

36. OTDK Biológia szekció

Új szarvasmarha-adenovírus első európai kimutatása és előzetes molekuláris jellemzése

Készítette: Mitró Gergő,
Biológus MSc II. évfolyam,
Eötvös Loránd Tudományegyetem,
Állatorvostudományi Kutatóintézet

Témavezető: Vidovszky Márton, PhD
Állatorvostudományi Kutatóintézet

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	3
2.	Összefoglalás	4
3.	Bevezetés.....	5
3.1.	Az adenovírusok általános jellemzése	5
3.2.	Az adenovírusok jelentősége	6
3.3.	Az emlősök adenovírusainak rendszertana.....	7
3.3.1.	<i>Adenoviridae</i> család	7
3.3.2.	<i>Mastadenovirus</i> nemzetség.....	7
3.3.3.	<i>Atadenovirus</i> nemzetség	9
3.4.	Célkitűzés.....	10
4.	Vizsgálatok anyaga és módszerei	11
4.1.	Vizsgált minták	11
4.2.	DNS kivonás	12
4.3.	REPLI-g.....	12
4.4.	Diagnosztikai PCR	12
4.5.	Agaróz gélelektroforézis.....	14
4.6.	PCR termékek tisztítása	15
4.7.	Primer tervezés.....	15
4.8.	PCR specifikus primerekkel	16
4.9.	DNS szekvenálás.....	17
4.10.	Primer séta.....	19
4.11.	Bioinformatikai elemzések.....	19
5.	Eredmények.....	21
5.1.	Pozitív minták száma.....	21
5.2.	Bioinformatikai elemzések eredményei	22
5.3.	Filogenetika, törzsfa-rekonstrukció eredménye	24
6.	Megbeszélés	26
6.1.	Pozitív minták	26
6.2.	Filogenetika, törzsfa-rekonstrukció.....	28
7.	Hivatkozások jegyzéke	30
8.	Köszönetnyilvánítás.....	34

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AdV	adenovirus	adenovírus
BaAdV	bat adenovirus	denevér-adenovírus
BAdV	bovine adenovirus	szarvasmarha-adenovírus
bp	base pair	bázispár
CAdV	canine adenovirus	kutya-adenovírus
EAdV	equine adenovirus	ló-adenovírus
HAdV	human adenovirus	humán adenovírus
MAdV	murine adenovirus	egér-adenovírus
OAdV	ovine adenovirus	juh-adenovírus
PAdV	porcine adenovirus	sertés-adenovírus
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
<i>pol</i>	DNA-dependent	DNS-függő
	DNA polymerase gene	DNS-polimeráz gén
SAdV	simian adenovirus	majom-adenovírus

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Adenoviridae* víruscsaládon belül eddig tíz szarvasmarha-adenovírus típust írtak le, jellemzően valamilyen korábbi szarvasmarha megbetegedéssel összefüggésben. Ezek a típusok két nemzetségbe sorolhatóak: a csak emlősöket fertőző adenovírusokat tartalmazó *Mastadenovirus*, és a gazda specifikusság tekintetében diverz *Atadenovirus* nemzetségbe. Utóbbi nemzetség tagjai madarakon és hüllőkön kívül az emlősök osztályán belül csak a kérődzőket fertőzik. Munkám során gyomor- és bélrendszeri megbetegedésben szenvedő, vagy elpusztult szarvasmarháktól származó bélsár-, illetve szerv-mintákat szűrtem adenovírus jelenlétére. A szűrésre PCR-t alkalmaztam, ami a DNS-függő DNS-polimeráz gén egy rövid konzervált szakaszát erősíti fel. A PCR eredményeket minden esetben szekvenálás segítségével erősítettem meg. A vizsgálat során egy szervmintában azonosítottam a BAdV-10-et, aminek Magyarországon ez az első kimutatása, míg a kontinentális Európában a második. Az egyik bélsár mintában, egy eddig ismeretlen adenovírust azonosítottam. A mintát további három adenovírus-PCR-rel is vizsgáltam, ami három további gén (IVa2, hexon, pVIII) rövid szakaszát erősíti fel. Az így nyert szekvenciák alapján elmondható, hogy a kimutatott adenovírus jelentős különbséget mutat a korábban leírt szarvasmarha-adenovírus típusokhoz képest, így elneveztük BAdV-11-nek. A kimutatott hexon génszakasz szekvenciájának elemzése alapján egy Amerikában (Wisconsin) végzett, szarvasmarha telep adenovírus szűrése során azonosított, tovább nem vizsgált, és eddig nem tipizált adenovírus hexon szekvenciájával egyezik meg. A Magyarországon és Európában is először kimutatott BAdV-11 a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik. További célunk volt a négy meghatározott génszakasz közötti hosszabb vírus-genom szakaszok PCR-es felerősítése specifikus primerek használatával, ezáltal a vírus-genom minél nagyobb részének megismerése. Az alkalmazott módszerekkel sikeresen kinyert teljes DNS-függő DNS-polimeráz gén ismeretében valós képet kaptunk a vírus rokonsági viszonyáról és filogenetikai elhelyezkedéséről.

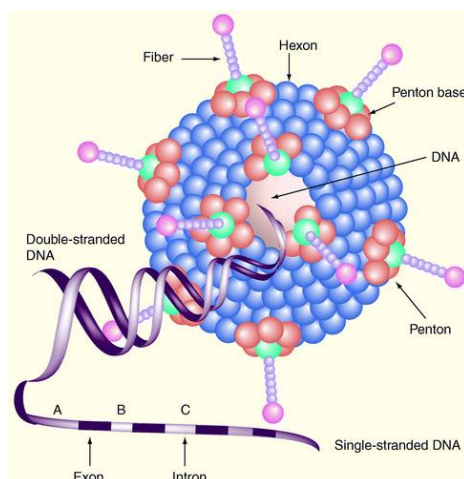
3. BEVEZETÉS

3.1. Az adenovírusok általános jellemzése

Az adenovírusok (AdV) elnevezése a felfedezésükhöz köthető. A nevük előtagja, a görög „adenos” szóból származik, ami mirigyet jelent. Elsőként emberi garatmandula szövetből készített sejtenyészetből sikerült AdV-t izolálni (Rowe et al., 1953). Azóta minden gerinces osztály képviselőiből mutatták már ki AdV jelenlétét, a halaktól kezdve egészen az emberig.

Az AdV-ok közepes méretű (70-90 nm átmérőjű), lipidburok nélküli, kapsziddal rendelkező vírusok. Genomjukat egyetlen, lineáris duplaszálú DNS alkotja, melynek hossza 25 és 48 ezer bp között változik (Benkő et al., 2022). Az ikozaéder alakú virion kapszidjának fő tömegét 240 hexon fehérje adja, az ikozaéder csúcsainál pedig 12 penton-bázis fehérje található, amikből egy-egy fiber fehérje ered. A vírus a fiberek disztális, feji részének segítségével kapcsolódik a sejtfelszíni receptorokhoz, és ezt követően receptormediált endocitózissal jut be a gazda sejtbe (Harrach, 2008). Nagy ellenállóképességű vírusok, a savas kémhatást (pH~3) is jól tűrik, emiatt szájon át is fertőzőképesek. A hőrezisztenciájuk is magas, a legellenállóbbak az *Aviadenovirus* nemzetség tagjai, amik rövid ideig akár 60 °C körüli hőmérsékleten is megtartják fertőzőképességüket. Sejtkárosító hatásukra jellemző, hogy magzárványokat hoznak létre, illetve a gazda sejtek lekerekedését, lízisét okozzák, valamint az apoptózis gátlása révén enyhe onkogén hatásuk is ismert (Turnell, 2008).

