

SZAKDOLGOZAT

Mitró Gergő

2021

Állatorvostudományi Egyetem
Biológia Intézet

Vadonélő és állatkerti emlősök adenovírusainak vizsgálata

Készítette: Mitró Gergő

Témavezető: Vidovszky Márton, PhD
Állatorvostudományi Kutatóintézet

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	5
2.1.	Az adenovírusok általános jellemzése.....	5
2.2.	Az adenovírusok jelentősége	6
2.3.	Az emlősök adenovírusainak rendszertana.....	6
2.3.1.	<i>Adenoviridae</i> család	6
2.3.2.	<i>Mastadenovirus</i> nemzetség	7
2.3.3.	<i>Atadenovirus</i> nemzetség.....	9
2.4.	Célkitűzés	11
3.	Vizsgálatok anyaga és módszerei.....	12
3.1.	Vizsgált minták.....	12
3.2.	DNS kivonás.....	15
3.3.	Polimeráz láncreakció (PCR)	15
3.4.	Agaróz gélelektroforézis.....	17
3.5.	PCR termékek tisztítása.....	18
3.6.	Primer tervezés	18
3.7.	PCR az új primerekkel.....	19
3.8.	DNS szekvenálás	20
3.9.	Bioinformatikai elemzések	21
4.	Eredmények.....	22
4.1.	Pozitív minták száma.....	22
4.2.	Bioinformatikai elemzések eredményei	25
5.	megbeszélés.....	27
5.1.	Pozitív minták.....	27
5.2.	Emlősök és adenovírusok koevolúciója	28
6.	Összefoglalás.....	30
7.	Summary	31
8.	Hivatkozások jegyzéke.....	32
9.	Köszönetnyilvánítás	36

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AdV	adenovirus	adenovírus
BAdV	bovine adenovirus	szarvasmarha-adenovírus
bp	base pair	bázispár
HAdV	human adenovirus	humán adenovírus
MAdV	murine adenovirus	egér-adenovírus
nt	nucleotide	nukleotid
OAdV	ovine adenovirus	juh-adenovírus
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
pol	DNA-dependent	DNS-függő
	DNA polymerase gene	DNS-polimeráz gén
SAdV	simian adenovirus	majom-adenovírus

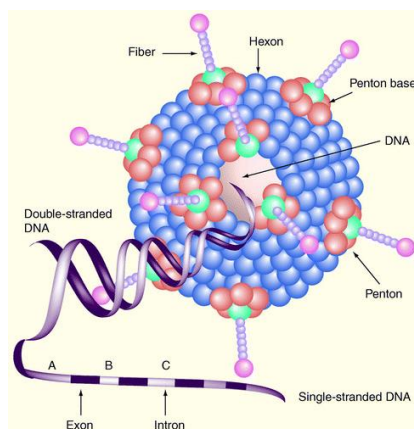
2. BEVEZETÉS

2.1. Az adenovírusok általános jellemzése

Az adenovírusok (AdV) elnevezése a felfedezésükhöz köthető. Elsőként emberi garatmandulából (garatmandula angolul = adenoid) készített sejttenyészetből sikerült AdV-t izolálni (Rowe et al., 1953). Azóta minden főbb gerinces osztályból mutatták már ki AdV jelenlétét, a halaktól kezdve egészen az emberig.

Az AdV-ok közepes méretű (65-90 nm átmérőjű), lipidburok nélküli, kapsziddal rendelkező vírusok. Genomjukat egyetlen, lineáris duplaszálú DNS alkotja, melynek hossza 25 és 48 ezer bp között változik. Az ikozaéder alakú virion kapszidjának fő tömegét 240 hexon fehérje adja, az ikozaéder csúcsainál pedig 12 penton-bázis fehérje található, amikből egy-egy fiber fehérje ered. A vírus a fiberek disztális, feji részének segítségével kapcsolódik a sejtfelszíni receptorokhoz (Harrach, 2008).

Az AdV-okra általában nagyfokú gazdaspecifikusság jellemző. Kórokozó képességük függ a vírus típusától és a gazdaszervezettől. A fertőzés legtöbbször tünetmentes, esetleg enyhe lefolyású betegséget okoz, azonban gyenge immunrendszerű gazda esetén kialakulhat súlyos betegség is. Az AdV-ok emberben főleg enyhe lefolyású, felsőlégúti betegségeket okoznak, mint mandula- és torokgyulladás, de más szervek fertőzései is előfordulhatnak. Állatok esetében a fontosabb AdV-ok által okozott betegségek közé tartozik pl. a kutyák fertőző májgyulladása (ICH) és a baromfi tojáshozam-csökkenés szindrómája (EDS). Előbbi betegség vírusa más ragadozókat (*Carnivora*) is fertőzhet, míg utóbbi vírusát kacsából, libából, tyúkból és vadonélő madarakból is kimutatták (Benkő, 2008).



1. ábra: Az adenovírusok szerkezetének sematikus rajza

(Rein et al., 2006)

2.2. Az adenovírusok jelentősége

Az AdV-okat, mint vektorokat, előszeretettel alkalmazzák az orvostudományban főleg rákellenes kezelések során. Ezen kívül kutatják a lehetséges felhasználásukat a regeneratív és személyre szabott orvoslásban, illetve az egygénese betegségekkel szembeni génterápiában is (Lee et al., 2017).

Az AdV-okat felhasználják a vektor alapú COVID-19 vakcinagyártásban is. Az Oxford-AstraZeneca SARS-CoV-2 elleni vakcinája genetikailag módosított replikációra képtelen csimpánz AdV-t (ChAdOx1) használ vektorként (Folegatti et al., 2020). A Gam-COVID-Vac (Szputnyik V) vektora rekombináns HAdV-26 az első dózisban és rekombináns HAdV-5 a másodikban (Logunov et al., 2021). A Johnson & Johnson egydózisú Ad26.COV2.S nevű COVID-19 vakcinájában pedig szintén replikációra képtelen HAdV-26-ot használnak (Sadoff et al., 2021).

Mindezekon túl, az AdV-ok jó modell organizmusok a vírus-gazda koevolúció vizsgálatára. A vírusok obligát sejtparaziták, amik évmilliók óta fejlődnek a gazdaszervezeteikkel együtt. Mind a vírusok, mind a gazdaszervezeteik evolúciója örökösen a fitnessük növelésének irányába hat. Ez a régóta fennálló evolúciós nyomás többek között olyan következményekkel jár, hogy az AdV-ok az eredeti gazdaszervezeteikben többnyire nem patogének, vagy csak enyhe tüneteket okoznak, de gazdaváltás során a vírusfertőzés komolyabb betegséggel is járhat az új gazdaszervezetben (Kaján et al. 2020).

2.3. Az emlősök adenovírusainak rendszertana

2.3.1. *Adenoviridae* család

AdV-okat majdnem minden főbb gerinces osztályból sikerült izolálni vagy kimutatni. A madarakat, hüllőket és denevéreket fertőző AdV-ok a legváltozatosabbak, de kételtűekből és halakból is mutattak már ki egy-egy AdV-t.

Az *Adenoviridae* víruscsalád hat nemzetségre oszlik, ezek mindegyike egy független evolúciós vonalat képez, amelyek a gazdaszervezeteikkel együtt fejlődtek koevolúció révén. A *Mastadenovirus* nemzetségbe kizárólag emlősöket fertőző, míg az *Aviadenovirus* nemzetségbe csak madarakat fertőző vírusok tartoznak. Az *Atadenovirus* nemzetségbe zömmel pikkelyes hüllőket (*Squamata*) fertőző AdV-ok tartoznak, de madarakban és emlősökben is előfordulnak ebbe a nemzetségbe sorolható vírusok. A *Siadenovirus* nemzetség foglalja magába az egyetlen

publikált béka AdV-t és számos madár AdV-t. Az *Ichtadenovirus* nemzetségben a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) kimutatott egyetlen hal AdV található. Teknősökből is mutattak már ki AdV-okat, amik egy frissen (2021 márciusától) elfogadott hatodik, *Testadenovirus* nemzetségbe tartoznak [Harrach et al., 2019; <https://www.sites.google.com/site/adenoseq/> (Megtekintve: 2021.04.25.)].

