

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**A veszettség molekuláris epidemiológiája
Magyarországon**

Doktori értekezés tézisei

Forró Barbara



2019

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Dr. Bányai Krisztián
Magyar Tudományos Akadémia,
Agrártudományi Kutatóközpont,
Állatorvos-tudományi Intézet

Bevezetés

A *Lyssavirus* nemzetség tagjai közé tartozó rabies vírus (RABV) az idegrendszert érintő zoonotikus fertőző agy- és gerincvelő gyulladás okozója. A nemzetség típusfaja a RABV, mely évente közelítőleg 59 000 ember halálát okozza, több mint 150 országban. Az esetek nagy része Ázsiában és Afrikában fordul elő.

Magyarországon humán esetet legutóbb 1994-ben dokumentáltak. A kutyák kötelező vakcinázásának köszönhetően az urbanikus járványtani forma visszaszorult. Jelenleg Magyarországon a RABV szilvaticus terjedésének megfékezésén van a hangsúly, melynek elsődleges fenntartója a vörös róka. 1992 óta évente kétszer zajlik a rókák immunizálása csalétek vakcinák kihelyezésével. A hazai csalétekvakcinázás olyannyira sikeres, hogy 2011-es és 2012-es szűrővizsgálatok során egyetlen RABV esetet sem diagnosztizáltak. 2013 augusztusában váratlanul fellobbant egy járvány Kecskemét környékén, amely 15 hónapig tartott, ezt követően visszaesett évi egy-kettőre a detektált RABV esetek száma. A denevérek terjesztette European Bat Lyssavirus (EBLV) vírus monitorozására kevesebb lehetőség van jelenleg hazánkban, passzív szűrővizsgálatok során eddig hét esetet dokumentáltak 1977 és 2017 között 144 denevérminta feldolgozásával.

Korábban nem született átfogó molekuláris epidemiológiai vizsgálat e két vírus genetikai és járványtani tulajdonságaira Magyarországon. Ezt a hiányt szeretnénk volna pótolni munkánk során. Megszekvenáltuk a hozzáférhető, hazánkban azonosított RABV (n=61) és EBLV-1 (n=2) törzsek genomját, annak érdekében, hogy molekuláris epidemiológiai vizsgálatot végezzünk a hazai törzsek terjedésének, molekuláris tulajdonságainak felderítéséhez. Továbbá választ kerestünk a 2013-ban az ország középső területén váratlanul kitört (2013.08.31-től 2014.10.06-ig) járvány eredetére és terjedési irányaira. Összegyűjtöttük a szórványos hazai adatokat a denevérek hordozta veszettség vírusokról, valamint összesítettük az eddigi eseteket és európai szekvenciák bevonásával az EBLV-1 leszármazási vonalak elterjedését és terjedési irányait vizsgáltuk.

Lehetőségünk nyílt a hazai csalétek vakcinázás során használt Lysvulpen vakcina vírus törzsekből (n=5) és egy vakcina okozta vörös róka fertőzésből nyert minta szekvenálására, így megvizsgálhattuk a vakcina vírus genomok variabilitását is.

Célkitűzések

Célul tűztük ki a hazai veszettség (RABV, EBLV) esetekből nyert törzsek teljes genomjának genetikai vizsgálatát molekuláris epidemiológiai és evolúciós elemzésekkel. Tanulmányozni kívántuk a rabies vírus és a denevér lyssavírusok országokon és tájegységeken átívelő eloszlását, példaként használva egy, a közelmúltban (2013-2014 során) lezajlott járványt.

Egy vakcinaeredetű eset kapcsán felmerült egy olyan eljárás kidolgozásának igénye, amivel a kelet-közép európai veszettség eseteknél elkülöníthető az esetleges vakcina vírus okozta fertőzés.

Céljaink közé tartozott a vírus patogenitásért közvetlenül felelős fehérjéinek tanulmányozása és modellezése, az esetleges eltérések feltérképezése különböző leszármazási vonalak között.

Anyag és módszer

Vizsgált minták eredete és származási helye

A dolgozatban felhasznált mintákat a NÉBIH-ÁDI Virologia laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre, melyek aktív és passzív szűrővizsgálatok során kerültek kivizsgálásra.

Teljes genomszekvenciák meghatározására feldolgoztunk 61 RABV mintát melyek vörös rókából (*Vulpes vulpes*) (n=53), szarvasmarhából (*Bos taurus*) (n=2), házi macskából (*Felis catus*) (n=1), európai őzből (*Capreolus capreolus*) (n=1), kutyából (*Canis lupus*) (n=1), kecskéből (*Capra aegagrus hircus*) (n=3) származtak, és két EBLV genomot is megszekvenáltunk, melyek közönséges kései denevérből (*Eptesicus serotinus*) lettek kimutatva. Továbbá meghatároztuk a nukleotidsorrendjét öt csalétek vakcinának, egy rókából kimutatott vakcina törzsnek és ennek tovább szaporított mintáinak (egér n=1; N2a n=2).

Veszétség vírus minták feldolgozásához használt molekuláris biológiai módszerek

A rendelkezésünkre bocsátott mintákból RNS-t tisztítottunk és reverz transzkripciót végeztünk nem specifikus (random) primerekkel, így az RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. A RABV és EBLV törzsek felerősítéséhez egymással átfedő primer párokat terveztünk, amelyek alkalmazásával a teljes genomot lefedő ampliconokat kaptunk. Pozitív kontroll gyanánt a veszétségvírus diagnosztikája során használt, N és G gén szakaszokon tapadó primerek szolgáltak. További molekuláris munkák előtt a PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk.

