

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Ősibb gerincesek különféle vírusainak genetikai  
vizsgálata, biodiverzitása és filogenetikája**

PhD értekezés

Tarján Zoltán László

2021

Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
**Prof. Dr. Benkő Mária**, az MTA doktora  
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet  
témavezető

**Prof. Dr. Harrach Balázs**, az MTA levelező tagja  
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet  
témabizottsági tag

**dr. Doszpoly Andor**  
ELKH Állatorvostudományi Kutatóintézet  
témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a/az.....számú példány.

.....  
Tarján Zoltán László

## IRODALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	5
1. ÖSSZEFOGLALÁS .....	7
2. BEVEZETÉS .....	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	12
3.1. Adenovírusok.....	12
3.1.1. Az adenovírusok általános jellemzése .....	12
3.1.2. Az adenovírusok genomszerveződése és replikációja .....	13
3.1.3. Az adenovírusok evolúciója és rendszertana.....	17
3.2. Herpeszvírusok.....	20
3.2.1. A herpeszvírusok általános jellemzése .....	20
3.2.2. A herpeszvírusok genomszerveződése és replikációja .....	22
3.2.3. A herpeszvírusok evolúciója és rendszertana.....	23
3.2.4. Az <i>Alloherpesviridae</i> család részletes bemutatása.....	24
3.2.4.1. A kétéltűek alloherpeszvírusai.....	24
3.2.4.2. A halak alloherpeszvírusai .....	25
3.3. CRESS DNS vírusok .....	28
3.3.1. A CRESS DNS vírusok általános jellemzése .....	28
3.3.2. A CRESS DNS vírusok evolúciója és rendszertana .....	29
3.3.3. CRESS DNS vírusok ősbibb gerincesekben.....	30
3.3.4. A <i>Circoviridae</i> család bemutatása .....	30
3.3.4.1. A <i>Circovirus</i> nemzetség .....	32
3.3.4.2. A <i>Cyclovirus</i> nemzetség.....	33
4. CÉLOK .....	35
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	36
5.1. A vizsgálati minták eredete .....	36
5.1.1. Teknős-adenovírusok .....	36
5.1.2. Lesőharcsa-herpeszvírus .....	36
5.1.3. Ősbibb gerincesek CRESS DNS vírusai .....	37
5.2. DNS kivonás.....	39
5.2.1. DNS kivonás szervmintákból.....	39
5.2.2. DNS kivonás bélsárból és kloakatampon mintákból .....	39
5.2.3. DNS dúsítás REPLI-g® Mini Kit-tel .....	39
5.3. Polimeráz láncreakció és szekvenálás .....	40
5.3.1. Diagnosztikai szűrővizsgálatok .....	40
5.3.2. DNS szekvenálás .....	41
5.3.3. Az egyes vírusok által kódolt további gének kimutatása PCR-rel.....	41
5.4. Molekuláris klónozás .....	44
5.5. Adatelemzés és filogenetikai vizsgálatok .....	45
5.6. Vírusizolálás .....	46
6. EREDMÉNYEK .....	48
6.1. Vörösfülű ékszerteknős-adenovírus.....	48
6.1.1. PCR-es vizsgálatok és DNS szekvenálás.....	48

6.1.2. Részleges genomanalízis.....	49
6.1.3. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció.....	53
6.2. Lesőharcsa-herpeszvírus.....	57
6.2.1. Makroszkópos vizsgálatok.....	57
6.2.2. PCR-es vizsgálatok és DNS szekvenálás.....	58
6.2.3. Részleges genomanalízis.....	58
6.2.4. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció.....	59
6.3. CRESS DNS vírusok.....	62
6.3.1. PCR-es vizsgálatok és genomszekvenálás.....	62
6.3.2. Teljesgenom-analízis.....	63
6.3.3. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció.....	66
7. MEGBESZÉLÉS.....	73
7.1. Vörösfülű ékszerteknős-adenovírus.....	73
7.1.1. Részleges genomanalízis.....	73
7.1.2. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció.....	74
7.2. Lesőharcsa-herpeszvírus.....	78
7.2.1. Részleges genomanalízis.....	79
7.2.2. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció.....	80
7.3. Ősibb gerincesek CRESS DNS vírusai.....	81
7.3.1. Új cirkovírusok halakban.....	81
7.3.2. Sertés cirkovírus 2 halakban.....	82
7.3.3. A cirkovírusok eredetére vonatkozó hipotézis.....	83
7.3.4. CRESS DNS vírus hullőben és kétéltűben.....	85
7.4. Következtetések.....	86
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	88
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	89
10. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI.....	103
10.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent publikációk.....	103
10.2. Konferencia prezentációk.....	103
10.3. Rendszertani javaslat az ICTV részére.....	104
11. A DOKTORI KUTATÁS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	104
11.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent publikációk.....	104
11.2. Konferencia prezentációk.....	104
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	105
13. MELLÉKLETEK.....	106
1. melléklet: A disszertációban felhasznált adenovírus szekvenciák adatai.....	106
2. melléklet: A disszertációban felhasznált alloherpeszvírus szekvenciák adatai.....	107

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>Rövidítés</b>	<b>Angol megfelelő</b>	<b>Magyar megfelelő</b>
AciHV	acipenserid herpesvirus	tok-herpeszvírus
AdV	adenovirus	adenovírus
aLRT	approximate Likelihood-Ratio Test	hozzávetőleges valószínűségi arány teszt
AngHV	anguillid herpesvirus	angolna-herpeszvírus
as	amino acid	aminosav
A+T	adenine and thymine	adenin és timin
bp	base pair	bázispár
BIC	Bayesian information criterion	Bayes-i információs kritérium
<i>cp</i>	capsid protein encoding region	kapszidfehérjét kódoló gén
Cp	capsid protein	kapszidfehérje
G+C	guanine and cytosine	guanin és citozin
CRESS	circular replication-associated protein	kör alakú, replikációs fehérjét kódoló,
DNS	encoded single-stranded DNA	egyszálú DNS
CV	circovirus	cirkovírus
CyHV	cyprinid herpesvirus	ponty-herpeszvírus
CyV	cyclovirus	ciklovírus
DBP	DNA-binding protein	DNS-kötő fehérje
dsDNS	double-stranded DNA	duplaszálú DNS
E	early	korai
EM	electron microscope	elektronmikroszkóp
ESS	evolutionarily stable strategy	evolúciósan stabil stratégia
EVE	endogenous viral element	endogén virális elem
HV	herpesvirus	herpeszvírus
IcHV	ictalurid herpesvirus	csatornaharcsa-herpeszvírus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság
ITR	inverted terminal repeat	fordított genomvég ismétlődés
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Tiszta és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója
kbp	kilobase pair	ezer bázispár
L	late	késői
M	molar	mólos
MLP	major late promoter	fő késői promóter
NCBI	National Center for Biotechnology Information	nemzeti biotechnológiai információs adatközpont a marylandi Bethesdában
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	open reading frame	nyitott leolvasási keret
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció

PCV	porcine circovirus	sertés-cirkovírus
pTP	precursor of terminal protein	a terminális fehérje prekurzora
RaHV	ranid herpesvirus	béka-herpeszvírus
RCR	rolling circle replication	gördülő-kör típusú replikáció
<i>rep</i>	replication-associated protein encoding region	replikációs fehérjét kódoló gén
Rep	replication-associated protein	replikációs fehérje
RESAdV	red-eared slider adenovirus	vörösfülű ékszerteknős-adenovírus
rpm	revolutions per minute	fordulatszám
ssDNS	single-stranded DNA	egyszálú DNS
SalHV	salmonid herpesvirus	lazac-herpeszvírus
SiHV	silurid herpesvirus	harcsa-herpeszvírus
TE	tris-EDTA	trisz-EDTA
TP	terminal protein	terminális fehérje
WSAdV	white sturgeon adenovirus	fehér tok-adenovírus

## 1. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám célja az ősbibb gerinces csoportok képviselőiben előforduló egyes DNS vírusok genetikai és törzsfajlódástani vizsgálata volt. Ezeknek a gerinces csoportoknak a képviselőit fertőző vírusokkal kapcsolatban sokkal kevesebb ismerettel rendelkezünk, mint a fajszámukat tekintve kevésbé népes madarak és emlősök vírusairól szerzett tudásanyag. Ez a tény indokolja a vizsgálatukat. Ehhez halak, kétélűek és hüllők mintáinak PCR-es szűrővizsgálatát végeztem el és a pozitív mintákat genetikai, illetve törzsfajlódástani elemzéseknek vettem alá.

A vörösfülű ékszerteknős-AdV (RESAdV-1) jelentőségét az adja, hogy vizsgálatával hosszabb idő óta először lehetőség adódott egy újabb AdV nemzetség taxonómiai besorolására. Eredményeim lehetőséget kínáltak az AdV-ok törzsfajlódástani kapcsolatainak vizsgálatára és ezzel a témacsoportunk által korábban felállított AdV-gazda koevolúciós hipotézis tesztelésére. A vírus 14776 bázispár (bp) méretű genomiális DNS szakaszának nukleotidsorrendjét határoztam meg és elemeztem. A pVI, pVII és pX fehérjék proteáz vágási helyeinek egyedi jellemzői és a törzsfarekonstrukciók azt mutatták, hogy a RESAdV-1 a teknősökkel (*Testudines*) együtt fejlődött önálló leszármazási ág képviselője. Az eredményeket a koevolúciós vizsgálat során kapott törzsfaj is alátámasztotta. Eredményeink alapján az ICTV (Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság) 2021. március 8-án hivatalosan is rendszerbe foglalta a teknősök AdV-ai számára általunk javasolt *Testadenovirus* nemzetséget és annak alapító fajaként a RESAdV-1 által képviselt *Pond slider testadenovirus A* vírusfajt.

A lesőharcsa HV okozta fertőzésével kapcsolatban munkám kezdetén még nem álltak rendelkezésre molekuláris adatok. Magyar kutatók az 1980-as évek elején számoltak be a lesőharcsa jellegzetes bőrelváltozásával járó megbetegedéséről, amelynek hátterében az elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatok alapján HV-t feltételeztek. Egy hazai halgazdaságból származó himlőszerű bőrelváltozásokat mutató kétnyaras lesőharcsa bőrmintáján molekuláris biológiai elemzését végeztem el. A hal-herpeszvírusok kimutatására alkalmazott polimeráz láncreakciók (PCR) közül több is pozitív eredményt adott. PCR termékek szekvenciája alapján tervezett primerekkel 15222 bp méretű genomszakaszt sikerült felerősíteni és szekvenálni. A vírus az *Alloherpesviridae* család *Cyprinivirus* nemzetségébe sorolható. Filogenetikai távolsága alapján egy önálló vírusfajként, silurid herpeszvírus 2 néven javasoljuk rendszerbe foglalni.

A CRESS DNS vírusok sokfélesége a metagenomikai vizsgálatoknak köszönhetően válik egyre ismertebbé. Halakból magyar kutatók két cirkovírus (CV) teljes genomját írták le. Hazai, vadon élő razbórából (*Pseudorasbora parva*) két, dévérkeszegből (*Abramis brama*) és angolnából (*Anguilla anguilla*) egy-egy új CV-t, míg fenékjáró küllőből (*Gobio gobio*) egy új ciklovírust (CyV) sikerült kimutatnom. Amazóniai tejbékából (*Trachycephalus resinifictrix*) egy, az *Arfiviricetes* osztályba tartozó ismeretlen kládba, esetleg a CRESS 1-es csoportba tartozó

CRESS DNS vírust, vörösfülű ékszerteknősből egy, a CRESS 2-es csoportba sorolható CRESS DNS vírust tudtam felerősíteni. Minden esetben elvégeztem a teljes genomiális DNS szekvenálását, jellemzését és filogenetikai vizsgálatát. Genomméretük és genomszerveződésük miatt feltételezésem szerint az angolna és a vörösfülű ékszerteknős esetében a gazda örökítőanyagába integrálódott vírus eredetű szekvenciákról (EVE) vagy szabad replikonokról lehet szó, míg a másik öt esetben intakt, recens vírusokat feltételezhetünk.



## 2. BEVEZETÉS

PhD kutatásaimat az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetének Molekuláris és Összehasonlító Virologia témacsoportjában végeztem. A kutatócsoport munkájába, amely lényegében egyes DNS-vírusok sokféleségének vizsgálatára összpontosul, már évekkorábban, szakdolgozatos hallgatóként bekapcsolódtam. Ekkor az állati adenovírusok bizonyos csoportjainak eredete után kutatva, alacsonyabb rendű, ősbibb gerincesek, főként halak és hüllők véletlenszerűen gyűjtött mintáit szűrtük PCR segítségével. Célunk az volt, hogy a lehetőségek szerint minél több, a tudomány számára új AdV-t mutassunk ki, és ezek molekuláris genetikai jellemzése és filogenetikai elemzése után megkíséreljük az AdV-ok evolúciójának múltbeli eseményeit rekonstruálni.

A kutatócsoport eredetileg a kérődzőkben és baromfiban mindössze pár évtizeddel az AdV-ok felfedezése után már megtalált, szokatlan tulajdonságokat mutató, rendhagyó adenovírusok eredetét kutatta (Bartha, 1969). Ugyanis a különféle DNS vizsgálatok (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus, DNS-hibridizáció), majd a szekvenálás elterjedése nyomán meghonosított filogenetikai elemzések mind megerősítették a különleges vírusok jelentős genetikai távolságát az emlősök és madarak korábban jól megismert adenovírusaitól (Harrach és mtsai, 1997; Benkő és Harrach, 1998). A teljes genomsekvenciák összehasonlítása további bizonyíték volt arra, hogy a rendhagyó vírusok nem sorolhatók az addig elismert két, emlős és madár AdV leszármazási vonalak alkotta egyik nemzetségbe sem. Az eredmények alapján megkezdtek a rendhagyó vírusok eredeti gazdáinak keresését, amihez, tekintettel a nagy genetikai távolságra, célszerűnek látszott az ősbibb gerincesekben előforduló AdV-ok vizsgálata (Benkő és mtsai, 2002). Ennek folyamán valóban sikerült a hüllőkben számos új AdV-t kimutatni (Wellehan és mtsai, 2004; Farkas és mtsai, 2008). Azonban kételtűből és halból máig is mindössze egy-egy izolátum ismert (Davison és mtsai, 2000; Doszpoly és mtsai, 2019).

A kutatócsoport eredményei és javaslatai nyomán az *Adenoviridae* család rendszertana folyamatosan alakult, és a két eredeti (*Mastadenovirus* és *Aviadenovirus*) genus mellett előbb az *Atadenovirus*, majd a *Siadenovirus* nemet is elfogadták (Benkő, 2004). Az egyetlen halból, nevezetesen a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) származó AdV besorolásához 2009-ben egy ötödik nemzetséget (*Ichtadenovirus*) is elfogadott az ICTV, amelynek Adenoviridae Munkacsoportjában évtizedek óta meghatározó feladatot látnak el a magyar kutatók.

A szekvencia-analízisen alapuló filogenetikai elemzések eredményei alapján hipotézis született az AdV-ok gerinces gazdáikkal történt evolúciójára vonatkozóan. Az eredeti elmélet szerint valószínűsítették, hogy az adenovírus nemzetségek a gerincesek öt fő csoportjával (osztályával) együtt fejlődött leszármazási vonalaknak felelnek meg. A *Mastadenovirus* és *Aviadenovirus* az emlősök, illetve madarak vírusait foglalja magában, míg a halak AdV-ai az

*Ichtadenovirus* genusba tartozónak várhatók. A gazdaspektrum szempontjából szélesebb skálát mutató, de alapvetően a hullók és kétéltűek AdV-ainak tartott, *Atadenovirus* és *Siadenovirus* nemzetség esetén több gazdaváltás előfordulását feltételezték (Benkő és Harrach, 2003). A tapasztalatok szerint a valószínűsíthetően gazdaváltáson átesett vírusok az új gazdában a szokásosnál súlyosabb kimenetelű, esetenként elhullással is együtt járó fertőzést okozhatnak (Benkő, 2004).

Később egyre világosabbá vált, hogy atadenovírusokat a hullók közül szinte kizárólag pikkelyes hullókban (Squamata) lehet találni. A többi hullórend tagjaiban nem, vagy csak elvétve mutattak ki atadenovírust. Érdekes módon 2007-ben, szinte azonos időben, egy amerikai és két magyar laboratóiumban is felfedezték az addig ismertektől jelentős filogenetikai távolságban lévő AdV-okat különféle teknősökben, többek között résteknősben (*Malacochersus tornieri*), díszes dobozteknősben (*Terrapene ornata ornata*), keleti dobozteknősben (*Terrapene carolina carolina*). A PCR-rel felerősített génszakasz szekvenciája alapján sejthető volt, hogy az újonnan talált vírusok egy külön leszármazási vonalat képviselnek, amelynek besorolásához valószínűleg egy újabb nemzetség kialakítására lesz szükség (Farkas és Gál, 2009; Doszpoly és mtsai, 2013). Ennek alátámasztására terveztük e vírusok egyik képviselőjének genomjából lehetőleg a teljes, vagy a lehetőségek szerinti minél hosszabb szakasz nukleotidsorrendjének meghatározását, ezzel alátámasztva a fentieket.

Szaktervezési munkám során feladatomból volt minél több mintát gyűjteni hazai őshonos, illetve betelepített vagy kedvtelésből tartott, egzotikus halakból, kétéltűekből és hullókból. A többszáz elemből álló mintagyűjteményt először AdV-ok jelenlétére szűrtem, de kétéltűekben és halakban nem kaptam egyetlen pozitív PCR eredményt sem. Részben ez befolyásolta PhD munkám témáját, amelyben a meglévő vagy újabb minták vizsgálatát terveztük herpesz- és cirkovírusok jelenlétének kimutatására is.

Az evolúciós szempontból ősi gerinces csoportok képviselőinek herpeszvírus-szerű fertőzöttsége régóta ismeretes, sőt a pettyes csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) vírusának teljes genomszekvenciáját is már több évtizeddel ezelőtt meghatározták (Davison, 1992). A vírusok kimutatására és genetikai jellemzésére szolgáló molekuláris biológiai eszközök fejlődésével egyre több, az intenzív haltenyésztésben komoly veszteségeket, illetve néha a természetes vizekben is jelentős elhullásokat okozó herpesz-szerű vírus megismerésére nyílt lehetőség. A teljes genomszekvenciák és filogenetikai elemzések rávilágítottak, hogy a halakban előforduló HV-ok jelentősen eltérnek a klasszikus *Herpesviridae* család emlősökből, madaraktól, illetve hullókból származó tagjaitól. Ezért időszerű lett a rendszertanukban jelentős változások bevezetése. *Herpesvirales* néven létrehoztak egy rendet, amelyen belül a halak és kétéltűek HV-ainak besorolásához megalapították az *Alloherpesviridae* családot. Az ide sorolható vírusok állategészségügyi jelentőségét fokozta széleskörű elterjedtségük, valamint a tünetmentes vírushordozás és a vírustípustól függően esetenként állomány szintű tömeges

elhullással is járó fertőzések előfordulása (Hedrick és mtsai, 2000; Aoki és mtsai, 2007; Shchelkunov és mtsai, 2009; Waltzek és mtsai, 2009). Az *Alloherpesviridae* család tagjai halakat és kétéltűeket fertőző, halgazdasági és állategészségügyi szempontból is jelentős kórokozók, amelyeket rendszertanilag jelenleg négy, egymástól jól elkülönülő nemzetségbe sorolnak (Davison és mtsai, 2009; Waltzek és mtsai, 2009). Ezek közül hazánkban a legjelentősebb a *Cyprinivirus* nemzetség, ahová a tudomány aktuális állása szerint a pontyfélékben (Cyprinidae) és angolnafélékben (Anguillidae) előforduló HV-ok tartoznak (Hanson és mtsai, 2011). A hazánk természetes vizeiben is őshonos lesőharcsa (*Silurus glanis*) HV által okozottnak feltételezett, himlőszerű bőrtüneteinek első makroszkópos és elektronmikroszkópos megfigyeléseken alapuló esetleírása magyar kutatók nevéhez fűződik (Békési és mtsai, 1981). Egy hazai tógazdaságból 2015 őszén intézetünkbe szállított, a korábban leírt esetekhez hasonló bőrelváltozásokat mutató, kétnyaras lesőharcsa vizsgálatát végeztem el. A bőrmintában PCR-rel kimutatott, a tudomány számára új HV részleges molekuláris elemzését is elvégeztem. A lesőharcsa növekvő tógazdasági jelentősége, valamint természetes vizeinkben betöltött ökológiai szerepe indokoltá teszi vírusos fertőzéseinek alapos megismerését.

A *Circoviridae* családba sorolható vírusok előfordulását halakban elsőként magyar kutatók igazolták (Lőrincz és mtsai, 2011, 2012). Érdekesnek látszott a halak, kétéltűek és hullók mintáinak szűrése CV-ok jelenlétére. A környezeti mintákból nyert szekvencia adatok ugrásszerű gyarapodása nyomán fokozatosan ismertté vált a ma már CRESS DNS vírusnak nevezett vírusok rendkívüli mennyisége, változatossága és elterjedtsége (Rosario és mtsai, 2009; Delwart és Li, 2012). E vírusok közös jellemzője, hogy körkörös, egyszálú DNS genommal rendelkeznek, amely Rep fehérjét is kódol. A CRESS DNS vírusok között található gerinces és gerinctelen állati szervezeteket, a növényvilág különböző szerveződésű tagjait és gombákat fertőző vírusok is (Krupovic, 2013). Ugyanakkor viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk a virozférában betöltött szerepükre, illetve esetleges kórokozó képességükre vonatkozóan. Az evolúciós viszonyokat tükröző rendszertanuk kialakítását nehezíti a CRESS DNS vírusokra jellemző változatos genomszerveződés és magas mutációs ráta (Rosario és mtsai, 2012). Feltételezik, hogy gyakori lehet a rekombináció, eltérő gazdafajok fertőzése és a horizontális géntranszfer is (Li és mtsai, 2011; Liu és mtsai, 2011; Martin és mtsai, 2011). Ezek a tényezők nemcsak a CRESS DNS vírusok terjedéséhez és környezeti adaptációjához járulhatnak hozzá, de elősegíthetik kórokozó képesség kialakulását vagy változását is (Lefeuvre és mtsai, 2009). A környezeti minták használata a vírusdiverzitás megismerésére irányuló szűrővizsgálatokban sok esetben azt is jelenti, hogy nem vagy nem biztosan ismert a potenciális fogékony gazdafaj, amelyet az adott vírus természetes úton fertőz (Blinkova és mtsai, 2009, 2010; Rosario és mtsai, 2009, 2012). Doktori kutatásaim kezdetéig kétéltűekből és hullókból nem mutattak ki CRESS DNS vírusokat, azonban egyes gerinces gazdafajok genomiális DNS-ébe integrálódott virális eredetű DNS jelenlétét leírták (Belyi és mtsai, 2010).

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

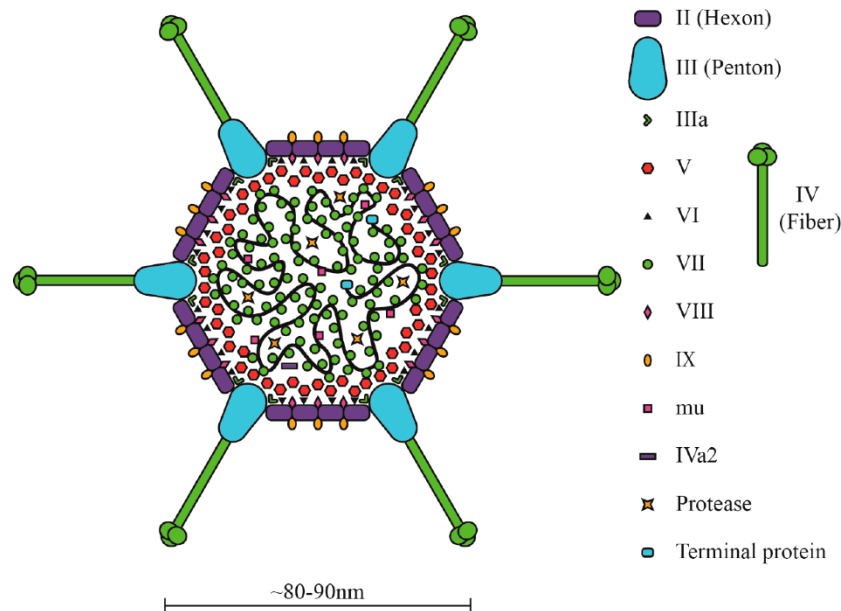
#### 3.1. Adenovírusok

##### 3.1.1. Az adenovírusok általános jellemzése

Az AdV-ok családjának (Family: *Adenoviridae*) képviselői gerinceseket fertőző, duplaszálú DNS genommal rendelkező vírusok (Harrach és mtsai, 2012). Rowe és mtsai (1953) gyermekek műtéti úton eltávolított orr- és garatmanduláiból (adenoid szövet) készült sejttenyészetekben spontán degenerációt tapasztaltak, majd ezt követően sikerrel izolálták a sejtkárosító hatásért felelős ágenszt. A következő évben Cabasso és mtsai (1954) a kutya fertőző májgyulladásának (Rubarth-kór) kóroktani előidézőjeként azonosítottak AdV-t, amelyet később kutya adenovírus-1 (CAV-1) néven írtak le. Az AdV-ok világszerte elterjedt ágensek, gazdafajaik között valamennyi gerinces osztály képviselői megtalálhatóak, ugyanakkor gerincteleneket fertőző AdV-ok jelenleg nem ismertek (Russell és Benkő, 1999; Kovács és mtsai, 2003; Benkő, 2004). Az AdV-fajok általában erős gazdaspecificitással jellemezhetők, esetenként azonban ugyanaz a vírus több, egymással törzsfelődéstanilag közeli kapcsolatban álló gazdafajból is kimutatható. Ugyanakkor egyes gerinces gazdáiban több AdV is előfordulhat (Harrach és mtsai, 2012). Patogenitásuk a gazda és a vírus típusának függvényében változó. Főként fiatal állatokban és gyermekekben okoznak szubklinikai vagy enyhe klinikai tünetek formájában megnyilvánuló, többnyire emésztőszervi és felső légúti megbetegedéseket. Az AdV-ok súlyos problémát általában csak HIV fertőzés, daganatellenes kezelés, szervátültetés vagy más vírusok és paraziták, illetve szteroidkezelés miatt immunszuppresszált állapotban lévő gazdáiban okoznak. A vírus az esetek egy jelentős részében hosszú távon keresztül képes fennmaradni a fertőzött szervezetben (perzisztencia). A fertőződés leggyakrabban szájon át, belégzéssel vagy kötőhártyán keresztül történik, szennyezett élelmiszer, ivóvíz vagy különféle fertőző váladékok közvetítésével.

A burok (envelope) nélküli AdV-ok fertőzőképes virionja 70–90 nm átmérőjű, ikozaéder alakú, kubikális szimmetriájú nukleokapsziddal rendelkezik (1. ábra). A genomális DNS komplementer szálainak 5' végéhez kovalens módon kapcsolódó terminális fehérje (TP) prekursor formában (pTP) termelődik, érése és aktiválódása poszttranszlációs módosítással történik a vírusgenomban kódolt endopeptidáz általi hasítással a vírusszaporodás érési fázisában. Azok a géntermékek, amelyek prekursor formában termelődnek a proteolitikus hasításhoz vágási szignálszekvenciákat tartalmaznak. Ezek a szekvencia motívumok evolúciósan jól megőrzött aminosavsorrendek és az AdV-ok esetében rendszertani markerként is figyelembe vehetők (Weber, 1995; Davison és mtsai, 2003; Mangel és San Martín, 2014). A kapszid komplex szerkezete a II, III, pIIIa, IV, pVI, pVIII (illetve csak mastadenovírusokban a IX-es) jelű fehérjékből áll. A kapszid belsejében található úgynevezett mag fehérjék (pVII, pX, pTP

és csak mastadenovírusokban az V-ös) a vírusnukleinsavval szoros kapcsolatban található. A kapszid 240 hexonból és 12 pentonból épül fel. A hexon az AdV-ok fő szerkezeti fehérjéje és legjelentősebb antigénje is egyben (van Oostrum és mtsai, 1987; Kulanayake és Tikoo, 2021). A penton a III-as számú polipeptid molekulából, vagyis pentonbázisból és az abból antenyszerűen kinyúló polipeptid IV molekulából, azaz fiberből épül fel. A kapszid csúcsain minden egyes penton mellett (legújabb kutatások szerint ezen belül) 2–2 molekula pIIIa jelzésű polipeptid található (San Martín és mtsai, 2008; Harrach és mtsai, 2012; Reddy és Nemerow, 2014). A 20–50 nm hosszúságú fiber végén elhelyezkedő gömbszerű fejecske közvetíti a vírus elsődleges kötődését a sejtfelszíni receptorokhoz (Pallister és mtsai, 1996; Davison és mtsai, 2003; Harrach és mtsai, 2012; Péntes és mtsai, 2014). Az V-ös és a pVII-es fehérje közös tulajdonsága, hogy aminosav láncuk argininben gazdagok, ami bázikus jellegű ad a peptidmolekuláknak, így azok képesek kötődni a vírus DNS-hez. Az V-ös struktúrfehérje feltételezett funkciója a vírusgenom és a kapszid közötti kapcsolat megteremtése, segítve ezzel a kapszid összeépülését (Matthews és Russell, 1998; Russell, 2000; Lee és mtsai, 2003). A IX-es protein a nukleokapszid külső felszínén stabilizálja a hexon kapszomert, transzkripcióaktivátorként viselkedik, ezen kívül részt vesz a nukleáris reorganizációban (Rosa-Calatrava és mtsai, 2001). Az AdV polipeptid molekulái közül a pVI-os, pVIII-as és IX-es jelűek a hexonnal létesítenek kapcsolatot (Russell, 2000).

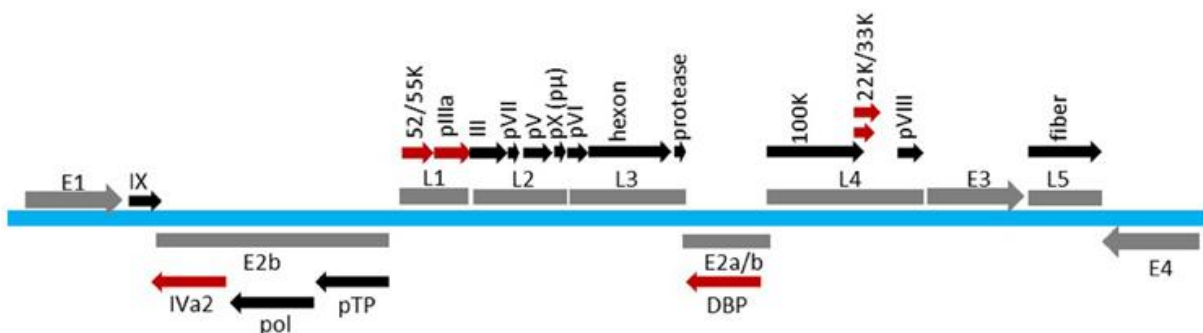


**1. ábra:** Az adenovírusok szerkezeti felépítése a humán adenovírus virionjának bemutatásával (Saha és Parks, 2020).

### 3.1.2. Az adenovírusok genomszerveződése és replikációja

Az AdV-ok genomja lineáris, duplaszálú DNS. Az eddig megismert genomok méretét 26163 és 48395 bp közöttinek találták, ami alapján az *Adenoviridae* család tagjai a közepes

méretű DNS vírusok közé tartoznak. A genom két végén 36–371 bp hosszúságú, fordított végisméltődés, azaz ITR szekvencia található. A DNS mindkét szála kódol, így jobbra és balra átíródó szálról beszélünk. A DNS guanin és citozin (G+C) tartalma 33,6% és 66,9% között változhat (Davison és mtsai, 2003; Harrach és mtsai, 2012). A genom központi része a víruscsalád egészét tekintve jól konzervált, azonban a DNS két vége mind méretében, mind pedig genetikai összetételében meglehetősen nagy változatosságot mutat (Benkő és Harrach, 2003). Genomszerveződésük tekintetében az egyes nemzetségek tagjai viszonylag egységes csoportokat képeznek. Az AdV-ok örökítőanyaga a génkifejeződés időrendiségének szempontjából korai (E) és késői (L) régiókra bontható (E régió: E1–E4, L régió: L1–L5) (2. ábra). A korai géntermékek felelősek többek között a perzisztencia kialakulásáért, a gazdasajt védekező mechanizmusainak (pl. interferon termelés) blokkolásáért (E3 régió), szabályozzák a virális makromolekulák szintézisét (E1, E2 régió – a vírus DNS replikációs komplexének összeállítása –, E4 régió), illetve az esetlegesen kialakuló onkogén sejtttranszformáció mechanizmusában (E1A és E1B régiók) játszanak fontos szerepet (Davison és mtsai, 2003). Az E2A régió kódolja a DNS-kötő fehérjét (DBP), míg az E2B régióban a pTP, a DNS-függő DNS-polimeráz és a virális DNS kapszidba történő beépülését elősegítő IVa2 proteinek kódoló gének találhatóak. Az L régióban a virion felépítésében részt vevő szerkezeti fehérjék génjei találhatóak. A vírusgenomok szekvenciaelemzése során kiderült, hogy az L és E2 régiók az egész *Adenoviridae* családot tekintve jól megőrzöttek, ugyanakkor az E1, E3 és E4 transzkripció egységek által kódolt fehérjék mind hosszukat, mind pedig összetételüket tekintve meglehetősen nagyfokú variabilitást mutatnak még az adott nemzetségen belül is. A genom központi részén található konzervált gének átírása a DNS-polimerázzal átfedésben található fő késői promóter (MLP) működéséhez kapcsolódik. Ugyanakkor a DNS-polimeráz, a pTP és a DBP átírása az ellenkező szálon található közös promóter segítségével történik (Davison és mtsai, 2003; Young, 2003; Harrach és mtsai, 2012).



**2. ábra:** Az adenovírusok genomszerveződésének sematikus ábrája a HAdV-5 genomján szemlélítve (Ahi és Mittal, 2016).

Az *Adenoviridae* család génjeit előfordulásuk alapján feloszthatjuk minden nemzetségben meglévő (konzervált) és nemzetség specifikus génekre. A minden nemzetségre jellemző gének száma 16, amelyek feltételezhetően egy közös AdV őstől származnak.

Elsődleges működésük a DNS replikációjában (pTP, polimeráz, DBP), enkapszidációjában (52K, IVa2), valamint a víruspartikulumok szerkezeti felépítésében (pIIIa, III, pVII, pX, pVI, hexon, proteáz, 100K, 33K, pVIII, és a fiber) nyilvánul meg. Mivel a vírus proteáz enzime genus-common gén által kódolt, a fehérjék proteolitikus érése az AdV replikációs ciklus ősi jellegzetességének számít. A fertőző víruspartikulum képződéséhez szükséges egyes proteinek (a konzervált pTP, pIIIa, pVII, pX, pVI, pVIII, illetve a nemzetség specifikus p32K az atadenovírusokban) lépésekben történő proteolitikus hasítása. A minden nemzetségben megtalálható gének jellemzően a vírusgenom központi részén lokalizálódnak, míg az úgynevezett niche-specifikus vagy nemzetség-specifikus gének a különböző vírus leszármazási vonalak DNS-ének terminális részein helyezkednek el az E1 és E4 génrégiók területén, de mastadenovírusokban és siadenovírusokban az E3 régióban is előfordulnak. A genus specifikus és genus-common géneknek ez az előfordulási mintázata nem korlátozódik csupán az AdV-okra, mivel a jelenséget más lineáris, duplaszálú DNS (dsDNS) vírusok (*Herpesviridae*, *Poxviridae*) genomszerveződésében is megfigyelték (Davison és mtsai, 2003).

A jelenleg legtöbb ismert tagot számláló *Mastadenovirus* nemzetség az emlősöket fertőző AdV-okat tartalmazza, amelyeknek genom-mérete 30288–37860 bp, míg G+C tartalma 43,6 és 63,9% között mozog. Az ITR szekvenciák hossza (93 és 371 bp közötti) és komplexitása (a nagyszámú celluláris faktor kötőhelyének következtében) nagyobb, mint a víruscsalád többi nemzetségében (Dán és mtsai, 2001; Harrach, 2014). Csak ebben a nemzetségben ismert az V-ös és a IX-es struktúrproteinek kódoló gének megléte (Harrach és mtsai, 2012).

Az *Aviadenovirus* nemzetség tagjait napjainkig kizárólag madarakban mutatták ki. Ezek 42940–45781 bp méretű genommal rendelkező vírusok. DNS-ük két végén számos, eddig ismeretlen funkciójú nyitott leolvasási keret (ORF) található és hiányzik az E3 génrégió. Örökítőanyaguk G+C tartalma 44,7 és 67,6% között változik. Az ITR szekvenciák mérete 39–118 bp (Harrach és mtsai, 2012; Harrach, 2014).

Az *Atadenovirus* genus gazdafaj-spektruma széles, pikkelyes hüllők (Squamata), a mór teknős (*Testudo graeca*), madarak, méhlepényesek, kérődzők és egy erszényes, az ecsetfarkú oposzum (*Trichosurus vulpecula*) egyaránt megtalálhatóak közöttük. A nemzetségbe tartozó vírusok 27751–33213 bp méretű genetikai anyagának bázisösszetételét a magas (57–66,4%) adenin és timin (A+T) arány jellemzi, azonban a hüllőkből kimutatott atadenovírus szekvenciákban ez az eltolódott bázisösszetétel nem figyelhető meg. Az ITR szekvenciák mérete 42–118 bp. Csak erre a csoportra jellemző, hogy genomjukból hiányzik az E1A (amely helyett az újonnan megjelenő p32K fehérje génje, valamint az LH2 jelzésű gén van jelen), illetve az E3 régió (Thomson és mtsai, 2002; Benkő, 2004; Harrach és mtsai, 2012; Harrach, 2014; Garcia-Morante és mtsai, 2016).

A főként madaraktól, de három béka- és három teknősfajból is kimutatott *Siadenovirus* nemzetség tagjainak genomszerveződésére a kis méret (26163–26340 bp, amelyek a jelenleg

ismert legrövidebb AdV genomok), a bal terminális részen elhelyezkedő szialidáz-szerű gén, az alacsony G+C tartalom (34,2–38,5%), valamint a rövid (30–39 bp) ITR szekvenciák jellemzőek. A mastadenovírusok E1, E3 és E4 génrégióinak helyén a siadenovírusokban is találunk két, egy, illetve két gént, azonban a két nemzetségben e régiók eredete nem homológ (Davison és Harrach, 2002; Davison és mtsai, 2003; Harrach, 2014). A víruscsalád nemzetségsspecifikus génjeinek funkciója és a génkifejeződés időbeli szabályozása jelenleg még nem ismert és a fő késői promóter jelenlétére sincsenek kísérletes bizonyítékok (Young, 2003; Benkő, 2004; Rivera és mtsai, 2009; Schumacher és mtsai, 2012, Péntes, 2015).

Bár a halak AdV-ai számára 2009-ben létrehozott *Ichtadenovirus* nemzetségbe mindeddig csak a fehér tokból (*Acipenser transmontanus*) izolált WSAdV-1-et sikerült besorolni, a genom G+C tartalma (42,7%) arra enged következtetni, hogy a vírus a halakkal közös ágon fejlődött. A vírusnukleinsav 48395 bp, ami a jelenleg ismert legnagyobb méretű AdV genom. Szerveződése nagymértékben eltér a többi AdV nemzetség képviselőinek nukleinsav organizációjától. A fiber gén homológ szekvenciák a bal oldali genomvégen a hiányzó E1 régió helyén található. A genom jobb oldali részén az utolsó megőrzött gén a pVIII fehérjét kódoló régió. Ezt követően 28, méretük alapján feltételezhetően fehérjét kódoló ORF-et sikerült azonosítani, amelyek néhány kivételtől (Ig-szupercsalád, parvovírus nem szerkezeti fehérje, illetve szulfotranszferáz kódoló régiókhoz hasonlító szekvenciák) eltekintve nem mutatnak hasonlóságot más génekkel. Az ITR szekvencia 126 bp hosszúságú (Kovács és mtsai, 2003; Doszpoly és mtsai, 2019).

Az AdV-ok replikációját a humán AdV C fajba tartozó HAdV-2 és HAdV-5 típusok esetében tanulmányozták részletekbe menően (Russell, 2000). Szaporodásuk a gazdasejt magjában történik (Davison és mtsai, 2003). A vírusszaporodás jellemzője, hogy a fertőzésre fogékony sejtben fénymikroszkóposan is jól látható citopatogén elváltozásokat, bazofil sejtmagzárványokat okoznak, amelyek eredményeként az érintett sejt elpusztul (Dubovi, 2017). A vírus működési ciklusa a fogékony sejt fertőzésével kezdődik, amikor az a fiber által a gazdasejt víruskötő receptorához kapcsolódik és endocitózis útján jut be a sejtbe. AdV-ok esetében a dekapszidáció nem teljes és már néhány kapszidfehérje elvesztése után megkezdődik a korai vírusfehérjék mRNS molekuláinak szintézise. A citoplazmából a gazdasejt magjába jutó vírus DNS replikációját, valamint a késői vírusfehérjék képződését a virionok összeépülésének fázisa követi, amelynek során a nukleokapszid újonnan szintetizált alkotóelemeiből a sejtmagban felépül az üres prokapszid. Ezt követően speciális scaffolding proteinek irányításával a kész nukleinsav beépül a prokapszidba. A kapszid és a nukleinsav egymásra találását a vírusgenom által kódolt speciális szignálszekvencia teszi lehetővé. A nukleokapszid összeépülésének stratégiája vírusfüggő. A vírus a makromolekulák képződésének időbeli, valamint koncentrációbeli szabályozásával hat a nukleinsav tartalmú kapsziddal rendelkező fertőzőképes (komplett) és a DNS-t nem tartalmazó kapszidból álló nem fertőzőképes (inkomplett) virionok



fennmaradás szempontjából minél kedvezőbb arányára. A kész virionok sejtből történő kiszabadulása a vírusszaporodás során fellépő programozott sejthalál (apoptózis) nyomán megy végbe (Russell, 2000; Zhang és Bergelson, 2005). Humán AdV-ok vizsgálata során 1977-ben írták le a vírus DNS-ről átíródott prekursor mRNS-ek érését, a splicing folyamatát (Berg et al., 1977; Chow és mtsai, 1979). A teljes genomok szekvenálásának eredményei alapján elmondható, hogy a splicing nemzetségtől függően általános mechanizmus a IVa2, a DNS-polimeráz és a pTP gének esetében.

### 3.1.3. Az adenovírusok evolúciója és rendszertana

Evolúciós történetüket tekintve az AdV-ok feltételezhetően az eukariótákban széles körben elterjedt ősi, dsDNS genommal rendelkező nagyméretű transzpozonokkal (polintovírusok), valamint rajtuk keresztül egyes fágokkal, a dsDNS bakteriofágokhoz tartozó *Tectiviridae* család tagjaival vannak származástani kapcsolatban (Koonin és mtsai, 2015a, 2015b; Krupovic és Koonin, 2015; Iranzo és mtsai, 2016; Koonin és mtsai, 2020). A hipotézist a két víruscsoport biológiai jellemzői közötti hasonlóságok (lineáris dsDNS genom, B típusú DNS-polimeráz, penton, hexon és fiber, ITR) támasztják alá (Bamford és mtsai, 2005; Harrach és mtsai, 2012; Oksanen és Bamford, 2012). Az AdV-ok fő szerkezeti (kapszid) fehérjéje a hexon felépítése nagymértékű hasonlóságot mutat a tectivírusok közé tartozó PRD1 bakteriofág kapszidjának P3 szerkezeti fehérjéjével (Benson és mtsai, 1999). Tovább erősíti a fágokkal közös törzsfajlódástani kapcsolatot, hogy az AdV-ok mellett egyes bakteriofágok is rendelkeznek olyan DNS-polimerázzal, amely képes fehérjét használni primerként a replikáció során. Az evolúciós kapcsolatot támasztja alá a tectivírusok ikozaéder alakú kapszidjából fiberszerűen kiálló képződmények és az ITR megléte is (Berencsi és mtsai, 1995; Brenkman és mtsai, 2002; Mysiak és mtsai, 2004; Oksanen és Bamford, 2012). Az atadenovírusok p32K szerkezeti fehérjéjének konzervált C-terminális része elsődleges és másodlagos szerkezetét tekintve hasonlóságot mutat egyes baktériumok kis savoldékony fehérjéivel. A strukturális hasonlóság egyben funkcionális hasonlóságot is feltételez (Élő és mtsai, 2003).

