

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Pulyka-, liba- és más madár-adenovírusok
genetikai vizsgálata**

PhD értekezés

dr. Kaján Győző

2011

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Benkő Mária
Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témavezető

Dr. Dán Ádám
Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága
témabizottság tagja

Prof. Dr. Harrach Balázs
Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....
dr. Kaján Győző

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás.....	7
2. Bevezetés	9
3. Irodalmi áttekintés	11
3.1. Adenovírusok.....	11
3.1.1. Az adenovírusok morfológiája, genomszerveződése és replikációja.....	11
3.1.2. Az adenovírusok rendszertana	13
3.1.3. Az adenovírusok evolúciója	15
3.2. Az <i>Aviadenovirus</i> génusz.....	15
3.3. Pulyka-adenovírusok	16
3.4. Liba-adenovírusok	17
3.5. Tyúk-adenovírusok	18
3.6. Az aviadenovírusok, tyúk-adenovírusok molekuláris diagnosztikája.....	21
4. Anyag és módszer.....	23
4.1. A vírusok eredete, izolálása és tisztítása	23
4.2. A virális DNS kivonása.....	25
4.3. DNS kivonása szervmintákból	25
4.4. Gélelektroforézis.....	26
4.5. A virális DNS klónozása.....	26
4.6. A plazmid DNS tisztítása alkalikus mini plazmid preparálással	27
4.7. Alkalmazott PCR módszerek	28
4.7.1. Réskitöltő PCR-ek a genomszekvenálások során	28
4.7.2. Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló PCR.....	28
4.7.3. A tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló PCR.....	29
4.8. PCR-termékek tisztítása	30
4.9. DNS-szekvenálás	31
4.10. Alkalmazott bioinformatikai módszerek	31
4.11. Filogenetikai elemzések.....	32
5. Eredmények	33
5.1. A genomok virtuális restrikciós endonukleázos emésztése, és a belfasti TAdV-1 és -2 törzs vizsgálata	33
5.2. A pulyka- és liba-adenovírus 1 genomjának tulajdonságai.....	33
5.2.1. Általános tulajdonságok.....	33
5.2.2. A genomok központi régiója	35
5.2.3. Bal genomvég	35
5.2.4. Jobb genomvég.....	36

5.2.5. ITR	37
5.2.6. Feltételezések az RNS-splicing folyamatáról	37
5.2.7. Proteáz vágási szignálok	37
5.3. A pulyka- és liba-adenovírus 1 rendszertani helyének elemzése	39
5.4. A tyúk-adenovírus referenciatörzsek filogenetikai elemzése	39
5.5. Egyéb madár-adenovírus minták filogenetikai elemzése	43
6. Megbeszélés	45
6.1. A D90/2 pulyka-adenovírus törzs és a P29 liba-adenovírus törzs típusba sorolása	45
6.2. A DNS-szekvenálási módszerek összehasonlítása	45
6.3. A pulyka- és liba-adenovírus 1 genomja	46
6.3.1. A genomok központi régiója	46
6.3.2. Bal genomvég	48
6.3.3. Jobb genomvég	49
6.3.4. ITR	50
6.3.5. Splicing	51
6.3.6. Proteáz vágási szignálok	52
6.3.7. A pulyka-adenovírus 1 és 3, valamint a liba-adenovírus 1 és a kacsadenovírus 1 összehasonlítása	52
6.4. A pulyka- és liba-adenovírus 1 típus filogenetikája	52
6.5. A tyúk-adenovírus referencia törzsek filogenetikája; polimeráz gén alapú PCR a diagnosztikai kimutatásukra	55
6.6. Egyéb madár-adenovírus minták PCR-es szűrése; új vírusok filogenetikája	56
7. Új tudományos eredmények	59
8. Irodalom	61
9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények	73
9.1. Lektorált, impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk	73
9.2. Könyvfejezet	73
9.3. Konferencia prezentációk	73
9.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	74
10. Köszönetnyilvánítás	75

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol	Magyar
bp	basepair	bázispár
BLAST	basic local alignment search tool	-
CELO	chicken embryo lethal orphan	csirkeembrió letális árvavírus
DAdV	duck adenovirus	kacsa-adenovírus
DBP	DNA-binding protein	DNS-kötő fehérje
DNS	deoxyribonucleic acid (DNA)	deoxiribonukleinsav
dNTP	mixture of deoxyribonucleotide triphosphates	dezinukleotid-trifoszfátok keveréke
EDS	egg drop syndrome	tyúk tojánhéjképződési zavara
EDSV	egg drop syndrome virus	tyúk tojánhéjképződési zavarának vírusa
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
FAdV	fowl adenovirus	tyúk-adenovírus
GoAdV	goose adenovirus	liba-adenovírus
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	izopropil beta-D-tiogalaktopiranozid
ITR	inverted terminal repeat	fordított végismétlődés
kbp	kilo base pair	ezer bázispár
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani médium
MLP	major late promoter	fő késői promóter
ORF	open reading frame	nyílt leolvasási keret
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
pTP	precursor of terminal protein	terminális fehérje prekuzora
RFLP	restriction fragment length polymorphism	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
rpm	revolutions per minute	fordulatszám
SOC	super optimal broth with catabolite repression	-
TAdV	turkey adenovirus	pulyka-adenovírus
TAE	tris base-acetic acid-EDTA	trisz-ecetsav-EDTA
TE	tris base-EDTA	trisz-EDTA
TEG	tris base-EDTA-glucose	trisz-EDTA-glükóz
THEV	turkey hemorrhagic enteritis virus	pulyka vérzéses bélgyulladásának vírusa
TP	terminal protein	terminális fehérje
trisz	tris (hydroxymethyl) aminomethane	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid

1. Összefoglalás

Az adenovírusok (*Adenoviridae* család) jelenlegi rendszertani beosztása szerint, madarakat fertőző adenovírusok tartoznak az *Aviadenovirus* génusz mellett a *Si-*, és *Atadenovirus* génuszba is. A madaraktól izolált adenovírusok közül munkám kezdetekor négynek is ismert volt a teljes genomja, nevezetesen a pulyka-adenovírus 3, kacsza-adenovírus 1, tyúk-adenovírus 1 és tyúk-adenovírus 9 genomja, de mindössze utóbbi két típus tartozik az *Aviadenovirus* nemzetségbe. (Legújabban publikálták a tyúk-adenovírus 8 (FAdV-8) teljes genomját is, de a tyúk-adenovírusokon kívül más baromfi-adenovírus teljes genomját nem elemezték még részletesen.) Előzetes elemzéseink szerint a vízibaromfifélék adenovírusai filogenetikailag elkülönülnek a tyúkalakúak adenovírusaitól. Munkám fő célja ezért egy pulykából és egy libából izolált, hazai adenovírus törzs teljes genomszekvenciájának meghatározása és elemzése volt. Vizsgáltam továbbá egyéb madaraktól származó mintákat is adenovírusok jelenlétére.

A pulyka-adenovírus 1 (angol nevéből TAdV-1) genomjának nukleotidsorrendjét a véletlenszerű klónozás, a liba-adenovírus 1 (szintén angol nevéből GoAdV-1) genomjának nukleotidsorrendjét a „sörétespuska” (shotgun) szekvenálás módszerével állapítottuk meg. Továbbá egy tyúk-adenovírus referencia törzsgyűjtemény eddig nem vizsgált tagjaiból, valamint egyéb madár-adenovírus mintákból részleges DNS-függő DNS-polimeráz és hexon gén szakaszokat erősítettünk fel PCR-rel, és ezek szekvenciáin alapuló összehasonlító filogenetikai elemzéseket végeztünk.

Megállapítottuk, hogy a TAdV-1 genomja a leghosszabb közölt adenovírus genom (45.413 bp) a legmagasabb ismert G+C-tartalommal (67,55%). Az ITR-ek hossza 95 bp, ami az aviadenovírusok között a leghosszabb. A GoAdV-1 genomját 43.376 bp hosszúnak találtuk, 44,6%-os G+C-tartalommal és 39 bp méretű ITR-rel.

Mindkét genom központi régiója megőrzött sorrendben tartalmazza azt a 16 gént, mely minden adenovírusban így található meg. Ezekhez illeszkedik még az U-exon és a fiber génje, a három ismert genomú tyúk-adenovírusban tapasztalhatóhoz hasonlóan. A TAdV-1 genomjában egy teljes és két csökevényes fiber gént találtunk, a GoAdV-1 genomjában pedig két teljeset. A filogenetikai elemzések és az összehasonlító genomanalízis bizonyította, hogy a TAdV-1 közeli rokona a FAdV-oknak: a TAdV-1 bal genomvégén megtaláltuk az ORF0, ORF1, ORF1A, ORF1B, ORF2, ORF12, ORF13, ORF14 és ORF24, míg a jobb végén a lipáz, ORF8, ORF9, ORF11, ORF17, ORF20, ORF20A, ORF22 és ORF26 homológját. Mindössze egy

olyan ORF-et (ORF50) találtunk az egész genomban, melynek származtatott terméke nem mutatott homológiát a GenBankban található egyetlen fehérjével sem. Hasonló elemzések sokkal távolabbi kapcsolatot jeleztek a GoAdV-1 és a FAdV-ok között: a bal genomvégén az ORF1, ORF2, ORF12 és ORF24 homológját, valamint 2 új ORF-et (ORF51, ORF60) találtunk. A jobb végén az ORF20, ORF20A és ORF22 homológját találtuk meg, a lipáz gént duplikálódva, és 8 teljesen új ORF-et (ORF52-ORF59).

Az évtizedekkel ezelőtt leírt TAdV-1 és GoAdV-1 eredeti izolátuma mára nem elérhető, szekvencia pedig nem áll rendelkezésre belőlük. Ezért célszerűnek látszik, hogy a témában különösen aktív kutatókkal történő egyeztetés után az általunk szekvenált D90/2 pulyka-adenovírus és P29 liba-adenovírus törzs képviselje ezentúl a pulyka-adenovírus 1 és liba-adenovírus 1 típusokat. Elemzéseink szerint továbbá ezen TAdV-1 és GoAdV-1 törzsek távolsága más törzsektől megalapozza ezek fajszintű elkülönítését is. Ezért a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság felé hivatalos javaslatot fogunk tenni, melyben javasoljuk a Turkey adenovirus B faj elfogadását a TAdV-1 típus részére, továbbá a GoAdV-1 típus besorolását a *Goose adenovirus* fajba.

Meghatároztuk a virális DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges nukleotidsorrendjét a tyúk-adenovírusok tíz olyan típusának referenciatörzséből, melyből ez eddig nem volt elérhető. Eredményeink szerint a madár-adenovírus minták PCR-es vizsgálata alapján hazánkban a leggyakoribb tyúk-adenovírusok a FAdV-D és -E, valamint ritkábban a FAdV-A fajokba sorolhatók. Először állapítottuk meg Magyarországon egy FAdV-B fajba sorolható törzs jelenlétét molekuláris módszerrel. A vadmadár mintákból at-, avi- és sziaadenovírusok is kimutathatóak voltak.

2. Bevezetés

A baromfifajokban előforduló adenovírusokat a 2005-ben hivatalossá vált rendszertani beosztás szerint három nemzetségbe soroljuk az *Adenoviridae* családon belül. A *Si-* és *Atadenovirus* génuszba egy-egy baromfiból izolált adenovírus tartozik, és mindkettőnek ismert a teljes genomszekvenciája. Azonban a madár-adenovírusok többségét magában foglaló *Aviadenovirus* nemzetség tagjai közül munkám kezdete előtt csupán két házityúk-adenovírus teljes genomjának elemzését közölték. A pulyka vagy a vízibaromfi fajok aviadenovirusaiból csak a legfontosabb kapszid fehérje, a hexon génjének rövid szakaszaiból volt ismert szekvencia.

Részleges hexon gén szekvenciák alapján végzett előzetes törzsfarekonstrukciós számításaink szerint a lúdalakúak (Anseriformes) aviadenovirusai határozottan elkülönülnek a tyúkalakúak (Galliformes) aviadenovirusaitól. Ezzel szemben a pulyka aviadenovirusai nagyfokú hasonlóságot mutatnak a házityúk aviadenovirusaival. Nem tudtuk azonban, hogy a vírusok genetikai szerveződésének szintjén mekkora különbségek várhatóak a két csoport között.

A DNS-kimutatáson alapuló, modern és érzékeny diagnosztikai módszerek alkalmazásával kiderült, hogy adenovírusok jelenléte a hazai libaállományokban nem ritka, de esetleges kórtani szerepükre vonatkozó adatok nem álltak rendelkezésünkre.

Egy hazai izolálású pulyka-adenovírus törzs molekuláris klónozását és DNS-szekvenálását már elkezdték laboratóriumunkban. Ezért munkám céljából ennek a törzsnek a teljes genomszekvenálását tűztük ki. Továbbá egy szintén hazánkban izolált liba-adenovírus törzs teljes genomjának bázis-sorrendjét is meg kívántuk határozni. Ezután számítógépes programok segítségével terveztük azonosítani a más adenovírusokban is megtalálható, ismert géneket, és elemezni a várhatóan előforduló ismeretlen ORF-ek méretét, számát és pontos helyeződését.

A genomszekvenálási projekttel párhuzamosan terveztük további pulyka-, liba-, tyúk- és vadmadár-adenovírus minták vizsgálatát olyan esetekből, amelyek háttérben adenovírusok, mint kórokozók feltételezhetőek. Ezekből PCR segítségével terveztük felerősíteni a hexon gén bizonyos szakaszait, majd szekvenciájukat meghatározva ennek alapján tipizálni a vírusokat. Megkíséreltük más génszakaszok (DNS-polimeráz) PCR-rel történő felerősítését is, és vizsgáltuk ezek alkalmazhatóságát a tipizálásban.

Kutatásaink nemzetközi érdeklődésre is számot tartó, elméleti és gyakorlati eredményekkel is kecsegtettek. Feltételeztük, hogy alapkutatási eredményeink a madár-adenovírusok rendszertanának és feltételezett evolúciós útjának pontosításához

járulhatnak hozzá. A diagnosztikai módszerek tökéletesítése, az egyes kórképek és adenovírus típusok közötti esetleges összefüggések feltárása pedig fontos adatokat szolgáltat a baromfi-egészségügy számára.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Adenovírusok

Az első adenovírusokat gyermekek műtéti úton eltávolított mandulájából előállított szövettanyészet készítése során fedezték fel (Rowe et al., 1953). A jellegzetes sejtlekerekedést okozó citopatogén vírust először adenoidál-faringeál-konjunktivál ágensnek nevezték el (Huebner et al., 1954), majd később adenovírusnak. Az adeno- előtag a görög „aden” szóból ered, mely mirigyet jelent, így utalva a vírus izolálására. Heveny felső légúti megbetegedések oktatni vizsgálata során hamarosan újabb szerotípusokat izoláltak. Mindössze néhány év múlva már több háziállatból kimutattak szérumneutralizációs próbákkal elkülöníthető adenovírusokat. Napjainkra adenovírust a gerincesek minden osztályának képviselőiből izoláltak, ideértve a halakat is (Benkő et al., 2005).

3.1.1. Az adenovírusok morfológiája, genomszerveződése és replikációja

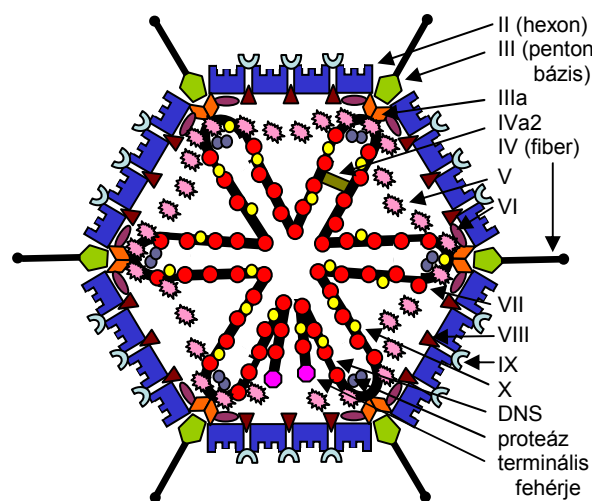
Az adenovírusok közepes méretű (70–90 nm), burok (envelope) nélküli DNS-vírusok. A virion kapszidja ikozaéder alakú, a fő szerkezeti fehérje neve a hexon. A kapszid 20 lapja összesen 240 darab homotrimer hexonból épül fel. A kapszid 12 csúcsán az ún. penton található, mely a pentonbázis és a megnyúlt fiber együttese. Az aviadenovírusok esetében minden pentonbázis két fibert tartalmaz (Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982). Más fehérjék vagy szintén a kapszid felépítésében vesznek részt (IIIa, VI, VIII és IX), vagy a víruskapszidon belül helyeződnek. Utóbbiak többsége a virális DNS-hez kötött (V, VII, μ , IVa2 és a terminális fehérje), az egyetlen nem asszociált fehérje a virális proteáz (Russell, 2009). Az V és IX fehérje csak a masztadenovírusokban található (Harrach, 2008) (1. ábra). A virális fehérjéket először római számozással nevezték el a poliakrilamid gélelektroforézis kép alapján nagyság szerint számozva. Az először római egyessel (I) jelölt fehérje később nem megfelelően disszociált kapszidfehérjék egységének bizonyult, ezért ma a római kettessel (II, hexon) kezdődő számozást alkalmazzuk.

Az adenovírusok genomja lineáris, duplaszálú DNS-genom, mely mindkét szálon kódol. A jobbra átíródó szálat *r*, a balra átíródót *l* szálnak nevezik. A genom hossza 26–45 kbp. A genom két végén egy fordítottan ismétlődő végszekvencia (inverted terminal repeat, ITR) található, mely 36–368 bp hosszúságú. A genom DNS-szálainak 5'

végeihez kovalens kötással kötődik a terminális fehérje (TP), a genomiális G+C-tartalom 33,7–67,55% között változik. A genom központi magja megőrzött az egész víruscsaládban, míg a terminális részek nagy különbségeket mutatnak a nemzetségek között mind hosszban, mind géntartalomban, nemzetség-, faj- esetleg típus-specifikus géneket tartalmaznak (Davison et al., 2003; Harrach, 2008).

Az RNS-átszabást, a splicingot, az adenovírusok kutatása során írták le először, több alternatív splice-helyet is leírtak a humán adenovírus 2 és 5 esetében (Berk és Sharp, 1977; Chow et al., 1977; Davison et al., 2003). A genom központi konzervált régiójában a legtöbb késői gén a fő késői promóterről (major late promoter, MLP) íródik át, mely a DNS-polimeráz génnel átfed. De maga a DNS-polimeráz, a terminális fehérje prekuzora (pTP) és a DNS-kötő fehérje (DNA binding protein, DBP) is közös promóterről íródik át az ellenkező szálon (Harrach, 2008).

A sejt fertőzésekor az elsődleges kapcsolat a fiber feje és a Coxsackie-adenovírus-receptor (CAR) kapcsolódása révén jön létre. Ezután a pentonbázis RGD motívuma az integrinnel kapcsolódik, és a virion endocitózis útján bejut a citoplazmába. Innen a sejtmagba jut, miközben megtörténik az uncoating, azaz a virális DNS kiszabadul a kapszidból. A sejtmagban történik a replikáció, a virális DNS átíródása és a virion összeállítása. Ez okozza a jellegzetes nukleáris magzárványokat adenovírus fertőzés esetén (Jiang et al., 1999). A virális DNS-t a celluláris DNS-függő RNS-polimeráz II írja át a genom mindkét száláról öt korai (E1A, E1B, E2, E3 és E4), két átmeneti és a fő késői promótert alkalmazva. Egyes humán, majom- és tyúk-adenovírusok kódolnak ún. vírusasszociált RNS-eket is, melyeket a gazda DNS-függő RNS-polimeráz III enzime ír át, szerepük a gazda RNS-interferencia válaszában kiküszöbölése (Andersson et al., 2005).



1. ábra: Egy masztadenovírus virionjának stilizált keresztmetszete
Mivel a nukleoprotein mag szerkezete nem ismert, a DNS-hez kapcsolódó fehérjék ábrázolt helyzete csak feltételezett. (Harrach et al., 2011; Stewart and Burnett, 1993)

Az adenovírusok prekursor fehérjéi (pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pX, pTP) a virális proteáz vágása után nyerik el végleges hosszukat, szerkezetüket. A fehérjék érésének fontossága miatt a proteáz vágási szignálok jól megőrzöttek az adenovírusokban, egyesek csak intragenerikusan, mások intergenerikusan is. Négyféle konszenzus vágási szignál ismert a prekursor fehérjék származtatott aminosavszekvenciájában. Ezek meglehetősen kladsztikus markernek is tekinthető az adenovírusok esetében. Jó példa erre a pVII fehérje, amelynek első proteáz vágási szignálja IIb típusú (NTGW'G) minden génuszban. A második vágási szignál I-es típusú [(M/L/I/V/F)XGG'X] minden maszt- és sziaadenovírusban, II-es típusú [(M/L/I/V/N/Q)X(A/G)X'G] az aviadenovírusokban és III-as típusú [(M/L/I)XAX'G] az atadenovírusokban (Anderson, 1990; Davison et al., 2003; Farkas et al., 2002; Vráti et al., 1996; Webster et al., 1989).

3.1.2. Az adenovírusok rendszertana

Az *Adenoviridae* család évtizedekig két nemzetséget foglalt magába: az emlősökből származó vírusokat a *Mastadenovirus* génuszba sorolták, a madaraktól származókat pedig az *Aviadenovirus* génuszba. Az egy génuszba tartozó vírusok általában rendelkeztek közös komplementkötő antigénnel, de mindkét génuszban hamarosan felismertek olyan vírusokat, amelyek nem rendelkeztek a közös antigénnel. Ilyen volt például néhány kérődző-adenovírus, melyek lassabban is szaporodtak sejtenyészeten, emelkedett hőűrésűek voltak, eltérő magzárványt képeztek és patogénebbek is voltak a többi adenovírusnál.

A rendszertan megújítására volt szükség, ahol már nem a gazdafaj rendszertani helye, hanem a filogenetikai számítások alapján mért evolúciós távolság a rendszerezés alapja (Benkő et al., 1998). Végül 2002-ben filogenetikai és genomelemzésekre, valamint egyéb szempontokra támaszkodva a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (ICTV) elfogadta az *At-* és a *Siadenovirus* génuszt (Benkő et al., 2005), majd 2009-ben az *Ichtadenovirus* génuszt (www.ictvonline.org). Az új génuszok létrehozásával egyidőben az ICTV eltörölte az aviadenovírusok II és III számozású csoportját; a II csoport egyetlen tagja (turkey hemorrhagic enteritis virus) a *Siadenovirus*, a III csoport egyetlen tagja (egg drop syndrome virus) pedig az *Atadenovirus* génuszba került (Harrach et al., 1997).

2002-ben került elfogadásra a faj meghatározása is az *Adenoviridae* családon belül; a vírusfajokat a gazdafaj után nevezik el, ehhez a névhez az angol ábécé egy nagybetűjét teszik. Az egy gazdafajból izolált vírustípusokat emelkedő sorrendben számozzák, a rokon vírustípusok alkotnak egy fajt (Benkő et al., 2005; Davison et al., 2003).

