. E., 2010: Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *Journal of virology*, 84. 21. p. 11496-11504.
- Molini, U., Aikukutu, G., Roux, J. P., Kemper, J., Ntahonshikira, C., Marruchella, G., Khaiseb, S., Cattoli, G., & Dundon, W. G., 2020: Avian influenza H5N8 outbreak in African penguins (*Spheniscus demersus*), Namibia, 2019. *Journal of wildlife diseases*, 56. 1. p. 214-218.
- Morandini, V., Dugger, K. M., Ballard, G., Elrod, M., Schmidt, A., Ruoppolo, V., Lescroel, A., Jongsomjit, D., Massaro, M., Pennycook, J., Kooyman, G. L., Schmidlin, K., Kraberger, S., Ainley, D. G., & Varsani, A., 2019: Identification of a novel adelic penguin circovirus at cape crozier (Ross Island, Antarctica). *Viruses*, 11. 12. p. 1088.
- Morgan, I. R., & Westbury, H. A., 1981: Virological studies of Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian diseases*, 25. 4. p. 1019-1026.
- Morgan, I. R., Westbury, H. A., & Campbell, J., 1985: Viral infections of little blue penguins (*Eudyptula minor*) along the southern coast of Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 21. 3. p. 193-198.
- Morgan, I. R., Westbury, H. A., Caple, I. W., & Campbell, J., 1981: A survey of virus infection in sub-antarctic penguins on Macquarie Island, Southern Ocean. *Australian Veterinary Journal*, 57. 7. p. 333-335.
- Murray, M. D., & Vestjens, W. J. M., 1967: Studies on the ectoparasites of seals and penguins. III. The distribution of the tick *Ixodes uriae* White and the flea *Parapsyllus magellanicus heardi* de Meillon on Macquarie Island. *Australian Journal of Zoology*, 15. 4. p. 715-725.

Niemeyer, C., Favero, C. M., Kolesnikovas, C. K., Bhering, R. C., Brandão, P., & Catão-Dias, J. L., 2013: Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. *Avian Pathology*, 42. 6. p. 546-551.

Niemeyer, C., Favero, C. M., Shivaprasad, H. L., Uhart, M., Musso, C. M., Rago, M. V., Silva-Filho, R. P., Canabarro, P. L., Craig, M. I., Olivera, V., Pereda, A., Brandao, P. E., & Catão-Dias, J. L., 2017: Genetically diverse herpesviruses in South American Atlantic coast seabirds. *PloS one*, 12. 6.

Nunes, C. F., Fonseca, F., Leite, A. T. M., Silva Filho, R. P. D., Finger, P. F., Castro, C. C., Foncesa, F., Leite, A. T. M., Silva-Filho, R. P., Finger, P. F., Castro, C. C., Fischer, G., Vargas, G. D., & Hübner, S. D. O., 2012: Investigation on Newcastle disease virus (NDV), infectious bursal disease virus (IBDV) and avian poxvirus (APV) in Magellanic Penguins in Southern Region of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55. 4. p. 537-542.

Offerman, K., Carulei, O., van der Walt, A. P., Douglass, N., & Williamson, A. L., 2014: The complete genome sequences of poxviruses isolated from a penguin and a pigeon in South Africa and comparison to other sequenced avipoxviruses. *BMC genomics*, 15. 1. p. 1-17.

Parsons, N. J., Gous, T. A., Schaefer, A. M., & Vanstreels, R. E., 2016: Health evaluation of African penguins (*Spheniscus demersus*) in southern Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83. 1. p. 1-13.

Parsons, N. J., Gous, T. A., Van Wilpe, E., Strauss, V., & Vanstreels, R. E. T., 2015: Herpesvirus-like respiratory infection in African penguins *Spheniscus demersus* admitted to a rehabilitation centre. *Diseases of aquatic organisms*, 116. 2. p. 149-155.

Pearce, D. A., & Wilson, W. H., 2003: Viruses in Antarctic ecosystems. *Antarctic Science*, 15. 3. p. 319.

Pfaff, F., Schulze, C., König, P., Franzke, K., Bock, S., Hlinak, A., Kammerling, J., Ochs, A., Schüle, A., Mettenleiter, T. C., Höper, D., & Beer, M., 2017: A novel alphaherpesvirus associated with fatal diseases in banded Penguins. *Journal of General Virology*, 98. 1. p. 89-95.

Rivera, S., Wellehan Jr, J. F. X., McManamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., & Frasca Jr, S., 2009: Sunifying systemic

adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 21. 4. p. 415-426.

Salzmann, E., Müller, E., & Marschang, R. E., 2021: Detection of testadenoviruses and atadenoviruses in tortoises and turtles in Europe. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 52. 1. p. 223-231.

Smith, K. M., Karesh, W. B., Majluf, P., Paredes, R., Zavalaga, C., Hoogesteijn Reul, A., Stetter, M., Braselton, W. E., Puche, H., & Cook, R. A., 2008: Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. *Avian diseases*, 52. 1. p. 130-135.