Az AdV-ok proteáz génjének és gazdafajaik mitokondriális rRNS-ének kis alegységének törzsfajlódástani vizsgálata során megfigyelték, hogy a kapott filogenetikai fák topológiája és az egymáshoz viszonyított genetikai távolságok nagymértékű hasonlóságot mutatnak. Ez vezetett az AdV-ok és gazdáik közös törzsfajlódására vonatkozó elmélet megszületéséhez, amely szerint az AdV-ok napjainkban megfigyelhető diverzitása a gazdafajjal történt hosszútávú koevolúció során alakulhatott ki (Harrach, 2000; Benkő és Harrach, 2003; Podgorski és mtsai, 2018). Korábbi elképzelések szerint mivel a törzsfajlódástaniilag ősi gerinces csoportok rendelkeznek saját AdV-okkal, Kumar és Hedges (1998) gerinces evolúciót rekonstruáló filogenetikai elemzése arra enged következtetni, hogy az *Adenoviridae* család képviselői a főbb gerinces osztályok szétválásának kezdetén, mintegy 400 millió éve

feltételezhetően már léteztek (Harrach, 2001). Wadell és mtsai (1980) már évtizedekkel ezelőtt feltételezték, hogy az AdV-ok kialakulása az egyes gerinces csoportok szétválása előtt, vagy röviddel az után következhetett be. Vizsgálatainak összefoglalásaként hasonló következtetésre jutott Benkő (2004) is. Az ősz AdV genomja McGeoch és Davison (1995) elképzelése szerint eredetileg csak a replikációhoz és a virion fennmaradásához nélkülözhetetlen nukleinsav szakaszt tartalmazta. Ezek a ma ismert AdV-ok mindegyikében megtalálható úgynevezett genus-common gének, amelyek a genomban főként a középső régióban kódoltak (Davison és mtsai, 2003). A genom kódoló kapacitásának növekedése az AdV evolúció során más nagyméretű dsDNS vírusokhoz hasonlóan rekombinációval, génduplikációval, génszerzéssel, de novo génkeletkezéssel stb. történhetett. A feltételezések szerint a törzsejlődés során az ősz-AdV alapinformációt kódoló, rövid genomja környezetével kölcsönhatásban, gazdafajaitól és más vírusoktól fokozatosan szerezhette meg a fennmaradásához és a lehető legtökéletesebb környezeti alkalmazkodásához szükséges géneket (Harrach, 2000; Harrach, 2001; Shackelton és Holmes, 2004). A teljes AdV-genomok méretét és szerveződését megfigyelve elmondható, hogy azokon jól látható a különböző gerinces taxonokhoz történő evolúciós alkalmazkodás. Az AdV-ok és gazdafajaik molekuláris kutatásában kapott eredményekre alapozva (Benkő és Harrach, 2003) úgy gondolják, hogy a madarak és az emlősök AdV-ainak jelenlegi diverzitása egyértelműen az ezekkel a gerinces csoportokkal történt koevolúció eredménye. Ugyanakkor a jelenlegi ismereteink szerint hüllőket, madarakat, egy-egy erszényes- és teknősfajt és kerdődzöket is fertőző atadenovírusok eredetileg a pikkelyes hüllőket (Squamata) fertőzhették és a rendszertanilag azoktól eltérő gazdafajokra gazdaváltás (host switch) útján kerültek át (Benkő és Harrach, 2003; Farkas és mtsai, 2008). A gazdaváltás jelenségét más vírusok esetében is feltételezik (Bandín és Dopazo, 2011). Az eredetileg a kétélűekkel közösen fejlődött vírusleszármazási águnk gondolt, madarakat és néhány béka-, illetve teknősfajt fertőzni képes siadenovírusok gazdaeredete napjainkig nem pontosan tisztázott. A jelenlegi elképzelés szerint az ősi, ma még nem azonosított siadenovírus-gazdáról gazdaváltás útján kerültek át a mai gerinces fajok őseit fertőző siadenovírusok, amelyek ezt követően már új gazdáikkal közös vonalon fejlődtek tovább. Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, hogy a feltételezeten új gazdában lévő vírusok erőteljesebb kórokozó-képességgel rendelkeznek (Benkő és Harrach, 2003; Kohl és mtsai, 2012). Megfigyelték továbbá, hogy a gazdaváltáson átesettnek vélt AdV-ok genomjának nukleotid-összetétele eltolódott, jelentősen nőtt bennük az A+T arány (Benkő, 2004). A jelenségek pontos oka egyelőre nem tisztázott, vélhetően a vírus és a gazda immunrendszerének kölcsönhatása során alakulhatott ki. Egyes feltételezések szerint az AdV-ok genetikai anyagának bázisarányai összefüggésben állhatnak a gazdafajuk genomi bázisösszetételével (Harrach, 2000). Mivel napjainkig egyetlen halból származó AdV ismert, az *Ichtadenovirus* genus gazdaeredete nem tekinthető egyértelműen tisztázottnak (Benkő és Harrach, 2003).

Az AdV-okat, 1953-ban történt leírásukat követően az ICTV először *Adenovirus* nemzetséggé sorolta be a vírusok rendszerébe, amit 1956-ban *Adenoviridae* család szintű kategóriára változtatott. Egészen 2002-ig két nemzetség (*Aviadenovirus* és *Mastadenovirus*) alkotta a víruscsaládot (Benkő, 2004). A besorolás kezdeti alapját a madár vagy emlős gazdákat fertőző vírusok biológiai, biokémiai és szerológiai tulajdonságaiban megfigyelt eltérések képezték (Norrby és mtsai, 1976). A *Mastadenovirus* nemzetségbe sorolták be az emlősállatokból és az emberből származó vírusizolátumokat, amelyeket gazdafajaik szerinti csoportosításban szerotípusokként tartottak nyilván. Azonos, csoportspecifikus antigénjeik alapján a megfelelő szerotípusokat egy-egy szerocsoportba sorolták. A madaraktól elkülönített AdV-okat közös szolubilis antigénjeiknek megfelelően három csoportba (I-III) osztották, amelyeken belül szerotípusokat különböztettek meg. Mindeközben Bartha Adorján magyar virológus, egyes különleges szarvasmarha AdV-okkal végzett szerológiai vizsgálatainak eredményei alapján már 1969-ben javaslatot tett egy új rendszertani kategória megalkotására (Bartha, 1969). A taxonómiai revízió alapját az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetében elvégzett összehasonlító DNS-vizsgálatok, majd a szekvenálás, és az ezek alapján végzett első törzsfa-rekonstrukciók szolgáltatták (Benkő és mtsai, 1990; Benkő és Harrach, 1998). Az új eredmények figyelembevételével 2002. július 30-án, a Mikrobiológiai Társaságok Nemzetközi Szövetségének (IUMS) XII. Nemzetközi Virologiai Kongresszusán sor került az *Adenoviridae* család két újabb nemzetséggel (*Atadenovirus* és *Siadenovirus*) történő bővítésére (Mayo, 2002). A mastadenovírusoktól már több mint 30 éve elkülönített, különleges szarvasmarha-AdV-okat és az aviadenovírusok III. csoportjába tartozó vírusokat egybevonva létrehozták az *Atadenovirus* nemzetséget. A madárvírusok II. csoportjának tagjaiból, valamint az egyetlen ismert béka-AdV-ból pedig megalkották a *Siadenovirus* nemzetséget (Benkő, 2004). A módosítások következtében eltűntek a *Mastadenovirus* és az *Aviadenovirus* nemzetségből a kivételek és a szerológiai reaktivitás, valamint a genom szerveződése szempontjából is egységes, kizárólag emlős vagy madár gazdákat fertőző vírusnemzetségek jöttek létre.

Az egyetlen ismert, halból származó AdV izolátum genomszerveződés szempontjából olyan mértékben eltérőnek mutatkozott (Benkő és mtsai, 2002; Kovács és mtsai, 2003), hogy 2009-ben létrehozták számára az *Ichtadenovirus* nemzetséget, amelynek azóta is egyetlen ismert képviselője (Harrach és mtsai, 2012; Doszpoly és mtsai, 2019).

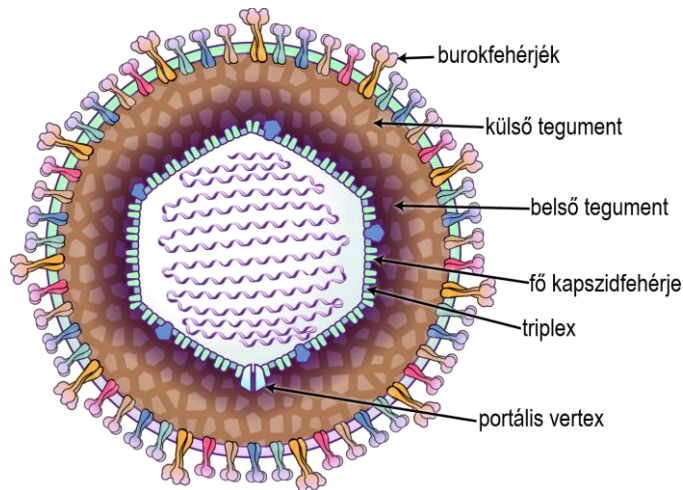
Az *Adenoviridae* család kutatásaim kezdetén öt, az ICTV által hivatalosan elfogadott nemzetségből állt (Harrach és mtsai, 2012). A vírusfajt, mint új rendszertani kategóriát 1991-ben vezették be (van Regenmortel és Mahy, 2004). Ennek köszönhetően az egyes AdV nemzetségeken belül vírusfajokat különítünk el. A fajokat a gazda nevével és az ABC betűivel jelöljük, mint például *Human mastadenovirus A*. Egy-egy fajba olyan, közeli rokon vírustípusok sorolhatók, amelyek DNS-függő DNS-polimeráz enzimjének homológ aminosav szekvenciái között 5%-nál kisebb a különbség. Tehát egy faj általában több vírustípust tartalmaz (pl. a

*Porcine mastadenovirus A* fajba tartozik porcine AdV-1, -2 és -3 típus). Néha előfordul az is, hogy egy vírusfajba több gazdafajból származó, eltérő vírustípusok tartoznak (pl. az *Ovine mastadenovirus A* fajba juhból az ovine AdV-2, -3, -4 és -5-ös szerotípusokat, míg szarvasmarhából a bovine-2-es szerotípust sorolták be). Azok az AdV-típusok, amelyeknek a polimeráz génjéből nyert nukleotidszekvenciából származtatott aminosavsorrendje között 15%-nál nagyobb eltérés van, külön fajba sorolandók. Amennyiben a különbség 5 és 15% közé esik, a faji besorolás kritériumai között a vírusok egyéb jellegzetességeit (szerológia, rekombinációs képesség, nukleotid-összetétel, genomszerveződés, patogenitás, onkogenitás, gazdaspektrum stb.) is figyelembe veszik (Harrach és mtsai, 2012). Legalaposabb ismeretekkel az emlősök, azon belül is az ember AdV-airól, különösen a HAdV-C faj képviselőiről rendelkezünk. A korábban általánosan használt szerológiai próbák helyett napjainkban már szekvenciák alapján osztályozzák a vírusokat, ezért szerotípus helyett inkább típusokról, vagy genotípusokról beszélhetünk (Benkő, 2004, 2011; Harrach és mtsai, 2012).

## **3.2. Herpeszvírusok**

### **3.2.1. A herpeszvírusok általános jellemzése**

A HV-ok (order: Herpesvirales) a gerinceseket és néhány gerinctelen gazdafajt fertőző, világszerte, széles körben előforduló, humán és állategészségügyi szempontból is jelentős kórokozók. Virionjuk átmérője 160–300 nm és a magból (core), a nukleokapszidból, az úgynevezett tegumentből és a burokból épül fel (3. ábra). Elmondható, hogy a változatos genomszerveződésnek köszönhetően a HV-ok közös jellemvonásait a virion morfológiája képviseli. Az örökítő anyag jellegzetességei és mérete alapján a HV-ok a legnagyobb méretű és legkomplexebb szerveződésű vírusok közé tartoznak (Davison, 2002). A mag tartalmazza az örökítőanyagot, amely egyszeres kópiában meglévő, lineáris kétszálú DNS. Az ikozaéder szimmetriájú kapszid átmérője nagyjából 100–125 nm. A gazdasejt membránjából származó, vírus eredetű fehérjéket is tartalmazó pleomorf burok a vírus-sejt kölcsönhatásokban és az immunrendszerrel történő interakciókban játszik szerepet. A burok és a kapszid között helyezkedik el a proteinekben gazdag tegument réteg. Ezeknek a fehérjéknek a feladata vírushatáskor a gazdasejt anyagcseréjének megváltoztatása. A HV-ok közvetlen érintkezéssel vagy cseppfertőzés útján kerülnek át az újabb fogékony gazdaszervezetbe (McGeoch és mtsai, 2006; Osterrieder, 2017; Pellett és mtsai, 2012).



**3. ábra:** A herpesvírusok felépítésének sematikus rajza (<https://www.lsbio.com/research-areas/infectious-disease/herpesviridae>).

A vírusszaporodás a fogékony gazdasejt magjában történik. A burok vírusspecifikus antireceptor glükoprotein molekuláinak és a sejthártya receptorainak fúzióját követően az intakt nukleokapszidból kiszabaduló nukleoprotein komplex a sejtmagba jut. Ekkor megkezdődik az azonnali korai gének expressziója. Ezek a géntermékek a korai gének működését szabályozzák. A korai gének által kódolt proteinek a DNS replikációjában és a gazdasejt anyagcsere funkcióinak megváltoztatásában játszanak szerepet. A késői gének többnyire szerkezeti fehérjéket kódolnak és a virion felépítésében vesznek részt. A kész virion érési folyamat során jut el a fertőzött sejt membránjához, azon keresztül exocitózissal távozik, miközben hozzájut gazdaeredetű membránburkához (Pellett és mtsai, 2012).

Néhány, az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozó vírus kivételével a HV-ok általában szűk gazdaspektrummal rendelkeznek, tehát csak egy adott gazdafajt, valamint annak rendszertanilag közeli rokonfajait fertőzik meg. Ugyanakkor egy gazdafajnak több HV-a lehet és egyszerre több, egymástól különböző HV-sal is fertőződhet (Pellett és mtsai, 2012). A gazdaspecificitás feltételezhetően hosszútávú koevolúció eredményeként alakulhatott ki (McGeoch és mtsai, 1995). A burok érzékenysége miatt környezeti tényezőkkel szembeni ellenálló képességük gyenge. A HV-ok közé olyan, állatorvosi szempontból jelentős kórokozók tartoznak, mint például a sertés Aujeszky-betegsége, az egyes madárfajokban előforduló Marek-betegség, a macska és a szarvasmarha fertőző rhinotracheitisének vírusa vagy a pontyban elhullást okozó Koi-herpeszvírus. A HV-ok gyenge immunogének. A primer fertőzést feltehetően élethosszig tartó vírushordozás, úgynevezett látencia követi. Ekkor vírusszaporodás nem történik, azonban egyes gének transzkripciója végbemegy. A fertőzött egyed élete során bizonyos hatások (pl. endokrin változások, kondíció romlása, életkor előrehaladása, stressz stb.) következtében fellépő immunosuppresszió a vírus reaktiválódását okozza (Medveczky, 1998). A HV-ok szervezetbe jutását követően kialakuló primer fertőzés, valamint a sok esetben jelentkező másodlagos bakteriális fertőzések miatt állományszintű elhullás is kialakulhat. A HV-

ok fertőzött sejttel történő kölcsönhatásának következménye az óriássejt-képződéssel, szinciciumok létrejöttével vagy magzárványok kialakulásával járó erős citopatogén hatás. Néhány esetben (pl. a békák vese adenokarcinómája vagy Lucké-tumor, egyes baromfifajok körében megjelenő Marek-betegség visceralis lymphomatosis kórképe) a HV-ok tumorkeltő hatását is megfigyelték (Osterrieder, 2017).

### **3.2.2. A herpesvírusok genomszerveződése és replikációja**

A HV-ok genomja lineáris, duplaszálú DNS, amelynek G+C tartalma széles határok között (32–75%) lehet akár egy nemzetségen belül is. Genomméretük szintén tág határok között változhat (108–300 kilobázispár - kbp) (McGeoch és mtsai, 2006; Pellett és mtsai, 2012). A genomvégeken terminális ismétlődő szekvenciák találhatóak. Egyes HV-okban a genomot a vírustól függő méretben egyedi rövid és egyedi hosszú szakaszokra osztó köztes ismétlődések is előfordulnak. Az ismétlődő szekvenciák számától és elhelyezkedésétől függően a HV-ok között számos genomszerveződési forma létezik. A genomban a DNS mindkét szála kódol, az egyes gének, illetve génkazetták irányultsága változatos. Néhány gén esetében splicingot is feltételeznek, azonban nem találunk olyan komplex génátfedéseket, mint az AdV-ok genomjában (Dospoly, 2011). Az eddig megismert HV-ok genomjában a potenciálisan fehérjét kódoló ORF-ek száma 70–200 közötti lehet. Ezen kívül változó számú mikroRNS (miRNS) gén és számos ismeretlen funkciójú, valószínűsíthetően nem lefordítódó mRNS-t kódoló szakasz is előfordul. A vírus által kódolt fehérjék kisebb része szerkezeti fehérje, míg nagyobb részük a vírus működési ciklusához elengedhetetlen enzim (pl. timidin-kináz, DNS-függő DNS-polimeráz stb.) (Pellett és mtsai, 2012). A HV-ok replikációjáról szerzett ismereteink nagy részben a humán HV-okkal (pl. HSV-1) kapcsolatban végzett részletes vizsgálatokból származnak. A hüllők, a madarak és az emlősök HV-ait magába foglaló *Herpesviridae* család tagjaiban közel 40 fehérjét kódoló gén egy része erősen megőrzöttnek tekinthető. A konzervált gének kapszid proteinek, a DNS replikációt és a vírus összeszerelődését segítő fehérjéket, nukleotid modifikációs enzimeket, membrán-, valamint tegument proteinek és kisebb számban szabályozó proteinek kódolnak. Ezek a gének a genomban hat blokkba rendeződnek, amelyek sorrendje és orientációja eltérő az egyes alcsaládokban, azonban az egyes blokkokon belül a génsorrend és az irányultság kevésbé változik. A HV-ok génexpressziója kaszkád jellegű folyamat, és az átíródás időrendiségének megfelelően a genom három régióra osztható. Az egyes víruscsaládok és alcsaládok vonatkozásában nagyon eltérő azonnali korai gének a későbbi expressziót szabályozzák transzkripciós és poszttranszkripciós mechanizmusok által. Az azonnali korai gének kifejeződésétől függő korai gének kódolják a DNS replikációs komplex alkotóelemeit, valamint a sejt anyagcseréjét befolyásoló enzimek és fehérjék különböző típusait. A vírus szerkezeti fehérjéit elsődlegesen a virális DNS szintézistől függő késői gének kódolják. A HV-ok genetikai változatosságát figyelembe véve valószínűsíthető, hogy az egyes vírusok

replikációs stratégiáik részleteit tekintve is különbözhetnek egymástól (Mettenleiter és mtsai, 2009; Pellett és mtsai, 2012). A genomban megtalálható még néhány, feltételezhetően egymástól függetlenül szerzett gén is. Az ősbíró gerincesekből (halakból, békákból) származó, az *Alloherpesviridae* családba tartozó HV-ok DNS-ének szerveződése nagymértékben eltér a *Herpesviridae* család tagjaiban megismertektől, ugyanis a homológia a DNS-polimeráz és a termináz gén feltételezett ATP-áz alegységének esetében is nehezen felismerhető (McGeoch és mtsai, 2006).

### 3.2.3. A herpeszvírusok evolúciója és rendszertana

A HV-ok gazda-specifikus előfordulása alapján feltételezhető, hogy hosszú időn keresztül együtt fejlődhettek gazdaszervezeteikkel és azokhoz rendkívül jól alkalmazkodtak. Ezt az elképzelést támasztják alá a filogenetikai vizsgálatok eredményei és a HV-ok természetes környezetükben mutatkozó alacsony patogenitása, illetve a látenciára való képesség. Az emberben vagy gazdasági haszonállatokban magas kórokozó képességgel rendelkező HV-ok által kiváltott megbetegedések, mindig az emberi tevékenység által előidézett egyensúlyhiány eredményeire vezethetők vissza (Davison, 2002). A három víruscsaládot (*Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* és *Malacoherpesviridae*) magába foglaló HV-ok rendje (*Herpesvirales*) nagyon sokszínű csoport. A DNS vírusok származtatott aminosav szekvenciái alapján végzett nagyléptékű elemzés eredményei alapján a HV családok közt megfigyelhető szekvencia hasonlóság nagyon kis mértékű, a három család nem alkot monofiletikus leszármazási egységet (Wu és mtsai, 2009). Az egyetlen nagyfokú megőrzöttséggel rendelkező HV-specifikus gén a virion összeépülés során a genomnak a formálódó kapszidba történő bekerülését segítő termináz gén feltételezett ATP-áz alegysége. Megőrzöttsége kisebb mértékben ugyan, de a T4-szerű bakteriofágok közé tartozó *Myoviridae* család tagjaiban is megfigyelhető (Davison, 1992, 2002; Davison és mtsai, 2009; Pellett és mtsai, 2012). Az AlloHV-ok és gerinces gazdafajaik összehasonlító filogenetikai vizsgálata során Waltzek és mtsai (2009) arra a következtetésre jutottak, hogy az egymással szorosabb rokonságban lévő vírusok együtt fejlődhettek gerinces gazdáikkal, ugyanakkor a távolabbi rokonságban lévő vírusok esetében nem volt tapasztalható szignifikáns kodiverzifikáció. Immunológiai szempontból vizsgálva a HV–gazda kapcsolatot Stempel és mtsai (2019) is hasonló következtetésre jutottak. Véleményük szerint a HV-oknak a gazdaszervezet immunvédekezésének modulációjára való képessége a genetikai anyaguk nagymértékű kódoló kapacitása mellett a hosszútávú, szoros koevolúciós kapcsolat eredményeként alakulhatott ki. Jelenlegi ismereteink szerint a HV-ok feltételezett törzsfajlódása az AdV-októl eltérő ágon, a prokarióták farkos fágjainak (*Caudovirales*) csoportjából indulhatott ki (Baker és mtsai, 2005; Koonin és mtsai, 2015a). A HSV-1 termináz enzimének strukturális elemzése a bakteriofágok termináz, RNáz-H, integráz, DNS-polimeráz és topoizomeráz

enzimeire jellemző szerkezeti sajátosságokat tárt fel, megerősítve a két vírustaxon tagjai közötti evolúciós kapcsolat teóriáját (Sigamani és mtsai, 2013).

Mintegy 12 éve a HV-ok taxonómiai beosztása átfogó változáson ment át. Ezt megelőzően a HV-okat a *Herpesviridae* családon belül három alcsaládba (*Alpha*-, *Beta*- és *Gammaherpesvirinae*) sorolták (Roizman és mtsai, 1992). Az alcsaládokba történő beosztást biológiai, genomszerveződésbeli és leszármazástani tulajdonságok határozták meg. Az alcsaládokon belül létrehozott nemzetségekbe szerológiai tulajdonságaik, elsősorban vírusneutralizációs próbák alapján helyezték el a HV szerotípusokat. Bár morfológiai jellemzőik alapján megegyeztek az Amniota gerincesek (hüllők, madarak és emlősök) HV-aival, az ősi gerincesek közé tartozó halak (Pisces) és kétéltűek (Amphibia), valamint a puhatestűek (Mollusca) közé tartozó Csendes-óceáni osztriga (*Crassostrea gigas*) HV-ának genetikai diverzitását, genomszerveződését és törzspejlődéstani viszonyait tanulmányozva 2005-ben felmerült az igény a herpeszvírus-rendszertan felülvizsgálatára (Davison és mtsai, 2005, 2009). Ennek alapján az ICTV 2008-ban a *Herpesviridae* családot *Herpesvirales* néven rend szintű kategóriává emelte és azon belül három új családot hozott létre (Davison és mtsai, 2009). A *Herpesviridae* családba tartoznak a hüllők, a madarak és az emlősök HV-ai. Az *Alloherpesviridae* családba a halakat és kétéltűeket fertőző HV-okat sorolták be, míg a puhatestűek körében leírt egyes HV-okat a *Malacoherpesviridae* család foglalja magába. A filogenetikai távolság a jelenlegi három család között olyan nagy, hogy mindössze két közös gén (DNS-függő DNS-polimeráz és a termináz feltételezett ATP-áz alegységét kódoló szekvencia) származtatható a közös őstől (Pellett és mtsai, 2012). Mivel az általam vizsgált lesőharcsa-herpeszvírus a filogenetikai számítások eredményei alapján egyértelműen az *Alloherpesviridae* család tagjának bizonyult, ezért a továbbiakban ennek a víruscsaládnak a részletesebb bemutatásával foglalkozom.

### **3.2.4. Az *Alloherpesviridae* család részletes bemutatása**

Az *Alloherpesviridae* családot a halakból és a kétéltűekből kimutatott HV-ok besorolására alakították ki (Waltzek és mtsai, 2009; Davison, 2010). A jelenleg ismert alloHV-ok genomjának mérete a három HV család közül a legnagyobb, 134–295 kbp közötti. Genetikai diverzitásukat tekintve az alloHV-ok képviselői között sokkal nagyobb különbségek találhatók, mint a hüllők, madarak és emlősök HV-ai között. Mindössze 12–13 konzervált génjük van, amelyek feltételezhetően egy közös herpeszvírus őstől származhatnak (van Beurden és mtsai, 2010; Pellett és mtsai, 2012; Hanson és mtsai, 2016).

#### **3.2.4.1. A kétéltűek alloherpeszvírusai**

A kétéltűek közül csak a farkatlan kétéltűeket képviselő békák (*Anura*) egyes fajainak HV fertőzöttségét írták le. Ezeket a vírusokat a *Batrachovirus* nemzetségbe sorolták. Az ide tartozó



vírusokra vonatkozó első megfigyelések a múlt század első feléből származnak (Lucké, 1934, 1938). Északi leopárdbékák (*Lithobates pipiens*) között gyakori, vese mirigyhám-eredetű daganat (adenokarcinóma) kóroktanában vírusos hátteret feltételeztek. A tumor kialakulását beteg állatok szervdörzsölékének szűrletével és beteg szövet átültetésével reprodukálni lehetett (Tweedell, 1967). A vírusszaporodást kísérletes körülmények között Sauerbier és mtsai (1995) vizsgálták. A Lucké tumor herpeszvírus hivatalos neve ranid herpeszvírus 1 (RaHV-1). Kimutatták, hogy a vírus életciklusa és a tumorképződés hőmérsékletfüggő. Alacsonyabb hőmérsékleten (7°C) a vírus szaporodását és zárványok képződését figyelték meg, daganatképződés nem vagy csak igen kis mértékben jelentkezett, ugyanakkor magasabb hőmérsékleten (28°C) nem figyeltek meg zárványokat a tumorsejtekben, de azok hajlamossá váltak az áttét képzésére (Breidenbach és mtsai, 1971; McKinnell, 1973; McKinnell és Tarin, 1984). Rafferty (1963) ugyancsak adenokarcinóma tüneteit mutató északi leopárdbéka vizeletéből kimutatott egy másik vírust a RaHV-2-t, amelynek daganatképződésben játszott szerepét nem sikerült igazolni (Granoff és mtsai, 1969). A RaHV-2 esetében nem írták le a vírus járványos megjelenését vagy társult megbetegedések előfordulását, de a lárvakori fertőzésen átesett, felnőtt egyedekben erőteljes ödéma képződést figyeltek meg (Rafferty, 1967; McKinnell, 1973). A két vírus teljes genomjának szekvenálása és jellemzése csak jóval később történt meg (Davison és mtsai, 2006). Gyepi béka (*Rana temporaria*) súlyos, proliferatív bőrelváltozásával kapcsolatos kutatások eredményeként írták le a RaHV-3-at 2015-ben Svájcban (Origgi és mtsai, 2017). Az EM-os vizsgálatokat és a vírusizolálást követő molekuláris elemzések, valamint a teljes genom szekvenálása igazolták a HV jelenlétét a fertőzött állatokban. Svájcban szabadon élő barna varangyok (*Bufo bufo*) között 2014-től kezdődően minden évben jelentkező, súlyos bőrgyulladás oki háttereként írták le a Bufonid herpeszvírus 1 (BfHV-1) vírusát 2018-ban (Origgi és mtsai, 2018). Erdei békában (*Rana dalmatina*) nem jellemzett HV-okkal kapcsolatos bőrelváltozásokról számoltak be Olaszországban és Svájcban (Bennati és mtsai, 1994; Grossenbacher, 1997). Később Németországban és az Egyesült Királyságban barna ásóbékában (*Pelobates fuscus*), gyepi békában, valamint mocsári békában (*Rana arvalis*) mutatták ki HV jelenlétét (Mutschmann és Schneeweiss, 2008; Franklinos és mtsai, 2018).

#### **3.2.4.2. A halak alloherpeszvírusai**

Az első, halakban betegséget okozó HV-t, az ictalurid herpeszvírus 1-et 1968-ban izolálták (Fijan és mtsai, 1970), majd jellemezték (Wolf és Darlington, 1971) pettyes csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) tömeges elhullását követően. A dolgozat írásának időpontjáig az ICTV halakban 10 vírust sorolt be faji szinten a három nemzetség (*Cyprinivirus*, *Ictalurivirus* és *Salmonivirus*) valamelyikébe, ugyanakkor 15 hal-alloHV még nem kapott végleges besorolást. Ennek oka, hogy ezeknek a vírusoknak az izolálására tett kísérletek nem jártak sikerrel és nem rendelkezünk teljesgenom-adatokkal. Ezek a vírusok jelenlegi tudásunk szerint a sugarasúszójú

halak (Actinopterygii) osztályába sorolt porcos-vértes halak (Chondrostei) és valódi csontshalak (Teleostei) szuperrendjébe tartozó gazdafajokat fertőznek. A vízi élettér a fertőzést jól közvetítő közeg, amely különösen nagy egyedsűrűség (pl. halastavi környezet), a zsúfoltság miatti stressz következtében fellépő csökkent immunműködés, rossz tartástechnológia (pl. egyoldalú takarmányozás, bejövő állományok kihelyezés előtti karantén kötelezettségének be nem tartása stb.) mellett rendkívül gyors vírusterjedést okozhat. A vadon élő és a tógazdasági körülmények között tartott halak esetében is a vertikális fertőződés az egyik fő fenntartója a HV-ok által okozott megbetegedéseknek. A halak téli nyugalmi állapota (vermelés) általánosságban megviseli a gazdaszervezetet. Az alacsony (4°C körüli) vízhőmérsékleten nyugalmi állapotban lévő hal testhőmérséklete az alloHV-ok szaporodásához nem megfelelő. Azonban tavasszal a vízhőmérséklet emelkedése miatt reaktiválódó vírus a tél végére legyengült kondíciójú és immunrendszerű halakban jellegzetes szezonalitással (tavasz-nyár eleje) előforduló tünetek megjelenését okozza (Hanson és mtsai, 2011, 2016). Egyes halHV-fajok által előidézett fertőzések következtében állományszintű megbetegedés, illetve tömeges elhullás is előfordulhat (Haenen és mtsai, 2004; Shchelkunov és mtsai, 2009; Doszpoly és mtsai, 2015). Az egyre gyarapodó molekuláris ismereteknek és a vírusok gazdasági jelentőségének köszönhetően kutatások folynak egyes halakat fertőző alloHV-ok elleni vakciák előállítására (Boutier és mtsai, 2015a, 2017).

A halakban előforduló HV-okat az általuk okozott megbetegedések és azok lefolyása alapján négy csoportba lehet sorolni (Shchelkunov és mtsai, 2009).

Az első csoportba azok a magas virulenciájú HV-ok tartoznak, amelyek akut, egész szervezetet érintő, nagymértékű mortalitással járó megbetegedést okoznak a gazdafaj kültakarójának érintettsége nélkül. Például: a pettyes harcsából kimutatott csatornaharcsa-herpeszvírus 1 (IcHV-1) (Fijan és mtsai, 1970), a fekete törpeharcsát (*Ameiurus melas*) fertőző IcHV-2 (Alborali és mtsai, 1996) és az aranyhal (*Carassius auratus*) vérképzőszervi nekrozisát okozó ponty-herpeszvírus 2 (CyHV-2) (Jung és Miyazaki, 1995).

A második csoportba sorolhatók azok a gyengén virulens alloHV-ok, amelyek szintén a kültakaró érintettsége nélkül krónikus, szisztémás fertőzést okoznak. Ilyen például a szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*) és a királylazacban (*Oncorhynchus tshawytscha*) tüneteket okozó lazac-herpeszvírus 1 (SalHV 1) (Eaton és mtsai, 1989).

A harmadik csoportba a sorolják azokat az erős virulenciával rendelkező vírusokat, amelyek nagy mortalitással járó, de elsősorban bőrtünetekben (sejtburjánzás, nekrozis, fekélyképződés) megnyilvánuló megbetegedéseket okoznak. Ide tartozik a teljesség igénye nélkül a fehér tokot (*Acipenser transmontanus*) fertőző AciHV-1 (Hedrick és mtsai, 1991) és AciHV-2 (Watson és mtsai, 1995), a japán lazacot (*Oncorhynchus masou*) károsító SalHV-2 (Kimura és Yoshimizu, 1989), a pontyot (*Cyprinus carpio*) és a koi pontyot megbetegítő (pontyhimlő) CyHV-1 (Sano és mtsai, 1990b) és CyHV-3 (Hedrick és mtsai, 2000; Boutier és

mtsai, 2015b), a tavi pisztráng (*Salvelinus namaycush*) járványos bőrbetegségének vírusa (Bradley és mtsai, 1989; McAllister és Herman, 1989), a nagy vitorlášhal (*Pterophyllum altum*), a japán lepényhal (*Paralichthys olivaceus*) és a kékszemű vértesharcsa (*Panaque suttoni*) HV-ai (Mellergaard és Bloch, 1988; Iida és mtsai, 1989; Yanong, 1995). Hasonló tünetek alapján a CyHV-1 feltételezett előfordulását pontyon kívül leírták aranyhalban (*Carassius auratus*), bodorkában (*Rutilus rutilus*), compóban (*Tinca tinca*), dévérkeszegben (*Abramis brama*), fejes domolykóban (*Squalius cephalus*), jászkeszegben (*Leuciscus idus*), márnában (*Barbus barbus*), széles kárászban (*Carassius carassius*), szélhajtó kűszben (*Alburnus alburnus*) és vörösszárnyú keszegben (*Scardinius erythrophthalmus*) is (Dixon, 2008), azonban molekuláris vizsgálatokkal ezidáig csak a márna esetében igazolták a vírus pontytól eltérő halfajban történő megjelenését (Borzák és mtsai, 2020).

A negyedik csoport tagjai általában enyhe bőrelváltozásokat okozó, gyenge virulenciával jellemezhető vírusok. Ide tartozik pl. az amerikai süllő (*Sander vitreus*) diffúz epidermális hiperpláziáját okozó percid HV-1 (Kelly és mtsai, 1983), az európai bűzöslazac (*Osmerus eperlanus*) papillomatózisának vírusa (Anders és Möller, 1985), az atlanti lazac (*Salmo salar*) papillomatózisának HV-a (Shchelkunov és mtsai, 1992), egyes csukaféléket (*Esox lucius* és *E. masquinongy*) fertőző esocid HV-1 (Yamamoto és mtsai, 1984; Freitas és mtsai, 2016), a lesőharcsa (*Silurus glanis*) HV-a (Békési és mtsai, 1981) és az európai angolnát (*Anguilla anguilla*) és a japán angolnát (*Anguilla japonica*) fertőző AngHV-1 (Békési és mtsai, 1986; Sano és mtsai, 1990a; van Beurden és mtsai, 2010).

Dél-amerikai szardínia egyik alfajában (*Sardinops sagax neopilchardus*) írták le 1995-ben, majd 1998-ban a nagy mortalitással járó megbetegedést okozó pilchard HV-t, amely a megjelenését követően mintegy tíz évvel már enzootiássá vált az ausztrál partmenti vizekben (Hyatt és mtsai, 1997; Crockford és mtsai, 2005; Whittington és mtsai, 2008).

Japán kutatók 2015-ben nyújtottak be egy részleges (353 bp) DNS-polimeráz szekvenciát (GenBank azonosító: LC092221) a Nemzeti Biotechnológiai Információs Adatközpont (NCBI) génbankjába AngHV-2 néven, amelyet a Japán angolnából (*Anguilla japonica*) sikerült kimutatniuk. Felfedezésüket a mai napig nem publikálták, így a vírus által okozott elváltozásokról sem rendelkezünk adatokkal. (Mizutani, T., Naoi, Y., Omatsu, T. nem publikált).

Garver és mtsai (2018) sügérben (*Perca fluviatilis*) írták le a Percid HV-2 előfordulását, amely az eseteírás szerint a hámban csoportosan elhelyezkedő, egymástól jól elhatárolódó, apró, kemény fehér göbök formájában jelentkezik.

A silurid HV-1 előfordulásáról Henriquez és mtsai (2018) számoltak be üvegharcsából (*Kryptopterus bicirrhis*). A vírus 2003-ban egy thaiföldi akvakultúrában okozott jelentős elhullással járó megbetegedést. A fertőzött egyedek izomzata elszíneződött, úszásuk rendellenessé vált.

Magyar kutatók a Cyprinidae családba tartozó garda (*Pelecus cultratus*) tömeges elhullásával kapcsolatban (Doszpoly és mtsai, 2015), valamint a bodorka és a balin (*Leuciscus aspius*) pontyhimlő típusos bőrtüneteit mutató egyedeiből (Sellyei és mtsai, 2020) mutatták ki a HV fertőzöttséget. Az új vírusok a filogenetikai vizsgálatok alapján önálló leszármazási vonalaknak tekinthetők és a garda esetében CyHV-4, míg a bodorka és a balin esetében CyHV-5 megnevezéssel kerültek besorolásra.

Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a halakat fertőző alloHV-ok száma lényegesen magasabb lehet. Számos közlemény található a nemzetközi szakirodalomban olyan herpesz-szerű vírusok kimutatásáról, amelyek meglétét csak EM-os vizsgálatokkal észlelték, azonban sejttenyészetben történő izolálásuk nem járt sikerrel és molekuláris adatok sem állnak rendelkezésre (Hanson és mtsai, 2011, 2016).

Újabban az alloHV-ok közé tartozónak vélik a tízlábú rákok (Decapoda) rendjébe sorolt kék királyrákokból (*Paralithodes platypus*) kimutatott herpesz-szerű vírust (Ryazanova és mtsai, 2015). Az eredmény azért érdekes, mert ez az első, gerinctelen fajban leírt alloHV fertőzés.

### **3.3. CRESS DNS vírusok**

#### **3.3.1. A CRESS DNS vírusok általános jellemzése**

A CRESS DNS vírusok csoportja a jelenleg ismert szekvenciaadatok alapján a földi virom egyik meghatározó komponensének számít, rendkívüli diverzitással rendelkeznek és képviselői a sejtes szerveződés mindhárom (Archaea, Bacteria, Eucaryota) doménjébe tartozó gazdákat fertőznek (Krupovic, 2013; Kazlauskas és mtsai, 2019). Egy gazdafajon belül is nagy változatossággal jellemezhetők (Blinkova és mtsai, 2010; Liu és mtsai, 2020). A genom méret és -szerveződés az egyes víruscsaládok között jelentős eltéréseket mutat (Rosario és mtsai, 2012; Krupovic és mtsai, 2020). Kisméretű (1–10 kb) genommal rendelkeznek, amely családtól függően 2–8 ORF-et tartalmaz. A vírusgenom sokszorozódása gördülő-kör típusú replikációval (RCR) történik, amelynek iniciációjában a HUH endonukleáz szuperfamilia tagja, a vírus által kódolt replikációs protein (Rep) és a genomban található konzervált nonanukleotid régió játszik kitüntetett szerepet (Chandler és mtsai, 2013; Rosario és mtsai, 2017). A replikációs fehérje N-terminális részén található a HUH domén, amely három konzervált motívumból áll. A C-terminális régióban az 3-as szuperfamilia tagja, a helikázokra jellemző négy domén (Walker A, B, C és az úgynevezett arginin ujj) aminosav szekvenciái helyezkednek el (Kazlauskas és mtsai, 2019). A víruscsoport képviselőinek relatív abundanciája eukariótákban számottevően nagyobb, mint prokariótákban (Koonin és mtsai, 2015a). Az ide tartozó vírusok között humán, állatorvosi és növényvédelmi szempontból fontos kórokozók is találhatóak. A minta típusának (víz, szennyvíz, talaj, bélsár stb.) és a vizsgálati módszereknek (metagenomikai vizsgálatok és széles spektrumú konszenzus PCR) köszönhetően legtöbb képviselőjüknek nem tisztázott a

gazdaeredete. Ezért sem a földi bioszférában játszott szerepükről sem pedig esetleges kórokozó képességükről nem rendelkezünk információval (Krabberger és mtsai, 2015; Reavy és mtsai, 2015; Rosario és mtsai, 2017; Zhao és mtsai, 2019). A CRESS DNS vírusokra jellemző a magas nukleotid szubsztitúciós ráta és a rekombinációs hajlam, valamint a horizontális géntranszfer (Liu és mtsai, 2011; Martin és mtsai, 2011; Rosario és mtsai, 2012; Kazlauskas és mtsai, 2019). Ezek a tulajdonságok a CRESS DNS vírusok gyors evolúcióját okozzák, hozzájárulnak a terjedésükhöz és a környezeti adaptációhoz, valamint a kórokozó képesség kialakulásában és annak változásában is szerepet játszhatnak (Lefeuvre és mtsai, 2009; Rosario és mtsai, 2012).

### 3.3.2. A CRESS DNS vírusok evolúciója és rendszertana

Evolúciójukat tekintve a modern molekuláris kutatási eredmények alapján az egyszálú DNS (ssDNS) vírusokra feltételezhetően a polifiletikus leszármazás jellemző (Krupovic, 2013). A Rep fehérjék összehasonlító molekuláris és filogenetikai vizsgálatával megállapították, hogy a CRESS DNS vírusok replikációs mechanizmusának kialakulása három egymástól független alkalommal történhetett. Ezek a feltételezett események eukariótákat fertőző, pozitív, egyszálú RNS (+ssRNS) vírusok kapszid kódoló génjeinek baktériumok SF3 helikáz doménnel rendelkező, RCR mechanizmussal szaporodó ősi plazmidjai által, három különböző időpontban történő átvételét jelenthették. Az ilyen plazmidok és ssRNS vírusok kapszid génjeinek cDNS kópiái között bekövetkező rekombinációs események eredményezhették a CRESS DNS vírusok és jelenleg még be nem sorolt víruskládok kialakulását, diverzifikációját és radiációját a különböző gazdafajokban (Koonin és mtsai, 2015a; Kazlauskas és mtsai, 2019). A CRESS DNS vírusok evolúciójának érdekessége, hogy a legújabb molekuláris biológiai vizsgálatok szerint feltehetően egy kládjuk (klád 2) kiindulópontja lehetett humán- és állatorvosi szempontból jelentős kórokozók kialakulásának. A ssDNS genommal rendelkező *Parvoviridae* család tagjai vélhetően közvetlenül az ehhez a kládhoz tartozó CRESS DNS vírusokból alakultak ki. Ugyancsak CRESS DNS vírus ősöket feltételeznek a cirkuláris dsDNS genommal rendelkező polyomavírusok és papillomavírusok esetében is, amelyek vélhetően parvovírusok közvetítésével alakulhattak ki (Kazlauskas és mtsai, 2019).

A modern környezeti mikrobiológiai kutatásoknak és metagenomikai módszereknek köszönhetően az utóbbi évtizedben jelentős mértékben nőtt a CRESS DNS vírusokkal kapcsolatban megismert szekvenciaadat-mennyiség (Rosario és mtsai, 2012; Labonté és Suttle, 2013; Zhao és mtsai, 2019; Tisza és mtsai, 2020). Ez a változás magával hozta a vírusrendszertani revízió szükségességét, mivel az addig alkalmazott rendszertani kategóriák alapján már nem lehetett a valós leszármazást hűen tükröző taxonómiai besorolást elvégezni (Rosario és mtsai, 2017; Simmonds és mtsai, 2017; Krupovic és mtsai, 2020). A rendszerezés alapját az egyes vírusok genomszerveződése (feltételezett ORF-ek száma és orientációja,

intergénikus régiók), genetikai jellemzői (Rep konzervált motívumok, nonanukleotid szekvencia és szárhurok) és filogenetikai kapcsolataik képezik. A CRESS DNS vírus csoport kialakítása 2012-re tehető (Rosario és mtsai, 2012). A már folyamatosan növekvő számú, rendszertanba foglalt és a még be nem sorolt CRESS DNS vírusok számára az ICTV 2020-ban létrehozta a *Cressdnaviricota* törzset, azon belül pedig az *Arfiviricetes* és *Repensiviricetes* osztályokat. A két osztály 13 jól elkülönülő csoportot tartalmaz, amelyek közül hét kapott család szintű besorolást, míg a rendszerbe még nem foglalt vírusok számára további hat csoportot (CRESSV1–6) hoztak létre. A mai tudásunk szerint a *Nanoviridae* és *Geminiviridae* családok tagjai növényeket, a *Bacilladnaviridae* család tagjai algákat, a *Genomoviridae* család képviselői gombákat míg a *Circoviridae*, *Smacoviridae* és *Redondoviridae* család tagjai állatokat, illetve embert fertőznek (Delwart és Li, 2012; Varsani és Krupovic, 2018; Abbas és mtsai, 2019; Zhao és mtsai, 2019).

### 3.3.3. CRESS DNS vírusok ősbibb gerincesekben

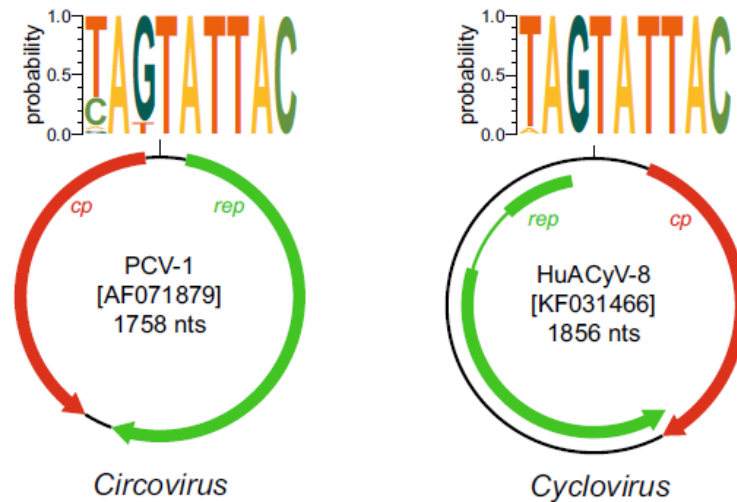
Paleovirologiai vizsgálatok alapján elmondható, hogy a CRESS DNS vírusok halakban, kétélűekben és hüllőkben már több tízmillió éve jelen lehettek. A feltételezett hosszútávú evolúciós múltra utal, hogy ősbibb gerinces gazdafajok genetikai anyagának vizsgálata során kimutatták CV-ok múltbeli, lehetséges genomintegrációját is (Belyi és mtsai, 2010; Liu és mtsai, 2011; Horie és Tomonaga, 2011; Fehér és mtsai, 2013; Gilbert és mtsai, 2014; Dennis és mtsai, 2018, 2019). A horizontális géntranszfer a gazdafaj fogékony sejtjének genomja felé feltételezi a fertőzőképes virionok meglétét. Intakt, teljes vírusgenom első kimutatása halakból történt és magyar kutatók nevéhez fűződik (Lőrincz és mtsai, 2011, 2012).

Tekintettel a vizsgálataim során kapott eredményekre, a továbbiakban a *Circoviridae* család bemutatására fókuszálok.

### 3.3.4. A *Circoviridae* család bemutatása

A *Circoviridae* családot az 1990-es években hozták létre olyan, állatokat fertőző, cirkuláris ssDNS genommal rendelkező vírusok számára, amelyek jelentős genetikai és filogenetikai eltérést mutattak az akkor ismert egyéb cirkuláris (*Geminiviridae*) és lineáris (*Parvoviridae*) örökítőanyagú ssDNS vírusoktól. Az ide tartozó sertés és madár vírusokat a *Circovirus* és a *Gyrovirus* nemzetségekbe sorolták be. A CRESS DNS vírusok diverzitásnövekedésével járó taxonómiai revízió során 2016-ban a *Circoviridae* család összetétele is változott. A *Gyrovirus* nemzetséget genomszerveződésbeli sajátosságainak köszönhetően átsorolták az *Anelloviridae* családba, ugyanakkor a *Circoviridae* családban létrehozták a *Cyclovirus* nemzetséget. Jelenleg a víruscsalád két nemzetséget (*Circovirus* és a *Cyclovirus*) foglal magába. A genetikai és genomszerveződésbeli hasonlóságok ellenére a Rep és Cp proteinek alapján elvégzett filogenetikai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a két nemzetség egymástól jól elkülönülő leszármazási vonalat alkot (Rosario és mtsai, 2017). A

*Circovirus* és *Cyclovirus* nemzetségbe tartozó vírusokra jellemző genomszerveződést a 4. ábra mutatja be.