A *Mastadenovirus* génusz minden tagja emlősöket fertőz, az *Aviadenovirus* génusztól eredetileg az eltérő gazdaspektrum mellett az eltérő komplementkötő antigének jelenléte alapján különítették el. Az eddig megismert masztadenovírusok genomja 30–38 kbp méretű, 40,8–63,8% közötti G+C-tartalommal. Az ITR masztadenovírusokban a leghosszabb (93–368 bp) és legösszetettebb, több celluláris faktor kötőhelyét tartalmazza. Az V és IX strukturális fehérjéket csak masztadenovírusokban találjuk meg (Harrach, 2008). Sok emlősből mutattak már ki adenovírust, természetesen a legkutatottabb terület a humán adenovírusoké. Jelenleg legalább 54 humán típust ismerünk (Ishiko és Aoki, 2009), de számuk folyamatosan emelkedik. Ezek általában akut légúti, gasztrointesztinális vagy okuláris fertőzést okoznak. Állatorvosi jelentősége van több masztadenovírusnak is, a kutya-adenovírus 1 a Rubarth-kórt, vagy más néven a kutya fertőző májgyulladását okozza. A szarvasmarha- és juh-adenovírusok tüdő- és bélgyulladást (Rusvai és Fodor, 1998), a sertés-adenovírusok különféle megbetegedéseket okoznak (Nagy és Tuboly, 2000).

Az *Atadenovirus* génusz ismert gazdaspektruma tágabb: kérődzők, pikkelyes hüllők, madarak és egy erszényes emlős (közönséges rókakuzu) (Both, 2002; Thomson et al., 2002). A génuszt eredetileg a masztadenovírusoktól nagyon elkülönülő kérődző-adenovírusok besorolására létesítették (Benkő és Harrach, 1998), neve ezek magas A+T-arányára utal. De filogenetikai elemzések ide helyezték az egg drop syndrome vírusát (kacsa-adenovírus 1, korábban a III-as csoportba tartozó aviadenovírus) (Harrach et al., 1997; Hess et al., 1997) is. Hüllők célzott vizsgálata kiderítette (Harrach, 2000), hogy a pikkelyes hüllőkben is ebbe a génuszba sorolható adenovírusok fordulnak elő (Benkő et al., 2002; Farkas et al., 2002; Papp et al., 2009; Wellehan et al., 2004) is. Ezek azonban meglepő módon kiegyensúlyozott A+T-arányú genommal rendelkeznek. Az atadenovírusok genomja 28–33 kbp hosszú, ITR-ük 46–118 bp, a nem hüllő eredetű vírusok G+C-tartalma pedig 33,7–43,0% (Harrach, 2008).

A *Siadenovirus* génuszt a aviadenovírusok közül eltávolított (ott II-es csoportba tartozó) 3-as típusú pulyka-adenovírusnak (turkey hemorrhagic enteritis virus) (Pitcovski et al., 1998) és az 1-es béka-adenovírusnak (Davison et al., 2000) alapították (Davison és Harrach, 2002). A 3-as típusú pulyka-adenovírus vérzéses bélgyulladást okoz pulykákban, márványlép betegséget fácánokban és lépmegnagyobbodást tyúkokban (Pierson és Fitzgerald, 2008). A génusz a nevét az ide tartozó vírusokban talált szialidázszerű génről kapta. A sziaadenovírusok rendelkeznek a legrövidebb genommal az *Adenoviridae* családon belül (~26 kbp), ITR-ük 36–39 bp hosszú, G+C-tartalmuk 35–38% (Harrach, 2008). Korábban feltételezték, hogy esetleg a sziaadenovírusok képviselik a kétéltűek adenovírusait. Újabbban azonban további sziaadenovírusokat mutatnak ki madaraktól és teknősből is (Kovács és Benkő,

2009; Kovács és Benkő, 2011; Rivera et al., 2009; Wellehan et al., 2009). Ezért e génusz gazdaeredete továbbra is kérdéses.

Az *Ichtadenovirus* génusz a legfrissebben elfogadott nemzetség a családban. Jelenleg egyetlen tagja van, a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izolált fehér tok-adenovírus 1 (Benkő et al., 2002; Kovács et al., 2003).

3.1.3. Az adenovírusok evolúciója

Az adenovírusok jelenleg ismert öt nagy csoportja nagyjából a gerincesek öt osztályának felel meg. Ennek alapján született a hipotézis az adenovírusok gerinces gazdáikkal történő koevolúciójára vonatkozóan (Benkő és Harrach, 2003). Az eredeti elmélet szerint az atadenovírusok a hullókkal, a sziaadenovírusok pedig esetleg a kétélűekkel együtt fejlődött adenovírus leszármazási vonalat képviselik. Ezt alátámasztja az adenovírusok proteáz génszekvenciáiból és a gazdák riboszomális RNS-szekvenciáiból származtatott filogenetikai fák hasonlósága (Harrach, 2000). Az elmélet szerint az adenovírusok már az ősi gerinceseket is fertőzték, és ahogy a gerincesek divergálódtak, velük fejlődtek vírusaik is. Ezután persze gazdafajváltások is lezajlottak, így fertőzhetnek pl. atadenovírusok kérődzőket is. A gazdák saját, eredeti vírusai általában kevésbé patogének, mivel alkalmazkodtak a gazdához. A gazdát váltó vírusok azonban általában patogénebbek (Benkő és Harrach, 2003).

3.2. Az Aviadenovirus génusz

A jelenlegi *Aviadenovirus* nemzetség tagjai csak madarakat fertőznek, és mind rendelkeznek egy génuszspecifikus közös komplementkötő antigénnel. A nemzetségben hivatalosan hét faj található: a tyúk-adenovírusok 5 faja (A-E), a sólyom-adenovírus A (Tomaszewski és Phalen, 2007) és a liba-adenovírus. Ide sorolható továbbá a kacsza-adenovírus B, a galamb-adenovírus (Hess et al., 1998), a pulyka-adenovírus B (Ursu et al., 2003), valamint a Meyer aranyosvállú papagájának adenovírusa (Wellehan et al., 2005) és a papagájforma madarak adenovírusa (Harrach és Kaján, 2011; Lüschow et al., 2007), de ezek egyelőre csak javasolt, de hivatalosan még nem jóváhagyott fajok. Izoláltak aviadenovírust továbbá pézsmarécéből is (Bouquet et al., 1982).

A nemzetség fajdemarkációs kritériuma szerint egy új faj elkülönítéséhez a faj tagjának (tagjainak) az alábbi szempontok többsége szerint el kell különböznie a többi aviadenovírus faj tagjaitól (Harach et al., 2011):

- filogenetikai távolság (>5–15% elsődlegesen a DNS-polimeráz gén származtatott aminosavszekvenciájának távolsági mátrix analízisére alapozva)
- genomszerveződés (jellemzően a genom jobb végén található ORF-ek száma)
- RFLP analízis
- gazdaspektrum
- patogenitás
- keresztneutralizáció
- rekombinációs képesség

Az *Aviadenovirus* génusz leginkább kutatott tagjai a tyúk-adenovírusok, rajtuk kívül a többi típus genomjából csak töredékszekvenciák ismertek. Kivétel a sólyom-adenovírus 1, melynek genomjából ismert 6257 bp (Schrenzel et al., 2005).

3.3. Pulyka-adenovírusok

Pulykákból korábban két adenovírus típust írtak le. A később TAdV-1-nek elnevezett vírust először a 70-es évek elején izolálták Észak-Írországból kötőhártyagyulladást, vesegyulladást és légzságyulladást mutató madarakból, de tapasztaltak hasonló tüneteket más esetben is, amikor nem járt sikerrel a vírusizolálás (Scott és McFerran, 1972). Napos pulykák sejtzárványos májgyulladásából egy másik adenovírust izoláltak, ami később elvégzett fertőzési kísérletek szerint gyenge (szuboptimális) keltetési eredményt okoz (Guy és Barnes, 1997; Guy et al., 1988). A pulyka-adenovírusok két típusát TAdV-1 és -2 néven először 1980-ban említi a szakirodalom (Adair et al., 1980), de DNS-szekvencia eddig nem jelent meg egyikből sem. További adenovírusokat izoláltak légúti tüneteket mutató pulykákból is (Crespo et al., 1998; Simmons et al., 1976; Sutjipto et al., 1977) de ezeket nem hasonlították szerológiai vagy egyéb módszerekkel a belfasti TAdV-1 és -2 típusához. A szekvenciaadatok hiányában pedig eddig hivatalosan vírusfajba se lehetett besorolni ezeket a TAdV típusokat (Benkő et al., 2005).

3.4. Liba-adenovírusok

Libák bélsarából és befulladt tojásokból először hazánkban izoláltak olyan adenovírust, amely szerológiailag elkülöníthető volt a tyúk-adenovírusoktól (Csontos, 1967). Az izolátumok és a tyúk-adenovírusok között nem volt kimutatható szerológiai kapcsolat. Később Zsák és Kisary (1984a) 7 törzset izoláltak 2–4 hetes libák májából és beléből, és ezeket a genom restrikciós enzimes emésztéssel adott mintázata alapján 3 típusba sorolták. Kimutatták, hogy a liba- és tyúk-adenovírusok közös komplementkötő antigénnel rendelkeznek, és hogy az izolátumok nem patogének, állatkísérletekben még súlygyarapodás-csökkenést sem okoznak. Ugyanakkor beszámoltak arról, hogy a magyar tenyészetek nagy része fertőzött liba-adenovírral. Ezzel egyidejűleg Kanadában is beszámoltak egy liba-adenovírus törzs izolálásáról, mely sejtzárványos májgyulladás és 25%-os elhullást okozott 8–28 napos libákban (Riddell, 1984). Később ugyanitt légúti tüneteket mutató kislibákból izoláltak adenovírust, az elhullás ekkor 12%-os volt a 4–11 napos libák között (Riddell et al., 1992). A vírusok tipizálását azonban nem végezték el, a légzőszervi tüneteket előidéző vírus nagy valószínűséggel az EDS vírus lehetett. Németországban 1998-ban nagy lilikben (*Anser albifrons*), vetési lúdban (*Anser fabalis*) és házilúdban is kimutattak adenovírusok elleni ellenanyagokat (Hlinak et al., 1998; Kaleta et al., 1998).

Az EDS vírust is kimutatták libákból (Bartha et al., 1982), de ez kacsákban is igen gyakori volt, ezért lett a vírus hivatalos neve kacsá-adenovírus 1. Feltételezhetően ez a vírus a libához is adaptálódott, hiszen ellenanyag a legtöbb magyar állományban kimutatható volt ellene, de kísérletes fertőzéssel még mikroszkópikus léziókat se tudtak előidézni, és a tojástermelést, a tojás minőségét sem befolyásolta (Zsák et al., 1982). Azonban egyes esetekben heveny légúti megbetegedést is okozhat kislibákban (Ivanics et al., 2001); és a Kínában nagy gazdasági károkat okozó, kislibák új típusú virális bélgyulladását (new type gosling viral enteritis) is egy EDS törzs okozza (Cheng et al., 2001). A vírus fibrines elhalásos bélgyulladást, és következményes bélelzáródást okoz 30 napos kor alatt. A sorozatos vizsgálatok többek között kimutatták a vírusról, hogy intracitoplazmatikus sejtzárványokat és apoptózist okoz kacsá embrionális fibroblasztsejteken (Chen et al., 2008a; Chen et al., 2008b). Kísérletes állatfertőzés után immunhisztokémiai módszerrel a kislibák limfoid- és emésztőszerveiben (májban, hasnyálmirigyben is), a szívizomban, a vesében, a nagyagyban és a kisagyban mutatták ki a vírust (Chen et al., 2009a, b; Chen et al., 2010a). 2010-ben egy inaktivált vakcináról is beszámoltak, melyet rekombináns liba interleukin-2-vel kombináltak (Chen et al., 2010b; Chen et al., 2011), és állatkísérletekben kedvező eredményeket értek el vele.

3.5. Tyúk-adenovírusok

A tyúk-adenovírusoknak 12 típusát különítették el szerológiai módszerekkel (McFerran et al., 1972; McFerran és Connor, 1977; McFerran és Smyth, 2000). Mivel azonban a létrehozott európai, japán és amerikai törzsgyűjteményekben más-más prototípustörzsek szerepeltek, és a szerotípus számozásuk nem volt egyeztetve, ez máig feloldatlan félreértéseket eredményez. A 2000-ben megjelent vírusrendszertani jelentésben azonban már minden víruscsalád esetében kötelező volt a faj meghatározása. Az adenovírusoknál több hasonló tulajdonsággal rendelkező szerotípust soroltak egy fajba. A tyúk-adenovírusok besorolásához a restriktív enzimes mintázat alapján korábban kialakított csoportokat vették alapul (Zsák és Kisary, 1984b). Közben megjelentek az első DNS-szekvenciák is. Az átszámozások megelőzése érdekében ekkor a régi európai szerotípus számozást vették figyelembe, és az egyébként egymáshoz nagyon közeli két típust 8a és 8b névvel látták el. Sajnos a különböző laboratóriumokban a prototípus törzsek azonossága még ma sem teljesen megbízható. Később a hexon génre alapozott filogenetikai számítások is megerősítették (Meulemans et al., 2004; Raue és Hess, 1998) a FAdV típusok beosztását, mely az alábbi táblázatban olvasható (1. táblázat).

1. táblázat: A tyúk-adenovírus típusok rendszertani beosztása

Faj	Típusok	Jellegzetes törzsek
<i>Fowl adenovirus A</i>	FAdV-1	CELO
<i>Fowl adenovirus B</i>	FAdV-5	340
<i>Fowl adenovirus C</i>	FAdV-4, -10	KR5, C-2B
<i>Fowl adenovirus D</i>	FAdV-2, -3, -9, -11	685, SR49, A2, 380
<i>Fowl adenovirus E</i>	FAdV-6, -7, -8a, -8b	CR119, X11, 58, 764

A tyúk-adenovírusok terjedése vertikálisan, tojáson át és horizontálisan, általában bélsárral történhet. Állattartó telepeken a fertőzött állományok általában 3 hetes koruktól kezdik a vírus ürítését nagyobb mennyiségben. Ezután perzisztens fertőzés alakulhat ki, és akár egész életen át hordozhatják a vírust a tyúkok. A vírusürítés stressz—mint például tojásrakás—hatására újra megjelenhet, így fertőzve a következő generációt. Egy állományból sokszor több típus is izolálható, főleg ha az állományt több kisebb állomány egyesítésével hozták létre (Adair és Fitzgerald, 2008; Smyth és McNulty, 2007).

Aviadenovírusokat a házityúkok sokféle megbetegedéséből izoláltak már, a biztosan adenovírus-sal összefüggő leggyakoribb kórkép a sejtzárványos májgyulladás,

a hydropericardium szindróma és a zúzógyomorfekély, amelyek jellegzetességei az alábbiakban foglalhatóak össze.

A sejtzárványos májgyulladás (inclusion body hepatitis, IBH) a napi elhullások hirtelen emelkedése (2–10%) jellemzi, mely néhány napig tart. Főleg 3–7 hetes brojlerekben fordul elő. A túlélőkre borzolt tollazat, bágyadtság jellemző, esik a takarmányhasznosítás és a súlygyarapodás. A betegség tipikus kórbonctani elváltozásai az anaemia, az elszórt vérzések a szív külső hártálya alatt és a vázizomzatban is. A máj megnagyobbodott, törékeny, sápadt, benne vérzések és gombostűfejnyi-lencsényi gyulladással elhalásos góccok találhatóak. Szövettanilag a májsejtek magjában jellegzetes zárványok láthatóak. Bár szinte minden szerotípusú tyúk-adenovírust izoláltak már sejtzárványos májgyulladásban elhullott csirkékből, leggyakrabban a FAdV-E (FAdV-6, -7, -8a, -8b), vagy FAdV-D (FAdV-2, -3, -9, -11) faj típusai mutathatóak ki (Ojkić et al., 2008a; Ojkić et al., 2008b). A betegség kialakulásában sokszor szerepe van valamilyen immunszuppresszív hatásnak, pl. a fertőző bursitis vírusának (Adair és Fitzgerald, 2008; Smyth és McNulty, 2007).

A hydropericardium szindróma hasonló a sejtzárványos májgyulladásához, de mind a morbiditás, mind a mortalitás magasabb (30–60%). Az elhullott állatok szívburka szalmasárga savóval telt, tüdőödéma figyelhető meg. A máj duzzadt és sárgás, a vesék is duzzadtak. Szövettanilag szintén magzárványok figyelhetőek meg a májban. A betegséget a FAdV-4 típushoz (FAdV-C faj) kötik (Adair és Fitzgerald, 2008; Smyth és McNulty, 2007).

Japánban a FAdV-1 típusról (chicken embryo lethal orphan, CELO; FAdV-A faj) leírták, hogy fiatal brojlerekben zúzógyomorfekélyt okoz. Klinikai tüneteket a mortalitás megemelkedésén kívül nem tapasztaltak. Kórbonctani vizsgálatok során viszont a zúzógyomor véres folyadékkal telt, és nyálkahártyájában véres alapú fekélyek figyelhetőek meg, melyek a keratinbélés folytonossági hiányát okozzák (Adair és Fitzgerald, 2008). A molekuláris vizsgálatok szerint a vírus fiber génjében megfigyelt variációk esetleg összefüggésben állhatnak a Japánban izolált törzsek kórokozó képességének változásával (Okuda et al., 2006), de az európai törzsek vizsgálatakor nem találtak hasonló összefüggést (Marek et al., 2010b).

Ugyancsak a FAdV-1 (CELO törzs) fürjekben súlyos légúti tüneteket, ún. fürjbronchitist okoz, mely akár 50%-os mortalitással is járhat (Reed és Jack, 2008; Smyth és McNulty, 2007).

Tyúk-adenovírusok izolálhatóak légúti tüneteket mutató tyúkokból is, de ezek elsődleges szerepét itt nem feltételezik. Légúti tünetek kialakításához immunszuppresszív tényezők közrejátszása is szükségesnek látszik (Adair és Fitzgerald, 2008; Smyth és McNulty, 2007).

Munkám kezdetekor az egész *Aviadenovirus* génuszban csak két FAdV típus teljes genomja volt ismert, nevezetesen a FAdV-1 (FAdV-A faj) (Chiocca et al., 1996) és FAdV-9 (FAdV-D faj) (Ojkić és Nagy, 2000) típusoké. A FAdV-8 (FAdV-E faj) genomjának teljes szekvenciáját csak nemrég közölték (Grgić et al., 2011). De részleges szekvenciákat már meghatároztak a FAdV-C faj típusaiból is. Ismertek a faj mindkét típusából a genomok terminális régiói (Corredor et al., 2008; Corredor et al., 2006), továbbá a FAdV-4 típusból a hexon (Ganesh et al., 2001), a FAdV-10 típusból pedig több szekvencia is (Sheppard et al., 1995; Sheppard és Trist, 1992; Sheppard és Trist, 1993; Sheppard et al., 1998a). Legkevesebb ismerettel a FAdV-B faj egyetlen típusának (FAdV-5) genomjáról rendelkezünk (Hanson et al., 2006; Meulemans et al., 2004).

A tyúk-adenovírusok genomkutatásának az is lendületet ad, hogy potenciális génevktorként tartják számon őket nagy genomjuk miatt (Corredor és Nagy, 2010; Francois et al., 2004; François et al., 2001; Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2000; Ojkić és Nagy 2001; Ojkić és Nagy, 2003; Sheppard et al., 1998c).

Az *Adenoviridae* családon belül az aviadenovírusokat képviselő tyúk-adenovírusok genomját találták a leghosszabbnak. Például a FAdV-1 és FAdV-9 teljes genomjának hossza 43.804 és 45.063 bp. G+C-tartalmuk 53,8–59%, az ITR-ek rövidebbek, mint a masztadenovírusoknál (51–72 bp). A főemlős-masztadenovírusokban leírt dUTP-pirofoszfátáz (dUTPáz) gén homológja az aviadenovírusokban is megtalálható, jöllehet a másik genomvégen (Harrach, 2008).

Érdekes módon két másik víruscsalád egy-egy génjének homológja is előfordul a FAdV-okban. Ezek egyike a parvovírusok NS1 (non-structural 1, Rep protein) génje, melynek homológja (esetenként több példányban is) a genom bal végén az *I* és az *r* szálon található meg (Chiocca et al., 1996; Corredor et al., 2006; Washietl és Eisenhaber, 2003). A másik a Marek-betegséget okozó herpeszvírus lipáza, mely az aviadenovírusok triacilglicerol-lipáz génjével mutat homológiát (Ojkić és Nagy, 2000).



2. ábra: A 9-es szerotípusú tyúk-adenovírus elektronmikroszkópos képe uranil-acetáttal negatívan festve
A képen látható a tyúk-adenovírusok dupla fibere. A lépték 100 nm. (Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982)

A késői gének tyúk-adenovírusokban is a fő késői promoterről (MLP) íródnak át, de nem háromosztatú leadert (tripartite leader) alkalmazva, mint a masztadenovírusoknál, hanem csak kétosztatút (bipartite leader) (Ojkić et al., 2002; Sheppard et al., 1998b). A tyúk-adenovírusok virionjának jellegzetessége, hogy minden csúcán két fibert tartalmaz vertexenként (Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982) (2. ábra). A FAdV-1 esetében ezek eltérő hosszúságúak, és a genomban is két fibert kódoló gént találunk (Chiocca et al., 1996). A többi típus esetében egyforma hosszúak, és a FAdV-8 és -9 genomjában csak egy fiber gént találunk (Grgić et al., 2011; Ojkić és Nagy, 2000). Az aviadenovírus genomok jobb végén sok ismeretlen funkciójú nyílt leolvasási keretet találtak, melyek többsége még nincs jellemezve. A FAdV-1 GAM-1 fehérjéről (ORF8 kódolja) kimutatták, hogy antiapoptotikus hatású (Chiocca et al., 1997), és az ORF22 által kódolt fehérjével együtt kapcsolódik a retinoblasztóma fehérjéhez, és aktiválja az E2F rendszert (Lehrmann és Cotten, 1999).

3.6. Az aviadenovírusok, tyúk-adenovírusok molekuláris diagnosztikája

Kezdetben az izolált FAdV törzsek szerotípusokba sorolása a vírusneutralizációs próbák eredménye alapján történt. A szerotípusok számának gyors emelkedése a szerológiai vizsgálatokat egyre munkaigényesebbé, nehezebbé tette. Egy új szerotípus megállapításához szükség lett volna a teljes referenciatörzs és savó gyűjteményre, ami azonban nem mindenütt állt rendelkezésre. Még a főbb referencialaboratóriumokban is előfordult az egyes törzsek keveredése, félretipizálása.

