

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

Marko ZADRAVEC

ADENOVIRUSI PRI PTICAH V SLOVENIJI

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
UDK 616.98:578.826:578.2(497.12)(043.3)

Marko ZADRAVEC, dr. vet. med.

ADENOVIRUSI PRI PTICAH V SLOVENIJI

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

Marko ZADRAVEC

ADENOVIRUSI PRI PTICAH V SLOVENIJI

DELO JE BILO OPRAVLJENO NA:

VETERINARSKI FAKULTETI, UNIVERZA V LJUBLJANI

INŠTITUT ZA ZDRAVSTVENO VARSTVO PERUTNINE

Predstojnica: prof. dr. Olga Zorman Rojs

VETERINARY MEDICAL RESEARCH INSTITUTE,

HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES

Predstojnik: prof. dr. Balázs Harrach

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentorica: prof. dr. Olga Zorman Rojs

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Članica in predsednica: prof. dr. Darja Barlič Maganja

Članica: prof. dr. Alenka Dovč

Član: prof. dr. Peter Hostnik

Član: dr. Tomi Trilar, višji znanstveni sodelavec, muzejski svetnik

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorand: Marko Zadavec

*Ko hodiš,
pojdi zmeraj do konca.*

*Spomladi do rožne cvetice,
poleti do zrele pšenice,
jeseni do polne police,
pozimi do snežne kraljice,
v knjigi do zadnje vrstice,
v življenju do prave resnice,
v sebi do rdečice čez eno in drugo lice.*

*A če ne prideš ne prvič, ne drugič
do krova in pravega kova
poskusi: vnovič
in zopet
in znova.*

(Tone Pavček)

Katarini, Filipu in Franu

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	1
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	11
IZVLEČEK.....	13
ABSTRACT	14
1 UVOD	15
1.1 RAZISKOVALNI PROBLEMI, NAMEN DELA, CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE	16
2 PODATKI IZ LITERATURE.....	18
2.1 SPLOŠNO O ADENOVIRUSIH	18
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	18
2.3 ZGRADBA VIRIONA	20
2.4 ORGANIZACIJA GENOMA	21
2.5 RAZMNOŽEVANJE ADENOVIRUSOV.....	24
2.6 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI ADENOVIRUSOV.....	26
2.7 HEMAGLUTINACIJSKA SPOSOBNOST ADENOVIRUSOV.....	26
2.8 PATOGENOST ADENOVIRUSOV	26
2.9 POMEMBNEJŠE BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO ADENOVIRUSI.....	27
2.9.1 INKLUZIJSKI HEPATITIS (ANGL. <i>INCLUSION BODY HEPATITIS</i> - IBH)	27
2.9.2 SINDROM ZAOSTALE TEKOČINE V OSRČNIKU (ANGL. <i>HYDROPERICARDIUM SYNDROME</i> - HS), BOLEZEN ANGARA (ANGL. <i>ANGARA DISEASE</i>)	28
2.9.3 RAZJEDE MIŠIČNEGA ŽELODCA (ANGL. <i>GIZZARD EROSIONS</i>).....	29
2.9.4 BRONHITIS PREPELIC (ANGL. <i>QUAIL BRONCHITIS</i> - QB)	29
2.9.5 SINDROM PADCA NESNOSTI (ANGL. <i>EGG DROP SYNDROME</i> - EDS) ..	30
2.9.6 HEMORAGIČNI ENTERITIS (ANGL. <i>HEMORRHAGIC ENTERITIS</i> - HE) ..	30
2.9.7 BOLEZEN MARMORIRANE VRANICE (ANGL. <i>MARBLE SPLEEN DISEASE</i> - MSD) (TADV-3)	31
2.9.8 DRUGA OBOLENJA, KI JIH POVZROČAJO Z ADENOVIRUSI PRI PTICAH.....	31
2.10 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z ADENOVIRUSI.....	32

2.11	RAZŠIRJENOST ADENOVIRUSOV PRI RAZLIČNIH VRSTAH PTIC IN PERUTNINI	35
2.11.1	DOKAZ BAZOFILNIH IN/ALI EOZINOFILNIH INKLUZIJ V JEDRIH.....	35
2.11.2	DOKAZ ADENOVIRUSOV Z ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO	35
2.11.3	DOKAZ ADENOVIRUSOV Z METODO IZOLACIJE VIRUSA.....	36
2.11.4	DOKAZ PROTITELES PRI PTICAH	36
2.11.5	DOKAZ ADENOVIRUSOV Z MOLEKULARNIMI METODAMI.....	38
2.12	EVOLUCIJA ADENOVIRUSOV	40
3	MATERIAL IN METODE	44
3.1	MATERIAL	44
3.1.1	VZORCI PROSTOŽIVEČIH PTIC	44
3.1.1.1	VZORCI V NAJLONSKE MREŽE UJETIH PTIC	44
3.1.1.2	VZORCI PROSTOŽIVEČIH PTIC, OSKRBLJENIH V AMBULANTI ZA PTICE, MALE SESALCE IN PLAZILCE	45
3.1.2	VZORCI PTIC, KATERIH VZORCI SO BILI DEL PROGRAMA AKTIVNEGA NADZORA AI V SLOVENIJI V LETU 2010.....	45
3.1.3	VZORCI USTRELJENIH RAC MLAKARIC	46
3.1.4	VZORCI DVORIŠČNE PERUTNINE	46
3.1.5	VZORCI ŽIVALI ŽIVALSKIH VRTOV IN ŽIVALSKIM VRTOM PODOBNIH PROSTOROV V SLOVENIJI.....	47
3.1.6	VZORCI FAZANOV	47
3.1.7	VZORCI SOKOLOV V UJETNIŠTVU	47
3.1.8	VZORCI LJUBITELJSKIH VRST PTIC, PREGLEDANIH V AMBULANTI ZA PTICE, MALE SESALCE IN PLAZILCE.....	48
3.1.9	ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	48
3.2	METODE	51
3.2.1	TRANSPORT IN HRANJENJE VZORCEV.....	51
3.2.2	PRIPRAVA VZORCEV BRISOV	51
3.2.3	MOLEKULARNE METODE ZA DOKAZOVANJE NUKLEINSKE KISLINE ADENOVIRUSOV V KLOAKALNIH BRISIH PTIC	51
3.2.3.1	IZOLACIJA CELOKUPNE DNA	51
3.2.3.2	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (ANGL. <i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>) (PCR)	53
3.2.3.2.1	VGNEZDITVENA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (ANGL. <i>NESTED PCR</i>) ZA DOKAZOVANJE GENA ZA POLIMERAZO.....	53

3.2.3.2.2	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO ZA DOKAZOVANJE GENA ZA HEKSON	54
3.2.3.3	DOKAZOVANJE PRODUKTOV PCR	54
3.2.3.4	DODATNO POMNOŽEVANJE ŠIBKIH PRODUKTOV PCR.....	55
3.2.3.5	ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR.....	55
3.2.3.6	ANALIZA PRODUKTOV VGNEZDITVENE PCR IN PCR	56
3.2.3.6.1	ANALIZA NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ.....	56
4	REZULTATI	60
4.1	VZORCI PREGLEDANIH PTIC.....	60
4.1.1	VZORCI PREGLEDANIH PROSTOŽIVEČIH PTIC	60
4.1.2	VZORCI PREGLEDANE DVORIŠČNE PERUTNINE.....	60
4.1.3	VZORCI PREGLEDANIH LJUBITELJSKIH PTIC, PTIC IZ ŽIVALSKIH VRTOV IN SOKOLOV IZ UJETNIŠTVA	60
4.2	MOLEKULARNE PREISKAVE.....	65
4.2.1	DOKAZ GENOMA ADENOVIRUSOV V KLOAKALNIH BRISIH PTIC.....	65
4.2.1.1	DOKAZOVANJE ODSEKA GENA ZA ADENOVIRUSNO POLIMERAZO	65
4.2.1.1.1	DOKAZOVANJE ODSEKA GENA ZA ADENOVIRUSNO POLIMERAZO V KLOAKALNIH BRISIH RAZLIČNIH VRST PROSTOŽIVEČIH PTIC	65
4.2.1.1.2	DOKAZOVANJE ODSEKA GENA ZA ADENOVIRUSNO POLIMERAZO V KLOAKALNIH BRISIH RAZLIČNIH VRST LJUBITELJSKIH PTIC, PTIC IZ ŽIVALSKIH VRTOV IN SOKOLOV IZ UJETNIŠTVA	66
4.2.1.1.3	DOKAZOVANJE ODSEKA GENA ZA ADENOVIRUSNO POLIMERAZO V KLOAKALNIH BRISIH RAZLIČNIH VRST DVORIŠČNE PERUTNINE	66
4.2.1.2	DOKAZOVANJE ODSEKA GENA ZA ADENOVIRUSNI HEKSON.....	67
4.2.2	DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH IN AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ	73
4.2.2.1	DOLOČANJE AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ ODSEKOV GENA ZA ADENOVIRUSNO POLIMERAZO.....	73
4.2.3	FILOGENETSKA ANALIZA ODSEKOV GENA ZA POLIMERAZO ADENOVIRUSOV, KI SO BILI UGOTOVLJENI V KLOAKALNIH BRISIH RAZLIČNIH VRST PROSTOŽIVEČIH PTIC, LJUBITELJSKIH PTIC, PTIC IZ ŽIVALSKIH VRTOV IN SOKOLOV IZ UJETNIŠTVA	76
4.2.4	FILOGENETSKA ANALIZA ODSEKOV GENA ZA POLIMERAZO ADENOVIRUSOV, KI SO BILI UGOTOVLJENI V KLOAKALNIH BRISIH RAZLIČNIH VRST DVORIŠČNE PERUTNINE, PERUTNINE INTENZIVNE REJE IN NEKATERIH VRST PROSTOŽIVEČIH PTIC IZ REDA PLOJKOKLJUNOV IN POBREŽNIKOV	80
4.2.5	FILOGENETSKA ANALIZA ODSEKA ZA HEKSON AVIADENOVIRUSOV	83

4.2.6	RAZVRSTITEV ADENOVIRUSOV V POSAMEZNE RODOVE TER RAZVRSTITEV GLEDE POJAVNOST PRI DOLOČENI VRSTI OZ REDU PTIC.....	85
5	RAZPRAVA	87
5.1	PROSTOŽIVEČE PTICE	89
5.1.1.1	PEVCI (PASSERIFORMES).....	90
5.1.1.2	MOČVIRNIKI (CICONIIFORMES).....	93
5.1.1.3	PLOJKOKLJUNI (ANSERIFORMES).....	93
5.1.1.4	UJEDE (FALCONIFORMES).....	94
5.1.1.5	SOVE (STRIGIFORMES).....	95
5.1.1.6	ŽERJAVOVCI (GRUIFORMES).....	96
5.1.1.7	POBREŽNIKI (CHARADRIFORMES).....	96
5.1.1.8	GOLOBI (COLUMBIFORMES).....	97
5.1.1.9	VPIJATI (CORACIIFORMES).....	97
5.1.1.10	PLEZALCI (PICIFORMES).....	97
5.1.2	LJUBITELJSKE VRSTE PTIC V UJETNIŠTVU.....	98
5.1.2.1	PAPIGE (PSITTACIFORMES).....	98
5.1.2.2	PEVCI (PASSERIFORMES).....	100
5.1.2.3	DRUGE VRSTE LJUBITELJSKIH PTIC V UJETNIŠTVU	100
5.1.3	DVORIŠČNA IN INTENZIVNA REJA PERUTNINE	100
5.1.3.1	KURE (GALLIFORMES).....	102
5.1.3.2	PLOJKOKLJUNI (ANSERIFORMES).....	105
5.1.4	EVOLUCIJA ADENOVIRUSOV IN ZAKLJUČKI.....	105
5.2	SKLEPI.....	110
6	POVZETEK	113
7	SUMMARY	118
8	ZAHVALA	123
9	LITERATURA	124
	PRILOGE	144

KAZALO SLIK

Slika 1:	Sorodstveni odnosi med rodovi v družini Adenoviridae	19
Slika 2:	Shematični prikaz adenovirusnega viriona	21
Slika 3:	Shematični prikaz štirih različnih vzorcev organizacije genoma v družini Adenoviridae	23
Slika 4:	Prikaz pojavljanja adenovirusov petih priznanih rodov pri vretenčarskih gostiteljih iz petih večjih razredov	42
Slika 5:	Odlov prostoživečih ptic v najlonske mreže	44
Slika 6:	Odvzem kloakalnega brisa s posebnim, majhnim brisom	45
Slika 7:	Dvoriščna perutnina	46
Slika 8:	Odvzem kloakalnega brisa pri fazanu	47
Slika 9:	Pregled ljubiteljske ptice ob izofluranski anesteziji in odvzem kloakalnega brisa	48
Slika 10:	Prikaz pomnoževanja gena za polimerazo adenovirusov z metodo vgnezditvene PCR	49
Slika 11:	Prikaz pomnoževanja gena za hekson adenovirusov z metodo PCR	49
Slika 12:	Primer elektroforezne ločitve produktov pomnoževanja z vgnezditveno PCR in začetnima oligonukleotidoma polFinner/polRinner	65
Slika 13:	Primer elektroforezne ločitve produktov pomnoževanja s PCR in začetnima oligonukleotidoma HexonA/HexonB	67
Slika 14:	Poravnava aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo	74
Slika 15:	Poravnava aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo	75
Slika 16:	Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo adenovirusov pri prostoživečih pticah, ljubiteljskih pticah, pticah iz živalskih vrtov in živalskim vrtom podobnih prostorov ter sokolih iz ujetništva	79
Slika 17:	Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo virusov, ki so bila ugotovljena pri dvoriščni perutnini, perutnini intenzivne reje in nekaterih prostoživečih pticah iz reda plojkokljunov in pobrežnikov	82
Slika 18:	Filogram nukleotidnih zaporedij odseka za hekson aviadenovirusov	84

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razvrstitev adenovirusov, ki so bili potrjeni z molekularnimi metodami, in boleznimi oziroma bolezenski znaki, ki jih povzročajo	39
Tabela 2: Začetni oligonukleotidi za detekcijo gena za adenovirusno polimerazo	50
Tabela 3: Začetni oligonukleotidi za detekcijo gena za adenovirusni hekson	50
Tabela 4: Seznam različnih tipov adenovirusov, ki smo jih, poleg lastnih sekvenc, uporabili v filogenetskih analizah aminokislinskih zaporedij za adenovirusno polimerazo	57
Tabela 5: Seznam različnih tipov adenovirusov, ki smo jih, poleg lastnih sekvenc, uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za hekson	58
Tabela 6: Kloakalni brisi odvzeti pri prostoživečih pticah	61
Tabela 7: Število odvzetih kloakalnih brisov pri dvoriščni perutnini	63
Tabela 8: Število odvzetih kloakalnih brisov pri ljubiteljskih pticah, pticah živalskih vrtov in živalskim vrtom podobnih prostorov ter sokolih v ujetništvu	64
Tabela 9: Dokaz odseka gena za adenovirusno polimerazo pri prostoživečih pticah	68
Tabela 10: Dokaz odseka gena za adenovirusno polimerazo pri ljubiteljskih pticah, pticah živalskih vrtov živalskim vrtom podobnih prostorov ter in sokolih v ujetništvu	70
Tabela 11: Dokaz odseka gena za adenovirusno polimerazo pri dvoriščni perutnini	71
Tabela 12: Adenovirusi, ugotovljeni z začetnima oligonukleotidoma za pomnoževanje odseka gena za hekson	72
Tabela 13: Število in razporeditev adenovirusov, ki smo jih potrdili pri pticah v Sloveniji v obdobju od 2008 do 2011	85
Tabela 14: Pogostnost potrditve posameznih rodov adenovirusov pri različnih redovih ptic	86

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AdV	adenovirus
AdVs	adenovirusi "adenoviruses"
AI	aviarna influenza
AtAdV	<i>Atadenovirus</i>
AviAdV	<i>Aviadenovirus</i>
BAdV	adenovirus goveda "bovine adenovirus"
CAR	celični receptor pri kokseki- in adenovirusu "coxsackievirus and adenovirus receptor"
CELO	"chicken embryo lethal orphan"
ChAdV	adenovirus kameleonov "chameleon adenovirus"
DAdV	račji adenovirus "duck adenovirus"
DBP	DNA-vezavni protein "DNA-binding protein"
DNA	deoksiribonukleinska kislina "deoxyribonucleic acid"
dNTP	deoksinukleozid trifosfat "Deoxyribonucleotide triphosphate"
EDS	sindrom padca nesnosti "egg drop syndrome"
ELISA	encimsko imunski test "enzyme-linked immunosorbent assay"
EM	elektronska mikroskopija
FAdV	kokošji adenovirus "fowl adenovirus"
FaAdV	adenovirus sokolov "falcon adenovirus"
FrAdV	žabji adenovirus "frog adenovirus"
GoAdV	gosji adenovirus "goose adenovirus"
GTAdV	adenovirus velikih sinic "great tit adenovirus"
HAdV	humani adenovirus "human adenovirus"
HE	hemoragični enteritis
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti "human immunodeficiency virus"
HS	sindrom zaostale tekočine v osrčniku "hydropericardium syndrome"
IBH	inkluzijski hepatitis "inclusion body hepatitis"
IchtAdV	<i>Ichtadenovirus</i>
MAdV	adenovirus glodavcev "murine adenovirus"
MastAdV	<i>Mastadenovirus</i>
MHC	molekule poglobitnega histokompatibilnega kompleksa "major histocompatibility complex"
mRNA	sporočilne RNA "messenger RNA"
MSD	bolezen marmorirane vranice "marble spleen disease"
OAdV	ovčji adenovirus "ovine adenovirus"
PCR	verižna reakcija s polimerazo "polymerase chain reaction"
PiAdV	golobji adenovirus "pigeon adenovirus"
PsAdV	adenovirus papig "psittacine adenovirus"
QB	bronhitis prepelic "quail bronchitis"

RAdV	adenovirus ujed	"raptor adenovirus"
REA	preiskava cepitve pomnoženega odseka	"restriction enzyme analysis"
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina	"ribosomal ribonucleic acid"
SARS	sindrom akutne respiratorne stiske	"severe acute respiratory syndrome"
SiAdV	<i>Siadenovirus</i>	
SnAdV	kačji adenovirus	"snake adenovirus"
STAdV	adenovirus želve <i>Indotestudo forstenii</i>	"Sulawesi tortoise adenovirus"
TAdV	puranji adenovirus	"turkey adenovirus"
Bolezen WN	bolezen zahodnega Nila	"West Nile disease"

ADENOVIRUSI PRI PTICAH V SLOVENIJI

IZVLEČEK

Ključne besede: Ptice, bolezni – epidemiologija; adenovirusne infekcije – epidemiologija; adenovirus – klasifikacija; verižna reakcija spolimerazo – metode; filogenija; ptice; Slovenija

Pri pticah so dokazani adenovirusi iz treh rodov: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus*. Čeprav večina adenovirusov ne povzroča bolezni pri pticah, so nekateri tipi povzročitelji pomembnih bolezni v intenzivni reji perutnine. V Sloveniji in svetu je malo podatkov o razširjenosti adenovirusov pri pticah, pridobljenih z molekularnimi metodami. Odločili smo se, da v naši raziskavi pridobimo čim več podatkov o pojavljanju adenovirusov z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pri različnih vrstah ptic in ugotovimo njihove filogenetske odnose.

Kloakalne brise ali sveže iztrebke smo odvzeli različnim vrstam prostoživečih ptic, ljubiteljskim vrstam ptic, dvoriščni perutnini in perutnini v intenzivni reji. Vzorce smo pregledali z vgnezditveno PCR. Uporabili smo visoko degenerirane začetne pare oligonukleotidov za pomnoževanje odseka polimeraze adenovirusov. Z omenjenim postopkom so uspešno dokazali vse do sedaj poznane adenoviruse.

Pregledali smo skupno 1281 vzorcev, med katerimi je bilo 233 vzorcev (18,2 %) pozitivnih na prisotnost adenovirusov. Izmed 626 vzorčenih prostoživečih ptic smo adenoviruse potrdili v 139 vzorcih (22,2 %). V rod *Aviadenovirus* jih je bilo uvrščenih 45 (7,2 %), v rod *Siadenovirus* 52 (8,3 %) in v rod *Atadenovirus* 42 (6,7 %). Izmed 317 vzorcev dvoriščne perutnine smo adenoviruse potrdili v 25 vzorcih (7,9 %). Od tega je bilo 13 (4,1 %) aviadenovirusov in 12 (3,8 %) siadenovirusov. Atadenovirusov v tej skupini ptic nismo ugotovili. Pregledali smo tudi 338 vzorcev ljubiteljskih ptic. Adenoviruse smo potrdili v 69 vzorcih (20,4 %). Med njimi je bilo 15 (4,4 %) aviadenovirusov, 48 (14,2 %) siadenovirusov in 6 (1,8 %) atadenovirusov.

Ugotovili smo, da se pojavljanje adenovirusov razlikuje med posameznimi redovi ptic. Pri plojkokljunih je bila 5,1 %, pri kurah 9,8 %, golobih 72,7 %, močvirnikih 10,0 %, ujedah 39,0 %, pobrežnikih 12,5 %, vpijatih 66,7 %, plezalcih 18,2 %, pevcih 15,4 % in pri papigah 14,2 %. Adenovirusov nismo ugotovili v redu sov, žerjavovcev in veslonožcev.

Dvestotriintriideset (233) ugotovljenih adenovirusov smo uvrstili v 87 različnih tipov. Izmed teh jih 76 še ni bilo opisanih. Adenoviruse smo dokazali pri 54 vrstah ptic, od tega pri 43 vrstah prvič. Ugotovili smo, da veliko kladov, predvsem v rodu *Aviadenovirus* in *Siadenovirus*, sestavljajo sevi adenovirusov, ki smo jih odkrili pri isti vrsti ptice ali med pticami v isti družini. Rezultat potrjuje domnevo o skupnem evolucijskem razvoju virusa in gostitelja. V rodu *Atadenovirus* so ugotovljeni adenovirusi le v 4 od 13 pregledanih redov ptic. Zelo verjetno je, da ptice niso izvorni gostitelji in so atadenovirusi posledica preskokov virusa med razredi vretenčarjev. Rezultati naših raziskav kažejo tudi na verjetne medvrstne preskoke adenovirusov pri pticah, ki si delijo skupen habitat ali so v odnosu plenilec – plen.

Potrdili smo domnevo, da je lahko ena vrsta ptic okužena z adenovirusi iz dveh ali celo vseh treh rodov. Ugotovili smo, da so dvoriščna perutnina in prostoživeče ptice lahko pomemben rezervoar različnih patogenih adenovirusov. Potrdili smo virus DAdV-1 pri mlakarici in virus TAdV-3 ter različne tipe FAdV pri perutnini iz dvoriščne reje, ki smo jih natančneje določali z metodo PCR in začetnimi oligonukleotidi, ki pomnožujejo variabilni odsek heksona.

ADENOVIRUSES IN BIRDS IN SLOVENIA

ABSTRACT

Key words: Bird diseases – epidemiology; adenovirus infection – epidemiology; adenovirus – classification; polymerase chain reaction – methods; phylogeny; birds; Slovenia

Adenoviruses from three genera have been detected in birds: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* and *Atadenovirus*. Although most adenoviruses do not cause diseases in birds, commercial poultry industry faces some important adenoviral diseases. With exception of data obtained from commercial poultry, there are very few data on the prevalence of adenoviruses in birds based on molecular methods. The main goal of our research was to gain as many data as possible about the prevalence of adenoviruses in various bird species by the PCR molecular method, and determine their phylogenetic relationships. We sampled cloacal swabs or fresh feces from various species of free-living birds, cage birds, backyard flocks and poultry reared by intensive farming. Samples were examined by nested PCR with highly degenerated primers targeting the adenoviral DNA polymerase gene. This method was successfully applied to every currently known adenovirus. In total, 1281 samples were examined, among them 233 (18.2%) were positive for the presence of adenoviruses. Of 626 samples of free-living birds, 139 (22.2%) were positive for adenoviruses: 45 (7.2%) were aviadenoviruses, 52 (8.3%) siadenoviruses and 42 (6.7%) atadenoviruses. Of 317 samples of backyard flock birds, 25 (7.9%) were positive for adenoviruses: 13 (4.1%) were aviadenoviruses and 12 (3.8%) siadenoviruses; no atadenoviruses were confirmed in this group of birds. Finally, 338 samples of cage birds were examined. Adenoviruses were found in 69 (20.4%) samples: 15 (4.4%) were aviadenoviruses, 48 (14.2%) siadenoviruses and 6 (2.1%) atadenoviruses.

The prevalence of adenoviruses confirmed in our study varied among different orders of birds. The prevalence was 5.1% in Anseriformes, 9.8% in Galliformes, 72.7% in Columbiformes, 10.0% in Ciconiiformes, 39.0% in Falconiformes, 12.5% in Charadriiformes, 66.7% in Coraciiformes, 18.2% in Piciformes, 15.4% in Passeriformes and 14.2% in Psittaciformes. Adenoviruses were not confirmed in the following orders: Strigiformes, Gruiformes and Pelecaniformes. The 233 adenoviruses detected in our study clustered in 87 different types. Seventy-six of them were detected for the first time. Adenoviruses in our study were detected in 54 bird species. For 43 species, our study provides the first molecular confirmation of the presence of adenoviruses in them. Many clades, especially in genera *Aviadenovirus* and *Siadenovirus*, were formed by strains confirmed in the same bird species or in birds within the same family. These results strongly support the hypothesis of coevolution of adenoviruses and their bird hosts. Atadenoviruses were detected only in 4 out of 13 examined orders. It is very likely that birds are not the original host of atadenoviruses and that the presence of different strains in genus *Atadenovirus* in birds is a result of several interclass host switches. Our results also hint at several interspecies host switches in birds that share habitat or are in predator–prey relationship. We also confirmed the hypothesis that one bird species can be infected with different adenoviruses from two or even three different genera. Finally, we confirmed that backyard flocks and free-living birds can be an important reservoir of various pathogenic adenoviruses. Specifically, DAdV-1 in mallards and TAdV-3 and various FAdV types in backyard flocks have been confirmed in our study. The different FAdV types were further characterized by PCR using primers for amplification part of the variable hexon gene.

1 UVOD

Družina Adenoviridae je monofiletska skupina virusov, ki jo sestavlja pet rodov: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* in *Ichtadenovirus*. Predvidevajo, da gre za zelo stare viruse, ki so se hkrati s svojimi gostitelji spreminjali tekom evolucije. Adenovirusi so dokazano prisotni pri gostiteljih vseh glavnih razredov vretenčarjev. Tako naj bi pet rodov adenovirusov ustrezalo petim večjim razredom vretenčarjev: sesalcem, pticam, plazilcem, dvoživkam in ribam (1–3).

Gostitelji mastadenovirusov so sesalci, aviadenovirusov ptice in ichtadenovirusov ribe. Na osnovi filogenetskih izračunov in značilne organizacije genoma vsi predstavniki rodov *Atadenovirus* in *Siadenovirus* ne sovpadajo s predvidenim razredom gostitelja, to so plazilci za rod *Atadenovirus* ter dvoživke za rod *Siadenovirus* (4). Rodova imata širok spekter gostiteljev in oba vključujeta tudi ptice (2,5–8).

Večina adenovirusov pri pticah ne povzroča kliničnih bolezenskih znakov, nekateri med njimi pa povzročajo različne bolezni. Pri pticah so najpogosteje ugotovljeni adenovirusi iz rodu *Aviadenovirus*. Čeprav so manj pogosti, pa so siadenovirusi in atadenovirusi za ptice bolj patogeni (9). Posamezna ptica je lahko okužena z enim ali istočasno z več različnimi tipi adenovirusov (10).

Bolezni, ki jih povzročajo adenovirusi v intenzivnih rejah perutnine, so poznane in dobro opisane, saj povzročajo znatne ekonomske izgube (9,10). Zelo malo pa je podatkov o razširjenosti in boleznih, ki jih povzročajo adenovirusi med različnimi prostoživečimi pticami in pticami v ujetništvu, ki niso predmet intenzivne reje (11).

1.1 Raziskovalni problemi, namen dela, cilji in delovne hipoteze

Namen naše raziskave:

- proučiti razširjenost adenovirusov pri prostoživečih pticah, ljubiteljskih vrstah ptic in perutnini v prosti reji ter perutnini v intenzivni reji,
- na podlagi rezultatov molekularnih preiskav in filogenetske obdelave podatkov poskušati določiti odnose med samimi virusi in njihovimi gostitelji,
- z molekularnimi metodami potrditi adenoviruse pri vrstah ptic, pri katerih še niso bili dokazani in
- vzporedno razviti ter optimizirati molekularno diagnostiko adenovirusov, ki jo bomo uporabljali tudi pri diagnostiki adenovirusnih obolenj v intenzivni reji perutnine.

Cilji naše raziskave:

- z metodo vgnezditevne verižne reakcije s polimerazo dokazati prisotnost nukleinske kisline adenovirusa v kloakalnem brisu oziroma iztrebku različnih vrst ptic,
- ugotoviti odstotek prisotnosti adenovirusov pri različnih vrstah ptic v kloakalnem brisu oziroma iztrebku,
- ugotoviti morebitno povezavo koevolucije med adenovirusi in pticami na podlagi filogenetskih raziskav ohranjenega odseka (gen za polimerazo) in variabilne regije (hekson) adenovirusnega genoma,
- ugotoviti morebitno kroženje patogenih adenovirusov, ki se pojavljajo v intenzivni reji perutnine, med prostoživečimi pticami, ljubiteljskimi pticami in perutnino v prosti reji, ter morebitna pota kroženja ter
- ugotoviti ali so prostoživeče ptice, ljubiteljske ptice in perutnina v prosti reji rezervoar za okužbe v intenzivni reji perutnine.

Z raziskavo bomo skušali potrditi naslednje hipoteze:

- prostoživeče vrste ptic, ljubiteljske vrste ptic in dvoriščna perutnina so nosilci vsaj enega izmed virusov iz rodov *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus*,
- z molekularnimi metodami lahko dokažemo adenoviruse pri vrstah ptic, pri katerih še niso bili dokazani in
- s primerjavo zaporedij nukleinskih kislin variabilnih odsekov virusnega genoma lahko določimo povezave med adenovirusi, ki krožijo znotraj posameznih vrst ptic ter med prostoživečimi pticami, ljubiteljskimi pticami in dvoriščno perutnino.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 Splošno o adenovirusih

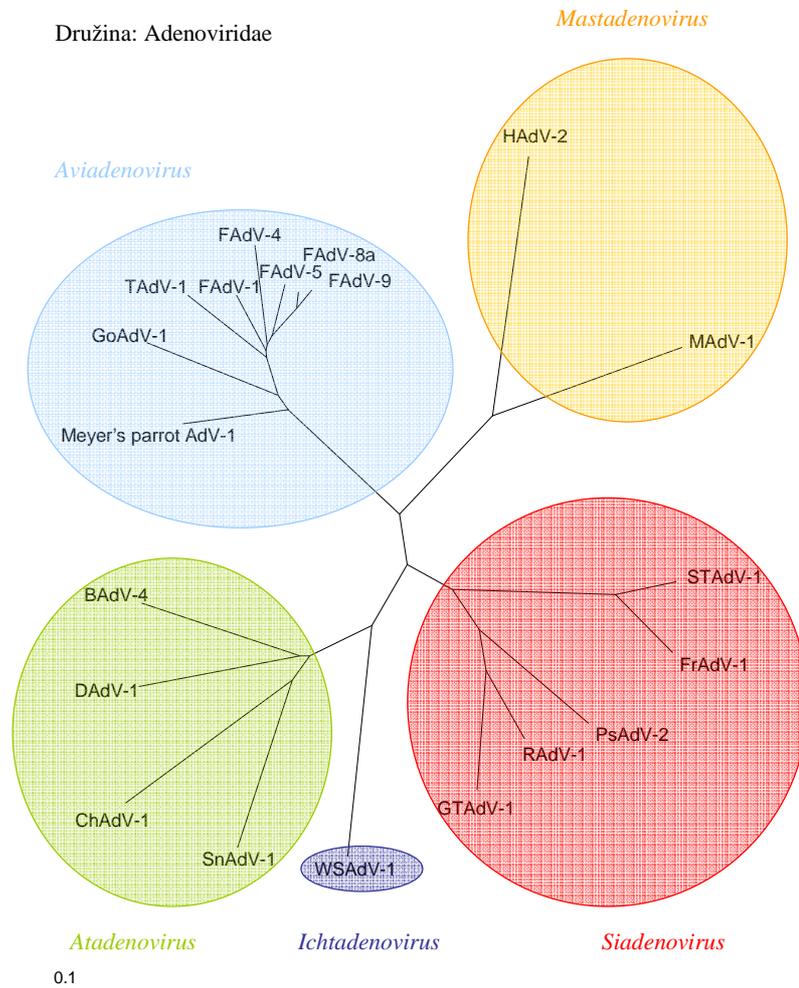
Virus je bil prvič izoliran leta 1953 iz tonzil človeka. Ime adenovirus (AdV) izvira iz grškega poimenovanja žleze (gr. *αδέννας* – adenos) (12). Adenovirusi spadajo v široko monofiletsko skupino. Dokazani so bili pri vseh večjih razredih vretenčarjev. Danes so zanimivi za raziskovanje iz različnih vidikov: so povzročitelji različnih bolezni, imajo imunosupresiven učinek, pogosto se uporabljajo kot vektorji v genskih terapijah in nenazadnje so zelo primerni za raziskovanje evolucije virusov in njihove koevolucije z gostitelji.

2.2 Taksonomska uvrstitev

Adenovirusi (AdVs) so uvrščeni v družino Adenoviridae, v kateri je pet rodov, prikazanih na sliki 1 (13). Imena nekaterih rodov razkrijejo razred gostitelja; rod *Mastadenovirus* (gr. *mastos* = mlečna žleza) sestavljajo izključno adenovirusi izolirani pri sesalcih, v rodu *Aviadenovirus* (lat. *aves* = ptica) so adenovirusi izolirani izključno iz ptic, v rod *Ichtadenovirus* (gr. *ichthys* = riba) pa je uvrščen adenovirus, ki je bil izoliran iz ameriškega belega jesetra (*Acipenser transmontanus*). V nasprotju z omenjenimi imata rodova *Atadenovirus* in *Siadenovirus* širši krog gostiteljev, med drugim tudi ptice (2,9).

V vsakem rodu so virusi razporejeni v vrste. Vrste so poimenovane po gostitelju, pri katerem so bili prvič dokazani in z dodano zaporedno črko v abecedi (14). Razvrstitev v vrste poteka po več kriterijih. Najpomembnejši kriterij je filogenetska oddaljenost, ki ločuje vrste. Za novo vrsto so predlagani virusi, ki imajo raznolikost v aminokislinskem zaporedju heksona (polipeptid II) in DNA polimeraze večjo kot 5 do 10 %. Drugi kriteriji so vrsta gostitelja, razčlenjevanje produktov DNA hibridizacije, raznolikost dolžin restrikcijskih fragmentov, onkogenost ugotovljena pri glodavcih, način *in vitro* razmnoževanja, navzkrižni nevtralizacijski test, hemaglutinacijska aktivnost, nukleotidna sestava in organizacija genoma. Pričakujejo, da vsi navedeni kriteriji sovpadajo s filogenetskim izračunom (9). Znotraj vsake vrste adenovirusov lahko obstaja več tipov, ki so oštevilčeni z zaporednimi arabskimi številkami glede na zaporedje odkritja (9).

Raziskave kažejo, da imajo skupni evlucijski razvoj z adenovirusi tudi določeni bakteriofagi (Tectiviridae), virus zelenih alg *Paramecium bursaria* Chlorella virus 1 (Phycodnaviridae) in virus *Archaea*, ki so ga odkrili v naravnih termalnih vrelih (9,15–17).



Slika 1: Sorodstveni odnosi med rodovi v družini Adenoviridae. Filogenetsko drevo smo izdelali na podlagi aminokislinskih zaporedij dela adenovirusne polimeraze z dostopnimi številkami (angl. *accession number*) iz podatkovne zbirke GeneBank: HAdV-2 (angl. *human adenovirus 2*) (P03261), MAdV-1 (angl. *murine adenovirus 1*) (AP000342), STAdV-1 (angl. *Sulawesi tortoise adenovirus 1*) (EU056826), FrAdV-1 (angl. *frog AdV-1*) (AF224336), PsAdV-2 (angl. *psittacine adenovirus 2*) (EU0586825), RAdV-1 (angl. *raptor adenovirus 1*) (EU715130), GTAdV-1 (angl. *great tit adenovirus 1*), WSAAdV-1 (angl. *white sturgeon adenovirus 1*), SnAdV-1 (angl. *snake adenovirus 1*) (DQ106414), ChAdV-1 (angl. *chameleon adenovirus 1*) (AY576679), DAdV-1 (angl. *duck adenovirus 1*) (Y09598), BAdV-4 (angl. *bovine adenovirus 4*) (AF036092), Meyer's parrot AdV-1 (angl. *Meyer's parrot adenovirus 1*) (AAT66510), GoAdV-4 (angl. *goose adenovirus 4*), TAdV-1 (angl. *turkey adenovirus 1*) (GU936707), FAdV-1 (angl. *fowl adenovirus 1*) (AP_000410), FAdV-4 (angl. *fowl adenovirus 4*) (HM853997), FAdV-5 (angl. *fowl adenovirus 5*) (HM85398), FAdV-8a (angl. *fowl adenovirus 8a*) (HM854001), FAdV-9 (angl. *fowl adenovirus 9*) (AAD50336). Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evlucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej.

2.3 Zgradba viriona

Adenovirusi so srednje veliki DNA virusi brez zunanje lipidne ovojnice. Imajo linearno, nesegmentirano, dvojnovijačno genomsko DNA. Njena organizacija je značilna za rod. Velika je 26 do 45 kilo baznih parov (bp) (2,5,18,19).

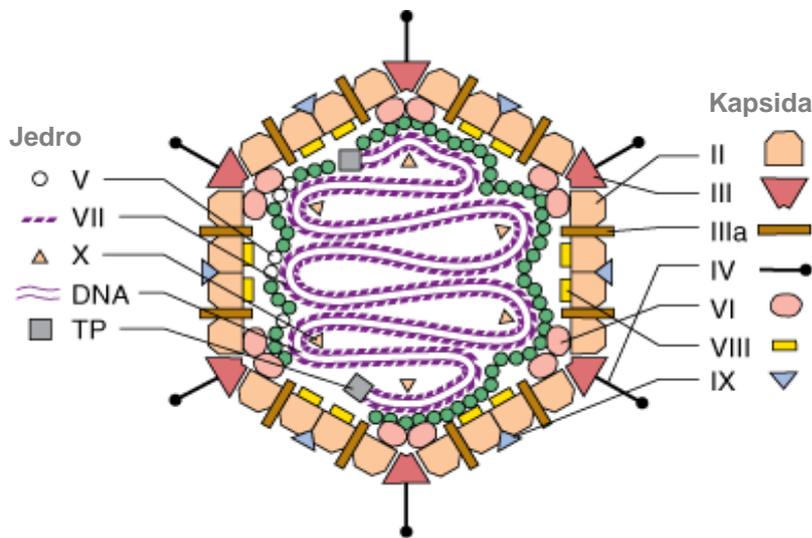
Genom adenovirusa kodira več kot štirideset beljakovin. Polipeptide v zrelem adenovirusnem virionu označujemo z rimskimi številkami (II-XII), najnižja številka označuje beljakovino z najvišjo molekularno maso (20). Za nekatere beljakovine so pogosteje v uporabi sinonimi – hekson (angl. *hexon*) za beljakovino II, pentonska baza (angl. *penton base*) za beljakovino III, nitasti podaljšek (angl. *fiber*) za beljakovino IV in μ za beljakovino X. Pentonska baza skupaj z dolgimi nitastimi podaljški formira kompleks imenovan penton. Z izjemo beljakovine V in IX so vse druge strukturne beljakovine ohranjene v vseh rodovih (Slika 2) (9,15).

Adenovirusi imajo obliko ikozaedra, geometrijskega telesa z 20 ploskvami enakostraničnih trikotnikov, ki se stikajo v 12 ogliščih in 30 robovih (21). Ikozaedrična virusna ovojnica (kapsida) ima premer 70 do 90 nm in obdaja genski material (9,15). Sestavlja jo enajst strukturnih beljakovin. Najpomembnejše so hekson, pentonska baza in nitasti podaljšek (15). Zaradi ikozaedrične zgradbe kapside se povezuje na ogliščih v kapsomero pet protomer (pentoni), na trikotnih stranicah in robovih pa po šest protomer (heksoni) (21). Skupno torej virusno kapsido sestavlja 252 kapsomer, med njimi je 240 heksonov in 12 pentonov (9). V vsakem oglišču pentonske kapsomere podpirajo in utrjujejo nitasti podaljški, ki se podaljšujejo navzven (22). Med tipi AdV se nitasti podaljški razlikujejo v velikosti ter tudi po številu (4,23,24). Služijo za pritrdjevanje virusa na gostiteljsko celico (21). Hekson je največja beljakovina adenovirusne ovojnice. Zanki na vrhu heksonske molekule oblikujeta zunanjo površino viriona. Prav te regije imajo največjo variabilnost v zgradbi med posameznimi tipi adenovirusov in oblikujejo za posamezen tip specifične epitope (25,26).

Jedro vsebuje enojno kopijo linearne dvojne vijačnice DNA in štiri virusne beljakovine: V, VII, μ in terminalno beljakovino. Molekula DNA skupaj z beljakovino VII (zelo osnoven polipeptid) služi kot funkcionalna matrica za podvojevanje in prepisovanje *in vivo*. Beljakovina VII ima tudi vlogo posredovalca med prehodom virusne DNA v jedro (27).

Terminalna beljakovina je kovalentno vezana na 5' konec vsake vijačnice. V vsakem virionu je prisotna v dveh kopijah in je med podvojevanjem nepogrešljiva (28,29). Struktura jedra se v virusih, ki okužijo ptice, razlikuje od virusov ugotovljenih pri sesalcih, saj nimajo beljakovine V (14).

Do sedaj je bilo pri adenovirusih opisanih trideset nestrukturnih beljakovin (14,30). Čeprav natančna vloga večine še ni poznana, predvidevajo, da imajo katalitične in regulatorne funkcije (15).



Slika 2: Shematični prikaz adenovirusnega viriona. Komponente viriona so označene z rimskimi številkami polipeptidov z izjemo terminalne beljakovine (TP). Polipeptida V in IX sta prisotni le v rodu *Mastadenovirus* (Povzeto po: Stewart PL, Burnett RM. Jpn J Appl Phys 1993;32:1342.)