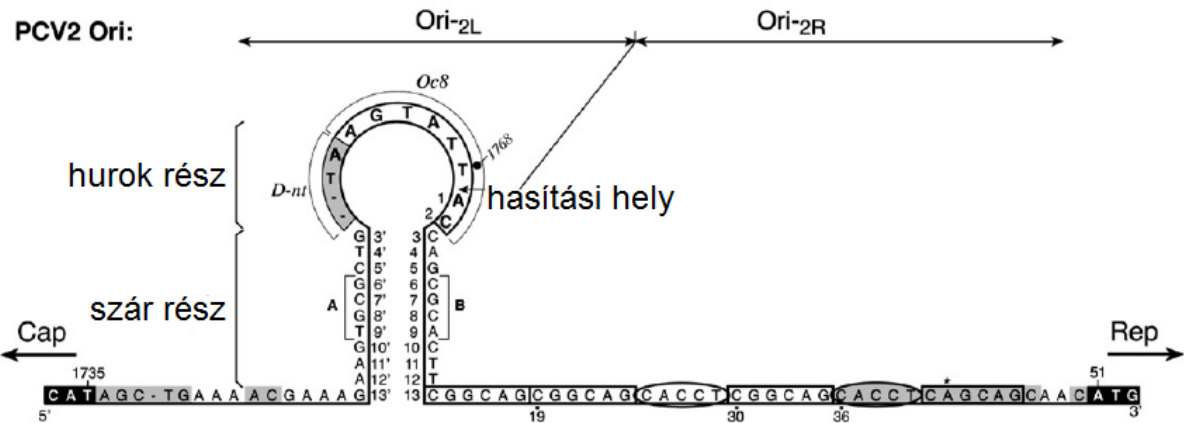
**4. ábra:** A *Circoviridae* család két nemzetségének jellemző genomszerveződése és a nonanukleotid szekvenciák nt sorrendje sematikusan ábrázolva (Rosario és mtsai, 2017).

A CV-ok evolúciós eredetével kapcsolatban több lehetséges elmélet ismert. A Rep-kódoló gének szupercsaládja (HUH endonukleáz szupercsalád) összehasonlító elemzése alapján egyes szerzők a CV-ok és a nanovírusok közös őseinek a növényeket fertőző geminivírusokat tartják (Mankertz és mtsai, 1997; Meehan és mtsai, 1997; Londoño és mtsai, 2010; Rosario és mtsai, 2012). Gibbs és Weiller, (1999) véleménye szerint első lépésként egy nanovírus gazdaváltás útján képessé vált növényevő gerinces fertőzésére, majd ezt követően retrotranszpozabilis elemek vagy retrovírus segítségével rekombinálódott egy picorna-szerű vírussal (feltételezhetően calicivírussal). A ssDNS vírusok Rep homológjait eubaktériumok és algák plazmidjaiban is leírták, ami a köztük lévő evolúciós kapcsolatot feltételezi (Oshima és mtsai, 2001; Gibbs és mtsai, 2006; Liu és mtsai, 2011). Az erősen konzervált Rep és az RCR megléte kézenfekvő bizonyíték a ssDNS vírusok és ssDNS molekulák közös őstől való leszármazására (Faurez és mtsai, 2009, Martin és mtsai, 2011). Gerincesek genomanalízise során felfedezett, a gazda DNS-be integrálódott ősi ssDNS vírusszekvenciák elemzése arra utal, hogy a *Circoviridae* család több mint, 40–50 millió éve létezhet. Más szerzők ugyancsak EVE vizsgálata alapján a gerincesekkel való 100 millió éves koevolúciót feltételeznek (Belyi és mtsai, 2010; Delwart és Li, 2012; Katzourakis és Gifford, 2010). Erre az időszakra - a kréta középső szakaszától a késő eocén korszakig - a főbb gerinces csoportok már kialakultak (Ravi és Venkatesh 2008). Mások a madár és emlős CV-ok életkorát csupán 500 évre becsülik, megkérdőjelezve ezzel a gazdával való hosszú távú koevolúciót (Firth és mtsai, 2009). Egyes szerzők véleménye szerint a különböző gazdafajokban szaporodó számos CV és CyV között fennálló szoros filogenetikai rokonság a gazdafajok közötti átvitel jele lehet (Gibbs és mtsai, 2006; Li és mtsai, 2011; Delwart és Li, 2012).

### 3.3.4.1. A *Circovirus* nemzetség

A CV-ok 1974-ben történt első leírása (Tischer és mtsai, 1974) és az első felismert CV által okozott betegség, nevezetesen a papagájok csőr- és tollbetegsége régóta ismert (Pass és Perry, 1984). A CV-ok sokfélesége, hasonlóan más CRESS DNS vírusokéhoz csak az utóbbi közel húsz évben kezdett a tudomány számára ismertté válni. A molekuláris biológiai módszerek folyamatos fejlesztése számos új cirko- és cirko-hoz hasonló vírus felfedezését tette lehetővé az elmúlt néhány évben (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2017). A CV-ok virionja kicsi (12–26,5 nm), gazdasejt eredetű burokkal nem rendelkezik. A környezeti hatásokkal szembeni ellenállóképessége jelentős mértékű. Az ikozaéder szimmetriájú kapszidban elhelyezkedő genom körülbelül 1,8–2,1 kb méretű, kör alakú, egyszálú DNS. A genomszerveződés általában ambiszensz, és tartalmaz legalább két gént (*rep* – replikációs és *cp* – kapszid). A *rep* a szensz (genomi vagy Rep kódoló) szálon található és a replikációs fehérjét (Rep), míg a replikatív intermedier forma antiszensz (komplementer) szálán elhelyezkedő *cp* a kapszid proteint (Cp) kódolja. A két géntermék közül a Rep a jobban megőrzött, rajta az RC (rolling circle) replikációban szerepet játszó aminosavszekvencia-motívumok jól felismerhetők. Ezzel szemben a kapszidfehérje sokkal változatosabb, csak az N-terminális régióban található, bázikus aminosavban (arginin) gazdag régió jellemzi, amely karakteréből adódóan feltételezhetően DNS-kötő aktivitással rendelkezik (Niagro és mtsai, 1998; Rosario és mtsai, 2017). A vírusnukleinsav szerkezetéből következően a két kódoló régió között két intergénikus régió található. A genomi szálon, a gének végei közötti hosszabb szakaszon helyezkedik el egy úgynevezett szárhurok struktúra a konzervatív nonanukleotid régióval. Ez utóbbi 7. és 8. nukleotidja között a Rep által ejtett bemetszéssel kezdődik a vírus replikációja, ezért ennek a régióknak a neve replikációs origó (*ori*). A vírusreplikáció a fertőzött sejt magjában történik egy duplaszálú DNS replikatív intermedier formán keresztül. A folyamatot, amelynek az iniciációjában a replikációs origót magába foglaló konzervatív nonanukleotid szekvenciának – (T/n)A(G/t)TATTAC – van jelentősége feltehetően gazdaeredetű enzimek katalizálják (Steinfeldt és mtsai, 2006; Biagini és mtsai, 2012). A sertés cirkovírusokkal végzett vizsgálatok alapján a replikáció befejezésében lényeges szerepe van szárhurok szerkezetnek (Cheung, 2007). A szárhurok felépítését az 5. ábra szemlélteti. A vírusgenom korlátozott kódoló kapacitása miatt a CV-ok replikációjához S fázisban lévő gazdasejtre van szükség (Todd, és mtsai, 2001).





**5. ábra:** A *Circoviridae* család replikációs origójának és a szárhurok szekvencia felépítésének bemutatása a sertés cirkovírus 2 homológ régiójának sematikus ábráján (Cheung, 2007 alapján módosítva).

A *Circovirus* nemzetség tagjait világszerte különböző állatfajok, főként gerincesek képviselőiből mutatták ki, de kórokozó szerepük az esetek többségében nem tisztázott (Delwart és Li, 2012). A mai napig csak a madarak CV-ai és a sertés cirkovírus 2-es típusa (PCV-2) köthetők egyértelműen specifikus betegségekhez (Ellis és mtsai, 1998; Woods és Latimer, 2000; Dán és mtsai, 2003; Cságola és mtsai, 2006). Feltételezik, hogy a CV-ok szerepe ezekben az állatbetegségekben is elsősorban immunszuppresszív hatásuknak tulajdonítható (Todd, 2000; Todd és mtsai, 2001; Faurez és mtsai, 2009). A különböző metagenomikai megközelítések és a széles körben alkalmazott PCR-szűrések CV és CV-szerű szekvenciák felfedezéséhez vezettek főleg környezeti mintákban és szennyvízben (Blinkova és mtsai, 2009; Rosario és mtsai, 2009, 2017), de gerinctelenektől származó mintákból (tengeri csillag, szúnyog, kullancs) is mutattak ki CV-szerű szekvenciákat (Fahsbender és mtsai, 2015; Sadeghi és mtsai, 2018; Liu és Liu nem publikált - GenBank azonosító: KX987146).

### 3.3.4.2. A *Cyclovirus* nemzetség

A nemzetségbe tartozó vírusokat először 2009/2010-ben írtak le főemlősöktől (csimpánz és ember) származó ürülékminták és emberi fogyasztásra szánt, különböző eredetű (emlős és baromfi) húsok metagenomikai és széles spektrumú konszenzus PCR-rel történő vizsgálatának eredményeként (Victoria és mtsai, 2009; Li és mtsai, 2010). Gazdaspektrumuk és diverzitásuk a CV-okhoz hasonlóan széles, azonban a CV-okhoz hasonlítva eddig több gerinctelen fajban (erdei hangya, szitakötőfajok, erdei csótány, pókfajok, méh, légy, bolha) és kevesebb madárfajban írták le a CyV-ok jelenlétét (Rosario és mtsai, 2017, 2018; Zhao és mtsai, 2019). Genomszerveződésük néhány alapvető különbséget leszámítva nagyban hasonlít a CV-okéhoz, azonban a két csoport között fennálló genomialis és filogenetikai eltérések indokolták a külön nemzetség létrehozását (Delwart és Li, 2012; Rosario és mtsai, 2017). A CyV-ok genomja kisebb, mindössze 1,7–1,9 kb méretű. A két fő ORF közül a kapszidfehérjét kódoló *cp* található

a genomi szálon, míg a replikációs fehérjét kódoló *rep* a replikatív intermedier dsDNS komplementer szálán helyezkedik el. A feltételezett replikációs origó hasonlóan a CV-okhoz a szárhurok struktúra csúcsán található nonamer szekvenciánál helyezkedik el, de annál konzervatívabb (TAGTATTAC). A Rep és Cp kódoló régiók 5' végei között elhelyezkedő intergénikus régió CyV-ok esetében is megtalálható, viszont a 3' végek közötti rész igen rövid vagy hiányzik (Rosario és mtsai, 2012). A genomszerveződésbeli különbségek mellett egyes CyV genomokban található ORF-ekben intronokat azonosítottak, ami splicingra utal. CV-okban hasonló jelenséget eddig nem figyeltek meg (Rosario és mtsai, 2017).

#### 4. CÉLOK

- Ősibb gerincesek mintáinak PCR-es szűrése a három víruscsalád (*Adenoviridae*, *Alloherpesviridae* és *Circoviridae*) tagjainak kimutatására.
- A kimutatott új vírusokból a teljes genom, vagy a lehetőségek szerint minél nagyobb genomszakaszok nukleotid sorrendjének meghatározása.
- Az újonnan nyert szekvenciák elemzése, a vírusok filogenetikai vizsgálata, az új vírusok rendszertani helyének tisztázása.
- A vírusok és a gazdafajok feltételezett koevolúciójának tanulmányozása.

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. A vizsgálati minták eredete

#### 5.1.1. Teknős-adenovírusok

Összesen 23 teknősfaj 148 egyedéből származó mintákat használtam. A minták saját gyűjtésből vagy együttműködőink (Fővárosi Állat- és Növénykert, Oázis Kertészet, ELTE Fűvészkert, budapesti kisállatkereskedések) által kerültek a laboratóriumunkba. A DNS kivonáshoz használt mintáim főként élő állatokból vett kloakatamponok voltak, de kisebb számban elhullott állatok belső szerveit (máj, vese, tüdő, gyomor, bél) is feldolgoztam. A minták fajonkénti megoszlását az 1. táblázat szemlélteti.

**1. táblázat:** A teknősök adenovírus szűrővizsgálata során alkalmazott minták fajonkénti megoszlása

fajnév	latin név	család	vizsgált egyedek száma
csíkos iszapteknős	<i>Kinosternon bauri</i>	Kinosternidae	3
díszes ékszerteknős	<i>Chrysemys picta</i>	Emydidae	2
ékszerteknős (sárgafülű)*	<i>Trachemys scripta scripta</i>	Emydidae	29
ékszerteknős (vörösfülű)*	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Emydidae	47
floridai lágyhéjúteknős	<i>Apalone ferox</i>	Trionychidae	1
görög teknős	<i>Testudo hermanni</i>	Testudinidae	7
kirgiz teknős	<i>Testudo horsfieldii</i>	Testudinidae	2
kis pézsmateknős	<i>Sternotherus minor</i>	Kinosternidae	3
kínai lágyhéjú teknős	<i>Pelodiscus sinensis</i>	Trionychidae	1
közönséges kígyónyakúteknős	<i>Chelodina longicollis</i>	Chelidae	4
közönséges zsanérteknős	<i>Kinixys belliana</i>	Testudinidae	11
leopárdteknős	<i>Stigmochelys pardalis</i>	Testudinidae	1
mocsári teknős	<i>Emys orbicularis</i>	Emydidae	5
mór teknős	<i>Testudo graeca</i>	Testudinidae	3
nagyfejű teknős	<i>Platysternon megacephalum</i>	Platysternidae	2
pennsylvaniai iszapteknős	<i>Kinosternon subrubrum</i>	Kinosternidae	2
sarkantyús teknős	<i>Centrochelys sulcata</i>	Testudinidae	1
sárga iszapteknős	<i>Kinosternon flavescens</i>	Kinosternidae	1
sárgafejű teknős	<i>Indotestudo elongata</i>	Testudinidae	1
sárgafoltos folyamteknős	<i>Podocnemis unifilis</i>	Podocnemididae	2
szegélyes teknős	<i>Testudo marginata</i>	Testudinidae	2
szenes teknős	<i>Chelonoidis carbonarius</i>	Testudinidae	4
travancore-i teknős	<i>Indotestudo travancorica</i>	Testudinidae	1
vöröshasú huszártknős	<i>Emydura subglobosa</i>	Chelidae	13

A \* a *Trachemys scripta* faj két alfaját jelöli.

#### 5.1.2. Lesőharcsa-herpeszvírus

Egy hazai tógazdaságból 2015 őszén intézetünkbe szállított és proliferatív, himlőszerű bőrelváltozásokat mutató, kétnyaras lesőharcsa bőrmintájának molekuláris biológiai vizsgálatát végeztem el. Az állat boncolását és a mintavételeket Dr. Eszterbauer Edit (Halparazitológia témacsoport) végezte. Az eutanáziát követő boncolás során az egész testre kiterjedő himlőszerű, göbös bőrelváltozások voltak megfigyelhetők. A bőrfelszínből kiemelkedő, halvány rózsaszín vagy opálosan fehér, kerek, gyakran pontszerű bevérzéseket tartalmazó képletek a

bőrrel nem voltak leválaszthatóak. A később elvégzett szövettani vizsgálatok az érintett területeken a hámszövet hiperpláziáját (szöveti burjánzását) mutatták.

### 5.1.3. Ősibb gerincesek CRESS DNS vírusai

A halak vizsgálatához hazai vizeinkből 40 halfaj 407 egyedétől gyűjtöttem vizsgálati mintát. A halaktól származó belsőszervminták nagy része saját, természetes vízi gyűjtéseim eredményeként kerültek laboratóriumunkba, ahol a feltáró boncolást követően a belső szerveket (kopoltyú, vese, máj, bél, szív, esetlegesen kóros elváltozásra utaló hámképlet) egyedenként vagy több egyedről együtt (poolozott formában) gyűjtöttem össze. A kétéltű- (15 faj, 52 egyed) és hüllőminták (29 faj, 107 egyed) az általam történő gyűjtések mellett kisállat-kereskedésekből, együttműködő állatorvosoktól, valamint a Fővárosi Állat- és Növénykertből és annak karanténállomásáról származó hullák belső szervei (máj, vese, lép, bél, gyomor, tüdő, szív, fiziológiástól eltérő egyéb elváltozások) és hüllők esetében élő egyedek kloakatumpon-mintái voltak. A minták fajonkénti megoszlását az 2. táblázat mutatja be.

**2. táblázat:** Az ősibb gerincesek CRESS DNS vírusainak szűrővizsgálata során alkalmazott minták fajonkénti megoszlása

fajnév	latin név	család	vizsgált egyedek száma
<b>HALAK</b>			
amur	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Cyprinidae	6
angolna	<i>Anguilla anguilla</i>	Anguillidae	1
balin	<i>Aspius aspius</i>	Cyprinidae	3
pettyes busa	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Cyprinidae	6
bagolykeszeg	<i>Abramis sapa</i>	Cyprinidae	4
bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>	Cyprinidae	18
compó	<i>Tinca tinca</i>	Cyprinidae	1
csuka	<i>Esox lucius</i>	Esocidae	3
csupasztrókú géb	<i>Neogobius gymnotrachelus</i>	Gobiidae	1
dévérkeszeg	<i>Abramis brama</i>	Cyprinidae	19
dunai ingola	<i>Eudontomyzon mariae</i>	Petromyzontidae	1
ezüstkárász	<i>Carassius gibelio</i>	Cyprinidae	13
fejes domolykó	<i>Squalius cephalus</i>	Cyprinidae	8
fekete törpeharcsa	<i>Ameiurus melas</i>	Ictaluridae	10
feketeszájú géb	<i>Neogobius melanostomus</i>	Gobiidae	17
fenékjáró küllő	<i>Gobio gobio</i>	Cyprinidae	1
folyami géb	<i>Neogobius fluviatilis</i>	Gobiidae	1
garda	<i>Pelecus cultratus</i>	Cyprinidae	5
jászkeszeg	<i>Leuciscus idus</i>	Cyprinidae	2
karikakeszeg	<i>Abramis bjoerkna</i>	Cyprinidae	15
kecsege	<i>Acipenser ruthenus</i>	Acipenseridae	1
kősüllő	<i>Sander volgensis</i>	Percidae	2
laposkeszeg	<i>Abramis ballerus</i>	Cyprinidae	2
lesőharcsa	<i>Silurus glanis</i>	Siluridae	2
lénai tok	<i>Acipenser baeri</i>	Acipenseridae	12
márna	<i>Barbus barbus</i>	Cyprinidae	1
menyhal	<i>Lota lota</i>	Gadidae	13
naphal	<i>Lepomis gibbosus</i>	Centrarchidae	14
paduc	<i>Chondrostoma nasus</i>	Cyprinidae	1
ponty	<i>Cyprinus carpio</i>	Cyprinidae	9
razbóra	<i>Pseudorasbora parva</i>	Cyprinidae	27
sügér	<i>Perca fluviatilis</i>	Percidae	4
süllő	<i>Sander lucioperca</i>	Percidae	1

<b>fajnév</b>	<b>latin név</b>	<b>család</b>	<b>vizsgált egyedek száma</b>
szélhajtó kúsz	<i>Alburnus alburnus</i>	Cyprinidae	153
szilvaorrú keszeg	<i>Vimba vimba</i>	Cyprinidae	1
tarka géb	<i>Proterorhinus marmoratus</i>	Gobiidae	2
törpeharcsa	<i>Ameiurus nebulosus</i>	Ictaluridae	14
vágódurbincs	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	Percidae	1
vágótok	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Acipenseridae	10
vörösszárnyú keszeg	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Cyprinidae	2
<b>KÉTÉLTŰEK</b>			
amazóniai tejbéka	<i>Trachycephalus resinifictrix</i>	Hylidae	2
amerikai zöld fabéka	<i>Hyla cinerea</i>	Hylidae	2
aranyos nyílméregbéka	<i>Dendrobates auratus</i>	Dendrobatidae	7
ausztrál zöld fabéka	<i>Litoria caerulea</i>	Hylidae	3
barna varangy	<i>Bufo bufo</i>	Bufonidae	5
bordás götte	<i>Pleurodeles waltl</i>	Salamandridae	5
díszes szarvasbéka	<i>Ceratophrys ornata</i>	Ceratophryidae	3
festőbéka	<i>Dendrobates tinctorius</i>	Dendrobatidae	5
foltos szalamandra	<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandridae	1
kecskébéka	<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	Ranidae	3
paradicsombéka	<i>Dyscophus guineti</i>	Microhylidae	2
sávós nyílméregbéka	<i>Phyllobates vittatus</i>	Dendrobatidae	5
törpe karmosbéka	<i>Hymenochirus curtipes</i>	Pipidae	3
vörösszemű levelibéka	<i>Agalychnis callidryas</i>	Hylidae	3
zöld varangy	<i>Bufotes viridis</i>	Bufonidae	3
<b>HÜLLŐK</b>			
barna anolisz	<i>Norops sagrei</i>	Dactyloidae	4
ékszerteknős (sárgafülű)*	<i>Trachemys scripta scripta</i>	Emydidae	14
ékszerteknős (vörösfülű)*	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Emydidae	17
floridai lágyhéjúteknős	<i>Apalone ferox</i>	Trionychidae	1
gabonasikló	<i>Pantherophis guttatus</i>	Colubridae	3
görög teknős	<i>Testudo hermanni</i>	Testudinidae	7
kis pénzmateknős	<i>Sternotherus minor</i>	Kinosternidae	3
kockás sikló	<i>Natrix tessellata</i>	Colubridae	8
közönséges kígyónyakúteknős	<i>Chelodina longicollis</i>	Chelidae	2
közönséges lábatlangyík	<i>Anguis fragilis</i>	Anguillidae	1
közönséges óriáskígyó	<i>Boa constrictor</i>	Boidae	1
közönséges zsanériteknős	<i>Kinixys belliana</i>	Testudinidae	11
leopárdgekkó	<i>Eublepharis macularius</i>	Eublepharidae	2
lovaganolisz	<i>Deiroptyx equestris</i>	Dactyloidae	1
mocsári teknős	<i>Emys orbicularis</i>	Emydidae	3
mór teknős	<i>Testudo graeca</i>	Testudinidae	1
nagyfejű teknős	<i>Platysternon megacephalum</i>	Platysternidae	2
pápaszemes kajmán	<i>Caiman crocodylus</i>	Alligatoridae	1
pennsylvaniai iszapteknős	<i>Kinosternon subrubrum</i>	Kinosternidae	2
rövidfarkú törpekaméleon	<i>Rieppeleon brevicaudatus</i>	Chamaeleonidae	2
sárgafejű teknős	<i>Indotestudo elongata</i>	Testudinidae	1
szakállas agáma	<i>Pogona vitticeps</i>	Agamidae	4
szegélyes teknős	<i>Testudo marginata</i>	Testudinidae	1
szenes teknős	<i>Chelonoidis carbonarius</i>	Testudinidae	2
tanimbar piton	<i>Simalia nauta</i>	Pythonidae	1
travancore-i teknős	<i>Indotestudo travancorica</i>	Testudinidae	1
vízisikló	<i>Natrix natrix</i>	Colubridae	3
vöröshasú huszárteknős	<i>Emydura subglobosa</i>	Chelidae	5
zöld anolisz	<i>Anolis carolinensis</i>	Dactyloidae	2
zöld leguán	<i>Iguana iguana</i>	Iguanidae	1

A \* a *Trachemys scripta* faj két alfaját jelöli.

## **5.2. DNS kivonás**

### **5.2.1. DNS kivonás szervmintákból**

A szervmintákból 25–50 mg-ot 1ml 1×TE pufferben (Trisz-EDTA, összetétele: 10 mM Trisz-HCl, 1 mM EDTA; pH=8) Tissue Lyser LT (Qiagen) készülék segítségével 20 percen át, 50 Hz-en történő rázatással homogenizáltam, 4 mm átmérőjű fém csapágygolyó használatával. Az így nyert szervszuszpenziót 5417R (Eppendorf) típusú asztali centrifugában 13000 fordulatszámon (rpm) fordulatszámon, 1 percig centrifugáltam. A szerv homogenizátumokból 100 µl-t egy éjszakán át 55°C-on, 4 µl proteináz K enzimmel (20 mg/ml) és 10 µl 10%-os szarkozil oldattal kezeltem, majd 300 µl guanidin-hidroklorid oldatot (8 mólos – M) és 20 µl ammónium-acetátot (7,5 M) adtam az elegyhez és egy órán át, 20 percenként átforgatva szobahőmérsékleten inkubáltam. A DNS kicsapást 1 ml –20°C-os abszolút etil-alkohollal végeztem, majd a csövek tartalmát forgatással óvatosan megkevertem és 13000 rpm-en, 15 percig centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően a keletkezett csapadékot 1 ml -20°C-os 70%-os etil-alkohollal mostam, majd ismét 13000 rpm-en, 8 percen át centrifugáltam. A felülúszó leöntése után a mintákat vákuum centrifugában beszárítottam. A tisztított DNS-t 50 µl ultradesztillált vízben vagy elúciós pufferben (5 mM TrisHCl, pH=8,5) feloldottam és a további felhasználásig –20°C-on tároltam.

### **5.2.2. DNS kivonás bélsárból és kloakatampon mintákból**

A bélsár mintákból és azokból a kloakatamponokból, amelyek segítségével sikerült elegendő mennyiségű ürüléket nyerni az E.Z.N.A. Stool® DNA Kit (Omega Bio-Tek) használatával vontam ki nukleinsavat a gyártó utasításait követve. A bélsárral kevésbé szennyezett kloakatamponoknál az 5.2.1. fejezetben leírt szervminták esetében alkalmazandó DNS-kivonási protokollt követtem. A tamponokat 1×TE pufferben 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam, közben 10 percenként röviden vortexeltem. Ezután a tamponhoz nyomott pipetahegygel 100 µl folyadékot új csőbe tettem és ezt használtam a DNS kivonásához.

### **5.2.3. DNS dúsítás REPLI-g® Mini Kit-tel**

Az ékszerteknős-AdV esetében a szervmintákból kivont, korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló DNS megőrzésére REPLI-g® Mini Kit-tel (Qiagen) izotermális, nem specifikus DNS dúsítási eljárást alkalmaztam a gyártó utasításait követve. Erre a lépésre azért volt szükség, mert a szervminták PCR vizsgálatainak időpontjában az állat teteme már nem áll rendelkezésre. A D1 puffer előállításához a készletben található nukleázmentes, ultratiszta vízből 32 µl-t elegyítettem 9 µl DLB pufferrel, míg az N1 puffer 68 µl ultratiszta víz és 12 µl Stop oldat összemérésével készült. A reakció indításaként 5 µl D1 puffert pipettáztam 5 µl tisztított vírusnukleinsav oldathoz, és az elegyet kíméletesen vortexeltem, majd 3 percig

szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt követően 10 µl N1 puffert mértem az előbb elkészített oldathoz, amit ezután ismét óvatosan vortexeltem. Az így előállított templát-DNS tartalmú oldatból 10 µl-t pipettáztam 30 µl reagens oldathoz, amelyet előzőleg 29 µl REPLI-g Mini Reaction Buffer és 1 µl REPLI-g Mini DNA Polymerase enzim összemérésével készítettem el jégen. A kapott elegyet 30°C-os vízfürdőben 16 órán keresztül inkubáltam. Az enzim inaktiválására termoblokkban 65°C-on 3 perces hőkezelést végeztem. Az így felszaporított DNS hosszabb ideig tárolható -20°C-on.

### **5.3. Polimeráz lánreakció és szekvenálás**

#### **5.3.1. Diagnosztikai szűrővizsgálatok**

A vírusnukleinsav jelenlétének kimutatására a nemzetközi szakirodalomban már közölt, széles körben alkalmazott PCR protokollokat használtam, amelyeket az egyes víruscsoportok adott génjeiben található konzervatív régiók felerősítésére terveztek. A teknős-AdV-ok diagnosztikáját a Wellehan és mtsai (2004) által leírt módszer szerint végeztem. A konszenzus, nested primerpárok alkalmazásával az AdV-ok DNS-polimeráz génjének egy kb. 320 bp méretű szakaszát lehet felerősíteni. A lesőharcsa-HV általános kimutatását a Hanson és mtsai (2006) által közöltek alapján kíséreltem meg. Az egykörös PCR konszenzus primerek használatával a HV-ok DNS-polimeráz enzimét kódoló gén megközelítőleg 500 bp hosszúságú szakaszára irányul. Mivel a CRESS DNS vírusok tekintetében a fő célom a *Circoviridae* családba tartozó vírusok kimutatása és vizsgálata volt, ezért a Halami és mtsai (2008) által kidolgozott PCR módszert használtam, ami a CV-ok *rep* génjének mintegy 350 bp méretű, megőrzött szakaszának felerősítésére alkalmas.

A PCR-ekhez többféle polimeráz enzimet és protokollt használtam. A szűrővizsgálatokhoz a REDTaq® ReadyMix™-et (Sigma-Aldrich) és a 2×DreamTaq Green PCR Master Mix-et (Thermo Scientific) használtam. A várhatóan hosszabb termékek felerősítésére, egymástól távol elhelyezkedő genomszakaszok összekötésére a PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.), PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) és a Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimeket és a hozzájuk tartozó gyári kit-eket alkalmaztam. A reakciókat a gyártók által mellékelt használati utasítás alapján mértem össze szűrővizsgálatok esetében 25 µl, egyéb esetben 50 µl végtérfogatban. Az alkalmazott primerek koncentrációja 10–15 pmol/µl (GXL, MAX és Phusion polimeráz enzimek esetében), illetve 50 pmol/µl (DreamTaq és RedTaq polimerázok esetében), térfogata minden esetben 1 µl (50 µl végtérfogatra) vagy 0,5 µl (25 µl végtérfogatra) volt. A bemért DNS mennyisége a szűrővizsgálatoknál egykörös PCR vagy nested PCR külső köre esetében 1 µl (nested PCR-nél a belső kör 5 µl első körös reakcióterméket tartalmazott) egyéb esetben 2 µl volt.



A PCR elegyből 8 µl-t a termék várt méretétől függően 0,7–1%-os agaróz gélen elektroforézissel vizsgáltam. Molekulatömeg-kontrollként GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) markert vagy *Pst*I-gyel emésztett λ-fág DNS-t használtam. A DNS UV-fényben történő láthatóvá tételét a gélhez adott GelRed® (Biotium Inc.) festék biztosította. A gélekről UV-fénynél készítettem fotót. További vizsgálatokhoz a PCR terméket vagy közvetlenül a reakcióelegyből, vagy szükség esetén a gélből UV-fény alatt kivágott specifikus fragmentumból tisztítottam a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Machery-Nagel) használatával.

### **5.3.2. DNS szekvenálás**

A tisztított DNS fragmentumok nukleotidsorrendjének meghatározását BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) használatával végeztem. A PCR termékek Sanger-féle szekvenálási reakcióihoz a megfelelő PCR primereket használtam 5 pmol/µl koncentrációban, a klónozott fragmentumok szekvenálásához a klónozó kithoz tartozó gyári primereket alkalmaztam. A DNS oldat gélelektroforézis alapján becsült koncentrációjától függően a szekvenálást 5 vagy 10 µl végtérfogatban végeztem el. A tisztított PCR termékeket a megfelelő primerek felhasználásával mindkét irányban megszekvenáltam. A nagyobb méretű (>700 bp) nukleotidsorrendek esetén a primerséta módszerét alkalmaztam. Az elkészült termékek elektroforézisét az MTA Szegedi Biológiai Központjának DNS Szekvenáló Laboratóriumában vagy a gödöllői Biomi Kft.-nél végezték ABI Prism® 3100 és 3500 Genetic Analyzer típusú automata készülékeken. A kapott szekvenciákat BioEdit v7.0.9.0 (Hall, 1999) számítógépes programmal jelenítettem meg, majd ezt követően az NCBI honlapjáról (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) elérhető BLAST homológiaKERESŐ programok (Altschul és mtsai, 1990) segítségével az NCBI GenBank adatbázisában tárolt nukleotid (nt) és aminosav (as) szekvenciákkal hasonlítottam össze. A génszakaszok kétoldalról kapott nukleotid szekvenciáját a Staden programcsomag (Staden és mtsai, 1998) Pregap4 v1.6 és Gap v4.11.2 programjaival jelenítettem meg és illesztettem össze, majd eltávolítottam a primer szekvenciákat és szükség esetén elvégeztem a javításokat.

### **5.3.3. Az egyes vírusok által kódolt további gének kimutatása PCR-rel**

A vírus jelenlétének kimutatását követően a vírusgenomból további fragmentumok felerősítését és ezek összekötését kíséreltem meg. A cirkuláris genommal rendelkező vírusok esetében inverz PCR-t használtam. A specifikus primerek tervezését a Primer Designer v2.0 (Scientific and Education Software) program használatával végeztem. A konszenzus primereket a célgénnek génbanki homológjainak as szekvenciái alapján elkészített többszörös illesztés használatával manuálisan terveztem.

Az ékszerteknős-AdV további genetikai vizsgálatához nemzetség-specifikus, konszenzus primereket alkalmazva megkíséreltem a IVa2, a hexon, a pentonbázis, a proteáz, a 100K és a pVIII gének adott szakaszait felerősíteni. Mivel ezek a gének a genom központi régiójában találhatóak és jelenlétüket minden eddig jellemzett AdV-ban leírták, ezért feltételeztem, hogy homológjuk az ékszerteknős-AdV genomjában is megtalálható. A kimutatására szintén a Wellehan és mtsai (2004) által közölt kétkörös PCR program hőmérséklet-időtartam profilját alkalmaztam, azonban a felhasznált primerektől függően egyes vizsgálatok csak egykörösök voltak. Ezeknél a vizsgálatoknál a laboratóriumunk munkatársai által korábban tervezett, illetve saját tervezésű primereket használtam. A DNS-polimeráz és IVa2 gének összekötésére tervezett nested PCR mindkét körének kezdeti denaturációs lépését (94°C/300 mp) 45 cikluson keresztül követte 94°C/30 mp denaturáció, 46°C/60 mp primerbekötődés, 72°C/60 mp lánchosszabbodás, majd 72°C/180 mp végső lánchosszabbodás következett. Mivel a termék előzetesen becsült mérete 2 kbp alatt volt, ezért a PCR-t 2×DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) használatával végeztem. A DNS-polimeráz és hexon gén között elhelyezkedő, előzetesen mintegy 13 kbp méretűnek becsült genomszakasz felerősítésére PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) enzimet használtam. Az alkalmazott kétkörös PCR külső és belső körében a kezdeti denaturációs lépést (98°C/180 mp) 45 cikluson keresztül követte 98°C/10 mp denaturáció, 60°C/15 mp primerbekötődés, 68°C/130 mp lánchosszabbodás, majd egy lépésben 68°C/600 mp végső lánchosszabbodás következett. Az 3. táblázat a pozitív eredménnyel alkalmazott PCR-ek során használt primerek adatait tartalmazza.

**3. táblázat:** Az ékszerteknős-AdV vizsgálatához alkalmazott nested primerek adatai

<b>célgén(ek)</b>	<b>primerszekvenciák (5'&gt;3')</b>	<b>hivatkozás</b>
hexon	outfo: TTYAAYCAYCAYMRNAAYMGNGG outre: CATYTGNAYNARVHACCARTC info: GARTGGTGGTTYMGNAARGAYCC inre: GGNAVNARNANDCKRTCRTTNCC	Doszpoly és mtsai, 2013
polimeráz-hexon	outfo: GCTCATGAATTCGTTGGTCCAACATAA outre: CTTGACCGTTACTTTGCTGGACGTATT info: GATAGCCTTCGGTACAGAGATAATCTT inre: AAGTCTGGTTGTTATTGTGCTGTCTCA	saját tervezés
polimeráz-IVa2	outfo: TCAAGATTATCTCTGTACCG outre: NTBCATRCANTCRTCNADNAYNAY info: CTATCTTCCAAGCCAATCTC inre: NSWYTTNCCNSWNCBNGTNGGNCC	saját tervezés

A Tiszta és Alkalmazott Kémia Nemzetközi Uniója (IUPAC) által deklarált konszenzus bázisok jelölése: N=A/C/T/G; D=A/G/T; H=A/T/C; M=A/C; B=G/T/C; S=G/C; Y=C/T; K=G/T; W=A/T; R=A/G; V=A/C/G. Primerek: outfo/re: külső kör előre/visszafelé haladó, info/re: belső kör előre/visszafelé haladó.

A lesőharcsa-HV előzetes filogenetikai vizsgálatának eredményei alapján a *Cyprinivirus* nemzetség esetében Doszpoly és mtsai (2015) által alkalmazott konszenzus primereket és PCR protokollt használtam a DNS-polimeráz, a termináz ATPáz alegységének és a helikáz gén egy-egy szakaszának a felerősítésére. Ezzel párhuzamosan a CyHV-1, a CyHV-2, a CyHV-3 és az AngHV-1 egyes konzervatívnak tekintett (van Beurden és mtsai, 2010; Davison és mtsai, 2013) kódoló régióinak (DNS-polimeráz, fő kapszid protein, termináz, helikáz, primáz, kapszid proteáz) felerősítését, illetve a polimeráz és a CyHV ORF87/ AngHV-1 ORF45 homológ régió összekötését saját tervezésű primerekkel is megkíséreltem. A lesőharcsa-HV genomjában található DNS-polimeráz és az ORF87/45 homológ gének összekötését Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimmal végeztem kétkörös PCR-t alkalmazva. A kezdeti denaturációt (98°C/180 mp) 45 cikluson keresztül 98°C/10 mp denaturáció, 60°C/15 mp primerbekötődés, 68°C/200 mp lánchosszabbodás, majd egy körben 68°C/600 mp végső lánchosszabbodás követte. A polimeráz gén egy megközelítőleg 2 kb méretű szakaszának felerősítésére használt egykörös PCR program a következőkből állt: kezdeti denaturáció (98°C/30 mp), 45 ciklus (98°C/10 mp denaturáció, 46°C/30 mp primerbekötődés, 72°C/60 mp lánchosszabbodás), majd 72°C/300 mp végső lánchosszabbodás. A reakcióhoz ebben az esetben is Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimet használtam. A pozitív PCR-ekben alkalmazott primerek adatait a 4. táblázatban foglaltam össze.

**4. táblázat:** A lesőharcsa-HV vizsgálatához alkalmazott primerek adatai

<b>célgén(ek)</b>	<b>primerszekvenciák (5'&gt;3')</b>	<b>hivatkozás</b>
polimeráz	fo: TTYGTNTWYAAAYTAYGAYTTYGA	saját tervezés
	re: ACNGTNGCNGTRTTYTCRTANGC	Doszpoly és mtsai, 2015
polimeráz-ORF87/45 homológ	outfo: AACATCGTCGATTCGAGCCTGC	saját tervezés
	outre: GACGTTCCGCATCAACTACCTG	
	info: TCGAGTTCGTGATGCGTCTGAG	
	inre: TCGATCAAGGGCACGTCTACAC	

Az IUPAC által deklarált konszenzus bázisok jelölése: N=A/C/T/G; Y=C/T; W=A/T; R=A/G. Primerek: fo/re: előre/visszafelé haladó.

A CRESS DNS vírusok diagnosztikai vizsgálatát követően a teljes vírusgenom felerősítését célzó inverz, két lépéses PCR-ekhez az előzetesen felerősített replikációs fehérjét kódoló DNS szakasz szekvenciaadatai alapján tervezett specifikus primerpárokat használtam. A vizsgálatokat minden esetben PrimeSTAR® MAX DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) enzimmal végeztem. Az oligo-k tervezésénél elsődlegesen arra ügyeltem, hogy a primerpárok hossza és olvadási hőmérsékleteik ( $T_m$ ) olyan mértékben legyenek azonosak, hogy a gyártó által az enzimhez mellékelt használati utasítás alapján számolva a primer bekötődés 55°C-on 5 mp legyen. Ezzel a módszerrel mindegyik minta esetében ugyanazt a PCR protokollt tudtam alkalmazni. Ennek a

lépései a külső és a belső kör esetében egyaránt a következők voltak: a kezdeti denaturációt (98°C/300 mp) követően 40 cikluson keresztül 98°C/10 mp denaturáció, 55°C/5 mp primerbekötődés, 72°C/60 mp lánchosszabbodás, majd egy körben 72°C/120 mp végső lánchosszabbodás következett. A PCR-ek során alkalmazott primerpárok adatait a 5. táblázat mutatja.

**5. táblázat:** A CRESS DNS vírusok teljes genomjának felerősítésére szolgáló inverz, nested PCR primerek adatai

<b>vírus neve (mintaazonosító)</b>	<b>primerszekvenciák (5'&gt;3')</b>
dévérkeszeg cirkovírus (BRE-2)	<b>outfo:</b> GCCACTTTCATCCGCTATGG <b>outre:</b> GCGCGTGGTGAGATCACTTC <b>info:</b> CTATTGGCTGACTGTTGGAG <b>inre:</b> TGAAGATAGTCTCGCCTTG
razbóra cirkovírus 1 (Z368) és razbóra cirkovírus 2 (Z410)	<b>outfo:</b> GATGCGCAGGTATGTTTTCCC <b>outre:</b> CAGGGCAAGAGATCTGATCTG <b>info:</b> TCGTCATTTTGCAGGTCGGTG <b>inre:</b> AGATGCTGCACTACACGAACG
fenékjáró küllő-asszociált cirkuláris DNS vírus (Z374)	<b>outfo:</b> GCTCGAAACGACCTGAAAGCAGC <b>outre:</b> GCAGTTTGTGGAGTCCCAGCTTC <b>info:</b> AAAGAAGTCTGTGCTGCGGTC <b>inre:</b> TTCTGCGAGTCGACGTCAGTTC
angolna cirkovírus (Ba1)	<b>outfo:</b> GCGCTTGAGGATTCTCATTC <b>outre:</b> CAGATCGTTCCCTCTCCCTT <b>info:</b> GACTTTGGATGGAAGAAGCC <b>inre:</b> CCTTGTTATGCTGGTCGTTG
amazóniai tejbéka-asszociált cirkuláris DNS vírus (Z184)	<b>outfo:</b> AAGGCCAAATTGGACTTAGGG <b>outre:</b> TAAATCGTTACGTCGGCCTTG <b>info:</b> GAAGCGACTATAGCCGAAGAG <b>inre:</b> TCGATTGACCTTCCGGTTTC
vörösfülű ékszerteknős-asszociált cirkuláris DNS molekula (Z52)	<b>outfo:</b> ATCGACTCAGACATCTACCTGCG <b>outre:</b> TTCTACTTCGCCTGTTTCTTGC <b>info:</b> CTACAGGACGCTCAAAGAAATCG <b>inre:</b> TGTAGTCTCCGTCCCTTCTTGACG

Primerek: outfo/re: külső kör előre/visszafelé haladó, info/re: belső kör előre/visszafelé haladó.

#### 5.4. Molekuláris klónozás

Amennyiben a PCR termék szekvenciája többszörös hullámokat eredményezett, feltételeztem, hogy a PCR során nem homogén termék keletkezett. Ezekben az esetekben

molekuláris klónozással különítettem el az azonos méretű, de különböző eredetű DNS fragmentumokat.

A molekuláris klónozást a CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) használatával végeztem, a gyártó utasításainak megfelelően. A reakcióhoz pJET1.2/blunt plazmid vektort használtam, amely tompa végű (blunt end) PCR terméket igényel. Tompa vég kialakítása az erre szolgáló, a kit részét képező speciális enzim (DNA blunting enzim) használatával történt, amely a klónozni kívánt DNS darab 3' túlnyúló végét eltávolítja, az 5' túlnyúló véget pedig kipótolja. A T4 DNS-ligáz használata után a kompetens sejtekbe hősokk segítségével juttattam be a plazmid-inzert konstrukciót. Ehhez One Shot™ TOP10/P3 (Invitrogen) kémiaiailag kompetens *E. coli* baktériumsejtet használtam. Az inzertet tartalmazó plazmiddal transzformált baktériumokat ampicillin tartalmú (50 µg/ml) szelektív Luria-Bertani táptalajra szélesztettem és 37°C-on egy éjszakán át (16 óránál nem hosszabb ideig) inkubáltam. Másnap a kapott telepeket steril pipettahegygel ampicillin tartalmú (50 µg/ml), folyékony Luria-Bertani tápfolyadékba helyeztem át, majd egy éjszakán át, 37°C-on és 180-as fordulatszámon IKA KS 4000 i control rázó inkubátorban (IKA) inkubáltam. A plazmid DNS tisztítása NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) segítségével történt, a gyártó utasításait követve vagy alkáli miniprep módszerrel a Sambrook és Russel (2001) által leírt és a következőkben részletezett protokoll alapján. A baktériumkultúra 3 ml-ét két frakcióban 13000 rpm-en 30 mp-ig centrifugáltam, majd a felülúszót gondosan eltávolítottam. A csapadékot 100 µl I-es oldat (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH=8) hozzáadása után 30 mp-ig alaposan vortexeltem, ezt követően 200 µl frissen készített II-es oldatot (0,2 N NaOH, 1% SDS) adtam hozzá. Az elegyet 5 percig jégen inkubáltam. Ezután 150 µl III-as oldatot (3 M KAc, pH=4,8) mértem be, majd 10 percig jégen inkubáltam a csöveket. Tíz percig (13000 rpm) történő centrifugálás után a felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam és 800 µl 96%-os etanolt adtam hozzá. Újabb tíz perces centrifugálás (13000 rpm) után a felülúszót eltávolítottam, és a keletkezett csapadékot 600 µl 70%-os etanollal mostam. Hét perc centrifugálás (13000 rpm) után a csapadékot vákuum centrifugában szobahőmérsékleten szárítottam. A tisztított plazmid DNS-t 2,5% RNáz tartalmú ultratiszta vízben feloldottam majd felhasználásig -20°C-on tároltam. A klónozás során kapott plazmid DNS-ek mértetét 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A beépített DNS-szakasz méretét *BglII* restrikciós endonukleázzal történő vágással vagy colony PCR-rel ellenőriztem a klónozó kit gyártói utasításainak megfelelően.

