

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**ÁLLATOK ÁLTAL HORDOZOTT VÍRUSOK DIVERZITÁSÁNAK VIZSGÁLATA
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI, IMMUNOLÓGIAI ÉS KLASSZIKUS VIROLÓGIAI
MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL**

DR. JAKAB FERENC



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET**

PÉCS, 2018

„Nem értem a tudományos siker fogalmát. Véleményem szerint a siker az, ha az ember elégedett a munkájával. Ha boldog. Legfontosabb a tudomány iránti szenvedély, és ha az megvan, az maga a siker.”

Ada Jonat

PROLÓGUS

„Az ember folyamatos uralmára a Földön a legnagyobb veszélyt a vírus jelenti.” – hangzik el Joshua Lederberg Nobel-díjas kutató híres idézete Wolfgang Petersen *Vírus* című 1995-ös filmjének első percében. A mondat, amely meghatározta nemcsak az azt követő filmélményt, de talán azóta is sokak fülében cseng egy-egy híradás hallatán. Persze a szakmaiságot sokszor nélkülöző, a valóságtól néha teljesen elrugaszkodott hollywoodi alkotás azért a laikus néző számára maga volt az igazi tudomány. Félelmet keltett, elgondolkodtatott vagy éppen elvarázsolt. *Elvarázsolt*, és talán emberi sorsokat, életeket határozott meg akkor, amikor fiatalon, a tinédzser éveinek utolsó perceit taposó diák, gimnáziumi tanulmányaiból a mikrobiológia néhány apró morzsáját épp csak felcsipegetve először pillanthatott bele ebbe a csodálatos világba. Ma már tudja: a tudomány ennél sokkal több, mégis az idő múlását meghazudtoló módon, töretlen lelkesedéssel és soha el nem múló izgatottsággal tekint az ismeretlenség világába nap mint nap.

Pécs, 2018. november 25.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE és FAJLISTA	5
BEVEZETÉS	11
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
Vizsgálatainkban szereplő vírussaládok bemutatása	
1.1. Rágcsálók által hordozott vírusok	12
1.1.1 <i>Hantaviridae</i> család – Hantavírusok	12
1.2. Ízeltlábúak által terjesztett vírusok	15
1.2.1 <i>Nairoviridae</i> család	15
1.2.2 <i>Flaviviridae</i> család	18
1.2.2.1 Kullancsenkefalitisz vírus	18
1.2.2.2 Nyugat-nílusi vírus	19
1.2.2.3 Usutu vírus	20
1.3. Denevérek és vírusaik	21
1.3.1 <i>Astroviridae</i> család	21
1.3.2 <i>Caliciviridae</i> család	22
1.3.3 <i>Picornaviridae</i> család (<i>Mischivirus</i> nemzettség)	23
1.3.4 <i>Coronaviridae</i> család	24
1.3.5 <i>Parvoviridae</i> család	25
1.3.6 <i>Filoviridae</i> család	25
2. CÉLKITŰZÉSEK	27
3. ANYAGOK és MÓDSZEREK	28
3.1. Vizsgálati minták gyűjtése	28
3.1.1 Rágcsáló minták gyűjtése	28
3.1.2 Ízeltlábú vektorok (kullancsok, szúnyogok) gyűjtése	28
3.1.3 Humán vérminták gyűjtése	29
3.2. Molekuláris biológiai módszerek	30
3.2.1 Nukleinsav preparálás	30
3.2.2 RT-PCR, qRT-PCR vizsgálatok (TaqMan próba)	30
3.2.3 3' RACE PCR	31
3.2.4 Hagyományos „Sanger” szekvenálás	31
3.2.5 NGS alapú szekvenálás	31
3.2.6 Klónozás, transzformálás, fehérje-expresszióhoz szükséges plazmidok előkészítése	32
3.2.7 Rekombináns fehérje expresszió, fehérjetisztítás	32
3.2.8 Transzgenikus CHO sejtvonal előállítása	33
3.3. Immunológiai módszerek	34
3.3.1 Western blot vizsgálat	34
3.3.2 ELISA vizsgálat	34
3.3.3 Immunfluoreszcens vizsgálat	35
3.4. Vírusizolálási kísérletek	35
3.4.1 Alkalmazott sejtvonalak	35

3.4.2 Sejtek előkészítése, vírusizolálási kísérletek	35
3.5 A molekuláris analízisek módszerei	36
3.5.1 Filogenetikai analízis	36
3.5.2 Rekombináció analízis	36
3.5.3 RNS másodlagos szerkezetének elemzése	36
3.5.4 Polyprotein vágási helyek elemzése	36
3.5.5 Fehérje modellezés	37
4. EREDMÉNYEK és MEGVITATÁSUK	38
4.1 Rágcsálók hordozta hantavírusok komplex hazai vizsgálata	38
4.1.1 Rekombináns DNS technikák alkalmazása	38
4.1.1.1 Rekombináns fehérje expresszió	38
4.1.1.2 WB analízisek	40
4.1.1.3 ELISA vizsgálatok specifitása és szenzitivitása	42
4.1.2 DOBV kimutatása molekuláris biológiai és szerológiai módszerekkel	43
4.1.3 Egyéb hantavírusok kimutatása és vizsgálata (röviden)	49
4.1.4 Klinikai vizsgálatok és esettanulmányok	52
4.1.4.1 Esettanulmány 1.	52
4.1.4.2 Esettanulmány 2.	56
4.1.4.3 Hantavírus előfordulás az akut vesebetegséggel hospitalizált betegek körében	59
4.1.5 Szeroprevalencia vadászok és erdészeti dolgozók körében	63
4.2 Ízeltlábúak terjesztette vírusok vizsgálata	66
4.2.1 Krími-kongói vérzések vírusa	66
4.2.2 Kullancsenkefalitisz vírus	70
4.2.3 Nyugat-nílusi vírus	75
4.2.4 Usutu vírus	89
4.3 Denevérek hordozta vírusok jellemzése	91
4.3.1 Astrovírusok	91
4.3.2 Calicivírusok	94
4.3.3 Koronavírusok	100
4.3.4 Pikornavírusok	103
4.3.5 Parvovírusok	108
4.3.6 Filovírusok	113
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	116
6. JEGYZÉKEK	120
6.1 Irodalomjegyzék	120
6.2 Scientometria	135
6.3 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	136
6.4 Egyéb közlemények	139
6.5 Könyvfejezetek	146
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	147

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE és FAJLISTA

AAG	<i>Apodemus agrarius</i>
ABI	Applied Biosystems
AFL	<i>Apodemus flavicollis</i>
AKI	akut veseelégtelenség (akut kidney injury)
AMV	madár (avian) myeloblastozis vírus
APO	<i>Apodemus ponticus</i>
as	aminosav
ASIV	Asikkala vírus
ASY	<i>Apodemus sylvaticus</i>
ATK	Agrártudományi Kutatóközpont
ÁTI	Állatorvos-tudományi Intézetének
bp	bázispár
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
BSL	biobiztonsági szint (biosafety level)
BtAstV	denevérek által terjesztett astrovírusok
BtBV	denevérek által terjesztett parvovírusok (bufavírus)
BtCalV	denevérek által terjesztett calicivírusok
BtCoV	denevérek által terjesztett koronavírusok
BtPV	denevérek által terjesztett pikornavírusok
CDC	Amerikai Egyesült Államok Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (Center for Diseases Control and Prvention)
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CHO	kínai hörcsög petefészek sejtvonal (chinese hamster ovary)
CO ₂	szén-dioxid
CosV	cosavírus
CP	citopatogén hatás
CRP	C-reaktív fehérje (protein)
CT	komputertomográfia
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium tápfolyadék
DNS	dezoxiribonukleinsav

dNTP	deoxiribonukleotid-trifoszfát
DOBV	Dobrava hantavírus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ
ELISA	enzimhez kötött immunvizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMCV	encefalomiokarditisz vírus
ENSZ	Egyesült Nemzetek Szervezete
ETT	Egészségügyi Tudományos Tanács
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
FCV	macska calicivírus (feline calicivirus)
FMDV	száj-és körömfájás vírusa (foot-and-mouth disease vírus)
GPC	glikoprotein prekursor
GOT	glutamát-oxálacetát transzamináz
GPT	glutamát-piruvát transzamináz
GTC	guanidin-thiocianát
HCl	hidrogén-klorid
HCPS	hantavírus kardiopulmonáris szindróma
HDPA	high-density particle agglutination
HEK	humán embrió vese (human embryonic kidney)
HFRS	hemorrhágiás láz veseszindrómával (haemorrhagic fever with renal syndrome)
His	hisztidin
HNTV	Hantaan vírus
HRP	tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IFA	immunfluoreszcens vizsgálat (assay)
IgG	immunglobulin G
IgM	immunglobulin M
INR	nemzetközi normalizált ráta (intern. normalized ratio)
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

IRES	belső riboszóma kötő hely (internal ribos. entry site)
IU	nemzetközi egység (international unit)
KCl	kálium-klorid
kDa	kilodalton
KEV	kullancsenkefalitisz vírus
KK	Klinikai Központ
KKVLV	Krími-kongói vérzések láz vírusa
LB	Luria-Bertani tápfolyadék
LLOV	Lloviu vírus
MAG	<i>Microtus agrestis</i>
MAR	<i>Microtus arvalis</i>
MERS	Közel-keleti légúti koronavírus (Middle East Respiratory Syndrome virus)
mg	milligramm
MgCl ₂	magnézium-klorid
MGL	<i>Myodes glareolus</i>
MIR	minimum infekciós ráta
ml	milliliter
mmol	millimól
mM	millimólos
MOE	<i>Microtus oeconomus</i>
MSU	<i>Microtus subterraneus</i>
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
NaCl	nátrium-klorid
NaH ₂ PO ₄	mononátrium-foszfát (monosodium-phosphate)
NE	nefropátia epidemika
NEB	New England Biolabs
NGS	újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)
NiCl ₂	nikkel-klorid
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ
NVAV	Nova vírus
nt	nukleotid
NTPáz	nukleoproteáz
OKI	Országos Közegészségügyi Intézet

ORF	nyílt leolvasó keret (open reading frame)
PAGE	polyacrylamid gél elektroforézis
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PGM	„personal genome machine”
poly(A)	polyadenilát
rpm	fordulat per perc
PTE	Pécsi Tudományegyetem
PUUV	Puumala hantavírus
RACE	cDNS végek gyors amplifikációja (rapid amplification of cDNA ends)
RdRp	RNS-függő RNS polimeráz
pmol	pikomól
PMSF	Phenylmethysulfonyl fluoride
RNP	ribonukleoprotein
RNS	reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
RT	reverz-transzkriptáz
RT-PCR	reverz-transzkripció polimeráz láncreakció
SAAV	Saaremaa vírus
SANGV	Sangassou vírus
SARS	Súlyos Akut Légzőszervi Szindróma koronavírus (Severe Acute Respiratory Syndrome virus)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEOV	Seoul vírus
SNV	Sin Nombre vírus
SWSV	Seewis vírus
TBS	trissel pufferelt sóoldat (tris buffered saline)
TBS-T	trissel pufferelt sóoldat-Tween-20 reagenssel
Tb1-Lu	<i>Tabarida brasiliensis</i> denevér tüdő sejtvonala (lung)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TMEV	Theiler's egér encephalomyelitis vírus
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
TULV	Tula hantavírus
U	egység (unit)
USUV	Usutu vírus

UTR	nem kódoló régió (untranslated region)
VP	vírus fehérje (viral protein)
VPg	genomhoz kapcsolt vírus protein (viral protein genome-linked)
WB	Western blot
WNND	neuroinvazív Nyugat-nílusi vírus okozta betegség (West Nile neuroinvasive disease)
WNV	Nyugat-nílusi vírus (West Nile vírus)
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µM	mikromólos

FAJLISTA

<i>Aedes vexans</i>	-
<i>Anopheles maculipennis</i>	foltos maláriaszúnyog
<i>Apodemus agrarius</i>	pirók erdeieger
<i>Apodemus flavicollis</i>	sárganyakú erdeieger
<i>Apodemus pontiucus</i>	-
<i>Apodemus sylvaticus</i>	közönséges erdeieger
<i>Coquillettidia richiardii</i>	-
<i>Corvus brachyrhynchos</i>	rövidcsőrű varjú
<i>Culex pipiens</i>	dalos szúnyog
<i>Dermacentor marginatus</i>	birkakullancs
<i>Eptesicus serotinus</i>	közönséges késeidenevér
<i>Haemaphysalis concinna</i>	-
<i>Hipposideros gigas</i>	-
<i>Hyalomma marginatum</i>	-
<i>Ixodes persulcatus</i>	-
<i>Ixodes ricinus</i>	közönséges kullancs
<i>Lepus europaeus</i>	mezei nyúl
<i>Myotis alcathoe</i>	nimfa denevér
<i>Myotis blythii</i>	hegyesorrú denevér
<i>Microtus agrestis</i>	csaltjáró pocok
<i>Microtus arvalis</i>	mezei pocok

<i>Microtus oeconomus</i>	északi pocok
<i>Microtus pennsylvanicus</i>	-
<i>Microtus subterraneus</i>	közönséges földipocokók
<i>Miniopterus schreibersii</i>	hosszúszárnyú denevér
<i>Myodes glareolus</i>	vöröshátú erdeipocok
<i>Myotis bechsteinii</i>	nagyfülű denevér
<i>Myotis dasycneme</i>	tavi denevér
<i>Myotis daubentonii</i>	vízi denevér
<i>Myotis emarginatus</i>	csönkefülű denevér
<i>Myotis myotis</i>	közönséges denevér
<i>Myotis nattereri</i>	horgasszörű denevér
<i>Nyctalus noctula</i>	rőt koraidenevér
<i>Ochlerotatus caspius</i>	-
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	-
<i>Peromyscus maniculatus</i>	őzegér
<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	szoprán törpedenevér
<i>Plecotus auritus</i>	barna hosszúfülű-denevér
<i>Rhinolophus euryale</i>	kereknyergű patkósdenevér
<i>Rhinolophus hipposideros</i>	kis patkósdenevér
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	nagy patkósdenevér
<i>Rhinolophus macrotis</i>	-
<i>Rhinolophus pearsonii</i>	-
<i>Rhinolophus pusillus</i>	-
<i>Rhinolophus sinicus</i>	kínai vörös patkósorrú denevér
<i>Talpa europea</i>	közönséges vakond
<i>Turdus merula</i>	fekete rigó
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	-

Dolgozatomban a vírusok, betegségek, tünetek, laboratóriumi eredmények és egyéb orvosi kifejezéseket a magyar helyesírás szabályainak betartása mellett, kiejtésszerűen, fonetikusan használtam (*magyarosítás*).

(Bősze Péter: *A magyar orvos-biológiai szakírás: magyarosítás, magyarítás, fogalmazás magyarul és fordítás magyarra - Nyelvészeti megfontolások az orvos szemével. MAGYAR ORVOSI NYELV 2013, 1, 43–51.*)

BEVEZETÉS

A XXI. század számos új kihívást támasztott az emberiség elé, amelyek közül talán az egyik legnagyobb az emberiségre veszélyt jelentős kórokozókkal vívott harc. A globalizációs folyamatok, a világméretű kereskedelem, a népességrobbanás vagy éppen a korlátlan utazási lehetőségek mind hozzájárulhatnak a fertőző betegségek határtalan, emberi erővel szinte megállíthatatlan terjedéséhez, lehetőségeket biztosítva ezzel újabb- és újabb járványok kialakulására. A folyamat, ami járványok kirobbanásához és futótűzszerű terjedéséhez vezet nem volt példanélküli az elmúlt évtizedekben sem. Gondoljunk csak a 2002-es SARS koronavírus járványra, vagy a 2009-ben megjelent négyszeres reasszortáns H1N1 pandémiás influenzavírusra. Az emberi civilizáció terjedésével, a modern kor technológiai találmányai és az életminőség javítása érdekében bevezetett vívmányai sokszor számos veszélyt is rejthetnek magukban. Európa egyik legforgalmasabb repülőterének számító frankfurti repülőtér 24 óra alatt több mint 167 ezer utas veszi igénybe, ami havi szinten több mint 5 millió utast jelent. A modern molekuláris biológiai technológiák lehetőséget nyújtanak a kórokozók gyors felismerésére, genetikai adataik gyors megismerésére, vagy akár ezidáig ismeretlen, egészségügyi kockázattal bíró patogének leírására is. Az új kórokozók folyamatos keresése, megismerése már széleskörűen elfogadott eljárás, egyre növekvő kutatási irány, amely a közegészségügy szempontjából kritikus jelentőségű helyzetek megelőzését teheti lehetővé. Jó példa erre az elmúlt években egyre gyakoribb és súlyosabb járványokat okozó filovírusok kutatása. A 2013 és 2016 között tomboló nyugat-afrikai ebolavírus járvány a modern kor legsúlyosabb epidémiája volt, de egyúttal a történelem legjobban feltárt járványa is, hiszen a megbetegedések 5 százalékából sikerült teljes virális genomikai adatot nyerni. Így a hasonló méretű és kimenetelű járványok megelőzésének egyik alkalmas módszere lehet a vírusok időben történő felfedezése, melyre ugyancsak jó példa a nemrégiben leírásra került Bombali ebolavírus, amelyet Sierra Leone területén befogott denevérekben azonosítottak. Azonban a felbukkanó és/vagy újra-felbukkanó fertőző betegségek megismeréséhez komplex megközelítések szükségesek, így legalább annyira fontos a természetes gazdaszervezetek és vektorszervezetek megismerése, mint a kórokozó direkt genomikai vizsgálata.

Jelen disszertációban a hazánkban és a környező országokban előforduló állatok, elsősorban rágcsálók, szúnyogok, kullancsok és denevérek által hordozott virális kórokozókat mutatom be. A munka jelentős mértékben támaszkodik a már ismert, illetve új vírusok azonosításának fontosságára, molekuláris jellemezésükre, terjedésük dinamikájának feltárására és gazdaszervezeteik megismerésére.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A dolgozatban tárgyalt eredmények diverzitása miatt, ebben a fejezetben elsősorban az értekezésben szereplő víruscsaládok (bizonyos esetekben nemzetségek) rövid, érintőleges bemutatását végeztem el, a kórokozókat hordozó állatcsoportok csoportosításával. Elsősorban azon témákra, ismeretanyagokra összpontosítottam a bemutatott vírusok, víruscsaládok esetében, amelyek a későbbi vizsgálatok tárgyát képezték és szorosan kötődtek a dolgozat eredményeihez is.

1.1. Rágcsálók által hordozott vírusok

1.1.1 *Hantaviridae* család – Hantavírusok

A hantavírusok világszerte elterjedtek, és így földrajzilag is alapvetően két nagy csoportra oszthatók. Az Európában és Ázsiában jelen lévő vírusokat „Óvilági hantavírusoknak” nevezzük, míg az Amerika területén lévőket „Újvilági hantavírusoknak”.

A koreai háború idején (1950-1953) egy vérzésekkel járó vesebetegségre figyelt fel a világ, melyben több ezer ENSZ katona szenvedett a háború alatt. Az akkor még ismeretlen kórokozót koreai hemorrhágiás láz vírusnak nevezték el. 1978-ban azonosították a vírust a Han-folyó közelében befogott *Apodemus agrarius* (AAG) tüdőszövetéből; az első felfedezés helye után a Hantaan vírus (HNTV) nevet kapta (Lee és mtsai. 1978). Az 1980-as években egy újabb vírust tudtak azonosítani, mely vérzésekkel járó vesebetegséget HFRS-t (Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome) okoz humán szervezetben, és elnevezték Seoul vírusnak (SEOV), mivel Seoulban befogott patkányból izolálták először (Lee és mtsai. 1982).

Európában a Dobrava (DOBV) és Puumala (PUUV) vírusoknak van nagy kóroki szerepük. A PUUV-t egy finnországi faluról nevezték el, ahol 1980-ban először izolálták a vírust, *Myodes glareolus* (MGL) tüdejéből. A PUUV a HFRS-nél enyhébb lefolyású betegséget, a nefropátia epidemikát (NE) okozza. A veseérintettség itt is kialakul viszont jóval enyhébbek a kísérő tünetek (Brummer-Korvenkontio és mtsai. 1980). A HFRS kórképet okozó vírust 1992-ben Szlovéniában egy *Apodemus flavicollis* (AFL) egér mintájából mutatták ki, valamint ezzel párhuzamosan (az akkori) Jugoszláviában egy HFRS-ben szenvedő beteg mintájából is, ezért a Dobrava-Belgrade vírus nevet kapta (Avsic-Zupanc és mtsai. 1992, Gligic és mtsai. 1992). Több európai hantavírus faj nem okoz humán megbetegedést, így a cickányok által közvetített Seewis vírus (SWSV) és Asikkala vírus (ASIV) sem, viszont a mai napig nem tisztázott egyértelműen a Tula vírus (TULV) humán patogenitása (Schultze és mtsai. 2002; Klement és mtsai. 2003; Clement és mtsai. 2003;

Zelená és mtsai. 2013). Magyarországon is több hantavírus faj van jelen egyidejűleg. Ferenczi és munkatársai már 1992 és 2000 között végeztek felméréseket, melyek alapján a DOBV és PUUV együttes jelenlétét igazolták (Ferenczi és mtsai. 2003; Ferenczi és mtsai. 2005) rágcsálókban. Bár nem humán patogén hantavírus, de Magyarországon is kimutattak vakondfélék által terjesztett hantavírust, a Nova vírust (NVAV), melyet a *Talpa europea* fajból (TEU) izoláltak (Khang és mtsai. 2009).

Amerikában az újvilági hantavírusok közül az elsőt 1985-ben azonosították, *Microtus pennsylvanicus* (MPE) rágcsálóban (Lee és mtsai. 1985). Az első újvilági hantavírus fertőzést pedig 1993-ban a Four Corners régióban található Navajo indián rezervátumban regisztrálták, a fertőzést a Sin Nombre vírus (SNV) okozta (Childs és mtsai. 1994, Nichol és mtsai. 1993). A kórképet, hantavírus kardiopulmonáris szindrómának (HCPS) nevezték el. A vírust a *Peromyscus maniculatus* rágcsálóból sikerült azonosítani.

Afrikában is sikerült hantavírust azonosítani rágcsálóból ami a Sangassou vírus (SANGV) nevet kapta, mely a DOBV-val mutat hasonlóságot (Klempa és mtsai. 2012).

A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (ICTV) legutóbbi adatai alapján az eddig ismert 41 hantavírus fajt a *Bunyavirales* rendbe, a *Hantaviridae* családba és azon belül az *Orthohantavirus* nemzetségbe sorolták. Azonos tulajdonságuk, hogy a virionok gömb alakúak, 80-120 nm átmérőjűek. Kettős lipidmembránnal borítottak, felszínükön 5-10 nm hosszúságú glikoprotein nyúlványokkal (G_n , G_c) (Schmaljohn és mtsai. 1987). Három szegmensből álló RNS genommal rendelkeznek, a szegmensek, gyűrűvé záródott egymástól elkülönülő negatív szálú, egyfonalú RNS molekulából épülnek fel. Az 1,6-2 kilobázis (kb) hosszú S szegmens kódolja a nukleokapszid proteint. A G_n , G_c glikoproteineket kódoló M-szegmens 3,2-4,0 kb, míg az RNS-függő RNS polimerázt (RdRp) kódoló L-szegmens 6,5 kb hosszú (Plyusnin és mtsai. 1996). A vírus szaporodása a célsejtek citoplazmájában játszódik le, miután a vírus a G_n , G_c glikoproteinekkal kötődik a célsejt receptoraihoz, majd endocitózissal jut be a gazdasejtbe. A virion összeépülése a Golgi membránján történik, ahonnan leválva vezikulumokba csomagolva transzportálódik a membrán felé, ahol exocitózissal kijut a sejtől (Schmaljohn és Nichol 2007).

A hantavírusok gazdaszervezetei a különböző rágcsálók, cickányok, vakondok és denevérek. A vírus a fertőzött állat vizeletében, székletében, nyálában egyaránt megtalálható. A beszáradt testváladékok vaporizációjával kerülhet a vírus mind az emberi, mind az állati szervezetbe, valamint állatok esetében harapás útján fertőzhetik meg egymást (Glass és mtsai. 1988, Hinson és mtsai. 2004). Nagyon ritkán fordulhat elő, hogy vadon élő rágcsálók harapása által és/vagy azok vérével, szövetével érintkezik az ember. Ezekben az esetekben is

előfordulhat fertőződés, de jóval alacsonyabb ennek esélye, mint a beszáradt, szálló exkrétummal történő érintkezéssel.

Fertőződés esetén a hantavírusok három kórképet okozhatnak a humán szervezetben a fertőző hantavírus faj jellegétől függően: ezek a HFRS, NE, HCPS. HNTV és DOBV esetében 5-10%-os lehet a halálozási arány, míg a HCPS-t okozó SNV esetében ez akár az 50%-ot is elérheti (Jonsson és mtsai. 2010). Hazánkban és Európában, esősorban a HFRS kórképnek van klinikai relevanciája. Az átlagosan 9-14 napos inkubációs idő lejárta után, a HFRS lefolyása öt szakaszra bontható:

1. fázis: lázas fázis, melyben influenzaszerű tüneteket mutat a beteg, mint a hirtelen magas láz, fejfájás, izomfájdalom, hasi és deréktáji fájdalom. Hányinger, hányás és hasmenés is előfordulhat.
2. fázis: hipotenzív (alacsony vérnyomás) szakasz, ami proteinuriával (fehérjevizelés) társul, valamint a látászavar és a kettős látás is gyakori. A fázis időtartama igen változó lehet, néhány órától egészen napokig is elhúzódhat.
3. fázis: a vizelet mennyisége csökken (oliguria) vagy teljesen elapad (anuria) és ekkor jelentkeznek a vérzéses manifesztációk, mint pl: konjunktivális vérzés, légyszájpadí bevérzés megfigyelhetők. Ezt követően a hirtelen vérnyomáscsökkenés, a pulzusszaporulat életveszélyes állapotot okozhat. A kialakult veseelégtelenség miatt az esetek egy részében hemodialízist alkalmaznak a beteg életének megmentése érdekében. A veseelégtelenség következtében az addigi hipotenzió hirtelen hipertóniába lép át. Ritkán akut légzési elégtelenség, agyödéma, encefalopátia, tüdőödéma komplikálhatja a kórképet.
4. fázis: a vesefunkció normalizálódik, így erre a szakaszra bő vizeletürítés (poliuria) jellemző.
5. fázis: a lábadozás szakasza, ami hetekig, akár hónapokig is eltarthat.

A NE esetében az említett szakaszok nem különülnek el ilyen élesen egymástól, jóval enyhébb lefolyású a betegség, bár a tünetek teljesen hasonlóak lehetnek (Alexeyev és Morozov, 1995, Linderholm és mtsai., 1997).

A HCPS esetében, a kezdeti influenzára emlékeztető tünetek után jelentkeznek a légúti tünetek. Szapora pulzus és légzés, alacsony vérnyomás lép fel, valamint a tüdők felett szörcsörej hallható. Ezt követően gyorsan tüdőödéma alakul ki. Amennyiben a beteg túléli a tüdőödémát, a légúti tünetek gyorsan megszűnnek, ezzel egy időben poliuria indul meg, ami az egyik közös tünet a HFRS-sel (Duchin és mtsai., 1994, Zaki és mtsai., 1995, Nolte és mtsai., 1995).

A hantavírus fertőzés kezelése csak tüneti, Ribavirin HFRS esetében hatásosnak bizonyulhat (Marcos és mtsai. 2014). A rágsálókkal való kontaktus kerülés az egyetlen biztos módja a vírusfertőzés elkerülésére.

A vírus diagnosztizálása speciális szaktudást és laboratóriumi háttérrel igényel. A virális nukleinsav kimutatása molekuláris módszerrel végezhető vérből, bár ez nem minden esetben ad egyértelmű eredményt. Mivel a hantavírusok igen rövid ideig és viszonylag alacsony vírustiterrel okoznak virémiát, a vírus molekuláris kimutatása csak a betegség korai szakaszában lehetséges. Általában mire a specifikus tünetek megjelennek a vírus már nem mutatható ki a beteg vérmintájából. A legelterjedtebb vizsgálati módszer a szerológiai tesztek alkalmazása, melyekkel elsősorban a vírus ellen termelődött IgM és IgG antitesteket detektáljuk. A legáltalánosabb ilyen módszerek az „enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat” (ELISA), Western-blot (WB) és az immunfluoreszcens mikroszkópia (IFA).

1.2 Ízeltlábúak által terjesztett vírusok

1.2.1 *Nairoviridae* család – Krími-kongói vérzések láz vírus (KKVLV)

A *Bunyavirales* renden belül a *Nairoviridae* család, *Orthonairovirus* nemzettségébe sorolható a Krími-kongói vérzések láz vírusa (KKVLV). A KKVLV mellett említést érdemel a Hazara vírus, Nairobi sheep disease és a Dugbe vírus is, melyek a Hazara vírus kivételével szintén humán patogének (Flusin és mtsai, 2011).

A KKVLV esetében a 100 nm átmérőjű virionok gömbölyűek, lipid kettősmembránnal borítottak, felszínükön 5-10 nm hosszúságú glikoprotein nyúlványok találhatók. A nukleokapszid hosszúkás, helikális szimmetriájú (Whitehouse és mtsai., 2004). A virális RNS ribonukleoprotein komplexekbe (RNP) rendeződve helyezkedik el a citoplazmában, ahol a genom szegmenseket a nukleoprotein borítja és az RdRp is jelen van a virális RNS mellett. A RNP-t kívülről az envelop és glikoproteinek határolják. A virális genom három, egy rövid duplaszálú RNS (dsRNS) szakasz által gyűrűvé záródott, egymástól elkülönülő negatív szálú, egyfonalú RNA (ssRNS) molekulából épül fel. A három RNS molekulát méretük alapján különböztetjük meg: S, M és L szegmensek. Az S szegmens (~1,6 kb) kódolja a nukleokapszid proteint (N). Az M szegmens (~5,4 kb) a glikoprotein prekuzort (GPC) kódolja, melyből a különböző érési folyamatok (pl. glikolizáció) és enzimatis hasítások során alakulnak ki a virális glikoproteinek (G1 és G2). A legnagyobb az L szegmens (~12,1 kb), mely az RdRp gént kódolja (Zivcec és mtsai., 2016).

A jelentős humánegészségügyi vonatkozással bíró KKVLV elterjedése a kullancsok által terjesztett emberi megbetegedéseket okozó vírusok közül a legkiterjedtebb, így a WHO egy lehetséges járvány okozójaként jelölte meg.

Első dokumentált megjelenése 1944-1945-re tehető, amikor körülbelül 200 szovjet katonát fertőzött a Krím-félszigeten a II. világháborúban. A vírus izolálását azonban csak 1967-ben végezték el, ekkor Krími vérzések láznak nevezték. 1956-ban azonosították a Kongó vírust is egy beteg gyermek mintájából. Csak az 1970-ben végzett kutatások támasztották alá, hogy a két kórokozó ugyanaz, és innentől az elnevezés komplex, KKVLV lett (Ergönül, 2006).

A vírus több mint 30 országban jelen van már, leginkább a *Hyalomma* kullancsfaj elterjedési területének megfelelően. Megjelent Afrikában (Zaire, Uganda, Kenya, Tanzánia, Uganda), Ázsiában (Kína, Kazahsztán, Pakisztán), Közel-Keleten (Egyesült Arab Emírátsok, Irak, Irán, Szaúd-Arábia), Délkelet-Európa számos területén (Bulgária, Albánia, Törökország) és Közép-Európában (Portugália, Franciaország, Görögország) is. Európában számos szerológiai tanulmány is készült, amely szintén alátámasztja a vírus jelenlétét. Ilyen magas szeroprevalenciát mutató területek közé tartozik Törökország, Macedónia, Bulgária, Románia, Görögország, Koszovó és Albánia (Maltezou és mtsai., 2011). A különböző területekről származó vírus nukleinsav szekvenciák nagy genetikai diverzitást mutatnak. A legtöbb genom elemzés az S szegmens vizsgálatán alapul, azonban néhány tanulmány az M szegmens alapján is foglalkozik. A filogenetikai analízisek alapján 8 elkülöníthető vírus kládot írtak le a földrajzi elhelyezkedéseknek megfelelően (Ergönül, 2006).

Eddig több mint 30 kullancsfajt azonosítottak, melyek részt vehetnek a vírus terjesztésében (*Hyalomma* sp., *Rhipicephalus* sp., *Ornithodoros* sp., *Boophilus* sp., *Dermacentor* sp. és *Ixodes* sp.). Ezek közül a legjelentősebbek a *Hyalomma* fajok (*H. marginatum*, *H. anatolicum*, *H. truncatum*, *H. impeltatum*, *H. impressum*). A kullancsok képesek a fertőzést transzovárisan (utódoknak is átadja a fertőzést) és transztadiálisan (különböző fejlődési stádiumoknak is átadja a fertőzést) is terjeszteni a vírust (Ergönül, 2006). Az éghajlat melegekedés következtében a mediterrán kullancsfajok elterjedése egyre északabbra tolódott. A kullancsok földrajzi terjedésében nagy szerepet játszanak a vándormadarak is, hiszen az állat több mint 26 napig képes a gazdaállaton maradni. Amennyiben a kullancs egy számára megfelelő klimatikus környezetbe kerül, úgy a kedvező éghajlati körülmények hatására képes megtelepedni és stabil populációt kialakítani (De Liberato és mtsai., 2018). A kísérletesen fertőzött kullancsok a vírust legnagyobb titerben a nyálmirigyükben és a

reproduktív szerveikben tartalmazták, míg alacsonyabb volt a vírus kimutatható mennyisége a Malphigi-edényekben, középbelben, izom- és idegszövetben (De Liberato és mtsai., 2018).

A humán megbetegedések leginkább kullancscsípéshez köthetők, de a fertőzött állatok vérével történő közvetlen érintkezés is okozhatja az emberek fertőződését. Fontos megjegyezni, hogy a nem megfelelően előkezelt tej (elsősorban kecsketej) szintén lehet a fertőzés forrása. A vírus képes emberről emberre is terjedni a fertőzött testnedvek közvetítésével, így a betegek kezelésekor a maximális biztonsági és higiéniai szabályok betartása elengedhetetlen a nozokomiális fertőzések elkerülése érdekében. A halálozási arány 2-30% is lehet a földrajzi elhelyezkedéstől, a vírustörzstől, valamint a beteg állapotától függően (Ergönül, 2006). A vírussal való fertőződés után különböző fázisok különíthetők el:

1. fázis: inkubáció, melynek hossza függ a fertőzés módjától: kullancscsípés esetén 2-7 nap, míg vírussal szennyezett vérrel vagy szövetrel való közvetlen érintkezés esetén 7-12 nap is lehet.
2. fázis: a prehemorrhágiás periódus. A tünetek gyorsan kezdődnek, általában erős fejfájással, magas lázzal (39-41°C), hidegrázással, szédüléssel, fényérzékenységgel, izomfájdalommal, fáradtsággal, hányással, hasmenéssel és hasi fájdalommal járhatnak. Ez a szakasz általában 1-7 napig tart.
3. fázis: a hemorrhágiás periódus viszonylag rövid, 1-2 nap alatt zajlik le. A hemorrhágiás tünetek jelentkezhetnek a törzsön és a végtagokon apró bőrvérzések formájában vagy súlyosabb esetben nyálkahártyavérzések, kiterjedt bőrvérzések, máj- és vesefunkciós zavarokkal kombinálva. Jellemző a kipirult arc, szájpád bevérvzés.
4. fázis: a lecsengési időszak, amely 10-20 napig is tarthat.

A kísérleti eredmények igazolták, hogy a kullancscsípést követően a vírus viszonylag rövid időn belül és igen nagy titerben jelenik meg a vérben. A vírus elsősorban a vaszkuláris endotél sejteket fertőzi, de a kórokozó megtámadja a mononukleáris fagocitákat, dendritikus sejteket és hepatocitákat is. Továbbá a fertőzés előrehaladtával a vírus jelenléte az 5-10. napot követően igazolható több zsigeri szervben is (máj, lép, vese). A betegeknél trombocitopénia, leukopénia jelenik meg, továbbá emelkedik a máj enzimek, kreatinin-foszfokináz, bilirubin, laktát-dehidrogenáz, aszpartát-aminotranszferáz, alanin-aminotranszferáz szintje. Az összes fehérje, albumin, fibrinogén és hemoglobin ezzel párhuzamosan csökken (Ergönül, 2006).

A fertőzés megelőzésének a leghatékonyabb módja a kullancscsípés elleni védekezés, valamint a tej hőkezelés után történő fogyasztása. Mivel a fertőzött haszon- és vadállatok sokszor tünetmentesek, így a feldolgozásuk közben bekövetkező fertőződés lehetősége igen nagy. A vágóhidakon vírus tartalmú vérrel, hússal történő érintkezés ilyen esetekben

elkerülhetetlen, így a fertőződés elleni védekezés nehéz. A fertőződésnek leginkább kitett személyek a mezőgazdasági dolgozók, állattartók, vágóhídi dolgozók, állatorvosok és az egészségügyben dolgozók.

Diagnosztikai céllal általában a vírus direkt molekuláris kimutatását szokták alkalmazni. Ezt a későbbi szerológiai vizsgálatok, illetve a vírus esetleges sejtkultúrában történő izolálása erősítheti meg. Fertőződés esetén lehetséges a betegek tüneti kezelése, szupportív kezelés, illetve a betegség korai stádiumában antivirális kezelés (Ribavirin) hatékonyan alkalmazható. Védőoltás jelenleg nem áll rendelkezésre (Ergönül, 2006).

1.2.2 *Flaviviridae* család

A flavivírusok a *Flaviviridae* családon belüli Flavivírus nemzetség tagjai (ICTV). A nemzetség több mint ötven ízeltlábúak által hordozott vírust (arbovírust) foglal magába, köztük jelentős humán patogén vírusokkal, mint a Nyugat-nílusi láz vírus, a Sárgaláz vírusa vagy a Dengue vírus. A flavivírusok egységes virion szerkezettel rendelkeznek. A burokkal körülhatárolt érett virionok gömbölyűek és hozzávetőlegesen 50 nm átmérőjűek. A virion legkülső rétege egy glikoprotein burok, amely 180 darab, ismétlődő burok- és membrán fehérje egységből épül fel. A virion felszíne ikozahedrális szimmetriát mutat, amelyen a burok (envelop) dimerek 30 darab hármas csoportot alkotva helyezkednek el. A flavivírusok genomja körülbelül 11000 nukleotidból felépülő, negatív szálú RNS, amely az 5' végén I-es típusú CAP fehérjét tartalmaz, míg a 3' végén hiányzik a poly(A)-farok (Samuel és Diamond, 2006; Barrows és mtsai., 2018). A flavivírusok genomja egyetlen polipeptidet kódol, amely a transzlációt követően virális és gazdaszervezet eredetű proteázok révén, kotranszlációs és poszttranszlációs modifikáció során hasítódik tíz érett vírusfehérjére (C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Barrows és mtsai, 2018).

1.2.2.1 Kullancsenkefalitisz vírus (KEV)

A kullancsok által okozott encefalitisz, mint betegség, a klinikumban 1931-ben került elsőként leírásra Ausztriában. Később, 1937-ben a betegséget okozó vírust is azonosították és felismerték a kullancsok, mint vektor fajok szerepét a vírus emberekre való terjesztésében is (Kaiser, 2008). A vírusnak három közeli rokonsági viszonyban lévő altípusa létezik, melyek az európai, szibériai és távol-keleti altípusok. Az európai altípus elsődleges terjesztőjeként az *Ixodes ricinus* kullancsfajt jegyzik, míg a másik két altípus terjesztéséért az *Ixodes persulcatus* fajt teszik felelőssé. Az emberek a kullancscsípésen kívül a fertőzött állattól származó, nem megfelelően hőkezelt tejtermékek fogyasztása útján is megfertőződhetnek

(Šmit és Postma, 2015). A vírus számos gazdaszervezetet fertőz (madarak, rágcsálók, ragadozók és kérődzők), melyek rezervoárként szolgálva biztosítják a vírus természetben való fennmaradását (Füzik és mtsai., 2018).

A KEV súlyos központi idegrendszeri fertőzést okoz, amely hosszú távú vagy tartós idegrendszeri következményekkel vagy akár a páciens halálával is járhat. A KEV okozta betegség lefolyása és súlyossága altípusonként eltérő. A legmagasabb halálozási aránnyal (5-35%) és a legsúlyosabb lefolyással a távol-keleti altípus rendelkezik, amely során gyakran agyvelőgyulladás alakul ki a fertőzötteknél. Ezzel szemben a szibériai altípus egy kevésbé súlyos lefolyású, alacsonyabb halálozási aránnyal (1-3%) jellemezhető betegséget okoz, amely krónikus fertőzés kialakulásáért felelős a páciensek körében, míg az európai altípus kétfázisú patomechanizmussal jellemezhető és halálozási aránya mindhárom közül a legalacsonyabb (1-2%). Az utóbbi altípus kezdetben influenzaszerű tünetekkel jelentkezik, amely gyakran meningitisz, meningoencefalitisz, meningoencephalo-mielitisz és meningoencephalo-radikulitisz kialakulásával végződik az érintetteknél (Šmit és Postma, 2015). Európa és Oroszország évente 10000-30000 KEV okozta meningitisz, encephalitisz és meningoencefalitisz esetet számlál (Füzik és mtsai., 2018). A humán esetek elmúlt harminc évben bekövetkezett gyakoriságának nagymértékű emelkedése az emberek endemikus területekre való utazásának gyakoribbá válásával, a szabadidős tevékenységek népszerűbbé válásával és a klímaváltozás vektorszervezetekre gyakorolt hatásával magyarázható. Az említett tényezők hozzájárulnak nem csak az esetszámok növekedéséhez, de a vírus terjedését is elősegítik. A fertőződést követően nem áll rendelkezésünkre specifikus kezelési módszer. Az egyetlen hatásos védelmet a megfelelően időzített védőoltás alkalmazása jelenti az emberek számára, habár annak ellenére, hogy az oltás biztonságos az endemikus országokban a népesség átoltottsága igen alacsony (Šmit és Postma, 2015; Růžek és mtsai., 2010).

1.2.2.2 Nyugat-nílusi vírus (WNV)

A Nyugat-nílusi vírust (WNV) 1951-ben írták le először Ugandában. A vírus által okozott nyugat-nílusi láz betegség jelentős közegészségügyi gondot okoz világszerte. A vírusnak több ismert és feltételezett genetikai variánsát azonosították (számszerint 8), melyek fertőzőképessége és neuroinvasív hajlama nagymértékben eltérőnek bizonyult (Pachler és mtsai., 2014; Papa és mtsai., 2011). A genetikai variánsok közül az 1-es és 2-es variánsok jelentik a legnagyobb humánegészségügyi kockázatot világszerte (Bakonyi és mtsai., 2006). Habár, alapvetően, az 1-es genetikai variánsnak tulajdonítottak magasabb fertőzőképességet és neuroinvasivitást, egészen a 2-es genetikai variáns csoportjába tartozó törzs dél-afrikai

megjelenéséig, mely emelkedett fertőzőképességgel és neuroinvazív tulajdonsággal rendelkezett (Venter és mtsai., 2010). Egészen 2004-ig bezárólag csak az 1-es és 3-as genetikai variáns jelenléte volt bizonyítható Európában, majd az említett évben Magyarországon kimutatásra került a 2-es genetikai variáns jelenléte is (Bakonyi és mtsai., 2006). Az első felbukkanását követően az említett genetikai variánst robbanásszerű elterjedés jellemezte és számos járvány kialakulásáért volt felelős Európa szerte (Olaszország, Görögország, Szerbia, Ausztria stb.) mind humán, mind pedig állategészségügyi (elsősorban lovakat érintő) esetekkel, megközelítőleg 200-300 humán esetet számlálva évente (Hernández-Triana és mtsai., 2014; Kurolt és mtsai., 2014).

A WNV egy a *Culex* nemzetségbe tartozó szúnyogok által terjesztett állatokról emberekre terjedő kórokozó. Természetben való fennmaradását elsősorban madarak biztosítják, amelyek mint „felsokszorozó gazdaszervezet” vesznek részt a folyamatban biztosítva ezzel a vírus szúnyogok által való továbbterjesztésének lehetőségét. Véletlen gazdaként szolgáló emberek és lovak a fertőzött madáron táplálkozott szúnyog csípése útján fertőződhetnek meg, illetve nagyon ritka esetben fertőzött vér transfúziója vagy szervtranszplantáció során (Huhn és mtsai., 2003; Ulbert, 2011; Paphitou és mtsai., 2017).

Humán szempontból a fertőzés nem jár súlyos következményekkel és a legtöbb esetben tünetek nélkül lezajlik vagy az esetek 20%-ban enyhébb influenzaszerű tünetekkel átvészeli az érintettek. A vírus okozta megbetegedés első jelei a fertőződést követő 2-14 napon belül jelentkeznek. A vírusfertőzés az esetek 1%-ában azonban súlyos neuroinvazív betegséghez is vezethet (enkefalitisz és meningitisz) főleg idősek, gyermekek és immunszupresszált emberek esetében. Az említett csoportokon belül a halálozási arány elérheti akár a 20%-ot is (Ulbert, 2011). A neurológiai betegségen átesettek hónapokon vagy éveken át tartó maradandó tünetektől szenvedhetnek, mint az emlékezetkiesés, izomgyengeség, fejfájás, fáradtság, szédülés, depresszió és halláskárosodás (Anastasiadou és mtsai., 2013). A WNV okozta megbetegedés tranziens és egész életre szóló védettséget hagy maga után (Ulbert, 2011). Jelenleg a humánegészségügy számára elérhető védőoltás nem áll rendelkezésre (Poore és mtsai., 2017; Rossi és mtsai., 2010).

1.2.2.3 Usutu vírus (USUV)

A vírust fertőzött szúnyogból írták le először 1959-ben, a Dél-afrikai Köztársaság területén. A vírus első európai megjelenését 1996-ban igazolták Olaszországban (Weissenböck és mtsai., 2013). Azóta a vírust számos országban kimutatták Európán belül, többek között Ausztriában, Belgiumban, Németországban, Görögországban, Magyarországon,

Franciaországban, Spanyolországban, Hollandiában és Svájcban. Az érintett országokban az USUV megjelenését a madár faunát érintő magas elhullás jellemezte, amely elsősorban a *Turdus merula* fajt érintette (Ashraf és mtsai., 2015; Cadar és mtsai., 2017). Az USUV természetben való fennmaradása szúnyog-madár-szúnyog enzoótikus ciklushoz kötött, amelyben a szúnyogok, mint vektor, a madarak, mint gazdaszervezetek vesznek részt. Véletlen gazdaként emberek, lovak és rágcsálók is előfordulhatnak. Humán esetek során az érintettek központi idegrendszeret érintő fertőzéssel (meningoencefalitisz) és magas lázzal küzdöttek, habár a vírus humánegészségügyi kockázata mindeztáig nem tisztázott (Ashraf és mtsai., 2015). Az USUV fertőzés elkerülése kizárólag a szúnyogcsípés megelőzésével lehetséges, célzott terápia a fertőzés leküzdésére jelenleg nincs.

1.3 Denevérek és vírusaik

1.3.1 *Astroviridae* család

Az astrovírusok taxonómiaiilag az *Astroviridae* családba tartoznak, melybe két nemzetség tartozik: a *Mamastrovirus* (19 faj), és az *Avastrovirus* (3 faj) (Adams és mtsai., 2017). A jellegzetes, csillag alakú morfológiával rendelkező vírusokat először 1975-ben írták le egy hasmenésben szenvedő csecsemő székletmintájából (Appleton és Higgins, 1975), azóta az emésztő-szervrendszeri fertőzések egyik fő okozójának tartják világszerte. Az ember mellett számos állatfaj esetében tudott, hogy fogékony az astrovírus fertőzésre, beleértve szárazföldi és vízi élőhelyen élő házi, szinantrop és vadon élő állatokat. Az astrovírusok állategészségügyi és közegészségügyi jelentősége kiemelkedő. A fertőzés leggyakoribb tünete a hasmenés, de néhány esetben súlyosabb betegségeket is okozhatnak, mint például vesegyulladás, májgyulladás és agyvelőgyulladás (De Benedictis és mtsai., 2011; Quan és mtsai., 2010).

Az astrovírusok hozzávetőlegesen 28-30 nm átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú, gömb alakú, burok nélküli partikulumok, öt- vagy hatágú csillaghoz hasonló felszíni struktúrával. A vírusgenom körülbelül 6800 nukleotid hosszúságú, egyfonalú, pozitív szálú RNS, mely egy poly-A farokkal rendelkezik a genom 3' végén. A genomban három fehérjét kódoló régiót (ORF) különböztetünk meg. Az 5' véghez közelebb álló, ORF1a és ORF1b a vírus szaporodásához nélkülözhetetlen nem strukturális fehérjéket: proteázt és RdRp-t, míg a 3' végnél lévő ORF2 régió a virion kapszidját felépítő három fő strukturális fehérjét kódolja. Ezek egyenként körülbelül 25, 27 és 34 kDa molekulatömegűek és a kapszid prekursor-fehérje hasítása során keletkeznek. Található még egy genomon kívüli (subgenom) RNS is, ami körülbelül 2400 nukleotid hosszúságú és a genom kapszid régiójával azonos. Fertőzéskor

a sejtben mind a teljes genom, mind pedig a subgenom RNS replikálódik (Monroe és mtsai., 1991).

Az astrovírusok egyedi evolúciós változatosságot mutatnak, mely leginkább a Föld különböző részein élő, különböző denevérfajokhoz köthető (Fischer és mtsai., 2017). A legelső tanulmányok, melyek a denevérekből kimutatott astrovírusokkal (BtAstV) foglalkoztak, kiemelkedő genetikai változatosságát mutatták be a vírusnak (Chu és mtsai., 2008; Zhu és mtsai., 2009). Ezek a tanulmányok elsősorban Kínában készültek, az itt végzett vizsgálatok eredményeként magas genetikai variabilitást írtak el az *Astroviridae* család, *Mamastrovirus* nemzetség tagjai között (Li és mtsai., 2010a; Xiao és mtsai., 2011; Wu és mtsai., 2012). Az első európai tanulmányokban elsősorban a lehetséges kapcsolatot vizsgálták a denevér kolónia állapota és a kolónia adeno-, astro-, és koronavírus fertőződése között. Ezeket a tanulmányokat követve megfigyelhető, hogy genetikailag rokon vírusokat írtak le a különböző európai régiókból, így például Németországból és Csehországból egyaránt (Dufkova és mtsai., 2015; Fischer és mtsai., 2016). Szintén ezek a tanulmányok nyújtották az első, fontos szekvencia adatokat a *Myotis myotis* által hordozott astrovírusokra vonatkozóan (Drexler és mtsai., 2011) is. Az egyre növekvő számú tanulmány eredményeként mára jelentős számú, új genetikai törzset írtak már le feltételezett gazdaspecifitással.

A denevérek által hordozott astrovírusok (BtAstV) tényleges zoonótikus potenciáljának felmérése érdekében további vizsgálatokra van szükség. Jelen tudásunk szerint annak az esélye, hogy denevérekből származó astrovírusok direkt kontaktus révén embert fertőzzenek, nagyon alacsony. Sokkal érdekesebb kutatási téma lehet a denevérek szerepe az astrovírusok evolúciójában.

1.3.2 *Caliciviridae* család

A *Caliciviridae* család kis méretű, burokkal nem rendelkező RNS vírusokat foglal magába, melyeket 5 nemzetségbe sorolunk: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* és *Nebovirus*. Továbbá be nem sorolt calicivírusokat írtak le majmokban, sertésekben, madarakban és halakban is (Farkas és mtsai., 2008; L'Homme és mtsai., 2009; Wolf és mtsai., 2011; Liao és mtsai., 2014; Mikalsen és mtsai., 2014). A calicivírus családon belüli Norovírus és Sapovírus nemzetség tagjai felelősek az embereket érintő megbetegedésekért. A norovírusok a nem bakteriális eredetű, heveny hasmenés egyik leggyakoribb okozói minden korosztályban, de különösen az 5 év alatti gyermekek, az idősek és az immunszuppresszált betegségek esetében (Lu és mtsai., 2014).

A calicivírusok pozitív, egyszálú, 3' végén poli(A)-farkat tartalmazó RNS genommal rendelkeznek, amely két vagy három ORF-be szerveződik. A genom 5'-végéhez közel elhelyezkedő, ORF1 nem strukturális fehérjéket kódol, amelyek ugyanabban a sorrendben az összes calicivírusban megtalálhatók: N-terminális fehérje, NTPáz, 3A-szerű fehérje, VPg, proteáz és az RdRp (Liao és mtsai., 2014).

Denevérekhez kötődő calicivírusokat (BtCalV) először Hong Kongból és Új-Zélandból származó guanó mintákban írtak le (Tse és mtsai., 2012; Wang és mtsai., 2015). A közös jellemzője ezeknek a denevérekből kimutatott calicivírusoknak, hogy nagyon különbözőek az eddig ismert *Caliciviridae* családba tartozó vírusok genetikai állományától. Mivel igen kevés tanulmány készült a BtCalV vizsgálatára, még nagyon sok nyitott kérdés maradt a vírus tényleges kóroki és evolúciós szerepére vonatkozóan. Az eddigi vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy az embert és állatot fertőző calicivírusok evolúciójában jelentős szerepet játszanak a random pontmutációk, illetve az egymás közt létrejövő rekombinációs események (Giammanco és mtsai., 2013).

1.3.3 *Picornaviridae* család (*Mischivirus* nemzettség)

A picornavírusok, kisméretű (27-30 nm), burokkal rendelkező, ikozahedrális szimmetriájú, pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkező vírusok. A virális genom 7,1-8,9 kb hosszúságú, 3' végén poli(A)-farok található és egyetlen poliproteint kódoló ORF-ből áll. A genom 5' végénél elhelyezkedő nem kódoló régió (UTR) egy belső riboszóma bejutási helyet (IRES) tartalmaz. A P1 régió a szerkezeti polipeptideket kódolja, míg a P2 és P3 régiók kódolják a replikációval kapcsolatos nem strukturális fehérjéket. Taxonómiaailag a *Picornaviridae* családba (*Picornavirales* rend) tartoznak, jelenleg 94 vírust 40 genusba sorolunk (Adams és mtsai., 2017). Jelenlétüket és kórokozó képességüket emberekben és több állatcsoportban is igazolták már, ahol nagyon különböző klinikai megjelenési formáit tapasztalták. Főként légzőszervi, kardiológiai, neurológiai, bélrendszeri vagy akár szisztémás lefolyású fertőzést is képesek okozni különböző súlyossággal (Tracy és mtsai., 2006).