St. George, T. D., Standfast, H. A., Doherty, R. L., Carley, J. G., Fillipich, C., & Brandsma, J., 1977: The isolation of Saumarez Reef virus, a new flavivirus, from bird ticks *Ornithodoros capensis* and *Ixodes eudyptidis* in Australia. *Australian journal of experimental biology and medical science*, 55. 5. p. 493-499.

Travis, E. K., Vargas, F. H., Merkel, J., Gottdenker, N., Miller, R. E., & Parker, P. G., 2006: Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*, 42. 3. p. 625-632.

Tuxbury, K. A., Innis, C. J., Thaiwong, T., Wise, A. G., Maes, R., Garner, M. M., & Kiupel, M., 2020: Herpesvirus Encephalitis in a Little Blue Penguin (*Eudyptula minor*). *Veterinary Pathology*, 57. 4. p. 582-585.

Uhart, M., Thijl Vanstreels, R. E., Gallo, L., Cook, R. A., & Karesh, W. B., 2020: Serological survey for select infectious agents in wild magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in Argentina, 1994–2008. *Journal of wildlife diseases*, 56. 1. p. 66-81.

Varsani, A., Kraberger, S., Jennings, S., Porzig, E. L., Julian, L., Massaro, M., Pollard, A., Ballard, G., & Ainley, D. G., 2014: A novel papillomavirus in Adelie penguin (*Pygoscelis adeliae*) faeces sampled at the Cape Crozier colony, Antarctica. *Journal of General Virology*, 95. 6. p. 1352-1365.

Varsani, A., Porzig, E. L., Jennings, S., Kraberger, S., Farkas, K., Julian, L., Massaro, M., Ballard, G., & Ainley, D. G., 2015: Identification of an avian polyomavirus associated with Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *Journal of General Virology*, 96. 4. p. 851-857.

Wellehan, J. F., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A. P., Johnson, C. M., Garner, M. M., Childress, A., & Jacobson, E. R., 2004: Detection and analysis of six lizard adenoviruses

by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of virology*, 78. 23. p. 13366-13369.

Wille, M., Aban, M., Wang, J., Moore, N., Shan, S., Marshall, J., González-Acuna, D., Vijaykrishna, D., Butler, J., Wang, J., Hall, R. J., Williams, D. T., & Hurt, A. C., 2019: Antarctic penguins as reservoirs of diversity for avian avulaviruses. *Journal of virology*, 93. 11.

Wille, M., Harvey, E., Shi, M., Gonzalez-Acuña, D., Holmes, E. C., & Hurt, A. C., 2020: Sustained RNA virome diversity in Antarctic penguins and their ticks. *The ISME journal*, 14. 7. p. 1768-1782.

Woo P. C., Lau S. K., Teng J. L., Tsang A. K., Joseph M., Wong E. Y., Tang Y., Sivakumar S., Bai R., Wernery R., Wernery U., Yuen K. Y., 2014: Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. *Virology*, 471-473. p. 117-125.

Yinda, C. K., Esefeld, J., Peter, H. U., Matthijssens, J., & Zell, R., 2019: Penguin megrivirus, a novel picornavirus from an Adelie penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Archives of virology*, 164. 11. p. 2887-2890.

Zhao, L., Rosario, K., Breitbart, M., & Duffy, S., 2019: Eukaryotic circular rep-encoding single-stranded DNA (CRESS DNA) viruses: ubiquitous viruses with small genomes and a diverse host range. *Advances in virus research*, 103. p. 71-133.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetem témavezetőmnek, dr. Kaján Győzőnek, aki hatalmas türelmével, nyugalmával, szakértelmével, hasznos tanácsaival és rengeteg segítséggel járult hozzá szakdolgozatom elkészültéhez.

Köszönöm szépen a laboratórium minden dolgozójának a kedvességet, segítőkészséget és a lehetőséget, hogy ilyen kellemes légkörben végezhettem szakdolgozati munkámat.

Szeretnék köszönetet mondani az állatkertek és a pingvinrezervátum munkatársainak, akik számos mintát rendelkezésemre bocsátottak, ezzel segítették szakdolgozati munkámat.

Köszönet jár a családomnak, akik a kezdetek óta bíztattak és mellettem álltak, kiváltképp édesanyám, aki a világon mindenkinél jobban igyekszik támogatni, bármibe fogok bele.

Végül köszönetem a csodálatos szaktársaimnak és barátaimnak, akik egész egyetemi pályafutásom alatt motiváltak és partnerek voltak az éjszakába nyúló tanulásban.

Köszönöm szépen mindenkinek!

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott dr. Kaján Győző igazolom, hogy Simon Zita Pingvin-eredetű minták szűrése adeno- és CRESS-DNS vírusokra című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védezésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021. április 30.



dr. Kaján Győző

Állatorvostudományi Kutatóintézet