## 5.5. Adatelemzés és filogenetikai vizsgálatok

Az as és nt szekvenciák pozicionális illesztései a T-Coffee (Notredame és mtsai, 2000) program webszerverének (<http://www.tcoffee.org/>) alkalmazásával készültek a következő beállításokkal: M-Coffee mód, Mmafft\_pair és Mmafft\_msa páros és többszörös pozicionális illesztés. Az általam alkalmazott maximum likelihood (Felsenstein, 1981) elemzés és a Bayes-i

statisztika (Yang és Rannala, 2012) az evolúciós modellek előzetes szelekcióját igényli. Az adataimra (többszörös as szekvencia illesztések) legjobban illeszkedő evolúciós modell kiválasztására a ProtTest v3.3 programot (Darriba és mtsai, 2011) használtam. Amennyiben az indokolt volt, a nukleinsav alapú többszörös illesztések használatát választottam. Ezekben az esetekben a legjobban illeszkedő evolúciós modell tesztelését a jModelTest 2.1.10 (Darriba és mtsai, 2012) programmal végeztem. Az ékszerteknős-AdV esetében az illesztésekben esetlegesen előforduló bizonytalan régiókat a Gblocks v0.91 program (Castresana, 2000) online szerverének használatával távolítottam el. A HV-ok és a CRESS DNS vírusok esetében manuálisan végeztem az illesztések szerkesztését a BioEdit v7.0.9.0 programmal. A három víruscsoport időben nagyléptékű evolúciós kapcsolatainak vizsgálata miatt a filogenetikai elemzésekhez származtatott as szekvenciákat használtam, amelyeket az interneten keresztül elérhető (<https://www.annular.org/~sdbrown/dna/translator.html>) JavaScript DNA Translator 1.1 programmal (Perry, 2002) állítottam elő. Az ékszerteknős-AdV esetében a feltételezett mRNS splicing donor- és akceptorhelyeinek a meghatározására a BDGP szerverét ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) használtam, majd az így összeállított származtatott aminosavsorrendet az NCBI Genbank adatbázisában elérhető szekvenciákkal hasonlítottam össze. A maximum likelihood analízist az ATGC portál szerverén (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) keresztül végeztem el a PhyML 3.0 program (Guindon és mtsai, 2010) használatával. A törzsfák topológiájának megbízhatóságát Shimodaira-Hasegawa-féle approximate likelihood ratio test (SH-like aLRT) alkalmazásával teszteltem (Anisimova és Gascuel, 2006). A Markov-lánc Monte Carlo (MCMC) módszer alkalmazásával működő, Bayes-i statisztikán alapuló filogenetikai elemzéshez a MrBayes 3.2.7 programot (Huelsenbeck és Ronquist, 2001) használtam. A 4 független futtatás során kapott p és t fájlok diagnosztikai vizsgálatát a Tracer v1.7.1 programmal (Rambaut és mtsai, 2018) végeztem. Az adott elemzés generációinak számát úgy állítottam be, hogy az úgynevezett: *standard deviation of split frequencies* faktor értéke  $\leq 0,01$  legyen. A MrBayes program bemeneti fájljaiként szolgáló nexus fájlokat a ClustalX v2.1 programmal (Larkin és mtsai, 2007) generáltam. A vírusok és természetes gazdáik feltételezett közös evolúciós múltját bemutató tanglegramokat a Dendroscope v3.7.2 program (Huson és Scornavacca, 2012) segítségével készítettem el. A sematikus géntérképeket és genomábrákat az Artemis r16.0.0 programcsomag (Carver és mtsai, 2012) DNAPlotter r1.11 programjának használatával készítettem.

## 5.6. Vírusizolálás

Az ékszerteknős-AdV izolálási kísérlethez laboratóriumunkban fenntartott, dobozteknős (*Terrapene carolina*) szívből származó fibroblasztokat és epiteliális sejteket tartalmazó TH-1 (ATCC® CCL-50™) permanens sejtvonalat (Clark és Karzon, 1967) használtam. A fertőzéshez egy előzetes PCR vizsgálat, majd azt követő szekvenálás által AdV pozitívnak minősített

elhullott vörösfülű ékszerteknős boncolása során eltávolított máj, vese és bél mintákat használtam. A szervmintákat 15 ml-es centrifugacsőben DMEM (Sigma-Aldrich), 2% FBS (Sigma-Aldrich), 2% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) és 2% Gentamicin (Sigma-Aldrich) összetételű feltáró médiumban különíttem el és 4°C-on tároltam a 24 órán belüli felhasználásig. A bélből származó mintát előzetesen 3× mostam 5% Penicillin-Streptomycin és 5% Gentamicin tartalmú PBS (Sigma-Aldrich) oldatban. A virionok szövetből történő feltárását 1 ml feltáró médiumba helyezett lencsényi szövetdarab 10 percig tartó rázatásával (50 1/s) végeztem. Ezt követően 10 percig tartó centrifugálást alkalmaztam 3000-es fordulatszámon, majd szervmintánként 500 µl viriontartalmú felülúszót T25-ös (25 cm<sup>2</sup>) szövettenyésztő edényben (Sarstedt) fenntartott TH-1 sejtekhez (kb. 70%-os konfluencia szint) pipettáztam. A fertőzésekkel párhuzamosan minden esetben alkalmaztam negatív kontrollt is. A fertőzést követően a szövettenyészeteket 28°C-on inkubáltam. Az adenovírusokra jellemző sejtkárosító hatás (magzárvány, sejtlekerekedés, lízis) esetleges megjelenését naponta invert mikroszkóppal (Carl Zeiss) ellenőriztem. Általában két hét inkubációt követően passzázszt végeztem, amit egymás után négy alkalommal ismételttem. Az egyes passzázsokból a szubkultiváció során mintát vettem és a DNS feltárást követően diagnosztikai PCR-rel (Wellehan és mtsai, 2004) ellenőriztem a fertőzés esetleges megeredését és a vírus szaporodását.

A lesőharcsa-herpeszvírussal kapcsolatban izolálási kísérletet nem végeztem.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. Vörösfülű ékszerteknős-adenovírus

#### 6.1.1. PCR-es vizsgálatok és DNS szekvenálás

A teknősök AdV fertőzöttségének kimutatására a DNS-polimeráz génre tervezett PCR-rel végzett szűrés során csak ékszerteknősökből származó mintákat találtam pozitívnak. A vizsgált 76 ékszerteknős mintájából 19 bizonyult pozitívnak. A felerősített fragmentumok mérete 321 bp volt. A primerszekvenciák eltávolítását követően a termékek mérete 273–275 bp maradt. A pozitív minták mindegyike az ékszerteknős (*Trachemys scripta*) két alfajából, a vörösfülű ékszerteknősből (*T. s. elegans*) és a sárgafülű ékszerteknősből (*T. s. scripta*) származott. A vizsgálatba bevont 76 ékszerteknős közül 14 vörösfülű és 5 sárgafülű egyed volt AdV fertőzött, ami 25%-os prevalenciának felel meg.

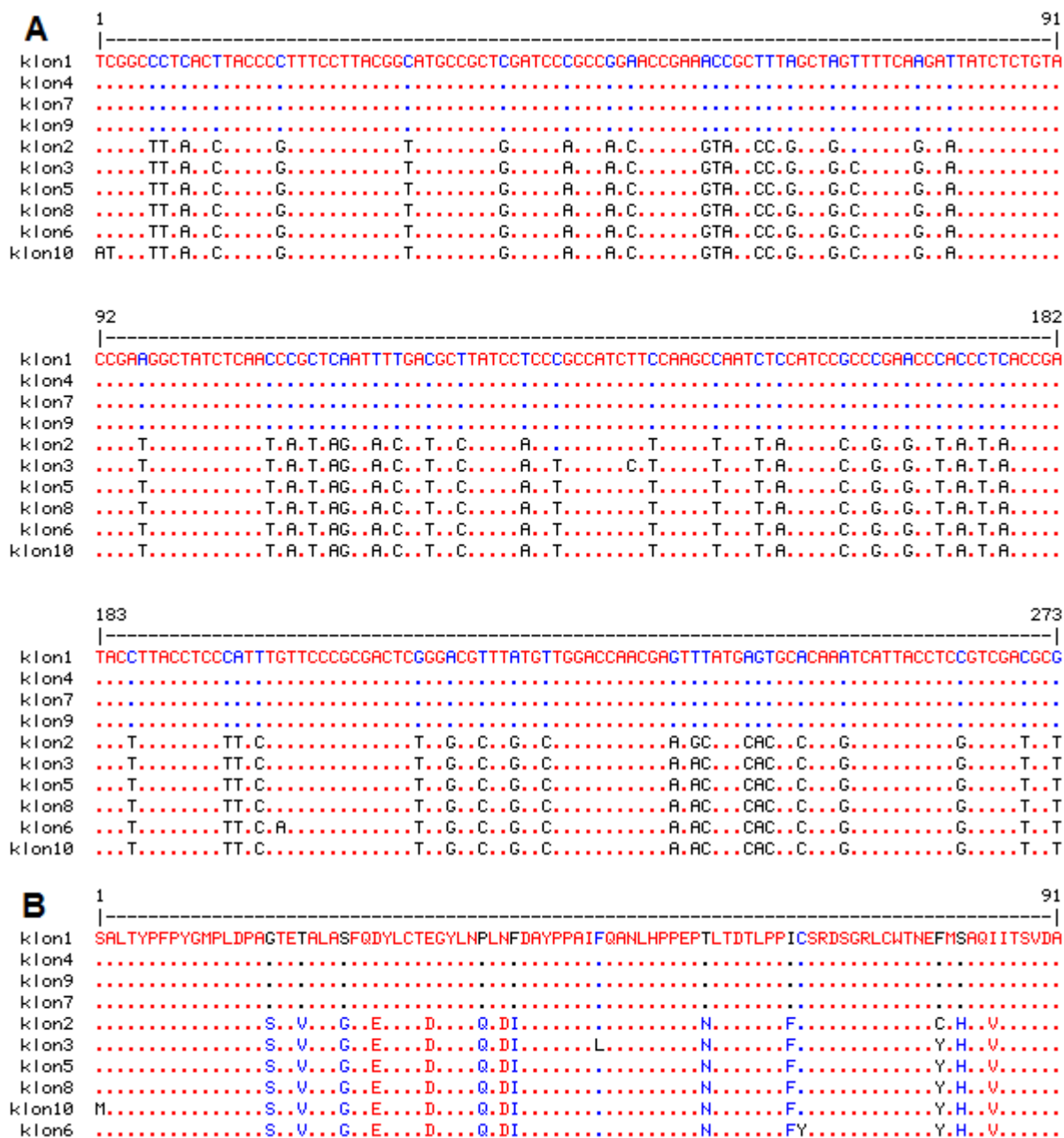
A 19 minta közül kilencnek a nukleotid szekvenciája tartalmazott egynél több hullámot, ami arra utalt, hogy az állatok több adenovírusszekvencia-variánssal fertőződhetek. Ennek bizonyítékául szolgál a 6. ábra, ahol a bemutatott klónok esetében jól látszik, hogy a nem tiszta hullámokat nem szekvenálási hiba okozta. A tiszta, egyszeres hullámokat eredményező szekvenciák összehasonlításakor azt tapasztaltam, hogy ebben az esetben sem lehet egyetlen nukleotid vagy aminosav variánshoz kötni az eseteket. A két ékszerteknős alfajhoz tartozó DNS-polimeráz diagnosztikai PCR-ek nukleotid szekvenciái alapján származtatott aminosavsorrendeket nem lehetett alfajonként csoportosítani. A további, nagyobb genomrészek megismerésére irányuló vizsgálatokat a V5 mintaazonosítóval ellátott vörösfülű ékszerteknős gyomormintájából származó tisztított DNS REPLI-g® Mini Kit-tel felerősített reakciótermékével végeztem, mivel a diagnosztikai PCR-t követő szekvenálás eredménye alapján ezt az állatot egy vírusvariáns fertőzte.

A további nemzetség-specifikus primerekkel történő PCR-es vizsgálatok közül csak a hexon gén részleges szekvenciájának felerősítésére tervezett PCR-rel sikerült felerősíteni egy 476 bp hosszúságú nukleotidszakaszt, amely a primerszekvenciák eltávolítását követően 430 bp méretűnek bizonyult.

A IVa2 és DNS-polimeráz gén, illetve a hexon és a DNS-polimeráz gén összekötésére irányuló kétkörös PCR-ek sikerrel jártak. A két PCR terméken a primerséta (primer walking) módszerét alkalmazva mindösszesen 14776 bp méretű genomszakasz kétoldali szekvenálását végeztem el. A benyújtott szekvencia GenBank azonosítószáma: JN632576. A további vizsgálatokat ezzel a szekvenciával végeztem.

A vírusizolálási kísérlet során a sejtenyészen adenovírusokra jellemző sejtkárosító hatást nem figyeltem meg, a vírust nem sikerült izolálni.



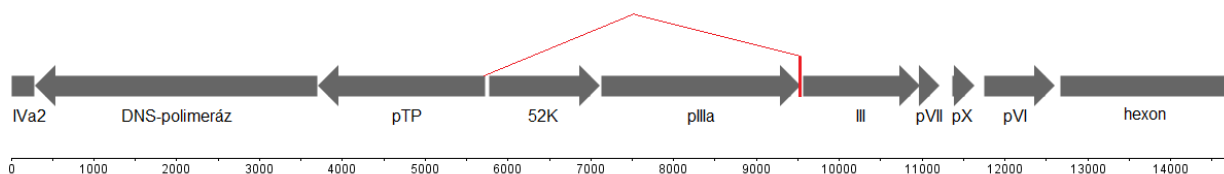


**6. ábra:** A Z47 mintaazonosítóval ellátott vörösfülű ékszerteknős vesemintájából felerősített rövid polimeráz génfragmentum molekuláris klónozásával kapott klónok (A) nukleotid és (B) származtatott aminosavsorrendjei. A nukleinsav variánsok száma: 5, ebből 4 járt aminosav változással. A pontok aminosav azonosságot jeleznek.

### 6.1.2. Részleges genomanalízis

Az ékszerteknős-adenovírus IVa2 és hexon génje között felerősített részleges genomja 14776 bp méretű, G+C tartalma kiegyensúlyozottnak tekinthető (55,2%). A szekvencia a GenBank nukleotid adatbázisában JN632576 nyilvántartási számon érhető el. A homológia keresés és a szekvencia analízis során az *Adenoviridae* család képviselőire általánosan jellemző és azokban a genom központi részén elhelyezkedő 10 megőrzött gént azonosítottam (7. ábra). Meghatároztam a IVa2 és a hexon gén részleges szekvenciáját, valamint a DNS-

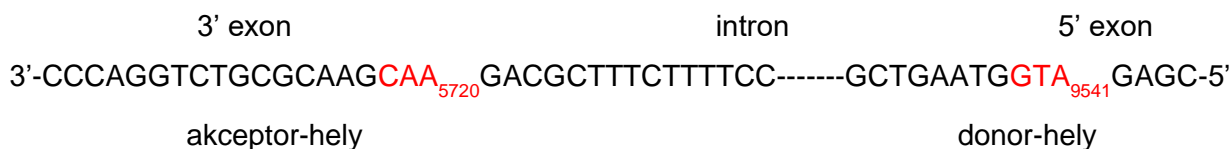
polimeráz, a pTP, az 52K, a pIIIa, a penton bázis (III), a pVII, a pX és a pVI génjének teljes nukleotidsorrendjét.



**7. ábra:** Az RESAdV-1 IVa2 és hexon gének közötti genomszakaszának sematikus ábrája. A pTP lehetséges splicing helye a szokásos módon és piros vonallal jelölve.

A teljes hosszúságú géntermékek közül az 52K (449 as), a pIIIa (797 as) és a pVI (286 as) hosszabbnak bizonyult a vizsgált AdV-ok homológ fehérjéinél, míg a pX (92 as) esetében csak a madaraknál találtam nagyobb méretű fehérjét. Ugyanakkor a pVII (57 as) fehérje a WSAdV-1 pVII proteinjéhez (24 as) hasonlóan a legkisebb méretű az AdV-ok között. A DNS-polimeráz (1136 as), a pTP (671 as) és a pentonbázis (472 as) mérete átlagosnak mondható.

A RESAdV-1 részleges genomjában egy lehetséges splicing helyet azonosítottam, amely a pTP-t kódoló, balra átíródó (*l*) DNS szálon található. A pTP start kodonja (ATG) a pentonbázis (III) és a pIIIa proteinek kódoló ORF-ek közötti intergénikus régióban található a 9541.–9539. nukleotid pozícióban. A pTP nukleotid szekvenciája ezt követően az 5720. nukleotid pozícióban folytatódik. Az első (5') és a második (3') exon és az intron körüli nukleotid régiók környezete a 8. ábrán látható.



**8. ábra:** A RESAdV-1 pTP génjének lehetséges splicing helyei.

A szekvenált régió öt prekurzorként keletkező fehérje génjét tartalmazza. A pTP, a pIIIa, a pVI (9. ábra), a pVII (10. ábra) és a pX (11. ábra) prekurzor fehérjék származtatott as szekvenciáiban vizsgáltam a jellegzetes proteáz felismerési szignálokat és vágáshelyek jelenlétét. A pVI és pX prekurzor proteinek esetében jelentős eltéréseket tapasztaltam a többi nemzetség vizsgálatba bevont képviselőihez képest, ugyanakkor a pVII esetében ez az eltérés kisebb, de mindkét endopeptidáz vágási hely aminosav mintázata esetében található eltérés. A pTP aminosav szekvenciájában egy I-es típusú (LSGG'V), egy II-es típusú (MQGF'G) és két III-as típusú (LLAG'G és LSAH'G) feltételezett proteáz vágási helyet azonosítottam a 318., 174., a 27. és a 127. as pozícióban, míg a pIIIa fehérje két I-es típusú (IAGG'G és VHGG'L) mellett egy III-as típusú (MDAL'G) hasítási helyet is tartalmazott a 155., a 340. és a 719. as pozícióban. A vágáshelyek vizsgálatánál alkalmazott adenovírusok adatait az 1. melléklet tartalmazza.

**Mastadenovirus**

HAdV-2 : NWQSTLNSIVGLGVQSLKRRRCF  
HAdV-12 : NWQSTLNSIVGLGVKSLKRRRCY  
HAdV-40 : NWQSTLNSIVGLGVKSLKRRRCY  
CAdV-1 : GWQGTLANIVGVGLSNVKRRRCF  
PAdV-3 : GWQNKLNITIVGLGVRTCKRRRCY  
EAdV-2 : NWQGTNLNIVGLGVASAKRRRCF  
MAdV-2 : DWQSKLANVVGAGLRCSRRRCF  
CSLAdV-1 : GWQSTLNNIVGMGVRVNKRRRCF  
GPAdV-1 : RWQTTLNDIVGLGFHIDKRRRCY  
TSAdV-1 : GWQGKLSIVGVGVRPIKRRRCY

**Aviadenovirus**

FAdV-1 : QWRARLDSLSGTGVATATRRRCY  
FAdV-3 : SWRSRLNTLSGNGVATSRRRCY  
FAdV-4 : SWRARLNTLSGTGVNVSSRRRCY  
TAdV-1 : SWRARLDTLAGKGVASSRRCY  
GoAdV-4 : TWRSLDSMTGSGVQYMKRRRCY  
DAdV-2 : SWRSRLNSMTGSGVAASRRRCY  
PiAdV-2 : NWRDRLNSISGTGVSASSRRRCY  
PsAdV-1 : SWRNRLDSLTTGTGVHTSSRRRCY

**Atadenovirus**

BAdV-4 : GWGAFLNDMTGDGVNSVTRRCY  
BAdV-6 : GWGAFLNDMTGDGVNSVTRRCY  
DAdV-1 : GWGAALDSMVGDVVRYGSQRCY  
OAdV-7 : GWGAFLDNMTGDGVNFNTRRCY  
PsAdV-3 : SWGTVLDGITGDGVRFSRRRCY  
SnAdV-1 : GWGSALEDMLGDGVCYRSKRCY  
LAdV-2 : GWGTALEEMLGNGVDFGSKRCY  
BAdV-1 : GWGAALDMLGDGVSHRAQRCY  
OdAdV-1 : GWGAFLDDMTGEGVNCSTRRCY

**Siadenovirus**

FrAdV-1 : AWRQKLNIVGSGVNYSTLSRCY  
GTAdV-1 : EWQQQLRNMLGEGVRYSSTKRCY  
RAdV-1 : EWQRQLNSMLGQGVRYTNTNRCY  
SPSAdV-1 : EWQRHLNSMLGQGVRYTNTNRCY  
TAdV-3 : EWQTHLNKMLGQGVRFSTNRCY  
CPAdV-2 : EWQIHLNNMLGQGVRYTSSNRCY  
PsAdV-5 : EWQRQLNSMLGQGVKFTSANRCY  
PsAdV-6 : EWQRQLNSMLGQGVKFTSANRCY  
PsAdV-7 : EWQRQLNNMLGQGVKFTSTNRCY

**Ichtadenovirus**

WSAdV-1 : GYGRGMLPFCGRGVSYSKLRRCY

**Testadenovirus**

RESAdV-1 : RWKRALRQMTG-GLARKRRRYCH

**9. ábra:** A pVI fehérje terminális vágáshelyei az adenovírus nemzetségek szerinti bontásban. Szürke háttérrel (II-es típusú) és sárga háttérrel (I-es típusú) a vágási szignálok, piros (RESAdV-1) és kék színű betűvel a vírus proteáz aktiváló pVIc kofaktort ábrázoltam. Jól látható, hogy a hivatalosan elfogadott hat nemzetség közül egyedül a *Testadenovirus* nemzetségbe tartozó vörösfülű ékszerteknős 1-es típusú adenovírusának (RESAdV-1) pVI aminosav szekvenciájában található I-es típusú [(M/L/I/V/F)XGG'X] vágási hely (a kofaktor hossza 10 aminosav). A többi adenovírus nemzetség képviselőinek pVI molekulája II-es típusú [(M/L/I/V/N/Q)X(A/G)X'G] proteinázs vágási helyet tartalmaz (a kofaktor mérete 11 aminosav). A proteáz vágási helyeket eltérő színű aláhúzással jelöltem.

### **Mastadenovirus**

HAdV-2 : MSILISPSNNTGWGLRFPFSKMFGGAKKRSDQHPVVRVGRHYRAPWG  
HAdV-12 : MSILVSPSNNTGWGLGA-ARMYGGAKTRSSQHPVVRVGRHYRAPWG  
HAdV-40 : MSILISPDNNTGWGLCS-AGMYGGAKRRSSQHPVVRVGRHYRAPWG  
CAdV-1 : MAILISPSNNTGWGLGT-HKLFGGAKQKSDQHPVYVQAHYRAPWG  
PAdV-3 : MAILVSPSNNTGWGLGL-RSMYGGARRLSPDHPVIVRRHYRANWA  
EqAdV-2 : MAILVSPSNNSGWGLGL-RSMYGGARKRSAEHPVVRVGRHYRAAWG  
MAdV-2 : MSILISPSNNTGWGLGV-SKMYGGALTRQGPYTVAVRSYRRPWG  
CSLAdV-1 : MSILISPTNNTGWGIGS-GILYGGARTRSDVHPVKVRAHYRAAWG  
GPadV-1 : MAILISPDNNTGWGLGM-SRMYGGARFRSEGHVVRVQRHFAPWG  
TSAdV-1 : MAILVSPSNNSGWGLGV-KSMYGGARKRSAAHPVLVKKHYRAPWG

### **Aviadenovirus**

FAdV-1 : MSILISPSDNRGWGANMRYRRRA-----SMRGVG-R-----  
FAdV-3 : MSILISPNDNRGWM--RRRSR-----SSMRGVGIR-----  
FAdV-4 : MSILISPNNNTGWGM--RRRSRS-----SSMRGVGMRRR-----  
TAdV-1 : MSILISPNDNRGWM--RRRSR-----SSMRGVGTRRP-----  
GoAdV-4 : MSILISPSDNRGWGTM-MRRRSRSTMRRRPAMRGTVRRR-----  
DAdV-2 : MSILISPSDNRGWGAM-MRRRSRSMRRRPSMRGTGLRRRLTRV  
PiAdV-2 : MSILISPSDNRGWGM--RRRTR-----SSMRGVGVR-----

### **Atadenovirus**

BAdV-4 : MSILMSPSDNTGWGSIGTALMRATGVKFSKRQPVVRVPYYRAQWG  
BAdV-6 : MSILVSPSDNTGWGNIGSALMRATGLKFSKKQPVVRVQYYRAQWG  
DAdV-1 : MSILMSPADNTGWG-LGTRMLRATGLRFSEREPPVVRVSYRAQWG  
OAdV-7 : MSILVSPSDNTGWG-IGTSSMRATGLKFSKKQPVVRVPYYRAQWG  
PsAdV-3 : MSILISPSDNNTGWG-VGTTLMRATGTRFTDDEPVRVRAYYRAQWG  
SnAdV-1 : MPILISPSDNNTGWG-LGKLRI RATGLTFTDSTPVSVRHYFRDSSG  
LAdV-2 : MSILISPSDNNTGWG-LGNCRI RGTGARFTLSTPVPVRHYRAQWG  
BDAdV-1 : MSILISPSDNNTGWG-IGTSLRGTGLRYRAQPPVHVSYYRSQWG  
OdAdV-1 : MSVLMSPSDNNTGWGAI GTALMRATGLKFTKNQPVVRVPYYRAQWG

### **Siadenovirus**

FrAdV-1 : MTAVLLSPADNRGWCARAMRSGSVYLVGGASAPSDVYTEHVRGYW  
GTAdV-1 : MTAVFYSPGDSRGWGLGSSSMRDYYLIGGALQPSDVYTVRVREHW  
RAdV-1 : MSSIVYSPADSRGWGIGNTAMR-AYLIGGALEPSDVYTVRVREHW  
SPSAdV-1 : MASIVYSPGDSRGWGIGNSAMRDYYLVGGALEPSDVYTVRVREHW  
TAdV-3 : MHSVVYSPGDSRGWGIGNSSMRDYYLIGGALQPSDIYTVRVREHW  
PsAdV-5 : MASIVYSPSDSRGWGIGN-----YLIGGALQPSDVYTVRVREHW  
PsAdV-6 : MASFVYSPSDSRGWGIGN-----YLIGGALQPSDIYTVRVREHW  
PsAdV-7 : MASIVYSPSDSRGWGIGS-----YLIGGALQPSDIYTVRVREHW

### **Ichtadenovirus**

WSAdV-1 : MY----STGDSSTGWGRRVSQIRFSFQIF-----

### **Testadenovirus**

RESAdV-1 : MYLGLTSPGNTRGWGRRMYRRRRRRMTGGSVASRVGHLERNYSYR

**10. ábra:** Az adenovírusok pVII fehérjéinek proteáz vágáshelyei. Sárga háttérrel: I-es típusú [(M/L/I/V/F)XGG'X] vágási szignál, szürke háttérrel: II-es típusú vágási szignál [(M/L/I/V/N/Q)X(A/G)X'G], zöld háttérrel: IIb típusú vágási szignál (NTGW'G), piros háttérrel: III-as típusú vágási szignál [(M/L/I)XAX'G]. Jól látható, hogy a *Testadenovirus* nemzetségbe tartozó vörösfülű ékszerteknős 1-es típusú adenovírusának (RESAdV-1) pVII aminosav szekvenciájában található vágási helyek az I-es és a IIb típusba tartoznak. Ez a mintázat a siadenovírusokra és a mastadenovírusokra jellemző, azonban jól látható, hogy az aminosav-összetétel a RESAdV-1 esetében mindkét vágási szignálszekvenciában eltér mind a *Siadenovirus*, mind a *Mastadenovirus* nemzetség képviselőinek az aminosav-összetételétől. A proteáz vágási helyeket aláhúzással jelöltem.

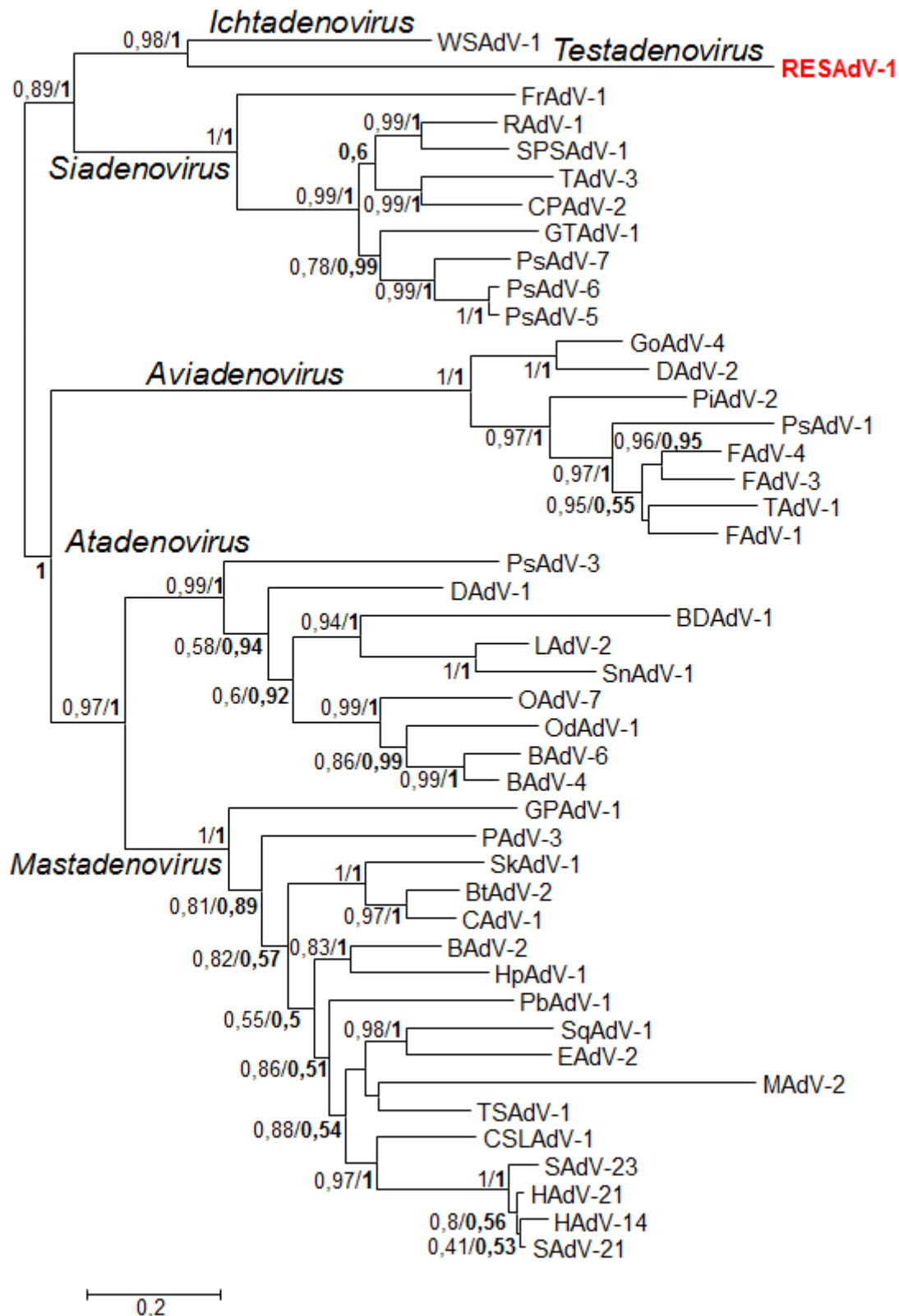
<b>Mastadenovirus</b>	
HAdV-2	: MAGHG <b>LTGGM</b> -----MRGGI <b>LP</b> LLIPLIAAAIGAVPGIASVALQAQRH-----
HAdV-12	: LTGNG-----MKGGV <b>LP</b> FLIPLIAAAIGAVPGIASVALQASRKN-----
HAdV-40	: MAGSG-----TKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGVASVALQAARKQ-----
CAdV-1	: <b>LTGAG</b> -----MKGGF <b>LP</b> ALIPLIAAAIGAVPGIASVALQAARH-----
PAdV-3	: <b>LRGGF</b> -----MRGGI <b>LP</b> ALVPIIAASIWAIPGIASVAMSARQRN-----
EqAdV-2	: <b>MYGGK</b> -----LNGGF <b>LP</b> LLAPIIAAAVGAIPGIASVALQASRKN-----
MAdV-2	: <b>RLGGG</b> -----LCGGF <b>IP</b> AVLAPIIAAAVGAIPAIASVALQAKALNQR-----
CSLAdV-1	: <b>LRGGR</b> -----LKGGF <b>LP</b> ALVPIIAAAIGAI PGIASVAIQASRNLQ-----
GPAdV-1	: <b>ARGGA</b> -----MRGGF <b>LA</b> ALAPIIAAAIGAI PGIASVAMAANRR-----
TSAdV-1	: <b>LSGGR</b> -----LKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAVGAIPGIASVAVQAARKN-----
<b>Aviadenovirus</b>	
FAdV-1	: <b>LTGGR</b> -----MTGTG---LKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGIA GTAVGIANLKEQQRFNKIYGDKK-----
FAdV-3	: <b>LTGGR</b> -----VSGAG---LKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGIA GTAVGIASLKEQQRFNKMYNQK-----
FAdV-4	: <b>LTGGR</b> -----LTGTG---MRGGF <b>FP</b> ALIPLIAAAIGAI PGIA GTAVGIASLKEQQRFNKL YGNK-----
TAdV-1	: <b>LTGGR</b> -----LTGGA---LKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGIA GTAVGIASLQEQRQFNKMYGNSK-----
GoAdV-4	: <b>LTGGR</b> -----LSGSG---MRGGF <b>FP</b> ALIPLIAAAIGAI PGIA GTAVGIANLKEQQRQYNEQMKLQREQMERLYGKKT-----
DAdV-2	: <b>LTGGR</b> -----LTGSG---LRGGI <b>FP</b> ALIPLIAAAIGAI PGIA GTAVGIANLKEQQRQYNEQMKLQREQLERLTGKKK-----
PiAdV-2	: <b>LSGGR</b> -----LGGSG---LKGGF <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGIA GTAVGIASLQEQRQFNRM YGKTNN-----
PsAdV-1	: <b>LSGSG</b> -----LGGTG---LRGGI <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAI PGIA GTAVGIASLKEQQRFNRL YGKSR-----
<b>Atadenovirus</b>	
BAdV-4	: <b>LTGGR</b> <b>LP</b> ALIPIIAAAISAAPAIAGTVIAAQNARSR-----
BAdV-6	: <b>LQGGF</b> <b>LP</b> ALIPIIAAAIGAAPAIAGTVIAAQNARFLN-----
DAdV-1	: <b>LKGGF</b> <b>LP</b> AI IPLIAAAISAAPAIAGTVIAAKNAR-----
OAdV-7	: <b>LQGGF</b> <b>LP</b> ALIPIIAAAISAAPAIAGTVIAAKNANRS-----
PsAdV-3	: <b>LKGGF</b> <b>LP</b> LLIPLISAAIGAAPAIASTVIAAKNARRH-----
SnAdV-1	: <b>MRGGF</b> <b>LP</b> LLAPILAAAIGSIPGIVIAAKQK-----
LAdV-2	: <b>MRGGF</b> <b>LP</b> LLAPILAAAIGAI PGIVVAARQK-----
BDAdV-1	: <b>MRGGF</b> <b>LP</b> LLAPILAAAVGSIPGIVMAAKQR-----
<b>Siadenovirus</b>	
FrAdV-1	: <b>LRGGF</b> <b>LP</b> LLVPIIAAAISAAPGIAGAVLAAKNHN-----
GTAAdV-1	: <b>LRGGF</b> <b>FA</b> FALVPLIASAITAI PGIASAI IQAKQSS-----
RAdV-1	: <b>LRGGI</b> <b>LP</b> PFLVPIISSLITAAPAIAGTIIAAKNASK-----
SPSAdV-1	: <b>MRGGI</b> <b>LP</b> PFLIPILSSLI TAAPAIAGTVIAARNASK-----
TAdV-3	: <b>LRGGF</b> <b>V</b> SVLVPLLSSLI GAAPAIAGTVIAARNASK-----
CPAdV-2	: <b>MRGGF</b> <b>I</b> ASLIPIISSLITAAPAIASTVIAARNASK-----
PsAdV-5	: <b>LRGGF</b> <b>LP</b> PFLIPILSSLI SAAPAIAGTIIAAKNNSR-----
PsAdV-6	: <b>LRGGF</b> <b>LP</b> PFLIPILSSLI TAAPAIAGTIIAAKNNSR-----
PsAdV-7	: <b>LRGGF</b> <b>LP</b> LLIPILSSLI SAAPAIAGTIIAARNNSR-----
<b>Ictadenovirus</b>	
WSAdV-1	: <b>MRGGF</b> <b>VF</b> ASLIPIIAAAIGAAPAIASVAMQAKRG-----
<b>Testadenovirus</b>	
RESAdV-1	: <b>LRGRGL</b> NQPIAMPMTMRGHGFSAASSASLAPTLLGGRPOLTGRLRYNSE <b>MRGGV</b> <b>LP</b> LLIPLIIPALASVAAAGVGSIPGIIMASKN-----

**11. ábra:** Az adenovírusok pX fehérjéinek proteáz vágáshelyei. Sárga: I-es típusú [(M/L/I/V/F)XGG'X] vágási szignál, szürke: II-es típusú vágási szignál [(M/L/I/V/N/Q)X(A/G)X'G]. A vörösfülű ékszerteknős 1-es típusú adenovírusának (RESAdV-1) pX aminosav szekvenciájában I-es és II-es típusú vágási szignál is található, de aminosav-összetételük, elhelyezkedésük és az együttes előfordulási gyakoriságuk is eltér a másik öt nemzetség képviselőiben található azonos típusú vágási szignálok hasonló jellemzőitől.

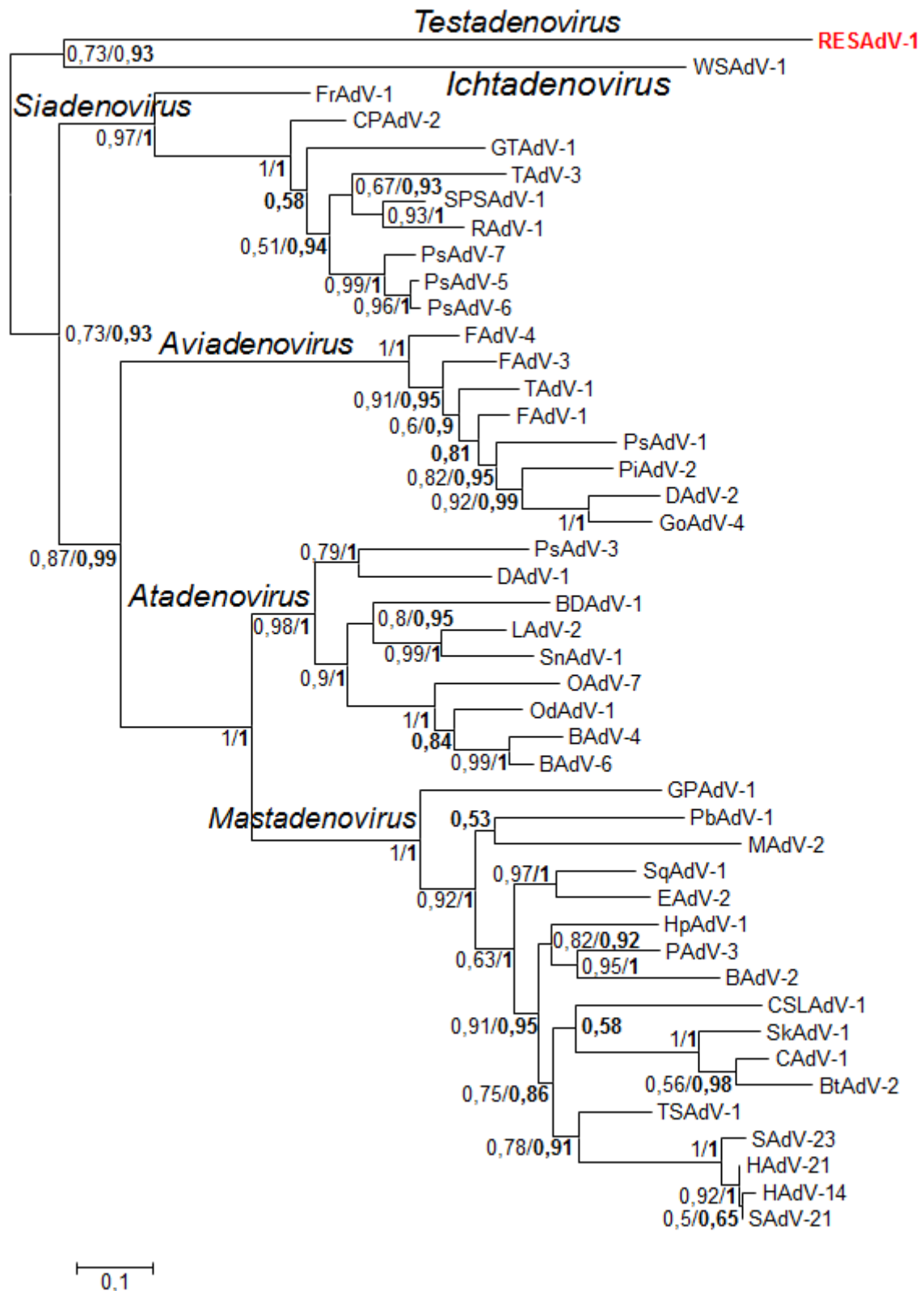
A proteáz vágási helyeket aláhúzás jelöli. A piros betűvel jelölt, erősen megőrzött feltételezett transzmembrán domén jelentős eltérést mutat a többi adenovírus hasonló szekvenciájának összetételétől.

### 6.1.3. Törzsfa-rekonstrukció, rendszertan és evolúció

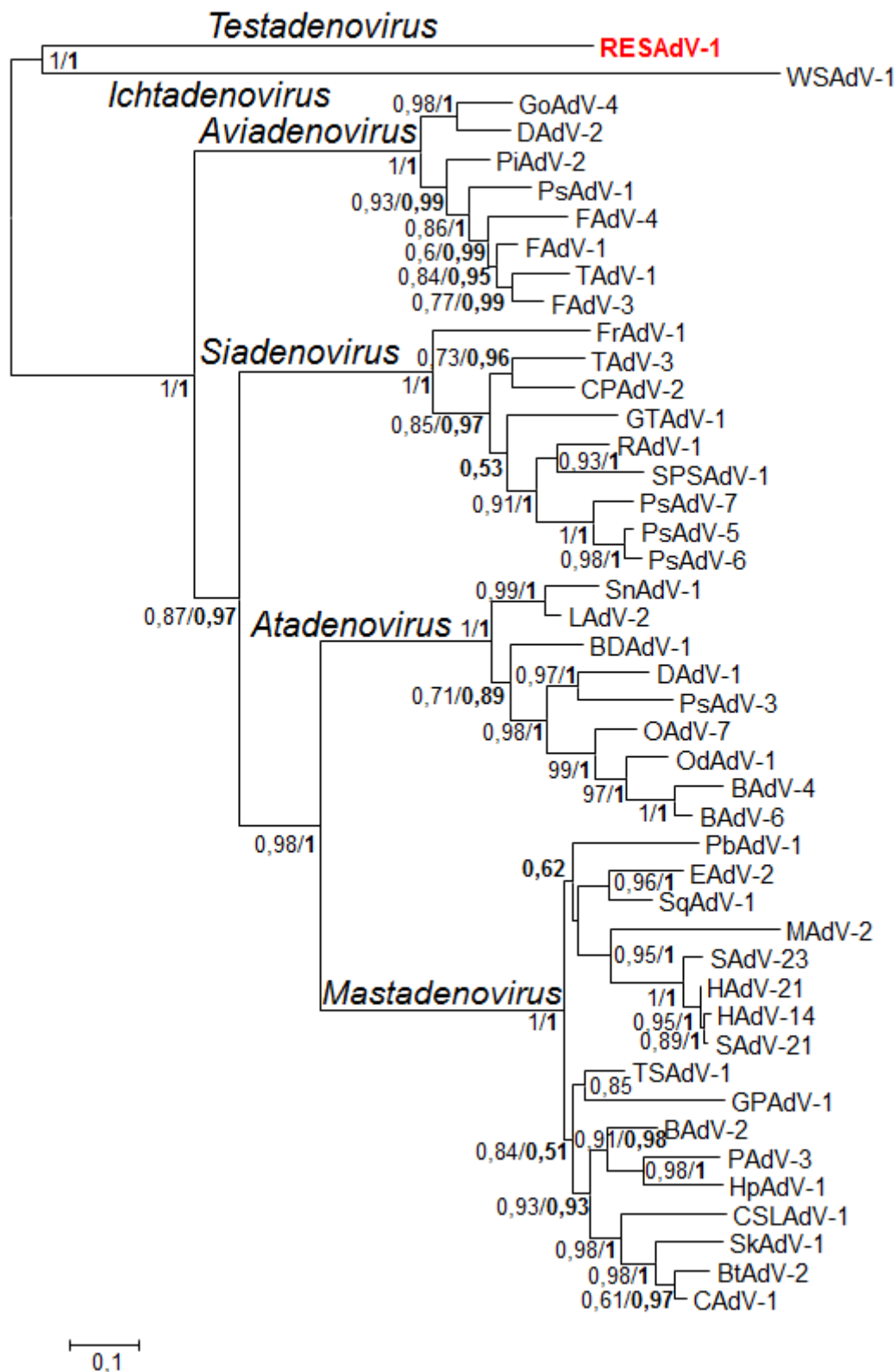
Az evolúciós kapcsolatokat két teljes gén, a DNS-polimeráz (12. ábra) és a pentonbázis (13. ábra), valamint a részleges hexon gén (14. ábra) alapján elvégzett törzsfa-rekonstrukciókkal vizsgáltam. Az RESAdV-1 mindhárom törzsfán a hivatalosan elfogadott nemzetségektől jól elkülönülő ágon jelent meg, amelynek testvércsoportja minden esetben a fehér tokból kimutatott WSAdV-1 volt. Az eredmények bizonyították egy, a tudomány számára új AdV leszármazási vonal létezését, ezért az ICTV-nél javaslatot tettünk egy új, hatodik AdV nemzetség kialakítására *Testadenovirus* néven. Az ugyanazzal a génnel végzett különböző számítások nagyon hasonló topológiát eredményeztek, amit az elágazódási pontoknál feltüntetett magas aLRT és Bayes-i posterior probability értékek alátámasztanak. Ahol csak egy megbízhatósági érték szerepel egy ág elágazásánál, a másik módszer nem támogatta azt megfelelő mértékben. A törzsfa-rekonstrukcióknál alkalmazott adenovírusok adatait az 1. melléklet tartalmazza.



**12. ábra:** Az AdV-ok DNS-polimeráz enzimének 620 aminosavból álló illesztése alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfa-rekonstrukció (maximum likelihood és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell (Le és Gascuel, 2008), I=0,194, G=0,942). A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. Az általam vizsgált mintát piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát mutatja.