A *Picornaviridae* család képviselőit az elmúlt évek során több esetben is kimutatták már denevérekből (BtPV), amely magas genetikai diverzitásukat és széles földrajzi elterjedésüket bizonyította. Jelenlegi ismereteink szerint a *Crohivirus*, *Kobuvirus*, *Kunsagivirus*, *Hepatovirus*, *Mischivirus* és *Shanbavirus* genusok képviselői és néhány egyelőre nem besorolt picornavírus jelenlétét igazolták denevérmintákban (Lau és mtsai., 2011; Wu és mtsai., 2012; Drexler és mtsai., 2015). Világméretű tanulmány egyelőre csupán a denevér hepatovírusokkal kapcsolatban született (Drexler és mtsai., 2015). A *Mischivirus*

genus első tagját ázsiai *Miniopterus schreibersii* denevérekben írták le elsőként, majd ugyanezen vírust mutatták ki Afrikában egy másik denevércsoport képviselőjéből, a *Hipposideros gigas* fajból (Wu és mtsai., 2012). Az elmúlt évek vonatkozó kutatásai ellenére is kevésbé feltárt a BtPV-ok evolúciós múltja, diverzitása, elterjedése és állat- vagy humánegészségügyi jelentősége.

1.3.4 *Coronaviridae* család

A koronavírusokat taxonómiaiilag a *Nidovirales* renden belül a *Coronaviridae* víruscsaládba soroljuk. Ezen belül *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- és *Gammacoronavirus* genusokat különítünk el. A koronavírusok burokkal rendelkező, gömbölyű, kb. 120 nm átmérőjű részecskék, amelyben az RNS-genom a nukleoproteinhez kapcsolódik, és együtt alkotják a nukleokapszidot. A koronavírusok genomja 27-32 kb méretű, pozitív, egyszálú RNS, amely 3' végén poly(A)-farkat tartalmaz (Fehr és Perlman, 2015).

A denevérekkel összefüggésben két genust ismerünk, az alfa- és bétakoronavírusokat melyek általánosan is emlősöket fertőznek. A denevérek szerepét a felbukkanó fertőző betegségek megjelenésében jól példázza két humán pathogén bétakoronavírus felbukkanása az elmúlt évtizedekben (Severe Acute Respiratory Syndrome – SARS és Middle Eastern Respiratory Syndrome Coronavirus – MERS) (Hu és mtsai., 2015; Adams és mtsai., 2017). A SARS koronavírus pandémiát követően a denevérek virológiai célú vizsgálata jelentősen növekedett, aminek eredményeként világszerte rendkívüli diverzitást tártak fel az általuk hordozott koronavírusokkal összefüggésben. A pandémiát okozó vírustörzs eredetét egyértelműen visszavezették az úgynevezett SARS-szerű bétakoronavírusok csoportjához, melyeket elsőként (a járvány forrásaként) kínai patkósorrú denevérfajokban azonosítottak (*Rhinolophus sinicus*, *R. pearsonii*, *R. ferrumequinum*, *R. macrotis* és *R. pusillus*) (Lau és mtsai., 2005; Ren és mtsai., 2006; Hon és mtsai., 2008). Ezt követően, SARS-szerű koronavírusokat mutattak ki világszerte, melyek alapján a (jelenlegi tudásunk szerint) a denevéreket tartják ezek természetes rezervoár szervezetének (Chen és mtsai., 2016; He és mtsai., 2014; Yang és mtsai., 2013; Yang és mtsai., 2015; Drexler és mtsai., 2010; Lelli és mtsai., 2013; Hu és mtsai., 2015). A denevérek által hordozott koronavírus (BtCoV) kimagasló prevalenciával és jelentős genetikai diverzitással jellemezhetők, habár patogenitásuk a denevérekre nézve egyelőre nem bizonyított. Emellett számos egyéb vonatkozásuk sem ismert, mint a denevérek közötti transzmissziós útvonaluk vagy egyéb ökológiai vonatkozásuk (Drexler és mtsai., 2011). A BtCoV-ok, felbukkanó fertőző betegségekben betöltött szerepére egy másik markáns példa a MERS vírus (Anthony és

mtsai., 2017). A koronavírusok zoonótikus potenciáljára már több példát is leírtak, és az esetek nagyrésztében ezek genetikai, molekuláris biológiai hátterét is részben feltárták (Hu és mtsai., 2015; Menachery és mtsai., 2015). Ennek ellenére a csoport evolúciójában szerepet játszó folyamatok még nem teljesen ismertek, melyre jó példa egy nemrég felfedezett víruscsaládok közti rekombináció eredményeként létrejött új koronavírus. A vírus egy funkcionális, ortoreovírus eredetű gént hordoz magában (Huang és mtsai., 2016).

1.3.5 *Parvoviridae* család

A *Parvoviridae* családba burok nélküli, körülbelül 5 kb nagyságú, egyszálú DNS-sel rendelkező vírusok tartoznak. A *Densovirinae* alcsaládba csak ízeltlábúakat fertőző vírusokat sorolnak, míg a *Parvovirinae* alcsalád humán és más gerinces állatokat is fertőző vírusokat tartalmaz. A *Parvovirinae* alcsalád jelenleg 8 törzsre osztott (Cotmore és mtsai., 2014). A DNS vírusok között a parvovírusok mutatják a legmagasabb mutációs rátát, melynek mértéke hasonló az RNS vírusok esetében megfigyelt értékekkel. Variabilitásukat tovább fokozza, hogy nagymértékben hajlamosak rekombinációra is (Shackelton és mtsai., 2007; Decaro és mtsai., 2009). A parvovírusok emberben és az állatokban különböző akut és krónikus betegségekkel hozhatók összefüggésbe. A dependovírusok, Parvovírus B19, humán bocavírus, Parvovírus 4 és a nemrég leírt bufavírusok hozhatók direkt vagy indirekt összefüggésbe humán megbetegedésekkel (Brown, 2010; Phan és mtsai., 2012).

Az embert fertőző bufavírust 2012-ben izolálták egy akut hasmenésben szenvedő gyermek székletmintájából (Phan és mtsai., 2012). Azóta számos földrajzi régióból sikerült azonosítani a vírust, elsősorban humán mintákból (Smits és mtsai., 2014; Väisänen és mtsai., 2014; Yahiro és mtsai., 2014). Evolúciós eredetük ezeknek az újonnan leírt vírusoknak még ismeretlen, habár bufavírusokat találtak már nem humán főemlősök, rágcsálók és sertések székletmintáiban is (Sasaki és mtsai., 2015; Hargitai és mtsai., 2016; Liu és mtsai., 2016).

1.3.6 *Filoviridae* család

A *Filoviridae* család tagjai, mint például az ebolavírusok (*Bundibogyo*, *Reston*, *Sudan*, *Tai forest*, *Zaire ebolavirus*) és a *Marburg marburgvirus* világszerte jelentős közegészségügyi kockázattal bírnak. Az ebolavírus okozta napjaink egyik legpusztítóbb járványát Nyugat-Afrikában, mely több mint 28 ezer embert érintett és 40%-os halálozási aránnyal járt (Coltart és mtsai., 2017). A filovírusok eltérő hosszúságú (665-805 nm) filamentáris szerkezettel rendelkező kórokozók. Genomja nem szegmentált, negatív, egyszálú, hozzávetőlegesen 19 kb hosszúságú lineáris RNS-ből épül fel, amely hét fehérjét kódol (NP, VP35, VP40, GP/sGP,

VP30, VP24 és RdRp). Mind a 3', mind pedig az 5' végén a genomnak szokatlanul hosszú UTR-ek konzerváltak (Messaoudi és mtsai., 2015).

Annak ellenére, hogy az elmúlt, közel 30 év során számos kísérletet tettek a filovírusok természetes rezervoár fajainak azonosítása érdekében, csak az utóbbi időben vált világossá, hogy a denevérek lehetnek az ebolavírusok és a marburgvírusok lehetséges gazdaszervezetei. Az elmúlt 10 évben többféle denevérfaj esetében észleltek filovírus eredetű RNS-t és antitesteket (Carroll és mtsai., 2013). Kínából származó denevér mintákból genetikailag változatos filovírusokat izoláltak, ezzel egy nem várt genetikai variabilitást és eloszlást írtak le ezeknél a vírusoknál is (He és mtsai., 2015; Yang és mtsai., 2017). A Spanyolországban, *Miniopterus schreibersii* denevérből izolált *Lloviou virus* (LLOV) által Európa is lehetséges földrajzi régiója lett a filovírusok elterjedésének (Negredo és mtsai., 2011). A LLOV az egyetlen tagja a *Cuevavirus* nemzetségnek, 2002-es megjelenése óta nem jelentettek újabb esetet. Az új vírus *in vitro* izolálása és a teljes genetikai jellemzése is kudarcba fulladt, ezáltal a vírus tanulmányozása nagyon nehézkessé vált (Burk és mtsai., 2016). A LLOV humán patogenitása, illetve esetleges kóroki szerepe a humán fertőzésekben még nem tisztázott, viszont számos rekombináns LLOV fehérjével végzett kísérlet azt mutatja, hogy a vírus képes lehet az embert és a denevért is egyaránt fertőzni. Megfigyelték ugyanis, hogy a vírus ugyanazokat a receptorokat használja, mint az ebolavírusok (Burk és mtsai., 2016). Mivel nincs elérhető, replikációra képes LLOV izolátum, illetve megfelelő kísérleti állatmodell sincs a vírus tanulmányozására, a vírus patogenitásának tisztázása jelenleg az egyik legnagyobb kérdés a filovírusokkal foglalkozó virológusok körében. A valószínűsített kapcsolat a LLOV és a spanyolországi tömeges *Miniopterus* denevérek elhullása között felveti a lehetőségét annak, hogy van egy természetes hordozója a vírusnak, amely ezidáig azonban még ismeretlen maradt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink elsődleges célja a hazánkban, illetve a régióban előforduló, állatok által hordozott vírusok jellemzése volt. Elsősorban olyan vírusokra összpontosítottunk, amelyeknek jelentős szerepe van /lehet humán- és/vagy állategészségügyi, közegészségügyi és járványügyi szempontból. Ennek megfelelően vizsgálatainkat főleg a természetben gyakran előforduló rágcsálók, szúnyogok és kullancsok által hordozott vírusok felmérésére irányítottuk, illetve a későbbiekben, egy napjainkban egyre növekvő tendenciát mutató kutatási irányt, a denevérek által hordozott vírusok körét vontuk be. Módszertani palettánk részeként elsősorban molekuláris biológiai technikákat hívtunk segítségül, de jelentős hangsúlyt fektettünk az immunológiai és hagyományos virológiai metodikák alkalmazására is. Mivel sok esetben új, ismeretlen kórokozók felderítése és molekuláris jellemzése volt a fő cél, ezen kísérleteinkben kutatási stratégiánkat elsősorban metagenomikai megközelítéseken alapuló technikákra alapoztuk.

Céljaink voltak:

- A hazai **hantavírusok** komplex vizsgálata, amely magába foglalta a molekuláris biológiai, klinikai és epidemiológiai ismereteink bővülését a vírussal kapcsolatban.
- A **kullancsenkefalitisz vírus** hazai kimutatása rágcsálókból és a vektor szervezetekből egyaránt. A kimutatott vírusok filogenetikai, filogeográfiai besorolása.
- A **Krími-kongói vérzések láz vírus** hazai vizsgálata, a vírus tényleges jelenlétének igazolása (vagy cáfolása), molekuláris biológiai és szerológiai technikák alkalmazásával.
- A **Nyugat-nílusi vírus** hazai és régiós szintű kimutatása, valamint sokrétű molekuláris biológiai jellemzése, filogenetikai analízise.
- Az **Usutu vírus** régiós kimutatása, filogenetikai besorolása.
- A **denevérek által hordozott vírusok** esetében a korszerű molekuláris biológiai módszerek nyújtotta lehetőségeket kihasználva új vírusok leírását céloztuk meg, amely így együtt járt a vírusok részleges vagy teljes genomjának meghatározásával. Ennek segítségével feltérképezhetővé váltak a vírusok evolúciós szintű változásai, jellemezhetők filogenetikai, filogeográfiai kapcsolataik vagy akár megismerhetők a virális fehérjék struktúrái és azok feltételezett funkcionális szerepe. Fontos kérdésünk volt a vírusok tényleges gazdafajainak megismerése és ezáltal a fajok közti átadás lehetőségének, a lehetséges állategészségügyi kockázatnak, vagy akár a potenciális zoonótikus képességnek a felmérése is.

3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

A doktori értekezésben tárgyalt eredmények elérésének céljából az elmúlt években számos laboratóriumi módszert alkalmaztunk és fejlesztettünk, amelyek széles körben lefedték elsősorban a molekuláris biológia és immunológia, de részben a hagyományos virológia módszertanát is. Mindemellett, a bioinformatika határtalan fejlődése lehetőséget adott az újabb elemző szoftverek alkalmazására és így eredményeink bővebb, átfogóbb interpretálására. Mivel az MTA Doktori Értekezés célja elsősorban az új tudományos eredmények bemutatása és nem a részletes, az ismételhetőség tekintetében pontos laboratóriumi eljárások leírása, így ebben a részben törekedtem a rövid, tömör leíratok elkészítésére, amelyekből ugyan egyértelműen kiderül az a sokszínű módszertani paletta, amit az elmúlt időszakban használtunk, mégis figyelembe veszi a dolgozat terjedelmi és tartalmi kritériumait is.

3.1 Vizsgálati minták gyűjtése

3.1.1 Rágcsáló minták gyűjtése

A hantavírus vizsgálatok esetében a legfontosabb hordozó fajokat gyűjtöttük és vizsgáltuk, nevezetesen: AFL, AAG, MGL és *Microtus arvalis* (MAR). A kisemlősöket a Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Állatökológia Tanszék munkatársaival (Dr. Horváth Győző irányításával) közösen csapdáztuk elsősorban Somogy- és Baranya megye területén, illetve hazai és horvátországi határmenti területeken. Mivel a Tanszék munkatársainak elsődleges kutatási tevékenysége a rágcsálókkal kapcsolatos ökológiai felmérések voltak, vizsgálataink alapját a csapdázások során természetesen elhullott rágcsálók képezték. A rágcsálók faj szintű meghatározását az Ökológiai Tanszék szakavatott taxonómusai végezték, az igen jellegzetes morfológiai bélyegek alapján.

Kísérleteinkben a rágcsálók tüdőszövetében szaporodó vírusokat kerestük, így természetesen a vizsgálataink tárgyát képező kisemlősök boncolása elengedhetetlen volt. A megfelelő biztonsági és sterilitási feltételek betartása mellett a boncolás folyamán kiemeltük az állatok tüdejét, máját, veséjét, agyvelejét és amennyiben lehetséges volt a lépét is. A mintákat feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

3.1.2 Ízeltlábú vektorok (kullancsok, szúnyogok) gyűjtése

Kullancsok esetében a gyakorlatban igen elterjedt, legegyszerűbb, kézi gyűjtési módszert alkalmaztuk, melynek során egy hagyományos törölköző segítségével sikerült

összegyűjteni az állatokat az aljnövényzetről. A gyűjtést részben csoportunk munkatársai, részben pedig a Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvostudományi Intézetének (MTA, ATK, ÁTI) (Dr. Gyuranecz Miklós munkacsoportja segítségével) kutatói végezték Baranya és Békés megyében.

A csípőszúnyogok (*Culicidae*) gyűjtését Baranya megye négy helyszínén kezdtük meg, hagyományos CDC (Centers for Disease Control and Prevention) szén-dioxid (CO₂) csalogatós csapdákkal és kézi gyűjtéssel. A négy, monitorozás alá vont pont mindegyike vándormadarak által sűrűn látogatott, aktív csípőszúnyog tenyészhely volt (Sumony madárvárta, Drávapalkonya ártér, Mohács-Kölked Duna holtág és Pellérdi láprét). Monitorozási tevékenységünket folyamatosan végeztük, majd 2014-től kiterjesztettük Szerbia délvidéki régiójára, illetve Pécs város területére is. A gyűjtési módszer hasonlóan az előző munkához CDC-CO₂ csapdákkal történt, minden esetben a szúnyogok aktív tenyészidőszakában (május-szeptember).

Az ízeltlábúak faj szintű meghatározását ebben az esetben is szakavatott taxonómusok végezték a jellegzetes morfológiai bélyegek alapján.

3.1.3 Humán vérminták gyűjtése

A hantavírusok okozta fertőzések klinikai vizsgálatához a humán betegmintákat a PTE, Klinikai Központ, I. számú Belgyógyászati Klinika, Infektológiai Tanszék (Dr. Péterfi Zoltán), illetve a II. számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum munkatársainak (Dr. Sebők Judit, Prof Dr. Wittmann István) segítségével gyűjtöttük. (A minták kizárólag kutatási, és nem diagnosztikai céllal kerültek begyűjtésre. Diagnosztikai vizsgálatot csak az érintett referencia laboratórium végezhet el. Erre a klinikus kollégák figyelmét minden esetben felhívtuk.) A klinikai vizsgálatokhoz akut veseelégtelenségben (AKI) szenvedő betegek vérmintáit gyűjtöttük, akik megfeleltek a következő kritériumoknak: szérum-kreatinin koncentráció magasabb, mint 125 $\mu\text{mol/l}$ a kórházi felvételnél, és minimum 1,5-szeres emelkedést mutatott a felvételt követő 7 napban. További kritériumok voltak (amelyek a hantavírus fertőzés gyanúját vetették fel): láz ($\geq 38^\circ\text{C}$), magas fehérvérsejt-szám, trombocitopénia, emelkedett transzamináz szint, valamint vizelet kiválasztási/ürítési problémák. A szérum mintákat -20°C -on tároltuk a feldolgozásig. Az epidemiológiai és klinikai adatokat a kórházi felvétel időpontjában, valamint a teljes klinikai ápolás ideje alatt rögzítettük.

A humán érintettségű hantavírus vizsgálatok másik nagy célcsoportja a fertőzésnek leginkább kitett rizikócsoport (erdészek, vadászok, mezőgazdasági dolgozók) volt. A

vizsgálathoz önkéntesektől vettünk vért, a lehető legszélesebb földrajzi területéről hazánkban. Minden véradó esetében gyűjtöttünk háttéradatokat is a későbbi adatelemzéshez. A vizsgálatok etikai engedély száma: ETT-TUKEB No#2213-0/2010-1018EKU.

3.2 Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1 Nukleinsav preparálás

A virális nukleinsav preparálását mindig az adott kísérlethez igazítva végeztük el. A legtöbb vizsgálatnál a kereskedelmi forgalomban is kapható nukleinsav izoláló kytteket (Viral Nucleic Acid Extraction Kit II – Geneaid, GeneJET Viral DNA and RNA purification Kit – Thermo Scientific, QIAamp MinElute Virus Spin Kit – Qiagen) használtuk, minden esetben betartva a gyártó által előírt paramétereket. Abban az esetben, ha a kísérlet megkövetelt más jellegű nukleinsav izolálást, leggyakrabban a TRIzol (Invitrogen) alapú módszert, vagy a hagyományos Guanidin-thiocianát-Silica (GTC-Silica) extrakciós technikát alkalmaztuk.

3.2.2 RT-PCR, qRT-PCR vizsgálatok (TaqMan próba)

Mivel a vizsgálat kórokozók a kísérletek jelentős részében RNS vírusok voltak, leggyakrabban egy-lépéses (one-step) reverz transzkripció polimeráz láncreakciót (RT-PCR) alkalmaztunk, mind a hagyományos, végpont RT-PCR, mind pedig a TaqMan próbás RT-PCR során. Ezekhez főleg a Qiagen cég által forgalmazott terméket használtuk (One Step RT-PCR Kit) a gyártó által meghatározott paraméterek alkalmazásával.

Abban az esetben, ha a kísérlet komponensekből történő összemérést igényelt, az összemért RT reakció-keverékben (25 µl) a reagensek koncentrációi a következők voltak: 1x AMV puffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, pH 8,3), 0,4 mM dNTP mix (Promega), 2U AMV-RT (Promega), 4U nukleáz inhibitor (Promega), 0,05 µM dithiothreitol, 50 pmol primer (kísérlettől függően). E keverékből mintánként 20 µl-t, az RNS mintából 5-5 µl-t használtunk. Az RT 42 °C-on 60 perc alatt ment végbe. A PCR összemért reakciókeverékben (50 µl) a reagensek koncentrációja a következő volt: 1x GoTaq® Flexi Buffer, 4 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP mix, 50 pmol-50 pmol primer (kísérlettől függően), 1,25U GoTaq® polimeráz (Promega), 5 µl cDNS. Az amplifikációs programban a kezdő denaturáció 95 °C-on 5 perc alatt játszódott le, amit 40 ciklusból álló láncreakció következett. A primerek kapcsolódása 47-58 °C-on (kísérlettől függően) 30-90 másodperc alatt (kísérlettől függően) történt, majd az ezt követő extenzió 72 °C-on egy percre tartott.

Kísérleteink során a 3 kb-nál hosszabb nukleotid szakaszok felsokszorozásának céljából Phusion U Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific), valamint SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) enzimeket használtunk.

3.2.3 3' RACE PCR

A 3' genomi végek meghatározása céljából a 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) módszert alkalmaztuk. A felhasznált, univerzális oligonukleotid primerek a következők voltak: 5' - GAC TCG AGT CGA CAT CGA polyT - 3'; 5' - GAC TCG AGT CGA CAT CGA - 3'. Ezen felül minden esetben génspecifikus primerek kerültek felhasználásra. A kísérlethez a Superscript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) rendszert alkalmaztunk, a gyártó által javasolt előírásokat és javaslatokat követve. A genom 5' végének meghatározását az 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation Kit (Roche) segítségével végeztük.

3.2.4 Hagyományos „Sanger” szekvenálás

A szekvenálási reakcióhoz szükséges RT-PCR termékeket kereskedelmi forgalomban kapható kitek (QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen, Wizard® SV Gel és PCR Clean-Up Kit – Promega, Gel/PCR DNA fragments extraction kit – Geneaid) segítségével tisztítottuk ki az agaróz gélből, a gyártó utasításai alapján.

A szekvenálási reakciót BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával, a kísérlet jellegétől függő oligonukleotid primerekkel végeztük el. Az amplifikációs programban a kezdő denaturáció 96 °C-on 1 perc alatt játszódott le, ezt 25 ciklusból álló amplifikáció követett, melyben a denaturáció 96 °C-on 20 másodperc alatt, a primerek kapcsolódása 50 °C-on 5 másodperc alatt ment végbe, majd az elongáció 60 °C-on 4 percig tartott. A reakciót követően a mintákhoz 40 µl nukleázmentes vizet (Promega) adtunk, majd a szekvenálandó termék kicsapása 0,1 térfogat 3 M nátrium-acetát oldattal (pH 7,0) és 2 térfogat abszolút alkohollal történt. A minták centrifugálása (30 perc, 16 000 x g) után, a kicsapódott termékeket 70%-os alkohollal mostuk, majd a pelletet 50 °C-on 3 percig szárítottuk. A nukleinsav visszaoldásához 20 µl formamidot (Hi-Di) használtunk. A szekvenálást automata ABI Prism 310 DNS szekvenáló készülékkel (Applied Biosystems) végeztük.

3.2.5 NGS alapú szekvenálás

Kísérleteink bizonyos szakaszában újgenerációs szekvenálást (NGS) is alkalmaznunk kellett, amely egy igen komplex előkészítést igényelt. Röviden: az Ion Torrent PGM (Life

Technologies) kompatibilis szekvenálási könyvtárakat a NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent Kit (New England Biolabs) használatával készítettük el. A könyvtárkészítés során az IonTorrent Xpress barcode adapterei (Life Technologies) kerültek felhasználásra. A klonális fragment amplifikációt elvégző emulziós PCR reakciókat az Ion OneTouch 200 Template Kit felhasználásával, a OneTouch 2 (Life Technologies) platformon végeztük. A templátok dúsítását az Ion OneTouch ES pipettázó robot végezte. A szekvenálásokhoz a 200 bázispáros szekvenálási protokollt alkalmaztuk, 316-os chip felhasználásával, Ion Torrent PGM platformon. A szekvencia adatok de novo összeszerelését a MIRA v3.9.17 szoftver alkalmazásával végeztük. További bioinformatikai elemzéseket, validációt és javításokat a CLC Genomics Workbench szoftver segítségével oldottuk meg.

3.2.6 Klónozás, transzformálás, fehérje expresszióhoz szükséges plazmidok előkészítése

A kísérletek jelentős részében a könnyebb kezelhetőség miatt a PCR terméket közvetlenül TA-klónozó rendszerbe (pGEM-T Vector System; Promega) juttattuk be, majd a fragmentumot pET28a(+) (Novagen) expressziós vektorba klónoztuk. Ennek érdekében a tisztított vektorokból 2-2 µg-ot használtunk fel a kettős emésztéshez. A restrikciós endonukleáz emésztéseket kísérlettől függő kombinációban végeztük el (NdeI/XhoI, NheI/XhoI) (New England Biolabs) a megfelelő enzimpuffer jelenlétében 2 óráig 37 °C -on. A keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, és a gélből tisztítottuk (az előbb ismertetett kitek egyikével).

A restrikciós emésztést a ligálási reakció követte. A ligálási elegyet 50 ng vektor, 30 ng fragmentum DNS, enzim kompatibilis ligáz puffer és 1 U T4 DNS ligáz (Promega) alkotta. A reakció 15 °C-on, 18 órán keresztül zajlott. A ligálási reakció eredményeként keletkezett pET28a(+)-virális rNP plazmid konstrukciót első lépésben *E. coli* DH5α (Promega) kompetens sejtekbe transzformáltuk (5 µl plazmid konstrukció). Ezt követően a sejteket 30 µg/ml kanamycint (Sigma) 1,0 mM IPTG-t (Sigma) és 0,004% X Gal oldatot (Promega) tartalmazó táptalajra szélesztettük, és egy éjszakán át 37 °C-on növesztettük. A transzformálás hatékonyságának megállapítása érdekében, a hagyományos kék-fehér kolónia szelekció módszerét alkalmaztuk (Inoue és mtsai., 1990). A pozitív (fehér) klónokat, 3 ml, 30 µg/ml kanamycint tartalmazó LB tápfolyadékban folyamatos rázatás mellett (200 rpm) növesztettük 37 °C-on 12-15 órán keresztül, majd a felszaporodott *E. coli* sejtekből plazmid izolálást végeztünk (Wizard® Plus SV Miniprep Kit, Promega) a gyártó utasításai szerint. A tisztított vektort ezután expressziós *E. coli* törzsbe, BL21 Rosetta (DE)pLysS (Novagen) kompetens sejtekbe transzformáltuk.

3.2.7 Rekombináns fehérje expresszió, fehérjetisztítás

A rekombináns plazmidot tartalmazó BL21 Rosetta sejteket 37 °C-on, folyamatos rázatás mellett (200 rpm) LB tápfolyadékban növesztettük 30 µg/ml kanamycin és 35 µg/ml kloramfenikol jelenlétében. A logaritmusos fázis (OD₆₀₀ 0,8-1,0) elérésekor a sejtek indukcióját 1,0 mM IPTG hozzáadásával indítottuk. Az indukció 15 °C-on 20 órán keresztül történt, majd a sejteket üleptítettük és felhasználásig a sejt pelletet 20 °C-on tároltuk.

A fehérje expressziót követően a sejt pelletet Bacterial Protein Extraction Reagent® (B-PER; Thermo Scientific) segítségével oldottuk fel a gyártó utasításai alapján. Röviden, egy gramm nedves tömeghez 4 ml B-PER reagenst, 8 µl lizozim enzimet (50 mg/ml) és 8 µl DNase I enzimet (2500 U/ml) adtunk. A szuszpendálást követően az elegyet szobahőmérsékleten 20 percet inkubáltuk, majd ezt követően centrifugáltuk (30 perc, 20 000 x g, 4 °C), hogy az oldatban maradt fehérjéket elválasszuk a zárványtestet (inclusion body) alakító proteinektől. A zárványtesteket képző proteinek feltáráshoz denaturáló lízis puffert (6 M guanidine HCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris HCl, pH 8) alkalmaztunk. A lizátumból az esetleges sejt törmelékét centrifugálással távolítottuk el.

A rekombináns fehérjék tisztítása a sejtek feltáráshoz hasonlóan denaturáló körülmények között zajlott HIS Select® HF Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich) oszlop segítségével. A fehérje felkötése a gyantára 4 °C-on történt, a lizátumot többször átfolyatva az oszlopon. Az eluálást csökkenő pH-jú denaturáló oldatsorozattal végeztük (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris) pH 8,0 és 4,0 között csökkentve. A fehérjetisztítás után mind az átfolyót, mind az elúciós frakciókat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával (Mini-PROTEAN® TGX; Bio-Rad) választottuk el, és Comassie blue (Brilliant Blue R, Sigma) segítségével tettük láthatóvá.

A fehérjék renaturálását dialízissel végeztünk el (dialízis membrán: 12,4 kDa; Sigma). A folyamat során fokozatosan csökkentettük a fehérjét tartalmazó oldat urea koncentrációját a dializáló puffer (6 M urea, 20 mM Hepes, pH 7,9; 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 0,5 mM PMSF) hígításával. A fehérjék pontos méretét, tisztaságát és koncentrációját Protein LabChip® Kit segítségével Agilent 2100 Bioanalyzer készülék (Agilent Technologies) használatával állapítottuk meg a gyártó utasításai szerint.

3.2.8 Transzgenikus CHO sejt vonal előállítása

Transzgenikus kínai hörcsög ovarium (CHO) sejteket a KKVLV vizsgálataink során használtunk (Dr. Kvell Krisztián munkacsoportjával kollaborációban). Röviden, a KKVLV NP-t kódoló nukleinsav fragmentet EF1α promotert tartalmazó lentivirális pWPIR transzfer

plazmidba klónoztuk. Ezt követően lentivirális vektorokat állítottunk elő a korábban publikált módon (Kvell és mtsai., 2005). Egy envelope szerkezetet (pMD.G), egy csomagoló plazmidot (R8.91) és egy transzfer plazmidot (pWPTS-alapú konstrukciókat) kalcium-foszfát transzfekciós módszerrel tranziensen ko-transzfectáltunk humán embrióvese sejtekbe (HEK 293T). A vírust termelő sejtek felülcsóóját 48 órával később gyűjtöttük össze. Végül, a megcélzott CHO sejteket spinokulációval fertőztük.

3.3 Immunológiai módszerek

3.3.1 Western blot (WB) vizsgálat

A fehérjemintákat gélelektroforézis alkalmazásával, 10%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk el és elektroblottolással nitrocellulóz membránra (BioRad) juttattuk át. A transzferálás Semi-Dry Transfer készülékkel (BioRad), 120 mA áramerősségen, 25 percig történt. A nem specifikus kötéseket blokkolását 30 percen át 5% tejport (Bio-Rad) tartalmazó TBS pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) végeztük. Az antitesteket minden esetben 0,1% BSA-t tartalmazó TBS-T pufferben (0,05% Tween-20, TBS) hígítottuk. Elsődleges antitest jellegét és koncentrációját az adott kísérlet határozta meg, azonban a His-fehérje szakasz jelölésére minden esetben 1:1000 hígításban Penta-His monoklonális antitestet (Qiagen) használtunk. Az egy órás inkubálás után a membránokat háromszor 10 percig mostuk TBS-T pufferben. Másodlagos antitestként tormaperoxidázal (HRP) konjugált, kecske, anti-egér IgG (1:1000, Dako), illetve poliklonális, anti-humán IgG antitestet (1:2000, Dako) alkalmaztunk. Az ismételt háromszori 10 perces mosást követően a reakciót kromogén oldat, DAB-NiCl₂ (3, 3' diaminobenzidine; Sigma) és H₂O₂ segítségével tettük láthatóvá.

3.3.2 ELISA vizsgálat

Standard, indirekt ELISA vizsgálatokat a hantavírus illetve a KKVLV kísérletek során alkalmaztunk. A kísérletekben a 96 lyukú mikrotiter lemezeket (Maxisorp Nunc Immuno Plate, Nunc) rNP antigénnel érzékenyítettük, melynek hígítását karbonát-bikarbonát pufferrel (40 mM Na₂CO₃, 60 mM NaHCO₃, pH 9,6) végeztük. Az érzékenyítés 37 °C-on, 2 órán keresztül történt. A háromszori PBS mosást követően a nem specifikus kötőhelyek blokkolására 5% BSA/PBS oldatot használtunk. Az egy órás 37 °C-on történő inkubálás után a lemezeket ötször mostuk PBS-T-vel (0,5% Tween 20, PBS). Ezt követően 1:100 hígításban 100-100 µl rácsáló, illetve nyúl savót adtunk minden lyukhoz, és egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, melyet ismételt mosás követett. HRP konjugált, kecske, anti-egér IgG

antitestet (1:5000, Dako) vagy kecske, anti-nyúl IgG antitestet (1:3000, HRP) használtunk másodlagos antitestként. Az antitestek hígításához minden esetben 1% BSA-t tartalmazó PBS-T-t alkalmaztunk. Ötszöri mosást követően 100 µl 3,3',5,5'-tertrametilbenzidin szubsztrátot (TMB; BD Biosciences) adtunk a lyukakhoz, és 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Az enzimreakciót 2 M H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le, és az eredményeket mikrotiter lemez spektrofotométerrel (Thermo Electron Corporation) 450 nm hullámhosszon mértük.

A humán vérsavókkal végzett ELISA vizsgálatok kisebb változtatással az előzőekben leírtakkal megegyezően zajlottak, rNP alkalmazásával.

3.3.3 Immunfluoreszcens vizsgálat

Kísérleteinkben a CHO-KKVLV transzfektált sejtvonalat metanolos fixálást követően tárgylemezre szárítottunk. A hígított szérumot, mely feltételezhetően tartalmazza a vírus specifikus IgG-t, 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 3 x 10 perc mosási lépést követően kecske, anti-nyúl IgG Alexa Fluor 488 (Abcam) szekunder antitestet adtunk. A mosási lépéseket követően az eredményeket Nikon Eclipse Ti-U mikroszkóp rendszerrel, 480 nm gerjesztési hullámhosszon értékeltük.

3.4 Vírusizolálási kísérletek

3.4.1 Alkalmazott sejtvonalak

Vizsgálataink során az izolálni kívánt vírustól függően számos állati és humán sejtvonalat használtunk. A legfontosabbak a következők voltak: Vero E6 (afrikai szavannacerkóf vese sejtvonal, ATCC CRL 1586), HEK 293 (humán embrió vese, ATCC CRL-1573), A549 (humán tüdőkarcinóma, ATCC CCL-185), Tb1-Lu (denevér – *Tabarida brasiliensis* tüdő sejtvonal, ATCC CCL-88) és C6/36 (szúnyog – *Aedes albopictus* lárva sejtvonal ATCC CRL-1660).

3.4.2 Sejtek előkészítése, vírusizolálási kísérletek

A begyűjtött mintákból származó (szúnyog, kullancs és szervek) homogenizátumok (PBS vagy DMEM tápfolyadék) centrifugálását követően 200 µl felülszót vittünk a 70%-ban konfluens sejtekre és 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében egy órán keresztül inkubáltuk, miközben 10-15 percenként átmozgattuk a 25 cm²-es sejtenyésztő edényeket. Az inkubáció leteltével a szöveten lévő inokulumot eltávolítottuk, majd megfelelő mennyiségű fenntartó tápoldatot mértünk a sejtekre (2% FBS és 5% Penicillin-Streptomycin tartalmú DMEM). Ezt követően a

sejtenyészeteket 37 °C-on, 5% CO₂ jelenléte mellett, nedves környezetben tároltuk és hét-tíz napig figyelemmel kísértük a kórokozók esetleges szaporodását jelző szöveti elváltozásokat.

A zoonótikus potenciállal rendelkező vírusok esetében előfordulhat a laboratóriumi fertőzés is, ennek megfelelően, minden izolációs kísérletet kizárólag 3-as, illetve 4-es biológiai biztonsági szinten (BSL-3 és BSL-4) végeztünk (ahol ez szükséges volt) a Pécsi Tudományegyetem, Szentágothai János Kutatóközpont BSL-3 és BSL-4 Virologiai Laboratóriumában.

3.5 A molekuláris analízisek módszerei

3.5.1 Filogenetikai analízis

Az alapvető szekvencia szerkesztéseket és ellenőrzéseket GeneDoc 2.7-es verziójú szoftver segítségével végeztük. A nukleotid szekvenciákat a ClustalX 2.0 szoftverrel igazítottuk egymáshoz, amelyet követően a filogenetikai analízist a MEGA (v3.1, v5.0 és v6.0) programmal végeztük (Tamura és mtsai., 2013). Az automatikus modellkiválasztást a PhyML online verziójának Smart Model Selection (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml-sm/>) funkciója segítségével valósítottuk meg annak érdekében, hogy mindegyik adatsorunkhoz a legmegfelelőbb filogenetikai modellt használjuk a vizsgálatunk során.

3.5.2 Rekombináció analízis

Kísérleteinkben a BtBV vizsgálatokban rekombináció analízist is végeztünk. A lehetséges rekombinációs események feltárása érdekében az általunk leírt vírusgenomot a SimPlot szoftver v3.5.1 verziójának használatával rekombinációs analízisnek vetettük alá (Lole és mtsai., 1999).

3.5.3 RNS másodlagos szerkezetének elemzése

Az 5'-IRES és 3' UTR régiók másodlagos RNS szerkezetének meghatározásához manuális korrekciók alkalmazásával Mfold programot használtunk (Zuker, 2003).

3.5.4 Polyprotein vágási helyek elemzése

Az új, denevérek által hordozott pikornavírus poliprotein lehetséges vágási helyeinek meghatározásához és ellenőrzéséhez elsősorban a NetPicoRNA program (Blom és mtsai., 1996) predikcióit vettük figyelembe.

3.5.5 Fehérje modellezés

Fehérje szerkezet modellezést csak a calicivírus karakterizálás esetében végeztünk (Dr. Gellért Ákos segítségével – MTA ATK ÁOTI). Az érett víruskapszidok három dimenziós szerkezeti modelljeit az I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) online elérhető automatikus modellépítő szerver segítségével hoztuk létre (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2008; Roy és mtsai., 2010). A modelleket az újonnan azonosított vírus törzsek aminosav szekvenciáinak felhasználásával állítottuk elő. A következő templátokat alkalmaztuk a denevér calicivírus kapszidfehérje szerkezetek modellezéséhez: Feline calicivírus kapszidfehérje (PDBid: 3M8L), egy natív calicivírus kapszidfehérje (PDBid: 2GH8) valamint a Norwalk vírus kapszidfehérje (PDBid: 1IHM) szerkezeteit. A nyers fehérje modelleket a Schrödinger Suite (Schrödinger, 2015) MacroModel energia minimalizáló és geometria optimalizáló moduljával finomítottuk annak érdekében, hogy az aminosav oldallánc atomok közötti térbeli ütközéseket kiküszöböljük. Az aminosav szekvencia illesztéseket az SRS bioinformatikai szoftvercsomag NeedleP eszközével hajtottuk végre. A T=3 csonkolt ikozaéderes szerkezetű virion modelleket a VIPERdb Oligomer Generator (http://viperdb.scripps.edu/oligomer_multi.php) alkalmazásával hoztuk létre. A virion modellek felépítése előtt az új denevér calicivírusok kapszidfehérjéiből álló aszimmetrikus egységeket (A, B és C kapszidfehérje alegységek) a Schrödinger Suite-tal úgy transzformáltuk át, hogy azok azonos orientációban legyenek az FCV és a Norwalk vírus A, B és C alegységeinek VIPERdb adatbázisban lévő koordinátaival. A molekula grafikát és a szekvencia összerendezés vizualizációját a VMD v1.9.1 molekulagrafikai szoftverrel (Humphrey és mtsai., 1996), illetve a Schrödinger Suite Multiple Sequence Viewer alkalmazásával állítottuk elő.

4. EREDMÉNYEK és MEGBESZÉLÉS

4.1 Rágcsálók hordozta hantavírusok komplex hazai vizsgálata

4.1.1 Rekombináns DNS technikák alkalmazása

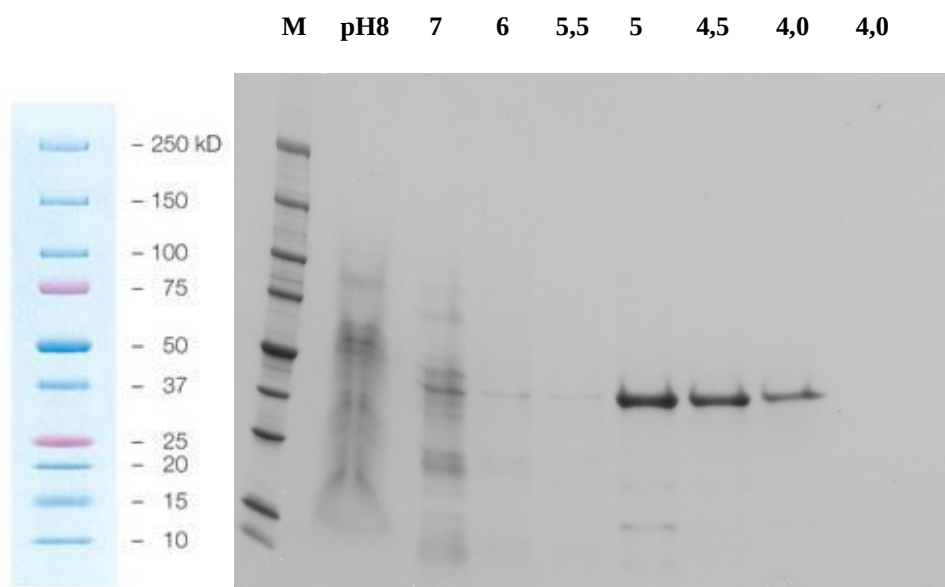
4.1.1.1 Rekombináns fehérje expresszió

A rekombináns fehérje sokrétű alkalmazása lehetővé teszi az egyes laboratóriumok számára, hogy akár saját fejlesztésű szerológiai tesztet (ELISA, WB) használjanak vizsgálataikban. Annak érdekében, hogy mind a humán, mind pedig a kisemlősök vizsgálatát el tudjuk végezni nemcsak a molekuláris biológiai, de szerológiai (antigén alapú) tesztek is optimalizálni kellett. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható hantavírus szerológiai tesztek kísérleteinkhez nem voltak megfelelőek, mivel: i) kizárólag humán minták vizsgálatát teszik lehetővé, így a vadon élő állatok tesztelésére nem alkalmasak, ii) nem minden esetben specifikus az adott régióban cirkuláló hantavírusokra, hiszen a tesztek alapja más földrajzi területről gyűjtött vírusból kiinduló fehérje, iii) kutatási célra nem költséghatékonyak.

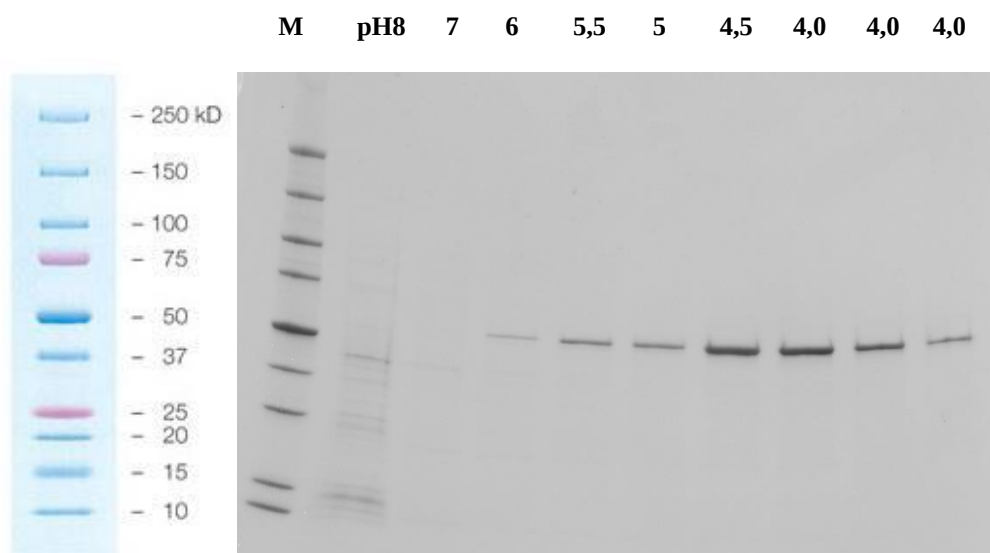
Ennek megfelelően munkánk első lépéseként DOBV és PUUV rekombináns nukleokapszid fehérjéket (NP) állítottunk elő. DOBV esetében nemcsak a teljes NP-t expresszáltuk, hanem a különböző hantavírusok elkülönítésére alkalmas csonka DOBV NP-t (rNP50) is. Araki és munkatársai (2001) igazolták, hogy a hantavírus nukleokapszid protein N terminálisán elhelyezkedő első 49 aminosav tartalmazza az immundomináns, típus azonos epitópokat.

A bakteriális expressziós rendszer alkalmazásának egyik oka, hogy ez a legegyszerűbb fehérje termelő rendszer, aminek használata gyors, és szinte minden laboratóriumban adottak a technikai feltételek a kísérletek elvégzéséhez. Másrészt a virális kapszid protein nem esik át poszt-transzlációs modifikáción, és így nem volt szükséges a nehezen kivitelezhető eukarióta expressziós rendszert alkalmaznunk. Az expresszió kiindulása mind a DOBV mind pedig a PUUV esetében a régióban fogott rágcsálóból kimutatott hantavírus RNS volt. A fehérjék termeltetése *E. coli* BL21 Rosetta törzsben történt pET28a(+) expressziós vektor segítségével. A plazmid genetikai konstrukciójának köszönhetően a képződött rekombináns fehérjék hat darab hisztidinből (6xHis) álló mintázatot kaptak, amely lehetővé tette a túltermeltetett fehérje Ni^{2+} affinitás kromatográfián történő tisztítását. A bakteriális expresszió egyik hátrány azonban az, hogy a nagy mennyiségben termelt, idegen fehérje a sejtekben nem oldott állapotban, hanem zárványokat (zárványtest vagy inclusion body) képezve található meg. Ezeket kaotróp oldószer (6 M guanidin-HCl) segítségével oldottuk fel, majd a Ni-NTA oszlopra kötődött proteint szintén kaotróp oldószerrel (8 M urea), denaturáló körülmények

között tisztítottuk a nem specifikusan kötődött fehérjétől. A fehérje oszlopról történő leválasztását, csökkenő pH-jú oldatsorozattal alkalmazásával végeztük. Az rNP50 először a pH5,0; pH4,5 és pH4,0 frakcióban jelent meg (1. ábra), míg az rNP-t a legnagyobb koncentrációban a pH4,5 és pH4,0 frakciókban tisztítottuk a gyantáról (2. ábra). A PAGE vizsgálatok egyértelműen mutatták, hogy várakozásunknak megfelelően 45-50 kDa méretű, túlermelt fehérjéket kaptunk, hozzávetőlegesen 0,5 mg/ml koncentrációban.

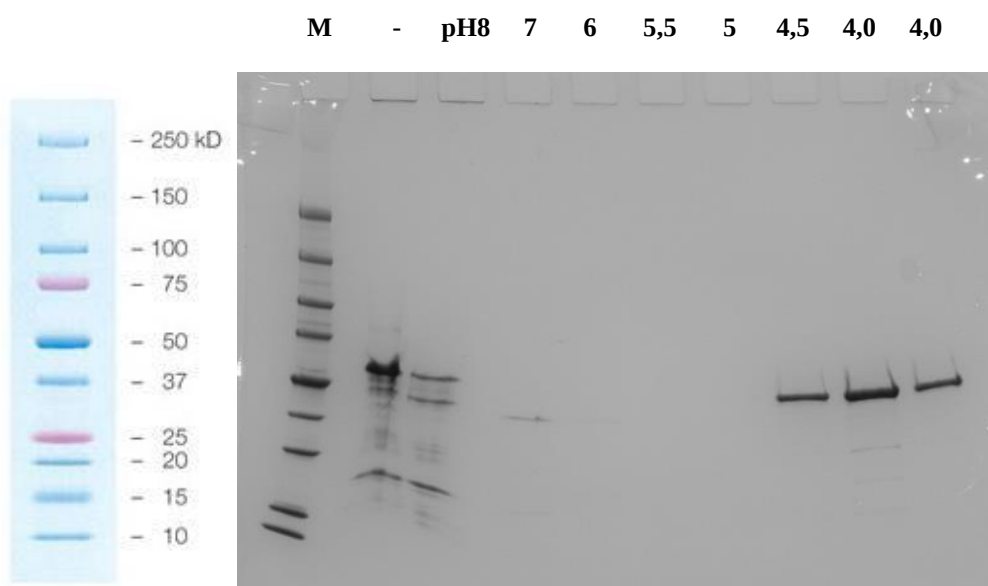


1. ábra. Az rNP50 antigén tisztításának ellenőrzése SDS-PAGE segítségével. M: protein marker (Promega), majd a különböző pH értékekhez tartozó frakciók következnek.



2. ábra. Az rNP antigén tisztításának ellenőrzése SDS-PAGE segítségével. M: protein marker (Promega), majd a különböző pH értékekhez tartozó frakciók következnek.

A teljes PUUV rNP elúciója pH4,5 értéknél indult és pH4,0 értéknél volt a leghatékonyabb (3. ábra). A poliakrilamid gél, valamint a mikrofluidikai analízis alapján a PUUV rNP 59 kDa méretűnek adódott, koncentráció mérés pedig 2 mg/ml értékeket mutatott.



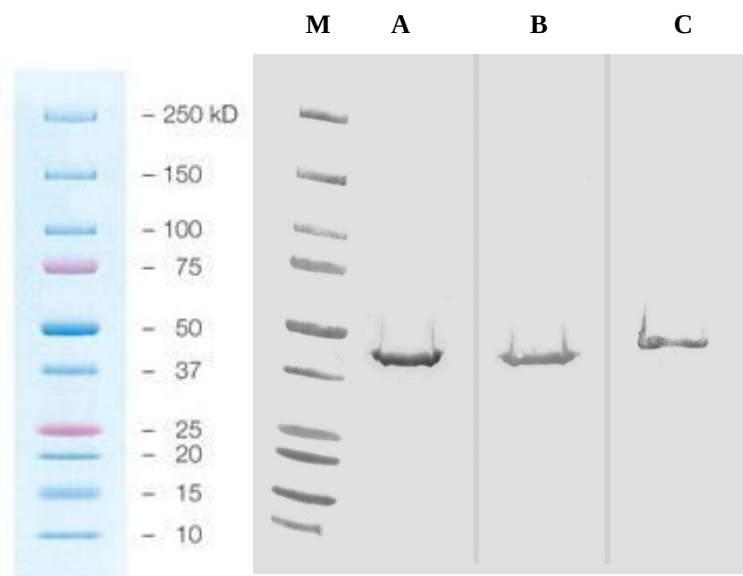
3. ábra. A tisztított PUUV rNP SDS-PAGE képe. M: protein marker (Promega), majd a különböző pH értékekhez tartozó frakciók következnek.

4.1.1.2 WB analízisek

A rekombináns, virális antigének aktivitását, antigenitását WB módszerrel is ellenőriztük (4. 5. és 6. ábra).

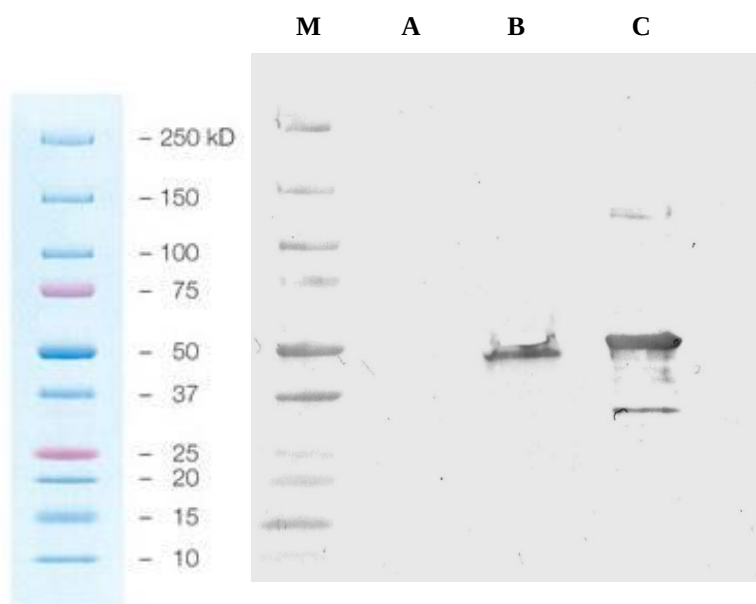
A fehérjék N terminálisán lévő hisztidin (6xHis) motívumra specifikus monoklonális anti-6xHis antitestet és poliklonális anti-DOBV illetve anti-PUUV humán IgG antitesteket használtunk a kísérletekben. Mindkét vírus esetében megfelelő intenzitású jelet kaptunk, ami egyértelműen a fehérjék aktív immunológiai állapotára utalt.

Habár a poliklonális antitestekkel kapott jelintenzitás is az egyértelmű, specifikus pozitív reakció eredménye, a 6xHis monoklonális antitesttel észlelt reakció a célfehérjék jelenlétét minden kétséget kizárólag igazolta. Ilyen mintázat ugyanis a természetben nem fordul elő, így a vizsgálatban kapott jel kizárólag a rekombináns antigén jelenlétét mutatta. Negatív kontrollként egészséges, hantavírus fertőzésen át nem esett ember vérsavóját használtuk. A WB analízisek eredményei alapján, megkezdhattuk az ELISA vizsgálatok optimalizálását is.

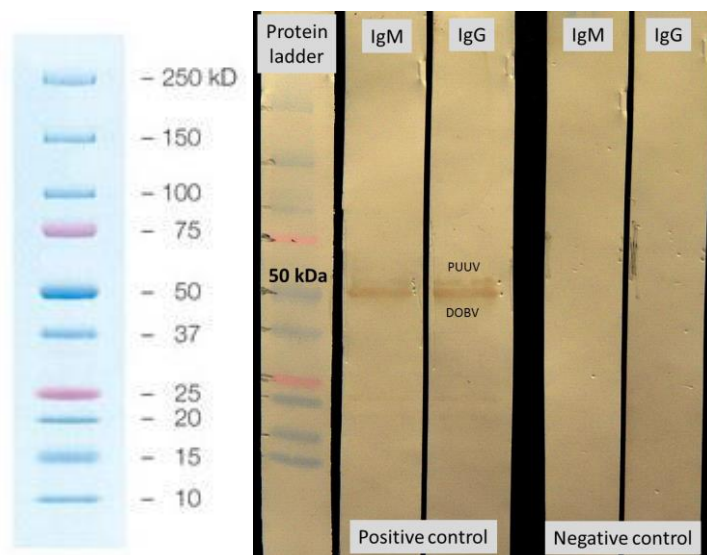


4. ábra. Az rNP50 antigén WB analízise. (A) rNP50 vizsgálata anti-DOBV antitesttel, (B) és anti-His antitesttel, (C) rNP analízise anti-hantavírus antitesttel, M: protein marker (BioRad).