Az AdV-okra általában nagyfokú gazdaspecifikusság jellemző. Kórokozó képességük függ a vírus típusától és a gazdaszervezettől. A fertőzés legtöbbször tünetmentes, esetleg enyhe lefolyású betegséget okoz, azonban gyenge immunrendszerű gazdaszervezet esetén kialakulhat súlyos betegség is. Az AdV-ok emberben főleg enyhe lefolyású, felsőlégúti betegségeket okoznak, mint mandula- és torokgyulladás, de ismertek enterálisan terjedő, gasztrointesztinális tüneteket okozó humán AdV-ok (HAdV) is. A szarvasmarha-adenovírusok (BAdV) a HAdV-okhoz hasonlóan légzőszervi és gyomor-bélrendszeri megbetegedéseket okoznak szarvasmarháknál, mint amilyen az enzootikus hörgőtüdőszöveti gócos tüdőgyulladás (bronchopneumonia) vagy borjak tüdő- és bélgyulladása (pneumoenteritis). Más állatoknál a fontosabb AdV-ok által okozott betegségek közé tartozik pl. a kutyák fertőző májgyulladása (ICH) és a baromfi tojáshozam-csökkenés szindróma (EDS). Előbbi betegség vírusa más ragadozókat (Carnivora) is fertőzhet, míg utóbbi vírusát kacsából, libából, tyúkból és vadonélő madarakból is kimutatták (Benkő, 2008).



1. ábra: Az adenovírusok szerkezetének sematikus rajza (Rein et al., 2006)

3.2. Az adenovírusok jelentősége

Az AdV-ok vektorként való alkalmazása igen népszerű az orvostudományban, elsősorban rákellenes kezelések során. Kutatják továbbá lehetséges felhasználásukat a regeneratív és személyre szabott orvoslásban, illetve az egyénes betegségekkel szembeni génterápiában is (Lee et al., 2017).

Az AdV-okat felhasználják a vektor alapú vakcinagyártásban is. Az Oxford-AstraZeneca SARS-CoV-2 elleni vakcinája genetikailag módosított, replikációra képtelen csimpánz AdV-t (ChAdOx1) használ vektorként (Folegatti et al., 2020). A Gam-COVID-Vac (Szputnyik V) vektora rekombináns HAdV-26 az első dózisban és rekombináns HAdV-5 a másodikban (Logunov et al., 2021). A Johnson & Johnson egydózisú Ad26.COV2.S nevű COVID-19 vakcinájában pedig szintén replikációra képtelen HAdV-26-ot használnak (Sadoff et al., 2021). A H5N1 influenza elleni vakcina fejlesztése során a BAdV-3 vektort sikerebben alkalmazták, mint a HAdV vektorokat. Ennek oka a HAdV fertőzések magas prevalenciája a népességben és ezáltal a HAdV-okat neutralizáló immunglobulinok (vektor immunitás) elterjedtsége az emberi populációban (Singh et al., 2008).

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

3.3. Az emlősök adenovírusainak rendszertana

3.3.1. *Adenoviridae* család

AdV-okat minden főbb gerinces osztályból sikerült izolálni vagy kimutatni. A madarakat, hüllőket és denevéreket fertőző AdV-ok a legváltozatosabbak, de kétélűekből és halakból is mutattak már ki egy-egy AdV-t. Az AdV-ok nevezéktana oly módon épül fel, hogy az egyes AdV-ok a gazda szervezetről kapják a nevüket, a különböző vírustípusokat pedig számmal jelöljük. Mindezidáig a típusokat betűkkel jelölt fajokba soroltuk, ám a közelmúltban tért át a vírustaxonómia is a binomiális nomenklatúrára.

Az *Adenoviridae* víruscsalád hat nemzetségre oszlik, ezek mindegyike egy független evolúciós vonalat képez, amelyek a gazdaszervezeteikkel együtt fejlődtek a koevolúció során. A *Mastadenovirus* nemzetségbe kizárólag emlősöket fertőző, míg az *Aviadenovirus* nemzetségbe csak madarakat fertőző vírusok tartoznak. Az *Atadenovirus* nemzetségbe zömmel pikkelyes hüllőket (Squamata) fertőző AdV-ok tartoznak, de madarakban és emlősökben (kizárólag kérődzőkben) is előfordulnak ebbe a nemzetségbe sorolható vírusok. A *Siadenovirus* nemzetség foglalja magába az egyetlen publikált béka AdV-t és számos madár AdV-t. Az *Ichadenovirus* nemzetségben a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) kimutatott egyetlen hal AdV található. Teknősökből is mutattak már ki AdV-t, a vörösfülű ékszerteknősben (*Trachemys scripta elegans*) talált AdV egy frissen (2021 márciusától) elfogadott hatodik, *Testadenovirus* nemzetségbe tartozik (Harrach et al., 2019; Benkő et al., 2022).

3.3.2. *Mastadenovirus* nemzetség

A *Mastadenovirus* nemzetségbe tartoznak a főemlősök AdV-ai, ahova az embereket is fertőző humán AdV-ok (HAdV) is tartoznak. A főemlősök AdV-ainak törzsfáján alapi helyzetben helyezkednek el a félmajmok AdV-ai (Podgorski et al., 2018). Ezeket követik az újlégi majmok majd az óvilági majmok AdV-ai, végül pedig az emberszabású majom AdV-ok és a HAdV-ok. Ez az elrendezés hűen tükrözi a főemlősök leszármazási viszonyait és alátámasztja az elméletet, miszerint az AdV-ok a gazdaszervezeteikkel együtt fejlődtek (Harrach et al., 2019).

A denevérek AdV-ai a legváltozatosabbak az emlős AdV-ok között. Ezt a diverzitást tükrözik a más emlős gazdaszervezetekből származó AdV-okkal alkotott változatos rokonsági kapcsolataik (Vidovszky et al., 2015; Harrach et al., 2019).

A párosujjú patások rendjéből régóta ismertek AdV-ok. Házi sertésből (*Sus scrofa domestica*) három AdV teljes genomszekvenciája ismert, ezek a sertés-AdV-3, -4 és -5 (PAdV-3, -4, -5). A párosujjú patások rendjén belül a házasított kérődzők közül szarvasmarhából (*Bos taurus*), házi kecskéből (*Capra hircus*) és házi juhból (*Ovis aries*) sikerült AdV-okat kimutatni és izolálni (Harrach et al., 2019). Szarvasmarha-AdV-ből (BAdV) tíz típust ismerünk, amelyekből négy mastadenovírus. A BAdV-1, -2 és -3 esetében a teljes genom ismert, míg a BAdV-10 esetében részleges genom szekvencia áll rendelkezésünkre. A négy vírus típus a *Bovine mastadenovirus A*, *B* és *C*, illetve az *Ovine mastadenovirus A* fajokba sorolhatóak be. [<https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/> (Megtekintve: 2022.10.22.)]. A mastadenovírusok közé tartozik a BAdV-9 is, ami azonban inkább a HAdV-kal mutat közelebbi rokonságot (*HAdV-C* fajba tartozik), és nem a többi szarvasmarha-mastadenovírral. A közelmúltban izolált juh-AdV-8 (OAdV-8) az első teljes egészében szekvenált juh-mastadenovírus genom (Vidovszky et al., 2019). Vadonéló kérődzők közül fehér-farkú szarvasból (*Odocoileus virginianus*) mutattak ki egy mastadenovírust. Az így izolált vírus a szarvas-AdV-2 nevet kapta és a teljes genomszekvenciáját meghatározták (Ridpath et al., 2017). A közelmúltban új generációs szekvenálással (NGS) sikerült egy fogságban tartott tüdőgyulladással (pneumonia) és a kislégutak gyulladásával (bronchiolitis) diagnosztizált rénszarvasból (*Rangifer tarandus*) egy új AdV-t kimutatni, ami a rénszarvas-AdV-1 nevet kapta (Dastjerdi et al., 2022).

A cetfélékben talált AdV genomok szekvenciaanalízise szintén alátámasztani látszik a vírus-gazda koevolúció elméletet. Ezek alapján a jelenleg ismert delfin-AdV-ok a testvérkládját alkotják a párosujjú patások AdV-ai közül a BAdV-1-nek és BAdV2-nek, illetve a PAdV-5-nek (Harrach et al., 2019).