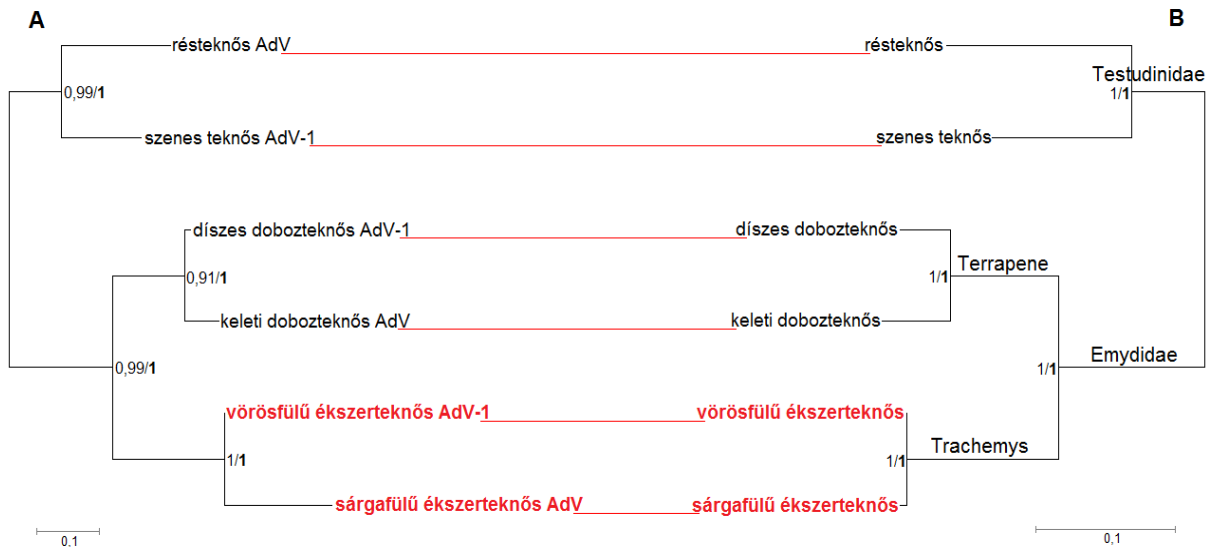
**13. ábra:** Az AdV-ok pentonbázis (III) fehérjéjének 373 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,123, G=1,245). A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. Az általam vizsgált mintát piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciókénti számát mutatja.



**14. ábra:** Az AdV-ok fő kapszidproteinjének (hexon) részleges 488 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfarekonstrukció (maximum likelihood és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell,  $I=0,154$ ,  $G=0,891$ ). A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. Az általam vizsgált mintát piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciónkénti számát mutatja.



A teknős-AdV-ok és az általuk fertőzött gazdák közös evolúciós leszármazását a 15. ábrán mutatom be. Jól látható a törzsfák topológiájának nagymértékű hasonlósága. Az ágelágazódásoknál feltüntetett magas megbízhatósági értékek alátámasztják a törzsfák szerkezetét.

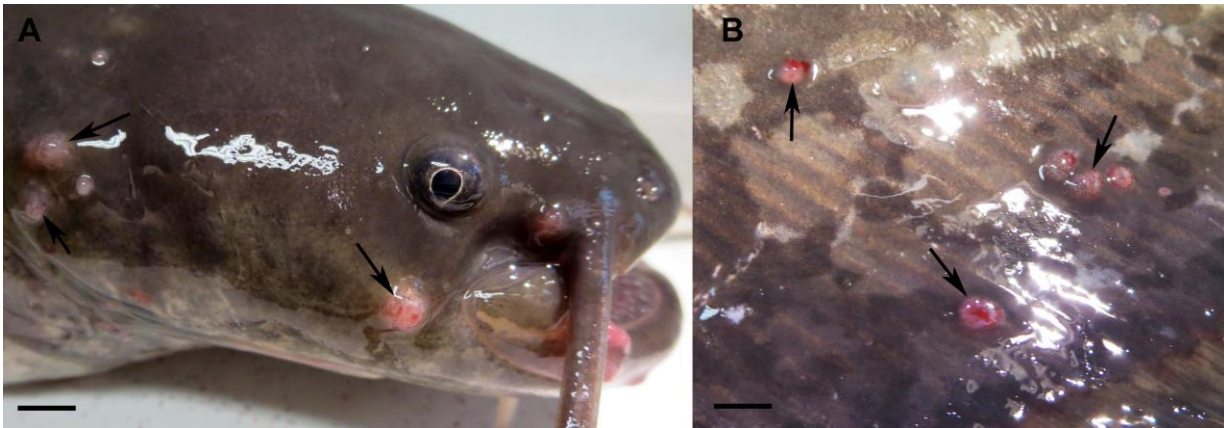


**15. ábra:** A *Testadenovirus* nemzetség tagjainak (A) és gazdafajaiknak (B) filogenetikai kapcsolatait ábrázoló, középpontban gyökereztetett törzsfa-rekonstrukciók. A testadenovírusok filogenetikai fája a polimeráz gén 92 aminosav hosszúságú többszörös illesztése alapján készült (maximum likelihood módszer, BIC, JTT+I modell (Jones és mtsai, 1992),  $l=0,543$ ). A gazdafajok filogenetikai fája a mitokondriális citokróm-c oxidáz I-es alegysége és a citokróm-b gének 1701 nukleotid hosszúságú illesztett szakasza alapján készült (maximum likelihood módszer, BIC, GTR+G modell (Tavaré, 1986),  $G=0,2682$ ). A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövérrel szedve) jelzi. Az ágvégek találkozásainál a vírusok és a gazdafajok neve és piros vonal jelzi a kapcsolatot. Az általam vizsgált vírusokat és gazdafajokat piros, félkövér írásmóddal jelöltem. A törzsfák alatt található lépték az aminosav, illetve nukleotid szubsztitúciók pozícionkénti számát mutatja.

## 6.2. Lesőharcsa-herpeszvírus

### 6.2.1. Makroszkópos vizsgálatok

A vizsgálatra küldött egyed egész testén a hám felszínéből kiemelkedő, kemény tapintású, halvány rózsaszín vagy opálosan fehér, proliferatív, himlőszerű bőrelváltozásokat figyeltünk meg. Ezek egy részén a hám sérülése miatt krátterszerű, vérzéses területek is előfordultak (16. ábra). Az elváltozások a bőrrel nem voltak leválaszthatók. Az eutanáziát követően elvégzett boncolás során a belső szervek megtekintésre épnek bizonyultak, makroszkóposan látható elváltozást nem tapasztaltunk.



**16. ábra:** Bőrelváltozások a lesóharcsa (A) fején és (B) törzsén. A bőrből kiemelkedő, kemény, göbös, bevérzett képleteket nyilak jelölik. A képek bal alsó sarkában található lépték 1 cm-nek felel meg. A fényképeket és az ábrát Dr. Eszterbauer Edit (ÁTKI Halparazitológiai Témacsoport) készítette és bocsátotta rendelkezésemre.

### 6.2.2. PCR-es vizsgálatok és DNS szekvenálás

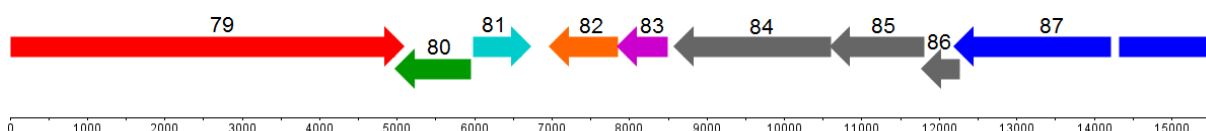
Konszenzus PCR-rel sikerült felerősíteni a DNS-polimeráz génből a katalitikus alegység (továbbiakban polimeráz) és a termináz gén ATP-áz alegységének (továbbiakban termináz) egy-egy fragmentumát. A primerszekvenciák eltávolítását követően a polimeráz 463 bp, a termináz 1002 bp hosszúságú volt. A polimerázra irányuló újabb PCR-rel a gén 1759 bp méretű szakaszát is sikerült felerősíteni. A további gének kimutatását célzó PCR-ek sikertelennek bizonyultak. A termináz molekuláris klónozásával sikerült egy 711 bp méretű DNS szekvenciát kapni, amely a GenBank adatbázisában található CyHV-ok ORF87, illetve AngHV-1 ORF45 szekvenciáihoz hasonló. Ezt az eredményt az erre a szakaszra tervezett PCR-rel kapott termék kétoldali szekvenálásával megerősítettem. A CyHV-ok genomszerveződésén alapuló, a polimeráz és az ORF87/45 homológ szakasz összekötésére tervezett specifikus PCR-rel egy 15222 bp méretű nukleotid szekvenciát sikerült felerősíteni és primer séta módszerrel két oldalról megszekvenálni. A GenBank nukleotid adatbázisába a polimeráz és az ORF87/45 homológ közti 15222 bp méretű nukleotidsorrend az MW732127 nyilvántartási számon került benyújtásra, a termináz 1002 bp méretű szakasza az MW732128 azonosítószámot kapta.

### 6.2.3. Részleges genomanalízis

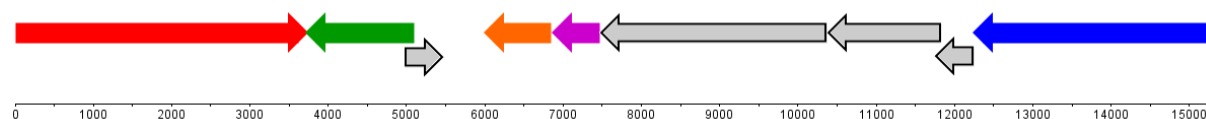
A genomszakasz szekvenciájának elemzése során 16 ATG-vel kezdődő, 300 bp-nál nagyobb ORF-et találtam, amelyek közül kilencet fogadtam el génnek (17. ábra). A CyHV-1-ben használt számozás szerint a DNS-polimeráz (ORF79), az Allo60 (ORF80), két membránprotein (ORF82 és ORF83) és egy ismeretlen funkciójú fehérje (ORF87) génjének a homológja megtalálható a CyHV-1 genomban is, ugyanolyan sorrendben és orientációban. A CyHV-okra jellemző ORF81-nek megfelelő helyen és orientációban a lesóharcsa-HV genomban is található egy ORF, azonban a két ORF között nincs kimutatható homológia. Az AngHV-1 polimeráz

(ORF55) és ORF45 közötti szakaszával összehasonlítva a lesőharcsa HV-ban szereplő mindegyik fent említett ORF fordított sorrendben és orientációban található meg. Az összehasonlító genomvizsgálatok eredményei alapján a SiHV-2 felerősített részleges genomszakasza szerveződésében egyértelműen a CyHV-1 megfelelő szakaszára hasonlít jobban (17. ábra).

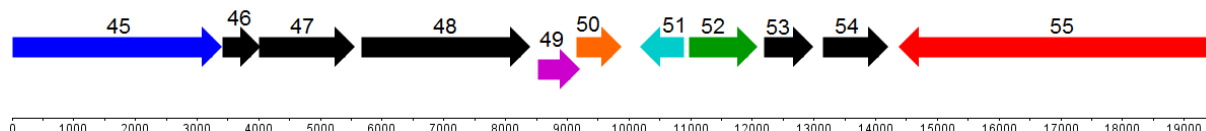
CyHV-1 (JQ815363)



SiHV-2 (MW732127)



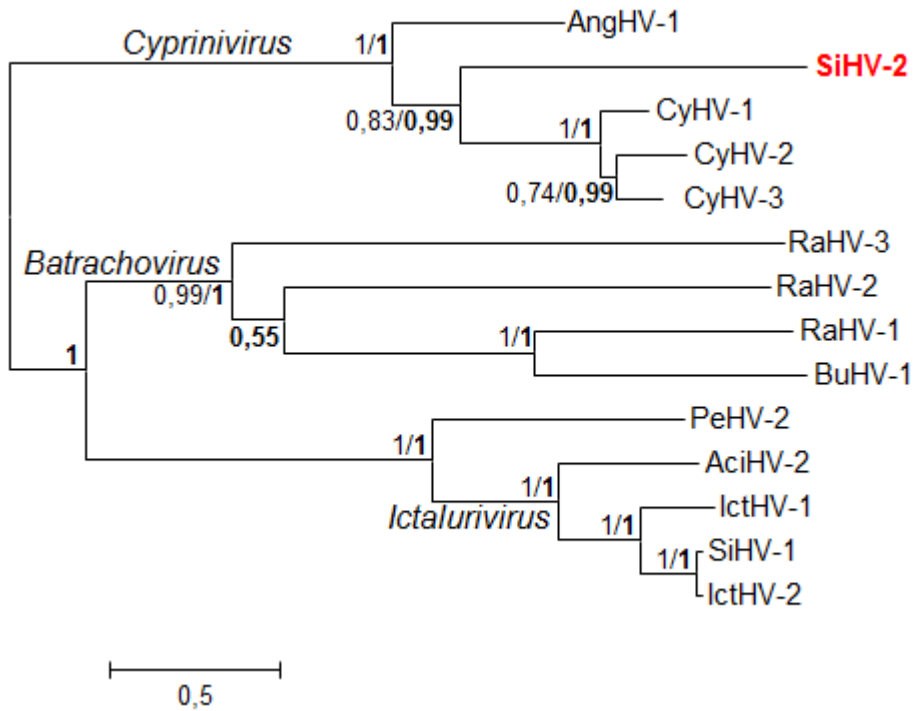
AngHV-1 (FJ940765)



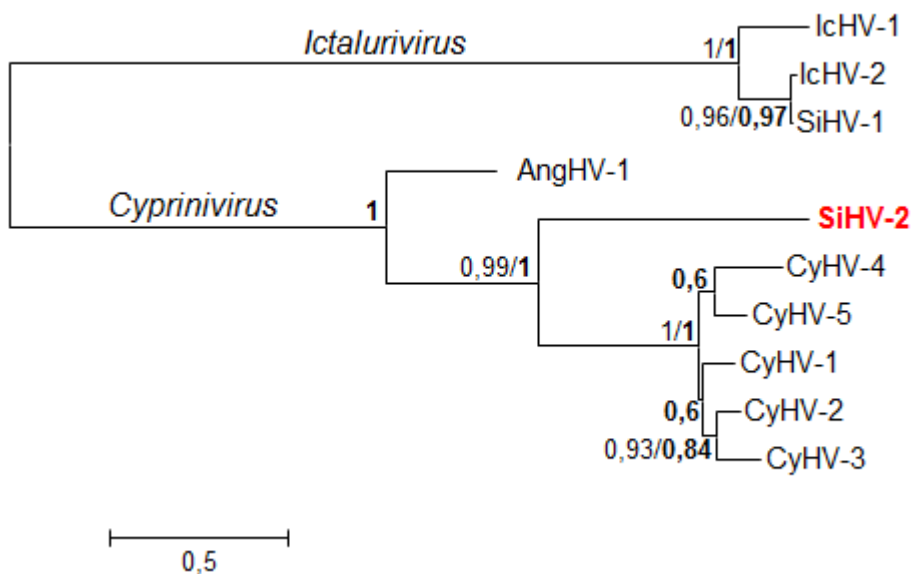
**17. ábra:** A lesőharcsa-HV (SiHV-2) DNS-polimeráz és ORF87/45 homológok között felerősített genomszakaszának áttekintő ábrája és részleges genomszerveződésének összehasonlítása a CyHV-1 és az AngHV-1 homológ genomszakaszával méretarányosan ábrázolva. A számozott nyilak az egyes ORF-eket jelölik. A három vírus esetében azonos színek homológ ORF-eket jelölnek. A fekete nyilak (AngHV-1), a sötétszürke nyilak (CyHV-1) és a világosszürke, keretezett nyilak (SiHV-2) az egyes vírusokra jellemző ORF-eket jelölik. A nem folytonos nyíl (CyHV-1 ORF87 esetében) splicingra utal.

#### 6.2.4. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció

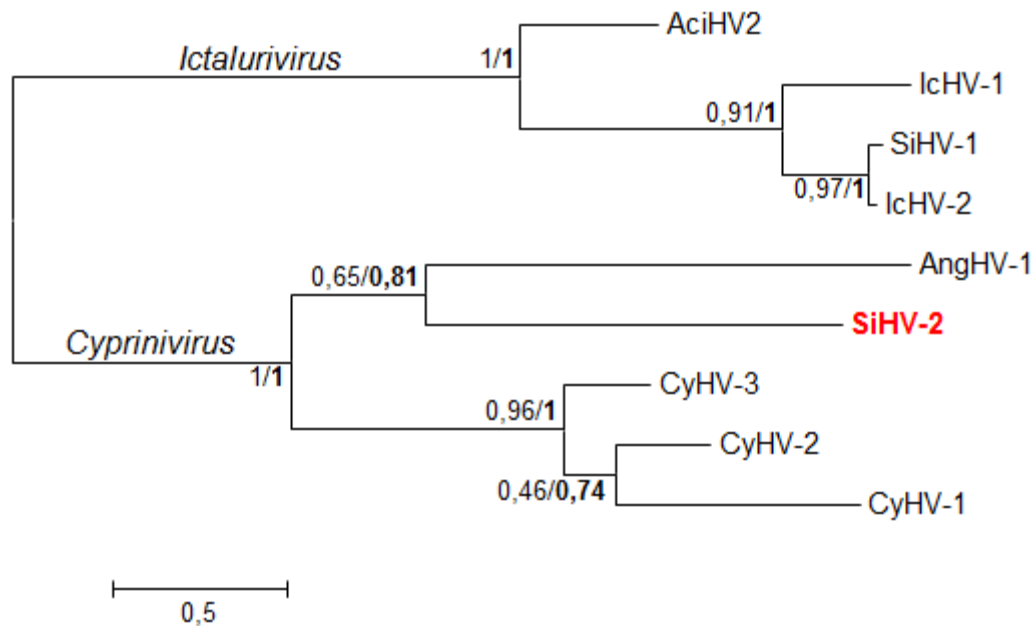
A alloHV-ok részleges DNS-polimeráz (18. ábra), termináz (19. ábra) és Allo60 (20. ábra) génjeinek 1474 as, 354 as, illetve 351 as hosszúságú többszörös illesztései alapján elvégzett törzsfarekonstrukciók alapján a SiHV-2 egyértelműen a *Cyprinivirus* nemzetségbe tartozik. A DNS-polimeráz, termináz és *Cyprinivirus* ORF87/45 homológ génekkel végzett törzsfarekonstrukciókban a SiHV-2 pozíciója megegyezett, a CyHV-ok és az AngHV-1 között helyezkedett el jól elkülönülő leszármazási vonalként. Az allo60 gén törzsfáján a SiHV-2 nem önálló ágon, hanem az AngHV-1 testvércsoportjaként helyezkedett el, de attól jól elkülönülve. A SiHV-2 taxonómiai pozícióját a *Cyprinivirusok* ORF87/45 homológ génjeinek törzsfaszerkezete is alátámasztja (21. ábra). A filogenetikai távolságok és az ágelágazások magas megbízhatósági értékei minden esetben alátámasztják a törzsfák szerkezetét. A törzsfarekonstrukciónál alkalmazott alloherpeszvírusok adatait a 2. melléklet tartalmazza.



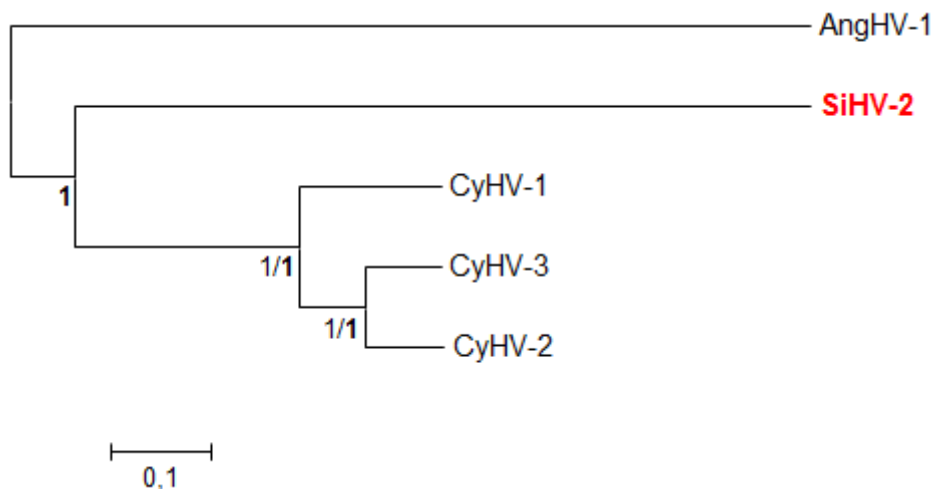
**18. ábra:** Az alloHV-ok DNS-polimeráz enzimének 1474 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,041, G=1,499). Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. A lesőharcsa-HV-t piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát mutatja.



**19. ábra:** A hal-alloHV-ok termináz enzimének 354 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, AIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,047, G=1,564). Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. A lesőharcsa-HV-t piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát mutatja.



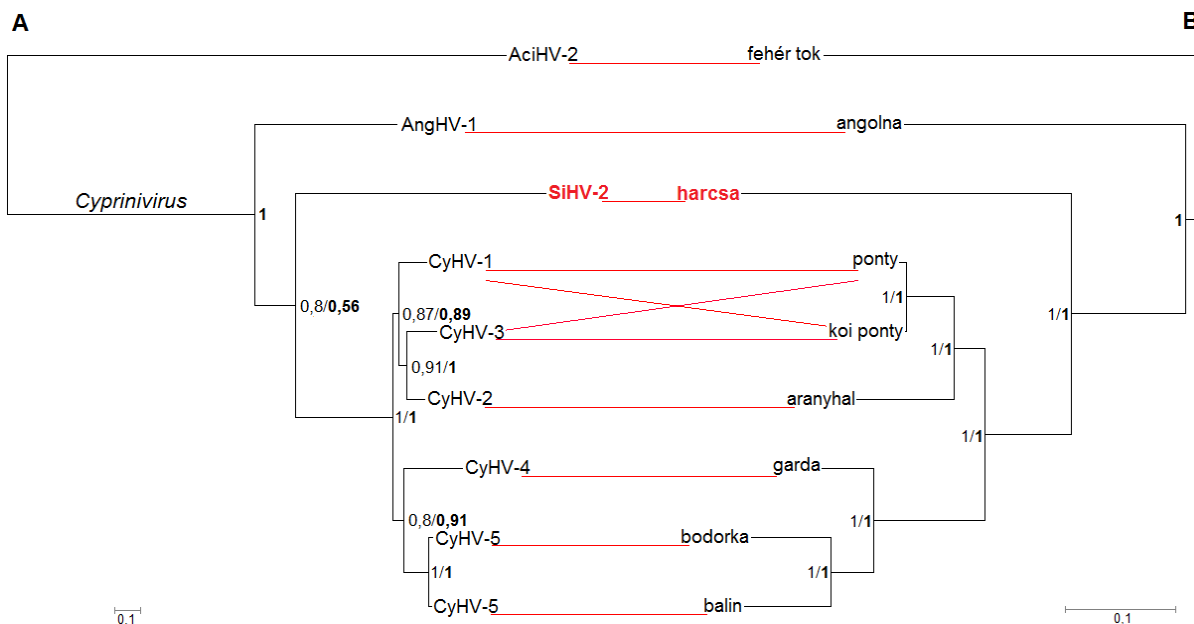
**20. ábra:** A hal-alloHV-ok Allo60 proteinjének 351 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell,  $I=0,054$ ,  $G=2$ , 136). Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. A lesőharcsa-HV-t piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciókénti számát mutatja.



**21. ábra:** A *Cyprinivirus* nemzetség képviselőinek ORF 87 (CyHV-ok) és ORF 45 (AngHV-1) homolog génjének 798 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített, középpontban gyökereztetett törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, WAG+G modell (Whelan és Goldman, 2001),  $G=0,616$ ). Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) jelzi. A lesőharcsa-HV-t piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciókénti számát mutatja.

A vírus–gazda koevolúció vizsgálatához felhasznált virális DNS-polimeráz és termináz gének származtatott aminosav szekvenciáiból egyesített többszörös illesztés, valamint a gazdafajok mitokondriális citokróm-c oxidáz I-es alegysége, citokróm-b és 16S riboszomális

RNS gének egyesített 2386 nukleotid hosszúságú illesztett szakasza alapján készült filogenetikai fák topológiája nagymértékben hasonló (22. ábra).



**22. ábra:** A *Cyprinivirus* nemzetség tagjainak (A) és gazdafajaiknak (B) filogenetikai kapcsolatait ábrázoló törzsfarekonstrukciók. A cyprinivírusok törzsfája a polimeráz és termináz gének 467 aminosav hosszúságú összevont többszörös illesztése alapján készült (maximum likelihood módszer, LG+G modell, G=1,195). Kulcsoportként az AciHV-2-t használtam. A gazdafajok filogenetikai fája a mitokondriális citokrom-c oxidáz l-es alegysége, a citokrom-b és a 16S riboszomális RNS gének 2386 nukleotid hosszúságú illesztett, konkatenált szakasza alapján készült (maximum likelihood módszer, GTR+I+G modell, I=0,3915, G=0,5827). Kulcsoportként a fehér tokot használtam. Az elágazások megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon írva) és posterior probability érték (félkövérrel írva) jelzi. Az ágvégek találkozásainál a vírusok és a gazdafajok neve és piros vonal jelzi a kapcsolatot. Az általam vizsgált vírust és gazdafaját piros, félkövér írásmóddal jelöltem. A törzsfák alatt található lépték az aminosav, illetve nukleotid szubsztitúciók pozíciónkénti számát mutatja.

### 6.3. CRESS DNS vírusok

#### 6.3.1. PCR-es vizsgálatok és genomszekvenálás

A replikációs fehérje konzervatív szakaszára tervezett nested PCR-rel a szűrővizsgálatok során 566 vizsgálati mintából 8 esetben kaptam pozitív eredményt úgy, hogy ezt követően a teljes vírusgenomot sikerült felerősíteni. Az eredetileg CV-ok kimutatására tervezett PCR protokoll (Halami és mtsai, 2008) és nested primerpár alkalmasnak bizonyult CyV és *Circoviridae* rokon CRESS DNS vírusok kimutatására is. Pozitív PCR-t eredményezett a dévérkeszeg, a razbóra, az angolna, a fenékjáró küllő, az amazóniai tejbéka és a vörösfülű ékszerteknőstől származó minták vizsgálata. A vírusok mindegyike újnak bizonyult a tudomány számára. Egy folyami gébtől (*Neogobius fluviatilis*) származó szervminta keverékből a sertés CV-2-es típusát mutattam ki.

A szűrővizsgálatokkal pozitívnak talált 8 minta mindegyikéből sikerült a genom teljes nukleotidsorrendjét meghatározni. Egyes esetekben (razbóra CV-1 és 2, fenékjáró küllő-asszociált CyV, amazóniai tejbéka-asszociált CRESS DNS vírus) molekuláris klónozással különítettem el a vírus nukleinsavat a járulékosan felerősített egyéb DNS szekvenciáktól. A sertés CV-2 teljes genomjának mérete 1766 nt és a GenBank adatbázisában található szekvenciák közül a BLASTn keresés alapján egy Brazíliából származó mintával (KT819161) mutatta a legnagyobb egyezést (99,15%).

### 6.3.2. Teljesgenom-analízis

A teljesgenom-analízis során az alábbiakban részletezett tulajdonságoknak megfelelően megállapítottam, hogy a 7 új vírusból 4 (a dévérkeszegtől, az angolnától és a razbórától kimutatott mindkét vírus) a cirkovírusok közé tartozott. A fenékjáró küllőtől leírt vírus ciklovírusnak, míg az amazóniai tejbéka vírusa CRESS DNS vírusnak bizonyult. A vörösfülű ékszerteknős vírusa a szekvenciák alapján szintén CRESS DNS vírus, de a genommérete kisebb. A PCR-es felszorzás után szekvenált CRESS DNS vírusok teljes genomjának fontosabb jellemzőit a 6. táblázat foglalja össze.

**6. táblázat:** A felerősített új CRESS DNS vírusok teljes genomjának fontosabb jellemzői

vírus	génbanki azonosító	gazda	genomméret (nt)	G+C (%)	REP (as)	CP (as)	nonanukleotid szekvencia (5'>3')
dévérkeszeg cirkovírus	KF358279	dévérkeszeg ( <i>Abramis brama</i> )	1906	47,32	313	257	TAGTATTAC
razbóra cirkovírus 1	MN837844	razbóra ( <i>Pseudorasbora parva</i> )	1816	50,66	318	243	TAGTATTAC
razbóra cirkovírus 2	MN837845	razbóra ( <i>Pseudorasbora parva</i> )	1819	50,63	318	244	TAGTATTAC
angolna cirkovírus 1	KC469701	angolna ( <i>Anguilla anguilla</i> )	1378	48,69	286	114	TAGTATTAC
fenékjáró küllő-asszociált ciklovírus	MN837846	fenékjáró küllő ( <i>Gobio gobio</i> )	2463	46,98	313	317	TAGTATTAC
amazóniai tejbéka-asszociált CRESS DNS vírus	MN837847	amazóniai tejbéka ( <i>Trachycephalus resinifictrix</i> )	1950	43,59	304	255	TAGTATTAC
vörösfülű ékszerteknős-asszociált CRESS DNS vírus	MN837848	vörösfülű ékszerteknős ( <i>Trachemys scripta elegans</i> )	1172	50,34	285	172*	CAGTATTAC

A \* Cp homológiával nem rendelkező feltételezett fehérje.

A Rep fehérjék származtatott aminosav szekvenciájában található megőrzött motívumokat a 23. ábra mutatja be. A *Circoviridae* családba tartozó, halban talált vírusok konszenzus szekvenciái között nagyobb a hasonlóság. A legjobban megőrzöttek az endonukleáz domén I-es és II-es motívuma, valamint a helikáz domén Walker B és MC szekvenciája bizonyult.

	RC endonukleáz domén	SF3 helikáz domén
	MI MII MIII	WA WB MC Arg.ujj
angolna:	CFTLNN-PHSQG-HNKDYCSK-GIPGCGKSRYAR-IILDDF-ITSN-ALYRRM	
dévérkeszeg:	CFTLNN-PHLQG-QNDEYCTK-GPPGCGKSRYAF-IIDDF-ITSN-ALMRRV	
razbóra 1:	CFTLNN-PHLQG-QNDEYCTK-GEPGCGKSRYCH-IIDDF-ITSN-ALMRRV	
razbóra 2:	CFTLNN-PHLQG-QNDEYCTK-GEPGCGKSRYCH-IIDDF-ITSN-ALMRRV	
fenékjáró küllő:	CFTLNN-PHLQG-DSQKYCSK-GKPGTGKSRYAL-IIDDF-ITSN-AISRRV	
amazóniai tejbéka:	CFTLNN-EHFQG-QARDYCMK-GPPGSGKSRKAK-VIDDF-ITSN-ALTRRI	
vörösfülű ékszerteknős:	CFTINN-EHLQG-QAADYCKK-GKAGCGKSRRAR-IILDDF-ITSN-AIKRRF	

**23. ábra:** Az új CRESS DNS vírusok Rep fehérjéjének doménszerkezete és szekvencia motívumai. Rövidítések: MI-MIII: motívum I-III, WA: Walker A, WB: Walker B, MC: C motívum, Arg. ujj: erősen konzervált, katalitikusan aktív arginin ujj.

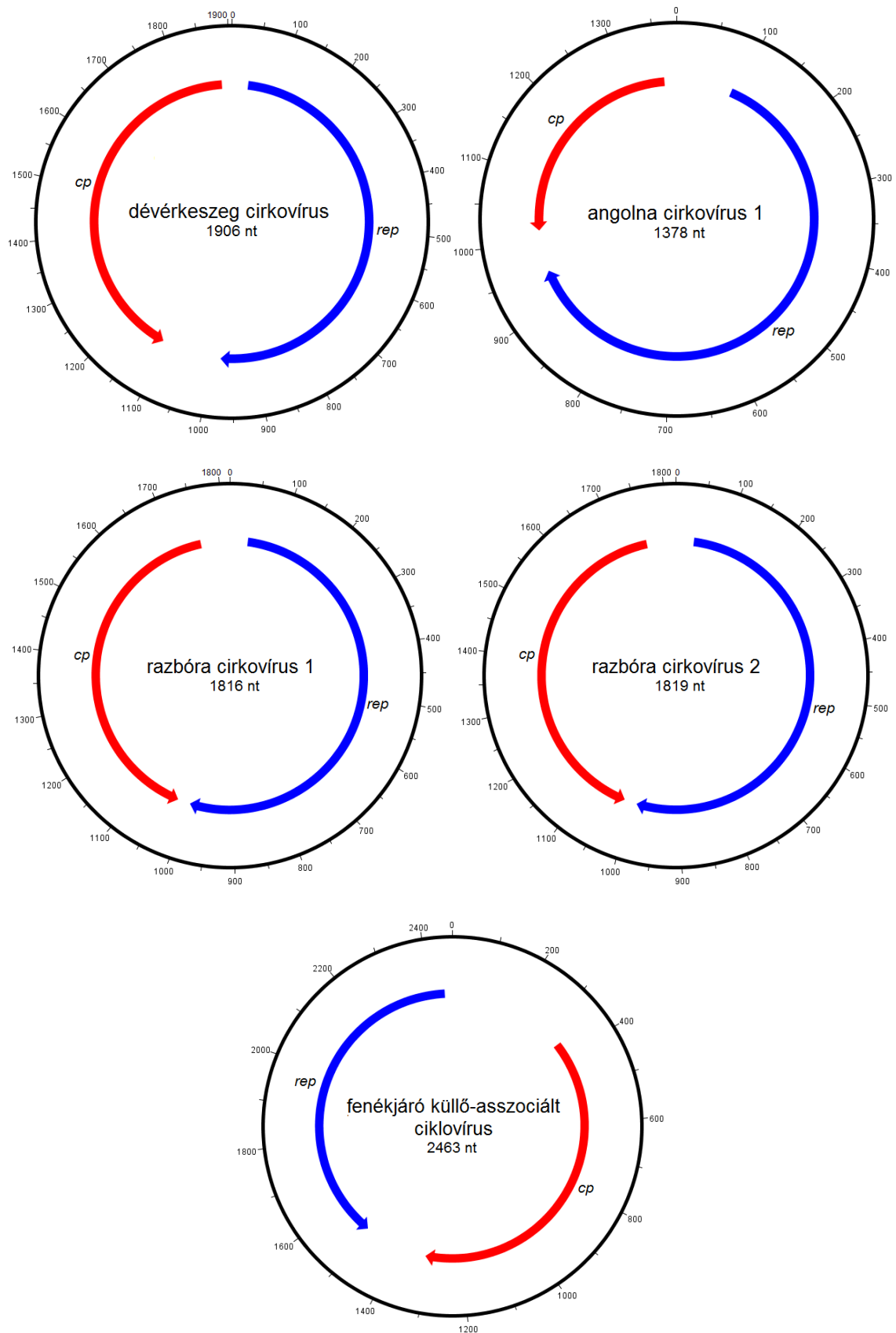
Az új vírusok genomszerveződését a 24. és a 25. ábra szemlélteti. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a jellemzett vírusok közül a dévérkeszegtől, a razbórától, a fenékjáró küllőtől és az amazóniai tejbékától komplett, intakt genomokat sikerült felerősíteni. Ezeknek a vírusoknak az esetében a genomok és az egyes ORF-ek mérete megfelelő, a replikációs fehérjét és a kapszidfehérjét kódoló ORF-ek antiszensz irányultságúak, az amazóniai tejbéka-asszociált CRESS DNS vírus kivételével, amelynek genomjában a két gén azonos irányban (szensz) kódol. A genomban található két fő ORF (*rep* és *cp*) orientációja a dévérkeszeg, a razbóra és az angolna vírusainak esetében megegyezik a *Circoviridae* család *Circovirus* nemzetségébe tartozó vírusokban leírt irányokkal, míg a fenékjáró küllőtől felerősített genomszekvenciában a leolvasás iránya ezzel ellentétes, a *Cyclovirus* nemzetség tagjaiban megfigyelt orientációra jellemző.

Az angolna esetében a teljes *rep* szekvencia mellett csonkának tűnő *cp* szekvenciát kaptam az inverz PCR termékéből, amely start (Met) kodonnal kezdődik és stop (TAG) kodonnal végződik. A származtatott aminosavsorrend alapján az N-terminális, argininben gazdag régió is megtalálható, de mindössze 114 as-ból áll, ami jelentősen kevesebb, mint az átlagos (>200 as) méretű CV kapszidfehérje. A teljes genom mérete kisebb (1378 nt), mint általában a CV-oknak (6. táblázat).

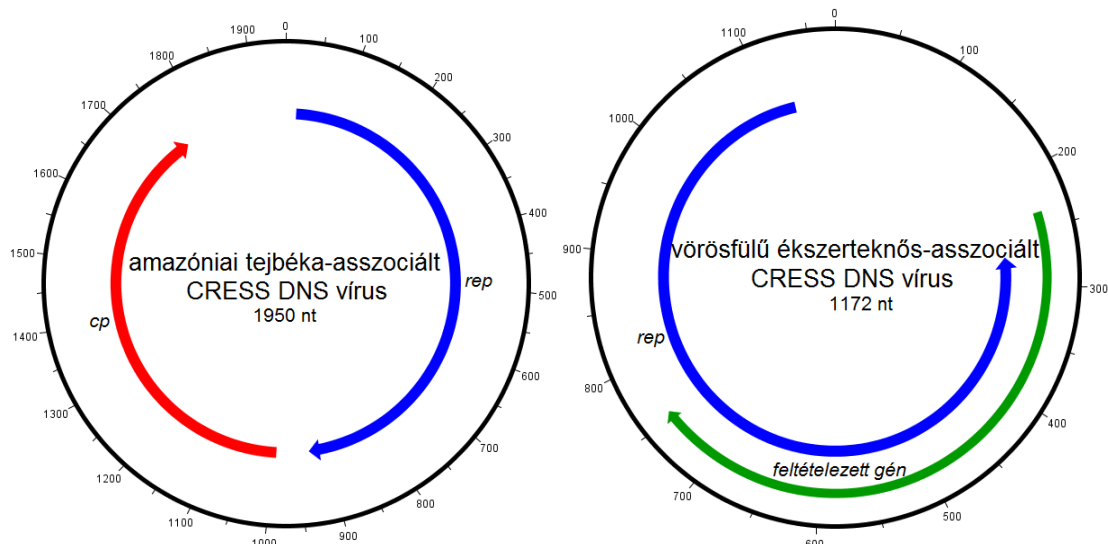
A vörösfülű ékszerteknősből származó CRESS DNS szintén szabályosnak tűnő *rep* génnel rendelkezik, azonban a másik kódoló régió - amely start (ATG) kodonnal kezdődik és stop (TGA) kodonnal végződik - homológia keresése során nem tudtam kapszid hasonlóságot felfedezni. Ezt megerősíti az a tény, hogy az aminosavlánc N-terminális végén nem található meg az argininben gazdag bázikus régió, valamint a hossza is rövidebb (172 as) az átlagos CV Cp méreténél. Genommérete CRESS DNS vírusokhoz képest kicsi (1172 nt). A *rep* és a feltételezett fehérjét kódoló ORF leolvasási iránya és pozíciója egymással ellentétes, de átfedő (20. ábra).

A razbórától kimutatott két CV teljes genomiális DNS-ének páros illesztése alapján számított szekvencia azonosság 97,6%.





**24. ábra:** A *Circoviridae* családba tartozó újonnan kimutatott CRESS DNS vírusok sematikus ábrája. A genomméretek megadása a szárhurok régióban található nonanukleotid szekvencia első nukleotidjával kezdődik. Rövidítések: *rep*: a replikációs fehérjét kódoló ORF, *cp*: kapszidfehérjét kódoló ORF.



**25. ábra:** A *Circoviridae* családba nem sorolható újonnan kimutatott CRESS DNS vírusok sematikus ábrája. A genomméretek megadása a szárhurok régióban található nonanukleotid szekvencia első nukleotidjával kezdődik. Rövidítések: *rep*: a replikációs fehérjét kódoló ORF, *cp*: kapszidfehérjét kódoló ORF. Zöld szín a kapszid homológiát nem mutató feltételezett fehérjét kódoló ORF-et jelöli

### 6.3.3. Törzsfa-rekonstrukció, rendszertan és evolúció

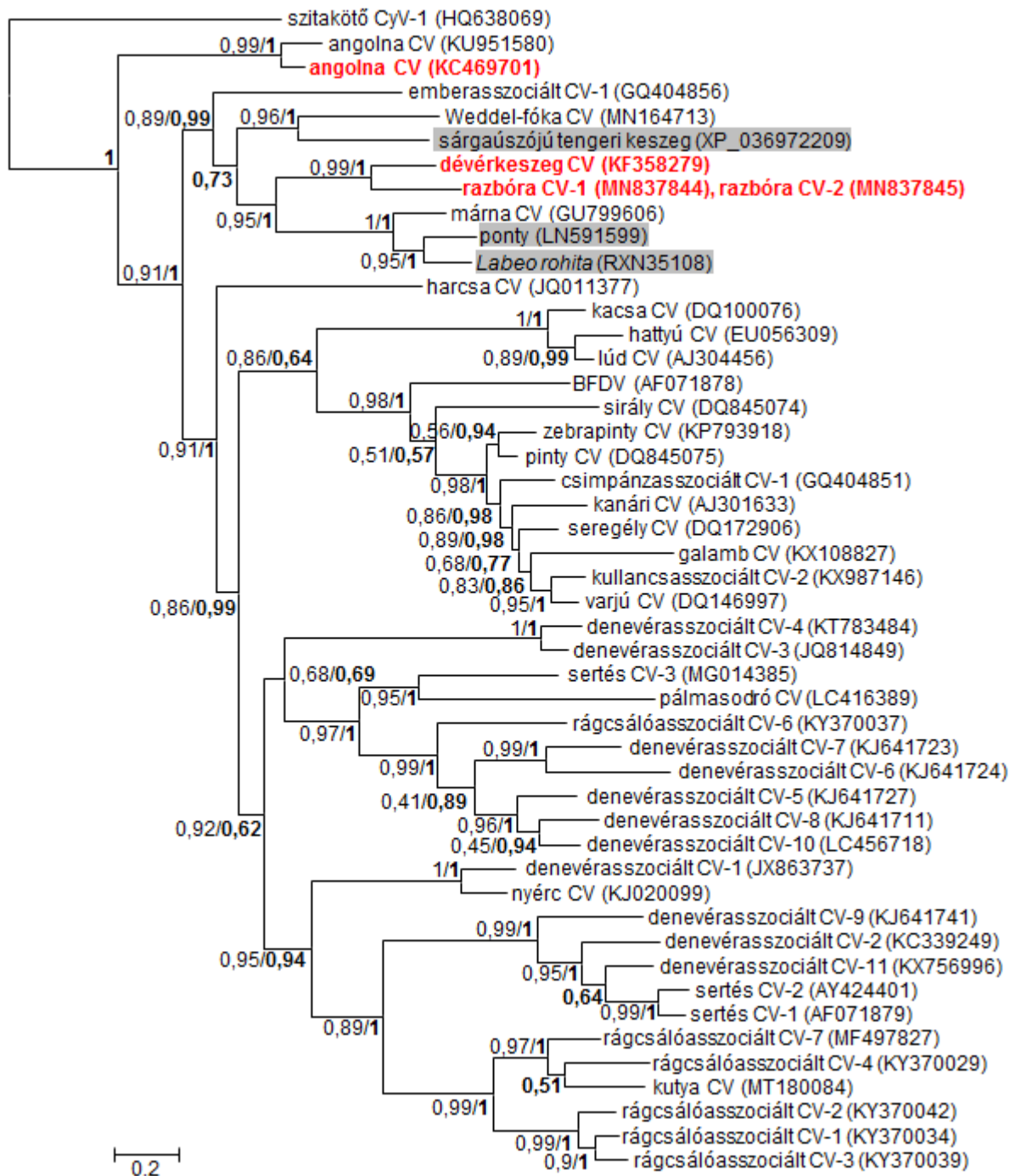
Az egyes elemzésekhez a nemzetközi szakirodalomban széles körben használt teljes Rep származtatott aminosavsorrendjeit használtam. Az elvégzett törzsfa-rekonstrukciók eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált CRESS DNS vírusok mindegyike az *Arfiviricetes* osztályba, azon belül pedig a *Cirivirales* rendbe tartozik. A 6.3.2. fejezetben ismertetett genomszerveződésre irányuló vizsgálatok eredményeit a törzsfa-rekonstrukciók minden esetben alátámasztják.

A BLAST homológiakeresések, valamint az előzetes filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a *Circoviridae* család evolúciójának vizsgálatát elvégeztem külön-külön a CV-ok (26. ábra) és a CyV-ok (27. ábra) vonatkozásában is. Erre a megközelítésre a CRESS DNS vírusok rendkívüli Rep-szekvencia diverzitása miatt volt szükség, mert így állíthatók elő a leghomogénebb többszörös illesztések, az adatainkra legjobban illeszkedő modelltesztek, valamint a nemzetségeken belüli leszármazástani viszonyokat legpontosabban ábrázoló törzsfa-rekonstrukciók. Ugyanakkor a CV-ok és a CyV-ok közti leszármazástani viszonyok rekonstruálása érdekében végeztem egy *Circoviridae* családot egészében vizsgáló törzsfa-rekonstrukciót is külcsoport bevonásával (28. ábra). A *Circovirus* nemzetség hivatalosan már rendszerbe foglalt tagjainak felhasználásával elvégzett törzsfa-rekonstrukciók alapján a halakból kimutatott CV-ok nem monofiletikus leszármazásúak, hanem három ágra (angolna CV-ok, lesőharcsa CV és egyéb halból származó CV-ok) tagolhatók. Ugyanakkor elmondható, hogy a három ág együttesen a *Circovirus* nemzetség egyéb besorolt tagjaihoz viszonyítva bazális pozícióban helyezkedik el. A dévérkeszeg és a razbóra CV-ai az angolna és a lesőharcsa CV-ok között helyezkednek el a legnépesebb ágon belül testvércsoportokként.