A PCR megjelenése után nem sokkal már megpróbálták olyan primereket tervezni, amelyek az izolátumok azonosítására alkalmas lehet. Kezdetben a hexon gén volt az ilyen PCR-ek célpontja, mert a szerológiai reakciók szempontjából is ez a legfontosabb fehérje. Ilyen Raue és Hess (1998) PCR-e, mely ugyan a FAdV-5 típust nem mutatta ki, de az EDS vírustól való differenciálásra alkalmas volt. 1999-ben publikáltak egy újabb PCR-t FAdV-ok detektálására (Xie et al., 1999). Meulemans és mtsai (2001; 2004) PCR-ével már az összes FAdV típust ki lehetett mutatni, és a PCR-termék szekvenciaanalízisével a pontos típust is meg lehetett határozni. Később terveztek még általánosabban használható PCR-eket, mellyel a FAdV-ok mellett az EDS vírust és a THEV-et is detektálni lehet (Mase et al., 2009; Raue et al., 2005).

A DNS-függő DNS-polimeráz génre irányuló PCR-módszerek közül (Hanson et al., 2006; Thomson et al., 2002) a legszélesebb körben alkalmazható Wellehan és mtsai kétkörös PCR-e (2004), mely degenerált konszenzus primereket alkalmaz, és eredetileg új gyík-adenovírusok kimutatására tervezték. Széles detektálóspektrumát

kihasználva akár eddig ismeretlen adenovírusok kimutatására is használják például a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságán. A két említett fő célpont mellett, ezektől eltérő PCR módszert is leírtak (Jiang et al., 1999).

A közelmúltban újabb módszereket is elkezdtek alkalmazni a tyúk-adenovírusok diagnosztikájában: megjelent a valós idejű PCR és a termékek nagy felbontású olvadásgörbe-analízise (Marek et al., 2010a; Steer et al., 2009), valamint a piroszekvenálás (Pizzuto et al., 2010).

4. Anyag és módszer

4.1. A vírusok eredete, izolálása és tisztítása

Egy hazai izolálású pulyka-adenovírus törzset vizsgáltunk, amelyet dr. Palya Vilmos izolált légúti tüneteket mutató, 10 hetes pulykából csirkeembrió májsejteken. A törzs neve, melyet vizsgálataink után a pulyka-adenovírus 1 (azaz turkey adenovirus 1, TAdV-1) prototípus törzsének javasolunk, D90/2 volt. Hasonlóképpen a liba-adenovírus 1 (goose adenovirus 1, GoAdV-1) prototípus törzsének javasoljuk a P29-es jelzésű dr. Palya Vilmos által szintén hazánkban libaembrió májsejteken izolált vírust. A továbbiakban TAdV-1 és GoAdV-1 néven tárgyalom ezeket.

Mindkét vírus esetében, amikor a citopatogén hatás maximális volt, a sejteket háromszori fagyasztás-olvasztási ciklusnak vetettük alá, hogy kiszabaduljanak a sejthez kötött virionok, majd alacsony sebességű centrifugálással eltávolítottuk a szövettörmeléket. A felülúszót Beckman XL-90 típusú ultracentrifugán SW-28 rotorral 24.000 rpm fordulatszámon 1,5 órán át centrifugáltuk a virionok koncentrációja érdekében, majd az üledéket 2 ml TE (10 mM trisz-(hidroximetil)-amino-metán, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav, pH 7,9) pufferben reszuszpendáltuk.

Összehasonlítás céljából a korábban publikált TAdV-1 és -2 típusok prototípus törzseit is vizsgáltuk, melyeket Brian M. Adair bocsátott rendelkezésünkre, és a John Brian McFerran által alapított aviadenovírus referencia törzsgyűjteményből származtak Belfastból (McFerran és Smyth, 2000).

Vizsgáltuk továbbá egy prototípus FAdV-törzsgyűjtemény 10 törzsét (FAdV-2–8b, -10, -11) is, melyeket dr. Révész Tamás bocsátott rendelkezésünkre az akkori Országos Állategészségügyi Intézetből. A törzsgyűjtemény szintén a fenti belfasti referencia törzsgyűjteményből származott.

Aviadenovírusos fertőzöttségre gyanús gyakorlati esetekből mintákat (szervdarabokat, mint máj és bél, vagy ezekből kivont DNS-t) vagy izolátumokat kaptunk a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának budapesti és debreceni intézeteiből, a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karáról valamint külföldi kollégáktól is (2. táblázat).

2. táblázat: A disszertációban tárgyalt, gyakorlati esetekből származó minták összefoglalása

Minta jele	Származási ország	Kórbonctani lelet
balkáni gerle 5958	Magyarország	
fekete rigó	Magyarország	
fekete rigó 1482	Svájc	
fekete rigó 1486	Svájc	
fekete rigó 1729	Ausztria	
fekete rigó 1773	Ausztria	
fenyőpinty 6625	Magyarország	
jégmadár	Magyarország	
kacsa 11697	Magyarország	
karvaly 5696	Magyarország	
karvaly 6438	Magyarország	
liba 758	Magyarország	
liba 763	Magyarország	
liba 1036	Magyarország	hydropericardium
pulyka 5267	Magyarország	
pulyka 18054	Magyarország	
széncinege 1659	Ausztria	
tyúk 143	Magyarország	
tyúk 1308	Magyarország	
tyúk 5865	Magyarország	
tyúk 6474	Magyarország	
tyúk 6528	Magyarország	
tyúk 6651	Magyarország	
tyúk 7910	Magyarország	
tyúk 8844	Magyarország	
tyúk 12798	Magyarország	
tyúk 13198	Magyarország	
tyúk 15319	Magyarország	
tyúk 15688	Magyarország	
tyúk 15843	Magyarország	
tyúk 17479 2b	Magyarország	
tyúk 18285	Magyarország	
tyúk 29432	Magyarország	
tyúk 30909	Magyarország	
tyúk 31553	Magyarország	
tyúk 38259	Magyarország	
tyúk HPI 07	Magyarország	
tyúk HPI 08	Magyarország	
tyúk lengyel	Lengyelország	zúzógyomorfekély
veréb 1488	Svájc	
veréb 1498	Svájc	
veréb 1504	Svájc	
veréb 1505	Svájc	
veréb 1514	Svájc	
zöldike 1675	Magyarország	

4.2. A virális DNS kivonása

A virionokból fenol segítségével tisztítottuk a DNS-t. Egy eppendorf csőben a vírusszuszpenziót 0,5% nátrium-dodecil-szulfát és 1,25 μ M etilén-diamin-tetraecetsav jelenlétében 50 μ M proteináz K enzimmel emésztettük 400 μ l végtérfogatban 4 órán keresztül 37 °C-on. Ezután az oldathoz azonos mennyiségű, TE pufferrel (pH 8,0) telített fenolt adtunk, és kíméletesen, de alaposan összekevertük. A vizes és szerves fázist 5 perces 3.800 xg gyorsuláson végzett centrifugálással különítettük el, majd a felső, vizes fázist új csőbe tettük. A fenolos kezelést kétszer megismételtük. Az utolsó vizes fázist új csőbe tettük, és azonos térfogatú kloroform:izoamil-alkohol (24:1 arányú) keverékkel elegyítettük a fenol maradványok eltávolítása céljából. A vizes fázist ismét új csőbe tettük, és a reakcióelegyből 0,3 M végkoncentrációjú nátrium-acetát (pH 5,3) és -20 °C-os abszolút etanol segítségével a DNS-t kicsaptuk. A csövet egy éjszakán át -70 °C-on tartva fokoztuk a precipitációt. A keletkezett csapadékot 30 perces 18.000 xg gyorsulással végzett centrifugálással üleptítettük 4 °C-on, a felülúszót elöntöttük, majd a csapadékot 500 μ l -20 °C-os 70%-os etanollal mostuk. Ezután 10 perces 18.000 xg gyorsulással végzett 4 °C-os centrifugálást követően a felülúszót elöntöttük, és a DNS-t rövid szobahőmérsékleten történő szárítás után 100 μ l ultraszűrt steril vízben oldottuk fel.

4.3. DNS kivonása szervmintákból

Különböző hazai, illetve külföldi laboratóriumokból kapott szervmintákból a teljes DNS-t egy guanidin-HCl alapú módszerrel vontuk ki Dán és mtsai (2003) útmutatása alapján. Eszerint a szervből eltávolított borsnyi darabot homogenizáltuk 200 μ l TE pufferrel. A homogenizátumból 100 μ l-t eppendorf csőben 10 μ l 10%-os szarkozillal és 4 μ l 20 mg/ml-es proteináz K enzimmel elegyítettük. A reakcióelegyet keverés után 16 órán át 55 °C-on inkubáltuk. Ezután hozzáadtunk 300 μ l 8 M-os guanidin-HCl-ot és 20 μ l 7,5 M-os ammónium-acetátot, majd egy keverés után, 20 percenként ismét megkeverve, 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A reakcióelegyhez 1 ml -20 °C-os abszolút etanolt adtunk, majd keverés után 12 percig centrifugáltuk 18.000 xg gyorsulással. A felülúszót elöntöttük, a kicsapódott DNS-t 1 ml -20 °C-os 70%-os etanollal mostuk. 5 perces centrifugálás (18.000 xg) után a felülúszót elöntöttük, és a DNS-t rövid szobahőmérsékleten történő szárítást követően 50 μ l ultraszűrt steril vízben oldottuk fel. Ha a csőben emésztetlen szövethomogenizátum maradt, a DNS vizes oldatát egy rövid centrifugálás után új csőbe emeltük át.

4.4. Gélelektroforézis

A DNS-t agaróz gélelektroforézis segítségével vizualizáltuk. Ehhez 0,8–1,5%-os agaróz géleket használtunk a vizsgált DNS-darabok méretétől függően. Az agaróz gél TAE (trisz-ecetsav-EDTA) pufferben (Sambrook et al., 1989) készítettük el, és a géleket ebben a pufferben is futtattuk. A gélöntéshez és a futtatáshoz Bio-Rad gélöntő tálcákat, fésűket, horizontális kádákat és tápegységeket használtunk. A gélek GelRed (Biotium) festéket tartalmaztak 10.000x hígításban a DNS festésére. A mintafelvívő puffer 2,5 mg/ml brómfenolkéket és 400 mg/ml szaharózt tartalmazott. A futtatás után 302 nm hullámhosszú ultraibolya fényben fényképeztük a géleket Kodak Gel Logic 212 készülék segítségével. A felvételeket a Kodak Molecular Imaging szoftver 5.0.1.27 verziójával jelenítettük meg és szerkesztettük.

4.5. A virális DNS klónozása

A pulyka-adenovírus 1 genomját *Bam*HI restrikciós endonukleázzal (Fermentas) hasítottuk a gyártó utasításai szerint 2 óra inkubációs idővel. Etanolos kicsapás után 10 µl ultraszűrt steril vízben visszaoldottuk a fragmentumokat. Ezeket *Bam*HI enzimmel vágott pBluescript II KS plazmidba (Fermentas) ligáltuk T4 DNS-ligázt használva; a reakció egy éjszakán át (16 óra) zajlott 16 °C-os vízfürdőben. A nagyobb fragmentumokat később *Pst*I restrikciós endonukleáz alkalmazásával szubklónoztuk. A genomvégeken, a fenolos kezelés ellenére, a virális DNS 5' végén megmaradó terminális fehérje (TP) maradványa rendszerint meggátolja a klónozást. Ezért klónozás előtt a genomvégeket lúgos kezelésnek vetettük alá (Zakharchuk et al., 1993). A *Bam*HI végfragmentumokat *Eco*RV és *Bam*HI enzimmel vágott pBluescript II KS plazmidba (Fermentas) klónoztuk.

A liba-adenovírus 1 genomjának nukleotidsorrendjét az úgynevezett shotgun szekvenálási módszerrel határoztuk meg. Ehhez a kivont DNS-t ultrahangos kezeléssel nem specifikus módon tördeltük. A keletkezett fragmentumokat 1%-os agaróz gélen szeparáltuk, és a 600–1500 bp mérettartományba esőket a kivágott géldarabból kinyertük. A megfelelő méretű fragmentumokat pSTBlue1 Perfectly Blunt Cloning kit (Novagen) segítségével klónoztuk a gyártó utasításai szerint.

A ligálási reakció 1 µl-ével *Escherichia coli* baktérium DH5α vagy TOP10 törzsét transzformáltuk kalcium-klorid hősokk vagy elektroporáció segítségével. Utóbbi esetben 2 mm-es réssel rendelkező küvettákat használtunk, Easyject Plus (Equibio) készülékben 2500 V-os feszültséget, 25 µF elektromos kapacitást és 201 Ω-os ellenállást 5 ms ideig alkalmazva. A transzformátumokat SOC tápfolyadék hozzáadása

után 45 percig 37 °C-on rázattuk, majd ampicillint (100 µg/ml) tartalmazó LB-agarra szélesztettük. Az agar felületén a baktériumok szélesztése előtt 50 µl X-galt (20 mg/ml) és 5 µl IPTG-t (200 mg/ml) is szélesztettünk az inzerteket tartalmazó plazmidok kék-fehér szelekciója érdekében. A lemezeket 16 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

A restrikciós endonukleázzal történő hasítás, ligálás, transzformálás nem tárgyalt részleteit Sambrook és munkatársai (1989) útmutatása alapján végeztük, valamint a használt táptalajokat is eszerint készítettük el.

4.6. A plazmid DNS tisztítása alkalikus mini plazmid preparálással

A molekuláris klónozás eredményeként nőtt fehér telepeket 3 ml ampicillin tartalmú (100 µg/ml) folyékony LB tápfolyadékban növesztettük 16 órán át rázatva 37 °C-on. Az elszaporított baktériumtenyészetekből körülbelül 1,5 ml-t steril eppendorf csőben centrifugáltunk 30 s ideig 18.000 xg gyorsulással, majd a leülepített baktériumokról gondosan eltávolítottuk a felülúszó tápfolyadékot. Az üledéket 100 µl TEG (25 mM Trisz/HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM glükóz) oldatban alaposan reszuszpendáltuk vortex segítségével. Ezután 200 µl frissen készített NaOH/SDS oldatot (0,2 M NaOH; 1% SDS) mértünk a szuszpenzióra, és óvatos keverés után jégen állni hagytuk. 5 perc után 150 µl 3 M-os kálium-acetát (pH 4,8) oldattal csaptuk ki a fehérjéket, majd óvatos keverés után 10 percet ismét állni hagytuk a centrifugacsövet jégen. Ezután 10 perces centrifugálás következett 18.000 xg gyorsulással, majd a felülúszót egy új centrifugacsőbe töltöttük. Ebből 800 µl 96%-os etanol hozzáadásával kicsaptuk a DNS-t, majd ezt 10 perces centrifugálással ülepitettük 18.000 xg gyorsulással. A felülúszó elöntése után 600 µl 70%-os etanollal mostuk a csapadékot, majd 7 percig centrifugáltuk 18.000 xg gyorsulással. A felülúszót elöntöttük, majd a centrifugacsöveket nyitott kupakkal állni hagytuk szobahőmérsékleten, amíg a maradék etanol el nem párologott. A plazmid DNS-t végül 50 µl ribonukleáz tartalmú (5 µg/ml) ultraszűrt steril vízben oldottuk fel. A tisztított plazmidok méretének és tisztaságának ellenőrzése céljából 1 µl-t a feloldott plazmid DNS-ből agaróz gélen elektroforézissel vizsgáltunk.

4.7. Alkalmazott PCR módszerek

4.7.1. Réskitöltő PCR-ek a genomszekvenálások során

A genomszekvenálások esetén réskitöltő PCR-eket alkalmaztunk a hiányzó részek pótlására. Ennek során primereket terveztünk a már ismert szekvenciájú egymáshoz közel fekvő genomrészekre a Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) program segítségével. A PCR-re általában *Taq* polimeráz alapú enzimet alkalmaztunk (pl. REDTaq, Sigma-Aldrich; GoTaq, Promega; DreamTaq, Fermentas) MJ Research PTC-200, Biometra T1 Thermocycler vagy Biometra TPersonal típusú berendezésekben az enzimek gyártóinak utasításai szerint. Az elongációs időket a termékek várható hossza alapján terveztük, melyet az ismert szekvenciájú szakaszok homológjainak FAdV-1-ben és FAdV-9-ben tapasztalható átlagos távolságai alapján becsültünk meg.

4.7.2. Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló PCR

A diagnosztikai intézetekből, és egyéb helyen dolgozó kollégáktól kapott szervmintákból kivont DNS-t először az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló PCR-rel vizsgáltuk, az eredeti leíráshoz képest kissé módosított módszerrel (Wellehan et al., 2004). A reakcióelegy pontos összetételét (3. táblázat), a primerek szekvenciáit (4. táblázat) és a reakció hőmérsékleti paramétereit (5. táblázat) az alábbi táblázatok tartalmazzák. Pozitív kontrollként a szarvasmarha-adenovírus 4-es szerotípusának egy izolátumát, negatív kontrollként pedig ultraszűrt steril vizet alkalmaztunk. Ha a PCR-termék szekvenálásának eredménye alapján feltételezhető volt, hogy a mintában esetleg több vírus is lehet, molekuláris klónozással választottuk szét a különböző PCR-termékeket.

3. táblázat: Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló kétkörös PCR összetevői

Összetevők	Térfogat
ultraszűrt steril víz	37 µl
REDTaq DNS-polimeráz reakciópuffere (10x)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1,5 µl
Pol out/inn fo primer (50mM)	1 µl
Pol out/inn re primer (50mM)	1 µl
Minta	1 µl
REDTaq DNS-polimeráz	2,5 µl
Végtérfogat	50 µl

4. táblázat: Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló kétkörös PCR-ben alkalmazott erősen degenerált, konszenzus primerek szekvenciái

Külső kör	poloutfo	5'-TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC-3'
	poloutre	5'-GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT-3'
Belső kör	polinnfo	5'-GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC-3'
	polinnre	5'-CCANCCBCDRTTTRTGNARNGTRA-3'

A többféle nukleotidot tartalmazó pozíciók jelölései: 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.

5. táblázat: Az adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjére irányuló kétkörös PCR mindkét körében alkalmazott hőmérsékleti paraméterek

Lépés	Hőmérséklet	Idő
Denaturáció	94 °C	5 min
45 ciklus		
1. Denaturáció	94 °C	30 s
2. Primerek illeszkedése	46 °C	1 min
3. Szintézis	72 °C	1 min
Végső szintézis	72 °C	3 min

4.7.3. A tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló PCR

A tyúkokból és pulykákból származó, adenovírusra gyanús DNS-mintákat a Meulemans és mtsai (2004) által tervezett PCR-rel is megvizsgáltuk, kisebb módosításokat alkalmazva. Ez a tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló, kétkörös PCR. A reakcióelegy pontos összetételét (6. táblázat), a primerek szekvenciáit (7. táblázat) és a reakció hőmérsékleti paramétereit (8. táblázat) az alábbi táblázatok mutatják be. Pozitív kontrollként egy tyúk-adenovírus 9-es szerotípusú izolátumot, negatív kontrollként pedig ultraszűrt steril vizet alkalmaztunk.

6. táblázat: A tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló kétkörös PCR összetevői

Összetevők	Térfogat
ultraszűrt steril víz	29,75 µl
Green GoTaq Flexi puffer (5x)	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
hexA/C primer (125 µM)	1 µl
hexB/D primer (125 µM)	1 µl
minta	1 µl
GoTaq DNS-polimeráz	0,25 µl
Végtérfogat	50 µl

7. táblázat: A tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló kétkörös PCR-ben alkalmazott erősen degenerált, konszenzus primerek szekvenciái

Külső kör	hexA	5'-CAARTTCAGRCAGACGGT-3'
	hexB	5'-TAGTGATGMCGSGACATCAT-3'
Belső kör	hexC	5'-SKCSACYTAYTTTCGACAT-3'
	hexD	5'-TTRTCQCKRAADCCGATGAT-3'

A többféle nukleotidot tartalmazó pozíciók jelölései: M = A/C, R = A/G, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, D = A/G/T.

8. táblázat: A tyúk-adenovírusok hexon génjére irányuló kétkörös PCR-ben alkalmazott hőmérsékleti paraméterek

Lépés	Hőmérséklet	Idő
Denaturáció	94 °C	5 min
35 ciklus		
Denaturáció	94 °C	30 s
Primerek illeszkedése		
1. kör	60 °C	30 s
2. kör	55 °C	30 s
Szintézis	72 °C	45 s
Végső szintézis	72 °C	3 min

4.8. PCR-termékek tisztítása

A PCR-termékeket szekvenálás előtt NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) kit segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. Ha a PCR-ben csak a specifikus terméket kaptuk, akkor a teljes reakcióelegyet mértük a kit oszlopára. Amennyiben nem-specifikus csíkokat is tapasztaltunk a gélelektroforézis során, akkor a specifikus terméket kivágtuk a gélből.

4.9. DNS-szekvenálás

A szekvenáló reakciókat minden esetben BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A szekvenálási reakciót mi végeztük el a 4.7.1. fejezetben leírt PCR-gépek egyikében. Ezután a terméket, alkoholos kicsapást követően, beszárított formában elküldtük elektroforetikus kiértékelésre. Ez Gödöllőn a Biomi Kft.-nél vagy az MTA Szegedi Biológiai Központjában ABI PRISM 3100 berendezés alkalmazásával történt.

A genomvégek szekvenálása esetében eltérő módszert alkalmaztunk a pulyka-adenovírus 1 és a liba-adenovírus 1 esetében. A TAdV-1 esetében a 4.5 pontban leírt végfragmentumokat tartalmazó klónokat szekvenáltuk. A GoAdV-1 esetében a nem-specifikus, ultrahangos genomtördelés után a genomvégek klónozása nem járhatott sikerrel, hiszen a terminális fehérjét nem távolítottuk el, ezért más módszert kellett alkalmazni. Ehhez a már megismert genomszekvencia bal végére terveztünk egy kifelé, azaz balra irányuló szekvenáló primert. Ezzel közvetlenül szekvenáltuk a genom bal végét tisztított, virális DNS-t használva templátként. Így megismertük az ITR szekvenciáját, és ezt, valamint az ismert genomrész jobb végének szekvenciáját alapul véve terveztünk specifikus primereket egy PCR-hez, mely a jobb véget erősítette föl, végül ennek termékét szekvenáltuk.

4.10. Alkalmazott bioinformatikai módszerek

Az újonnan meghatározott szekvenciákat az NCBI Genbank adatbázisában elhelyezett szekvenciákhoz hasonlítottuk a BLAST homológiaereső program segítségével (Altschul et al., 1997). A TAdV-1 esetében így folyamatosan készítettük a genom *Bam*HI alapú fizikális térképét. A szekvenciákat a Staden programcsomag (Staden et al., 2000) segítségével szerkesztettük és illesztettük össze.

A TAdV-1 és GoAdV-1 genom virtuális restrikciós endonukleázos emésztését a pDRAW32 program segítségével végeztük el, és az eredményt az észak-ír laboratóriumból rendelkezésünkre bocsátott TAdV-1 és -2 genomok restrikciós endonukleázos emésztésének eredményéhez (Guy és Barnes, 1997; Scott és McFerran, 1972), valamint a magyar GoAdV-1, -2, -3 hasonló analízisének eredményéhez (Zsák és Kisary, 1984a) hasonlítottuk.