A DOBV rNP50 alapú ELISA vizsgálataink teljes specificitásának meghatározása érdekében végeztünk keresztreaklási kísérleteket is. Nevezetesen, rNP50 és rNP specificitásának vizsgálatához igazoltan PUUV fertőzött betegek vérérumait használtuk fel (a mintákat kutatási együttműködés keretében Németországból kaptuk – Prof. Dr. Detlev H. Krüger, Charité, Institute of Virology, Berlin) melyeket összehasonlító WB vizsgálatokban teszteltünk. A WB kísérletben az rNP50 nem reagált a PUUV beteg szérumával (5. ábra, A), míg az rNP (B) és természetesen a PUUV-rNP (C) esetében pozitív jeleket kaptunk.



5. ábra. Összehasonlító WB analízis anti-PUUV antitesttel. (A) DOBV- rNP50, (B) DOBV- rNP, (C) PUUV-rNP, M: Marker.



6. ábra. Egy reprezentatív WB kép anti-PUUV humán IgG antitest használatával. A PUUV fehérje (59 kDa) a DOBV (55 kDa) felett helyezkedik el, a két fehérje közti méretbeli különbség miatt.

4.1.1.3 ELISA vizsgálatok specificitása és szenzitivitása

Ahhoz, hogy ELISA tesztjeinket megbízhatóan használjuk rágcsgáló, illetve humán szérumok további vizsgálatához, meg kellett határozunk annak specificitását és szenzitivitását.

A DOBV fehérjék összehasonlító vizsgálatához kereskedelmi forgalomban kapható tesztet használtunk (Reagent Dobrava-Hantaan IgG EIA). A vizsgálatához összesen 50 humán szérum állt rendelkezésünkre. A gyártó (Reagent) utasításait követve elvégeztük a vizsgálatot, melynek eredményeként 8 DOBV pozitív és 42 DOBV negatív mintát határoztunk meg. Az rNP és rNP50 antigén alapú saját ELISA-val szintén megvizsgáltuk az 50 vérmintát. A nyolc szérumból hét esetben mi is megállapítottuk az anti-DOBV IgG pozitivitást. A 42 negatív savó közül is mindössze egy esetben kaptunk álpozitív eredményt. Ezek alapján a számolt specificitást 97,6%-ban, a szenzitivitást 88,8%-ban állapítottuk meg a piacon elérhető Reagent tesztel összehasonlítva. A továbbiakban, az eredmények megerősítése érdekében mind az 50 minta tesztelését WB vizsgálattal is elvégeztük, mind az rNP50, mind pedig az rNP fehérjék alkalmazásával. A fent említett eredményt teljes mértékben (100%) megismételtük, vagyis az ELISA és WB vizsgálataink is átfedést mutattak.

A következőkben szükséges volt a PUUV-rNP specificitás és szenzitivitás értékeinek meghatározására is. A 40 db hantavírus-negatív szérumból és 10 PUUV IgG pozitív szérumból álló minta-készleten lefuttattuk a saját tervezésű ELISA és WB teszteket, valamint ebben az esetben is egy kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit (Hantavirus IgG, and IgM DxSelect™ ELISA kit, Focus Diagnostics) tesztet használtunk. A saját fejlesztésű

ELISA teszt a tízből csak 9 valós pozitív mintát talált, a Focus Diagnostics kit 2 fals negatív és 40/40 valódi negatív eredménye mellett. Ennek megfelelően a szenzitivitást 90,9%-ban, a specificitás pedig 95,2%-ban határoztuk meg. A WB vizsgálat validálásának eredményeként mind a 10 valós PUUV IgG pozitív minta, mind a saját, mind pedig a gyári Focus Diagnostics tesztel pozitív lett, így a WB szenzitivitási 100%, míg a specificitás érték 97,5% (egy fals pozitív eredmény) volt.

A hantavírus fertőzések során a NP indukálja a legnagyobb mértékben a humorális immunválaszt (Kallio-Kokko és mtsai., 2001, Zöller és mtsai., 1989), így a szerológiai metodikákban is előszeretettel használják. Az NP N terminális végén elhelyezkedő lineáris epitópok ellen termelődött antitestek nem típusspecifikusak, így jelentős keresztreakciót mutatnak a hantavírus genus tagjai között különböző szerológiai tesztekben használva (Elgh és mtsai., 1996, Elgh és mtsai., 1998). Ennek megfelelően a különböző hantavírus szerotípusok elkülönítése a teljes NP fehérje alkalmazásával a hagyományos szerológiai tesztekben nehezen megvalósítható (Lundkvist és mtsai., 1997). A legvariánsabb régiók az 50-80 és 230-310 aminosavak között helyezkednek el (Kaukinen és mtsai., 2005), vagyis ezek a régiók specifikusak a különböző hantavírus törzseknél. Ennek érdekében génszészeti módszerekkel olyan rekombináns fehérjék is előállíthatók, melyek nem tartalmazzák az N terminális szakaszt, viszont hordozzák a variábilis régiókat. Hantavírusok esetében már számos esetben fejlesztettek csonka proteinekkel bíró ELISA teszteket, melyek alkalmasak voltak a különböző vírusok elkülönítésére (Koma és mtsai., 2010, Maes és mtsai., 2004, Yasuda és mtsai., 2012).

4.1.2 DOBV kimutatása molekuláris biológiai és szerológiai módszerekkel

A DOBV első szisztematikus hazai vizsgálatában összesen 125 *Apodemus* egyedet teszteltünk: 67 AAG és 58 AFL, amelyek ismertén a DOBV elsődleges gazdaszervezetei. A rágsálók boncolása után az állatok tüdőszövetét használtuk, mivel a szakirodalom szerint a kisemlősök e szervében nagyon sokáig és igen nagy mennyiségben perzisztál a vírus. A DOBV jelenlétét az általunk újonnan tervezett génspecifikus primerpárokkal, RT-PCR vizsgálattal mutattuk ki. A vírusgenom S szegmensére specifikus primerek 433 bázispár nagyságú szakaszt amplifikáltak a virális genomból. A pozitív mintákat az olvadáspont (T_m) görbék alapján különítettük el.

A 125 mintából a T_m analízisek alapján 10 (7,7%) minta esetén kaptunk pozitív eredményt. A tíz pozitív minta közül hármat (4,5%) AAG-ból, míg hetet (11,1%) AFL-ből mutattunk ki. A tíz pozitív mintából, nyolc esetben tudtuk a teljes NP gént (1290 bázispár)

amplifikálni, szekvenálni és elemezni (DOB/Pécs/27Aa/06, DOB/Pécs/31Aa/06, DOB/Sármellék/77Aa/06, - GenBank referencia számok: EF059978 – EF 059980); DOBV/Gola/235Af/07, DOB/Gola/242Af/07, DOB/Gola/291Af/07, DOB/Gola/343Af/07 és DOB/Pécs/210Af/07 törzsek). Két minta esetében nem állt rendelkezésre elegendő mennyiségű tudószövet a vizsgálatok folytatásához.

Az AFL által hordozott DOBV esetében a filogenetikai vizsgálatok (7. ábra) azt mutatták, hogy az egymáshoz földrajzilag közel eső területekről származó vírusok genetikai hasonlósága nagyobb, így a horvát, szlovén (Slo/Af) és magyar törzsek vizsgálatainkban is egyértelműen elkülönültek egyéb európai, például a görögországi törzsektől (AP/13Af, AP/Af19). A filogenetikai összehasonlításon kívül nukleinsav és aminosav szinten is végeztünk szekvencia elemzéseket (1. táblázat). Az aminosav szekvenciát vizsgálva nem találtunk egyik esetben sem nagy eltérést, a vizsgált törzsek 99% fölötti egyezést mutattak. Ezzel szemben a nukleotid szekvenciák között már mutatkoztak különbségek. A régióban kimutatott, és így egyértelműen egy csoportot alkotó törzseknél a nukleotid szekvenciák 95,9-96,5%-ban voltak hasonlóak. A részletesebb molekuláris vizsgálat a határmenti területeken gyűjtött törzsek között mutatta a legnagyobb, 99% fölötti azonosságot. Az AAG által hordozott DOBV filogenetikai elemzésénél azonban jól látható, hogy a csoporton belül külön ágon helyezkednek el a nyugat európai és a kelet-európai törzsek. Utóbbi ágba kapcsolódtak be a Magyarországon kimutatott vírusok is. Ez a földrajzi elkülönülés visszaköszön a szekvenciák összehasonlításakor is, hiszen a kelet-európai törzsekkel 91% fölötti nukleotid hasonlóságot tapasztalunk, míg ez az érték a német törzsek esetében 88 és 89% között mozog (2. táblázat). Az aminosav szekvenciák százalékos hasonlósága 99% fölötti értéket mutatott. Az új törzsek egy horvátországi vírussal (Saa/Croatia/Aa12) mutattak genetikai hasonlóságot.

A filogenetikai analízisek eredményeiből egyértelműen megállapítható, hogy Közép-Európában – így hazánkban és Horvátország határmenti, északi részén is – legalább két, részben különböző genetikai állományú DOBV hantavírus cirkulál. A gazdaállatoknak megfelelően mi is AAG és AFL által hordozott hantavírusokat különítettünk el, és megállapítottuk, hogy habár a két vírustípus egyazon vírusok csoportjába tartozik, mégis genetikailag két külön szubtypust alkot. A témában járatos kutatók ebben a kérdésben két táborra szakadnak. Az egyik csoport szerint csak egy DOBV van, amit az AFL terjeszt (DOBV-Af), a másik típusa a vírusnak a SAAV amit Észtországban izolálták és az AAG terjeszt. A másik tábor három típust különít el. Az AFL által terjesztett DOBV-Af, az AAG által hordozott DOBV-Aa (az úgynevezett Közép-európai hantavírust) és a szintén AAG által terjesztett SAAV.

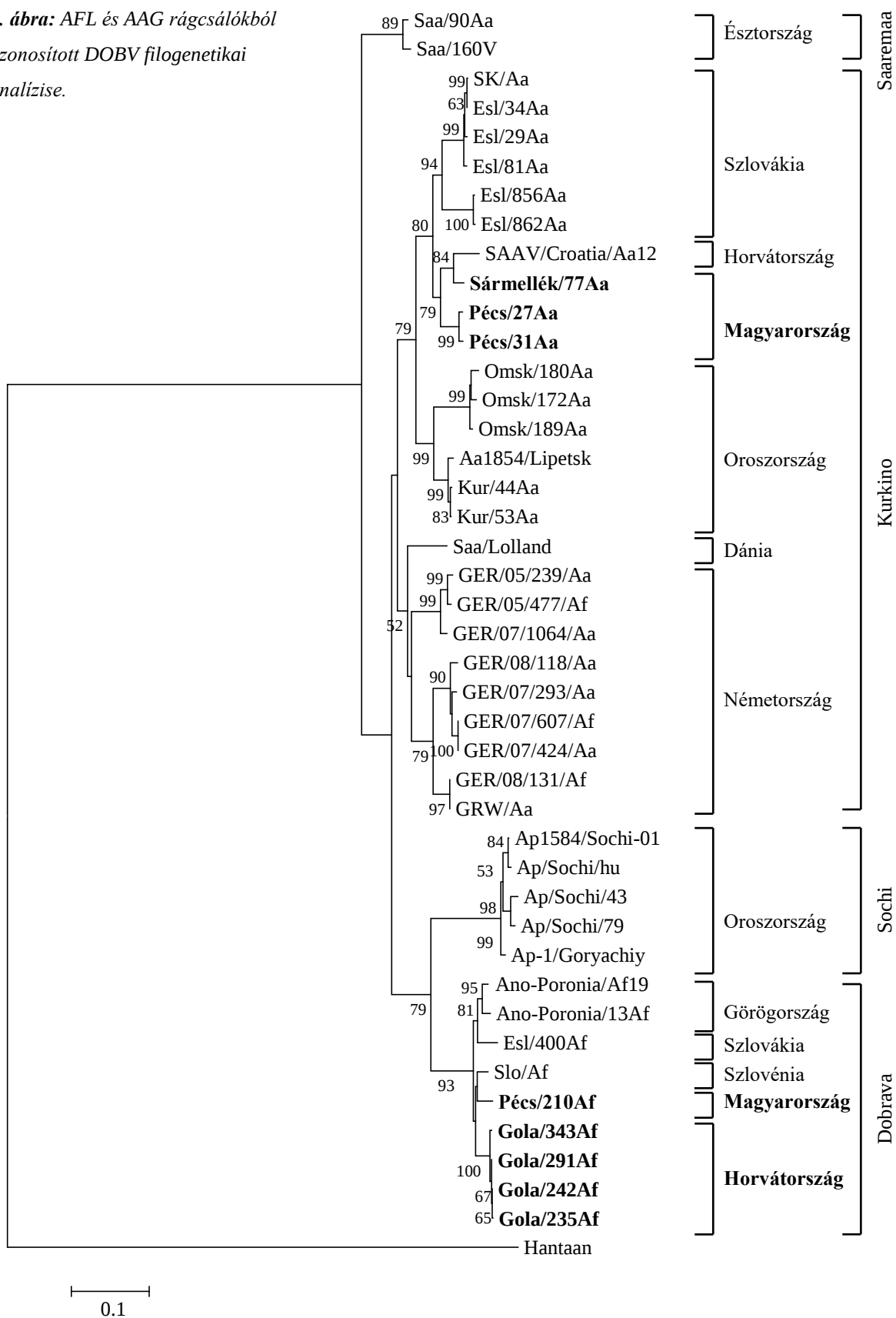
Vírusterzsek	210		235		242		291		343	
	nt	as	nt	as	nt	as	nt	as	nt	as
Pécs/210Af	-	-	95.9	99.7	96.0	100	95.9	100	96.1	99.7
Gola/235Af	95.9	99.7	-	-	99.9	99.7	99.8	99.7	99.3	99.5
Gola/242Af	96.0	100	99.9	99.7	-	-	99.9	100	99.4	99.7
Gola/291Af	95.9	100	99.8	99.7	99.9	100	-	-	99.5	99.7
Gola/343Af	96.1	99.7	99.3	99.5	99.4	99.7	99.5	99.7	-	-
Slo/Af	96.5	99.5	96.4	99.3	96.5	99.5	96.4	99.5	96.2	99.3
AP/13Af	95.6	100	96.0	99.7	96.1	100	96.0	100	96.0	99.7
AP/Af19	95.7	100	95.8	99.7	95.8	100	95.8	100	95.9	99.7
Esl/400Af	94.8	99.7	94.5	99.5	94.6	99.7	94.5	99.7	94.5	99.5

1. táblázat. Az DOBV S szegmens nukleotid (nt) (1290 bp) és aminosav (as) (429 aminosav) szekvenciájának hasonlósága AFL-ből kimutatott vírusok esetében, százalékban kifejezve.

Vírusterzsek	27		31		77	
	nt	as	nt	as	nt	as
Pécs/27Aa	-	-	98.9	99.3	94.9	98.6
Pécs/31Aa	98.9	99.3	-	-	94.6	98.3
Sármellék/77Aa	94.9	98.6	94.6	98.3	-	-
SK/Aa	92.7	99.3	92.7	99.0	92.9	98.8
GRW/Aa	89.4	99.0	89.3	98.9	88.6	98.1
Esl/29Aa	93.0	99.5	93.0	99.3	93.0	99.0
Esl/34Aa	92.8	99.5	92.8	99.3	93.0	99.0
Esl/81Aa	92.9	99.5	92.7	99.3	92.9	99.0
Esl856/Aa	92.6	99.0	92.4	98.8	92.3	98.6
Esl/862Aa	92.6	99.0	92.4	98.8	92.2	98.6
Kur/44aa	91.4	98.1	91.3	97.9	91.4	98.1
Kur/53Aa	91.5	98.6	91.3	98.3	91.7	98.6
Aa1854/Lipetsk	91.2	98.6	91.0	98.3	91.3	98.6
GER/08/118/Aa	88.4	98.3	88.6	98.1	88.2	98.3
GER/08/131/Af	89.4	99.0	89.3	98.8	88.6	98.1
GER/05/239/Aa	88.1	98.6	88.5	98.3	89.0	98.6
GER/07/293/aa	88.6	98.6	88.9	98.3	88.3	98.1
GER/07/424/Aa	88.2	98.8	88.4	98.6	88.1	98.3
GER/05/477/Af	88.1	98.3	88.3	98.1	89.1	98.3
GER/07/607/Af	88.2	98.8	88.4	98.6	88.1	98.3
GER/07/1064/Aa	89.1	98.6	89.2	98.3	89.6	98.6
Saa/160V	86.9	96.9	86.7	96.7	86.5	96.5
Saa/90Aa	87.4	96.9	87.2	96.7	87.8	96.5
Saa/Lolland	88.9	99.3	88.9	99.0	88.9	98.3
Saa/Croatia/Aa12*	94.7	98.7	94.9	98.7	97.7	98.4

2. táblázat. Az DOBV S szegmens nukleotid (nt) (1290 bp) és aminosav (as) (429 aminosav) szekvenciájának hasonlósága AAG-ből kimutatott vírusok esetében, százalékban kifejezve (a *-gal jelölt törzs esetében részleges szekvencia található az adatbázisban).

7. ábra: AFL és AAG rágcsálókban azonosított DOBV filogenetikai analízise.



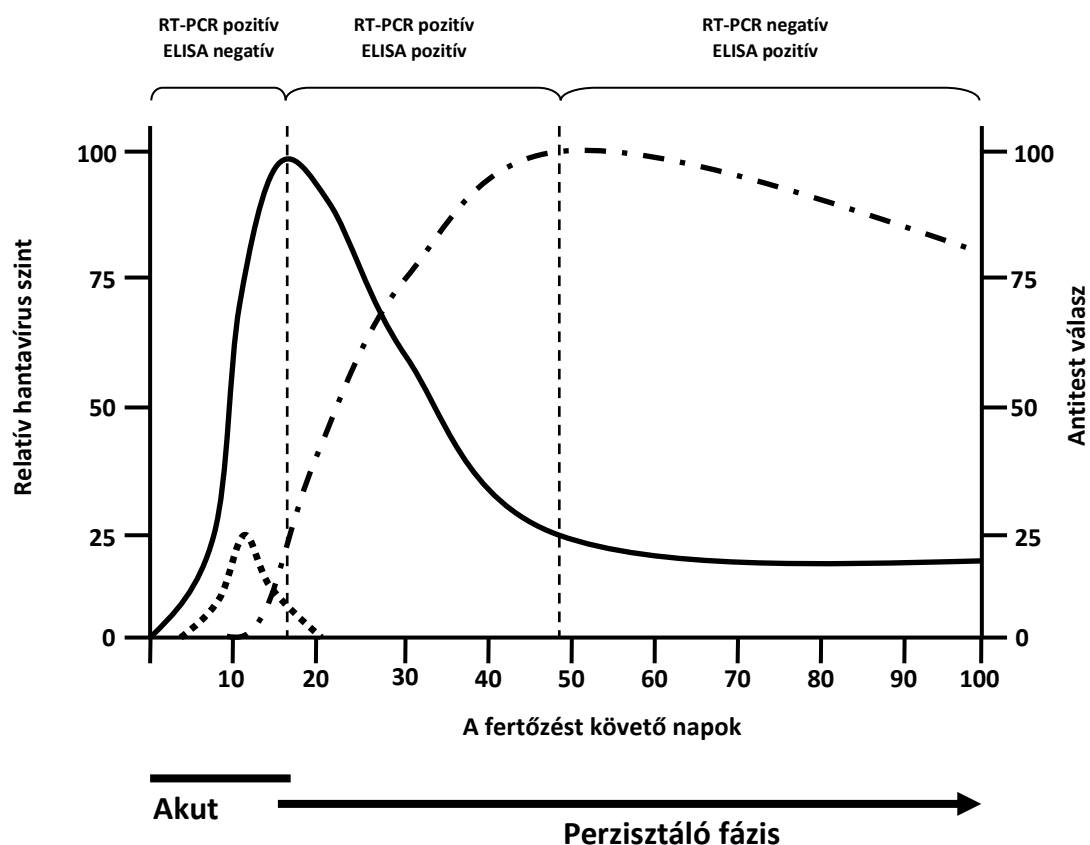
Eredményeink megerősítik azokat a felvetéseket, melyek a DOBV taxonómiáját érintő vitában jelentkeztek. Plyusnin és munkatársai által 1997-ben első alkalommal izolált SAAV-t AAG rágszálókból mutatták ki Észtországban, Saaremaa szigeten (Plyusnin és mtsai., 1997). A későbbiekben Európa számos országában mutattak ki kórokozót AAG rágszálóból, melyek genetikailag azonban jelentősen különböztek a SAAV-tól. Kutatók egy része szerint azonban az AAG-ből kimutatott összes vírustörzset SAAV-ként kellene jegyezni (Plyusnin és mtsai., 2003). A helyzetet még tovább árnyalta, hogy Klempa és munkatársai (2008) Kelet-Európában *A. ponticus* (APO)-ból is mutattak ki egy új hantavírus típust. Szintén Klempa és munkatársai (2012) közleményükben javaslatot tettek a DOBV fajon belüli genotípusok megkülönböztetésére. Ennek értelmében a DOBV fajon (species) belül, Dobrava (AFL), Saaremaa (AAG), Kurkino (AAG) és Sochi (APO) genotípusok bevezetését szorgalmazzák, az első kimutatási/izolálási helytől függően. Eddigi szakirodalmi ismereteinkre, illetve saját filogenetikai vizsgálataink eredményeire alapozva kutatócsoportunk egyértelműen osztozik Klempa és munkatársai 2012-ben publikált tanulmányának következtetésével.

A DOBV fertőzés igazolására a molekuláris vizsgálatok mellett szerológiai vizsgálatokat is elvégeztünk. A korábban RT-PCR módszerrel vizsgált 125 *Apodemus* egyed mindegyikénél a DOBV elleni antitestek jelenlétét ELISA kísérletekben határoztuk meg, rNP50 rekombináns antigén segítségével. ELISA módszerrel összesen 16 *Apodemus* egyedet találtunk pozitívnak, melyek közül 6 AFL, 10 pedig AAG rágszáló volt. A két módszer (RT-PCR és IgG kimutatás) együttes alkalmazásával tehát megállapítható volt a DOBV tényleges gyakorisága a vizsgálat régióban. A 125 kisemlősből 21 (17%) állat (10 AAG és 11 AFL) adott pozitív reakciót (3. táblázat) legalább az egyik módszerrel. Öt állat (4%) esetében mindkét módszerrel pozitív eredményt kaptunk, míg öt (4%) rágszálónál csak molekuláris módszerrel sikerült igazolni a fertőzést. Kizárólag szerológiai tesztünkkel 11 (8,8%) kisemlőst találtunk pozitívnak. 104 állatnál egyik vizsgálat sem mutatta a vírushatás bármely jelét.

		Vizsgálati minták			
		AFL; n= 58		AAG; n= 67	
		RT-PCR	RT-PCR	RT-PCR	RT-PCR
		+	-	+	-
ELISA	+	2	4	3	7
	-	5	47	0	57

3. táblázat. A prevalencia megállapítására (szerológia és molekuláris biológia) elvégzett kísérletekben kapott eredmények összefoglaló táblázata.

A molekuláris és szerológiai vizsgálatokban kapott eltérő pozitív eredmények oka a rágcásalókban megfigyelhető fertőzési folyamat ismeretében jól magyarázható (8. ábra). A vírusgazdában a kórokozó fertőzése három szakaszra osztható. Az első fázisban, a fertőzést követő napokban a vírus gyorsan szaporodik a tüdőben, viszont a vérben jelenlévő vírusok mennyisége ebben a stádiumban sem kiemelkedően jelentős. Feltételezhető tehát, hogy ekkor a vírust elsősorban molekuláris biológia technikákkal lehet nagyobb eséllyel kimutatni. A következő periódusban, a fertőzést követő 14-16. naptól kezdődően az immunválasz szerepe jelentősen növekszik, a kórokozó mennyisége azonban már csökkenést mutat a tüdőben. Ebben a szakaszban nagy biztonsággal mindkét módszerrel igazolni lehet a fertőzés tényét. A harmadik stádiumban szinte teljesen visszaszorul a kórokozó mennyisége, ezzel párhuzamosan azonban a fertőzéssel szemben fellépő immunológiai folyamatok kiteljesednek. Ennek megfelelően ebben az esetben elsősorban a szerológiai módszerek igazolják a fertőzést.



8. ábra. Hantavírus fertőzés dinamikája a rágcásalókban. Szaggatott vonal: vírus mennyisége a vérben, fekete vonal: vírus relatív mennyisége a tüdőben, félszaggatott vonal: IgG antitest titer a vérben (Easterbrook és Klein, 2008).

Általános gyakorlat, hogy a kórokozók gyakoriságának megállapítására először a rágcslók mintáit szerológiai tesztelésnek vetik alá, majd az igazolt pozitív mintákkal végeznek további RT-PCR vagy PCR vizsgálatokat a fertőzés tényének megerősítésére. Eredményeink egyértelműen rámutattak arra, hogy ezzel a stratégiával a fertőzés korai stádiumában lévő rágcslók pozitivitása nem kimutatható, ami téves következtetésekhez vezethet, hiszen jelentősen csökkentheti a vírus gyakoriságát. Plyusnina és munkatársai (2009) a fent említett módon vizsgáltak Magyarországon csapdázott rágcslók mintáit, annak érdekében, hogy megállapítsák a DOBV, SAAV és PUUV prevalenciáját. Eredményeik alapján elmondható, hogy az általuk vizsgált 362 *Apodemus sp.* 10,5%-a (38/362) lett szerológiai módszerrel pozitív, melyből mindössze kettő esetben sikerült további RT-PCR vizsgálattal kimutatni a virális nukleinsavat. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az általuk végzett kísérletben a molekuláris vizsgálatokkal megerősített pozitív minták aránya 0,5% volt, míg ez az érték a mi vizsgálatainkban 16-szor magasabb, 8%-os értéket mutatott. A különbség egyértelműen abból adódik, hogy vizsgálatainkban nemcsak az ELISA pozitív mintákat vizsgáltuk, hanem RT-PCR vizsgálatnak vetettük alá a szerológiailag negatívnak bizonyult mintákat is. Avsic-Zupanc és munkatársai még 2000-ben mérte fel Szlovéniában (a DOBV kimutatásának első helyszínén) a vírus gyakoriságát és genetikai variabilitását 260 *Apodemus* egyedet vizsgálva. Az állatok 20,4%-a mutatott szeropozitivitást IFA és ELISA tesztekben (53/260), melyből 49 AFL és 4 AAG volt, közöttük 27 egyed volt RT-PCR pozitív (Avsic-Zupanc és mtsai., 2000).

4.1.3 Egyéb hantavírusok kimutatása és vizsgálata (röviden)

PUUV kimutatásához MGL rágcslókat vizsgáltuk. A 74 tesztel állat közül 19 esetben (26%) mutattuk ki a PUUV jelenlétét tüdőszövetben. A vírus kimutatását RT-PCR vizsgálattal végeztük, általunk tervezett, glikoprotein génre specifikus primerekkel. Vizsgálataink tényleges megkezdése előtt, több különböző méretű terméket amplifikáló primert teszteltünk, amelyek közül egy 303 bázispár hosszúságú terméket adó primer kombináció bizonyult a legoptimálisabbnak a kísérletek folytatáshoz. A RT-PCR eredményeit PUUV meghatározás esetén is olvadáspont analízissel (T_m) határoztuk meg, majd a kapott specifikus terméket agaróz gélen is lefutattuk, hogy eredményeinket megerősítsük.

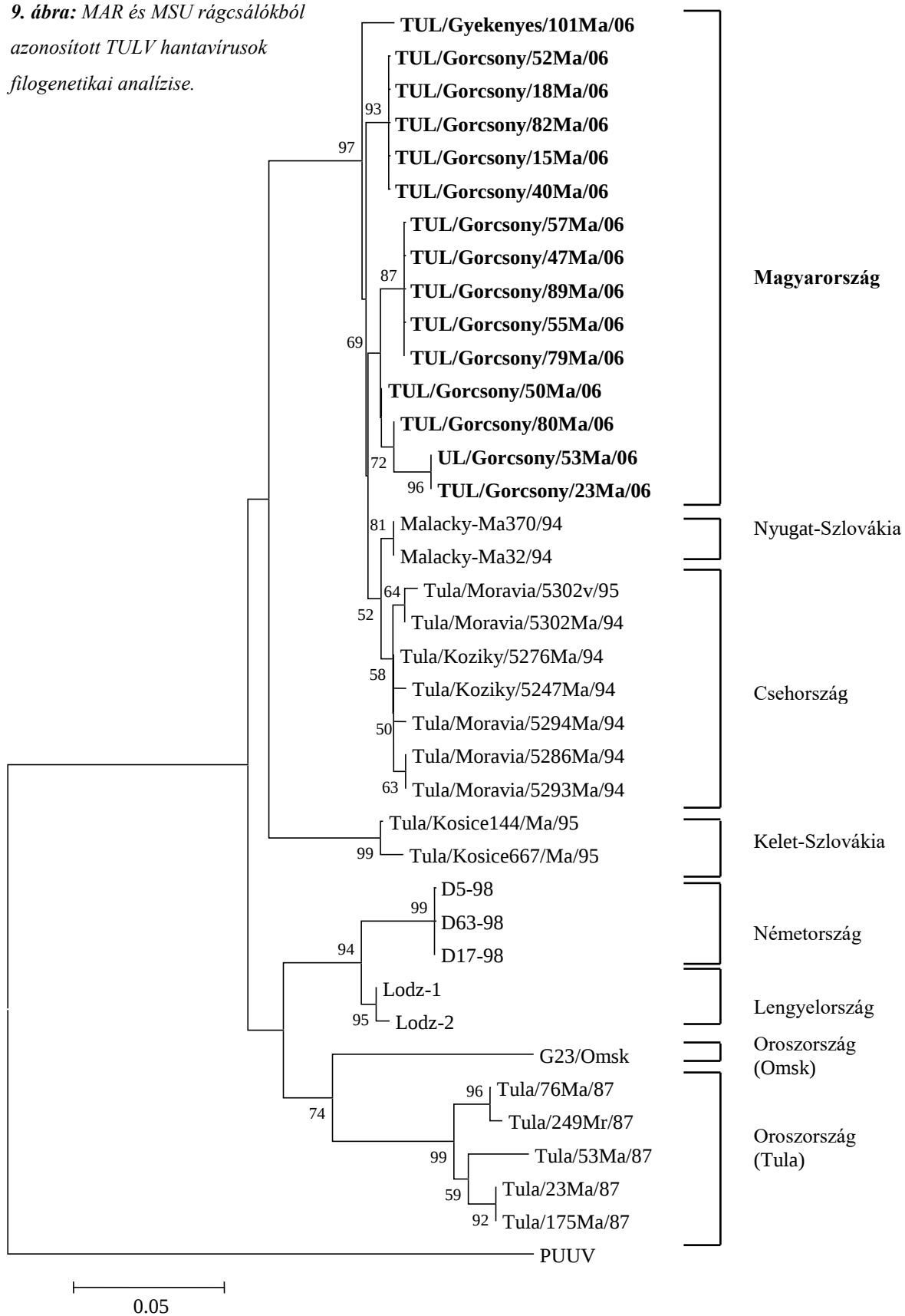
Az óvilági hantavírusok közül a PUUV nukleinsavat ki tudtak mutatni humán megbetegedések kapcsán nyálból is. Ez az eredmény feltételezi a vírus emberről-emberre történő terjedésének lehetőségét, amit ezidáig nem tudtak egyértelműen igazolni. A PUUV-al folytatott kísérleteink során kutatócsoportunk szintén vizsgálata a vírus nyálban történő

megjelenést, amivel kapcsolatban ígéretes eredményeket értünk el: egy esetben sikerült a virális nukleinsavat beteg nyálából is kimutatnunk. A szakirodalomban ezidáig összesen két olyan publikáció olvasható, ami a PUUV nyálából történő kimutatását ismertette (Pettersson és mtsai., 2008, Pettersson és mtsai., 2011). Az eredmények nem meglepőek, hiszen jól ismert tény, hogy a vírus természetes gazdáiban (rágcsálókban) képes a nyálmirigyekben is szaporodni, ezzel nyálukkal is terjesztve a vírust. Feltételezhető tehát, hogy hasonló patomechanizmussal a humán szervezetben is képes a nyálmirigyek fertőzésére, azokban történő szaporodásra. A téma izgalmas és még nem teljesen feltárt volta miatt kutatócsoportunk folytatni kívánja ezen irányú vizsgálatait is.

A TULV vizsgálatokor összesen 65 *Microtus* sp. pocok szövetmintája került tesztelésre. A rágcsálók felboncolása után azok tüdőszövetéből kivont nukleinsavat a TULV nukleokapszid génre tervezett RT-PCR módszerével vizsgáltuk. A rágcsálók faji megoszlását tekintve 46 *Microtus arvalis* (MAR) és 19 *Microtus subterraneus* (MSU) egyed volt. Az RT-PCR a MAR rágcsálók 37%-ában mutatott ki TULV-t, az MSU rágcsálók közül egy sem bizonyult TULV pozitívnak. A nukleokapszid gén parciális régiójának szekvencia analízise szerint 85-100%-os nukleinsav, és 95-100%-os aminosav egyezés van a kimutatott TULV szekvenciák között (GenBank referencia számok: EU493154 – EU493159). A filogenetikai elemzés (9. ábra) a mintavételi helyeknek megfelelően négy csoportba különíti a vírusokat. Az első csoport Nyugat-Szlovákiából és Csehországból, a második csoport tagjai Kelet-Szlovákiából származó mintákkal mutatnak hasonlóságot. Érdekes módon, a harmadik csoportba került vírusok németországi és lengyelországi TULV vírusokkal mutatnak egyezést, míg a negyedik csoportba került szekvenciák az Oroszországban izolált TULV szekvenciákhoz állnak legközelebb.

Hasonló filogenetikai csoportokat állapítottak meg Plyusnina és munkatársai (2007). Habár a vizsgált nukleokapszid génszakasz mérete valószínűleg nem elegendő a tényleges variabilitás felméréséhez, eredményeink alapján úgy tűnik, több, genetikailag eltérő TULV típus cirkulál hazánkban. A TULV-t először Oroszországban írták le (Plyusnin és mtsai., 1994). A TULV azóta több európai országban észlelték, így Szlovákiában, Csehországban, Lengyelországban, Ausztriában, Belgiumban, Horvátországban, valamint Franciaországban. Gyakorisága ellenére a TULV emberi fertőzésekben játszott szerepéről keveset tudunk. TULV elleni antitestet mutattak ki egy egészséges erdészeti dolgozó véréből, ami arra utal, hogy a vírusfertőzés emberre is áterjedhet (Vapalahti és mtsai., 1996). Ezen felül, Németországban leírtak egy TULV fertőzéssel kapcsolatba hozható HLVS esetet (Klempa és mtsai., 2003).

9. ábra: MAR és MSU rágcsálókban azonosított TULV hantavírusok filogenetikai analízise.



4.1.4 Klinikai vizsgálatok és esettanulmányok

A hantavírusokkal folytatott kutatásaink során, nem kizárólag állati mintákat dolgoztunk fel, hanem a humán fertőzések kórlefolyását is tanulmányoztuk. Együttműködésben a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ (PTE, KK) több klinikájával, illetve a budapesti Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK, akkor: OKI) munkatársaival, próbáltuk kiszűrni a lehető legtöbb hantavírus fertőzést a régióban. A továbbiakban az igazoltan pozitív betegek esetén, vizsgálatuk a vírus által okozott klinikai képet, illetve próbáltuk meghatározni a fertőzést okozó vírus típusát, molekuláris karakterisztikáját. Vizsgálataink számos új eredménnyel szolgáltak. Elsőként tudtunk molekuláris módszerekkel igazolni hantavírus fertőzést humán szérum mintából. Ez a diagnosztikai eljárás – habár igen nehézkes, és sokszor nehezen kivitelezhető – laboratóriumunkban rutin módszerré vált. Elsőként írtunk le DOBV fertőzés által mimikált heveny vakbélgyulladást

A továbbiakban két, általunk igazolt hantavírus fertőzés teljes esettanulmányát, valamint a klinikai vizsgálatok eredményeit, tapasztalatait ismertetem:

4.1.4.1 Esettanulmány 1.

2006 augusztusában 11-én egy 46 éves hobbi vadász került felvételre a PTE, Klinikai Központ, II-es számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumba, akut veseelégtelenség diagnózisával. A páciens első klinikai tünetei augusztus 5-én jelentkeztek, láz, diffúz izom- és ízületi fájdalom, gasztroenteritisz és homályos látás formájában. A kórházi felvételnél (augusztus 11.) a beteg levertségre, hasi és ágyéki fájdalomra panaszkodott. Az ezt követő fizikai és ultrahangos vizsgálatok periorbitális és láb ödémát, kétoldali mellúri folyadékgyülemet, kis mennyiségű hasúri folyadékgyülemet, valamint megnagyobbodott veséket mutattak. Fontosabb laboreredményei a következők voltak: (a normál értékek zárójelben feltüntetve): leukocitózis $22,1 \times 10^6/\text{ml}$ ($4-10 \times 10^6$), 70% neutrofil, 15% limfocita és 15% monocita aránnyal, trombocitopénia $1,8 \times 10^4$ ($15-45 \times 10^4$), emelkedett szérumkreatinin, $545 \mu\text{mol/l}$ ($0-93 \mu\text{mol/l}$), urea $28,3 \text{ mmol/l}$ ($0-8,5 \text{ mmol/l}$), valamint C-reaktív fehérje (CRP) szint 140 mg/l ($0-10 \text{ mg/l}$). A laboratóriumi tesztek emelkedett májenzim aktivitást is jeleztek: alanin aminosztransferáz 57 U/l ($<40 \text{ U/l}$), aszpartát aminosztransferáz 56 U/l ($<40 \text{ U/l}$) és laktát dehidrogenáz 668 U/l ($<270 \text{ U/l}$) értékekkel. Elektrolit eltérések is megfigyelhetők voltak (hipokalcémia és hiponatrémia), míg a vizelet teszt proteinuriát detektált ($1,1 \text{ g/nap}$, normál érték: 150 mg/nap). A páciens súlyos akut oliguriás veseelégtelensége következtében hatszori hemodialízis kezelésen esett át, melynek

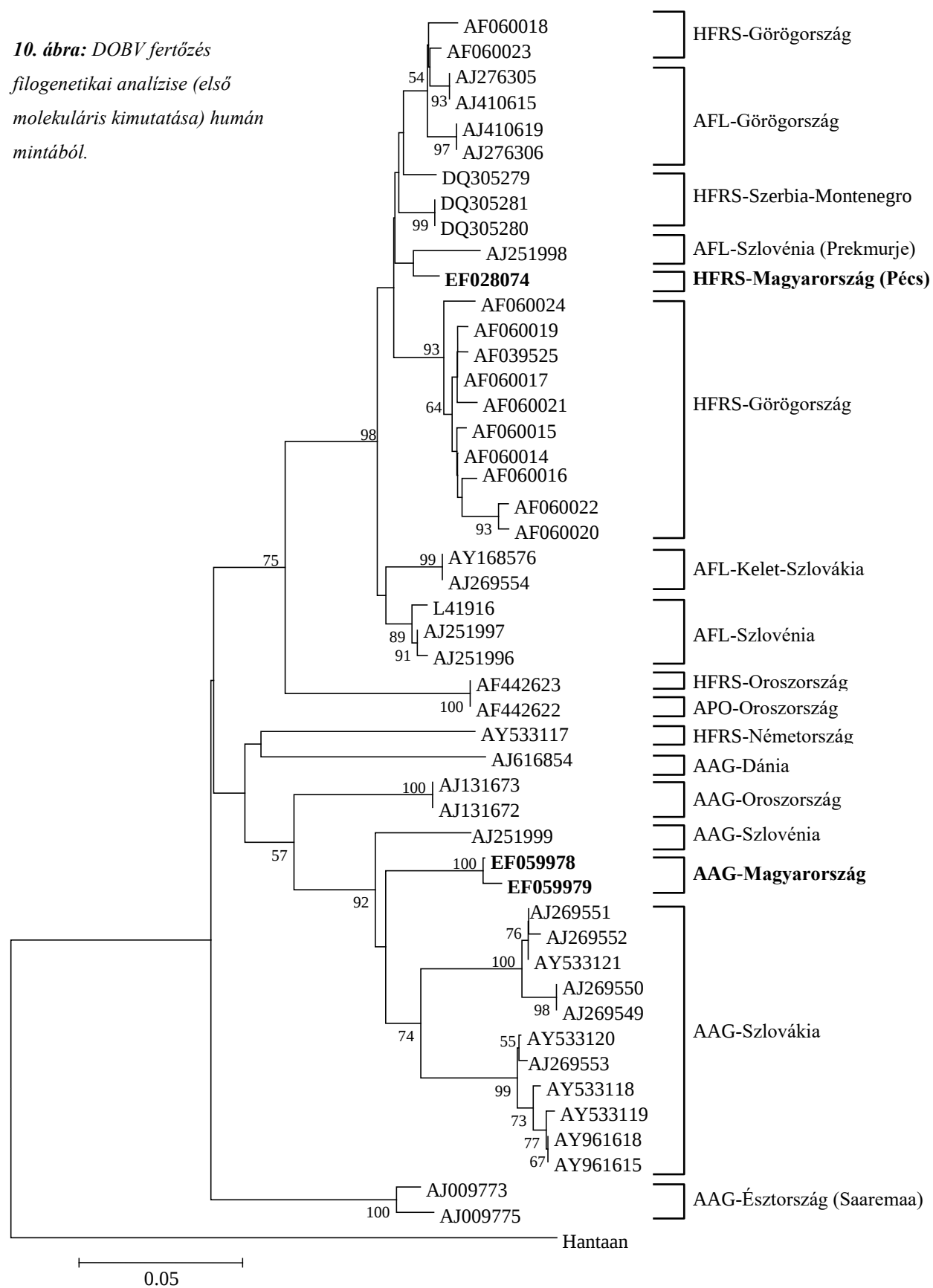
következtében a vizelet mennyisége folyamatosan emelkedett 80 ml/nap értékről 2300 ml/nap értékre. A beteg augusztus 20-ától poliuriássá vált, napi 3000-5000 ml vizeletürítéssel. 17 napi kórházi kezelés után javuló labor és májfunkciós értékekkel bocsátották haza (augusztus 28-án). A szérumkreatinin értéke december elsején érte el a normál szintet (97 $\mu\text{mol/l}$), (11. ábra).

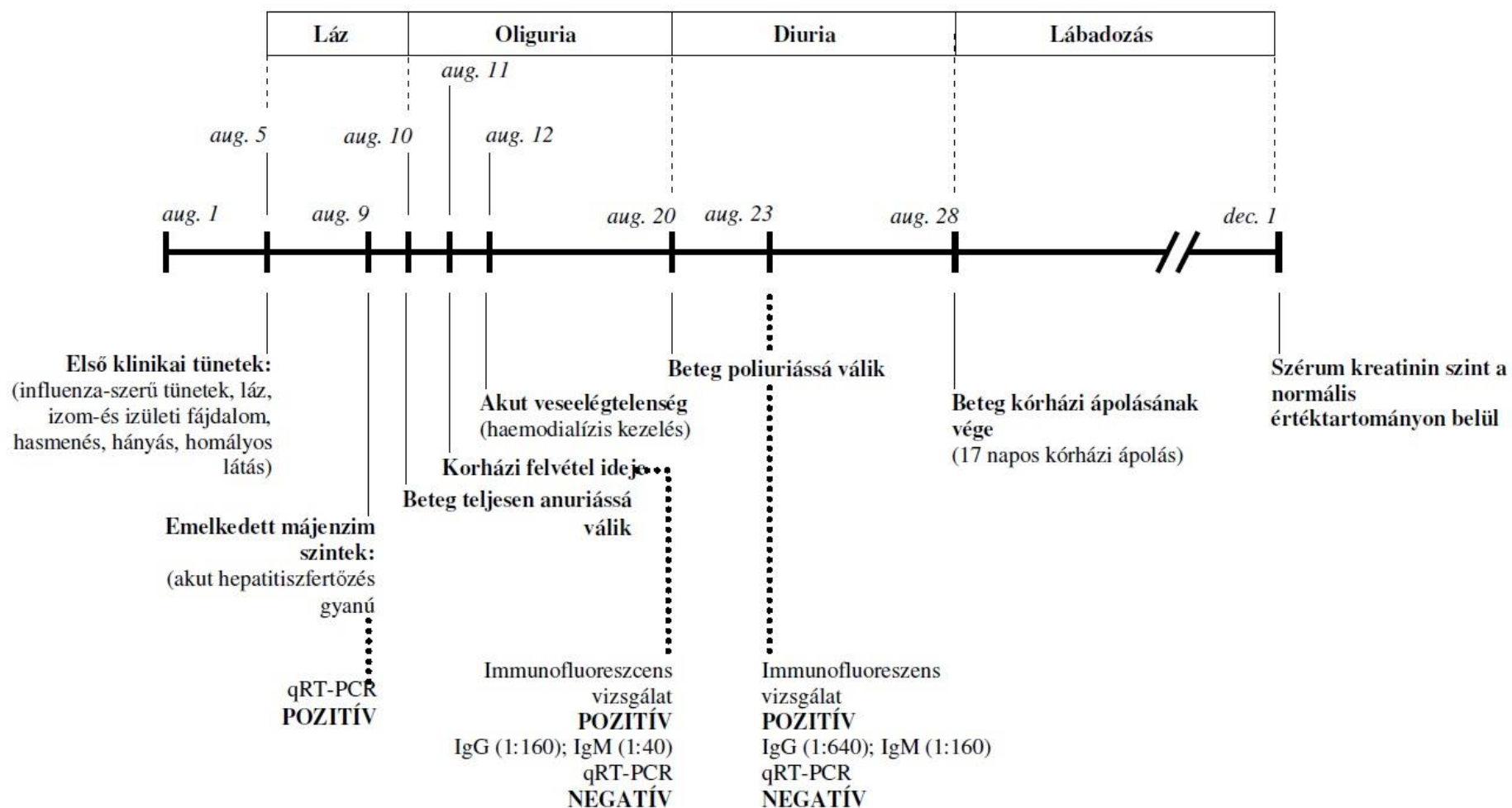
A klinikai tünetek alapján hantavírus fertőzés vagy leptospirozis gyanúja merült fel. A latex agglutinációs teszt negatív volt *Leptospira* baktériumra, míg a DOBV vírus elleni antigén (Vero E6 sejtvonalból izolált IFA DOBV antigén) szerológiai tesztje pozitív lett. IFA segítségével kimutatott DOBV-specifikus IgG és IgM antitest titer 1:160 és 1:40 volt az augusztus 11-én vett vérmintában, valamint 1:640 és 1:160 a lábadozás időszaka alatt vett vérmintában (augusztus 23). Az akut és lábadozási fázis antitest titereit összehasonlítva négyszeres növekedés volt megfigyelhető mind az IgG és IgM antitest titerben, mely egyértelműen egy akut DOBV fertőzés bizonyítéka. Virális nukleinsav a klinikai tünetek első megjelenése után négy nappal, az augusztus 9-én vett vérmintában volt kimutatható, míg az augusztus 11-én és 23-án vett vérminták negatívak voltak DOBV vírusra, RT-PCR módszerrel vizsgálva.

A kimutatott vírussal izolációs kísérleteket is végeztünk, Vero E6 sejtvonalon, BSL-3 laboratóriumi körülmények között. Izolálási kísérleteink azonban minden esetben negatív eredménnyel zárultak, ami alátámasztja azt az ismert tényt, hogy a vírus igen alacsony titerben és nagyon rövid ideig okoz virémiát az emberi szervezetben. Habár a szérum mintából még sikeresen mutattuk ki a virális nukleinsavat, feltételezhető, hogy az izoláláshoz a fertőzőképes víruspartikulumok száma már nem volt elegendő.

A filogenetikai és nukleinsav szekvencia analízis (10. ábra) alapján a páciensből kimutatott DOBV nukleinsav (GenBank referenciái szám: EF028074) egy, a magyar-szlovén határon (Prekmurje) gyűjtött AFL rágcsáló által hordozott vírussal egyezett nagymértékben. A páciens fentiekben leírt összes klinikai tünete és laboratóriumi lelete is a DOBV okozta HFRS szindróma gyanújára utalt, ami igazolódott is.

10. ábra: DOBV fertőzés
 filogenetikai analízise (első
 molekuláris kimutatása) humán
 mintából.

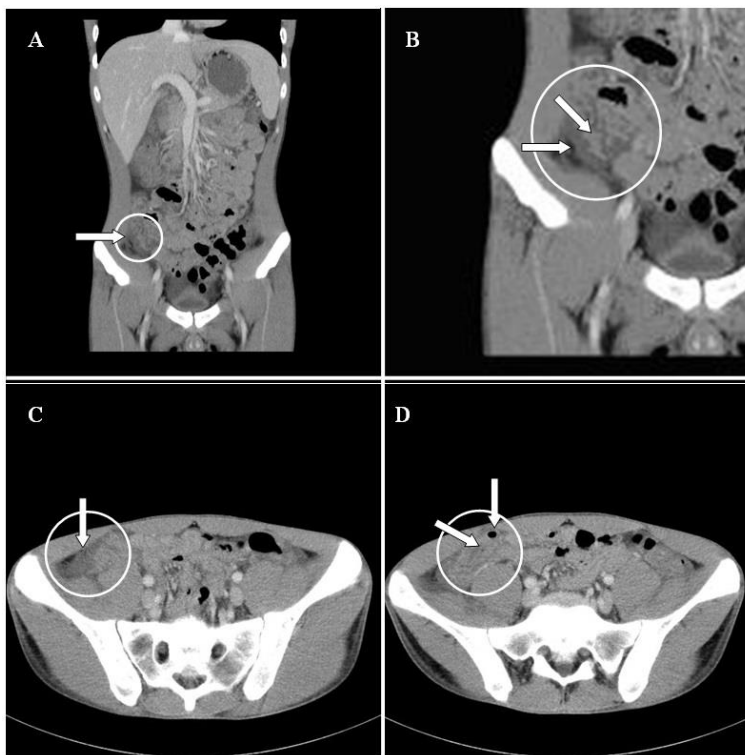




11. ábra: DOBV fertőzés lefolyásának pontos bemutatása, az első molekuláris biológiai módszerrel igazolt fertőzés vázlatos leírása, jellemzése.

4.1.4.2 Esettanulmány 2.

A Baranya Megyei Kórház sürgősségi betegellátó osztályán jelentkezett egy 27 éves férfi hasi fájdalommal, mely a jobb alsó kvadránsra lokalizálódott. A kísérő tünetek az alábbiak voltak: hányinger, hányás, étvágytalanság és véres hasmenés. A kezdeti tünetek (láz, valamint erős, diffúz hasi fájdalom) hat nappal korábban jelentkeztek (1. nap). A tünetek és a fizikai vizsgálatok alapján akut vakbélgyulladás gyanúja merült fel. A Pécsi Diagnosztikai Központban „Computer Tomográf” (CT) felvétel készült. A képalkotó eljárás a vakbél (coecum) területén jelentős bélfal-vastagodást tárt fel, számottevő mennyiségű hasvízzel és a vakbél körüli feltételezett levegőgyülemmel (12. ábra). A máj, a lép és a vesék állapota a normálisnak megfelelt. Fentiek alapján akut perforált appendicitis diagnózis mellett a beteget még aznap (6. nap) a PTE, KK, Sebészeti Klinikájára továbbították. Felvételkor vérnyomása és szívfrekvenciája a normális tartományban volt, láza nem jelentkezett. Ugyanakkor, rossz általános állapotban, erős hasi fájdalomról panaszkodott, dezorientáltság és erős verejtékezés mellett. A has betapintásra diffúzan lágy volt, maximális fájdalommal a McBurney ponton.



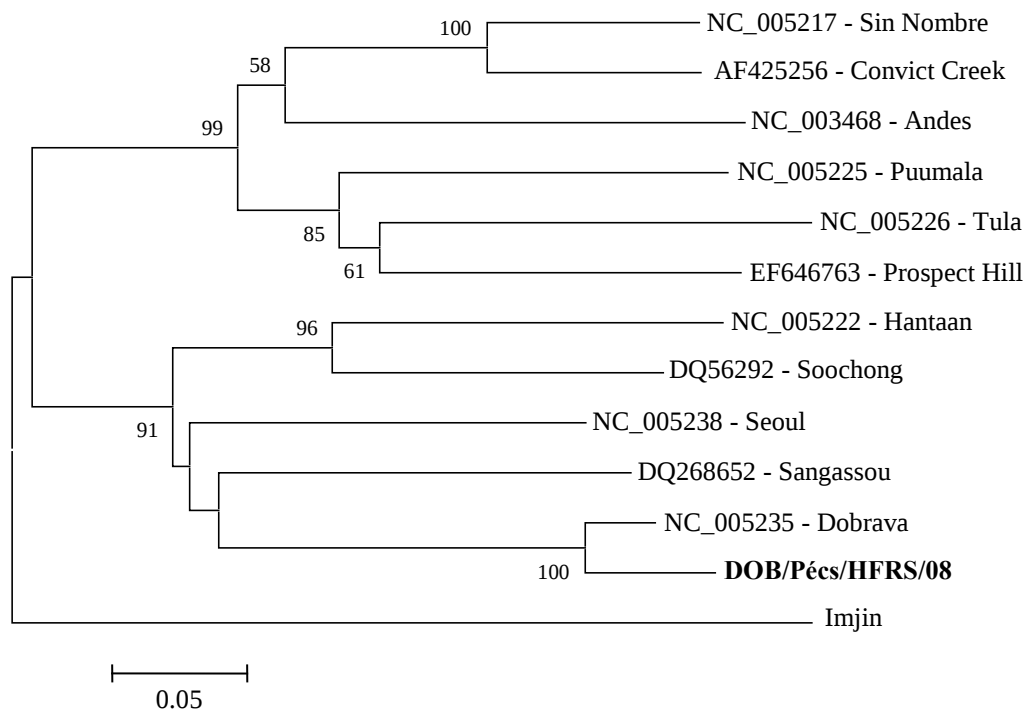
12. ábra: A betegről készült hasi CT felvétel. A képalkotó eljárás a vakbél (coecum) területén jelentős bélfal-vastagodást tárt fel, számottevő mennyiségű hasvízzel (A és B) és a vakbél körüli feltételezett levegőgyülemmel (C és D).