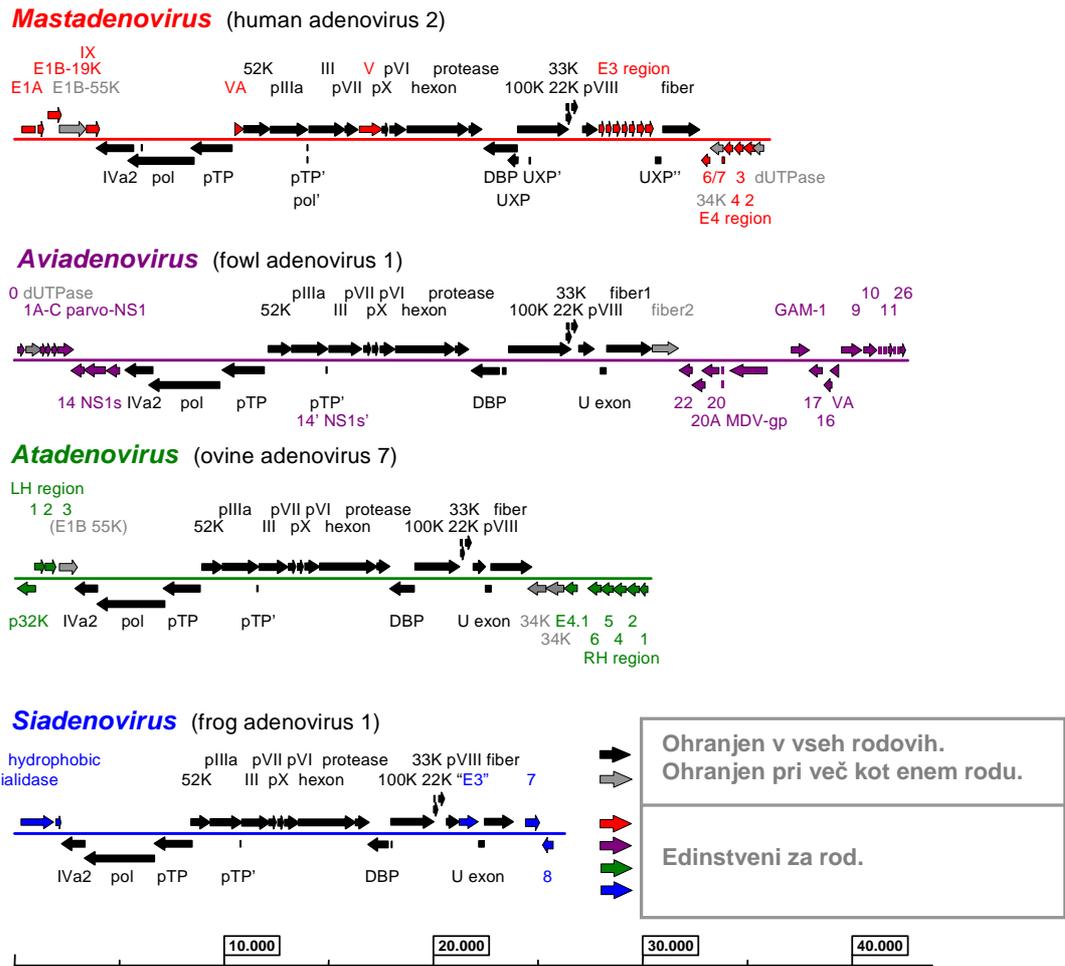
2.4 Organizacija genoma

Genom adenovirusov vsebuje 33,7 do 63,8 % G+C. Organizacija osrednjega dela genoma je ohranjena pri vseh predstavnikih družine Adenoviridae (2,15). Adenovirusi imajo šestnajst homolognih genov. Predpostavljajo, da so ti geni podedovani od prednikov adenovirusov. Geni pol, pTP in DBP, ki jih kodira regija E2, so odgovorni za pomnoževanje DNA, gena 52K in IVa2 pa za obdajanje DNA s kapsido. Pri tvorbi strukture viriona sodelujejo geni spIIIa, III, pVII, pX, pVI, hekson, proteaza, 100K, 33K, pVIII ter vlakno (2). Končni deli genoma (3' konec in 5' konec) se med rodovi razlikujejo v dolžini in/ali vsebnosti genov. Ti geni so specifični za posamezen rod (Slika 3) (2,15). Adenovirusni genom vsebuje različne prepisovalne razrede, ki kodirajo različne beljakovine. Razdelimo jih lahko v zgodnje (E),

vmesne in pozne (L) razrede. Prepisovalni razred E1A kodira beljakovine 13, 27 ter 32, E1B kodira beljakovine 16, 21, 55, E2A kodira DNA-vezavni protein (angl. *DNA-binding protein*) (DBP), E2B kodira DNA polimerazo ter končno beljakovino (angl. *terminal protein*), E3 kodira beljakovine 4, 7, 8, 10, 12, 13, 15 ter 19, E4 kodira beljakovine 7, 13, 14, 15 ter 17, L1 kodira p52/55 (ogrodne beljakovine) (angl. *scaffolding*) ter beljakovino IIIa (kapsidni cement) (angl. *capsid cement*), L2 kodira beljakovine VII (jedrna beljakovina) (angl. *core protein*), pX (jedrna beljakovini X oziroma μ), V (jedro) (angl. *core*) ter III (pentonska baza) (angl. *penton base*), L3 kodira proteazo, beljakovino VI (kapsidni cement), II (hekson) (angl. *hexon*), L4 kodira beljakovine 25, VIII (kapsidni cement) ter 1000 kDa, L5 kodira beljakovino IV (nitasti podaljšek) (angl. *fiber*), vmesna razreda pa kodirata beljakovini IX (kapsidni cement) ter IVa2 (15).

Čeprav je genom adenovirusov opisan kot linearna dvojnovijska molekula DNA, lahko izjemoma oblikujejo tudi krožno DNA molekulo (31). Krožna molekula je lahko monomerni vektorski genom, lahko pa se vektorski genomi med seboj povezujejo in oblikujejo krožne konkatemere – dolge DNA molekule, ki vsebujejo več povezanih kopij genoma (32). Poleg opisov nastanka krožnega genoma v *in vitro* pogojih sta Krepel in Kochanek opisala tudi spontani nastanek po okužbi evkariontske celice (33). V zgodnjih raziskavah so predvidevali, da je nastanek začasne krožne molekule pri HAdV-5 predstavljal vmesno stopnjo med procesom vključevanja genoma v celico (34).

Dandanes uporabljajo krožne gene adenovirusov predvsem v izdelavi rekombinantnih adenovirusnih vektorjev za *in vivo* in *in vitro* genske transfere (35).



Slika 3: Shematični prikaz štirih različnih vzorcev organizacije genoma v družini Adenoviridae. Povzeto po: (13).

Ker so predmet našega raziskovanja ptice, se bomo v nadaljevanju omejili le na rodove, ki se pojavljajo pri pticah: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* in *Siadenovirus*.

Genom aviadenovirusov je najdaljši v družini Adenoviridae. Kokošji adenovirus 1 (angl. *fowl adenovirus 1*) (FAdV-1) in FAdV-9 imata z dolžino 43.804 oziroma 45.063 bp najdaljši genom med poznanimi adenovirusi (9,24). Nukleotidna sestava je med 53,8 in 59 % G+C (9).

V genomu ni genov, ki kodirajo polipeptid V in IX, prav tako ne genov E1 in E3. Gen za dUTP pirofosfatazo se nahaja na 3' koncu genoma. 5' konec genoma vsebuje vrsto prepisovalnih enot, ki so značilne za rod, a je njihova natančna vloga še nepojasnjena (2,9).

Virusi, uvrščeni v rod *Atadenovirus* nimajo natančno določenega gostitelja, pač pa se pojavljajo pri gostiteljih iz različnih razredov vretenčarjev. Ugotovljeni so bili pri sesalcih, pticah in plazilcih (2,9). Že prve raziskave so kazale na možnost izvora atadenovirusov iz nižjih razredov vretenčarjev in kasnejšega prenosa na prežvekovalce in ptice (37). Novejši rezultati to hipotezo potrjujejo, saj vsi izolirani adenovirusi luskarjev (*Squamata*) pripadajo rodu *Atadenovirus* (38).

Rod je dobil ime po visokem odstotku vsebnosti A+T (33,7 do 43 % G+C) v genomu prvih poznanih pripadnikov tega rodu; govejih adenovirusov (angl. *bovine adenovirus*) (BAdVs) ter račjega AdV-1 (angl. *duck adenovirus 1*) (DAdV-1) (9,39,40). V nasprotju z omenjenimi virusi je nukleotidna sestava genomov virusov ugotovljenih pri plazilcih, uravnovežena (43,75 do 58,09 % G+C) (38).

Velikost genomov sekveniranih AdV se giblje med 27.751 bp pri kačjem AdV-1 (angl. *snake adenovirus 1*) (SnAdV-1) do 33.213 bp pri DAdV-1. Vsebnost G+C je pri ovčjem AdV-7 (angl. *ovine adenovirus 7*) (OAdV-7) 33,7 % , pri DAdV-1 pa 43 % (2,9).

V rod *Siadenovirus* sta bila sprva uvrščena žabji AdV-1 (angl. *frog adenovirus 1*) (FrAdV-1) in puranji AdV-3 (angl. *turkey adenovirus 3*) (TAdV-3) (41,42). Kljub temu, da imata virusa evolucijsko zelo različne gostitelje, imata podobno organizacijo genoma in sta si filogenetsko zelo sorodna (43). Virus z enakim nukleotidnim zaporedjem in serološkimi značilnostmi kot TAdV-3 je bil poleg puranov izoliran tudi pri fazanih in piščancih (9,44).

Predstavniki tega rodu imajo najkrajši genom med adenovirusi. Poleg ohranjenih genov v osrednjem delu genoma je bilo ugotovljenih le pet dodatnih genov. Na 3' koncu genoma je gen, ki je zelo podoben bakterijski sialidazi, po katerem je rod tudi poimenovan. Dolžina genoma TAdV-3 je 26 263 bp, nukleotidna sestava genoma pa je 35 % G+C. Nizka vsebnost G+C nakazuje, da izvorni gostitelj rodu najverjetneje še ni bil odkrit (29).

2.5 Razmnoževanje adenovirusov

Adenovirusi najpogosteje okužujejo epitelijske celice. Okužba se prične z začetnim stikom med nitastimi podaljški adenovirusa in celičnimi receptorji CAR (angl. *coxsackievirus and adenovirus receptor*). V kolikor so celični receptorji CAR odsotni, lahko za nekatere tipe

adenovirusov prevzamejo njegovo funkcijo molekule poglobitnega histokompatibilnega kompleksa razreda I $\alpha 2$ (MHC) (angl. *major histocompatibility complex*) (45). Razmnoževanje virusa poteka v dveh fazah in se odvija v jedru gostiteljeve celice (46).

V zgodnji fazi virus z endocitozo vstopi v gostiteljsko celico. Po lizi endosomalnega mešička se kapsida in virusna DNA ločita. Virusna DNA se prenese v jedro celice, ki je mesto virusnega prepisovanja, DNA pomnoževanja in združevanja (9,47). Virusna okužba povzroči zaustavitev sinteze gostiteljske DNA in omogoči sintezo virusne RNA in virusnih beljakovin (9). Iz zapisa zgodnjih genov (E1A, E1B, E2, E3 in E4) se najprej prepisejo t. i. zgodnje sporočilne RNA (mRNA), ki se prevedejo v zgodnje beljakovine (21,48). Adenovirusna mRNA mora biti pred prevajanjem podvržena izrezovanju (angl. *splicing*) intronov. Šele po izrezovanju zapusti jedro in v citoplazmi prične s prevajanjem (9). Zgodnje beljakovine imajo regulacijsko in encimsko vlogo in so odgovorne za spremembe v delovanju celice, ki omogočajo lažje pomnoževanje virusne DNA ter prepisovanje in prevajanje poznih genov (21,48). Regulacijske beljakovine preprečijo podvojevanje celične DNA in sintezo celičnih beljakovin, encimske pa sprožijo pomnoževanje virusne nukleinske kisline (21). Pod nadzorom na novo zgrajenih molekul virusne DNA se nato iz zapisa poznih genov (L1, L2, L3, L4 in L5) sintetizirajo pozne beljakovine (21,48). To so strukturne beljakovine, ki predstavljajo primarno strukturo kapside, in regulacijske, ki prekinajo sintezo zgodnjih beljakovin (21,49).

Združevanje kapside z adenovirusnim genomom poteka v jedru okužene celice. V prazne kapside vstopi virusna DNA in beljakovine sredice. Kapsida se nato zapre v kristalno strukturo viriona. Virusni razmnoževalni cikel traja od 32 do 36 ur. Nastane več kot 10.000 virusnih delcev na celico, vendar je kužnih le 1 do 5 % (48,49). Kopičenje virionov, predvsem pa višek proizvedenih strukturnih proteinov, povzroči nastanek bazofilnih znotraj jedrnih inkluzij (10). Virioni se sprostijo v okolico z razkrojem okužene celice (10,21).

Posamezni zgodnji geni imajo različne vloge med pomnoževanjem virusne DNA ter prepisovanjem in prevajanjem poznih genov. Beljakovina E1A je potrebna za sintezo vseh drugih zgodnjih beljakovin, ki so vključene v pomnoževanje virusne DNA ter ščiti virus pred celičnimi interferoni. Skupaj z beljakovino E1B, ki zavira celično apoptozo, lahko v nekaterih primerih sprožita onkogeno transformacijo celice. Nestrukturna beljakovina E3 ima vlogo

zaviralca citolize, blokira pa tudi prenos MCH molekul na površino celice. Nestrukturna beljakovina E2 (virusna DNA polimeraza) se veže na terminalni protein pripet na 5' konec virusne DNA. Kopičenje beljakovine E2 sproži pomnoževanje virusne DNA in prehod celice v S fazo (50). Gen E4 kodira vsaj šest različnih polipeptidov, poimenovanih E4 ORF1 do E4 ORF6/7. V zgodnjih osemdesetih letih prejšnjega stoletja so veliko pozornosti posvečali vlogi gena E4 med litičnim propadom adenovirusov. Sedaj ga povezujejo tudi z nadzorovanjem prepisovanja, razvojem celičnega kroga, apoptozo, popravili DNA in celičnim signaliziranjem (51).

2.6 Fizikalno-kemijske lastnosti adenovirusov

Ikozaeder je za zgradbo virusa optimalno geometrijsko telo. Je fizikalno stabilen in ima pri ponavljajočih se sestavinah največjo prostornino (21). Adenovirusi so stabilni v zamrznjenem stanju. Odpornost na povišano temperaturo je med rodovi različna. Trideset minut v vodni kopeli pri temperaturi 56° C naj bi zadostovalo za inaktivacijo adenovirusov, a so predvsem nekateri tipi aviadenovirusov sposobni preživeti 30-minutno kopel pri 70° C. Odporni so na blage kisline ter neobčutljivi na maščobna topila, kot so eter, kloroform, tripsin, 2 % fenol in 50 % alkohol. Preživijo v pH okolju med 3 in 9. Raztopina formalina v redčitvi 1 : 1000 inaktivira adenoviruse (9).

2.7 Hemaglutinacijska sposobnost adenovirusov

Hemaglutinacijsko sposobnost imajo le nekateri adenovirusi. Virus sindroma padca nesnosti (EDS), predstavnik rodu *Atadenovirus*, aglutinira eritrocite kokoši, rac, puranov, gosi, golobov in pavov (52,53). FAdV-1 aglutinira le eritrocite podgan (54). Podtip FAdV-1 Indiana C zleplja tudi ovčje eritrocite, kar je izjema in kaže na razlike tudi med tipi adenovirusov (55).

2.8 Patogenost adenovirusov

Patogenost adenovirusov je spremenljiva in jo je težko natančno ovrednotiti. Pri pticah jih pogosto ugotovimo, a le redko povzročajo bolezen in so velikokrat zgolj naključna najdba. Pri različnih boleznih se pojavijo sočasno z drugimi virusi, predvsem imunosupresivnimi (56).

Pri pticah najpogosteje povzročajo hemoragični enteritis in vnetja trebušne slinavke, jeter, vranice ter dihal (9,10,56). Obolevajo predvsem mlade živali med tretjim in osmim tednom starosti ali populacija živali, ki se z virusom še ni srečala (naivna populacija) (10). Obolele ptice ne kažejo patognomoničnih kliničnih znakov. Običajno so mirne, imajo našopirjena peresa, hujšajo. Odvisno od tipa AdV, vrste in starosti gostitelja lahko razvijejo tudi druge klinične znake; oteženo dihanje, krvave iztrebke, poliurijo, imajo znižano nesnost in/ali ležejo jajca s spremenjeno jajčno lupino. Nekateri tipi adenovirusov lahko povzročajo tudi akutni ali perakutni pogin živali (9).

Najpomembnejše adenovirusne bolezni ptic, ki jih povzročajo predstavniki rodu *Aviadenovirus*, so inkluzijski hepatitis, sindrom zaostale tekočine v osrčniku, razjede mišičnega želodca in respiratorna obolenja (10,56).

Iz rodu *Atadenovirus* je najpomembnejši adenovirus, ki povzroča bolezen sindrom padca nesnosti (10,56).

Najpomembnejši bolezni, ki ju povzroča adenovirus iz rodu *Siadenovirus*, sta hemoragični enteritis in bolezen marmorirane vranice (10,56).

2.9 Pomembnejše bolezni, ki jih povzročajo adenovirusi

2.9.1 Inkluzijski hepatitis (angl. *Inclusion body hepatitis* - IBH) (vsi znani FAdV)

Najpogosteje je inkluzijski hepatitis (IBH) opisan pri piščancih brojlerjih (*Galus domesticus*). Običajno se pojavi pri piščancih v starosti 3 do 7 tednov (10), čeprav so opisani tudi izbruhi bolezni tako pri 7-dnevnih (57) kot tudi 20-tedenskih živalih (58). Obolevnost je nizka, pogin pa približno 10 %, v nekaterih primerih je pogin tudi višji in doseže 30 % (10,57). Bolezenski znaki, ki spremljajo IBH so neznčilni. Oboleli piščanci so zgrbljeni, našopirjeni in bodisi poginejo v 48 urah po pojavu prvih kliničnih znakov bodisi okrevajo. Za IBH je značilen nenadni porast pogina 3 do 4 dni po okužbi, ki 5. dan ponovno upade. V primerih sekundarnih bakterijskih okužb je povečan pogin prisoten do 3 tedne (59–61). Do sedaj so bili pri naravno potekajočih okužbah piščancev brojlerjev z IBH potrjeni že vsi tipi FAdV (FAdV-1 do 8a in FAdV-8b do 11) (10,62). Leta 2011 smo tri izbruhe IBH ugotovili tudi v Sloveniji. Povzročitelja sta bila adenovirusa FAdV-8b in nedoločljivi tip FAdV skupine D (63,64).

Pogosto je IBH opisan pri domačih golobih (*Columba livia domestica*) (65–67). Poleg golobov so bolezen opisali tudi pri plemenitih papigah (*Eclectus roratus*) (68,69), Meyerjevi papigi (*Poicephalus meyeri*) (70), papigi vrste *Poicephalus robustus* (71), sivi papigi (*Psittacus erithacus*) (67,69,71–73), nimfi (*Nymphicus hollandicus*) (74), rožnatoglavem agapornisu (*Agapornis roseicollis*) (75), rumenotemeni amazonki (*Amazona ochrocephala*) (76), oranžnoperuti papigi (*Brotogeris pyrrhopterus*) (67), papigah iz rodov *Ara*, *Aratinga*, *Platicercus* (69) ter *Poicephalus* (69,77), malem sokolu (*Falco columbarius*) (78,79), ameriški postovki (*Falco sparverius*) (80,81), mavricijski postovki (*Falco punctatus*) (82), sokolu selcu (*Falco peregrinus*) (79), sokolu vrste *Falco femoralis septentrionalis* (79), sokolu vrste *Falco deiroleucus* (79), sokolu vrste *Falco fasciinucha* (79,83), harisonovem kragulju (*Parabuteo unicinctus*) (84), črnem škarniku (*Milvus migrans*) (85), skalnem viru (*Bubo bengalensis*), orlovskem viru (*Bubo lacteus*) (84), sovjem lastovičniku (*Podargus strigoides*) (86), japonski prepelici (*Coturnix coturnix japonica*) (87), virginijskem kolinu (*Colinus virginianus*) (88), prepelici novega sveta vrste *Callipepla gambelii* (89), goseh (*Anser* spp.) (90) in puranih (*Meleagris gallopavo*) (91,92).

2.9.2 Sindrom zaostale tekočine v osrčniku (angl. *Hydropericardium syndrome* - HS), bolezen Angara (angl. *Angara disease*) (FAdV-4)

Sindrom zaostale tekočine v osrčniku (HS) je bil prvič opisan v Pakistanu leta 1987. Bolezen se je pojavila v kraju Angara, na območju z zelo koncentrirano rejo brojlarskih piščancev. Od tod tudi izvira drugo poimenovanje za to bolezen – bolezen Angara (93). V enem letu po prvem izbruhu je bolezen skoraj popolnoma uničila industrijo piščancev brojlerjev v Pakistanu (10). Obolevnost je nizka, pogin pa lahko zelo visok, tudi do 80 %. Piščanci začno poginjati 3 tedne po okužbi. Pogin doseže vrh v četrtem do petem tednu in nato upade. Bolezen je opisana tudi pri nesnicah in v matičnih jatah, vendar povzroča nižjo smrtnost. V veliki večini izbruhov bolezn je bil potrjen adenovirus FAdV-4 (10).

Bolezen običajno spremlja tudi IBH, zato se predvideva, da je HS pravzaprav IBH z visoko smrtnostjo in visoko pogostnostjo pojavnosti bistre tekočine slamnate barve v osrčniku (10). Nedavno se je zato pričelo v angleški literaturi poimenovanje hepatitis-hydropericardium, ki hkrati opisuje obe patološki spremembi (94).

Sindrom zaostale tekočine v osrčniku so ugotovili tudi pri golobih (95), goseh (96) in japonskih prepelicah (97).

S suspenzijo jeter okuženih domačih golobov so HS lahko eksperimentalno povzročili pri piščancih brojlerjih. Prav tako so ugotovili, da je mogoče domače golobe zaščititi proti omenjeni bolezni z uporabo kokošnjega cepiva (95).

2.9.3 Razjede mišičnega želodca (angl. *Gizzard erosions*) (FAdV-1, FAdV-5)

Po prehodu v 21. stoletje so se pričeli vrstiti opisi izbruhov bolezni, ki je prizadela predvsem mišični želodec piščancev brojlerjev (98–104). Sprva so izbruhe zabeležili na Japonskem (98), kasneje tudi v Evropi (102,103). V veliki večini primerov je bil kot povzročitelj potrjen FAdV-1, čeprav je bil v enem primeru ugotovljen FAdV-5 (101). Pogin mladih piščancev brojlerjev je skoraj vedno edini znak obstoja bolezni (98), čeprav v literaturi kot spremljajoče klinične znake opisujejo tudi zmanjšano živahnost, našopirjenost in zmanjšan prirast (104). Najbolj izražene spremembe so na sluznici mišičnega želodca. Razjede segajo globoko v koilinsko plast, obseg mišičnega želodca je povečan, notranjost pa napolnjena s krvavo vsebino (98). Podobne spremembe na koilinski plasti mišičnega želodca so ugotovili tudi pri pegatkah (*Numida meleagris*) (105).

2.9.4 Bronhitis prepelic (angl. *Quail bronchitis* - QB) (FAdV-1)

Bronhitis prepelic (QB) je akutno zelo kužno respiratorno obolenje, v prvi vrsti mladih farmsko vzrejenih virginijskih kolinov (10). Prvič ga je opisal Olson po izbruhu bolezni v zahodni Virginiji, ZDA, leta 1949 (106). Povzročitelj je FAdV-1, za katerega se predpostavlja, da sta z virusom CELO (angl. *chicken embryo lethal orphan*) ista etiološka agensa (10,56).

Začetek bolezni spremlja nenadno povečanje dnevnega pogina. Pri natančnem pregledu lahko ugotovimo zmanjšano ješčnost, našopirjenost, živali stisnjene v gručice, oteženo dihanje, kihanje in očesno-nosni izcedek ter živčne znake (10,106). Klinični znaki se pojavijo med 2. in 7. dnevom po okužbi. Najbolj so prizadete živali mlajše od treh tednov. Živali, ki so ob okužbi starejše od 6 tednov, redko poginejo in bolezen poteka asimptomatsko. Obolenost in smrtnost je zato zelo različna, odvisna je od starosti živali ob okužbi. Pri okužbi živali mlajših

od treh tednov lahko obolevnost in pogin presežeta 50 %. Opisana je tudi 100 % smrtnost (10). Bolezen je bila potrjena tudi pri japonskih prepelicah (107), medtem ko poskusna okužba piščancev in puranov sproži imunski odziv, vendar brez kliničnih znakov bolezni (10).

2.9.5 Sindrom padca nesnosti (angl. *Egg drop syndrome - EDS*) (DAdV-1)

Po prvem opisu sindroma padca nesnosti (EDS) pri kokoših leta 1976 (108) je predstavnik rodu *Atadenovirus* do sedaj postal eden od najpomembnejših vzrokov za izgube v svetovni proizvodnji kokošjih jajc (10). Spremembe, ki jih povzroča DAdV-1, so omejene na jajcevod. Vidna je atrofija jajcevoda ali edem jajcevoda s prisotnim izločkom lupinskih žlez (53,109). Ob vnosu virusa v naivno populacijo sicer klinično zdrave kokoši ležejo jajca z mehko lupino ali brez nje. Ko se virus utrdi v populaciji so spremembe na jajčni lupini manj izrazite, nesnice pa dosegajo nižjo nesnost od predvidene (10).

Klinični znaki so pri drugih vrstah ptic redki. Poleg kokoši je naravno potekajoča bolezen z značilnimi kliničnimi znaki opisana pri racah (*Anas spp.*) (10,110–112), japonskih prepelicah (113), pegatkah (114) in puranih (115). Poleg omenjenih vrst so bolezen poskusno uspeli povzročiti tudi pri fazanih (*Phasianus colchicus*) (116).

2.9.6 Hemoragični enteritis (angl. *Hemorrhagic enteritis - HE*) (TAdV-3)

Hemoragični enteritis je akutna virusna bolezen puranov. Prvič sta jo v Minnesoti, ZDA, opisala Pomeroy in Fenstermacher leta 1937 (117). Pojavlja se pri puranih od 4. tedna starosti dalje. Klinični znaki HE so potrtoost, krvavi iztrebki in pogin. Bolezen v jati običajno traja 7 do 10 dni. Obolevnost je visoka, doseže lahko tudi 100 %. Povprečen pogin je 10 do 15 %, doseže pa tudi 60 %, v poskusnih pogojih celo 80 % (10). TAdV-3 je imunosupresiven, zato so zapleti s sekundarnimi bakterijskimi okužbami zelo pogosti. V primeru sekundarnih okužb je smrtnost višja, podaljša pa se tudi potek bolezni, običajno za 2 do 3 tedne (10,56). V nasprotju z večino drugih AdV se TAdV-3 razmnožuje predvsem v limfocitih B in makrofagih (118–121). Poškodbe gastrointestinalnega trakta puranov so imunsko pogojene in so posledica sproščanja velike količine citokinov med okužbo (119). Dodatno k razvoju poškodb v prebavilih pripomore delovanje prostaglandina in histamina, ki se sprošča iz mastocitov, nakopičenih v sluznici dvanajstnika med okužbo (122).

Adenovirusni hemoragični enteritis je opisan tudi pri pegatkah (123), sivi papigi (71,73), rumenoprsi ari (*Ara ararauna*), amazonki (*Amazona* spp.), kakaduju (*Cacatua* spp.) (124), papigi vrste *Poicephalus robustus* (71), gorskem loriju (*Trichoglossus haematodus*), loriju vrste *Trichoglossus chlorolepidotus* (125), ameriški postovki (81) in mavricijski postovki (82).

2.9.7 Bolezen marmorirane vranice (angl. *Marble spleen disease* - MSD) (TAdV-3)

Prvič je bolezen marmorirane vranice (MSD) opisal Mandelli s sodelavci leta 1966 ob izbruhu bolezni v Italiji (126). Povzročitelj je *Siadenovirus*, ki je serološko enak TAdV-3, le malo razlik med obema pa je tudi na molekularnem nivoju (10). Zbolijo predvsem fazani v starosti 3 do 8 mesecev, gojeni v oborah. Obolevnost je podobno kot pri HE visoka (10). Pogin je običajno akuten, stopnja pogina znaša 5 do 20 % v obdobju 10 dni ali več tednov (127). V kolikor so prisotni klinični znaki, so živali potrte, oslabele, oteženo dihajo, lahko imajo izcedek iz nosnic (10,128). Poginule živali imajo značilno povečano in marmorirano vranico ter edem pljuč, ki je najpogostejši vzrok pogina (127,129). Patogeneza MSD je zelo podobna tisti pri HE. Zelo verjetno je, da je prizadetost dihal pri fazanih posledica razlik med vrstama v takoimenovanih šokovnih organih (10). Zanimiv je podatek, da so uspeli z eksperimentalno okužbo fazanov s povzročiteljem MSD povzročiti zgolj značilne spremembe na vranici. Predvidevajo, da imajo na nastanek usodnih sprememb na dihalih pri naravnih izbruhih MSD pomemben vpliv nekateri do sedaj nepoznani dejavniki okolja (130).

Podobne klinične znake, značilne za MSD, so opisali tudi pri pegatkah (131) papigah nedoločenih vrst (124) in skobčevkah (*Melopsittacus undulatus*) (132).

2.9.8 Druga obolenja, ki jih povzročajo z adenovirusi pri pticah

Poleg zgoraj opisanih bolezni so bili adenovirusi potrjeni etiološki agensi tudi pri nekaterih drugih obolenjih. So povzročitelji traheitisov pri gosjih mladičih (133), mladičih moškatne bleščavke (*Cairina moschata*) (134) in puranih (135,136), nekrotizirajočega vnetja trebušne slinavke pri pegatkah (105,135) in nojih (*Struthio camelus*) (137,138), zadrgnitve tankega črevesja pri gagah (*Somateria mollissima*) (139), konjunktivitisa pri modrem črnoglavem agapornisu (*Agapornis personata*) (140) in keratokonjunktivitisa pri racah (26).

Pri različnih vrstah ptic so pogosto ugotovljene adenovirusne bazofilne inkluzije v jedrih v različnih celicah ledvičnega parenhima. Opisane so pri japonski prepelici (141), tankokljuni lumni (*Uria aalge*) (142), sivemu žerjavu (*Grus grus*) (143), skobčevki (144–146), vzhodni rozeli (*Platycercus eximus*) (145), bledi beloglavi rozeli (*Platycercus eximus adscitus*) (145), rdečehrbti papigi (*Psephotus haematonotus*) (145) in modrem črnoglavem agapornisu (140). Vsi avtorji so mnenja, da gre za idiopatske, naključno ugotovljene spremembe. Podobne inkluzije so naključno ugotovili tudi v Fabricijevi burzi srebrnega galeba (*Larus argentatus*) (147).

2.10 Laboratorijska diagnostika okužb z adenovirusi

Zaradi razpoznavne morfologije so adenovirusi dobro prepoznavni z elektronskim mikroskopom (EM) (46,61). Slabost te preiskave je, da morfološke lastnosti adenovirusov ne zadoščajo za razlikovanje med rodovi ali posameznimi tipi. Podobno zanesljiva, a prav tako nespecifična preiskava je barvanje histoloških rezin z hematoksilinom in eozinom. Za adenovirusne okužbe so značilne bazofilne inkluzije v jedru, ki vsebujejo virusne delce in so patognomonične za adenovirusna obolenja (148). Pogosto se pojavljajo tudi eozinofilne inkluzije v jedru z zrnato in nitasto vsebino brez virusnih delcev (72,144). V večini primerov, ko so bila dokazana inkluzijska telesa, so prisotnost adenovirusnih delcev dokazali tudi z EM ali izolacijo virusa (149).

Zlati standard v diagnostiki mikroorganizmov predstavlja osamitev povzročiteljev, ki je bila v preteklosti ključna za tipizacijo virusov (149). Najprimernejše kulture za osamitev različnih FAdV so celična kultura iz ledvic piščančjih zarodkov, celična kultura iz jeter piščančjih zarodkov in celična kultura iz piščančjih hepatoma celic (150–152). Prav tako je v nekaterih primerih uspešna inokulacija rumenjake vrečke kokošjih embrijev (131). Opisana je tudi uspešna izolacija FAdVs iz drugih vrst ptic na celični kulturi iz ledvic piščančjih zarodkov (61) in uspešna izolacija petih različnih tipov FAdV, izoliranih iz golobov na celični kulturi jeter piščančjih zarodkov (153). V kolikor celične kulture homologne vrste gostitelja niso dostopne, se priporoča v prvi vrsti uporaba celične kulture jeter piščančjih zarodkov (55,153–155).

Izolirane viruse lahko podrobneje določimo z uporabo indirektnega imunofluorescenčnega testa, nevtralizacijskega testa seruma in encimskoimunskega testa (ELISA) (46,156–158).

Izolacija ptičjih siadenovirusov je omejena. Za razmnoževanje uporabljamo celično kulturo iz puranjih levkocitov iz periferne krvi ali celično kulturo iz levkocitov iz periferne krvi homolgne ptičje vrste (46,159,160). Najpogosteje se za neposredno dokazovanje antigena TAdV-3 uporablja agar-gel precipitacijski test (161,162). Slaba stran omenjenega testa je nizka občutljivost. Veliko višjo občutljivost dosežemo z uporabo encimskoimunskih testov (ELISA) (163,164).

Z imunohistokemičnimi preiskavami so raziskovali porazdelitev virusa v tkivih in patogenezo bolezni (165–167).

DAdV-1 je edini med ptičjimi adenovirusi, ki je sposoben aglutinirati ptičje eritrocite. Zato se test inhibicije hemaglutinacije uporablja pri dokazovanju protiteles proti DAdV-1 (46,52,168,169). Izjema so le nekateri sevi FAdV-1, ki pa aglutinirajo le podganje eritrocite (170–172). Za izolacijo DAdV-1 so najobčutljivejša gojišča iz embrioniranih jajc vodne perutnine in njihove tkivne celične kulture. Opisana je tudi uspešna izolacija na celični kulturi iz ledvic piščančjih zarodkov in celični kulturi iz jeter piščančjih zarodkov (152,173,174).

V zadnjem desetletju ustaljeno diagnostiko zelo uspešno nadomeščajo molekularne metode. Te so vedno bolj dostopne, občutljive, specifične in enostavne za uporabo. V primerjavi s serološkimi metodami lahko z molekularnimi metodami odkrijemo veliko več razlik v genomu virusov. Primerna mesta za serotipizacijo predstavlja le 15 % adenovirusnega genoma, medtem ko imamo z molekularnimi metodami lahko vpogled v celoten genetski zapis (149).

Prva molekularna tehnika, ki je omogočala učinkovito razlikovanje med 12 tipi FAdV, je bila preiskava cepitve pomnoženega odseka (angl. *restriction enzyme analysis*) (REA) (175). Z uporabo enakih restrikcijskih encimov so uspeli pridobiti tudi značilne vzorce za tri tipe gosjih adenovirusov ter dva tipa puranjih adenovirusov (91,174,176). Uspešno so neposredno dokazali adenovirusni genetski zapis tudi z *in-situ* hibridizacijsko metodo (120,177–180).

Danes je najpogosteje uporabljena metoda za dokaz in določitev adenovirusov verižna reakcija s polimerazo (PCR). Opisane so bile različne tehnike PCR, usmerjene v prepoznavanje gena za največjo beljakovino kapside – heksona. Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje tega odseka genoma so visoko specifični. Z njimi težko odkrivamo različne adenoviruse. V najboljšem primeru lahko dokažemo posamezni rod adenovirusov. Večina začetnih oligonukleotidov je oblikovanih za določanje FAdVs (181,182), nekateri pa so bili oblikovani za specifično prepoznavanje DAdV-1 (183) ali TAdV-3 (184). Določili so tudi univerzalni par začetnih oligonukleotidov, ki naj bi pomnoževal odsek heksona vseh ptičjih adenovirusov v rodovih *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus*. Pomnoževanje s temi začetnimi oligonukleotidi so preizkusili na DAdV-1, TAdV-3 in nekaterih izbranih tipih FAdV (19).

Kasneje so opisali različne metode PCR za pomnoževanje gena za od DNA odvisne DNA polimeraze (185,186). Pravi preboj na tem področju je uspel Wellehanu in sodelavcem (38). Z uporabo zelo degeneriranih začetnih oligonukleotidov so s postopkom vgnezditvene PCR uspeli oblikovati postopek, s katerim so uspešno odkrili vse do sedaj znane adenoviruse iz vseh petih rodov (187).

Visoka občutljivost, ki so jo dosegli z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi, pa prinaša manjšo specifičnost. Z metodo vgnezditvene PCR lahko razlikujemo vseh pet vrst *FAdV* (od A do E), ne moremo pa razlikovati posameznih tipov FAdV. Na odseku gena za od DNA odvisno DNA polimerazo imajo FAdV-6 in FAdV-8b, FAdV-7 in FAdV-8a ter FAdV-9 in FAdV-11 enako nukleotidno zaporedje. Idenično aminokislinsko zaporedje so ugotovili pri tipih FAdV-2, -3, -9, -11, ki vsi sodijo v skupino *FAdV-D* in FAdV-6, -7, -8a, 8b iz skupine *FAdV-E*. Zaradi navedenega je sekveniranje vseh dobljenih produktov PCR zelo pomembno (187).

V zadnjih letih je vedno več objavljenih prispevkov o uporabi novih molekularnih orodij v diagnostiki adenovirusov, predvsem uveljavljanje klasične metode PCR in njene novejšje različice PCR v realnem času (188–190).

2.11 Razširjenost adenovirusov pri različnih vrstah ptic in perutnini

2.11.1 Dokaz bazofilnih in/ali eozinofilnih inkluzij v jedrih

Bazofilne in/ali eozinofilne inkluzije v jedrih, ki so značilne za adenovirusne okužbe, so pri pticah ugotovili v različnih organih. V povezavi z različnimi boleznimi ali zgolj kot naključna najdba so bile potrjene pri kokoših (46,56), japonskih prepelicah (97,113), prepelicah novega sveta vrste *Callipepla gambelli* (191), puranih (136), fazanih (192), domačih racah (*Anas domestica*) (134), gagi (139), goseh (90,96,133,134), pegatkah (105,123,131,193), sivem žerjavu (143), srebrnemu galebu (147), tenkokljuni lumni (142), harisonovem kragulju (84), skalnem viru in orlovskem viru (84), sovjem lastovičniku (86), domačem golobu (67), noju (137) in različnih vrstah papig – Meyerjevi papigi (70,189), papigi vrste *Poicephalus robustus* (71,189), papigah vrst *Poicephalus cryptoxanthus* in *Poicephalus ruepelli* (189), senegalski papigi (*Poicephalus senegalus*) (189), sivi papigi (67,69,71–73), nimfi (74), plemeniti papigi (68,69), modročeli amazonki (*Amazona aestiva*) (189), rumenotemeni amazonki (76), amazonki (*Amazona* spp.) (124), kakaduju (*Cacatua* spp.) (124), inkovskem kakaduju (*Cacatua laedbeateri*) (189), oranžnoperuti papigi (67), aleksandru (*Psittacula krameri*) (194), skobčevki (132,144,145,195), ploskorepi papigi (*Platicercus* spp.) (69), plavolici rozeli (145), rozeli (*Platycercus eximius*) (145), rdečehrbti pojoči papigi (145), konuri vrste *Pyrrhura rupicola sandiae* (189), modrem črnoglavem agapornisu (140), bradati papigi (*Psittacula alexandri*) (189), rumenoprsi ari (124), ari (*Ara* spp.) (69), dolgoperuti papigi (*Poicephalus* spp.) (69), aratingi (*Aratinga* spp.) (69), gorskem loriju ter loriju vrste *Trichoglossus chlorolepidotus* (125).

2.11.2 Dokaz adenovirusov z elektronsko mikroskopijo

Za potrjevanje adenovirusne okužbe ali razločevanje adenovirusov od drugih virusnih povzročiteljev, predvsem pri domačih golobih in papigah, se je najpogosteje uporabljala elektronska mikroskopija (75,196). Značilno morfologijo adenovirusnih delcev so opisali pri kokoših (46), puranih (197,198), pegatkah (105,123) prepelicah novega sveta vrste *Callipepla gambelii* (89), japonskih prepelicah (141), goseh (90,133), racah (134,138), moškatni bleščavki (55), modrem črnoglavem agapornisu (140), skobčevki (144–146), nimfi (74), rožnatoglavem agapornisu (75), vzhodni rozeli (145), bleđi beloglavi rozeli (145), senegalski papigi (189), papigah vrst *Poicephalus robustus* in *Poicephalus cryptoxanthus*

(189), inkovskem kakaduju (189), konuri vrste *Pyrrhura rupicola sandiae* (189), rdečehrbti pojoči papigi (145), aleksandru (194), gorskem loriju (125), sivi papigi (67,71–73), oranžnoperuti papigi (67), modročeli amazonki (189), rumenotemeni amazonki (76), plemeniti papigi (68), srebrnemu galebu (147), sivemu žerjavu (143), tankokljuni lumni (142), ameriški postovki (80,81), malem sokolu (78), sokolu selcu (79), sokolu vrste *Falco fasciinucha* (83), sokolu vrste *Falco femoralis septentrionalis* (79), črnem škarniku (85) in noju (137,199).

2.11.3 Dokaz adenovirusov z metodo izolacije virusa

Kljub zahtevni izolaciji nekaterih tipov adenovirusov v literaturi poročajo o uspešni izolaciji adenovirusov pri kokoši (46,200), puranu (135,154,197,201), virginijskem kolinu (88,106), japonski prepelici (87,202), pegatki (193,203), fazanu (204), domačih racah (110,205), mlakarici (200), gagi (139), moškatni bleščavki (55), goseh (90,96,206,207), domačem golobu (61), skobčevki (61), papigi vrste *Poicephalus gulielmi* (69), modročeli amazonki (189), bradati papigi (189), inkovskem kakaduju (189), modrorami aratingi (*Aratinga acuticaudata*) (69), sivi papigi (71), senegalski papigi (189), papigah vrst *Poicephalus robustus* (71) in *Poicephalus ruepelli* (189), papigi iz roda *Poicephalus* spp. (77), sokolu selcu (208), sokolu vrste *Falco femoralis septentrionalis* (79,208), črnem škarniku (85) in noju (137,138,199,209).

2.11.4 Dokaz protiteles pri pticah

Za dokazovanje specifičnih protiteles proti adenovirusom uporabljamo različne serološke metode. Največja težava, s katero se soočamo pri ovrednotenju rezultatov in diagnostiki, je njihova interpretacija, saj lahko specifična protitelesa proti adenovirusom odkrijemo tako pri bolnih kot tudi zdravih pticah. Nemalokrat so ugotovili pri isti živali specifična protitelesa tudi proti različnim serotipom adenovirusov (46).

Specifična protitelesa proti različnim tipom adenovirusov iz roda *Aviadenovirus* so ugotovili pri različnih vrstah ptic, predvsem iz redu kur (Galliformes) (46). Do sedaj so pri kokoših ugotovili vseh 12 serotipov FAdV (46,149). Protitelesa proti različnim tipom FAdV pa so bila ugotovljena tudi pri fazanih (167,210,211), virginijskih kolinah (88) in japonskih prepelicah (88,97,107). Protitelesa proti aviadenovirusom so izven redu kur ugotovili tudi pri goseh

(96,207), domačih golobih (*Columba livia domestica*) (153,212), papigah iz rodov *Poicephalus*, *Aratinga*, *Ara*, *Psittacus*, *Platicercus* in *Eclectus* (69,71), kanji (*Buteo buteo*) (213), črnem škarniku (85) in noju (199).

Protitelesa proti siadenovirusom so ugotovili tako pri zdravih kot tudi bolnih pticah (46). Najpogosteje so bila prisotna protitelesa proti virusu hemoragičnega enteritisa pri puranih, fazanih in piščancih (46). Protitelesa proti siadenovirusom so ugotovili tudi pri pavu (*Pavo cristatus*) (214) in pegatkah (123).

Najpogosteje ugotovimo protitelesa proti atadenovirusom kot odziv na virus sindroma padca nesnosti pri kokoših nesnicah, domačih racah, gojenih goseh in pegatkah (110,215,216). Bolezen EDS in tudi serološko pozitivne kokoši se pojavljajo šele od leta 1976 dalje (108,172). Retrogradno pregledani serološki vzorci, odvzeti pred letom 1976, so bili negativni na prisotnost omenjenih protiteles (217–219). So pa z retrogradnimi serološkimi preiskavami ugotovili protitelesa proti EDS v serumu različnih vrst vodnih ptic tudi pred letom 1975. Tako so bile serološko pozitivne domače race (205,219), divje in prostoživeče race, gosi ter srebrni galebi v preiskavi Barthe in sodelavcev na Madžarskem (219). Leta 1980 je Kaleta s sodelavci odkril protitelesa tudi pri lesni sovi (*Strix aluco*), veliki uharici (*Bubo bubo*), štoklji (*Ciconia* spp.) ter labodu pevcu (*Cygnus cygnus*) v Nemčiji (218). Kasneje so protitelesa proti DAdV-1 ugotovili tudi pri drugih vrstah ptic: pri domačem vrabcu (*Passer domesticus*) Rampin s sodelavci (220), pri beli kravji čaplji (*Bubulcus ibis*) Malkinson in Weisman (215), pri zlatouhem ponirku (*Podiceps auritus*), ponirku vrste *Podilymbus podiceps*, ameriški liski (*Fulica americana*), belolični trdorepki, raci vrste *Aythya collaris*, nevestici, malem zvoncu (*Bucephala albeola*), ameriški rjavki (*Aythya affinis*), velikem žagarju (*Mergus merganser*), mlakarici, konopnici (*Anas strepera*) in žličarici (*Anas clypeata*) (221), pri moškati bleščavki Bouquet s sodelavci (55), pri raci vrste *Anas superciliosa* Wilcox s sodelavci (11), pri japonskih prepelicah Das in Pradhan (113), pri kanji Frölich s sodelavci (213), pri domačih golobih Tsai in Lee (212) ter pri puranih Bidin s sodelavci (115).

2.11.5 Dokaz adenovirusov z molekularnimi metodami

Z molekularnimi testi so v rodu *Aviadenovirus* določili vseh dvanajst znanih kokošnjih adenovirusov (angl. *fowl adenovirus*) (FAdV-1 do 8a in 8b do 11) (36), sokolji adenovirus (angl. *falcon adenovirus* 1) (FaAdV-1) (79) ter gosji adenovirus 1 (angl. *goose adenovirus* 1) (GoAdV-1) (36). Poleg naštetih so bili ugotovljeni še drugi adenovirusi, ki pa še niso potrjeni kot samostojna vrsta v rodu *Aviadenovirus*: trije gosji adenovirusi (GoAdV-2, -3 in 4), račji adenovirus 2 (DAdV-2) (angl. *duck adenovirus* 2) (36), golobji adenovirus 1 (PiAdV-1) (angl. *pigeon adenovirus* 1) (153), puranja adenovirusa 1 in 2 (angl. *turkey adenovirus* 1, 2) (TAdV-1 in 2) (135) ter dva adenovirusa pri papagajih – adenovirus papagajev 1 (angl. *psittacine adenovirus* 1) (PsAdV-1) in adenovirus Meyerjeve papige 1 (Meyer's parrot AdV-1) (70,189), ki pa še niso potrjeni kot samostojna vrsta v rodu *Aviadenovirus* (36).

V rod *Atadenovirus* je bil do sedaj uvrščen le en adenovirus dokazan pri pticah – račji adenovirus 1 (angl. *duck adenovirus* 1) (DAdV-1) (222).