2.3.2. *Mastadenovirus* nemzetség

A *Mastadenovirus* nemzetségbe tartoznak az embereket is fertőző HAdV-ok, amiket *Human mastadenovirus* A-tól G-ig jelölt fajokba soroltak. Ezeknek a fajoknak a nagy részébe az emberen kívül más főemlősökből kimutatott AdV-okat is sorolhatunk. Ez alól egyedülként kivételt képez a *Human mastadenovirus D* (HAdV-D), amit jelenleg az egyetlen olyan AdV fajnak tartunk, amibe tartozó vírusoknak az eredeti gazdája is az ember volt. A HAdV-B, -C és -E fajokba tartozó vírusokat sokszor kimutatták emberszabású majmokból, gorillából (*Gorilla* sp.), csimpánzból (*Pan troglodytes*) és bonobóból (*Pan paniscus*). Ez arra utal, hogy ezeknek a vírusoknak az eredeti gazdaszervezetei ezek az emberszabásúak lehettek. A HAdV-A, -F és -G fajok pedig feltehetőleg más óvilági majmokból származnak [Hoppe et al., 2015].

A HAdV fajokba sorolható AdV-okon kívül más AdV-ok is megtalálhatók a főemlősökben. Az afrikai emberszabásúak majom-AdV-ai (SAdV) a fent említett HAdV-B, -C és -E vírusokkal mutatnak közeli rokonságot [Hoppe et al., 2015].

Nagyszámú SAdV-t mutattak már ki különböző óvilági majmokból a HAdV-A, -F és -G fajokba sorolható vírusokon kívül is. Ezeket közönséges makákó (*Macaca fascicularis*), rézusmajom (*Macaca mulatta*), Anubisz-pávián (*Papio anubis*), sárgás babuin (*Papio cynocephalus*), szavannacerkóf (*Chlorocebus aethiops*) és arany piszeorrú majom (*Rhinopithecus roxellana*) fajokból sikerült izolálni. Továbbá vannak, amiket csak PCR-rel mutattak ki, az asszámi makákó (*Macaca assamensis*), üstökös mangábé (*Lophocebus aterrimus*), galléros pávián (*Papio hamadryas*), mandrill (*Mandrillus sphinx*), Cambell-cerkóf (*Cercopithecus campbelli*), Diána-cerkóf (*Cercopithecus diana*), huszármajom (*Erythrocebus patas*), fekete-fehér kolobusz (*Colobus* sp.) és vörös kolobusz (*Piliocolobus* sp.) esetében. Az említett, izolált vagy kimutatott vírusokat *Simian mastadenovirus* A-tól I-ig osztották fajokba [Harrach et al., 2019; Podgorski et al., 2016].

Újvilági majmok közül, eddig egyedül rezes kabócamajomból (*Callicebus cupreus*) sikerült AdV-t izolálni, ami felső légúti tünetekkel és tüdőgyulladással járó fertőzést okozott egy fogságban tartott kabócamajom populációban. Habár a vírus tenyésztése emberi tüdő sejtvonalon sikeresnek bizonyult, nem ismerünk tényleges újvilági majom AdV fertőzést

embereknél (Chen et al., 2011). Sokkal több AdV-t sikerült csak PCR-rel kimutatni újvilági majmokból: közönséges mókusmajom (*Saimiri sciureus*), Apella-csuklyásmajom (*Sapajus apella*), szürkehasú éjímajom (*Aotus lemurinus*), aranykezű tamarin (*Saguinus midas*), fehérarajú tamarin (*Saguinus labiatus*), gyapjasfejű tamarin (*Saguinus oedipus*), aranyfejű oroszlanmajmocská (*Leontopithecus chrysomelas*), fehérfejű selyemmajom (*Callithrix geoffroyi*), fehérpamacsos selyemmajom (*Callithrix jacchus*) és fekete pókmajom (*Ateles paniscus*) esetében (Podgorski et al., 2018).

A közelmúltban kezdtek el a félmajmok PCR-es szűrését AdV-okra. Ezzel a módszerrel sikerült új AdV-okat kimutatni gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*), szürke bambuszmaki (*Hapalemur griseus*), koronás maki (*Eulemur coronatus*), szerecsenmaki (*Eulemur macaco*), vöröshomlokú maki (*Eulemur rufifrons*) és fekete-fehér vari (*Varecia variegata*) mintákból (Podgorski et al., 2018).

A főemlősök AdV-ainak törzsfáján alapi helyzetben helyezkednek el a félmajmok AdV-ai, ezeket követik az újvilági majmok és óvilági majmok AdV-ai, és végül következnek az emberszabású majmok és a HAdV-ok. Ez az elrendezés hűen tükrözi a főemlősök leszármazási viszonyait és alátámasztja az elméletet, miszerint az AdV-ok a gazdaszervezeteikkel együtt fejlődtek (Harrach et al., 2019).

Rágcsálókban eddig öt AdV teljes genomszekvenciája ismert. Az egér-AdV-1-et és -2-t (MAdV-1, -2) házi egérből (*Mus musculus*), a MAdV-3-at pedig pirók erdeiegeéből (*Apodemus agrarius*) izolálták, míg a mókus-AdV-1 európai mókusból (*Sciurus vulgaris*) származik (Klempa et al., 2009; Abendroth et al., 2017). Legújabban a tengerimalac (*Cavia porcellus*) AdV-ának a genomját közzétették (Hofmann-Sieber et al., 2020). Ezeken kívül részleges szekvenciákat ismerünk patkány (*Rattus sp.*), amerikaieger (*Peromyscus sp.*), kínai csíkos törpehörcsög (*Cricetulus barabensis*), délnyugat-kínai pocok (*Eothenomys custos*), keleti szürkemókus (*Sciurus carolinensis*) és Dauri ürge (*Spermophilus dauricus*) fajokból (Harrach et al., 2019).

A denevérek AdV-ai a legváltozatosabbak az emlős AdV-ok között. Ezt a diverzitást tükrözik a más emlős gazdaszervezetekből származó AdV-okkal alkotott változatos rokonsági kapcsolataik. A denevér AdV-oknál egyfelől megfigyelhetők a vírus-gazda koevolúciót alátámasztó leszármazási viszonyok, másfelől számos más emlősben talált AdV mutat közeli rokonságot a denevér AdV-okkal, mint pl. a ló-AdV-1, a kutya-AdV-ok vagy a bűzösborz-AdV-1 (Vidovszky et al., 2015; Harrach et al., 2019).

Kérődzőkből régóta ismertek AdV-ok. A házasított kérődzőkön belül szarvasmarhából (*Bos taurus*), házikacskából (*Capra hircus*) és házijuhából (*Ovis aries*) sikerült AdV-okat kimutatni

és izolálni (Harrach et al., 2019). A közelmúltban izolált OAdV-8 az első teljes egészében szekvenált juh mastadenovírus genom (Vidovszky et al., 2019). Vadonéló kérődzők közül fehér-farkú szarvasból (*Odocoileus virginianus*) mutattak ki egy mastadenovírust. Az így izolált vírus a szarvas-AdV-2 nevet kapta és a teljes genomszekvenciáját meghatározták (Ridpath et al., 2017).

A cetfélékben talált AdV-ok genomszekvencia analízise szintén alátámasztani látszik a vírus-gazda koevolúció elméletet. Ezek alapján a jelenleg ismert delfin-AdV-ok a testvér-kládját alkotják a párosujjú patások AdV-ai közül a szarvasmarha-AdV-1-nek és -2-nek (BAdV-1, -2), illetve a sertés-AdV-5-nek (Harrach et al., 2019).