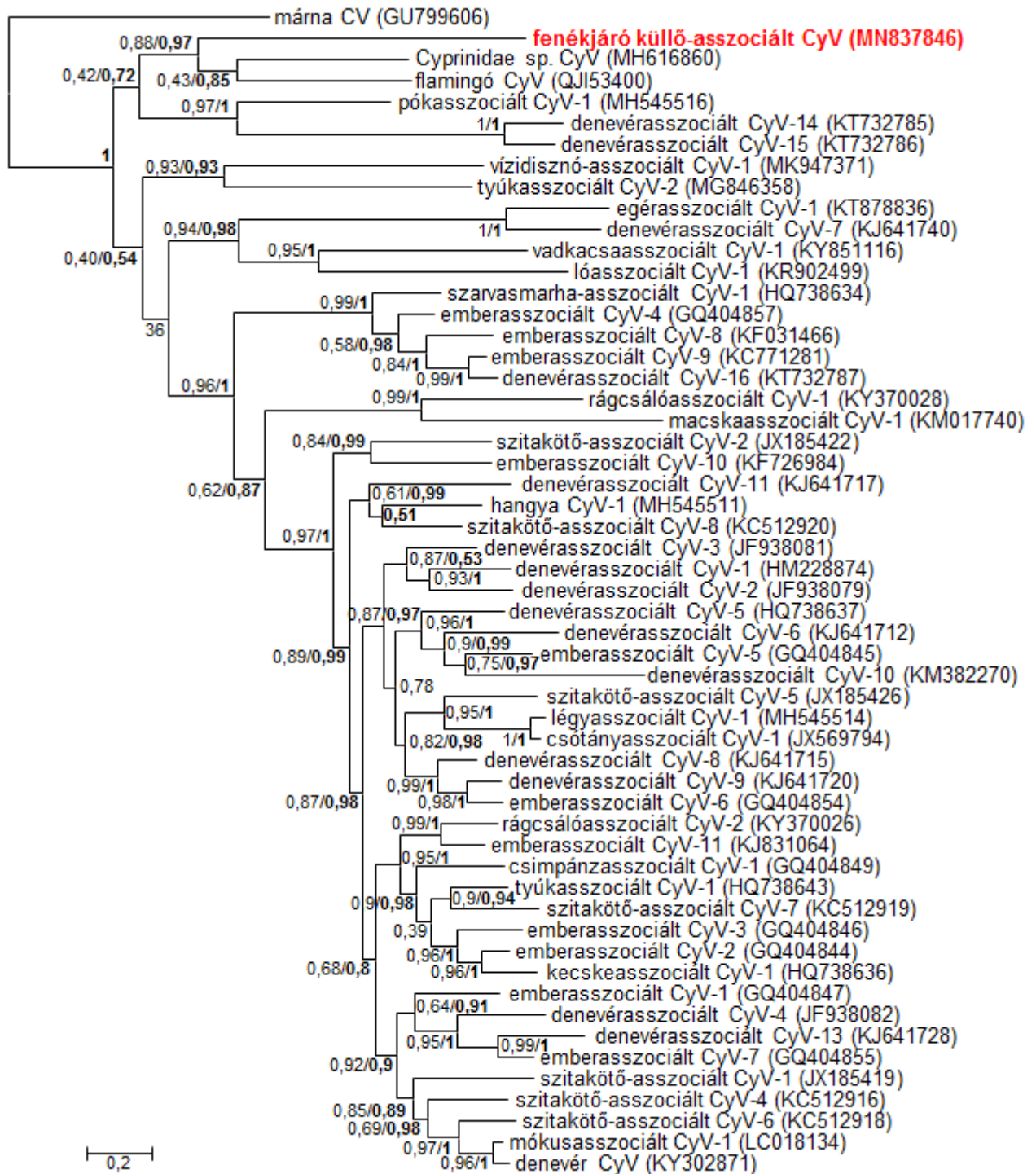
A fenékjáró küllőből kimutatott vírus a törzsfa-rekonstrukciókon a *Cyclovirus* genusba tartozik. Legközelebbi rokonai a metagenomikai vizsgálatok során halból (Cyprinidae) kimutatott CyV és egy flamingó fajból (*Phoenicopteridae* sp.) ismertté vált, a *Circoviridae* családba tartozó, de hivatalosan még nem besorolt vírus.

Az *Arfiviricetes* osztály *Circoviridae* családba nem sorolható taxonjainak filogenetikai elemzését külön-külön végeztem el. A vörösfülű ékszerteknősből származó vírus a CRESSV2-es víruskládba tartozik (29. ábra), ugyanakkor a tejbékából kimutatott vírus a CRESSV1-es csoport tagja vagy egy jelenlegi állás szerinti ismeretlen kládba sorolandó (30. ábra). A rokonsági viszonyokat tekintve ez utóbbi jelenleg nem dönthető el pontosan, mivel a rokonságába tartozó vírusok pontos besorolása hivatalosan még nem történt meg. Mindkét vírus esetében elmondható, hogy a törzsfán jól beágyazottan találhatók az adott kládok képviselői között.

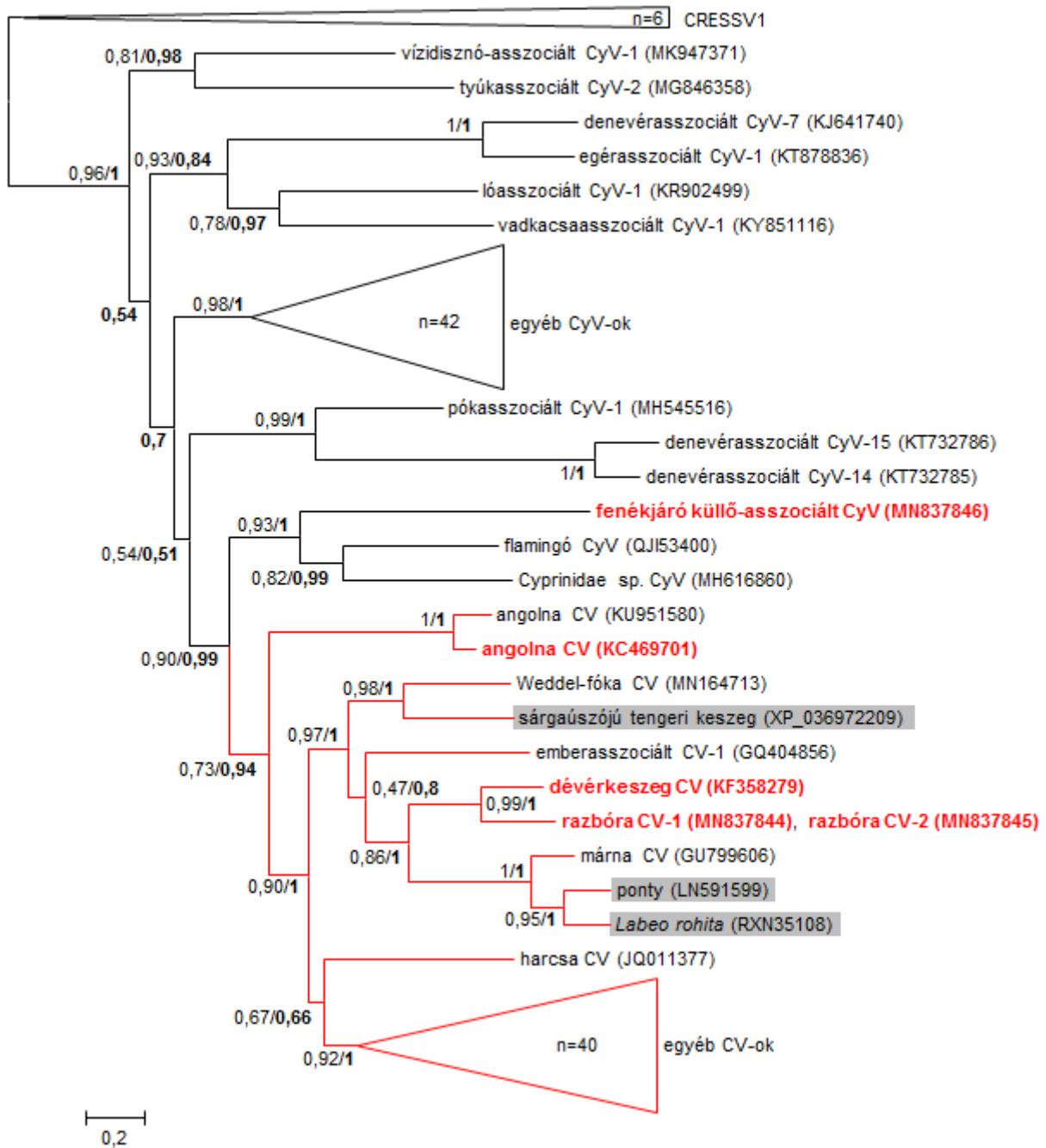
A többi rokon vírustól számított filogenetikai távolság mértéke mindegyik vírus esetében alátámasztja az új fajként történő besorolásukat. Az elágazások megbízhatóságának jellemzésére szolgáló magas aLRT és posterior probability értékek a törzsfák topológiáját megerősítik.



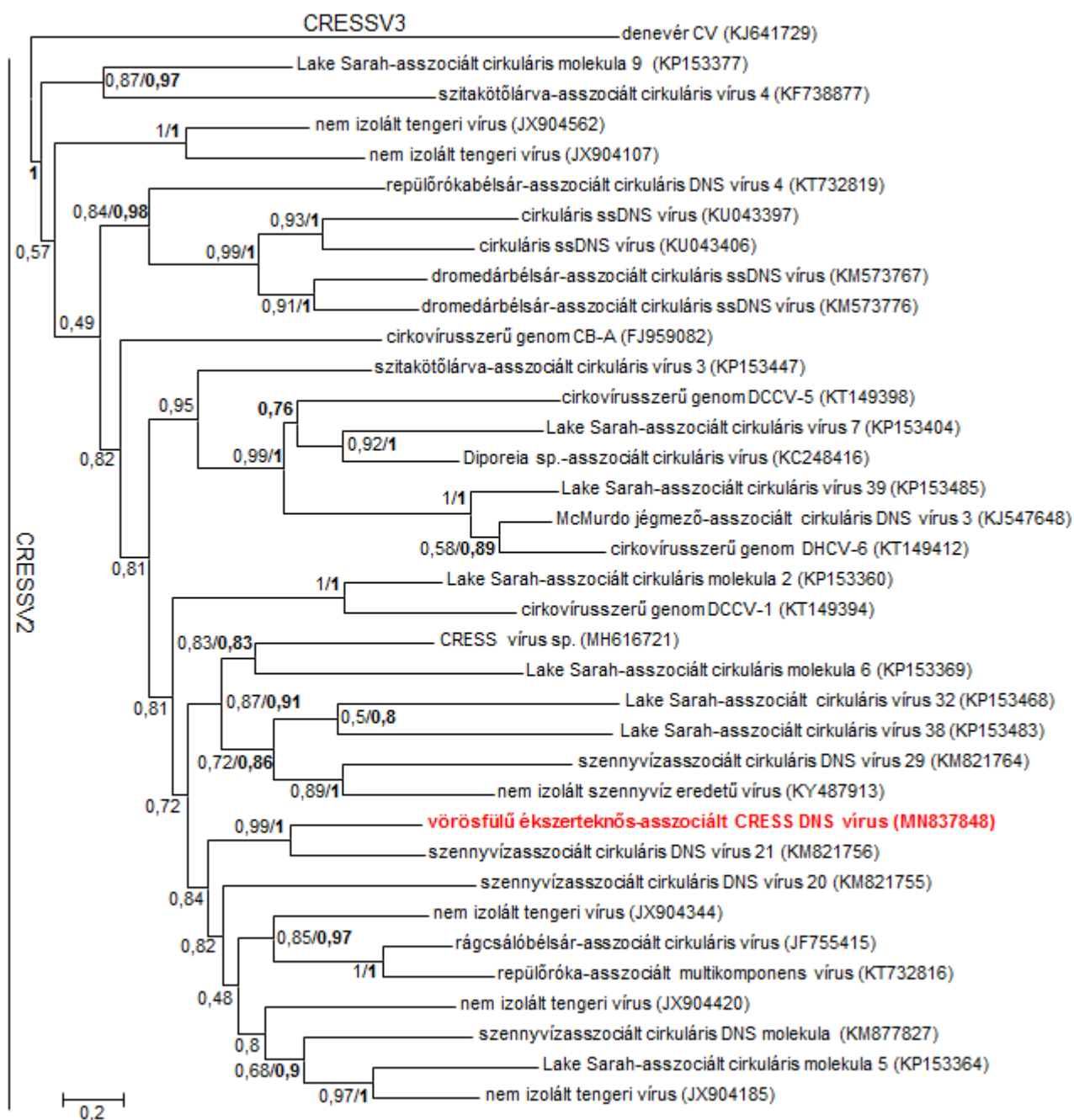
**26 ábra:** A *Circovirus* nemzetség képviselőinek replikációs proteinje alapján készített, 441 aminosavból álló illesztett szakasza törzsfarekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,082, G=1,034). Kulcsoportként a szitakötő CyV-1 szerepel. A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) mutatja. Az újonnan kimutatott CV-okat piros, félkövér betűtípus jelöli. Szürke háttérrel a BLAST homológia keresés során kapott haleredetű genomális DNS szekvenciák szerepelnek. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát jelzi.



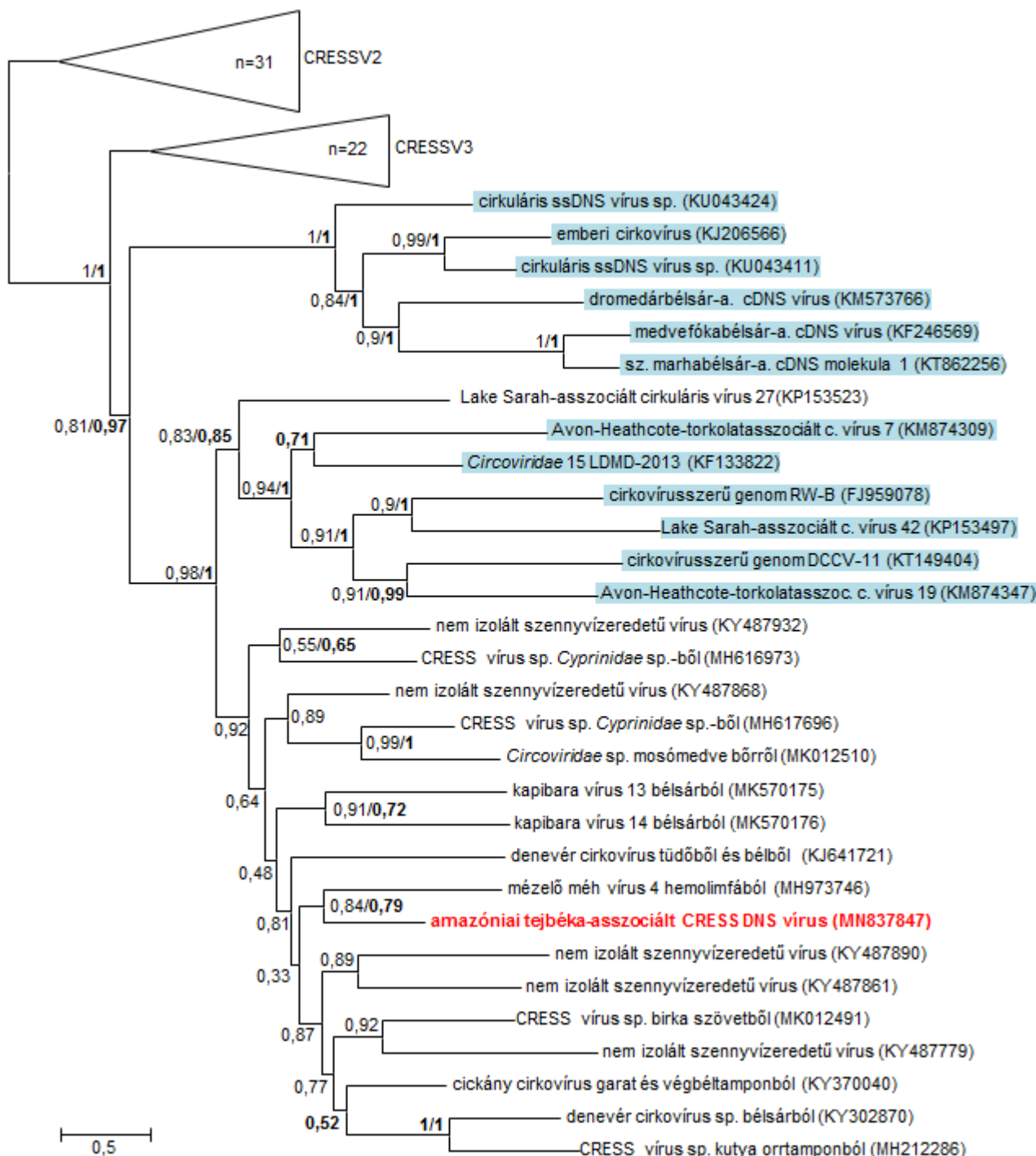
**27. ábra:** A *Cyclovirus* nemzetség képviselőinek replikációs proteinjének 551 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+G modell, G=0,796). Kulcsoportként a márna cirkovírus szerepel. A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) mutatja. Az újonnan kimutatott CyV-t piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát jelzi.



**28. ábra:** A *Circoviridae* család *Circovirus* (piros ágrendszerrel) és *Cyclovirus* (fekete ágrendszerrel) nemzetségek replikációs proteinjének (Rep) 855 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített törzsfa-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,017, G=1,006). Kulcsoportként a CRESSV1 klád néhány tagja szerepel. A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) mutatja. Az újonnan kimutatott vírusokat piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozícionkénti számát jelzi. Szürke háttérrel a BLAST homológia keresés során kapott haleredetű genomiális DNS szekvenciák szerepelnek.



**29. ábra:** A *Cirivirales* rendbe tartozó CRESSV2 klád replikációs proteinjének (Rep) 480 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített törzsfá-rekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, LG+I+G modell, I=0,049, G=1,263). Kulcsoportként egy CRESSV3 csoportba tartozó denevér vírusa szerepel. A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) mutatja. Az újonnan kimutatott vírust piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciókenti számát jelzi.



**30. ábra:** A *Cirivirales* rendbe tartozó CRESSV1 (kék háttérrel), CRESSV2 és CRESSV3 kládok replikációs proteinjének 1049 aminosavból álló illesztett szakasza alapján készített törzsfarekonstrukció (maximum likelihood módszer és Bayes-i analízis, BIC szelekciós kritérium, RtREV+I+G+F modell (Dimmic és mtsai, 2002), I=0,007, G=1,144). A még be nem sorolt CRESS DNS vírusokat színes háttér nélkül, normál írásmóddal ábrázoltam. Kulcsoportként a CRESSV2 csoport szerepel. A topológia megbízhatóságát Shimodaira–Hasegawa-szerű közelítő likelihood-ratio érték (normál módon szedve) és posterior probability érték (félkövér betűtípussal ábrázolva) mutatja. Az újonnan kimutatott vírust piros, félkövér betűtípussal jelöltem. A lépték az aminosav szubsztitúciók pozíciónkénti számát jelzi.



## 7. MEGBESZÉLÉS

### 7.1. Vörösfülű ékszerteknős-adenovírus

#### 7.1.1. Részleges genomanalízis

Az új nemzetség létrehozásához a teljes genom szekvenciájának kinyerését tűztük ki célul. A kutatások kezdetén csak a DNS-polimeráz és a hexon gének 448 bp, illetve 430 bp méretű szakaszai voltak ismertek. A RESAdV-1 részleges genomelemzése során az AdV-ok E2B (IVa2, DNS-polimeráz, pTP), L1 (52K, pIIIa), L2 (III, pVII, pX) és L3 (pVI, hexon) régióban található géneket sikerült azonosítanom a víruscsaládra általában jellemző sorrendben és orientációban (7. ábra). A diagnosztikai PCR-rel felerősített, konzervatívnak minősülő rövid DNS-polimeráz szakaszok molekuláris klónozással történő vizsgálatának eredményei a RESAdV-1 polimorfizmusát mutatják. A vírusok nukleotid és aminosav szinten is meglévő heterogenitása a hosszútávú evolúciót támasztja alá. A nukleinsav változatok a jelenleg is zajló genomevolúció alapjai, amelyek közül a természetes szelekció a fitness alapján kiszelektálja a legrátermettebb változatokat. A gazdafaj díszállat-kereskedelemnek köszönhetően egyre szélesebb elterjedési területe miatt fellépő környezeti változások feltételezhetően intenzív genetikai adaptációs mechanizmusokat hívtak életre a RESAdV-1 örökítő anyagában. Ennek részeként értékelem a polimeráz enzimefehérje nukleotid, illetve származtatott aminosavsorrendjeiben tapasztalható szekvenciavariánsokat. Ezt a feltételezést megerősíti, hogy azok a minták sem voltak nukleotid és aminosav szinten sem egységesek, amelyekben csak egy vírusváltozat szerepelt. A közönséges ékszerteknős poikiloterm gerinces, aktivitása napszakosan és évszakosan is illeszkedik élőhelye hőmérsékleti paramétereire. Ez feltételezhetően hatással van a sejt magjában szaporodó RESAdV-1 által kódolt DNS-polimeráz aktivitására, ezen keresztül pedig a vírus replikációjára is. Egy olyan polimeráz-enzimváltozat, amely a vad változattal szemben bármilyen adaptációs előnyt (pl. alacsonyabb hőmérsékleten is képes működni, vagy a vad változat hőmérsékleti optimumán, annál magasabb szinten képes katalízisre, esetleg növeli a polimeráz 5'-3' exonukleáz aktivitását és ezzel a proofreading hibajavító aktivitás határfokát) biztosít a vírus számára, elterjed a populációban és evolúciósan stabil stratégiaként (ESS) rögzülhet a génkészletben. Az ékszerteknős nagyon sikeres inváziós fajként gyorsan terjed és ebben szerepet játszhat többek között a különböző élőhelyek klimatikus tényezőihez történő enzimadaptáció is.

A vizsgált RESAdV-1 fehérjeszekvenciákban az AdV-ok proteáz génje által kódolt endopeptidáz (proteáz) hasítási mintázatok I-es, II-es, IIb és III-as típusait sikerült azonosítanom. A prekursor proteinek proteáz általi vágása ősi evolúciós sajátosság az AdV-ok szaporodási ciklusának érési fázisában (Davison és mtsai, 2003). A pVI, pVII és pX prekursor fehérjék endopeptidáz vágási helyeinek (9., 10. és 11. ábra) vizsgálata alapján elmondható, hogy a RESAdV-1 az eddig leírt öt AdV nemzetségtől mindhárom esetben többé-kevésbé (az

első jellemző a pVI és pX esetében, míg az utóbbi a pVII esetében) eltérő molekuláris mintázatot figyelhetünk meg. A pVIc kofaktor hossza szemben az összes többi AdV nemzetségnél tapasztalt 11 as-val, a RESAdV-1 esetében 10 as hosszúságú és a szekvenciájában a mastadenovírusokhoz és az aviadenovírusokhoz hasonlóan megtalálható egy argininben gazdag bázikus rész. A kofaktor utolsó előtti (9.) as pozíciója hasonlóan a többi nemzetséghez az RESAdV-1 esetében is megőrzött. Az itt található cisztein diszulfid hidat képez a proteáz adott ciszteinjével (az enzimaktivitás biztosításáért felelős úgynevezett triád egyik kitüntetett aminosava a proteáz as szekvenciájában) ami az irodalmi adatok szerint a proteínáz enzimaktivitását több nagyságrenddel megemeli (Webster és mtsai, 1993). A filogenetikai elemzés szerint az RESAdV-1 testvércsoportjának számító WSAdV-1 pIIIa molekulájában nem található jellegzetes vágási hely, ugyanakkor a pTP-ben az RESAdV-1-hez hasonlóan három (két II-es és egy I-es típusú) hasítási hely található, azonban ezek szekvenciája alapvetően különbözik az RESAdV-1 motívumokétól. A proteáz vágási szignálok az egyes AdV nemzetségekben taxonómiai markerként jól megőrzöttek. A hasítási mintázatoknak a fertőzőképes virion kialakulásában esszenciális szerepük van, így a RESAdV-1 esetében tapasztalt eltérések megerősítik a törzsfarekonstrukciók eredményeit és támogatják a *Testadenovirus* nemzetség hivatalos elismerését, valamint az RESAdV-1 új vírusfajként történő besorolását.

A teljes hosszúságú géntermékek méretének vizsgálata alapján kapott eredmények szintén alátámasztják az új nemzetség létrehozásának igényét. Az AdV-ok között átlagos méretűnek mondható DNS-polimeráz, a pTP és a pentonbázis mellett a többi gén vagy hosszabb (52K, pIIIa, pVI és pX) vagy rövidebb (pVII) a vizsgált AdV-ok homológ génjeinél.

A pIIIa-t és a pentonbázist kódoló régiók között sikerült azonosítani a pTP mRNS-ének feltételezett splicing helyét (8. ábra). Ennek szerkezete eltérő a más AdV-okban leírtaktól, mert az 5' exon kizárólag a metionint kódoló ATG tripletre (start kodon) korlátozódik. Hasonlóan rövid 5' exonra (6 nukleotid hosszúságú) az *Aviadenovirus* nemzetség képviselői között találunk példákat.

### **7.1.2. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció**

A teknősök rendje (order Testudines) jelenlegi ismereteink szerint 361 fajt foglal magába (<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>). A gerinces állattan egyik máig sem teljesen tisztázott kérdése éppen a teknősök (*Testudines*) leszármazásával kapcsolatos (Zardoya és Meyer, 2001; Joyce és Gauthier, 2004; Werneburg és Sánchez-Villagra, 2009; Chiari és mtsai, 2012; Hedges, 2012; Lee, 2013; Crawford és mtsai, 2015). A zoológiai és paleontológiai vizsgálatok korábban a legősibb hüllővonalnak, az Anapsida fejlődési ágnak gondolták, azonban a modern molekuláris vizsgálatok eredményei alapján alkotott vélemények szerint a Diapsida fejlődési irányhoz tartozó csoport (Zardoya és Meyer, 1998; Lee, 2013;

Schoch és Sues, 2016). Jelenleg biztosnak tűnik, hogy a teknősök a krokodilokat és a madarakat is magába foglaló Archosauria klád testvércsoportja (Chiari és mtsai, 2012; Shaffer és mtsai, 2017), amellyel együtt az Archelosauria kládot alkotja (Crawford és mtsai, 2015). Mindenesetre a paleontológiai és a molekuláris biológiai adatok alapján jelenlegi tudásunk szerint a teknősök legkorábbi képviselői mintegy 220–260 millió évvel ezelőtt már léteztek és feltételezhetően szárazföldi életmódot folytattak (Joyce és Gauthier, 2004; Scheyer és Sander, 2007; Li és mtsai, 2008; Schoch és Sues, 2015; Thomson és mtsai, 2021). Ez az időintervallum egyben megadja az AdV-okkal feltételezett közös fejlődésük időbeli felső határát is.

Ennek a specializálódott testfelépítésű, viszonylag kis fajszerű állatcsoportnak legtöbb képviselője védelemre szorul. Ezért az esetlegesen előforduló vírusfertőzések felderítése, és ennek függvényében a megfelelő óvintézkedések (karantén, állatkerti fajvédelmi és szaporítási programok, élőhelyvédelem, esetleges vakcinázás stb.) bevezetése az önfenntartó teknős állományok hosszú távú megmaradásában is fontos szerepet játszhat. Különböző teknősfajokban napjainkig számos DNS- és RNS-vírus előfordulását írták le (Ariel, 2011; Marschang, 2011). Annak eldöntése, hogy egy állat az adott vírusnak csak átmeneti, passzív hordozója, vagy aktívan megfertőződő, tényleges gazdája, mind a kutatók, mind a gyakorló állatorvosok számára fontos kérdés lehet. A gazdaspecificitással és a feltételezett gazdaváltással kapcsolatos események nyomaira több víruscsalád (pl. *Flaviviridae*, *Herpesviridae*), ill. nemzetség (pl. *Lentivirus*, *Novirhabdovirus*, *Poliomavirus*, *Ranavirus*) tagjainak esetében is bizonyítékokat véltek felfedezni (Bandín és Dopazo, 2011; Sharp és Simmonds, 2011).

Az *Adenoviridae* család gazdaspektruma széles, az AdV-ok a ma ismert főbb gerinces csoportok legtöbb képviselőjében megtalálhatóak. Feltételezésünk szerint az AdV-ok ma látható sokfélesége alapvetően a gazdával történt koevolúció során alakult ki (Benkő és Harrach, 2003). Ezt alátámasztja az AdV-ok és gazdafajaik törzsfái közötti feltűnő topológiai hasonlóság (Harrach, 2000, Podgorski és mtsai, 2018; Ntumvi és mtsai, 2021). A törzsfákon elfoglalt pozíciók és a filogenetikai távolságok a *Testadenovirus* nemzetség AdV családon belüli feltételezhetően ősi leszármazását valószínűsítik. A rövid DNS-polimeráz aminosavszekvenciák alapján készített törzsfa-rekonstrukcióink eredménye azt mutatja, hogy nem különíthetők el alfajok szerinti kládok, tehát az ékszerteknős-AdV gazdaspeciációja fajszerűen érvényesül.

Az AdV-ok többségére általában jellemző a gazdafaj-specifitás, azonban ismerünk olyan AdV-okat is, amelyek több, evolúciós szempontból közeli, vagy ritkábban távolabbi gazdafaj egyedeit is képesek megfertőzni (Benkő, 2004). Már több állatcsoport, elsősorban a madarak és kérődzők esetében kimutatták, hogy egyedeik eltérő nemzetségbe tartozó AdV-okkal is fertőződhetnek. Házityúkban például a madarakkal végig együtt fejlődött leszármazási vonalnak tartott aviadenovírusok mellett az *Atadenovirus* és *Siadenovirus* nemzetségbe sorolt vírusok is előfordulhatnak. Kutatócsoportunk elképzelése szerint a két utóbbi vírusnemzetség

tagjai gazdaváltással juthattak madarakba, és adaptációjuk eredményeként napjainkra már több madárfaj sikeres fertőzésére is képessé váltak. A gazdaváltáson átesett AdV-ok az új gazdában általában súlyosabb, klinikai betegségben is megnyilvánuló fertőzést okoznak (Benkő és Harrach, 2003; Benkő, 2004; Davison és mtsai, 2003). Feltételezzük, hogy a vörösfülű és sárgafülű ékszerteknősökből kimutatott AdV-ok az ékszerteknősök saját AdV vonalát képviselik, hosszú távú, közös evolúció eredményeként alkalmazkodtak gerinces gazdáikhoz. Ezt a feltételezést támasztja alá az eddig felfedezett testadenovírusok és gazdáik filogenetikai rekonstrukciójának nagyfokú hasonlósága is (15. ábra). Hipotézisünk szerint a teknősök közös őst már fertőzte adenovírus, amely a fajképződés során a kialakuló teknős fajokkal együtt fejlődött tovább kialakítva a ma megfigyelhető változatosságot. A hosszú távú koevolúció mellett a testadenovírusok feltételezett ősi leszármazását a törzsfa-rekonstrukciókon elfoglalt pozíciója és más AdV-okhoz viszonyított nagy filogenetikai távolsága is alátámasztani látszik (12., 13. és 14. ábra). A filogenetikai elemzéseknél az enzimfehérje (DNS-polimeráz) és a szerkezeti fehérjék (hexon és pentonbázis) használatával a célt a különböző funkcióval rendelkező fehérjékre ható, feltételezhetően különböző szelekciós mechanizmusok által hajtott evolúciós utak összehasonlítása volt. A fenti három AdV-fehérje funkciójának és szerkezetének feltételezhetően szigorúan bizonyos keretek között kell maradnia hiszen kulcsfontosságú szerepük van a replikáció folyamatában (DNS-polimeráz) és az integritás, ezen keresztül pedig a fertőzőképesség (pentonbázis és hexon) fenntartásában. Az ilyen típusú fehérjékre erős tisztító szelekció hat, amely kevesebb aminosav változással jár. Ez pedig azt eredményezi, hogy evolúciójuk lassúbb folyamat, mint a kevésbé szigorú kontroll alatt álló proteineké (Liu és mtsai, 2008). Feltételezésem szerint ezeknek a proteineknek az alapján elvégzett filogenetikai vizsgálatok eredményeinek az összehasonlításával a valós viszonyokat reálisabban tükröző képet kaphatunk a RESAdV-1 leszármazásáról, mintha azonos vagy nagyon hasonló funkcióval rendelkező fehérjéket vizsgálnánk, amelyek feltehetően hasonló kényszerfeltételek mentén változtak az idők során. A DNS-polimeráz és a pentonbázis alapján végzett filogenetikai számítások a nemzetségek között nagyon hasonló leszármazási kapcsolatokat mutatnak. A hexon génnel végzett törzsfa-rekonstrukció ettől némiképp eltérő szerkezetet mutat. Ezek az eredmények a fenti elképzelést látszanak alátámasztani és feltételezhetően az AdV-ok evolúciója során végbemenő, a vírusoknak egymással és a gazdáikkal történő kölcsönhatásának az eredményeként értelmezhetők.

Egyelőre nem bizonyított, de rendszeresen megfigyelhető jelenség, hogy a feltételezett gazdaváltáson átesett AdV-ok genomiális DNS-ének bázisösszetétele erősen eltolódik az A+T túlsúly irányába. Ezt tükrözi az *Atadenovirus* genus elnevezése, ugyanis e nemzetség első, alapító képviselőinek, a korábban a mastadenovírusok úgynevezett kettős alcsoportjába elkülönített bovin adenovírusoknak, valamint a szárnyasokban patogén EDS-vírusnak a DNS-ében a G+C nukleotidok aránya alig éri el az egyharmadot. Hipotézisünknek megfelelően már

sikerült feltárni, hogy az ebbe a leszármazási vonalba tartozó AdV-ok valóban a pikkelyes hüllőkben (Squamata) gyakoriak, és genetikai anyaguk bázisösszetétele ezekben a gazdáiban kiegyensúlyozott. Benkő és Harrach (2003) elmélete szerint a gazdafajváltás következtében új molekuláris niche-be került adenovírusok G+C tartalma a genomiális DNS-t érő erős szelekciós nyomás hatására csökkent a jelenleg tapasztalható értékre. A jelenség hátterében a gerincesek természetes immunrendszerének részét képező, kórokozókra jellemző molekuláris mintázatfelismerő Toll-szerű receptorok (TLR) családjába tartozó TLR9 (Toll Like Receptor 9) működése állhat. A receptor felismeri a szervezet számára idegen DNS-ben található nem metilált CpG dinukleotidokat, ami erős szelekciós hatásként a vírus G+C bázisarányának csökkenését eredményezheti (Krieg és mtsai, 1998). Mikrobiális ökológiai szempontból a gazdaváltás élőhely váltásként is értelmezhető. Az új gazdának az eredeti gazdához való rendszertani viszonyának függvényében a vírusnak különböző mértékben alkalmazkodnia kell a sikeres túléléshez. Ennek az új genetikai és immunológiai környezethez történő adaptációnak a sikere a vírus új gazdában történő megmaradásának, szaporodásának és a fogékony populációban történő szétterjedésének az alapja (Bandín és Dopazo, 2011). A pikkelyes hüllők atadenovírusainak genomjában tapasztaltakhoz hasonlóan a RESAdV-1 felerősített részleges genomjában sem mutatható ki a G+C tartalom (55,2%) csökkenése, ezért feltételezhető, hogy a vörösfülű ékszerteknősben nem állt fenn a bázisarány-eltolódást előidéző szelekciós nyomás. Ez a megfigyelés szintén alátámasztani látszik azt az elképzelést, amely szerint az RESAdV-1 koevolúciós kapcsolatban áll gazdafajával. Az ICTV által javaslatunkra idén márciusban elfogadott *Testadenovirus* nemzetség tagjaiból nyert genomiális DNS-szekvenciákban szintén kiegyensúlyozott (45–55% körüli) a G+C arány. Az amerikai adatokat is figyelembe véve megállapítható, hogy a két, földrajzilag jól elkülönülő ékszerteknős-állományból kimutatott AdV-ok azonos fejlődési ághoz tartoznak, ami tovább bizonyítja, hogy ez az édesvízi teknősökkel együtt fejlődő AdV leszármazási vonal. A vizsgált egyedek többsége a mintavételek időpontjában fizikailag jó állapotban volt, klinikailag egészségesnek látszott, mindössze két minta származott elhullott állatból, de ezek esetében sem lehetett a bennük kimutatott AdV-ok kóroktani hatását bizonyítani. Erre csak a Koch-féle posztulátumok vizsgálatával lenne lehetőség, azonban eddig nem sikerült sejtenyészeten szaporítani a vírust. Valószínűbb, hogy az állatok elhulláshoz az AdV mellett más kórokozóval történő felülfertőződés, vagy az immunműködést károsító környezeti hatások vezethettek.

A korábban több teknős fajban leírt siadenovírus (STAdV-1) (Rivera és mtsai, 2009; Schumacher és mtsai, 2012) és a mór teknősből kimutatott atadenovírus (Garcia-Morante és mtsai, 2016) feltételezésünk szerint gazdaváltás útján jutott a teknősökbe, amelyek adaptáció hiányában súlyos tünetek kíséretében megbetegedtek, ill. elhullottak. Megjegyzendő, hogy a DNS kis G+C-tartalma az eddig teljesen vagy részlegesen szekvenált valamennyi siadenovírus esetén megfigyelhető volt. Ez érvényes a békából izolált AdV-ra, a pulykák vérvéses

bélgnyulladást okozó THEV-re, és számos, vadmadárból nyert teljes vagy részleges siadenovírus genomra is. Helytállóan tűnik a feltételezés, hogy ennek az AdV-vonalnak az eredete nem a jelenleg ismert gazdáiban keresendő.

A részleges szekvenciák molekuláris vizsgálatával és törzsfa-rekonstrukciók alapján megállapítottuk, hogy az újonnan felismert teknős AdV-ok a jelenleg hivatalosan elfogadott öt AdV-nemzetségtől világosan elhatárolódó csoportot alkotnak, ezért javaslatot tettünk egy új, hatodik nemzetség megalapítására az *Adenoviridae* családon belül *Testadenovirus* névvel. A név utal az ide sorolható vírusok gazdáinak rendszertani csoportjára, nevezetesen a Testudinoidea szuper családra. A nemzetségbe sorolandó jelenleg ismert teknős AdV-ok fajsztintű elkülönítését indokoltan tartjuk. Javaslatunkat az ICTV elfogadta és 2021. március 8-án hivatalosan is létrehozta a teknős gazdákat fertőző AdV-ok számára a *Testadenovirus* nemzetséget. A RESAdV-1-et pedig alapító típusfajként *Pond slider testadenovirus A* néven fajsztintű kategóriaként foglalta rendszerbe. A javasolt új genuson belül még legalább három új AdV-faj kialakítása is időszerűvé vált, a dobozteknősök, résteknősök és szenes teknősök AdV-ai (GenBank azonosító: KU601299–601301) számára (15. ábra). Mivel az ICTV *Adenoviridae* Munkacsoportjának ajánlása szerint az AdV-fajok elkülönítéséhez több feltétel együttes figyelembevétele, és lehetőleg minél hosszabb genomszakaszok, ideális esetben teljes gének szekvenciájának ismerete szükséges, a teknős AdV-fajok kialakításának javaslatához is további szekvenciák meghatározására lesz szükség. Az új vírusfajként történő rendszertani besorolást a filogenetikai fákon történő elhelyezkedés mellett a többi vírustól jól láthatóan eltérő filogenetikai távolság mértéke is indokolja (12., 13. és 14. ábra).

Bár hazánk egyetlen őshonos teknősfajában, az invazívnek nyilvánított ékszerteknősökkel együtt az Emydidae családba tartozó mocsári teknős egyedeiben AdV-os fertőzöttség előfordulását még nem mutatták ki, az általunk használt diagnosztikai módszerekkel a jövőben érdemes az állatorvosi vizsgálatra kerülő mocsári teknősök alkalomszerű szűrése.

## 7.2. Lesőharcsa-herpeszvírus

A HV-ok a halakat fertőző legjelentősebb víruscsoportok közé tartoznak (Hedrick és Sano, 1989; Shchelkunov és mtsai, 2009; Hanson és mtsai, 2016). A hal-HV-ok által okozott bőrtünetekről Anders és Yoshimizu (1994) számolt be. Számos HV által okozott megbetegedés patogenezisének fő jellemzője a HV-ok hámszöveti preferenciája. A halak esetében ez magában foglalja mind a proliferatív elváltozásokat, mind a gyulladáshoz vezető reakciókat. Az általunk vizsgált halvírusokkal társult 32 bőrelváltozással járó megbetegedés közül 12 esetben bizonyított a HV-ok érintettsége. A lesőharcsa HV-os fertőzöttségének feltételezett előfordulásáról korábban már beszámoltak magyar kutatók (Békési és mtsai, 1981). Ezek az eredmények szövettani és kórszövettani, valamint EM-os vizsgálatokon alapultak. Mivel kutatásom során nem végeztem morfológiai vizsgálatokat, ezért csak a leírt kórkép és tünetek alapján mondható el, hogy nagy

valószínűséggel a korábban már morfológiai alapon leírt HV újabb felbukkanásából származó vírus molekuláris vizsgálatát végeztem el. Kísérletes állatfertőzések hiányában nem igazolható minden kétséget kizáróan a bőrtünetek és a kimutatott HV közti ok-okozati kapcsolat, annak megléte csak feltételezhető. A kapcsolat bizonyítása állatkísérleti modellben a négy Koch-féle posztulátum teljesülése esetén lehetséges. A kórokozó képességről és az állományon belüli terjedésről is csak korlátozott ismeretekkel rendelkezünk. A vírus kártétele külső megjelenését tekintve leginkább a CyHV-1 által okozott pontyhimlő (epithelioma papulosum) bőrtüneteivel hasonlítható össze, bár attól szemmel jól elkülöníthető. Az valószínűsíthető, hogy szemben például a CyHV-3 okozta állományszintű elhullással járó megbetegedéssel, a lesőharcsa-HV egy szintén tömeges, de enyhébb lefolyású, bőrtünetekben megnyilvánuló megbetegedést okoz. A tünetek és a lefolyás alapján a HV-oknak gazdáik iránti patogenitástól függően történő felosztási rendszerében a 4. alcsoportba tartozik (Shchelkunov és mtsai, 2009). Mivel az állomány, amelyből a vizsgálathoz felhasznált egyed származott jelentős átfertőzöttséget mutatott, ezért a vírus feltételezhetően magas ragályozó képességgel jellemezhető. Ugyanakkor a halgazdaságban áttelelő, fertőzött egyedek számából arra lehet következtetni, hogy amennyiben nem lép fel másodlagos felülfertőződés, ép immunrendszerrel rendelkező halgazdában a lesőharcsa-HV más HV-okhoz hasonlóan feltételezhetően látenciába mehet át. A primer fertőződés helyétől idegpályák mentén ganglionokba jutó HV-ok bizonyos hatások következtében reaktiválódhat és újra a primer fertőződés helyére esetleg ahhoz közeli területre visszajutva válhatnak ki újra tüneteket. A látencia képessége és a reaktiválódás bőrtünetek formájában történő megnyilvánulása feltételezhetően a testet kívülről fedő hám és az idegi elemek közös ectodermális eredetének köszönhetően alakul ki.

### **7.2.1. Részleges genomanalízis**

Az összehasonlító genomvizsgálatok eredményei alapján a lesőharcsa-HV felerősített részleges genomszakaszának szerveződése, az azonosított ORF-ek száma és orientációja, valamint a genomszakasz mérete egyértelműen a CyHV-ok DNS-polimeráz és ORF87 közötti szakaszának szerveződésére hasonlít (17. ábra). A BLAST homológiakeresés eredménye azt mutatja, hogy a CyHV-1 DNS-polimeráz és ORF87 közötti szakaszán található 9 ORF-ből 5-nek (ORF79, ORF80, ORF82, ORF83 és ORF87) van egyértelmű homológja a SiHV-2 PCR-rel felerősített szakaszán. Ugyanakkor a CyHV ORF81, ORF84, ORF85 és ORF86 genombeli elhelyezkedésének és orientációjának megfelelő ORF-ek megtalálhatók a SiHV-2 genomjában is, azonban a homológia keresés ezeknek az esetében nem mutatott hasonlóságot más CyHV-okkal. Így abban sem lehetünk biztosak, hogy kifejeződnek-e és amennyiben igen, akkor mi a kódolt géntermékek funkciója. A homológia keresés során azonosítottam egy potenciális kódoló régiót, amelyhez hasonló ORF-ek előfordulását eddig kizárólag a *Cyprinovirus* nemzetség tagjaiban írták le. A CyHV-okban az ORF87, az AngHV-1-ben az ORF45 jelzéssel ellátott ORF-

ek funkciója eddig nem tisztázott (van Beurden és mtsai, 2010; Davison és mtsai, 2013). A CyHV-1 és a CyHV-2 genomokban az ORF87 mRNS-e valószínűsíthetően splicing-on megy keresztül, de ugyanakkor a CyHV3 ORF87 kódoló szakaszon nem azonosítottak splicing helyet. A SiHV-2 rendelkezésre álló részleges nukleotid szekvenciájának a CyHV-1 és a CyHV-2 ORF87 régiójával történő páros illesztéseiben azok akceptor és donor helyei között lévő intront kódoló DNS szakaszon a SiHV-2 esetében egy az intront teljes egészében átfedő, egybefüggő gap régió található, ami arra enged következtetni, hogy a SiHV-2 esetében nincs splicing az ORF87 mRNS molekulájának érése folyamán, tehát ebben a tulajdonságban feltételezhetően a CyHV-3-ra hasonlít.

Az AngHV-1 homológ genomszakaszának kódoló kapacitása nagyobb (11 ORF), mint a SiHV-2-ben tapasztalt érték (9 ORF). Az egyes gének orientációjával összehasonlítva a SiHV-2 jellemzett genomszakaszán azonosított homológ ORF-ek leolvasási iránya minden esetben ellentétes az AngHV-1-ben megfigyelttel. A CyHV-3 ORF87 régiójához hasonlóan az AngHV-1 ORF45 esetében sem feltételeznek splicing mechanizmust, tehát ebben a jellemzőben a SiHV-2 vélhetően az AngHV-1-gyel is megegyezik. A filogenetikai vizsgálatok eredményeit tehát a genomszakaszok szerveződése is alátámasztja, amely szerint a SiHV-2 új vírusfajt képvisel.

### **7.2.2. Törzsfarekonstrukció, rendszertan és evolúció**

A lesőharcsa-HV leszármazástani vizsgálata alapján egyértelműen a *Cyprinivirus* nemzetségbe tartozik. A DNS-polimeráz és a termináz törzsfákon mérhető filogenetikai távolságok alapján az AngHV-1 és a CyHV-ok csoportja között elhelyezkedő SiHV-2 a CyHV-okkal, azok közül is a CyHV-1-gyel van közelebbi rokonságban, azonban az ORF87/ORF45 filogenetikai fáján a CyHV-1, a CyHV-2 és a CyHV-3 megközelítőleg azonos távolságban van a SiHV-2-től. Az all60 ismeretlen funkcióval rendelkező gén törzsfáján ugyanakkor az AngHV-1-től és a CyHV-3-tól megközelítőleg azonos távolságra található, de a CyHV-1 és CyHV-2-től távolabb. A nemzetségbe tartozó vírusokkal szemben meglévő filogenetikai távolsága mind a négy vizsgálatba bevont fehérje alapján indokoltá teszi új vírusfajként történő rendszerezését (18., 19., 20. és 21. ábra). A molekuláris és filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a közeljövőben javaslatot teszünk az ICTV-nek egy új alloherpeszvírus-faj létrehozására az *Alloherpesviridae* család *Cyprinivirus* nemzetségén belül a lesőharcsa HV-ának vírusrendszertani besorolására. A gazdafajra tekintettel javasoljuk a silurid herpeszvírus 2 (SiHV-2) elnevezést.