V zadnjih letih se je število ugotovljenih adenovirusov pri pticah povečalo, uvrščeni so predvsem v rod *Siadenovirus*. Do sedaj sta priznana le adenovirus ujed 1 (angl. *raptor adenovirus* 1) (RAdV-1) (7) in puranji adenovirus 3 (angl. *turkey adenovirus* 3) (TAdV-3) (223). Drugi predstavniki, ki pa še niso priznani kot vrsta znotraj rodu, so adenovirus skobčevk 1 (angl. *budgerigar adenovirus* 1) (132), adenovirus velikih sinic 1 (angl. *great tit adenovirus* 1) (GTAdV-1) (5), adenovirus papagajev 2 (angl. *psittacine adenovirus* 2) (PsAdV-2) (6) in adenovirus govnačk 1 (angl. *south polar skua adenovirus* 1) (Tabela 1) (224).

Hiter razvoj in dostopnost molekularnih metod nakazujeta, da se bo število dostopnih podatkov o DNA adenovirusih še naprej povečevalo. Z novimi podatki bi lahko v prihodnje bolje preučili vpliv teh virusov na gostitelje, ki nam je zaradi pogostih naključnih najdb pogosto neznan (2–4).

Tabela 1: Razvrstitev adenovirusov, ki so bili potrjeni z molekularnimi metodami, in bolezni oziroma bolezenski znaki, ki jih povzročajo

Vrsta adenovirusa	Tip adenovirusa	Bolezni in bolezenski znaki
Rod <i>Aviadenovirus</i>		
<i>Falcon adenovirus A</i>	Falcon adenovirus 1 (FaAdV-1)	akutni, perakutni pogini sokolov
<i>Fowl adenovirus A</i>	Fowl adenovirus 1 (FAdV-1)	CELO, QB, IBH, erozije kutikule mišičnega želodca
<i>Fowl adenovirus B</i>	Fowl adenovirus 5 (FAdV-5)	IBH, erozije kutikule mišičnega želodca
<i>Fowl adenovirus C</i>	Fowl adenovirus 4 (FAdV-4)	IBH, HS
	Fowl adenovirus 10 (FAdV-10)	IBH
<i>Fowl adenovirus D</i>	Fowl adenovirus 2 (FAdV-2)	IBH
	Fowl adenovirus 3 (FAdV-3)	IBH
	Fowl adenovirus 9 (FAdV-9)	IBH
	Fowl adenovirus 11 (FAdV-11)	IBH
<i>Fowl adenovirus E</i>	Fowl adenovirus 6 (FAdV-6)	IBH
	Fowl adenovirus 7 (FAdV-7)	IBH
	Fowl adenovirus 8a (FAdV-8a)	IBH
	Fowl adenovirus 8b (FAdV-8b)	IBH
<i>Goose adenovirus A</i>	Goose adenovirus 5 (GoAdV-5)	IBH pri goseh, HS
<i>Turkey adenovirus B</i>	Turkey adenovirus 1 (TAdV-1)	konjunktivitis, nefritis, aerosakulitis pri puranih
	Duck adenovirus 2	neznano
	Meyer's parrot adenovirus 1	IBH pri papigah
	Pigeon adenovirus 1 (PiAdV-1)	neznano
	Psittacine adenovirus 1 (PsAdV-1)	neznano
	Turkey adenovirus 2 (TAdV-2)	IBH pri puranih
Rod <i>Atadenovirus</i>		
<i>Duck adenovirus A</i>	Duck adenovirus 1 (DAdV-1)	EDS
Rod <i>Siadenovirus</i>		
<i>Great tit adenovirus A</i>	Great tit adenovirus 1 (GTAdV-1)	neznano
<i>Raptor adenovirus A</i>	Raptor adenovirus 1 (RAdV-1)	pogini pri različnih ujedah in sovah
<i>Turkey adenovirus A</i>	Turkey adenovirus 3 (TAdV-3)	HEV puranov, MSD pri fazanih
	Budgerigar adenovirus 1	neznano
	Psittacine adenovirus 2 (PsAdV-2)	pogini papig
	South Polar skua adenovirus 1	viremija

CELO – chicken embryo lethal orphan; IBH – inkluzijski hepatitis; HS – sindrom zaostajanja tekočine v osrčniku; EDS – sindrom padca nesnosti; HEV – hemoragični enteritis; MSD – bolezen marmorirane vranice
 Modro so označeni tipi sorodnih virusov, ki bi lahko bili uvrščeni v predpostavljene rod, vendar še niso bili potrjeni kot vrsta v rodu.

2.12 Evolucija adenovirusov

Podobnosti, ki izhajajo iz filogenetske primerjave nukleotidnih zaporedij za adenovirusno proteazo in majhno podenoto gostiteljske mitohondrijske rRNA, kažejo na skupen razvoj adenovirusov in njihovih gostiteljev (4). Proglasitev sesalcev in ptic za izvirne gostitelje rodov *Mastadenovirus* in *Aviadenovirus* je zelo smiselna, saj kljub obilici različnih tipov AdV le-ti niso bili dokazani izven izvornih razredov gostiteljev. Prav tako so verjetno ribe izvorni gostitelj rodu *Ichtadenovirus*, katerega predstavnik velja za najstarejši poznan AdV (3). Večji izziv za določitev izvornih gostiteljev predstavljata rodova *Atadenovirus* in *Siadenovirus* (Slika 4).

Atadenovirusi so bili sprva dokazani pri različnih prežvekovalcih (225–227), kmalu zatem pa tudi pri pticah (108) in vrečarju vrste *Trichosurus vulpecula* (185). Vsi tedaj znani predstavniki so imeli visoko vsebnost A+T v genomski DNA, po čemer je rod bil tudi poimenovan (39). Vidno razhajanje med atadenovirusi pri prežvekovalcih, njihova številčnost in velika raznolikost tipov kaže, da imajo relativno dolgo zgodovino sobivanja z gostiteljem (3,9). Med iskanjem izvornega gostitelja je bilo narejenih veliko preiskav na nižjih vretenčarjih (37). Harrach je na podlagi primerjave filogenetskih dreves ugotovil, da so BAdV 4, 6 in 7 filogenetsko približno tako oddaljeni od drugih sesalčjih in ptičjih adenovirusov, kot so plazilci in dvoživke filogenetsko oddaljeni od sesalcev in ptic. Predvideval je, da so plazilci izvorni gostitelji atadenovirusov (37). Prvi celotni genetski zapis plazilčjega AdV je objavil Farkas leta 2008 (228). Adenovirus SnAdV-1 izoliran iz ameriškega goža (*Elaphe guttata*) pripada po genomski organizaciji značilnim atadenovirusom. Edina razlika je v vsebnosti nukleotidov, ki je pri SnAdV-1 uravnotežena (51 % G+C) (228). Podobno razmerje nukleotidov so ugotovili tudi pri drugih AdV, ki so bili izolirani iz različnih kuščarjev (38,229) in kač (230).

Visoka vsebnost A+T (~60 %) v genomu bi lahko bila, skupaj s povečano stopnjo virulence, povezana z nedavnim preskokom virusa na novega gostitelja (38). Odmik vrednosti G+C proti A+T je verjetno prilagoditveni odgovor na novega gostitelja, zato raziskovalci sklepajo, da so AdV z uravnoteženo vsebnostjo G+C prilagojeni na gostitelja, medtem ko AdV z višjo vsebnostjo A+T verjetno predstavljajo nedavno ali novo infekcijo gostitelja (29). Dodaten dvom o tem, da so plazilci izvorni gostitelji zgolj atadenovirusov, se je pojavil, ko so odkrili

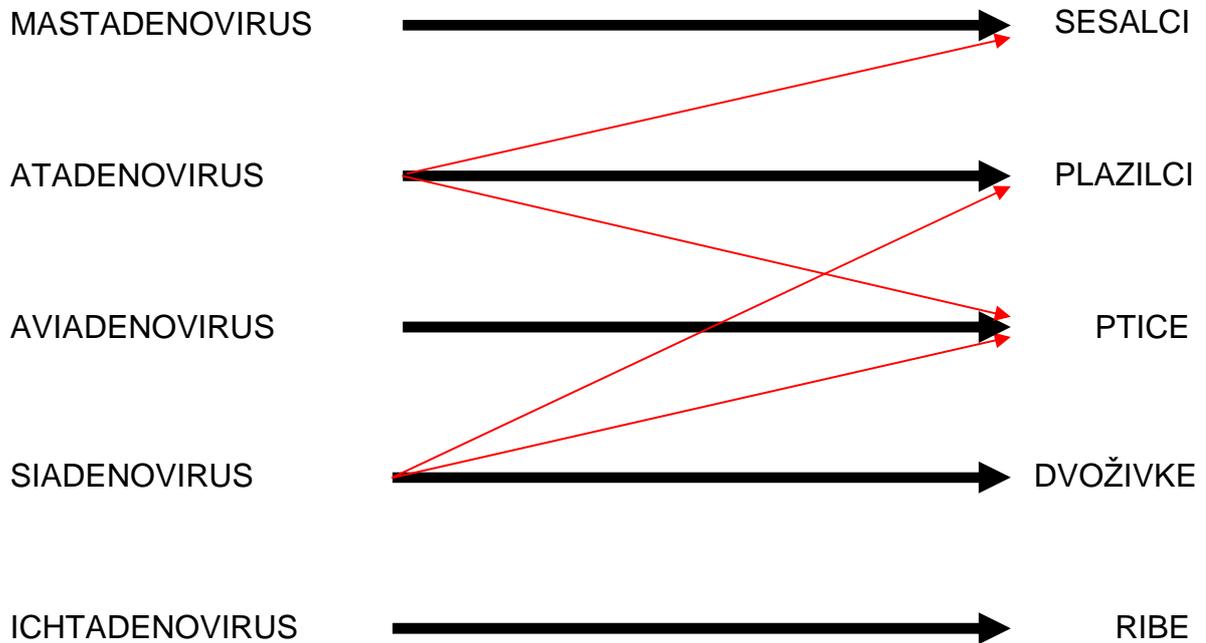
siadenoviruse pri želvah (231). Novejše raziskave kažejo, da so izvorni gostitelji atadenovirusov resda plazilci (*Reptilia*), vendar samo iz redu luskarjev (*Squamata*) (29).

Tudi za rod *Siadenovirus* izvorna gostiteljska skupina še ni opredeljena. Siadenovirusi naj bi se evolucijsko razvili iz dvoživk (2). Kljub številnim poskusom poleg FrAdV-1 drugi AdV pri dvoživkah niso bili potrjeni. Večino novih siadenovirusov so ugotovili pri pticah. V zadnjem času so poleg DAdV-1 dokazali predstavnike siadenovirusov še pri ujedah (RAdV-1), veliki sinici (GTAdV-1) in papigah (budgerigar adenovirus 1, PsAdV-2) (2,5–7,132). Večje število siadenovirusov pri papigah in odkritje novega siadenovirusa pri želvi vrste *Leucocephalon yuwonoi* (231) nakazuje, da je izvorna linija gostiteljev verjetno red v razredu plazilcev, ki niso luskarji. Ker oblikujejo ptice s plazilci monofiletsko skupino, se zdi predvidevanje še toliko bolj verjetno. Vsi do sedaj poznani siadenovirusi imajo visoko vsebnost A+T v genomskem zaporedju, zato je zelo verjetno, da tiči izvorni gostitelj v do sedaj še nerazkriti liniji plazilcev (29).

Petim vzpostavljenim rodovom adenovirusov bo verjetno v bližnji prihodnosti dodan nov, šesti red. Vsaj štirje tipi adenovirusov, nedavno odkriti pri kopenskih želvah iz rodu škatlaric (*Terrapine*) in vodnih želvah iz rodu *Trachemys*, namreč oblikujejo svoj klad (29).

ROD VIRUSOV

RAZRED GOSTITELJA



Slika 4: Prikaz pojavljanja adenovirusov petih priznanih rodov pri vretenčarskih gostiteljih iz petih večjih razredov. Črne puščice označujejo predpostavljeno osnovno skupino gostitelja, rdeče puščice označujejo verjetne medrazredne preskoke. Povzeto po (4).

Podatki, zbrani do sedaj, nakazujejo, da vsako glavno vretenčarsko linijo opredeljuje drug rod adenovirusov (232). To verjetno pomeni, da je skupni predhodnik današnjih adenovirusov obstajal že pred razcepitvijo vretenčarskih razredov pred več kot 400 milijoni let (4).

Njihovo zgodnejšo evolucijo lahko predvidevamo glede na podobnosti, ki si jih adenovirusi delijo z nekaterimi drugimi virusi. Adenovirusi imajo zgradbo viriona in nekatere strukturne beljakovinske komponente (hekson) zelo podobne bakteriofagu PRD1. Osupljiva podobnost glavne kapsidne beljakovine ni edina podobnost, saj sta si zelo sorodna tudi zgradba in biološka aktivnost obeh virusov (17). PRD1 okužujejo po Gramu negativne bakterije in jih uvrščamo v družino Tectiviridae. Adenovirusni hekson z zgradbo rolade je sicer skupen kapsidnim beljakovinam različnih virusov, vendar je po zgradbi najbolj podoben prav strukturi PRD1. Prav tako ima PRD1 analog adenovirusnim nitastim podaljškom. Ti podatki

nakazujejo na divergentni evlucijski razvoj adenovirusov in tectivirusov iz skupnega prednika, ki je imel morfologijo podobno adenovirusom in je bil prisoten v obdobju pred evkarionti. Enako strukturno lastnost so odkrili tudi pri bakteriofagu Bam35, ki okužuje po Gramu pozitivne bakterije. Bam35 in PRD1 sta morfološko enaka, kljub temu da je njun evlucijski razhod ocenjen na obdobje pred več milijoni let (233).

Predvidevajo, da so adenovirusi morfološke značilnosti pridobili že v obdobju pred evkarionti. Predhodnik adenovirusnega genoma je bil verjetno kratek. Vseboval je le najnujnejše podatke, pomembne za pomnoževanje in preživetje (234). Procesi, ki so bili dejavni v postopnem večanju in razvoju genoma, so verjetno enaki ali podobni tistim, ki so predvidoma vpleteni v evluciji družin drugih velikih dvojnovijačnih DNA virusov (234). Ti vključujejo rekombinacijo genov, njihovo izrezovanje, spajanje, zajetje in podvojevanje, katerih sledi so razvidne tudi v genomu današnjih adenovirusov (4). S pridobitvijo dodatnih pomnoževalnih in strukturnih genov se je oblikoval adenovirus, iz katerega so vsi obstoječi pripadniki družine *Adenoviridae* podedovali vsaj 16 genov. Z razvojem so se kasneje različne linije razvijale in pridobile različne garniture genov, ki so jim omogočili boljšo umestitev v določeno biološko nišo (2)

Zdi se, da je družina *Adenoviridae* prva družina virusov, pri kateri molekularna filogenija lahko razkrije progresivni razvoj virusov, ki je usklajen z evlucijskim razvojem njihovih gostiteljev (4).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci prostoživečih ptic

3.1.1.1 Vzorci v najlonske mreže ujetih ptic

Ptice pevke in druge manjše vrste ptic smo lovili v obdobju jesenske selitve (konec avgusta ali september) leta 2008, 2009 in 2011. Odlov je potekal na območju ornitološke postaje Prirodoslovnega muzeja Slovenije na Ljubljanskem barju v okolici Vrhnike.

Ptice smo privabljali s pomočjo napeva (ptičjega petja), reproduciranega s kasetofonom. Lovili smo jih v najlonske mreže velikosti 3,3 x 12 metrov (Slika 5).



Slika 5: Odlov prostoživečih ptic v najlonske mreže. Foto: Marko Zadravec

Ujetim pticam je usposobljeni ornitolog iz Prirodoslovnega muzeja Slovenije pričvrstil obroček, določil vrsto, spol in starost ter izmeril telesno maso in dolžino peruti ter druge biometrične podatke, ki so potrebni za nedvoumno določitev vrste. Pri goločih se pticah je popisal način golitve.

Ptice smo med postopkom popisovanja in obročkanja klinično pregledali in jim odvzeli kloakalni bris. Uporabili smo brise, primerne velikosti vzorčenim pticam (Meus, Italija).

Majhnim vrstam ptic smo odvzeli vzorec s posebnimi majhnimi brisi (Copan[®], Italija) (Slika 6). S tem smo preprečili poškodbe kloake, ki bi lahko nastale pri odvzemu vzorca.



Slika 6: Odvzem kloakalnega brisa s posebnim, majhnim brisom (Copan[®], Italija). Foto: dr. Tomi Trilar

3.1.1.2 Vzorci prostoživečih ptic, oskrbljenih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce

Ptice pevke in ujede so prinesli v ambulanto kot najdene prostoživeče ptice, ki so potrebovale nujno veterinarsko oskrbo.

Prostoživečim pticam, ki so bile veterinarsko pregledane in oskrbljene, smo odvzeli kloakalni bris, kot je opisano v poglavju 3.1.1.1.

3.1.2 Vzorci ptic, katerih vzorci so bili del programa aktivnega nadzora AI v Sloveniji v letu 2010

Vzorci kloakalnih brisov prostoživečih ptic različnih vrst je odvezel veterinar v Zatočišču za živali prosto živečih vrst. Kloakalni brisi so bili skupaj s podatki o vrsti ptice, mesta najdbe, ter kraja in časa odvzema vzorca poslani na Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine.

3.1.3 Vzorci ustreljenih rac mlakaric

Vzorci kloakalnih brisov rac mlakaric so v okviru programa aktivnega nadzora AI, ki ga predpisuje Veterinarska uprava RS, odvzeli lovci lovskih družin na območju Slovenije. Vzorce so odvzeli v letih 2009, 2010 in 2011 v času lovne dobe rac mlakaric (od 31.9. do 31.1.). Lovec, ki je odvzel vzorec odstreljeni raci mlakarici, je izpolnil poseben spremni dokument, na katerem so bili navedeni kraj in čas odvzema vzorca ter spol in starost rase mlakarice.

3.1.4 Vzorci dvoriščne perutnine

Kloakalne brise smo odvzeli različnim vrstam perutnine na različnih območjih Slovenije v letih 2008, 2009 in 2010. Vzorčili smo približno 10 živali na dvorišču. V kolikor je bilo mogoče, smo vzorčili različne vrste perutnine na istem dvorišču (Slika 7). Posameznim vrstam perutnine (pavji puran) smo zaradi prevelike plašnosti in možnosti poškodb med lovljenjem vzorčili sveže iztrebke. Bris smo previdno pogreznili v sredino svežega iztrebka, da bi bila možnost kontaminacije vzorca iz okolja čim manjša.



Slika 7: Dvoriščna perutnina. Foto: Marko Zadravec

3.1.5 Vzorci živali živalskih vrtov in živalskim vrtom podobnih prostorov v Sloveniji

Kloakalne brise smo v spremstvu veterinarja odvzeli različnim vrstam ptic, kot je opisano v poglavju 3.1.1.1.

3.1.6 Vzorci fazanov

Vzorčili smo na štirih fazanerijah v Sloveniji (Bonini, Vurberk, Peskovci in Beltinci). V vsaki fazaneriji smo kloakalne brise odvzeli 25 živalim (Slika 8).



Slika 8: Odvzem kloakalnega brisa pri fazanu. Foto: dr. Tomi Trilar

3.1.7 Vzorci sokolov v ujetništvu

Vzorčili smo celotno rejo sokolov različnih vrst in podvrst pri slovenskem gojitelju sokolov na dveh različnih lokacijah. Vzorčili smo konec meseca februarja 2011. Sokoli se v tem obdobju leta intenzivno pripravljajo na paritveno obdobje. Da bi zmanjšali poseganje v tem pomembnem obdobju, smo vzorčili njihove sveže iztrebke. Bris smo previdno pogreznili v sredino svežega iztrebka, da bi bila možnost kontaminacije vzorca iz okolja čim manjša.

3.1.8 Vzorci ljubiteljskih vrst ptic, pregledanih v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce

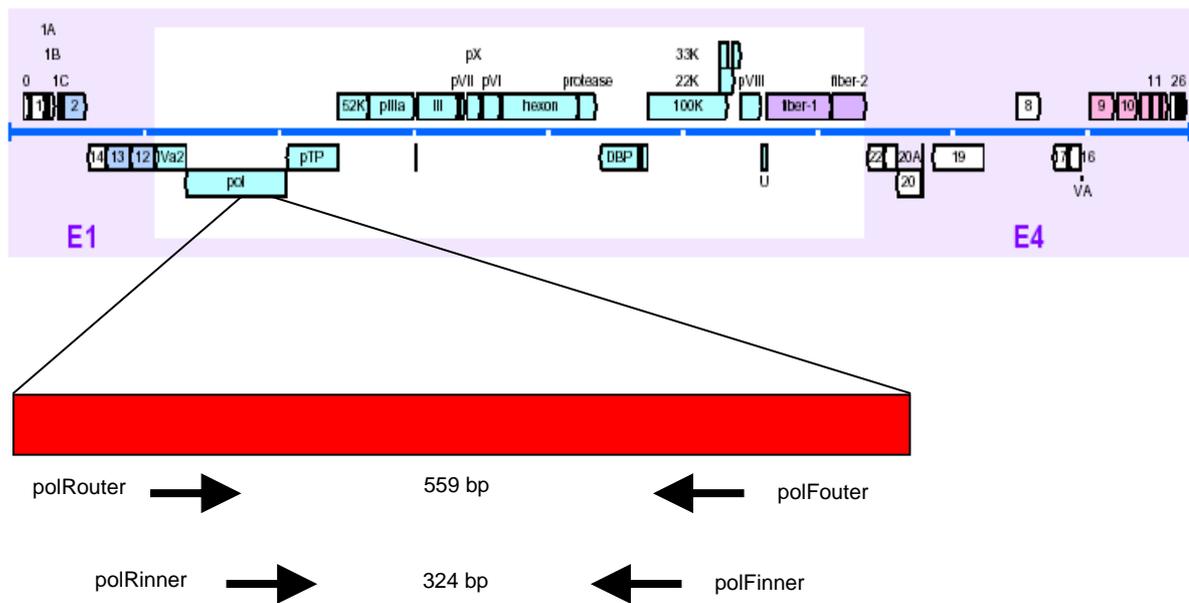
Kloakalne brise smo v ambulanti odvzeli različnim ljubiteljskim vrstam ptic. Odvzeli smo jih med kliničnim pregledom ali pri podrobnejšem pregledu ob izofluranski anesteziji (Slika 9). Prevladovale so papige ter ljubiteljske vrste ptic pevk. Manjšim vrstam ptic smo kloakalne brise jemali s posebnimi, majhnimi brisi, kot je opisano v poglavju 3.1.1.1.



Slika 9: Pregled ljubiteljske ptice ob izofluranski anesteziji in odvzem kloakalnega brisa.
Foto: Marko Zadravec

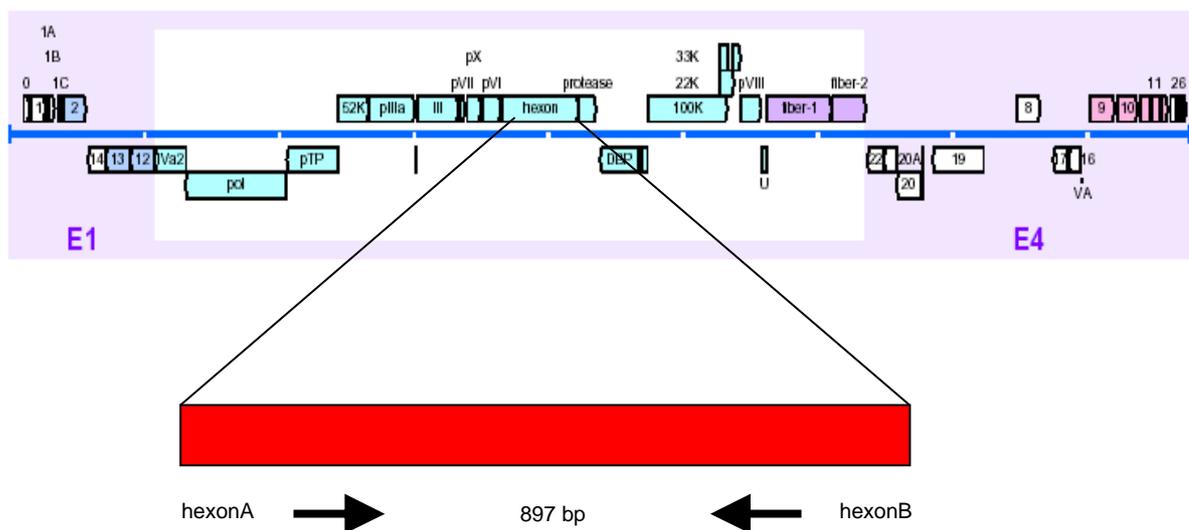
3.1.9 Začetni oligonukleotidi

V postopku vgnezditvene PCR smo za pomnoževanje odseka za od DNA odvisne DNA polimeraze uporabili dva para začetnih oligonukleotidov polRouter/polFouter in polRinner/polFinner, ki so jih določili Wellehan in sodelavci (38) (Slika 10). Uporabljeni začetni oligonukleotidi so podani v tabeli 2.



Slika 10: Prikaz pomnoževanja gena za polimerazo adenovirusov z metodo vgnezditvene PCR. Povzeto po: (38).

V postopku vgnezditvene PCR smo za pomnoževanje odseka za hekson uporabili degenerirane začetne oligonukleotide, HexonA in HexonB, ki so jih določili Meulemans in sodelavci (182) (Slika 11). Uporabljeni začetni oligonukleotidi so podani v tabeli 3.



Slika 11: Prikaz pomnoževanja gena za hekson adenovirusov z metodo PCR. Povzeto po: (182).

Začetne oligonukleotide so proizvedli pri podjetju Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, ZDA).

Tabela 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za adenovirusno polimerazo.

Gen za polimerazo	Smiselni začetni oligonukleotid	polFouter 5'→3' TNMGNGGNGGNMGTGYTTAYCC*	polFinner 5'→3' GTNTWYGAYATHGTGYGGHATGTAYGC**
	Protismiselni začetni oligonukleotid		
	polRouter 5'→3' GTDGCRAANSHNCCRTABARNG***	559 bp	
	polRinner 5'→3' CCANCCBCDRTRTGNARNGTRA		324 bp

* kjer je Y = C ali T, N = A, C, G ali T, in M = A ali C

** kjer je W = A ali T

*** kjer je R = A ali G, M = A ali C, D = A, G ali T, S = G ali C, H = A, T ali C in B = G, T ali C

Vir: Wellehan in sodelavci (38)

Tabela 3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za adenovirusni hekson.

Gen za hekson	Smiselni začetni oligonukleotid	heksonA (144-161) 5'→3' CAARTTCAGRCAGACGGT
	Protismiselni začetni oligonukleotid	
	heksonB (1041-1021) 5'→3' TAGTGATGMC GSGACATCAT	897 bp

Vir: Meulemans in sodelavci (182)

3.2 METODE

3.2.1 Transport in hranjenje vzorcev

Odvzete vzorce smo hranili v originalni embalaži brisov. Posebne, majhne brise (Copan[®], Italija) brez individualne embalaže smo po odvzemu kloakalnega brisa skrajšali in shranili v 2,0 ml vijalko (TPP, Švica). Vzorce smo v najkrajšem možnem času dostavili na Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine. Tam smo vzorce shranili pri temperaturi -20°C do nadaljnjih preiskav.

3.2.2 Priprava vzorcev brisov

Zamrznjene vzorce smo iz zamrzovalne skrinje prestavili v brezprašno komoro. Tam smo jih odtalili in jim dodali 1 ml hranilnega medija (MEM; Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija). Vzorce smo stresali z vibracijskim stresalnikom 5 minut.

3.2.3 Molekularne metode za dokazovanje nukleinske kisline adenovirusov v kloakalnih brisih ptic

Za optimizacijo vgnezditvene PCR smo uporabili celokupno DNA, ki smo jo izolirali iz liofilizata cepiva EURICAN DHPPi²-L (Merial, ZDA). Liofilizatu smo dodali 1 ml sterilne tekočine (Mini plasco Aqua ad injectabilia 20 ml, B. Braun Melsungen AG, EU) ter iz 0,5 ml raztopine osamili celokupno DNA. Liofilizat vsebuje živ atenuiran pasji adenovirus 2 (angl. *canine adenovirus 2*) (CAV-2). Osamljeno DNA smo uporabljali tudi za pozitivno kontrolo pri dokazovanju virusnega genoma z metodo vgnezditvene PCR.

Za optimizacijo PCR, s katero smo dokazovali prisotnost gena za adenovirusni hekson, smo uporabljali DNA, izolirano iz komercialnega inaktiviranega liofilizata, ki vsebuje virus FAdV-1 (CELO) (GD, Animal Health Service, Deventer, EU). Izolirano DNA smo uporabljali tudi kot pozitivno kontrolo pri dokazovanju virusnega genoma z metodo PCR.

3.2.3.1 Izolacija celokupne DNA

Za izolacijo celokupne DNA iz kloakalnih brisov smo uporabili QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, EU).

Potek izolacije DNA:

- 20 μL proteinaze K smo prenesli na dno 1,5 ml reagenčne epruvete.
- Dodali smo 200 μL vzorca, raztopljenega v hranilnem mediju.
- Dodali smo 200 μL pufra AL.
- Vzorec smo stresali z vibracijskim stresalnikom 15 sekund.
- Inkubirali smo 10 min na 56°C .
- Reagenčno epruveto smo kratek čas centrifugirali pri 3.000 obratih na minuto (rpm), toliko da smo odstranili kapljice vsebine na notranji strani njenega pokrovčka.
- Vzorcju smo dodali 200 μL 100 % etanola in ponovno stresali z vibracijskim stresalnikom 15 sekund. Reagenčno epruveto smo kratek čas centrifugirali pri 3000 rpm, toliko da smo odstranili kapljice vsebine na notranji strani njenega pokrovčka.
- Previdno smo prenesli vsebino reagenčne epruvete (700 μL vključujoč usedlino) v 2 ml kolonco (QIAamp Mini spin column), postavljeno v novo reagenčno epruveto. Zaprli smo pokrovček in centrifugirali na sobni temperaturi 1 minuto pri 8.200 rpm. V tem delu postopka poteče vezava DNA iz vzorca na silikonsko membrano vezano v kolonci.
- Previdno smo prenesli kolonco in jo postavili v novo 2 ml epruveto. V kolonco smo dodali 500 μL pufra AW1. Centrifugirali smo na sobni temperaturi 3 minute pri 8.200 rpm.
- Previdno smo prenesli kolonco in jo postavili v novo 2 ml epruveto. V kolonco smo dodali 500 μL pufra AW2. Centrifugirali smo na sobni temperaturi 3 minute pri 14.000 rpm.
- Previdno smo prenesli kolonco in jo postavili v novo 2 ml epruveto, brez pokrovčka. Centrifugirali smo na sobni temperaturi 1 minuto pri 14.000 rpm, da smo izločili morebitni presežek pufra AW2.
- Kolonco smo postavili v novo epruveto, ki smo jo označili z oznako vzorca. Dodali smo 100 μL pufra AE ali enako količino destilirane vode in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Centrifugirali smo na sobni temperaturi 1 minuto pri 8.200 rpm.
- Vsebina označene epruvete je vsebovala raztopljeno DNA iz vzorca, ki smo jo shranili na -70°C do nadaljnjih laboratorijskih preiskav.

3.2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*) (PCR)

Izvajali smo dve različni metodi: vgnezditveno verižno reakcijo s polimerazo in verižno reakcijo s polimerazo. Za pomnoževanje DNA, izolirane iz vzorcev ptic, smo uporabili encim HOTTaq polymerase (Qiagen, Nemčija, EU). Pomnoževanje (PCR) je potekalo v reagenčni epruveti ob dodatku specifičnih začetnih oligonukleotidov.

3.2.3.2.1 Vgnezditvena verižna reakcija s polimerazo (angl. *nested PCR*) za dokazovanje gena za polimerazo

Pripravili smo 25 μL mešanico:

- 2 μL raztopine DNA
- 1 μL Mg^{2+}
- 1,5 μL vsakega specifičnega začetnega oligonukleotida (polFouter in polRouter)
- 0,5 μL mešanice dNTP
- 2,5 μL pufra
- ddH₂O do končnega volumna (25 μL)

Reakcijsko mešanico smo postavili v termopomnoževalnik, kjer je potekla reakcija:

- začetna denaturacija (5 minut pri 94°C)
- 40 ciklov, sestavljenih iz:
 - denaturacije (2 minuti pri 94°C)
 - prileganja specifičnih začetnih oligonukleotidov (1 minuto pri temperaturi 60°C)
 - sinteze nove verige (90 sekund pri 72°C)
- reakcijo pomnoževanja smo zaključili s podaljšano sintezo (10 minut pri 72°C) in ohlajanjem pri 4°C

Opisani postopek smo ponovili še z drugima paroma začetnih oligonukleotidov (polFinner in polRinner). V drugem krogu smo pripravljene mešanice namesto 2 μL raztopine DNA dodali 2 μL vsebine mešanice iz prve reakcije.

3.2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo za dokazovanje gena za hekson

Pripravili smo 25 μL mešanico:

- 2 μL raztopine DNA
- 1 μL Mg^{2+}
- 1,5 μL vsakega specifičnega začetnega oligonukleotida (HexonA in HexonB)
- 0,5 μL dNTP mešanice
- 2,5 μL pufra
- ddH₂O do končnega volumna (25 μL)

Reakcijsko mešanico smo postavili v termopomnoževalnik, kjer je potekla reakcija:

- začetna denaturacija (5 minut pri 94°C)
- 45 ciklov, sestavljenih iz:
 - denaturacije (30 sekund pri 94°C)
 - prileganja specifičnih začetnih oligonukleotidov (1 minuto pri 46°C)
 - sinteze nove verige (1 minuto pri 72°C)
- reakcijo pomnoževanja smo zaključili s podaljšano sintezo 7 minut pri 72°C in ohlajanjem pri 4°C.

3.2.3.3 Dokazovanje produktov PCR

Velikost produktov PCR smo analizirali z vodoravno elektroforezo v gelu iz 1,8-odstotne agaroze, ki smo ga obarvali z etidijevim bromidom. Gel smo pripravili tako, da smo 2,2 g agaroze v prahu (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Herkules, ZDA) s segrevanjem v mikrovalovni pečici popolnoma raztopili v 120 ml 1 % pufra TAE (tris-acetat-EDTA). Raztopino smo ohladili na približno 60°C in jo vlili v model, zatisnjen z gumijasto oblogo na obeh koncih, vstavili glavnik in počakali, da se je gel strdil. Gel smo skupaj z modelom brez tesnil prenesli v kadičko za elektroforezo, napolnjeno s pufrom TAE. 5 ali 25 μL obarvanega produkta smo nanесли v žepke na gelu, odvisno od velikosti žepka. Poleg vzorcev smo v en žep nanесли tudi označevalec velikosti DNA (100 bp DNA ladder, Gibco BRL, Velika Britanija). Ločevanje fragmentov po velikosti je potekalo približno 1 uro pri električnem toku 100 mA. Kot usmernik električnega toka smo uporabili Power Pack P25

(Biometra, Nemčija). Gel smo po končani elektroforezi obarvali z raztopino etidijevega bromida (BioRad, ZDA) in ga po 15 minutah barvanja sprali z vodo. Rezultate smo odčitali z UV transiluminatorjem (Gel Doc 1000, Bio-Rad, Nemčija, EU). Produkte zaželeni velikosti smo izrezali iz gela, jih prenesli v reagenčno epruveto ter jih stehali, da smo določili količino reagenta za nadaljnje reakcije.

3.2.3.4 Dodatno pomnoževanje šibkih produktov PCR

V primeru, ko smo pri analizi produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu dobili šibek produkt pričakovane velikosti, smo dobljene produkte prečistili iz agaroznega gela, kot je opisano v poglavju 3.2.3.5. Da bi pridobili več produkta PCR, smo le-tega uporabili kot osnovo za dodatno pomnoževanje v PCR reakciji z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi ("notranjima" začetnima oligonukleotidoma polFinner in polRinner za produkte adenovirusne polimeraze in začetnima oligonukleotidoma HexonA in HeksonB za heksonske produkte). Dodatno pomnoževanje je potekalo po shemi, zapisani za omenjeni par začetnih oligonukleotidov v poglavjih 3.2.3.2.1 in 3.2.3.2.2 Velikost produktov smo ponovno analizirali z vodoravno elektroforezo v gelu 1,8-odstotne agaroze, kot je opisano v poglavjih 3.2.3.3.

3.2.3.5 Čiščenje produktov PCR

Specifične produkte PCR, ki smo jih izrezali iz agaroznega gela, smo očistili s komercialnim kompletom Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA).

Čiščenje produktov smo izvajali po naslednji shemi:

- Izrezanim in stehanim produktom iz gela v 1, 5-mililitrski reagenčni epruveti smo dodali reagent za vezavo DNA na kremenčevo membrano (Membrane Binding Solution) v razmerju 10 µL reagenta na 10 mg izrezanega gela.
- Vzorec smo premešali z vibracijskim mešalnikom in ga nato vstavili v toplotni stresalnik z nastavlljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija), da se je popolnoma stopil. Gel smo običajno inkubirali 15 minut pri temperaturi 60°C in 350 obratih na minuto.

- Vzorec smo po inkubaciji centrifugirali 10 sekund pri 2.000 rpm in ga prenesli na kolono ("SV Minicolumn"), ki smo jo postavili v zbirno epruveto ("Collection tube").
- Vzorec smo inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi in ga nato centrifugirali v centrifugi (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Nemčija) 1 minuto na 14000 rpm.
- Kolono smo vzeli iz zbirne epruvete, odlili tekočino in kolono ponovno vstavili v zbirno epruveto.
- V kolono smo odpipetirali 700 µL raztopine za spiranje membrane ("Membrane Wash Solution"), ki smo jo razredčili s 95 % etanolom.
- Vzorec smo centrifugirali 1 minuto na 14.000 rpm in nato odlili tekočino iz zbirne epruvete.
- Kolono smo ponovno spirali s 500 µL raztopine za spiranje.
- Vzorec smo centrifugirali 5 minut na 14.000 rpm in iz njega vzeli kolono. Zbirno epruveto smo po centrifugiranju zavrgli.
- Kolono smo postavili v novo sterilno 1,5-mililitrsko reagenčno epruveto in odprto centrifugirali na 2.000 rpm 2 minuti, da je izhlapel preostanek etanola.
- Kolono smo prenesli v novo sterilno 1,5-mililitrsko reagenčno epruveto, dodali 50 µL ddH₂O in inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi.
- Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 1 minuto na 14.000 rpm, da smo sprali na membrano vezano DNA.
- Po centrifugiranju smo kolono zavrgli, 1,5-mililitrsko epruveto z raztopljeno DNA pa shranili pri - 20°C.

Tako očiščene produkte PCR smo poslali v nadaljnjo obdelavo v laboratorij Macrogen (www.macrogen.com), kjer so izvedli sekveniranje.

3.2.3.6 Analiza produktov vgnezditive PCR in PCR

3.2.3.6.1 Analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

Z brskalnikom Enterez Browser, ki ga ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (NCBI, angl. *National Centre for Biotechnology Information*), smo pridobili podatke o nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju različnih tipov adenovirusov. Sekvence, ki še niso bile objavljene in smo jih zajeli v naši raziskavi, smo uporabili z

dovoljenjem Veterinarsko-medicinskega raziskovalnega inštituta Madžarske akademije za znanost v Budimpešti. Prikazane so v tabelah 2 in 3.

Tabela 4: Seznam različnih tipov adenovirusov in njihovih sekvenc v genomski banki, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah aminokislinskih zaporedij za adenovirusno polimerazo.

Ime tipa	Dostopna številka v GenBank (angl. accession number)	Izvorni gostitelj	Uvrstitev v rod v družini Adenoviridae
WSAdV-1	sekvenca ni objavljena	beli jeseter	<i>Ichtadenovirus</i>
HAdV-2	P03261	človek	<i>Mastadenovirus</i>
MAdV-1	AP000342	podgana, miš	<i>Mastadenovirus</i>
Meyer's parrot AdV	AAT66510	papiga	<i>Aviadenovirus</i>
GoAdV-4	sekvenca ni objavljena	gos	<i>Aviadenovirus</i>
TAdV-1	GU936707	puran	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-1	AP_000410	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-2	HM853995	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-3	HM853996	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-4	HM853997	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-5	HM85398	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-6	HM853999	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-7	HM854000	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-8a	HM854001	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-8b	HM854002	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-9	AAD50336	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-10	HM854003	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-11	HM854004	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
BAdV-4	AF036092	krava	<i>Atadenovirus</i>
SnAdV-1	DQ106414	kača	<i>Atadenovirus</i>
ChAdV-1	AY576679	kameleon	<i>Atadenovirus</i>
DAdV-1	Y09598	raca	<i>Atadenovirus</i>
STAdV-1	EU0586825	kopenska želva	<i>Siadenovirus</i>
FrAdV-1	AF224336	žaba	<i>Siadenovirus</i>
PsAdV-2	EU0586825	papiga	<i>Siadenovirus</i>
RAdV-1	EU715130	kragulj, sova	<i>Siadenovirus</i>
GTAdV-1	ACW84422	velika sinica	<i>Siadenovirus</i>
TAdV-3	NP_047384	puran	<i>Siadenovirus</i>

Tabela 5: Seznam različnih tipov adenovirusov in njihovih sekvenc, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za hekson.

Ime seva	Dostopna številka v GenBank (angl. <i>accession number</i>)	Izvorni gostitelj	Uvrstitev v rod v družini <i>Adenoviridae</i>
FAdV-1	U46933	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-2	AF508946	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-3	AF508949	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-4	AF508950	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-5 (340)	EU979371	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-5 (TR22)	AF508953	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-6	AF508954.2	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-7	AF508955	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-8a	AF508957	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-8b	EU979375	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-9	AF083975.2	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-10	U26221	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
FAdV-11	AF508959.2	kokoš	<i>Aviadenovirus</i>
TAdV-1	GU936707.2	puran	<i>Aviadenovirus</i>
TAdV-2	GU936708	puran	<i>Aviadenovirus</i>
PsAdV-1	EF442329	papiga	<i>Aviadenovirus</i>
PiAdV-1	FN824512	domači golob	<i>Aviadenovirus</i>
FaAdV-1	AY683541	sokol	<i>Aviadenovirus</i>

Lastne sekvence delnih zaporedij genov za adenovirusno polimerazo in hekson smo najprej obdelali s programi iz programskega paketa Lasergene (DNASTAR, ZDA). Nukleotidna zaporedja smo uredili s programom Seqman. Pri nekaterih nukleotidnih zaporedjih smo dobili več prekrivajočih se vrhov nukleotidnih zaporedij. V takšnem primeru smo se na mestih z dvojno prekrivajočimi se vrhovi odločili za »višji« vrh. Nukleotidna zaporedja delnih genov za adenovirusno polimerazo smo pretvorili v aminokislinska zaporedja s pomočjo programa ExPASy translate tool (SIB, Švica). Pri poravnavi več zaporedij smo uporabili program MultAlin (235). S paketom BioEdit smo v FASTA formatu oblikovali lastno podatkovno zbirko, ki je vsebovala že objavljene sekvence in lastne sekvence. Novo zaporedje smo vstavili v podatkovno zbirko in s primerjavo z ostalimi sekvencami ugotavljali sorodnost te sekvence z že obstoječimi.

Za filogenetske izračune smo uporabljali orodja v paketu PHYLIP (236). Za izračun sorodnosti pridobljenih sekvenc smo uporabili analizo oddaljenosti (angl. *distance analysis*), ki poleg zaporedja omogoča tudi vpogled v medsebojno podobnost preiskovanih genov ali beljakovin. Sorodnost je sorazmerna z dolžino vej filogenetskega drevesa.

V programu DNADIST smo za posamezne pare nukleotidnih zaporedij uporabili Kimurov dvoparametrični evolucijski model (237). V programu PROTDIST smo za izračun matrike razdalj parov aminokislinskih zaporedij uporabili model kategorij (angl. *categories model*). Kot distančni model smo v programu FITCH uporabili metodo Fitch-Margoliash (238).

Z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s programom SEQBOOT (239) smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves in vrednosti "bootstrap" vpisali na vozlišča dreves. Vrednosti prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča pri 1000 ponovitvah.

Za grafično predstavitev topologije drevesa delnih sekvenc gena za adenovirusno polimerazo smo uporabili program TREEVIEW (240) in za delne sekvence gena za hekson program Mega, različica 5 (241). Dokončno smo filogenetsko drevo grafično oblikovali v programu Microsoft Office PowerPoint 2003.

4 REZULTATI

4.1 VZORCI PREGLEDANIH PTIC

Z metodo vgnezditvene PCR smo preiskali kloakalne brise 1281 ptic, ki pripadajo 112 vrstam iz 13 redov.

4.1.1 Vzorci pregledanih prostoživečih ptic

Pregledali smo kloakalne brise prostoživečih ptic, ki so bili odvzeti pticam v obdobju jesenske selitve v letih 2008, 2009 in 2011 na Vrhniki, prostoživečim pticam, oskrbljenim v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete v letih 2008 in 2009, pticam v Zatočišču za živali prosto živečih vrst vzorčenim leta 2010 in racam mlakaricam ustreljenim leta 2009, 2010 in 2011. Skupno smo odvzeli in pregledali kloakalne brise 626 pticam, ki pripadajo 66 vrstam iz 10 redov.