A beteg alábbi releváns laboratóriumi értékei: fehérvérsejtszám ($13.2 \times 10^6/\text{ml}$; referencia tartomány: $4-10 \times 10^6$); 73% neutrofil granulocita, 11% limfocita és 16% monocita; trombocitopénia ($5,7 \times 10^4$; referencia tartomány: $15-45 \times 10^4$); emelkedett szérum-kreatinin $626 \mu\text{mol/l}$ ($0-93 \mu\text{mol/l}$), C-reaktív fehérje 55 mg/l ($0-10 \text{ mg/l}$), alanin aminotranszferáz 46 U/l ($<40 \text{ U/l}$), aszpartát aminotranszferáz 41 U/l ($<40 \text{ U/l}$), valamint laktát dehidrogenáz 496 U/l ($<270 \text{ U/l}$). A hemoglobin szint $9,6 \text{ g/l}$ ($12-17 \text{ g/l}$); emellett vizelet analízis alapján proteinuria ($>3,5 \text{ g/l}$) és hematuria állt fenn. Az aktivált parciális tromboplastin idő $45,1$ másodperc, (referencia tartomány: $27-35 \text{ mp}$), valamint a protrombin idő $1,41$ INR értékeket mutatott (referencia tartomány: $0,8-1,2$).

Fenti eredmények alapján feltárási laparoszópos műtétre került sor, mely a korábban felállított diagnózist nem erősítette meg, a vakbél normális állapotú volt. A műtét utáni napon (7. nap) a betegnél oliguria alakult ki, emiatt átszállították a PTE, KK, II. sz. Belgyógyászati Klinika Nephrológiai Centrumába. Az akut vesekárosodás beállta miatt hemodialízis kezelést indítottak. A páciens a kezdeti tünetek utáni 12. napon poliuriássá vált, trombocita- és fehérvérsejt száma normalizálódott. Tizennégy napi kórházi ápolás (20. nap) után a beteget otthonába bocsájtották, normál laborértékekkel és jó fizikai állapotban.

Az újabb klinikai tünetek és laboratóriumi paraméterek alapján Leptospira, illetve hantavírus fertőzés gyanúja merült fel. A Leptospira fertőzés a latex agglutinációs teszt-eredmények után kizárásra került, az ELISA teszt (Hantavirus IgG/IgM DxSelect, Focus Diagnostics) azonban a beteg szérumában hantavírus-pozitív IgM és IgG antitesteket ($>1:100$) igazolt. Utóbbi, kereskedelmi forgalomban lévő ELISA teszt tartalmazta az összes klinikai szempontból releváns hantavírus-antigént, de nem tesz különbséget az egyes specifikus vírus törzsek (DOBV, Seoul, Hantaan, Puumala, illetve Sin Nombre vírus) között, így a teszt tipizálásra nem alkalmas. Mivel a szerológia nem nyújtott információt a fertőző hantavírus-típusról, a vérmintákat nested RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A módszer típusazonos primerek alkalmazásával, a hantavírusok erősen konzervált RdRp génjét amplifikálja. Pozitív PCR reakció után a kórokozó típusát a tisztított PCR amplikon szekvenálásával határoztuk meg.

A PCR teszt kimutatta a vérben lévő virális nukleinsavat a kezdeti tünetek utáni 8. napon gyűjtött vérmintában. Az RT-PCR termék molekuláris szekvenciaelemzése a DOBV vírushoz genetikailag közel álló kórokozó ágenszt igazolt (13. ábra).



13. ábra: A DOBV fertőzés igazolása, filogenetikai analízise humán mintából. A betegből kimutatott DOBV (DOB/Pécs/HFRS/08) vastagon jelölve.

Ismert tény, hogy a hantavírus fertőzés az úgynevezett „akut has” kórképhez, különösen a paralitikus ileuszhoz hasonló tünetekkel járhat. Több, Oroszországból származó esettanulmány számol be szükségtelenül végrehajtott műtéti beavatkozásról, ahol a feltételezett betegség akut vakbélgyulladás volt (Sakhautdinov és mtsai., 2001). Hasonló eseményt publikáltak Wichmann és mtsai 2001-ben, PUUV fertőzés kapcsán. Utóbbi esetben a vakbélgyulladás diagnózisa csak a klinikai tünetek és laboratóriumi eredmények alapján született, képalkotó eljárásokat nem alkalmaztak. Ezen tanulmányokkal ellentétben, jelen esetben nemcsak a klinikai tünetegyüttes, hanem a CT képalkotó eljárás is az appendicitis gyanúját vetette fel. Feltételezzük, hogy a CT képeken látható elváltozás a hasi szervek súlyos ödémás állapotát tükrözi, ami gyakori manifesztáció HFRS során (Tulumović és mtsai., 2003).

Az eset differenciál diagnosztikus következményei rávilágítanak a fertőzés terjedésével kapcsolatos problémáira. A Çelikbaş és mtsai (2005) által közölt tanulmányban egy fiatal nő páciens került kórházba láz, rosszullét, hasi panaszok és súlyos vérzés tünetekkel. A klinikai és járványügyi adatok szerint kezdetben KKVLV fertőzést diagnosztizáltak. A kórházi ápolás 8. napján a további tünetek és hasi ultrahang (UH) vizsgálat után akut appendicitis gyanúja is felmerült. Hasonló módon, a feltáró laparoszkópos műtét során a vakbél épnek bizonyult,

ugyanakkor hasi vérzés igazolódott. Mivel a KKVLV fertőzést már diagnosztizálták a műtét előtt, a sebészi csoport értesült a fertőzés kockázatáról. A szerzők következtetése szerint hasonló előzményű műtétek előtt UH és/vagy CT vizsgálat javasolt, valamint a sebészi csapatot fel kell világosítani a fertőzés potenciális veszélyéről, így műtét során a szükséges óvintézkedésekre sor kerülhet. Az általunk közölt esetben a sebészi csoport a helyes diagnózis – virális vérzéses láz fertőzés – előtt kezdte meg a műtétet. Szerencsére azonban az operáló személyzet egy tagjánál sem jelentkeztek betegsége utaló tünetek, illetve mindegyikük hantavírus szerológiai tesztje negatív eredményt adott. Eredményeink megerősítik, hogy az akut has a virális hemorrhágiás láz egyik legelső klinikai tünete lehet, mely lehetőségre az infektológus szakemberek mellett a sebészeknek is figyelni kell.

4.1.4.3 Hantavírus előfordulás az akut vesebetegséggel hospitalizált betegek körében

2011 januárjától – 2015 decemberéig 94 embert vizsgálatunk, akiknél a feltételezett diagnózis hantavírus fertőzés volt. Mindegyik beteg esetén közös tünetek az alábbiak voltak: láz, magas leukocita szám, trombocitopénia, magas szérum kreatinin és/vagy transzamináz szint, valamint fennálló vizeleti rendellenességek. Minden beteg mintája negatív Leptospirózis tesztet adott. A 94 páciensből, 69 (73,4%) férfi és 25 (26,6%) nő volt. Az átlag életkor 52 év, a legfiatalabb 9 éves, a legidősebb 77 éves volt.

Szerológiai vizsgálatok alapján, összesen 9 beteg (9,6%) esetében sikerült igazolni a hantavírus fertőzést. Hét (7,4%) beteg (P-1-től P-7-ig jelölve) mintájából lehetett egyidejűleg kimutatni IgM és IgG antitesteket is, ami akut fertőzésre utal, míg 2 beteg esetében (2,1%) csak anti-hantavírus IgG-t detektáltunk. Az utóbbi két betegnél egy lezajlott fertőzést igazoltunk, az akut fertőzés tényét nem tudtuk bizonyítani. A humán, anti-hantavírus IgM és IgG általában keresztreakciót mutat PUUV és DOBV antigénnel, így az akut fázisban lévő fertőzés esetében a WB vizsgálat pozitív lehet egyszerre mindkét vírusra. Habár a WB alapú azonosítás során a jel színintenzitása a specifikus virális antigénre sokkal erősebb, így gyakorlott laboratóriumi szakember számára a fertőzés típusa nagy valószínűséggel elkülöníthető, de egyértelműen nem állapítható meg! Ezek alapján, feltételezhetően mind a hét akut fázisban lévő beteg esetében DOBV fertőzést tudunk kimutatni. A kezelés szempontjából a fertőzést okozó vírus típus ismerete nem kritikus jelentőségű. A hantavírussal fertőzött betegek szinte minden esetben támogató kezelést kapnak, ugyanakkor (pozitív teszt esetén) a bakteriális, gombás vagy egyéb (virális) fertőzés kizárásával a kezelőorvos elkerülheti az antibiotikumok szükségtelen alkalmazását, csökkentve ezzel a terápiás mellékhatásokat is. A szerológiai vizsgálatokkal egyidejűleg a szérum mintákat egy

lépéses TaqMan RT-PCR alkalmazásával is megvizsgáltuk. A módszer – amellet, hogy az egyik legmodernebb eljárás –, a hantavírus-diagnosztika esetében bizonyos nehézségekbe ütközik: mivel a virémiás időszak nagyon rövid és igen alacsony szérumszám mellett párosul, az RT-PCR sok esetben hamis negatív eredményt adhat. A szerológiai negatív minták egyike sem bizonyult pozitívnak a molekuláris azonosítás alapján, míg csak egy akut HRFS esetén (P-2) volt detektálható hantavírus RNS is. Az utóbbi esetben a 106 bázispár hosszú TaqMan RT-PCR termék szekvenciaanalízise alapján egyértelműen DOBV fertőzést mutattunk ki.

A klinikai tünetek közül (4. táblázat) az emésztőszervrendszeri eltérések domináltak, míg hemorrhágiás tünetek (ami fontos jele a súlyos megbetegedésnek) csak egy beteg esetében voltak (P-1), akinél a gyomortükrözés során hemorrhágiás gastritist állapítottak meg. Magas láz gyakori, habár nem feltétlenül jelenik meg egyenlő arányban a hantavírus fertőzötteknél. Fejfájás és szédülés megfigyelhető volt (P-1, P-4 és P-6) a betegeknél. Egy páciensnél (P-1) gyors mértékű súlygyarapodás (6 kg) volt tapasztalható az első 9 kórházban töltött napja alatt. Hasonlóan egy másik páciens (P-2) végtagduzzadást is tapasztalt. Mind a kettő, fentebb említett tünet a jelentős mértékű akut vesebetegség eredménye volt. Egy beteg (P-1) homályos látásra is panaszkodott, ami szintén az egyik jele a súlyosabb fokú hantavírus fertőzésnek. A laborértékek közül a thrombocitopénia a legárulkódóbb jel, mely emelkedett szérumszám mellett társul. Az eredményeinkben szereplő összes akut beteg esetében mindkét diagnosztikai marker jelentős fokú eltérést mutatott. A leukocita szám emelkedés nagyon különböző mértékű volt a betegeknél, míg a szérumszám emelkedés nem volt nagymértékű vagy egyáltalán nem is volt tapasztalható. Általában a hospitalizációt igénylő esetekben a vesefunkció rendellenességek (oliguria/anuria) majdnem mindig szembetűnők, ami összhangban van a magas szérumszám koncentrációval. Vizsgálatainkba bevont betegek mindegyikénél jelentősen csökkent a vizelet ürítés szintje, ami vérrel és/vagy fehérjével társult. Ennek ellenére egyik betegnek sem volt szüksége hemodialízisre.

A hét akut fertőzés esetében, csak egy betegnél (P-2) hozható összefüggésbe a megbetegedés hobbi tevékenységgel; a beteg gyakran járt túrázni, közvetlenül a megbetegedése előtt is a helyi erdőben túrázott, feltételezhetően itt fertőződött meg.

Klinikai tünetek	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
Fejfájás	Igen	Nem	Nem	Igen	Nem	Igen	Nem
Izomfájdalom	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem
Emésztőszervi panaszok	Igen	Igen	No	Igen	Igen	Igen	Igen
Hemorrágiás tünetek	Igen	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem
Legmagasabb testhőmérséklet (°C)	39.9	38.2	40	39	N/A	37	39
Kórházban töltött idő (nap)	15	14	14	11	7	10	9
Laborértékek (normal tartomány)	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
Legmagasabb leukocita szám (4-10 G/l)	14.1	11.7	8,2	7,88	15.3	9	8.44
Legalacsonyabb hgl konc. (120-170 g/l)	112	135	130	124	129	124	129
Legalacsonyabb vérlemezke szám (142-424 G/l)	24	30	54	131	179	355	153
Legmagasabb szérum kreatinin konc. (60-120 µmol/l)	267	488	352	681	531	378	505
Legmagasabb GOT konc. (<44 IU/l)	114	48	116	27	29	33	41
Legmagasabb GPT konc. (<50 IU/l)	127	11	108	23	20	54	78
Legmagasabb GGT konc. (<70 IU/l)	179	23	27	20	26	84	59
Vizelési rendellenességek	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
Oliguria/anuria	Igen	Igen	Nem	Igen	Igen	Igen	Igen
Vérvizelés (≥5cells/FV)	Igen	Igen	Nem	Igen	Igen	Igen	Nem
Fehérjeürítés (≥1.5 g/day)	Igen	Igen	Nem	Igen	Igen	Igen	Igen
Hemodialízis	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem

4. táblázat: A vizsgálatba bevont hét hantavírus fertőzött személy legfontosabb laboratóriumi paramétereinek összefoglalása.

A P-2 beteg szérum-mintáinak nyomonkövető vizsgálatainak során még a fertőzés után hét hónappal vett minta is IgM-pozitívítást mutatott. Általában, a hantavírus-specifikus IgM a

fertőzést követően három hónappal eltűnik a szérumból (Tai és mtsai, 2005). Ennek ellenére, DOBV-fertőzött betegek esetében perzisztens, anti-hantavírus IgM jelenlétét igazolták a fertőzés után egészen három évvel, (Meisel és mtsai, 2006), bár igen alacsony antitest-titer mellett.

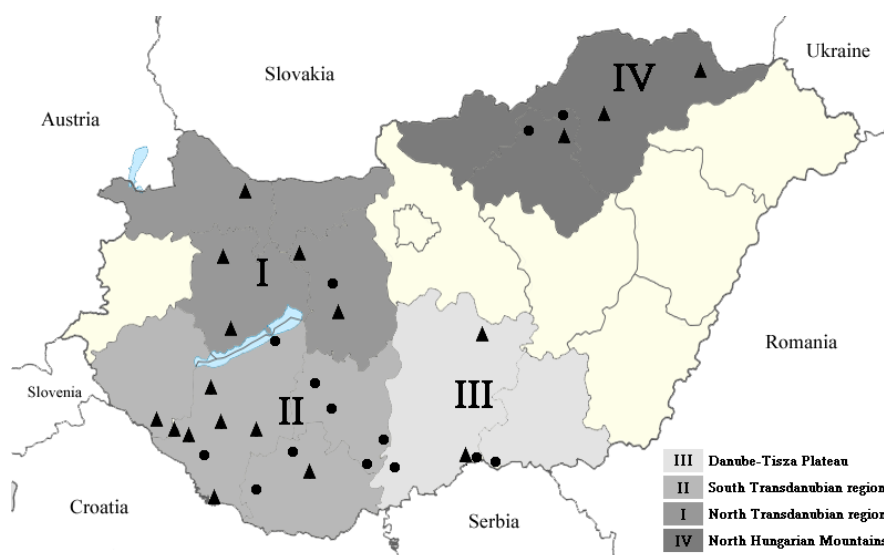
A Balkán régióban szintén a DOBV és PUUV hantavírus törzsek állnak a klinikai esetek hátterében. A HFRS vagy sporadikusan, vagy nagyobb kitörések formájában jelenik meg, a vírust hordozó rágcsálók lokális abundanciájának függvényében. Bár a betegség előfordulása aránylag alacsony, a súlyos megbetegedésekért a DOBV felelős – hasonlóan a jelen tanulmányhoz –, összességében 12%-os mortalitási arány mellett (Avšič Županc és mtsai, 1999). A leggyakoribb klinikai tünetek a láz, hidegrázás, izomfájdalom, háti és hasi fájdalom, fejfájás, hányás, hasmenés, látászavar, valamint oliguria, és az azt követő poliuria (Avšič Županc és mtsai., 1999; Markotić és mtsai., 2002b). Mindezek megfelelnek az általunk megfigyelt tüneteknek. A kettőslátás, hasmenés illetve a véres hasmenés a horvátországi páciensek körében szignifikánsan gyakoribbak DOBV fertőzés esetén (Markotić és mtsai., 2002b). Ezzel ellentétes megfigyelés származik Szlovéniából, ahol a látászavart jelentősen gyakrabban figyelték meg PUUV fertőzöttek körében (Avšič Županc és mtsai., 1999). Jelen tanulmányban csak egy beteg (P-1) panaszkodott látászavarról. Ez volt az egyetlen eset, ahol a virális RNS kimutatás (RT-PCR) DOBV genotípus okozta fertőzést igazolt, relatív magas vírus titerrel a szérumban. Az eurázsiai kontinens más részeihez hasonlóan, a HFRS vezető tünete a vesekárosodás. A korai diagnózis felállítását erősítik tehát az emelkedett szérum urea és kreatinin szintek. Az oliguria tünete legalább a betegek egyharmadánál jelentkezik, az anuriás esetek pedig átmeneti hemodialízis kezelést igényelnek (Avšič Županc és mtsai., 1999; Markotić és mtsai., 2002b). Összehasonlításként, jelen tanulmány összes betegénél megfigyelhető volt a magas szérum kreatinin, a hét páciensből hatnál állt fenn oliguria (ám hemodialízis kezelésre egyikőjük esetében sem volt szükség).

A klinikai tünetek sokfélesége miatt a hantavírusok korai differenciál diagnózisa igen nehéz. Így például az egyéb felmerülő diagnózis lehet: egyéb okra visszavezethető akut vesekárosodás, illetve tubulo-intersticiális nefritis, akut lázas húgyúti fertőzés, akut és krónikus glomerulonefritis, akut has, vakbélgyulladás, vérzéssel járó skarlát, hemolitikus urémiás szindróma, trombotikus trombocitopénias purpura, akut légúti megbetegedések, illetve szepis. Magyarországhoz hasonlóan, a hantavírus fertőzések esetében a Balkánon is a legfontosabb differenciál diagnózis a *Leptospira* baktérium okozta fertőzés. Mindkét kórokozó esetében a rágcsálók a hordozók, mindkettő Délkelet-Európában endémiás, valamint a fertőzés elején identikus klinikai tünetekkel és laboratóriumi eredményekkel

járnak. Ugyanakkor, a leptospirózisban szenvedő betegek laboratóriumi eredményei között magasabb az ALT, GOT, és főleg az összes bilirubin szint (Markotić és mtsai., 2002a). *Leptospira* és hantavírus koinfekcióját néhány beteg esetében már hazánkban is leírták (Nemes és Péterfi, 2000), illetve vizsgálataink során mi is kimutattuk a koinfekció lehetőségét rágszálók esetében. Szigorúan csak a klinikai tanulmányokat figyelembe véve, csak néhány balkáni országból találunk adatokat. Albániában, egy 2003 és 2006 között végzett kutatás eredményeként a KKVLV-gyanús esetek 11,7%-áról igazolódott, hogy hantavírus okozta HFRS szindróma áll a háttérben (Papa és mtsai, 2008). Bulgáriában, az „akut lázas megbetegedések” 2,8%-a volt hantavírus etiológiájú (Christova és mtsai, 2013).

4.1.5 Szeroprevalencia vadászok és erdészeti dolgozók körében

Összesen 835 vérmintát gyűjtöttünk önkéntes, egészséges erdészekről/vadászokról, 9 megye 106 erdészetéből. A 750 férfi (18 év – 70 év) és a 85 nő (23 év – 59 év) átlagéletkora 45 év volt, átlagosan 25 év (0,1- 51 év) terepi munkával. A 835 szérumszámú kezdeti, kevert PUUV és DOBV antigént használó IgG ELISA mérése során 45 (5,4%) reaktív és kétes eredményt kaptunk. Az összes ELISA pozitív szérumszámú WB vizsgálata után 38 (4,6%) bizonyult ismételt szeropozitívnak. Az ország 4 fő régióra osztott (14. ábra): Észak-dunántúli régió (I), Kelet-dunántúli régió (II), Duna-Tisza köze (III) és Északi-Középhegység (IV).



14. ábra: Vérminták származási helyei és a magyarországi régiók. A fekete körök (●) jelzik azokat a mintázó helyeket, ahol a szérumszámú minta negatív, a háromszöggel (▲) jelzett helyek azok, ahonnan a kapott szérumszámú minta pozitív lett.

A gyűjtött és tesztelt minták a következőképpen oszlottak meg a különböző régiók között (5. táblázat): 248 minta az I. régió 6 mintázó helyéről; 321 minta a II. régió 16 mintázó helyéről; 107 minta a III. régió 5 mintázó helyéről és 159 minta a IV. régió 5 mintázó helyéről érkezett be. Habár a teljes szeroprevalencia 4,6% volt, a régiókat összehasonlítva a IV. régióban volt a legmagasabb, itt 8,2%-os értéket mutatott.

Régió	Minta gyűjtő helyek száma	Minták száma	Pozitív minták száma	Szeroprev. (%)
Duna-Tisza köze (III.)	5	107	2	1.9
Kelet- Dunántúl (II.)	16	321	10	3.1
Észak- Dunántúl (I.)	6	248	13	5.2
Északi- középhegység (IV.)	5	159	13	8.2
Összesen	32	835	38	4.6

5. táblázat: Az gyűjtött minta régiók szerinti eloszlása és a regionális szeropozitivitás értéke.

A tanulmány országos viszonylatban magas hantavírus szeropozitivitás arányt tárt fel az Északi-középhegység területén (IV). A IV és III-as területek közti különbség ötszörös volt. Minden területen megfigyelhető volt az egyes mintavételi helyek és a hozzájuk rendelt régiók közötti eltérő szeropozitivitás érték. Meg kell említenünk, hogy bármely adott mintavételi helyre akár 100 km-es körzetből is érkeztek önkéntes vradók. Az adatok feldolgozásánál a régiók létrehozása utóbbi tény miatt történt, így az értékelés a valóságot jobban közelíti. Mivel a humán hantavírus fertőzések forrását a hordozó rágcsálók jelentik, a fenti módon nyert, területre jellemző szeroprevalencia eltérések tükrözhetik az adott helyek közti rágcsáló expozíciót. Ahogy azt már az előzőekben ismertettem, hazánkban a DOBV gazdaállata az AFL és az AAG, a PUUV hordozója pedig az MGL. Habár az AAG elterjedés tekintetében erdőkben és mezőgazdasági területeken is előfordul, a másik két gazdaállat (különösen az AFL) jellemzően a nagy kiterjedésű, összefüggő hegyvidéki erdőségeket kedveli (Suchomel és mtsai., 2007, Trubenovj és Miklós, 2007). Ezen lombhullató erdők a kellően idős és diverz faállománynak köszönhetően szinte minden évben bőséges táplálékot nyújtanak az egerek számára (Kryštufek, 1991; Vukićević-Radić és mtsai., 2006, Avšič Županc és mtsai., 2014). Eredményeink az utóbbi megfigyeléseket alátámasztják, mivel a legmagasabb hantavírus szeroprevalencia értékeket az I és IV jelzésű, kiejert hegyvidéki erdőségeink területén mértük. Tovább erősítik utóbbiakat a statisztikai tesztek is, ahol jelentős eltérés csak akkor merült fel, ha a IV-es régiót a II és III-as területekhez hasonlítottuk, utóbbi két régió ugyanis inkább alacsonyabb fekvésű dombos, vagy sík terület. A III-as területen mért igen alacsony

szeroprevalencia feltehetően a kicsi és nyitott erőfoltos jellegnek köszönhető, ahol a kisemlős populáció jóval kevertebb, számos egyéb rágcsáló- és cickányfajjal kibővülve.

A hantavírus szeroprevalenciájának felderítésére irányuló felmérésünkhöz hasonló kutatásokat végeztek Európában, valamint a Balkánon, erdészeti dolgozók körében. Szlovákiában 2133 alany vett részt a DOBV, PUUV és TULV hantavírusok szűrésében. Az ország keleti részén 5,9%-os szeroprevalenciát mutattak ki (Sibold és mtsai., 1999). Németországban hasonló munkát végeztek az északkeleti Brandenburg területén, amelyből kiderült, hogy összesen 563 vizsgált személy közül 9% bizonyult szeropozitívnak DOBV, PUUV és TULV-ra nézve (Mertens és mtsai., 2011). Svájcban 1693 gazdálkodó, erdészeti dolgozó, fiatal katona és véradók vizsgálata alacsonyabb szeroprevalencia eredményeket mutatott, maximális értékük 1,9% volt (Schultze és mtsai., 2007). Két kapcsolódó tanulmány készült Lengyelországban, Gut és munkatársai 2007-ben 86 erdészeti dolgozó és 47 kistestű emlősökkel foglalkozó zoológus szérum mintáit értékelték hantavírus specifikus IgG-re nézve. A PUUV-specifikus antitesteket a zoológusok mintáinak 14,9%-ában (7/47) detektálták, míg az erdészeti dolgozók összes mintája negatív volt (Gut és mtsai., 2007). Másrésről, Grygorczuk és munkatársai 2008-ban a Lengyelország észak-keleti részén végzett felmérésben az erdészeti dolgozók szérum mintáinak vizsgálatakor anti-PUUV IgG-t 5,7%-os arányban (4/69), míg HTNV-specifikus IgG 2,9%-os (2/69) arányú jelenlétét figyelték meg (Grygorczuk és mtsai., 2008).

Számos további, a Balkánt érintő tanulmány foglalkozott hantavírus szeroprevalenciával. 2010-ben Bosznia-Hercegovina területén végeztek hantavírus endémiás régió vizsgálat, melyben összesen 1331 ember vett részt. Az általános populációban előforduló szeroprevalencia az endémiás régióban 7,4%, a nem endémiás régióban pedig 2,4% volt. Ugyanazon a területen a kockázati populáció (16,1%) és az általános lakosság (6,2%) között szignifikáns kontrasztot mutattak ki (Hukic és mtsai., 2010). Egy Horvátországban végzett szeropidemiológiai felmérés, ami 300 erdészeti dolgozó és 260 lakossági résztvevő bevonásával végeztek el, kimutatta, hogy az antitestek prevalenciája 0% és 8,9% közötti, 1,6%-os átlag prevalencia mellett (Borčić és mtsai., 1991). Görögországban, egy összesen 2653 vérmintát feldolgozó szerológiai felmérés 0%-tól 14%-ig terjedően, 4%-os szeroprevalencia mutatkozott, ahol magasabb arányt figyeltek meg a foglalkozásukból származóan magasabb fertőzési kockázattal bíró személyek körében (Antoniadis és mtsai., 1987). Szlovéniában a lakosság átlagosan 1,7%-os hantavírus-specifikus antitest előfordulást mutatott, azonban a faipari munkások csoportjának vizsgálatakor (Avšič Županc és Poljak, 1994) ez 0% és 14,3% között változott. Romániában a hantavírus diagnosztikája viszonylag

későn kezdődött meg, 2008-ban. Korábban a betegséget látszólag figyelmen kívül hagyták, csak 5 visszamenőlegesen megerősített HFRS esetet találunk a szakirodalomban (Maftai és mtsai., 2012). 2008-tól további 17 HFRS esetet jelentettek be, és az összes fertőzést DOBV-ként azonosították. A legtöbb HFRS-esetet foglalkozásból származó kockázattal hozták összefüggésbe pásztorok és faipari munkások esetében (Heyman és mtsai., 2011, Avšič Županc és mtsai., 2014).

Érdemes összevetni eredményeinket egy korábbi, hazai, nagy mintaszámot feldolgozó munkával. Egy 2000-ben végzett, nemzeti szerológiai felmérés keretében 2257 állampolgár mintáit tesztelték hantavírus-specifikus antitestekre IFA, agglutinációs teszt (HDPa) és ELISA módszerekkel. Az adatok szerint az egészséges populáció körülbelül 10%-a tekinthető szeropozitívnak. Az érintet személyek az ország minden részéből származtak (Ferenczi és mtsai., 2003).

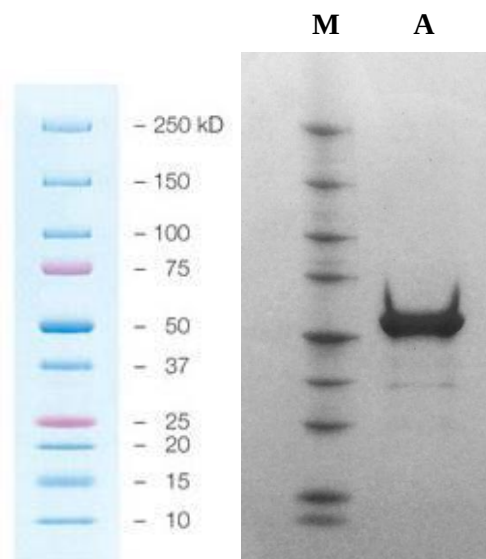
A Magyarországon végzett átfogó vizsgálatunk alapján feltételezzük, hogy a hantavírus szeroprevalencia az erdészeti dolgozók körében hasonlít a közép-európai-balkáni tengely értékeihez, ezért a hantavírus fertőzés nagyobb figyelmet érdemel a kockázati populációban a jövőben.

4.2 Ízeltlábúak terjesztette vírusok vizsgálata

4.2.1 Krími-kongói vérzések vírusa (KKVVLV)

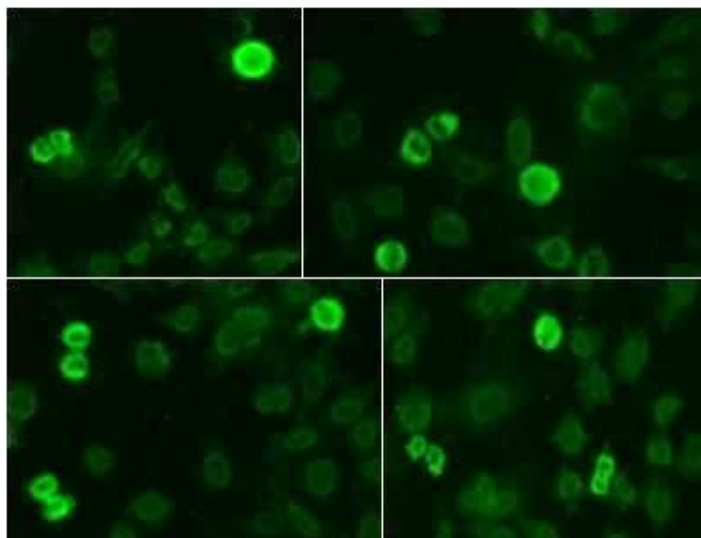
Kutatásunk egyik kiemelt jelentőségű témája a KKVVLV előfordulásának igazolása (vagy cáfolása) volt. Az első vizsgálatok a vírussal hazánkban az 1970-es évek végén, illetve az 1980-as évek elején történtek, de azóta komolyabb, átfogóbb vizsgálat nem volt a vírus tényleges jelenlétére és esetleges közegészségügyi szerepére nézve.

Kutatásaink első lépéseként, a vírus vizsgálatára alkalmas módszertant kellett kidolgozni, aminek megfelelően két különböző szerológiai vizsgálati tesztet fejlesztettünk és optimalizáltunk. Ezek egy ELISA és egy IFA vizsgálat volt, mindkettő esetében antigénként KKVVLV rNP alkalmazásával (a vizsgálatok időpontjában még nem rendelkezünk BSL-4 laboratóriummal). Az rNP expresszállásának (1448 bp) teljes folyamata megegyezett a hantavírus (DOBV és PUUV) NP fehérjék termeltetésének eljárásával (15. ábra). A másik vizsgálati módszerünk egy transzgenikus CHO-KKVVLV sejtvonallal létrehozása volt, amit IFA vizsgálathoz használtunk.



15. ábra. A tisztított KKVLV rNP antigén WB analízise. A rNP vizsgálata humán anti-KKVLV IgG antitesttel (A), protein marker (M) (BioRad).

A szakirodalomból ismert, hogy a vírus gyakran fertőz mezei nyulakat, ami elsősorban valószínűleg a nyúl és kullancs gyakori találkozásából adódhat. Egyértelmű bizonyíték azonban még nincs erre. A mezei nyulakat fő rezervoárjaként azonosították a KKVLV-nek a Szovjetunióban, Bulgáriában és Afrikában; azonban egy albániai tanulmány arról számolt be, hogy nem sikerült kimutatni a KKVLV elleni antitesteket ebben a gazdaszervezetben (Hoogstraal, 1979; Papa és mtsai. 2009). Vizsgálatainkat így mezei nyúl vérmintáinak (*Lepus europaeus*) szerológiai tesztelésével kezdtük. A Dévaványa falu környékéről (47 ° 05'N, 20 ° 56'E) származó (Dr. Gyuranecz Miklós gyűjtése), összesen 198 mezei nyúl szérum mintát teszteltünk paralel módon ELISA és IFA vizsgálatokkal. A mintákból először (hígítás: 1: 100) az anti-KKVLV IgG antitestek jelenlétét szerettük volna bizonyítani rNP alapú ELISA alkalmazásával. A következőkben ugyanezen mintákat az előzetesen előállított rNP KKVLV-CHO alkalmazásával IFA módszerrel is teszteltük. Eredményeink értékelésekor mind az ELISA, mind pedig az IFA tesztek eredményét figyelembe vettük. A 198 mintából mindkét vizsgálati módszerrel 12 (6%) adott pozitív eredményt (6. táblázat). Négy minta volt pozitív csak IFA tesztel (16. ábra), egy szérum volt pozitív csak ELISA vizsgálattal. Meg kell jegyeznünk, hogy az ELISA egy objektív, mérhető kimutatási módszer, míg az IFA sokkal szubjektívebb, nagymértékben függ a vizsgálatot végző személy rutinjától.



16. ábra: KKVLV IgG pozitív minták IFA képe CHO-KKVLV transzgenikus sejtvonalon.

		IFA	
		Pozitív	Negatív
ELISA	Pozitív	12	1
	Negatív	4	181

6. táblázat: Anti-KKVLV IgG antitestek kimutatása *Lepus europaeus* vérmintáiból, ELISA és IFA vizsgálatokkal hazánkban.

Eredményeink szépen kiegészítik azt a történelmi megfigyelést, hogy a KKVLV endemikus gócai jelen vannak Magyarországon, azonban a rezervoár fajok, vektorok és amplifikáló gazdák teljes spektrumának felderítéséhez még további vizsgálatok szükségesek. A KKVLV magyarországi előfordulásáról szóló ismereteink korlátozottak és főként történelmi megfigyeléseken alapulnak. Az 1960-as évek végén elvégzett szerológiai vizsgálatok juhok, szarvasmarhák és a humán szérumok esetében 31%, 0,9%, illetve 2,9% szeropozitivitást mutattak KKVLV esetében. Ebben a tanulmányban agar gél diffúziós precipitációs módszert alkalmaztak (Horváth, 1975; Horváth, 1976). Bár az *Ixodes ricinus* kullancs szokatlan faj a KKVLV fertőzés számára, két törzset izoláltak szopós egerekben az 1970-es évek elején, az arbovírusok országos felmérésének részeként (Molnár, 1982). Legjobb tudásunk szerint azonban ezek az izolátumok megsemmisültek, így sem pontos típusuk, sem szekvenciájuk nem ismert.

KKVLV fertőzésekre vonatkozó szerológiai bizonyítékok kézzelfoghatóak, azonban sok felderítendő terület maradt ahhoz, hogy megismerjük és megállapítások közegészségügyi vonatkozásait. Hazánkban az évente jelentett vírusos vérzések száma 2000-től

átlagosan 10-15 (évente: 3-21), de a legtöbb eset természetesen hantavírus fertőzésekhez kapcsolódott. Ennek ellenére előfordulnak nem diagnosztizált esetek, ahol még a virális eredet sem bizonyított. Így egyértelmű, hogy Magyarországon fontos lehet az ismeretlen etiológiájú vérzések lázak további komplex vizsgálata, akár modern molekuláris biológiai, metagenomikai vizsgálatok alkalmazásával. KKVLV pozitív eredményt ezidáig hazánkban nem sikerült azonosítani akut fertőzésből. Az, hogy klinikai mintából ezidáig nem sikerült KKVLV-t kimutatni több okra vezethető vissza: (i) Az egyik lehetőség, hogy Magyarországon nem cirkulál magas fertőzőképességű KKVLV törzs, így az emberi KKVLV fertőzések kevésbé súlyosak, vagy akár teljesen tünetmentesek lehetnek. Ebben az esetben ezek a fertőzések nem kerülnek felderítésre, a klinikusok nem is gondolnak a KKVLV etiológiai szerepére. Mivel a humán diagnosztikai célú vizsgálatokat kizárólag csak az NNK referencia laboratóriuma végezhet, így az akut betegminták felderítése egy kutató laboratóriumban nem megoldható. Az esetleges fertőzések igazolására átfogó szeroepidemiológiai vizsgálatokra lenne szükség, hogy a KKVLV ellen termelődött IgG antitestek jelenlétét utólag igazolni lehessen. A nem magasan patogén törzs jelenlétének hipotézist az AP92 törzs példája is alátámaszthatja. Az AP92 KKVLV törzset a *Rhipicephalus bursa* kullancsokban mutatták ki Görögországban. Ez a törzs apatogénnek bizonyult, illetve a bejelentett esetekben, Törökországban alacsony patogenitást mutatott (Papadopoulos és mtsai., 1980; Midilli és mtsai., 2009). Bár a *Hyalomma* fajok Magyarországon nem tekinthetők elsődleges vírusvektornak, más kullancsfajok, például a *Rhipicephalus* fajok és az *Ixodes* fajok vélhető vektorokként szolgálhatnak az országban. Kérdéses, hogy az *Ixodes ricinus* fajok szerepet játszhatnak-e az AP92-szerű törzsek vagy más, KKVLV apatogén törzsének transzmissziójában. Ennek igazolására átfogó, szisztematikus molekuláris vizsgálatot tervezünk a hazai *Ixodes sp.* fajok vizsgálatával. Minden esetben a legfontosabb a vírus tényleges molekuláris biológiai igazolása lenne. Kutatócsoportunk a szeropozitív nyulak területéről gyűjtött kullancsokban (1359 db) próbálta a vírus jelenlétét kimutatni saját fejlesztésű, univerzális, minden ismert KKVLV törzs kimutatására alkalmas TaqMan RT-PCR módszerrel, azonban ezidáig minden teszt negatív eredményt adott. A KKVLV jelenlétének molekuláris igazolása ezidáig nem volt sikeres. (ii) A KKVLV-nek nincs humán expozíciója. Ha a szerológiai adatokat vesszük figyelembe, a KKVLV hazai jelenléte vad- és haszonállatokban igazolt. Ebben az esetben azonban a humán expozíció elmaradásának esélye csekély. (iii) Nem maga a vírus, hanem egy KKVLV-szerű vírus cirkulál az országban, amely vadállatokat fertőz (akár tünetmentesen is), szerológiai keresztreakciót ad a KKVLV törzsével, de a humán megbetegedésekben nincs szerepe.

4.2.2 Kullancsenkefalitisz vírus (KEV)

A kullancsenkefalitisz vírussal (KEV) végzett vizsgálatainkban mind a hordozó rágsáló fajok, mind pedig a kullancs vektor vizsgálataira fókuszáltunk. Igazolni szerettük volna a kisemlősök szerepét a vírus terjesztésében, vizsgáltuk a kullancsok átfertőzöttségét, valamint a vírus genetikai állományát.

A vírus kullancsokból történő kimutatása céljából összesen 2731 (261 csoportba gyűjtve) kullancsot (616 lárva, 1621 nimfa, 494 felnőtt) vizsgáltunk, melyeket 2009 and 2012 között gyűjtöttek az MTA, ATK, ÁOTI munkatársai (Dr. Gyuranecz Miklós és kollégáinak segítségével). Az állatok vizsgálatát közösen, együttműködés keretén belül végeztük el. 2300 (84,2%) (206 csoportba gyűjtve) kullancsot közvetlenül a növényzetről, 436 állatot (15,8%) (55 csoportba gyűjtve) kisemlősökről gyűjtöttek.

Az *Ixodes ricinus* faj volt a leggyakoribb faj (80,4%; n=2196), amit a *Haemaphysalis concinna* (17,8%; n=489) és a *Dermacentor marginatus* (1,7%; n=46) követett. A kisemlősök esetén AFL-ről, AAG-ról és MAR-ról történtek a gyűjtések.

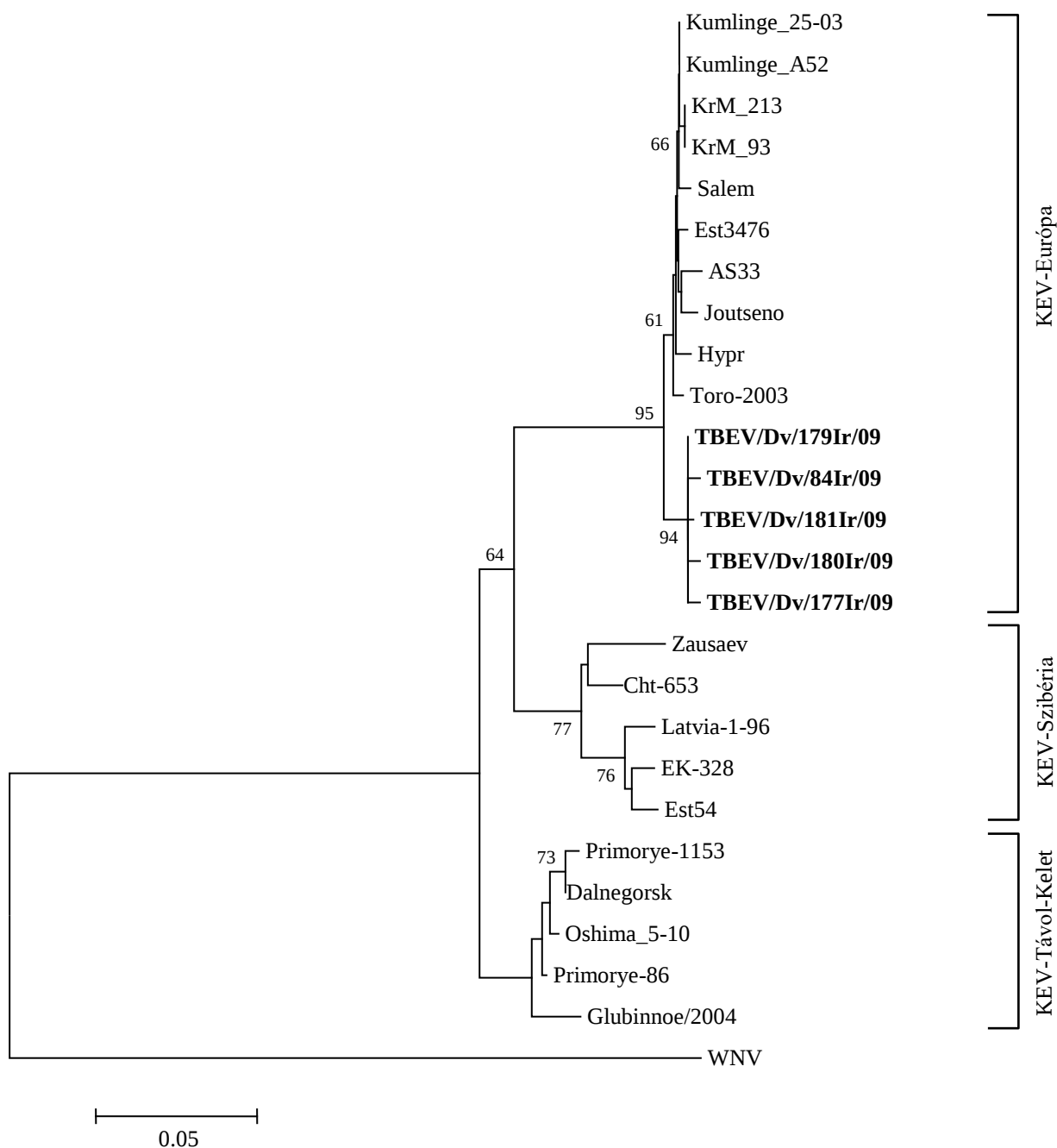
Vizsgált faj	Fejlődési stádium	Mintaszám	Csoportok szám	Pozitív csoportok száma	Minimum kimutatási ráta (%)*
<i>Ixodes ricinus</i>	lárva	515	43	4	0.77
	nimfa	1244	106	1	0.08
	hím	233	25	0	0
	nőstény	204	23	0	0
	Összesen	2196	197	5	0.23
<i>Dermacentor marginatus</i>	lárva	0	0	0	0
	nimfa	2	1	0	0
	hím	20	4	0	0
	nőstény	24	5	0	0
	Összesen	46	10	0	0
<i>Haemaphysalis concinna</i>	lárva	102	11	0	0
	nimfa	374	37	0	0
	hím	7	2	0	0
	nőstény	6	3	0	0
	Összesen	489	53	0	0

* Minimum kimutatási ráta: pozitív csoportok száma /összes vizsgálat kullancsok száma

7. táblázat: KEV vizsgálatokhoz gyűjtött kullancsok számának és a vizsgálatok eredményeinek táblázatos összefoglalása.

Az általunk gyűjtött kullancsfajok közül csak az *Ixodes ricinus*-ból tudtuk igazolni a vírus jelenlétét (7. táblázat). A KEV pozitív mintákon belül egyetlen tartalmazott nimfákat

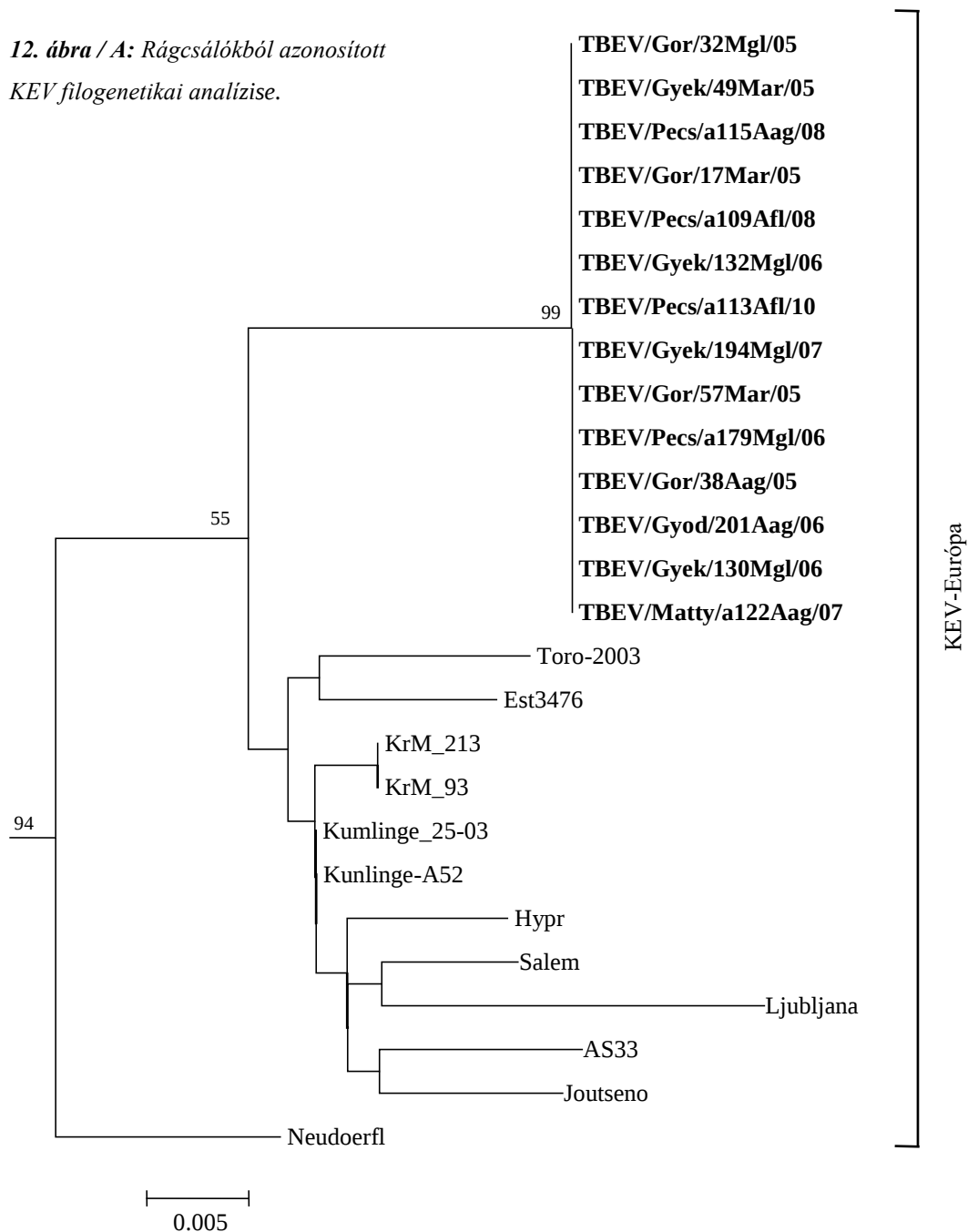
(0,9%) és négy pedig lárvákat (9,3%). A KEV pozitív nimfákat tartalmazó csoport egyedeit (5 egyed/csoport) növényzetről, míg a lárvákat (1, 2, 5, és 8 egyed/csoport) rágcsálókról gyűjtöttük (három csoport egyedei AAG-ról és egy csoport egyedei MAR-ról). A vírus minimális detekciós rátája (feltételezve minimum egy fertőzött kullancsot csoportonként) 0,08% volt a nimfák és 0,77% pedig a lárvák esetében. Az elvégzett filogenetikai elemzés (11. ábra) is igazolta, hogy az általunk azonosított KEV törzsek az európai altípushoz tartozó KEV törzsekkel csoportosulnak.



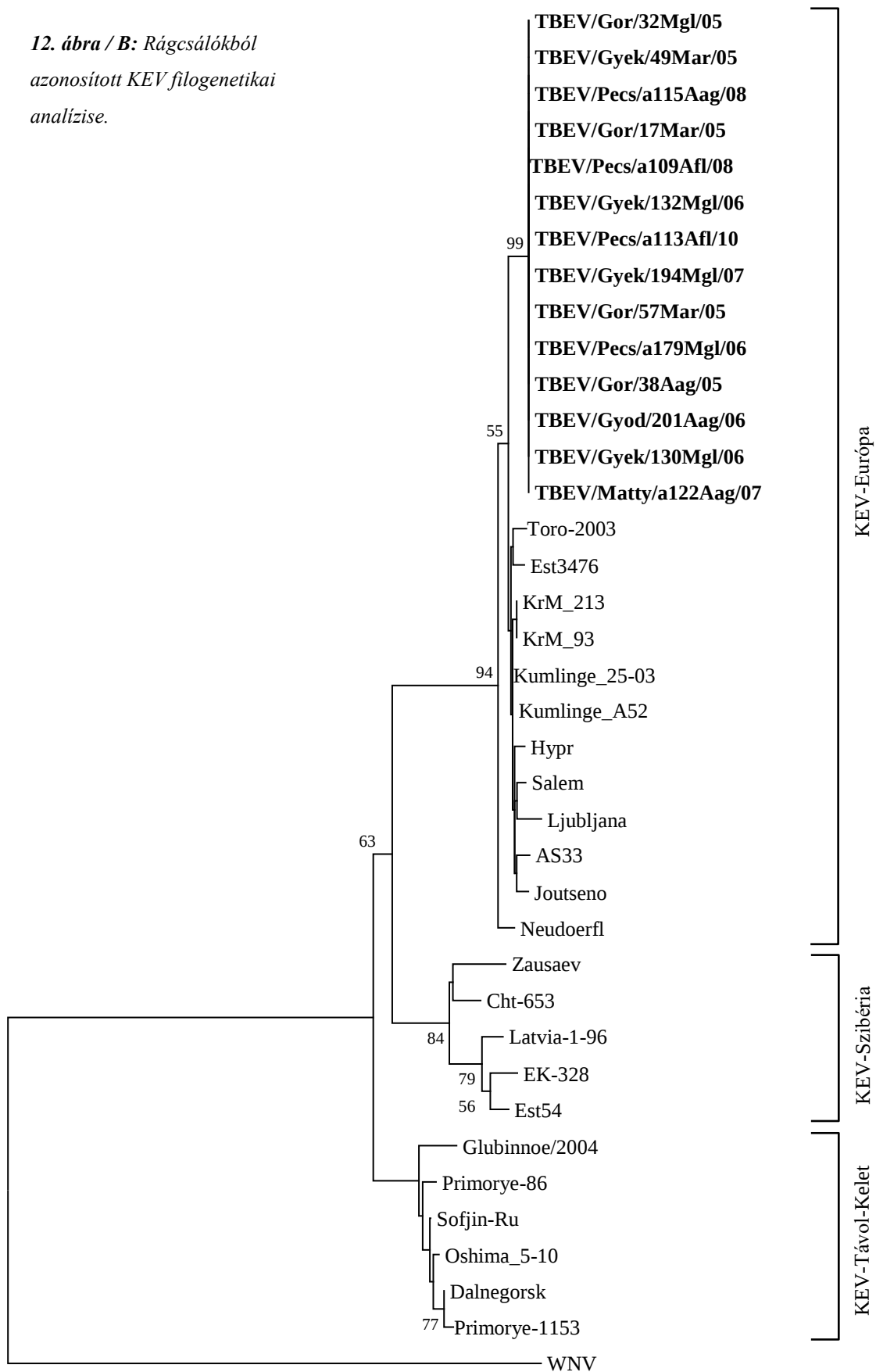
11. ábra: Kullancsokból azonosított KEV filogenetikai analízise.

A kisemlősök körében végzett kutatásunk során 8 különböző fajtól származó 405 rágcsáló májmintát vizsgáltunk a KEV fertőzés igazolása céljából. A vizsgált kisemlősök a következők voltak: 55 AAG, 100 AFL, 11 *Apodemus sylvaticus* (ASY), 48 MAR, 2 *Microtus agrestis* (MAG), 8 *Microtus oeconomus* (MOE), 31 *Microtus subterraneus* (MSU) és 150 MGL. Összesen 17 mintában (4,2%) sikerült kimutatni a vírus RNS jelenlétét. A vírust négy rágcsáló fajban írtuk le: AAG (7,3%), MAR (6,2%), AFL (4,0%), és MGL (4,0%). A filogenetikai elemzés során a KEV törzsek szintén a vírus európai altípusához tartozó törzsekhez csoportosultak (11. ábra A / B).