3.3.3. *Atadenovirus* nemzetség

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

Kérődzők esetében az ismert BAdV-ok megközelítőleg fele sorolható az *Atadenovirus* nemzetségbe. Ezek a BAdV-4, -5, -6, -7 és -8, amik közül a BAdV-4, -5 és -8 típusok a *Bovine atadenovirus D* fajba tartoznak, míg a BAdV-6 egy másik fajba a *Bovine atadenovirus E*-be. A BAdV-7-et még nem sorolták be egy fajba sem. [<https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/> (Megtekintve: 2022.10.22.)]. Más, házasított és vadonélő kérődzőkben is találtak már atadenovírusokat. A két ismert szarvas-AdV közül az egyik szintén ebbe a nemzetségbe tartozik. A vírust először öszvérszarvasból (*Odocoileus hemionus*) mutatták ki, de azóta megtalálták fekete-farkú szarvasban (*Odocoileus columbianus*), virginiai szarvasban (*Odocoileus virginianus*), jávorszarvasban (*Alces alces*) és sziklás-hegységi vapitiben (*Cervus canadensis nelsoni*) is. A szarvasfélékben szórványosan előforduló szarvas-AdV-1-nek elnevezett vírus, magas elhullási aránnyal járó, vérzéses megbetegedésekért felelős az Amerikai Egyesült Államokban, Kaliforniában (Miller et al., 2017).

3.4. Célkitűzés

TDK dolgozatomat az Állatorvostudományi Kutatóintézetben, a Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoportnál készítettem. Témámnak emlősök AdV-ainak vizsgálatát, illetve emlősökből történő új AdV-ok kimutatását választottam. Az egyik projekt, amiben részt vettem, szarvasmarhák adenovírusokra történő szűréséből állt. Ennek a munkának a kutatási céljai közé tartozott a szarvasmarha eredetű minták szűrése AdV-ok jelenlétére, és az újonnan kimutatott AdV-ok vizsgálata. Az így nyert eredmények alapján a témacsoport vírus-gazda koevolúció elméletét tanulmányoztam. További cél volt az újonnan kimutatott AdV-ok diverzitásának vizsgálata és rokonsági viszonyaik feltérképezése.

4. VIZSGÁLATOK ANYAGA ÉS MÓDSZEREI

4.1. Vizsgált minták

Összesen 10 darab, szerv- illetve bélsár-mintát vizsgáltam, különböző magyarországi szarvasmarha tartó telepek állományából. Három esetben szerv mintákat (bél, oltógyomor, vese, tüdő), további öt esetben bélsár eredetű mintát vizsgáltam, két esetben pedig egyazon egyedektől származó szerv- és bélsár minták is rendelkezésre álltak. A vizsgált minták adatait az 1. számú táblázatban mutatom be.

1. táblázat: A vizsgált szarvasmarha szerv- és bélsár minták

Azonosítószám	Állatfaj	Minta típus	Diagnózis (ha van)
0073	szarvasmarha	bélszövet	-
1864	szarvasmarha borjú	bél-, oltógyomor-, veseszövet	-
5338	46 hónapos szarvasmarha tehén	bélsár és veseszövet	Senyvesség, híg, sötét béltartam, vesében genny-gócos gyulladás.
7500	1 éves szarvasmarha üsző	bél- és tüdőszövet	Híg hasmenés, elhullás. Boncoláskor kevés véres savó a hasüregben, mellüregben, beleekben híg, vízszerű bőséges tartalom, bővérű mellékvese.
7701	7 hónapos szarvasmarha borjú	bélsár	-
7937	50 napos szarvasmarha borjú	bélsár	-
8009	választott szarvasmarha borjú	bélsár	senyvesség, hasmenés
8091	választott szarvasmarha borjú	bélsár	senyvesség, hasmenés
8096	választott szarvasmarha borjú	bélsár	senyvesség, hasmenés
8162	7 hónapos szarvasmarha borjú	bélsár és bélszövet	-

4.2. DNS kivonás

Az 1864-es és 7500-as azonosítószámú minták esetében egyesítve („pool-ozva”) vizsgáltuk, a négy féle szervmintát (vese, oltógyomor, veseseb, tüdő). Azokban az esetekben, ahol szerv- és bélseb minta is rendelkezésemre állt, külön kezeltük a két minta típust. A 0073-as és 7500-as azonosítószámú mintákból a DNS kivonást magam végeztem, a többi minta esetében már kivont DNS állt rendelkezésemre. A két általam kezelt szerv-minta esetében a DNS kivonását NucleoSpin™ DNA Tissue Kit (Macherey-Nagel™) segítségével végeztem a gyártó használati utasításai szerint. A kivont DNS-t -20°C-on tároltuk a PCR vizsgálatok elvégzéséig.

4.3. REPLI-g

A 7937-es minta esetében a kivont össz-DNS mennyiségét REPLI-g™ Kit (QIAGEN™) segítségével sokszorozítottam a gyártó használati utasításai szerint. A Kit DNS polimerázt, valamint ahhoz való puffert és reagenseket tartalmaz, kis mennyiségű minta össz-DNS tartalmának „multiple displacement amplification” (MDA) módszerrel történő felerősítéséhez. A kezelt mintáknál a felsokszorozott DNS mennyiség több kísérlet végrehajtását tette lehetővé és a reakciók érzékenységét is növelte.

4.4. Diagnosztikai PCR

Az adenovírus DNS kimutatásához általános, kétkörös (nested) PCR-t használtam konszenzus primerekkel (Wellehan et al., 2004). Ennek során, az erősen konzervált DNS-függő DNS-polimeráz gén (*pol*) egy szakaszát erősítettem fel a pozitív mintákból. A 7937-es pozitív minta esetében a vírus egy új szarvasmarha-adenovírusnak bizonyult, így a további jellemzése és meghatározása miatt további génszakaszok felerősítését is elvégeztem: IVa2 (nested, Vidovszky et al., 2015), pVIII (nested, Vidovszky; személyes közlés) és hexon (egykörös, Kiss et al., 1996). A PCR során DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix-et használtam 50 µM hígítású primerekkel (2. táblázat). Pozitív kontrollnak minden esetben BAdV-1 DNS-t használtam (Evans et al., 1998). A keletkező PCR-termékek várható mérete a felerősíteni kívánt szakasztól és a primerektől függően 250-450 bp körül volt, amiket +4 °C-on tároltunk a további vizsgálatok elvégzéséig. A PCR idő- és hőmérséklet protokollját a 3. táblázat foglalja magába, míg a vizsgálatok során használt primer szekvenciák a 4. táblázatban találhatók meg.

2. táblázat: Diagnosztikai, adenovírus DNS kimutatására irányuló PCR-ek összetétele

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

3. táblázat: A diagnosztikai PCR-ek protokolljai

Általános kétkörös PCR			Egykörös hexon PCR		
Első és második kör			Első kör		
Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés	Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
95	300	×1	95	300	×1
94	30	×45	94	30	×35
46	60		50	30	
72	60		72	30	
72	180	×1	72	300	×1

4. táblázat: A diagnosztikai PCR vizsgálatok során használt primerek szekvenciái

Felerősíteni kívánt szakasz	Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	PCR termék mérete (bp)
<i>pol</i>	poloutfo	5'-TNM GNG GNG GNM GNT GYT AYC C-3'	~310
	poloutre	5'-GTD GCR AAN SHN CCR TAB ARN GMR TT-3'	
	polinfo	5'-GTN TWY GAY ATH TGY GGH ATG TAY GC-3'	
	polinre	5'-CCA NCC BCD RTT RTG NAR NGT RA-3'	
IVa2	IVa2outfo	5'-CCN NSN CCN GAR CAN GTN TTY TT-3'	~300
	IVa2outre	5'-GGR TTC ATR TTR TGN ARN ACN AC-3'	
	IVa2info	5'-CCN CAR RTN GAY ATG ATH CCN CC-3'	
	IVa2inre	5'-TTN SWN GGR AAN GCRT GRA ARA AYT T-3'	
pVIII	pVIIIoutfo	5'-ATH CCM ACV CCB TAY RTD TGG-3'	~480
	pVIIIoutre	5'-CNG GNG GKC CNG ARW AVG GNT-3'	
	pVIIIinfo	5'-GCC GCA RTG GTC YTA CAT GCA CAT C-3'	
	pVIIIinre	5'-CAC RAA YTC NYS NAC RAA YTG-3'	
hexon	mastB	5'-GCC GCA RTG GTC YTA CAT GCA CAT C-3'	~300
	mastJ	5'-CAG CRY RCC GCG GAT GTC AAA RT-3'	