Natančni podatki o številu in vrstah vzorčenih prostoživečih ptic so podani v tabeli 6.

4.1.2 Vzorci pregledane dvoriščne perutnine

Kloakalne brise različnim vrstam dvoriščne perutnine smo odvzeli na različnih območjih Slovenije. Dvoriščno perutnino smo vzorčili v letih 2008, 2009 in 2010. Skupno smo odvzeli in pregledali kloakalne brise 317 pticam, razvrščenih v 12 vrst in 2 redova.

Natančni podatki o številu in vrstah vzorčenih prostoživečih ptic so podani v tabeli 7.

4.1.3 Vzorci pregledanih ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva

Kloakalne brise različnim vrstam ljubiteljskih ptic, pticam iz živalskih vrtov in sokolom iz ujetništva smo odvzeli v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete v letih 2008 in 2009, v dveh živalskih vrtovih leta 2010 in v privatni reji sokolov leta 2011. Skupno smo odvzeli in pregledali kloakalne brise 338 pticam, ki pripadajo 34 vrstam iz 5 redov.

Natančni podatki o številu in vrstah vzorčenih prostoživečih ptic so podani v tabeli 8.

Tabela 6: Vzorci odvzeti pri prostoživečih pticah.

Red		Vrsta		Število ptic
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	
plojkokljuni	Anseriformes	labod grbec	<i>Cygnus olor</i>	26
		mlakarica	<i>Anas platyrhynchos</i>	90
golobi	Columbiformes	domači golob	<i>Columba livia domestica</i>	11
močvirniki	Ciconiiformes	kvakač	<i>Nycticorax nycticorax</i>	1
		siva čaplja	<i>Ardea cinerea</i>	2
		bela štorclja	<i>Ciconia ciconia</i>	7
ujede	Falconiformes	sršenar	<i>Pernis apivorus</i>	2
		kragulj	<i>Accipiter gentilis</i>	1
		skobec	<i>Accipiter nisus</i>	3
		kanja	<i>Buteo buteo</i>	13
		postovka	<i>Falco tinnunculus</i>	26
žerjavovci	Gruiformes	mokož	<i>Rallus aquaticus</i>	1
pobrežniki	Charadriiformes	mali martinec	<i>Actitis hypoleucos</i>	2
		pikasti martinec	<i>Tringa ochropus</i>	1
		rumenonogi galeb	<i>Larus cachinnans</i>	5
sove	Strigiformes	mali skovik	<i>Glaucidium passerinum</i>	1
		lesna sova	<i>Strix aluco</i>	8
		kozača	<i>Strix uralensis</i>	1
		mala uharica	<i>Asio otus</i>	8
vpijati	Coraciiformes	vodomec	<i>Alcedo atthis</i>	3
plezalci	Piciformes	vijeglavka	<i>Jynx torquilla</i>	19
		veliki detel	<i>Dendrocopos major</i>	2
pevci	Passeriformes	breguljka	<i>Riparia riparia</i>	1
		kmečka lastovka	<i>Hirundo rustica</i>	25
		drevesna cipa	<i>Anthus trivialis</i>	3
		siva pevka	<i>Prunella modularis</i>	21
		taščica	<i>Erithacus rubecula</i>	53
		veliki slavec	<i>Luscinia luscinia</i>	2
		slavec	<i>Luscinia megarhynchos</i>	3
		modra taščica	<i>Luscinia svecica</i>	1
		prosnik	<i>Saxicola torquatus</i>	1
		kos	<i>Turdus merula</i>	11
		cikovt	<i>Turdus philomelos</i>	7
		vinski drozg	<i>Turdus iliacus</i>	1
		kobiličar	<i>Locustella naevia</i>	2
		bičja trstnica	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	5
		močvirska trstnica	<i>Acrocephalus palustris</i>	2
		srpična trstnica	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	19
rakar	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	18		

Red		Vrsta		Število ptic
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	
pevci	Passeriformes	rumeni vrtnik	<i>Hippolais icterina</i>	21
		črnoglavka	<i>Sylvia atricapilla</i>	58
		vrtna penica	<i>Sylvia borin</i>	24
		mlinarček	<i>Sylvia curruca</i>	1
		rjava penica	<i>Sylvia communis</i>	4
		grmovščica	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	2
		vrhji kovaček	<i>Phylloscopus collybita</i>	2
		sivi muhar	<i>Muscicapa striata</i>	3
		črnoglavi muhar	<i>Fidacula hypoleuca</i>	5
		dolgorepka	<i>Aegithalos caudatus</i>	6
		plavček	<i>Cyanistes caeruleus</i>	8
		velika sinica	<i>Parus major</i>	2
		močvirska sinica	<i>Poecile palustris</i>	1
		rjavi srakoper	<i>Lanius collurio</i>	3
		sraka	<i>Pica pica</i>	1
		poljska vrana	<i>Corvus frugilegus</i>	1
		siva vrana	<i>Corvus cornix</i>	9
		krokar	<i>Corvus corax</i>	1
		škorec	<i>Sturnus vulgaris</i>	1
		poljski vrabec	<i>Passer montanus</i>	29
		ščinkavec	<i>Fringilla coelebs</i>	5
		pinoža	<i>Fringilla montifringilla</i>	2
		grilček	<i>Serinus serinus</i>	1
zelenec	<i>Carduelis chloris</i>	3		
lišček	<i>Carduelis carduelis</i>	3		
dlesk	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	3		
trstni strnad	<i>Emberiza schoeniclus</i>	19		
Σ pregledanih redov		Σ pregledanih vrst		Σ ptic
10		66		626

Tabela 7: Vzorci odvzeti pri dvoriščni perutnini.

Red		Vrsta		Število ptic
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	
kure	Galliformes	kokoš	<i>Gallus gallus domesticus</i>	91
		puran	<i>Meleagris gallopavo</i>	15
		pavji puran	<i>Meleagris ocellata</i>	5
		pegatka	<i>Numida meleagris</i>	18
		pav	<i>Pavo cristatus</i>	7
		fazan	<i>Phasianus colchicus</i>	103
		japonska prepelica	<i>Coturnix japonica</i>	11
		kitajska prepelica	<i>Coturnix chinensis</i>	5
plojkokljuni	Anseriformes	domača rasa	<i>Anas</i> sp.	24
		mandarinka	<i>Aix galericulata</i>	4
		moškatna bleščavka	<i>Cairina moschata</i>	18
		gos	<i>Anser anser domesticus</i>	16
Σ pregledanih redov		Σ pregledanih vrst		Σ ptic
2		12		317

Tabela 8: Vzorci odvzeti pri ljubiteljskih pticah, pticah živalskih vrtov in živalskim vrtom podobnih prostorov ter sokolih v ujetništvu.

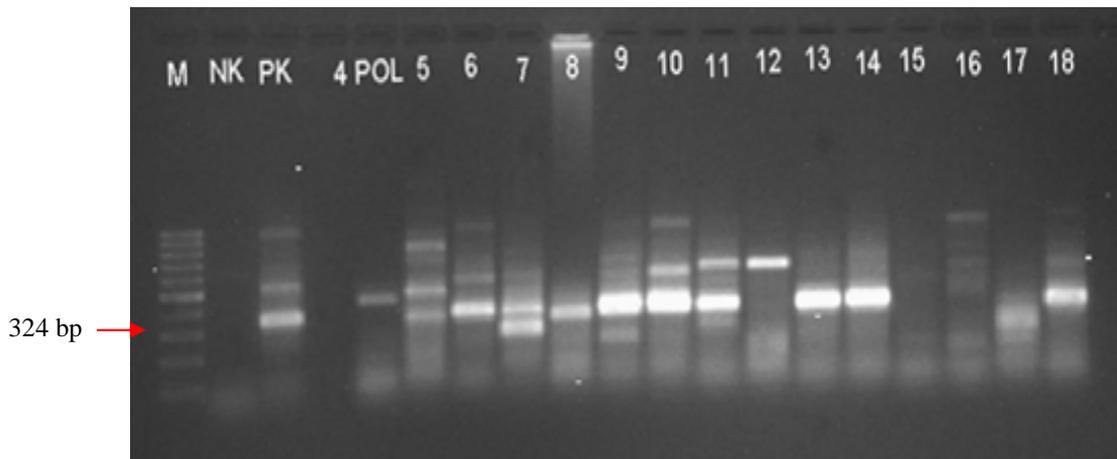
Red		Vrsta		
Slovensko ime	Latinsko ime	Slovensko ime	Latinsko ime	Število ptic
papige	Psittaciformes	skobčevka	<i>Melopsittacus undulatus</i>	112
		nimfa	<i>Nymphicus hollandicus</i>	46
		kakadu	<i>Cacatua</i> sp.	14
		rozela	<i>Platycercus eximius</i>	2
		penant	<i>Platycercus elegans</i>	1
		kozica	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	2
		neofema	<i>Neophema</i> sp.	3
		kraljeva papiga	<i>Alisterus scapularis</i>	2
		rdečekрила papiga	<i>Aprosmictus erythropterus</i>	1
		baraband	<i>Polytelis swainsonii</i>	6
		plemenita papiga	<i>Electus roratus</i>	2
		mavrični lori	<i>Trichoglossus haematodus</i>	2
		veliki aleksander	<i>Psittacula eupatria</i>	2
		mali aleksander	<i>Psittacula krameri</i>	13
		agapornis	<i>Agapornis</i> sp.	18
		senegalska papiga	<i>Poicephalus senegalus</i>	1
		siva papiga	<i>Psittacus erithacus</i>	16
		ara	<i>Ara</i> sp.	13
		amazonka	<i>Amazona</i> sp.	11
		pionites	<i>Pionites</i> sp.	3
aratinga	<i>Aratinga</i> sp.	4		
patagonska papiga	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	1		
pevci	Passeriformes	kanarček	<i>Serinus canaria domestica</i>	10
		zebrica	<i>Poephila guttata castanotis</i>	3
		riževec	<i>Padda oryzivora</i>	1
		indijski kos	<i>Gracula religiosa</i>	2
plezalci	Piciformes	orjaški tukan	<i>Ramphastos toco</i>	1
ujede	Falconiformes	sokol selec	<i>Falco peregrinus</i>	27
		sokol plenilec	<i>Falco cherrug</i>	1
		arktični sokol	<i>Falco rusticolus</i>	2
		prerijski sokol	<i>Falco mexicanus</i>	1
		križanci sokolov	<i>Falco</i> sp.	5
		mali sokol	<i>Falco columbarius</i>	1
veslonožci	Pelecaniformes	rožnati pelikan	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	9
Σ pregledanih redov		Σ pregledanih vrst		Σ ptic
5		34		338

4.2 Molekularne preiskave

4.2.1 Dokaz genoma adenovirusov v kloakalnih brisih ptic

4.2.1.1 Dokazovanje odseka gena za adenovirusno polimerazo

Z metodo vgnezditevne PCR smo preiskali 1281 kloakalnih brisov ptic. S paroma začetnih oligonukleotidov polRouter/polFouter in polRinner/polFinner smo z metodo vgnezditevne PCR pomnoževali 324 bp dolg odsek gena za adenovirusno polimerazo (Slika 12).



Slika 12: Primer elektroforezne ločitve produktov pomnoževanja z vgnezditveno PCR in začetnima oligonukleotidoma polFinner/polRinner: 4-18 – vzorci kloakalnih brisov, PK – pozitivna kontrola (CAV-2), NK – negativna kontrola reakcijske mešanice PCR, M – standard DNA velikosti 100 bp.

4.2.1.1.1 Dokazovanje odseka gena za adenovirusno polimerazo v kloakalnih brisih različnih vrst prostoživečih ptic

Med 626 preiskanimi vzorci smo gen za adenovirusno polimerazo dokazali v 139 vzorcih (22,2 %) prostoživečih ptic iz 34 različnih vrst. Nukleinsko kislino virusov iz rodu *Aviadenovirus* smo ugotovili v 45 (7,2 %) vzorcih, iz rodu *Siadenovirus* v 52 (8,3 %) vzorcih in iz rodu *Atadenovirus* v 42 (6,7 %) vzorcih. Skupno so pozitivni vzorci pripadali 63 različnim tipom adenovirusov. Med njimi smo ugotovili 25 različnih tipov aviadenovirusov, 20 različnih tipov siadenovirusov in 18 različnih tipov atadenovirusov. Natančni podatki o številu dokazanih adenovirusov med vzorčenimi prostoživečimi pticami so podani v tabeli 9.

4.2.1.1.2 Dokazovanje odseka gena za adenovirusno polimerazo v kloakalnih brisih različnih vrst ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva

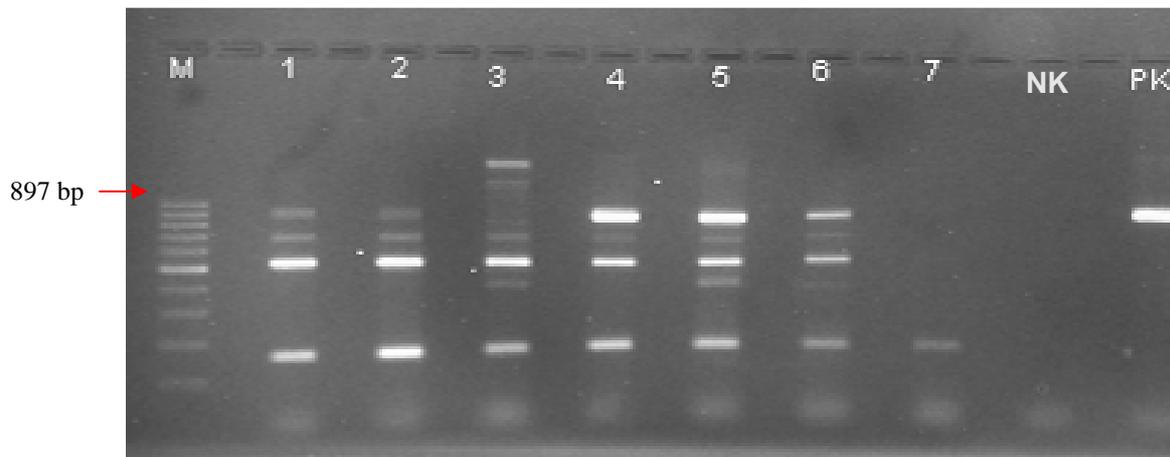
Med 338 preiskanimi vzorci smo gen za adenovirusno polimerazo dokazali v 69 vzorcih (20,4 %) ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva iz 14 različnih vrst. Nukleinsko kislino virusov iz rodu *Aviadenovirus* smo ugotovili v 15 (4,4 %) vzorcih, iz rodu *Siadenovirus* v 48 (14,2 %) vzorcih in iz rodu *Atadenovirus* v 6 (1,8 %) vzorcih. Skupno so pozitivni vzorci pripadali 16 različnim tipom adenovirusov. Med njimi smo ugotovili 5 različnih tipov aviadenovirusov, 7 različnih tipov siadenovirusov in 4 različne tipe atadenovirusov. Natančni podatki o številu dokazanih adenovirusov med vzorčenimi ljubiteljskimi pticami, pticami iz živalskih vrtov in sokoli iz ujetništva so podani v tabeli 10.

4.2.1.1.3 Dokazovanje odseka gena za adenovirusno polimerazo v kloakalnih brisih različnih vrst dvoriščne perutnine

Med 317 preiskanimi vzorci smo gen za adenovirusno polimerazo dokazali v 25 vzorcih (7,9 %) dvoriščne perutnine iz 5 različnih vrst. Nukleinsko kislino virusov iz rodu *Aviadenovirus* smo ugotovili v 13 (4,1 %) vzorcih in iz rodu *Siadenovirus* v 12 (3,8 %) vzorcih. Nukleinske kisline virusov iz rodu *Atadenovirus* nismo ugotovili. Skupno so pozitivni vzorci pripadali 13 različnim tipom adenovirusov. Med njimi smo ugotovili 11 različnih tipov aviadenovirusov in 2 različna tipa siadenovirusov. Natančni podatki o številu dokazanih adenovirusov med vzorčeno dvoriščno perutnino so podani v tabeli 11.

4.2.1.2 Dokazovanje odseka gena za adenovirusni hekson

Z metodo PCR smo preiskali vse vzorce kloakalnih brisov, v katerih smo ugotovili odsek za polimerazo adenovirusov iz rodu *Aviadenovirus*. Z začetnima paroma oligonukleotidov HexonA/HexonB smo pomnoževali 897 bp dolg odsek gena za adenovirusni hekson (Slika 13). Skupno smo pregledali 73 kloakalnih brisov ptic. Z metodo PCR smo ugotovili prisotnost odseka gena za hekson v 11 vzorcih, vendar je bilo le 6 izmed njih primernih za vključitev v filogenetske izračune. Natančni podatki so podani v tabeli 12.



Slika 13: Primer elektroforezne ločitve produktov pomnoževanja s PCR in začetnima oligonukleotidoma **HexonA/HexonB**. 1-7 – vzorci kloakalnih brisov, PK – pozitivna kontrola (FAAdV-1 CELO), NK – negativna kontrola reakcijske mešanice PCR, M – standard DNA velikosti 100 bp.

Tabela 9: Seznam prostoživečih ptic, pri katerih smo dokazali odsek gena za adenovirusno polimerazo.

Slovensko ime	Rod <i>Aviadenovirus</i>		Rod <i>Siadenovirus</i>		Rod <i>Atadenovirus</i>		Družina <i>Adenoviridae</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
labod grbec	3/26 (11,5 %)	2	1/26 (3,9 %)	1	0/26	0	4/26 (15,4 %)	3
mlakarica	4/90 (4,4 %)	3	0/90	0	1/90 (1,1 %)	1	5/90 (5,6 %)	4
domači golob	1/11 (9,1 %)	1	7/11 (63,6 %)	1	0/11	0	8/11 (72,7 %)	2
kvakač	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
siva čaplja	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
bela štoklja	1/7 (14,3 %)	1	0/7	0	0/7	0	1/7 (14,3 %)	1
sršenar	1/2 (50,0 %)	1	0/2	0	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1
kragulj	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
skobec	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
kanja	1/13 (7,7 %)	1	0/13	0	0/13	0	1/13 (7,7 %)	1
postovka	2/26 (7,7 %)	1	3/26 (11,5 %)	2	0/26	0	5/26 (19,2 %)	3
mokož	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
mali martinec	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
pikasti martinec	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
rumenonogi galeb	0/5	0	1/5 (20,0 %)	1	0/5	0	1/5 (20,0 %)	1
mali skovik	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
lesna sova	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0
kozača	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
mala uharica	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0
vodomec	2/3 (66,7 %)	1	0/3	0	0/3	0	2/3 (66,7 %)	1
vijglavka	3/19 (15,8 %)	1	0/19	0	1/19 (5,3 %)	1	4/19 (21,1 %)	2
veliki detel	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
breguljka	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
kmečka lastovka	3/25 (12,0 %)	2	2/25 (8,0 %)	2	1/25 (4,0 %)	1	6/25 (24,0 %)	5
drevesna cipa	1/3 (33,3 %)	1	1/3 (33,3 %)	1	0/3	0	2/3 (66,6 %)	2
siva pevka	4/21 (19,1 %)	4	0/21	0	4/21 (19,1 %)	1	8/21 (38,2 %)	5
taščica	5/53 (9,4 %)	1	0/53	0	8/53 (15,1 %)	2	13/53 (24,5 %)	3
veliki slavec	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
slavec	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
modra taščica	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
prosnik	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
kos	2/11 (18,2 %)	2	1/11 (9,1 %)	1	2/11 (18,2 %)	1	5/11 (45,5 %)	4
cikovt	0/7	0	1/7 (14,3 %)	1	0/7	0	1/7 (14,3 %)	1
vinski drozg	1/1 (100,0 %)	1	0/1	0	0/1	0	1/1 (100,0 %)	1
kobiličar	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
bičja trstnica	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
močvirska trstnica	0/2	0	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	1/2 (50 %)	1

1 število pozitivnih ptic / število vzorčenih ptic

2 število različnih tipov AdV

Slovensko ime	Rod <i>Aviadenovirus</i>		Rod <i>Siadenovirus</i>		Rod <i>Atadenovirus</i>		Družina <i>Adenoviridae</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
srpična trstnica	2/19 (10,5 %)	2	6/19 (31,6 %)	3	4/19 (21,1 %)	2	12/19 (63,2 %)	7
rakar	0/18	0	2/18 (11,1 %)	1	0/18	0	2/18 (11,1 %)	1
rumeni vrtnik	3/21 (14,3 %)	3	1/21 (4,8 %)	1	1/21 (4,8 %)	1	5/21 (23,8 %)	5
črnoglavka	1/58 (1,7 %)	1	15/58 (25,9 %)	4	1/58 (1,7 %)	1	17/58 (29,3 %)	6
vrtna penica	0/24	0	5/24 (20,8 %)	1	10/24 (41,7 %)	5	15/24(62,5 %)	6
mlinarček	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
rjava penica	1/4 (25,0 %)	1	0/4	0	0/4	0	1/4 (25,0 %)	1
grmovščica	0/2	0	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	1/2 (50,0 %)	1
vrnji kovaček	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
sivi muhar	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
črnoglavi muhar	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
dolgorepka	0/6	0	1/6 (16,7 %)	1	1/6 (16,7 %)	1	2/6 (33,4 %)	2
plavček	0/8	0	1/8 (12,5 %)	1	0/8	0	1/8 (12,5 %)	1
velika sinica	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1
močvirska sinica	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
rjavi srakoper	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
sraka	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
poljska vrana	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
siva vrana	0/9	0	1/9 (11,1 %)	1	0/9	0	1/9 (11,1 %)	1
krokar	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
škorec	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
poljski vrabec	1/29 (3,5 %)	1	1/29 (3,5 %)	1	3/29 (10,3 %)	2	5/29(17,3 %)	4
ščinkavec	0/5	0	0/5	0	2/5 (40,0 %)	2	2/5 (40,0 %)	2
pinoža	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
grilček	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
zelenec	1/3 (33,3 %)	1	0/3	0	0/3	0	1/3 (33,3 %)	1
lišček	1/3 (33,3 %)	1	1/3 (33,3 %)	1	0/3	0	2/3 (66,6 %)	2
dlesk	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
trstni strnad	1/19 (5,3 %)	1	0/19	0	1/19 (5,3 %)	1	2/19 (10,6 %)	2
Σ	45/626 (7,2 %)	25	52/626 (8,3 %)	20	42/626 (6,7 %)	18	139/626 (22,2 %)	63

1 število pozitivnih ptic / število vzorčenih ptic

2 število različnih tipov AdV

Tabela 10: Seznam ljubiteljskih ptic, ptic živalskih vrtov in pticah živalskih vrtov ter sokolov v ujetništvu, pri katerih smo dokazali odsek gena za adenovirusno polimerazo.

Slovensko ime	Rod <i>Aviadenovirus</i>		Rod <i>Siadenovirus</i>		Rod <i>Atadenovirus</i>		Družina <i>Adenoviridae</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
skobčevka	0/112	0	10/112 (8,9 %)	2	0/112	0	10/112 (8,9 %)	2
nimfa	1/46 (2,2 %)	1	12/46 (26,1 %)	2	1/46 (2,2 %)	1	14/46 (30,4 %)	4
kakadu	0/14	0	4/14 (28,6 %)	1	1/14 (7,1 %)	1	5/14 (35,7 %)	2
rozela	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1
penant	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
kozica	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
neofema	0/3	0	1/3 (33,3 %)	1	0/3	0	1/3 (33,3 %)	1
kraljeva papiga	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1
rdečekрила papiga	0/1	0	1/1 (100,0 %)	1	0/1	0	1/1 (100,0 %)	1
baraband	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0
plemenita papiga	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
mavrični lori	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
veliki aleksander	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1	0/2	0	1/2 (50,0 %)	1
mali aleksander	0/13	0	1/13 (7,7 %)	1	1/13 (7,7 %)	1	2/13 (15,4 %)	2
agapornis	0/18	0	0/18	0	0/18	0	0/18	0
senegalska papiga	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
siva papiga	1/16 (6,3 %)	1	0/16	0	0/16	0	1/16 (6,3 %)	1
ara	0/13	0	0/13	0	0/13	0	0/13	0
amazonka	0/11	0	2/11 (18,2 %)	1	0/11	0	2/11 (18,2 %)	1
pionites	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	0
aratinga	0/4	0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
patagonska papiga	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
kanarček	0/10	0	0/10	0	3/10 (30,0 %)	2	3/10 (30,0 %)	2
zebrica	0/3	0	2/3 (66,6 %)	1	0/3	0	2/3 (66,6 %)	1
riževec	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
indijski kos	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0
orjaški tukan	0/1	0	0/1	0	0/1	0	0/1	0
sokol	13/37 (35,1 %)	3	12/37 (32,4 %)	4	0/37	0	25/37 (67,5 %)	7
rožnati pelikan	0/9	0	0/9	0	0/9	0	0/9	0
Σ	15/338 (4,4 %)	5	48/338 (14,2 %)	7	6/338 (1,8 %)	4	69/338 (20,4 %)	16

1 število pozitivnih ptic / število vzorčenih ptic

2 število različnih tipov AdV

Tabela 11: Seznam dvoriščne perutnine, pri katerih smo dokazali odsek gena za adenovirusno polimerazo.

Slovensko ime	Rod <i>Aviadenovirus</i>		Rod <i>Siadenovirus</i>		Rod <i>Atadenovirus</i>		Družina <i>Adenoviridae</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
kokoš	7/91 (7,7 %)	7	1/91 (1,1 %)	1	0/91	0	8/91 (8,8 %)	8
puran	0/15	0	8/15 (53,3 %)	1	0/15	0	8/15 (53,3 %)	1
pavji puran	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
pegatka	0/18	0	0/18	0	0/18	0	0/18	0
pav	0/7	0	1/7 (14,3 %)	1	0/7	0	1/7 (14,3 %)	1
fazan	5/103 (4,9 %)	3	0/103	0	0/103	0	5/103 (4,9 %)	3
japonska prepelica	1/11 (9,1 %)	1	2/11 (18,2 %)	1	0/11	0	3/11 (27,3 %)	2
kitajska prepelica	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
domača raca	0/24	0	0/24	0	0/24	0	0/24	0
mandarinka	0/4	0	0/4	0	0/4	0	0/4	0
moškatna bleščavka	0/18	0	0/18	0	0/18	0	0/18	0
gos	0/16	0	0/16	0	0/16	0	0/16	0
Σ	13/317 (4,1 %)	11	12/317 (3,8 %)	2	0/317 (0 %)	0	25/317 (7,9 %)	13

1 število pozitivnih ptic / število vzorčenih ptic

2 število različnih tipov AdV

Tabela 12: Seznam ptic, pri katerih smo ugotovili adenoviruse s pomnoževanjem odseka gena za hekson.

Slovensko ime	Št. pozitivnih vzorcev z vgnedritveno PCR (polimeraza)		Št. pozitivnih vzorcev s PCR (hekson)/uporabne sekvence*
	št. sekvenc	št. tipov	
labod grbec	3	2	0 / 0
mlakarica	4	3	0 / 0
domači golob	1	1	0 / 0
bela štoklja	1	1	0 / 0
sršenar	1	1	0 / 0
kanja	1	1	0 / 0
postovka	2	1	0 / 0
vodomec	2	1	0 / 0
vijglavka	3	1	0 / 0
kmečka lastovka	3	2	0 / 0
drevesna cipa	1	1	0 / 0
siva pevka	4	4	0 / 0
taščica	5	1	0 / 0
kos	2	2	0 / 0
vinski drozg	1	1	0 / 0
srpična trstnica	2	2	0 / 0
rumeni vrtnik	3	3	1 / 1
črnoglavka	1	1	0 / 0
rjava penica	1	1	0 / 0
poljski vrabec	1	1	0 / 0
zelenec	1	1	0 / 0
lišček	1	1	0 / 0
trstni strnad	1	1	0 / 0
kokoš	7	7	5 / 3
fazan	5	3	1 / 1
japonska prepelica	1	1	1 / 0
nimfa	1	1	0 / 0
siva papiga	1	1	0 / 0
sokol	13	3	3 / 1
Σ	73	39	11 / 6

*nekatero sekvence so bile del adenovirusnega genoma za hekson, a kljub ponovitvam nismo uspeli pridobiti primerno dolge sekvence, ki bi jo lahko uporabili v filogenetskih analizah.

4.2.2 Določanje nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

4.2.2.1 Določanje aminokislinskih zaporedij odsekov gena za adenovirusno polimerazo

Z določanjem aminokislinskih zaporedij odseka gena za adenovirusno polimerazo smo želeli ugotoviti filogenetske odnose med slovenskimi izolati in različnimi tipi adenovirusov iz podatkovne zbirke GenBank. Za vsako filogenetsko drevo smo najprej naredili aminokislinsko poravnavo.

Aminokislinsko zaporedje za filogenetsko drevo adenovirusov različnih vrst prostoživečih ptic, ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva smo določili pri 92 različnih tipih adenovirusov. Aminokislinsko zaporedje za filogenetsko drevo adenovirusov dvoriščne perutnine, perutnine intenzivne reje in vodne perutnine smo določili pri 50 različnih tipov adenovirusov. Za vsak končni produkt vgnezditive PCR smo imeli po dva kromatografska zapisa. Prvi je predstavljal nukleotidno zaporedje, ki smo ga pridobili z začetnim oligonukleotidom polFinner, drugi pa zapis, ki smo ga pridobili z začetnim oligonukleotidom polRinner. Na podlagi primerjave obeh zapisov smo določili 272 nukleotidov dolga zaporedja, ki smo jih pretvorili v aminokislinska zaporedja in jih shranili v lastno podatkovno zbirko (Sliki 14 in 15). Pri nekaterih nukleotidnih zaporedjih smo dobili več prekrivajočih se nukleotidnih zaporedij. Na mestih z dvojno prekrivajočimi se vrhovi smo se pri določitvi nukleotidnega zaporedja odločili za »višji« vrh. Po poravnavi zaporedij smo ugotovili ohranjene odseke v genu za polimerazo vseh adenovirusov.

92 91
human-2 **SAL**THMPWGPPLNPFYERAAARAWQALDLQGGCKIDYFDARLLPGVFTVDAD**F**DETQLD**L**PFCSRRGGRLCWTNERLRGEVATSVLD
murine-1 **SAL**THMPSGWPLEPKARAEALADWTKHLSN-SAPI**SY**NTCLLHGIVLIDAD**P**CETQLD**V**PFCSRRGGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
bovine-4 **SAL**THMPYGRTLNPFANSTIDWQNMLDS-SEVL**SY**DDPRIKAMIVVADCE**P**FLLEYLD**V**PFCSRRGGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
chameleon **SAL**THMPSGTTEPPTDAALSIAFYQDLDDK-PDQI**SY**F-SQVQPMIVLADCY**P**ALARLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEVLTAELTAVTDL
snake-1 **SAL**SHMPYGPPLSPFDSAVAIAEAFQKRLDG-QSEL**SY**DDPIFFMIVVADAF**P**SLHCLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
duck-1 **SAL**THMPFGRTEDPLTASISIKTFQDKLDS-PAKL**SY**GESIKPMIVYADCY**P**PLEHVD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
RM37rAnaplat **SAL**THMPFGRTEDPLTASISIKTFQDKLDS-PAKL**SY**GESIKPMIVYADCY**P**PLEHVD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M15robin **SAL**THLPLFGRTEDPLTASIQHFQSLLDK-KDTI**SY**DDPSIKPMIVYADCN**P**ALENLD**T**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M77embsch **SAL**THMPYGRTEPLTASISIQHFQSLLDK-KATI**SY**DDPSIKPMIVYADCN**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M25Acscir **SAL**THMPFGRTEDPLTASASVQYFQSLDLS-KETI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LELLD**T**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AP111Aacsc **SAL**THMPSGKLCNRLQSAFYINKLQKLNK-SEKI**SY**DDPEIKPMIVYADCY**P**PLEQLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M68aegcau **?????????????????**IESAIYMKRLQSKLNS-NSQI**SY**DDQISPMIVYADCF**P**PLEQLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M38physib **?????????????**GKLCNKLRSAYMEKQLQKLNK-NEKV**SY**DDPEIKPIIAYADCY**P**PLEKLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M4761prum **SAL**THMPAGKLCNRLQSAFYINKLQKLDL-NTKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LELLD**T**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AL87 nimfas **SAL**THMPYGRTEPLTASISIKTFQDKLDS-QGTI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LELLD**T**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AP117Asybo **SAL**THMPCGKLCNRLKSAAYMSRFQKQLR-NTKL**SY**DDPIMP IAYADCY**P**PLEKLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M63gardens **SAL**THMPCGKLCNRLKSAAYMSRFQKQLR-NTKL**SY**DDPIMP IAYADCY**P**PLEKLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M185yboris **SAL**THMPCGKLCNRLKSAAYMTRFQKQLR-NTKL**SY**DDPIMP IAYADCY**P**PLEKLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M645yboris **SAL**THMPCGKLCNRLKSAAYMTRFQKQLR-NTKL**SY**DDPIMP IAYADCY**P**PLEKLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4M79FRICOE **?????????????**PLCNKLKAAAYHMETFQKLNK-KHKI**SY**DDPIMP IAYADCY**P**PLEQLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
121KCanar **SAL**THMPAGKLCNRLQSAFYINKLQKLNK-KTHI**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
85canary **SAL**THMPAGKLCNRLQSAFYINKLQKLDL-PCPI**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M8robin **SAL**THLPLSGKLCNRLQSAFYINKLQKLDL-SESI**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M25pasmon **?????????????**PLCNRLQSAFYINKLQKLDL-SESI**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M231Hirrus **SAL**THMPFGRTEDPLTASISIQHFQSLDLS-KDTI**SY**DDPSIKPMIVYADCN**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Blackb6M57 **SAL**THLPHGLPQDPLTSSLAISIKLNQMLDS-NDKI**SY**DDPSIKPMIVYADCN**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4M64hipict **?????????????**LGASVALQKFDALDR-PGLI**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
22Mpkrame **SAL**THLPLVGRADNTIAGLAIITFQQLNS-PSKI**SY**DDLVKPMIVYADCP**P**LEQLD**T**PFCSRRGGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
frog-1 **SAL**THMPFGVPLSQEKQEIHLQSKLNK-EKTL**SY**DDPKIAIYADCY**P**PIENLD**V**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
travancore **SAL**THMPFGIPISKKEKEQAIELLQSKLEN-KKTI**SY**DDPEIKPMIISISAL**P**PVEFLT**N**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A74Kfepige **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLNK-RKPI**SY**EENIKPMIVSINAF**P**PLEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M38hipict **?????????????**IPVGYDERAEINKLQKLES-CEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4M25tuphul **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
PM72yelgul **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
PaittAdv2 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AM30 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A112kzebfis **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M22Acscir **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AP110Aacsc **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
87AMcardue **?????????????????**RDTAITFQQLNS-TNMI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
M210Acarud **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M2atr1mtb **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M77readw **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4gar4M77 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M78parmaj **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
2great12 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
L29budger **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M2stucnus **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A119Cocorn **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
M241Hirrus **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
LA5Cygolor **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
MED31 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
P014_MED29 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
MED26 **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
FM46Fatinn **SAL**THLPLFGIPVQTEKTAIEINKLQKLEQ-KEKI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A44KJaquas **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A3MKHirrus **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
raptor-1 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M24Cuzmer **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M58Cuzmer **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M9robin **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Reedw5M69 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Meyer parr **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
AL32Pseric **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
307ACynolo **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A132KPasmo **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4M7Prumodu **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
116carduel **?????????????**GMLPDPYHVTAAYVDLNLQILAT-ETNI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M36eylcom **?????????????**MPLNPFYFTSEFVKNLNSILAB-EHDI**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
3M59prumod **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
6M5Anthust **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
A53KPIgeon **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
PM56Butcbu **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
M237Hirrus **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
M230Hirrus **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
M27kingfis **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
MED30P07 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
PO 5 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
RM8Anaplat **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
RM17Anaplat **SAL**THLPHGPPLDPKFTAHVDELNRLDLS-PTPL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
RM3Anaplas **SAL**THLPHGPPLDPKFTAHVDELNRLDLS-PTPL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
fowl-1 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
fowl-5 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Fadv_4 AVI **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Fadv_9AVI **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
Fadv_8aAVI **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M31jyntor **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
5M35hipict **?????????**MPHGMPLEPKFTAQHVDELNRLDLS-PTPL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
MED36 **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
PM38Fatinn **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
4M49embsch **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
whsturgeon **SAL**THMPYGPVGMTEERNKNTIIPNKLSS-KEKL**SY**DDPKIKPMIVYADCP**P**LEQLD**L**PFCSRRSGRLCWTNEPLRGEITTTIDV

Slika 14: Poravnava aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo. Nukleotidna zaporedja smo pridobili z metodo vgnezditvene PCR (38). Aminokislinska zaporedja smo uporabili za izdelavo filogenetskega drevesa, predstavljenega na sliki 16. Poravnava je urejena v formatu PHYLIP. Homologe do 91 aminokislinskih dolge sekvence odgovarjajo komplementu baz 6458 do 6732 humanega adenovirusa 1 (HAdV-1) (GenBank accession number AF534906). Pri nepopolnih aminokislinskih zaporedjih so neznan odsek nadomeščen z vprašaji, vodoravna črta ločuje rodove, črtice pa nadomeščajo deležije aminokislinskih zaporedij. Po poravnavi zaporedij smo ugotovili ohranjene odseke v genu za polimerazo adenovirusov, ki so zeleno obarvani.

50	91
human-2	SALTHMPWGPPLNPFYERALAARAWQALDLQGGCKIDYFDARLLPGVFTVDADPPDETQLDLPPEFCSRKGGRLCWTNERLRGEVATSVDL
murine-1	SALTHMPGSGWPLEFKARAEALADWTKHLSN-SAPISYFNTCLLHGIVLIDADPPCETQLDVLPEFCSRKGGRLCWTNEPLRGEITTTIDV
bovine-4	SALTHMPYGRITLNPFEANTSIDEMQNMLDS-SEVLSYFDPRIKAMIVVADCEPPTLEYLDVLPPLCSKSGKGLCWTNEPLINETVTSIDL
RM37rAnapl	SALTHMPFGRTEDEPLTASISIKTFQDKLDS-PAKLSYFGESIKPMIVVADCYPPLEHVLDVLPPLCSRKSGLCWTNEPLLGEVVTIDL
duck-1	SALTHMPFGRTEDEPLTASISIKTFQDKLDS-PAKLSYFGESIKPMIVVADCYPPLEHVLDVLPPLCSRKSGLCWTNEPLLGEVVTIDL
snake-1	SALSHMPYGPPLSFFDSAVAIAEFQRKLDG-QSELSYFDDPIFPMIVVADAFPPSLHCLDVLPLPLCSRKSGLCWTNEPLLGEVVTIDV
chameleon	SALSHMPSGTTESEPTDAALSIAFYQDQLLDK-PDQISYF-SQVKPMIVLADCYPPALARLDVLPPLCSRRSGKGLCWTNEVLTAELTTVDL
travancore	SALTHMPFGIPISSKKEQAIELLQSKLEN-KKTSYFDHEIKPMIISISALPPVEFLTNIPLPLCSRKSGLCWTNEPLYDEVTVIDV
A44KJapqua	SALTHMPYGHPIGKTERDNEINLLNEKLENRTSKLSYF-TDIKPMIVNVNAIPPEKLDLPLPLCSRKSGLCWTNEILQNEIITSIDI
ÉszakiP015	SALTHMPYGHPIGKTERDNEINLLNEKLENRTSKLSYF-TDIKPMIVNVNAIPPEKLDLPLPLCSRKSGLCWTNEILQNEIITSIDI
ALj25Japqu	SALTHMPYGHPIGKTERDNEINLLNEKLENRTSKLSYF-TDIKPMIVNVNAIPPEKLDLPLPLCSRKSGLCWTNEILQNEIITSIDI
ALj20Dohen	SALTHMPYGFPIGEKERNNEITKLNEKLLKTKTKLSYF-TDIKPMIVMIDAIPPPPEHLDPPLPLCSRQSGKGLCWTNEI????????
217Vtur-3	SALTHMPYGFPIGEKERNNEITKLNEKLLKTKTKLSYF-TDIKPMIVMIDAIPPPPEHLDPPLPLCSRQSGKGLCWTNEILKNEIVTSIDI
A112KTurke	SALTHMPYGFPIGEKERNNEITKLNEKLLKTKTKLSYF-TDIKPMIVMIDAIPPPPEHLDPPLPLCSRQSGKGLCWTNEILKNEIVTSIDI
AML34peaco	SALTHMPYGFPIGEKERNNEITKLNEKLLKTKTKLSYF-TDIKPMIVMIDAIPPPPEHLDPPLPLCSRQSGKGLC????????????
PsittAdv2	SALTHLPLFGIPVGGKTEKEQEIEKFRLLDT-KEKISYF-ENIKPMIININAFPPPEKLDLPLPLCSRKSGLCWTNEPLKDEIVTSIDA
2greatith	SALTHPLPYGTPVGGKEERDHEIKKFNQLLS-KDEISYF-ADIKPMIVCINAFPPPELDPPLPLCSKASGLCWTNEPLHKEIVTSIDI
frog-1	SALTHMPFVPLSQKEKNQEIHLQSKLQN-EKTLNFDPEIKPMIISISAFPPVEYLTNIPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
raptor-1	SALTHMPYGIPIVGEKERLEEKFTNLLSR-RDPISYFNQGIKPMIVTVNAFPPPELDPPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
R128KCyolo	SALTHLPHGSPDPKSTAIHVDILNSILQG-QETISYFDSRIKPSILKVEAHPPELDPPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
goose	SALTHLPHGSPDPKSTAIHVDILNSILQG-QETISYFDSRIKPSILKVEAHPPELDPPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
Meyer parr	SALTHMPHGIPLDPHHTVTHVLLNIILASGERPISYFDRIKPAIKLTDADFPPPEMLDVLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
KpB2KDohen	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
AFV31Kphea	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
AFB52Kphea	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
384J	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
KpB5KDohen	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
MarkoZIBH	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
760Adomhen	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
turkey-1	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
fowl-1	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
RM8Anaplat	SALTHMPHGIPLDPRFTAHAHVEELNRLSD-PTPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
ALj28Japqu	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
AB73Kpheas	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_2 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_3 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_4 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
KpB1KDohen	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
ALj16Domhe	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_5 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_6 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_7 AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_8aAVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_8bAVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_9AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_10AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
FadV_11AVI	SALTHMPHGMPDPKFTAHAHVEELNALMKS-ERPLSYFDPRIKPSILKIEAYPPPEQLDPLPLPLCSRRGRLVWNEALYDEVTVIDV
RML7Anapla	SALTHLPHGPPDPKFTAHAHVEELNINFILLT-TRHISYFDSRIKPSILKVEAHPPELDPPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
RM3Anaspla	SALTHLPHGPPDPKFTAHAHVEELNINFILLT-TRHISYFDSRIKPSILKVEAHPPELDPPLPLCSRKSGLCWTNEALYDEVTVIDV
whsturgeon	SALTHMPYGYPLEPLEASIHITLQFQLLDR-PEDISYFNDTVKPMILSIDAHPPELDPPLPLCSRQSGKGLCWTNEALYDEVTVIDV

Slika 15: Poravnava aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo. Nukleotidna zaporedja smo pridobili z metodo vgnezditevne PCR (38). Aminokislinska zaporedja smo uporabili za izdelavo filogenetskega drevesa, predstavljenega na sliki 17. Poravnava je urejena v formatu PHYLIP. Homologe do 91 aminokislinske dolge sekvence odgovarjajo komplementu baz 6458 do 6732 humanega adenovirusa 1 (HAdV-1) (GenBank accession number AF534906). Pri nepopolnih aminokislinskih zaporedjih so neznani odseki nadomeščeni z vprašaji, vodoravna črta ločuje rodove, črtice pa nadomeščajo deležije aminokislinske v odseku. Po poravnavi zaporedij smo ugotovili ohranjene odseke v genu za polimerazo adenovirusov, ki so zeleno obarvani.

4.2.3 Filogenetska analiza odsekov gena za polimerazo adenovirusov, ki so bili ugotovljeni v kloakalnih brisih različnih vrst prostoživečih ptic, ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva

Filogenetsko drevo na sliki 16 je narejeno na podlagi 91 poravnanih aminokislinskih zaporedij, ki so vključevala tudi 74 zaporedij adenovirusov ugotovljenih v naši raziskavi, le-ta pa predstavljajo prav toliko različnih tipov adenovirusov. V 74 tipov je vključen 201 sev, kolikor je bilo pozitivnih vzorcev iz kloakalnih brisov različnih vrst prostoživečih ptic, ljubiteljskih ptic, ptic iz živalskih vrtov in sokolov iz ujetništva. Genom adenovirusov smo ugotovili pri 49 vrstah ptic, ki jih uvrščamo v 10 redov. Šestindvajset vrst ptic (kos, rumeni vrtnik, črnoglavka, trstni strnad, srpična trstnica, močvirska trstnica, kmečka lastovka, poljski vrabec, taščica, dolgorepka, siva pevka, kanarček, vrtna penica, ščinkavec, grmovščica, lišček, drevesna cipa, cikovt, velika sinica, plavček, zebriča, vrana, rakar, vinski drozg, rjava penica in zelenec) je iz reda pevcev, ena iz reda plezalcev (vijeglavka), ena iz reda golobov (domači golob), dvanajst iz reda papig (siva papiga, skobčevka, nimfa, aleksander, veliki aleksander, rdečekрила papiga, neofema, rozela, amazonka, roza kakadu, beli kakadu, kraljeva papiga), ena iz reda vpijatov (vodomec), ena iz reda pobležnikov (rumenonogi galeb), ena iz reda močvirnikov (bela štoklja), dve iz reda plojkokljunov (mlakarica, labod grbec), ena iz reda kur (japonska prepelica) in tri iz reda ujed (sokol, navadna postovka, kanja). Populacija adenovirusov pri pticah v Sloveniji je zelo heterogena. Aminokislinska zaporedja oblikujejo tri večje monofiletske skupine - rodove *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* in *Siadenovirus* (Slika 16).