DIVA (differentiated infected from vaccinated animals) TaqMan reverz transzkripció PCR (RT-PCR) módszert fejlesztettünk a kelet-európai RABV törzsek és vakcina törzsek meghatározására és megkülönböztetésére. Kelet európai RABV (n=28) és vakcina törzsek (n=7) teljes genomjának szekvenciaillesztése alapján terveztük a primereket és a próbákat. A degenerált primerek 113 nukleotid hosszú szakaszt erősítenek fel a polimeráz génen. A vakcina próba kizárólag vakcina törzshöz tapad (FAM), míg a konzervatív próba (HEX), mind a vad RABV, mind pedig a vakcina törzsekhez kötődik.

A mintákból nyert és felerősített ampliconokat (cDNS szakaszok) agarózgélben látható jelintenzitás alapján mértük össze. Teljes genom szekvenálást Ion Torrent PGM félvezető szekvenálóval végeztük. Saját tervezésű primerekkel Sanger szekvenálást alkalmaztunk a kapott teljes genomok homopolimer vagy az alacsony lefedettségű régióinak validálására.

Bioinformatikai módszerek

A szekvenciaillesztés és annotálást megelőzően a kapott nyers szekvencia részleteket minőségi ellenőrzésnek vetettük alá. Kiszűrtük a túl rövid vagy rossz minőségű nukleotid szakaszokat és levágtuk az adapter régiókat. Referenciához történő szekvencia illesztéssel állítottuk össze a teljes genomokat. RABV minták esetében a JQ944708 GenBank-i azonosítójú genomot használtuk referenciának a 31183-as mintához. Az így kapott konszenzus genom szolgált a többi RABV minta nukleotid szakaszainak referenciájaként. A vakcina minták esetében az EF206708 azonosítójú genom szolgált referenciaként. Az EBLV readeket az NC009527 számú genomhoz illesztettük. A kapott konszenzus genomokat manuálisan javítottuk és annotáltuk. A fent említett bioinformatikai lépéseket Geneious 9.1.8 (G9.1.8) program segítségével hajtottuk végre.

Az evolúciós és filogeográfiai elemzésekhez a kapott teljes genomokat egymáshoz illesztettük MAFFT algoritmussal a G9.1.8 szoftver segítségével. Esetleges rekombinációt vizsgáltunk az RDP4 programmal. Nukleotid diverzitást a DnaSP6 segítségével számoltunk. Szelekciós nyomás vizsgálatához a Datamonkey webszerver programjait használtuk. Filogenetikai fa generálásához a MEGA 6.06 programot hívtuk segítségül. Filogeográfiai elemzéshez az adatainkra legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztását a Jmodeltest és a MEGA 6.06 programokkal végeztük. Bayes alapú módszerrel szimulációt végeztünk a BEAST v1.10.0 program csomaggal. A BEAUti v1.10.0 használatával beállítottuk az adathalmaznak megfelelő szubsztitúciós modellt, szekvenciáinkkal együtt elemzendő jellegzetességeket (esetünkben mintavétel dátuma, mintavétel helye), molekuláris órát, populáció „prior”-ját és a megfelelő iterációt. BEAGLE segítségével gyorsabb és hatékonyabb BEAST futást értünk el. Az eredmények elemzéséhez a BEAST output log fájljainak egyesítésében és tömörítésében LogCombiner v1.10.0 segített. A Tracer v 1.6 programmal ellenőriztük a Markov-láncok konvergenciáját az ESS (Effectiv Sample Size) értékek alapján és leolvastuk a kapott szubsztitúciós rátákat. A BEAST programmal végzett számításból kapott „tree-output” tömörítését is a LogCombiner v1.10.0 szoftverrel végeztük, ezt követően a TreeAnnotator-ral összegeztük az adatokat és Maximum clade credibility (MCC) fát generáltunk, ami a Bayes-i filogenetikai számítások eredményeinek összegzése. A MCC filogenetikai fákat a FigTree v 1.4.3 segítségével ábráztuk. A kapott eredményeket SpreaD3 programmal illesztettük Európa térképére. A fehérje szintű elemzésekhez a nukleotid sorrendet átfordítottuk aminosav sorrendre a G9.1.8 programmal végeztük. Az eltérő leszármazási vonalba tartozó glikoproteinek harmadlagos szerkezetének vizsgálatához az I-Tasser online programot és a SwissModel szoftvert használtuk. A kapott pdb kiterjesztésű modelleket a Chimera 1.11 segítségével vizualizáltuk.

Eredmények

Magyarországi RABV genomok molekuláris epidemiológiája és evolúciója (2006-2018)