4.5. Agaróz gélelektroforézis

A PCR vizsgálatok pozitívítását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, a PCR termékek mérete és a pozitív kontrollhoz történő viszonyítás alapján. A futtatás során GelRed™ (Biotium) fluoreszcens DNS festéket tartalmazó (4 µl/100 ml) 1%-os agaróz gélét használtunk (5. táblázat). A mintákból, a negatív és a pozitív kontrollokból 5 µl-t, a molekulatömeg markerből (Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix) 2 µl-t vittem fel a gélre. A gélelektroforézis 0,5%-os hígítású TAE [tris-(hidroximetil)-aminometán, ecetsav, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)] pufferben történt 70-90V feszültségen 40-80 percig. A gélképeket Imager CHEMI Premium gél-dokumentációs rendszer (VWR™) és Image Capture szoftver használatával készítettem.

5. táblázat: Agaróz gél összetétele

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

4.6. PCR termékek tisztítása

Az agaróz gélelektroforézis után a pozitívnak tűnő minták PCR termékeiből kitisztítottam a megfelelő méretű DNS-t szekvenáláshoz. A diagnosztikai adenovírus PCR-ek termékeinél a pozitív kontrollal megegyező méret alapján választottam el a megfelelő amplikont az aspecifikus termékektől. A specifikus primerekkel végzett PCR-ek esetén az ismert AdV-ok genom térképének ismerete alapján kiszámolt, megfelelő méretű amplikont választottam ki. Minden esetben szikepengével vágtam ki a kívánt méretű terméket az agarózgélből, majd NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel™) segítségével tisztítottam a gyártó használati utasításai szerint.

4.7. Primer tervezés

A 7937-es minta esetén a részleges IVa2, *pol*, hexon és pVIII szekvenciák összekötésére (IVa2-*pol*, *pol*-hexon, hexon-pVIII) és ezáltal nagyobb, filogenetikai elemzésre alkalmasabb genomszakasz meghatározására specifikus primereket terveztem. A munkához a University of Tartu & Estonian Biocentre Primer3 webszerverét használtam. A ThermoFisher Scientific Multiple Primer Analyzer weboldal segítségével kizártam a primerek dimer képzési hajlandóságát. A primereket minden esetben a Eurofins Genomics-től rendeltük meg. Mindhárom szakasz esetén kétkörös PCR-hez terveztem külső és belső primerpárt, érzékenyebbé téve a reakciót (6. táblázat).

6. táblázat: A megtervezett specifikus primerek szekvenciái

Felerősíteni kívánt szakasz	Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	PCR termék mérete (bp)
IVa2- <i>pol</i>	7937_IVa2outfo	5'-CTA ACA CTA TGG CTA TGG GTC CT-3'	~2000
	7937_poloutre	5'-CGT TAA ACC CAT ATG AGA GAG CC-3'	
	7937_IVa2info	5'-TAG TTG TGG TCT AGT GTG AGG TC-3'	
	7937_polintre	5'-AAA GGA GGA AGA TTG TGT TGG AC-3'	
<i>pol</i> -hexon	7937_poloutfo	5'-AAA ATA CCG GGA AGT AGA CAA GTG-3'	~13000
	7937_hexonoutre	5'-GAA CGA ATC TCA ACT GCA GTC TTT-3'	
	7937_polinfo	5'-CAA GGC TCT CTC ATA TGG GTT TAA-3'	
	7937_hexoninre	5'-TTA AAG TAA GTT TCC GTA GCC TGG-3'	
hexon-pVIII	7937_hexonoutfo	5'-AAT TTA GAA ATC CTA CCG TGG CC-3'	~7000
	7937_pVIIIoutre	5'-TTT TAT ACA CAT TCG TCT GGC CC-3'	
	7937_hexoninfo	5'-CTT ACA AAA CCC GCT TTC AAC TG-3'	
	7937_pVIIIinre	5'-CCC CTG TTT GTC ATT TCA GTT TC-3'	

4.8. PCR specifikus primerekkel

A specifikus primerekkel végzett PCR-ek során Takara™ PrimeSTAR™ HS DNS polimerázt használtam 50 µM hígítású primerekkel (7. táblázat). A PCR-ek optimalizált idő- és hőmérséklet protokollja a 8. táblázatban látható. Az optimalizálási folyamat a következőkben olvasható: A *pol*-hexon szakasz felerősítését először egykörös PCR-rel kíséreltem meg, majd két sikertelen próbálkozás után (első alkalommal a protokollnak megfelelően, második alkalommal 30-ról 35-re növelt ciklusszámmal) kétkörös PCR-re tértem át. A IVa2-*pol* és hexon-pVIII szakaszok felerősítését a tapasztalatok alapján már kezdettől fogva kétkörös PCR-rel végeztem. A hexon-pVIII szakasz esetén sikertelen első próbálkozást követően megismétltem a tesztet 55 °C-ról 50 °C-ra csökkentett primer kötődési (annealing) hőmérséklettel. Harmadik alkalommal a ciklusszámot 30-ról 40-re növeltem és a primer kötődési (annealing) hőmérsékletet 53 °C-ra állítottam be. A *pol*-hexon PCR során 13000 bp körüli PCR-terméket, a hexon-pVIII PCR esetén 7000 bp körülit, míg a IVa2-*pol* PCR során 2000 bp körülit vártam.

7. táblázat: Hosszabb adenovírus DNS szakasz kimutatására irányuló specifikus primerekkel végzett PCR-ek összetétele

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

8. táblázat: Specifikus primerekkel végzett PCR-ek protokollja

Első és második kör		
Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
98	120	×1
98	10	×30-40
55	5	
72	5/kb	
72	420	×1

4.9. DNS szekvenálás

A tisztított PCR termékek szekvenciáját mindkét irányból meghatároztam Sanger féle szekvenálási eljárással. A szekvenáláshoz BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-et és a PCR-ek során használt primereket (kétkörös PCR esetén a belső körösöket) használtam, 4 µM hígításban. A szekvenálási reakció összetételét és protokollját a 9. és 10. táblázatok tartalmazzák.

9. táblázat: A szekvenálási reakció összetétele

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

10. táblázat: A szekvenálási reakció protokollja

Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ismétlés
96	60	×1
96	10	×35
50	5	
60	240	

A szekvenálási reakció után a termékeket alkohollal kicsaptam. Ennek során 40 µl kicsapó mixet adtam minden mintához (11. táblázat), amiket óvatos keverés után szobahőmérsékleten, napfénytől elzárva és letakarva 15 percig inkubáltam. Ezt követően 45 percig 4400 percenkénti fordulatszám (RPM) és SOFT beállítás (a centrifuga kíméletesen, lassabban, hosszabb idő alatt éri el a végső fordulatszámot) mellett Centrifuge 5417C (Eppendorf) készülék használatával centrifugáltam a csöveket szobahőmérsékleten, majd eltávolítottam a felülúszót. Ezután minden mintához 70 µl 70%-os etil-alkoholt adtam és 15 percig 4400 RPM és SOFT beállítás mellett centrifugáltam őket szobahőmérsékleten, majd ismét eltávolítottam a felülúszót. Ezt egy szárítási lépés követte: a csöveket nyitva hagyva, szobahőmérsékleten és fénytől elzárt helyen 10 percig állni hagytam a maradék alkohol elpárologtatása érdekében. Ezt követően a szekvenálási reakció termékeit tartalmazó csöveket postai úton a mórahalomi Seqomics Kft. szolgáltató laborjába küldtük, ahol elvégezték a kapilláris gélelektroforézist.