V rod *Atadenovirus* je uvrščenih 48 sevov adenovirusov, ki so uvrščeni v 22 različnih tipov. Ugotovljeni so bili pri štirih različnih redovih ptic (pevci, plezalci, papige in plojkokljuni) in dvajsetih različnih vrstah ptic (kos, rumeni vrtnik, črnoglavka, srpična trstnica, močvirska trstnica, siva pevka, vrtna penica, trstni strnad, poljski vrabec, taščica, grmovščica, ščinkavec, kanarček, dolgorepka, kmečka lastovka, vijeglavka, nimfa, kakadu, aleksander, mlakarica). Znotraj rodu oblikujejo pet linij. Tri izmed njih so tipi adenovirusov, ki smo jih dokazali pri nimfi in kakaduju, aleksandru in dveh kosih. Dve liniji sta večji monofiletski skupini.

Prva monofiletska skupina je zelo heterogena. Tipe adenovirusov, ki jo sestavljajo, smo dokazali v redu pevka, plezalcev in plojkokljunov. Rumeni vrtnik je v skupini najbolj

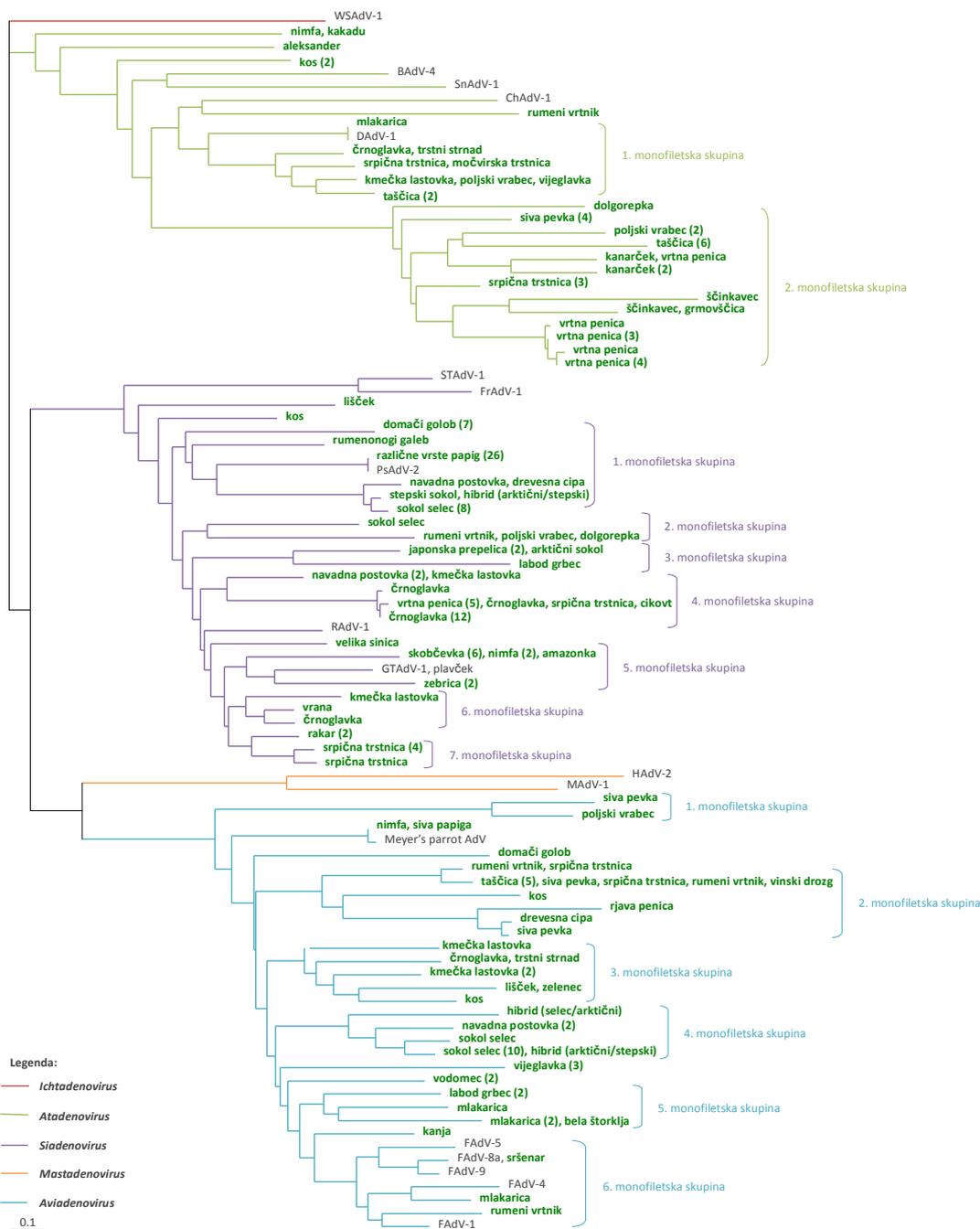
filogenetsko oddaljen tip in ima skupnega prednika z ChAdV-1. Svojo linijo v tej monofiletski skupini oblikuje tudi adenovirus, ki smo ga dokazali pri mlakarici in ima enako aminokislinsko zaporedje kot DAdV-1. Preostali adenovirusi, ugotovljeni pri črnoglavki, trstnem strnadu, srpični trstnici, močvirski trstnici, kmečki lastovki, poljskem vrabcu, taščici in vijeglavki, oblikujejo svoj klad.

Drugo monofiletsko skupino sestavljajo adenovirusi, ki smo jih dokazali izključno v redu pevk. Adenovirusi dokazani pri dolgorepki, sivih pevkah in srpičnih trstnicah, so samostojne linije. Pri poljskem vrabcu in taščici, kanarčku in vrtni penici ter ščinkavcu in grmovščici smo ugotovili adenoviruse, ki imajo najbližje skupne prednike v tej skupini. Klad devetih adenovirusov, dokazanih pri vrtnih penicah, oblikuje štiri tipe, ki so filogenetsko zelo sorodni.

V rod *Siadenovirus* je uvrščenih 96 sevov adenovirusov, ki so uvrščeni v 26 različnih tipov. Ugotovljeni so bili pri sedmih različnih redovih ptic (pevci, papige, golobi, ujede, pobrežniki, kure in plojkokljuni) in triintridesetih različnih vrstah ptic (lišček, kos, cikovt, drevesna cipa, rumeni vrtnik, poljski vrabec, kmečka lastovka, črnoglavka, vrtna penica, rakar, srpična trstnica, velika sinica, plavček, dolgorepka, zebrica, siva vrana, skobčevka, nimfa, roza kakadu, beli kakadu, rozela, neofema, kraljeva papiga, veliki aleksander, aleksander, rdečekрила papiga, amazonka, domači golob, sokol selec, postovka, japonska prepelica, labod grbec in rumenonogi galeb). Znotraj rodu lahko tipe adenovirusov razvrstimo v tri posamezne linije in sedem monofiletskih skupin. Posamezne linije v rodu *Siadenovirus* oblikujejo adenovirusi, ki smo jih ugotovili pri liščku, kosu in veliki sinici. Prvo monofiletsko skupino v rodu oblikuje šest tipov adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri domačih golobih, rumenonogem galebu, papigah, navadni postovki, drevesni cipi in sokolu selcu. Drugo monofiletsko skupino oblikujeta dva tipa adenovirusa, ki smo ju ugotovili pri sokolu selcu, rumenem vrtniku in dolgorepki. Tretjo monofiletsko skupino oblikujeta dva tipa adenovirusa, ki smo ju ugotovili pri japonski prepelici, sokolu selcu in labodu grbcu. Četrto monofiletsko skupino oblikujejo trije tipi adenovirusov. Ugotovili smo jih pri navadnih postovkah, kmečki lastovki, črnoglavkah, vrtnih penicah, srpični trstnici in cikovtu. Peto monofiletsko skupino oblikujejo trije tipi adenovirusov. Ugotovili smo jih pri skobčevkah, nimfah, amazonki, plavčku in zebricah. Šesto monofiletsko skupino oblikujejo trije tipi adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri kmečki lastovki, sivi vrani in črnoglavki. Sedmo monofiletsko skupino

oblikujejo trije tipi adenovirusov. Ugotovili smo jih pri rakarju in dva tipa pri srpičnih trstnicah. Slednja sta si filogenetsko zelo sorodna.

V rod *Aviadenovirus* je uvrščenih 57 sevov adenovirusov, ki so uvrščeni v 27 različnih tipov. Ugotovljeni so bili pri osmih različnih redovih ptic (pevci, papige, golobi, ujede, močvirniki, vpijati, plezalci in plojkokljuni) in trintridesetih različnih vrstah ptic (siva pevka, rjava penica, črnoglavka, rumeni vrtnik, srpična trstnica, taščica, poljski vrabec, lišček, zelenec, trstni strnad, drevesna cipa, vinski drozg, kos, kmečka lastovka, nimfa, siva papiga, domači golob, postovka, sokol selec, kanja, vodomec, vijeglavka, bela štorclja, labod grbec in mlakarica). Znotraj rodu lahko tipe adenovirusov razvrstimo v pet posameznih linij in šest monofiletskih skupin. Posamezne linije oblikujejo adenovirusi, ki smo jih ugotovili pri nimfi in sivi papigi, domačem golobu, vijeglavki, vodomcu ter kanji. Prvo monofiletsko skupino v rodu oblikujeta dva tipa adenovirusov, ki smo ju ugotovili pri sivi pevki in poljskem vrabcu. Drugo monofiletsko skupino oblikujejo tri linije. Prvo linijo sestavljata dva tipa adenovirusov, ki smo ju ugotovili pri rumenih vrtnikih, srpičnih trstnicah, taščicah, sivi pevki in vinskem drozgu. Drugo linijo oblikuje le en tip, ugotovljen pri kosu, tretjo linijo pa adenovirusi, ki smo jih ugotovili pri rjavi penici, sivi pevki in drevesni cipi. Tretjo monofiletsko skupino oblikuje pet tipov adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri kmečkih lastovkah, črnoglavki, trstnem strnadu, liščku, zelencu in kosu. Četrto monofiletsko skupino oblikujejo štirje tipi adenovirusov, vse pa smo ugotovili pri ujedah – sokolih selcih in postovki. Peto monofiletsko skupino oblikujejo trije tipi adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri labodih grbcih, mlakaricah in beli štorclji. Šesto monofiletsko skupino oblikujeta dva tipa adenovirusov. Tip, ugotovljen pri mlakarici, ima najbližjega skupnega prednika s FAdV-4, adenovirus, ki smo ga ugotovili pri rumenem vrtniku, pa je najbolj soroden FAdV-1.



* različne vrste papig: nimfa (10), skobčevka (4), rozela, kraljeva papiga, rdečekrla papiga, neofema, veliki aleksander, aleksander, beli kakadu, roza kakadu, kakadu (2), amazonka (2).

Slika 16: Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo adenovirusov pri prostoživečih pticah, ljubiteljskih pticah, pticah iz živalskih vrtov in živalskim vrtom podobnih prostorov ter sokolih iz ujetništva. Nekoreninjeno filogenetsko drevo WSAdV-1 je izbrana zunanja skupina. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evolucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence, število v oklepaju je število identičnih sekvenc pri imenovani vrsti ptice.

4.2.4 Filogenetska analiza odsekov gena za polimerazo adenovirusov, ki so bili ugotovljeni v kloakalnih brisih različnih vrst dvoriščne perutnine, perutnine intenzivne reje in nekaterih vrst prostoživečih ptic iz reda plojkokljunov in pobrežnikov

Filogenetsko drevo na sliki 17 je narejeno na podlagi 50 poravnanih aminokislinskih zaporedij, ki so vključevala tudi 22 zaporedij adenovirusov, ugotovljenih v naši raziskavi. Dvaindvajset sevov predstavlja prav toliko različnih tipov adenovirusov, ki zajemajo 33 sekvenc delnega odseka za polimerazo, ki smo jih ugotovili v naši raziskavi v kloakalnih brisih različnih vrst dvoriščne perutnine, perutnine intenzivne reje in vodne perutnine.

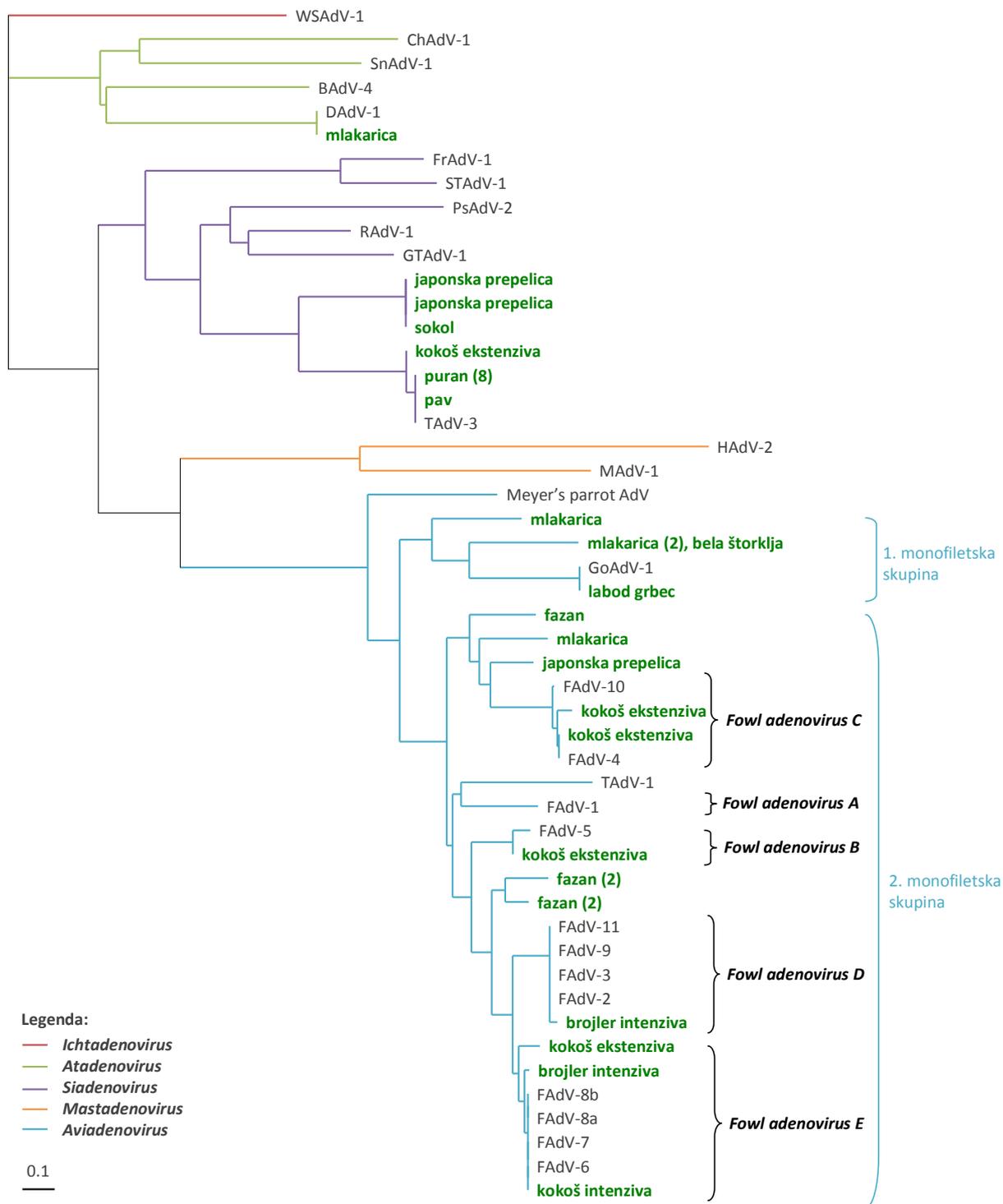
Prisotnost genoma adenovirusov je bila ugotovljena pri 8 vrstah ptic, uvrščenih v 3 redove. Pet vrst ptic (domača kokoš, puran, pav, fazan in japonska prepelica) je iz redu kur, dve (mlakarica in labod grbec) iz redu plojkokljunov in ena iz redu močvirnikov (bela štorclja). Vsa preiskana aminokislinska zaporedja oblikujejo tri večje monofiletske skupine – rodove *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* in *Siadenovirus*.

V rod *Atadenovirus* je uvrščen en sev adenovirusa. Ugotovili smo ga pri mlakarici in ima enako aminokislinsko zaporedje kot DAdV-1.

V rod *Siadenovirus* je uvrščenih 12 sevov, ki so uvrščeni v 3 različne tipe. Ugotovljeni so bili v redu kur pri štirih različnih vrstah (japonska prepelica, domača kokoš, puran in pav). Znotraj rodu oblikujejo monofiletsko skupino. Adenovirusi, ugotovljeni pri pavu in puranih, imajo enako aminokislinsko zaporedje kot TAdV-3. Njim zelo soroden je adenovirus, ki smo ga ugotovili pri kokoših v ekstenzivni reji. Adenovirus, ki smo ga ugotovili pri japonski prepelicih, je posebna linija v tem kladu.

V rod *Aviadenovirus* je uvrščenih 19 sevov, ki so uvrščeni v 15 različnih tipov. Ugotovljeni so bili pri treh različnih redovih ptic (kure, plojkokljuni in močvirniki) in šestih različnih vrstah ptic (domača kokoš, fazan, japonska prepelica, mlakarica, labod grbec, bela štorclja). Znotraj rodu lahko tipe adenovirusov razvrstimo v dve monofiletski skupini. Prvo monofiletsko skupino oblikujejo trije tipi adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri mlakaricah, beli štorclji in labodu grbcu. Adenovirus, ugotovljen pri labodu grbcu, ima enako aminokislinsko zaporedje kot GoAdV-1. Drugo monofiletsko skupino oblikujeta dva klada.

V prvem kladu je 6 tipov adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri fazanu, mlakarici, japonski prepelici in domači kokoši. Oba virusa, ki smo ju ugotovili pri domači kokoši sta si zelo sorodna in spadata v skupino *FAdV-C*. Eden izmed njiju ima aminokislinsko zaporedje, enako kot FAdV-4. V drugem kladu je 7 tipov adenovirusov, ki smo jih ugotovili pri domačih kokoših in fazanih. Adenovirus, ki smo ga ugotovili pri kokoši ekstenzivne reje in je soroden FAdV-5, spada v skupino *FAdV-B*. Adenovirus, ki smo ga ugotovili pri piščancu brojlerju in je soroden FAdV-2, spada v skupino *FAdV-D*. Adenovirus, ki smo ga ugotovili pri kokoši v intenzivni reji in je soroden FAdV-6, spada v skupino *FAdV-E*. Adenovirusa, ki smo ju ugotovili pri kokoši v ekstenzivni reji in pri piščancu brojlerju, imata najbližjega skupnega predhodnika z adenovirusi skupine *FAdV-E*. Dva tipa adenovirusa, ki smo ju odkrili pri fazanih, sta si filogenetsko zelo sorodna. Oblikujeta svoj klad, uvrščen med skupini *FAdV-B* in *FAdV-D*.



Slika 17: **Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo virusov, ki so bila ugotovljena pri dvoriščni perutnini, perutnini intenzivne reje in nekaterih prostoživečih pticah iz reda plojkokljunov in pobrežnikov.** Nekoreninjeno filogenetsko drevo WSAdV-1 je izbrana zunanja skupina. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evolucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence, število v oklepaju je število identičnih sekvenc pri imenovani vrsti ptice.

4.2.5 Filogenetska analiza odseka za hekson aviadenovirusov

Filogenetsko drevo na sliki 18 je narejeno na podlagi 24 poravnanih nukleotidnih zaporedij, ki so vključevala tudi 6 delnih odsekov adenovirusnega heksona, ki smo jih ugotovili v naši raziskavi. Šest sevov predstavlja prav toliko različnih tipov adenovirusov.

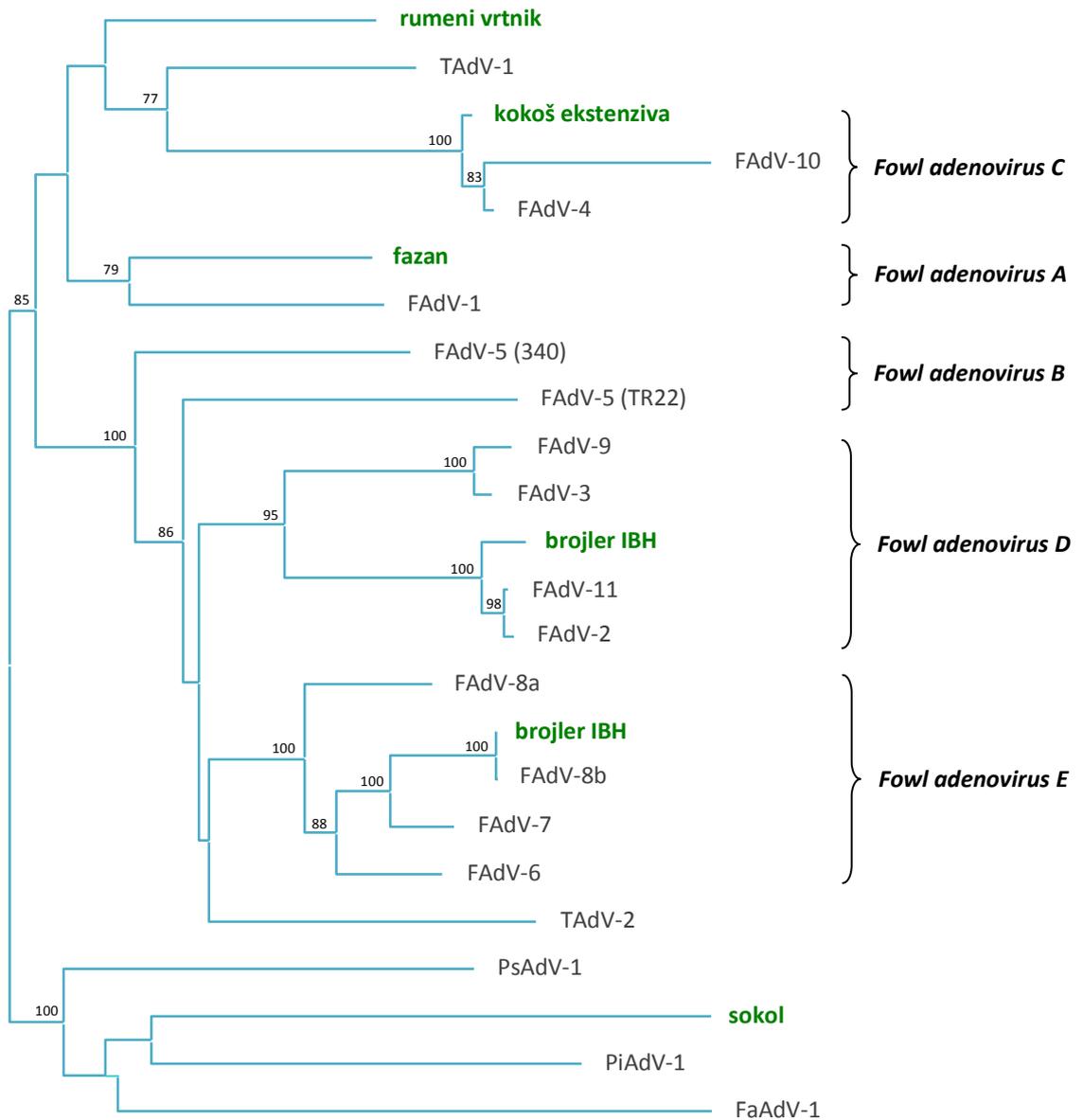
Prisotnost gena za hekson adenovirusov je bila ugotovljena pri 4 vrstah ptic, uvrščenih v 3 redove. Dve vrsti ptic (domača kokoš in fazan) sta iz redu kur, ena (rumeni vrtnik) iz redu pevcev in ena iz redu ujed (sokol selec). Vsa preiskana zaporedja so uvrščena v rod *Aviadenovirus*.

Tri sekvence adenovirusnega heksona, ki smo jih uspeli pridobiti iz kloakalnih brisov domačih kokoši, so podobno uvrščene kot na filogenetskem drevesu na sliki 17. Zaporedje heksona adenovirusa, dokazanega pri kokoši iz ekstenzivne reje, se z visoko statistično podporo (100) združuje s FAdV-4 in FAdV-10 v skupino *FAdV-C*. Z enako visoko statistično podporo se zaporedje adenovirusa piščanca brojlerja združuje z FAdV-2 in FAdV-11 v klad znotraj skupine *FAdV-D*. Nukleotidno zaporedje virusa piščanca brojlerja iz skupine *FAdV-E* je enako zaporedju FAdV-8b in je prav tako podprto s statistično podporo 100.

Sekvenca, pridobljena iz kloakalnega brisa fazana, si s statistično podporo 79 deli najbližjega skupnega prednika s tipom FAdV-1.

Sekvenca, pridobljena iz kloakalnega brisa sokola si deli najbližjega skupnega prednika s tipom PiAdV-1, a je statistična podpora nizka (pod 75).

Sekvenca, pridobljena iz kloakalnega brisa rumenega vrtnika si deli najbližjega skupnega prednika z TAdV-1, vendar prav tako z nizko statistično podporo (pod 75).



Legenda:

— *Aviadenovirus*

0.1

Slika 18: Filogram nukleotidnih zaporedij odseka za hekson aviadenovirusov. Nekoreninjeno filogenetsko drevo. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist s Kimurovim dvoparametričnim evolucijskim modelom. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom MEGA različica 5. Na razvejitvah so navedene statistične podpore posameznih cepitev pri 100 samovzorčenjih, ki so višje od 75. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence. (PiAdV-1 (angl. *pigeon adenovirus*), FaAdV (angl. *falcon adenovirus 1*)).

4.2.6 Razvrstitev adenovirusov v posamezne rodove ter razvrstitev glede pojavnost pri določeni vrsti oz redu ptic

V tabeli 13 so predstavljeni rezultati o pojavnosti adenovirusov, ki so bili dokazani pri pticah, v vseh treh rodovih, ter število različnih vrst ptic, pri katerih smo jih potrdili prvič. Skupno smo ugotovili 87 različnih tipov adenovirusov. Osemtrideset tipov (43,7 %) je razporejenih v rod *Aviadenovirus*, 22 (25,3 %) v rod *Atadenovirus* in 27 (31,0 %) v rod *Siadenovirus*. Izmed naštetih je bilo prvič ugotovljenih 31 tipov (81,6 %) aviadenovirusov, 21 (95,5 %) tipov atadenovirusov in 24 (88,9 %) tipov siadenovirusov. Skupno smo potrdili 76 novih adenovirusov (87,3 %).

Adenoviruse smo potrdili pri 54 različnih vrstah ptic. Pri 29 (53,7 %) vrstah smo potrdili aviadenoviruse, pri 20 (37,0 %) atadenoviruse in pri 36 (66,7 %) siadenoviruse. Prvič smo aviadenoviruse potrdili pri 24 (82,8 %) vrstah ptic, atadenoviruse pri 18 (90,0 %) vrstah ptic in siadenoviruse pri 24 (66,7 %) vrstah ptic. Z molekularno metodo vgnezditive PCR smo ugotovili adenoviruse pri 43 (79,6 %) vrstah ptic, pri katerih še niso bili potrjeni.

Tabela 13: Število in razporeditev adenovirusov, ki smo jih potrdili pri pticah v Sloveniji v obdobju od 2008 do 2011.

	Rod AdV			Σ
	<i>Aviadenovirus</i>	<i>Atadenovirus</i>	<i>Siadenovirus</i>	
Število ugotovljenih tipov AdV	38	22	27	87
Število prvič potrjenih tipov AdV	31	21	24	76
Število vrst ptic, pri katerih smo potrdili AdV	29	20	36	54
Število vrst ptic, pri katerih smo AdV potrdili prvič	24	18	24	43

Aviadenoviruse smo potrdili v 9 (69,2 %) redovih ptic izmed 13 pregledanih, siadenoviruse v 7 (53,8 %) redovih in atadenoviruse v 4 (30,8 %) redovih. Skupno število vrst ptic je med rodovi adenovirusov primerljivo, a je v rodu *Atadenovirus* to posledica velikega števila vrst ptic pevk (25 vrst), pri katerih smo dokazali adenovirus (Tabela 14).

Tabela 14: Pogostost potrditve posameznih rodov adenovirusov pri različnih redovih ptic

Red ptic	Rod AdV		
	AviAdV (n)	SiAdV (n)	AtAdV (n)
kure	3	4	/
plojkokljuni	2	1	1
golobi	1	1	/
močvirniki	1	/	/
ujede	4	3	/
sove	/	/	/
žerjavovci	/	/	/
pobrežniki	/	1	/
vpijati	1	/	/
plezalci	1	/	1
pevci	14	16	25
papige	2	10	3
veslonožci	/	/	/
Σ_n	29	36	30

n – število vrst ptic, pri katerem smo potrdili adenovirus v pripadajočem rodu

5 RAZPRAVA

V zadnjem desetletju je bilo v znanstvenih in strokovnih krogih veliko pozornosti posvečeno prostoživečim živalim. Poleg zbiranja podatkov, ki so pomembni za njihovo ohranitev, je vse več raziskav usmerjenih v preučevanje živali kot rezervoarjev ali potencialnih prenašalcev različnih bolezenskih povzročiteljev (242,243).

Ptice so lahko pomemben gostitelj množice patogenih mikroorganizmov, ki se lahko prenesejo na druge živali, nekatere tudi na ljudi (242,243). Njihov učinkovit način premikanja in selitvene poti jim dajejo poseben status v epidemiološkem preučevanju, saj lahko različne mikroorganizme prenesejo na nova, oddaljena območja v relativno kratkem času (242–244). Pri pticah sta bili v zadnjem desetletju najbolj odmevni dve virusni bolezni z zoonotičnim potencialom; aviarna influenza (AI) in bolezen Zahodnega Nila (WN) (243,245,246). Bolezni sta se in se še pojavljata pri pticah, drugih živalih in tudi ljudeh na različnih kontinentih. Raziskovanje drugih virusnih bolezni prostoživečih ptic, ki bi se lahko prenesle na sobne ptice, dvoriščno perutnino ali celo v intenzivne reje, je bilo zaradi aktualnosti teh dveh zoonoz dokaj zapostavljeno.

V Sloveniji segajo začetki sistematičnega proučevanja zdravstvenega statusa prostoživečih ptic v leto 2003. Epidemiologijo AI in WN pri nas je v obdobju med leti 2003 in 2006 podrobneje opisal Račnik (247). V tem času je bilo vzpostavljeno tudi vzorčenje prostoživečih ptic pevk, ki smo ga z ornitologom izvajali veterinarji Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine. Enak način vzorčenja smo uporabili tudi v naši raziskavi. Tehnika vzorčenja prostoživečih ptic pevk, ki jo je uporabil Račnik (247), je omogočila vzorčenje različnih vrst ptic, kar je za epidemiološko raziskavo izjemno pomembno. Veliko večino vzorčenih prostoživečih ptic smo ulovili v najlonske mreže s pomočjo predvajanih napevov med letno selitvijo (247,248). Vse ptice smo klinično pregledali in ocenili kot klinično zdrave. Manjše število vzorcev (16,3 %) smo odvzeli pticam, ki so bile oskrbljene v Zatočišču za živali prostoživečih vrst in v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete v Ljubljani (102 od 626 – 16,3 %). Večina teh živali je bila poškodovanih, oslabljenih ali drugače nezmožnih preživetja v naravi.

Ljubiteljskim vrstam ptic smo vzorce odvzeli med kliničnim pregledom v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce ter v živalskem vrtu in živalskim vrtovom podobnih prostorih. Da bi zajeli kar najširše območje in s tem dobili vpogled v razširjenost adenovirusov pri domači perutnini, smo vzorce te kategorije odvzeli na različnih območjih celotne Slovenije: vzorčili smo na Primorskem, Notranjskem, Dolenjskem, Štajerskem in v Prekmurju. Izbirali smo dvorišča z različnimi vrstami pernatih živali. V raziskavo smo zajeli tudi vse štiri večje fazanerije v Sloveniji, sokole pa smo vzorčili na dveh lokacijah. Menimo, da smo s takšnim pristopom sistematično zajeli območje naše države. Skupno smo odvzeli 1281 brisov pticam, razvrščenih v 112 vrst in 13 redov.

Poročil o neposrednem dokazu adenovirusa pri različnih vrstah ptic je malo kljub ugotovljenim specifičnim protitelesom proti različnim tipom adenovirusov pri različnih vrstah ptic (11,46). Vzrok za to je zahtevno gojenje nekaterih tipov adenovirusov. Večino lahko izoliramo in razmnožujemo le na celičnih kulturah, pripravljenih iz homologne vrste gostitelja (46,149). Z izjemo virusov, ki okužujejo domačo perjad, so bili poskusi izolacij adenovirusov zato pogosto neuspešni (11,46,189). Moderne molekularne metode so na tem področju ostale nepogrešljive in omogočajo edinstven vpogled v njihovo razširjenost (249).

Adenoviruse smo dokazovali neposredno, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Do sedaj so pri pticah ugotovili adenoviruse iz treh rodov: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus* (11,46). Glede na raznolikost vzorčenih ptic smo pričakovali, da bomo pri njih dokazali adenoviruse iz vseh treh rodov. Gen za polimerazo je v družini Adenoviridae zelo dobro ohranjen, zato smo prisotnost adenovirusov preiskovali z vgnezditevno PCR z začetnimi pari oligonukleotidov, ki pomnožujejo odsek gena polimerazo. Uporabljena degenerirana začetna para oligonukleotidov (polRouter/polFouter, polRinner/polFinner) in postopek je opisal Wellehan s sodelavci (38). Rezultati preiskav kažejo, da omenjena para omogočata dokazovanje vseh do sedaj znanih adenovirusov (29).

Občutljivost metode zagotavlja visoka degeneriranost začetnih oligonukleotidov, kar pa zmanjšuje njihovo specifičnost (187). Veliko bolj specifični so oligonukleotidi, ki pomnožujejo odsek gena za hekson. Hekson je glavna beljakovina kapside in je zelo variabilen. Začetni oligonukleotidi povečini pomnožujejo odsek gena za hekson FAdV in so kot takšni zelo primerni za dokazovanje adenovirusov pri kokoših (182,187). Z začetnimi

oligonukleotidi (HexonA/HexonB), ki so jih opisali Meulemans in sodelavci (182), smo vse vzorce, v katerih smo aviadenoviruse dokazali z vgnezditveno PCR, ponovno pregledali.

Pregledane ptice smo razvrstili na prostoživeče vrste (po redovih), vrste ptic iz ujetništva in na ptice dvoriščne perutnine ter perutnino iz intenzivnih rej. Za sistematsko razdelitev ptic smo uporabili slovenski imenik ptic zahodne Palearktike (250). Pticam, pri katerih so spremenili latinsko obliko imena, smo poimenovanje povzeli po drugi izdaji priročnika Collins bird guide (251).

5.1 Prostoživeče ptice

V Sloveniji so ornitologi z opazovanji registrirali 388 vrst ptic (252,253). Vrste, ki se ne selijo in ki skozi vse leto ostanejo v bližini gnezdišč ali se pozimi klatijo po bližnji okolici, imenujemo stalnice in predstavljajo 21 odstotkov. Ostale so selivke. Štirideset odstotkov registriranih ptic je selivk na kratke razdalje, ki prezimujejo na ozemlju Evrope ali v Sredozemlju. Rezultati načrtnega lova in obročkanja so pokazali, da k nam prihajajo ptice s skoraj celotnega območja Sredozemlja. Selivk na dolge razdalje, ki zimo preživijo v tropski in podsaharski Afriki, je 39 odstotkov. Selitveno popotovanje se v enem letu odvije dvakrat. Spomladi, ko se ptice iz južnih krajev vračajo v severna gnezdišča, in jeseni, ko ponovno letijo proti jugu na prezimovališča (244).

Evropske selivke se v splošnem selijo po štirih ustaljenih selitvenih poteh. Kar tri izmed njih se križajo nad območjem Slovenije. Preko Slovenije potekajo zahodna ali italijansko-španska selilna pot (iz Srednje Evrope proti Pirenejskemu polotoku), vzhodna ali bospor-sueška-azijsko-afriška selilna pot (ožina Bosporja v Malo Azijo, kjer se selitvene poti razidejo proti Aziji, Indiji ter večina prek Bližnjega Vzhoda v Afriko) in jadransko-tunizijska selilna pot (Apeninski polotok, preko Sicilije in Malte v severno Afriko). Odraz vseh selitvenih poti preko našega ozemlja je veliko število in pestrost ptičjih vrst. Veliko število ptic selivk se v Sloveniji tudi za kratek čas ustavi, saj morajo na svoji poti preleteti visoko pogorje Alp (244).

Izmed 388 opazovanih vrst prostoživečih ptic v Sloveniji, se jih 291 pojavlja bolj ali manj redno (252,253). Ker so nekatere vrste ptic bile opazovane zelo redko, smo se v nadaljevanju omejili na 291 vrst, ki so bolj ali manj redno opazovane. V našo raziskavo smo zajeli 66 (66 od 291 – 22,7 %) vrst. Veliko večino ptic smo ujeli v najlonske mreže s pomočjo

predvajanih napevov med jesensko selitvijo. Jesenska selitev preko območja Slovenije traja približno štiri mesece od konca avgusta do začetka novembra (244). Vse vrste prostoživečih ptic se ne odzivajo na posnet napev, zato lovljenje na opisan način pogosto ni neuspešno. Običajno smo ptice lovili v začetku ali ob koncu meseca septembra, ko jesenska selitev doseže vrh. Ptice se selijo v valovih, čas selitve pa se od vrste do vrste razlikuje (244). Ker smo lovili v mesecu septembru, smo ulovili pretežno vrste, ki imajo vrhunec selitve v tem obdobju. V kolikor bi hoteli v študijo zajeti večjo vrstno raznolikost ptic, bi morali loviti tudi v drugih obdobjih jesenske selitve in med pomladansko selitvijo ptic.

5.1.1.1 Pevci (Passeriformes)

V literaturi sta do sedaj opisani dve potrditvi adenovirusov pri pticah pevkah. Protitelesa proti virusu EDS so bila dokazana pri domačem vrabcu (220). Neposredno, z metodo vgnezditevne PCR in začetnimi oligonukleotidi, ki jih je opisal Wellehan s sodelavci, pa so uspeli potrditi GTAdV-1 pri veliki sinici (5). Virus so dokazali v različnih organih ptice.

V raziskavi smo pregledali 393 vzorcev 44 vrst ptic iz redu pevcev (Tabela 6). Po podatkih Komisije za redkost iz junija 2010 je bilo v Sloveniji opaženih 153 vrst ptic pevk (252,253). Adenoviruse smo potrdili v 107 (27,2 %) vzorcih, ki so izvirali iz 24 (54,5 %) vrst ptic. Izkazalo se je, da potrjeni adenovirusi pripadajo 66 različnim tipom (Tabela 9).

Filogenetska analiza je pokazala, da virusi pripadajo trem rodovom adenovirusov (Slika 16). V rodu *Atadenovirus* smo uvrstili 18 različnih tipov virusov, ki so izvirali iz 14 različnih vrst ptic pevk. Filetska skupina ni enotna, saj so enaki tipi adenovirusov potrjeni pri pticah pevkah iz različnih družin. Prepletajo se vrste ptic iz družine penic, strnadov, lastovk, vrabcev, drozgov, dolgorepk, pevk in ščinkavcev. Ugotovili smo identičnost aminokislinskih zaporedij na odseku za polimerazo virusov, ki smo jih potrdili pri kosu, taščici, poljskem vrabcu, srpični trstnici in sivi pevki. Najvišjo homologijo med atadenovirusi pri isti vrsti ptic smo potrdili pri taščici, kjer smo ugotovili kar 6 enakih sevov. Veliko sorodnost adenovirusov smo potrdili pri vrtni penici, kjer je 9 virusov oblikovalo svoj klad (Slika 16). Ti rezultati potrjujejo domnevo, da imajo posamezni tipi adenovirusov najverjetneje svojo vrsto izvornih gostiteljev.

V rod *Siadenovirus* je uvrščenih 16 različnih tipov virusov, ki smo jih potrdili pri 14 različnih vrstah ptic pevk. Z izjemo sevov, ki smo jih potrdili pri rumenem vrtniku, poljskem vrabcu in

dolgorepki, oblikujejo preostali siadenovirusi ptic pevk linije ter klade, ki jih povezuje družina gostitelja. Nekateri tipi oblikujejo linije in so značilni za vrsto ptic, za katere predvidevamo, da so izvorni gostitelji. Takšen primer je siadenovirus, ugotovljen pri liščku, kosu, veliki sinici, plavčku, kmečki lastovki, sivi vrani, črnoglavki, dveh rakarjih in pri srpični trstnici (Slika 16).

V rod *Siadenovirus* je uvrščen tudi edini v literaturi opisan adenovirus – GTAdV, ki so ga madžarski raziskovalci ugotovili pri veliki sinici (5). V naši raziskavi smo pri plavčku potrdili adenovirus z enakim aminokislinskim zaporedjem gena za polimerazo, kot je bil tisti pri sinici. Obe vrsti ptic sta si zelo sorodni in sta uvrščeni v družino sinic. Podrobnejši pregled klada, ki ga sestavlja 14 adenovirusov, ugotovljenih pri črnoglavkah, 5 pri vrtnih penicah in po en pri srpični trstnici in cikovtu, kaže, da so bili vsi virusi razen enega potrjeni pri pticah iz družine penic (Slika 16).

Štirinajst različnih tipov adenovirusov, ki smo jih potrdili pri 14 različnih vrstah pevk, je uvrščenih v rod *Aviadenovirus*. Filogenetska raziskava je pokazala, da tudi v tem rodu nekateri tipi oblikujejo linije, ki so vezane na specifičnega gostitelja (siva pevka, poljski vrabec, rjava penica, kmečka lastovka, rumeni vrtnik) ali klad, v katerem so uvrščeni virusi potrjeni pri pticah iz enotne družine (rumeni vrtnik, srpična trstnica, lišček in zelenec). Podobno kot v rodu *Siadenovirus* smo tudi med aviadenovirusi ugotovili enake seve virusov, potrjenih pri pticah v družini penic ter družini drozgov (taščica in vinski drozg) (Slika 16).

Vzrokov za nastanek raznolikosti med adenovirusi v redu pevcev je lahko več. Po evolucijskem razhodu posameznih redov ptic naj bi se adenovirusi razvijali skupaj s svojimi gostitelji (2,4). Velika vrstna raznolikost ptic, pri katerih so bili potrjeni posamezni tipi adenovirusov, nakazuje, da so se v evolucijskem razvoju preskoki virusov med gostitelji dogajali (4). Verjetno je bil prenos horizontalen, saj so enaki tipi pogosto ugotovljeni pri različnih vrstah ptic, ki si delijo habitat ali so v odnosu plenilec – plen. Z molekularno metodo smo potrdili prisotnost nukleinske kisline adenovirusa, za potrditev okužbe in s tem prenosa virusa pa bi potrebovali izolacijo virusa oziroma potrditev virusa v tkivu gostitelja. Ker je izolacija adenovirusov zelo zahtevna in pogosto neuspešna, ponovljivost vzorčenja živih prostoživečih ptic nemogoča, količina pridobljenega seroma za serološke teste pa premajhna, je uporabljena molekularna metoda najboljši približek za raziskovanje pojavljanja

adenovirusov pri teh vrstah ptic (3,4). V naši raziskavi so enak tip virusa imele ptice, ki si delijo habitat ali pa so v odnosu plenilec – plen. Dokaz virusne nukleinske kisline v kloakalnem brisu lahko izvira tudi iz plena ali iz okolja (voda) in ne pomeni nujno okužbe pač pa je lahko posledica prisotnosti virusa v tranzitni mikroflori.

Nekateri filogenetsko zelo sorodni tipi adenovirusov, ki oblikujejo klad, pa so bili potrjeni izključno pri eni vrsti gostitelja. Možen vzrok v teh primerih je tudi začasna izoliranost posameznih populacij iste vrste, ki so se v osami razvijale ločeno. Takšen primer je opisal Hanson s sodelavci pri rakarju (254). V študiji so proučevali znotraj-vrstne raznolikosti in njegovo porazdelitev v preteklosti. Nepričakovano so odkrili dva ločena klada, ki sta se ločila med zadnjo ledeno dobo (pred 26.000 do 20.000 leti). Po umiku ledenih pregrad sta se klada iz refugijev (majhnih območij pribežališč) ponovno razširila na nova območja v različnih časovnih obdobjih in po različnih poteh ter se ponovno združila. Danes je genetski zapis obeh kladov rakarjev še vedno viden in različno pogosto prisoten. Kljub temu, da je bilo časovno obdobje ločevanja prekratko za nastanek reprodukcijske izoliranosti obeh kladov, so v njihovem genetskem zapisu vidne razlike (254). Do podobnih razlik je lahko med izolacijami vrst iz različnih vzrokov privedlo tudi adenoviruse, ki so se v tem času razvijali ločeno, skupaj s svojim gostiteljem.