A 2006-2018-ból származó teljes RABV genomokból készített szekvenciaillesztés hossza 11 799 nukleotid volt. A RABV genomok azonossága 94,36% és 100% között változott. Filogenetikai fát generáltunk az általunk vizsgált RABV genomokból, hogy képet kapjunk a csoportok közötti lehetséges leszármazási irányokról. A II. és III. klaszteren belüli nt szintű azonosság (II. klaszter: 98,75% – 99,94%; III. klaszter: 98,64% – 100%) alapján nagyobb variabilitást mutattak, mint az I. klaszter törzsei (99,4 % – 100%). Időskálázott fákat generáltunk, hogy megbecsülhessük a magyarországi RABV törzsek leszármazási vonalainak szétválási idejét és ezzel jobban megértsük a járványügyi vizsgálatok mögött húzódó törvényszerűségeket. A Magyarországon 2006 óta azonosított RABV törzsek közös őse 170-180 évvel ezelőtt válhatott szét a ma ismert I., II., és III. klaszterre. Az I. leszármazási vonalhoz tartozó RABV mintákat azonosítási helyük szerint egymáshoz közelítőleg ~100 km-es távolságból jelentették, egymást követő évek során. Az I. klaszterbe tartozó RABV szekvenciákat vizsgálva megfigyeltük, hogy a nagyhegyesi minta eltér a többi I. klaszterbe sorolt vírustól és 1990-ben (± 7 év) már elvált a klaszter többi törzsétől. A II. klaszterbe tartozó RABV szekvenciák legkorábbi hazai képviselője Pusztaradványból származott (1970 környékén vált el), míg az ezt követő két évből jelentett RABV eseteket innen ~ 250 km-re Dél-Magyarország területéről azonosították. A III. klaszter esetében is látható a csoporton belüli diverzitás; a 2010-ben Pocsajról származó vírushinta a ~100 km-re fekvő, 2016-2017-ben bejelentett mintákkal alkot közelebbi csoportot, de így is jól elválik azoktól a törzsektől. A teljes genomszekvenciák meghatározása után végzett elemzések szerint a III.b (2013-2014-es járvány mintái) csoporton belül két leszármazási vonal létrejött (III.b1 és III.b2), melyek ráadásul nem is a járványos időszak során, hanem korábban, 2008 körül (95%HPD, 2007-2010) különültek el. A 2006 és 2018 között azonosított veszettségvírusok genomszekvenciáiból szubsztitúciós rátát számítottunk. Ez az érték a hazai RABV adathalmazra $1,75E-4$ nukleotidcsere/hely/év (95% HPD: $1,14E-4$ – $2,38E-4$) volt. A kódoló régiókra kapott szubsztitúciós ráták alapján az általunk vizsgált RABV törzsek L génje mutatta a leglassúbb ütemű változást ($2,17E-4$ nukleotidcsere/hely/év). A RABV genom egyes régióiban megfigyelt eltérő ütemű evolúciós változások felvetették annak lehetőségét, hogy a változások mögött valamiféle szelekciós nyomás érvényesül. Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogy a RABV kódoló régióin (CDS) belül mely kodonokon érvényesül pozitív szelekciós nyomás. A 2006-2018 között hazánkban kimutatott RABV törzsek fehérje kódoló régióin nem érvényesül tartós pozitív szelekció. A RABV genomok kódoló régióinak elemzése azt mutatta, hogy a glikoprotein és a foszfoprotein a két

legvariábilisabb fehérje. Az általunk vizsgált foszfoprotein és glikoprotein szekvenciák között klaszterre jellemző eltérést néhány aminosav pozícióban találtunk. Nem mutatkozott különbség a foszfoprotein C-terminális doménen, továbbá a vizsgált RABV glikoprotein szekvenciák konzervatívák mind az nAChR, mind a p75 neurotrofin-kötő helyeken.

A 2013-2014 során kitört veszettségjárvány idején azonosított RABV genomszekvenciák a III.b klaszterbe csoportosultak. Ez az adathalmaz nagyon homogén (nukleotid diverzitás érték: $\pi=0,00087$) és időben rendkívül rövid intervallumot (két év) fedett le, ezért a becslések valószínűségi intervallumai tágabbak. Az evolúciós számítások ($n=42$ róka minta felhasználásával) ugyanarra az időintervallumra tették a két szubklaszter (III.b1, III.b2) szétválásának idejét (2006; 95%HPD: 1998-2010), mint amit a teljesebb, 2006-2018 adathalmaznál a III.b klaszterre becsültünk (2008; 95%HPD: 2007-2010). A vírus Duna-Tisza köze területén jellemző terjedésének dinamikáját vizsgáló filogeográfiai elemzést is végeztünk. A szimuláció eredményeként az átlagos vírusterjedési sebességet évi 16,7 km-re (95% HPD: 6,4-27,6 km/év) becsültük, ami az időskálázott MCC fa adatainak figyelembe vételével azt sejtette, hogy a vírus nem a járványkitörés észlelt időszakában, hanem annál korábban terjedhetett szét a Duna-Tisza közén.

Európai és magyarországi részleges RABV nukleoprotein és glikoprotein szekvenciák filogeográfiai elemzése

A 2006-2018 közötti időintervallumból származó magyarországi RABV genomok elemzése a környező országok RABV törzseivel való rokoni kapcsolatokra nem világít rá, ezért reprezentatív számú GenBank-i szekvencia adatot gyűjtöttünk európai országokból származó RABV vírustörzsekről. Az 1990-es évekből származó magyarországi RABV minták szekvenciáit is bevontunk az elemzésbe, beleértve a GenBank-ban található ($n=6$) és az általunk szekvenált 1996-ból származó RABV törzs szekvenciáit is. A teljes genomszekvenciák elenyésző száma miatt az elemzésekhez az N és G gének részleges szekvenciáit tudtuk csak felhasználni. A GenBank-ban fellelhető európai RABV N fehérjét kódoló szekvenciák 20 országból, 1972-től 2017-ig terjedő időintervallumban gyűjtött mintákból származtak ($n=123$; 571 nt). Az illesztett szekvenciák nt szintű azonossága 88,9%-100% közöttinek bizonyult. Az összegyűjtött RABV részleges G szekvenciái (672 nt, nt szintű azonosság 91,4%-100%) ($n=198$), melyek 14 országot reprezentáltak, és tartalmazták a hazai (1991-2017) és a GenBank-ban fellelhető európai szekvenciákat (1882-2017). A RABV N génszekvenciák alapján az 1990-es évektől napjainkig hazánkban azonosított és genetikailag jellemzett RABV törzsek két nagyobb kládba sorolhatóak, a közép-európai és a kelet-európai kládba (Kuzmin-féle rendszer). A III.b. klaszterbe csoportosuló hazai RABV törzsek már körülbelül 2000-ben (95% HPD: 1996-2006) szétváltak a ma ismert közel rokon romániai RABV törzsektől; ez azt valószínűsíti, hogy a 2013-2014-es magyarországi

járványkitörés szülői törzsei Romániából származhattak. Az időskálázott fán a közép-európai kládon belül legalább 5 független behurcolásra utaló jelet láttunk, míg a kelet-európai kládon belül 6 ilyen esemény nyomait lehetett felfedezni.