A genomokat az Artemis program (Rutherford et al., 2000) segítségével értelmeztük. Először minden 40 aminosavnál hosszabb ORF aminosavszekvenciáját kinyertük a genomokból. Ezeket egy saját készítésű adatbázis elemeihez hasonlítottuk, mely minden ismert aviadenovirális ORF-et tartalmazott. Az összehasonlításhoz a

BioEdit programban (Hall, 1999) fehérje-fehérje BLAST (blastp) programot (Altschul et al., 1997) alkalmaztunk. Azokat az ORF-eket, melyeknek homológiát megtaláltuk, a homológgal azonosan jelöltük Davison és mtsai (2003) által használt nevezéktannak megfelelően. Ha a talált ORF által kódolt fehérje nem mutatott homológiát az NCBI GenBank egyetlen aminosavszekvenciájával sem, Corredor és mtsai (2008) számozását folytattuk. A származtatott aminosavszekvenciákban feltételezhető megőrzött doméneket az InterProScan Sequence Search (Zdobnov és Apweiler, 2001) használatával kerestünk.

4.11. Filogenetikai elemzések

A származtatott aminosavszekvenciák illesztését a ClustalW (Thompson et al., 1994) program segítségével végeztük el, majd az illesztéseket a BioEdit (Hall, 1999) programban szerkesztettük. Amennyiben fehérjét kódoló DNS-szekvenciák filogenetikai elemzését akartuk elvégezni, az illesztést akkor is a származtatott aminosavszekvencia alapján készítettük, majd a már szerkesztett illesztést visszafordítottuk az eltárolt DNS-szekvenciára BioEditben. A filogenetikai számításokat a Phylip programcsomag (Felsenstein, 1989) interneten elérhető verziójával végeztük (Mobylye@pasteur: mobyle.pasteur.fr). Az aminosavszekvenciáknál a Protdist programot a kategóriák modellel, míg DNS-szekvenciáknál a Dnadist programot a Kimura 2-paraméter modellel (Kimura, 1980). A filogenetikai fákat a mátrixokból a Fitch program segítségével számítottuk a teljes újrendezés (global rearrangements) opciójának alkalmazásával. A filogenetikai fák megbízhatóságát bootstrap módszerrel ellenőriztük, és végül a Mega (Tamura et al., 2007) programmal jelenítettük meg.

5. Eredmények

5.1. A genomok virtuális restrikciós endonukleázos emésztése, és a belfasti TAdV-1 és -2 törzs vizsgálata

A vizsgált pulyka-adenovírus D90/2 törzs, valamint liba-adenovírus P29 törzs virtuális restrikciós endonukleázos emésztése alapján kapott fragmentummintázat eredménye jelentősen eltért az irodalomban korábban közölt TAdV-1 és -2 (Guy és Barnes, 1997), valamint GoAdV-1, -2 és -3 (Zsák és Kisary, 1984a) DNS-ének megfelelő restrikciós enzim mintázatától. A hexon génre irányuló PCR-termék (Meulemans et al., 2004) szekvenálása továbbá kimutatta, hogy az eredeti belfasti TAdV-1 izolátum továbbpasszált leszármazottja mára a FAdV-8a típusal (58-as törzs) egyezik meg (lásd később: 6. ábra, 7. ábra).

Ugyanakkor a belfasti TAdV-2 törzs minden más aviadenovírus fajtól elkülönülő vonalat képez a törzsfarekonstrukciós vizsgálatok során (lásd később: 6. ábra, 7. ábra). Részleges hexon gén szekvenciája GU936708 számon érhető el a GenBank Nucleotide adatbázisában.

5.2. A pulyka- és liba-adenovírus 1 genomjának tulajdonságai

5.2.1. Általános tulajdonságok

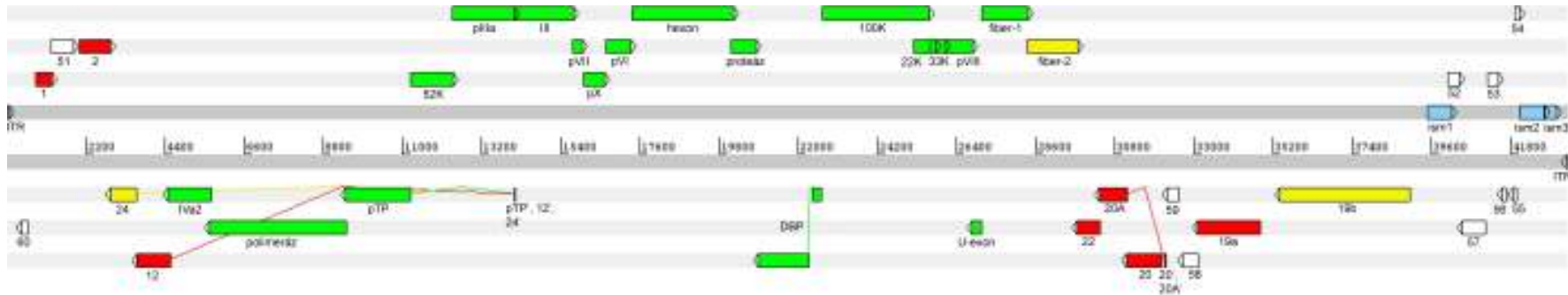
A GenBank Nucleotide adatbázisában a TAdV-1 teljes genomja a GU936707 számon érhető el, a GoAdV-1 teljes genomja pedig a JF510462 számon.

A TAdV-1 teljes genomja 45.413 bp-ból áll, ami eddig a leghosszabb ismert adenovírus genom. G+C-tartalma 67,55%, ami ugyancsak az eddigi legmagasabb a teljes genomsekvenciák között. A GoAdV-1 genomja 43.376 bp-t tartalmaz, G+C-tartalma 44,6%. A genomterképeket ábra mutatja be (3. ábra).

TAdV-1:



GoAdV-1:



3. ábra: A pulyka-adenovírus 1 (TAdV-1) és liba-adenovírus 1 (GoAdV-1) teljes genomjának géntérképe

A hat-hat világoszürke csík a leolvasási kereteket jelöli. Zöld nyilak: a teljes *Adenoviridae* családban megőrzött központi genomrégió génjei. Piros nyilak: minden aviadenovírusban megőrzött gének. Sárga nyilak: csak egyes aviadenovírusokban megtalálható gének. Fehér nyilak: egyedi, homológ nélküli gének.

Az exonokat vékony vonalak kötik össze. A fiber-2-L és fiber-2-R a TAdV-1 genomjában a második fiber génből eredő két csökevényes fiber gén. ism – ismétlődéseket tartalmazó régió; ITR – inverted terminal repeat, fordított végismétlődés; pTP – precursor of terminal protein, terminális fehérje prekurzora; DBP – DNA-binding protein, DNS-kötő fehérje

5.2.2. A genomok központi régiója

Mindkét genom központi régiója a megőrzött géntartalmat és -sorrendet mutatta: a IVa2 géntől a pVIII-ig a 16 központi gént találtuk. Szintén mindkét genomban ezekhez közvetlenül csatlakozik az U-exon és a fiber. A TAdV-1-ben három fiber gén homológ található, míg a GoAdV-1-ben kettő (3. ábra).

A fő késői promóter (MLP) transzkripció faktor kötőhelyeit és a kétosztatú leader (ld. 3.5. fejezet, 21. oldal) részeit mind a TAdV-1, mind a GoAdV-1 genomjában megőrzött pozícióban azonosítottuk, az *r* szálon, a DNS-polimeráz és a pTP génnel átfedő régióban. Az MLP TATA-boxát és a kétosztatú leadert már leírták a FAdV-1 (Payet et al., 1998) és FAdV-10 (Sheppard et al., 1998b) típus genomjának elemzésekor. Munkánk során megpróbáltuk azonosítani a TAdV-1, GoAdV-1 és a FAdV-1, -9 és -10 genomjában az összes kötőhelyet és a kétosztatú leadert. Eredményeinket táblázatban (9. táblázat) foglaltuk össze.

9. táblázat: A fő késői promóter (MLP) transzkripció faktor kötőhelyei és a kétosztatú leader részei a TAdV-1, GoAdV-1 és különböző FAdV genomokban

	TAdV-1	GoAdV-1	FAdV-1	FAdV-9	FAdV-10
Upstream activating element	8459–8470	6557–6568	7461–7471	8324–8335	1136–1147
TATA-box	8489–8496	6584–6591	7488–7495	8345–8352	1175–1183
Initiator	8521–8527	n. k.	n. k.	n. k.	n. k.
Kétosztatú leader 1. fél	8528–8564	6612–6647	7533–7554	8376–8418	1206–1244
Downstream activating element	8559–8569	6750–6760	7549–7559	8409–8419	1239–1249
Kétosztatú leader 2. fél	12479–12607	10365–10490	11285–11413	12299–12421	4973–5102

A számok a transzkripció faktor kötőhelynek vagy a leadernek az első és utolsó nukleotidját mutatják. Dőlten mások eredményeit tüntettük fel: FAdV-1: Payet et al., 1998; FAdV-10: Sheppard et al., 1998b. A táblázatban hivatkozott szekvenciák száma az NCBI GenBank adatbázisában: TAdV-1: GU936707, GoAdV-1: JF510462, FAdV-1: AC_000014, FAdV-9: AC_000013, FAdV-10: AF007577. n. k. - nem kimutatható

5.2.3. Bal genomvég

A TAdV-1 és GoAdV-1 genom bal vége hasonló a FAdV genomok megfelelő régiójához, amennyiben génusz- és fajspecifikus géneket tartalmaz. A TAdV-1 genomja itt az ORF0, ORF1, ORF1A, ORF1B és ORF2 géneket tartalmazza az *r* szálon, és az ORF12, ORF13, ORF14 és ORF24 nyílt leolvasási kereteket az *l* szálon. A GoAdV-1 megfelelő régiójában az ORF1 és ORF2, valamint egy új, feltételezett gén,

az ORF51 található az *r* szálon, míg a másik irányban az ORF12 és ORF24, valamint a szintén eddig homológ nélküli, új, feltételezett ORF60 kerül el (3. ábra).

Az ORF1 (dUTPáz) dUTP-pirofoszfátáz domént (IPR008180) tartalmaz a TAdV-1 esetében a 27. és 156., a GoAdV-1 esetében pedig a 18. és 143. aminosav között. Az ORF2 hasonlóságot mutat a TAdV-1 genomjában az ORF12-höz és ORF13-hoz, a GoAdV-1 genomjában pedig az ORF12-höz. Mind az öt említett ORF terméke szekvenciahomológiát mutat a parvovírusok nem-strukturális NS1 fehérjéjével, és négy esetben ez a doménkeresés során is kimutatható (IPR001257: TAdV-1 ORF2: 4–266. aminosav, TAdV-1 ORF13: 4–129. aminosav, GoAdV-1 ORF2: 3–261. aminosav, GoAdV-1 ORF12: 15–233. aminosav). A TAdV-1 esetében az ORF14 és ORF24 egymáshoz való hasonlósága is megemlíthető.

5.2.4. Jobb genomvég

A TAdV-1 genomjának jobb végi régiójában az ORF8, ORF9, ORF11 és ORF26 homológját találtuk meg az *r* szálon, valamint egy új gént, melyet ORF50-nek nevezünk el. Az *l* szálon az ORF17, ORF19, ORF20, ORF20A, és ORF22 található. A 39.679–39.923. bázispár közötti régióban egy ismétlődő szekvenciavariációkat tartalmazó régiót találtunk, amely nyolc 29–32 bp hosszú aleggységből áll.

A GoAdV-1 megfelelő régiója az *r* szálon egyetlen megőrzött gént sem tartalmaz. Az itt található, egyelőre semmilyen ismert fehérjével nem homológ fehérjét kódoló, feltételezett géneket ORF52, 53, 54-nek nevezük el. Az *l* szálon az ORF19 két homológja található, melyet ORF19a és ORF19b névvel láttunk el, továbbá az ORF20, ORF20A és ORF22. Öt új feltételezett gén is található ezen a szálon (ORF55–ORF59). Az ORF19b-től jobbra 3 régió is ismétlődéseket tartalmaz a következő bázispárok között: 39.454–40.123, 42.058–42.727, 42.728–43.040. Az 1. régió három teljes (168 bp hosszú) és egy részleges ismétlődést (141 bp) tartalmaz, a 2. és a 3. négy teljeset (152 és 70 bp) és egy részlegeset (62 és 33 bp). A 2. ismétlődéseket tartalmazó régió ismétlődő nukleotidszekvenciái nyílt leolvasási keretként is értelmezhetőek, ugyanazt a fehérjét kódolják az 1., a 3., majd a 2. leolvasási keretben, végül egy variánst ismét az elsőben. Az 1. ismétlődéseket tartalmazó régió egy összefüggő fehérjeként fordítható le, melyben háromszor ismétlődik ugyanazon aminosavszekvencia motívum, majd egy 4. variációval zárul.

A TAdV-1 ORF50-ének származtatott aminosavterméke két feltételezett transzmembrán domént tartalmaz a 39–59. és a 86–108. aminosavak között. További transzmembrán doméneket találtunk az ORF20A (14–34. és 44–64. aminosavak között), ORF19 (4–26., 36–56. és 884–904. aminosavak között) és az ORF9 (257–277. aminosavak között) származtatott termékeiben. Az ORF9 és az ORF11 terméke egy

immunglobulinszerű redőt tartalmaz (Interpro: IPR013783, ORF9: 130–211. aminosav, ORF11: 18–115. aminosav).

Transzmembrán régiókat találunk a GoAdV-1 ORF22 (101–121. aminosavak között), ORF20A (10–32. és 46–66. aminosavak között), ORF59 (124–146. aminosavak között), ORF58 (98–118. aminosavak között), ORF19a (549–571. aminosavak között) és ORF19b (1135–1155. aminosavak között) fehérjetermékeiben is. Az ORF59 egy immunglobulinszerű redőt (Interpro: IPR013783, 10–117. aminosavak között) is tartalmaz.

5.2.5. ITR

A TAdV-1 genom fordított végismétlődése (ITR-e) 95 bp hosszú, bár egy nukleotid eltérés (egy C→T tranzíció) található az 53. pozícióban. A GoAdV-1 genom ITR-e 39 bp hosszú.

5.2.6. Feltételezések az RNS-splicing folyamatáról

A TAdV-1 és GoAdV-1 genomjában több splice-helyet azonosítottunk. Feltételezzük, hogy mindkét genomban egy közös rövid (TAdV-1: 3 aminosav, GoAdV-1: 2 aminosav) 5' exonnal íródik át a pTP és a IVa2-től balra, az / szálon kódolt gének, azaz a TAdV-1 esetében az ORF12, ORF13, ORF14 és ORF24, a GoAdV-1 esetében pedig az ORF12 és ORF24. Hasonlóan közös 5' exonja van mindkét genomban az ORF20 és ORF20A génnek. Szintén mindkét genom esetében feltételezzük, hogy a 22K fehérjét kódoló gén kezdeti szakaszából splicing után folytatódik a 33K fehérjét kódoló gén. Egyedi splice-helynek minősül a TAdV-1 genomjában az ORF0-ban feltételezett: splice-donor: 623-628. bp, splice-fogadó: 681-695. bp. Ezen kívül megemlíthető még egy feltételezett ORF a GoAdV-1 genom jobb végén a 42.907–43.292. bp-ok között, mely előtt közvetlenül egy splice-fogadó helyet találtunk. Ennek esetleges splice-donor párja lehet az előtte fekvő ismétlődéseket tartalmazó régióban, ahol mind a négy teljes ismétlődésben megtalálható ugyanaz a splice-donor hely. Az említett ORF-et azonban nem tüntettük fel a genomtérképen (3. ábra) (ld. 6.3.3. fejezet, 50. oldal).

5.2.7. Proteáz vágási szignálok

A prekursor polipeptidek proteáz vágási szignáljait táblázatos formában mutatjuk be (10. táblázat), a pVI fehérjén találhatóakat pedig ábrán (4. ábra). A pVI fehérje végén található pVIc kofaktort, mely a virális proteáz aktivitását fokozza (Mangel et al., 2003; Webster et al., 1993), mindkét genomban megtaláltuk, konszenzusszekvenciája aviadenovírusokban: GV(A/T/Q)XXX(R/K)R(M/V)CY.

10. táblázat: A TAdV-1 és GoAdV-1 prekursor polipeptidjeinek proteáz vágási szignáljai

	TAdV-1				GoAdV-1			
	I típus	II típus	IIb típus	III típus	I típus	II típus	IIb típus	III típus
pTP	329	170, 203		206 ^a	301, 306	167, 184		187 ^a
pIIa	185	184 ^b , 510, 539, 547		262 ^c	184 ^b	506 ^d , 524, 561		262 ^c
pVII		25, 46	10 ^e			32, 55	10 ^e	
pX	6, 113 ^f , 140				6, 126	101		
pVI	25, 164	212			25	209		
pVIII	37, 112, 128, 139	164			35, 110, 128, 139	160		

A számok a vágási szignálok első aminosavait mutatják. Majdnem minden vágási szignál megőrzött, azaz legalább még egy másik aviadenovírusban megtalálható a megfelelő relatív pozícióban. Dőlten a nem megőrzött vágási szignálokat tüntettük fel.

^a A III-as típusú vágási szignál egy variánsát találtuk: TAdV-1: AGAA'G, GoAdV-1: SGAS'G.

^b Az I-es típusú vágási szignál egy variánsát találtuk minden aviadenovírusban: NXGG'X.

^c A III-as típusú vágási szignál egy variánsát találtuk: TAdV-1: TDAE'G, GoAdV-1: VDAD'G.

^d A II-es típusú vágási szignál egy variánsát találtuk: FTGT'G.

^e A IIb típusú vágási szignál egy variánsát találtuk mindkét genomban: NRGW'G az NTGW'G helyett. Bár előbbi a gyakoribb az aviadenovírusokban 7-ből 6 esetben.

^f II-es típusú minden más aviadenovírusban.

	*	20	*	40	*	60																
TAdV-1	:	MNY-AALS	PHVGHMQLR	DDQLGDS	SLRGGAINW	ENLGSRISSAL	SSTGRWLNH	NAGSRFVN	:	59												
GoAdV-1	:	MDY-AALS	PHVGSMA	LRDDVHG	NSSIRGGAIN	WENVGSRISSAL	GSTGRWLS	SNTGNRFLN	:	59												
FAdV-1	:	MDY-AALS	PHLGGMAL	RDDHHLG	DSSLRGGAIN	WGNLGSRISSAL	NSTGRWLN	TGNRFVH	:	59												
FAdV-9	:	MDY-AALS	PHVGSMA	LRDDGYL	GDSLRGGAIN	WENVGSRLSSAL	GTAGRWME	NQGNRFLN	:	59												
FaAdV-1	:	MDLRAS	LSLPHVGS	MSLRDEHL	GDSLRGGAIN	WENIGSRLSSAL	SSTGRWLN	HAGNRFVH	:	60												
		Mly	AaLSPH6G	W	LRD	G1SS6RGGAIN	WgN6GSR63SAL	3tGRW6	N	GnRF6												
	*	80	*	100	*	120																
TAdV-1	:	SQAFGQIK	QKQLKDS	GLVQNVAS	LAGE	TLTSLAL	TDIGRLK	LQDDLEK	LRRKALGE	DGPT-SQ	:	118										
GoAdV-1	:	SNTFQIK	QKQVRDS	GVIRKNAAN	LACD	TVNSLLD	IGRLK	LQDDLEN	LRRKALGE	QGPP-NV	:	118										
FAdV-1	:	SNTFNQIK	QKQIQDS	GVIRNVAN	LAGE	TLGAL	TDIGRLK	LQDDLEK	LRRKALGE	EGPA-TQ	:	118										
FAdV-9	:	SNTFGQIK	QKQKDS	GVIRNVAN	LAGE	TLGAL	TDIGRLK	LQDDLEK	LRRKALGE	DGPA-TQ	:	118										
FaAdV-1	:	SNTFNQIK	QKQIKDS	GVIRKNAAN	LAGE	TINAL	TDIGRLK	LQDDLEK	LRRKALGE	EGPPNT	:	120										
		SntF	QIKQG	kDSG66	N	AnLAGeT6	aLtDIGRLK	6QDDLEk	LRRKALGE	GP												
	*	140	*	160	*	180																
TAdV-1	:	AELQALIQ	ALQAQV-	ASAS-E	PAA-SAP	LRP-----	TTRPIPE	MVTEVR	BPAP	LPGGE	:	168										
GoAdV-1	:	AELQALIS	ALQSOL	NASASSA	PAANTAP	MAP-----	TTRPIPE	MVTEVR	PPPT	VPVVE	:	171										
FAdV-1	:	AELQALIQ	ALQAQVA	AGE--	PEAAPA	PAPAPPLVP--	TTRPIPE	MVTEVR	PPV	TSSAPA	:	174										
FAdV-9	:	AELQALIQ	ALQAQVA	AGESV	PTTAPT	VGPSAPAEVPR	TTRPIPE	MVTEVR	PPV	TSSAPA	:	178										
FaAdV-1	:	AELQALIA	ALQAQVA	NQSASQ	TTMDL	PPPLVP----	TTRPIPE	MVTEV	PL	PEVASSG	PS	:	176									
		AELQALI	ALQaQ6	a	p	a	p	TTRPIPE	MVTEv	Pp	t											
	*	200	*	220	*																	
TAdV-1	:	PTTLDL	PPPPSAP	PAVPAAPA	ASTFR	RNRKR	RARE	FGSWR	ARLD	LAGR	GVASSR	KRM	CY	:	226							
GoAdV-1	:	PF---	VTSSAA	VPE	STL	DLPP	PPAAK	RRPR	FR	GR	SR	LD	SMTG	SGVQY	MKKRM	CY	:	226				
FAdV-1	:	VP-----	VDV	PTTLE	MR	PP	PKRR-	RKR	ARE	FG	QWR	AR	LD	SL	SGT	VAT	ATRR	M	CY	:	223	
FAdV-9	:	VPE-----	TDR	PTTLE	MR	PP	AKRR-	RKR	PA	FG	SWR	TR	LN	LS	GN	GV	AVSR	RRR	M	CY	:	228
FaAdV-1	:	LP-----	VDT	PTTLE	YH	ES	IP	RRR-	RKR	P-	GN	WR	GR	LS	SMTG	SV	TKS	RRV	M	CY	:	223
		p		P	tl	p		4R	RKR		G	WR	RL	36	G	GV					4R6CY	

4. ábra: Aviadenovírusok pVI fehérjéjének proteáz vágási szignáljai

Zöld: I-es típusú vágási szignál, piros: II-es típusú vágási szignál. Kék keretben: pVIc kofaktor.