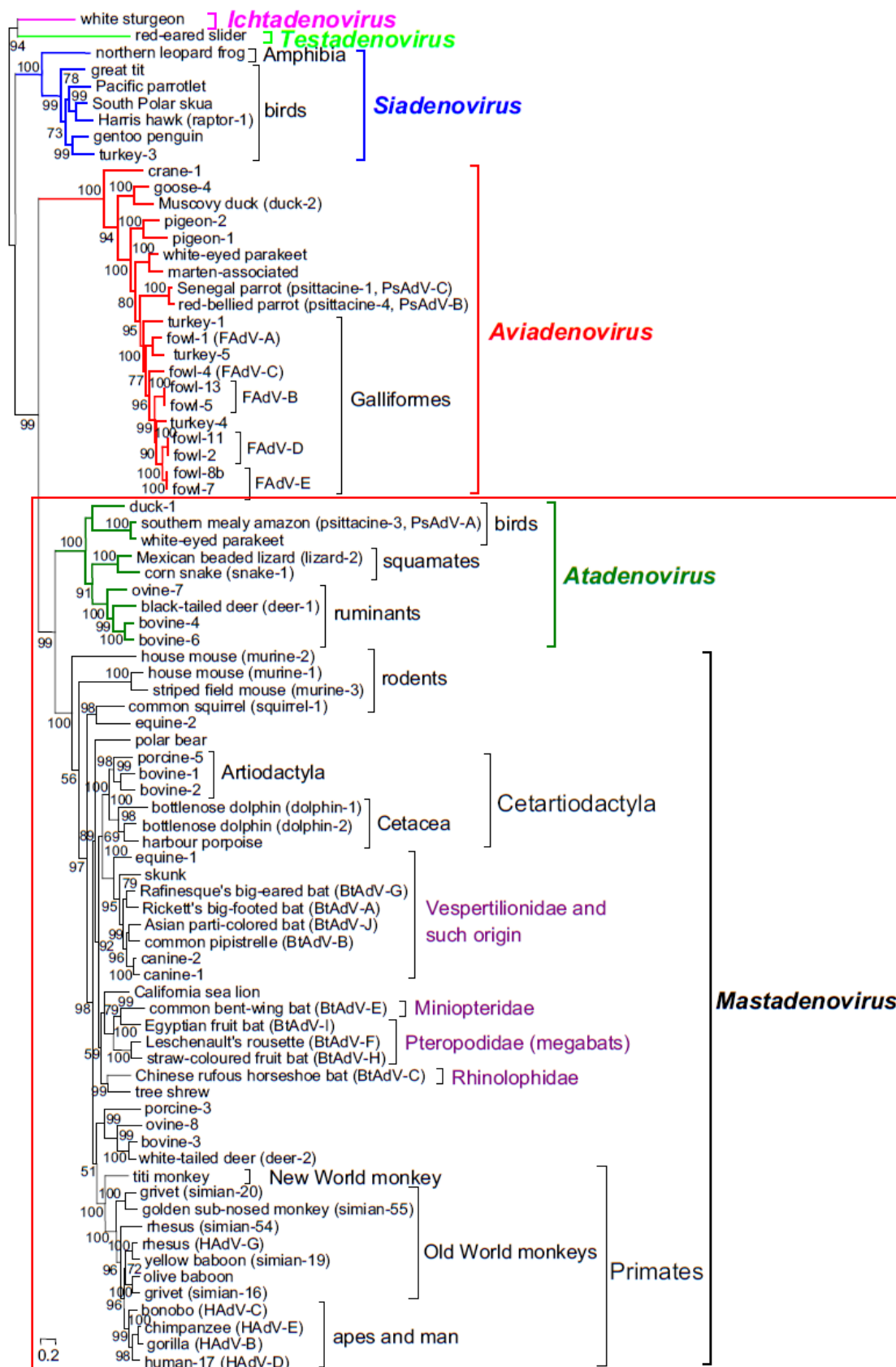
Az *Afrotheria* öregrendbe tartozó emlősökből, vendégízületesekből (*Xenarthra*), erszényesekből (*Marsupialia*) és kloákásokból (*Monotremata*) egyelőre nem ismertek mastadenovírusok (Harrach et al., 2019).

2.3.3. *Atadenovirus* nemzetség

Az *Atadenovirus* nemzetséghez tartozó vírusokat, szarvasmarhában és baromfiban (tyúkban és kacsában) mutatták ki először. A nemzetség a nevét az ide tartozó vírusok genomjának magas (>60%) adenin és timin tartalmáról kapta. Az *Aviadenovirus* és *Mastadenovirus* nemzetségektől való filogenetikai távolság, és hogy az összes kígyó- és gyík-AdV az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozik, arra enged következtetni, hogy az ide tartozó vírusok gazdaváltás során kerültek át az emlősökbe és madarakba a pikkelyes hüllőkből (Harrach et al., 2019).

Kérődzők esetében az ismert BAdV-ok megközelítőleg fele sorolható az *Atadenovirus* nemzetségbe. Ezenkívül más házasított és vadonéló kérődzőkben is találtak már atadenovírusokat (Harrach et al., 2019). A két ismert szarvas-AdV közül az egyik szintén ebbe a nemzetségbe tartozik. A vírust először öszvérszarvasból (*Odocoileus hemionus*) mutatták ki, de azóta megtalálták fekete-farkú szarvasban (*Odocoileus hemionus columbianus*), virginiai szarvasban (*Odocoileus virginianus*), jávorszarvasban (*Alces alces*) és sziklás-hegységi vapitiben (*Cervus canadensis nelsoni*) is. A szarvasfélékben szórványosan előforduló szarvas-AdV-1-nek elnevezett vírus, magas elhullási aránnyal járó, vérzéses megbetegedésekért felelős az Amerikai Egyesült Államokban, Kaliforniában (Miller et al., 2017).

Eddig két erszényes faj egyedeiben találtak AdV-t, ami mindkét alkalommal atadenovírusnak bizonyult. Mivel mindkét esetben bélsármintából történt a vírus kimutatása, ezért nincs közvetlen bizonyíték, hogy ennél a két fajnál fenn is állt az AdV fertőzés, vagy csak az elfogyasztott táplálékkal került az állatok emésztőcsatornája a vírus (Harrach et al., 2019).



2. ábra: Az adenovírusok törzsfája, bekeretezve rajta a két nemzetség, amelyekbe az emlősökben előforduló AdV-ok tartoznak

(Harrach et al., 2019)

2.4. Célkitűzés

Szakdolgozatomat, a munkám kezdetén az Agrártudományi Kutatóközponthoz tartozó, azóta ismét önállósodott Állatorvostudományi Kutatóintézetben, a Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoportnál készítettem. Témámnak emlősök AdV-ainak vizsgálatát, illetve emlősökből történő új AdV-ok kimutatását választottam. Az eleinte hazai, vadonélő emlősök [európai őz (*Capreolus capreolus*), eurázsiai hód (*Castor fiber*)] vizsgálatából álló munkám kiegészült a 2020 nyarán teljesített szakmai gyakorlat során főemlős mintákon végzett AdV szűrés vizsgálataival is. Kutatásunk céljai közé tartozott a fent említett emlős eredetű minták szűrése AdV-ok jelenlétére, és az újonnan kimutatott AdV-ok vizsgálata. Az így nyert eredmények alapján a témacsoport vírus-gazda koevolúció elméletét tanulmányoztam. További cél volt az AdV-ok diverzitásának vizsgálata és rokonsági viszonyaik feltérképezése.

3. VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZEREI

3.1. Vizsgált minták

Összesen 47 darab mintát vizsgáltunk, amik közül 8 darab szerv eredetű minta hazai, vadonélő emlősöktől (európai őz, eurázsiai hód) származott. Hét darab szervmintát az Őrségi Nemzeti Park munkatársai gyűjtöttek elhullott hódokból. Ezek közül kettő minta vese eredetű volt, a többi öt minta öt különböző szervet (vese, máj, lép, tüdő, szív) tartalmazott. Egy veseminta pedig egy vadásztársaság által Petőfiszállás mellett kilőtt beteg őzből származott. 21 darab szív minta az Ape Heart Project keretein belül, különböző európai állatkertekben szívbetegség következtében elhunyt főemlősökből származott és postai úton juttatták el hozzánk molekuláris virológiai vizsgálatra. Ezeken a mintákon kívül félmajmoktól (vörös vari, gyűrűsfarkú maki, koronás maki) és emberszabásúaktól (orangután, gorilla, csimpánz, bonobó) származó 18 darab bélsármintát is kaptunk Dr. Liptovszky Mátyás állatkerti állatorvostól az angliai Twycross Zoo állományából. A vizsgált minták adatait az 1-4. számú táblázatok foglalják magukba.

1. táblázat: A vizsgált magyarországi szervminták származása, típusa, darabszáma és jelölése

Fajnév	Származási hely	Minta típus	db	Azonosító
európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>)	Magyarország (Petőfiszállás)	vese	1	49215
eurázsiai hód (<i>Castor fiber</i>)	Magyarország (Őrségi Nemzeti Park)	vese	2	H1-H2
eurázsiai hód (<i>Castor fiber</i>)	Magyarország (Őrségi Nemzeti Park)	vese, máj, lép, tüdő, szív	5	H27-H31

2. táblázat: A vizsgált főemlős bélsárminták származása, darabszáma és jelölése

Fajnév	Származási hely	Minta típus	db	Azonosító
vörös vari (<i>Varecia rubra</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	2	Ma142-Ma143
gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	2	Ma153-Ma154
koronás maki (<i>Eulemur coronatus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	2	Ma155-Ma156
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	3	Ma150-Ma152
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	3	Ma147-Ma149
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	3	Ma144-Ma146
bonobó (<i>Pan paniscus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	bélsár	3	Ma157-Ma159

3. táblázat: A vizsgált főemlős szívmenták származása, darabszáma és jelölése (1)