RABV vakcina vírus kimutatása vörös rókából

2015 novemberében Csabaszabadin (Békés megye) egy másfél éves vörös rókát lőttek ki. A Csabaszabadi vakcinavírus-mintának, és annak egérbe oltott passzázsának, valamint kétszeri, N2a sejtvonalon felszaporított izolátumának genomját megszekvenáltuk (n=4). Az orális vakcinázási kampány során felhasznált Lysvulpen vakcina törzsek (n=5) genomszekvenciáját szintén meghatároztuk. A Csabaszabadi mintáról bebizonyosodott, hogy Lysvulpen vakcinából származott. Filogenetikai fa segítségével megállapítottuk, hogy a hazánkban használt Lysvulpen vakcina törzsek és a rókából kimutatott vakcina vírus közelebbi rokonságban álltak a SAD vakcinából származtatott törzsekhez (≤ 6 nt eltérés; $\geq 99.9\%$ nukleotid hasonlóság), mint az eredeti SAD Lysvulpen (EF206708) törzshöz. A kelet-európai RABV és a vakcina törzsek gyors meghatározására DIVA-TaqMan RT-PCR módszert fejlesztettünk.

Az EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológiai vizsgálata

Az első hazai EBLV-1 esetet 1999-ben azonosították, összesen hét esetet dokumentáltak 2017-ig. A hazai minták közül a 22540_2011 és az 52206_2015 törzsek teljes genom szekvenálását és a kapott szekvenciák szoftveres illesztését végeztük el. A GenBank-ban megtalálható EBLV-1 teljes genomokkal végeztük a filogenetikai és evolúciós elemzéseket (n=100); ezeket 10 országból írták le, a 1968 és 2015 közötti időszakból. Az EBLV-1 filogenetikai rekonstrukciója szerint az általunk felhasznált genomok két nagyobb leszármazási csoportra váltak szét, melyek az EBLV-1a (n=44) és az EBLV-1b (n=56) klaszterek voltak. Az EBLV-1a csoport további két klaszterre vált szét, míg az EBLV-1b négy kisebb filogenetikai csoportra tagolódott. Mindkét hazai vizsgált denevérvészesség vírus az EBLV-1a_I szubklaszterhez tartozott.

Az EBLV-1 genomokra nukleotid diverzitás értéket számítottunk; a teljes adathalmazra $\pi=0,02968$ értéket kaptunk. A két nagy klaszter nukleotid diverzitása $\sim 0,01$ körüli (0,01309 és 0,01798) volt. Az EBLV-1b_II csoport bizonyult a legvariábilisabb szubklaszternek. Az általunk elemzett EBLV-1 genomok becsült szubsztitúciós rátájának értéke $3,583E-5$ (95%HPD: $2,55E-5$ - $4,61E-5$). Az EBLV-1 adathalmaz alapján a foszfoprotein, a mátrixprotein és a glikoprotein gyorsabban evolválódik, mint a nukleoprotein és polimeráz enzim kódoló L CDS, a különbség azonban elenyésző (legfeljebb 1,2X). Az időskálázott fa alapján 1300-as évek környékén válhatott el az EBLV-1 két szubtípusa egymástól. A magyarországi származású szekvenciák szlovákiai, lengyelországi és dániai

mintákkal csoportosultak és a szlovákiai mintától ~1950-es években válhattak el. A filogenetikai fa és az MCC fa is alátámasztja, hogy az EBLV-1a csoportba tartoztak kelet-európai genomok is, míg az EBLV-1b leszármazási vonalba tartozó minták Nyugat-Európából származtak. Az EBLV-1 leszármazási vonalainak terjedési irányaira vonatkozó sejtéseinket statisztikailag is szükségesnek éreztük alátámasztani. Ezért az EBLV-1a és EBLV-1b leszármazási vonalak evolúciós számításaiból kapott eredményekből a lehetséges terjedési irányok valószínűségét számítottuk. Az EBLV-1a klaszterbe tartozó vírusok Közép-Európából főleg keleti irányba terjedtek. Feltételezhető, hogy Magyarországon azonosított EBLV-1a vírusok Lengyelországból kerülhettek hazánkba. Az EBLV-1b Nyugat-Európából terjedt tovább kelet felé. Vizsgáltuk az EBLV-1 génekre ható szelekciós erők hatását. Az EBLV-1a glikoprotein szekvenciákban a 244. as és az EBLV-1b szekvenciákban a foszfoprotein 141. as áll pozitív szelekció hatása alatt. A patogenitásban fontosabb szerepet betöltő fehérjék klaszter szintű eltéréseit a G és P kódoló régiók as illesztésében vizsgáltuk. Az EBLV-1 glikoprotein szekvenciák as sorrendjében két pozícióban találtunk a klaszterekre jellemző különbséget: a 19. as és a 224. pozícióban.