12. ábra / A: Rágcsálókából azonosított KEV filogenetikai analízise.



12. ábra / B: Rágcsálókban azonosított KEV filogenetikai analízise.



Az elmúlt évtizedek során Európában nőtt a diagnosztizált KEV fertőzések száma beleértve olyan országokat is, ahol ezidáig nem volt jellemző a KEV vírushoz köthető megbetegedés. Jelenleg a vírus jelenléte abundánsnak számít számos európai országban, különösen Észak- és Kelet-Európában endemikus (Süss, 2005; Süss, 2008; Kuncz, 2003, Lindgren, 1998). A vírust hazánkban 1952-ben azonosították először (Fornosi and Molnár, 1954). Magyarországon előforduló esetek száma 1996-tól jelentősen csökkent, amelynek valószínűsíthető oka a vírus elleni védőoltás megjelenése lehet. Figyelmebe kell azonban venni, hogy ezekre az évekre tehető a diagnosztikai tesztek jelentős árnövekedése is, ami szintén okozhatta a vizsgálatok számának csökkenő tendenciáját (Süss, 2003).

A KEV endemikus területeken az *I. ricinus* és *I. persulcatus* kullancsfajok számítanak elsődleges vektornak, habár számos tanulmány eredményei szerint a potenciális vektorfajok száma bővebb (Ko és mtsai., 2010). A rendelkezésünkre álló irodalmi adatokkal összhangban az általunk gyűjtött kullancsfajok közül csak az *I. ricinus* fajt tartalmazó minták mutattak KEV pozitivitást. Pozitív mintákat azonosítottunk a kisemlősökről gyűjtött kullancsok körében is. Az említett jelenség a kisemlősök rezervoár szervezetként betöltött szerepére lehet ismét bizonyíték (Hubálek és Rudolf, 2012). A kisemlősök tulajdonságai számos szempontból hozzájárulnak és segítik a KEV terjedését. Először is az endemikus területeken magas egyedszámmal fordulnak elő, ahol kullancsok által erősen parazitáltak, másodsor a kisemlősök biztosítják a vírus nem virémiás átvitelét a fertőzött és nem fertőzött kullancsok között táplálkozás közben (Labuda és mtsai., 1997; Kiffner és mtsai., 2011). Vizsgálatunk során nem tudtuk pontosan meghatározni, hogy a vizsgált kullancs maga vagy a kisemlős, amelyről a kullancsot eltávolítottuk volt eredetileg fertőzött a vírussal.

A rágcsálókkal végzett vizsgálatunk során az AAG, AFL, MAR és MGL fajokat azonosítottuk, mint gazdaszervezetek. Európában a legjelentősebb KEV rágcsáló gazdaszervezetek az *Apodemus* és *Myodes* fajok közé sorolhatók, habár más rágcsálók (*Microtus*, *Mus*, *Micromys*, *Pitymys*, *Arvicola*, *Sciurus* és *Citellus*) és rovarrevők (*Sorex*, *Talpa* és *Erinaceus*) rendjébe tartozó fajok is részt vehetnek a vírus természetes átviteli ciklusában (Labuda és mtsai., 1997). Eredményeinkhez hasonlóan egy korábbi magyarországi tanulmány során is az AFL és MGL fajokat azonosították, mint elsődleges KEV gazdaszervezet az országban (Molnár és mtsai., 1982), habár jelen tanulmány igazolta a vírus jelenlétét AAG és MAR fajokban is. Számos európai országban mutatták ki a vírust kisemlősökből, noha az előfordulás gyakorisága országonként eltérő volt. Szlovákia KEV endemikus nyugati részén AFL és MGL fajok alkotják a kisemlős populáció 75%-át és az egyedek kb. 15%-ban mutatható ki KEV elleni antitest (Kozuch és mtsai., 1990). Egy német tanulmány során

befogott állatok 10%-a bizonyult KEV pozitívnak RT-PCR vizsgálat során (Achazi és mtsai., 2011), míg egy finnországi tanulmányban a begyűjtött kismélsők szerveinek RT-nested PCR alapú KEV szűrése hozzávetőlegesen 12% pozitivitást mutatott (Tonteri és mtsai., 2011). Eredményeinket figyelembe véve, valamint más kutatók eredményeivel egyetértésben kijelenthetjük, hogy a kismélsők fontos szerepet töltenek be a KEV életciklusában, ezért az említett állatok rendszeres monitorozása jó prognosztikai adatokat szolgáltat a KEV aktivitásról az ország endemikus régióin belül.

4.2.3 Nyugat-nílusi vírus (WNV)

Kutatásaink fontos témája a Nyugat-nílusi vírus (WNV) vizsgálata volt. A kórokozó egyre nagyobb mértékű elterjedése jó példa a szúnyogok által terjesztett vírusos megbetegedések térhódítására napjainkban. A vírus régiós szintű vizsgálata nemcsak virológiai szempontból érdekes, de hasznos információkat szolgáltat mind a humán-, mind pedig az állategészségügy és közegészségügy számára is.

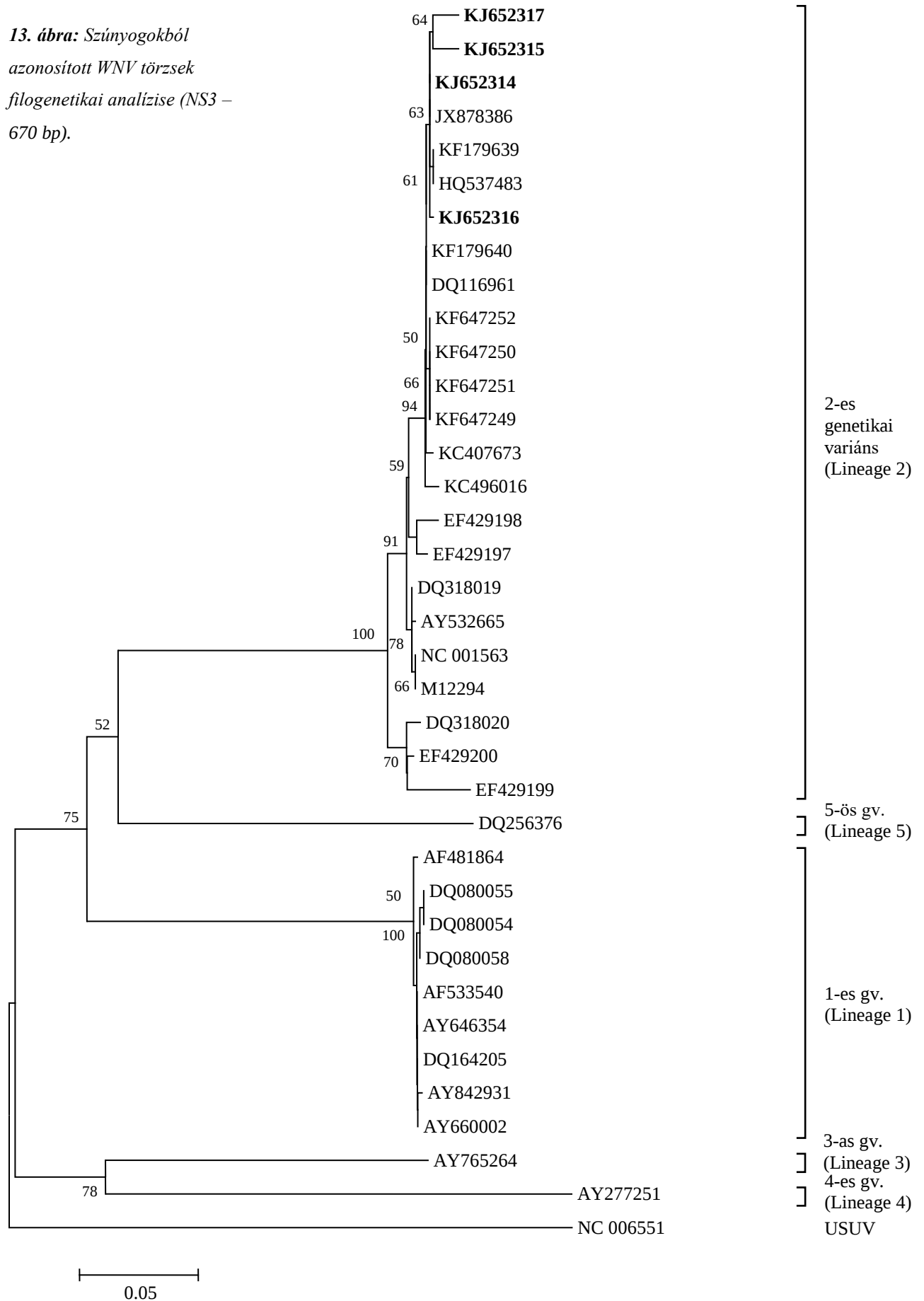
Szerb kollégákkal (Bosilijka Kritinic és Vesna Milankov) végzett tanulmányunk során összesen 6369 nőstény szúnyogot (180 csoportba gyűjtve) vizsgáltunk, melyek 11 fajból származtak (8. táblázat). A 180 tesztelt csoportból 10 (5,5%) bizonyult WNV pozitívnak (minimum infekciós ráta [MIR] érték: 1,57), melyek közül 9 származott *Culex pipiens* (MIR érték: 1,61; 95% konfidencia intervallum: 0,70 – 3,10) és egy pedig *Anopheles maculipennis* fajból (MIR érték: 45; 95% konfidencia intervallum: 1,20 – 228,40). A WNV pozitív szúnyogokat júliusban és augusztusban gyűjtöttük Kikinda, Novi Sad és Srpski Krstur területeken.

Faj	Gyűjtött szúnyogok száma	Tesztelt és (pozitív) csoportok száma
<i>Culex pipiens</i>	5568	115 (9)
<i>Aedes vexans</i>	405	19
<i>Anopheles maculipennis</i>	22	11 (1)
<i>Culiseta longiareolata</i>	1	1
<i>Coquillettidia richiardii</i>	34	7
<i>Anopheles hyrcanus</i>	3	1
<i>Culiseta annulata</i>	2	2
<i>Ochlerotatus caspius</i>	195	13
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	120	7
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	18	3
<i>Aedes rossicus</i>	1	1
ÖSSZESEN	6369	180 (10)

8. táblázat: WNV felmérés eredményeinek összefoglalása (Vojvodina tartomány, Szerbia, 2013)

A tanulmány során kiemelkedően magas fertőzöttségi arányt mutattunk ki a *C. pipiens* és *A. maculipennis* szúnyogokban Szerbia Vojvodina tartományában. Az említett két szúnyog faj esetében korábban már bizonyították, hogy Európában alkalmasak a WNV terjesztésére. Az összességében kapott 5,5% WNV pozitivitás arányaiban magasabb, mint az eddigi Európában végzett szúnyog szűrővizsgálatok eredménye (Savage és mtsai., 1999; Engler és mtsai., 2013). Mindemellett, a WNV jelenlétének igazolása szerbiai *A. maculipennis* szúnyogokban fontos megfigyelésnek számít, habár nem példa nélküli Európában (Balenghien és mtsai., 2006). Az említett faj WNV terjesztésében betöltött szerepének vizsgálata fontos cél a jövőbeli kutatások számára. A vírus figyelemre méltó aktivitását jól példázza a 2013 során igazolt számos humán eset, valamint a szúnyogok magas fertőzöttségi aránya ugyanazon vizsgálati évben. A WNV pozitív mintavételi területek közül kettő közel helyezkedett el Magyarország és Románia határaihoz, amely humánegészségügyi kockázattal járhatott a szomszédos országok számára, tekintettel, hogy a szúnyog populációk kedvező ökológiai feltételei is biztosítottak voltak. Az általunk azonosított WNV törzsek filogenetikai alapú azonosításához az NS3 gén 670 bázispár hosszúságú szakaszát sokszoroztuk és elemeztük. Az előzetes filogenetikai vizsgálathoz a különböző területeken kimutatott vírusok egy-egy reprezentatív törzsét használtuk, összesen 4 törzset analizáltunk (GenBank referencia számok: KJ652314 - KJ652317). A filogenetikai fán (13. ábra) jól látszik, hogy a szerbiai WNV törzsek egyértelműen a 2-es genetikai variánshoz tartoznak, valamint jelentős eltérést mutatnak az országon belüli földrajzi területek szerint is (Kikinda, Srpski Krstur and Novi Sad). A 2013-as szerbiai WNV törzsek egyértelműen közelebbi rokonságot mutatnak a 2012-es olaszországi és a 2010-es görögországi WNV törzsekkel (98-100% és 98-99%) (14. ábra). Más kutatócsoportok által végzett előzetes vizsgálatok szerint a WNV 2-es genetikai variánsának legalább két különböző genetikai csoportja cirkulált egyidejűleg 2012-ben Szerbiában, felvetve annak a lehetőségét, hogy a vírust két eltérő esemény során hurcolták be az országba (Petrović és mtsai., 2013). Vizsgálataink során feldolgozott szúnyogokból származó WNV törzsekkel végzett filogenetikai vizsgálatok is egy független bejutási, terjedési eseményét igazolnak. Feltételezhetően a vírus Olaszországból, Görögországból, vagy Afrikából érkezhetett (esetleg vándorló madarakon keresztül), ahol a WNV 2-es genetikai variánsa hosszú ideje enzoonótikus.

13. ábra: Szűnyogokból azonosított WNV törzsek filogenetikai analízise (NS3 – 670 bp).



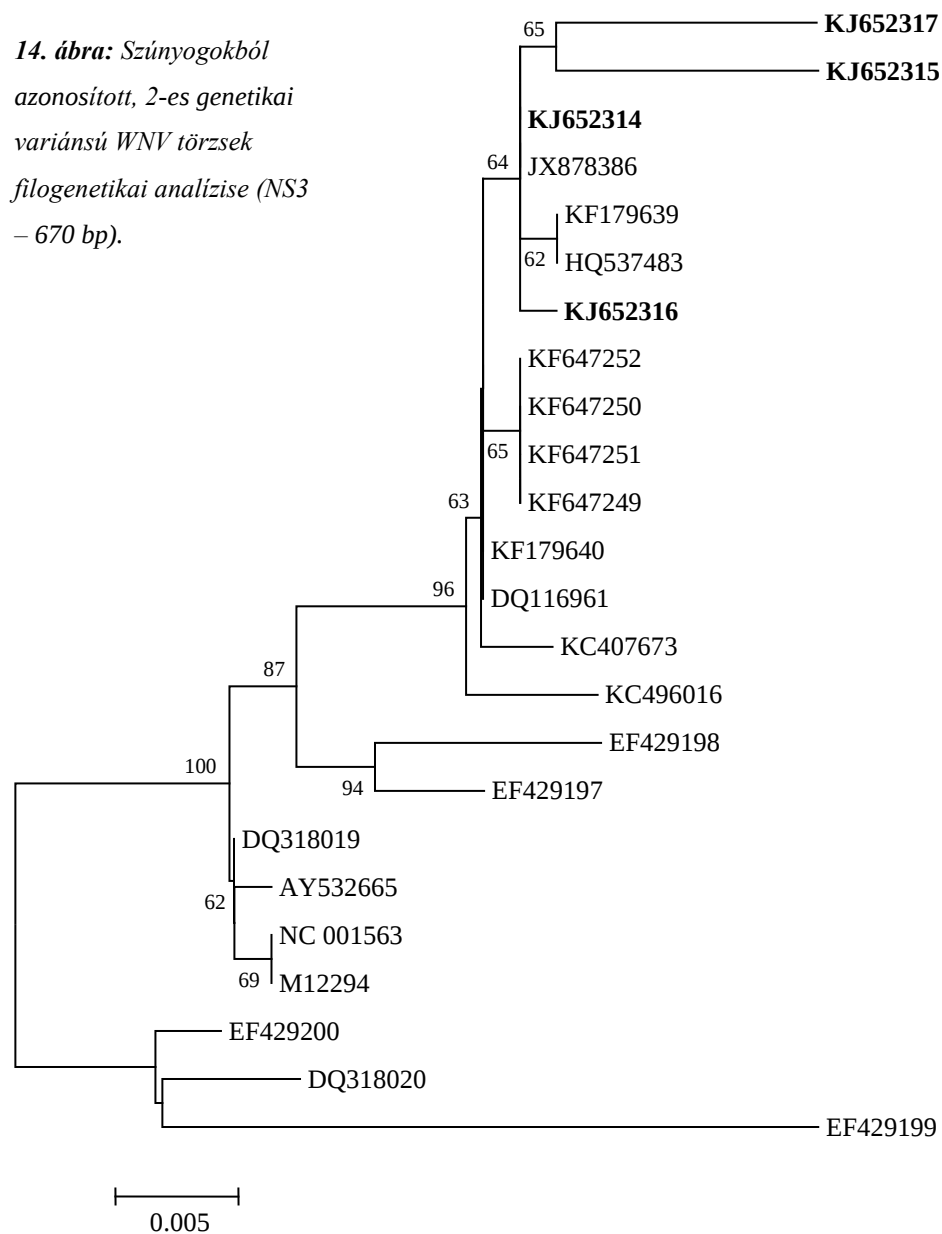
2-es
genetikai
variáns
(Lineage 2)

5-ös gv.
(Lineage 5)

1-es gv.
(Lineage 1)

3-as gv.
(Lineage 3)
4-es gv.
(Lineage 4)
USUV

14. ábra: Szúnyogokból azonosított, 2-es genetikai variánsú WNV törzsek filogenetikai analízise (NS3 – 670 bp).



“WNV/95Cp/HUN/2013”

WNV/60Cp/HUN/2013

“WNV/35Cp/HUN/2013”

"2436/12"

“Greece/2012/Kavala/39.1”

"Nea Santa-Greece-2010"

“WNV/71Cp/HUN/2013”

"Italy/2013/Rovigo/35.1"

"Italy/2013/Rovigo/33.1"

"Italy/2013/Padova/34.1"

"Italy/2013/Rovigo/33.2"

"Austria/2008_gh"

“goshawk-Hungary/04”

"Sad/12"

"Novi Sad-2010"

"SA93/01"

"SPU116/89"

“ArD76104”

"B956"

“Strain 956”

“33/G8; 34/F6”

"H442"

“ArB3573/82”

"SA381/00"

Szerbia / Kikinda / 2013

Szerbia / Kikinda / 2013

Szerbia / Srpski Krstur / 2013

Olaszország / 2012

Görögország / 2012

Görögország / 2010

Szerbia / Novi Sad / 2013

Olaszország / 2013

Olaszország / 2013

Olaszország / 2013

Olaszország / 2013

Ausztria / 2008

Magyarország / 2004

Szerbia / 2012

Szerbia / 2010

Dél-afrika Köztársaság / 2001

Dél-afrika Köztársaság / 1989

Szenegál / -

-

-

-

Dél-afrika Köztársaság / 1958

Közép-afrika Köztársaság / -

Dél-afrika Köztársaság / 2000

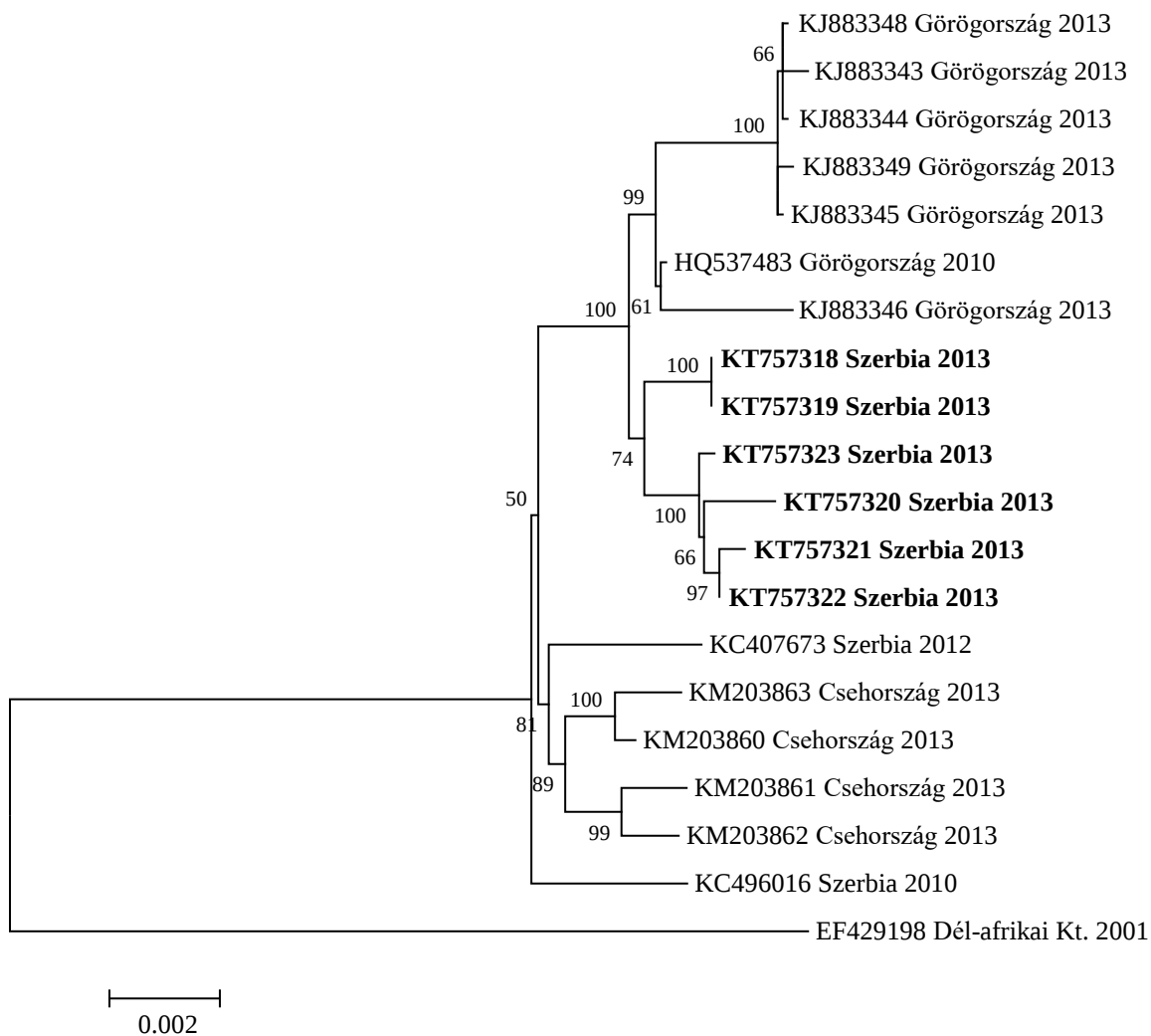
A vírussal végzett további vizsgálatainkban az általunk kimutatott törzsek teljes genom alapú, komplex molekuláris biológiai és filogenetikai analízisét végeztük el. Mind a 6 törzs esetében sikerült a teljes genomot szekvenálni és *de novo* összeépíteni. Összesen 10948 nukleotidot határoztunk meg hat WNV törzsből (GenBank referencia számok: KT757318 - KT757323), amelyek így a vírus teljes kódoló régióját (3434 aminosav) lefedték. Az általunk azonosított szerbiai törzsek a Nea Santa-Greece-2010 törzzsel mutatták a legmagasabb nukleotid azonosságot (99%). Vizsgálatunk során összesen hat aminosav változást találtunk különböző pozíciókban a polipeptid kódoló régió belül, amelyek között a WNV megváltozott patogenitására és virulenciájára vonatkozó számos, korábban már leírt, aminosav-szubsztitúciót is azonosítottunk. Ilyen például a Proline (Pro) az NS1₂₅₀P pozícióban, az aszparagin (Asp) változások az N-kapcsolt glikozilációs helyek NS1₁₃₀N, NS1₁₇₅N, NS1₂₀₇N és E_{153/154}N pozícióiban (Whitemann és mtsai., 2011; Samuel és mtsai., 2006; Moudy és mtsai., 2011). Még érdekesebb, hogy az NS3 régió 249-es pozíciójában (NS3₂₄₉P) a Pro aminosav-szubsztitúció is mind a hat törzs esetében kimutatható volt. Ezt a mutációt korábban a megnövekedett neuropatogenitás potenciális markereként írták le. Továbbá, párhuzamos mutációt mutattunk ki az NS3 fehérje helikáz doménje és az NS4B TM fehérjéje között, habár az NS4B TM fehérje mutációit korábban Papa és munkatársai egy 2011-es tanulmányukban már említi, de a párhuzamos mutáció és az NS3₂₄₉P / H lókuszt lehetséges funkcionális kapcsolatát nem erősítették meg. Az NS3₂₄₉H (His) szubsztitúcióval rendelkező törzsek párhuzamos NS4B₁₄S (Ser) és NS4B₄₉T (Thr) mutációkkal rendelkeznek, míg az NS3₂₄₉P aminosav mutációval rendelkezők pedig NS4B₁₄G (Gly) és NS4B₄₉A (Ala) mutációt tartalmaznak (9 és 10. táblázatok). A teljes kódoló régió filogenetikai és szekvencia analízise is megerősítette, hogy a 2013-as szerbiai törzsek a WNV 2-es genetikai variánsának csoportjához tartoznak. Hasonlóan az NS3 alapú filogenetikai elemzéshez, a teljes kódoló régió alapuló filogenetikai fa is egyértelműen jelzi, hogy a szerbiai WNV törzsek egyetlen monofiletikus csoportot alkotnak, amely a 2010-ben és 2013-ban leírt NS3₂₄₉P mutációt hordozó görög törzsekkel csoportosulnak (15. ábra). Az olaszországi NS3₂₄₉P mutációval rendelkező WNV szekvenciák hiánya miatt csak egy részleges NS3 szekvencia áll rendelkezésre, amely bizonyítékot szolgáltat az NS3₂₄₉P törzsek jelenlétére Olaszországban is (16. ábra). Ez is igazolja azt a megfigyelést, miszerint a különböző szerbiai WNV törzsek eltérő európai területekről történő többszöri behurcolások eredményeként kerülhettek az országba. A teljes kódoló szekvencia (és a részleges NS3 filogenetikai) analízis alapján elmondhatjuk, hogy az NS3₂₄₉P mutációval rendelkező törzsek az egyéb európai törzsekkel szembeni különálló csoportosulása figyelhető meg.

WNV törzs	Ország	GB ref. szám	Év	Fehérje és aminosav pozíciók									
				E	NS1				NS3	NS4B			
				154	130	175	207	250	249	14	23	32	49
Nea Santa-Greece-2010	Görögország	HQ537483	2010	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Greece/2013/Xanthi_3	Görögország	KJ883345	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Greece/2013/Thessaloniki_4	Görögország	KJ883346	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Italy-2012	Olaszország	JX878386	2012	-	-	-	-	-	Pro	-	-	-	-
Serbia/2013/Vojvodina-1	Szerbia	KT7573718	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Serbia/2013/Vojvodina-2	Szerbia	KT7573719	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Serbia/2013/Vojvodina-3	Szerbia	KT7573720	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Ala
Serbia/2013/Vojvodina-4	Szerbia	KT7573721	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Serbia/2013/Vojvodina-5	Szerbia	KT7573722	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
Serbia/2013/Vojvodina-6	Szerbia	KT7573723	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala
-	DRC	HM147824	1958	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Ala	Ser	Thr
SA93/01	Dél-afrikai közt.	EF429198	2001	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Ala	Ser	Thr
Goshawk-Hungary/04	Magyarország	DQ116961	2004	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr
Austria/2008_gh	Ausztria	KF179640	2008	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr
Novi Sad-2010	Szerbia	KC496016	2010	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr
Cz 13-502	Csehország	KM203863	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr
Cz 13-329	Csehország	KM203861	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr
Italy/2013/Rovigo/32.1	Olaszország	KF588365	2013	Asn	Asn	Asn	Asn	Pro	His	Ser	Thr	Asn	Thr

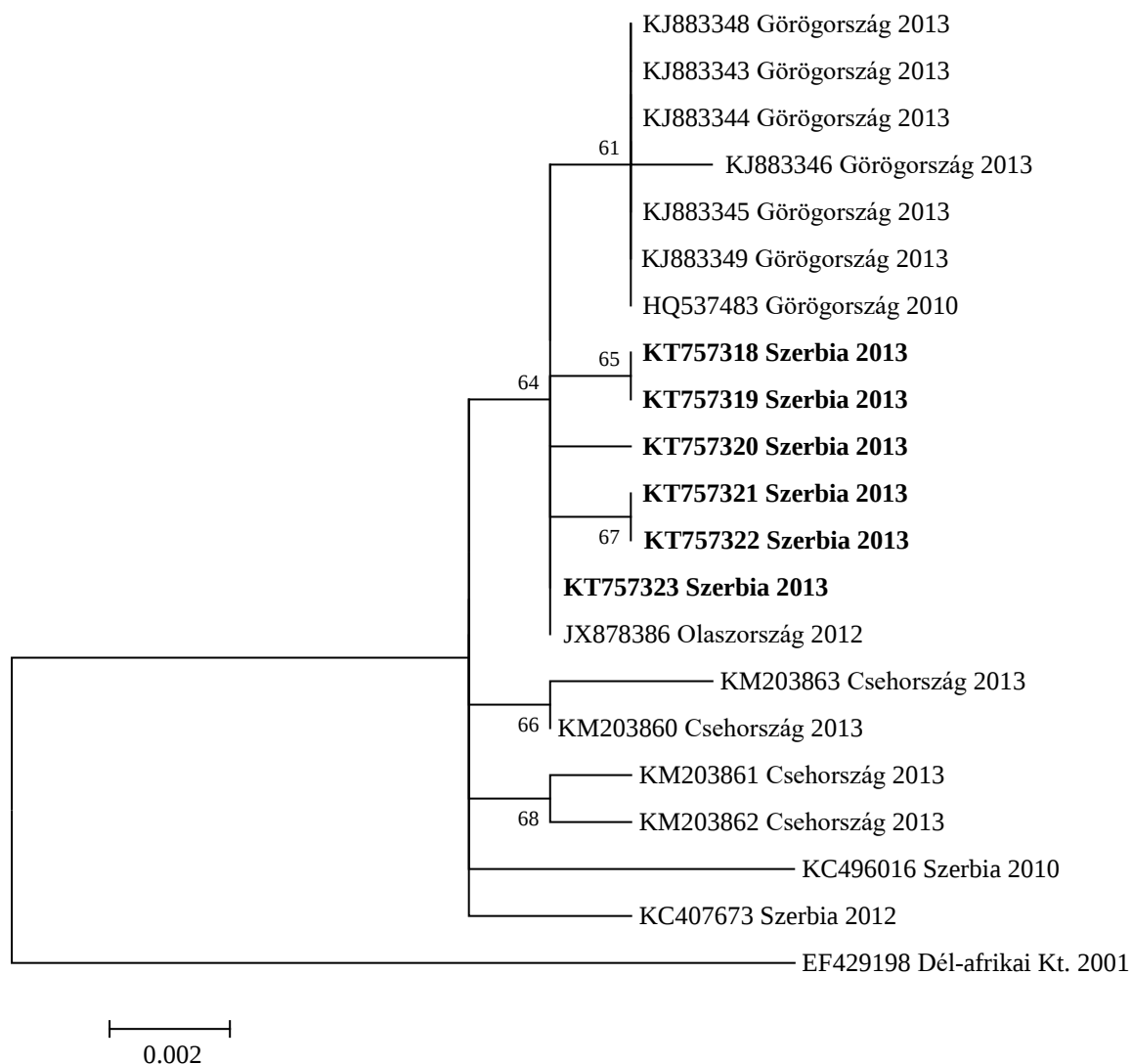
9. táblázat: Előzetes tanulmányokban leírt, a 2-es genetikai variánsú WNV törzsek fertőzésekor (patogenitás, virulencia) jegyzett fontosabb aminosav pozíciók összefoglaló táblázata, kiegészítve a 2013-as Szerbiai törzsekkel (vastagon kiemelve). Parallel mutációk (NS3₂₄₉H/P - NS4B₁₄ és NS4B₄₉) vastagon kiemelve. Rövidítések: Asn, aszparagin; Pro, prolin; His, hisztidin; Gly, glicin; Ser, szerin; Thr, threonin; Ala, alanin.

		Fehérje és aminosav pozíciók					
		NS1			NS2A	NS4A	NS5
WNV törzs	GB ref. szám	77	109	166	155	61	650
Serbia/2013/Vojvodina-1	KT7573718	Thr	Glu	Met	Val → Ala	Ser	Thr
Serbia/2013/Vojvodina-2	KT7573719	Thr	Glu	Met	Val → Ala	Ser	Thr
Serbia/2013/Vojvodina-3	KT7573720	Thr → Ala	Glu → Gly	Met	Val	Ser → Gly	Thr → Ala
Serbia/2013/Vojvodina-4	KT7573721	Thr → Ala	Glu → Gly	Met → Val	Val	Ser	Thr
Serbia/2013/Vojvodina-5	KT7573722	Thr → Ala	Glu → Gly	Met	Val	Ser	Thr
Serbia/2013/Vojvodina-6	KT7573723	Thr → Ala	Glu → Gly	Met	Val	Ser	Thr

10. táblázat: A 2013-as, 2-es genetikai variánsú, szerbiai WNV törzsek egyedi aminosav változásainak összefoglaló táblázata, összehasonlítva a Neo Santa-Greece-2010 vírus törzssel. A változások vastagon kiemelve. Rövidítések: Thr, threonin; Ala, alanin; Glu, glutaminsav; Gly, glycin; Met, metionin; Val, valin; Ser, szerin.



15. ábra: A WNV törzsek teljes kódoló régiójának (10948 nukleotid) elemzésén alapuló filogenetikai analízis. A szerbiai WNV törzsek egyetlen monofiletikus csoportot alkotnak, amely a 2010-ben és 2013-ban leírt NS3₂₄₉P mutációt hordozó görög törzsekkel csoportosulnak.



16. ábra: A WNV törzsek részleges kódoló régiójának (NS3 – 743 nukleotid) elemzésén alapuló filogenetikai analízis. A szerbiai WNV törzsek egyetlen monofiletikus csoportot alkotnak, amely a 2010-ben és 2013-ban leírt NS3_{249P} mutációt hordozó görögországi törzsekkel csoportosulnak. Az olaszországi NS3_{249P} mutációval rendelkező WNV szekvenciák hiánya miatt csak egy részleges NS3 szekvencia áll rendelkezésre, amely bizonyítékot szolgáltat az NS3_{249P} törzsek jelenlétére Olaszországban is.

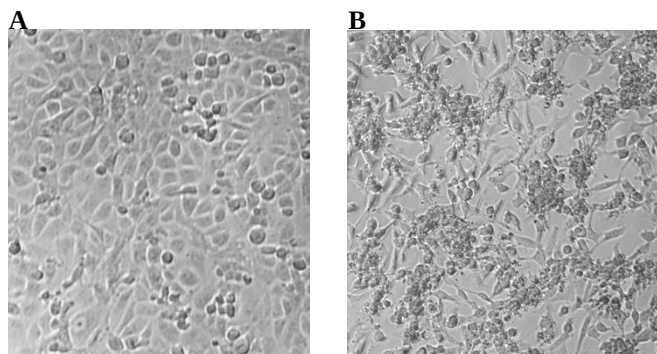
A WNV egy tipikus szezonális megbetegedés, amely erősen kötött a szúnyogok aktivitásához. A vírus aktivitásának feltérképezése egy területen, több pilléren alapul. A szúnyog monitorozás, a vektor kompetencia tanulmányok, az emberi vagy állati esetek regisztrálása, bejelentése és a szerológiai monitoring tevékenységek mind fontos vizsgálati módszerei a WNV fertőzések Európában fennálló kockázatának megértéséhez és a jövőbeni járványok előrejelzéséhez. Mindezekon felül, a lokálisan keringő WNV törzsek vizsgálata, a mutációk és aminosav változások korai kimutatása (amelyek például befolyásolhatják a

neurovirulenciát vagy patogenitást), elengedhetetlenek a fertőzések lehetséges hatásainak értékeléséhez. Az előbb leírtakra jó példa a Szerbiában végzett tanulmányunk, ahol a vártnál sokkal magasabb arányban volt jelen a vírus az általunk gyűjtött *C. pipiens* és *A. maculipennis* szúnyogokban. Eredményeink egyfelől magyarázattal szolgálnak a 2013-ban előfordult nagyszámú humán esetre Szerbiában, a vírus robbanásszerű terjedésére az érintett területeken, valamint a 2014-ben Szerbiában kitört WNV járványra egyaránt. Szúnyog vizsgálatainkkal már prognosztizáltuk a fertőzések számának növekedését, és egy esetleges járvány megjelenését. Tanulmányunk során hat WNV törzs teljes kódoló régióját vizsgáltuk aminosav változások leírása céljából, amelyeket korábbi vizsgálatokban, mint feltételezett virulencia faktorok, írtak le. Az NS1 (NS1₁₃₀N, NS1₁₇₅N, NS1₂₀₇N) és az E (E_{153/154}N) fehérjék 3 N-kötésű glikozilációs helyén az összes vizsgált 2-es genetikai variáns szekvenciában észlelt aszparagin változásokat azonosítottuk. Az említett aminosav változások fontos szerepet játszhatnak e fehérjék különleges funkcióiban. Az NS1 jól ismert kofaktor a vírus replikáz működése során (Whitemann és mtsai., 2011; Samuel és mtsai., 2006), míg az E fehérje a sejtfelszínhez való kötődésért, a membránfúzió kialakításáért és a vírus összeszerelődésért felelős (Samuel és mtsai., 2006). A New York-ban 1999-ben azonosított WNV törzs esetében (HQ596519) már kimutatták, hogy az E fehérje molekuláris determináns (E_{153/154}N) a neuroinvasivitást szempontjából (Shirato és mtsai., 2004). Az NS3 genomális régióban kimutattuk a közelmúltban leírt NS3₂₄₉P szubsztitúciót az összes általunk vizsgált szerbiai törzsben. A legtöbb 2-es genetikai variánsba tartozó WNV törzs NS3 fehérjéje His aminosavat tartalmaz a 249 pozícióban, amely a legtöbb neuroinvasív 1-es törzsre is jellemző (Papa és mtsai., 2011). A korábbi kísérleti vizsgálatokban az NS3 fehérjén belüli NS3₂₄₉P szubsztitúciót összefüggésbe hozták a megnövekedett virémiával és mortalitással a vizsgált amerikai varjak között (*Corvus brachyrhynchos*), amelyek pozitív hatással lehettek a megnövekedett vírusátviteli sebességre is (Samuel és mtsai., 2006; Brault és mtsai., 2007; Papa és mtsai., 2011). Emellett a megnövekedett virémiával és az emelkedett termotoleranciával rendelkező NS3₂₄₉P mutánsok magasabb patogenitást is mutathatnak (Brault és mtsai., 2007). Ezt a fontos mutációt csak egyetlen olaszországi szekvenciában, több görögországi törzsben és az általunk azonosított szerbiai 2-es genetikai variánsú vírusokban mutatták ki. Az NS3₂₄₉P aminosav csere megjelenése a szerbiai WNV törzsek genomjában magyarázatot nyújthatott a neuroinvasív WNV esetek (West Nile neuroinvasive disease – WNND) 2012-2013-as számának növekedésére az országban (Popović és mtsai., 2013). Emellett párhuzamos mutációt mutattunk ki az NS3 fehérje helikáz doménje és az NS4B TM fehérje között (NS3₂₄₉H NSB₁₄S és NS3₂₄₉P NS4B₁₄G), ami befolyásolhatja a feltételezett

fehérje-fehérje kölcsönhatást a két virális fehérje között. Hasonlóan egy korábbi tanulmány eredményeihez az általunk elvégzett filogenetikai vizsgálat is a vírus több behurcolási eseményét jelzi Szerbiába. A 2013-as mintákból általunk azonosított szerbiai WNV törzsek a görög törzsekkel mutattak csoportosulást, amelyek 2010-ből és 2013-ból származtak. Az utóbbi eredmény arra enged következtetni, hogy ezek a törzsek Görögországból származnak, ami magyarázatot adna az NS3₂₄₉P aminosav szubsztitúció jelenlétére a szerbiai mintákban. A filogenetikai analízis alapján feltételezhetjük, hogy a vírus Görögországból kerülhetett Olaszországba, hiszen a 2012-ben leírt törzs is tartalmazza az NS3₂₄₉P mutációt. A korábbiakban azonosított szerbiai WNV törzsek (2010 és 2012) egyértelműen más európai WNV törzsekkel csoportosultak, amelyek azonban nem tartalmazzák az NS3₂₄₉P mutációt.

A Szerbiában gyűjtött szunyogmintákból kimutatott WNV molekuláris elemzéseinek eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az általunk azonosított mindegyik WNV törzs genomjában sikerült leírni az NS3₂₄₉P aminosav-szubsztitúciót, amelyet korábban a megnövekedett neuropatogenitás potenciális markereként írtak le. Ezen kívül az NS3 fehérje helikáz domén és az NS4B TM fehérje közötti párhuzamos mutációkat is felfedeztünk, amelyek befolyásolhatják a fehérje-fehérje kölcsönhatást, és ezáltal az NS3 fehérje RNS-kötődését, amely elősegítheti a virális replikációt. Eredményeink nagyban támogathatják a jövőbeli molekuláris vizsgálatokat, valamint felhívják a figyelmet a neuropatogén hatással járó mutációk vizsgálatának fontosságára.

A WNV pozitív mintákkal izolálási kísérleteket is végeztünk BSL-3 laboratóriumi körülmények között. A vírust mind C6/36 rovar-, mind pedig Vero E6 majomvese sejtvonalakon sikeresen izoláltuk és sorozatosan passzáltuk. A fertőzést követő hozzávetőlegesen 48-72 óra elteltével jelentkeztek az első citopatogén hatások (CP) mindkét sejtvonal esetében. A CP a Vero E6 sejtvonalon volt markánsabb a mikroszkópos kép alapján (17. ábra).



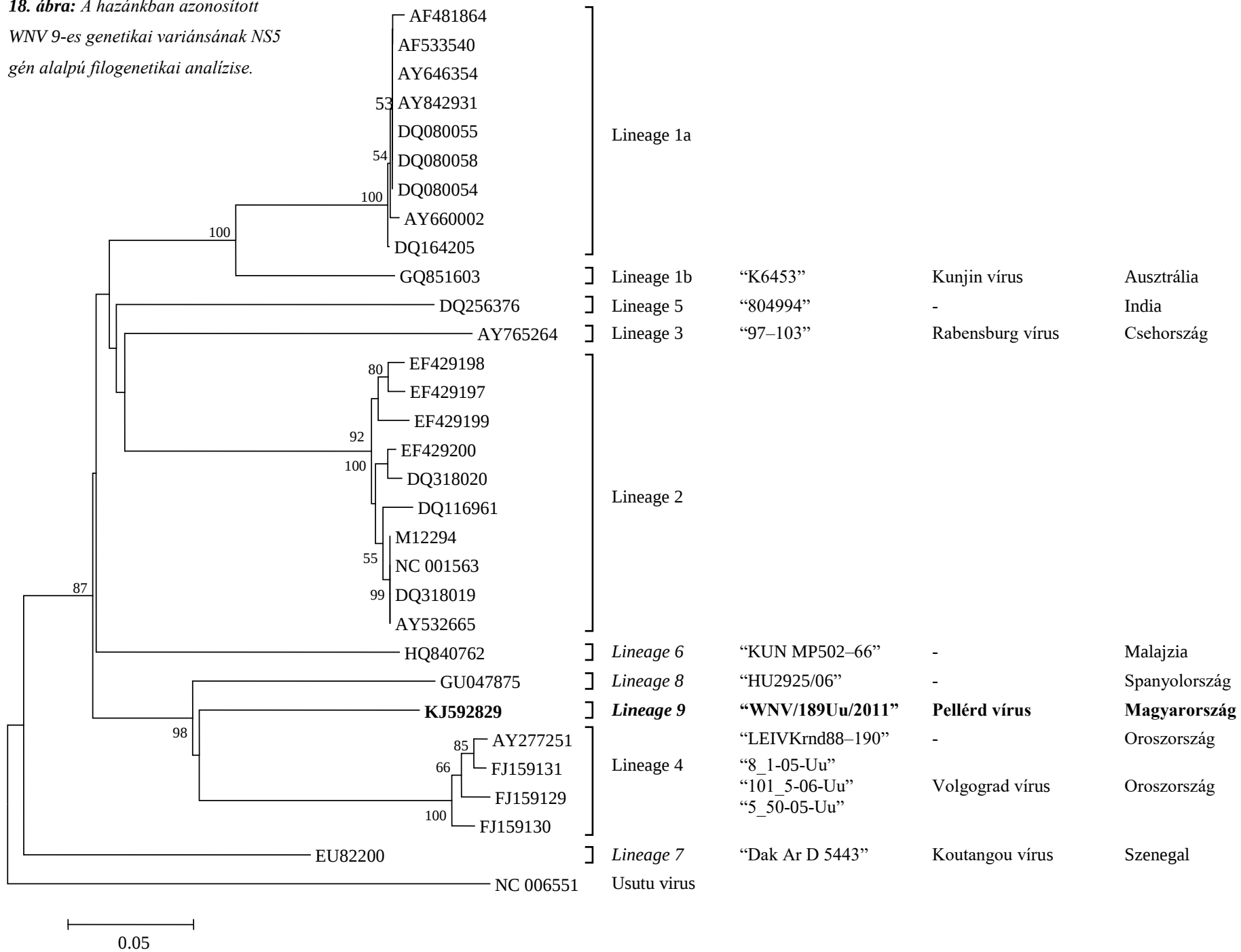
17. ábra: Mikroszkópos felvétel a WNV sejtkárosító hatásáról (B) Vero E6 sejtvonalon. Negatív kontroll (A).

A vírussal végzett vizsgálatainkban egy hasonló, Baranya-megyében elvégzett szúnyog monitorozás keretén belül összesen 23029 db nőtény szúnyogot szűrtünk és kerestük a WNV 1-es, valamint 2-es genetikai variánsát a régióban. (A vizsgálat része volt egy nagyszabású hazai felmérésnek, amit Szentpéteri-Gavallér Katalin és munkatársai irányítottak és elsősorban a WNV humán patogén törzseinek kimutatását célozta meg.) Habár ezeket a genetikai variánsokat nem sikerült megtalálnunk, egy sokkal nagyobb jelentőségű eredményt tudtunk felmutatni, nevezetesen egy új genetikai variáns megjelenését egy szintén új szúnyogfajban. Ez a genetikai variáns a 9-es variáns nevet kapta. A vírust *Uranotaenia unguiculata* nőtény egyedekből sikerült azonosítani. Bár az *U. unguiculata* gyakori faj a Földközi-tenger egész területén, ezt a szúnyogot számos európai országban is leírták már, beleértve Magyarországot is (Becker és mtsai., 2003).

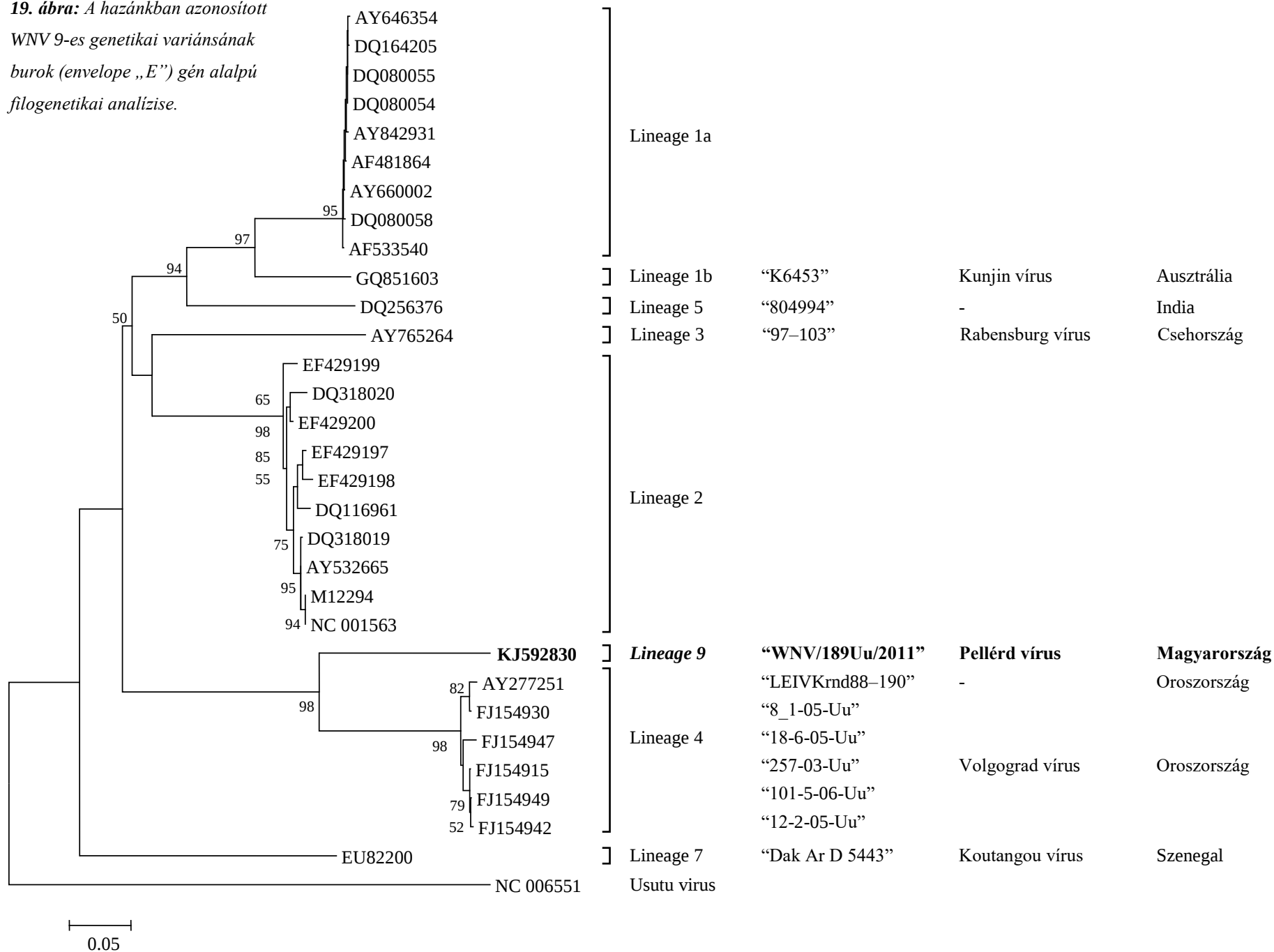
Mindezidáig csak WNV-szerű vírust (ún. "Volgograd vírus") azonosítottak az *U. unguiculata* szúnyogfajban, Oroszországban (A.E. Platonov, nem publikált adat, GenBank referencia szám: FJ159131). Mivel az általunk felszorzozott NS5 gén rövid fragmentuma (250 bázispár) nem volt alkalmas a magyar *U. unguiculata* WNV törzs filogenetikai besorolására, ugyanazon gén (875 bázispár) és az „envelope” glikoprotein (E) gén (865 bázispár) hosszabb régióját szekvenáltuk (GenBank referencia számok: KJ592829 és KJ592830). Habár, a filogenetikai fán a magyarországi WNV (WNV/189Uu/2011) szekvencia más WNV törzsekkel csoportosult, de egyértelműen külön monofiletikus ágat alakított ki. Az NS5 gén alapú elemzések (18. ábra) kimutatták, hogy az új magyarországi WNV törzs a legnagyobb hasonlóságot a WNV-4 képviselőivel (legfeljebb 82%, filogenetikai távolság: 0,413) valamint a feltételezett 8-as genetikai variánssal (83%, filogenetikai távolság: 0,360) mutatta, amelyek Oroszországból és Spanyolországból származtak. Az E génen alapuló elemzések (19. ábra) is hasonló eredményt hoztak, hiszen az új magyar WNV törzs elkülönült a többi WNV törzstől, amelyeket ugyanabból a szúnyogfajból (*U. unguiculata*) írtak le Volgogradban, Oroszországban és inkább a WNV-4-el együtt mutatott csoportosulást. Tehát a "Pellerd vírus" (WNV/189Uu/2011) genom két különböző régiójának szekvencia- és filogenetikai analízise is azt mutatta, hogy az új magyar WNV törzs különbözik a korábban leírt WNV törzsektől, és különálló monofiletikus ágat alakított ki.

Bár a szekvencia a WNV-4-hez és a feltételezett WNV-8-hoz kapcsolódott, azt feltételeztük, hogy a WNV/189/Uu/2011 törzs új genetikai variánst jelenthet a WNV törzsek között (68%-78% homológia, filogenetikai távolság: 0,265-0,584).

18. ábra: A hazánkban azonosított WNV 9-es genetikai variánsának NS5 gén alalpú filogenetikai analízise.



19. ábra: A hazánkban azonosított WNV 9-es genetikai variánsának burok (envelope „E”) gén alalpú filogenetikai analízise.