5.3. A pulyka- és liba-adenovírus 1 rendszertani helyének elemzése

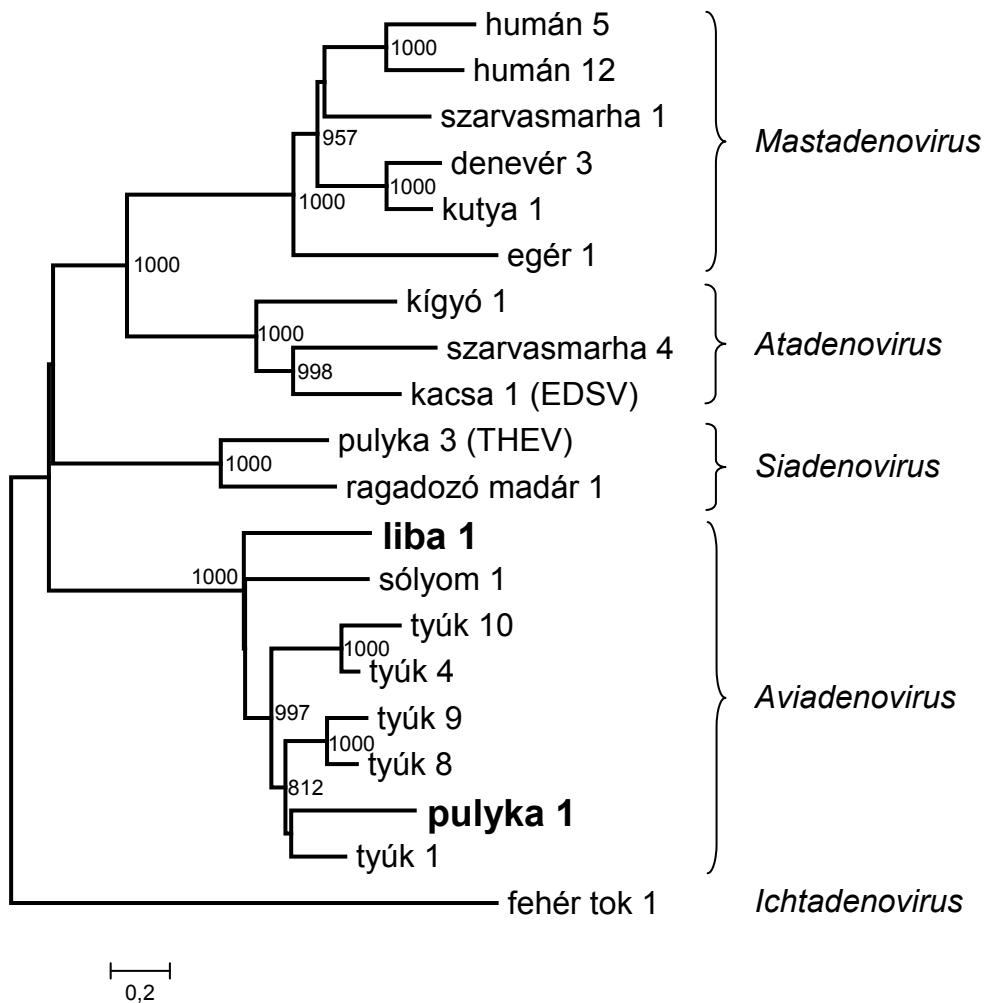
A teljes hexon gén származtatott aminosavszekvenciáján alapuló törzsfarekonstrukciós elemzés mind a TAdV-1, mind a GoAdV-1 típust egyértelműen az *Aviadenovirus* génuszba sorolta, de filogenetikai távolságuk a többi fajtól megalapozza új fajként való elkülönítésüket. A különböző génuszok tagjai elkülönülnek a törzsfán, és ezt a magas bootstrap értékek is megerősítik (5. ábra).

Az aviadenovírusok részleges hexon gén nukleotidszekvenciáján (Meulemans et al., 2004) alapuló elemzés a liba-adenovírusokat egy monofiletikus kládba sorolta, míg a TAdV-1 a *Tyúk-adenovírus A* és *C* fajok tagjaival található egy leszármazási vonalon, de azoktól elkülönülő fajt alkot. A belfasti laboratóriumból származó TAdV-1 teljes mértékben megegyezik a FAdV-8a típusal az elemzésen, míg a TAdV-2 a tyúk-adenovírusok között található, de azoktól elkülönülő ágat alkot (6. ábra).

A DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges származtatott aminosavszekvenciáján (Wellehan et al., 2004) alapuló elemzés a TAdV-1 típust a FAdV-1 típusal csoportosította, de attól itt is elkülönülő fajt alkot, míg a GoAdV-1 három másik liba izolátummal monofiletikus, sőt azokkal aminosav szinten teljes mértékben meg is egyezik. A belfasti TAdV izolátumok csoportosulása nagyon hasonló a részleges hexon gén szekvencián alapuló elemzésben megfigyeltékhez, azaz a belfasti TAdV-1 megegyezik a FAdV-8a típusal, a TAdV-2 pedig elkülönülő ágon található (7. ábra).

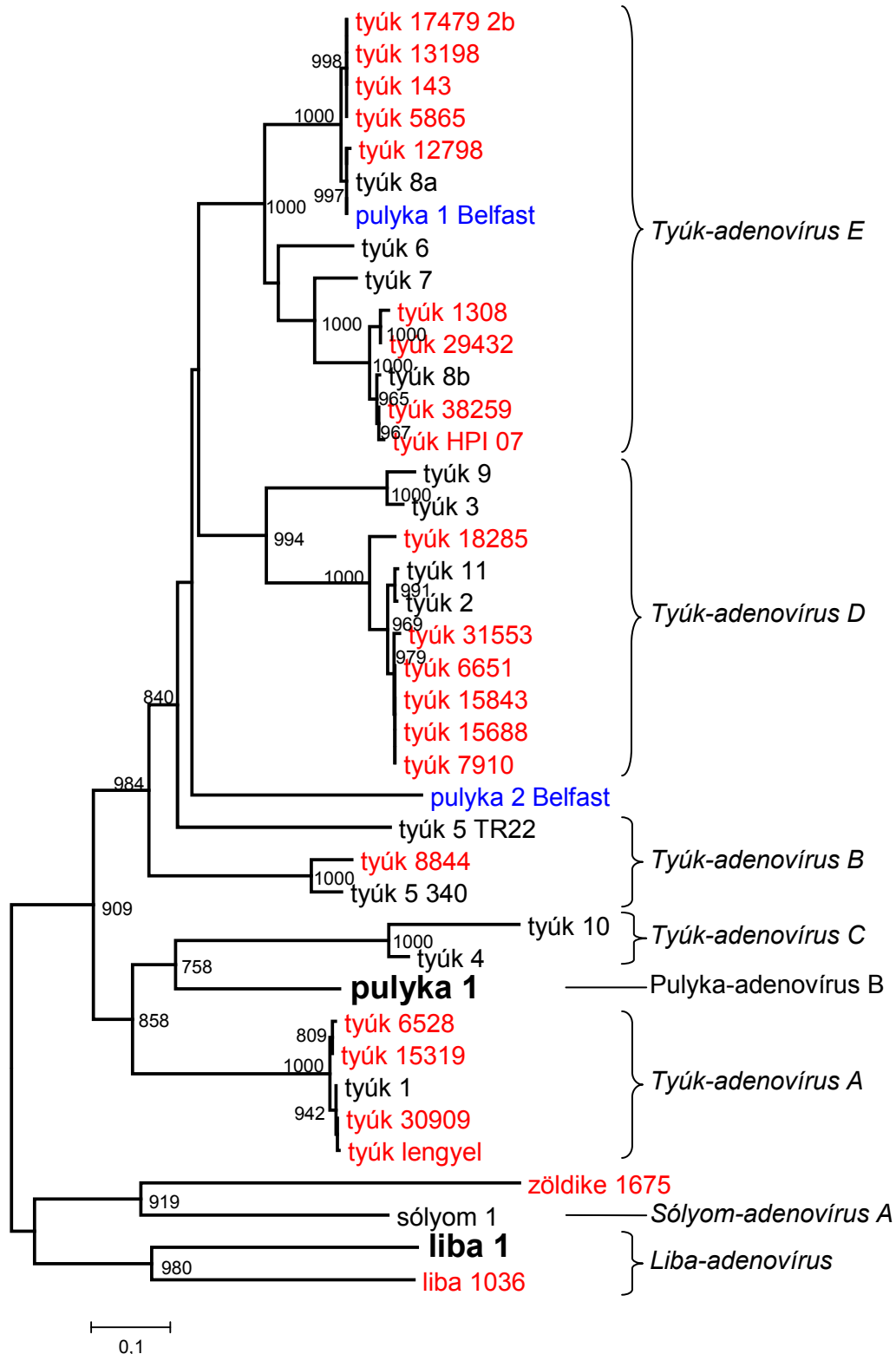
5.4. A tyúk-adenovírus referenciatörzsek filogenetikai elemzése

A vizsgált 10 tyúk-adenovírus referenciatörzs DNS-függő DNS-polimeráz génjének részleges szekvenciáját (272 bp) HM853995–HM854004 elérési számon helyeztük el a GenBankban. A törzsfarekonstrukciós elemzés az egy fajba sorolt típusokat monofiletikusan ábrázolta, a tyúk-adenovírusok öt faja jól elkülöníthető a törzsfán, és ezt a magas bootstrap értékek is alátámasztják. A FAdV-D és -E faj típusai egy fajon belül aminosav szinten teljes mértékben megegyeztek (7. ábra).



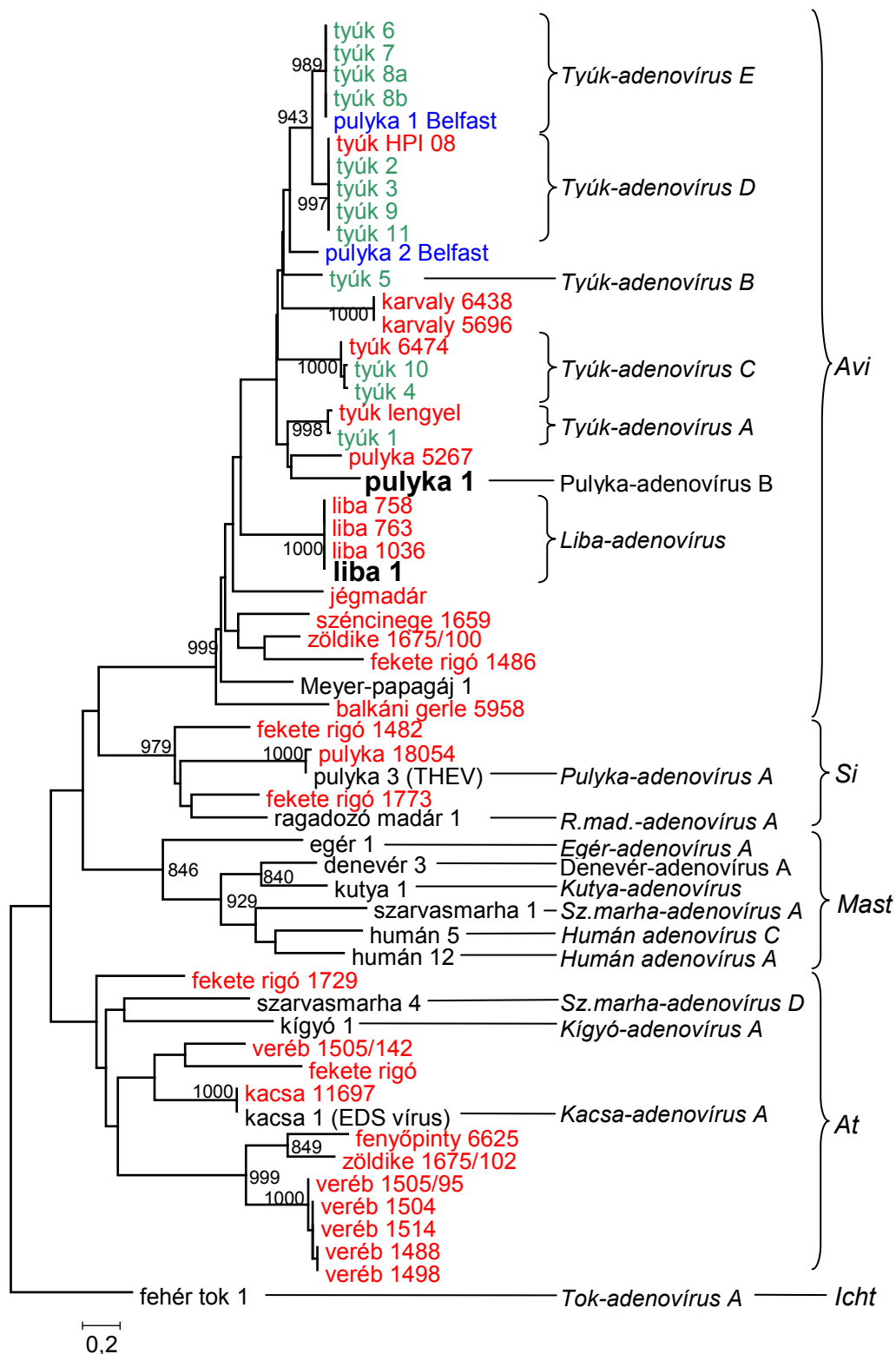
5. ábra: Adenovírusok teljes hexon génjének származtatott aminosavszekvenciáján alapuló törzsfa-rekonstrukciós elemzés

A törzsfát a megjelenítéshez a fehér tok 1-es típusú adenovírusával gyökerezítettük. Az adenovírus típusokat a fán a gazdaállat nevével és a típusszámmal tüntettük fel (ragadozó madár 1: raptor adenovirus 1). A vizsgált pulyka- és liba-adenovírus 1 típusokat félkövéren és nagyobb betűmérettel tüntettük fel. Dőlt betűvel a génuszokat jelöltük. A bootstrap értékek 1000 analízisre vonatkoznak, és akkor tüntettük fel őket, ha 750-nél nagyobbak.



6. ábra: Aviadenovírusok részleges hexon gén nukleotidszekvenciájának távolsági mátrix analízisén alapuló törzsfá-rekonstrukciós elemzés

A törzsfát a megjelenítéshez a középpontján gyökerezítettük. Az adenovírus típusokat a fán a gazdaállat nevével és a típuszámmal tüntettük fel. A tyúk-adenovírus 5 esetében a vírustörzs számát is jelöltük. Az általunk vizsgált mintákat a gazdafaj és egy azonosító képviseli, ezeket piros színnel jelöltük. A belfasti pulyka-adenovírus 1 és 2 törzsek kékek Belfast jelöléssel. A vizsgált pulyka- és liba-adenovírus 1 típusok félkövéren és nagyobb betűmérettel szerepelnek, az elfogadott fajnevek pedig dőlten. A törzsfá topológiáját bootstrap módszerrel ellenőriztük, a bootstrap értékek 1000 analízisre vonatkoznak, és akkor tüntettük fel őket, ha 750-nél magasabbak.



7. ábra: Adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjének egy szakaszáról származtatott aminosavszekvencián alapuló törzsfá-rekonstrukció

A törzsfát a megjelenítéshez a fehér tok 1-es típusú adenovírusával gyökerezítettük. Az adenovírus típusokat a fán a gazdaállat nevével és a típuszámmal tüntettük fel (ragadozó madár 1: raptor adenovirus 1). Az általunk vizsgált mintákat a gazdafaj és egy azonosító képviseli, ezeket piros színnel jelöltük. A belfasti pulyka-adenovírus 1 és 2 törzsek kékek Belfast jelöléssel, a tyúk-adenovírus referenciatörzsek zöldek. A vizsgált pulyka- és liba-adenovírus 1 típusok félkövéren és nagyobb betűmérettel szerepelnek, az elfogadott faj- és génusznevek pedig dőlten (*Avi* – *Aviadenovirus*, *At* – *Atadenovirus*, *Icht* – *Ichtadenovirus*, *Mast* – *Mastadenovirus*, *Si* – *Siadenovirus*, *R.mad.* – *Ragadozó madár*, *Sz.marha* – *Szarvasmarha*). A törzsfá topológiáját bootstrap módszerrel ellenőriztük, a bootstrap értékek 1000 analízisre vonatkoznak, és akkor tüntettük fel őket, ha 750-nél magasabbak.

5.5. Egyéb madár-adenovírus minták filogenetikai elemzése

Az egyéb madaraktól, PCR segítségével kimutatott adenovírusok DNS-függő DNS-polimeráz génjének részleges származtatott aminosavszekvenciáját (90 aminosav) (Wellehan et al., 2004) és részleges hexon gén nukleotidszekvenciáját (531-555 bp) (Meulemans et al., 2004) filogenetikai számításokkal elemeztük. Egyes esetekben egy mintából több vírust is ki tudtunk mutatni.

A DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges származtatott aminosavszekvenciáján alapuló elemzés a tyúkból származó minták nagy részét a FAdV-D és -E fajba sorolta, melyek többségét ezen a törzsfán nem tüntettük fel. A 6474-es tyúkmintát a FAdV-C fajba sorolta az elemzés, egy lengyel tyúkmintát pedig a FAdV-1 típusal mutatott szinte azonosnak. Az 5267-es pulykaminta a szekvenált TAdV-1 típusal helyeződik monofiletikusan, de attól távol, három libaminta (758, 763, 1036) pedig a szekvenált GoAdV-1 típusal egyezik meg teljes mértékben aminosavszerint a vizsgált szakaszon. Egy pulykamintában (18054) sikerült kimutatni a pulykák vérzéses bélgyulladásának vírusát (*Siadenovirus* génusz), egy kacsamintában (11697) pedig az EDS vírust (*Atadenovirus* génusz). A további vadmadár-adenovírusoknak csak egy részét sorolta az *Aviadenovirus* génuszba az elemzés, kettő a *Siadenovirus* génuszba, tíz pedig az *Atadenovirus* génuszba került a törzsfán. Egy zöldike (1675) mintájában egy avi- valamint egy atadenovírus jelenlétét is kimutattunk. Egy veréből (1505) származó mintában pedig két, elkülönülő atadenovírust találtunk (7. ábra, 11. táblázat).

A hexon géntípusra irányuló Meulemans-féle PCR (2004), melyet tyúk-adenovírusokból származó szekvenciák alapján terveztek, valóban szinte minden esetben csak tyúk-adenovírusokkal adott pozitív eredményt. Ezek többsége a FAdV-D és -E fajba sorolódott, de 4 esetben kimutattunk a FAdV-1 típusal (FAdV-A faj) a vizsgált szakaszon szinte nukleotidszerint megegyező vírust is. Ezenkívül egy mintát (tyúk 8844) soroltunk a FAdV-B fajba, a mintából származó részleges hexonszekvencia a JF304111 azonosítót kapta a GenBank Nucleotide adatbázisában. Egy feltételezett zöldike-adenovírus (1675) a törzsfá-rekonstrukción a sólyom-adenovírus 1 típusal monofiletikus volt. Megállapítottuk továbbá, hogy az egy fajba sorolt típusok monofiletikusak, de egymástól elkülöníthetők a törzsfán (6. ábra, 11. táblázat).

11. táblázat: A gyakorlati esetekből származó mintákból kimutatott adenovírusok összefoglalása

Minta jele	Klón jele	Származási ország	Kb. lelet	A diagnosztizált adenovírus		
				Génusza	Faja	Típusa
balkáni gerle 5958		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
fekete rigó		Magyarország		<i>Atadenovirus</i>		
fekete rigó 1482		Svájc		<i>Siadenovirus</i>		
fekete rigó 1486		Svájc		<i>Aviadenovirus</i>		
fekete rigó 1729		Ausztria		<i>Atadenovirus</i>		
fekete rigó 1773		Ausztria		<i>Siadenovirus</i>		
fenyőpinty 6625		Magyarország		<i>Atadenovirus</i>		
jégmadár		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
kacsa 11697		Magyarország		<i>Atadenovirus</i>	DAdV-A	DAdV-1
karvaly 5696		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
karvaly 6438		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
liba 758		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
liba 763		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
liba 1036		Magyarország	h.p.card.	<i>Aviadenovirus</i>		
pulyka 5267		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
pulyka 18054		Magyarország		<i>Siadenovirus</i>	TAdV-A	TAdV-3
széncinege 1659		Ausztria		<i>Aviadenovirus</i>		
tyúk 143		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8a
tyúk 1308		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8b
tyúk 5865		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8a
tyúk 6474		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-C	
tyúk 6528		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-A	FAdV-1
tyúk 6651		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 7910		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 8844		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-B	FAdV-
tyúk 12798		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8a
tyúk 13198		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8a
tyúk 15319		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-A	FAdV-1
tyúk 15688		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 15843		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 17479 2b		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8a
tyúk 18285		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 29432		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8b
tyúk 30909		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-A	FAdV-1
tyúk 31553		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk 38259		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8b
tyúk HPI 07		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-E	FAdV-8b
tyúk HPI 08		Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-D	
tyúk lengyel		Lengyelország	z.gy.fek.	<i>Aviadenovirus</i>	FAdV-A	FAdV-1
veréb 1488		Svájc		<i>Atadenovirus</i>		
veréb 1498		Svájc		<i>Atadenovirus</i>		
veréb 1504		Svájc		<i>Atadenovirus</i>		
veréb 1505	95	Svájc		<i>Atadenovirus</i>		
	142		<i>Atadenovirus</i>			
veréb 1514		Svájc		<i>Atadenovirus</i>		
zöldike 1675	100	Magyarország		<i>Aviadenovirus</i>		
	102		<i>Atadenovirus</i>			

Kb. lelet: kórbonctani lelet; h.p.card.: hydropericardium; z.gy.fek.: zúzógyomorfelekély; DAdV: duck adenovirus, kacsa-adenovírus; FAdV: fowl adenovirus, tyúk-adenovírus; TAdV: turkey adenovirus; pulyka-adenovírus

6. Megbeszélés

Kutatócsoportunk elsőként határozta meg nem házityúk eredetű aviadenovírusok teljes genomjának szekvenciáját. Eredményeinket összevetve más kutatócsoportok által közölt adatokkal, az alábbi következtetésekre jutottunk.

6.1. A D90/2 pulyka-adenovírus törzs és a P29 liba-adenovírus törzs típusba sorolása

Az évtizedekkel ezelőtt leírt TAdV-1 és GoAdV-1 eredeti izolátuma mára nem elérhető, szekvencia pedig nem áll rendelkezésre belőlük. Ezért célszerűnek látszik, hogy a témában különösen aktív kutatókkal történő egyeztetés után az általunk szekvenált D90/2 pulyka-adenovírus és P29 liba-adenovírus törzs képviselje ezentúl a pulyka-adenovírus 1 és liba-adenovírus 1 típusokat. Annak ellenére is, hogy a genom restrikciós enzimes emésztése megmutatta (5.1 fejezet), ezek a törzsek nem egyeznek meg az eredetileg leírt TAdV-1 és GoAdV-1 típusok törzseivel. Nem tartjuk ugyanis ésszerűnek az eddigi számozás folytatását, mivel a régi típusokból semmilyen szekvenciainformáció nem áll rendelkezésünkre és ez várhatóan nem is fog változni. Az eredeti belfasti TAdV-1 típus (Scott és McFerran, 1972) törzsének továbbpasszált leszármazottja mára ugyanis a FAdV-8a típus (58-as törzs) egyezik meg (6. ábra, 7. ábra), az eredeti GoAdV-1 típusból (Zsák és Kisary, 1984a) pedig egyetlen törzs se maradt ránk.