Megbeszélés

RABV fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata

A 2013-2014-es veszettség járványt a Duna-Tisza közén azonosították, a felderített esetek alapján a vírus egy ~10 000 km² méretű területen cirkulált. Ebben a régióban nem vakcináltak 2008 óta egészen a járvány kitöréséig. 2008-2013 között csupán a déli és keleti határszakaszokon, a határ menti 50 km-es zónában helyeztek ki csalétek-vakcinát. A 2013-2014 során azonosított veszettség eseteket megelőző két évben Magyarországon nem diagnosztizáltak RABV okozta megbetegedést, ellenben 2013 augusztusában az ország közepén, Kecskeméten egy veszettséggel fertőzött vörös rókát találtak és 2014 októberéig további 46 RABV okozta fertőzést dokumentáltak. A közel teljes hosszúságú genomszekvenciák elemzése és az evolúciós becslések rámutattak, hogy a 2013-2014-es járványban azonosított RABV genomok valójában két klaszterbe csoportosultak, melyek 2008 környékén válhattak szét. A közép-magyarországi rabies járvány előhírnökei, tehát már évekkel korábban két genetikai ágra váltak szét és ez a folyamat akár korábbi hazai, surveillance alá nem vont területeken is lezajlódhatott. A matematikai modellekből már ismert és általánosan elfogadott becslés szerint a vörös rókák által terjesztett rabies évenként 30-60 km-t is nyomulhat előre. Ezt az értéket természetesen számos tényező (domborzat, időjárás, populációsűrűség, rabies elleni vakcinázás) befolyásolhatja. A kevésbé fogékony (azaz vakcinázott) rókák esetében például 10-25 km/év a szakirodalmi adat a vírusterjedési sebességre. A genomszekvenciákra és a törzsek származási idejére és helyére épülő

számítások lassúbb terjedésről (~17 km/év) árulkodtak a hazai 2013-2014-es járványkitörésnél, ami a publikált adatokkal (10-60 km/év) jól egybevetethető. Mindezt csak úgy lehetséges értelmezni, ha a vírus éveken át cirkulált észrevétlenül az érintett területen. Arra a kérdésre, hogy miért az ország közepénél tört ki a 2013-as járvány az egyik lehetséges magyarázat szerint vízi életmódot is folytató kisméltóságokban (hód, vidra, pézsmapocok) lappanghatott és terjedhetett a vírus, mivel ezek a fajok képesek lehetnek a Tiszán könnyedén átkelni. Azt sem lehet kizárni, hogy borzban, nyestben, nyestkutyaiban, mosómedvében is lappanghatott a vírus; ez esetben azzal kell kalkulálni, hogy ezeknek a gazdaállatoknak több időt vehetett igénybe eljutni arra a Duna-Tisza köze területre, ahol a járványkitörés lezajlott. A hazai aktív monitoring kizárólag vörös rókéra terjed ki, azonban passzív szűrővizsgálat során minden lehetséges gazdafajt megvizsgálunk. Az utóbbi vizsgálatoknak köszönhetően 1987-től 2018-ig tudomásunk van veszettséggel fertőzött nyestkutya (n=1), borz (n=9) és kisméltóság (n=59) esetekről. A kisméltóságok vándorlásának sajátosságai, továbbá az a tény, hogy a csalétekvakcina elsősorban rókákat vonz (bár ritkán borzok is elfogyaszthatják), megerősíteni látszanak azt a lehetőséget, hogy amennyiben a 2013-2014-es járványt előidéző RABV törzs közép-magyarországi megjelenése vadon élő állatokhoz köthető, akkor abban talán kisméltóságok is részt vehettek.

Amennyiben a III.b klaszter vírusai által előidézett 2013-2014-es járványról végzett számítások helyesek, úgy érdemes újragondolni az elmúlt évek során hazánkban azonosított RABV járványok dinamikájáról alkotott képet is. A 2006-tól 2010-ig, és a 2014 után dokumentált hazai rabies esetek az aktuálisan kijelölt vakcinázási zónákon belül, az adott területen végzett surveillance-nek köszönhetően kerültek azonosításra. Több alkalommal valamely földrajzi régióban sporadikusan kerültek elő RABV fertőzött vad- és háziállatok (lásd Pusztaradvány, 2008, II.a klaszter; Nagyhegyes, 2007, I.b klaszter; Pocsaj, 2010, III.a klaszter), melyek molekuláris szinten távolabbi rokonságot mutattak. Más esetekben a sporadikus izolátumok mögött genetikai egyezést találtunk, ami időben elhúzódó látens járványra utaló jelként is értelmezhető (például Szerencs és környéke, 2016-2017, III.c klaszter; Nyírlugos és környéke, 2006-2009, I.a klaszter). Figyelembe véve a filodinamikai elemzések eredményeit, és kiemelve az egy gócpont körül azonosított, időben izolált eseteket arra következtetünk, hogy az azonosított esetek mellett ismeretlen számú nem-identifikált rabies eset is előfordulhatott. Az alacsony mintaszámmal reprezentált járványkitörések nagyságrendjét azonban utólag nehéz megbecsülni.

A fenti számítások rámutattak arra, hogy a teljes genom szekvenciákon alapuló molekuláris epidemiológiai és evolúciós vizsgálatok segíthetnek pontosabb képet alkotni egy adott területen zajló járvány kialakulásáról és dinamikájáról, azonban csak a szomszédos országokból publikált adatok fényében kaphattunk ennél is részletesebb képet arról, hogy a kérdéses vírus mely földrajzi régióból származhatott. Számításokat végeztünk száznál több

európai és 67 hazai részleges RABV genom szekvencia bevonásával. Az 1990-es években hazánkból származó RABV törzseket a 2000-es évek közepétől Magyarországon már nem lehetett kimutatni. A részleges N és G gén szekvenciákból kapott MCC fa alapján a 2006-2017 között kimutatott három magyarországi RABV klaszter további szubklaszterekre volt tagolható. Feltételezésünk szerint az utóbbi idők hazai járványaiban ezeknek a RABV klasztereknek részben egymástól független behurcolásait sikerült dokumentálni. Külön kiemelve a 2013-2014-es járványkitörést, a III.b klaszter N génjének szekvencia elemzéséből arra következtettünk, hogy az eredeti vírustörzs Romániából származhatott, míg a III.b klaszter további két genetikai vonalra történő szétválása Magyarországon mehetett végbe. Az adatok megfelelő kiértékeléséhez és értelmezéséhez a molekuláris epidemiológiai vizsgálatok egységesítésére lenne szükség, tehát teljes génekkel és lehetőség szerint teljes genomokkal lenne érdemes az elemzéseket végezni.