4.2.4 Usutu vírus (USUV)

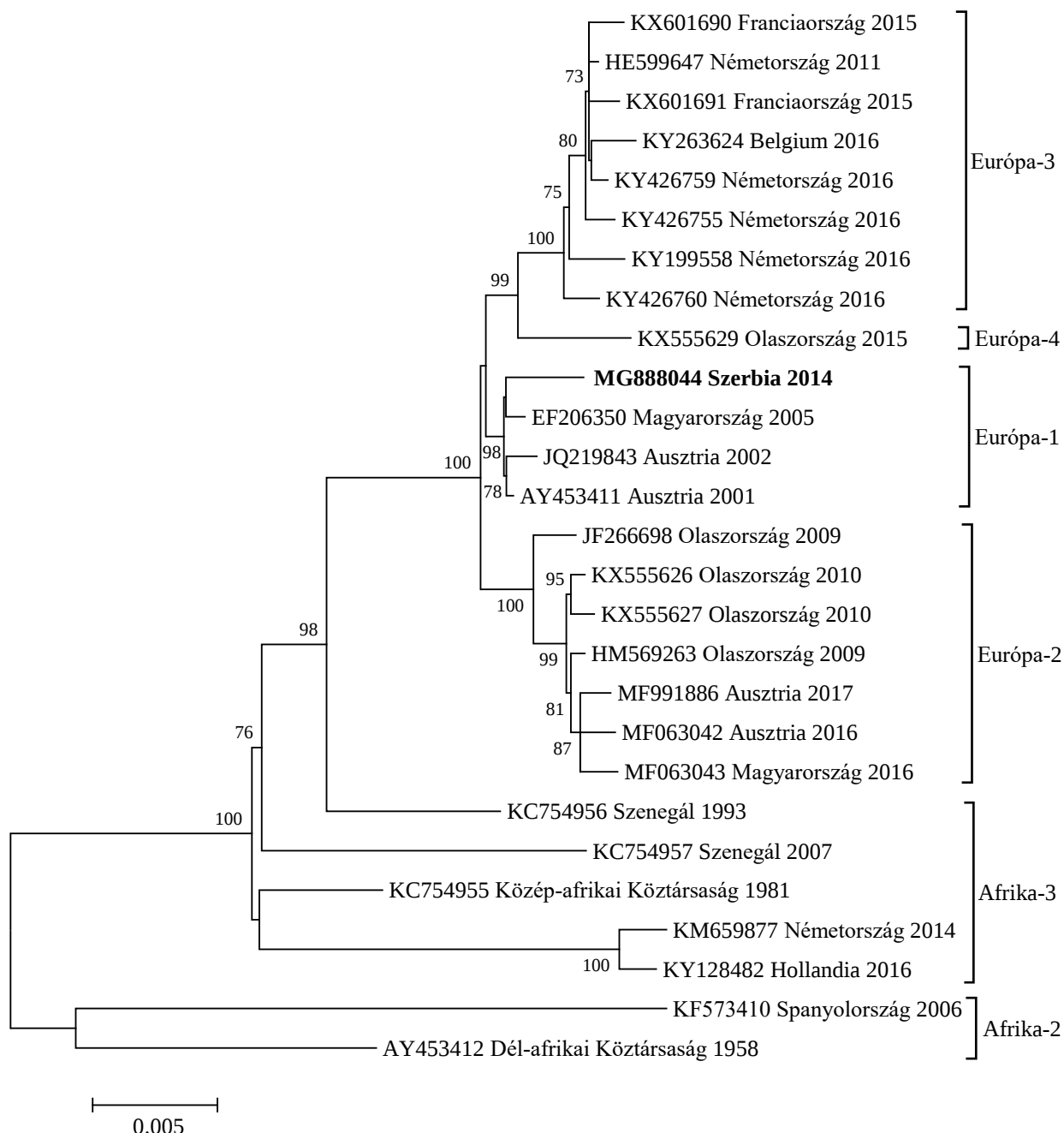
Az előzőekben már ismertetett vizsgálatok megkezdése után a Szerb kollégákkal folyamatos kapcsolatban dolgoztunk (azt jelentős mértékben meg is erősítettük), aminek egy hosszú távú, szisztematikus vizsgálat lett az eredménye. Ennek keretében folytattuk az előzőekben ismertetett szúnyog monitorozás vizsgálatot, elsősorban WNV kimutatás céljából, de emellett a 2014-től Usutu vírus (USUV) azonosítására is célzott vizsgálatokat terveztünk. Az említett években összesen 23753 szúnyogot gyűjtöttünk és vizsgáltunk meg. A szúnyogokat csoportokba gyűjtöttük (faj, gyűjtési hely és idő szerint, maximum 50 egyed/csoport). A legtöbbet mintázott faj a *Culex pipiens* volt (11099, az összes szúnyogminta 47% -a), majd *Aedes vexans* (10005, az összes szúnyog példány 42% -a). A vizsgált terület domináns fajai az *Ochlerotatus caspius* (1574, 7%), *Ochlerotatus sticticus* (559, 2,4%) és *Coquilletidia richiardii* (332, 1,4%) voltak. Az összes többi faj jelentősen alacsonyabb ($n < 100$, $< 0,5\%$) egyedszámmal fordult elő.

Összesen 753 szúnyog csoportot vizsgáltunk, amiből USUV jelenlétét 3-ból (0,4%) sikerült kimutatni. A pozitív minták augusztusban gyűjtött *C. pipiens* fajtól származtak. A továbbiakban az NS5 régió egy szakaszát sokszoroztuk és szekvenáltuk, ami egyértelműen azonosította az USUV genetikai állományát a mintákban. A közeli földrajzi elhelyezkedést, a vektorfaj egyezést és a részleges NS5 szekvenciák 100%-os azonosságát figyelembe véve egy pozitív mintát választottunk ki részletesebb molekuláris biológiai elemzés céljából, és alkalmaztuk, mint a régióból származó referencia törzset. A vírus teljes kódoló régióját sikerült meghatároznunk egy részleges 3'-UTR-fragmenssel (GenBank referencia szám: MG888044) együtt, amely így 10302 bázispár hosszúságú szakaszt adott. Ez összesen 3434 aminosavból álló, egy nyitott leolvasási kerettel rendelkező poliproteint kódolt. Az ismert feltételezett genetikai törzsek reprezentatív tagjait (Afrika 2 és 3, Európa 1-4) kiválasztottuk, hogy az általunk leírt törzs esetleges evolúciós kapcsolatait felderítsük. A kapott filogenetikai eredmények (20. ábra), valamint a részletes molekuláris vizsgálatok alapján a szerbiai USUV törzs egyértelműen az európai 1-es genetikai variánsok közé sorolódott, amelyet eredetileg Ausztriában, 2001-ben írtak le. Az 1-es genetikai variáns jelenléte Szerbiában a vírus földrajzi terjeszkedését jelzi a balkáni félsziget délkeleti területein.

Számos új mutációt is kimutattunk a vírus genomjában, amelyek több régiót is érintettek. Ezek a mutációk a következők voltak: C₅₄L, E₇₀₂A, NS₁₁₂₄₀I, NS₅₂₆₅₆R és NS₅₃₂₅₇I. Természetesen további funkcionális elemzések szükségesek annak érdekében, hogy a felismert, kimutatott mutációknak van-e esetleg jelentősége a vírus patogenitásában.

A vírus izolálására tett kísérleteink mind a C6/36, mind pedig a Vero E6 sejtvonalakon sikertelenek voltak, amit feltételezhetően a vírus alacsony kópiaszáma magyaráz.

Az általunk elvégzett tanulmány nyújtotta az első bizonyítékot az USUV európai 1-es genetikai variáns földrajzi kiterjedésére a balkáni félsziget déli területein, és szolgáltatja az USUV első genetikai adatait a térségben.



20. ábra: Az USUV törzs teljes kódoló régiójának (10302 nukleotid) elemzésén alapuló filogenetikai analízis.

4.3 Denevérek hordozta vírusok jellemzése

A denevérek által hordozott vírusok kimutatására, felderítésére irányuló vizsgálatok a 2002-es SARS koronavírus járvány után ugrásszerűen megnöttek. A világ számos országában a virológusok egyre nagyobb figyelmet fordítottak ezekre a kórokozókra, így egyértelmű volt, hogy hazánkban is elindítsuk a virológiai kutatás ezen ágát. Mivel minden denevérfaj nemzetközi (és hazai) védelem alatt áll, a mintavétel igen nagy összefogást igényelt a kutatóktól. Így első lépésként először egy hazai, majd egy nemzetközi hálózatot szerveztünk több ország számos kutatójának bevonásával. Az első vizsgálati szakaszban (2012 és 2013 között) összesen 447 guanó mintát gyűjtöttünk, 7 különböző gyűjtési ponton hazánkban. Mintáink 24 különböző denevérfajtól származtak. Ezen minták szisztematikus tesztelésével kezdtük meg vizsgálatainkat. A későbbiekben (hasonlóan a szúnyogok által terjesztett kórokozók vizsgálatakor), a denevérekkel kapcsolatos kutatásainkat is kiterjesztettük a határmenti területekre. A bevezető kísérletekhez szintén szerbiai munkacsoportokkal sikerült kiépítenünk sikeres együttműködést. Ennek keretében összesen további 128 (45 hím és 83 nőstény) *Miniopterus schreibersii* denevért csapdázását végeztük el. A továbbiakban az előbb elmitett minták feldolgozásával született eredményeinket ismertetem.

4.3.1 Astrovírusok (*BtAstV*)

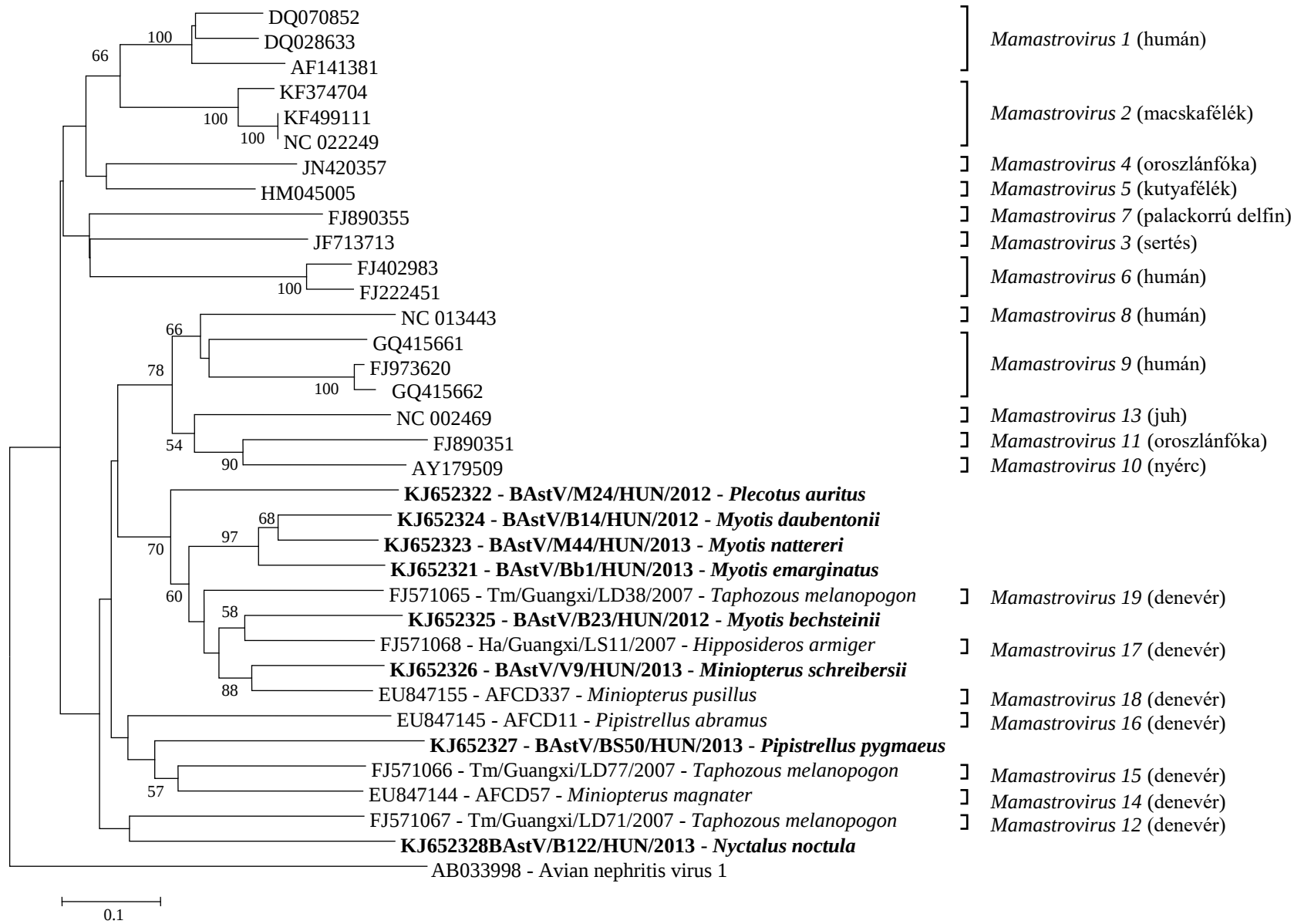
Az első nagyléptékű európai denevér eredetű astrovírus (*BtAstV*) felmérést Magyarországon több különböző denevér faj bevonásával végeztük el. A 24 vizsgált denevérfaj közül 8 fajban sikerült kimutatni *BtAstV*-kat: *Miniopterus schreibersii*, *Myotis bechsteinii*, *Myotis daubentonii*, *Myotis emarginatus*, *Myotis nattereri*, *Nyctalus noctula*, *Pipistrellus pygmaeus*, és *Plecotus auritus*. Összesen a minták 6,93%-ban mutattuk ki a vírust (95% C.I.: 4.854, 9.571), ám jelentős eltérést tapasztaltunk egyes fajok esetében (2,7%-80%). A *M. schreibersii* fajban magasabb előfordulást mutatott a vírus, mint bármelyik másik vizsgált egyedben. Az RdRp gén egy fragmensének szekvencia és filogenetikai analízise (21. ábra) egyértelműen azt mutatta, hogy a magyar *BtAstV* törzsek (GenBank referencia számok: KJ652321–KJ652328) azonos klaszterbe tartoznak a többi világszerte azonosított *BtAstV* törzsekkel és jelentősen eltér a többi emlős eredetű *AstV* törzstől. Az eddigi tanulmányoknak megfelelően, a hazai vizsgálatokban is magas genetikai variabilitást figyeltünk meg a *BtAstV* törzsek között. Genetikailag diverz szekvenciákat azonosítottunk a *Myotis spp.* mintákban (*M. daubentonii*, *M. nattereri*, *M. emarginatus* és *M. bechsteinii*), míg a *Miniopterus spp.*, *Pipistrellus spp.*, *Plecotus spp.*, és *Nyctalus spp.* fajokban az adott fajra jellemző szegregációs mintázatokat írtuk le. A nukleinsav szekvencia azonosság mértéke 51% és 75% között

változott a Magyarországon detektált BtAstV és a világon, más helyeken leírt BtAstV vírustörzsek között. Az ICTV irányelvei szerint az átlagos nukleinsav szekvencia divergenciája AstV törzsek között minimum 55%. Ennek megfelelően az RdRp gén alacsony szekvencia divergenciájából is kiindulva feltételezhetjük, hogy a Magyarországon leírt BtAstV törzsek akár új fajok is lehetnek az AstV-k között.

Az BtAstV első leírása 2008-ban történt (Chu és mtsai., 2008). Azóta számos újabb tanulmány született, ahol újabb BtAstV leírása történt denevér rezervoár szervezetekből Európában és Ázsiában egyaránt (Zhu és mtsai., 2009; Drexler és mtsai., 2011; Anthony és mtsai., 2013). Európában csak *M. myotis*, *M. daubentonii*, *M. bechsteinii*, és *P. auritus* fajokat azonosítottak eddig BtAstV rezervoár szervezetként. Kutatásunk során öt újabb potenciálisan hordozó denevér fajt írtunk le. A legtöbb BtAstV pozitív minta *M. schreibersii* fajból származott. Érdekes, hogy egy kolóniában kimagaslóan magas, közel 80%-os prevalenciát figyeltünk meg. Magyarországon a *M. schreibersii* denevér az egyetlen olyan faj, amely kizárólag földalatti pihenőhelyeket használ (Gombkötő és mtsai., 2007). Kolóniáik általában nagyok és sűrűek, hiszen így a test-test közelségek miatt jelentős mennyiségű energiát tudnak spórolni hibernációs periódusuk során. Ezek a denevérek sokszor vegyes kolóniákat is alkothatnak például *R. ferrumequinum*, *R. euryale*, *M. myotis*, *M. blythii*, és *M. emarginatus* fajokkal. A *M. schreibersii* az egyik leggyorsabban és legmesszebb (>500 km) repülő denevér faj Európában, ennek megfelelően nagy távolságokat képes áthidalni a pihenőhelyek között (Hutterer és mtsai., 2005; Hutson és mtsai., 2008). A nagy kolónia, illetve a kimagasló repülési képesség is hozzájárulhatott ahhoz, hogy a *M. schreibersii* denevérek körében gyakrabban detektáltunk BtAstV-t. A hipotézist, miszerint a nagy kolónia méret (mint például az *M. schreibersii* faj esetében) hozzájárul a különböző vírusok terjedéséhez, korábbi tanulmányok is alátámasztják (Xiao és mtsai., 2011).

Következő oldal

21. ábra. Az újonnan kimutatott BtAstV törzsek filogenetiai analízise, az RdRp régió 420 bázispár hosszúságú szakasza alapján. Az új, hazai törzsek feketével kiemelve.



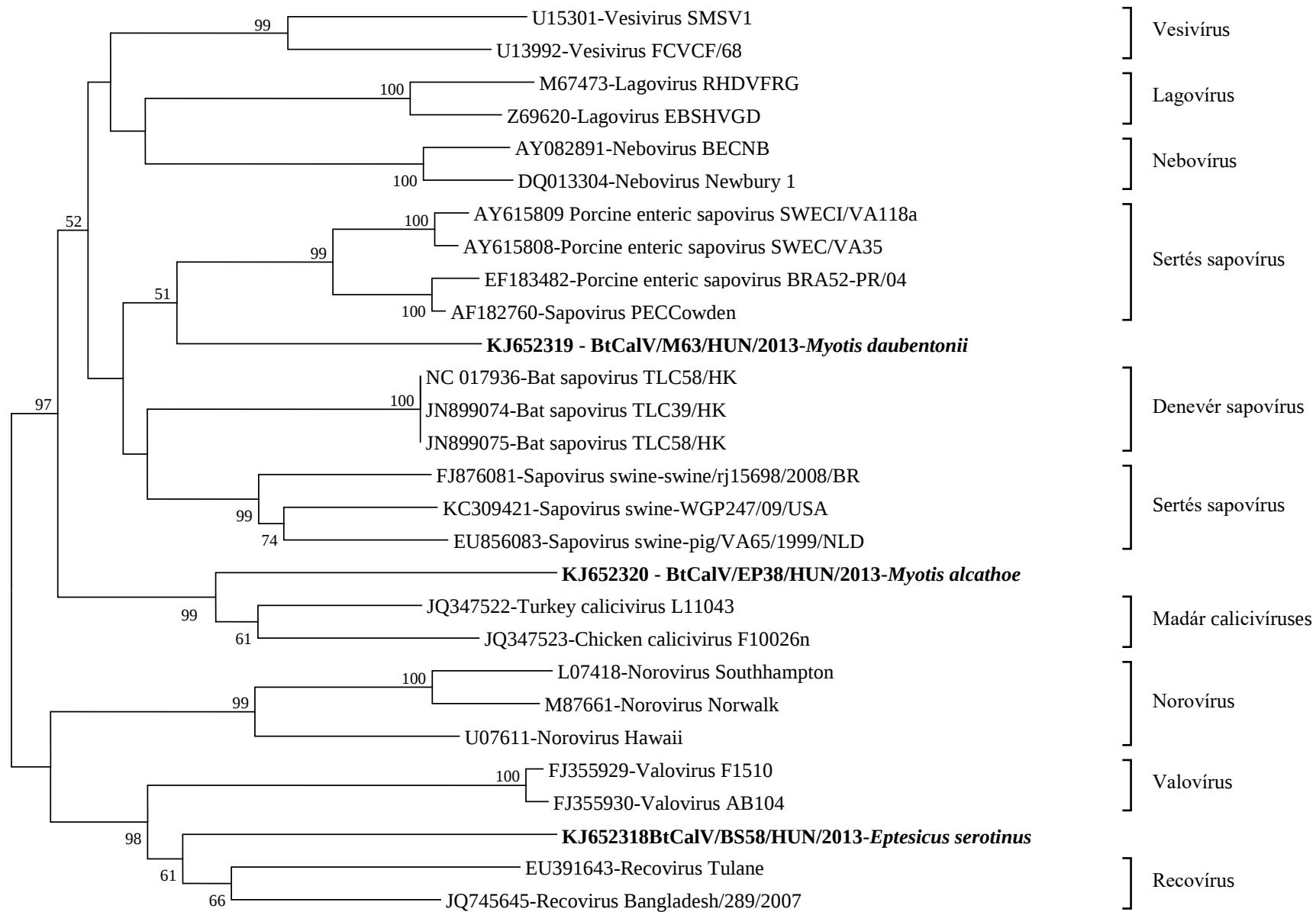
4.3.2 Calicivírusok (*BtCalV*)

Hasonlóan a hazánkban kimutatott *BtAstV*-hoz, új denevér calicivírus fajokat (*BtCalV*) írtunk le három denevérfajban: *M. daubentonii*, *M. alcahoe* és *E. serotinus* egyedekből. A kimutatási ráta a mintázott denevérek között 0,67% volt (95% C.I.: 0.189, 1.780). A *BtCalV* kimutatásához szintén az RdRp egy 320 nukleotid hosszúságú szakaszát sokszoroztuk fel. A szekvencia hasonlósági keresés a mintákat egyértelműen a *Caliciviridae* családba sorolta. Ezt az eredményt filogenetikai vizsgálattal is alátámasztottuk (22. ábra). A filogenetikai törzsfán is jól látszik, hogy a *BtCalV*/M63/HUN/2013 (GenBank referencia szám: KJ652319) törzs, mely *M. daubentonii*-től származott, sokkal közelebb áll a sertés sapovírusokhoz, de különbözik a Kínában izolált denevér sapovírusoktól. A *BtCalV*/BS58/HUN/2013 törzs (GenBank referencia szám: KJ652318), ami *E. serotinus*-tól származott, kívül eső törzsnek tűnik a *Recovírus* és *Valovírus* nemzetségek között. Még ennél is érdekesebb a *M. alcahoe*-től származó, *BtCalV*/EP38/HUN/2013 törzs (GenBank referencia szám: KJ652320), ami madár CalV-től szegregálódott és nem más emlős vírusoktól.

Annak érdekében, hogy molekuláris szinten még részletesebben jellemezzük a hazai *BtCalV*-kat, meghatároztuk a *BtCalV*/M63/HUN/2013 és *BtCalV*/BS58/HUN/2013 genom szekvenciájának nagy részét a 3' RACE PCR módszer alkalmazásával. (Sajnálatos módon a *BtCalV*/EP38/HUN/2013 esetében a 3' RACE PCR alkalmazása többször sikertelennek bizonyult, valószínűleg az alacsony virális RNS kópiaszám miatt.) Mivel – hasonló okból kifolyólag – az 5' RACE PCR módszer sem volt sikeres a vizsgált mintáknál, a *BtCalV*/M63/HUN/2013 törzsből egy 3278 nukleotid hosszú, míg a *BtCalV*/BS58/HUN/2013 törzsből egy 3130 nukleotid hosszú, részleges szakaszt tudtunk nyerni. A szekvenált genomi régió magába foglalta az RdRp gén egy részét (M63, 879 nt; BS58, 841 nt) és a teljes burok fehérje kódoló régióját (1545 nt and 1436 nt) továbbá a VP2 fehérje teljes kódoló szakaszát (656 nt and 668 nt). A calicivírusok konzervált aminosav motívumait, a GLPSG-t, YGDD-t (Smiley és mtsai., 2002) és DYXXWDST még így is sikerült azonosítanunk az RdRp szakaszban. Ez utóbbinál a hazai mintákban leírt aminosav sorrend a DFSKWDST volt (Wolf és mtsai., 2011).

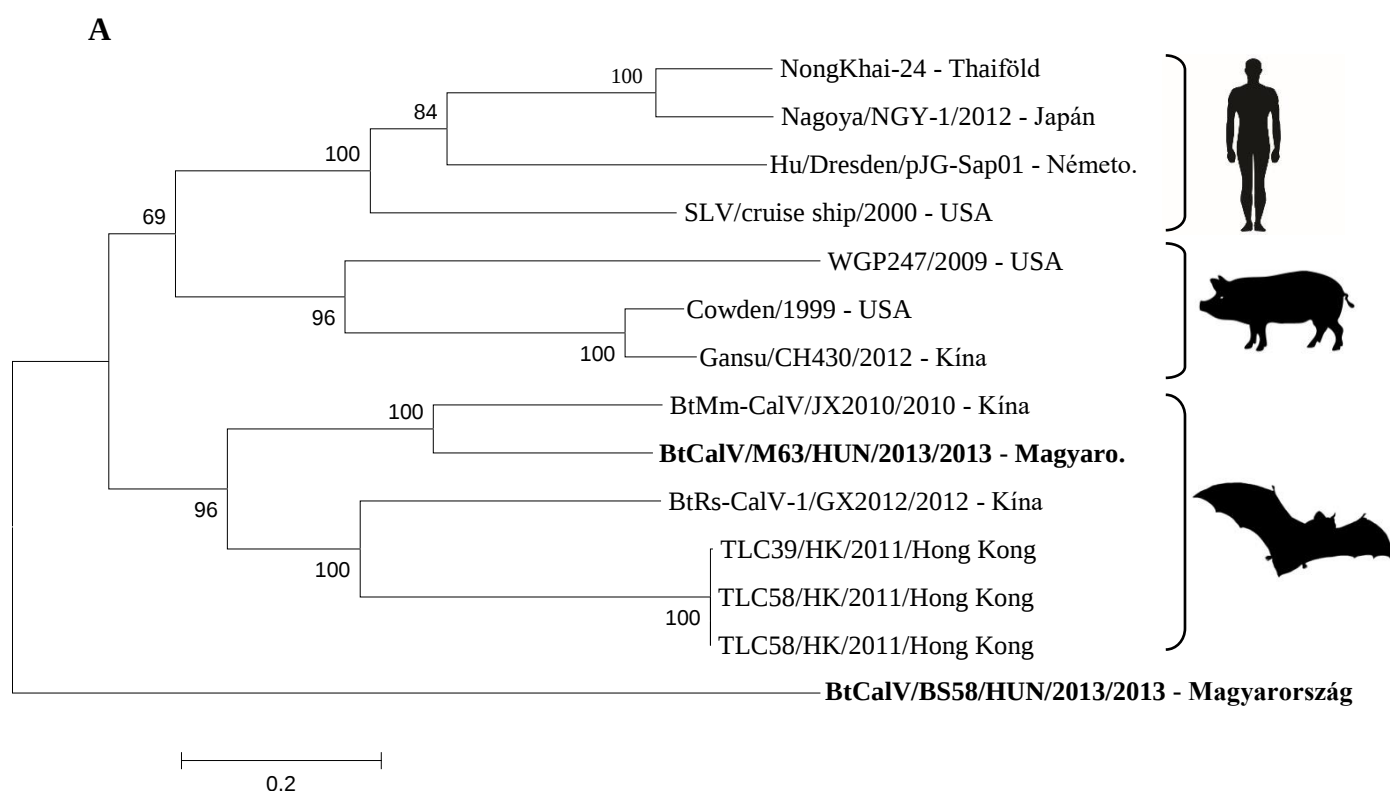
Következő oldal

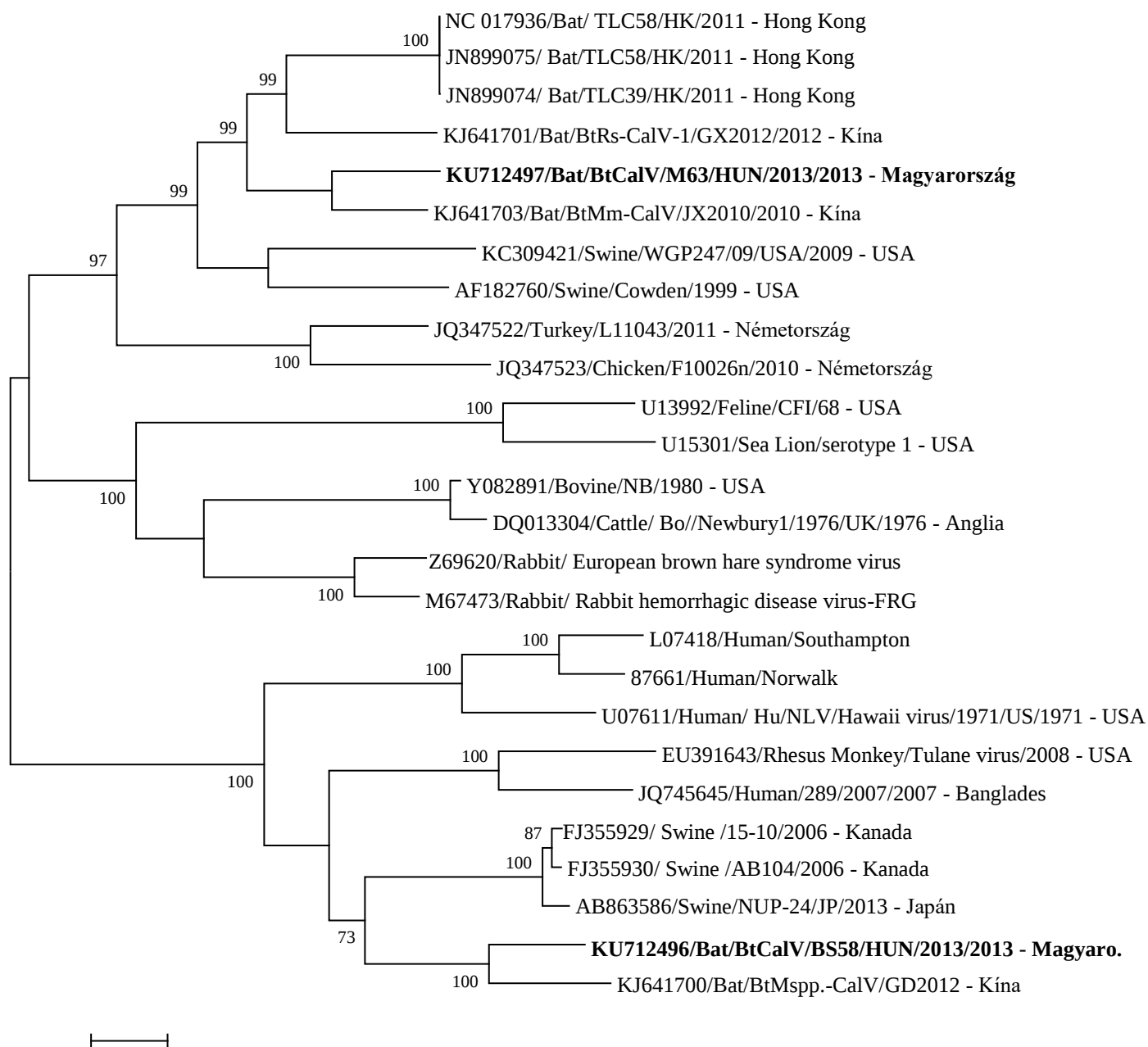
22. ábra: Az újonnan kimutatott *BtCalV* törzsek filogenetiaki analízise, az RdRp régió 320 bázispár hosszúságú szakasza alapján. Az új, hazai törzsek feketével kiemelve.



A *Myotis* és *Eptesicus* denevérekben leírt a rokon calicivírusok szintén azt bizonyítják, hogy egymástól jelentős földrajzi távolságban élő fajok is hordozhatnak genetikailag közelálló vírusokat. Ez az eredmény egy ősi evolúciós kapcsolat meglétét veti fel a denevérek és vírusaik között és feltételezhetően a denevérek Laurasiatheria-i eredetének a következménye (23/A. ábra).

A nagyobb genomi szakaszok filogenetikai analízise alapján (23/B. ábra), a BtCalV/M63/HUN/2013 törzs a Kínában azonosított, szintén denevérekből származó sapovírushoz (GenBank referencia szám: KJ641703) állt legközelebb. A hasonlóság mértéke a BtCalV/M63/HUN/2013 és a KJ641703 között 67%-os nukleotid egyezést és 67%-os aminosav egyezést mutatott az RdRp régióban, valamint 66%-os nukleotid egyezést és 61%-os aminosav egyezést a vírus kapszid génjének analízisekor. Úgy tűnik tehát, hogy a BtCalV/M63/HUN/2013 szinte biztosan a *Sapovirus* nemzetségbe tartozik, míg a BtCalV/BS58/HUN/2013 törzs a *Valovirus* nemzetségéhez tartozó BtCalV-al és sertés calicivírusokkal mutatott rokonságot. A legközelebbi filogenetikai kapcsolatot egy kínai BtCalV-sal mutatta, a BtMssp.-CalV/GD2012-vel. A hasonlóság mértéke az RdRp gén esetében nukleotid szinten 63%-os és aminosav szinten 60%-os volt, a kapszid gén esetében pedig 63%-os nukleotid szinten és 56%-os volt aminosav szinten a két törzs között. Habár a legközelebbi filogenetikai rokonságot a valovírusoknál mutatták, az új BtCalV-ok egyértelműen egy külön ágba tartoztak.



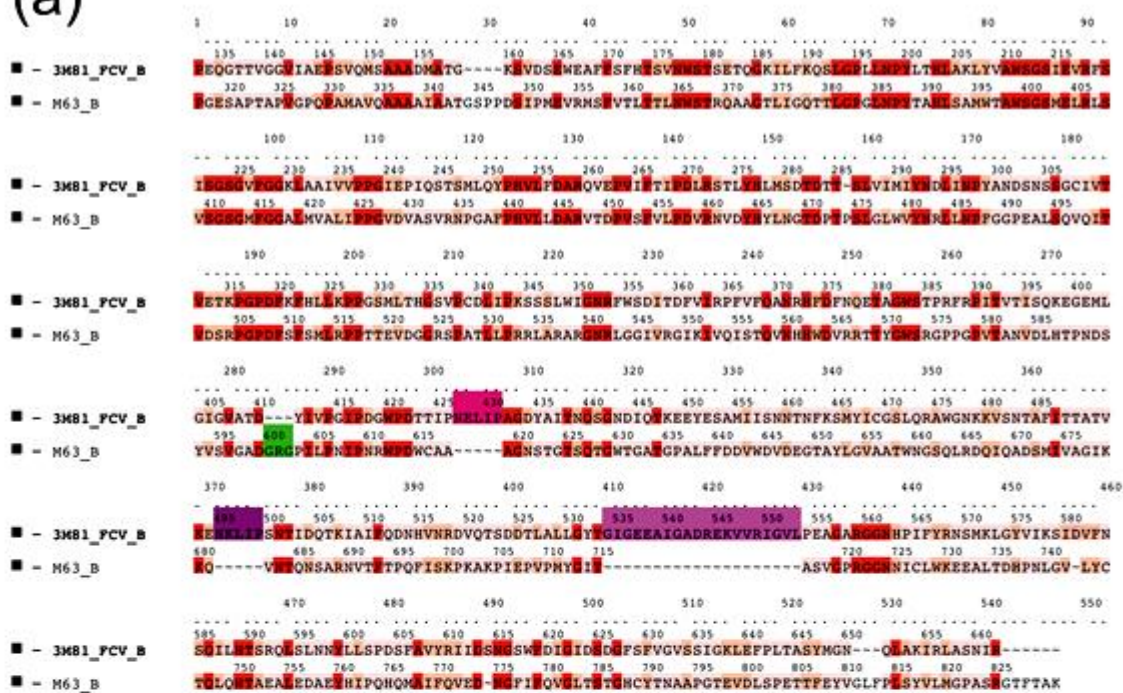
B

23. ábra: Filogenetikai kapcsolat az emberből, sertésből és denevérekből kimutatott sapovírusokkal (A). Filogenetikai fa a két új BtCalV szekvenciával és azok származási kapcsolatai más, ismert nemzetség calicivirusaival (B). A filogenetikai analízisek egy 3130 nukleotid hosszú szakasz alapján készültek, ami magába foglalta a vírusok kapszid génjének teljes szakaszát. Az új, hazai törzsek feketével kiemelve.

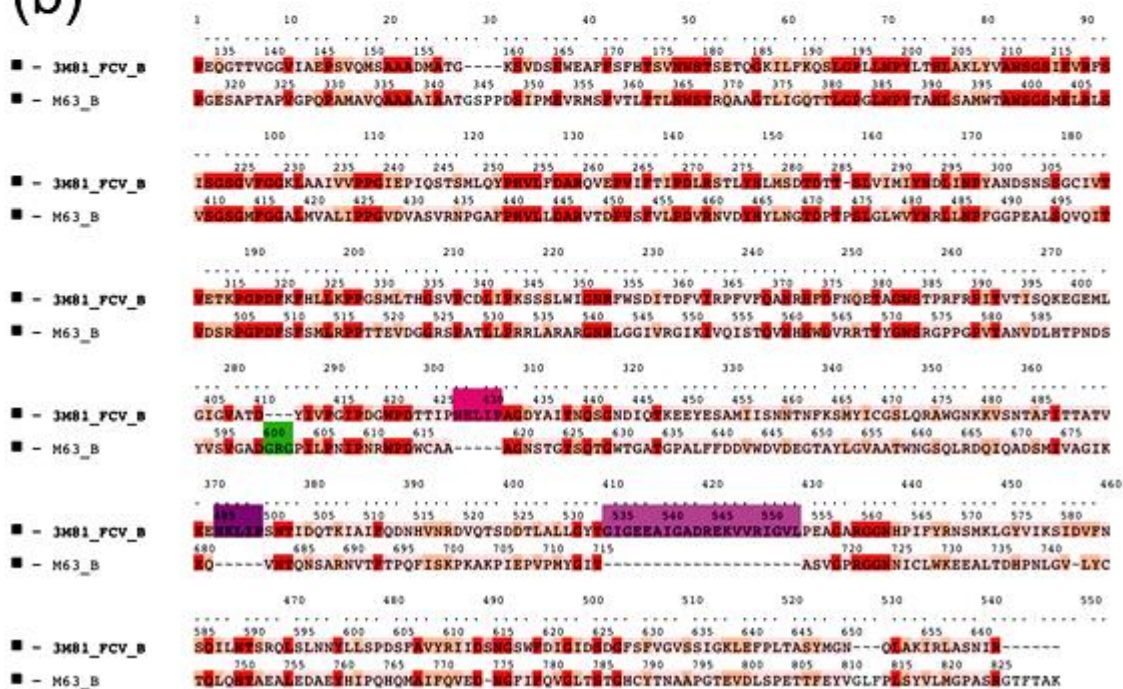
Részletes szerkezeti vizsgálatokat is végeztünk a calicivírusok kapszidjával (Dr. Gellért Ákossal folytatott közös vizsgálatban). Homológia modellezés által pontosabb jellemzést tudtunk adni a két fent említett új calicivírus felszíni struktúráiról. A BtCalV/M63/HUN/2013 törzs esetében a kapszid fehérje, valamint a referenciaként használt macska calicivírus (FCV) fehérje (PDB azonosító: 3M8L) között 27,3%-os aminosav egyezést és 42,3%-os aminosav hasonlóságot mutatott. Hasonlóan, 34,7%-os aminosav egyezést és 47,6%-os aminosav hasonlóságot láttunk a BtCalV/BS58/HUN/2013 BtCalV kapszidja és referenciaként választott Norwalk vírus kapszidjával (PDB azonosító: 1IHM) (24/A és B. ábra). Ezek az egyezési és hasonlósági értékek megbízható homológia modellezést és a két vírus virális kapszidjának és virionjának újjáépítését tették lehetővé. Az érett calicivírus kapszid fehérjénél három fő domént írtunk le: S, P1 és P2 (24/C és D. ábra). Az S (az angol *shell* szóból) domén nyolc-szálú β -hordó szerkezettel rendelkezik. Ez a domén alkotja a virion belső részét és a calicivírusok között ennek a fehérjének van a legkonzerváltabb szerkezete. A P1 és P2 domén építi fel a középső és külső régióját a virionnak. A hipervariábilis szerkezeti struktúrák (melyek a neutralizáló antitestek elsődleges célpontjai), a P2 doménben találhatók (Ossiboff és mtsai., 2010). Az alapszerkezet az ismert fő doménnel együtt konzerváltnak tűnt a két magyar törzs esetében is, habár a BtCalV/M63/HUN/2013 törzs P2 régióin belül három deléciót és egy inszerciót is találtunk. Hasonlóan ehhez, a BtCalV/BS58/HUN/2013 törzs esetében két inszerciót és két deléciót azonosítottunk a P2 doménben a referencia szekvenciával összehasonlítva. Inszerciók és/vagy deléciók a P2 doménben gyakoriak azon calicivírusok között amik egyazon nemzetségbe tartoznak (Pinto és mtsai., 2012; Medici és mtsai., 2015). Ezekből a kis szerkezeti és szekvenciabeli különbségekből adódó fehérjeszerkezeti eltérések feltételezhetően fontos szerepet játszanak a P2 domén kettős szerepének betöltésében. Egyfelől a vírus felszíni régiói valószínűleg antigénként szolgálnak a humorális immunrendszer számára, másfelől részt vehetnek a fehérje-fehérje kapcsolat létrehozásában a kapszid és a megfelelő receptor között ezzel elősegítve a fertőzést (Ossiboff és mtsai., 2010).

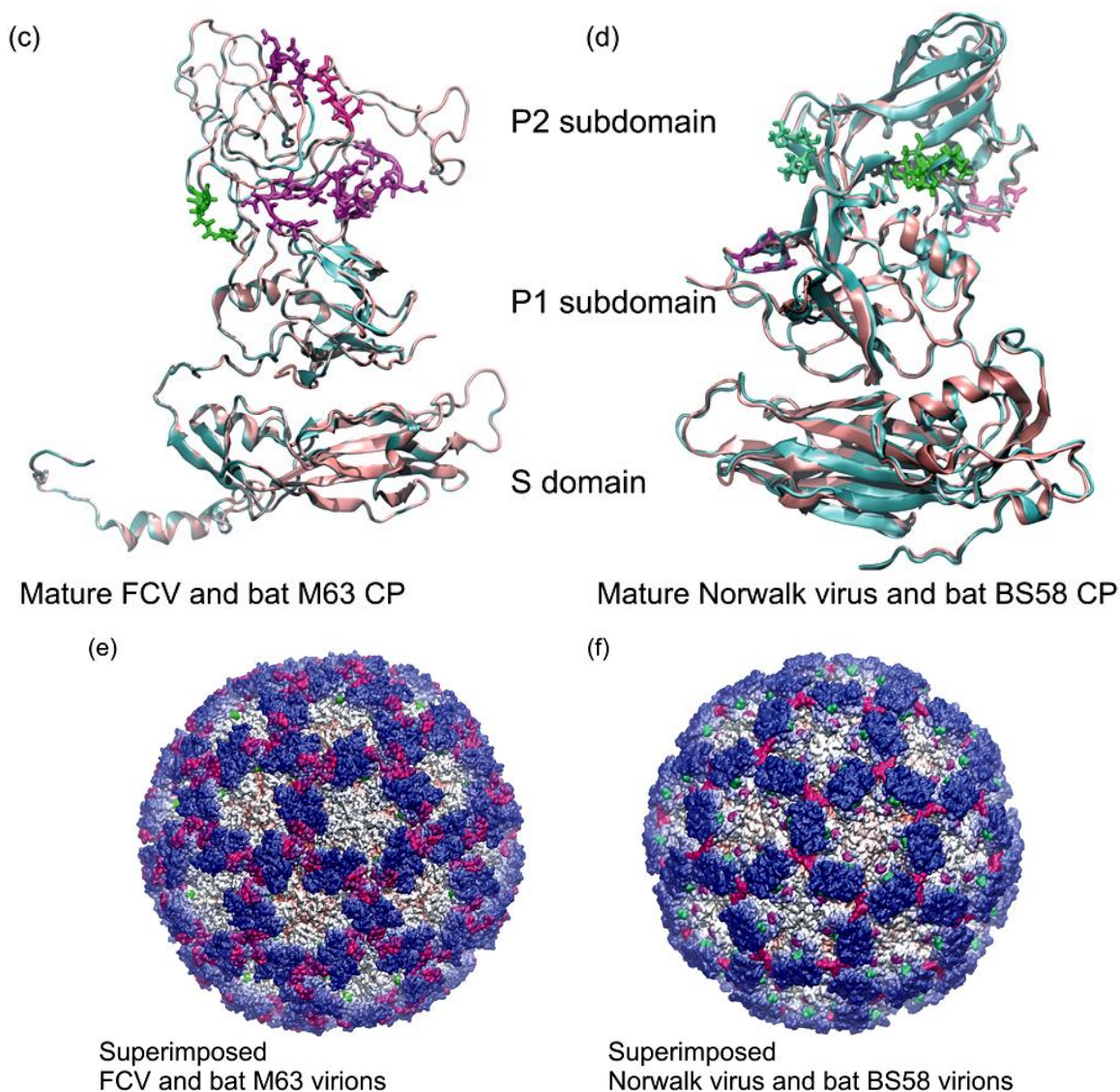
A genomszekvenálás, a filogenetikai vizsgálat és a homológia modellezés sokkal pontosabb jellemzését tették lehetővé az általunk leírt új BtCalV-nak. Bár az eddig azonosított BtCalV törzsek jelentős genetikai variabilitást mutatnak, az egyértelműen látszik, hogy a faj specificitás kimutatható a különböző gazdákból izolált vírusok között, amely egy hosszú távú evolúciós folyamatra vezethető vissza.

(a)



(b)





24. ábra: Szerkezeti összehasonlítása az érett calicivírus kapszid fehérjéinek (ORF2, VP1 szegmens) és virionjainak. Az újonnan leírt BtCalV és a referencia, FCV és Norwalk calicivírus VP1 fehérjék aminosav sorrendjeinek (a és b) és VP1 fehérje szerkezetének (c és d) összehasonlítása. A virion felszínén található molekulák megjelenítése a referencia és az újonnan leírt denevér vírusoknál (e) és (f). A sötétkék részek jelzik a legjobban kiemelkedő kapszid részeket.

4.3.3 Koronavírusok (BtCoV)

Az általunk elvégzett szisztematikus tanulmány során, hazánkban először sikerült denevérek hordozta koronavírussokat (BtCoV) kimutatnunk. Összesen három európai denevér nemzetség hét denevérfajában találtunk BtCoV-t, ezek a *M. daubentonii*, *M. myotis*, *M. nattereri*, *P. pygmaeus*, *R. euryale*, *R. ferrumequinum* és *R. hipposideros*, ami 1,79% (95% C.I.: 0.849, 3.348) prevalenciának felelt meg. A tanulmány egyik legérdekesebb eredménye, hogy SARS-szerű BtCoV-t (GenBank referencia szám: KJ652335) mutattunk ki az *R. euryale*

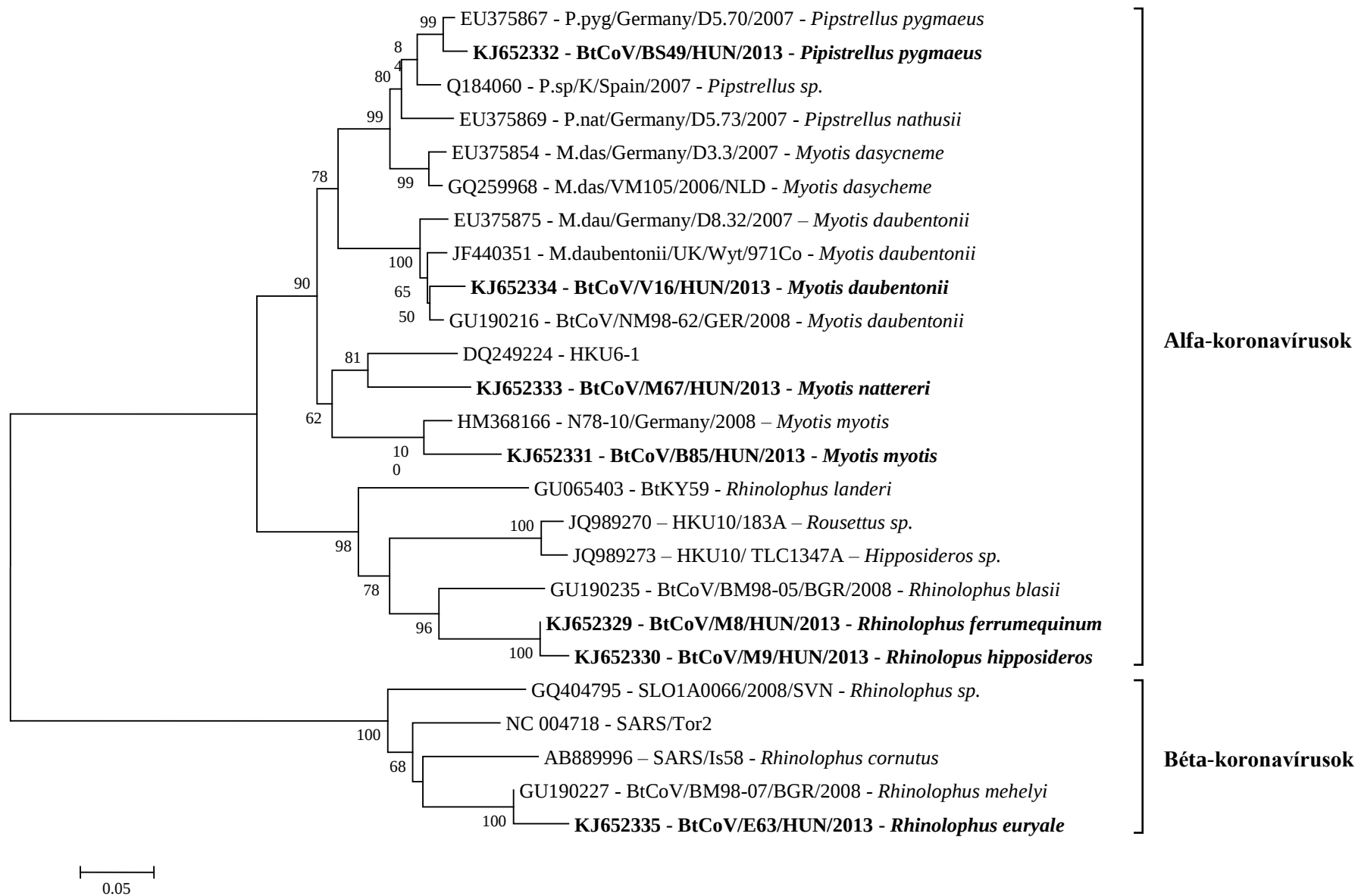
fajban, míg alfa (α)-BtCoV RNS-t detektáltunk az *R. ferrumequinum*, *R. hipposideros*, *M. daubentonii*, *M. myotis*, *M. nattereri*, és *P. pygmaeus* denevérfajokból (GenBank referencia számok: KJ652329–KJ652334). Az általunk használt három különböző primer pár a vizsgálatokban eltérő hatékonyságot mutatott. A Souza-Luna és munkatársai (2007) által közzétett primerek voltak a legmegfelelőbbek a vírus kimutatására, ami a polimeráz régióra specifikus terméket adott. Ez magyarázható a CoV magas genomi diverzitásával és a primerek eltérő specificitásával abban az esetben is, ha a primer cél szekvenciája magasan konzervált régiókra esett. Az RdRp gén-alapú filogenetikai analízis alapján (25. ábra) az új magyarországi BtCoV törzs azonos klaszterbe tartozott a korábban Németországban és Bulgáriában leírt BtCoV törzsekkel. A hazánkban kimutatott α -BtCoV törzsek 52-96% nukleotid azonosságot mutattak egyéb α -BtCoV-kal, míg a magyarországi béta (β)-BtCoV törzs 82-96% nukleotid azonosságot mutatott egyéb β -BtCoV törzsekkel.

Számos denevérfaj világszerte természetes rezervoár szervezete különböző CoV törzseknek, többek között a SARS és MERS-hez köthető koronavírusoknak is (Brandao és mtsai., 2008; Corman és mtsai., 2013; Ithete és mtsai., 2013). Az elmúlt évek során több CoV-t detektáltak különböző európai denevérfajokban az Egyesült Királyságban, Németországban, Hollandiában, Bulgáriában, Szlovéniában, Magyarországon és Franciaországban. Az általunk végzett BtCoV felmérés összesített kimutatási rátája alacsonyabb volt, mint a többi európai országban végzett tanulmányoké (Annan és mtsai., 2013; Goffard és mtsai., 2015). Ez főleg abból adódik, hogy az eddigi tanulmányok nagy számban mutatták ki a vírust *Myotis dasycneme*-ből, míg hazánkban ezt nem tudtuk megerősíteni. Meg kell azonban jegyezni, hogy összesen csak 11 egyedet teszteltünk ebből a fajból, így további vizsgálatok szükségesek az ellentmondás feltárása.

A növekvő urbanizáció hatására gyakrabban alakulnak ki interakciók denevérek és emberek között. Mivel a denevérek által terjesztett divergens CoV törzsek lehetnek patogének emberre illetve háziállatokra egyaránt (pl.: SARS, MERS koronavírusok), szisztematikus monitoring vizsgálatok és további általánosan alkalmazható diagnosztikai eljárások kidolgozása szükséges, hogy a zoonotikus potenciállal bíró vírusokat detektálni tudjuk még egy esetleges járvány kitörése előtt (Memish és mtsai. 2013).

Következő oldal

25. ábra: A hazánkban kimutatott, denevérek által hordozott alfa- és béta-koronavírusok filogenetikai analízise. Az analízis az RdRp gén, 440 nukleotid hosszúságú szakaszának elemzésével készült el. A hazai BtCoV törzsek vastagon kiemelve.

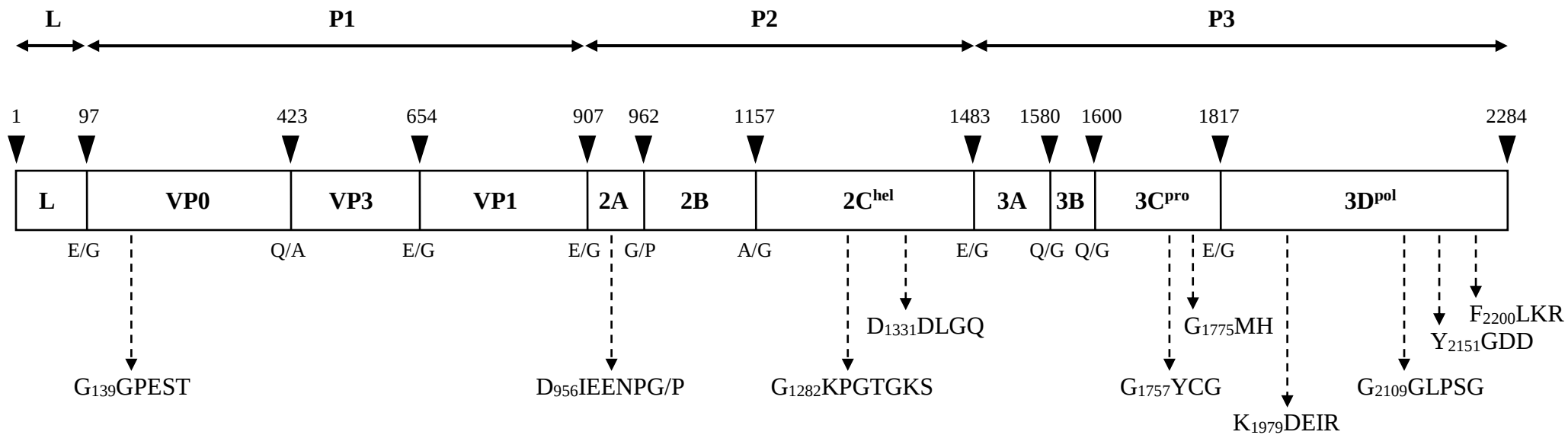


4.3.4 Pikornavírusok (*BtPV*)

Vizsgálataink során, két mintából sikerült kimutatnunk denevér pikornavírus (*BtPV*) szekvencia adatokat az elvégzett virális metagenomikai elemzés eredményeképpen. Összesen 416 és 465 bázispárnyi virális genomadatot nyertünk, amelyek segítségével specifikus RT-PCR rendszert terveztünk. Az így optimalizált molekuláris biológiai kimutatási rendszerrel további 4 minta pozitivitását igazoltuk. A virális metagenomika által nyert szekvencia adatok alapján elvégeztük az 5' és 3' RACE PCR kísérleteket a genomi végek szekvencia adatainak megismerésére. Kísérleteink eredményeként a virális genomot majdnem teljes hosszában meghatároztuk (7947 bázispár) mind a 6 pozitív minta esetében (GenBank referencia számok: KP054273-KP054278). A megismert szekvencia adatok a teljes kódoló régiót magukba foglalták, a teljes 3' UTR-t, és az 5' genom-vég UTR egy részével együtt. A kódoló régió 2284 aminosav hosszúságú poliproteint kódolt.