Nastanek novih vrst adenovirusov so nedavno opisali pri novo odkritih tipih humanih adenovirusov (HAdV): HAdV-D53, D54 in D56. Ugotovili so, da so verjetno nastali kot rezultat rekombinacije med dvema ali več različnimi tipi adenovirusov. Zanimivo je, da imajo novo nastali virusi drugačne poti širjenja in prenašanja med populacijo kot katerikoli "starševski" adenovirus, iz katerih so nastali. Ugotovili so, da je HAdV-56 nastal kot produkt rekombinacije med HAdV-D22, D37 in D8 (255).

V humani mikrobiologiji pojav novih adenovirusov pripisujejo tudi dlje časa potekajoči imunosupresiji, kot v primeru okužbe s HIV. Zmanjšana obrambna sposobnost organizma omogoča dolgotrajno prisotnost virusov v organizmu, v katerem so ustvarjene ugodne razmere za nastanek sočasnih okužb (255).

Tudi ptice so lahko izpostavljene različnim imunosupresivnim dejavnikom. Neugodne življenjske razmere (vremenske razmere, pomanjkanje hrane), veliki fizični napori (selitve)

ali nekateri biološki agensi (virusi, mikotoksini) lahko ustvarijo pogoje, pri katerih je obrambna sposobnost ptic zmanjšana. Dokazano je tudi, da so lahko ptice okužene z dvema ali več tipi adenovirusov hkrati (46). Tako so izpolnjeni pogoji, ki lahko privedejo do nastanka novih, pogosto bolj virulentnih tipov adenovirusov pri pticah.

5.1.1.2 Močvirniki (Ciconiiformes)

V redu močvirnikov so bila do sedaj dokazana le specifična protitelesa proti virusu EDS. Ugotovili so jih pri štorclji in kravji čaplji (215,218). Neposredno adenovirusi v tem redu ptic še niso bili dokazani. V raziskavi smo pregledali 10 vzorcev, odvzetih pri 3 vrstah močvirnikov (Tabela 6). Sicer je na območju naše države bilo opaženih 13 vrst ptic močvirnikov (252,253). Adenovirus smo potrdili le pri beli štorclji.

Aminokislinsko zaporedje polimeraze adenovirusa, ki smo ga potrdili pri beli štorclji, je bilo enako kot pri dveh adenovirusih, ki smo ju potrdili pri racah mlakaricah. Skupaj z adenovirusoma, ki smo ju potrdili pri labodih grbcih in adenovirusom, ki smo ga potrdili pri mlakarici (red plojkokljuni), tvorijo monofiletsko skupino v rodu *Aviadenovirus* (Slika 16, 17). Močvirniki in plojkokljuni sicer niso v bližnjem sorodstvu, si pa vse tri vrste delijo habitat v počasnejših delih rek, njihovih mrtvih rokavij ter poplavnih območjih (251).

Bela štorclja je glede na taksonomsko razvrščenost drugih vrst ptic, pri katerih smo potrdili aviadenoviruse, izjema, zato je verjetneje, da je ugotovljeni virus pridobila in ni njegov osnovni gostitelj. Predvsem stoječa in počasi tekoča voda je dober medij za prenos virusov, ki se izločajo preko telesnih izločkov. Menimo, da je bila bela štorclja zgolj naključni gostitelj.

5.1.1.3 Plojkokljuni (Anseriformes)

Zaradi pojava sindroma padca nesnosti v intenzivnih rejah perutnine, ki je povezan z visokimi ekonomskimi izgubami zaradi upada nesnosti, so se intenzivne raziskave in ugotavljanje izvornega gostitelja DAdV-1 pričele že pred leti (215,218,219,221). Specifična protitelesa proti virusu EDS so najpogosteje potrdili pri plojkokljunih, predvsem racah (11,46,215,219,221). Protitelesa so dokazali pri različnih vrstah rac. Zanimivo je, da virus pri prostoživečih racah neposredno še ni bil potrjen. V Sloveniji so ugotovili 33 različnih vrst plojkokljunov (252,253). V našo raziskavo smo zajeli le dve vrsti; laboda grbca in raco

mlakarico. Pregledali smo 90 vzorcev mlakaric in 26 vzorcev labodov grbcev. Adenovirus smo potrdili v petih vzorcih mlakaric in treh vzorcih labodov grbcev (Tabela 6).

Nadaljnje preiskave so pokazale, da so 4 adenovirusi rac mlakaric uvrščeni med aviadenoviruse, eden pa v rod *Atadenovirus*. Filogenetsko najbolj oddaljen tip aviadenovirusa je bil najbolj soroden FAdV-4. Druga dva tipa, ki sta si zelo podobna, oblikujeta skupaj z adenovirusom, dokazanim pri beli štorclji in dvema adenovirusoma, dokazanima pri labodu grbcu, skupen klad (Slika 17). Predvidevamo, da so plojkokljuni osnovni gostitelji teh tipov adenovirusov.

Atadenovirus, potrjen pri mlakarici je enak virusu DAdV-1, povzročiteljem boleznih sindroma padca nesnosti. Po naših podatkih je to prvi neposreden dokaz virusa EDS pri prostoživečih racah, kar dodatno potrjuje predvidevanja, da so race izvorni gostitelj in rezervoar boleznih.

Poleg že prej omenjenih aviadenovirusov smo pri labodu grbcu potrdili tudi siadenovirus, ki v tem rodu oblikuje lastno linijo.

5.1.1.4 Ujede (Falconiformes)

Večina vzorcev, ki smo jih odvzeli ujedam, so bili vzorci sokolov, ki so bili gojeni v ujetništvu. V interpretaciji rezultatov smo jih obravnavali skupaj z drugimi prostoživečimi ujedami, saj so sokoli med učenjem tudi izpuščeni. Posredno in neposredno so bili adenovirusi v redu ujed že ugotovljeni (11,46). Opisani so bili pri posameznih poginih ali ob večjih poginih sokolov v vzrejnih centrih (78–81,83–85,208). Dokazali so specifična protitelesa proti različnim adenovirusom, za adenovirusne okužbe značilne bazofilne inkluzije v jedrih, adenovirusne delce z elektronskim mikroskopom in genom adenovirusov z molekularno metodo PCR.

Potrjenih je 32 vrst ptic iz redu ujed, ki so bolj ali manj prisotne na območju Slovenije (252,253). V naši raziskavi smo preiskali 45 vzorcev, ki smo jih odvzeli petim vrstam prostoživečih ujed, in 37 vzorcev ujed v ujetništvu (Tabela 6, 8). Ti vzorci so bili odvzeti šestim različnim vrstam. Delež pozitivnih vzorcev je relativno visok, saj smo adenoviruse potrdili v 32 primerih. Večina, kar 25, je bila ugotovljena pri sokolih v ujetništvu (Tabela 9, 10).

Vsi pozitivni vzorci sokolov, ki so bili uvrščeni v rod *Aviadenovirus*, oblikujejo klad. V tem kladu sta tudi aviadenovirusa, potrjena pri postovki, ki sicer oblikujeta svojo linijo. Adenovirus, ki smo ga potrdili pri kanji, oblikuje svojo linijo v rodu (Slika 16). Ugotovitev ni presenetljiva, saj kanje uvrščamo v ločeno družino med orle.

Aviadenovirus, ki smo ga potrdili pri sršenarju, je identičen FAdV-8b (Slika 16). Ta tip virusa smo potrdili pri piščancih brojlerjih ob izbruhu IBH. Sršenar je bil oskrbljen v zavetišču za prostoživeče živali. Ker so del prehrane ujed v ujetništvu tudi piščanci, je zelo verjetno, da se je okužil s hrano.

V rodu *Siadenovirus* oblikujejo adenovirusi, potrjeni pri sokolih, klad skupaj s tistimi, pri postovki in drevesni cipi. Slednja je ptica pevka in je v tem kladu verjetno slučaj. Siadenovirus, ki izvira iz arktičnega sokola, je enak virusoma pri japonskih prepelicah (Slika 16). Predvidevamo, da gre tukaj za enak primer kot pri sršenarju, saj so japonske prepelice osnovna prehrana sokolov v pregledani reji.

Sokoli selci naj bi bili po predpostavki Schrenzla in sodelavcev primarni gostitelji sokoljega adenovirusa(79). Sami namreč ne zbolevalo ob okužbi in so asimptomatski nosilci virusa. S seroneutralizacijskim testom so ugotovili, da so specifična protitelesa proti adenovirusu sokolov prisotna skoraj izključno pri sokolih. Odstotek serološko pozitivnih prostoživečih in v ujetništvu živečih sokolov selcev je bil med 80 % in 100%. Druge vrste severnoameriških sokolov so imele nižji odstotek prisotnosti specifičnih protiteles (od 43 do 57 %), medtem ko sokoli iz različnih geografsko izoliranih otočij in tropov niso imeli specifičnih protiteles. Slednji so v primeru okužbe z adenovirusom sokolov pogosto poginili. Sokoli selci imajo verjetno vlogo trojanskega konja, saj lahko z asimptomatskim prenašanjem virusa okužijo naivne vrste, ki lahko akutno ali perakutno poginejo (79).

5.1.1.5 Sove (Strigiformes)

Kar nekaj poročil iz strokovnega slovstva navaja okužbe z adenovirusi pri pticah iz redu sov. Specifična protitelesa proti virusu EDS so bila dokazana pri lesni sovi in veliki uharici (218), z molekularnimi metodami pa so bili adenovirusi dokazani tudi pri skalnem in orlovskem viru (84). Na območju Slovenije se bolj ali manj redno pojavlja 12 vrst ptic iz reda sov (252,253). V naši raziskavi smo preiskali vzorce 18 sov, ki pripadajo vrstam mali skovik, lesna sova,

kozača in mala uharica, vendar okužb z adenovirusi nismo potrdili (Tabela 6, 9) (Slika 16).

5.1.1.6 Žerjavovci (Gruiformes)

Iz reda žerjavovcev so bila specifična protitelesa dokazana pri vrsti liske *Fulica americana* (221), pri sivem žerjavu pa so za adenoviruse značilne bazofilne inkluzije v jedru potrdili s histološko preiskavo (143). V Sloveniji se pojavlja 11 vrst žerjavovcev (252,253). V naši raziskavi smo pregledali le en vzorec mokoža, ki je bil negativen (Tabela 6) (Slika 16).

5.1.1.7 Pobrežniki (Charadriiformes)

V redu pobrežnikov so adenoviruse ugotovili s posrednimi in neposrednimi metodami (11). Posredno z dokazom inkluzij v jedrih, z elektronsko mikroskopsko preiskavo ali serološkimi testiranjami so bili potrjeni pri srebrnem galebu ter tenkokljuni lumni (142,256).

Vidovsky in sodelavci so z enako metodo, kot smo jo uporabljali v naši raziskavi (vgnezditvena PCR), preiskali 350 švedskih vzorcev različnih vrst morskih ptic. Šestindvajset vzorcev je bilo pozitivnih. Potrjeni so bili adenovirusi iz rodu *Aviadenovirus* in *Siadenovirus*. Pozitivnih je bilo 22 vzorcev rečnih galebov (*Larus ridibundus*), dva vzorca morskega galeba (*Larus marinus*), en vzorec sivega galeba in en vzorec kaspijske čigre (*Hydroprogne caspia*). Tudi med enajstimi galebi, ki so jih proučevali na Madžarskem, je bil en vzorec pozitiven. Na nukleotidnem nivoju je bil ta virus povsem enak tistim, ki so jih dokazali pri galebih na Švedskem (256). Nedavno so objavili tudi celoten genom siadenovirusa, ki so ga potrdili v različnih tkivih poginulih antarktičnih govnačk (224).

Kljub temu, da smo v raziskavo zajeli le 3 od 73 vrst, ki so bolj ali manj pogosto prisotne pri nas (252,253), smo adenovirus potrdili v enem od 8 vzorcev (Tabela 6, 9). Pozitiven je bil vzorec rumenonovega galeba, virus pa je bil uvrščen v rod *Siadenovirus* in oblikuje lastno linijo (Slika 16).

5.1.1.8 Golobi (Columbiformes)

Okužbe z adenovirusi so pri golobih povezane z dvema boleznima: tako imenovano klasično adenovirusno boleznijo in nekrotizirajočim hepatitisom (66). Poročila o dokazanih virusih pri golobih so redka, zato tudi ni natančnih podatkov o etiološki povezavi med obema boleznima. Vsi do sedaj dokazani virusi so uvrščeni v rod *Aviadenovirus*. Opisi bolezni se nanašajo predvsem na golobe pismonoše. Klasična oblika bolezni prizadene mlade golobe pred dopolnjenim enim letom starosti. Običajno golobi pismonoše zbolijo po prvi tekmi. Druga oblika, nekrotizirajoči hepatitis, pa se pojavlja tekom celega leta pri vseh starostnih skupinah golobov (66). Podatkov o adenovirusih pri prostoživečih golobih v literaturi nismo zasledili.

V raziskavi smo pregledali 11 vzorcev domačih prostoživečih golobov (Tabela 6). Vzorčili smo eno vrsto golobov izmed petih, kolikor jih v Sloveniji opažajo (252,253). Adenovirus smo potrdili kar v 8 vzorcih (Tabela 9). Sedem jih je oblikovalo lastno linijo v rodu *Siadenovirus*, en virus pa je oblikoval lastno linijo v rodu *Aviadenovirus* (Slika 16). Rezultati naših preiskav, ki jih zaradi pomanjkanja podatkov iz literature nismo mogli primerjati z drugimi, nakazujejo, da so domači golobi osnovni gostitelji tako linije v rodu *Aviadenovirus* kot tudi linije v rodu *Siadenovirus*.

5.1.1.9 Vpijati (Coraciiformes)

V literaturi ni podatkov o adenovirusih pri pticah iz redu vpijatov. V Sloveniji so redno opazili 4 vrste iz redu vpijatov (252,253). V našo raziskavo smo zajeli le vodomca. Vzorce smo odvzeli trem pticam in v dveh primerih potrdili adenovirus (Tabela 9). Oba virusa sta bila uvrščena v rod *Aviadenovirus*, kjer oblikujeta lastno linijo (Slika 16). Pri vodomcu so enak virus potrdili na Madžarskem (Harrach, osebna komunikacija), zato predvidevamo, da je vodomec osnovni gostitelj dokazanega tipa.

5.1.1.10 Plezalci (Piciformes)

Podobno kot pri vpijatih tudi pri plezalcih v literaturi nismo zasledili podatkov o okuženosti z adenovirusi.

V Sloveniji je evidentiranih 10 vrst ptic iz tega redu (252,253). V raziskavo smo zajeli 21 vzorcev ptic, ki so pripadali dvema vrstama – veliki detel in vijeglavka (Tabela 6). Pri

velikem detelju virusa nismo potrdili. Izmed 19 pregledanih vzorcev vijeglavk pa so bili štirje vzorci pozitivni (Tabela 9). Trije adenovirusi oblikujejo lastno linijo v rodu *Aviadenovirus*, zato predvidevamo, da so vijeglavke osnovni gostitelj tega tipa adenovirusa. Četrty sev je uvrščen v rod *Atadenovirus*. Enak tip virusa smo potrdili še pri kmečki lastovki in poljskem vrabcu (Slika 16). Heterogenost gostiteljev verjetno priča o medvrstnem preskoku virusa.

5.1.2 Ljubiteljske vrste ptic v ujetništvu

Med ljubiteljskimi pticami v ujetništvu smo obravnavali tiste ptice, ki niso prostoživeče vrste na območju Slovenije in so bile vzrejene v zaprtih, omejenih prostorih. Najpogostejše med njimi so papige in ptice pevke iz oddaljenih krajev sveta.

5.1.2.1 Papige (*Psittaciformes*)

Natančno število vrst papig v Sloveniji zelo težko ocenimo, čeprav je njihova vrstna pestrost velika. So najpogostejše ljubiteljske vrste ptic, s katerimi se veterinarji srečujemo predvsem pri kliničnem delu. Prav zaradi tega je v literaturi zaslediti precej več podatkov o okužbah z adenovirusi. Najpogosteje gre za opise posameznih kliničnih primerov obolelih ptic ali nenadnih poginov v rejah papig. Adenovirusi pri papigah so bili dokazani posredno in neposredno, vendar v večini pri že poginulih živalih. Različni avtorji navajajo najdbo bazofilnih inkluzij v jedrih in adenovirusne delce, vidne z elektronskim mikroskopom (67,69,71,72,74–76,124,125,140,144–146,189,194). V zadnjem desetletju, ko so začeli uporabljati nove diagnostične metode, je poročil o dokazu adenovirusov pri različnih vrstah papig čedalje več.

Raue s sodelavci (183) je z molekularno metodo prva dokazala adenoviruse pri papigi iz rodu *Poicephalus*. Virus so poimenovali adenovirus papig (PsAdV) in je uvrščen v rod *Aviadenovirus*. Istega leta je Wellehan s sodelavci (70) z uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odseka gena za polimerazo dokazal aviadenovirus, ki je povzročil jetrne in limfoidne nekroze pri Meyerjevi papigi. Poimenovali so ga adenovirus Meyerjeve papige. Z isto metodo je dokazal tudi siadenovirusno okužbo pri slivoglavi papigi (*Psittacula cyanocephala*) in belem kakaduju (*Cacatua alba*). Povzročitelja so poimenovali PsAdv-2 (6). Katoh in sodelavci (6) so pri petih poginulih skobčevkah potrdili adenovirus, ki so ga poimenovali adenovirus skobčevk 1 (BuAdV-1).

V naši raziskavi smo pregledali 275 vzorcev papig iz 22 različnih vrst (Tabela 8). Adenoviruse smo potrdili v 39 vzorcih pri 11 vrstah papig (Tabela 10). Virusi oblikujejo 5 linij v rodovih *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus* (Slika 16).

V rod *Siadenovirus* je uvrščenih 35 adenovirusov, ki oblikujejo dve liniji. Šestindvajset je enakih virusu PsAdV-2. V naši raziskavi smo virus PsAdV-2 potrdili pri 10 vrstah papig. Pozitivne so bile 4 skobčevke, 10 nimf ter po ena rdečekрила papiga, neofema, rozela, veliki aleksander in aleksander. Virus smo potrdili tudi pri štirih kakadujih in dveh amazonkah (Slika 16). Za dva kakaduja je vrsta znana: en je roza kakadu, drugi pa beli kakadu. Za preostala dva kakaduja in amazonki pa vrsta ni bila natančno določena.

PsAdV-2 smo dokazali pri 9,5 % pregledanih papigah in polovici (11 od 22) pregledanih vrst, zato domnevamo, da je ta virus med njimi zelo razširjen (Tabela 8, 10, 13). Ali pri njih povzroča tudi klinična obolenja, bomo natančneje proučili v prihodnje, ko bomo pregledali in ovrednotili kartotečne zapiske ter usmerjeno raziskali vpliv tega virusa na zdravstveno stanje papig.

Drugo linijo v rodu *Siadenovirus* sestavlja 9 (3,3 %) adenovirusov, ki smo jih potrdili pri 6 skobčevkah, 2 nimfah ter eni amazonki (Slika 16). Ta tip pri papigah do sedaj še ni bil opisan, najbolj soroden pa je z virusom GTAdV-1, ki je bil potrjen pri veliki sinici in plavčku, ter adenovirusom, ki smo ga ugotovili pri dveh kanarčkih.

V rod *Aviadenovirus* sta bila uvrščena virusa, ki smo ju potrdili pri nimfi in sivi papigi. Virus sta na aminokislinskem nivoju enaka virusu, ki so ga potrdili pri mladiču Meyerjeve papige (Meyer's parrot adenovirus) (Slika 16). Njegova pojavnost je v populaciji papig na območju Slovenije nizka (0,7 %) (Tabela 8).

Atadenovirusi do sedaj še niso bili dokazani v redu papig. V naši raziskavi smo jih potrdili v treh (1,1 %) vzorcih kloakalnih brisov papig (Tabela 8), kar je prva potrditev v tem redu ptic. Primerjava aminokislinskih zaporedij je pokazala, da oblikujejo dve liniji in se bistveno razlikujejo od drugih virusov v rodu *Atadenovirus* (Slika 16).

5.1.2.2 Pevci (Passeriformes)

V to skupino smo uvrstili ptice iz redu pevk, ki se uspešno razmnožujejo v ujetništvu, hkrati pa jih ne uvrščamo med prostoživeče ptice pri nas. V literaturi nismo zasledili opisanega primera okužbe ali podatka o adenovirusih pri ljubiteljskih vrstah ptic pevk. Preiskali smo 16 vzorcev kloakalnih brisov štirih ljubiteljskih vrst ptic pevk – kanarčki, zebrice, rižavec in indijski kos. Adenoviruse smo potrdili pri treh kanarčkih in dveh zebricah (Slika 16) (Tabela 8, 10).

Trije adenovirusi, ki smo jih ugotovili pri kanarčkih, so bili uvrščeni v rod *Atadenovirus*. V rodu oblikujejo klad iz dveh filogenetsko zelo sorodnih tipov virusa. Klad vključuje tudi adenovirus, ki smo ga ugotovili pri vrtni penici (Slika 16). Vrsti gostiteljev sicer sodita v isti red ptic, vendar je le malo verjetno, da bi se njuni poti v naravi srečali. Kanarčki se že stoletja uspešno vzrejajo v ujetništvu, pogosto jih pariyo tudi z drugimi vrstami iz družine ščinkavcev.

Virusa, ki smo ju potrdili pri zebricah, sta bila uvrščena v rod *Siadenovirus*. V rodu oblikujeta linijo, ki si deli najbližjega skupnega prednika z virusom GTAdV-1, ugotovljenim pri veliki sinici in plavčku (Slika 16). Virus z enakim aminokislinskim zaporedjem so pri zebrici ugotovili tudi na Veterinarskem raziskovalnem inštitutu (Veterinary Medical Research Institute – VMRI) v Budimpešti (Harrach osebna komunikacija, neobjavljeni podatki). Predvidevamo, da so zebrice osnovni gostitelj opisanega tipa adenovirusa.

5.1.2.3 Druge vrste ljubiteljskih ptic v ujetništvu

Preiskali smo tudi en vzorec, ki smo ga odvzeli orjaškemu tukanu (red plezalci) in devet vzorcev rožnatih pelikanov (red veslonožci) (Tabela 8). Vzorec je sicer majhen, vendar so ptice iz teh dveh redov v Sloveniji redke. Vsi vzorci so bili negativni (Tabela 10), prav tako tudi v literaturi nismo zasledili podatkov o morebitnih boleznih, povzročenih z adenovirusi ali njihovem dokazu v redu plezalcev in veslonožcev.

5.1.3 Dvoriščna in intenzivna reja perutnine

Z izrazom perutnina, citiram uredbo: "pojmuje vse ptice, ki se redijo ali gojijo v ujetništvu za proizvodnjo mesa ali konzumnih jajc, za proizvodnjo drugih proizvodov, za obnovo populacije prostoživečih ptic ali za vzrejni program za proizvodnjo teh kategorij ptic

(ULRS 47/2007). Najpogostejše vrste perutnine so kokoši, purani, pegatke, race, gosi, prepelice, golobi, fazani, jerebice in ratiti.

V intenzivni reji perutnine je o različnih boleznih, ki jih povzročajo adenovirusi, veliko znanega (46). Bronhitis prepelic, inkluzijski hepatitis in sindrom hidroperikarda pri piščancih, hemoragični enteritis puranov, bolezen marmorirane vranice fazanov ter sindrom padca nesnosti pri kokoših nesnicah so najznačilnejše bolezni, ki jih pri perutnini povzročajo adenovirusi (46,56).

Veliko število in velika gostota živali v objektih intenzivnih rej predstavljajo idealne razmere za prenos različnih bolezenskih povzročiteljev. Dodatno k izražanju bolezni pripomore stres in okrnjen imunski sistem ptic v zanje manj ugodnih pogojih bivanja (11,46).

Opisanih je bilo veliko različnih tipov adenovirusov, ki povzročajo različne bolezni pri perutnini. V preteklosti je njihova diagnostika temeljila na specifični klinični sliki bolezni, patoanatomskih in histoloških preiskavah, elektronski mikroskopiji, seroloških preiskavah ter izolaciji povzročitelja (46). Molekularne metode pa so določanje in tipizacijo povzročiteljev še izboljšane. Raziskovalci so razvili različne pare začetnih oligonukleotidov, ki so običajno specifični za določenega povzročitelja ali skupino adenovirusov. Večinoma so se usmerili v pomnoževanje različnih odsekov gena za glavno kapsidno beljakovino, hekson (181,182). V literaturi je največ podatkov o FAdV pri kokoših, virusu HE pri puranih in MSD pri fazanih ter virusu EDS pri kokoših nesnicah (46). Z uporabo zelo specifičnih začetnih oligonukleotidov pa je bilo verjetno veliko adenovirusov tudi spregledanih. Kajan (187) je predvideval, da bi z uporabo občutljivih, a manj specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo odsek adenovirusne polimeraze (38), pri kokoših dokazali poleg FAdV in virusa EDS (DAdV-1) tudi nove tipe adenovirusov.

V naši raziskavi smo vzorčili dvoriščno perutnino na različnih območjih Slovenije. Vzorčenje smo poskušali čim bolj uravnoteženo razporediti po čim širšem območju, a ponekod ni bilo na voljo primernih dvorišč z različnimi vrstami perutnine ali pa so lastniki vzorčenje odklonili. V intenzivni proizvodnji perutnine nismo načrtno preučevali razširjenosti adenovirusov, ampak smo v raziskavo vključili vzorce živali, ki so poginile ob izbruhih bolezni s sumom na adenovirusno okužbo.

5.1.3.1 Kure (Galliformes)

V Sloveniji sta bila v preteklosti v intenzivni reji kokoši serološko potrjena adenovirusa CELO in EDS. Slednji je večje ekonomske izgube povzročil v osemdesetih letih prejšnjega stoletja, v zadnjih letih pa se pojavlja le sporadično (56). V naši raziskavi smo pregledali 91 vzorcev domačih kokoši iz 21 dvoriščnih rej ter 7 vzorcev iz intenzivne reje kokoši (Tabela 7).

Pri kokoših, ki smo jih vzorčili v ekstenzivnih rejah, smo ugotovili nizko pojavnost zelo heterogenih adenovirusov. Med 91 vzorčenimi kokošmi smo adenoviruse potrdili pri petih (5,5 %) (Tabela 11). Virusi so bili med seboj zelo različni in so razporejeni v pet različnih tipov adenovirusov. En tip je imel aminokislinsko zaporedje heksona enako kot TAdV-3 (Slika 17). Siadenovirusi pri kokoših še niso bili neposredno dokazani. Rezultat naših preiskav pa kaže na možnost, da so tudi kokoši lahko prenašalci ali celo rezervoar teh virusov, ki sicer povzročajo obolenja pri puranih in fazanih. Dva seva sta bila uvrščena v vrsto *FAdV-C*, eden je bil najbolj soroden *FAdV-5*, predstavniku vrste *FAdV-B*, peti pa spada v vrsto *FAdV-E* (Slika 17).

V času naše raziskave je prišlo v intenzivnih rejah brojlerjev do višjih poginov s kliničnimi znaki in patološkimi spremembami značilnimi za inkluzijski hepatitis piščancev. Vseh sedem pregledanih vzorcev je izviralo iz teh rej piščancev. Značilna bazofilna inkluzijska telesa v jedrih v različnih organih smo potrdili v vseh treh primerih, v katerih smo viruse tudi uspešno potrdili. Dva tipa virusa sta uvrščena v vrsto *FAdV-E*, eden pa v vrsto *FAdV-D* (Slika 17).

Ker so začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka gena za polimerazo manj specifični, smo za natančnejšo determinacijo tipov adenovirusov uporabili začetne oligonukleotide, ki pomnožujejo bolj variabilno regijo v virusnem genomu (182), razviti pa so bili za določanje tipov *FadV*. Podrobnejša analiza dobljenih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij je pokazala, da dveh izmed teh ne moremo umestiti v nobenega izmed 12 poznanih tipov *FAdV*.

Virus dokazan pri kokoši iz dvoriščne reje, ki je bil na podlagi odseka gena za polimerazo, uvrščen v vrsto *FAdV-C*, se je tudi v odseku gena za hekson razlikoval od *FAdV-4* in *FAdV-10*. Podobno se je razlikoval tudi virus, ki smo ga potrdili v primeru kliničnega izbruha inkluzijskega hepatitisa pri piščancih brojlerjih. Na podlagi nukleotidnega zaporedja odseka

gena za hekson smo virus sicer uvrstili v vrsto *FAdV-D*, vendar se na podlagi filogenetskih rezultatov razlikuje od *FAdV-2*, *FAdV-11*, *FAdV-3* in *FAdV-9* (Slika 18). V teh primerih bi morali pomnožiti daljši odsek genoma, ki bi ga nato primerjali s sekvencami adenovirusov dostopnimi v genski banki. Na ta način bi lažje uvrstili takšne viruse v obstoječe tipe adenovirusov znotraj vrste *FAdV-C* in *FAdV-D*.

V prvem primeru potrjenega inkluzijskega hepatitisa pri brojlerskih piščancih v Sloveniji leta 2010 smo s pomočjo začetnih oligonukleotidov po Meulemansu uspešno določili kot povzročitelja virus *FAdV* tip 8b (63) (Slika 18).

Pri puranih so bili do sedaj potrjeni trije tipi adenovirusov; *TAdV-1* iz rodu *Aviadenovirus*, *TAdV-3* iz rodu *Siadenovirus* ter *DAdV-1* iz rodu *Atadenovirus* (2,36,135,223).

Hemoragični enteritis puranov je ena izmed najpogostejših boleznih v intenzivni reji puranov po svetu. V Sloveniji je bil potrjen leta 2001 (56). V raziskavo smo vključili vzorce vranic, ki smo jih hranili iz 6 izbruhov boleznih HE v preteklosti, dva ločena izbruha boleznih pa smo obravnavali tudi v času naše raziskave. V vseh primerih smo virus tudi uspešno potrdili. Vseh 8 sevov je bilo enakih virusu *TAdV-3*, povzročitelju hemoragičnega enteritisa puranov (Slika 17). V ekstenzivnih rejah virusa pri puranih nismo dokazali.

Specifična protitelesa proti povzročitelju hemoragičnega enteritisa so bila poleg pri puranih, ugotovljena tudi pri fazanih, piščancih, pavih in pegatkah (46,123,214), vendar virus *TAdV-3* pri omenjenih vrstah perutnine ni bil neposredno dokazan. Z našo raziskavo smo potrdili *TAdV-3* pri kokoši in pavu (Slika 17). Gre za prvi neposredni dokaz tega virusa pri omenjenih vrstah perutnine, ki potrjuje izsledke predhodnih seroloških preiskav, da omenjeni vrsti lahko služita kot rezervoar virusa *TAdV-3*. Virus *TAdV-1* in *DAdV-1* v naši raziskavi nismo odkrili.

V vzorcih 18 pegatk okužb z adenovirusi nismo potrdili.

Pri fazanih prevladuje le en tip adenovirusa, *Siadenovirus*, ki je antigensko enak virusu HE puranov (*TAdV-3*) (46,56). Virus je povzročitelj boleznih marmorirane vranice pri fazanih, ki je po nekaterih podatkih najpogostejša bolezen mladih fazanov (257). Na območju Slovenije delujejo 4 večje fazanerije, ki vzrejajo fazane za izpuste v lovišča. Ena izmed njih ima tudi

lastno valilnico in oskrbuje s kebčki dve drugi fazaneriji, medtem ko ena kupuje kebčke v tujini. V pogovoru z oskrbniki fazanerij smo ugotovili, da niso opažali sprememb v zdravstvenem stanju fazanov, pogin je bil v mejah normalnih vrednosti. V naši raziskavi smo preiskali po 25 vzorcev kloakalnih brisov fazanov iz vsake fazanerije, skupno 100 vzorcev, ter 3 fazane, ki smo jih vzorčili kot dvoriščno perutnino.

Skupno je bilo 5 vzorcev (4,9 %) pozitivnih. Vsi adenovirusi so bili uvrščeni v rod *Aviadenovirus*, pripadajo pa trem tipom. Dva tipa, vsak s po dvema enakima predstavnikoma, oblikujeta klad, ki je jasno ločen od drugih poznanih adenovirusov. Klad je uvrščen med vrsti *FAdV-B* in *-D*, vendar je od obeh skupin jasno ločen. Tretji tip oblikuje linijo, ki si deli skupnega prednika s *FAdV-4* in *FAdV-10* (skupina *FAdV-C*) ter tipoma, ki smo ju ugotovili pri mlakarici in japonski prepelici (Slika 17). Po nam poznanih podatkih so bili ti tipi aviadenovirusov pri fazanih prvič dokazani v naši raziskavi.

Kljub razširjenosti bolezni marmorirane vranice med fazani drugod po svetu, virusa pri fazanih na območju Slovenije v naši raziskavi nismo dokazali.

Pri prepelicah je opisan aviadenovirus, ki je popolnoma identičen virusu CELO in je povzročitelj bronhitisa prepelic (46). Bolezen v Sloveniji še ni bila dokazana (56).

V naši raziskavi smo pregledali 11 vzorcev japonskih prepelic in 5 vzorcev kitajskih prepelic. Adenovirus smo dokazali pri treh japonskih prepelicah. Dva izolata sta enaka in oblikujeta skupaj z adenovirusom, ki smo ga potrdili pri arktičnem sokolu, samostojen klad v rodu *Siadenovirus* (Slika 16, 17). Sokole v reji, kjer smo vzorčili, sicer hranijo pretežno s prepeličjim mesom, vendar so pozitivne prepelice izvirale iz jate, ki je locirana na povsem drugem območju Slovenije, in med seboj nimajo stika. Predvidevamo, da so osnovni gostitelj tega tipa japonske prepelice. Po naših podatkih je to prvi dokaz prisotnosti siadenovirusov pri japonskih prepelicah.

Drugi tip adenovirusov, ki smo ga ugotovili v raziskavi, je uvrščen v rod *Aviadenovirus*, vendar ni soroden virusu CELO, kot bi pričakovali, pač pa je filogenetsko zelo soroden *FAdV-10*. Virus, ki bi bil enak virusu CELO, v naši raziskavi nismo ugotovili.

Vseh pet pregledanih vzorcev kitajskih prepelic je bilo negativnih.

5.1.3.2 Plojkokljuni (Anseriformes)

Podobno kot pri prostoživečih racah in goseh je tudi pri domačih racah in goseh veliko posrednih dokazov o prisotnosti adenovirusov (46). V večini primerov gre za dokaz specifičnih protiteles proti virusu DAdV-1, povzročitelju sindroma padca nesnosti. Virus je splošno razširjen v populaciji domačih rac in gosi (46), izoliran pa je bil tako iz zdravih (258) kot tudi bolnih rac s kliničnimi znaki driske in padcem nesnosti (46,110,205). Tudi gosi so pogosto okužene z DAdV-1, vendar potekajo okužbe običajno asimptomatsko. DAdV-1 je bil pri domačih goseh izoliran le v enem primeru, pri gosjih mladičih z izrazitim respiratornim obolenjem (259).

V Sloveniji reja vodne perutnine (race, gosi) ni razširjena. V manjšem številu jih gojijo le ljubiteljski rejci, zato številčnejše vzorčenje te kategorije ptic ni bilo mogoče. Skupno smo odvzeli vzorce 62 pticam in sicer 24 domačim racam, štirim mandarinkam, 18 moškarnim bleščavkam in 16 gosem. Vsi vzorci so bili negativni na prisotnost adenovirusov (Tabela 7).

Glede na številna poročila o posrednem dokazu adenovirusov v redu plojkokljunov, predvsem dokazu specifičnih protiteles proti DAdV-1, je rezultat presenetljiv. DAdV-1 se med kokošmi širi vertikalno preko valilnih jajc ali horizontalno, zelo verjetno pa je prenos v redu plojkokljunov podoben (46,56). Virus so potrdili v iztrebkih, vendar je znano, da ga živali izločajo intermitentno in v nizkih koncentracijah (260). Pri odraslih samicah ptic je prisotnost virusa zelo verjetno posledica kontaminacije iztrebka z izločki jajcevoda (261). Večino rac in gosi, ki smo jih zajeli v naši raziskavi, smo vzorčili izven nesne sezone, zato se virus v času vzorčenja verjetno ni izločal.

5.1.4 Evolucija adenovirusov in zaključki

Jacques Lucien Monod je zanimivo opisal naš odnos do evolucijske teorije, ko je dejal, da je evolucija priljubljena zato, ker vsak misli, da jo razume (262). Še pred 200 leti je v evolucijo verjela le peščica ljudi, večina, predvsem ljudje naklonjeni kreacionizmu, jo je zavračala in izpodbijala. Danes bi, na podlagi nakopičenih dejstev evolucijsko teorijo težko zanikali (263).

Nekoliko širši pogled na biologijo našega planeta vodi do sklepa, da so virusi njegov upravitelj. Kot najštevilčnejša biološka entiteta so zelo pomembni v oblikovanju ekologije in

evolucije vsake vrste na Zemlji (264). Odnosi med virusi in njihovimi gostitelji so zelo raznoliki. Pojavijo se lahko kot na novo vznikle zoonotske okužbe (primer SARS, ki ga povzroča koronavirus) ali konvergentne združbe med virusom in gostiteljem, ki obstajajo že milijone let (primer papilomavirusov) (265).

Virusni genomi so različno veliki in obsegajo približno 3 redove velikosti (10^3 do 10^6 nukleotidov) (266). Virusi okužujejo celice vseh treh danes priznanih domen življenja: bakterije, arheje in evkarionte. Kljub raznolikim gostiteljem si virusi delijo nekatere skupne homologne gene, vendar noben gen ni skupen vsem virusom. Monofiletski izvor naj bi imele le nekatere večje skupine virusov (266, 267).

Evolucijsko povezavo med evkariontskimi in bakterijskimi virusi podpirajo tudi izsledki raziskave Bamforda in sodelavcev (268), v kateri so s strukturnimi analizami ugotovili skupno enoto v kapsidnih beljakovinah humanega adenovirusa in bakterijskega virusa PRD1. Enako kapsidno enoto so kasneje odkrili tudi pri drugih ikozaedričnih dvojno-vijačnih DNA virusih, bakterijskemu virusu Bam35, več skupinah evkarijontskih virusov (Phycodnaviridae, Iridoviridae, Asfarviridae in Mimiviridae) (269) in nenazadnje tudi v domnevni kapsidni beljakovini arhajskega virusa STV1, ki so ga odkrili v termalnih vrelih Yellowston-a (269, 270). Predvidevajo, da kapsida omenjenih DNA virusov, med njimi tudi adenovirusov, izvira iz kapside virusa, ki je bil prisoten pred ali v času zadnjega univerzalnega celičnega prednika (angl. *last universal cellular ancestor* - LUCA) (271).

Filogenetske raziskave potrjujejo domnevo, da so se adenovirusi pojavili že zelo zgodaj v evoluciji. Predniki adenovirusov naj bi imeli zelo kratek genom, ki je vseboval minimalno število ključnih zapisov o pomnoževanju in preživetju virusa (4). Postopno večanje in razvoj genoma je verjetno posledica različnih mehanizmov, ki so opisani v evoluciji drugih velikih dvojnovijačnih DNA virusov: rekombinacija, zajetje genov, podvojevanje genov, nastajanje novih genov,... (234). Podatkov o prisotnosti adenovirusov pri nevretenčarjih ni, zato predvidevajo, da je najstarejši znan adenovirus WSAAdV-1, ki so ga izolirali iz belega jesetra (4). Evolucijski vzpon adenovirusov ocenjujejo na obdobje pred razcepom njihovih gostiteljev ali kmalu zatem (272). Možnost, da razredi nižjih vretenčarjev posedujejo lastne adenoviruse, bi pomenila, da so adenovirusi obstajali že pred več kot 400 milijoni let, ko naj bi se pričeli razhajati razredi vretenčarjev (273).

Podobnosti, ugotovljene med primerjavami filogenetskih dreves za adenovirusno proteazo in majhno podenoto gostiteljske mitohondrijske ribosomalne RNA, kažejo na skupen razvoj adenovirusov in njihovih gostiteljev (4). Benko in Harrach sta opisala zelo dobro ujemanje virusov z njihovimi gostitelji. Na filogenetskem drevesu adenovirusi človeka in glodavcev zavzemajo podobno mesto kot primati in miši na filogenetskem drevesu gostiteljev. Prav tako so podoben položaj imeli kokošji adenovirusi (FAdV) in različne ptice (4). Klad atadenovirusov je zasedal podoben položaj kot nižji vretenčarji, zato je Harrach predpostavil, da so izvorni gostitelji atadenovirusov plazilci (4,37).

Adenovirusi pri pticah so bili dokazani v treh rodovih: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus* (11,46). Tudi vsi adenovirusi dokazani v naši raziskavi so bili uvrščeni v te tri rodove. Vzorčili smo kloakalne brise ali sveže iztrebke ter v vzorcu določevali prisotnost odseka polimeraze adenovirusov. Predvsem pri pticah pevkah je zaradi majhnosti in ogroženega statusa ključno, da vzorec odvzamemo kar najhitreje in s čim manjšimi posledicami za ptico. Izolacija virusa je zlati standard v virologiji, vendar je izolacija adenovirusov izven skupine FAdV redko uspešna (46.). Z našo raziskavo v vseh primerih ne moremo potrditi, da so bili dokazani adenovirusi vzrok okužbe ptic. Njihova prisotnost v iztrebkih je bila lahko del tranzitne mikroflore. Primer je adenovirus, ki smo ga dokazali pri prepelicah in je bil enak adenovirusu dokazanemu v vzorcu arktičnega sokola, katerega osnovna prehrana so bile prepelice. Podobno lahko zaključimo o dokazanem aviadenovirusu pri dveh mlakaricah in štoklji. Štoklja bi lahko zaužila virus z vodo, ki je bila onesnažena z račjimi iztrebki, vendar je koncentracija virusa v vodi nizka, s tem pa možnost detekcije v iztrebku zelo majhna. V primerih, ko smo dokazali enak virus pri isti vrsti ptice večkrat, pa je okužba bolj verjeten razlog njihovega pojavljanja. Takšni primeri so enaki adenovirusi odkriti pri domačih golobih, papigah, sokolih, zebricah, vrtnih penicah, srpičnih trstnicah, taščicah, kmečkih lastovkah in vijeglavkah.

Aviadenoviruse in siadenoviruse smo dokazali v večini izmed pregledanih redov ptic, zato sklepamo, da so se predhodniki današnjih adenovirusov iz obeh rodov pojavili že zgodaj v evolucijskem obdobju ptic in sicer že v času razcepa ptic na različne redove. Nasprotno so atadenovirusi zastopani zgolj v treh redovih ptic. Predvsem so razširjeni v redu ptic pevk. Tu oblikujejo klade in linije, v katerih je določen tip ugotovljen pri posamezni vrsti ptice. V teh primerih lahko upravičeno predvidevamo, da je vrsta ptice, pri kateri so bili ugotovljeni, tudi

izvorni gostitelj. Ker je zastopanost med drugimi redovi ptic manj številna, sklepamo, da se je prednik dokazanih atadenovirusov pri pticah pevkah pojavil šele v času razcepa reda pevcev v posamezne družine. Predvideni izvorni gostitelji atadenovirusov so luskarji, zato je poznejši pojav atadenovirusov pri pticah verjetno posledica med-razrednega preskoka virusa iz plazilca iz redu luskarja na ptico. Ker so se redovi plojkokljunov, pevk in papig evolucijsko razcepili v različnih obdobjih, je zelo verjetno, da so se preskoki zgodili ločeno.

Na skupen evolucijski razvoj adenovirusov in ptic nakazuje tudi oblikovanje kladov, v katere so uvrščeni tipi virusov, ki smo jih dokazali pri pticah iz iste družine ali reda. Za ptice, ki ne sodijo v omenjeno skupino, domnevamo, da je dokazan adenovirus zgolj naključje zaradi prehrabnih navad, življenjskega okolja ali pa gre za medvrstni preskok virusa.

Nekatere vrste ptic imajo omejen življenjski prostor in živijo dokaj izolirano od drugih vrst. Takšen primer so perutnina v intenzivnih rejah, fazani v fazanerijah in ljubiteljske vrste ptic. Za adenoviruse, ki smo jih dokazali pri teh vrstah ptic, sklepamo, da so njihovi izvorni gostitelji.

Preskoki adenovirusov na novo vrsto so običajno povezani z različnimi boleznimi. Takšen primer je izbruh hemoragične bolezni pri prostoživečih mulastih jelenih (*Odocoileus hemionus*) v Kaliforniji (274) in pojav EDS pri kokoših nesnicah leta 1976 s prenosom DAdV-1 iz rac (108). Pri pticah je, z izjemo intenzivnih rej perutnine, verjetnost odkritja bolezni zaradi medvrstnih ali medrazrednih preskokov adenovirusov majhna. V kolikor bi do preskoka prišlo pri majhnih pticah, bi ta verjetno ostal neopažen, saj je gostota živali v naravi nizka in s tem možnost za širjenje okužbe bistveno manjša (11).