A cyprinivirusok és gazdafajaik között feltételezett hosszútávú evolúciós viszonyok vizsgálatát a törzsfáik összehasonlításával végeztem el (22. ábra). A tanglegram magas megbízhatósági értékekkel alátámasztott topológiája tovább erősíti Waltzek és mtsai (2009) elméletét, amely szerint a taxonómiailag közelebbi rokon alloHV-ok és gazdafajaik között hosszútávú koevolúciós kapcsolat állhat fenn. Ugyanakkor Stempel és mtsai (2019) a HV-ok



élethosszig tartó vírushordozásának és a reaktivációnak a háttérben feltételezik a koevolúciót. A halgazdák törzsfarekonstrukcióját alátámasztják Near és mtsai (2012), valamint Hughes és mtsai (2018) molekuláris vizsgálatainak eredményei, amelyek szerint a sugarasúszójúak (Actinopterygii) családján belül a harcsaalakúak (Siluriformes) és a pontyalakúak (Cypriniformes) rendje közeli rokonok és közös ősök az angolnaalakúak (Anguilliformes) mintegy 179 millió éve történő kialakulását követően jött létre. A pontyalakúak és a harcsaalakúak evolúciója körülbelül 150 millió évvel ezelőtt vált el egymástól, a harcsaalakúak önálló fejlődése mintegy 126 millió évvel ezelőtt vette kezdetét. Ezek az időpontok megadják azokat az időkereteket, amelyek a *Cyprinivirus* nemzetség és azon belül a CyHV-ok, az AngHV-ok és a SiHV-2 leszármazására vonatkoztathatók koevolúciós viszonyrendszerrel feltételezve. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a SiHV-2 kivételével a harcsafélék (Siluridae) közé tartozó ragadozókat fertőző, jelenleg ismert HV-ok mindegyike (SiHV-1, IcHV-1, IcHV-2) az *Ictalurivirus* nemzetségbe tartozik. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a Siluridae család kialakulását követően legalább két alkalommal két különböző vírus ős (SiHV-2-ős és *Ictalurivirus*-ős) általi vírusevolúciós út alakulhatott ki.

### **7.3. Ősibb gerincesek CRESS DNS vírusai**

#### **7.3.1. Új cirkovírusok halakban**

A *Circoviridae* család mindkét nemzetsége esetében az ICTV által megállapított fajdemarkációs kritérium a genomiális DNS szekvenciáik között meglévő 80%-os vagy annál kisebb egyezés (Rosario és mtsai, 2017). Mivel a razbóra CV-1 és razbóra CV-2 genomok teljes nukleotid szekvenciái közötti azonosság 97,6%, ezért a két CV egy vírushalmaz két szekvenciavariánsa. A dévérkeszegből és az angolnából kimutatott CV-sal együtt halakból három új CV-t mutattam ki. Az újonnan kimutatott hal cirkovírusok filogenetikai vizsgálatának eredményei alapján nem lehet egyértelműen kimondani, hogy a halak CV-ai egy jól elkülönülő csoportot képviselnek. A törzsfán az angolna, a pontyfélék és a harcsa CV-ainak leszármazása nem monofiletikus (28. ábra). Ennek oka lehet a halakból napjainkig leírt kevés CV szekvencia.

A CV-ok körében tapasztalt, RNS-vírusokéhoz hasonló, magas mutációs ráta (Duffy és mtsai, 2008; Firth és mtsai, 2009; Rosario és mtsai, 2012) és a rekombinációs események által hajtott gyors evolúciós változások (Lefeuvre és mtsai, 2009; Martin és mtsai, 2011; Rosario és mtsai, 2012) elősegíthetik a CV-ok gazdáikhoz történő alkalmazkodását, a gazdagenomba történő integrációját és a potenciális gazdaváltást is. A genomintegráció a CV-ok egyik feltételezett stratégiája lehet a hosszútávú fennmaradásra, mivel így a gazda immunrendszere nem ismeri fel a beépült vírus DNS-t. A gazdaváltás jelensége a genomméretükből fakadóan kis kódoló kapacitással rendelkező vírusoknál egy ESS része lehet, de egyben alapja is az új

vírusok kialakulásának. A feltételezést alátámasztják Gibbs és Weiller (1999) CRESS DNS vírusokkal kapcsolatos kutatásainak eredményei is.

A Balatonból vizsgálat céljára laboratóriumunkba küldött angolna szájkörűli papillómaszerű elváltozásából, kopoltyújából és belső szerveiből (szív, máj, lép, vese) származó DNS mintákból 2011-ben kimutatott CV arra enged következtetni, hogy az angolna genomiális DNS-ébe integrálódott vírusszekvenciát mutattunk ki. Ezt az elképzelésünket támasztják alá Dennis és mtsai-nak (2019) vizsgálati eredményei is. Mivel a vizsgálati minták között nem szerepelt bél eredetű testszövet, ezért a felerősített szekvencia valószínűsíthetően nem táplálék eredetű szennyeződésként értékelendő. A teljes *rep* szekvencia mellett csonkának tűnő (114 as) *cp* szekvenciát erősítettem fel. Az intakt kapszid megléte esszenciális tulajdonság a fertőzőképes virion számára. Éppen ezért a CV-okhoz és CyV-okhoz képest is szokatlanul kisméretű aminosav szekvencia alapján feltételezhetően nem képes teljes értékű kapszid összeépülni. A probléma megválaszolására expressziós vektorba beépített, kapszid gént kódoló DNS konstrukcióval kifejezve a teljes fehérjét vizsgálható lenne az a kérdés, hogy a kisebb kapszid képes-e befogadni a redukált méretű genomot és képes-e megfelelően összeszerelődni. A vírust később Borzák és mtsai (2017) is kimutatták szintén a Balatonból származó angolnák szervezetében. A 2011-es és a 2014-es minták teljes genomiális DNS-ében 3 nukleotid pozícióban volt különbség, a genomméretek (1378 nt) megegyezettek. A gazda kromoszómájába történő integrációt a Rep fehérje és a sejtben esetlegesen előforduló transzpozonok segíthetik.

### **7.3.2. Sertés cirkovírus 2 halakban**

A sertés kettes típusú cirkovírus (PCV-2) okozta fertőzése mind a házisertés (*Sus scrofa domestica*), mind a vaddisznó (*Sus scrofa*) fogékony állományokban világszerte jelentős gazdasági kártételt képes okozni olyan fontos kórképek önálló vagy társ-előidézőjeként, mint például a sertések bőrgyulladásával és vesekárosodással járó tünetegyüttese (PDNS), a sertés komplex légzőszervi tünetegyüttese (PRDC) és a választott malacok cirkovírus okozta sorvadása (PMWS) (Harding és Clark, 1997; Segalés és mtsai, 1998; Thacker, 2001; Cságola és mtsai, 2006). Ennek megfelelően járványtani sajátosságainak bármely eleme fontos szerepet játszik a haszonállatok ellátását végző gyakorló állatorvosok munkájában. Ilyen tényezőként szerepel a fertőzés potenciális átvitelére képes vírushordozó állatok faji- és életmódbeli jellemzőinek ismerete. A hazai, vadon élő folyami géb kevert szervmintájából kimutatott PCV-2 jelenléte feltételezhetően a fertőzés terjedésének és átvitelének egyik lehetséges módjaként tarthat számot érdeklődésre, mivel a PCV-2 terjedésében a szájon át bélsár vagy szennyezett takarmány útján történő átvitel jelentős szerepet játszik (Varga és mtsai, 2018). A természetben élő vaddisznó táplálékspektrumában szerepel a hal, amely megfelelő körülmények között a vaddisznók PCV-2 fertőzöttségének kialakításában és fenntartásában is szerepet játszhat.

Hasonló a helyzet a nem megfelelően előállított hallisztek házisertések takarmányozása során történő felhasználásának esetében is. A PCV-2 halból kimutatott jelenléte véleményem szerint szennyezett táplálékkal vagy szennyvízzel történt érintkezés eredménye lehet. Ugyanakkor az intakt, teljes vírusgenom jelenléte azt valószínűsítheti, hogy a halak potenciális fertőzőforrásként szerepelhetnek a PCV-2 járványtanában feltételezhetően passzív vírushordozóként. Figyelembe véve egyes halfajok évszakos és napszakos vándorlási szokásait, ezek az állatok képesek lehetnek a PCV-2 fertőzés egymástól távolabbi területek közötti átvitelére. Ugyanakkor nem áll rendelkezésünkre adat azzal kapcsolatban, hogy a vírus a halakban képes-e hosszabb ideig fennmaradni, szaporodni és ürülni, illetve megőrizni fertőzőképességét. A PhD munkám során folyami gébből kimutatott teljes PCV-2 genom tudomásom szerint az első eset a vírus komplett genetikai anyagának halban történő előfordulásának igazolására. Rágcsálókkal végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a vírus klinikai tünetek nélkül képes a sertésen kívül más fajtákat is fertőzni, bennük szaporodni, a szervezetből ürülni és a rágcsálók fajtárait fertőzni (Cságola és mtsai, 2008; Lőrincz és mtsai, 2010).

### 7.3.3. A cirkovírusok eredetére vonatkozó hipotézis

A halak CV-ainak vizsgálatával kapott eredmények és a vonatkozó szakirodalom alapján a hal-CV-ok, ezen keresztül a CV-ok eredetére vonatkozóan megfogalmaztunk egy lehetséges elméletet. A 21. és 22. ábrák alapján elmondható, hogy a haleredetű vírusok mind a CV-ok, mind pedig a CyV-ok törzsfáján a gyökér közelében bazális pozícióban található. Ha a CRESS DNS vírusok 2. kládjában (Kazlauskas és mtsai, 2019) található *Circoviridae* családot néhány haleredetű genomialis DNS szekvenciával és jelenleg még pontosan be nem sorolt CV-sal kiegészítve, külcsoport bevonásával vizsgáljuk, akkor látható, hogy leszármazását tekintve a *Cyclovirus* nemzetség ősbibb, mint a *Circovirus* nemzetség (28. ábra). A CV-okkal egyedül a fenékjáró küllőből kimutatott CyV, valamint egy pontosan meg nem határozott flamingó fajból (*Phoenicopteridae* sp.) és egy fajszínten ugyancsak azonosítatlan pontytfélékhez sorolt halból származó Rep-szekvencia tartozik bazális testvércsoport pozícióban. Az előzetes vizsgálatokkal a fenékjáró küllőből kimutatott vírus egyértelműen CyV-ként került meghatározásra, azonban a metagenomikai vizsgálatok során ismertté vált másik két vírus esetében nem ismertek a teljes genom szekvenciák, így a két fő ORF egymáshoz és a nonanukleotid szekvenciához viszonyított helyzete sem meghatározható. A *Circoviridae* család két nemzetsége a törzsfá-rekonstrukció alapján a haleredetű ciklo-, illetve cirkovírusoknál kapcsolódik egymással. Feltételezésünk szerint a CV-ok a CyV-októl származtathatók, genetikai módosulással, amely a két kódoló régió orientációjának megcserélődésével járt. Ez elképzeléseink szerint két CyV szimultán fertőzésekor rekombináció útján jöhetett létre. A két CyV 5'-5' és 3'-3' intergénikus régióinak olyan pontján következhetett be a DNS molekula törése, amely pontok egymással azonosak voltak. Így lehetőség volt arra, hogy az újonnan létrejövő rekombinánsok legalább egyikében az

addigi irányultsággal ellentétesen épüljenek be a replikációs fehérjét és a kapszidfehérjét kódoló nukleotid régiók és így a CV-okra jellemző genomszerveződés alakuljon ki. Az elképzelést erősíti, hogy a CRESS DNS vírusok feltételezett kialakulásában is fontos szerepet játszó HUH endonukleáz szupercsalád egyes tagjai a ssDNS molekula replikációján kívül a transzpozíció különböző típusaiban, plazmidok replikációjában és konjugációjában, mobilizációban és relaxációban is képesek katalízisre (Chandler és mtsai, 2013; Kazlauskas és mtsai, 2019). Egy alternatív hipotézisünk szerint szimultán fertőzéskor az egyik vírusnak a vírusreplikáció során létrejövő dsDNS replikatív intermedier molekulája és a másik vírus ssDNS genomja között a RecA családba tartozó ATPáz molekula (Chen és mtsai, 2008) által katalizált rekombináció során történhetett meg a CV-okra jellemző genomorganizáció kialakulása. Amennyiben az új változat megfelelő genetikai fitnessszel rendelkezik a természetes szelekciós hatások nyomán elterjed a populációban és ESS-ként fennmaradva az evolúció során jól elkülönülő vonalként fejlődhet tovább. A CRESS DNS vírusokra jellemző magas mutációs és szubsztitúciós ráta és a rekombinációs hajlam ezt a folyamatot elősegíti és ezzel a potenciálisan új gazdák fertőzését is lehetővé teszi (Duffy és mtsai, 2008; Rosario és mtsai, 2012).

A gerincesek között legősibbnak tekintett halak (Pisces) egyes korai fajai fertőződhetek ős CyV-okkal, esetleg a CyV-ok és CV-ok közti átmeneti vírussal, amelyből a hosszútávú közös evolúció során alakulhattak ki a mai formában létező CV-ok. A CV-ok és CyV-ok leszármazását vizsgálva a fenékjáró küllő-asszociált CyV, valamint a flamingóból és a pontyféléből kimutatott CRESS DNS vírusoknak a hal CV-okhoz és feltételezetten integrálódott hal-CV szekvenciákhoz viszonyított filogenetikai távolságai alapján, a fenékjáró küllőből kimutatott vírus alakulhatott ki elsőként (28. ábra). Ehhez azt feltételeztem, hogy mindegyik *rep* génre hasonló szelekciós nyomás hatott és az általuk kódolt Rep fehérje aminosav szubsztitúciós rátái is hasonlóak voltak. A fenékjáró küllő vírusa viszont a genomszerveződés alapján egyértelműen CyV. A három szekvencia a *Circoviridae* törzsfán a *Circovirus* nemzetség testvércsoportja, a többi CyV-től jól elkülönül. A CV-okkal közös ősök, egyfajta evolúciós forrópontként (hotspot) értelmezhető a CV-ok kialakulásának irányába azt feltételezve, hogy a halak CV-ai a jelenleg ismert CV-ok ősei. A gerincesek evolúciós története során a halaktól az emlősökig vezető úton az egyes gerinces osztályok képviselőiben az ősi hal CV változása alakította a CV-ok evolúcióját. Elgondolásunkat alátámasztani látszik a CV-okkal és CyV-okkal kapcsolatban ismert lehetséges gazdafajok közötti fertőzés lehetőségére is (Li és mtsai, 2011). Mivel a hal-CV-ok a jelenlegi törzsfarekonstrukció alapján a legősibb CV-oknak tekinthetők, így ez a hipotézis egyben a CV-ok törzsfelfejlődésének korai szakaszával kapcsolatban is információval szolgálhat. Hipotézisünk egyben azt is jelentené, hogy a CV-ok kialakulása az eddig gondoltnál korábban kezdődött. Belyi és mtsai (2010) tanulmánya alapján a *Circoviridae* család kialakulása több, mint 40–50 millió évvel ezelőtt kezdődött. Endogén vírus eredetű szekvenciák gazdagenomban történő vizsgálata során Dennis és mtsai (2018 és 2019) által kapott adatok alapján úgy gondoljuk, hogy ez az

időtartam jóval hosszabb lehet. A szilur időszakban (444–416 millió éve) a gerincesek bazális csoportjaként számontartott állkapocs-nélküliekből (Agnatha) leágazó, fejlettebb halak csoportjainak a kambrium-ordovicium határán (mintegy 485 millió éve) kezdődő és az ordovicium alatt végbemenő radiációjával kialakultak a mai hal kládok ősei (Benton, 2015). A halak a devon időszakban (416–360 millió éve) széles körben benépesítették a vízi életteret. Recens CV-ok a mai napig csak csontos halakból ismertek. Feltételezett CV-eredetű EVE-ket azonban a csontos halakon kívül az állkapocs-nélküliekhez tartozó nyálkahalak (Myxini) egyik képviselőjéből (*Eptatretus burgeri*) is kimutattak (Dennis és mtsai, 2018). Ez arra utalhat, hogy a nyálkahalak és ingolák őseinek a szilur időszak kezdetén történő kialakulásától máig tartó időszakban történhetett meg a CV-ok őseinek kialakulása.

#### 7.3.4. CRESS DNS vírus hüllőben és kétéltűben

Hüllők körében végzett vizsgálatok során Altan és mtsai (2019) feketefejű pitonból (*Aspidites melanocephalus*) tudtak elsőként teljes cirkovírus DNS-t felerősíteni. Orton és mtsai (2020) Morafka sivatagi teknősének (*Gopherus morafkai*) egyedeitől származó bélsár mintákból azonosított a *Genomoviridae* és a *Microviridae* családokba sorolt ssDNS vírusokat, valamint addig még be nem sorolt CRESS DNS vírusokat. Mivel a genomovírusok és a mikrovírusok eddigi ismereteink szerint gombákat és ízeltlábúakat, valamint baktériumokat fertőznek, így feltételezhetően a teknősök bélflórájának tagjaiból vagy táplálékukból származhatnak. Az új CRESS DNS vírusok gazdafajként fertőzhetik a teknősöket is, de a vizsgálatok során erre eddig nem találtak bizonyítékot.

PhD munkám kezdetén kétéltűekből csak részleges Rep-szekvenciaadatokat határoztunk meg, amelyeket egy hazánkban elütött barna varangyból (*Bufo bufo*) és fogságban tartott ausztrál fabéka (*Litoria caerulea*) egy-egy élő és elhullott egyedéből sikerült kimutatnunk (Tarján és mtsai, 2014).

A vörösfülű ékszerteknős kloakatampon mintájából kimutatott CRESS DNS vírus a vegyes gazdaspektrummal jellemezhető CRESSV 2-es víruskládba tartozónak látszik, a törzsfa alapján (29. ábra). A minta származása miatt vírus eredeti gazdája feltételezhetően nem a teknős. Testvércsoportja a szennyvíz asszociált cirkuláris DNS vírus 21, amely kimutatása egy szennyvíztisztításhoz használt oxidációs medence vizéből történt, ezért az általuk eredetileg fertőzött szervezet nem ismert. A DNS molekula mérete és a *rep*, valamint a *cp* homológiával nem rendelkező, ismeretlen funkciójú, feltételezett fehérjét kódoló ORF egymással átfedő elhelyezkedése alapján valószínűsíthetően EVE vagy szabad replikon lehet. Mivel a kapszid nélküli egyszálú DNS még kovalensen zárt, cirkuláris formában is sérülékeny ezért egy hibásan összeépülő, fehérjeburok nélküli vírus feltételezésem szerint önálló molekulaként nem tud hosszabb távon fennmaradni. Mivel a vírus gazdasejt felszínén történő megtapadásához és a bejutáshoz is szükség van a sejtfelszíni víruskötő receptorral csatlakozó antireceptorra, amely

a kapszid felszínén található, ezért a kapszid hiánya esetén a sejtől kikerülő hibás vírus nem tud újabb sejtet fertőzni. Egy harmadik lehetőség szerint a molekula lehet egy, a nanovírusokhoz hasonló szegmentált genommal rendelkező vírus egy szegmense. Ezt a hipotézist a molekula kis méretén kívül az is megerősíteni látszik, hogy az ilyen vírusokban az egyes genomsegmentek között a Cp kódoló régió is külön-külön kapszidban foglal helyet.

Az amazóniai tejbékából kimutatott CRESS DNS vírus a filogenetikai vizsgálat szerint a CRESSV2 és CRESSV3 kládoktól jól elhatárolódva, a CRESSV1 csoport tagjai közé mélyen beágyazva helyezkedik el a törzsfán (30. ábra). Mivel azonban a jelenleg már rendszerbe foglalt CRESSV1 csoport tagjaitól jól elkülönülő, eddig be nem sorolt vírusok közé tartozik, ezért az a lehetőség is fennáll, hogy tejbéka vírusa és annak közeli rokonai a CRESSV1 klád tagjaitól elkülönülő, de azokkal közös őstől származó új, még be nem sorolt víruscsoport tagjai. Rokonsági körének gazdaspektruma szintén vegyesnek mondható, a gerinces és rovar gazdákon kívül szennyvíz eredetű mintákban is kimutatták a jelenlétüket, azonban ezekben az esetekben nem köthetők gazdához. A vírus legközelebbi rokona a házi méh egy fajtájának (*Apis mellifera linguistica*) hemolimfájából kimutatott *Apis mellifera* vírus 4-gyel. Mivel a tejbéka rovarevő életmódot folytat, a két vírus közötti rokonság egyben arra is utalhat, hogy nem a kételtű faj saját vírusát, hanem egy azonosítatlan rovarfertőző CRESS DNS vírust sikerült kimutatni. Az elképzelést erősíti, hogy a vírus közelebbi rokonsági körében egyéb rovarevő emlősökből (denevérek, cickány) származó légúti és tápcsatorna eredetű mintákból kimutatott vírusok is megtalálhatók.

#### 7.4. Következtetések

Vizsgálataim három, nagy és jelentős víruscsaládnak az ősbibb gerincesekben előforduló tagjainak jobb megismerését eredményezték. Az egyik víruscsalád a legrégebb óta ismertek közé tartozik, míg a másik két, viszonylag újabb családba tartozó vírusok rendkívüli elterjedtsége és fajgazdagsága a jelenleg egyre intenzívebben folyó kutatások nyomán bontakozik ki.

Az ékszerteknősökben és más, a Testudinoidea szuperfamiládba sorolt fajok képviselőiben kimutatott, új adenovírusokról már a PCR termékek rövid szekvenciáján alapuló törzsfá-rekonstrukció azt sugallta, hogy egy eddig nem ismert leszármazási vonalat képeznek, amely az *Adenoviridae* családon belül nemzetség szinten elkülöníthető. Noha az ékszerteknős-adenovírus sejtenyészetben történő izolálásának sikertelensége miatt épp az egyes nemzetségekre speciálisan jellemző genomvégek szekvenciája máig nem áll rendelkezésünkre, a PCR-rel kinyert, erősen megőrzött centrális genomrészt elemzése elegendő meggyőző bizonyítékot szolgáltatott az újonnan felismert genetikai vonal határozott elkülönülésére. Javaslatunk alapján az ICTV is indokoltnak találta és hivatalosan jóváhagyta az új, hatodik genus kialakítását *Testadenovirus* néven ezeknek a teknős eredetű vírusoknak a besorolásához.

A kétéltűek és halak herpesz-szerű vírusainak rendszerezéséhez nemrégiben létesítették az *Alloherpesviridae* családot a szintén újonnan alapított *Herpesvirales* renden belül. A családot pillanatnyilag négy nemzetségre osztják, melyeket az első felismert tagjaik gazdájáról neveztek el. A lesőharcsa kiütéses bőrelváltozásának okaként hazánkban négy évtizede leírt herpesz-szerű vírustól először nyertünk szekvencia adatokat. A PCR termékek szekvenciája alapján végzett filogenetikai elemzések szerint ez a vírus az *Alloherpesviridae* család *Cyprinivirus* genusába sorolható új, önálló fajként. A vírus oktani szerepe a betegségben egyelőre nem tekinthető tisztázottnak.

Az új vírusrendszertani kategóriaként alapított *Cressdnaviricota* törzsbe sorolható vírusok sokféleségére és elterjedtségére vonatkozó ismereteket hét vírus teljes genom-szekvenciájának meghatározásával és elemzésével gyarapítottam. Ezek közül öt származott halakból, amelyek közül négy a *Circovirus*, egy pedig a *Cyclovirus* nemzetségbe tartozónak bizonyult a *Circoviridae* családon belül. Két további, békában, illetve hüllőben kimutatott vírus családként egyelőre még nem definiált, egy-egy víruscsoport tagjaival mutat közelebbi rokonságot.

## 8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Egy ékszerteknősből kimutatott, az *Adenoviridae* család ismert nemzetségeitől jelentősen eltérő, új leszármazási vonalat képviselő vírus közel 15 kb méretű, középső genomszakaszának nukleotid-sorrendjét meghatároztam. A kódolt fehérjék elemzése és filogenetikai vizsgálata alátámasztotta egy új nemzetség kialakítását, amit javaslatunk alapján a Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság *Testadenovirus* néven hivatalosan jóváhagyott. A genus alapító tagja a *Pond slider testadenovirus A* faj.
2. A tudomány számára új alloherpeszvírust mutattam ki himlőszerű bőrelváltozást mutató lesőharcsából. A vírus genomjából több, mint 16 kb szekvenciát meghatároztam. A kódolt fehérjék elemzése alapján a vírust az *Alloherpesviridae* család *Cyprinivirus* nemzetségébe tartozónak találtam. Az új vírusnak, mely az angolna és a ponty herpeszvírusainak közeli rokona, a silurid herpesvirus 2 nevet adtam, és számára egy új faj alapítását javaslom.
3. PCR segítségével korábban nem ismert *rep* gén fragmentumokat nyertem különféle ősbibb gerincesek mintáiból. Hét mintából a teljes körkörös genom kinyerése is sikerült. A szekvenciák elemzése alapján *Circoviridae* családba illetve a CRESS DNS vírusok csoportjába sorolható vírusok jelenléte feltételezhető angolnában, dévérkeszegben, fenékjáró küllőben, razbórában, egy békában és egy ékszerteknősben.
4. A kimutatott vírusok és feltételezett gazdafajaik között az esetek többségében hosszú koevolúciós múltra utaló filogenetikai kapcsolatot mutattam ki.



## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbas, A.A., Taylor, L.J., Dothard, M.I., Leiby, J.S., Fitzgerald, A.S., Khatib, L.A., Collman, R.G., Bushman, F.D.: **Redondoviridae, a family of small, circular DNA viruses of the human oro-respiratory tract associated with periodontitis and critical illness**, Cell Host Microbe., 25. 719–729.e4, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.001>
- Ahi, Y.S., Mittal, S.K.: **Components of adenovirus genome packaging**, Front. Microbiol. 7. 1503, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01503>
- Alborali, L., Bovo, G., Lavazza, A., Capellaro, H., Guadagnini, P.F.: **Isolation of a herpesvirus in breeding catfish (*Ictalurus melas*)**, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 16. 134–137, 1996. [https://eafp.org/download/1996-Volume16/Issue%204/1996%20Vol%2016%20No%204\\_134.pdf](https://eafp.org/download/1996-Volume16/Issue%204/1996%20Vol%2016%20No%204_134.pdf)
- Altan, E., Kubiski, S.V., Burchell, J., Bicknese, E., Deng, X., Delwart, E.: **The first reptilian circovirus identified infects gut and liver tissues of black-headed pythons**, Vet. Res., 50. 35, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0653-z>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: **Basic Local Alignment Search Tool**, J. Mol. Biol., 215. 403–410, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anders, K., Möller, H.: **Spawning papillomatosis of smelt, *Osmerus eperlanus* L., from the Elbe estuary**, J. Fish Dis., 8. 233–235, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb01218.x>
- Anders, K., Yoshimizu, M.: **Role of viruses in induction of skin tumors and tumor-like proliferations of fish**, Dis. Aquat. Org., 19. 215–232, 1994. <https://www.int-res.com/articles/dao/19/d019p215.pdf>
- Anisimova, M., Gascuel, O.: **Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative**, Syst. Biol., 55. 539–552, 2006. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H., Hedrick, R.P.: **Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide**, J. Virol., 81. 5058–5065, 2007. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-07>
- Ariel, E.: **Viruses in reptiles**, Vet. Res., 42. 100, 2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-100>
- Baker, M.L., Jiang, W., Rixon, F.J., Chiu, W.: **Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages**, J. Virol., 79. 14967–14970, 2005. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14967-14970.2005>
- Bamford, D.H., Grimes, J.M., Stuart, D.I.: **What does structure tell us about virus evolution**, Curr. Opin. Struct. Biol., 15. 655–663, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.012>
- Bandín, I., Dopazo, C.P.: **Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates**, Vet. Res., 42. 67, 2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-67>
- Bartha A.: **Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses**, Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 19. 319–321, 1969.
- Belyi, V.A., Levine, A.J., Skalka, A.M.: **Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: the *Parvoviridae* and *Circoviridae* are more than 40 to 50 million years old**, J. Virol., 84. 12458–12462, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.01789-10>
- Benkő M.: **Az adenovírusok megújult rendszertana az evolúciós viszonyokat tükrözi (Irodalmi áttekintés)**, Magy. Állatorvosok, 126. 205–211, 2004.
- Benkő M.: **Molekuláris módszerek: új lehetőségek az adenovírus-kutatás tükrében**, Magy. Állatorvosok, 133. 498–505, 2011.
- 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.19.10056-10059.2002>
- Benkő M., Harrach B.: **A proposal for a new (third) genus within the family *Adenoviridae***, Arch. Virol., 143. 829–837, 1998. <https://doi.org/10.1007/s007050050335>
- Benkő M., Harrach B.: **Molecular evolution of adenoviruses**, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272. 3–35, 2003. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_1)
- Benkő M., Harrach B., D'Halluin, J.C.: **Molecular cloning and physical mapping of the DNA of bovine adenovirus serotype 4; study of the DNA homology among bovine, human and porcine adenoviruses**, J. Gen. Virol. 71. 465–469, 1990. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-465>
- Bennati, R., Bonetti, M., Lavazza, A., Gelmetti, D.: **Skin lesions associated with herpesvirus-like particles in frogs (*Rana dalmatina*)**, Vet. Rec., 135. 625–626, 1994.

- Benson, S.D., Bamford, J.K., Bamford, D.H., Burnett, R.M.: **Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures**, *Cell*, 98. 825–833, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81516-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81516-0)
- Benton, M.J.: **Vertebrate Palaeontology**. Fourth edition. Wiley Blackwell Publishing Ltd., Chichester, UK., pp. 40–83, 2015. <https://www.geokniga.org/bookfiles/geokniga-vertebrate-palaeontology.pdf>
- Berencsi Gy., Bánrévi A., Takács M., Lengyel A., Nász I.: **Evolutionary aspects and taxonomic definition of viruses together with mobile extrachromosomal elements of relative autonomy into a special highest rank taxon (a review)**, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 42. 141–153, 1995.
- Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A.: **Spliced segments at 5' terminus of adenovirus 2 late messenger-RNA**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74. 3171–3175, 1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3171>
- Békési L., Horváth I., Kovács-Gayer É., Csaba G.: **Demonstration of herpesvirus like particles in skin lesions of European eel (*Anguilla anguilla*)**, *J. Appl. Ichthyol.*, 2. 190–192, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1986.tb00662.x>
- Békési L., Kovács-Gayer É., Rátz F., Turkovics O.: **Skin infection of the sheatfish (*Silurus glanis* L.) caused by a herpesvirus**. In: Oláh, J., Molnár, K., Jeney, Z. (eds) *Fish, Pathogens, and Environment in European Polyculture*. Fisheries Research Institute, Szarvas, Hungary, pp. 58–69, 1981.
- Biagini, P., Bendinelli, M., Hino, S., Kakkola, L., Mankertz, A., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Teo, C. G., Todd, D.: **Family: Circoviridae**. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, San Diego, CA., pp. 343–349, 2012.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., Breitbart, M., Delwart, E.: **Frequent detection of highly diverse variants of *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Bocavirus*, and *Circovirus* in sewage samples collected in the United States**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 3507–3513, 2009. <https://doi.org/10.1128/JCM.01062-09>
- Blinkova, O., Victoria, J., Li, Y., Keele, B.F., Sanz, C., Ndjango, J.B., Peeters, M., Travis, D., Lonsdorf, E.V., Wilson, M.L., Pusey, A.E., Hahn, B.H., Delwart, E.L.: **Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees**, *J. Gen. Virol.*, 91. 74–86, 2010. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015446-0>
- Borzák R., Sellyei B., Baska F., Székely C., Doszpoly A.: **Detection of cyprinid herpesvirus 1 (CyHV-1) in barbel (*Barbus barbus*): First molecular evidence for the presence of CyHV-1 in fish other than carp (*Cyprinus carpio*)**, *Acta Vet. Hung.*, 68. 112–116, 2020. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00004>
- Borzák R., Sellyei B., Székely C., Doszpoly A.: **Molecular detection and genome analysis of circoviruses of European eel (*Anguilla anguilla*) and sichel (*Pelecus cultratus*)**, *Acta Vet. Hung.*, 65. 262–277, 2017. <https://doi.org/10.1556/004.2017.026>
- Boutier, M., Gao, Y., Vancsok, C., Suárez, N.M., Davison, A.J., Vanderplasschen, A.: **Identification of an essential virulence gene of cyprinid herpesvirus 3**, *Antiviral Res.*, 145. 60–69, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.002>
- Boutier, M., Ronsmans, M., Ouyang, P., Fournier, G., Reschner, A., Rakus, K., Wilkie, G.S., Farnir, F., Bayrou, C., Lieffrig, F., Li, H., Desmecht, D., Davison, A.J., Vanderplasschen, A.: **Rational development of an attenuated recombinant cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and in vivo bioluminescent imaging**, *PLoS Pathog.*, 11. e1004690, 2015a. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004690>
- Boutier, M., Ronsmans, M., Rakus, K., Jazowiecka-Rakus, J., Vancsok, C., Morvan, L., Peñaranda, M. M., Stone, D.M., Way, K., van Beurden, S.J., Davison, A.J., Vanderplasschen, A.: **Cyprinid herpesvirus 3: An archetype of fish alloherpesviruses**, *Adv. Virus Res.*, 93. 161–256, 2015b. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.03.001>
- Bradley, T.M., Medina, D.J., Chang, P.W., McClain, J.: **Epizootic epitheliotropic disease of lake trout (*Salvelinus namaycush*): history and viral etiology**, *Dis. Aquat. Org.*, 7. 195–201, 1989. <https://doi.org/10.3354/dao007195>
- Breidenbach, G.P., Skinner, M.S., Wallace, J.H., Mizell, M.: **In vitro induction of a herpes-type virus in "summer-phase" Lucké tumor explants**, *J. Virol.*, 7. 679–682, 1971. <https://doi.org/10.1128/JVI.7.5.679-682.1971>
- Brenkman, A.B., Breure, E.C., van der Vliet, P.C.: **Molecular architecture of adenovirus DNA polymerase and location of the protein primer**, *J. Virol.*, 76. 8200–8207, 2002. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8200-8207.2002>
- Cabasso, V.J., Stebbins, M.R., Norton, T.W., Cox, H.R.: **Propagation of infectious canine hepatitis virus in tissue culture**, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 85. 239–245, 1954. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20843>

- Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., McQuillan, J.A.: **Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data**, *Bioinformatics*, 28. 464–469, 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Castresana, J.: **Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis**, *Mol. Biol. Evol.*, 17. 540–552, 2000. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, A.B., Moncalian, G., Ton-Hoang, B. **Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily**, *Nat. Rev. Microbiol.*, 11. 525–538, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3067>
- Chen, Z., Yang, H., Pavletich, N.P.: **Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures**, *Nature*, 453(7194)., 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06971>
- Cheung, A.K.: **A stem-loop structure, sequence non-specific, at the origin of DNA replication of porcine circovirus is essential for termination but not for initiation of rolling-circle DNA replication**, *Virology*, 363. 229–235, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.017>
- Chiari, Y., Cahais, V., Galtier, N., Delsuc, F.: **Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria)**, *BMC Biol.*, 10. 65, 2012. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-65>
- Chow, L.T., Broker, T.R., Lewis, J.B.: **Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2**, *J. Mol. Biol.*, 134. 265–303, 1979. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90036-6)
- Clark, H.F., Karzon, D.T.: **Terrapene heart (TH-1), a continuous cell line from the heart of the box turtle *Terrapene carolina***, *Exp. Cell. Res.*, 48. 263–268, 1967. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(67\)90351-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(67)90351-5)
- Crawford, N.G., Parham, J.F., Sellas, A.B., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Papenfuss, T.J., Henderson, J.B., Hansen, M.H., Simison, W.B.: **A phylogenomic analysis of turtles**, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 83. 250–257, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.021>
- Crockford, M., Jones, J.B., Crane, M.S., Wilcox, G.E.: **Molecular detection of a virus, Pilchard herpesvirus, associated with epizootics in Australasian pilchards *Sardinops sagax neopilchardus***, *Dis. Aquat. Organ.*, 68. 1–5, 2005. <https://doi.org/10.3354/dao068001>
- Csághola A., Cadar, D., Tuboly T.: **Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice**, *Acta Vet. Hung.*, 56. 421–427, 2008. <https://doi.org/10.1556/AVet.56.2008.3.15>
- Csághola A., Kecskeméti S., Kardos G., Kiss I., Tuboly T.: **Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars**, *Arch. Virol.*, 151. 495–507, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0639-1>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: **ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution**, *Bioinformatics*, 27. 1164–1165, 2011. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: **jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing**, *Nat. Methods*, 9. 772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Davison, A.J.: **Channel catfish virus: a new type of herpesvirus**, *Virology*, 186. 9–14, 1992. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90056-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90056-u)
- Davison, A.J.: **Evolution of the herpesviruses**, *Vet. Microbiol.*, 86. 69–88, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00492-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00492-8)
- Davison, A.J.: **Herpesvirus systematics**, *Vet. Microbiol.*, 143. 52–69, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Davison, A.J., Benkő M., Harrach B.: **Genetic content and evolution of adenoviruses**, *J. Gen. Virol.*, 84. 2895–2908, 2003. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>
- Davison, A.J., Cunningham, C., Sauerbier, W., McKinnell, R.G.: **Genome sequences of two frog herpesviruses**, *J. Gen. Virol.*, 87. 3509–3514, 2006. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82291-0>
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E.: **The order Herpesvirales**, *Arch. Virol.*, 154. 171–177, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
- Davison, A.J., Harrach B.: **Siadenovirus**. In Tidona, C.A., Darai, G., Büchen-Osmond, C. (eds) *The Springer Index of Viruses*. Springer, Berlin pp. 29–33, 2002. [https://doi.org/10.1007/3-540-31042-8\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-31042-8_4)
- Davison, A.J., Kurobe, T., Gatherer, D., Cunningham, C., Korf, I., Fukuda, H., Hedrick, R.P., Waltzek, T.B.: **Comparative genomics of carp herpesviruses**, *J. Virol.*, 87. 2908–2922, 2013. <https://doi.org/10.1128/JVI.03206-12>

- Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R.M., Renault, T.: **A novel class of herpesvirus with bivalve hosts**, *J. Gen. Virol.*, 86. 41–53, 2005. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach B.: **DNA sequence of frog adenovirus**, *J. Gen. Virol.*, 81. 2431–2439, 2000. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2431>
- 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. <https://doi.org/10.1023/a:1008125324346>
- 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. <https://doi.org/10.1556/AVet.51.2003.4.13>
- Delwart, E., Li, L.: **Rapidly expanding genetic diversity and host range of the *Circoviridae* viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes**, *Virus Res.*, 164. 114–121, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.021>
- Dennis, T., de Souza, W.M., Marsile-Medun, S., Singer, J.B., Wilson, S.J., Gifford, R.J.: **The evolution, distribution and diversity of endogenous circoviral elements in vertebrate genomes**, *Virus Res.*, 262. 15–23, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.014>
- Dennis, T., Flynn, P.J., de Souza, W.M., Singer, J.B., Moreau, C.S., Wilson, S.J., Gifford, R.J.: **Insights into circovirus host range from the genomic fossil record**, *J. Virol.*, 92. e00145–18, 2018. <https://doi.org/10.1128/JVI.00145-18>
- Dimmic, M.W., Rest, J.S., Mindell, D.P., Goldstein, R.A.: **rtREV: an amino acid substitution matrix for inference of retrovirus and reverse transcriptase phylogeny**, *J. Mol. Evol.*, 55. 65–73, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-2304-y>
- Dixon, P.F.: **Virus diseases of cyprinids**. In: Eiras, J.C. Segner, H. Kapoor, B.G. (eds) *Fish Diseases* (Vol. 1). Science Publishers, Enfield, NH., pp. 87–184, 2008.
- Doszpoly A.: **Tokhal-adenovírus és hal-herpeszvírusok genetikai elemzése**, PhD értekezés. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest, 50–72, 2011.
- Doszpoly A., Harrach B., LaPatra, S., Benkő M.: **Unconventional gene arrangement and content revealed by full genome analysis of the white sturgeon adenovirus, the single member of the genus *Ichtadenovirus***, *Infect. Genet. Evol.*, 75. 103976, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103976>
- Doszpoly A., Papp M., Deákné P.P., Glávits R., Ursu K., Dán Á.: **Molecular detection of a putatively novel cyprinid herpesvirus in sichel (*Pelecus cultratus*) during a mass mortality event in Hungary**, *Arch. Virol.*, 160. 1279–1283, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2348-8>
- Doszpoly A., Wellehan, J.F. Jr, Childress, A.L., Tarján Z.L., Kovács E.R., Harrach B., Benkő M.: **Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles**, *Infect. Genet. Evol.*, 17. 106–112, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>
- Dubovi, E.J.: **Adenoviridae**. In: MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. (eds) *Fenner's Veterinary Virology*. Fifth edition. Academic Press, San Diego, CA., pp. 217–227, 2017.
- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C.: **Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants**, *Nat. Rev. Genet.*, 9. 267–276, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrg2323>
- Eaton, W.D., Wingfield, W.H., Hedrick, R.P.: **Prevalence and experimental transmission of the steelhead herpesvirus in salmonid fishes**, *Dis. Aquat. Org.*, 7. 23–30, 1989. <https://www.int-res.com/articles/dao/7/d007p023.pdf>
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D.: **Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome**, *Can. Vet. J.*, 39. 44–51, 1998. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539838/>
- Élő P., Farkas S.L., Dán A.L., Kovács G.M.: **The p32K structural protein of the atadenovirus might have bacterial relatives**, *J. Mol. Evol.*, 56. 175–180, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2391-4>
- Fahsbender, E., Hewson, I., Rosario, K., Tuttle, A.D., Varsani, A., Breitbart, M.: **Discovery of a novel circular DNA virus in the Forbes sea star, *Asterias forbesi***, *Arch. Virol.*, 160. 2349–2351, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2503-2>
- Farkas S.L., Gál J.: **Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary**, *Vet. Microbiol.*, 138. 169–173, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.016>
- Farkas S.L., Harrach B., Benkő M.: **Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus***, *Virus Res.*, 132. 132–139, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.009>

- Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., Jestin, A.: **Replication of porcine circoviruses**, *Virology*, 6, 60, 2009. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-60>
- Fehér E., Székely C., Lőrincz M., Cech G., Tuboly T., Singh, H.S., Bányai K., Farkas, S.L.: **Integrated circoviral rep-like sequences in the genome of cyprinid fish**, *Virus Genes*, 47, 374–377, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0928-9>
- Felsenstein, J.: **Evolutionary trees from DNA sequences: a Maximum Likelihood approach**, *J. Mol. Evol.*, 17, 368–376, 1981. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
- Fijan, N.N., Wellborn, T.L., Naftel, J.P.: **An acute viral disease of channel catfish**, *US Fish Wildl. Serv. Tech. Pap.*, 43, 1–11, 1970.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C.: **Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2**, *J. Virol.*, 83, 12813–12821, 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.01719-09>
- Franklinos, L.H.V., Fernandez, J.R., Hydeskov, H.B., Hopkins, K.P., Everest, D.J., Cunningham, A.A., Lawson, B.: **Herpesvirus skin disease in free-living common frogs *Rana temporaria* in Great Britain**, *Dis. Aquat. Organ.*, 129, 239–244, 2018. <https://doi.org/10.3354/dao03246>
- Freitas, J.T., Subramaniam, K., Kelley, K.L., Marcquenski, S., Groff, J., Waltzek, T.B.: **Genetic characterization of esocid herpesvirus 1 (EsHV1)**, *Dis. Aquat. Organ.*, 122, 1–11, 2016. <https://doi.org/10.3354/dao03059>
- Garcia-Morante, B., Péntzes J.J., Costa, T., Martorell, J., Martínez, J.: **Hyperplastic stomatitis and esophagitis in a tortoise (*Testudo graeca*) associated with an adenovirus infection**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 28, 579–583, 2016. <https://doi.org/10.1177/1040638716659903>
- Garver, K.A., Leskisenoja, K., Macrae, R., Hawley, L.M., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Richard, J., Josefsson, C., Valtonen, E.T.: **An alloherpesvirus infection of European perch *Perca fluviatilis* in Finland**, *Dis. Aquat. Organ.*, 128, 175–185, 2018. <https://doi.org/10.3354/dao03228>
- Gibbs, M.J., Smeianov, V.V., Steele, J.L., Upcroft, P., Efimov, B.A.: **Two families of rep-like genes that probably originated by interspecies recombination are represented in viral, plasmid, bacterial, and parasitic protozoan genomes**, *Mol. Biol. Evol.*, 23, 1097–1100, 2006. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi122>
- Gibbs, M.J., Weiller, G.F.: **Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8022–8027, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8022>
- Gilbert, C., Meik, J.M., Dashevsky, D., Card, D.C., Castoe, T.A., Schaack, S.: **Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes**, *Proc. Biol. Sci.*, 281, 20141122, 2014. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1122>
- Granoff, A., Gravell, M., Darlington, R.W.: **Studies on the viral etiology of the renal adenocarcinoma of *Rana pipiens* (Lucké tumor)**. In: Mizell, M. (ed.): *Biology of Amphibian Tumors*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 279–295, 1969.
- Grossenbacher, K.: **Eine Springfroschkrankheit auf der Alpensuedseite**, *RANA*, 2, 203–205, 1997.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O.: **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0**, *Syst. Biol.*, 59, 307–321, 2010. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Haenen, O., Way, K., Bergmann, S.M. Ariel, E.: **The emergence of Koi herpesvirus and its significance to European aquaculture**, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 24, 293–307, 2004. [https://www.researchgate.net/publication/40118840\\_The\\_emergence\\_of\\_Koi\\_herpesvirus\\_and\\_its\\_significance\\_to\\_European\\_aquaculture](https://www.researchgate.net/publication/40118840_The_emergence_of_Koi_herpesvirus_and_its_significance_to_European_aquaculture)
- Halami, M.Y., Nieper, H., Müller, H., Johne, R.: **Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR**, *Virus Res.*, 132, 208–212, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.001>
- Hall, T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95–98, 1999.
- Hanson, L., Dishon, A., Kotler, M.: **Herpesviruses that infect fish**, *Viruses*, 3, 2160–2191, 2011. <https://doi.org/10.3390/v3112160>
- Hanson, L., Doszpoly A., van Beurden, S.J., de Oliveira Viadanna, P.H., Waltzek, T.: **Alloherpesviruses of fish**. In: Kibenge, F.S.B., Godoy, M.G. (eds) *Aquaculture Virology*. First edition. Academic Press, San Diego, CA., pp. 153–172, 2016.