11. táblázat: A kicsapó mix összetétele

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

4.10. Primer séta

A specifikus primerekkel végzett PCR-rek hosszabb amlikonjainak szekvenálását primer séta („primer walking”) módszerrel végeztem. A szekvenálás során kapott kromatogrammok a leolvasás kezdetétől, a jelek gyengülésével egyre alacsonyabb amplitúdójú hullámokat eredményeznek. A még éppen biztonsággal leolvasható 7-800 bp utáni régióba újabb és újabb szekvenáló primereket tervezve, egy többbezres amplikont (több 7-800 bp hosszú leolvasásból) állítunk össze. Az ehhez szükséges specifikus szekvenáló primerek megtervezését és a szekvenálást a korábban leírtaknak megfelelően végeztem. A megtervezett primerek szekvenciái a 12. táblázatban láthatóak.

12. táblázat: A primer sétához megtervezett primerek szekvenciái

Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')
7937_polfo1	5'-AGT GTC CCT GAC CAT AAC TTT AAC-3'
7937_52Kre1	5'-GCT GAT AAG CTG TGA GTA AAT CGG-3'
7937_polfo2	5'-CAC CAA TCT GAA GAC TTG CTA TGA-3'
7937_52Kre2	5'-CTC ATG GCT GAA CTG CTC TTA CAC-3'

4.11. Bioinformatikai elemzések

A szekvenálás eredményeként kapott kromatogramokat elektronikus formában kaptam meg és a BioEdit Sequence Alignment Editor program használatával tekintetem meg őket. Az NCBI BLAST blastx homológia kereső szolgáltatásának segítségével a saját szekvenciáimat a GenBankban találhatóak alapján azonosítottam és megvizsgáltam, hogy melyekkel mutatják a legnagyobb fokú hasonlóságot.

A 7937-es minta esetén a filogenetikai vizsgálatokhoz a BioEdit Sequence Alignment Editor, NCBI BLAST blastx, MultAlin, JavaScript DNA Translator 1.1, MEGA-X szoftvereket használtam. A törzsfa-rekonstrukciót a 7937-es mintából kimutatott vírus és a GenBank-ban (NCBI) található mastadenovírusok *pol* szekvenciája alapján készítettem. A *pol* alapú törzsfa alkalmas a legnagyobb megbízhatósággal a rokonsági viszonyok vizsgálatára, a fajok besorolására, az AdV gének közül. A törzsfán összesen 56 AdV szerepel, amelyek *pol* szekvenciája átlagosan 1100-1200 aa hosszú. A vírus nevek mellett zárójelben feltüntettem a vírus fajokat is, amibe az egyes vírus típusok tartoznak. Mivel a GenBank-ban a humán-, főemlős- és denevér-AdV-ok felülreprezentáltak, ezért nem használtam fel az összes típust, hanem egy-egy típust választottam az egyes vírus fajok reprezentálására. Felkerültek a törzsfára a közelmúltban megismert AdV-ok is, amelyeket még nem soroltak be fajokba: disznódelfin-AdV-1, rénszarvas-AdV-1, mókusmajom-AdV-1, Gould denevér-AdV. Külcsoportként a legősibb leszármazású emlősök (rágcsálók) AdV-ainak ágát használtam. A törzsfa LG+G+I+F protein modell alapján, Maximum Likelihood módszerrel készült a MEGA X programmal (Le & Gascuel, 2008; Kumar et al., 2018).

5. EREDMÉNYEK

5.1. Pozitív minták száma

A *pol* rövid szakaszt célzó szűrővizsgálatok eredményeként a 10 darab mintából 4 darab, azaz a minták 40%-a, lett pozitív. A 7937-es azonosítószámú minta esetében a *pol* szakasz mellett a IVa2, hexon és pVIII gének rövid szakaszait is felerősítettem. Ugyanennél a mintánál a IVa2 és *pol* gének összekötésére irányuló kísérletem sikeres volt. A nagyjából 13000 bp nagyságú *pol*-hexon DNS szakasz felerősítését célzó kísérlet esetében egy rövidebb, megközelítőleg 5000 bp nagyságú szakaszt sikerült felerősíteni (*pol*-52K). Végül a hexon és pVIII gének összekötésére irányuló kísérleteim mindezidáig negatív eredménnyel zárultak. Az eredményeim összefoglalását a 13-14. számú táblázatok tartalmazzák.

13. táblázat: A mintákon végzett diagnosztikai vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Azonosítószám	Állatfaj	Minta típus	Adenovírus teszt (<i>pol</i> alapján)
0073	szarvasmarha	bélszövet	pozitív
1864	szarvasmarha borjú	gyomor-, vese- és bélszövet	pozitív
5338	46 hónapos szarvasmarha tehén	bélsár és veseszövet	negatív
7500	1 éves szarvasmarha üsző	bél- és tüdőszövet	negatív
7701	7 hónapos szarvasmarha borjú	bélsár	pozitív
7937	50 napos szarvasmarha borjú	bélsár	pozitív
8009	választott szarvasmarha borjú	bélsár	negatív
8091	választott szarvasmarha borjú	bélsár	negatív
8096	választott szarvasmarha borjú	bélsár	negatív
8162	7 hónapos szarvasmarha borjú	bélsár és bélszövet	negatív

14. táblázat: A 7937-es mintán végzett hosszabb szakaszok meghatározását célzó vizsgálatok eredményeinek összefoglalása

Azonosítószám	Állatfaj	Felerősíteni kívánt szakasz	Eredményül kapott szakasz
7937	50 napos szarvasmarha borjú	IVa2- <i>pol</i>	IVa2-<i>pol</i>
		<i>pol</i> -hexon	rövidebb szakasz, <i>pol</i>-52K
		hexon-pVIII	nem sikerült a felerősítés

