

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**A veszettség molekuláris epidemiológiája
Magyarországon**

PhD értekezés

Forró Barbara

2019

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető:

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

Készült 9 példányban. Ez az sz. példány.

.....
Forró Barbara

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Összefoglalás	6
2.1 Summary	7
3. Bevezetés	8
4. Irodalmi áttekintés	9
4.1 A veszettségről általánosságban.....	9
4.2 A veszettségvírus rendszertana	11
4.3 A veszettségvírus morfológiája, genomi szerveződése és élelciklusa	12
4.4 A veszettség patogenezise és immunológiája	15
4.5 A veszettség epidemiológiája	18
4.6 A veszettség tünetei	20
4.7 A veszettség elleni védekezés és terápia	21
4.8 A veszettség laboratóriumi diagnosztikája	22
4.9 A veszettségvírus hazai előfordulása	24
4.10 Célkitűzések	29
5. Anyag és módszer	30
5.1 A vizsgált minták eredete és származási helye	30
5.2 A vírusmintákhoz használt molekuláris vizsgálatok	32
5.2.1 Lyssavírus genomi RNS felerősítése RT-PCR módszerrel	32
5.2.2 PCR termékek tisztítása.....	34
5.3 Lyssavírusok kimutatása TaqMan RT-PCR módszerrel	35
5.4 Új generációs szekvenálás.....	36
5.5 Sanger-féle szekvenálás	36
5.6 Bioinformatikai módszerek	37
5.6.1 Szekvenciaillesztés és annotálás.....	37
5.6.2 Evolúciós és filogeográfiai elemzések	37
5.6.3 Fehérje szintű elemzések.....	39
6. Eredmények	40
6.1 Magyarországi RABV törzsek molekuláris epidemiológiája és evolúciója (2006-2018)	40
6.1.1 Magyarországi RABV genomok általános jellemzői (2006-2018).....	40
6.1.2 Magyarországi RABV törzsek evolúciós változásainak elemzése (2006-2018)	44
6.1.3 Patogenitásban szerepet játszó fehérjék klaszterenkénti variabilitása	47
6.2 Egy váratlan veszettségjárvány vírusizolátumainak jellemzése	50
6.2.1 A 2013-2014 évi járvány során azonosított RABV genomok evolúciós változásainak elemzése	51
6.3 Európai és magyarországi részleges RABV nukleoprotein és glikoprotein szekvenciák filogeográfiai elemzése	54
6.4 RABV vakcina vírus kimutatása vörös rókából	59

6.5 EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata	64
6.5.1 Hazai EBLV-1 esetek összefoglaló bemutatása	64
6.5.2 EBLV-1 filogenetikai vizsgálatok részleges kódoló régiók alapján	64
6.6 EBLV-1 törzsek evolúciós elemzése teljes genom szekvenciák alapján	66
6.6.1 EBLV-1 teljes genomok általános vizsgálata	66
6.6.2 EBLV-1 teljes genomok evolúciós elemzése	71
7. Megbeszélés	77
7.1 RABV fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata	77
7.2 EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata	85
8. Új tudományos eredmények.....	87
9. Irodalomjegyzék	88
10. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények	99
10.1 Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	99
10.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk	99
11. Köszönetnyilvánítás.....	101
12. Függelék	102
12.1 Az evolúciós elemzésekhez használt genom szekvenciák GenBank-i azonosítói	102
12.2 Az evolúciós elemzésekhez használt részleges N szekvenciák GenBank-i azonosítói	103
12.3 Az evolúciós elemzésekhez használt részleges G szekvenciák GenBank-i azonosítói	104

1. Rövidítések jegyzéke

as	aminosav
ÁSZIR	Állategészségügyi Számítógépes Információs Rendszer
BEAST	molekuláris szekvenciák Bayesian analízise (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees)
BEAUti	Bayesian analízis input generálására szolgáló grafikus felület (Bayesian Evolutionary Analysis Utility)
CDS	kódoló genomi régió (CoDing Sequence)
DIVA	fertőzött állat elkülönítése vakcinázottól (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)
EBLV	európai denevérvészesség vírus (European Bat Lyssavirus)
ERIG	ló veszettség vírus immunoglobulin (Equine Rabies Immunoglobulin)
ESS	hatékony minta elemszám (Effectiv Sample Size)
HDCV	humán diploid sejteken előállított vakcina (Human Diploid Cell Vaccine)
HRIG	humán veszettség vírus immunoglobulin (Human Rabies ImmuneGlobulin)
MCC	időskálázott filogenetikai fa (Maximum Clade Credibility)
MCMC	Markov lánc Monte Carlo módszer (Markov Chain Monte Carlo)
N2a	rágcsáló neuroblasztóma sejtvonala (murine neuroblastoma cell line)
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (National Food Chain Safety Office)
nt	nukleotid (nucleotide)
OIE	Állategészségügyi világszervezet (World Organization for Animal Health)
ORF	leolvasási keret (Open Reading Frame)
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
RABV	veszettség vírus
SNP	pontmutáció (Single Nucleotide Polymorphism)
TaqMan RT-PCR	reverz transzkripció PCR TaqMan próbával (TaqMan Reverse transcription PCR)
TCM	tetraciklin marker (TetraCycline Marker)
TMRCA	közös őstől való genetikai szétválás ideje (Time to Most Recent Common Ancestor)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

2. Összefoglalás

Az agy- és gerincvelő gyulladásban megnyilvánuló veszettség eseteket eddigi ismereteink alapján hazánkban a Rabies vírus (RABV) és az Európai denevérveszetttség-1 vírus (EBLV-1) törzsek okozzák.