6.2. A DNS-szekvenálási módszerek összehasonlítása

Munkánk során alkalmunk nyílt a véletlenszerű klónozás és az úgynevezett „sörétespuska” szekvenálás módszerét összehasonlítani.

A pulyka-adenovírus 1 genomjának meghatározásához egy több mint 4 éven át tartó munka keretében 296 reakcióval összesen 159.497 nukleotidot olvastunk le. A genom meghatározásában fel nem használt szekvenciák mennyisége 23.046 bp, a genom mérete pedig 45.413 bp. Ezek aránya 0,5:1. A genom lefedettsége átlagosan háromszoros.

A liba-adenovírus 1 esetében a „sörétespuska” szekvenálás módszerét alkalmazhattam a Glasgow-i Egyetem MRC Virologiai Egységében. Ehhez összesen

549.353 nukleotidot határoztunk meg körülbelül 1500 reakcióval, ebből 1290 került az adatbázisba (a többi rossz minőség vagy egyéb okból alkalmatlannak bizonyult). A legnagyobb részt kitevő, tényleges „sörétespuska” szekvenálás 1 hónap alatt zajlott le. A réskitöltő PCR-ek elvégzése és szekvenálása körülbelül újabb 1 hónapot vett igénybe. A leghosszabb ideig, több mint 4 hónapig, a genomvégeken lévő 643 bp hosszúságú szakasz szekvenálása tartott. Az adatbázisba bevett, tehát jó minőségű, de nem liba-adenovírus (hanem pl. házilúd kromoszóma) eredetű szekvenciák teljes hossza 243.005 bp, a genom mérete pedig 43.376 bp. Ezek aránya 5,6:1. A genom lefedettsége átlagosan 7-szeres.

A „sörétespuska” szekvenálás tehát jóval gyorsabban szolgáltat nagy mennyiségű információval, igaz csupán a szekvenálási reakciók számát hasonlítva ötszörös áron. Azonban, ha a munkaerő árát, valamint a TAdV-1 genomjának szekvenálásához szükséges PCR-ek és egyedi szekvenáló (genome walking) primerek költségeit is számításba vesszük, a „sörétespuska” szekvenálás mindenképp elsőnek kerül ki az összehasonlításból.

6.3. A pulyka- és liba-adenovírus 1 genomja

6.3.1. A genomok központi régiója

A genomok központi megőrzött régiója a IVa2 géntől a pVIII-ig nem tért el a más adenovírusokban tapasztaltaktól. Ez a 16 gén közvetlenül kapcsolódik az U-exonhoz és a fiber génhez, mint minden aviadenovírusban.

A TAdV-1 genomjában a pVIII-tól jobbra három ORF is homológiát mutatott más adenovírusok fiber génjeivel. A három ORF közül az első egy teljes fiber gén, melynek származtatott termékében felismerhető a fiberre jellemző farok, szár és fej régió. Viszont a második fiberhomológ származtatott termékében csak a farokrégió és a szár egy része volt felismerhető, míg a harmadikban a fejrégió és a szár. A két részhomológ átfedő régiójában található egy CCCCCC nukleotidmintázat (33137–33142. nukleotid), melyet ha 5 citozinra redukálunk, a leolvasási keret következményes eltolódása miatt a két részhomológ egy fibergénben egyesül, mely rendelkezik farok, szár és fejrégióval.

Hogy kizárjuk a szekvenálási hiba lehetőségét, a kérdéses régió nukleotid sorrendjét többször is meghatároztuk, mind a klónozott genomfragmentumon, mind pedig az eredeti vírus DNS-t mintaként használva egy felsokszorozott PCR-terméken. Minden alkalmommal ugyanazt az eredményt kaptuk, a TAdV-1 ezen izolátumában a második fiberben egy leolvasásikeret-eltolódás található, mely azt eredményezi, hogy egy fehérje helyett két csökevényes kódolódik.

Feltételezhetjük azonban, hogy a vad TAdV-1 még két teljes fiber génnel rendelkezett, és az inszerció csak az izolálás során jött létre. Több leolvasásikeret-tolódás, vagy a divergens evolúció más jelei nem figyelhetőek meg a régióban. Az adenovírusok a fiber fejrégiójával kapcsolódnak a gazdasejthez, és a vad vírus feltételezhetően két fibert kódolt. A TAdV-1 D90/2 törzsét csirkeembrió májsejt tenyészetben izoláltuk, feltételezhető, hogy ezek a sejtek nem fejezték ki a második fiber által használt receptort, így nem volt szüksége a vírusnak erre a fiber génre, képes volt szaporodni nélküle is.

Megjegyzendő, hogy azokban az aviadenovírusokban, melyek genomjának megfelelő régiója ismert, a FAdV-1 genomjában két fiber gén található (Chiocca et al., 1996), míg a FAdV-8 és -9 genomjában csak egy (Grgić et al., 2011; Ojkić és Nagy, 2000). Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a FAdV-ok egy kapszidcsúcsán két fiber fejeződik ki, melyek a FAdV-1 esetében különböző hosszúságúak, a többi FAdV típusnál nagyjából azonosak (Gelderblom és Maichle-Lauppe, 1982). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a FAdV-1 kivételével a tyúk-adenovírusoknak egy fiber génjük van. Sem a TAdV-1, sem a GoAdV-1 típus fiberjeit nem vizsgálták még elektronmikroszkóposan.

Ha a TAdV-1, GoAdV-1 és FAdV-1 homológ fiberrégióinak aminosavszekvenciáit összevetjük, azt találjuk, hogy az egyes és kettős fiberek farokrégiói a TAdV-1 és FAdV-1 típusokban jobban hasonlítanak egymásra a két típus között (TAdV-1 fiber-1–FAdV-1 fiber-1: 50%; TAdV-1 fiber-2–FAdV-1 fiber-2: 50%), mint a két fiber farokrégiói egy típuson belül (TAdV-1 fiber-1–fiber-2: 25%; FAdV-1 fiber-1–fiber-2: 24%). Hasonló megfigyelést tettünk a kettős fiberek fej régióival (TAdV-1–FAdV-1: 45%; TAdV-1 fiber-1–TAdV-1 fiber-2: 17%; FAdV-1 fiber-1–FAdV-1 fiber-2: 14%). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a két fiber gén jelen volt már a TAdV-1 és FAdV-1 közös őseiben is, amit alátámaszt a TAdV-1 és FAdV-1 közeli, esetenként akár monofiletikus helyeződése a törzsfarekonstrukciókon (5. ábra, 7. ábra). Ugyanakkor a fiberek szárrégiójának elemzésekor ennek némileg ellentmondó eredményre jutottunk, melyben a TAdV-1 kettős fibere 50%-os hasonlóságot mutat a FAdV-1 egyes fiberéhez, míg más vonatkozásban nem találunk jelentős hasonlóságot. Ezt azonban okozhatja esetleg a szárrégió hasonló szerkezetű részekből álló, moduláris felépítése, és az ebből következő nem örökletes eredetű hasonlóság.

A fő késői promóter és a kétosztatú leader hasonlóan helyeződött mindkét genomban a más aviadenovírusokban megfigyeltekhez (Payet et al., 1998; Sheppard et al., 1998b). Mivel eredményeink csak szekvenciahomológok keresésén alapulnak, kísérletes vizsgálatokra lenne szükség, hogy a transzkripció faktor kötőhelyek és a kétosztatú leader pontos lokalizációját meghatározhassuk. Azonban a kérdéses

szekvenciák és lokalizációk nagyfokú konzerváltsága az *Aviadenovirus* génuszban alátámasztja predikciónkat. Ugyanakkor azt sem szabad elfelejtenünk, hogy ez a konzerváltság adódhat az ugyanezen régióban az / szálon található DNS-függő DNS-polimeráz gén erősen konzervált szekvenciája miatt is.

6.3.2. Bal genomvég

A tyúk-adenovírusok genomjának vizsgálatok a genom bal terminális régiójában leírták már az ORF2-ORF12-ORF13 hasonlóságát, valamint ezek homológiáját a parvovírusok NS1 fehérjéjével (Chiocca et al., 1996; Corredor et al., 2006; Davison et al., 2003; Washietl és Eisenhaber, 2003). Az ORF14 és ORF24 hasonlóságát is észlelték már (Corredor et al., 2006; Washietl és Eisenhaber, 2003), ahogy az a TAdV-1 genomjában is megfigyelhető. Megemlíthető még a GoAdV-1 genomjában található ORF51, mely az ORF1 és ORF2 között helyeződik el. Ennek származtatott terméke 201 aminosav hosszú, és a 20–75. aminosav között 26–28%-os hasonlóságot mutat a TAdV-1 ORF13, valamint a FAdV-8, -9, -2 ORF2 termékéhez. Feltételezhetően ez a géncsalád (ORF2, ORF12, ORF13, ORF51) eredetileg egy génből állt, mely egy dependovírus genomjából inszertálódott egy koinfekció alkalmával, majd duplikálódott, és a duplikátumok divergálódtak az evolúció során. Persze ennek ellentéte is lehetséges, azaz hogy a gén egy adenovírusból került át parvovírusokba, de akár közös gazdaeredetű génszerzés is előfordulhatott.

Az aviadenovírusokban megismert, megőrzöttek vélt ORF-ek közül, a genom bal végén többnek a homológiát nem tudtuk kimutatni a két vizsgált vírusban. A TAdV-1 genomjából csak az ORF1C hiányzik, amit eddig majdnem minden aviadenovírus genomjában megtaláltak (Corredor et al., 2006). Ugyan az ORF1B és ORF2 között, ahol az ORF1C található a FAdV típusokban, találtunk egy rövid ORF-et (153 bp, 1803–1955. nukleotid), de mivel a származtatott aminosavterméke nem mutatott homológiát az NCBI GenBank egyetlen fehérjéjével sem, létezését nem valószínűsítjük. Az egyedüli FAdV típusok, ahol az ORF1C nem mutatható ki, a FAdV-C fajba sorolt mindössze két típus a FAdV-4 és -10. Érdekes módon a részleges hexon szekvencián alapuló törzsfarekonstrukción (6. ábra) a TAdV-1 ezzel a két FAdV típussal monofiletikusnak mutatkozik, még hozzá magas bootstrap értékkel támogatva, és a másik két törzsfán is közel helyeződnek egymáshoz.

A GoAdV-1 genomja még jobban eltér a tyúk-adenovírusokétól ebben a régióban. Nem található meg az / szálon az ORF0, ORF1A, ORF1B, az *r* szálon pedig az ORF13, ORF14 sem. Ez azonban nem meglepő, ha figyelembe vesszük a liba-adenovírus filogenetikai távolságát a tyúk- és pulyka-adenovírusoktól.

6.3.3. Jobb genomvég

A genomok jobb terminális régiójában a legmegőrzöttebb gének az *Aviadenovirus* génuszban az I szálán található ORF19, ORF20, ORF20A és OR22. Az ORF19 egy lipáz enzimet kódol, amely homológiát mutat a Marek-betegség vírusának (*Alphaherpesvirinae* alcsalád) lipáz génjével (Davison et al., 2003; Ojkić és Nagy, 2000). A GoAdV-1 lipáz génjeinek származtatott termékében meg is található a lipáz domén (InterPro: IPR000734, ORF19a: 53–109. aminosav, ORF19b: 472–627. aminosav), és ezen belül a GX SXG konszenzusmotívum, mely még az emlősök hasnyálmirigy lipázában is megtalálható (Corredor et al., 2008; Schrag és Cygler, 1997). Bár a GX SXG motívum kétszer is szerepel a TAdV-1 ORF19 aminosavtermékében (116–120. aminosav: GGSVG, 338–342. aminosav: GGSDG), lipázdomént nem detektáltunk a szekvenciában. Ezt a 13–125 aminosav hosszú inszerciók és deléciók okozhatják, melyek a más aviadenovírus lipázokban megtalálható, jól konzervált régiókat felszabdadják, eltüntetik. Feltételezhetjük tehát, hogy a fehérjének nincs már lipázaktivitása, a gén divergens evolúción ment át, és terméke már új szerepet tölt be. Feltételezhetően azonban még mindig lipidmembránhoz kötötte, mert három transzmembrán domén található benne. A GoAdV-1 lipázaiban csak egy-egy transzmembrán régió található.

Az aviadenovírus genomok jobb terminális régiójában gyakoriak az immunglobulin doménnel rendelkező fehérjéket kódoló gének, ilyen domén található a FAdV-1 ORF9, ORF10, ORF11, FAdV-2 ORF11a, FAdV-8 ORF23 és FAdV-9 ORF11, ORF23 génjeinek származtatott fehérjetermékében. Ezzel összhangban találtunk ilyen géneket a TAdV-1 és GoAdV-1 genomjában is. Ezek termékei egy aviadenovírus fehérjecsalád tagjai, mely fehérjék valószínűleg befolyásolni képesek a gazdaállat immunrendszerét (Corredor et al., 2008; Davison et al., 2003; Le Goff et al., 2005). Ezek az ORF-ek a tyúk-adenovírusokban és a TAdV-1 genomjában is az ORF19 (lipáz) géntől jobbra találhatóak, azonban a GoAdV-1 genomjában az ORF20 és ORF19a között, azaz a lipáz géntől balra találtuk meg az immunglobulin domént tartalmazó fehérje génjét, mely egyébként nem mutatott homológiát az eddig aviadenovírusokból ismert, hasonló domént tartalmazó fehérjéket kódoló génekkel.

A TAdV-1 genomjában a 39.935–40.117. bázispárok közt (stop kodontól stop kodonig számolva) levő ORF hasonlít a FAdV-8 (CA törzs) ORF28 génjére. De ha elfogadjuk a legelső lehetséges startkodont, a származtatott fehérje mindössze 27 aminosav lenne (génje: 40.034–40.117. nukleotid), és ezzel elvesztenénk hét megőrzött aminosavat a fehérjéből, mely a FAdV-8 ORF28 származtatott

aminosavszekvenciájában megtalálható. Ezért ezen ORF létezését nem valószínűsítjük.

Megemlítendő, hogy az ignorált ORF28 homológától balra található a TAdV-1 genomjában a nyolc darab ismétlődő szekvenciavariáció. Ismétlődéseket tartalmazó régiót találtak már a FAdV-4, -8, -9 és -10 genomjának hasonló régiójában is, 45–135 bp hosszú ismétlődő egységekkel (Cao et al., 1998; Corredor et al., 2008; Ojkić és Nagy, 2000). Az ismétlődések variálódó szekvenciája, és a csökevényes ORF28 alapján feltételezhetjük, hogy a TAdV-1 genomjának ezen régiója evolúciós változáson megy keresztül.

A GoAdV-1 genomjában három ismétlődéseket tartalmazó régió található; közvetlenül a második előtt egy szekvenciavariáció is felfedezhető. A régióból származó (a genom 42.029–42.057. nukleotidjai között) 19 szekvencia két variáns között oszlik meg, a két variáns 6 nukleotidban tér el egymástól. 15 alkalommal szerepel a konszenzusban szereplő variáns, és négy alkalommal egy másik, ahol hiányzik a régióba eső stop kodon. Ha tehát ezt a variációt fogadjuk el, az ORF54 31 aminosavval lesz hosszabb.

A GoAdV-1 genomjában a 3. ismétlődéseket tartalmazó régiótól jobbra található egy ORF (43.158–43.289. nukleotidjai között), mely nem rendelkezik startkodonnal, viszont splice-fogadó hellyel igen. A 3. ismétlődéseket tartalmazó régió minden egységében megtalálható egy splice-donor hely, bár startkodon ezekhez sem tartozik, kivéve a legelsőt. Ebben az első egységben található splice-donor helynek megfelelő ORF (42.643–42.738. nukleotidok között a splice-donor helyig számolva) a 2. ismétlődéseket tartalmazó régió 4. egységében kezdődik. A két ORF tehát esetleg kifejeződhet együtt, sőt ha a 3. ismétlődéseket tartalmazó régióban esetleg mutációval startkodonok alakulnak ki a megfelelő leolvasási keretben, a vírus eltérő aminosavszekvenciával kezdődő, de azonos végű fehérjevariációkat is kifejezhet a splice-helyek alkalmazásával. Azaz ez a genomszerkezet bizonyos körülmények között lehetővé teszi új gének kialakítását a megváltozott környezethez alkalmazkodva. Az ismétlődéseket tartalmazó régiókba eső ORF-eket azonban feltételezhető átmeneti jellegük miatt nem fogadtuk el. Valószínűsíthetjük továbbá, hogy az ismétlődéseket tartalmazó régiók a vad vírusban még nem szerepeltek, csak a mesterséges sejtenyészetben történő passzálás következményei (Davison et al., 2000).

6.3.4. ITR

Az adenovírusok genomjában az ITR-eknek nagyon fontos szerepük van a replikáció beindításában, különböző szabályozófaktoroknak biztosítanak kötőhelyet (Liu et al., 2003), és mivel megegyező szekvenciával rendelkeznek a két genomvégen

(Dán et al., 2001), mindkét irányból biztosítják ezeket. Az eddig ismert aviadenovírus ITR-ek közül a FAdV-1 típusé volt a legrövidebb (54 bp), de a GoAdV-1 típusé még ennél is rövidebb (39 bp), a leghosszabbnak pedig a FAdV-2 és -9 típusét találták (72 bp), de a TAdV-1 ITR-e még ennél is hosszabb: 95 bp, bár egy nukleotid eltérés (egy C-T tranzíció) található az 53. pozícióban.

6.3.5. Splicing

Az mRNS-splicing mechanizmusát adenovírusok vizsgálata során fedezték föl (Berk és Sharp, 1977; Chow et al., 1977), és alternatív splice-helyeket írtak le a humán adenovírus 2 és 5 esetében (Davison et al., 2003). Mint minden adenovírus genomjában, a TAdV-1 és GoAdV-1 genomjában is a 22K és 33K géneknek közös kezdetük van, mely a stop kodonig folytatódik a 22K gén esetében, a 33K esetében pedig splicing kapcsolja a közös kezdő szakaszt a 33K gén második exonjához. A DNS-kötő fehérje (DBP) splicinggal történő kódolását is leírták már FAdV-1 és -9 esetében (Davison et al., 2003), és a GoAdV-1 genomjában ezzel megegyező elrendeződést találtunk, de a TAdV-1 genomjában nem találtunk erre utaló jelet. Az ORF11 és ORF26 is több exonnal rendelkezik a FAdV-1 és -9 genomjában, de a TAdV-1 esetében, bár ezen ORF-ek homológjai megtalálhatóak a genomban, splicingra utaló jelet nem találtunk.

Aviadenovírusok egyik megőrzött tulajdonsága, hogy a pTP, és a IVa2 génjétől balra található ORF12, ORF13, ORF14, ORF24 géncsalád egy rövid (2-3 aminosav hosszúságú) közös exonnal kezdődik, mely a pIIIa és penton bázis (III) génjei között található az / szálon. Ehhez az exonhoz kapcsolja a splicing mechanizmusa az említett gének második, jóval hosszabb exonját. Hasonlóan közös kezdő exonnal rendelkezik az ORF20 és ORF20A is (Davison et al., 2003). Mindkét esetben ezekkel megegyező elrendezést tapasztaltunk a TAdV-1 és a GoAdV-1 genomjában is.

Az ORF0 esetében még nem írtak le splicingot, de a TAdV-1 esetében mégis feltételezzük. A gén mindkét exonja homológiát mutat más aviadenovírusok ORF0-jával, a hosszabbik, második exon nem rendelkezik startkodonnal, és találtunk megfelelő splice-donor és -fogadó helyeket.

Minden splicinggal kapcsolatos predikciónk csak bioinformatikai elemzésen alapszik, a splice-helyek létezésének és lokalizációjának megerősítéséhez szükség lenne a vírushordozó sejtenyészetből izolált mRNS-ek szekvenálására. Ugyanakkor egyes megtalált helyek egész családban, míg mások *Aviadenovirus* génuszban való megőrzöttsége valószínűsíthető, hogy feltételezéseink helytállóak.

6.3.6. Proteáz vágási szignálok

Elmondható, hogy a proteáz vágási szignálok a vizsgált két genomban túlnyomó többségben megőrzöttek voltak az *Aviadenovirus* génuszban, a 47 talált vágási szignálból mindössze 5 olyat találtunk, mely másik aviadenovírusban nem volt kimutatható a megfelelő relatív pozícióban.

6.3.7. A pulyka-adenovírus 1 és 3, valamint a liba-adenovírus 1 és a kacsa-adenovírus 1 összehasonlítása

Vizsgálataink során egyetlen olyan ORF-et sem találtunk a TAdV-1 genomjában, mely a TAdV-3 (THEV) génuszspecifikus ORF-jeinek bármelyikével homológiát mutatott volna, de ugyanez mondható el a GoAdV-1 és a kacsa-adenovírus 1 (EDS vírusa) kapcsolatáról is, pedig utóbbit libából is többször kimutatták (Bartha et al., 1982; Ivanics et al., 2001; Zsák et al., 1982). A TAdV-3 a *Siadenovirus* génusz tagja, mely génusz vírusai a legrövidebb genommal rendelkeznek. Mindössze öt-hat génuszspecifikus ORF található genomjukban, kettő-három mindkét genomvégen, és egy az E3 régióban a pVIII és a fiber génje között (Kovács és Benkő, 2011). A kacsa-adenovírus 1 pedig az *Atadenovirus* génusz tagja. A TAdV-1 és GoAdV-1 genom terminális régióiban aviadenovírus- vagy típus-specifikus géneket találtunk, nem volt kimutatható egyetlen „pulyka- vagy liba-specifikus” ORF sem. Bár a közös gazdafaj, az esetlegesen használt közös receptorok és megfertőzött sejttípusok miatt esetleg felmerülhetne, hogy „pulyka- vagy liba-specifikus” ORF-et keressünk, nem szabad elfelejtenünk, hogy a vírusok ugyanabban a gazdafajban eltérő tüneteket idéznek elő. A TAdV-1 típust légúti tüneteket mutató pulykákból izolálták, míg a TAdV-3 vérzéses bélgyulladást okoz a pulykában. A GoAdV-1 libákban feltételezhetően apatogén, ahogy általában a kacsa-adenovírus 1 is (Zsák et al., 1982), bár akut légúti megbetegedést okozhat néha kislibákban (Ivanics et al., 2001). Ugyanakkor a kacsa-adenovírus 1 (EDSV) nemcsak képes átlépni a fajbarriert és tyúkokat is megfertőzni (amire a liba-adenovírus nem képes), de az EDSV a tyúkokban erősen patogén is.