Molekuláris epidemiológiai vizsgálataink további érdekessége volt egy vakcina-eredetű rabies azonosítása vörös rókából, amely az első hazánkból származó leírás. A csaláttal kihelyezett vakcinák élő, attenuált vírustörzset tartalmaznak, mely képes lehet neuroinvazív fenotípusban megnyilvánulni és megbetegedést okozni bizonyos körülmények között. Laboratóriumi kísérletek is alátámasztják a fenti állítást. Dokumentálták vadonélő állatok SAD Bern vagy SAD B19 vakcina vírus törzs által indukált sporadikus fertőződését Ausztriában, Németországban, Lettországon, Romániában, Svájcban és Szlovéniában az orális vakcinázási kampányt követően. A Csabaszabadi mellett lőtt vörös rókából származó vírushinta és a korábbi vakcinázási kampányok során kihelyezett Lysvulpen vakcina vírustörzsek 99,9% feletti genom szintű azonossága, továbbá a pozitív tetraciklin marker teszt alátámasztja, hogy a korábbi vakcinázási kampány során kihelyezett vírustörzs okozta ezt a fertőzést. Az ilyen jellegű esetek monitorozásának fontossága miatt szükségét éreztük egy olyan DIVA TaqMan módszer kifejlesztésének, mely képes meghatározni és elkülöníteni a kelet-európai vad RABV törzsektől a vakcina törzseket.

Az intenzív magyarországi rabies eliminációs program továbbra is sikeres. Azonban a szomszédos országokban (Ukrajna, Románia, Szerbia) még nem jártak sikerrel a rabies mentesítés terén. Ezért továbbra is számítani lehet arra, hogy a szilvaticus rabies időnként felüti fejét Magyarországon is. Ezek lehetnek sporadikusnak megítélt esetek vagy jelentkezhetnek járványos formában is. Jelenleg Magyarországon a rabies-mentesítési program és az azt kísérő monitoring EU-s direktívák mentén szerveződik. Ez a rendszer nagy biztonsággal jelezheti a RABV jelenlétét egy surveillance alá vont területen. Fontos hangsúlyozni, hogy a molekuláris epidemiológiai felmérésekben szorosabb együttműködésre lenne szükség a szomszédos országokkal, ami - feltételezve a RABV elsődlegesen Magyarországra mutató behurcolási irányát - hazánk szemszögéből kulcsfontosságú és segíthet jobban értelmezni az egyes RABV variánsok eredetét és terjedésének dinamikáját.

A surveillance elől esetlegesen rejtve maradt rabies esetek feltárása érdekében megfontolásra érdemesnek tűnik az is, hogy a surveillance-t más gazdafajokra is kiterjesszük.

Az EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológiai vizsgálata

A teljes EBLV-1 genomokkal történő evolúciós elemzésektől azt vártuk, hogy pontosabb képet kapunk a hazai törzsek evolúciós mechanizmusairól és földrajzi eredetéről. A hét hazai EBLV-1 minta közül kettő volt alkalmas arra, hogy a teljes vírusgenomot meghatározzuk. A magyarországi EBLV-1 szekvenciákkal kiegészítve a Bayes-i statisztikai számítások a vírus evolúciós rátáját tekintve a publikált adatokéval összevethető eredményeket adtak (EBLV-1a, $3,45E-5$ vs $3,01E-5$; EBLV-1b, $4,04E-5$ vs $4,07E-5$). Az EBLV-1 két szubtypusának (EBLV-1a és EBLV-1b) térhódítása feltételezhetően kétirányú folyamat; az EBLV-1b Észak-Afrika irányából Dél-Spanyolországon keresztül terjedt el Európa más, nyugati fekvésű országaiban, míg az EBLV-1a esetében nyugat-keleti irányú elterjedés figyelhető meg. Franciaországban és Hollandiában mindkét genetikai csoport reprezentatív törzseit megtalálták. Az evolúciós becslések eredményeiből generált posteriori valószínűségek alapján megvizsgáltuk az EBLV-1a és EBLV-1b terjedési irányait Európán belül, s e vizsgálatok megerősíteni látszanak a szakirodalmi adatokat a vírus terjedésére vonatkozóan mindkét szubtypus esetében. Az általunk szekvenált EBLV-1a törzsek valószínűleg hazánk és Lengyelország között vándorló denevérfajok közvetítésével kerültek Magyarországra. Az EBLV-1 vírust az esetek nagy részében - hazánkban is - közönséges késeidenevérből mutatták ki, ami azt sejteti, hogy az EBLV-1 különböző genetikai változatai egyaránt jól adaptálódtak ehhez a gazdafajhoz. A közönséges késeidenevér nem vándorol, ezért az EBLV-1 földrajzi elterjedését feltehetően a közönséges késeidenevérral együtt élő egyéb, a vírusra fogékony denevérfajok segítik elő. Példának okáért a durvavitorlájú törpedenevérről (*Pipistrellus nathusii*) feltételezhető, hogy szerepet játszik az EBLV-1 terjesztésben, mert nagy területeken vándorló és igen elterjedt denevérfaj.