Fajnév	Származási hely	Minta típus	db	Azonosító
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	szív	1	Benji
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Dánia (Givskud Zoo)	szív	1	Judy
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Franciaország (La Vallée des Singes)	szív	2	Jorg, Panja
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Skócia (Blair Drummond)	szív	2	Blossom, Rosie
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Spanyolország (Madrid Zoo)	szív	1	Mirinda
bonobó (<i>Pan paniscus</i>)	Franciaország (La Vallée des Singes)	szív	1	Kirembo
bonobó (<i>Pan paniscus</i>)	Németország (Stuttgart Zoo)	szív	1	Zorba

4. táblázat: A vizsgált főemlős szívminták származása, darabszáma és jelölése (2)

Fajnév	Származási hely	Minta típus	db	Azonosító
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Blackpool Zoo)	szív	1	Victoria
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	szív	1	6844
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Németország (Heidelberg Zoo)	szív	1	Puan
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Spanyolország (Madrid Zoo)	szív	1	Kedua
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Anglia (Bristol Zoo Garens)	szív	1	Romina
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Dánia (Givskud Zoo)	szív	1	Nille
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Franciaország (Amneville)	szív	1	Ya Kwanza
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Frankfurt Zoo)	szív	1	Julchen
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Krefeld Zoo)	szív	1	Tumba
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Saarbrücken Zoo)	szív	1	Pesco
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Svájc (Basel Zoo)	szív	2	Goma, Zungu

3.2. DNS kivonás

A H27-H31 hód mintákból a szerveket (vese, máj, lép, tüdő, szív) egyesítve („pool-ozva”) vizsgáltuk, vagyis egybe rakva kezeltük az 5 féle szervmintát. A DNS kivonását NucleoSpin[™] DNA Tissue Kit (Macherey-Nagel[™]) segítségével végeztük a gyártó használati utasításai szerint. A többi minta esetén már kivont DNS állt a rendelkezésemre. A kivont DNS-t -20°C-on tároltuk a PCR vizsgálatok elvégzéséig.

3.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

Az adenovírus DNS kimutatásához általános, kétkörös (nested) PCR-t használtunk konszenzus primerekkel. Ennek során az erősen konzervált DNS-függő DNS-polimeráz (pol), illetve a szintén meglehetősen konzervált IVa2 génnek egy-egy szakaszát próbáltuk meg felerősíteni. (Wellehan et al., 2004; Vidovszky et al., 2015). Az így kapott pozitív mintákat a vírusok további jellemzése és meghatározása végett pVIII (nested PCR) és hexon (egykörös PCR) génekre is vizsgáltuk (Kiss et al., 1996). A PCR során DreamTaq[™] Hot Start Green PCR Master Mix-et használtunk 50 µMol hígítású primerekkel (5. táblázat). Sikertelen első próbálkozás esetén megismételtük a tesztet megnövelt (x2) primer és DNS mennyiség mellett. Pozitív kontrollnak minden esetben BAdV-1 DNS-t használtunk (Evans et al., 1998). A keletkező PCR-termékek várható mérete a felerősíteni kívánt szakasztól és a primerektől függően 250-450 bp körül volt, amiket +4 °C-on tároltuk a további vizsgálatok elvégzéséig. A PCR idő- és hőmérséklet protokollját a 6. táblázat foglalja magába, míg a vizsgálatok során használt primer szekvenciák a 7. táblázatban találhatók meg.

5. táblázat: Adenovírus DNS kimutatására irányuló PCR-ek összetétele

	Első és második kör
Milli-Q™ víz	10,5 µl
DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix (2x)	12,5 µl
Forward primer (50 µMol)	0,5 µl
Reverse primer (50 µMol)	0,5 µl
DNS	1 µl
Végtérfogat	25 µl

6. táblázat: A PCR-ek protokolljai

Általános kétkörös PCR			Egykörös hexon PCR		
Első és második kör			Első kör		
Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés	Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
95	300	x1	95	300	x1
94	30	x45	94	30	x35
46	60		50	30	
72	60		72	30	
72	180	x1	72	300	x1

7. táblázat: A PCR vizsgálatok során használt primerek szekvenciái

Felerősíteni kívánt szakasz	Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	PCR termék mérete (bp)
pol	poloutfo	TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC	279
	poloutre	GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT	
	polinfo	GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC	
	polinre	CCANCCBCDRTRTGNARNGTRA	
IVa2	IVa2outfo	CCNNSNCCNGARCANGTNTTYTT	253
	IVa2outre	GGRTTCATRTRTGNARNACNAC	
	IVa2info	CCNCARRTNGAYATGATHCCNCC	
	IVa2inre	TTNSWNGGRAANGCRTGRAARAAYTT	
pVIII	pVIIIoutfo	ATHCCMACVCCBTAYRTDTGG	453
	pVIIIoutre	CNGGNGGKCCNGARWAVGGNT	
	pVIIIinfo	GCCGCARTGGTCYTACATGCACATC	
	pVIIIinre	CACRAAYTCNYSNACRAAYTG	
hexon	mastB	GCCGCARTGGTCYTACATGCACATC	301
	mastJ	CAGCRYRCCGCGGATGTCAAART	

3.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR vizsgálatok pozitivitását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a PCR termékek mérete és a pozitív kontrollhoz történő viszonyítás alapján. A futtatás során GelRed™ (Biotium) fluoreszcens DNS festéket tartalmazó (4µl/100ml) 1%-os agaróz gélét használtunk (8. táblázat). A mintákból, a negatív és a pozitív kontrollokból 5µl-t, a molekulatömeg markerből (Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix) 2µl-t vittünk fel a géltre. A gélelektroforézis 0,5%-os hígítású TAE [tris-(hidroximetil)-aminometán, ecetsav, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)] pufferben történt 70-90V feszültségen 30-40 percig.

8. táblázat: Agaróz gél összetétele

agaróz	1 g
TAE puffer (0,5%)	100 ml
GelRed™	4 µl

3.5. PCR termékek tisztítása

Az agaróz gélelektroforézis után a pozitívnak tűnő minták PCR termékeit megtisztítottuk DNS szekvenáláshoz. A pozitív kontrollal megegyező méretű termékeket a gélelektroforézis után a gélből kivágtuk és NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel™) segítségével tisztítottuk a gyártó használati utasításai szerint.

3.6. Primer tervezés

Az őz minta esetén a részleges IVa2 és pol szekvenciák összekötésére és ezáltal nagyobb, filogenetikai elemzésre alkalmasabb DNS szakasz meghatározására primereket terveztünk. Ehhez a University of Tartu & Estonian Biocentre Primer3 webszerverét használtuk. A ThermoFisher Scientific Multiple Primer Analyzer weboldal segítségével ellenőriztük, hogy a primerek ne képezzenek egymással dimereket. Az így megtervezett primereket az Eurofins Genomics-tól rendeltük meg. Először csak egykörös PCR-hez készítettünk primerpárt. Később egy második primerpárt is terveztünk, belső körként alkalmazva, ezáltal érzékenyebbé téve a reakciót (9. táblázat).

9. táblázat: A megtervezett primerek szekvenciái

Felerősíteni kívánt szakasz	Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	PCR termék mérete (bp)
IVa2-pol	49215_IVa2outfo	CTAATTCTTCCATGCATTCATCC	~2200
	49215_poloutre	CAAGTGCTTTGACACATCCTTTC	
	49215_IVa2info	CATAAGTCAGACGGACAAAAGATG	~2000
	49215_polinre	CCACCAGAAGAACTTTACTCGAT	

3.7. PCR az új primerekkel

Elsőnek egy primerpárral (későbbi külső primerek) egykörös PCR-t végeztünk. A PCR-ek során Takara™ PrimeSTAR™ HS DNS Polimerázt használtunk 50 µMol hígítású primerekkel (10. táblázat). A PCR idő- és hőmérséklet protokollja a 11. táblázatban látható. Sikertelen első próbálkozást követően megismételtük a tesztet megnövelt (x2) primer és DNS mennyiséggel és 55°C-ról 50°C-ra csökkentett primer kötődési hőmérséklettel (annealing). Harmadik alkalommal a másodiknak használt PCR összetételt és protokollt ismételtük meg újra hígított primerekkel. Ezt követően egy második primerpár (belső primerek) bevonásával kétkörös PCR-re tértünk át. Ezt elvégeztük az eredeti összetétel és protokoll (10. és 11. táblázat) szerint, majd megnövelt (x2) primer és DNS mennyiséggel és 55°C-ról 50°C-ra csökkentett primer kötődési hőmérséklettel is. Az egykörös PCR során 2200 bp körüli PCR-terméket, míg a kétkörös PCR esetében 2000 körülit vártunk.