6.4. A pulyka- és liba-adenovírus 1 típus filogenetikája

A TAdV-1 és GoAdV-1 filogenetikai helyét többféle elemzéssel vizsgáltuk, szét kell választanunk az inter- és az intragenerikus elemzést. Mivel a hexon gén teljes szekvenciája még nem ismert az összes tyúk-adenovírusból (jóllehet más génuszok sok tagjából rendelkezésre áll), ezért leginkább csak a génuszba sorolásra alkalmas

(5. ábra). A részleges polimeráz szekvencia (Wellehan et al., 2004) már jóval több adenovírus típusból, munkánk eredményeként már az összes prototípus tyúk-adenovírusból rendelkezésre áll (7. ábra), ezért alkalmas lehet intragenerikus összehasonlításra is. A szekvencia rövidege azonban nem biztosít megfelelő feloldóképességet (ld. később, a 6.5 fejezetben tárgyalva). Az alkalmazott részleges hexon szekvenciának pedig ugyan meg lehetne találni homológját az összes adenovírusban, de mivel a PCR módszer (Meulemans et al., 2001), amivel a szekvenciák többségét kinyertük, aviadenovírusokra, még inkább legtöbbször csak a tyúk-adenovírusokra specifikus, ezért más génsz tagjait nem vontuk be ebbe a törzsfarekonstrukciós elemzésbe (6. ábra). A két vizsgált vírus pontos filogenetikai helyének megállapítására tehát a háromféle törzsfarekonstrukciós vizsgálat eredményét egyesítenünk kell, és így levonni következtetéseinket.

A három elvégzett elemzés közül kettő vonultat föl szekvenciákat mind az öt elfogadott génszúból, és megállapíthatjuk, hogy a különböző génszok ezeken jól elkülönülnek egymástól, amit a magas bootstrap értékek is alátámasztanak. Azt már egyéb eredményeink (genomszerveződés, homológ gének, splice-helyek, proteáz vágási szignálok, gazdafaj) alapján is elmondhatjuk, hogy a két vizsgált vírus az *Aviadenovirus* génszba tartozik, és ezt mindhárom törzsfarekonstrukciós elemzés alátámasztja. Ugyanakkor mindkét vírus olyannyira elkülönül a már elfogadott aviadenovírus fajoktól, hogy új fajként való elfogadásuk megalapozottnak tekinthető. Az egyik legfontosabb kritériuma a faj kategóriájának az *Aviadenovirus* génszban, hogy a feltételezett új faj a DNS-polimeráz gén származtatott aminosavszekvenciája alapján min. 5–15%-ban különbözzön más fajok típusaitól (Harrach et al., 2011). A rendelkezésünkre álló részleges polimeráz szekvenciák alapján számított hasonlósági értékek szerint a TAdV-1 a FAdV-1-re hasonlít leginkább, 81%-ban azonosak, a GoAdV-1 pedig ebben a régióban leginkább a belfasti TAdV-2 típusal (77% azonosság), az elfogadott fajok közül pedig a FAdV-D típusaival (75% azonosság) mutat hasonlóságot.

Mindkét faj esetében megfelelő távolságot mutatnak a vírusok az új fajként való elfogadáshoz, ezért javasoljuk a TAdV-1 elfogadását Turkey adenovirus B fajként. A GoAdV-1 esetében pedig a P29 törzs elfogadását GoAdV-1 prototípusként, hiszen az eredeti GoAdV-1 törzs nem áll rendelkezésre, és semmilyen szekvenciainformáció nem ismert belőle, ahogy a szintén *Goose adenovirus* fajba sorolt GoAdV-2 és -3 típusokból sem. Ha a P29-es törzs helyettesítheti az eredeti GoAdV-1 típust, a faj szekvenciaállománya rögtön egy teljes genommal gazdagodik és a számított hasonlósági értékek alátámasztják a faj elkülönítését.

A TAdV-1 a törzsfarekonstrukciós elemzéseken a tyúk-adenovírusok közé osztályozódik, a FAdV-1 (FAdV-A faj) típusal vagy/és a FAdV-C faj tagjaival (FAdV-4 és -10) monofiletikus. Ezt a genomszerveződés elemzése is alátámasztja, hiszen a TAdV-1 terminális régiója nagy hasonlóságot mutat a FAdV-1, -4 és -10 típusok megfelelő régiójával. Ezen vizsgálatok alapján feltételezhetjük, hogy ezen tyúk-adenovírusok elsődleges gazdafaja nem a házityúk, és csak azért ebben a fajban találták meg, mert a tyúkok vizsgálata túltreprezentált gazdasági értékük miatt. Ezt az is alátámaszthatja, hogy a TAdV-1 a legpatogénebb fajokkal (FAdV-A és -C) monofiletikus. A gazdafajjal hosszabb ideje együtt fejlődő, koevolválódó vírusról pedig feltételezzük, hogy kevésbé patogén, míg a nagyobb patogenitás nemrég lezajlott gazdaváltásra utalhat (Benkő és Harrach, 2003).

A GoAdV-1 viszont elkülönül a tyúk-adenovírusoktól, azoknál ősi leágazásokon szerepel a törzsfarekonstrukciós elemzéseken. A részleges hexon (6. ábra) és polimeráz (7. ábra) géneken alapuló elemzéskor más liba-adenovírusokkal monofiletikus kládot képez. A polimeráz gén vizsgált szakaszán annyira megőrzött az aminosavszekvencia, hogy nem találunk eltérést négy törzs között (7. ábra).

Előzetes eredmények, melyek a hexon gén részleges szekvenciáján alapultak (Papp et al., 2003), azt mutatták, hogy a lúdalakú madarak adenovírusai elkülönülnek a tyúkalakúakétól. Feltételeztük tehát, hogy a törzsfa topológiája alátámasztja az adenovírusok és gazdáik koevolúciójára vonatkozó elméletünket. A galliform és anseriform madarak az ősi Galloanserae kládból váltak ketté, ezért ha vírusaik velük együtt fejlődtek, az adenovírusok törzsfáján a két madárvírus klád is monofiletikus.

Újabb eredményeink, melyek már más rendből származó madarak adenovírusait is magukban foglalták, megkérdőjelezzik az elmélet alkalmazhatóságát a tyúk- és lúdalakú madarak esetében. Ugyanis a sólyom-adenovírus 1 és a tyúk-adenovírusok között ugyanakkora távolságot figyelhetünk meg a törzsfán (5. ábra), mint GoAdV-1 és a tyúk-adenovírusok között, pedig a sólyomalakúak rendje jóval távolabb áll a tyúkalakúakétól, mint a lúdalakúaké. De az is elképzelhető, hogy esetleg gazdaváltás következtében alakult ki ez a jelenlegi helyzet.

Mint azt már leírtam, az eredeti belfasti TAdV-1 prototípus törzséről kiderült, hogy mai leszármazottja a FAdV-8a típusnak felel meg (6. ábra, 7. ábra). Mivel korábbi vizsgálatok szerint szerológiailag elkülöníthető volt a tyúk-adenovírusoktól (Scott és McFerran, 1972), feltételezhetjük, hogy az eredeti izolátum a sorozatos passzálás során kontaminálódhatott a FAdV-8a típusal. Ugyanakkor a TAdV-2 típus minden törzsfarekonstrukciós elemzésünkön elkülönülő ágat alkot (6. ábra, 7. ábra). A még szerológiai módszerekkel történt elkülönítésével és jelölésével tehát egyetértünk, sőt, feltehetőleg egy új faj létrehozása is indokolt lehet számára.

6.5. A tyúk-adenovírus referencia törzsek filogenetikája; polimeráz gén alapú PCR a diagnosztikai kimutatásukra

Adenovírusok kimutatására, diagnosztikájára több külföldi és hazai laboratóriumban, így az MGSzH ÁDI-ban is alkalmazzák a Wellehan és mtsai (2004) által kifejlesztett kétkörös PCR módszert, mely az adenovírusok DNS-függő DNS-polimerázának egy szakaszát erősíti fel. A madárból és főleg tyúkokból származó minták azonosítása azonban nehézségekbe ütközött eddig, mivel a tyúk-adenovírus típusok többségének szekvenciája nem volt ismert ebből a régióból. Így az eredményeket csak a FAdV-1 (Chiocca et al., 1996) és FAdV-9 (Ojkić és Nagy, 2000) típusok szekvenciáihoz lehetett hasonlítani. Ezért készítettük el a szekvenciapanelt az összes olyan tyúk-adenovírus típusból (FAdV-2–8b, FAdV-10, FAdV-11), melyből ennek a régiónak a szekvenciája nem volt ismert.

A törzsfarekonstrukciós elemzés szerint a tizenkét tyúk-adenovírus típus öt fő kládba sorolódik (7. ábra), melyek megfelelnek a tyúk-adenovírusok öt elfogadott fájának (Benkő et al., 2005). Ez a rendszertan korábbi RFLP elemzéseken alapult (Zsák és Kisary, 1984b), melyet későbbi filogenetikai elemzések is alátámasztottak (Meulemans et al., 2004; Raue és Hess, 1998).

Az alkalmazott PCR-módszer erősen degenerált, konszenzus primereket alkalmaz, hogy minél szélesebb céltartománnyal rendelkezzen, mely nagy valószínűséggel az összes adenovírust magában foglalja. Ez a fokozott érzékenység azonban óhatatlanul a módszer specifikusságának csökkenését okozza. Ezért a PCR-termékek nukleotidszekvenciájának meghatározása elengedhetetlen a hamis pozitív eredmények kizárására.

Mégis ez az első olyan PCR, mely úgy képes kimutatni a tyúkokat fertőző avi-, at- és sziaadenovírusokat, hogy primereit nemcsak a tyúk-adenovírusok, a THEV (TAdV-3) és az EDS vírusa (kacsa-adenovírus 1) alapján tervezték, ezért új, eddig nem ismert adenovírusok, esetleg új tyúk-adenovírusok kimutatására is alkalmas lehet. Használatával írtak is már le vadmadarakat fertőző új adenovírusokat (Kovács et al., 2010; Wellehan et al., 2005; Zsivanovits et al., 2006).

A PCR a DNS-függő DNS-polimeráz gén legkonzerváltabb szakaszát célozza meg, mely annyira megőrzött, hogy általában csak előzetes, génusz- és fajsintű besorolást tesz lehetővé az eredmény. Fajon belüli, típus szintű elkülönítésre egyéb gének szekvenciája, például hexonszekvencia szükségeltetik, melyre a tyúk-adenovírusok esetében a Meulemans-féle PCR (2001) a legalkalmasabb (6. ábra).

A szekvenciapanel szükségességét a diagnosztikai munkában egy konkrét esettel is alátámaszthatjuk. Hanson és mtsai (2006) az általuk kifejlesztett PCR-t egy tyúk-adenovíruson tesztelték, de a kinyert szekvenciát (GenBank Nucleotide: DQ159938) nem tudták hasonlítani megfelelő szekvenciák hiányában, ezért tipizálni se tudták. Szekvenciapanelünk segítségével megállapítottuk, hogy a kérdéses vírus a FAdV-5 típusnak (FAdV-B faj) felel meg.

6.6. Egyéb madár-adenovírus minták PCR-es szűrése; új vírusok filogenetikája

A vizsgált tyúk-adenovírus minták többsége a FAdV-D és -E fajba sorolódott, hasonlóan mások vizsgálataihoz (Ojkić et al., 2008a; Ojkić et al., 2008b). Ezen fajok típusai okozzák a tyúkok leggyakoribb adenovírusos kórképét, a sejtzárványos májgyulladást (inclusion body hepatitis). De a FAdV-1 típust is sikerült kimutatnunk. Ezt egy esetben a patológiához is kötni tudtuk, a Lengyelországból származó mintákat (az ábrán: tyúk lengyel) ugyanis egy zúzógyomorfekélyes tyúkállományból kaptuk (6. ábra).

Mind a FAdV-B, mind a FAdV-C faj képviselőjét (6. ábra: tyúk 8844, 7. ábra: tyúk 6474) mindössze egyszer sikerült kimutatnunk. A FAdV-B fajba sorolható törzset korábban még nem mutattak ki hazánkban, így ez volt az első hazai izolálása és tipizálása. A vírust a tyúkok Achilles-inából izolálták, ami adenovírusok esetében ritka, de nem előzmények nélküli lokalizáció (Jones és Georgiou, 1984a). Érdekes lenne további vizsgálatokat végezni a törzs patogenitásával kapcsolatban, de irodalmi adatok alapján kísérleti állatoltástól sem feltétlenül várható egyértelmű eredmény (Jones és Georgiou, 1984b).

Egy májgyulladást és hydropericardium szindrómát mutató liba állományból sikerült kimutatnunk egy liba-adenovírus jelenlétét (D1036). Bár a vizsgált polimeráz szakasz aminosavszekvenciájában nem találtunk eltérést a liba-adenovírus törzsek között (7. ábra), a részleges hexon szekvenciák már nagyobb varianciát mutattak, és az ezen a szakaszon is vizsgált két törzs itt jól elkülönült (6. ábra). A teljes genomjában szekvenált P29 törzs és a D1036-os törzs nukleotidszekvenciája között a vizsgált szakaszon mindössze 60%-os a hasonlóság. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a vizsgált négy GoAdV törzs egy fajt, de legalább két típust alkot.

Érdekes eredmény, hogy a két karvalyból származó minta (7. ábra: 5695 és 6438) a tyúk-adenovírusok közé sorolódott be, a Meulemans-féle PCR (2001) mégis negatív eredményt hozott. Az aviadenovírus mintákról még az mondható el, hogy a vadmadár minták általában elkülönülnek a túlnyomó többségben lévő baromfimintáktól.

Néhány madár-adenovírus a *Siadenovirus* génuszba sorolódott (7. ábra), de ez az ott megtalálható madár-adenovírusok számának növekedésével (Kovács et al., 2010; Kovács és Benkő, 2011; Wellehan et al., 2009) talán nem is meglepő. Az általam vizsgált madár mintákból az *Atadenovirus* génuszba még több madár-adenovírus osztályozódott, az egyik mintából rögtön két elkülönülő törzs, melyeket távolságuk alapján biztosan külön fajba sorolhatunk (7. ábra: veréb 1505). A minták többsége, egy kivételével, egy külön leágazást képvisel az atadenovírusok között, mely csak madár-atadenovírusokat tartalmaz. Ezen vírusok gazdafaja szinte minden esetben a verébalakúak rendjébe sorolható madár, az egyetlen kivétel a kládon belül a kacsa-adenovírus 1 (EDS vírus). Hat házi veréb mintából is ki tudtunk mutatni atadenovírust, ezekből öt valószínűleg egy fajt alkot, mert a részleges polimeráz aminosavszekvencia alapján alig különböznek el egymástól (7. ábra: veréb 1488, 1498, 1504, 1505/95, 1514). Feltételezhetjük tehát, hogy a verébalakú madarakkal hosszabb ideje együtt fejlődhetnek az atadenovírusok, és jelenlétük e madarakban feltehetően egy ősi gazdaváltás következménye.

7. Új tudományos eredmények

1. A világon először határoztunk meg teljes genomszekvenciát nem tyúk eredetű baromfi-adenovírusokból. Egy pulyka- és egy liba-adenovírus elemzésével megállapítottuk, hogy mindkettő az *Aviadenovirus* nemzetség tagja.
2. Meghatároztuk a virális DNS-függő DNS-polimeráz gén részleges nukleotidsorrendjét a tyúk-adenovírusok (FAdV-ok) tíz olyan típusának referenciatörzséből, melyből ez eddig nem volt elérhető. A génszakaszt rendkívül érzékeny, kétkörös PCR segítségével megbízhatóan lehet felsokszorozni. Ezzel a PCR módszer állategészségügyi diagnosztikai célra való használhatóságát jelentősen fokoztuk.
3. Először állapítottuk meg Magyarországon egy FAdV-B fajba sorolható törzs jelenlétét molekuláris módszerrel.
4. Különbféle baromfi- és vadmadárfajokból származó minták PCR-es szűrése során korábban ismert FAdV típusokat és új adenovírusokat mutattunk ki.
5. Megállapítottuk, hogy hazánkban, illetve a környező országokban a leggyakoribb tyúk-adenovírusok a FAdV-D és -E, valamint ritkábban a FAdV-A fajokba sorolhatók.
6. Megállapítottuk, hogy a vadmadaraktól kimutatott, új adenovírusok általában az *Aviadenovirus* génuszba tartoznak, de énekesmadarakban (*Passeriformes*) másik két (*At-* és *Siadenovirus*) nemzetségbe tartozó vírusok is gyakoriak.

8. Irodalom

- Adair, B., McFerran, J., Calvert, V.: **Development of a microtitre fluorescent antibody test for serological detection of adenovirus infection in birds**, *Avian Pathol.*, 9. 291-300, 1980.
- Adair, B.M., Fitzgerald, S.D.: **Adenovirus infections. Group I adenovirus infections**, In: *Diseases of Poultry, 12th Edition*. Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E., s.l.: Wiley-Blackwell, 252-266, 2008.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**, *Nucl. Acids Res.*, 25. 3389-3402, 1997.
- Anderson, C.: **The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions**, *Virology*, 177. 259-272, 1990.
- Andersson, M.G., Haasnoot, P.C., Xu, N., Berenjian, S., Berkhout, B., Akusjärvi, G.: **Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA**, *J. Virol.*, 79. 9556-9565, 2005.
- Bartha A., Mészáros J., Tanyi J.: **Antibodies against EDS-76 avian adenovirus in bird species before 1975**, *Avian Pathol.*, 11. 511-513, 1982.
- Benkő M., Harrach B.: **A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae**, *Arch. Virol.*, 143. 829-837, 1998.
- Benkő M., Élő P., Ursu K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach B.: **First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses**, *J. Virol.*, 76. 10056-10059, 2002.
- Benkő M., Harrach B.: **Molecular evolution of adenoviruses**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 272. 3-35, 2003.
- Benkő M., Harrach B., Both, G., Russell, W., Adair, B., Ádám É., de Jong, J., Hess, M., Johnson, M., Kajon, A., Kidd, A., Lehmkuhl, H., Li, Q.-G., Mautner, V., Pring-Akerblom, P., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**, In: *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Szerk.: Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L., New York: Elsevier, 213-228, 2005.
- Berk, A.J., Sharp, P.A.: **Sizing and mapping of early adenovirus messenger-RNAs by gel-electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids**, *Cell*, 12. 721-732, 1977.

- Both, G.: **Atadenovirus**, In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., Berlin: Springer, 2-8, 2002.
- Bouquet, J.F., Moreau, Y., McFerran, J.B., Connor, T.J.: **Isolation and characterisation of an adenovirus isolated from Muscovy ducks**, *Avian Pathol.*, 11. 301-307, 1982.
- Cao, J., Krell, P., Nagy, É.: **Sequence and transcriptional analysis of terminal regions of the fowl adenovirus type 8 genome**, *J. Gen. Virol.*, 79. 2507-2516, 1998.
- Chen, S., Cheng, A.C., Wang, M.S.: **Morphologic observations of new type gosling viral enteritis virus (NGVEV) virulent isolate in infected duck embryo fibroblasts**, *Avian. Dis.*, 52. 173-178, 2008a.
- Chen, S., Cheng, A.C., Wang, M.S., Peng, X.: **Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling**, *World J. Gastroenterol.*, 14. 2174-2178, 2008b.
- Chen, S., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Luo, Q., Liu, F., Chen, X.: **Detection and localization of a goose adenovirus in experimentally infected goslings, using indirect immunofluorescence with paraffin-embedded tissue sections**, *Avian Pathol.*, 38. 167-174, 2009a.
- Chen, S., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Luo, Q., Liu, F., Chen, X.: **Immunohistochemical detection and localization of new type gosling viral enteritis virus in paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 130. 226-235, 2009b.
- Chen, S., Cheng, A.C., Wang, M.S., Zhu, D.K., Jia, R.Y., Luo, Q.H., Cui, H.M., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, Z.W., Chen, Z.L., Chen, X.Y., Wang, X.Y.: **Histopathology, immunohistochemistry, *in situ* apoptosis, and ultrastructure characterization of the digestive and lymphoid organs of new type gosling viral enteritis virus experimentally infected gosling**, *Poult. Sci.*, 89. 668-680, 2010a.
- Chen, S., Cheng, A.C., Wang, M.S., Zhu, D.K., Jia, R.Y., Luo, Q.H., Liu, F., Chen, X.Y., Yang, J.L.: **Humoral and cellular immune responses in adult geese induced by an inactivated vaccine against new type gosling viral enteritis virus**, *Poult. Sci.*, 89. 2410-2418, 2010b.
- Chen, S., Ma, G.P., Wang, M.S., Cheng, A.C., Zhu, D.K., Luo, Q.H., Jia, R.Y., Liu, F., Chen, X.Y., Han, X.F., Bo, Y., Zhou, D.C.: **Efficacy study and field application of an inactivated new type gosling viral enteritis virus vaccine for domestic geese**, *Poult. Sci.*, 90. 766-774, 2011.

- Cheng, A.C., Wang, M.S., Chen, X.Y., Guo, Y.F., Liu, Z.Y., Fang, P.F.: **Pathogenic and pathological characteristic of new type gosling viral enteritis first observed in China**, *World J. Gastroenterol.*, 7. 678-684, 2001.
- Chiocca, S., Baker, A., Cotten, M.: **Identification of a novel antiapoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus**, *J. Virol.*, 71. 3168-3177, 1997.
- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V., Cotten, M.: **The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO**, *J. Virol.*, 70. 2939-2949, 1996.
- Chow, L., Gelinas, R., Broker, T., Roberts, R.: **An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA**, *Cell*, 12. 1-8, 1977.
- Corredor, J., Garceac, A., Krell, P., Nagy É.: **Sequence comparison of the right end of fowl adenovirus genomes**, *Virus Genes*, 36. 331-344, 2008.
- Corredor, J., Krell, P., Nagy É.: **Sequence analysis of the left end of fowl adenovirus genomes**, *Virus Genes*, 33. 95-106, 2006.
- Corredor, J.C., Nagy É.: **The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement**, *Virus Res.*, 149. 167-174, 2010.
- Crespo, R., Shivaprasad, H., Droual, R., Chin, R., Woolcock, P., Carpenter, T.: **Inclusion body tracheitis associated with avian adenovirus in turkeys**, *Avian Dis.*, 42. 589-596, 1998.
- Csontos L.: **Isolation of adenoviruses from geese. Preliminary report**, *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 17. 217-219, 1967.
- Davison, A., Benkő M., Harrach B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, *J. Gen. Virol.*, 84. 2895-2908, 2003.
- Davison, A., Harrach B.: **Siadenovirus**, In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., Berlin: Springer, 29-33, 2002.
- Davison, A., Wright, K., Harrach B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, *J. Gen. Virol.*, 81. 2431-2439, 2000.
- Dán Á., Élő P., Harrach B., Zádori Z., Benkő M.: **Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs**, *Virus Genes*, 22. 175-179, 2001.
- Dán Á., Molnár T., Biksi I., Glávits R., Shaheim, M., Harrach B.: **Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases**, *Acta. Vet. Hung.*, 51. 551-562, 2003.
- Farkas S., Benkő M., Élő P., Ursu K., Dán Á., Ahne, W., Harrach B.: **Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake**

- (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus *Atadenovirus***, J. Gen. Virol., 83. 2403-2410, 2002.
- Felsenstein, J.: **PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)**, Cladistics, 164-166, 1989.
- Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Langlois, P.: **Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens**, Vaccine, 22. 2351-2360, 2004.
- François, A., Eterradossi, N., Delmas, B., Payet, V., Langlois, P.: **Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids**, J. Virol., 75. 5288-5301, 2001.
- Ganesh, K., Suryanarayana, V., Raghavan, R., Gowda, S.: **Nucleotide sequence of L1 and part of P1 of hexon gene of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome differs with the corresponding region of other fowl adenoviruses**, Vet. Microbiol., 78. 1-11, 2001.
- Gelderblom, H., Maichle-Lauppe, I.: **The fibers of fowl adenoviruses**, Arch. Virol., 72. 289-298, 1982.
- Grgić, H., Yang, D.H., Nagy É.: **Pathogenicity and complete genome sequence of a fowl adenovirus serotype 8 isolate**, Virus Res., 156. 91-97, 2011.
- Guy, J., Barnes, H.: **Characterization of an avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis in day-old turkeys**, Avian Dis., 41. 726-731, 1997.
- Guy, J.S., Schaeffer, J.L., Barnes, H.J.: **Inclusion-body hepatitis in day-old turkeys**, Avian Dis., 32. 587-590, 1988.
- Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, Nucl. Acids. Symp. Ser., 95-98, 1999.
- Hanson, L.A., Rudis, M.R., Vasquez-Lee, M., Montgomery, R.D.: **A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene**, Virol. J., 3. 28. 2006.
- Harrach B.: **Reptile adenoviruses in cattle?** Acta. Vet. Hung., 48. 485-490, 2000.
- Harrach B.: **Adenoviruses: General features**, In: *Encyclopedia of Virology*. Szerk.: Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V., Oxford: Elsevier, 1-9, 2008.
- Harrach B., Benkő M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkühl, H.D., Mautner, V., Mittal, S., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**, In: *Virus Taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Szerk.: King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., New York: Elsevier, in press, 2011.