A vírus, a rokon pikornavírusokhoz hasonló genomorganizációs elrendezést mutatott; 5' UTR[L-P1(VP0, VP3, VP1)-P2(2A, 2B, 2C^{hel})-P3(3A, 3B^{VPg}, 3C^{pro}, 3D^{pol})]3' UTR-poly(A). Az egyes régiók aminosav hossza a következőképp alakult: L – 97, P1 – 810, P2 – 576, P3 – 801. Az L fehérjéről azonban hiányzik a „papain-szerű thiol-proteáz katalitikus diádjá” (Cys és His) (Gorbalenya és mtsai., 1991), illetve a CHCC cink-kötő motívum is (Chen és mtsai., 1995). A VP0/VP3 és VP3/VP1 hasítási helyektől eltekintve, ugyanazt a hasítási mintázatot figyeltük meg, mint a legközelebbi rokon Mischivírus referencia vírustörzsnél (Wu és mtsai., 2012). A fehérje motívum adatbázis (CDD) használatával számos pikornavírus-specifikus motívumot azonosítottunk (26. ábra), ezek: Rhv-szerű kapszid domén (cd00205), 2C RNA helikáz (pfam00910), 3C cysteine proteáz (pfam00548) és 3D RdRp (cd01699).

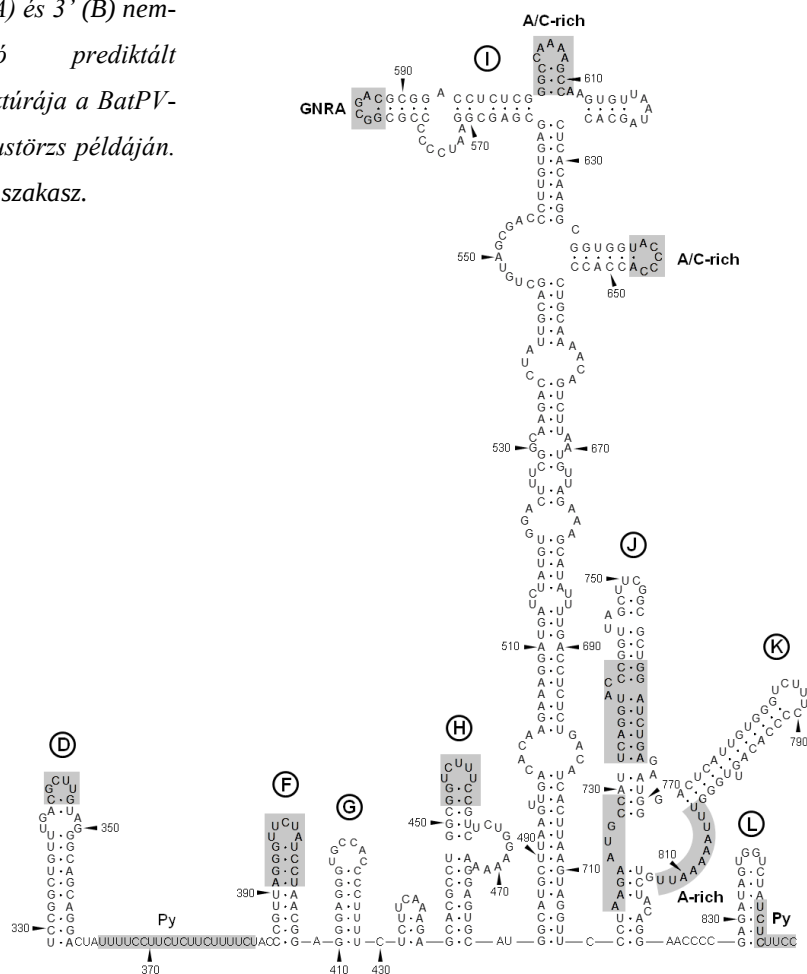
A genom 5' UTR-ját tekintve, a szekvencia hasonlóság és a másodlagos szerkezeti analízisek alapján II-es típusú IRES-t (belső riboszóma belépési hely) kódolt a genom (27. ábra), hasonlóan a száj- és körömfájás vírusához (FMDV), az encefalomiokarditisz vírusához (EMCV) és a cosavírusokhoz (CosV). Szemben a hazánkban leírt vírussal, az ezidáig leírt *BtPV*-ok a IV-es típusú IRES-t kódolják (Lau és mtsai., 2011). A II-es típusú IRES-ekre jellemző fő konzerált részek közül a H, I, J, K és L régiókat azonosítottuk az 5' UTR-ban. Számos egyéb II-es típusú IRES-re jellemző elemet is feltártunk, például a GNRA tetranukleotid és a két A/C gazdag hurok régiót az I domén apikális végén, továbbá „adenin” gazdag régiókat a J és K domének tövéénél. Az F doménben leírt 13 nukleotidos AGGGUUCUAUCCU szekvencia azonos a CosV-ban található homológ szekvenciával, továbbá a H domén 9 nukleotidos GGUCUUUCC szekvenciája azonos az EMCV hasonló funkciójú és pozíciójú szekvenciájával.



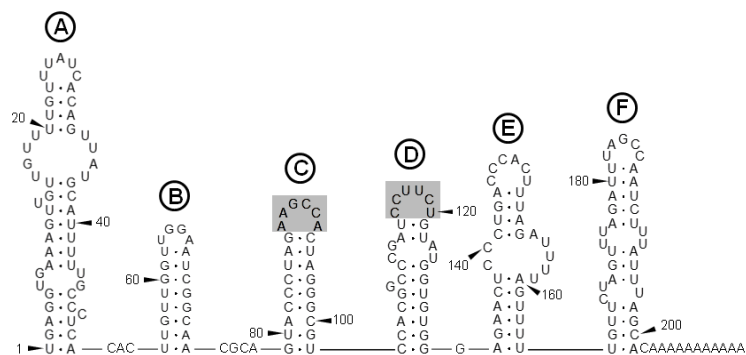
26. ábra: Az újonnan leírt BtPV genomorganizációs ábrája. A konzervált aminosav-motívumok, a poliprotein által kódolt gének nevei és azok határa is jelölésre kerültek.

27. ábra: Az 5' (A) és 3' (B) nem-kódoló régió prediktált másodlagos struktúrája a BatPV-V13/13/HUN vírustörzs példáján. Py, polipirimidin szakasz.

A



B



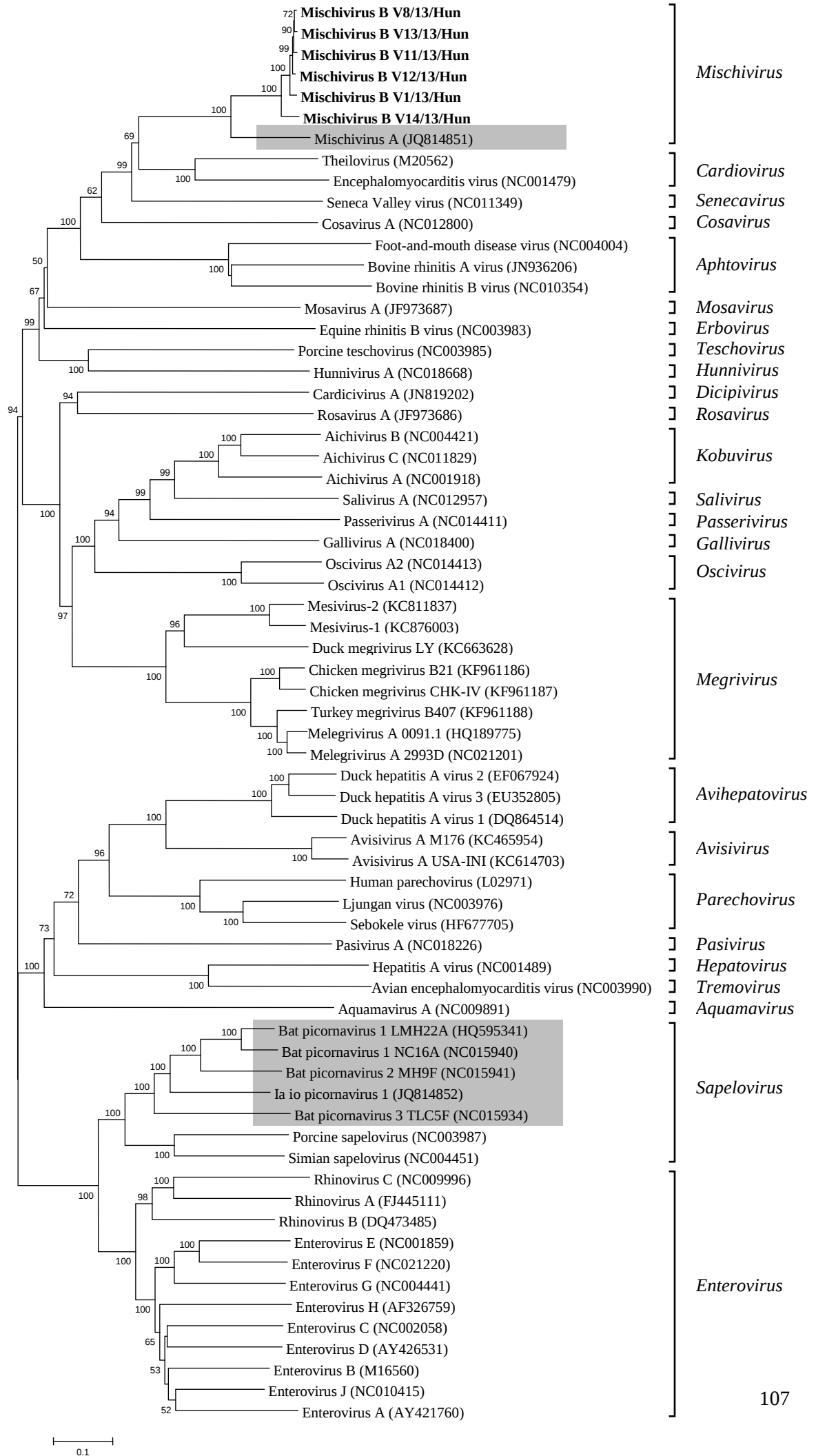
A D és J domén esetében is magas arányú szekvencia homológiát találtunk a CosV-sal, FMDV-sal és az EMCV-sal. Az L huroktól 3' irányba egy 8 nukleotid hosszú oligopirimidin szakasz található (Kapoor és mtsai., 2008; Duke és mtsai., 1992). A 329-es és 440-es pozíció közötti régió szekvenciális és strukturális hasonlóságokat mutat a CosV-ban található szakasszal, magában foglalva a prediktált D, F és G hurkokat és egy 20 nukleotid hosszúságú pirimidin traktust (364-383 pozíciók között).

A 3' UTR elemzése során 76%-os nukleotid szintű azonosságot tártunk fel a Mischivírus A-val (Wu és mtsai., 2012). A teljes 3' UTR hossza 211 nukleotid (a STOP kodonnal együtt). Érdekes módon a Theiler's egér encephalomyelitis vírussal (TMEV) ennél magasabb, 88%-os nukleotid szintű azonosságot mutat a 71 és 110 nukleotid közötti vizsgált régió (Buckwalter és mtsai., 2011; Law és Brown, 1990; Liang és mtsai., 2008; Myoung és mtsai., 2007; Pevear és mtsai., 1987; Sorgeloos és mtsai., 2013). A 3' UTR másodlagos struktúrájának predikciója hat domén jelenlétét tárta fel (A-F). A C domén egy AAGCCA₈₈₋₉₃ motívumot tartalmaz, amely az EMCV I-es doménjében is megtalálható. A D egység a szintén az EMCV leírt UCUUCU motívum (Duque és Palmenberg, 2001) egyik variánsát (CCUUCU₁₁₅₋₁₂₀) tartalmazza. A pikornavírusok 3' UTR változatos méretű és számú másodlagos hurok struktúrát tartalmaz, amelyeket a virális és celluláris fehérjék kötőhelyként feltételeznek (Rohll és mtsai., 1995).

A teljes kódoló régióra elvégzett filogenetikai rekonstrukció (28. ábra) az általunk leírt vírustörzsek közeli rokonságát tárták fel a *Mischivirus* genus már ismert tagjával a Mischivírus A-val, amelyet 2012-ben írtak le Kínában, szintén *Miniopterus* denevérfajból (Wu és mtsai., 2012). A teljes P1 régió (2429 nukleotid, 810 aminosav), P2 régió (1727 nukleotid, 576 aminosav) és P3 régió (2402 nukleotid, 801 aminosav), 73%, 73-74% és 67% aminosav szintű azonosságot mutat a Mischivírus A-val. Ugyanezen régiókkal összehasonlítva a hazai BtPV 32-37%, 35-39% és 29-32% aminosav szintű azonosságot mutat más denevérekből származó pikornavírusokkal a *Sapelovirus* genusból. A Mischivírus A esetén leírt fő aminosav motívumok az általunk vizsgált vírustörzsek esetében is kimutathatóak voltak. A referencia Mischivírus A törzzsel összevetve az általunk vizsgált vírusok minimális különbséget mutattak: L fehérjéje 6 aminosavval rövidebb, a P2 régió 1 aminosavval hosszabb és a P3 régió 3 aminosavval rövidebb. Filogenetikai rekonstrukciónk és genomikai sajátosságai alapján az általunk közölt vírustörzsek a *Mischivirus* genus egy új tagját jelentik, amely ennek megfelelően a *Mischiviurs* B nevet kapta és egy új fajként jelent meg az ICTV taxonómiai besorolása szerint.

Következő oldal

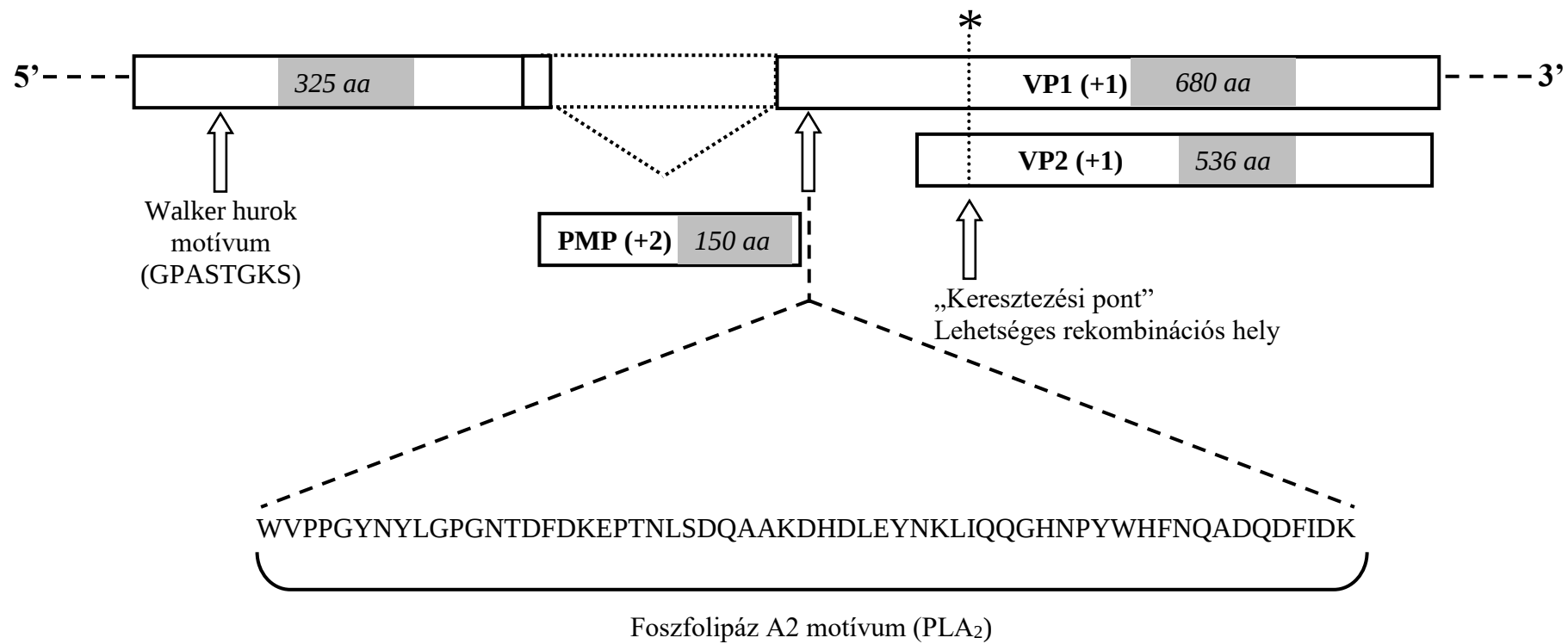
28. ábra: Az általunk leírt BtPV filogenetikai rekonstrukciós ábrája. Az analízis alapjául a kódoló régió 6852 bázispár méretű szakasza szolgált. A denevér-eredetű pikornavírusok szürke háttérrel kerültek kiemelésre. A hazai BtPV törzsek vastagon kiemelve.



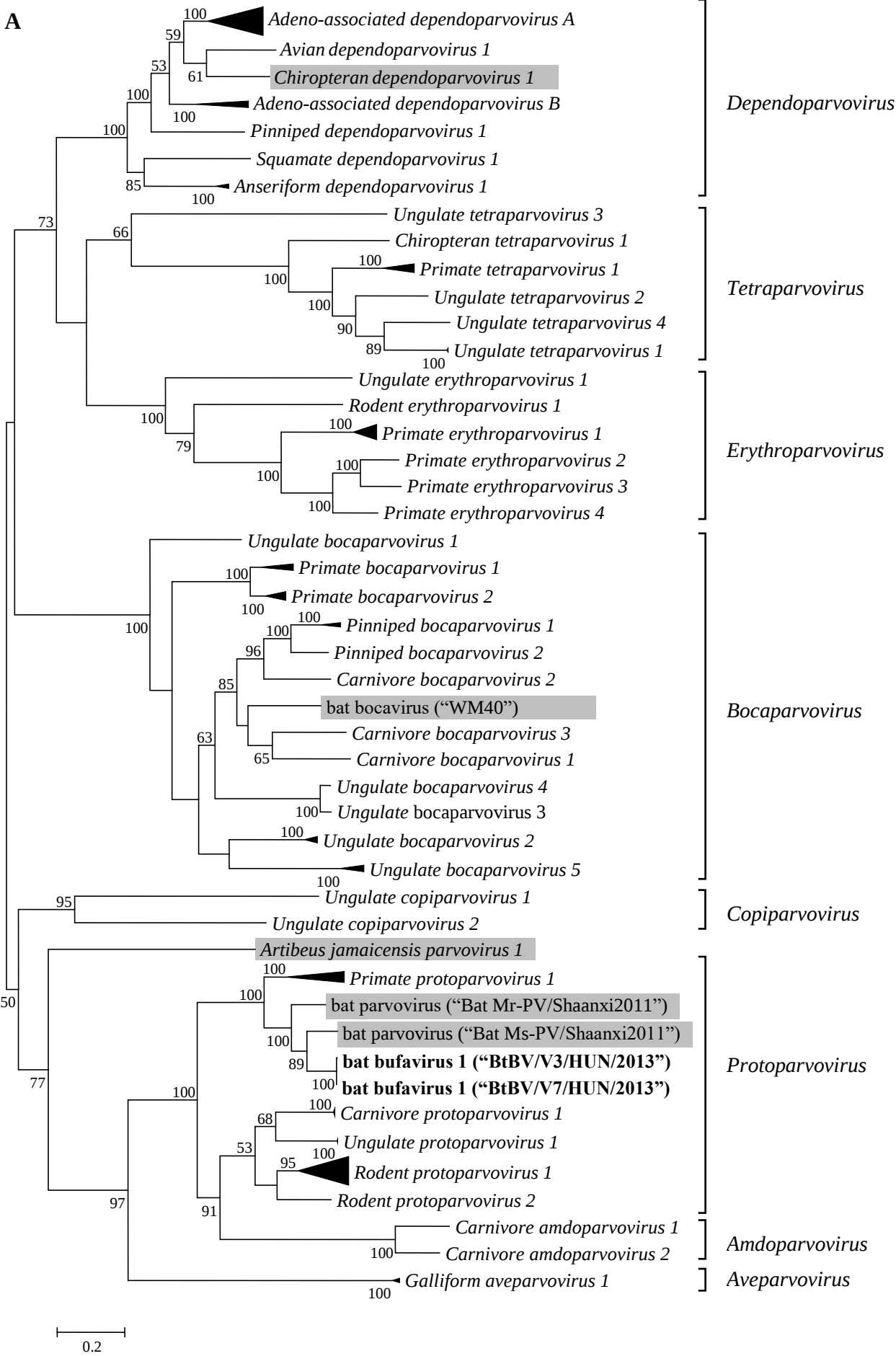
4.3.5 Parvovírusok – denevér bufavírus (BtBV)

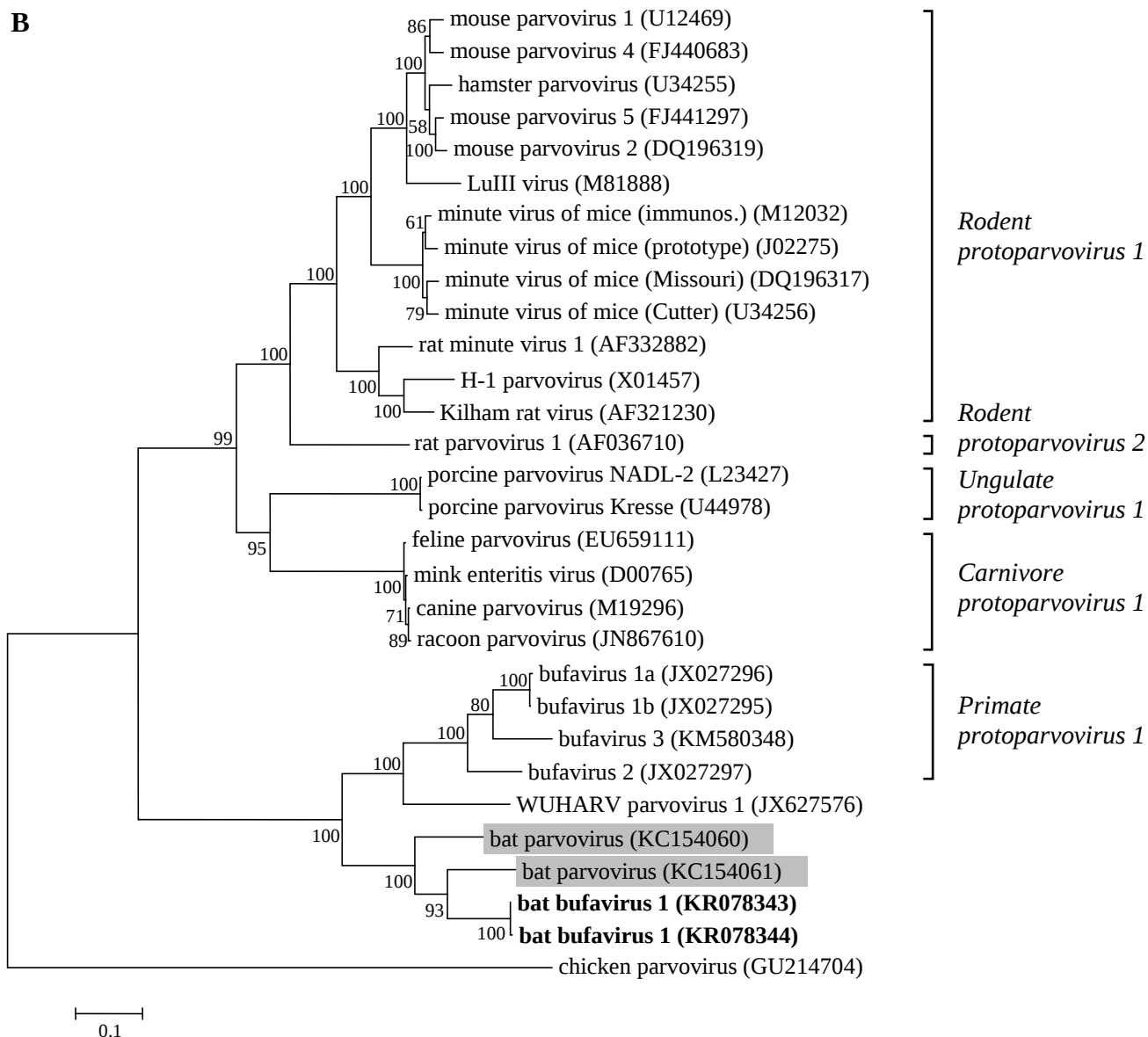
Parvovírussal rokon szekvencia adatokat szintén a hazánkban gyűjtött *M. schreibersii* mintáink metagenomikai elemzése során sikerült nyernünk. A metagenomikai adatok alapján két génspecifikus primer párt terveznünk, amiknek segítségével egyfelől további szűréseket végeztünk, másfelől a virális genom nagyobb régióját tudtuk felsokszorozni. 13 mintából 5 minta pozitívnak bizonyult, 2 minta esetében a nagyobb szegmens megsokszorozása is sikerrel járt (BtBV/V3/HUN/2013 és BtBV/V7/HUN/2013). Ezen régió szekvenálása révén 3438 nukleotid hosszú genomi részt tudunk analizálni, ami magába foglalta a 975 nukleotid hosszú NS1 szakaszt és a 2013 nukleotid hosszú VP1/VP2 géneket. Az NS1 és VP1/VP2 rész mellett egy másik kódoló szakaszt is azonosítottunk a kinyert szekvenciában, ami egy 450 nukleotid hosszú, úgynevezett feltételezett középső fehérje (PMP). Azonosítottuk a foszfolipáz A2 motívumot is a VP1 szakaszban, ami a parvovírusokra nagyon jellemző, míg más víruscsaládokba tartozó vírusoknál nem található meg. Az NS1 szakaszon található Walker hurok mintázata (GXXXXGK T/S) az általunk vizsgált szekvenciánál az alábbi aminosavsorrenddel jelent meg: GPASTGKS (29. ábra), ugyanezt már leírták az embert fertőző bufavírusoknál is (Phan és mtsai., 2012; Yahiro és mtsai., 2014). A nukleotid szekvenciák a referenciaként használt kínai denevér parvovírus szekvenciával 77% és 81% azonosságot mutattak. Másrésről, a *Parvovirinae* családba tartozó más vírusokhoz képest a nukleotid szekvenciájuk 45-47%-ban, míg aminosav szekvenciájuk 35-42%-ban mutatkozott azonosnak.

Filogenetikai vizsgálatok alapján (30. ábra A és B), az új BtBV (GenBank referencia számok: KR078343 - “BtBV/V3/HUN/2013” és KR078344 - “BtBV/V7/HUN/2013”) közeli rokonságot mutattak az embert fertőző bufavírusokkal, melyek a *Protoparvovirus* családba tartozó *Primate protoparvovirus 1* törzsek. A magyar denevér bufavírus (BtBV) szekvenciák nagy hasonlóságot mutattak azokhoz a vírusokhoz, melyeket Kínában írtak le (nem publikált adat, GenBank referencia számok: KC154061 és KC154060). Habár a magyar vírusok nagyon közel álltak a bufavírusokhoz, mégis egy külön, monofiletikus ágat alkottak. A filogenetika rávilágított arra, hogy a denevérekhez köthető bufavírusoknak közös, ismeretlen őse lehet az eddig ismert, embert fertőző bufavírusokkal. Egy nemrégiben megjelent tanulmányban egy új parvovírust azonosítottak (WUHARV), melyet nem humán főemlősből izoláltak, és közeli rokonságot mutatott a bufavírus 2 genotípussal (Handley és mtsai., 2012).



29. ábra: A magyar denevér protoparvovírusok genetikai részletei jelölve a konzervált aminosav- szekvenciákkal és a lehetséges rekombinációs ponttal.

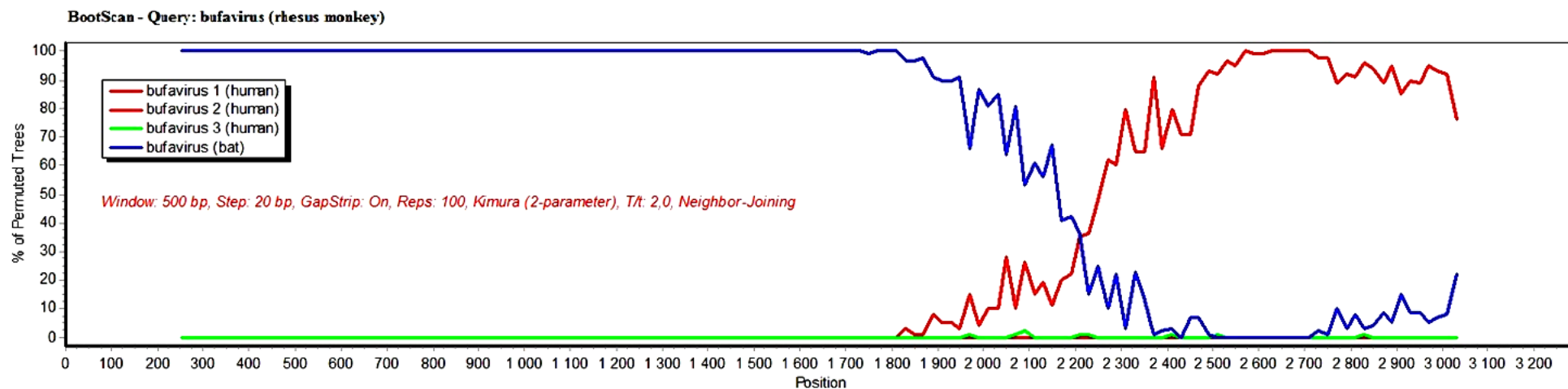




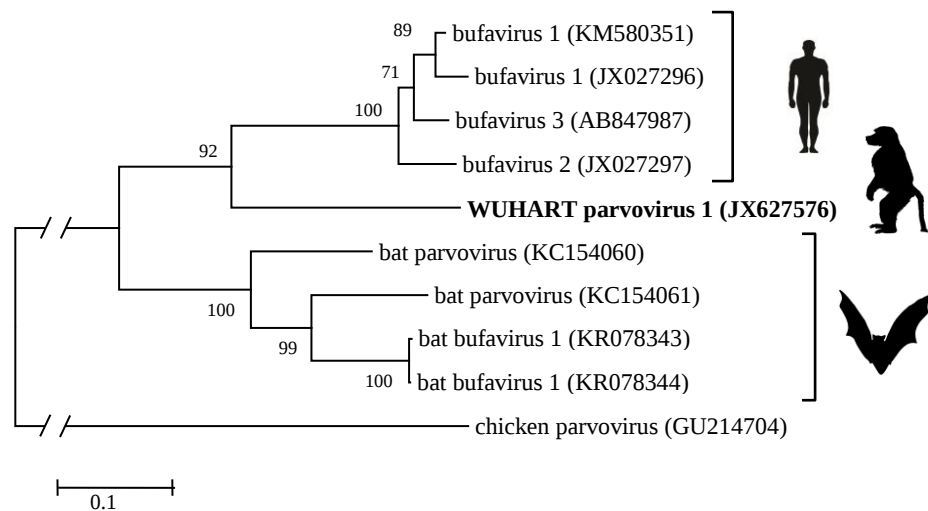
30. ábra: A parvovírusok (A) és protoparvovírusok (B) filogenetikai analízise, a 3396 bázispár hosszú kódoló szakasz alapján. A denevér-eredetű parvovírusok szürke háttérrel kerültek kiemelésre. A hazai BtBV törzsek vastagon kiemelve.

A hazai BtBV szekvenciákkal végzett rekombináció analízis eredményeként (31. ábra), egy potenciális rekombinációs eseményt tártunk fel a WUHARV parvovírus és a denevérekhez köthető bufavírusok között. Denevérekhez köthető parvovírusok esetében hasonló rekombinációs eseményeket írtak le indonéziai megadenevérekből is. A legközelebbi őse a megadenevér bufavirus 1-nek rekombinációs események során jöhetett létre, amely szintén jól mutatják a rekombináció fontosságát a vírusok evolúciójában (Sasaki és mtsai., 2016).

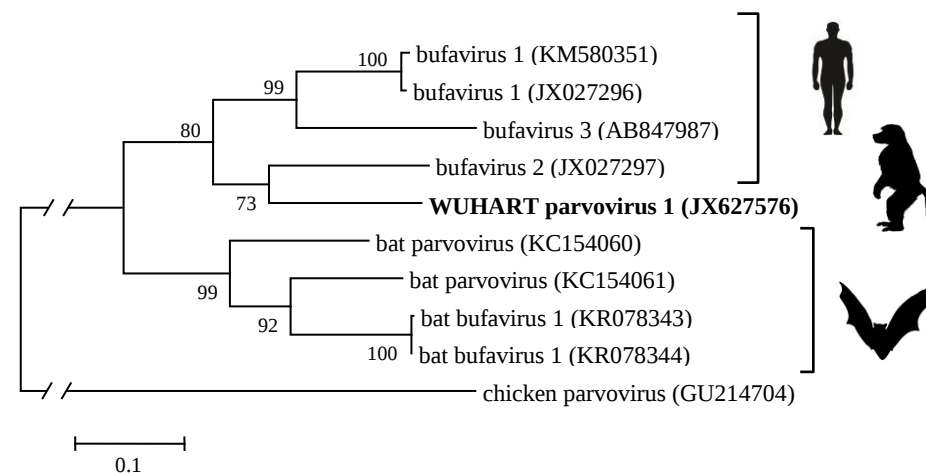
A



B



C



31. ábra: Bufavírusok rekombinációs vizsgálata. A Simplot (A) vizsgálat jelentős rekombinációs eseményt mutatott ki a létező denevér (kék vonal) és emberi (piros vonal) bufavírus törzsek között. A filogenetikai vizsgálatok eredményei a potenciális rekombinációs előtti előtt (B) és utáni (C) szakaszon.

4.3.6 Filovírusok

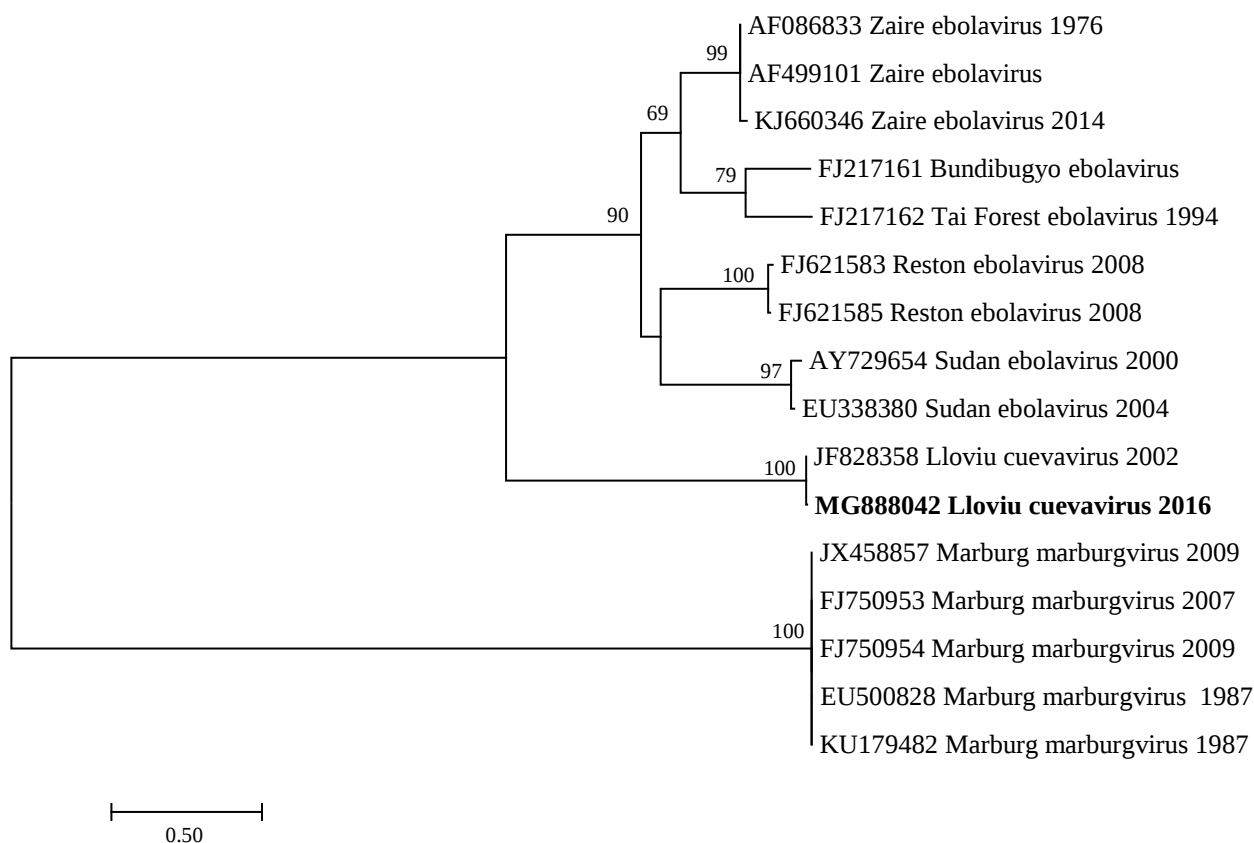
A *M. schreibersii* feltételezhetően Lloviu (LLOV) filovírus fertőzéseként bekövetkező pusztulására hivatkozva (Negredo és mtsai., 2011) Magyarországon is elindítottunk egy megfigyelést a hazai denevérfutató kollégákkal, hogy gyakran ellenőrizzék az ismert kolóniáit ennek a denevérfajnak, felkutatva ezzel az esetleges elhullásokat. 2013-ban tömeges elhalás történt egy *M. schreibersii* kolóniában, mely során körülbelül 500 egyed pusztult el Északkelet-Magyarországon (Bükk-hegység). Miután megvizsgáltuk a helyszínt, csak tetem maradványokat találtunk, melyek azonban virológiai vizsgálatokra alkalmatlanok voltak. Más ismert denevér kolóniákat is ellenőriztünk a területen, de azokat nem érintette a fertőzés abban az évben. Három évvel később, 2016-ban 5 *M. schreibersii* denevért jelentettek kóros (hemorrhágiás) elváltozásokkal (32. ábra) szintén Északkelet-Magyarországról, körülbelül 50 kilométerrel a 2013-as esettől. Érdekességgéppen: mind az 5 egyed a barlang bejáratához közel volt, míg a nagyméretű, egészséges egyedek csoportja a barlang mélyén hibernálódott, távol az említett beteg egyedektől. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a fertőzött denevérek külön érkeztek a barlanghoz.



32. ábra: Hemorrhágiás tünetek figyelhetők meg az összes állatnál (piros nyíl). LLOV RNS-t mutattunk ki a legjobb állapotban megmaradt állat (balról az első) tüdejéből és lépéből. (Dr. Boldogh Sándor felvétele).

Mind az 5 állatot sikerült begyűjteni és a pécsi laboratóriumba szállítani. Mivel egy ezidáig ismeretlen patomechanizmusú és zoonótikus tulajdonsággal rendelkező filovíusról

volt szó, a kísérleteket minden esetben BSL-4 szinten végeztük. Filovírus RNS-t sikeresen mutattunk ki egy elhullott egyedből. Megvizsgálva a szervek érintettségét, csak a lép és a tüdő esetében kaptunk pozitív reakciót (máj, vese és agy negatívnak bizonyult). Nem meglepően, a sikeres RT-PCR reakciót abból a mintából tudtunk készíteni, melyet a látszólag legjobb állapotú tetemből nyertünk. Úgy véljük, a tetemek rossz állapota és/vagy a virális nukleinsav lebomlása magyarázhatja azt, hogy a másik négy mintából nem sikerült kimutatni a virális genomot. A szekvenálást követő BLAST keresés egyértelműen igazolta, hogy a hazánkban kimutatott vírus nukleotid szekvenciája (GenBank referencia szám: MF996369) legjobban az MS-Liver-86/2003 (GenBank referencia szám: JF828358) LLOV törzshöz hasonlít (98%). A további filogenetikai vizsgálatok is megerősítették az előbbi eredményt, miszerint a hazai filovírus egy újabb LLOV törzs (LLOV/Mad/2016/Hungary) a *Cuevavirus* nemzetségen belül (33. ábra).



33. ábra: A 346 nukleotid hosszú, részleges RdRp gén szekvenciáján alapuló filogenetikai vizsgálat eredménye. A hazai LLOV törzs vastagon kiemelve.

A pozitív mintával részben izolációs kísérleteket, részben pedig részletesebb molekuláris elemzéseket is terveztünk. Mivel a vírust csak két esetben sikerült kimutatni (Spanyolország és Magyarország), izolálási kísérletek ezidáig nem történtek. A vírus izolálásához több, laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott sejtvonalat (Vero, VeroE6, A549, HEK293) valamint egy, az előzőektől ritkábban alkalmazott denevér sejtvonalat (Tb1-Lu) használtunk. Izolálási kísérleteink mindegyike negatív eredményt adott. Mivel jelen esetben igen kis mennyiségű (de a tudomány szempontjából annál értékesebb) mintával bírunk, a molekuláris biológiai elemzés lehetősége is korlátozott. Ezidáig a genom két szakaszát sikerült felsokszorozni (RdRp és nukleoprotein egy szakasza), de a vírus teljes nukleinsav sorrendjének meghatározása is folyamatban van.

Több mint egy évtized után a spanyolországi (Cueva del Lloviu) tömeges hosszúszárnyú denevér (*M. schreibersii*) pusztulást követően, a LLOV újra felbukkant Európában, amikor jelentős elhalálozást okozott Magyarországon ugyanannál a denevérfajnál. Ez az eset felveti a kérdést, hogy vajon ez egy második fertőződési esemény Európában, vagy a vírus folyamatosan kering az európai denevérek között. Annak érdekében, hogy felfedjük a valódi forrását a LLOV-nak, további felmérések szükségesek, beleértve a denevérekhez kapcsolódó niche-k vizsgálatát is. Hasonló, nagy ökológiai kárt okozó eset történt Észak-Amerikában a fehér orr szindróma felbukkanása során (Frick és mtsai., 2010).

Az általunk leírt eset az első filovírus szekvencia, melyet Magyarország területéről jelentettek és ez a LLOV jelentős földrajzi elterjedtségét is sejteti. Figyelembe véve a magyarországi és spanyolországi hosszúszárnyú denevérek pusztulását, a vírus állatvédelmi szempontból is jelentős kockázatot jelenthet. Mivel számos fontos kísérlet hiányában a vírus tényleges zoonótikus potenciálja sem ismert, a jövőben ennek tisztázására további célzott kísérleteket tervezünk.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Hantavírusok

❖ *Hantavírusok komplex hazai vizsgálata*

- Az előzetes irodalmi adatok alapján megterveztünk, optimalizáltunk és sikeresen alkalmaztunk egy *E. coli* alapú fehérje expressziós rendszert.
- A rendszer segítségével további immunológiai, szerológiai vizsgálatokra alkalmas, hat hisztidint tartalmazó DOBV és PUUV rekombináns teljes és csonka nukleokapszid fehérjét állítottunk elő. A 6xHis segítségével a fehérjéket Ni^{2+} -kelát oszlopon tisztítottuk.
- A tiszta rekombináns fehérjékkel ELISA és WB vizsgálatokat optimalizáltunk, illetve megállapítottuk az alkalmazott tesztek specifitási és szenzitivitási értékeit.
- Molekuláris biológiai és filogenetikai módszerekkel igazoltuk az AAG és AFL által terjesztett DOBV jelenlétét hazánkban.
- Az elvégzett filogenetikai analízisekkel, valamint a virális nukleinsav összehasonlító vizsgálatokkal alátámasztottuk az előzetes taxonómiai felvetést a DOBV fajon belüli genotípusok megkülönböztetésére.
- Megállapítottuk a hazánkban és a környező országokban kimutatható vírusok szoros filogeográfiai kapcsolatait.
- Alátámasztottuk, hogy hazánkban a DOBV Dobrava és Kurkino genotípusai cirkulálnak egyidejűleg.
- Az együttes molekuláris biológiai és szerológiai vizsgálatokkal megállapítottuk a DOBV tényleges prevalenciáját a vizsgálatba bevont rágcsálók körében, amit a hantavírus fertőzés rágcsálókban történő dinamikájával magyaráztunk.
- Igazoltuk a PUUV jelenlétét hazánkban a vizsgálatba bevont MGL rágcsálók körében.
- Igazoltuk a PUUV RNS jelenlétét akut veseelégtelenségben szenvedő beteg nyálmintájából.
- Első ízben írtuk le a TULV jelenlétét hazánkban MAR és MSU rágcsálókban, megállapítottuk annak magas prevalenciáját a vizsgálati régióban, elvégeztük a vírusok filogenetikai vizsgálatát.

❖ *Hantavírusokkal végzett klinikai, szeroepidemiológiai vizsgálatok*

- Első ízben igazoltuk molekuláris módszerekkel a DOBV fertőzést heveny veseelégtelenséggel járó hemorrhágiás lázban szenvedő beteg vérmintájából hazánkban.
- Első ízben készítettük el a DOBV fertőzés pontos klinikai nyomonkövetését, a betegség lefolyásának jellemzését és a fertőzést okozó vírustörzs filogenetikai jellemzését hazánkban.
- Elsőként igazoltunk molekuláris biológiai és filogenetikai módszerekkel a DOBV fertőzés mimikálta heveny fégnyűlvány-gyulladást akut veseelégtelenségben szenvedő betegben.
- Szoros együttműködésben a klinikusokkal, igazoltuk a hantavírus fertőzés tényét hét beteg esetében, majd elvégeztük a kórlefolyás klinikai analízisét.
- Elsőként végeztünk országos felmérést hazánkban a hantavírus fertőzés szeroprevalenciájának megállapítására a rizikócsoportba tartozó vadászok és erdészeti dolgozók körében.

Ízeltlábúak terjesztette vírusok vizsgálata❖ *Krími-kongói vérzéses láz vírusa*

- Megteremtettük a további szerológiai vizsgálatok háttérét BSL-2 laboratóriumi körülményekhez.
- *E. coli* fehérje expressziós rendszerrel rekombináns nukleokapszid fehérjét termeltettünk, majd tisztítottuk és ELISA vizsgálatokhoz használtuk.
- Transzgenikus CHO-KKVLV sejtvonalat hoztunk létre, amit IFA vizsgálatban alkalmaztunk.
- Elsőként igazoltuk mezei nyulak szeropozitivitását hazánkban a két immunológiai módszer együttes alkalmazásával.
- Megerősítettük a vírus jelenlétét hazánkban és felvetettük egy közép-európai KKVLV törzs meglétének lehetőségét *Ixodes ricinus* kullancsokban.

❖ *Kullancsenkefalitisz vírus*

- Molekuláris biológiai módszerrel megerősítettük a KEV jelenlétét a hazai *Ixodes ricinus* kullancsokban.
- Első ízben végeztünk sikerrel molekuláris szűrővizsgálatot a KEV jelenlétének igazolására rágcsálók körében.

- Kijelentettük, hogy a rágcsálók szűrése KEV kimutatása céljából hatékonyab volt, mint a növényzetről gyűjtött kullancsok monitorozása.
- Kijelentettük, hogy a kisemlősök rendszeres monitorozása jó prognosztikai adatokat szolgáltatna a KEV aktivitásról az ország endemikus régióin belül.

❖ *Nyugat Nilusi vírus*

- Elsőként azonosítottuk (jelentős prevalenciával) a WNV 2-es genetikai variánsát *Culex pipiens* és *Anopheles maculipennis* szúnyogban Szerbia határmenti területein.
- Filogenetikai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a Szerbiában jelenlévő törzs feltételezhetően Görögországból érkezhetett.
- Elemeztük a WNV törzsek teljes kódoló régióját, amelyek a 2013-as szerbiai WNV járvány ideje alatt mutattunk ki, így fontos adatokat kaptunk a törzs régiós szintű evolúciójával kapcsolatban.
- Azonosítottuk az NS3₂₄₉P aminosavsztitúciót, amelyet korábban a megnövekedett neuropatogenitás potenciális markereként írtak le.
- Első ízben írtunk le párhuzamos mutációkat az NS3 fehérje helikáz domén és az NS4B TM fehérje között, amelyek befolyásolhatják a fehérje-fehérje kölcsönhatást, és ezáltal az NS3 fehérje RNS-kötődését, amely elősegítheti a vírusreplikációt.
- Leírtuk a WNV egy feltételezett új genetikai variánsát (WNV-9) hazánkban *Uranotaenia unguiculata* szúnyogfajból, rámutatva ezzel a faj potenciális vektor szerepére Európában.

❖ *Usutu vírus*

- Elsőként írtuk le az USUV jelenétét Szerbiából származó *Culex pipiens* szúnyogban. Eddig csupán szerológiai adatok mutattak a vírus jelenlétére az országban.
- Meghatároztuk a vírus teljes kódoló régióját, elvégeztük a vírus molekuláris biológiai és filogenetikai jellemzését.
- Számos új mutációt azonosítottunk a vírus genomjában (C₅₄L, E₇₀₂A, NS₁₁₂₄₀I, NS₅₂₆₅₆R és NS₅₃₂₅₇I), amelyek több régiót is érintettek.
- Első ízben bizonyítékot szolgáltatunk az USUV európai 1-es genetikai variáns földrajzi kiterjedésére a balkáni félsziget déli területein.

Denevérek hordozta vírusok jellemzése

❖ *Astrovírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott astrovírusokat hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Öt újabb, potenciálisan hordozó denevérfajt azonosítottunk, a *Miniopterus schreibersii* faj dominanciájával.

❖ *Calicivírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott calicivírusokat hazánkban és végeztük el részletes molekuláris jellemezésüket.
- Részletes szerkezeti vizsgálatokat, valamint homológia modellezést készítettünk az új vírusok kapszidjával, a patogenitást *in silico* vizsgálatuk.

❖ *Koronavírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott koronavírusokat hazánkban (SARS-szerű β -koronavírusokat is) és végeztük el részletes molekuláris jellemezésüket.

❖ *Pikornavírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott új pikornavírust („Mischivirus B”) hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Genomszekvenálással meghatároztuk a virális genom organizációját, azonosítottuk a pikornavírus specifikus motívumokat, illetve analizáltuk az 5'UTR/IRES régiót.

❖ *Parvovírusok*

- Első ízben azonosítottunk denevérek által hordozott új parvovírust (denevér bufavírus) hazánkban és végeztük el molekuláris jellemezésüket.
- Genomszekvenálással meghatároztuk a virális genom organizációját, azonosítottuk a specifikus motívumokat. Potenciális rekombinációs eseményt tártunk fel, amely komoly jelentőséggel bírhat a Protoparvovírusok evolúciójában.

❖ *Fiovírusok*

- Első ízben mutattuk ki az egyetlen ezidáig ismert európai filovírust hazánkban (Európában másodszor) és végeztük el molekuláris jellemzését.
- A Lloviu vírusra specifikus TaqMan-PCR alapú tesztet fejlesztettünk ki, amely igen jelentős a vírus további kutatása céljából világszerte.

6. JEGYZÉKEK

6.1 Irodalomjegyzék

- Achazi K. és mtsai. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011; 11: 641-647.
- Adams MJ. és mtsai. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses *Archives of Virol*, 2017; 162: 2505.
- Alexeyev OA, Morozov VG. Neurological manifestations of hemorrhagic fever renal syndrome caused by Puumala virus? Review of 811 cases. *Clin Infect Dis*, 1995; 20: 255-258.
- Anastasiadou A. és mtsai. Follow-up study of Greek patients with West Nile virus neuroinvasive disease. *Int J Infect Dis*, 2013; 17: e494-497.
- Annan A. és mtsai. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; 19: 456-459.
- Anthony SJ. és mtsai. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio*, 2013; 4: e00598-13.
- Anthony SJ. és mtsai. Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *MBio*, 2017; 4: e00373-17.
- Antoniadis A. és mtsai. Clinical and epidemiological aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Greece. *Eur J Epidemiol*, 1987; 3: 295-301.
- Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, 1975; 1: 1297.
- Araki K. és mtsai. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 2397-23404.
- Ashraf U. és mtsai. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*, 2015; 7: 219-238.
- Avšič Županc T. és mtsai. HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res*, 2014; 187: 27-33.
- Avšič-Županc T, Poljak M. Hantavirus genomic variation and disease distribution. *Zdrav Vestn*, 1994; 63: 25-27.
- Avsic-Zupanc T. és mtsai. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol*, 2000; 81: 1747-1755.
- Avsic-Zupanc T. és mtsai. Characterisation of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol*, 1992; 38: 132-137.

- Avsic-Zupanc T. és mtsai. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia-a 10-year survey. *Clin Infect Dis*, 1999; 28: 860-865.
- Bakonyi T. és mtsai. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 618-623.
- Balenghien T. és mtsai. Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol*, 2006; 43: 936-46.
- Barrows NJ. és mtsai. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, 2018; 118: 4448-4482.
- Becker N. és mtsai. Mosquitoes and their control. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2003.
- Blom N. és mtsai. Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks. *Protein Sci*, 1996; 5: 2203-2216.
- Borčić B. és mtsai. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia: incidence of infection in human and wild animal reservoirs. *Lijec Vjesn*, 1991; 113: 320-323.
- Brandão PE. és mtsai. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008; 12: 466-468.
- Brault AC. és mtsai. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet*, 2007; 39: 1162-1166.
- Brown KE. The expanding range of parvoviruses which infect humans. *Medical Virology*, 2010; 20: 231-244.
- Brummer-Korvenkontio M. és mtsai. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis*, 1980; 141: 131-134.
- Buckwalter MR. és mtsai. Identification of a novel neuropathogenic Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Journal of Virology*, 2011; 85: 6893-6905.
- Buckwalter MR. és mtsai. Identification of a novel neuropathogenic Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Journal of Virology*, 2011; 85: 6893-6905.
- Burk R. és mtsai. Neglected filoviruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016; 40: 494-519.
- Cadar D. és mtsai. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill*, 2017; 22.
- Carroll SA. és mtsai. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J Virol*, 2013; 87: 2608-2616.
- Çelikbaş A. és mtsai. Crimean Congo hemorrhagic fever infection simulating acute appendicitis. *J Infect*, 2005; 50: 363-65.