10. táblázat: IVa2-pol szakasz kimutatására irányuló első PCR összetétele

	Első (és második) kör
Milli-Q™ víz	10,5 µl
Takara™ PrimeSTAR™ HS DNS Polimeráz	12,5 µl
Forward primer (50 µMol)	0,5 µl
Reverse primer (50 µMol)	0,5 µl
DNS	1 µl
Végtérfogat	25 µl

11. táblázat: IVa2-pol szakasz kimutatására irányuló első PCR protokollja

Első (és második) kör		
Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
98	120	x1
98	10	x45
55	15	
72	60	
72	420	x1

3.8. DNS szekvenálás

A tisztított PCR termékek szekvenciáját mindkét irányból meghatároztuk. Ehhez BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et és a PCR-ek során használt primereket (kétkörös PCR esetén a belső köröseket) használtunk, 4 µMol hígításban. A szekvenálási reakció összetételét és protokollját a 12. és 13. táblázatok tartalmazzák.

12. táblázat: A szekvenálási reakció összetétele

Milli-Q™ víz	1 µl
Szekvenáló puffer	1 µl
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1 µl
Primer (4 µMol)	1 µl
Minta	1 µl
Végtérfogat	5 µl

13. táblázat: A szekvenálási reakció protokollja

Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
96	60	x1
96	10	x35
50	5	
60	240	

A szekvenálási reakció után a termékeket alkoholosan kicsaptuk. Ennek során 40 µl kicsapó mixet adtunk minden mintához (14. táblázat), amiket keverés után szobahőmérsékleten, napfénytől elzárva és letakarva 15 percig inkubáltunk. Ezt követően 45 percig 4400 percenkénti fordulatszám (RPM) és SOFT beállítás (a centrifuga kíméletesen, lassabban, hosszabb idő alatt éri el a végső fordulatszámot) mellett centrifugáltuk a csöveket szobahőmérsékleten, majd eltávolítottuk a felülúszót. Ezután minden mintához 70 µl 70%-os etil-alkoholt adtunk és 15 percig 4400 RPM és SOFT beállítás mellett centrifugáltuk őket szobahőmérsékleten, majd ismét eltávolítottuk a felülúszót. Ezt egy szárítási lépés követte: a csöveket nyitva hagyva, szobahőmérsékleten és fénytől elzárt helyen 10 percig állni hagytuk. Ezt követően a szekvenálási reakció termékeit tartalmazó csöveket postai úton a Szegedi Biológiai Kutatóközpont szolgáltatólaborjába küldtük, ahol elvégezték a kapilláris gélelektroforézist.

14. táblázat: A kicsapó mix összetétele

Nátrium-acetát (3Mol)	1,5 µl
Etil-alkohol (96%)	31 µl
Milli-Q™ víz	7,5 µl
Végtérfogat	40 µl

3.9. Bioinformatikai elemzések

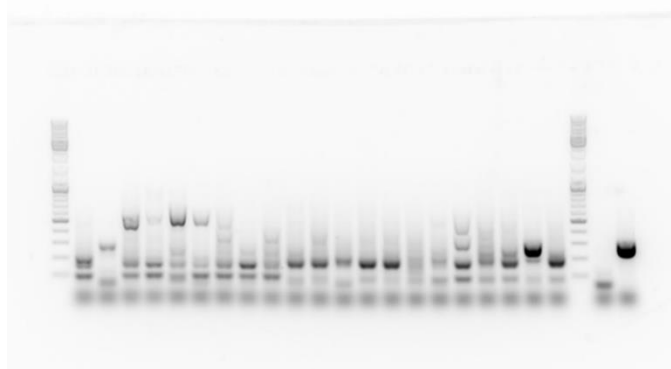
A szekvenálás eredményeként kapott kromatogramokat elektronikus formában kaptuk meg és a BioEdit program használatával tekintettük meg őket. Az így kapott szekvenciák végéről levágtuk a bizonytalan szakaszokat, ahova a primerek kötődnek, és összeillesztettük a kétoldalról leolvasott szekvenciákat, hogy minél hosszabb szakaszt határozhassunk meg. Az NCBI BLAST homológia kereső szolgáltatásának segítségével összehasonlítottuk a szekvenciáinkat a GenBankban találhatókkal és megnéztük, hogy melyekkel mutatják a legnagyobb fokú hasonlóságot.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Pozitív minták száma

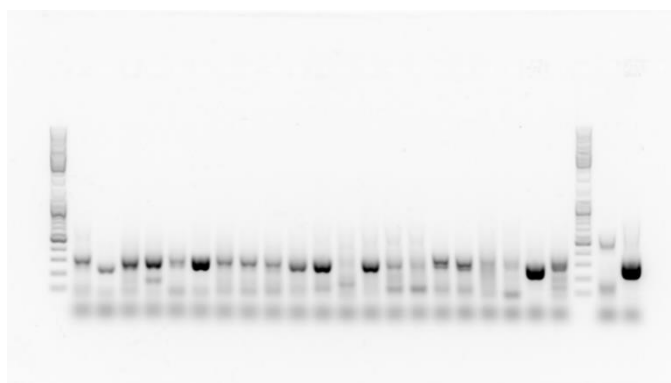
A pol és IVa2 gének rövid szakaszait célzó szűrő vizsgálataink alapján a 47 darab mintából 10 darab, azaz a mintáink 21,3%-a, lett pozitív a két AdV gén közül legalább az egyikre. A IVa2 génszakaszt 10 darab minta esetén sikerült felerősítenünk, melyek közül 7 darabnál a pol PCR is pozitívnak bizonyult. Ezt a 10 darab mintát tovább vizsgáltuk pVIII és hexon génekre is. A pVIII gént 2 darab mintából sikerült kimutatnunk, míg a hexon gént nem sikerült felerősítenünk egyik minta esetében sem. Az őz minta esetében a IVa2 és pol gének összekötésére irányuló kísérleteink minden esetben negatív eredménnyel zárultak. Európai őzből és orangutánból első alkalommal mutattunk ki AdV-t.

Az eredményeink összefoglalását a 15-17. számú táblázatok tartalmazzák. A 3. és 4. ábrán a szív minták esetén elvégzett pol és IVa2 kétkörös PCR-ek termékeinek gélképei láthatók.



3. ábra: pol kétkörös PCR gélkép

(balról jobbra: marker, 21 darab szív minta, marker, negatív kontroll, pozitív kontroll)



4. ábra: IVa2 kétkörös PCR gélkép

(balról jobbra: marker, 21 darab minta, marker, negatív kontroll, pozitív kontroll)

15. táblázat: A magyarországi emlősök szervmintáin végzett vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Fajnév	Származási hely	Azonosító	Adenovírus teszt
európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>)	Magyarország (Petőfiszállás)	49215	pozitív
eurázsiai hód (<i>Castor fiber</i>)	Magyarország (Őrségi Nemzeti Park)	H1	negatív
		H2	negatív
		H27	negatív
		H28	negatív
		H29	negatív
		H30	negatív
		H31	negatív

16. táblázat: A főemlős bélsármintákon végzett vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Fajnév	Származási hely	Azonosító	Adenovírus teszt
vörös vari (<i>Varecia rubra</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma142	negatív
		Ma143	pozitív
gyűrűsfarkú maki (<i>Lemur catta</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma153	negatív
		Ma154	negatív
koronás maki (<i>Eulemur coronatus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma155	pozitív
		Ma156	pozitív
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma150	negatív
		Ma151	pozitív
		Ma152	pozitív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma147	negatív
		Ma148	negatív
		Ma149	negatív
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma144	negatív
		Ma145	pozitív
		Ma146	pozitív
bonobó (<i>Pan paniscus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma157	negatív
		Ma158	negatív
		Ma159	pozitív

17. táblázat: A főemlős szívmintákon végzett vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Fajnév	Származási hely	Azonosító	Adenovírus teszt
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Benji	negatív
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Dánia (Givskud Zoo)	Judy	negatív
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Franciaország (La Vallée des Singes)	Jorg	negatív
		Panja	negatív
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Skócia (Blair Drummond)	Blossom	negatív
		Rosie	negatív
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Spanyolország (Madrid Zoo)	Mirinda	negatív
bonóbó (<i>Pan paniscus</i>)	Franciaország (La Vallée des Singes)	Kirembo	negatív
bonóbó (<i>Pan paniscus</i>)	Németország (Stuttgart Zoo)	Zorba	negatív
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Blackpool Zoo)	Victoria	negatív
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	6844	negatív
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Németország (Heidelberg Zoo)	Puan	pozitív
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Spanyolország (Madrid Zoo)	Kedua	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Anglia (Bristol Zoo Gardens)	Romina	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Dánia (Givskud Zoo)	Nille	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Franciaország (Amneville)	Ya Kwanza	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Frankfurt Zoo)	Julchen	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Krefeld Zoo)	Tumba	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Németország (Saarbrücken Zoo)	Pesco	negatív
gorilla (<i>Gorilla sp.</i>)	Svájc (Basel Zoo)	Goma	negatív
		Zungu	negatív