Jelenleg hazánkban kevés a denevérek mentésével foglalkozó szervezet, így nincsen megfelelő gyűjtési pont és diagnosztikai háttér a fővárostól távolabbi országrészekben; ugyanakkor egy szervezett, egész országra kiterjedő aktív, felmérő jellegű vizsgálatsorozat hiánypótló lenne. Ehhez a szűréseket minél több hazai denevérfajra érdemes lenne kiterjeszteni.

Új tudományos eredmények

1. Magyarországon először végeztünk veszettséggel kapcsolatos genomi epidemiológiai vizsgálatokat. A 2006-2017 között kimutatott RABV 79,2%-át bevontuk a vizsgálatokba és összesen 61 újonnan meghatározott RABV genomszekvenciát felhasználva végeztük az elemzéseket. A RABV genomszekvenciákra épülő számítások segítettek új alapokra helyezni a hazai RABV járványkitörések értelmezését.
2. Genom szintű vizsgálatokkal támasztottuk alá, hogy hazánkban az elmúlt 12 évben a RABV három genetikai klaszterének variánsai cirkuláltak. A három klaszteren belül további hét genetikai vonalat azonosítottunk, ami valószínűsíthetően legalább ugyanennyi független behurcolásról árulkodik. Feltételezzük, hogy az 1990-es évekből ismert magyarországi RABV variánsok a 2000-es évek közepére hazánkban kihaltak.
3. A genomszintű elemzések mutattak rá néhány, korábban félreértelmezett jelenségre és segítettek a megértésben. Ez érintette a 2013-2014-es járvány klonalitására vonatkozó korábbi megállapításokat is, de szekvenciaadatok és térinformatikai háttér adatok felhasználásával sikerült becslést adni a vírus terjedésének sebességére, valamint az evolúciós változások ütemére is, melyek fényében a hazai esethalmozódások mögött időben elhúzódó és az aktív monitoring számára észrevétlen víruscirkulációt sejtünk.
4. Hazánkban először írtunk le vakcina eredetű rabiést, mégpedig vörös rókából. Az azonosított vakcinavírus genomszerkezeti hasonlóságát vizsgálva megállapítottuk az itthon alkalmazott Lysvulpen vakcina törzsekkel mutatott genetikai egyezést.
5. Kidolgoztunk a RABV vakcinavírusok és vad típusú RABV törzsek elkülönítésére szolgáló DIVA Taq-Man RT-PCR rendszert. A módszer DNS szekvenálás alkalmazása nélkül segítheti a vakcina eredetű esetek gyors identifikálását.
6. Megalapoztuk a denevérveszetség genomi epidemiológiájának laboratóriumi hátterét is. Annak ellenére, hogy az esetszám alacsony volt, az EBLV-1 szekvenciák vizsgálatából kiderítettük, hogy a hazai törzsek az EBLV-1a klaszterbe tartoznak és az evolúciós becslésekből kapott adatok alapján valószínűsíthetően Lengyelország irányából juthattak hazánkba vándorló denevérfaj(ok) közvetítésével.

A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

- Hornyák Á., Juhász T., Forró B., Kecskeméti S., Bányai K.: **Resurgence of rabies in Hungary during 2013–2014: An attempt to track the origin of identified strains**, *Transbound. Emerg. Dis.*, 65. e14-e24, 2018. IF: 3,504
- Forró B., Bányai K., Sós E., Hornyák Á.: **A denevérvészesség aktuális helyzete Magyarországon**, *Magy. Álla. torv. Lap.*, 140. 485-494, 2018. IF: 0,196
- Forró B., Marton Sz., Kecskeméti S., Hornyák Á., Bányai K.: **Vaccine-associated rabies in red fox, Hungary**, *Vaccine*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.014>, 2019. IF: 3,285

A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

- Palya V., Walkóné K.E., Marton Sz., Tatár-Kis T, Felföldi B., Forró B., Domán M., Bányai K.: **Novel Orthobunyavirus Causing Severe Kidney Disease in Broiler Chickens, Malaysia, 2014–2017**, *Emerg. Infect. Dis.*, 25. 1110-1117, 2019. IF: 7,422
- Sulyok K.M., Kreizinger Zs., Bekő K., Forró B., Marton Sz., Bányai K., Catania S., Ellis C., Bradbury J., Olaogun O.M., Kovács Á.B.: **Development of Molecular Methods for the Rapid Differentiation of Mycoplasma gallisepticum Vaccine Strains from Field Isolates**, *J Clin Microbiol.*, 57.e01084-18. 2019. IF: 4,054
- Tóth R., Mészáros I., Hüser D., Forró B., Marton S., Olasz F., Bányai K., Heilbronn R., Zádori Z.: **Methylation Status of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2)**, *Viruses.*, 11. 38, 2019. IF: 3,761
- Marosi A., Dufkova L., Forró B., Felde O., Erdélyi K., Širmarová J., Palus M., Hönig V., Salát J., Tikos R., Gyuranecz M.: **Combination therapy of rabies-infected mice with inhibitors of pro-inflammatory host response, antiviral compounds and human rabies immunoglobulin**, *Vaccine.*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.066>, 2019. IF: 3,285
- Kaszab E., Marton S., Forró B., Bali K., Lengyel G., Bányai K., Fehér E.: **Characterization of the genomic sequence of a novel CRESS DNA virus identified in Eurasian jay (Garrulus glandarius)**, *Arch. Virol.*, 163. 285-289, 2018. IF: 2,57
- Gróznér D., Forró B., Sulyok K.M., Marton S., Kreizinger Z., Bányai K., Gyuranecz M.: **Complete genome sequences of Mycoplasma anatis, M. anseris and M. cloacale type strains**, *Genome. Announc.*, 7. e00939-18, 2018. IF: 1,18