Veliko rezultatov, pridobljenih v raziskavi bi bilo potrebno nadgraditi. Namen raziskave je bil prvenstveno pridobiti podatke o razširjenosti adenovirusov pri pticah v Sloveniji. Raznolikost ugotovljenih virusov in dejstvo, da smo jih potrdili pri večini pregledanih redov ptic pa odpirajo nova vprašanja in področja raziskav. Raziskati je potrebno predvsem, kaj dokaz nukleinske kisline adenovirusov v iztrebku pomeni – ali so le del tranzitne črevesne mikroflore ali je njihov dokaz posledica okužbe, ki lahko privede do kliničnega obolenja. Pri prostoživečih pticah je odvzem vzorca enkratno, ponovitev pa praktično neizvedljiva, zato se bomo morali zanašati na podobne rezultate tudi v prihodnje. Podrobneje pa bi lahko

pojavljanje adenovirusov in njihov vpliv na zdravstveno stanje raziskali pri pticah v ujetništvu, še posebej pri papigah, pri katerih smo dokazali adenoviruse iz vseh treh rodov. Papige so pogosti pacienti v veterinarskih ambulantah, kar daje možnost sistematičnega spremljanja in analize podatkov, ki so potrebni, da bi ustrezno povezali vključenost adenovirusov v patološke procese pri pticah.

5.2 SKLEPI

- V raziskavo smo vključili 1281 ptic 112 različnih vrst iz 13 različnih redov. Zajeli smo prostoživeče ptice, ljubiteljske vrste ptic in gojeno perutnino. Najtežje je pridobiti vzorce prostoživečih živali. Ptice pevke smo lovili s pomočjo napeva (ptičjega petja), reproduciranega s kasetofonom. Lovili smo jih v najlonske mreže. Na takšen način smo pregledali vzorce 44 vrst ptic, predvsem pevk. Glede na veliko vrstno raznolikost lahko zaključimo, da je tehnika izlova primerna za vzorčenje prostoživečih ptic, predvsem iz redu pevk.
- Serološka diagnostika, ki se najpogosteje uporablja za epidemiološke raziskave pri pticah, je v primeru adenovirusov zelo omejena. Obstaja namreč zelo veliko različnih serotipov adenovirusov, običajno pa imamo na voljo le majhno količino seruma, predvsem pri majhnih pticah pevkah. Molekularne metode so zato praktično edini način, s katerim lahko ugotovimo prisotnost adenovirusov pri majhnih pticah. V Sloveniji kot tudi drugod po svetu pojavljanje adenovirusov pri pticah na osnovi molekularnih tehnik še ni bila raziskana v takšnem obsegu.
- Za odkrivanje adenovirusov smo v laboratorijsko diagnostiko vpeljali molekularno tehniko vgnezditive PCR z začetnimi oligonukleotidi in postopkom, kot ga je opisal Wellehan in sodelavci (2004). Metoda je cenovno ugodna, specifična in občutljiva ter kot takšna primerna tudi za pregledovanje večjega števila vzorcev. Test, ki ga je opisal Meulemans s sodelavci (2004), se je izkazal kot primernejši za diagnostiko FAdV, ni pa primeren za diagnostiko adenovirusov izven te skupine.
- Med 1281 preiskanimi vzorci smo adenoviruse potrdili v 233 vzorcih. Dokazali smo 87 različnih tipov adenovirusov, od tega jih 76 še ni bilo opisanih. Do sedaj so bili adenovirusi z molekularnimi tehnikami potrjeni le pri 11 vrstah ptic, z našo raziskavo smo virus potrdili pri 54 vrstah ptic, pri 43 vrstah smo virus potrdili prvič. Sklepamo lahko, da je opisana metoda zelo primerna za dokazovanje prisotnosti adenovirusov in ugotavljanje novih tipov adenovirusov pri vrstah ptic, pri katerih še niso bili dokazani.
- Med 626 pregledanimi prostoživečimi pticami, smo potrdili adenovirusno nukleinsko kislino v 139 vzorcih (22,2 %). V rod *Aviadenovirus* je bilo uvrščenih 45 (7,2 %), v rod *Siadenovirus* 52 (8,3 %) in v rod *Atadenovirus* 42 (6,7 %). Sklepamo, da je med prostoživečimi pticami pojavljanje adenovirusov med posameznimi rodovi

primerljivo. Pregledali smo 317 vzorcev dvoriščne perutnine, med katerimi je bilo pozitivnih 25 vzorcev (7,9 %), od tega je bilo 13 (4,1 %) aviadenovirusov in 12 (3,8 %) siadenovirusov. Atadenovirusov v tej skupini ptic nismo potrdili. Sklepamo, da je pojavnost adenovirusov med dvoriščno perutnino nizko. Pojavnost aviadenovirusov in siadenovirusov je med dvoriščno perutnino primerljiva, medtem ko atadenovirusov nismo potrdili. Izmed 338 vzorcev, ki smo jih odvzeli ljubiteljskim pticam, je bilo 69 vzorcev (20,4 %) pozitivnih na prisotnost adenovirusov. Petnajst (4,4 %) je bilo aviadenovirusov, 48 (14,2 %) siadenovirusov in 6 (1,8 %) atadenovirusov. Sklepamo lahko, da je pojavnost adenovirusov med ljubiteljskimi vrstami ptic visoka. Prevladujejo siadenovirusi, manj je aviadenovirusov in atadenovirusov.

- Ugotovili smo, da se pojavljanje adenovirusov razlikuje med posameznimi pregledanimi redovi ptic. Pojavljanje pri plojkokljunih je bilo 5,1 %, pri kurah 9,8 %, pri golobih 72,7 %, pri močvirnikih 10,0 %, pri ujedah 39,0 %, pri pobrežnikih 12,5 %, pri vpijatih 66,7 %, pri plezalcih 18,2 % pri pevcih 15,4 % ter pri papigah 14,2 %. V redu sov, žerjavovcev in veslonožcev adenovirusne nukleinske kisline nismo ugotovili. Sklepamo lahko, da je pojavnost adenovirusov največja pri pticah iz reda golobov, vpijatirov, in ujed, predvsem sokolov. V nasprotju z našimi pričakovanji je njihova pojavnost najnižja pri kurah in plojkokljunih.
- V intenzivni reji perutnine smo potrdili adenoviruse v primerih izbruha hemoragičnega enteritisa pri puranih in izbruhov inkluzijskega hepatitisa pri piščancih brojlerjih. Dokazali smo, da so lahko nekatere vrste prostoživečih ptic ali dvoriščne perutnine rezervoar tipov adenovirusov, ki so pomembni patogeni v intenzivni vzreji perutnine. Kot prvi smo dokazali DAdV-1 pri prostoživeči mlakarici in TAdV-3 pri pavu in kokoši dvoriščne reje.
- Aviadenoviruse in siadenoviruse smo potrdili v skoraj vseh preiskanih rodovih ptic, zato sklepamo, da imajo ptice z omenjenima rodovoma skupno evolucijsko pot. Atadenoviruse smo ugotovili le v štirih izmed trinajstih preiskanih redov ptic. Večina atadenovirusov je bila ugotovljenih v redu ptic pevk. V literaturi zasledimo, da so osnovni gostitelji atadenovirusov plazilci, natančneje red luskarjev. Tudi rezultati naših preiskav to teorijo potrjujejo. Menimo, da je prisotnost atadenovirusov pri pticah

posledica medrazrednega preskoka adenovirusa med pticami in nekim drugim razredom vretenčarjev, najverjetneje plazilci.

- Raziskave potrjujejo hipotezo, da je lahko ena vrsta ptic okužena z več različnimi tipi adenovirusov. Ugotovili smo tudi, da je lahko ena vrsta ptic okužena z adenovirusi iz dveh ali celo vseh treh rodov. Vse tri rodove adenovirusov smo potrdili pri kmečki lastovki, kosu, srpični trstnici, rumenem vrtniku, črnoglavki, poljskem vrabcu in nimfi.
- Filogrami aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo adenovirusov prikazujejo razvrstitev ugotovljenih virusov v tri rodove: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus*. Prav tako lahko določimo vrste in večino tipov adenovirusov, z izjemo adenovirusov v skupini FAdV, kjer smo za natančnejšo določitev uporabili bolj variabilen gen, ki kodira hekson. Gen za polimerazo se je izkazal kot uporaben za proučevanje filogenetskih odnosov med različnimi adenovirusi.
- Ugotovili smo, da veliko kladov sestavljajo sevi adenovirusov, ki smo jih odkrili pri isti vrsti ptice ali med pticami, ki so uvrščene v isto družino. Ugotovili smo tudi isti tip virusa pri različnih ptičjih vrstah, ki pa si delijo habitat ali so v odnosu plenilec – plen. Predvidevamo, da je prišlo v teh primerih do medvrstnega horizontalnega prenosa virusa preko hrane oziroma primernega medija v okolju (voda) ali pa je virus del tranzitne mikroflore.

6 POVZETEK

Družino Adenoviridae sestavlja pet rodov: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* in *Ichtadenovirus*. Domnevajo, da gre za zelo stare viruse, ki so se hkrati s svojimi gostitelji spreminjali tekom evolucije. Adenovirusi so bili dokazani pri gostiteljih vseh glavnih razredov vretenčarjev. Pri pticah so dokazani adenovirusi iz rodov *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* in *Atadenovirus*. Večina adenovirusov pri pticah ne povzroča kliničnih bolezenskih znakov, nekateri med njimi pa povzročajo bolezni, ki so poznane in se pojavljajo predvsem v intenzivni reji perutnine. Najpogosteje opisane so inkluzijski hepatitis, sindrom zaostale tekočine v osrčniku, razjede mišičnega želodca, sindrom padca nesnosti, hemoragični enteritis, bolezen marmorirane vranice ter različna respiratorna obolenja. Omenjene bolezni so podrobno opisane v literaturi, medtem ko je podatkov o pojavljanju adenovirusov pri drugih vrstah ptic malo.

V raziskavi smo preučevali prisotnost in epidemiologijo adenovirusov med pticami v Sloveniji. Vzorce smo odvzeli različnim vrstam prostoživečih ptic, ljubiteljskim pticam in perutnini. Z izjemo poginulih živali iz intenzivnih rej perutnine ter ustreljenih mlakaric smo vzorčili žive živali. Za preiskavo smo s sterilno vatenko odvzeli kloakalni bris. V kolikor smo ocenili, da bi lovljenje živali povzročilo prekomeren stres ali možnost poškodb, smo z vatenko vzorčili svež iztrebek. Ptice, ki smo jih ujeli v najlonske mreže s pomočjo napeva, smo klinično pregledali, ornitolog pa jim je pričvrstil obroček, določil vrsto, spol in starost ter izmeril telesno maso in dolžino peruti. Pri golečih se pticah je zapisal potek golitve. Vzorce smo odvzeli tudi prostoživečim pticam, ki smo jih oskrbeli v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete. Prav tako je vzorce odvezel veterinar prostoživečim pticam, oskrbljenim v Zatočišču za živali prosto živečih vrst. V raziskavo smo vključili tudi različne vrste domače perutnine. Na različnih območjih Slovenije smo vzorčili kokoši, purane, pavje purane, pegatke, pave, fazane, japonske prepelice, kitajske prepelice, domače race, mandarinke, moškatne bleščavke in gosi. Vzorce ljubiteljskih vrst ptic smo zbirali v Ambulanti za ptice, male sesalce in plazilce, vzorčili pa smo tudi ljubiteljske ptice v živalskih vrtovih in živalskem vrtu podobnih prostorih. Poleg navedenih ptic smo opravili raziskavo tudi pri fazanih iz vseh štirih večjih slovenskih fazanerij ter sokolih istega rejca na dveh različnih lokacijah. Vzorce smo shranjene v sterilne vzorčne posodice hranili pri -20°C do nadaljnjih preiskav.

Adenoviruse smo dokazovali s tehniko vgnezditevne PCR. Molekularna metoda predstavlja metodo izbire predvsem pri majhnih prostoživečih pticah. Za dokaz adenovirusov smo uporabljali par zunanjih (polRouter/polFouter) in par notranjih (polRinner/polFinner) začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo 324 bp velik odsek gena za DNA polimerazo po postopku, ki ga je opisal Wellehan s sodelavci (38). Za natančnejšo razvrstitev adenovirusov, predvsem pri perutnini, smo vse ugotovljene aviadenoviruse pregledali tudi z metodo PCR z uporabo začetnih parov oligonukleotidov HexonA/HexonB, ki pomnožuje 897 bp dolg variabilen odsek gena za hekson (182). Dobljena nukleotidna in aminokislinska zaporedja smo analizirali in obdelali s programi iz programskega paketa Lasergene (DNASTAR, ZDA). Nukleotidna zaporedja smo uredili s programom Seqman. Nukleotidna zaporedja delnih genov za adenovirusno polimerazo smo pretvorili v aminokislinska zaporedja s pomočjo programa ExPASy translate tool (SIB, Švica). Pri poravnavi več zaporedij smo uporabili program MultAlin (235). S paketom BioEdit smo v FASTA formatu oblikovali lastno podatkovno zbirko, ki je vsebovala že objavljene sekvence in lastne sekvence.

Za filogenetske izračune smo uporabljali orodja v paketu PHYLIP. Za izračun sorodnosti pridobljenih sekvenc smo uporabili program za analizo oddaljenosti (angl. *distance analysis*), ki poleg zaporedja omogoča tudi vpogled v medsebojno podobnost preiskovanih genov ali beljakovin. Sorodnost je sorazmerna z dolžino vej filogenetskega drevesa.

V programu DNADIST smo za posamezne pare nukleotidnih zaporedij uporabili Kimurov dvoparametrični evolucijski model (237). V programu PROTDIST smo za izračun matrike razdalj parov aminokislinskih zaporedij uporabili model kategorij (angl. *categories model*). Kot distančni model smo v programu FITCH uporabili metodo Fitch-Margoliash (238).

Z metodo samovzorčenja (angl. *bootstrapping*) s programom SEQBOOT (239) smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves in vrednosti "bootstrap" vpisali na vozlišča dreves.

Za grafično predstavitev topologije drevesa delnih sekvenc gena za adenovirusno polimerazo smo uporabili program TREEVIEW (240) in za delne sekvence gena za hekson program Mega, različica 5 (241). Dokončno smo filogenetsko drevo grafično oblikovali v programu Microsoft Office PowerPoint 2003.

Adenoviruse smo s tehniko vgnezditive PCR ugotovili pri 233 (18,2 %) pticah izmed 1281 preiskanih.

Izmed 626 vzorčenih prostoživečih ptic, ki pripadajo 66 vrstam iz 10 redov, smo adenoviruse potrdili v 139 vzorcih (22,2 %). Izmed teh je bilo v rod *Aviadenovirus* uvrščenih 45 (7,2 %), v rod *Siadenovirus* 52 (8,3 %) in v rod *Atadenovirusov* 42 (6,7 %) dokazanih virusov. Vzorce smo odvzeli 317 pticam dvoriščne perutnine, ki pripadajo 12 vrstam iz 2 redov. Adenoviruse smo potrdili v 25 vzorcih (7,9 %), od tega je bilo 13 (4,1 %) aviadenovirusov in 12 (3,8 %) siadenovirusov. Atadenovirusov v tej skupini ptic nismo ugotovili.

Pregledali smo tudi 338 vzorcev ljubiteljskih ptic, razvrščenih v 34 vrst in 5 redov. V tej skupini je bilo 69 vzorcev (20,4 %) pozitivnih. Med njimi je bilo 15 (4,4 %) aviadenovirusov, 48 (14,2 %) siadenovirusov in 6 (1,8 %) atadenovirusov.

Ugotovili smo, da se pojavljanje adenovirusov razlikuje med posameznimi redovi ptic. Pri plojkokljunih je bila pojavnost 5,1 %, pri kurah 9,8 %, golobih 72,7 %, močvirnikih 10,0 %, ujedah 39,0 %, pobrežnikih 12,5 %, vpijatih 66,7 %, plezalcih 18,2 %, pevcih 15,4 % in pri papigah 14,2 %. V redu sov, žerjavovcev in veslonožcev adenovirusov nismo potrdili. Največ opisov o pojavnosti adenovirusov je pri kokoših in drugih vrstah perutnine, predvsem racah, zato so rezultati naše raziskave presenetljivi. V obeh redovih, pri plojkokljunih in kurah, smo namreč ugotovili najnižji odstotek ptic pozitivnih na adenoviruse.

Adenovirusi, ki smo jih potrdili, so bili uvrščeni v 87 različnih tipov adenovirusov, med katerimi 76 tipov še ni bilo opisanih (Slika 16, 17).

Adenoviruse smo dokazali pri 54 vrstah ptic. Po nam dosegljivih podatkih iz literature so bili do sedaj adenovirusi potrjeni z molekularnimi metodami le pri 11 vrstah ptic. V naši raziskavi smo kar pri 43 vrstah ptic adenoviruse potrdili prvi.

V intenzivnih rejah perutnine smo se osredotočili na dokazovanje adenovirusov v primerih suma na adenovirusne okužbe. Ob dveh ločenih izbruhih hemoragičnega enteritisa pri puranih smo uspešno dokazali TAdV-3. Prav tako smo uspešno dokazali inkluzijski hepatitis pri piščancih brojlerjih ob dveh ločenih izbruhih. Povzročitelja sta bila različna tipa iz skupine FAdV (FAdV-8b in nedeterminiran adenovirus iz skupine *FAdV-D*).

Vse viruse iz rodu *Aviadenovirus* smo preiskali tudi z začetnim parom nukleotidov HexonA/HexonB, ki pomnožujeta variabilno regijo heksona. Pridobili smo 6 nukleotidnih zaporedij, primernih za filogenetsko analizo. Ugotovili smo, da je omenjeni par začetnih oligonukleotidov primeren za pomnoževanje in natančnejše določanje tipa FAdV, je pa njuna uporaba zelo omejena pri virusih izven te skupine. Vseh virusov FAdV, ki smo jih odkrili pri kokoših, nismo uspeli umestiti med 12 poznanih tipov FAdV. Verjetno bi morali raziskave razširiti in uporabiti še druge pare začetnih oligonukleotidov.

V literaturi je pogosto omenjena hipoteza o skupnem evolucijskem razvoju adenovirusov z njihovimi gostitelji. V naši raziskavi smo ugotovili, da veliko kladov sestavljajo sevi adenovirusov, ki smo jih odkrili pri isti vrsti ptice, ali pri pticah, ki so uvrščene v isto družino. Predvsem veljajo te ugotovitve za predstavnike v rodu *Aviadenovirus* in *Siadenovirus*. Prav tako smo viruse iz obeh rodov ugotovili v večini pregledanih ptičjih redov. Ti podatki potrjujejo domnevo o skupnem evolucijskem razvoju virusa in gostitelja.

V rodu *Atadenovirus* smo ugotovili adenoviruse le v 4 od 13 pregledanih redov ptic. To kaže, da so se verjetno ugotovljeni atadenovirusi pojavili v večini redov ptic šele nedavno in izhaja njihov izvorni gostitelj iz drugega razreda vretenčarjev, predvidoma so to luskarji. Največje število pozitivnih vzorcev na prisotnost atadenovirusov smo ugotovili pri pticah pevkah. Sklepamo, da se je preskok virusa pri pevkah dogodil že dlje v preteklosti, še pred evolucijskim razcepom na posamezne družine in rodove.

Ugotovili smo tudi, da so se in se verjetno še vedno dogajajo preskoki adenovirusov med posameznimi vrstami ptic. Rezultati naših raziskav kažejo na verjetne preskoke pri vrstah ptic, ki si delijo skupen habitat ali so v odnosu plenilec – plen.

V raziskavi smo potrdili hipotezo, da je lahko ena vrsta ptic okužena z več različnimi tipi adenovirusov. Ugotovili smo tudi, da je lahko ena vrsta ptic okužena z adenovirusi iz dveh ali celo vseh treh rodov. Vse tri rodove adenovirusov smo potrdili pri kmečki lastovki, kosu, srpični trstnici, rumenem vrtniku, črnoglavki, poljskem vrabcu in nimfi.

Dvoriščna perutnina in prostoživeče ptice so lahko pomemben rezervoar različnih patogenih agensov ali njihovi prenašalci v intenzivne reje perutnine. V naši raziskavi smo potrdili virus DAdV-1 (povzročitelj sindroma padca nesnosti) pri mlakarici in virus

TAdV-3 (povzročitelj hemoragičnega enteritisa puranov) pri kokoši in pavu iz ekstenzivne, dvoriščne reje. Po nam znanih podatkih gre za prvo neposredno molekularno potrditev obeh adenovirusov pri pticah ali perutnini, ki ne izvirajo iz intenzivnih rej. V rejah dvoriščne perutnine smo tudi dokazali več tipov FAdV, ki v intenzivni reji kokoši povzročajo različna obolenja, predvsem inkluzijski hepatitis. Izsledki raziskave potrjujejo, da so lahko različne vrste prostoživečih ptic in dvoriščne perutnine pomemben rezervoar različnih adenovirusnih okužb in lahko pomenijo dejansko in neprestano nevarnost za vnos virulentnih adenovirusov v intenzivno rejo perutnine.

7 SUMMARY

Family *Adenoviridae* is currently divided into five accepted genera: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* and *Ichtadenovirus*. It is believed that adenoviruses are ancient viruses that have largely co-speciated with their hosts in the course of evolution. Adenoviruses are proved to exist in every major class of vertebrates.

Adenoviruses from genera *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* and *Atadenovirus* have been already confirmed in birds. Most adenoviruses are considered to be non-pathogenic for bird hosts, but some of them are well-known to cause various diseases, especially in intensive poultry industry. Diseases caused by adenoviruses that are most often diagnosed in poultry are inclusion body hepatitis, hydropericardium syndrome, gizzard erosions, egg drop syndrome, hemorrhagic enteritis, marble spleen disease and various respiratory diseases. These diseases are well described in literature, however there are very few data about the prevalence of adenoviruses in other bird species.

In our study, the prevalence and epidemiology of adenoviruses in birds in Slovenia were studied. Samples from various free-living birds, cage birds and poultry were taken. With the exception of dead animals from intensive poultry farms and shot mallards, live animals were sampled. Cloacal swabs were taken with a sterile swab. In cases where we concluded that sampling of cloacal swabs would result in excessive stress or enhanced possibilities for injuries, fresh feces were sampled. Birds captured in nylon nets were clinically examined. The ornithologist fixed the ring, determined the sex, species and age and measured the body weight and the length of the wings. Moreover, samples from free-living birds that were found debilitated or injured were taken at Clinic for birds, reptiles and small mammals of Veterinary Faculty and at Shelter for free-living animals. Additionally, various backyard poultry species in various regions of Slovenia were sampled. Cloacal swabs were taken from hens, turkeys, ocellated turkeys, guinea fowls, peacocks, pheasants, Japanese quails, Chinese painted quails, ducks, mandarine ducks, muscovy ducks and geese. Cloacal swabs of cage birds were taken at Clinic for birds, reptiles and small mammals and at zoos. Twenty-five pheasants from each of the four major pheasantries in Slovenia were also sampled. The falcons sampled belong to a single farm but live in two different locations. All samples were collected into sterile collection tubes and stored at -20°C until testing. Adenoviruses were detected using the

consensus nested PCR. This molecular method represents the method of choice for proving the presence of adenoviruses especially in free-living birds. Outer primers polRouter/polFouter and inner primers polRinner/polFinner were used. Applying this method by the protocol described by Wellehan et al. (37), a 324 bp long product of the DNA polymerase gene. For a more detailed classification of poultry aviadenoviruses samples were reexamined by PCR using HexonA/HexonB primers targeting a 897 bp fragment of the variable hexon gene (179). The obtained nucleotide and predicted amino acid sequences were further analyzed by the Lasergene software (DNASTAR, USA). Nucleotide sequences were assembled and edited by the Seqman software. Nucleotide sequences of partial adenovirus polymerase genes were converted to amino acids by the ExPASy translate tool (SIB, CH). For multiple sequence alignment the MultAlin program was used (234). The BioEdit package was employed to make homology search on our own database containing both priorly published and our new sequences.

Phylogenetic calculations were carried out using the programs of the PHYLIP package. The sequence similarity was computed using the distance matrix analysis program, which is very informative because it gives not only the clustering but also the extent of similarity of the studied genes, which is proportional to the branch length.

In the DNADIST programme, Kimura's two parameter evolution model (236) was used. In the PROTDIST programme, the category model based was applied. In the FITCH programme, the Fitch-Margoliash method with global rearrangements for phylogenetic tree reconstruction was used.

Bootstrapping (SEQBOOT, DNADIST, FITCH, CONSENSE) was applied to hexon gene analysis to see the probability of the calculated topology.

For the visualization of the results of the polymerase gene calculations the TREEVIEW programme (239) was used and Mega 5 was used for the visualization of the results of the hexon gene calculations (240). The final formatting of phylogenetic trees was done in Microsoft Office Powerpoint 2003.

In total, 1281 samples were examined, among them 233 (18.2%) were positive for the presence of adenoviruses.

Of 626 samples of free-living birds belonging to 66 species and 10 orders, 139 (22.2%) samples were positive for adenoviruses: 45 (7.2%) were aviadenoviruses, 52 (8.3%) siadenoviruses and 42 (6.7%) atadenoviruses.

Of 317 samples of backyard flock birds belonging to 12 species and 2 orders, 25 (7.9%) were positive for adenoviruses: 13 (4.1%) were aviadenoviruses and 12 (3.8%) siadenoviruses; no atadenoviruses were confirmed in this group of birds.

Finally, 338 samples of cage birds belonging to 34 species and 5 orders were examined. Adenoviruses were found in 69 (20.4%) samples: 15 (4.4%) were aviadenoviruses, 48 (14.2%) siadenoviruses and 6 (2.1%) atadenoviruses.

The prevalence of adenoviruses confirmed in our study varied among various orders of birds. The prevalence was 5.1% in Anseriformes, 9.8% in Galliformes, 72.7% in Columbiformes, 10.0% in Ciconiiformes, 39.0% in Falconiformes, 12.5% in Charadriiformes, 66.7% in Coraciiformes, 18.2% in Piciformes, 15.4% in Passeriformes and 14.2% in Psittaciformes. Adenoviruses were not found in the limited number of samples from orders Strigiformes, Gruiformes and Pelecaniformes.

Some of the results in our study are quite surprising since in the literature, most data about the prevalence of adenoviruses in birds come from various reports on chickens and other domestic poultry, especially ducks. In our study, orders Galliformes and Anseriformes had the lowest percentage of positive samples found.

The 233 adenoviruses detected in our study clustered in 87 different types. Seventy-six of them were detected for the first time.

Adenoviruses in our study were detected in 54 bird species. For 43 species, our study provides the first confirmation of their presence by molecular methods.

In the samples from intensive poultry production we focused on confirming the presence of adenoviruses in the cases where infection was suspected. At two different outbreaks of turkey hemorrhagic enteritis, TAdV-3 was successfully confirmed. There were also two cases of

confirmed inclusion body hepatitis in a broiler chicken integration. The causative agents were two different FAdV types (FAdV-8b and undetermined type from species *FAdV-D*).

All aviadenoviruses found by nested PCR targeting the adenoviral DNA polymerase gene were also examined by PCR applying primers HexonA/HexonB that amplify the variable region of hexon in FAdVs. Six hexon sequences of appropriate quality for phylogenetic analysis were obtained. We concluded that primers HexonA/HexonB are very useful for accurate analysis of FAdV types, but have a very limited value for aviadenoviruses that are not FAdV. Interestingly, some of the FAdV types confirmed in our study could not be identified as any of the 12 known FAdV types. Probably our study should be expanded and several different primers should be used.

The identity of adenoviruses occurring in Slovenia has not been studied to date. In order to get an insight in the prevalence of adenoviruses in birds and their phylogenetic relationships, part of the DNA polymerase gene was amplified, the nucleotide sequence determined and the predicted amino acid sequences used in phylogenetic calculations. A more detailed characterization of the found fowl adenoviruses was achieved by amplifying and sequencing also part of the hexon gene.

The hypothesis of coevolution of adenoviruses and their hosts is well represented in the literature. In our study, many clades consisted of adenovirus strains that were confirmed in a single bird species or in different bird species from the same family. This observation particularly holds for genera *Aviadenovirus* and *Siadenovirus*. Adenoviruses from both aforementioned genera were confirmed in almost every order of birds sampled, which confirms the hypothesis of coevolution of adenoviruses and their hosts.

Atadenoviruses were found only in four bird orders out of thirteen examined. It is very likely that atadenoviruses have some other primary hosts, most likely reptiles from order Squamata. Their presence in different bird species is probably a result of several recent inter-class host switches. Most atadenoviruses were found in various species of passeriformes birds. We hypothesize that the host switch to passeriformes may have occurred before the evolutionary split of birds to different families and genera.

It can also be concluded that interspecies host switches did occur in the past and that they probably still occur. Most likely, they are a result of different ways of horizontal spreading through water or in animals that are in prey–predator relationship. The results also confirmed our hypothesis that a single bird species can harbor different adenoviruses from two or even all three adenovirus genera. Adenoviruses from all three genera were confirmed in barn swallows, blackbirds, reed warblers, icterine warblers, blackcaps, Eurasian tree sparrows and in cockatiels.

Backyard poultry and free-living birds can be an important reservoir of many different pathological agents or a connecting link in the transmission between them and intensively reared poultry. DAdV-1 in mallards and TAdV-3 in domestic hen and peacock have been confirmed. To the best of our knowledge, these are the first molecular confirmations of both adenoviruses outside the intensively reared poultry. In our study various FAdV types that cause various diseases in intensively reared poultry, especially inclusion body hepatitis, have been confirmed in backyard flocks. The results of our study indicate that various species of free-living birds and backyard poultry can be an important reservoir of adenovirus pathogens and may mean an actual and constant danger for the industrial poultry rearing.

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se Agenciji za raziskovalno dejavnost RS, Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo za financiranje usposabljanja do doktorata.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Olgi Zorman Rojs za podporo in zaupanje v ideje, naklonjenost, skrb in spodbudo, ki sem jih, še posebej proti koncu, zelo potreboval.

Hvala prof. dr. Darji Barlič Maganja za poglobljen pregled mojega dela in vse napotke, ki so mi v času zaključevanja dela še kako prav prišli.

Hvala prof. dr. Alenki Dovč za vso spodbudo, pomoč in lepe besede.

Hvala prof. dr. Petru Hostniku za vse konstruktivne pripombe v nalogi iz zornega kota, ki ga sam nisem odkril.

Hvala dr. Tomiju Trilarju, ki mi je odprl pogled onstran meje veterinarske medicine. Napisan stavek ali dva za vzpodbudo sta mi pomenila več kot si mogoče mislil. Hvala za zaupanje.

Velik kamen od srca se je odlepil dr. Brigiti Slavec, ko smo zaključili z laboratorijskim delom... Hvala ti za ves čas, trud in enostavno razlago zapletenih stvari. Lepo je bilo delati s tabo.

Iskreno se zahvaljujem vsem na Veterinarsko medicinskem raziskovalnem inštitutu v Budimpešti, da ste me sprejeli medse. Predvsem bi se zahvalil prof. dr. Balázsu Harrachu za vse dolge ure potrpežljivega učenja in urejanja podatkov ter vse modre nasvete, ki ste mi jih namenili. Občudujem vašo zagnanost in čut za sočloveka. Hvala Moniki Ballmann za nesebično in neutrudno pomoč, potrpežljivost ter prijetno družbo. Prav tako bi se rad zahvalil dr. Gyözu Kajánu in prof. dr. Márii Benkö za vse lepe besede in pomoč na področju kokošnjih adenovirusov.

Hvala doc. dr. Jožkotu Račniku za vse zamisli, pomoč in zaupanje. Za veliko stvari v tem delu sem ti hvaležen in verjamem, da brez tvojega nalezljivega zanosa ne bi začel stopati po tej poti.

Hvala Cvetki Mahold za vso podporo in pomoč v času izdelovanja naloge. Lepo je imeti ob sebi nekoga z urejenimi podatki.

Za skrben pregled in natančnost citirane literature se zahvaljujem mag. Brigiti Grecs-Smole. Prav tako se za vso pomoč in knjižnične usluge zahvaljujem Stanislavi Ujc in Slavici Sekulič.

Za vso pomoč in podporo se zahvaljujem vsem drugim zaposlenim na IZVPE, predvsem doc. dr. Urošu Krapežu za številne napotke in pomoč ter Darji Krelj in Lidiji Dežman za dolge ure dela v laboratoriju.

Hvala tudi Tei Poljanec za neutrudno pomoč v laboratoriji. Zahvalil bi se Petri Bandelj, Petru Maričiću, Maji Čonč in vsem drugim veterinarjem, gojiteljem in znancem, ki ste mi pomagali pri vzorčenju ter kako drugače.

Za lektoriranje besedila sta poskrbela Alja Ferme in doc. dr. Sašo Živanović. Upam, da so izgubljene ure plesa že nadoknadene. Hvala vama.

Delu sta končen izgled oblikovala Andrej Likar in Maja Čonč. Hvala.

Naj se na koncu zahvalim še vsem drugim, ki so mi pomagali, pa jih nisem omenil.

Predvsem seveda moji družini, ki ni izgubila upanja, ki se je morala marsičemu odreči in potrpeti, da je lahko nastalo to delo. Hvala vam za vso vzpodbudo in pomoč.

9 LITERATURA

1. Benkő M, Élő P, Ursu K, et al. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* 2002; 76(19): 10056–9.
2. Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003; 84(11): 2895–908.
3. Harrach B, Benko M. Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. In: Wold WSM, Tollefson AE, eds. *Adenovirus Methods and Protocols*. 2nd ed. Vol. 2: Ad proteins, RNA, lifecycle, host interactions, and phylogenetics. (Methods in molecular medicine, Vol. 131). Totowa: Human Press, 2007: 299–334.
4. Benkő M, Harrach B. Molecular evolution of adenoviruses. In: Compans RW, Cooper MD, Koprowski H, Melchers F, Olsnes S, Vogt PK, eds. *Current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Springer Verlag, 2003: 3–35.
5. Kovács ER, Jánoska M, Dán A, Harrach B, Benko M. Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit. *J Virol Methods* 2010; 163(2): 262–8.
6. Wellehan JFX, Greenacre CB, Fleming GJ, Stetter MD, Childress AL, Terrell SP. Siadenovirus infection in two psittacine bird species. *Avian Pathol* 2009; 38(5): 413–7.
7. Kovács ER, Benko M. Confirmation of a novel siadenovirus species detected in raptors: partial sequence and phylogenetic analysis. *Virus Res* 2009; 140(1/2): 64–70.
8. Harrach B, Meehan BM, Benkő M, Adair BM, Todd D. Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 1997; 229(1): 302–8.
9. Harrach B. Adenoviruses: general features. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, eds. *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2008: 1–9.
10. McConnell CD, Adair B, Fitzgerald SD. Avian adenoviruses. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. Ames: Blackwell Publishing, 2008: 252–66.
11. Fitzgerald SD. Avian adenoviruses. In: Thomas, NJ, Hunter BD, Atkinson CT, eds. *Infectious diseases of wild birds*. Ames: Blackwell Publishing, 2007: 182–93.
12. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84(3): 570–3.
13. Harrach B, Benkő M, Both GW, et al. Family *Adenoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature*

- of viruses. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2011: 125–141.
14. Benkő M, Harrach B, Russell WC. Family *Adenoviridae*. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al., eds. Virus taxonomy. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, San Diego: Academic Press, 2000: 227–38.
 15. San Martín C, Burnett RM. Structural studies on adenoviruses. In: Compans RW, Cooper MD, Koprowski H, Melchers F, Olsnes S, Vogt PK, eds. Current topics in microbiology and immunology. Berlin: Springer Verlag, 2003: 57–94.
 16. Belnap DM, Steven AC. “Déjà vu all over again”: the similar structures of bacteriophage PRD1 and adenovirus. *Trends Microbiol* 2000; 8(3): 91–3.
 17. Benson SD, Bamford JK, Bamford DH, Burnett RM. Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. *Cell* 1999; 98(6): 825–33.
 18. Klempa B, Krüger DH, Auste B, et al. A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. *J Virol* 2009; 83(11): 5749–59.
 19. Mase M, Mitake H, Inoue T, Imada T. Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene. *J Vet Med Sci* 2009; 71(9): 1239–42.
 20. Maizel JV, White DO, Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 1968; 36(1): 115–25.
 21. Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 1998.
 22. Chroboczek J, Ruigrok RW, Cusack S. Adenovirus fiber. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 199: 163–200.
 23. Gelderblom H, Maichle-Lauppe I. The fibers of fowl adenoviruses. *Arch Virol* 1982; 72: 289–98.
 24. Chiocca S, Kurzbauer R, Schaffner G, Baker A, Mautner V, Cotten M. The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *J Virol* 1996; 70(5): 2939–49.
 25. Toogood CI, Crompton J, Hay RT. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* 1992; 73(6): 1429–35.

26. Rux JJ, Burnett RM. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *J Am Soc Gene Therapy* 2000; 1(1): 18–30.
27. Hindley CE, Lawrence FJ, Matthews DA. A Role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA. *Traffic* 2007; 8(10): 1313–22.
28. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 2009; 90(1): 1–20.
29. Kovacs E. Siadenoviruses: a comparative molecular and phylogenetic study. Budapest: Eotvos Lorand University, 2011. Doktorska dizertacija.
30. Petterson U. Structural and nonstructural adenovirus proteins. In: Ginsberg HS, ed. *The adenoviruses*. New York: Plenum Press, 1984: 35–125.
31. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotech* 1999; 10(5): 440–7.
32. Rauschhuber C, Noske N, Ehrhardt A. New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 2011; 91(1): 2–9.
33. Kreppel F, Kochanek S. Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol* 2004; 78(1): 9–22.
34. Ruben M, Bacchetti S, Graham F. Covalently closed circles of adenovirus 5 DNA. *Nature* 1983; 301(5896): 172–4.
35. Tashiro F, Niwa H, Miyazaki J. Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. *Hum Gene Ther* 1999; 10(11): 1845–52.
36. Harrach B. Available adenovirus sequences Budapest: Veterinary Medical Research Institute. 12.4.2012 (19.3.2012); <http://www.vmri.hu/~harrach/ADENOSEQ.HTM>.
37. Harrach B. Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Vet Hung* 2000; 48(4): 485–90.
38. Wellehan JFX, Johnson AJ, Pessier AP, et al. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol* 2004; 78(23): 13366–9.
39. Benkö M, Harrach B. A proposal for a new (third) genus within the family *Adenoviridae*. *Arch Virol* 1998; 143(4): 829–37.
40. Both GW. Atadenovirus. In: Tidona CA, Darai G, eds. *The Springer index of viruses*. Berlin: Springer-Verlag, 2002: 2–8.

41. Davison AJ, Harrach B. Genus Siadenovirus. In: Tidona CA, Darai G, eds. *The Springer index of viruses*. Berlin: Springer-Verlag, 2002: 29–33.
42. Benkő M, Harrach B, Both GW, et al. Family *Adenoviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy*. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Elsevier, 2005: 213–28.
43. Davison AJ, Wright KM, Harrach B. DNA sequence of frog adenovirus. *J Gen Virol* 2000; 81(10): 2431–9.
44. Pierson FW, Fitzgerald SD. HEV and related infections. In: Saif Y, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008: 276–86.
45. Arnberg N, Edlund K, Kidd AH. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 2000; 74(1): 42–8.
46. Fitzgerald SD, Adair BM, Smyth JA, Reed WM, Jack WM. Adenovirus infections. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008: 251–90.
47. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000; 81(11): 2573–604.
48. Robinson C, Echavarria M. Adenoviruses. In: Murray PR, Baron EY, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington: AMS Press, 2007: 1589–600.
49. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005: 533–9.
50. Hostnik P. Izbrana poglavja iz veterinarske virologije (Učno gradivo za študente 2. letnika Veterinarske fakultete). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2007: 5–7.
51. Täuber B, Dobner T. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* 2001; 278(1/2): 1–23.
52. Adair BM, McFerran JB, Connor TJ, McNulty MS, McKillop ER. Biological and physical properties of a virus (strain 127) associated with the egg drop syndrome 1976. *Avian Pathol* 1979; 8(3): 249–64.
53. Lu YS, Lin DF, Tsai HJ, et al. Outbreaks of egg drop syndrome 1976 in Taiwan and isolation of the etiological agent. *J Chin Soc Vet Sci* 1985; 11: 157–65.
54. McFerran JB. Adenoviruses of vertebrate animals. In: Kurstak E, Kurstak C, eds. *Comparative diagnoses of viral disease III*. New York: Academic Press, 1981: 102–65.

55. Bouquet JF, Moreau Y, McFerran JB, Connor TJ. Isolation and characterisation of an adenovirus isolated from Muscovy ducks. *Avian Pathol* 1982; 11(2): 301–7.
56. Zorman Rojs O. Virusne bolezni perutnine. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2006: 75–89.
57. Barr DA, Scott P. Adenoviruses and IBH. In: Proceedings of the 2nd Asian/Pacific Poultry Health Conference. Sydney: University of Sydney, 1988: 323–6.
58. Jones RC, Georgiou K. Experimental infection of chickens with adenoviruses isolated from tenosynovitis. *Avian Pathol* 1984; 13(1): 13–23.
59. Howell J, MacDonald DW, Christian RG. Inclusion body hepatitis in chickens. *Can Vet J* 1970; 11(5): 99–101.
60. Macpherson I, McDougall JS, Laursen-Jones AP. Inclusion body hepatitis in a broiler integration. *Vet Rec* 1974; 95: 286–9.
61. McFerran JB, McCracken RM, Connor TJ, Evans RT. Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol* 1976; 5(4): 315–24.
62. Gomis S, Goodhope AR, Ojkic AD, Willson P. Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. *Avian Dis* 2006; 50(4): 550–5.
63. Zdravec M, Slavec B, Krapež U, et al. Inclusion body hepatitis associated with fowl adenovirus type 8b in broiler flock in Slovenia: a case report. *Slov Vet Res* 2011; 48(3/4): 107–13.
64. Zdravec M, Slavec B, Krapež U, et al. Inclusion body hepatitis (IBH) outbreaks in broiler chickens in Slovenia. In: IX Peradarski dani 2011. Zagreb: Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, 2011: 36–9.
65. De Herdt P, Ducatelle R, Lepoudre C, Charlier G, Nauwynck H. An epidemic of fatal hepatic necrosis of viral origin in racing pigeons (*Columba livia*). *Avian Pathol* 1995; 24(3): 475–83.
66. Vereecken M, De Herdt P, Ducatelle R. Adenovirus infections in pigeons: a review. *Avian Pathol* 1998; 27(4): 333–8.
67. Weissenbock H, Fuchs A. Histological and ultrastructural characterisation of hepatic intranuclear inclusion bodies in psittacine birds and pigeons. *Avian Pathol* 1995; 24(3): 507–21.
68. Ramis A, Marlasca MJ, Majo N, Ferrer L. Inclusion body hepatitis (IBH) in a group of eclectus parrots (*Eclectus roratus*). *Avian Pathol* 1992; 21(1): 165–9.

69. Capua I, Liberti L, Gough RE, Casaccia C, Asdrubali G. Isolation and characterization of an adenovirus associated with inclusion body hepatitis in psittacine birds. *Avian Dis* 1995; 41(3): 526–30.
70. Wellehan JFX, Johnson AJ, Latimer KS, Bischoff K, Lafortune M, Jacobson ER. Identification and initial characterization of an adenovirus associated with fatal hepatic and lymphoid necrosis in a Meyer's parrot (*Poicephalus meyeri*). *J Avian Med Surg* 2005; 19(3): 191–7.
71. Soike D, Hess M, Prusas C, Albrecht K. Adenovirus infections in psittacines. *Tierarztl Prax K* 1998; 26(5): 354–9.
72. Scarlata E, Salguero JJ, Hervás J, et al. Filamentous intranuclear inclusion bodies in psittacine birds: a structural and ultrastructural study. *Zentralbl Veterinarmed B* 1999; 46(6): 375–80.
73. Droual R, Woolcock PR, Nordhausen RW, Fitzgerald SD. Inclusion body hepatitis and hemorrhagic enteritis in two African grey parrots (*Psittacus erithacus*) associated with adenovirus. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7(1): 150–4.
74. Scott PC, Condrón RJ, Reece RL. Inclusion body hepatitis associated with adenovirus-like particles in a cockatiel (Psittaciformes; *Nymphicus hollandicus*). *Aust Vet J* 1986; 63(10): 337–8.
75. Pass DA. Inclusion bodies and hepatopathies in psittacines. *Avian Pathol* 1987; 16(4): 581–97.
76. Gómez-Villamandos JC, Mozos E, Sierra MA, Pérez J, Mendez A. Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the intestine of a psittacine bird affected by inclusion body hepatitis. *J Wildl Dis* 1992; 28(2): 319–22.
77. Raue R, Gerlach H, Müller H. Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV). *Arch Virol* 2005; 150(10): 1933–43.
78. Schelling SH, Garlick DS, Alroy J. Adenoviral hepatitis in a merlin (*Falco columbarius*). *Vet Pathol* 1989; 26(6): 529–30.
79. Schrenzel M, Oaks JL, Rotstein D, et al. Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3402–13.
80. Tomaszewski EK, Phalen DN. Falcon adenovirus in an American kestrel (*Falco sparverius*). *J Avian Med Surg* 2007; 21(2): 135–9.
81. Sileo L, Franson JC, Graham DL, Domermuth CH, Rattner BA, Pattee OH. Hemorrhagic enteritis in captive American kestrels (*Falco sparverius*). *J Wildl Dis* 1983; 19(3): 244–7.