- Chen HH. és mtsai. The leader peptide of Theiler's murine encephalomyelitis virus is a zinc-binding protein. *Journal of Virology*, 1995; 69: 8076-8078.
- Chen YN. és mtsai. Detection of the Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus and Alphacoronavirus in the Bat Population of Taiwan. *Zoonoses Public Health*, 2016; 63: 608-615.
- Childs JE. és mtsai. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *J Infect Dis*, 1994; 169: 1271-1280.
- Christova I. és mtsai. Novel astroviruses in insectivorous bats. *Journal of Virology*, 2008; 82: 9107-9114.
- Christova I. és mtsai. Hemorrhagic fever with renal syndrome and Crimean-Congo hemorrhagic fever as causes of acute undifferentiated febrile illness in Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013; 13: 188-192.
- Clement J. és mtsai. Human Tula virus infection or rat-bite fever? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2003; 22: 332-333.
- Coltart CEM. és mtsai. The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017; 372: 20160297.
- Corman VM. és mtsai. Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. *Journal of General Virology*, 2013; 94: 1984-1994.
- Cotmore SF. és mtsai. The family Parvoviridae. *Archives of Virology*, 2014; 159: 1239-1247.
- De Benedictis P. és mtsai. Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol*, 2011; 11: 1529-1544.
- De Liberato. és mtsai. Monitoring for the possible introduction of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Italy based on tick sampling on migratory birds and serological survey of sheep flocks. *Preventive veterinary medicine*, 2018; 149: 47-52.
- De Souza Luna LK. és mtsai. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J Clin Microbiol*, 2007; 45: 1049-1052.
- Decaro N. és mtsai. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology*, 2009; 385: 5-10.
- Drexler JF. és mtsai. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2015; 112: 15190-15195.

- Drexler JF. és mtsai. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases*, 2011; 17: 449-456.
- Drexler JF. és mtsai. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *Journal of Virology*, 2010; 84: 11336-11349.
- Duchin JS. és mtsai. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl J Med*, 1994; 330: 949-955.
- Dufkova L. és mtsai. Detection of diverse novel bat astrovirus sequences in the Czech Republic. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 2015; 15: 518-521.
- Duke GM. és mtsai. Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *Journal of Virology*, 1992; 66: 1602-1609.
- Duque H, Palmenberg AC. Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *Journal of Virology*, 2001; 75: 3111-3120.
- Easterbrook JD, Klein SL. Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *PLoS Pathog*, 2008; 4: e1000172.
- Elgh F. és mtsai . Development of humoral cross-reactivity to the nucleocapsid protein of heterologous hantaviruses in nephropathia epidemica. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998; 22: 309-15.
- Elgh F. és mtsai . A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J Virol Methods*, 1996; 59: 161-172.
- Engler O. és mtsai. European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int J Environ Res Public Health*, 2013; 10: 4869-4895.
- Ergönül Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet infectious diseases*, 2006; 6: 203-214.
- Farkas T. és mtsai. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *Journal of Virology*, 2008; 82: 5408-5416.
- Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 2015; 1282: 1-23.
- Ferenczi E. és mtsai. Natural Foci of Classical and Emerging Viral Zoonoses in Hungary. *Emerging biological threat*, 2005; 370: 43-50.

- Ferenczi E. és mtsai. New data for the public health importance of hantaviruses in Hungary. *Orv Hetil*, 2003; 144: 467-474.
- Fischer K. és mtsai. Bat Astroviruses: Towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses*, 2017; 9: 34.
- Fischer K. és mtsai. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. *Infection Genetics and Evolution*, 2016; 37: 108-116.
- Flusin O. és mtsai. Inhibition of Hazara nairovirus replication by small interfering RNAs and their combination with ribavirin. *Virology journal*, 2011; 8: 249.
- Fornosi F, Molnár E. Tick encephalitis in Hungary; isolation of virus and its properties. *Acta Microbiol Hung*, 1954; 1: 9-21.
- Frick WF. és mtsai. An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. *Science*, 2010; 329: 679-682.
- Füzik T. és mtsai. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun*, 2018; 9: 436.
- Giammanco GM. és mtsai. Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, Winter 2012–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; 19: 1348-1349.
- Glass GE. és mtsai. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect*, 1988; 101: 459-72.
- Gligic A. és mtsai. Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis*, 1992; 166: 113-120.
- Gombkötő P, Boldogh S. Hosszúszárnyú denevér - *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817). In: Magyarország emlőseinek atlasza [Atlas of mammals of Hungary]. Edited by Bihari Z, Csorba G, Heltai M. Kossuth Press, Budapest, 2007; pp: 127-128.
- Gorbalenya AE. és mtsai. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses - Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Letters*, 1991; 288: 201-205.
- Grygorczuk S. és mtsai. Detection of anti-hantavirus antibodies in forest workers in the north-east of Poland. *Przegl Epidemiol*, 2008; 62: 531-537.
- Gut W. és mtsai. Hantavirus specific IgG antibodies in population of zoologists and forest workers. *Przegl Epidemiol*, 2007; 61: 483-488.
- Handley SA. és mtsai. Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome. *Cell*, 2012; 151: 253-266.

- Hargitai R. és mtsai. Detection and genetic characterization of a novel parvovirus distantly related to human bufavirus in domestic pigs. *Archives of Virology*, 2017; 161: 1033-1037.
- He B. és mtsai. Filovirus RNA in Fruit Bats, China. *Emerging Infectious Diseases*, 2015; 21: 1675-1677.
- He B. és mtsai. Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *Journal of Virology*, 2014; 88: 7070-7082.
- Hernández-Triana LM. és mtsai. Emergence of west nile virus lineage 2 in Europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health*, 2014; 2: 271.
- Heyman P. és mtsai. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill*, 2011; 16.
- Hinson ER. és mtsai. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *Am J Trop Med Hyg*, 2004; 70: 310-317.
- Hon CC. és mtsai. Evidence of the recombinant origin of a bat severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus and its implications on the direct ancestor of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 2008; 82: 1819-1826.
- Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*, 1979; 15: 307-417.
- Horváth LB. Incidence of antibodies to Crimean haemorrhagic fever in animals (author's transl). *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 1975; 22: 61-63.
- Horváth LB. Precipitating antibodies to Crimean haemorrhagic fever virus in human sera collected in Hungary. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 1976; 23: 331-335.
- Hu B. és mtsai. Bat origin of human coronaviruses. *Virology Journal*, 2015; 12: 221.
- Huang C. és mtsai. A bat-derived putative cross-family recombinant coronavirus with a reovirus gene. *PLoS Pathogens*, 2016; 12: e1005883.
- Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res*, 2012; 111: 9-36.
- Huhn GD. és mtsai. West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician*, 2003; 68: 653-660.
- Hukic M. és mtsai. A serosurvey reveals Bosnia and Herzegovina as a Europe's hotspot in hantavirus seroprevalence. *Epidemiol Infect*, 2010; 138: 1185-1193.
- Humphrey W. és mtsai. VMD - Visual MolecularDynamics. *J Mol Graph*, 1996; 14: 33-38.

- Hutson AM. és mtsai. *Miniopterus schreibersii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T13561A4160556.
- Hutterer R. és mtsai. Bat migrations in Europe - A review of banding data and literature. Bundesamt für Naturschutz Bonn, 2005; 180.
- Inoue H. és mtsai. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990; 96: 23-28.
- Ithete NL. és mtsai. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; 19: 1697-1699.
- Jonsson C B. és mtsai. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*, 2010; 23: 412-441.
- Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin North Am*, 2008; 22: 561-75.
- Kallio-Kokko H. és mtsai. Human immune response to Puumala virus glycoproteins and nucleocapsid protein expressed in mammalian cells. *J Med Virol*, 2001; 65: 605-613.
- Kapoor A. és mtsai. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008; 105: 20482-20487.
- Kaukinen P. és mtsai. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch Virol*, 2005; 150: 1693-713.
- Khang HJ. és mtsai. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*). *PLoS One*, 2009; 4: e6149.
- Kiffner C. és mtsai. Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany. *Parasitol Res*, 2011; 108: 323-335.
- Klempa B. és mtsai. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. *Arch Virol*, 2013; 158: 521-529.
- Klempa B. és mtsai. Occurrence of Renal and Pulmonary Syndrome in a Region of Northeast Germany Where Tula Hantavirus Circulates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41: 4894-4897.
- Klempa B. és mtsai. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 4894-4897.
- Klempa B. és mtsai. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg Infect Dis*, 2008; 14: 617-625.
- Klempa B. és mtsai. Sangassou virus, the first hantavirus isolate from Africa, displays genetic and functional properties distinct from those of other murinae-associated hantaviruses. *J Virol*, 2012; 86: 3819-3827.

- Ko S. és mtsai. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea. *J Vet Sci*, 2010; 11: 197-203.
- Koma T. és mtsai. Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Sin Nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in humans and rodents. *J Clin Microbiol*, 2010; 48: 1635-1642.
- Kozuch O. és mtsai. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol*, 1990; 34: 537-544.
- Kryštufek B: Sesalci Slovenije. Prirodoslovni muzej Slovenije, Ljubljana, 1991; pp. 150–159.
- Kunz C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine*, 2003; 21: 50-55.
- Kurolt IC. és mtsai. First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Res*, 2014; 189: 63-66.
- Kvell K. és mtsai. Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors. *Mol Ther*, 2005; 12: 892-899.
- Labuda M. és mtsai. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent host. *Virology*, 1997; 235: 138-143.
- Lau SK. és mtsai. Complete genome analysis of three novel picornaviruses from diverse bat species. *Journal of Virology*, 2011; 85: 8819-8828.
- Lau SK. és mtsai. Complete genome analysis of three novel picornaviruses from diverse bat species. *Journal of Virology*, 2011; 85: 8819-8828.
- Lau SK. és mtsai. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005; 102: 14040-14045.
- Law KM, Brown TD. The complete nucleotide sequence of the GDVII strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Nucleic Acids Research*, 1990; 18: 6707-6708.
- Lee HW. és mtsai. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis*, 1982; 146: 638-44.
- Lee HW. és mtsai. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 1978; 137: 298-308.
- Lee PW. és mtsai. Partial characterization of Prospect Hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J Infect Dis*, 1985; 152: 826-829.
- Lelli D. és mtsai. Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. *Viruses*, 2013; 5: 2679-2689.

- L'Homme Y. és mtsai. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes*, 2009; 39: 66-75.
- Li L. és mtsai. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology*, 2010; 84: 6955-6965.
- Liang Z. és mtsai. Phylogenetic analysis of the species Theilovirus: emerging murine and human pathogens. *Journal of Virology*, 2008; 82: 11545-11554.
- Liao Q. és mtsai. Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Archives of Virology*, 2014; 159: 2529-2531.
- Linderholm M. és mtsai. Impaired pulmonary function in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clin Infect Dis*, 1997; 25: 1084-1089.
- Lindgren E. Climate and tick-borne encephalitis. *Cons Ecol*, 1998; 25: 1-14.
- Liu L. és mtsai. Identification of a novel bufavirus in domestic pigs by a viral metagenomic approach. *Journal of General Virology*, 2016; 97: 1592-1596.
- Lole KS. és mtsai. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 1999; 73: 1521-1560.
- Lu L. és mtsai. Molecular epidemiology of human calicivirus infections in children with acute diarrhea in Shanghai: a retrospective comparison between inpatients and outpatients treated between 2006 and 2011. *Arch Virol*, 2014; 159: 1613-1621.
- Lundkvist A. és mtsai. Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *J Med Virol*, 1997; 53: 51-59.
- Maes P. és mtsai. Detection of Puumala hantavirus antibody with ELISA using a recombinant truncated nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Viral Immunol*, 2004; 17: 315-321.
- Maftai ID. és mtsai. Hantavirus infection--hemorrhagic fever with renal syndrome: the first case series reported in Romania and review of the literature. *Int Urol Nephrol*, 2012; 44:1185-1191.
- Maltezou H C, Papa A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: epidemiological trends and controversies in treatment. *BMC medicine*, 2011; 9: 131.
- Marcos L. és mtsai. Effectiveness of the ribavirin in treatment of hantavirus infections in the Americas and Eurasia: a meta-analysis. *VirusDis*, 2014; 25: 385-389.
- Markotić A. és mtsai. Double trouble: hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis. *Scand J Infect Dis*, 2002; 34: 221-224.

- Markotić A. és mtsai. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol*, 2002; 66: 542-551.
- Medici MC. és mtsai. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy. *Euro Surveillance*, 2015; 20: 30011.
- Meisel H. és mtsai. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. *Clin Vaccine Immunol*, 2006; 13: 1349-1357.
- Menachery VD. és mtsai. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*, 2015; 21: 1508-1513.
- Mertens M. és mtsai. Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med Microbiol Immunol*, 2011; 200: 263-268.
- Messaoudi I. és mtsai. Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus. *Nat Rev Microbiol*, 2015; 13: 663-76.
- Midilli K. és mtsai. The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus and a field survey. *BMC Infect Dis*, 2009; 9: 90.
- Mikalsen AB. és mtsai. Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in atlantic salmon (*Salmosalar L.*): proposal for a new genus of caliciviridae. *PLoS One*, 2014; 9: e107132.
- Molnár E. Occurrence of tick-borne encephalitis and other arboviruses in Hungary. *Geographia Medica Hung*, 1982; 12: 78-120.
- Monroe SS. és mtsai. Electron microscopic reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom, 1985-1987. *J Med Virol*, 1991; 33: 193-198.
- Moudy RM. és mtsai. Requirement of glycosylation of West Nile virus envelope protein for infection of, but not spread within, *Culex quinquefasciatus* mosquito vectors. *Am J Trop Med Hyg*, 2011; 85: 374-378.
- Myoung J. és mtsai. The immunodominant CD8⁺ T cell epitope region of Theiler's virus in resistant C57BL/6 mice is critical for anti-viral immune responses, viral persistence, and binding to the host cells. *Virology*, 2007; 360: 159-171.
- Negredo A. és mtsai. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathogens*, 2011; 7: e1002304.
- Nemes Zs, Péterfi Z. Simultaneous leptospirosis and hantavirus infection in the same patient]. *Orv Hetil Hun*, 2000; 141: 499-502.

- Nichol ST. és mtsai. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 1993; 262: 914-917.
- Nolte KB. és mtsai. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Hum Pathol*, 1995; 26: 110-120.
- Ossiboff RJ. és mtsai. Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *Journal of Virology*, 2010; 84: 5550-5564.
- Pachler K. és mtsai. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis*, 2014; 20: 2119-2122.
- Papa A. és mtsai. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis*, 2011; 17: 920-922.
- Papa A. és mtsai. Suspected Crimean Congo Haemorrhagic Fever cases in Albania. *Scand J Infect Dis*, 2008; 40: 978-980.
- Papa A. és mtsai. Ecology of the Crimean-Congo hemorrhagic fever endemic area in Albania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2009; 9: 713-716.
- Papadopoulos O, Koptopoulos G. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Greece: Isolation of the virus from *Rhipicephalus bursa* ticks and a preliminary serological survey. In: Vesenjak-Hirjan J, Porterfield JS, editors. *Arboviruses in the Mediterranean countries*. Stuttgart (Germany): Gustav Fisher Verlag, 1980; 117- 121.
- Papithou NI. és mtsai. The first human case of neuroinvasive West Nile virus infection identified in Cyprus. *J Infect Public Health*, 2017; 10: 891-893.
- Petrović T. és mtsai. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill*, 2013; 18: 20622.
- Pettersson L. és mtsai. Hantavirus RNA in saliva from patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Emerg Infect Dis*, 2008; 14: 406-411.
- Pettersson L. és mtsai. Hantavirus-specific IgA in saliva and viral antigen in the parotid gland in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Med Virol*, 2011; 83: 864-870.
- Pevear DC. és mtsai. Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus Theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that it is closely related to cardioviruses. *Journal of Virology*, 1987; 61: 1507-1516.
- Phan TG. és mtsai. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *Journal of Virology*, 2012; 86: 11024-11030.

- Pinto P. és mtsai. Discovery and genomic characterization of noroviruses from a gastroenteritis outbreak in domestic cats in the US. *PLoS One*, 2012; 2: e32739.
- Plyusnin A. és mtsai. Genetic interaction between Dobrava and Saaremaa hantaviruse: now or millions of years ago? *J Virol*, 2003; 77: 7156-7157.
- Plyusnin A. és mtsai. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol*, 1994; 68: 7833-7839.
- Plyusnin A. és mtsai. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol*, 1996; 77: 2677-2687.
- Plyusnin A. és mtsai. Dobrava hantavirus in Estonia: does the virus exist throughout Europe? *Lancet*, 1997; 349: 1369-1370.
- Plyusnin A. és mtsai. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol*, 1994; 68: 7833-7839.
- Plyusnina A. és mtsai. Co-circulation of three pathogenic hantaviruses? Puumala, Dobrava and Saaremaa in Hungary. *J Med Virol*, 2009; 81: 2045-2052.
- Plyusnina A. és mtsai. Puumala and Tula hantaviruses in France. *Virus Res*, 2007; 129: 58-63.
- Poore EA. és mtsai. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine. *Vaccine*, 2017; 35: 283-292.
- Popović N. és mtsai. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill*, 2013; 18: 20613-20616.
- Quan PL. és mtsai. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging Infectious Diseases*, 2010; 16: 918-925.
- Ren W. és mtsai. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *Journal of General Virology*, 2006; 87: 3355-3359.
- Rohll JB. és mtsai. The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *Journal of Virology*, 1995; 69: 7835-7844.
- Rossi SL. és mtsai. West Nile virus. *Clin Lab Med*, 2010; 30: 47-65.
- Roy A. és mtsai. A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 2010; 5: 725-738.
- Růžek D. és mtsai. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infect Dis*, 2010; 8: 223-232.
- Sakhautdinov VG. és mtsai. Differential diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome and acute surgical diseases of abdominal organs. *Khirurgiya*, 2001; 3: 23-25. (In Russian)

- Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol*, 2006; 80: 9349-9360.
- Sasaki M. és mtsai. Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. *Scientific Reports*, 2016; 6: 24257.
- Sasaki M. és mtsai. Distinct lineages of Bufavirus in wild shrews and nonhuman primates. *Emerging Infectious Diseases*, 2015; 21: 1230-1233.
- Savage HM. és mtsai. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 61: 600-611.
- Schmaljohn CS, Nichol ST. Bunyaviridae. In Knipe DM, Howley PM ed., *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams&Wilkins Philadelphia, 2005; 1741-1789.
- Schmaljohn CS. és mtsai. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*, 1987; 157: 31-39.
- Schrödinger L. Schrödinger Suite, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- Schultze D. . és mtsai. Cross-sectional survey on hantavirus seroprevalence in Canton St. Gallen, Switzerland. *Swiss Med Wkly*, 2007; 137: 21-26.
- Schultze D. és mtsai. Tula Virus Infection Associated with Fever and Exanthema After a Wild Rodent Bite. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2002; 21: 304-306.
- Shackelton LA. és mtsai. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *Journal of General Virology*, 2007; 88: 3294-3301.
- Shirato K. és mtsai. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J Gen Virol*, 2004; 85: 3637-3645.
- Sibold C. és mtsai. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula Hantaviruses in Slovakia. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 61: 409-411.
- Smiley JR. és mtsai. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *Journal of Virology*, 2002; 76: 10089-10098.
- Šmit R, Postma MJ. Review of tick-borne encephalitis and vaccines: clinical and economical aspects. *Expert Rev Vaccines*, 2015; 14: 737-747.
- Smits SL. és mtsai. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 2014; 20: 1218-1222.

- Sorgeloos F. és mtsai. Evasion of antiviral innate immunity by Theiler's virus L* protein through direct inhibition of RNase L. *PLoS Pathogens*, 2013; 9: e1003474.
- Suchomel J. Contribution to the knowledge of *Clethrionomys glareolus* populations in forests of managed landscape in Southern Moravia (Czech Republic). *J For Sci*, 2017; 53: 340-344.
- Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 2003; 21:19-35.
- Süss J. Importance of tick-borne encephalitis (TBE) increases in Europe. *Dtsch Med Wochenschr*, 2005; 130: 1397-1400.
- Süss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond - the epidemiological situation as of 2007. *Euro. Surveill*, 2008; 13: 18916.
- Tai PW. és mtsai. Hanta haemorrhagic fever with renal syndrome: a case report and review. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005; 38: 221-223.
- Tamura K. és mtsai. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013; 30: 2725-2729.
- Tonteri E. és mtsai. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*, 2011; 17: 72-75.
- Tracy S. és mtsai. Evolution of virulence in picornaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006; 299: 193-209.
- Trubenová K, Miklós P. Population ecology of *Apodemus flavicollis* in a montane beech-spruce forest in the western Tatra mountains. *Acta universitatis Comenianae*, 2007; 47: 83-90.
- Tse H. és mtsai. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS One*, 2012; 4: e34987.
- Tulumović D. és mtsai. Ultrasound findings on abdominal organs in the acute phase of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Acta Med Croatica*, 2003; 57: 427-431. (In Croatian)
- Ulbert S. West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology*, 2011; 54: 171-184.
- Väisänen E. és mtsai. Bufavirus in feces of patients with gastroenteritis, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 2014; 20: 1077-1080.
- Vapalahti O. és mtsai. Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*. *J Gen Virol*, 1996; 77: 3063-3067.

- Venter M, Swanepoel R. West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010; 10: 659-664.
- Vukićević-Radić O. és mtsai. Spatial organization and home range of *Apodemus flavicollis* and *A. agrarius* on mt. Avala, Serbia. *Acta Zool Acad Sci Hung*, 2006; 52: 81-96.
- Wang J. és mtsai. Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). *Journal of General Virology*, 2015; 96: 2442-2452.
- Weissenböck H. és mtsai. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis*, 2013; 19: 274-277.
- Whitehouse C A. Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral research*, 2004; 64: 145-160.
- Whiteman MC. és mtsai. Multiple amino acid changes at the first glycosylation motif in NS1 protein of West Nile virus are necessary for complete attenuation for mouse neuroinvasiveness. *Vaccine*, 2011; 29: 9702-9710.
- Wichmann D. és mtsai. Hemorrhagic fever with renal syndrome: diagnostic problems with a known disease. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 3414-3416.
- Wolf S. és mtsai. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Archives of Virology*, 2011; 156: 1143-1150.
- Wu Z. és mtsai. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *Journal of Virology*, 2012; 86: 10999-11012.
- Xiao J. és mtsai. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China. *Archives of Virology*, 2011; 156: 1415-1423.
- Yahiro T. és mtsai. Novel human bufavirus genotype 3 in children with severe diarrhea, Bhutan. *Emerging Infectious Diseases*, 2014; 20: 1037-1039.
- Yang L. és mtsai. Novel SARS-like betacoronaviruses in bats, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; 19: 989-991.
- Yang XL. és mtsai. Isolation and characterization of a novel bat coronavirus closely related to the direct progenitor of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, 2015; 90: 3253-3256.
- Yang XL. és mtsai. Genetically diverse filoviruses in *Rousettus* and *Eonycteris* spp. bats, China, 2009 and 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 2017; 23: 482-486.
- Yasuda SP. és mtsai. Application of truncated nucleocapsid protein (N) for serotyping ELISA of murinae-associated hantavirus infection in rats. *J Vet Med Sci*, 2012; 74: 215-219.
- Zaki SR. és mtsai. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol*, 1995; 146: 552-579.

- Zelená H. és mtsai. Tula Hantavirus Infection in Immunocompromised Host, Czech Republic. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; 19.
- Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008; 9: 40.
- Zhu CH. és mtsai. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *Journal of General Virology*, 2009; 90: 883-887.
- Zivcec M. és mtsai. Molecular insights into Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Viruses*, 2016; 8: 106.
- Zöller L. és mtsai. Immunoblot analysis of the serological response in Hantavirus infections. *J Med Virol*, 1989; 27: 231-237.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 2003; 31: 3406-3415.

6.2 Scientometria

(MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya, 2018. október 09.)

- Az összes közlemény összesített impakt faktora: **188,2**
 - PhD fokozat megszerzése előtti közlemények impakt faktora: **17,1**
 - PhD fokozat megszerzése utáni közlemények impakt faktora: **171,1**
 - Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: **77,5**
- Idézettség:
 - Összes idézetek száma: **1284**
 - Független idézetek száma: **934**
- Hirsch index: **20**

6.3 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jakab F**, Horvath G, Ferenczi E, Sebok J, Varecza Z, Szucs G. Detection of Dobrava hantaviruses in Apodemus agrarius mice in the Transdanubian region of Hungary. *VIRUS RESEARCH* 128:(1-2) pp. 149-152. (2007) (Impakt faktor: **2,810**)
2. **Jakab F**, Sebok J, Ferenczi E, Horvath G, Szucs G. First detection of Dobrava hantavirus from a patient with severe haemorrhagic fever with renal syndrome by SYBR Green-based real time RT-PCR. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* 39:(10) pp. 902-906. (2007) (Impakt faktor: **1,209**)

3. Maráczai A, Buda BL, Tóth GA, **Jakab F**. Hantavírus-fertőzések: történeti és klinikai kitekintés. BULLETIN OF MEDICAL SCIENCES / ORVOSTUDOMÁNYI ÉRTESÍTŐ 81:(4) pp. 232-235. (2008) (Impakt faktor: **0**)
4. **Jakab F**, Horvath G, Ferenczi E, Sebok J, Szucs G. First detection of Tula hantaviruses in *Microtus arvalis* voles in Hungary. ARCHIVES OF VIROLOGY 153:(11) pp. 2093-2096. (2008) (Impakt faktor: **2,020**)
5. Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth Gy, Oldal M, Kisfali P, Bányai K, **Jakab F**. Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. ARCHIVES OF VIROLOGY 156:(9) pp. 1655-1660. (2011) (Impakt faktor: **2,111**)
6. **Jakab F**, Sebok J, Szanto Z, Hang D, Imre M, Nemeth V, Madai M, Oldal M, Kovacs T, Wittmann I. Dobrava-Belgrade hantavirus infection mimics acute appendicitis. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 50:(2) pp. 164-166. (2011) (Impakt faktor: **3,969**)
7. Pintér R, Madai M, Vadkerti E, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Gyuranecz M, Kiss G, Bányai K, **Jakab F**. Identification of tick-borne encephalitis virus in ticks collected in southeastern Hungary. TICKS AND TICK-BORNE DISEASES 4:(5) pp. 427-431. (2013) (Impakt faktor: **2,878**)
8. Németh V, Oldal M, Madai M, Horváth Gy, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, **Jakab F**. Molecular characterization of Dobrava and Kurkino genotypes of Dobrava-Belgrade hantavirus detected in Hungary and Northern Croatia. VIRUS GENES 47:(3) pp. 546-549. (2013) (Impakt faktor: **1,837**)
9. Németh V, Oldal M, Egyed L, Gyuranecz M, Erdélyi K, Kvell K, Kalvatchev N, Zeller H, Bányai K, **Jakab F**. Serologic evidence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 13:(4) pp. 270-272. (2013) (Impakt faktor: **2,531**)
10. Klempa B, Avsic-Zupanc T, Clement J, Dzagurova TK, Henttonen H, Heyman P, **Jakab F**, Kruger DH, Maes P, Papa A, Tkachenko EA, Ulrich RG, Vapalahti O, Vaheri A. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: implications for taxonomy. ARCHIVES OF VIROLOGY 158:(3) pp. 521-529. (2013) (Impakt faktor: **2,282**)
11. Szentpáli-Gavallér K, Antal L, Tóth M, Kemenesi G, Soltész Z, Dán Á, Erdélyi K, Bányai K, Bálint Á, **Jakab F**, Bakonyi T. Monitoring of West Nile virus in

- mosquitoes between 2011-2012 in Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(9) pp. 648-655. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
12. Pintér R, Madai M, Horváth Gy, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, **Jakab F.** Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus in rodents captured in the Transdanubian region of Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(8) pp. 621-624. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
 13. Oldal M, Németh V, Madai M, Pintér R, Kemenesi G, Dallos B, Kutas A, Sebők J, Horváth Gy, Bányai K, **Jakab F.** Serosurvey of pathogenic hantaviruses among forestry workers in Hungary. INTERNATIONAL JOURNAL OF OCCUPATIONAL MEDICINE AND ENVIRONMENTAL HEALTH 27:(5) pp. 766-773. (2014) (Impakt faktor: **0,695**)
 14. Oldal M, Németh V, Madai M, Kemenesi G, Dallos B, Péterfi Z, Sebők J, Wittmann I, Bányai K, **Jakab F.** Identification of hantavirus infection by Western blot assay and TaqMan PCR in patients hospitalized with acute kidney injury. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE 79:(2) pp. 166-170. (2014) (Impakt faktor: **2,457**)
 15. Németh V, Oldal M, Sebők J, Wittmann I, **Jakab F.** Hantavírus fertőzések hazai jelentősége a legújabb virológiai, epidemiológiai és klinikai vizsgálatok eredményeinek tükrében. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 18:(3-4) pp. 76-81. (2014) (Impakt faktor: **0**)
 16. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Kurucz K, Kutas A, Földes F, Oldal M, Németh V, Martella V, Bányai K, **Jakab F.** Molecular survey of RNA viruses in Hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses and caliciviruses. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 14:(12) pp. 846-855. (2014) (Impakt faktor: **2,298**)
 17. Kemenesi G, Dallos B, Oldal M, Kutas A, Földes F, Németh V, Reiter P, Bakonyi T, Bányai K, **Jakab F.** Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. VIRUSDISEASE 25:(4) pp. 500-503. (2014) (Impakt faktor: **0**)
 18. Kemenesi G, Krtinić B, Milankov V, Kutas A, Dallos B, Oldal M, Somogyi N, Németh V, Bányai K, **Jakab F.** West Nile virus surveillance in mosquitoes, April to October 2013, Vojvodina province, Serbia: implications for the 2014 season. EUROSURVEILLANCE 19:(16) Paper 20779. 5 p. (2014) (Impakt faktor: **5,722**)

19. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldog S, Estók P, Kurucz K, Oldal M, Németh V, Madai M, Bányai K, **Jakab F**. Novel European lineages of bat astroviruses identified in Hungary. ACTA VIROLOGICA 58:(1) pp. 95-98. (2014) (Impakt faktor: **1,280**)
20. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Marton S, Bányai K, **Jakab F**. Genetic diversity and recombination within bufaviruses: detection of a novel strain in Hungarian bats. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 33: pp. 288-292. (2015) (Impakt faktor: **2,591**)
21. Kemenesi G, Zhang D, Marton S, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Kutas A, Bányai K, **Jakab F**. Genetic characterization of a novel picornavirus detected in *Miniopterus schreibersii* bats. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 96:(4) pp. 815-821. (2015) (Impakt faktor: **3,192**)
22. Görföl T, Kemenesi G, **Jakab F**. A denevérek által terjesztett vírusok változatossága a hazai denevér populációkban [High diversity of bat-related viruses in Hungary]. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 137:(11) pp. 679-686. (2015) (Impakt faktor: **0,212**)
23. Zana B, Kemenesi G, Herczeg R, Dallos B, Oldal M, Marton Sz, Krtinac B, Gellért Á, Bányai K, **Jakab F**. Genomic characterization of West Nile virus strains derived from mosquito samples obtained during 2013 Serbian outbreak. JOURNAL OF VECTOR BORNE DISEASES 53:(4) pp. 379-383. (2016) (Impakt faktor: **1,190**)
24. Kemenesi G, Gellért Á, Dallos B, Görföl T, Boldogh S, Estók P, Marton S, Oldal M, Martella V, Bányai K, **Jakab F**. Sequencing and molecular modeling identifies candidate members of Caliciviridae family in bats. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 41: pp. 227-232. (2016) (Impakt faktor: **2,885**)
25. Kurucz K, Kemenesi G, Zana B, Zeghib S, Oldal M, **Jakab F**. Ecological preferences of the putative West Nile virus vector *Uranotaenia unguiculata* mosquito with description of an original larval habitat. NORTH-WESTERN JOURNAL OF ZOOLOGY e161103:(1) p. 1. (2017) (Impakt faktor: **0,596**)
26. Kurucz K, Madai M, Bali D, Hederics D, Horváth Gy, Kemenesi G, **Jakab F**. Parallel survey of two widespread renal syndrome-causing zoonoses: *Leptospira* spp. and Hantavirus in urban environment, Hungary. VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES 18:(4) pp. 200-205. (2018) (Impakt faktor: **2,171**)
27. Kemenesi G, Kurucz K, Dallos B, Zana B, Földes F, Boldogh S, Görföl T, Carroll WM, **Jakab F**. Re-emergence of Lloviu virus in *Miniopterus schreibersii* bats,

Hungary, 2016. EMERGING MICROBES & INFECTIONS 7: Paper 66. 4 p. (2018)
(Impakt faktor: **6,032**)

28. Kemenesi G, Buzás D, Zana B, Kurucz K, Krtinac B, Kepner A, Földes F, **Jakab F**. First genetic characterization of Usutu virus from Culex pipiens mosquitoes Serbia, 2014. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 63: pp. 58-61. (2018) (Impakt faktor: **2,545**)

6.4 Egyéb közlemények

1. **Jakab F**, Walter J, Szűcs Gy. A humán astrovírusok jelentősége a gyermekkori gastroenteritisekben. INFEKTOLÓGIA ÉS KLINIKAI MIKROBIOLÓGIA 8:(3) pp. 118-122. (2001) (Impakt faktor: **0**)
2. **Jakab F**, Tímár L, Szűcs Gy. A humán astrovírusok okozta gastroenteritisek jellemzői és klinikuma kórházban ápolott gyermekek körében. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 53:(4) pp. 419-425. (2002) (Impakt faktor: **0**)
3. van Kooij A, Middel J, **Jakab F**, Elfferich P, Koedijk DG, Feijlbrief M, Scheffer AJ, Degener JE, The TH, Scheek RM, Welling GW, Welling-Wester S. High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 25:(3) pp. 400-408. (2002) (Impakt faktor: **1.375**)
4. Bányai K, **Jakab F**, Reuter G, Bene J, Új M, Melegh B, Szűcs Gy. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. ARCHIVES OF VIROLOGY 148:(12) pp. 2281-2291. (2003) (Impakt faktor: **1.876**)
5. **Jakab F**, Walter JE, Berke T, Matson DO, Mitchell DK, Szucs Gy. Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 39:(2) pp. 97-102. (2003) (Impakt faktor: **1.789**)
6. Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, **Jakab F**, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szűcs Gy. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 53:(8) pp. 791-801. (2004) (Impakt faktor: **2.484**)
7. Bányai K, Martella V, **Jakab F**, Melegh B, Szűcs Gy. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 42:(9) pp. 4338-4343. (2004) (Impakt faktor: **3.439**)

8. **Jakab F**, Meleg E, Bányai K, Melegh B, Tímár L, Péterfai J, Szűcs Gy. One year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary – Occurrence and genetic analysis of astroviruses. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 74:(1) pp. 71-77. (2004) (Impakt faktor: **2.331**)
9. Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, **Jakab F**, Meleg E, Mihály I, Szűcs Gy. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 76: pp. 414-423. (2005) (Impakt faktor: **2.520**)
10. **Jakab F**, Péterfai J, Meleg E, Bányai K, Mitchell DK, Szűcs Gy. Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. ACTA PAEDIATRICA 94: pp. 667-671. (2005) (Impakt faktor: **1.277**)
11. Meleg E, **Jakab F**, Kocsis B, Bányai K, Melegh B, Szűcs Gy. Human astrovírusok első kimutatása nyers szennyvízből Magyarországon. EGÉSZSÉGTUDOMÁNY 49: pp. 318-327. (2005) (Impakt faktor: **0**)
12. Bányai K, Jiang B, Bogdán Á, Horváth B, **Jakab F**, Meleg E, Martella V, Magyari L, Melegh B, Szűcs Gy. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 37:(4) pp. 317-322. (2006) (Impakt faktor: **2.630**)
13. Meleg E, **Jakab F**, Kocsis B, Bányai K, Melegh B, Szűcs Gy. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY 101:(5) pp. 1123-1129. (2006) (Impakt faktor: **2.206**)
14. Zhang Z, Mitchell DK, Afflerbach C, **Jakab F**, Walter J, Zhang YJ, Staat MA, Azimi P, Matson DO. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 134:(1-2) pp. 190-196. (2006) (Impakt faktor: **2.097**)
15. **Jakab F**, Péterfai J, Verebély T, Meleg E, Bányai K, Mitchell DK, Szűcs Gy. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. PEDIATRICS INTERNATIONAL 49: pp. 103-105. (2007) (Impakt faktor: **0.737**)
16. Bányai K, Martella V, Bogdán Á, Forgách P, **Jakab F**, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szűcs Gy. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 89: pp. 534-539. (2008) (Impakt faktor: **3.092**)

17. László B, Kónya J, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gomara M, **Jakab F**, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel Gy, Martella V, Melegh B, Mészáros J, Molnár P, Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs Gy, Bányai K. Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. *JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY* 55:(2) pp. 140-146. (2012) (Impakt faktor: **3.287**)
18. Midgley SE, Bányai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, **Jakab F**, Kaplon J, Larsen LE, Monini M, Poljšak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Steyer A, Koopmans M, Böttiger B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *VETERINARY MICROBIOLOGY* 156:(3-4) pp. 238-245. (2012) (Impakt faktor: **3.127**)
19. Ganesh B, Bányai K, Martella V, **Jakab F**, Masachessi G, Kobayashi N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. *REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY* 22:(4) pp. 245-256. (2012) (Impakt faktor: **7.615**)
20. Papp H, Al-Mutairi LZ, Chehadeh W, Farkas LS, Lengyel Gy, **Jakab F**, Martella V, Szűcs Gy, Bányai K. Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 59:(3) pp. 411-421. (2012) (Impakt faktor: **0.646**)
21. Papp H, László B, **Jakab F**, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnssens J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *VETERINARY MICROBIOLOGY* 165:(3-4) pp. 190-199. (2013) (Impakt faktor: **2.726**)
22. Papp H, Borzák R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnár P, Melegh B, Matthijnssens J, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 19: pp. 71-80. (2013) (Impakt faktor: **3.264**)
23. Papp H, Malik YS, Farkas SL, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *VIRUSDISEASE* 25:(2) pp. 215-222. (2014) (Impakt faktor: **0**)
24. Banyai K, Borzak R, Ihasz K, Feher E, Dan A, **Jakab F**, Papp T, Hetzel U, Marschang RE, Farkas SL. Whole-genome sequencing of a green bush viper reovirus reveals a shared evolutionary history between reptilian and unusual mammalian

- orthoreoviruses. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 153-158. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
25. Dandár E, Farkas SL, Marton S, Oldal M, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K. The complete genome sequence of a European goose reovirus strain. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 2165-2169. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
 26. Fehér E, Pazár P, Kovács E, Farkas SL, Lengyel G, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Molecular detection and characterization of human gyroviruses identified in the ferret fecal virome. ARCHIVES OF VIROLOGY 159:(12) pp. 3401-3406. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
 27. Martella V, Pinto P, Tummo F, De Grazia S, Giammanco GM, Medici MC, Ganesh B, L'Homme Y, Farkas T, **Jakab F**, Bányai K. Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a novel sub-classification system. ARCHIVES OF VIROLOGY 159: pp. 3185-3196. (2014) (Impakt faktor: **2.390**)
 28. Mihalov-Kovács E, Marton S, Fehér E, Lengyel G, **Jakab F**, Tuboly T, Bányai K. Enterális vírusfertőzések menhelyi kutyákban Magyarországon: Enteric viral infections of sheltered dogs in Hungary. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136: pp. 661-670. (2014) (Impakt faktor: **0.185**)
 29. Papp H, Marton S, Farkas SL, **Jakab F**, Martella V, Malik YS, Palya V, Bányai K. Classification and characterization of a laboratory chicken rotavirus strain carrying G7P[35] neutralization antigens on the genotype 4 backbone gene configuration. BIOLOGICALS 42:(6) pp. 299-304. (2014) (Impakt faktor: **1.209**)
 30. Papp H, Rigó D, Dán Á, Farkas SL, Oldal M, **Jakab F**, Bányai K. Szokatlan rotavírus antigén kombináció azonosítása fiatal fécében. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136: pp. 729-735. (2014) (Impakt faktor: **0.185**)
 31. Dóró R, Mihalov-Kovács E, Marton S, László B, Deák J, **Jakab F**, Juhász Á, Kisfali P, Martella V, Melegh B, Molnár P, Sántha I, Schneider F, Bányai K. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 28: pp. 495-512. (2014) (Impakt faktor: **3.015**)
 32. Dandár E, Huhtamo E, Farkas SL, Oldal M, **Jakab F**, Vapalahti O, Bányai K. Complete genome analysis identifies Tvärminne avian virus as a candidate new species within the genus Orthoreovirus. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 95: pp. 898-904. (2014) (Impakt faktor: **3.183**)

33. Farkas SL, Dandár E, Marton S, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K. Detection of shared genes among Asian and European waterfowl reoviruses in the whole genome constellations. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 28: pp. 55-57. (2014) (Impakt fator: **3.015**)
34. Farkas SL, Ihász K, Fehér E, Bartha D, **Jakab F**, Gál J, Bányai K, Marschang RE. Sequencing and phylogenetic analysis identifies candidate members of new picornavirus genus in terrestrial tortoise species. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 160: pp. 811-816. (2015) (Impakt faktor: **2.255**)
35. Kemenesi G, Kurucz K, Kepner A, Dallos B, Oldal M, Herczeg R, Vajdovich P, Bányai K, **Jakab F**. Circulation of *Dirofilaria repens*, *Setaria tundra*, and *Onchocercidae* species in Hungary during the period 2011-2013. *VETERINARY PARASITOLOGY* 214:(1-2) pp. 108-113. (2015) (Impakt faktor: **2.242**)
36. Marton S, Bányai K, Gál J, Ihász K, Kugler R, Lengyel G, **Jakab F**, Bakonyi T, Farkas SL. Coding-complete sequencing classifies parrot bornavirus 5 into a novel virus species. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 160:(11) pp. 2763-2768. (2015) (Impakt faktor: **2.255**)
37. Oldal M, Sironen T, Henttonen H, Vapalahti O, Madai M, Horváth Gy, Dallos B, Kutas A, Földes F, Kemenesi G, Németh V, Bányai K, **Jakab F**. Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES* 15:(5) pp. 317-322. (2015) (Impakt faktor: **1.956**)
38. Melegh S, Schneider Gy, Horváth M, **Jakab F**, Emődy L, Tigyi Z. Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital. *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 62:(3) pp. 233-245. (2015) (Impakt faktor: **0.568**)
39. Marton S, Mihalov-Kovács E, Dóró R, Csata T, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Matthijnssens J, Martella V, Bányai K. Canine Rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 96: pp. 3059-3071. (2015) (Impakt fator: **3.192**)
40. Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, **Jakab F**, Martella V, Bányai K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES* 21: pp. 660-663. (2015) (Impakt fator: **6.994**)
41. Antal L, László B, Kotlík P, Mozsár A, Czeglédi I, Oldal M, Kemenesi G, **Jakab F**, Nagy S. A Phylogenetic evidence for a new species of *Barbus* in the Danube River

- basin. *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 96: pp. 187-194. (2016) (Impakt faktor: **4.419**)
42. Dóró R, Marton S, Bartókné Horváth A, Lengyel G, Agócs Z, **Jakab F**, Bányai K. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 63: pp. 243-255. (2016) (Impakt faktor: **0.921**)
43. Farkas SL, Marton S, Dandár E, Kugler R, Gál B, **Jakab F**, Bálint Á, Kecskeméti S, Bányai K. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *SCIENTIFIC REPORTS* 6: Paper 36960. (2016) (Impakt faktor: **4.259**)
44. Francuski L, Milankov V, Ludoski J, Krtinic B, Lundström J, Kemenesi G, **Jakab F**. Genetic and phenotypic variation in central and northern European populations of *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen, 1830) (Diptera, Culicidae). *JOURNAL OF VECTOR ECOLOGY* 41:(1) pp. 160-171. (2016) (Impakt faktor: **1.473**)
45. Gál J, Marton S, Ihász K, Papp H, **Jakab F**, Malik YS, Bányai K, Farkas SL. Complete genome sequence of a genotype G23P[37] pheasant rotavirus strain identified in Hungary. *GENOME ANNOUNCEMENTS* 4:(2) Paper e00119-16. (2016) (Impakt faktor: **0**)
46. Kemenesi G, Földes F, Zana B, Kurucz K, Estók P, Boldogh S, Görföl T, Bányai K, Oldal M, **Jakab F**. Genetic Characterization of Providence virus isolated in bat guano, Hungary. *GENOME ANNOUNCEMENTS* 4:(3) Paper e00403-16. (2016) (Impakt faktor: **0**)
47. Kurucz K, Kiss V, Zana B, Schmieder V, Kepner A, **Jakab F**, Kemenesi G. Emergence of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in an urban area, Hungary, 2016. *PARASITOLOGY RESEARCH* 115:(12) pp. 4687-4689. (2016) (Impakt faktor: **2,329**)
48. Kugler R, Marschang RE, Ihász K, Lengyel G, **Jakab F**, Bányai K, Farkas SL. Whole genome characterization of a chelonian orthoreovirus strain identifies significant genetic diversity and may classify reptile orthoreoviruses into distinct species. *VIRUS RESEARCH* 215: pp. 94-98. (2016) (Impakt faktor: **2.628**)
49. Damásdi M, **Jakab F**, Kovács K, Oldal M, Kemenesi G, Szabó E, Vályi-Nagy I, Pytel Á, Farkas L, Szántó Á. Prevalence and type diversity of human papillomaviruses in penile cancers in Hungary. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 22:(3) pp. 643-646. (2016) (Impakt faktor: **1.736**)

50. Kugler R, Dandár E, Fehér E, **Jakab F**, Mató T, Palya V, Bányai K, Farkas LS. Phylogenetic analysis of a novel reassortant orthoreovirus strain detected in partridge (*Perdix perdix*). *VIRUS RESEARCH* 215: pp. 99-103. (2016) (Impakt faktor: **2.628**)
51. Kurucz K, Kepner A, Krtinic B, Zana B, Földes F, Bányai K, Oldal M, **Jakab F**, Kemenesi G. First molecular identification of *Dirofilaria* spp. (Onchocercidae) in mosquitoes from Serbia. *PARASITOLOGY RESEARCH* 115:(8) pp. 3257-3260. (2016) (Impakt faktor: **2.329**)
52. Bányai K, Kemenesi G, Budinski I, Földes F, Zana B, Marton S, Kugler R, Oldal M, Kurucz K, **Jakab F**. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION* 48: pp. 19-26. (2017) (Impakt faktor: **2.545**)
53. Damasdi M, Kovacs K, Farkas N, **Jakab F**, Kovacs G. Down-regulation of Toll-like Receptor TLR4 Is Associated with HPV DNA Integration in Penile Carcinoma. *ANTICANCER RESEARCH* 37:(10) pp. 5515-5519. (2017) (Impakt faktor: **1.865**)
54. Fehér E, Kemenesi G, Oldal M, Kurucz K, Kugler R, Farkas SL, Marton S, Horváth G, Bányai K, **Jakab F**. Isolation and complete genome characterization of novel reassortant orthoreovirus from common vole (*Microtus arvalis*). *VIRUS GENES* 53:(2) pp. 307-311. (2017) (Impakt faktor: **1.542**)
55. Kemenesi G, Kurucz K, Zana B, Tu VT, Görföl T, Estók P, Földes F, Sztancsik K, Urbán P, Fehér E, **Jakab F**. Highly divergent cyclo-like virus in a great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*), Vietnam. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 162:(8) pp. 2403-2407. (2017) (Impakt faktor: **2.160**)
56. Mihalov-Kovács E, Martella V, Lanave G, Bodnar L, Fehér E, Marton S, Kemenesi G, **Jakab F**, Bányai K. Genome analysis of canine astroviruses reveals genetic heterogeneity and suggests possible inter-species transmission. *VIRUS RESEARCH* 232: pp. 162-170. (2017) (Impakt faktor: **2.484**)
57. Zana B, Kemenesi G, Antal L, Földes F, Oldal M, Bányai K, **Jakab F**. Molecular traces of a putative novel insect flavivirus from *Anopheles hyrcanus* mosquito species in Hungary. *ACTA VIROLOGICA* 61:(1) pp. 127-129. (2017) (Impakt faktor: **0.696**)
58. Kemenesi G, Kurucz K, Zana B, Földes F, Urbán P, Vlaschenko A, Kravchenko K, Budinski I, Szodoray-Parádi F, Bücs Sz, Jéré Cs, Csősz I, Szodoray-Parádi A, Estók P, Görföl T, Boldogh S, **Jakab F**. Diverse replication-associated protein encoding circular DNA viruses in guano samples of Central-Eastern European bats. *ARCHIVES OF VIROLOGY* 163:(3) pp. 671-678. (2018) (Impakt faktor: **2.160**)

59. Kurucz K, Kiss V, Zana B, **Jakab F**, Kemenesi G. Filarial nematode (Order: Spirurida) surveillance in urban habitats, in the city of Pécs (Hungary). PARASITOLOGY RESEARCH 117:(10) pp. 3355-3360. (2018) (Impakt faktor: 2.558)
60. Zana B, Kemenesi G, Urbán P, Földes F, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, **Jakab F**. Metagenomic analysis of bat guano samples revealed the presence of viruses potentially carried by insects, among others by *Apis mellifera* in Hungary. ACTA VETERINARIA HUNGARICA 66:(1) pp. 151-161. (2018) (Impakt faktor: 1.042)

6.5 Könyvfejezetek

1. Reuter G, **Jakab F**, Bányai K, Szűcs Gy. Gasztroenteritist okozó vírusok. Humán astrovírusok. Humán enterális adenovírusok. Humán calicivírusok (norovírusok, sapovírusok). Rotavírusok. Feltételezetten gastroenteritist okozó egyéb vírusok. In: Berencsi György (szerk.), Orvosi molekuláris virológia. 393 p.; Budapest: Convention Budapest Kft., 2005. pp. 22-39. (ISBN: 9789639740204)
2. Meleg E, **Jakab F**. Astroviruses. In: Dong You Liu (szerk.), Molecular detection of foodborne pathogenes. 905 p.; Boca Raton (FL): CRC Press - Taylor and Francis Group, 2010. pp. 33-48. (ISBN: 9781420076431)
3. **Jakab F**. Bunyaviridae. In: Takács Mária, Kárpáti Judit (szerk.), Klinikai és járványügyi virológia. 872 p.; Budapest: Vox Medica Kiadói Kft., 2011. pp. 225-232. (ISBN: 9789639740204)
4. **Jakab F**. Filovírusok. In: Pál Tibor (szerk.), Az orvosi mikrobiológia tankönyve. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvk. Zrt., 2013. pp. 221-223. (ISBN: 9789632264639)
5. **Jakab F**. Bunyavírusok. In: Pál Tibor (szerk.), Az orvosi mikrobiológia tankönyve. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 228-231. (ISBN: 9789632264639)
6. **Jakab F**. Arenavírusok. In: Pál Tibor (szerk.), Az orvosi mikrobiológia tankönyve. 544 p.; Budapest: Medicina Könyvk. Zrt., 2013. pp. 231-233. (ISBN: 9789632264639)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Szűcs György Főorvos Úrnak, hogy lehetőséget adott számomra a laboratóriumi munkára, szakmai támogatásával segítette tanulásomat, elindított kutatói pályámon és témavezetésével doktori fokozatot szerezhettem.

Köszönetemet fejezem ki a külföldön végzett tudományos munkámban segítő mentoraimnak, feletteseimnek és barátaimnak: Dr. Sytske Welling-Wester, Matty Feijlbrief, Danny G.A.M. Koedijk (Groningen, Hollandia), Dr. Walter E. Jolán, Dr. Douglas K. Mitchell, Dr. David O. Matson (Virginia, USA).

Köszönettel tartozom Dr. Gábrriel Róbert Professzor Úrnak, hogy 2007-ben lehetőséget adott számomra, hogy újra a Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Karának munkatársa lehessenek, szakmailag, erkölcsileg és emberileg maximálisan támogatott. Köszönöm Dr. Putnoky Péter Professzor Úrnak, a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak, hogy befogadtak a tanszékre és hasznos tanácsaikkal segítettek eligazodni az egyetem „útvesztőiben”.

Köszönöm Dr. Kovács L. Gábor Professzor Úrnak, Dr. Helyes Zsuzsanna Professzor Asszonynak, Végh Tamara Igazgató Asszonynak és Czibók Balázs Menedzser Úrnak, hogy a PTE, Szentágothai János Kutatóközpont kutatói közé fogadtak, munkámat, terveimet önzetlenül támogatták.

Köszönettel tartozom a hazai és nemzetközi Kollégáknak, akikkel kutatásainkat, tudományos terveinket megvalósítottuk. Név szerint: Dr. Ferenczi Emőke, Prof. Dr. Wittmann István, Dr. Sebők Judit, Dr. Péterfi Zoltán, Dr. Horváth Győző, Dr. Gyuranecz Miklós, Dr. Gellért Ákos, Dr. Bakonyi Tamás, Dr. Csorba Gábor, Dr. Görföl Tamás, Dr. Boldogh Sándor, Dr. Estók Péter, Dr. Kvell Krisztián, Dr. Herve Zeller, Dr. Nikolay Kalvatchev, Dr. Carroll Miles, Dr. Sylvain Baize, Dr. Vesna Milankov, Dr. Bosiljka Krtinic.

A legnagyobb köszönet mégis azoknak az embereknek szól, akik az elmúlt 12 évben ott álltak mellettem, akik a kezdetektől velem voltak, és akikkel felépítettük mindazt, amire ma mindannyian büszkék lehetünk. Köszönöm Nektek: Dr. Németh Viktória, Madai Mónika, Dr. Oldal Miklós, Dr. Kemenesi Gábor, Dr. Bányai Krisztián, Dr. Kurucz Kornélia, Zana Brigitta, Földes Fanni, Dallos Bianka, Pintér Réka, Búzás Dóra, Papp Henrietta, Zeghibib Safia.

Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm szüleimnek a támogatást, a biztatás és azt, hogy hittek bennem. Köszönöm feleségemnek, Magyar Veronikának, hogy odaadó, önzetlen párként mindig mögöttem állt, gyermekeimnek Jakab Ferenc Péternek és Jakab Anna Veronikának, hogy mosolyukkal és szeretetükkel erőt adtak a mindennapokban és átsegítettek a nehézségeken.