- Gellért Á., Pósa T., Fábrián A., Szabó L., Bóka K., Forró B., Salánki K., Drahos L., Tóth E., Juhász A., Balázs E.: **A single point mutation on the cucumber mosaic virus surface induces an unexpected and strong interaction with the F1 complex of the ATP synthase in *Nicotiana clevelandii* plants**, *Virus. Res.*, 251. 47-55, 2018. IF: 2,484
- Marton S., Dóró R., Fehér E., Forró B., Ihász K., Varga-Kugler R., Farkas S.L., Bányai K.: **Whole genome sequencing of a rare rotavirus from archived stool sample demonstrates independent zoonotic origin of human G8P[14] strains in Hungary**, *Virus. Res.*, 227. 96-103, 2017. IF: 2,628
- Fehér E., Kaszab E., Forró B., Bali K., Marton S., Lengyel G., Bányai K.: **Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1**, *Arch. Virol.*, 162. 3925-3929, 2017. IF: 2,058
- Fehér E., Doszpoly A., Horváth B., Marton S., Forró B., Farkas S.L., Bányai K., Juhász T.: **Whole genome sequencing and phylogenetic characterization of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) origin ranavirus strains from independent disease outbreaks**, *Infect. Genet. Evol.*, 45. 402-407, 2016. IF: 2,885
- Forró B., Eszterbauer E.: **Correlation between host specificity and genetic diversity for the muscle-dwelling fish parasite *Myxobolus pseudodispar*: examples of myxozoan host-shift?**, *Folia. Parasitol.*, 63. 1, 2016. IF: 1,30
- Marton S., Bányai K., Forró B., Lengyel G., Székely C., Varga Á., Molnár K.: **Molecular genetic investigations on *Balantidium ctenopharyngodoni* Chen, 1955, a parasite of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)**, *Acta. Vet. Hung.*, 64. 213-221, 2016. IF: 1,14
- Eszterbauer E., Forró B., Tolnai Z., Guti C.F., Zsigmond G., Hoitsy G., Kallert D.M.: **Parental genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) brood stock affects offspring susceptibility to whirling disease**, *Parasit. Vectors.*, 8. 141, 2015. IF: 3,62
- Kallert D.M., Forró B., Eszterbauer E.: **Inosine-arginine salt as a promising agent for in vitro activation of waterborne fish-pathogenic myxozoan actinospores**, *Dis. Aquat. Organ.*, 109. 149-154, 2014. IF: 2,24
- Eszterbauer E., Sipos D., Forró B., Holzer A.S.: **Molecular characterization of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa), the agent of gill sphaerosporosis in common carp *Cyprinus carpio carpio***, *Dis. Aquat. Organ.*, 104. 59-67, 2013. IF: 2,17

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Bányai Krisztiánnak, hogy lehetőséget biztosít, hogy a témacsoportjában folyó kutatásokban részt vehessek. Hálás vagyok a rám fordított idejéért és elhullajtott hajszálaiért egyaránt. Köszönöm az izgalmas és kihívásokkal teli doktori témát és, hogy doktori munkám során mindig számíthattam a segítségére.

Hálásan köszönöm Dr. Hornyák Ákosnak, hogy rendelkezésemre bocsájtotta a hazánkban azonosított veszettség mintákat. Továbbá köszönöm a rengeteg szakmai és emberi tanácsát.

Köszönettel tartozom Dr. Cadar Dánielnek, hogy segítséget nyújtott a BEAST program megismeréséhez. Külön köszönet illeti, Dr. Kisfali Pétert, hogy rendelkezésemre bocsátotta a MIC real-time PCR gépet a vakcina és vad típusú RABV törzsek elkülönítésére szolgáló TaqMan RT-PCR módszer fejlesztéséhez.

Köszönöm Dr. Marton Szilviának, Kaszab Eszternek, Nagy Borbálának, Kovács Eszternek, Dr. Fehér Enikőnek, Varga-Kugler Renátának, Bali Krisztinának, Domán Marinnának, Jakab Szilviának, hogy nem csupán kollégaként, hanem barátként is támogattak a munkám során. Az „Új kórokozók felderítése” témacsoport összes munkatársának köszönöm az általuk teremtett vidám légkört és hogy egy ilyen összetartó csapat részese lehetek.

Külön köszönet illeti Kaszab Esztert és Gutti Csabát a dolgozatom lelkiismeretes átolvasásáért és „magyarítására” vonatkozó tanácsaiért.

Hálásan köszönöm családomnak, hogy elfogadják az érdeklődésiköröm és a „rendszámtáblás” gondolkodási módom. Köszönet illeti páromat, Gutti Csabát a mindennapokban biztosított nyugodt és harmonikus háttéréért. Köszönöm, hogy folyamatosan támogat és, hogy humorával, őszinteségével mindig tovább lendít a mélypontokon.

Köszönöm Láris Barnabásnak, Bors Eszternek, Bordi Beának, Dr. Ballmann Mónikának, hogy igaz barátként támogatnak és elfogadnak, olyannak amilyen vagyok.

A doktori munkámhoz elengedhetetlen anyagi fedezetet részben témavezetőm által elnyert Lendület program, részben az Asklepios (Advanced Studies towards Knowledge on Lyssavirus Encephalitis Pathogenesis Improving Options for Survival, EU FP7) pályázat biztosította, Dr. Gyuranecz Miklósnak köszönhetően.