5.2. Bioinformatikai elemzések eredményei

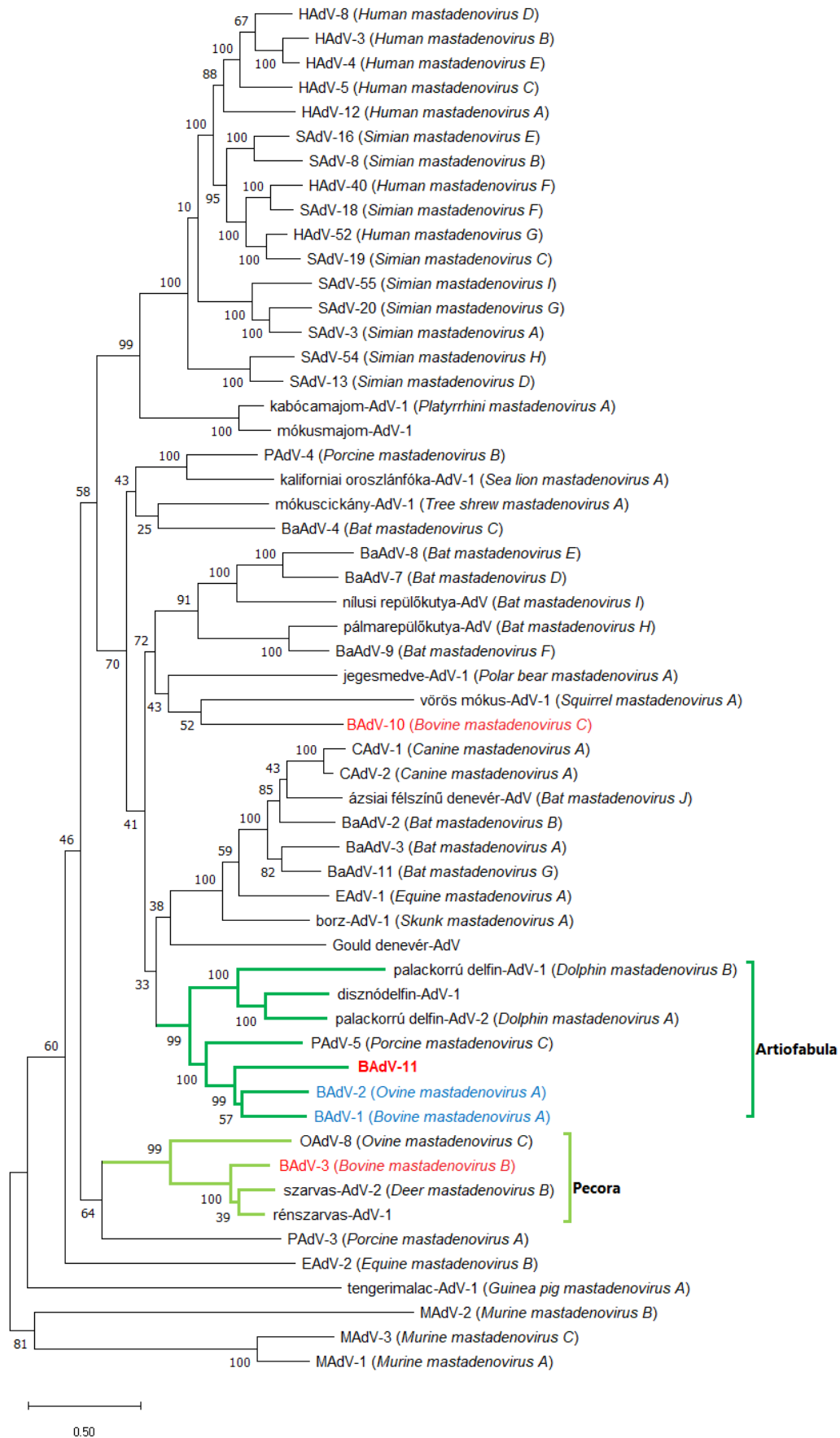
Az NCBI BLAST, blastx algoritmus segítségével az aminosavakra lefordított *pol* szakaszokat összehasonlítva a GenBank-ban (NCBI) található szekvenciákkal a 0073-as, 1864-es, 7071-es és 7937-es mintákból kimutatott AdV-ok különböző szarvasmarha-adenovírusokkal mutattak hasonlóságot. A 0073-as mintából kimutatott vírusszekvencia 97%-ban, míg a 7071-es minta szekvenciája 96%-ban volt azonos a BAdV-3-mal. Az 1864-es mintában detektált AdV szekvencia 98%-ban egyezett meg a BAdV-10-zel. A 7071-es minta szekvenciája 96%-ban volt azonos a BAdV-3 azonos szekvenciájával. A 7937-es mintában kimutatott AdV 87%-ban mutatott egyezést a BAdV-2-vel. A 7937-es pozitív mintában talált vírus további jellemzése és meghatározása során további génszakaszok felerősítését is elvégeztem, és az aminosavakra lefordított szekvenciáikat szintén összevettem a GenBank-ban található adatokkal: a IVa2 szakasz 76%-ban egyezett a PAdV-5-tel, míg a pVIII szakasz 62%-ban volt azonos a BAdV-1 és -2-vel. A hexon szakasz 99%-ban egyezett meg egy Amerikában (Wisconsin) végzett szarvasmarha telep AdV szűrése során azonosított, tovább nem vizsgált, és eddig nem tipizált szarvasmarha-adenovírussal (BAdV-WIb) (Sibley et al., 2011). Ez a nagymértékű hasonlóság azért nem mutatkozott a 7937-es minta többi génszakaszának összehasonlításánál, mert az BAdV-WIb vírusból csupán a hexon szakaszt erősítették fel. Az eredmények összefoglalva a 15. táblázatban láthatók.

A 7937-es mintában kimutatott AdV IVa2-*pol* és *pol*-52K szakaszainak felerősítésével az új vírus teljes *pol* szekvenciáját össze tudtam vetni a GenBank-ban található szekvenciákkal. Ez alapján a *pol* 81%-ban volt azonos a BAdV-2-vel, amivel a legnagyobb arányú egyezést mutatta. A *pol* G+C aránya 41,4%, ami hasonló érték, mint a legközelebbi rokon BAdV-2 azonos génjének 42,6%-os G+C aránya.

15. táblázat: Az NCBI BLAST blastx által kapott eredmények összefoglalása

Azonosítószám	Állatfaj	Gén	Hasonló adenovírus
0073	szarvasmarha	<i>pol</i>	97% BAdV-3
1864	szarvasmarha borjú	<i>pol</i>	98% BAdV-10
7701	7 hónapos szarvasmarha borjú	<i>pol</i>	96% BAdV-3
7937	50 napos szarvasmarha borjú	<i>pol</i>	87% BAdV-2
7937	50 napos szarvasmarha borjú	IVa2	76% PAdV-5
7937	50 napos szarvasmarha borjú	hexon	99% BAdV Wlb
7937	50 napos szarvasmarha borjú	pVIII	62% BAdV-1, BAdV-2

5.3. Filogenetika, törzsfa-rekonstrukció eredménye



2. ábra: A *Mastadenovirus* genus filogenetikai törzsfa-rekonstrukciója a *pol* alapján. Az általam (is) kimutatott vírusok nevei vörös színnel (az újonnan kimutatott vastagon szedve), míg az egyéb szarvasmarha-mastadenovírusok nevei kékkel vannak jelölve. Világos zöld színnel a Pecora alrendágba tartozó kérődzők adenovírusai, míg sötét zölddel az Artiofabula klád adenovírusai láthatóak.

A 2. ábrán látható törzsfa alapján az új BAdV-11 az Artiofabula (a kérődzőket, ceteket és sertéseket magába foglaló) taxon AdV-aival sorolható egy csoportba. A legközelebbi rokonai a BAdV-1 és -2, amikkel egy kládot alkot, amihez képest a PAdV-5 alapi helyzetben helyezkedik el. Tőle távolabbi ágakon, de az Artiofabula taxon AdV-ait tartalmazó kládon belül pedig az eddig ismert delfin-AdV-okat találjuk.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Pozitív minták

A vizsgált szerv- és bélsárminták beteg, vagy elhullott fiatal állatoktól származtak. A *pol* felerősített szakasza alapján két esetben BAdV-3-at azonosítottam. A BAdV-3 a szakirodalom szerint fiatal borjakban (3-6 hónapos) okoz enyhe lázzal és esetenként hasmenéssel járó légzőszervi megbetegedéseket, idősebb állatokban jellemzően tünetmentesen van jelen a vírus. Egy másik, a mintáinkban a *pol* alapján azonosított vírus a BAdV-10 volt. Ez idáig ez volt a legutolsóként felfedezett BAdV, amit először 1980-ban Új-Zélandon mutattak ki (Horner et al., 1980). Később Észak-Írországból, Kanadából, Angliából, Hollandiából származó mintákban és az USA-ban is kimutatták a BAdV-10-et (Smyth et al., 1996; Smyth et al., 1999; Sibley et al., 2011). A BAdV-10-et most mutattuk ki elsőként Magyarországon és a második alkalom, hogy a vírus jelenlétét igazolták a kontinentális Európában. A többi szarvasmarhamastadenovírushoz képest a BAdV-10 nagyobb kórokozó-képességet mutat, idősebb (6-12 hónapos) borjakat is érinthet az általa okozott betegség, és jellemzőbbek rá a bélgyulladást (enteritis) és akár véres hasmenést, vérhast (dysenteria) is magukba foglaló gyomor-bélrendszeri tünetek (Smyth et al., 1996). A harmadik, *pol* alapján kimutatott, AdV nagy valószínűséggel egy tizenegyedik, új BAdV típus (BAdV-11), ezt a IVa2 és pVIII géneken végzett vizsgálataink is alátámasztották. Az új BAdV-nak ez az első kimutatása Magyarországon és Európában is.