4.2. Bioinformatikai elemzések eredményei

Az NCBI BLAST eredménye alapján az őz minta esetén kimutatott AdV a pol gén rövid 77 nt hosszúságú szakaszán 65 nt-ban egyezett a BAdV-4-gyel. A főemlősök esetében a IVa2 gén alkalmasabb AdV szűrésre és összehasonlításra, így a főemlős eredetű mintáknál a IVa2 génre kapott szekvenciáinkat hasonlítottuk össze a GenBank-ban található szekvenciákkal. Ezek alapján a félmajmokból kimutatott AdV-ok különböző félmajom-AdV-okkal mutattak hasonlóságot. A vörös vari mintából eredményül kapott szekvencia 253 nt hosszúságú szakasza 220 nt-ban mutatott egyezést egy fekete-fehér variból kimutatott AdV-sal. A koronás makikban detektált AdV-oknál egy esetben 240 nt-ból 214 nt egyezett, míg a másik esetben 162 nt-ból 138 nt volt azonos egy koronás makiból korábban kimutatott AdV azonos szekvenciájával. Az emberszabásúaknál kapott szekvenciák többféle SAdV-sal és HAdV-sal mutattak rokonságot, kivétel a Puan nevű orangután mintája, ami újvilági majom AdV-ra hasonlított. Két orangután minta esetében a kimutatott AdV-ok 303 nt hosszúságú szakaszon mutattak 276 nt egyezést páviánból és makákóból származó SAdV-okkal. A csimpánzokban detektált AdV-ok 296 és 292 nt hosszúságú szekvenciái mutattak 289 és 281 nt egyezést a HAdV-E faj csimpánzokból és bonobókból kimutatott egyes típusaival (SAdV-23, -24, -25, -37, -38). A bonobóból kimutatott AdV 224 nt hosszúságú szakaszon 223 nt-ban mutatott egyezést a HAdV-C faj bonobókból detektált egyes típusaival (SAdV-42 és -44). A Puan nevezetű orangután mintájából eredményül kapott szekvencia 303 nt hosszúságú szakasza 228 nt-ban megegyezett egy mókusmajomból kimutatott AdV-sal. Az eredmények összefoglalva a 18. táblázatban láthatók.

18. táblázat: Az NCBI BLAST által kapott eredmények összefoglalása

Fajnév	Származási hely	Azonosító	Gén	Hasonló AdV
európai őz (<i>Capreolus capreolus</i>)	Magyarország (Petőfiszállás)	49215	pol	84% BAdV-4
vörös vari (<i>Varecia rubra</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma143	IVa2	87% fekete-fehér vari AdV
koronás maki (<i>Eulemur coronatus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma155	IVa2	89% koronás maki AdV
koronás maki (<i>Eulemur coronatus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma156	IVa2	85% koronás maki AdV
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma151	IVa2	91% SAdV-A, -B
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma152	IVa2	91% SAdV-A, -B
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma145	IVa2	98% HAdV-E
csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma146	IVa2	96% HAdV-E
bonobó (<i>Pan paniscus</i>)	Anglia (Twycross Zoo)	Ma159	IVa2	99% HAdV-C
orangután (<i>Pongo sp.</i>)	Németország (Heidelberg Zoo)	Puan	IVa2	75% mókusmajom- AdV

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Pozitív minták

A vizsgált bélsárminták egészséges egyedekből álló főemlős csoportokból származtak. Bár a közös kifutóban tartott azonos fajhoz tartozó állatok kórokozó faunája feltételezhetően megegyezik, ha csak egy egyed is fertőzött AdV-sal, a nagyobb egyedszám miatt az ilyen típusú minták (több egyednek otthont adó kifutóból származó bélsár minta) nagyobb eséllyel pozitívak, mint az egyedi minták. Az emberszabású szervminták esetében nem találtunk összefüggést az elhullást okozó myocarditis szívbetegség és a kimutatott AdV fertőzések között. Feltételezzük, hogy az AdV pozitivitás oka a betegség által legyengített immunrendszer miatti állapot lehet, hiszen immunszuppresszált vagy beteg állatokból származó mintákból nagyobb valószínűséggel lehet vírusokat sikeresen kimutatni. Az őz szervminta egy, szemmel láthatóan beteg, legyengült állapotban lévő állatból származott. Ebben az esetben sem megerősíteni, sem cáfolni nem tudjuk az AdV pozitivitás és a betegség kialakulása közti ok-okozati összefüggést, mivel az erdészet által több állatnál is tapasztalt tünetek és többszöri próbálkozásunk ellenére sem sikerült újabb egyedekből mintát szereznünk.

A pol, IVa2, pVIII és hexon géneket célzó PCR-ek esetében minden alkalommal degenerált, konszenzus primereket alkalmaztunk és a primer kötődési lépésnél (annealing) alacsony hőmérsékletet állítottunk be (~46°C). Ezt a viszonylag alacsony hőmérsékletet a diagnosztikai PCR széles detektálási spektruma miatt alkalmazzák, mivel az alacsonyabb annealing hőmérsékletnél a primer kötődés során az A-T, C-G nukleotid párosítás egyes pontokon megengedőbb lehet, így a nem tökéletes komplement/kiegészítő szekvenciájú DNS-hez is kapcsolódhat az alkalmazott primer. Ennek eredményeképpen előfordulhat, hogy nem virális genomrészek is felerősödnek. Ezek általában bakteriális vagy gazdaszervezet eredetű génszakaszok. Ebből adódóan mindig szükséges a szekvenálás elvégzése is a pozitívnak tűnő PCR-ek megerősítésére.

Főemlősöknél a IVa2 gén kimutatására irányuló PCR hatékonyabbnak bizonyult, mint a pol gént célzó. A mostani vizsgálataink megerősítették a laboratóriumunk által korábban leírt tapasztalatot, miszerint a IVa2 PCR magasabb szerveződési szintű emlősöknél (jellemzően főemlősök) hatékonyabb az egyébként alkalmazott pol PCR-nél (Podgorski et al., 2018). Mivel a GenBank-ban az AdV-ok szekvenciái sok esetben hiányosak a IVa2 génre nézve, érdemes próbálkozni a pol gén kimutatásával is, hogy minél hosszabb szekvenciát kapjunk a detektált

AdV-ból. Ez azért is fontos, mivel más állatok AdV-ai esetén általában a pol szakasz ismert és ezáltal jobban használható a filogenetikai elemzések során.

A IVa2-pol szakasz összekötésére irányuló kísérleteinkhez specifikus primereket használtunk. Ennek ellenére nem sikerült felerősíteni a kívánt genomszakaszt. A IVa2-pol szakasz felerősítésének sikertelenségét feltételezhetően a mintában található túl kevés vírus DNS és a PCR optimalizálására fennálló elégtelen idő okozhatta.

5.2. Emlősök és adenovírusok koevolúciója

Az általunk európai őzből kimutatott atadenovírus a pol gén alapján a BAdV-4-gyel mutat nagyfokú hasonlóságot. A BAdV-4 a BAdV-6-tal, OAdV-7-tel és a két ismert szarvas AdV közül a szarvas-AdV-1-gyel alkot monofiletikus kládot az *Atadenovirus* nemzetségen belül (Harrach et al., 2019; Miller et al., 2017; Barbezange et al., 2000). Ez az eredmény tovább erősíti a témacsoport vírus-gazda koevolúció elméletét. Esetünkben feltételezhetjük annak a lehetőségét, hogy a kimutatott vírus, gazdaváltás során került az őzbe. A „frissen” gazdát váltott AdV-ok jellemzően komoly betegséget okoznak az új gazdaszervezetben. Magyarországon jelentős vad- és haszonállat állomány található, amik elkerülhetetlenül érintkeznek egymással. Ráadásul az európai őz kifejezetten túlnépesedettnek számít az országban és egy populáció túlnépesedése általános állapotleromlást eredményez. Egy legyengült, beteg állat esetén az ilyen módon szerzett vírusfertőzés kockázata is magasabb. Széles gazdaspektrumú, feltételezhetően gazdát váltott AdV-ra jó példa az említett szarvas-AdV-1-en kívül pl. a kutya-AdV-1 is, amit kutyán kívül többek között farkasból, rókából, vidrából és medvéből is kimutattak és filogenetikailag egyes denevér AdV-okkal alkot egy kládot (Vidovszky et al., 2015; Balboni et al., 2019; Harrach et al., 2019).