- Harrach B., Kaján Gy.L.: **Aviadenovirus**, In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., Berlin: Springer, in press, 2011.
- Harrach B., Meehan, B., Benkő M., Adair, B., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, *Virology*, 229. 302-308, 1997.
- Hess, M., Blöcker, H., Brandt, P.: **The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses**, *Virology*, 238. 145-156, 1997.
- Hess, M., Prusas, C., Monreal, G.: **Growth analysis of adenoviruses isolated from pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates**, *Avian Pathol.*, 27. 196-199, 1998.
- Hlinak, A., Müller, T., Kramer, M., Mühle, R.U., Liebherr, H., Ziedler, K.: **Serological survey of viral pathogens in bean and white-fronted geese from Germany**, *J. Wildl. Dis.*, 34. 479-486, 1998.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrott, R.H., Bell, J.A.: **Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system**, *N. Engl. J. Med.*, 251. 1077-1086, 1954.
- Ishiko, H., Aoki, K.: **Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 2678-2679, 2009.
- Ivanics É., Palya V., Glávits R., Dán Á., Pálfi V., Révész T., Benkő M.: **The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings**, *Avian Pathol.*, 30. 201-208, 2001.
- Jiang, P., Ojkic, D., Tuboly T., Huber, P., Nagy É.: **Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses**, *Can. J. Vet. Res.*, 63. 124-128, 1999.
- Johnson, M.A., Pooley, C., Ignjatovic, J., Tyack, S.G.: **A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus**, *Vaccine*, 21. 2730-2736, 2003.
- Johnson, M.A., Pooley, C., Lowenthal, J.W.: **Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors**, *Dev. Comp. Immunol.*, 24. 343-354, 2000.
- Jones, R.C., Georgiou, K.: **Experimental infection of chickens with adenoviruses isolated from tenosynovitis**, *Avian Pathol.*, 13. 13-23, 1984a.
- Jones, R.C., Georgiou, K.: **Experimental infection of chickens with an adenovirus isolated from tenosynovitis, following infection with either (1) an**

- arthrotropic reovirus, or (2) infectious bursal disease virus**, Avian Pathol., 13. 289-302, 1984b.
- Kaleta, E.F., Will, H., Bernius, E., Kruse, W., Bolte, A.L.: **The serologic detection of virus-induced infections in the domestic goose (*Anser anser dom.*)**, Tierarztl Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere, 26. 234-238, 1998.
- Kimura, M.: **A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**, J. Mol. Evol., 16. 111-120, 1980.
- Kovács E.R., Benkő M.: **Confirmation of a novel siadenovirus species detected in raptors: partial sequence and phylogenetic analysis**, Virus Res., 140. 64-70, 2009.
- Kovács E.R., Benkő M.: **The first complete sequence of a non-isolated adenovirus confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses**, Infect. Genet. Evol., in press, 2011.
- Kovács E.R., Jánoska M., Dán A., Harrach B., Benkő M.: **Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit**, J. Virol. Methods, 163. 262-268, 2010.
- Kovács G., LaPatra, S., D'Halluin, J., Benkő M.: **Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus**, Virus Res., 98. 27-34, 2003.
- Le Goff, F., Méderlé-Mangeot, I., Jestin, A., Langlois, P.: **Deletion of open reading frames 9, 10 and 11 from the avian adenovirus CELO genome: effect on biodistribution and humoral responses**, J. Gen. Virol., 86. 2019-2027, 2005.
- Lehrmann, H., Cotten, M.: **Characterization of CELO virus proteins that modulate the pRb/E2F pathway**, J. Virol., 73. 6517-6525, 1999.
- Liu, H., Naismith, J., Hay, R.: **Adenovirus DNA replication**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272. 131-164, 2003.
- Lüschow, D., Prusas, C., Lierz, M., Gerlach, H., Soike, D., Hafez, H.M.: **Adenovirus of psittacine birds: investigations on isolation and development of a real-time polymerase chain reaction for specific detection**, Avian Pathol., 36. 487-494, 2007.
- Mangel, W., Baniecki, M., McGrath, W.: **Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin**, Cell Mol. Life Sci., 60. 2347-2355, 2003.

- Marek, A., Günes, A., Schulz, E., Hess, M.: **Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region**, J. Virol. Methods, 170. 147-154, 2010a.
- Marek, A., Schulz, E., Hess, C., Hess, M.: **Comparison of the fibers of Fowl adenovirus A serotype 1 isolates from chickens with gizzard erosions in Europe and apathogenic reference strains**, J. Vet. Diagn. Invest., 22. 937-941, 2010b.
- Mase, M., Mitake, H., Inoue, T., Imada, T.: **Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene**, J. Vet. Med. Sci., 71. 1239-1242, 2009.
- McFerran, J.B., Clarke, J.K., Connor, T.J.: **Serological classification of avian adenoviruses**, Arch. Gesamte Virusforsch., 39. 132-139, 1972.
- McFerran, J.B., Connor, T.J.: **Further studies on the classification of fowl adenoviruses**, Avian Dis., 21. 585-595, 1977.
- McFerran, J.B., Smyth, J.A.: **Avian adenoviruses**, Rev. Sci. Tech., 19. 589-601, 2000.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Berg, T.P., Decaesstecker, M.: **Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses**, Avian Pathol., 30. 655-660, 2001.
- Meulemans, G., Couvreur, B., Decaesstecker, M., Boschmans, M., van den Berg, T.: **Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses**, Avian Pathol., 33. 164-170, 2004.
- Nagy M., Tuboly T.: **Porcine adenoviruses: an update on genome analysis and vector development**, Acta Vet. Hung., 48. 491-499, 2000.
- Ojkić, D., Krell, P., Nagy É.: **Unique features of fowl adenovirus 9 gene transcription**, Virology, 302. 274-285, 2002.
- Ojkić, D., Krell, P., Tuboly T., Nagy É.: **Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada**, Can. J. Vet. Res., 72. 236-241, 2008a.
- Ojkić, D., Nagy É.: **The long repeat region is dispensable for fowl adenovirus replication *in vitro***, Virology, 283. 197-206, 2001.
- Ojkić, D., Nagy É.: **Antibody response and virus tissue distribution in chickens inoculated with wild-type and recombinant fowl adenoviruses**, Vaccine, 22. 42-48, 2003.
- Ojkić, D., Martin, E., Swinton, J., Vaillancourt, J., Boulianne, M., Gomis, S.: **Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses**, Avian Pathol., 37. 95-100, 2008b.

- Ojkić, D., Nagy É.: **The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8**, J. Gen. Virol., 81. 1833-1837, 2000.
- Okuda, Y., Ono, M., Shibata, I., Sato, S., Akashi, H.: **Comparison of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism pattern of the fiber gene and pathogenicity of serotype-1 fowl adenovirus isolates from gizzard erosions and from feces of clinically healthy chickens in Japan**, J. Vet. Diagn. Invest., 18. 162-167, 2006.
- Papp T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján Gy.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus**, Vet. Microbiol., 134. 233-240, 2009.
- Papp T., Palya V., Benkő M., Adair, B.M., Harrach B.: **Aviadenoviruses isolated from waterfowls (order Anseriformes) cluster on a separated branch of the phylogenetic tree of the genus**, In: *6th Int. Congr. Vet. Virol.* Szerk.: Jestin, A., Clement, G., Saint-Malo, France, 161, 2003.
- Payet, V., Arnauld, C., Picault, J., Jestin, A., Langlois, P.: **Transcriptional organization of the avian adenovirus CELO**, J. Virol., 72. 9278-9285, 1998.
- Pierson, F.W., Fitzgerald, S.D.: **Adenovirus infections. Hemorrhagic enteritis and related infections**, In: *Diseases of Poultry, 12th Edition.* Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E., s.l.: Wiley-Blackwell, 276-286, 2008.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G., Michael, A., Goldberg, D.: **The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus**, Virology, 249. 307-315, 1998.
- Pizzuto, M.S., De Battisti, C., Marciano, S., Capua, I., Cattoli, G.: **Pyrosequencing analysis for a rapid classification of fowl adenovirus species**, Avian Pathol., 39. 391-398, 2010.
- Raue, R., Gerlach, H., Müller, H.: **Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV)**, Arch. Virol., 150. 1933-1943, 2005.
- Raue, R., Hess, M.: **Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus**, J. Virol. Methods., 73. 211-217, 1998.
- Reed, W.M., Jack, S.W.: **Adenovirus infections. Quail bronchitis**, In: *Diseases of Poultry, 12th Edition.* Szerk.: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E., s.l.: Wiley-Blackwell, 287-290, 2008.

- Riddell, C.: **Viral hepatitis in domestic geese in Saskatchewan**, Avian Dis., 28. 774-782, 1984.
- Riddell, C., den Hurk, J.V., Copeland, S., Wobeser, G.: **Viral tracheitis in goslings in Saskatchewan**, Avian Dis., 36. 158-163, 1992.
- Rivera, S., Wellehan, J.J., McManamon, R., Innis, C., Garner, M., Raphael, B., Gregory, C., Latimer, K., Rodriguez, C., Diaz-Figueroa, O., Marljar, A., Nyaoke, A., Gates, A., Gilbert, K., Childress, A., Risatti, G., Frasca, S.J.: **Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus**, J. Vet. Diagn. Invest., 21. 415-426, 2009.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G.: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture**, Proc. Soc. Exp. Biol., Med 84. 570-573, 1953.
- Russell, W.C.: **Adenoviruses: update on structure and function**, J. Gen. Virol., 90. 1-20, 2009.
- Rusvai M., Fodor L.: **Occurrence of some viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary**, Acta. Vet. Hung., 46. 405-414, 1998.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M., Barrell, B.: **Artemis: sequence visualization and annotation**, Bioinformatics, 16. 944-945, 2000.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition**, s.l.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Schrag, J., Cygler, M.: **Lipases and alpha/beta hydrolase fold**, Methods Enzymol., 284. 85-107, 1997.
- Schrenzel, M., Oaks, J.L., Rotstein, D., Maalouf, G., Snook, E., Sandfort, C., Rideout, B.: **Characterization of a new species of adenovirus in falcons**, J. Clin. Microbiol., 43. 3402-3413, 2005.
- Scott, M., McFerran, J.: **Isolation of adenoviruses from turkeys**, Avian Dis., 16. 413-420, 1972.
- Sheppard, M., McCoy, R.J., Werner, W.: **Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene**, J. Gen. Virol., 76. 2595-2600, 1995.
- Sheppard, M., Trist, H.: **Characterization of the avian adenovirus penton base**, Virology, 188. 881-886, 1992.
- Sheppard, M., Trist, H.: **The identification of genes for the major core proteins of fowl adenovirus serotype 10**, Arch. Virol., 132. 443-449, 1993.

- Sheppard, M., Tsatas, E., Johnson, M.: **DNA sequence analysis of the genes for the fowl adenovirus serotype 10 putative 33K and pVIII**, *DNA Seq.*, 9. 37-43, 1998a.
- Sheppard, M., Werner, W., McCoy, R., Johnson, M.: **The major late promoter and bipartite leader sequence of fowl adenovirus**, *Arch. Virol.*, 143. 537-548, 1998b.
- Sheppard, M., Werner, W., Tsatas, E., McCoy, R., Prowse, S., Johnson, M.: **Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease**, *Arch. Virol.*, 143. 915-930, 1998c.
- Simmons, D., Miller, S., Gray, J., Blalock, H., Colwell, W.: **Isolation and identification of a turkey respiratory adenovirus**, *Avian Dis.*, 20. 65-74, 1976.
- Smyth, J.A., McNulty, M.S.: **Adenoviridae**, In: *Poultry Diseases, 6th Edition*. Szerk.: Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J.M., Alexander, D., s.l.: Elsevier Health Sciences, 367-381, 2007.
- Staden, R., Beal, K., Bonfield, J.: **The Staden package**, *Methods Mol. Biol.*, 132. 115-130, 1998. 2000.
- Steer, P., Kirkpatrick, N., O'Rourke, D., Noormohammadi, A.: **Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 311-321, 2009.
- Stewart, P.L., Burnett, R.M.: **Adenovirus structure as revealed by X-ray crystallography, electron microscopy, and difference imaging**, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32. 1342-1347, 1993.
- Sutjipto, S., Miller, S., Simmons, D., Dillman, R.: **Physicochemical characterization and pathogenicity studies of two turkey adenovirus isolants**, *Avian Dis.*, 21. 549-556, 1977.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**, *Mol. Biol. Evol.*, 24. 1596-1599, 2007.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T.: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**, *Nucleic Acids Res.*, 22. 4673-4680, 1994.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach, B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)**, *Virus Res.*, 83. 189-195, 2002.
- Tomaszewski, E., Phalen, D.: **Falcon adenovirus in an American kestrel (*Falco sparverius*)**, *J. Avian. Med. Surg.*, 21. 135-139, 2007.

- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.: **Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3**, *Nucleic Acids Res.*, 35. 71-74, 2007.
- Ursu K., Papp T., Palya V., Somogyi V., Harrach B., Benkő M.: **A new turkey aviadenovirus isolate seems to classify amongst the fowl adenovirus serotypes as a new species**, In: *6th Int. Congr. Vet. Virol.* Szerk.: Jestin, A., Clement, G., Saint-Malo, France, 162, 2003.
- Vrati, S., Brookes, D., Strike, P., Khatri, A., Boyle, D., Both, G.: **Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites**, *Virology*, 220. 186-199, 1996.
- Washietl, S., Eisenhaber, F.: **Reannotation of the CELO genome characterizes a set of previously unassigned open reading frames and points to novel modes of host interaction in avian adenoviruses**, *BMC Bioinformatics*, 4. 55. 2003.
- Webster, A., Hay, R., Kemp, G.: **The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide**, *Cell*, 72. 97-104, 1993.
- Webster, A., Russell, S., Talbot, P., Russell, W., Kemp, G.: **Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity**, *J. Gen. Virol.*, 70. 3225-3234, 1989.
- Wellehan, J., Greenacre, C., Fleming, G., Stetter, M., Childress, A., Terrell, S.: **Siadenovirus infection in two psittacine bird species**, *Avian Pathol.*, 38. 413-417, 2009.
- Wellehan, J., Johnson, A., Harrach B., Benkő M., Pessier, A., Johnson, C., Garner, M., Childress, A., Jacobson, E.: **Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses**, *J. Virol.*, 78. 13366-13369, 2004.
- Wellehan, J., Johnson, A., Latimer, K., Bischoff, K., Lafortune, M., Jacobson, E.: **Identification and initial characterization of an adenovirus associated with fatal hepatic and lymphoid necrosis in a Meyer's parrot (*Poicephalus meyeri*)**, *J. Avian. Med. Surg.*, 191-197, 2005.
- Xie, Z., Fadl, A.A., Girshick, T., Khan, M.I.: **Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction**, *Avian Dis.*, 43. 98-105, 1999.
- Zakharchuk, A., Kruglyak, V., Akopian, T., Naroditsky, B., Tikchonenko, T.: **Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA**, *Arch. Virol.*, 128. 171-176, 1993.
- Zdobnov, E., Apweiler, R.: **InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro**, *Bioinformatics*, 17. 847-848, 2001.

- Zsák L., Kisary J.: **Characterisation of adenoviruses isolated from geese**, Avian Pathol., 13. 253-264, 1984a.
- Zsák L., Kisary J.: **Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by *Bam*HI and *Hind*III**, Intervirology, 22. 110-114, 1984b.
- Zsák L., Szekely A., Kisary J.: **Experimental infection of young and laying geese with egg drop syndrome 1976 adenovirus strain B8/78**, Avian Pathol., 11. 555-562, 1982.
- Zsivanovits, P., Monks, D., Forbes, N., Ursu K., Raue, R., Benkő M.: **Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*)**, J. Avian. Med. Surg., 20. 105-112, 2006.

9. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

9.1. Lektorált, *impakt faktoros tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk*

Kaján Gy.L., Kecskeméti S.: **Egy tyúk-adenovírus B fajba tartozó típus első magyarországi izolálása**, Magy. Állatorv. Lapja, nyomdában, 2011.

Kaján Gy.L., Sameti, S., Benkő M.: **Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: A reference panel for a general diagnostic PCR in poultry**, Acta Vet. Hung., 59. 279-285, 2011.

Kaján Gy.L., Stefanics R., Ursu K., Palya V., Benkő M.: **The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1**, Virus Res., 153. 226-233, 2010.

Ivanics É., Palya V., Markos B., Dán Á., Ursu K., Harrach B., Kaján Gy., Glávits R.: **Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings**, Acta Vet. Hung., 58. 47-58, 2010.

9.2. Könyvfejezet

Harrach B., Kaján Gy.L.: **Aviadenovirus**, In: *The Springer Index of Viruses*. Szerk.: Tidona, C.A., Darai, G., Berlin: Springer, nyomdában, 2011.

9.3. Konferencia prezentációk

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Benkő M.: **Beyond mammalian adenoviruses: genome and phylogeny of goose adenovirus**, 8th Int. Adenovirus Meeting, Zürich, 133, 2006.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Benkő M.: **Sequencing and phylogeny of a goose adenovirus**, In: *Proceedings of the ESVV 7th Int. Congr. Vet. Virol.* Szerk.: Leitao, A., Martins, C., Lisbon, 129, 2006.

Kaján Gy.L., Davison, A.J., Harrach B., Palya V., Papp T., Stefanics R., Benkő M.: **Sequencing and comparative analysis of a goose and a turkey**

- adenovirus**, Acta Microbiol. Immunol. Hung., Abstracts of the 15th Int. Congr. Hung. Soc. Microbiol., 54. (Supplement) 53, 2007.
- Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Benkő M.: **Full genome sequence analysis of a goose and a turkey aviadenovirus**, 9th Int Adenovirus Meeting, Dobogókő, 92, 2009.
- Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Papp T., Benkő M.: **Comparative sequence analysis of aviadenoviruses from a goose and a turkey**, 8th Int. Congr. Vet. Virol., 20 years of ESVV: Integrating classical and molecular virology, Budapest, 110, 2009.
- Kaján Gy.L., Davison, A.J., Palya V., Harrach B., Papp T., Stefancsik R., Benkő M.: **Comparative genome analysis of aviadenoviruses isolated from goose and turkey**, XIV. Int. Congr. Vir., Istanbul, 217, 2008.

9.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

- Mayer B., Kis Zs., Kaján Gy., Frenyó L.V., Hammarström, L., Kacs Kovics I.: **The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung**, Vet. Immunol. Immunopathol., 98. 85-89, 2004.
- Papp T., Fledelius, B., Schmidt, V., Kaján Gy.L., Marschang, R.E.: **PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus**, Vet. Microbiol., 134. 233-240, 2009.

10. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Benkő Mária professzorasszonynak, hogy mindig vezette, segítette munkámat, és biztosította annak hátterét is. Szintén nagyon hálás vagyok Dr. Harrach Balázs professzornak, hogy mindig számíthattam támogatására, tanácsaira.

Köszönöm dr. Papp Tibornak, hogy szó szerint kitért előttem az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet kapuját, és később is sokszor segítette munkámat. Köszönöm Erdei Noéminek, Ballmann Mónikának, Pantó Laurának, dr. Farkas Szilviának, Skoda Gabriellának, Péntes Juditnak, Dandár Eszternek, dr. Eszterbauer Editnek, Marton Szilviának, Kovács Endrének, Doszpoly Andornak, Vidovszky Mártonnak és dr. Élő Péternek, hogy mindig baráti légkörben teltek a munkanapok, és bármikor számíthattam segítségükre. Külön köszönöm Jánoska Máténak, hogy kitűnő szakdolgozóm és TDK-s diákom, jó kollégám és igaz barátom volt. Hálás vagyok az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetében minden más kollégámnak is, akik sokszor nyújtottak támogatást munkám során, és biztosították az ehhez szükséges feltételeket. Köszönöm Silje Fabrin Lågstadnak, Vibeke Sjøblom Halvorsennek és Soroush Sametinek, hogy szintén jó szakdolgozóim voltak.

Köszönöm dr. Palya Vilmosnak, hogy a szekvenált pulyka- és liba-adenovírus törzseket izolálta és rendelkezésünkre bocsátotta, és dr. Andrew J. Davisonnak, hogy a liba-adenovírus szekvenálását lehetővé tette. Hálás vagyok dr. Rachel E. Marschangnak is, hogy fogadott laboratóriumában, és megismerhettem a klasszikus virológia módszereit. Köszönöm dr. Ursu Krisztinának, dr. Stefanics Rajmundnak, dr. Papp Tibornak és dr. Bartók Gabriellának, hogy munkájukkal hozzájárultak a pulyka-adenovírus szekvenálásához.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Brian M. Adairnek a belfasti pulyka-adenovírus törzsekért, dr. Kecskeméti Sándornak, dr. Bakonyi Tamásnak, Dr. Rusvai Miklósnak, dr. Horváth-Papp Imrének, dr. Mató Tamásnak, dr. Dán Ádámnak, dr. Erdélyi Károlynak, dr. Ivanics Évának, dr. Glávits Róbertnek, dr. Sági Erzsébetnek és dr. Révész Tamásnak a rendelkezésünkre bocsátott izolátumokért, mintáért.

Köszönöm végül szüleimnek, hogy megfelelő alapot biztosítottak doktori munkámhoz. Hálás vagyok feleségemnek és gyermekeimnek is, hogy mindig szerető hátteret jelentettek számomra.