82. Forbes NA, Simpson GN, Higgins RJ, Gough RE. Adenovirus infection in Mauritius kestrels (*Falco punctatus*). *Avian Med Surg* 1997; 11(1): 31–3.
83. Dean J, Latimer KS, Oaks JL, Schrenzel M, Redig PT, Wünschmann A. Falcon adenovirus infection in breeding Taita falcons (*Falco fasciinucha*). *J Vet Diagn Invest* 2006; 18(3): 282–6.
84. Zsivanovits P, Monks DJ, Forbes NA, Ursu K, Raue R, Benkö M. Presumptive identification of a novel adenovirus in a Harris hawk (*Parabuteo unicinctus*), a Bengal eagle owl (*Bubo bengalensis*), and a Verreaux's eagle owl (*Bubo lacteus*). *J Avian Med Surg* 2006; 20(2): 105–12.
85. Kumar R, Kumar V, Asthana M, Shukla SK, Chandra R. Isolation and identification of a fowl adenovirus from wild black kites (*Milvus migrans*). *J Wildl Dis* 2010; 46(1): 272–6.
86. Reece RL, Pass DA, Butler R. Inclusion body hepatitis in a tawny frogmouth (*Podargus strigoides*: Caprimulgiformes). *Aust Vet J* 1985; 62(12): 426.
87. Singh A, Oberoi MS, Singh B. Pathogenicity of quail's inclusion body hepatitis virus (avian adenovirus-1) for Japanese quails and broiler chicks. *Vet Res Commun* 1995; 19(6): 545–51.
88. King DJ, Pursglove SR, Davidson WR. Adenovirus isolation and serology from wild bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis* 1981; 25(3): 678–82.
89. Bradley GA, Shupe MR, Reggiardo C, Noon TH, Lozano-Alarcon F, Bicknell EJ. Inclusion body hepatitis in Gambel's quail (*Callipepla gambelii*). *J Wildl Dis* 1994; 30(2): 281–4.
90. Riddell C. Viral hepatitis in domestic geese in Saskatchewan. *Avian Dis* 1984; 28(3): 774–82.
91. Guy JS, Schaeffer JL, Barnes HJ, Schaeffer AJL, Barnesb HJ. Inclusion-body hepatitis in day-old turkeys. *Avian Dis* 1988; 32(3): 587–90.
92. Barnes JS, Guy HJ. Characterization of an avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis in day-old turkeys. *Avian Dis* 1997; 41(3): 726–31.
93. Jaffery MS. A treatise on Angara disease in chickens. *Pak Vet Med Assoc* 1988: 1–34.
94. Hafez M. Avian adenoviruses infections with special attention to inclusion body hepatitis/ hydropericardium syndrome and egg drop syndrome. *Pak Vet J* 2010; 31(2): 85–92.
95. Naeem K, Akram HS. Hydropericardium syndrome outbreak in a pigeon flock. *Vet Rec* 1995; 136(12): 296–7.

96. Ivanics E, Palya V, Markos B, et al. Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings *Acta Vet Hung* 2010; 58(1): 47–58.
97. Roy P, Vairamuthu S, Sakthivelan SM, Purushothaman V. Hydropericardium syndrome in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Vet Rec* 2004; 155(9): 273–4.
98. Abe T, Nakamura K, Tojo T, Yuasa N. Gizzard erosion in broiler chicks by group I avian adenovirus. *Avian Dis* 2001; 45(1): 234–9.
99. Ono M, Okuda Y, Yazawa S, et al. Epizootic outbreaks of gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. *Avian Dis* 2010; 45(1): 268–75.
100. Ono M, Okuda Y, Yazawa S, et al. Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. *Vet Pathol* 2003; 40(3): 294–303.
101. Okuda Y, Ono M, Shibata I, Sato S. Pathogenicity of serotype 8 fowl adenovirus isolated from gizzard erosions of slaughtered broiler chickens. *J Vet Med Sci* 2004; 66(12): 1561–6.
102. Manarolla G, Pisoni G, Moroni P, Gallazzi D, Sironi G, Rampin T. Adenoviral gizzard erosions in Italian chicken flocks. *Vet Rec* 2009; 164(24): 754–6.
103. Marek A, Schulz E, Hess C, Hess M. Comparison of the fibers of Fowl adenovirus A serotype 1 isolates from chickens with gizzard erosions in Europe and apathogenic reference strains. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22(6): 937–41.
104. Domanska-Blicharz K, Tomczyk G, Smietanka K, Kozaczynski W, Minta Z. Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions. *Poultry Sci.* 2011; 90(5): 983–9.
105. Charlton BR, Bickford AA. Gross and histologic lesions of adenovirus group I in guinea fowl. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7(4): 552–4.
106. Olson NO. A respiratory disease (bronchitis) of quail caused by a virus. In: *Proc 54th Annu Meet US Livestock Sanit Assoc.* 1950: 171–4.
107. May CL. Adult coturnix quail bronchitis. *Avian Dis* 1979; 24(2): 520–6.
108. Van Eck JH, Davelaar FG, Heuvel-Plesman TA, Van Kol N, Kouwenhoven B, Guldie FH. Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. *Avian Pathol* 1976; 5(4): 261–72.
109. Smyth J. A study of the pathology and pathogenesis of egg drop syndrome (EDS) virus infection in fowl. Belfast: The Queen's University of Belfast, 1988. Doktorska dizertacija.

110. Bartha A. Dropped egg production in ducks associated with adenovirus infection. *Avian Pathol* 1984; 13(1): 119–26.
111. Der Tyan L, YaFang L, TienLai H. A serological survey and viral isolation of egg drop syndrome in domestic laying ducks in Taiwan. *Taiwan Vet J* 2002; 28: 32–7.
112. Liu MRS. Occurrence and pathology of rough and thin shelled eggs in ducks. *J Chin Soc Vet Sci* 1986; 12: 65–76.
113. Das BB, Pradhan HK. Outbreaks of egg drop syndrome due to EDS-76 virus in quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Vet Rec* 1992; 131(12): 264–5.
114. Watanabe T, Ohmi H. Susceptibility of guinea fowl to the virus of infectious laryngotracheitis and egg drop syndrome. *J Agric Sci* 1976; 28: 193–200.
115. Bidin Z, Lojkić I, Mikec M, Pokrić B. Naturally occurring egg drop syndrome infection in turkeys. *Acta Vet Brno* 2007; 76(3): 415–21.
116. Zenella A, Di Donato A, Nigrelli A, Poli G. Egg drop syndrome (EDS 76). Etiopathogenesis, epidemiology, immunology and control of the disease. *Clin Vet* 1980; 103: 459–69.
117. Pomeroy BS, Fenstermacher R. Hemorrhagic enteritis in turkeys. *Poult Sci* 1937; 16: 378–82.
118. Rautenschlein S, Suresh M, Neumann U, Sharma JM. Comparative pathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) infection in turkeys and chickens. *J Comp Pathol* 1998; 119(3): 251–61.
119. Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF. Hemorrhagic enteritis virus induced changes in the lymphocyte subpopulations in turkeys and the effect of experimental immunodeficiency on viral pathogenesis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 48(3/4): 233–48.
120. Suresh M, Sharma JM. Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus. *J Virol* 1996; 70(1): 30–6.
121. van den Hurk JV. Efficacy of avirulent hemorrhagic enteritis virus propagated in turkey leukocyte cultures for vaccination against hemorrhagic enteritis in turkeys. *Avian Dis* 1990; 34: 26–35.
122. Opengart K, Eyre P, Domermuth CH. Increased numbers of duodenal mucosal mast cells in turkeys inoculated with hemorrhagic enteritis virus. *Am J Vet Res* 1992; 53(5): 814–9.
123. Massi P, Gelmett D, Sironi G, Dottori M, Lavazza A, Pascucci S. Adenovirus-associated haemorrhagic disease in guinea fowl. *Avian Pathol* 1995; 24: 227–37.

124. Gomez-Villamandos JC, Muías JM, Hervas J, De Lara FC, Perez J, Mozos E. Spleno-enteritis caused by adenovirus in psittacine birds: a pathological study. *Avian Pathol* 1995; 24(3): 553–63.
125. Mackie JT, Black D, Prior H. Enteritis associated with adenovirus-like particles in captive lorikeets. *Aust Vet J* 2003; 81(5): 293–5.
126. Mandelli G, Rinaldi A, Cervio G. A disease involving the spleen and lungs in pheasants: epidemiology, symptoms, and lesions. *Clin Vet (Milano)* 1966; 89: 129–38.
127. Mayeda B, West GB, Bickford AA, Cho BR. Marble spleen disease in pen-raised pheasants in California. *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. Madison, 1982: 261–70.
128. Fitzgerald SD, Reed WM. A review of marble spleen disease of ring-necked pheasants. *J Wildl Dis* 1989; 25(4): 455–61.
129. Bygrave AC., Pattison M. Marble spleen disease in pheasants (*Phasianus colchicus*). *Vet Rec* 1973; 92: 534–5.
130. Fadly AM., Cowen BS., Nazerian K. Some observations on the response of ring-necked pheasants to inoculation with various strains of cell-culture-propagated type II avian adenovirus. *Avian Dis* 1988; 32: 548–52.
131. Cowen BS, Rothenbacher H, Schwartz LD, Braune MO, Owen RL. A case of acute pulmonary edema, splenomegaly, and ascites in guinea fowl. *Avian Dis* 1988; 32: 151–6.
132. Katoh H, Ohya K, Kubo M, Murata K, Yanai T, Fukushi H. A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of *Siadenovirus*. *Virus Res* 2009; 144(1/2): 294–7.
133. Riddell C, den Hurk JV, Copeland S, Wobeser G. Viral tracheitis in goslings in Saskatchewan. *Avian Dis* 1992; 36(1): 158–63.
134. Brash ML, Swinton JN, Weisz A, Ojkić D. Isolation and identification of duck adenovirus 1 in ducklings with proliferative tracheitis in Ontario. *Avian Dis* 2009; 53: 317–20.
135. Kaján GL, Stefancsik R, Ursu K, Palya V, Benko M. The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1. *Virus Res* 2010; 153(2): 226–33.
136. Crespo R, Shivaprasad HL, Droual R, Chin RP, Woolcock PR, Carpenter TE. Inclusion body tracheitis associated with avian adenovirus in turkeys. *Avian Dis* 1998; 42(3): 589–96.

137. Capua I, Gough RE, Scaramozzino P, Lelli R, Gatti A. Isolation of an adenovirus from an ostrich (*Struthio camelus*) causing pancreatitis in experimentally infected guinea fowl (*Numida meleagris*). *Avian Dis* 1994; 38(3): 642–6.
138. Gough RE, Drury SE, Capua I, Courtenay AE, Sharp MW, Dick AC. Isolation and identification of adenoviruses from ostriches (*Struthio camelus*). *Vet Rec* 1998; 140(5): 115–6.
139. Hollmén TE, Franson JC, Kilpi M, Docherty DE, Myllys V. An adenovirus associated with intestinal impaction and mortality of male common eiders (*Somateria mollissima*) in the Baltic Sea. *J Wildl Dis* 2003; 39(1): 114–20.
140. Jacobson ER, Gardiner C, Clubb S. Adenovirus-like infection in white-masked lovebirds (*Agapornis personata*). *Assoc Avian Vet* 1989; 1: 32–4.
141. Seok SH, Park JH, Cho SA, Park JH. Idiopathic intranuclear inclusion bodies in the renal tubular epithelia of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Vet Sci* 2005; 6(1): 75–6.
142. Lowenstine LJ, Fry DM. Adenovirus-like particles associated with intranuclear inclusion bodies in the kidney of a common murre (*Uria aalge*). *Avian Dis* 1985; 29(1): 208–13.
143. Fanke J, Wibbelt G, Krone O. Mortality factors and diseases in free-ranging Eurasian cranes (*Grus grus*) in Germany. *J Wildl Dis* 2011; 47(3): 627–37.
144. Okita M. Pathology of adenovirus in the kidney of budgerigars. *Jpn J Vet Res* 1989; 37(2): 128.
145. Mori F, Touchi A, Suwa T, Itakura C, Hashimoto A, Hirai K. Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the kidneys of psittacine birds. *Avian Pathol* 1989; 18(1): 197–202.
146. Tsai SS, Park JH, Iqbal BM, Ochiai K, Hirai K, Itakura C. Histopathological study on dual infections of adenovirus and papovavirus in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Pathol* 1994; 23(3): 481–7.
147. Leighton FA. Adenovirus-like agent in the bursa of Fabricius of herring gulls (*Larus argentatus pontoppidan*) from Newfoundland, Canada. *J Wildl Dis* 1984; 20(3): 226–30.
148. Gallina AM, Winterfield RW, Fadly AM. Adenovirus infection and disease. II. Histopathology of natural and experimental disease. *Avian Dis* 1973; 17: 343–53.
149. Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol* 2000; 29(3): 195–206.

150. Alexander HS, Huber P, Cao J, Krell PJ, Nagy E. Growth characteristics of fowl adenovirus type 8 in a chicken hepatoma cell line. *J Virol Methods* 1998; 74(1): 9–14.
151. Adair BM. Studies on the development of avian adenoviruses in cell cultures. *Avian Pathol* 1978; 7(4): 541–50.
152. Adair BM., Curran WL, McFerran JB. Ultrastructural studies of the replication of fowl adenoviruses in primary cell cultures. *Avian Pathol* 1979; 8(2): 133–44.
153. Hess M, Prusas C, Vereecken M, De Herdt P. Isolation of fowl adenoviruses serotype 4 from pigeons with hepatic necrosis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1998; 111(4): 140–2.
154. Scott M, McFerran JB. Isolation of adenoviruses from turkeys. *Avian Dis* 1972; 16: 412–20.
155. McFerran JB, Smyth JA. Avian adenoviruses. *Rev Sci Tech* 2000; 19(2): 589–601.
156. Adair BM, McFerran JB, Calvert VM. Development of a microtitre fluorescent antibody test for serological detection of adenovirus infection in birds. *Avian Pathol* 1980; 9(3): 291–300.
157. Grimes TM, King DJ, Kleven SH, Fletcher OJ. Involvement of a type-8 avian adenovirus in the etiology of inclusion body hepatitis. *Avian Dis* 1977; 21(1): 26–38.
158. Monreal G, Dorn R, Kassim M. Detection of neutralizing antibodies against avian adenoviruses by a microtiter cell culture system. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1980; 93(7): 125–8.
159. van den Hurk JV. Propagation of hemorrhagic enteritis virus in normal (nontumor derived) cell culture. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 307.
160. van den Hurk JV. Propagation of group II avian adenoviruses in turkey and chicken leukocytes. *Avian Dis* 1990; 34(1): 12–25.
161. Domermuth CH, Gross WB, DuBose RT, Douglass CS, Reubush JCB. Agar gel diffusion precipitin test for hemorrhagic enteritis of turkeys. *Avian Dis* 1972; 16: 852–7.
162. Domermuth CH, Gross WB, DuBose RT. Microimmunodiffusion test for hemorrhagic enteritis of turkeys. *Avian Dis* 1973; 17: 439–44.
163. Ianconescu M, Smith EJ, Fadly AM., Nazerian K. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hemorrhagic enteritis virus and associated antibodies. *Avian Dis* 1984; 28(3): 677–92.
164. van den Hurk JV. Quantitation of hemorrhagic enteritis virus antigen and antibody using enzyme-linked immunosorbent assays. *Avian Dis* 1986; 30(4): 662–71.

165. Silim A, Thorsen J. Hemorrhagic enteritis: virus distribution and sequential development of antibody in turkeys. *Avian Dis* 1981; 25(2): 444–53.
166. Saunders GK, Pierson FW, van den Hurk JV. Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol* 1993; 22(1): 47–58.
167. Fitzgerald SD, Reed WM, Burnstein T. Detection of type II avian adenoviral antigen in tissue sections using immunohistochemical staining. *Avian Dis* 1992; 36(2): 341–7.
168. Takai S, Higashihara M, Matumoto M. Purification and hemagglutinating properties of egg drop syndrome 1976 virus. *Arch Virol* 1984; 80(1): 59–67.
169. McFerran JB. Adenovirus. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, eds. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kennel Square, Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1998: 100–5.
170. Clemmer DI, Ichinose H. The cellular site of virus replication in the intestine of chicks infected with an avian adenovirus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1968; 25(3): 277–87.
171. McFerran JB, Connor TJ, Adair BM. Studies on the antigenic relationship between an isolate (127) from the egg drop syndrome 1976 and a fowl adenovirus. *Avian Pathol* 1978; 7(4): 629–36.
172. McFerran JB, McCracken RM, McKillop ER, McNulty MS, Collins DS. Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland. *Avian Pathol* 1978; 7(1): 35–47.
173. Todd D, McNulty MS. Biochemical studies on a virus associated with egg drop syndrome. *J Gen Virol* 1976; 40: 63–75.
174. Zsák L, Kisary J. Some biological and physico-chemical properties of egg drop syndrome (EDS) avian adenovirus strain B8/78. *Arch Virol* 1981; 68(3/4): 211–9.
175. Zsák L, Kisary J. Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by BamHI and HindIII. *Intervirology* 1984; 22(2): 110–4.
176. Guy JS, Barnes HJ. Characterization of an avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis in day-old turkeys. *Avian Dis* 1997; 41(3): 726–31.
177. Ramis A, Latimer KS, Niagro FD, Campagnoli RP, Ritchie BW, Pesti D. Diagnosis of psittacine beak and feather disease (PBFD) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA in situ hybridization. *Avian Pathol* 1994; 23(4): 643–57.

178. Goodwin MA, Latimer KS, Resurreccion RS, Miller PG, Campagnoli RP. DNA in situ hybridization for the rapid diagnosis of massive necrotizing avian adenovirus hepatitis and pancreatitis in chicks. *Avian Dis* 1996; 40(4): 828–31.
179. Latimer KS, Niagro FD, Williams OC, et al. Diagnosis of avian adenovirus infections using DNA in situ hybridization. *Avian Dis* 1997; 41(4): 773–82.
180. Allan GM, Todd D, Smyth JA, Mackie DP, Burns J, McNulty MS. In situ hybridization: an optimised detection protocol for a biotinylated DNA probe renders it more sensitive than a comparable 35S-labelled probe. *J Virol Methods* 1989; 24(1/2): 181–90.
181. Xie Z, Fadl AA, Girshick T, Khan MI. Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction. *Avian Dis* 1999; 43(1): 98–105.
182. Meulemans G, Couvreur B, Decaesstecker M, Boschmans M, Van Den Berg TP. Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 2004; 33(2): 164–70.
183. Raue R, Hess M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J Virol Methods* 1998; 73(2): 211–7.
184. Hess M, Raue R, Hafez HM. PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. *J Virol Methods* 1999; 81: 199–203.
185. Thomson D, Meers J, Harrach B. Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res* 2002; 83(1/2): 189–95.
186. Hanson LA, Rudis MR, Vasquez-Lee M, Montgomery RD. A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virol J* 2006; 3(28): 28.
187. Kaján GL, Sameti S, Benko M. Partial sequence of the DNA-dependent DNA polymerase gene of fowl adenoviruses: a reference panel for a general diagnostic PCR in poultry. *Acta Vet Hung* 2011; 59(2): 279–85.
188. Katoh H, Ohya K, Fukushi H. Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *J Virol Methods* 2008; 154(1/2): 92–8.
189. Lüscho D, Prusas C, Lierz M, Gerlach H, Soike D, Hafez HM. Adenovirus of psittacine birds: investigations on isolation and development of a real-time polymerase chain reaction for specific detection. *Avian Pathol* 2007; 36(6): 487–94.
190. Romanova N, Corredor JC, Nagy É. Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J Virol Methods* 2009; 159: 58–63.

191. Bradley GA, Shupe MR, Reggiardo C, Noon TH, Lozano-Alarcon F, Bicknell EJ. Inclusion body hepatitis in Gambel's quail (*Callipepla gambelii*). J Wildl Dis 1994; 30(2): 281–4.
192. Wyand DS, Jakowski RM, Burke CN. Marble spleen disease in ring-necked pheasants: histology and ultrastructure. Avian Dis 1972; 16(2): 319–29.
193. Zellen GK, Key DW, Jack SW. Adenoviral pancreatitis in guinea fowl (*Numida meleagris*). Avian Dis 1989; 33(3): 586–9.
194. Desmidt M, Ducatelle R, Uyttebroek E, Charlier G, Hoorens J. Respiratory adenovirus-like infection in a rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*). Avian Dis 1991; 35(4): 1001–6.
195. Tsai SS, Chang TC, Chang GN, Chern RS, Chien MS, Itakura C. Naturally-occurring adenovirus-associated gastrointestinal lesions in coturnix (*Coturnix coturnix*) quail. Avian Pathol 1998; 27(6): 641–3.
196. Bergmann V, Kiupel H. Einschlusskörperchen enteritis bei Tauben, hervorgerufen durch Adeno- und Parvovirus. Arch Exp Vet Med 1982; 36: 445–53.
197. Crespo R, Shivaprasad HL, Droual R, Chin RP, Woolcock PR, Carpenter TE. Inclusion body tracheitis associated with avian adenovirus in turkeys. Avian Dis 1998; 42(3): 589–96.
198. Itakura C, Carlson HC. Electron microscopic findings of cells with inclusion bodies in experimental hemorrhagic enteritis of turkeys. Can J Comp Med 1975; 39: 299–304.
199. El-Attrache J, Villegas P, O'Connor B, Buhr JR, Rowland GN. Adenovirus pathogenicity in immature ostriches. Avian Dis 2001; 45(2): 442–6.
200. McFerran JB, Connor TJ, McCracken RM. Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than domestic fowl. Avian Dis 1976; 20(3): 519–24.
201. Ahmed AAS, El Sisi MA, Saber MS. Ein Beitrag zur epizootologie einer adenoähnlichen virus (CELO)-Infektion beim Geflügel in Agypten. Tierarztl Umsch 1969; 24: 111–2.
202. Chew-Lim M. Adult coturnix quail bronchitis. Avian Dis 1980; 24(2): 520–6.
203. Pascucci S, Quaglio GL, Maestrini N, Prati A. Pancreatite da virus celo nella gallina faraona. Atti Soc Ital Sci Vet 1970; 24: 667–8.
204. Cakala A. Isolation of a Celovirus from pheasants. Med Wet 1966; 22: 261–4.
205. Gough RE, Collins MS, Spackman D. Isolation of a haemagglutinating adenovirus from commercial ducks. Vet Rec 1982; 110(12): 275–6.

206. Csontos L. Isolation of adenovirus from geese. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1967; 17: 217.
207. Kaleta EF. CELO-Virus bei Gänseküken. *Dtsch Tierartzl Wochenschr* 1969; 16: 427–8.
208. Oaks JL, Schrenzel M, Rideout B, Sandfort C. Isolation and epidemiology of falcon adenovirus. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3414–20.
209. Raines AM, Kocan A, Schmidt R. Experimental inoculation of adenovirus in ostrich chicks (*Struthio camelus*). *J Avian Med Surg* 1997; 11(4): 255–9.
210. Wieliczko A, Tomanek B, Kuczkowski M. Prevalence of infectious diseases in ring-necked pheasant flocks in Poland. *Pol J Vet Sci* 2003; 6(3): 177–82.
211. Tham VL, Thies NF. Marble spleen disease of pheasants. *Aust Vet J* 1988; 65(4): 130–1.
212. Tsai HJ, Lee CY. Serological survey of racing pigeons for selected pathogens in Taiwan. *Acta Vet Hung* 2006; 54(2): 179–89.
213. Frölich K, Prusas C, Schettler E, Hafez HM. Antibodies to adenoviruses in free-living common buzzards from Germany. *J Wildl Dis* 2002; 38(3): 633–6.
214. Hollamby S, Sikarskie JG, Stuht J. Survey of peafowl (*Pavo cristatus*) for potential pathogens at three Michigan zoos. *J Zoo Wildl Med* 2003; 34(4): 375–9
215. Malkinson M, Weisman Y. Serological survey for the prevalence of antibodies to egg drop syndrome 1976 virus in domesticated and wild birds in Israel. *Avian Pathol* 1980; 9(3): 421–6.
216. Calnek BW. Hemagglutination-inhibition antibodies against an adenovirus (virus-127) in white pekin ducks in the United States. *Avian Dis* 1978; 22(4): 798–801.
217. McFerran JB, Rowley HM, McNulty MS, Montgomery LJ. Serological studies on flocks showing depressed egg production. *Avian Pathol* 1977; 6(4): 405–13.
218. Kaleta EF, Khalaf SE, Siegmann O. Antibodies to egg-drop syndrome 76 virus in wild birds in possible conjunction with egg-shell problems. *Avian Pathol* 1980; 9(4): 587–90.
219. Bartha A, Meszaros J, Tanyi J. Antibodies against EDS-76 avian adenovirus in bird species before 1975. *Avian Pathol* 1982; 11(3): 511–3.
220. Rampin T, Enice F, Mandelli G. Antibodies against the “B/C” 14 virus antigen in laying and breeding flocks in Italy. *Clin Vet* 1978; 101: 265–72.

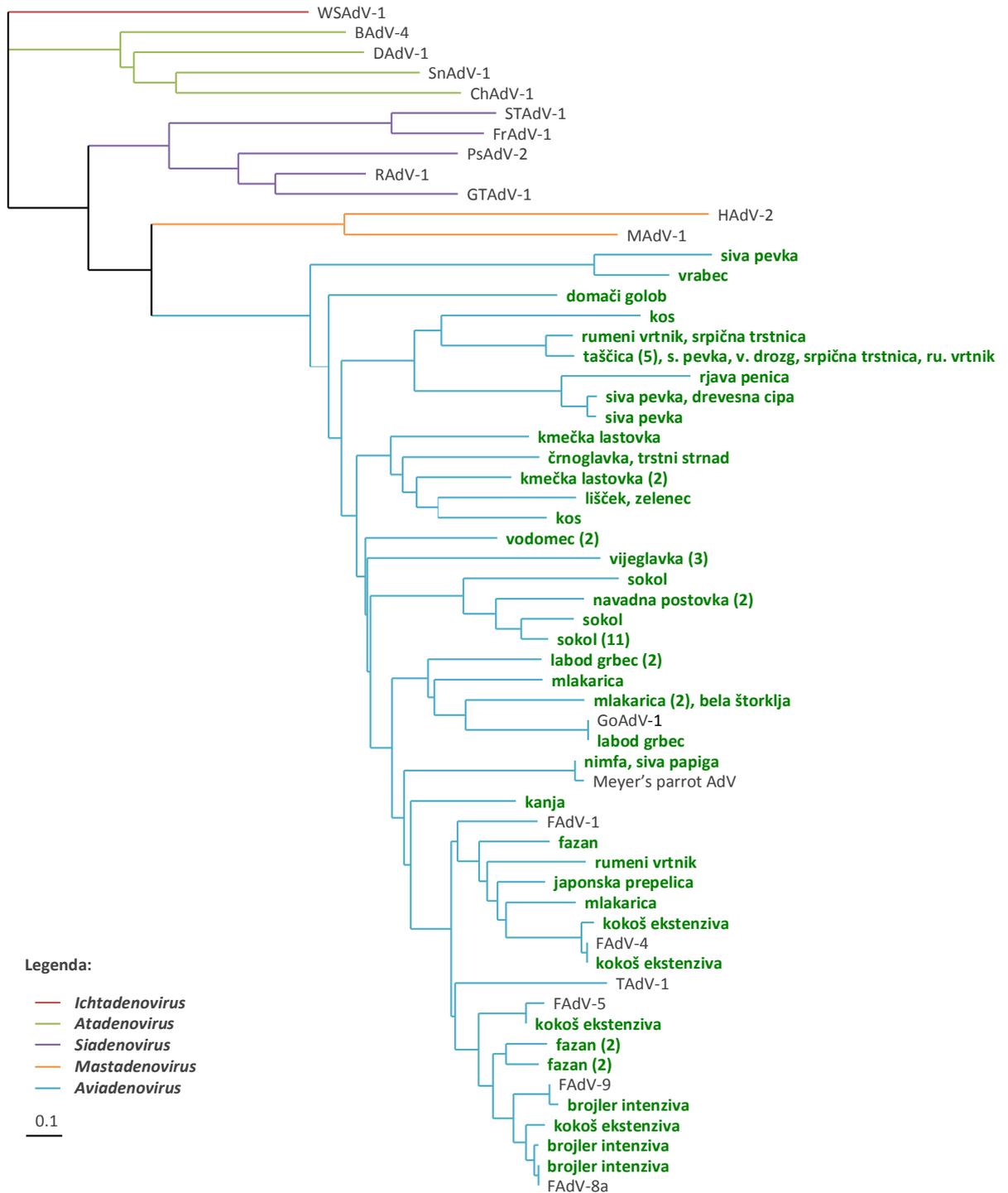
221. Gulka CM, Piela TH, Yates VJ, Bagshaw C. Evidence of exposure of waterfowl and other aquatic birds to the hemagglutinating duck adenovirus identical to EDS-76 virus. *J Wildl Dis* 1984; 20(1): 1–5.
222. Hess M, Blöcker H, Brandt P. The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology* 1997; 238(1): 145–56.
223. Pitcovski J, Mualem M, Rei-Koren, et al. The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 1998; 249(2): 307–15.
224. Park YM, Kim JH, Gu SH, et al. Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica. *Virology* 2012; 422(1): 144–50.
225. Vrati S, Brookes DE, Strike P, Khatri A, Boyle DB, Both GW. Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites. *Virology* 1996; 220(1): 186–99.
226. Dán A, Ruzsics Z, Russell WC, Benkő M, Harrach B. Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (*Atadenovirus*). *J Gen Virol* 1998; 79 (6): 1453–60.
227. Lehmkuhl HD, Cutlip RC. A new goat adenovirus isolate proposed as the prototype strain for goat adenovirus serotype 1. *Arch Virol* 1999; 144(8): 1611–8.
228. Farkas SL, Harrach B, Benko M. Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus *Atadenovirus*. *Virus Res* 2008; 132(1/2): 132–9.
229. Papp T, Fledelius B, Schmidt V, Kaján GL, Marschang RE. PCR-sequence characterization of new adenoviruses found in reptiles and the first successful isolation of a lizard adenovirus. *Vet Microbiol* 2009; 134(3/4): 233–40.
230. Farkas SL, Gal J. First Hungarian report of inclusion body hepatitis associated with adenoviruses and secondary parvovirus infection in an Indonesian pitviper [*Parias (Trimeresurus) hageni*]. *Hung Vet J* 2008; 130: 755–61.
231. Rivera S, Wellehan JFX, McManamon R, et al. Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(4): 415–26.
232. Kovács GM, LaPatra SE, D'Halluin JC, 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* 2003; 98(1): 27–34.

233. Ravantti JJ, Gaidelyte A, Bamford DH, Bamford JKH. Comparative analysis of bacterial viruses Bam35, infecting a gram-positive host, and PRD1, infecting gram-negative hosts, demonstrates a viral lineage. *Virology* 2003; 313(2): 401–14.
234. McGeoch DJ, Davison AJ. Origins of DNA viruses. In: Gibbs AJ, Calisher CH, Garcia-Arenal F, eds. *Molecular bases of virus evolution*. Cambridge: University Press, 1995: 67–75.
235. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 1988; 16(22): 10881–90.
236. Felsenstein J. PHYLIP-phylogeny interface package (Version 3.2). *Cladistics* 1989; 5: 164–6.
237. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16(1330): 111–20.
238. Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees. *Science* 1967; 155(760): 279–84.
239. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39(4): 783–91.
240. Page RDM. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosc* 1996; 12(4): 357–8.
241. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731–9.
242. Hubálek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 2004; 40(4): 639–59.
243. Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res* 2003; 1(1): 5–12.
244. Vrezec A, Tome D, Denac D. Selitev in izjemni selitveni pojavi pri pticah. *UJMA* 2006; 20: 125–36.
245. Jourdain E, Gauthier-Clerc M, Bicout D, Sabatier P. Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into Western Mediterranean wetlands. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3): 365–72.
246. Weber TP, Stilianakis NI. Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8): 1139–43.

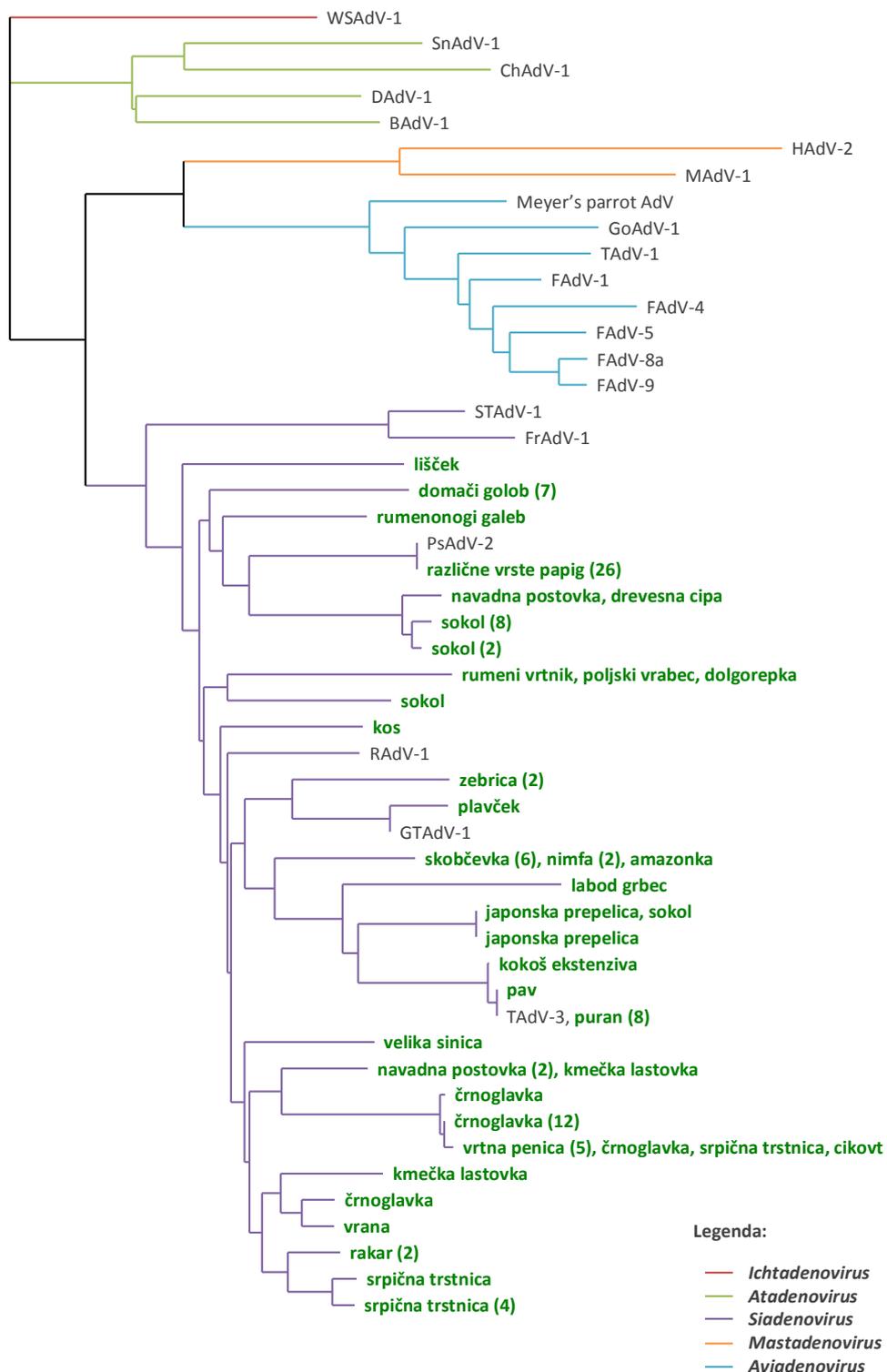
247. Račnik J. Epidemiološka študija aviarne influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2008. Doktorska disertacija.
248. Šere D. Zanimive najdbe na tujem v Sloveniji obročkanih ptičev. *Acrocephalus* 1998; 16: 3–7.
249. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487–91.
250. Jančar T, Bračko F, Grošelj P, et al. Imenik ptic zahodne Palearktike. *Acrocephalus* 1999; 20: 97–162.
251. Svensson L, Mullarney K, Zetterstrom D. Collins bird guide. 2nd ed. London: HarperCollins Publisher, 2009.
252. Božič L. Seznam ugotovljenih ptic Slovenije s pregledom redkih vrst. *Acrocephalus* 2001; 22(106/107): 115–20.
253. Bordjan D, Božič L, Hanžel J, Kravos K, Rubinič B, Vogrin M. Komisija za redkosti. Ljubljana: DOPPS – BirdLife Slovenia, Društvo za opazovanje. http://www.ptice.si/index.php?option=com_content&task=view&id=321&Itemid=14 (10.4.2012).
254. Hansson B, Hasselquist D, Tarka M, Zehindjiev P, Bensch S. Postglacial colonisation patterns and the role of isolation and expansion in driving diversification in a passerine bird. *PLoS ONE* 2008; 3(7): e2794 (15 str.). <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0002794> (10.4.2012).
255. Robinson CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 2011; 11(6): 1208–17.
256. Vidovszky M, Ursu K, Dan A, Ejdersund A, Benkő M, Harrach B. Abundance and genetic diversity of adenoviruses hosted by gulls. In: Majhen D, Ambriović-Ristov A, eds. *Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. 4th Croatian Congress of Microbiology. Zadar: Croatian Microbiology Society, 2008: 33.
257. Wieliczko A, Tomanek B, Kuczkowski M. Prevalence of infectious diseases in ring-necked pheasant flocks in Poland. *Pol J Vet Sci* 2003; 6(3): 177–82.
258. Baxendale W. Egg drop syndrome. *Vet Rec* 1978; 7(20): 189–91.
259. Ivanics E, Palya V, Glavits R, et al. The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings. *Avian Pathol* 2001; 30(3): 201–8.
260. Cook JK, Darbyshire JH. Epidemiological studies with egg drop syndrome-1976 (EDS-76) virus. *Avian Pathol* 1980; 9(3): 437–43.

261. Smyth JA, Platten MA, McFerran JB. A study of the pathogenesis of egg drop syndrome in laying hens. *Avian Pathol* 1988; 17(3): 53–66.
262. Monod JL. *Chance and necessity: an essay on the natural philosophy of modern biology*. London: Collins, 1972.
263. Dawkins R. *Največja predstava na Zemlji: dokaz o evoluciji*. Ljubljana: Modrijan, 2010: 13-50.
264. Desjardins C, Eisen JA, Nene V. New evolutionary frontiers from unusual virus genomes. *Genome Biol* 2005; 6: e212 (4 str.). <http://genomebiology.com/content/16/3/212> (11.4.2012).
265. Firth C, Kitchen A, Shapiro B, Suchard MA, Holmes EC, Rambaut A. Using time-structured data to estimate evolutionary rates of double-stranded DNA viruses. *Mol Biol Evol* 2010; 27(9): 2038–51.
266. Yutin N, Wolf IY, Raoult D, Koonin EV. Eucaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virology* 2009; 6: e223 (12 str.). <http://www.virologyj.com/content/6/1/223> (11.4.2012).
267. Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient virus world and evolution of cells. *Biol Direct* 2006; 1: e29 (28 str.) <http://www.biology-direct.com/1/1/29> (11.4.2012).
268. Bamford D. Do viruses form lineages across different domains of life? *Res Microbiol* 2003; 154(4): 231–6.
269. Benson SD, Bamford JKH, Bamford DH, Burnett RM. Does common architecture reveal a viral lineage spanning all three domains of life? *Mol Cell* 2004; 16(5): 673-85.
270. Rice G, Tang L, Stedman K, et al. The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 101(20): 7716–20.
271. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res* 2006; 117(1): 5–16.
272. Wadell G, Hammaröjöld ML, Winberg G, Varsanyi TM, Sundell G. Genetic variability of adenoviruses. *Ann NY Acad Sci* 1980; 354: 16–42.
273. Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 1998; 392(6679): 917–20.
274. Woods LW, Swift PK, Barr BC, et al. Systemic adenovirus infection associated with high mortality in mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. *Vet Pathol* 1996; 33(2): 125–32.

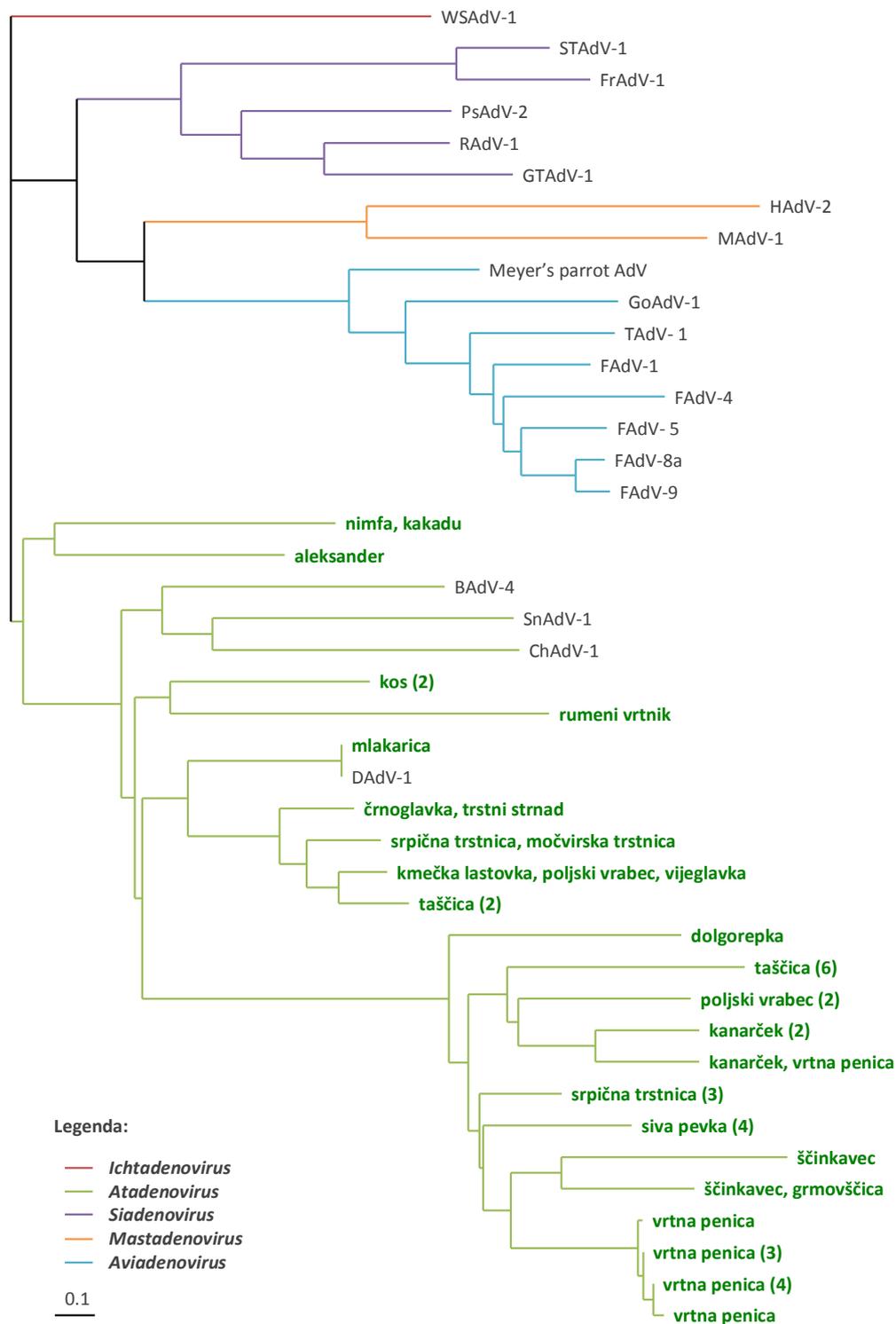
PRILOGE



Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo iz rodu *Aviadenovirus*. Nekoreninjeno filogenetsko drevo, WSAdV-1 je izbrana zunanja skupina. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evolucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerje z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence, število v oklepaju je število identičnih sekvenc pri imenovani vrsti ptice.



Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo iz roda *Siadenovirus*. Nekoreninjeno filogenetsko drevo, WSAdV-1 je izbrana zunanja skupina. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evolucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerje z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence, število v oklepaju je število identičnih sekvenc pri imenovani vrsti ptice.



Filogram aminokislinskih zaporedij odseka za polimerazo iz roda *Atadenovirus*. Nekoreninjeno filogenetsko drevo, WSAdV-1 je izbrana zunanja skupina. Filogenetski izračuni so bili opravljeni s paketom PHYLIP. Uporabili smo metodo ProtDist z evolucijskim vzorcem kategorij. Dolžine vej so sorazmerje z genetskimi razdaljami. Za rekonstrukcijo filogenetskega drevesa smo uporabili metodo Fitch-Margoliash z globalno prerazporeditvijo v programu Fitch. Filogenetsko drevo smo prikazali s programom TreeView. Merilo prikazuje razmerje med številom substitucij in dolžino vej. Zeleno označene so lastne sekvence, število v oklepaju je število identičnih sekvenc pri imenovani vrsti ptice.