A vizsgált esetekben sem megerősíteni, sem cáfolni nem tudjuk a mintákban kimutatott AdV-ok és a betegség kialakulása közti ok-okozati összefüggést. Először is mivel nem mutattuk ki egyik AdV szisztematikus jelenlétét sem az azonos tünetegyüttest mutató borjak mintái közt, másodsorban pedig az AdV pozitivitás oka a más betegség által legyengített immunrendszer miatti állapot is lehet. Eddigi tapasztalatok alapján legyengített immunrendszerű vagy beteg állatokból származó mintákból nagyobb valószínűséggel lehet vírusokat, köztük AdV-okat is, sikeresen kimutatni. Az azonban megerősítést nyert, hogy több BAdV típus is jelen van a hazai szarvasmarha állományban, sőt újonnan megjelent („emerging”) típusok is kimutatásra kerültek.

A szocializmus idejében a sokszor több ezer állatot is számláló telepeken a zsúfoltság, és a sokszor nem kielégítő higiéniai környezet, számos kórokozó melegágya volt. Mindezek okán gyakoriak voltak, a többek között AdV-ok okozta, légzőszervi és emésztőszervrendszeri

megbetegedések a fiatal szarvasmarhák körében. Ezen betegségek megelőzése érdekében Magyarországon bivalens vakcinát alkalmaztak immunprofilaxisként, ami tartalmazott egy-egy BAdV típust a *Mastadenovirus* és *Atadenovirus* nemzetségből is (Bürki, 1990). Az oltóanyagban jellemzően a BAdV-3 típus volt megtalálható a mastadenovírusok közül. A TSZ-ek felszámolása után az állományok méretei csökkentek, és javultak a tartási körülmények is, ami az állatorvosi köztudatban az AdV-ok eliminációjához vezetett. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az AdV-ok valamilyen oknál fogva ismét megjelentek a szarvasmarha állományokban és amennyiben kapcsolatba hozhatóak az elszórt elhullásokkal, akár gazdasági kockázatként is kell velük számolni. Manapság a szarvasmarha telepek genetikai állományának frissen tartásához időről-időre frissítik a vérvonalakat, új egyedek importálásával akár külföldről is. Az egyes állományok más és más kórokozók, köztük vírusok, szemben rendelkeznek immunitással, amelyek ellen a védettséget az anyaállatok gyakran a főcstejjel (kolosztrum) adják át borjaiknak. Abban az esetben, ha a borjú olyan kórokozóval találkozik, például a megváltozott környezet miatt, amellyel szemben korábban az anyaállat nem immunizálódott, a borjában nincs védettség az adott kórokozó ellen. Hasonló jelenség figyelhető meg emberi viszonylatban, mikor különböző epidemiológiai háttérrel rendelkező emberek nagy számban csoportosulnak egy helyen (pl. katonai toborzás során). Így korábban ártalmatlan AdV-ok gazdát váltva, lázas megbetegedéseket okoznak az új gazdaszervezetben. Az USA különböző katonai szervezetei ezért alkalmaznak megelőző oltási programokat kifejezetten AdV ellen (Russe et al., 2006; Choudhry et al, 2016). Napjainkban Magyarországon nincs szarvasmarha-AdV elleni vakcinázási protokoll, noha más országok, a mai napig sikeresen használnak AdV elleni vakcinákat az állatgyógyászatban. Jó példa erre Japán, ahol BAdV-7-et tartalmazó védőoltást alkalmaznak szarvasmarha farmokon (Cattlewin-6, Kyoto Biken Laboratories, Inc.). Kutatásunk eredményei azt mutatják, hogy a szarvasmarhák AdV szűrése fontos információkkal szolgál az állományokban elterjedt vírus típusokról. A fent leírtak alapján pedig érdemes lehet elgondolkodni AdV elleni vakcinák újra bevezetésének okszerűségén a szarvasmarhák körében a hazai állatorvoslásban.

6.2. Filogenetika, törzsfa-rekonstrukció

A kimutatott BAdV-3 a Pecora alrendágba tartozó kérődzők (tülkösszarvúak = Bovidae, szarvasfélék = Cervidae stb.) AdV-ait magába foglaló monofiletikus kládba tartozik. A BAdV-3 legközelebbi rokonai a szarvas-AdV-2 és a rénszarvas-AdV-1, valamint ebbe a kládba tartozik a kicsit távolabbi ágon elhelyezkedő OAdV-8 is (Vidovszky et al., 2019). Ezzel szemben a kimutatott BAdV-10 teljesen elkülönül a többi kérődző-mastadenovírustól, de minden más AdV-től is, ami arra enged következtetni, hogy a BAdV-10 evolúciós léptékben a közel múltban gazdaváltás során került át a szarvasmarhába (Benkő & Harrach, 2003). Noha legközelebbi rokona a vörös mókus-AdV-1, illetve monofiletikus csoportot alkot a jegesmedve-AdV-1-gyel és egy több denevér-AdV-t magába foglaló nagyobb kláddal is, ezek nem nyújtanak elég információt ahhoz, hogy kellő bizonyossággal megállapíthassuk a BAdV-10 eredeti gazdafaját. Mindazonáltal a BAdV-10 feltáratlan evolúciós kapcsolatai is azt mutatják, hogy az AdV-ok közötti rokonságok felderítése és megértése szempontjából célravezető lenne, ha több emlősfajból is rendelkeznenénk leírt AdV szekvenciákkal.

Mivel az újonnan kimutatott szarvasmarha-AdV típust még senki sem tipizálta, elneveztük BAdV-11-nek. A teljes polimeráz génen alapuló homológia vizsgálat alapján a legközelebbi AdV-sal csupán 81%-ban azonos, így erősen feltételezhető az is, hogy egy új AdV faj képviselőjéről van szó. Ennek igazolásához azonban a teljes genom szekvenálása szükséges. Utoljára 1980-ban írtak le új BAdV típust (Horner et al., 1980). Filogenetikai vizsgálataink alapján az előzetes eredményeinket megerősítve a kimutatott új BAdV-11 is a *Mastadenovirus* nemzetségbe tartozik, azon belül pedig a kérődzőket (Ruminantia), ceteket (Cetacea) és disznóalakúakat (Suina) magába foglaló Artiofabula taxon AdV-ait magába foglaló monofiletikus klád tagja. A törzsfa-rekonstrukció alapján a BAdV-11 legközelebbi rokonai a BAdV-1 és -2, kicsit távolabbi ágon pedig a PAdV-5. Az Artiofabula taxon AdV-ait magába foglaló klád másik ágát a cetek AdV-ai alkotják, ahol az eddig ismert három delfin-AdV található meg. Ez az eredmény tovább erősíti a témacsoport vírus-gazda koevolúció elméletét. Jelenleg úgy gondoljuk, hogy az utóbb említett klád, ahova a BAdV-11 is esik, tartalmazza a kérődzőket is magába foglaló Artiofabula taxon eredeti AdV-ait, amik a kérődzők, cetek és sertések szétválása előttől kezdve fejlődnek a gazdaszervezeteikkel együtt. Ezzel szemben a Pecora alrendág AdV-ai később kerülhettek át a tülkösszarvúak és szarvasfélék őseibe. Végül a BAdV-10, ami filogenetikailag távol helyezkedik el az összes többi ismert kérődző-mastadenovírustól, egy relatíve a közel múltban végbement gazdaváltás eredménye lehet.

Filogenetikai elemzésem alapján látható, hogy mennyire diverz a *Mastadenovirus* nemzetség. Ugyanannak a fajnak a vírusai egymástól távol elhelyezkedő fejlődési ágakon is szerepelhetnek. Egyes ágak alacsony bootstrap értékeire magyarázat lehet az aminosav szekvenciák változatossága. Emiatt is fontos a pontos faj leírásokhoz a virális genom minél nagyobb hányadának a feltérképezése, a legpontosabb képet pedig a teljes genom szekvencia ismerete adja. Kutatásunk eredményeit nézve fontosnak tartjuk az emlősök AdV-ainak további kutatását és részletesebb megismerését.

7. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Benkő, M., 2008: Adenoviruses: Pathogenesis. In: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology, 3rd ed.* Oxford, Elsevier, p. 24–29
2. Benkő, M., Aoki, K., Arnberg, N., Davison, A. J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M. S., Kaján, G. L., Kajon, A. E., Mittal, S. K., Podgorski, I. I., San Martín, C., Wadell, G., Watanabe H., Harrach, B., ICTV Report Consortium, 2022: ICTV Virus Taxonomy Profile: *Adenoviridae* 2022. *Journal of General Virology*, 103, 3, 001721
3. Benkő, M., Harrach, B., 2003: Molecular evolution of adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 272, p. 3–35
4. Bürki, F., 1990: Bovine adenoviruses, In: Dinter, Z., Morein, B. (eds.): *Virus Infections of Ruminants: Virus Infections of Vertebrates, Volume 3.* Elsevier, p. 161–169
5. Choudhry, A., Mathena, J., Albano, J. D., Yacovone, M., Collins, L., 2016: Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits. *Vaccine*, 34, 38, p. 4558–4564
6. Dastjerdi, A., Jeckel, S., Davies, H., Longue, C., Plummer, C., Vidovszky, M. Z., Harrach, B., Williams, J., 2022: Novel adenovirus associated with necrotizing bronchiolitis in a reindeer (*Rangifer tarandus*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, 5, p. 3097–3102
7. Evans, P. S., Benkő, M., Harrach, B., Letchworth, G. J., 1998: Sequence, transcriptional analysis, and deletion of the bovine adenovirus type 1 E3 region. *Virology*, 244, 1, p.173–185
8. Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K., Angus, B., Becker, S. Belij-Rammerstorfer, S., Bellamy, D., Bibi, S., Bittaye, M., Clutterbuck, E. A., Dold, C., Faust, S. N., Finn, A., Flaxman, A. L., Hallis, B., Heath, P., Jenkin, D., Lazarus, R., Makinson, R., Minassian, A. M., Pollock, K. M., Ramasamy, M., Robinson, H., Snape, M., Tarrant, R., Voysey, M., Green, C., Douglas, A. D., Hill, A. V. S., Lambe, T., Gilbert, S. C., Pollard, A. J., Oxford COVID Vaccine Trial Group, 2020: Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 396, 10249, p. 467–478

9. Harrach, B., 2008: Adenoviruses: General Features. In: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Oxford, Elsevier, p. 1-9
10. Harrach, B., Tarján, Z. L., Benkő, M., 2019: Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS Letters* 593, 24, p. 3660–3673
11. Horner, G. W., Hunter, R., Thompson, E. J., 1980: Isolation and characterization of a new adenovirus serotype from a yearling heifer with systemic infection. *New Zealand Veterinary Journal*, 28, 8, p. 165–167
12. Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z., L., Vidovszky, M. Z., Papp, T., 2020: Virus-host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses. *Journal of Molecular Evolution*, 88, 1, p. 41–56
13. Kiss, I., Matiz, K., Allard, A., Wadell, G., Benkő, M., 1996: Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Hungarica*, 44, 2, p. 243–251
14. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, p. 1547–1549
15. Le, S. Q., Gascuel, O., 2008: An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 7, p. 1307–1320
16. Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zheng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., Wolf, J. M., Reid, R. R., He, T. C., 2017: Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, 4, 2, p. 43-63
17. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., Dzharullaeva, A. S., Kovyrshina, A. V., Lubenets, N. L., Grousova, D. M., Erokhova, A. S., Botikov, A. G., Izhaeva, F. M., Popova, O., Ozharovskaya, T. A., Esmagambetov, I. B., Favorskaya, I. A., Zrelkin, D. I., Voronina, D. V., Shcherbinin, D. N., Semikhin, A. S., Simakova, Y. V., Tokarskaya, E. A., Egorova, D. A., Shmarov, M. M., Nikitenko, N. A., Gushchin, V. A., Smolyarchuk, E. A., Zyryanov, S. K., Borisevich, S. V., Naroditsky, B. S., Gintsburg, A. L., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group, 2021: Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*, 397, 10275, p. 671–681

18. Miller, M. M., Cornish, T. E., Creekmore, T. E., Fox, K., Laegreid, W., McKenna, J., Vasquez, M., Woods, L. W., 2017: Whole-genome sequences of *Odocoileus hemionus* deer adenovirus isolates from deer, moose and elk are highly conserved and support a new species in the genus *Atadenovirus*. *Journal of General Virology*, 98, 9, p. 2320–2328
19. Podgorski, I. I., Pantó, L., Földes, K., de Winter, I., Jánoska, M., Sós, E., Chenet, B., Harrach, B., Benkő, M., 2018: Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus-host co-evolution. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66, 3, p. 474-487
20. Rein, D. T., Breidenbach, M., Curiel, D. T., 2006: Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncology*, 2, 1, p. 137–143
21. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., Ward, T. G., 1953: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84, 3, p. 570–573
22. Russel, K. L., Broderick, M. P., Franklin, S. E., Blyn, L. B., Freed, N. E., Moradi, E., Ecker, D. J., Kammerer, P. E., Osuna, M. A., Kajon, A. E., Morn, C. B., Ryan, M. A. K., 2006: Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *The Journal of Infectious Diseases*, 194, 7, p. 877–885
23. Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwegh, D., Truyers, C., de Groot, A. M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P-J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K. E., De Rosa, S. C., Cohen, K. W., McElrath, M. J., Cormier, E., Scheper, G., Barouch, D. H., Hendriks, J., Struyf, F., Douoguih, M., Hoof, J. V., Schuitemaker, H., 2021: Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine, *The New England Journal of Medicine*, 384, 19, p. 1824–1835
24. Sibley S. D., Goldberg T. L., Pedersen J. A. 2011: Detection of known and novel adenoviruses in cattle wastes via broad-spectrum primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 14, p. 5001–5008
25. Singh, N., Pandey, A., Jayashankar, L., Mittal, S. K., 2008: Bovine adenoviral vector-based H5N1 influenza vaccine overcomes exceptionally high levels of pre-existing immunity against human adenovirus. *Molecular Therapy*, 16, 5, p. 965–971

26. Smyth, J.A., Benkő, M., Moffett, D.A., Harrach, B., 1996: Bovine adenovirus type 10 identified in fatal cases of adenovirus-associated enteric disease in cattle by *in situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 5, p. 1270–1274
27. Smyth, J. A., Moffett, D. A., van Garderen, E., Orr, J. P., 1999: Examination of adenovirus-types in intestinal vascular endothelial inclusions in fatal cases of enteric disease in cattle, by *in situ* hybridisation. *Veterinary Microbiology*, 70, 1-2, p. 1–6
28. Turnell, A. S., 2008: Adenoviruses: Malignant transformation and oncology. In: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M. H. V. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Oxford, Elsevier. p. 9–16
29. Vidovszky, M. Z., Kohl, C., Boldogh, S., Görföl, T., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B., 2015: Random sampling of the Central European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63, 4, p. 508–525
30. Vidovszky, M. Z., Szeredi, L., Doszpoly, A., Harrach, B., Hornyák, Á., 2019: Isolation and complete genome sequence analysis of a novel ovine adenovirus type representing a possible new mastadenovirus species. *Archives of Virology*, 164, p. 2205–2207
31. Wellehan, J. F. X., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A. P., Johnson, C. M., Garner, M. M., Childress, A., Jacobson, E. R., 2004: Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of Virology*, 78, 23, p. 13366–13369

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet a hasznos szarvasmarha mintákért Dr. Biksi Imre és Dr. Varga Tamás állatorvosoknak!

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Vidovszky Mártonnak, és a témacsoport vezetőjének, Dr. Harrach Balázsnak, a nekem nyújtott szakmai segítségüket, hasznos magyarázataikat és tanácsaikat! Valamint szeretnék köszönetet mondani a Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoport munkatársainak, akik szintén segítettek a TDK dolgozatom elkészültét!

A munka elvégzését anyagilag az OTKA NN140356 sz. kutatási pályázat biztosította.