- 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**, *Virology*, 3. 28, 2006. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-28>
- Harding, J.C.S., Clark, E.G.: **Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)**, *Swine Health Prod.*, 5. 201–203, 1997. <https://www.aasv.org/shap/issues/v5n5/v5n5p201.pdf>
- Harrach B.: **Reptile adenoviruses in cattle?** *Acta Vet. Hung.*, 48. 485–490, 2000. <https://doi.org/10.1556/004.48.2000.4.11>
- Harrach B.: **Az adenovírusok filogenetikája**. MTA doktori tézisek. Budapest, 2001.
- Harrach B.: **Adenoviruses: General features**. In: Caplan, M., Mitchell, R., Bradshaw, R. McManus, L. (eds) Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–10, 2014.
- 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.K., Wadell, G.: **Family Adenoviridae**. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA., pp. 125–141, 2012.
- Harrach B., Meehan, B.M., Benkő M., Adair, B.M., Todd, D.: **Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287**, *Virology*, 229. 302–308, 1997. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8390>
- Hedges, S.B.: **Amniote phylogeny and the position of turtles**, *BMC Biol.*, 10. 64, 2012. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-64>
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H., Eldar, A.: **A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp**, *J. Aquat. Anim. Health*, 12. 44–57, 2000. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2)
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Groff, J.M., Yun, S., Wingfield, W.H.: **Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white sturgeon *Acipenser transmontanus***, *Dis. Aquat. Org.*, 11. 49–56, 1991. <http://dx.doi.org/10.3354/dao011049>
- Hedrick, R.P., Sano, T.: **Herpesviruses of fish**. In: Ahne, W., Kurstak, E. (eds) *Viruses of Lower Vertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 161–170, 1989.
- Henriquez, R.N., Polchana, J., Kanchanakhan, S., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Subramaniam, K.: **Genome sequence of a novel Alloherpesvirus isolated from glass catfish (*Kryptopterus bicirrhis*)**, *Genome Announc.*, 6. e00403-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00403-18>
- Horie, M., Tomonaga, K.: **Non-retroviral fossils in vertebrate genomes**, *Viruses*, 3. 1836–1848, 2011. <https://doi.org/10.3390/v3101836>
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.: **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees**, *Bioinformatics*. 17. 754–755, 2001. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hughes, L.C., Ortí, G., Huang, Y., Sun, Y., Baldwin, C.C., Thompson, A.W., Arcila, D., Betancur-R, R., Li, C., Becker, L., Bellora, N., Zhao, X., Li, X., Wang, M., Fang, C., Xie, B., Zhou, Z., Huang, H., Chen, S., Venkatesh, B., Shi, Q.: **Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115., 6249–6254, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719358115>
- Huson, D.H., Scornavacca, C.: **Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks**, *Syst. Biol.*, 61. 1061–1067, 2012. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys062>
- Hyatt, A.D., Hine, P.M., Jones, H.B., Whittington, R.L., Kearns, C., Wise, T.G., Crane, M.S., Williams, M.L.: **Epizootic mortality in the pilchard *Sardinops sagax neopilchardus* in Australia and New Zealand in 1995. II. Identification of a herpesvirus within the gill epithelium**, *Dis. Aquat. Organ.*, 28. 17–29, 1997. <http://dx.doi.org/10.3354/dao028017>
- Iida, Y., Masumura, K., Nakai, T., Sorimachi, M., Matsuda, H.: **A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus***, *J. Aquat. Anim. Health*, 1. 7–12, 1989. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1989\)001%3C0007:AVDILA%3E2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1989)001%3C0007:AVDILA%3E2.3.CO;2)
- Iranzo, J., Krupovic, M., Koonin, E.V.: **The double-stranded DNA virosphere as a modular hierarchical network of gene sharing**, *mBio*, 7. e00978–16, 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00978-16>
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M.: **The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences**, *Comput. Appl. Biosci.*, 8. 275–282, 1992. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Joyce, W.G., Gauthier, J.A.: **Palaeoecology of triassic stem turtles sheds new light on turtle origins**, *Proc. Biol. Sci.*, 271. 1–5, 2004. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2523>

- Jung, S.J., Miyazaki, T.: **Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)**, J. Fish Dis., 18. 211–220, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb00296.x>
- Katzourakis, A., Gifford, R.J.: **Endogenous viral elements in animal genomes**, PLOS Genet., 6. e1001191, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001191>
- Kazlauskas, D., Varsani, A., Koonin, E.V., Krupovic, M.: **Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids**, Nat. Commun., 10. 3425, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11433-0>
- Kelly, R.K., Nielsen, O., Mitchell, S.C., Yamamoto, T.: **Characterization of Herpesvirus vitreum isolated from hyperplastic epidermal tissue of walleye, *Stizostedion vitreum vitreum* (Mitchill)**, J. Fish Dis., 6. 249–260, 1983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1983.tb00073.x>
- Kimura, T., Yoshimizu, M.: **Salmonid herpesvirus: OMV, *Oncorhynchus masou* virus**. In: Ahne, W., Kurstak, E. (eds) Viruses of Lower Vertebrates. Springer, Berlin, pp. 171–183, 1989.
- Kohl, C., Vidovszky, M.Z., Mühlendorfer, K., Dabrowski, P.W., Radonić, A., Nitsche, A., Wibbelt, G., Kurth, A., Harrach, B.: **Genome analysis of bat adenovirus 2: indications of interspecies transmission**, J. Virol., 86. 1888–1892, 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.05974-11>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., Krupovic, M.: **Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity**, Virology, 479-480. 2–25, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y.I., Yutin, N., Zerbini, F.M., Kuhn, J.H.: **Global organization and proposed megataxonomy of the virus world**, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 84. e00061–19, 2020. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19>
- Koonin, E.V., Krupovic, M., Yutin, N.: **Evolution of double-stranded DNA viruses of eukaryotes: from bacteriophages to transposons to giant viruses**, Ann. NY. Acad. Sci., 1341. 10–24, 2015b. <https://doi.org/10.1111/nyas.12728>
- Kovács G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.08.010>
- Kraberger, S., Argüello-Astorga, G.R., Greenfield, L.G., Galilee, C., Law, D., Martin, D.P., Varsani, A.: **Characterisation of a diverse range of circular replication-associated protein encoding DNA viruses recovered from a sewage treatment oxidation pond**, Infect. Genet. Evol., 31. 73–86, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.001>
- Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D., Davis, H.L.: **Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95. 12631–12636, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12631>
- Krupovic, M.: **Networks of evolutionary interactions underlying the polyphyletic origin of ssDNA viruses**, Curr. Opin. Virol., 3. 578–586, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.010>
- Krupovic, M., Koonin, E.V.: **Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution**, Nat. Rev. Microbiol., 13. 105–115, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3389>
- Krupovic, M., Varsani, A., Kazlauskas, D., Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Yutin, N., Wolf, Y.I., Harrach B., Zerbini, F.M., Dolja, V.V., Kuhn, J.H., Koonin, E.V.: **Cressdnaviricota: a virus phylum unifying seven families of rep-encoding viruses with single-stranded, circular DNA genomes**, J. Virol., 94. e00582-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/JVI.00582-20>
- Kulanayake, S., Tikoo, S.K.: **Adenovirus core proteins: structure and function**, Viruses, 13. 388, 2021. <https://doi.org/10.3390/v13030388>
- Kumar, S., Hedges, S.B.: **A molecular timescale for vertebrate evolution**, Nature, 392. 917–920, 1998. <https://doi.org/10.1038/31927>
- Labonté, J.M., Suttle, C.A.: **Previously unknown and highly divergent ssDNA viruses populate the oceans**, ISME J., 7. 2169–2177, 2013. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.110>
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G.: **Clustal W and Clustal X version 2.0**, Bioinformatics, 23. 2947–2948, 2007. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Le, S.Q., Gascuel, O.: **An improved general amino acid replacement matrix**, Mol. Biol. Evol., 25. 1307–1320, 2008. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Lee, M.S.Y.: **Palaeontology: turtles in transition**, Curr. Biol., 23. R513–R515, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.011>

- Lee, T.W.R., Blair, G.E., Matthews, D.A.: **Adenovirus core protein VII contains distinct sequences that mediate targeting to the nucleus and nucleolus, and colocalization with human chromosomes**, *J. Gen. Virol.*, 84. 3423–3428, 2003. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19546-0>
- Lefevre, P., Lett, J.M., Varsani, A., Martin D.P.: **Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses**, *J. Virol.*, 83. 2697–2707, 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-08>
- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E.: **Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces**, *J. Virol.*, 84. 1674–1682, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.02109-09>
- Li, L., Shan, T., Soji, O.B., Alam, M.M., Kunz, T.H., Zaidi, S.Z., Delwart, E.: **Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals**, *J. Gen. Virol.*, 92. 768–772, 2011. <https://doi.org/10.1099/vir.0.028704-0>
- Li, C., Wu, X.C., Rieppel, O., Wang, L.T., Zhao, L.J.: **An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China**, *Nature*, 456. 497–501, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07533>
- Liu, H., Fu, Y., Li, B., Yu, X., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D.: **Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes**, *BMC Evol. Biol.*, 11. 276, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-276>
- Liu, Q., Wang, H., Ling, Y., Yang, S.X., Wang, X.C., Zhou, R., Xiao, Y.Q., Chen, X., Yang, J., Fu, W.G., Zhang, W., Qi, G.L.: **Viral metagenomics revealed diverse CRESS-DNA virus genomes in faeces of forest musk deer**, *Virol. J.*, 17. 61, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01332-y>
- Liu, J., Zhang, Y., Lei, X., Zhang, Z.: **Natural selection of protein structural and functional properties: a single nucleotide polymorphism perspective**, *Genome Biol.*, 9. R69, 2008. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r69>
- Londoño, A., Riego-Ruiz, L., Argüello-Astorga, G.R.: **DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs**, *Arch. Virol.*, 155. 1033–1046, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0674-4>
- Lőrincz M., Cságola A., Biksi I., Szeredi L., Dán Á., Tuboly, T.: **Detection of porcine circovirus in rodents - short communication**, *Acta Vet. Hung.*, 58. 265–268, 2010. <https://doi.org/10.1556/AVet.58.2010.2.12>
- Lőrincz M., Cságola A., Farkas S.L., Székely Cs., Tuboly T.: **First detection and analysis of a fish circovirus**, *J. Gen. Virol.*, 92. 1817–1821, 2011. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031344-0>
- Lőrincz M., Dán Á., Láng M., Csaba G., Tóth A.G., Székely Cs., Cságola A., Tuboly T.: **Novel circovirus in European catfish (*Silurus glanis*)**, *Arch. Virol.*, 157. 1173–1176, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1291-1>
- Lucké, B.: **A neoplastic disease of the kidney of the frog, *Rana pipiens***, *Am. J. Cancer Res.*, 20. 352–379, 1934. <https://doi.org/10.1158/aic.1934.352>
- Lucké, B.: **Carcinoma in the leopard frog: its possible causation by a virus**, *J. Exp. Med.*, 68. 457–468, 1938. <https://doi.org/10.1084/jem.68.4.457>
- Mangel, W.F., San Martín, C.: **Structure, function and dynamics in adenovirus maturation**, *Viruses*, 6. 4536–4570, 2014. <https://doi.org/10.3390/v6114536>
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., Buhk, H.J.: **Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus**, *J. Virol.*, 71. 2562–2566, 1997. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.3.2562-2566.1997>
- Marschang, R.E.: **Viruses infecting reptiles**, *Viruses*, 3. 2087–2126, 2011. <https://dx.doi.org/10.3390/v3112087>
- Martin, D.P., Biagini, P., Lefevre, P., Golden, M., Roumagnac, P., Varsani, A.: **Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses**, *Viruses*, 3. 1699–1738, 2011. <https://doi.org/10.3390/v3091699>
- Matthews, D.A., Russell, W.C.: **Adenovirus core protein V interacts with p32-a protein which is associated with both the mitochondria and the nucleus**, *J. Gen. Virol.*, 79. 1677–1685, 1998. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-7-1677>
- Mayo, M.A.: **ICTV at the Paris ICV: results of the plenary session and the binomial ballot**, *Arch. Virol.*, 147. 2254–2260, 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050200052>
- McAllister, P.E., Herman, R.L.: **Epizootic mortality in hatchery-reared lake trout (*Salvelinus namaycush*) caused by a putative virus possibly of the herpesvirus group**, *Dis. Aquat. Organ.*, 6. 113–119, 1989. <https://dx.doi.org/10.3354/dao006113>



- McGeoch, D.J., Davison, A.J.: **Origins of DNA viruses**. In Gibbs, A.J., Calisher, C.H., Garcia-Arenal, F. (eds) *Molecular Basis of Virus Evolution*. University Press, Cambridge, pp. 67–75, 1995.
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J., Davison, A.J.: **Topics in herpesvirus genomics and evolution**, *Virus Res.*, 117. 90–104, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
- McKinnell, R.G.: **The Lucké frog kidney tumor and its herpesvirus**, *Am. Zool.*, 13. 97–114, 1973. <https://doi.org/10.1093/icb/13.1.97>
- McKinnell, R.G., Tarin, D.: **Temperature-dependent metastasis of the Lucké renal carcinoma and its significance for studies on mechanisms of metastasis**, *Cancer Metastasis Rev.*, 3. 373–386, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00051461>
- Medveczky I.: **Herpesviridae**. In: Tuboly S. (szerk.) *Állatorvosi Járványtan I (Állatorvosi mikrobiológia)*. Második, változatlan kiadás. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 340–353, 1998.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D.: **Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses**, *J. Gen. Virol.*, 78. 221–227, 1997. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-221>
- Mellergaard S, Bloch B: **Herpesvirus-like particles in angelfish *Pterophyllum altum***, *Dis. Aquat. Organ.*, 5. 151–155, 1988. <https://doi.org/10.3354/dao005151>
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H.: **Herpesvirus assembly: an update**, *Virus Res.*, 143. 222–234, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.018>
- Mutschmann F., Schneeweiss, D.: **Herpes-virus-infektionen bei *Pelobates fuscus* und anderen Anuren im Berlin-Brandenburger Raum**, *RANA*, 5. 113–118, 2008.
- Mysiak, M.E., Holthuizen, P.E., van der Vliet, P.C.: **The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication**, *Nucleic Acids Res.*, 32. 3913–3920, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh726>
- Near, T.J., Eytan, R.I., Dornburg, A., Kuhn, K.L., Moore, J.A., Davis, M.P., Wainwright, P.C., Friedman, M., Smith, W.L.: **Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109. 13698–13703, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206625109>
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D.: **Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses**, *Arch. Virol.*, 143. 1723–1744, 1998. <https://doi.org/10.1007/s007050050412>
- Norrby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R.S., Ginsberg, H.S., Kalert, S.S., Kawamura, H., Rowe, W.P., Russell, W.C., Schlesinger, W., Wigand, R.: **Adenoviridae**, *Intervirology*, 7. 117–125, 1976. <https://doi.org/10.1159/000149945>
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J.: **T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment**, *J. Mol. Biol.*, 302. 205–217, 2000. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Ntumvi, N.F., Dikko, J., Tamoufe, U., Ndze, V.N., Takuo, J.M., Mouiche, M., Nwobegahay, J., LeBreton, M., Gillis, A., Rimoin, A.W., Schneider, B.S., Monagin, C., McIver, D.J., Joly, D.O., Wolfe, N.D., Rubin, E.M., Lange, C.E.: **Evaluation of bat adenoviruses suggests co-evolution and host roosting behaviour as drivers for diversity**, *Microb. Genom.*, 7. 000561, 2021. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000561>
- Oksanen, H.M., Bamford, D.H.: **Tectiviridae**. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.J., Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA., pp. 317–322, 2012.
- Origi, F.C., Schmidt, B.R., Lohmann, P., Otten, P., Akdesir, E., Gaschen, V., Aguilar-Bultet, L., Wahli, T., Sattler, U., Stoffel, M.H.: **Ranid herpesvirus 3 and proliferative dermatitis in free-ranging wild common frogs (*Rana temporaria*)**, *Vet. Pathol.*, 54. 686–694, 2017. <https://doi.org/10.1177/0300985817705176>
- Origi, F.C., Schmidt, B.R., Lohmann, P., Otten, P., Meier, R.K., Pisano, S.R.R., Moore-Jones, G., Tecilla, M., Sattler, U., Wahli, T., Gaschen, V., Stoffel, M.H.: **Bufonid herpesvirus 1 (BfHV1) associated dermatitis and mortality in free ranging common toads (*Bufo bufo*) in Switzerland**, *Sci. Rep.*, 8. 14737, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32841-0>
- Orton, J.P., Morales, M., Fontenele, R.S., Schmidlin, K., Kraberger, S., Leavitt, D.J., Webster, T.H., Wilson, M.A., Kusumi, K., Dolby, G.A., Varsani, A.: **Virus discovery in desert tortoise fecal samples: novel circular single-stranded DNA viruses**, *Viruses*, 12. 143, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12020143>
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S.: **A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like**

- domains: clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination**, *Virology*, 285. 270–277, 2001. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0938>
- Osterrieder, K.: **Herpesvirales**. In: MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. (eds) *Fenner's Veterinary Virology*. Fifth edition. Academic Press, San Diego, CA., pp. 189–216, 2017.
- Pallister, J., Wright, P., Sheppard, M.: **A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses**, *J. Virol.*, 70. 5115–5122, 1996. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.8.5115-5122.1996>
- Pass, D.A., Perry, R.A.: **The pathology of psittacine beak and feather disease**, *Aust. Vet. J.*, 61. 69–74, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1984.tb15520.x>
- Pellett, P.E., Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., Lacoste, V., Minson, A.C., Nicholas, J., Roizman, B., Studdert, M.J., Wang, F.: **Order Herpesvirales**. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA., pp. 99–123, 2012.
- Perry, W.L., 3rd: **JavaScript DNA translator: DNA-aligned protein translations**, *BioTechniques*, 33. 1318–1320, 2002. <https://doi.org/10.2144/02336bc01>
- Pénzes J.: **Hüllőkben és kétéltűekben előforduló adenovírusok és parvovírusok sokfélesége és filogenetikája**, PhD értekezés. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola, Budapest, 2015.
- Pénzes J.J., Menéndez-Conejero, R., Condezo, G.N., Ball, I., Papp T., Doszpoly A., Paradela, A., Pérez-Berná, A.J., López-Sanz, M., Nguyen, T.H., van Raaij, M.J., Marschang, R.E., Harrach B., Benkő M., San Martín, C.: **Molecular characterization of a lizard adenovirus reveals the first atadenovirus with two fiber genes and the first adenovirus with either one short or three long fibers per penton**, *J. Virol.*, 88. 11304–11314, 2014. <https://doi.org/10.1128/JVI.00306-14>
- Podgorski, I.I., Pantó L., Földes K., de Winter, I., Jánoska M., Sós E., Chenet, B., Harrach B., Benkő M.: **Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus-host co-evolution**, *Acta Vet. Hung.*, 66. 474–487, 2018. <https://doi.org/10.1556/004.2018.042>
- Rafferty, K.A.: **Spontaneous kidney tumors in the frog: rate of occurrence in isolated adults**, *Science*, 141. 720–721, 1963. <https://doi.org/10.1126/science.141.3582.720>
- Rafferty, K.A.: **The biology of spontaneous renal carcinoma of the frog**. In: King, J.S. (ed.) *Renal neoplasia*. Little, Brown and Company, Boston, MA., pp. 311–315, 1967.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A.: **Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**, *Syst. Biol.*, 67. 901–904, 2018. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ravi, V., Venkatesh, B.: **Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity**, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18. 544–550, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.11.001>
- Reavy, B., Swanson, M.M., Cock, P.J., Dawson, L., Freitag, T.E., Singh, B.K., Torrance, L., Mushegian, A.R., Taliansky, M.: **Distinct circular single-stranded DNA viruses exist in different soil types**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81. 3934–3945, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.03878-14>
- Reddy, V.S., Nemerow, G.R.: **Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111. 11715–11720, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408462111>
- Rivera, S., Wellehan, J.F.X. Jr., McManamon, R., Innis, C.J., Garner, M.M., Raphael, B.L., Gregory, C.R., Latimer, K.S., Rodriguez, C.E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A.B., Nyaoke, A., Gates, A.E., Gilbert, K., Childress, A.L., Risatti, G.R., Frasca, S. Jr.: **Systematic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21. 415–426, 2009. <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>
- Roizman, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J.: **The family Herpesviridae: an update**, *Arch. Virol.*, 123. 425–449, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF01317276>
- Rosa-Calatrava, M., Grave, L., Puvion-Dutilleul, F., Chatton, B., Kedinger, C.: **Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization**, *J. Virol.*, 75. 7131–7141, 2001. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.7131-7141.2001>
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A.: **Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus**, *Arch. Virol.*, 162. 1447–1463, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M.: **Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics**, *J. Gen. Virol.*, 90. 2418–2424, 2009. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012955-0>

- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M.: **A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics**, Arch. Virol., 157. 1851–1871, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1391-y>
- Rosario, K., Mettel, K.A., Benner, B.E., Johnson, R., Scott, C., Yousseff-Vanegas, S.Z., Baker, C., Cassill, D.L., Storer, C., Varsani, A., Breitbart, M.: **Virus discovery in all three major lineages of terrestrial arthropods highlights the diversity of single-stranded DNA viruses associated with invertebrates**, PeerJ., 6. e5761, 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.5761>
- 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. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>
- Russell, W.C.: **Update on adenovirus and its vectors**, J. Gen. Virol. 81. 2573–2604, 2000. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2573>
- Russell, W.C., Benkő, M.: **Animal adenoviruses**. In: Granoff, A., Webster, R.G. (eds) Encyclopedia of Virology. Academic Press, San Diego, CA., pp. 14–21, 1999.
- Ryazanova, T.V., Eliseikina, M.G., Kalabekov, I.M., Odintsova, N.A.: **A herpes-like virus in king crabs: Characterization and transmission under laboratory conditions**, J. Invertebr. Pathol., 127. 21–31, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.02.003>
- Sadeghi, M., Altan, E., Deng, X., Barker, C.M., Fang, Y., Coffey, L.L., Delwart, E.: **Virome of > 12 thousand Culex mosquitoes from throughout California**, Virology, 523. 74–88, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.029>
- Saha, B., Parks, R.J.: **Recent advances in novel antiviral therapies against human adenovirus**, Microorganisms, 8. 1284, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091284>
- Sambrook, J., Russel, D.W.: **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY., 2001.
- San Martín, C., Glasgow, J.N., Borovjagin, A., Beatty, M.S., Kashentseva, E.A., Curiel, D.T., Marabini, R., Dmitriev, I.P.: **Localization of N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid**, J. Mol. Biol., 383. 923–934, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.054>
- Sano, M., Fukuda, H., Sano, T.: **Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel**. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (eds) Pathology in Marine Sciences. First edition. Academic Press, San Diego, CA., pp. 15–31, 1990a.
- Sano, T., Morita, N., Shima, N., Akimoto, M.: **A preliminary report on pathogenicity and oncogenicity of cyprinid herpesvirus**, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 10. 11–13, 1990b. [https://eafp.org/download/1990-Volume10/Issue%201/10\\_01%20p11.PDF](https://eafp.org/download/1990-Volume10/Issue%201/10_01%20p11.PDF)
- Sauerbier, W., Rollins-Smith, L.A., Carlson, D.L., Williams, C.S., Williams, J.W., McKinnell, R.G.: **Sizing of the Lucké tumor herpesvirus genome by field inversion gel electrophoresis and restriction analysis**, Herpetopathologia, 2. 137–143, 1995.
- Scheyer, T.M., Sander, P.M.: **Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles**, Proc. Biol. Sci., 274. 1885–1893, 2007. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0499>
- Schoch, R.R., Sues, H.D.: **A Middle Triassic stem-turtle and the evolution of the turtle body plan**, Nature, 523. 584–587, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14472>
- Schoch, R.R., Sues, H.D.: **The diapsid origin of turtles**, Zoology, 119. 159–161, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.01.004>
- Schumacher, V.L., Innis, C.J., Garner, M.M., Risatti, G.R., Nordhausen, R.W., Gilbert-Marcheterre, K., Wellehan, J.F., Jr, Childress, A.L., Frasca, S., Jr: **Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*)**, J. Zoo. Wildl. Med., 43. 501–510, 2012. <https://doi.org/10.1638/2011-0228R.1>
- Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E.M., Espuña, E., Domingo, M.: **Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain**, Vet. Rec., 142. 483–486, 1998. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.483>
- Sellyei, B., Baska, F., Varga, Á., Borzák, R., Doszpoly, A.: **Molecular detection of a novel cyprinid herpesvirus in roach (*Rutilus rutilus*) and asp (*Leuciscus aspius*) showing typical signs of carp pox disease**, Arch. Virol., 165. 1569–1576, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04638-y>
- Shackelton, L.A., Holmes, E.C.: **The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts**, Trends Microbiol., 12. 458–465, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.08.005>
- Shaffer, H.B., McCartney-Melstad, E., Near, T.J., Mount, G.G., Spinks, P.Q.: **Phylogenomic analyses of 539 highly informative loci dates a fully resolved time tree for the major clades of living turtles (Testudines)**, Mol. Phylogenet. Evol., 115. 7–15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.006>

- Sharp, P.M., Simmonds, P.: **Evaluating the evidence for virus/host co-evolution**, *Curr. Opin. Virol.*, 1, 436–441, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.018>
- Shchelkunov, I.S., Karaseva, T.A., Kadoshnikov, Y.P.: **Atlantic salmon papillomatosis: visualization of herpesvirus-like particles in skin growths of affected fish**, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12, 28–31, 1992. <http://eaftp.org/download/1992-Volume12/Issue%2018-Shchelkunov%20et%20al.pdf>
- Shchelkunov, I.S., Shchelkunova, T.I., Shchelkunov, A.I., Kolbassova, Y.P., Didenko, L.V., Bykovsky, A.P.: **First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia**, *Dis. Aquat. Organ.*, 86, 193–203, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02124>
- Sigamani, S.S., Zhao, H., Kamau, Y.N., Baines, J.D., Tang, L.: **The structure of the herpes simplex virus DNA-packaging terminase pUL15 nuclease domain suggests an evolutionary lineage among eukaryotic and prokaryotic viruses**, *J. Virol.*, 87, 7140–7148, 2013. <https://doi.org/10.1128/JVI.00311-13>
- Simmonds, P., Adams, M.J., Benkó M., Breitbart, M., Brister, J.R., Carstens, E.B., Davison, A.J., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Harrach B., Hull, R., King, A.M., Koonin, E.V., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lefkowitz, E.J., Nibert, M.L., Orton, R., Roossinck, M.J., Sabanadzovic, S., Sullivan, M.B., Suttle, C.A., Tesh, R.B., van der Vlugt, R.A., Varsani, A., Zerbini, F.M.: **Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics**, *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 161–168, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K.: **The Staden Package**. In: Misener, S., Krawetz, S. (eds) *Computer Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 115–130, 1998.
- Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A.: **Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1**, *J. Virol.*, 80, 6225–6234, 2006. <https://doi.org/10.1128/JVI.02506-05>
- Stempel, M., Chan, B., Brinkmann, M.M.: **Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway**, *Med. Microbiol. Immunol.*, 208, 495–512, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00582-0>
- Tarján Z.L., Péntzes J.J., Tóth R.P., Benkó M.: **First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes**, *Acta Vet. Hung.*, 62, 134–144, 2014. <https://doi.org/10.1556/AVet.2013.061>
- Tavaré, S. **Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences**, *Lectures Math. Life Sci.*, 17, 57–86, 1986. [https://www.damtp.cam.ac.uk/user/st321/CV\\_&Publications\\_files/STpapers-pdf/T86.pdf](https://www.damtp.cam.ac.uk/user/st321/CV_&Publications_files/STpapers-pdf/T86.pdf)
- Thacker, E.L.: **Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem?** *The Pig J.*, 48, 66–70, 2001.
- Thomson, D., Meers, J., Harrach B.: **Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)**, *Virus. Res.*, 83, 189–195, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00437-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00437-3)
- Thomson, R.C., Spinks, P.Q., Shaffer, H.B.: **A global phylogeny of turtles reveals a burst of climate-associated diversification on continental margins**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2012215118, 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012215118>
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G.: **Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines**, *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A*, 226., 153–167, 1974.
- Tisza, M.J., Pastrana, D.V., Welch, N.L., Stewart, B., Peretti, A., Starrett, G.J., Pang, Y.S., Krishnamurthy, S.R., Pesavento, P.A., McDermott, D.H., Murphy, P.M., Whited, J.L., Miller, B., Brenchley, J., Rosshart, S.P., Rehmann, B., Doorbar, J., Ta'ala, B.A., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Resnick, S.M., Bolduc, B., Sullivan, M.B., Varsani, A., Segall, A.M., Buck, C.B.: **Discovery of several thousand highly diverse circular DNA viruses**, *eLife*, 9, e51971, 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.51971>
- Todd, D.: **Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review**, *Avian Pathol.*, 29, 373–394, 2000. <https://doi.org/10.1080/030794500750047126>
- Todd, D., McNulty, M.S., Adair, B.M., Allan, G.M.: **Animal circoviruses**, *Adv. Virus Res.*, 57, 1–70, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(01\)57000-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(01)57000-1)
- Tweedell, K.S.: **Induced oncogenesis in developing frog kidney cells**, *Cancer Res.*, 27, 2042–2052, 1967. [https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/27/11\\_Part\\_1/2042.full.pdf](https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/27/11_Part_1/2042.full.pdf)
- van Beurden, S.J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M.H., Haenen, O.L., Peters, S., Abma-Henkens, M.H., Peeters, B.P., Rottier, P.J., Engelsma, M.Y.: **Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1**, *J. Gen. Virol.*, 91, 880–887, 2010. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016261-0>

- van Oostrum, J., Smith, P.R., Mohraz, M., Burnett, R.M.: **The structure of the adenovirus capsid. III. Hexon packing determined from electron micrographs of capsid fragments**, *J. Mol. Biol.*, 198. 73–89, 1987. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90459-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90459-1)
- van Regenmortel, M.H., Mahy, B.W.: **Emerging issues in virus taxonomy**, *Emerg. Infect. Dis.*, 10. 8–13, 2004. <https://doi.org/10.3201/eid1001.030279>
- Varga J., Rusvai M., Fodor L.: **A háziállatok fertőző betegségei**. MÁOK Kft., Budapest, pp. 312–315, 2018.
- Varsani, A., Krupovic, M.: **Smacoviridae: a new family of animal-associated single-stranded DNA viruses**, *Arch. Virol.*, 163. 2005–2015, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3820-z>
- Victoria, J.G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., Naeem, A., Zaidi, S., Delwart, E.: **Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis**, *J. Virol.*, 83. 4642–4651, 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.02301-08>
- Wadell, G., Hammarskjöld, M.L., Winberg, G., Varsányi, T.M., Sundell, G.: **Genetic variability of adenoviruses**, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 354. 16–42, 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27955.x>
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P.: **Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae***, *Dis. Aquat. Organ.*, 84. 179–194, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02023>
- Watson, L.R., Yun, S.C., Groff, J.M., Hedrick, R.P.: **Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus***, *Dis. Aquat. Org.*, 22. 199–210, 1995. <http://dx.doi.org/10.3354/dao022199>
- Weber, J.M.: **Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 199. 227–235, 1995. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79496-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79496-4_12)
- Webster, A., Hay, R.T., Kemp, G.: **The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide**, *Cell*, 72. 97–104, 1993. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90053-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90053-s)
- Wellehan, J.F., Johnson, A.J., Harrach B., Benkö M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R.: **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. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13366-13369.2004>
- Werneburg, I., Sánchez-Villagra, M.R.: **Timing of organogenesis support basal position of turtles in the amniote tree of life**, *BMC Evol. Biol.*, 9. 82, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-82>
- Whelan, S., Goldman, N.: **A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach**, *Mol. Biol. Evol.*, 18. 691–699, 2001. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003851>
- Whittington, R.J., Crockford, M., Jordan, D., Jones, B.: **Herpesvirus that caused epizootic mortality in 1995 and 1998 in pilchard, *Sardinops sagax neopilchardus* (Steindachner), in Australia is now endemic**, *J. Fish Dis.*, 31. 97–105, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00869.x>
- Wolf, K., Darlington, R.W.: **Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish**, *J. Virol.*, 8. 525–533, 1971. <https://doi.org/10.1128/JVI.8.4.525-533.1971>
- Woods, L.W., Latimer, K.S.: **Circovirus infection of nonpsittacine birds**, *J. Avian Med. Surg.*, 14. 154–163, 2000. [https://doi.org/10.1647/1082-6742\(2000\)014f0154:CIONB12.0.CO;2](https://doi.org/10.1647/1082-6742(2000)014f0154:CIONB12.0.CO;2)
- Wu, G.A., Jun, S.R., Sims, G.E., Kim, S.H.: **Whole-proteome phylogeny of large dsDNA virus families by an alignment-free method**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106. 12826–12831, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905115106>
- Yamamoto, T., Kelly, R.K., Nielsen, O.: **Epidermal hyperplasias of northern pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and C-type particles**, *Arch. Virol.*, 79. 255–272, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF01310815>
- Yang, Z., Rannala, B.: **Molecular phylogenetics: principles and practice**, *Nat. Rev. Genet.*, 13. 303–314, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Yanong, R.P.E.: **Possible herpesvirus-associated disease in the blue-eyed plecostomus, *Panaque suttoni***, *Proc. Int. Assoc. Aquat. Anim. Med.*, 26. 83, 1995.
- Young, C.S.H.: **The structure and function of the adenovirus major late promoter**, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 272. 213–249, 2003. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_8)
- Zardoya, R., Meyer, A.: **Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95. 14226–14231, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14226>

- Zardoya, R., Meyer, A.: **The evolutionary position of turtles revised**, *Naturwissenschaften*, 88. 193–200, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001140100228>
- Zhang, Y., Bergelson, J.M.: **Adenovirus receptors**, *J. Virol.*, 79. 12125–12131, 2005. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005>
- Zhao, L., Rosario, K., Breitbart, M., Duffy, S.: **Eukaryotic circular Rep-encoding single-stranded DNA (CRESS DNA) viruses: ubiquitous viruses with small genomes and a diverse host range**, *Adv. Virus Res.*, 103. 71–133, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.10.001>

## 10. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

### 10.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent publikációk

Tarján Z.L., Doszpoly A.: **Teknősökben előforduló adenovírusok divezitása (Autoreferátum és bővített irodalmi összefoglaló)**, Magy. Állatorvosok, 141. 747–757, 2019.

Harrach B., Tarján Z.L., Benkő M.: **Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo**, FEBS Lett., 593. 3660–3673, 2019. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13687>

Doszpoly A., Tarján Z.L., Glávits R., Müller T., Benkő M.: **Full genome sequence of a novel circo-like virus detected in an adult European eel *Anguilla anguilla* showing signs of cauliflower disease**, Dis. Aquat. Organ., 109. 107–115, 2014. <https://doi.org/10.3354/dao02730>

Tarján Z.L., Péntes J.J., Tóth R.P., Benkő M.: **First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes**, Acta. Vet. Hung., 62. 134–144, 2014. <https://doi.org/10.1556/avet.2013.061>

Doszpoly A., Wellehan, J.F. Jr., Childress, A.L., Tarján Z.L., Kovács E.R., Harrach B., Benkő M.: **Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles**, Infect. Genet. Evol., 17. 106–112, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>

### 10.2. Konferencia prezentációk

Tarján Z.L., Eszterbauer E., Benkő M.: **Új hal-herpeszvírus első kimutatása lesőharcsában (*Silurus glanis*)**, Akadémiai beszámolók, Budapest, 2019. (ELŐADÁS)

Tarján Z.L., Eszterbauer E., Benkő M.: **új hal-herpeszvírus első molekuláris kimutatása lesőharcsában (*Silurus glanis*)**, XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2018. (POSZTER)

Tarján Z.L., Eszterbauer E., Benkő M.: **Molecular demonstration of a supposedly novel fish herpesvirus species presence in European catfish (*Silurus glanis*) in Hungary**, 10<sup>th</sup> International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Budapest, 2017. (POSZTER)

Tarján Z.L., Péntes J., Benkő M.: **Full genome sequences of novel circoviruses detected in lower vertebrate animals**, 17<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2015. (POSZTER)

Tarján Z.L., Harrach B., Benkő M.: **Partial genome characterization of the red-eared slider adenovirus supports the establishment of a new genus**, 9<sup>th</sup> International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Malaga, 2014. (ELŐADÁS)

Tarján Z.L., Péntes J., Doszpoly A., Benkő M.: **Full genome analysis of four circoviruses newly detected in lower vertebrates (fishes, frogs and a turtle)**, XVI. International Congress of Virology (IUMS), Montreal, 2014. (POSZTER)

Benkő M., Tarján Z.L., Harrach B.: **Partial genome sequence of an adenovirus, representing a newly discovered lineage, from red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*)**, XVI. International Congress of Virology (IUMS), Montreal, 2014. (POSZTER)

Doszpoly A., Tarján Z.L., Glávits R., Müller T., Benkő M.: **Cirkovírus kimutatása karfiolbetegség tüneteit mutató angolnából**, XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2014. (POSZTER)

Tarján Z.L., Péntes J.J., Tóth R.P., Benkő M.: **Circovírus rep szekvenciák kimutatása ősbib gerincesekben**, Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2014. (ELŐADÁS)

Tarján Z.L., Péntes J.J., Tóth R.P., Benkő M.: **PCR-screening of lower vertebrate samples widens the known host range of circoviruses: first detection of circoviruses in frogs**, 4<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2013. (POSZTER)

Benkő M., Péntes J.J., Tarján Z.L., Harrach B.: **Targeted screenings of lower vertebrates unexpectedly widen the host spectrum of several long-known virus families**, IX. International Congress of Veterinary Virology, Madrid, 2012. (POSZTER)

### 10.3. Rendszertani javaslat az ICTV részére

Tarján Z.L., Péntes J.J., Doszpoly A., Harrach B., Benkő M.: **Create one new genus (*Testadenovirus*) and six new species (*Rowavirales: Adenoviridae*)**, Approved ICTV Proposal, 2020. [https://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/animal-dna-viruses-and-retroviruses/11018](https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/animal-dna-viruses-and-retroviruses/11018)

## 11. A DOKTORI KUTATÁS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

### 11.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent publikációk

Csépányi-Kömi R., Sáfár D., Grósz V., Tarján Z.L., Ligeti E.: **In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins**, Small GTPases, 4. 90–101, 2013. <https://doi.org/10.4161/sgtp.23708>

Kaján G.L., Doszpoly A., Tarján Z.L., Vidovszky M.Z., Papp T.: **Virus-host coevolution with a focus on animal and human DNA viruses**, J. Mol. Evol., 88. 41–56, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09913-4>

### 11.2. Konferencia prezentációk

Gabelics T.P., Tarján Z.L., Ballmann M., Benkő M.: **Genetic diversity of pigeon circoviruses in Hungary**, 17<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2015. (POSZTER)

Vadász G., Tarján Z.L., Benkő M.: **Genetic analysis of an adenovirus detected in a green anole (*Anolis carolinensis*)**, 10<sup>th</sup> International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Budapest, 2017. (POSZTER)



## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megtisztelő kötelességem köszönetet mondani Dr. Benkő Mária professzor asszonynak, aki témavezetőként és magánemberként egyaránt mindvégig, mindenben mellettem állt, elméleti és gyakorlati tudásával, tapasztalatával, tanácsaival segítette munkámat és utat mutatott a kutatóvá válás rögzös útján.

Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. Harrach Balázs akadémikusnak, aki sokszor inspirált és terelte folyton elkalandozó gondolataimat a helyes irányba. Disszertációm gondos javítása mellett mindig számíthattam rá szakmai és emberi szempontból egyaránt.

A Molekuláris és Összehasonlító Virologia, valamint a Halparazitológia Témacsoportok jelenlegi és hajdani munkatársait a kutatói környezet megalkotásáért és azért illeti köszönet, hogy bármikor, bárkivel tudtam konzultálni módszerekről, eredményekről, elképzelésekről, vagy akár csak az élet ügyes-bajos dolgairól, mindezt baráti környezetben.

Dr. Doszpoly Andornak, dr. Kaján Győzőnek, dr. Papp Tibornak és dr. Vidovszky Mártonnak a laboratóriumi munkában nélkülözhetetlen elméleti és gyakorlati tudnivalók elsajátításához nyújtott segítségét szeretném megköszönni.

A lesőharcsa-HV vizsgálatához nyújtott segítségéért Dr. Eszterbauer Editnek tartozom köszönettel, amiért rendelkezésemre bocsátotta a szervmintát DNS kivonáshoz és szükség esetén használhattam az általa vezetett laboratóriumot.

Dr. Sós Endre a Fővárosi Állat- és Növénykert vezető állatorvosa, valamint Huszák Péter és Czuczor István az intézmény állatgondozói a teknős-AdV-okkal kapcsolatos vizsgálatokhoz járultak hozzá, azzal, hogy engedélyezték és segítették a helyszíni mintavételeket. Csabai Domonkosnak a szép számban rendelkezésemre bocsátott és rendszertanilag meghatározott kétéltű- és hüllőmintákért tartozom köszönettel. Szendőfi Baláznak a halak mintavételezéséhez nyújtott nélkülözhetetlen gyakorlati segítségét és iránymutatását szeretném megköszönni.

Állatorvos és biológia szakos TDK-hallgatóimnak és szakdolgozóimnak, Vadász Gergőnek és Gabelics Tamás Péternek köszönöm, hogy mint társ-témavezető az oktatás oldaláról is bepillantottam a kutatói lét egy másik aspektusába. Gergőnek ezen kívül a teknősök állatkerti mintavételeinél nyújtott segítségéért is köszönettel tartozom.

Édesanyámnak, Keresztanyámnak, Öcsémnek, Feleségemnek Nórinak és Szüleinek, valamint Gerinek, Vilinek és Misának azért tartozom köszönettel, mert megteremtették azt a nyugodt családi légkört, ami nélkül nem lehet gondolatokat összerendezni. Szabolcs öcsém ezen kívül még halmintákkal is ellátott, és Nórival együtt a helyszíni mintavételeknél is segítségemre volt, amiért külön köszönet illeti őket.

Munkám anyagi háttérét az OTKA K100163 és NN107632 pályázatok, valamint a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Doktori Iskolájának PhD-kerete biztosította.

## 13. MELLÉKLETEK

### 1. melléklet: A disszertációban felhasznált adenovírus szekvenciák adatai.

RÖVID NÉV	TELJES NÉV	GENBANK AZONOSÍTÓ
<b>Testadenovirus</b>		
RESAdV-1	vörösfülű ékszerteknős-adenovírus 1	JN632576
<b>Ichtadenovirus</b>		
WSAdV-1	fehér tok-adenovírus 1	MK101347
<b>Siadenovirus</b>		
CPAdV-2	állszíjas pingvin-adenovírus 2	KP144329
FrAdV-1	béka-adenovírus 1	AF224336
GtAdV-1	széncinege-adenovírus 1	FJ849795
PsAdV-5	papagáj-adenovírus 5	MK695679
PsAdV-6	papagáj-adenovírus 6	MN687905
PsAdV-7	papagáj-adenovírus 7	MK227353
RAdV-1	ragadozómadár-adenovírus 1	EU715130
SPSAdV-1	délsarki halfarkas-adenovírus 1	HM585353
TAdV-3	pulyka-adenovírus 3	AF074946
<b>Aviadenovirus</b>		
DAdV-2	kacsa-adenovírus 2	KJ469653
GoAdV-4	liba-adenovírus 4	JF510462
FAdV-1	tyúk-adenovírus 1	U46933
FAdV-3	tyúk-adenovírus 3	KT862807
FAdV-4	tyúk-adenovírus 4	KU342001
PiAdV-2	galamb-adenovírus 2	KX121164
PsAdV-1	papagáj-adenovírus 1	MH580295
TAdV-1	pulyka-adenovírus 1	GU936707
<b>Atadenovirus</b>		
BAdV-4	szarvasmarha-adenovírus 4	AF036092
BAdV-6	szarvasmarha-adenovírus 6	JQ345700
BDAV-1	szakállas agáma-adenovírus 1	MT050041
DAdV-1	kacsa-adenovírus 1	Y09598
LAdV-2	gyík-adenovírus 2	KJ156523
OAdV-7	juh-adenovírus 7	U40839
OdAdV-1	öszvérszarvas-adenovírus 1	KY748210
PsAdV-3	papagáj-adenovírus 3	KJ675568
SnAdV-1	kígyó-adenovírus 1	DQ106414
<b>Mastadenovirus</b>		
BAdV-2	szarvasmarha-adenovírus 2	LC621239
BtAdV-2	denevér-adenovírus 2	JN252129
CAdV-1	kutya-adenovírus 1	AC_000003
CSLAdV-1	kaliforniai oroszlánfóka-adenovírus 1	KJ563221
EAdV-2	ló-adenovírus 2	KT160425
GPAAdV-1	tengerimalac-adenovírus 1	MN986925
HAdV-2	humán-adenovírus 2	MF044052
HAdV-12	humán-adenovírus 12	YP_002640218
HAdV-14	humán-adenovírus 14	JX892927
HAdV-21	humán-adenovírus 21	AY601633
HAdV-40	humán-adenovírus 40	NC_001454
HpAdV-1	barna delfin-adenovírus 1	KY352473
MAdV-2	egér-adenovírus 2	HM049560
PAdV-3	sertés-adenovírus 3	AC_000189
PbAdV-1	jegesmedve-adenovírus 1	MF773580
SAdV-21	majom-adenovírus 21	AC_000010
SAdV-23	majom-adenovírus 23	AY530877
SkAdV-1	bűzösborz-adenovírus 1	KP238322
SqAdV-1	vörös mókus-adenovírus 1	KY427939
TSAAdV-1	mókuscickány-adenovírus 1	AC_000190

**2. melléklet:** A disszertációban felhasznált alloherpeszvírus szekvenciák adatai.

<b>RÖVID NÉV</b>	<b>TELJES NÉV</b>	<b>GENBANK AZONOSÍTÓ</b>
<b><i>Batrachovirus</i></b>		
BuHV-1	varangy-herpeszvírus 1	MF143550
RaHV-1	béka-herpeszvírus 1	DQ665917
RaHV-2	béka-herpeszvírus 2	DQ665652
RaHV-3	béka-herpeszvírus 3	KX832224
<b><i>Cyprinivirus</i></b>		
AngHV-1	angolna herpeszvírus 1	FJ940765
CyHV-1	ponty herpeszvírus 1	JQ815363
CyHV-2	ponty herpeszvírus 2	JQ815364
CyHV-3	ponty herpeszvírus 3	DQ657948
CyHV-4	ponty herpeszvírus 4	polimeráz: KM357278, termináz: KM357276
CyHV-5	ponty herpeszvírus 5	polimeráz (balin): MK507839 termináz (balin): MK507840 polimeráz (bodorka): MK507844 termináz (bodorka): MK507845
SiHV-2	harcsa-herpeszvírus 2	MW732127, termináz: MW732128
<b><i>Ictalurivirus</i></b>		
AcHV-2	tok-herpeszvírus-2	FJ815289
IcHV-1	csatornaharcsa-herpeszvírus 1	M75136
IcHV-2	csatornaharcsa-herpeszvírus 2	MG271984
PeHV-2	sügér-herpeszvírus 2	MG570129
SiHV-1	harcsa-herpeszvírus 1	MH048901