A főemlősök esetén a félmajmokból származó mintákból kimutatott AdV-ok a IVa2 gén alapján több félmajom-AdV-sal mutattak nagyfokú hasonlóságot. A vörös variból kimutatott AdV egy közeli rokon félmajom fajból, fekete-fehér variból, kimutatott AdV-sal, míg a két koronás maki mintából kimutatott AdV-ok koronás maki AdV-sal mutatják a legnagyobb mértékű hasonlóságot. Ezzel további bizonyítékot nyertünk a legősibb főemlősök, a félmajmok AdV-ainak a többi majom-AdV-tól való evolúciós távolságára, vagyis, hogy elkülönülnek azoktól és egyben ezek a legősibbek a főemlős-AdV-ok közül. Ugyanakkor egymáshoz nagyon hasonlóknak bizonyultak a félmajmok AdV-ai. Ennek jelentősége, hogy eddig csak nagyon

kevés ilyen adat áll rendelkezésre, kizárólag a laboratóriumunk írt le félmajom AdV-okat korábban (Podgorski et al., 2018).

Az általunk emberszabásúakból kimutatott AdV-ok a IVa2 gén alapján, három kivétellel, HAdV-okkal mutatnak hasonlóságot. A két csimpánz mintából kimutatott AdV-ok a HAdV-E, míg a bonobóból kimutatott AdV a HAdV-C faj több emberszabásúból származó AdV-aival mutatja a legnagyobb fokú hasonlóságot. A HAdV-E fent említett típusait korábban csimpánzokból és bonobókból mutatták ki, míg a HAdV-C típusait bonobókban detektálták (Roy et al., 2004; Roy et al., 2009). Mindez ismét az AdV-ok és gazdáik közti koevolúció elméletet támogatja (akárcsak a félmajmok és AdV-aik esetében).

Az orangután eredetű Ma151 és Ma152 azonosítójú mintákból kimutatott AdV-ok a IVa2 gén alapján páviánból és makákóból származó SAdV-okra hasonlítottak leginkább (Chiu et al., 2013; Roy et al., 2012). A Puan nevű orangután szívminájából kimutatott AdV pedig mókusmajom AdV-sal mutatott hasonlóságot (Rogers et al., 2020). Ezek a legérdekesebb eredmények, hiszen inkább vártunk volna emberszabásúakból korábban leírt AdV-okkal való egyezést. Ismételten megjegyzendő, hogy eddig még senki nem írt le orangutánból származó AdV-t, ez adja eredményünk fontosságát. Érdekes megjegyezni az orangutánok vizsgálatánál, hogy eltérő, különböző típusú minták esetében is alacsonyabb rendű majom-AdV-ra hasonlító AdV-t találtunk. Kettő esetében állatkerti bélsármintákról lévén szó felmerülhet a közelmúltban történt gazdaváltás lehetősége és a fogvatartott állatok közti kontamináció esélye is. Ezen események potenciális katalizátora az állatkerti környezet lehetett.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Adenoviridae* víruscsalád hat nemzetségre oszlik. Ezek közül két nemzetség képviselői találhatók meg emlős gazdaszervezetekben. A *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozó AdV-ok kizárólag emlősöket fertőznek, a rágcsálóktól kezdve, a párosujjú patásokon és denevéreken át, egészen a főemlősökig. Az *Atadenovirus* nemzetség képviselőit emlősök közül kizárólag kérődzőkből mutatták ki. Az emlősökön kívül a nemzetségbe tartozó AdV-ok madarakat és pikkelyes hüllőket fertőznek.

Kutatásunk célja hazai, vadonélő emlősöktől és európai állatkerti főemlősöktől származó szerv- és bélsáreredetű minták szűrése volt AdV-okra és az így kimutatott vírusok jellemzése. Vizsgálataink során az AdV-ok és gazdaszervezeteik között fennálló koevolúcióra kerestünk bizonyítékokat.

A vizsgálatok során 47 darab szerv- és bélsármintát szűrtünk AdV-ra. A minták európai őztől (*Capreolus capreolus*), eurázsiai hódától (*Castor fiber*) és különböző főemlős fajoktól származtak. Utóbbiak két nagy csoportra oszthatók, félmajmokra, ahonnan vörös vari (*Varecia rubra*), gyűrűsfarkú maki (*Lemur catta*) és koronás maki (*Eulemur coronatus*) mintákat vizsgáltunk, és emberszabásúakra, amelyek közül orangután (*Pongo sp.*), gorilla (*Gorilla sp.*), csimpánz (*Pan troglodytes*) és bonobó (*Pan paniscus*) eredetű mintákat vizsgáltunk. Az AdV DNS kimutatására egy- illetve kétkörös PCR-t használtunk. A PCR-ek négy AdV gén (DNS-függő DNS-polimeráz, IVa2, pVIII, hexon) egy-egy rövid szakaszának felerősítésére irányultak. A PCR-ek eredményeit agaróz gélelektroforézissal ellenőriztük. A pozitív minták PCR termékeit megszekvenáltuk.

Az általunk kimutatott vírusok közül az őzben talált AdV az *Atadenovirus* nemzetségbe tartozó új vírusnak bizonyult, és a kérődzőket fertőző atadenovírusokkal mutat rokonságot. A vörös variból és koronás makikból kimutatott vírusok különböző félmajom-AdV-okra hasonlítanak nagymértékben, míg az emberszabásúakból származó AdV-ok több, korábban kimutatott majom-AdV-sal mutatnak nagyfokú egyezést. Elsőként írtunk le orangutánokból származó AdV-okat, amik két esetben páviánból és makákóból származó AdV-okkal, míg egy másik esetben közönséges mókusmajomból származó AdV-sal mutattak hasonlóságot. Eredményeink alátámasztják az AdV-ok és gazdáik között feltételezett koevolúciós elméletet.

7. SUMMARY

The family *Adenoviridae* contains six genera. Members of two genera can be detected in mammalian hosts. AdVs belonging to the genus *Mastadenovirus* infect exclusively mammals, from rodents, through even-toed ungulates and bats, to primates. Virus members of genus *Atadenovirus* were confirmed to infect only one type of mammals, namely ruminants. Besides this, AdVs of this genus also infect birds and scaled reptiles (squamates).

The aim of our research project was the AdV screening of native, wild mammals and primates living in captivity, and characterizing the detected novel AdVs. Furthermore, our goal was also the study of virus-host coevolution in context of AdVs.

We screened 47 organ and fecal samples for the presence of AdVs. The samples originated from roe deer (*Capreolus capreolus*), Eurasian beaver (*Castor fiber*) and different primate species. The samples of primate species divided to prosimians, such as red ruffed lemur (*Varecia rubra*), ring-tailed lemur (*Lemur catta*) and crowned lemur (*Eulemur coronatus*), and apes, like orangutan (*Pongo sp.*), gorilla (*Gorilla sp.*), chimpanzee (*Pan troglodytes*) and bonobo (*Pan paniscus*). For the detection of adenoviral DNA, we applied single-round and nested PCRs. The primers of the PCRs targeted four different AdV gene parts (DNA-dependent DNA polymerase, IVa2, pVIII, hexon). The results of the PCRs were checked by agarose gel electrophoresis. The PCR products were sequenced.

From the detected AdVs the one, found in roe deer, proved to be a new AdV and showed similarity to ruminant atadenoviruses. The AdVs detected in red ruffed lemur and crowned lemurs showed closer relation to known AdVs of prosimians. AdVs detected in apes showed high similarity to AdVs of monkeys. This is the first description of AdVs from orangutans. In two occasions, these AdVs showed the closest relation to baboon and macaque AdVs, and in one case to squirrel monkey AdV. Our results support the theory of the AdV-host coevolution.

8. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Abendroth, B., Höper, D., Ulrich, R. G., Larres, G., Beer, M., 2017: A red squirrel associated adenovirus identified by a combined microarray and deep sequencing approach. *Archives of Virology*, 162, p. 3167–3172
- Balboni, A., Musto, C., Kaehler, E., Verin, R., Caniglia, R., Fabbri, E., Carra, E., Cotti, C., Battilani, M., Delogu, M., 2019: Genetic characterization of canine adenovirus type 1 detected by real-time polymerase chain reaction in an oral sample of an Italian wolf (*Canis lupus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 55, 3, p. 737–741
- Barbezange, C., Benkő, M., Dan, A., Harrach, B., 2000: DNA sequencing and phylogenetic analysis of the protease gene of ovine adenovirus 3 suggest that adenoviruses of sheep belong to two different genera. *Virus Research*, 66, 1, p. 79–85
- Benkő, M., 2008: Adenoviruses: Pathogenesis. In: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Oxford, Elsevier. p. 24–29
- Chen, E. C., Yagi, S., Kelly, K. R., Mendoza, S. P., Tarara, R. P., Canfield, D. R., Maninger, N., Rosenthal, A., Spinner, A., Bales, K. L., Schnurr, D. P., Lerche, N. W., Chiu, C. Y., 2011: Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLOS Pathogens*, 7, 7, e1002155
- Chiu, C. Y., Yagi, S., Lu, X., Yu, G., Chen, E. C., Liu, M., Dick, E. J. Jr., Carey, K. D., Erdman, D. D., Leland, M. M., Patterson, J. L., 2013: A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio*, 4, 2, e00084–13
- Evans, P. S., Benkő, M., Harrach, B., Letchworth, G. J., 1998: Sequence, transcriptional analysis, and deletion of the bovine adenovirus type 1 E3 region. *Virology*, 244, p.173–185
- Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K., Angus, B., Becker, S., Belij-Rammerstorfer, S., Bellamy, D., Bibi, S., Bittaye, M., Clutterbuck, E. A., Dold, C., Faust, S. N., Finn, A., Flaxman, A. L., Hallis, B., Heath, P., Jenkin, D., Lazarus, R., Makinson, R., Minassian, A. M., Pollock, K. M., Ramasamy, M., Robinson, H., Snape, M., Tarrant, R., Voysey, M., Green, C., Douglas, A. D., Hill, A. V. S., Lambe, T., Gilbert, S. C., Pollard, A. J., Oxford COVID Vaccine Trial Group, 2020: Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a

phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 396, 10249, p. 467–478

- Harrach, B., 2008: Adenoviruses: General Features. In: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. Oxford, Elsevier. p. 1-9
- 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
- Hofmann-Sieber, H., Gonzalez, G., Spohn, M., Dobner, T., Kajon, A. E., 2020: Genomic and phylogenetic analysis of two guinea pig adenovirus strains recovered from archival lung tissue. *Virus Research*, 285, 197965
- Hoppe, E., Pauly, M., Gillespie, T. R., Akoua-Koffi, C., Hohmann, G., Fruth, B., Karhemere, S., Madinda, N. F., Mugisha, L., Muyembe, J. J., Todd, A., Petrzalkova, K. J., Gray, M., Robbins, M., Bergl, R. A., Wittig, R. M., Zuberbühler, K., Boesch, C., Schubert, G., Leendertz, F. H., Ehlers, B., Calvignac-Spencer, S., 2015: Multiple cross-species transmission events of human adenoviruses (HAdV) during hominine evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 8, p. 2072–2084
- 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
- Kiss, I., Matiz, K., Allard, A., Wadell, G., Benkő, M., 1996: Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica*, 44, 2, p. 243–251
- Klempa, B., Krüger, D. H., Auste, B., Stanko, M., Krawczyk, A., Nickel, K. F., Überla, K., Stang, A., 2009: A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. *Journal of Virology*, 83, 11, p. 5749–5759
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zheng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., Wolf, J. M., Reid, R. R., He, T. C., 2017: Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, 4, 2, p. 43-63
- Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tikhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., Dzharullaeva, A. S., Kovyreshina, A. V., Lubenets, N. L., Grousova, D. M., Erokhova, A. S., Botikov, A. G., Izhaeva, F. M., Popova, O., Ozharovskaya, T. A.,

Esmagambetov, I. B., Favorskaya, I. A., Zrelkin, D. I., Voronina, D. V., Shcherbinin, D. N., Semikhin, A. S., Simakova, Y. V., Tokarskaya, E. A., Egorova, D. A., Shmarov, M. M., Nikitenko, N. A., Gushchin, V. A., Smolyarchuk, E. A., Zyryanov, S. K., Borisevich, S. V., Naroditsky, B. S., Gintsburg, A. L., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group, 2021: Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*, 397, 10275, p. 671–681

- Miller, M. M., Cornish, T. E., Creekmore, T. E., Fox, K., Laegreid, W., McKenna, J., Vasquez, M., Woods, L. W., 2017: Whole-genome sequences of *Odocoileus hemionus* deer adenovirus isolates from deer, moose and elk are highly conserved and support a new species in the genus *Atadenovirus*. *Journal of General Virology*, 98, 9, p. 2320–2328
- Podgorski, I. I., Pantó, L., Földes, K., de Winter, I., Jánoska, M., Sós, E., Chenet, B., Harrach, B., Benkő, M., 2018: Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus-host co-evolution. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66, 3, p. 474-487
- Podgorski, I. I., Pantó, L., Papp, T., Harrach, B., Benkő, M., 2016: Genome analysis of four Old World monkey adenoviruses supports the proposed species classification of primate adenoviruses and reveals signs of possible homologous recombination. *Journal of General Virology*, 97. 7. p. 1604-1614
- Rein, D. T., Breidenbach, M., Curiel, D. T., 2006: Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncology*, 2, 1, p. 137–143
- Ridpath, J. F., Neill, J. D., Palmer, M. V., Bauermann, F. V., Falkenberg, S. M., Wolff, P. L., 2017: Isolation and characterization of a novel cervid adenovirus from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns in a captive herd. *Virus Research*, 238, p. 198–203
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., Ward, T. G., 1953: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84, 3, p. 570–573
- Rogers, D. L., Ruiz, J. C., Baze, W. B., McClure, G. B., Smith, C., Urbanowski, R., Boston, T., Simmons, J. H., Williams, L., Abee, C. R., Vanchiere, J. A., 2020: Epidemiological and molecular characterization of a novel adenovirus of squirrel

monkeys after fatal infection during immunosuppression. *Microbial Genomics*, 6, 9, mgen000395

- Roy, S., Gao, G., Clawson, D. S., Vandenberghe, L. H., Farina, S. F., Wilson, J. M., 2004: Complete nucleotide sequences and genome organization of four chimpanzee adenoviruses. *Virology*, 324, 2, p. 361–72
- Roy, S., Sandhu, A., Medina, A., Clawson, D. S., Wilson, J. M., 2012: Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Journal of Infectious Diseases*. 18, 7, p. 1081–1088
- Roy, S., Vandenberghe, L. H., Kryazhimskiy, S., Grant, R., Calcedo, R., Yuan, X., Keough, M., Sandhu, A., Wang, Q., Medina-Jaszek, C. A., Plotkin, J. B., Wilson, J. M., 2009: Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLOS Pathogens*, 5, 7, e1000503
- Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwegh, D., Truyers, C., de Groot, A. M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P-J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K. E., De Rosa, S. C., Cohen, K. W., McElrath, M. J., Cormier, E., Scheper, G., Barouch, D. H., Hendriks, J., Struyf, F., Douoguih, M., Hoof, J. V., Schuitemaker, H., 2021: Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine, *The New England Journal of Medicine* (online)
- Vidovszky, M. Z., 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 Veterinaria Hungarica*, 63, 4, p. 508–525
- Vidovszky, M. Z., Szeredi, L., Doszpoly, A., Harrach, B., Hornyák, Á., 2019: Isolation and complete genome sequence analysis of a novel ovine adenovirus type representing a possible new mastadenovirus species. *Archives of Virology*, 164, p. 2205–2207
- Wellehan, J. F. X., 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, p. 13366–13369

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Vidovszky Mártonnak, és a témacsoport vezetőjének, Harrach Balázsnak, akik szaktudásukkal, hasznos magyarázataikkal és tanácsaikkal hatalmas segítséget nyújtottak szakdolgozatom elkészüléséhez. Köszönet a hasznos főemlős mintákért Dr. Liptovszky Mátyás állatorvosnak. Valamint szeretnék köszönetet mondani a Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoport munkatársainak, akik szintén nagy segítséget nyújtottak szakdolgozatomhoz.

Hálával tartozom továbbá családomnak, akik tanulmányaim során sok türelemmel és gondoskodással támogattak, és minden helyzetben mellettem álltak.

Külön köszönöm páromnak, Lucának, hogy megértéssel és szeretettel támogatta céljaim elérését.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni szaktársaimnak, barátaimnak, akik hasznos tanácsokkal járultak hozzá a szakdolgozatomhoz és végig segítséget nyújtottak a tanulmányaim során.

Köszönöm mindenkinek!

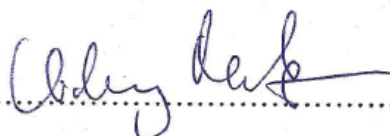
Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Vidovszky Márton PhD igazolom, hogy a Mitró Gergő által készített

Vadonélő és állatkerti emlősök adenovírusainak vizsgálata

című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021 április 30.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vidovszky Márton', is written over a horizontal dotted line.

Vidovszky Márton PhD

Molekuláris és Összehasonlító Témacsoport

Állatorvos-tudományi Kutatóintézet