Munkám megkezdésekor nem állt rendelkezésre az elmúlt időszak hazai RABV járványtani eseteit összegző leírás, ezért célul tűztük ki az 1996 és 2018 között azonosított magyarországi RABV minták adatainak feldolgozását és teljes genom szekvenálását annak érdekében, hogy molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végezzünk. 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.

Az elvégzett evolúciós becslések alapján a 2000-es évek óta lappanghatott hazánkban az a RABV törzs, ami valószínűsíthetően Románia irányából érkezett hazánkba. A járvány megjelenését az ország közepén magyarázhatja, hogy 2008-tól 2013 tavaszáig, kizárólag Szlovéniától Ukrajnáig, csak a határ menti 50 km-es sávban helyeztek ki csalétekvakcinákat. Az 1990-es évektől napjainkig, összességében három különböző leszármazási vonalhoz tartozó, egymástól genetikailag eltérő RABV törzs elterjedését detektáltuk hazánkban és legalább 7, időben független behurcolást azonosítottunk.

Ezen kívül lehetőségünk volt egy 2015-ben, Magyarországon először kimutatott vakcina indukált RABV fertőzés molekuláris szintű elemzésére is. Elvégeztük az ebben az időszokban alkalmazott csalétekvakcinák genomszintű összehasonlítását és megbizonyosodtunk az eset vakcina eredetéről. A hazai vakcina vírus genomok egymással magas homogenitást mutattak, ugyanakkor eltértek a törzs GenBank-ban fellelhető szekvenciájától, ezért kifejlesztettünk egy DIVA-TaqMan PCR módszert a kelet-európai vad RABV törzsek és a vakcina törzsek megkülönböztetésére.

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. Megállapítottuk, hogy az EBLV-1b Franciaországból terjedt északkeleti irányba. Közép és Kelet Európában az EBLV-1a előfordulása domináns, azonban a kelet-európai régióban jóval kevesebb dokumentált EBLV-1 esetről van tudomásunk, így további szűrővizsgálatok szükségesek az egyes EBLV törzsek előfordulásának feltérképezéséhez.

2.1 Summary

According to our knowledge Lyssavirus induced encephalomyelitis is caused by rabies virus (RABV) and *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1) in Hungary.

Our goal was to perform molecular epidemiology analysis of RABV in Hungary, therefore we sequenced 61 local RABV isolates, collected between 1996 and 2018. In addition, we aimed to determine the origin of the unexpectedly emerged rabies outbreak in the central region of Hungary during 2013-2014. We also made attempts to analyze the spatial dispersion and the lineage-specific evolution of the RABV strains in Hungary.

Due to the performed phylogeographic analysis we established that the common ancestor of the RABV strain might be a Romanian virus strain smoldering in Hungary since 2000. Between 2008 and 2013, Hungarian vaccination campaigns took place only in a 50 km wide zone by the north-east border, which could explain the localization of the outbreak. Overall, we found genomic evidence for three genetically different lineages of RABV and at least 7 independent introductions of the virus in Hungary.

Besides we sequenced the genome of the first RABV vaccine-derived case in Hungary, diagnosed from a red fox in 2015. We performed genome sequencing from five oral vaccine samples that had been used between 2012 and 2015 in the Hungarian oral vaccination campaign. We found high homology among the Hungarian vaccine genomes, however these showed low identity with the vaccine strain deposited to GenBank. Based on our findings we developed a DIVA-TaqMan PCR method for differentiation of Eastern-European wild RABV and vaccine strains.

We collected all available information about the Hungarian EBLV-1 isolates, and performed genome sequencing of two EBLV-1 virus samples. Our intention was to find the spreading direction of EBLV-1a and EBLV-1b lineages in Europe. EBLV-1b is spreading towards north-eastern Europe from Western Europe. EBLV-1a is dominant in Eastern-Europe and spreads towards Asia. The available information is scarce about EBLV-1 in the eastern part of Europe therefore further surveillance is required for more accurate molecular epidemiology results.

3. Bevezetés

A *Lyssavirus* nemzetség tagjai közé tartozó rabies vírus 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 urbánus 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 csalétekvakcinák 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 2014. október elejéig tartott, ezt követően visszaestek évi egy-kettőre a detektált RABV esetek. A denevérek terjesztette EBLV vírus monitorozására kevesebb lehetőség van jelenleg hazánkban, passzív szűrővizsgálatok során eddig 7 esetet dokumentáltak.

Korábban nem született átfogó molekuláris epidemiológiai vizsgálat e két vírus genetikai és járványtani tulajdonságaira Magyarországon. Ezt a hiányt szeretnénk 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, genetikai tulajdonságainak felderítéséhez.

Lehetőségünk nyílt a hazai csalétekvakcinázás során használt Lysvulpen vakcina vírus törzsekből és egy vakcina okozta vörös róka fertőzésből nyert minta szekvenálására, így megvizsgálhattuk a vakcina vírus genomok variabilitását is.

4. Irodalmi áttekintés

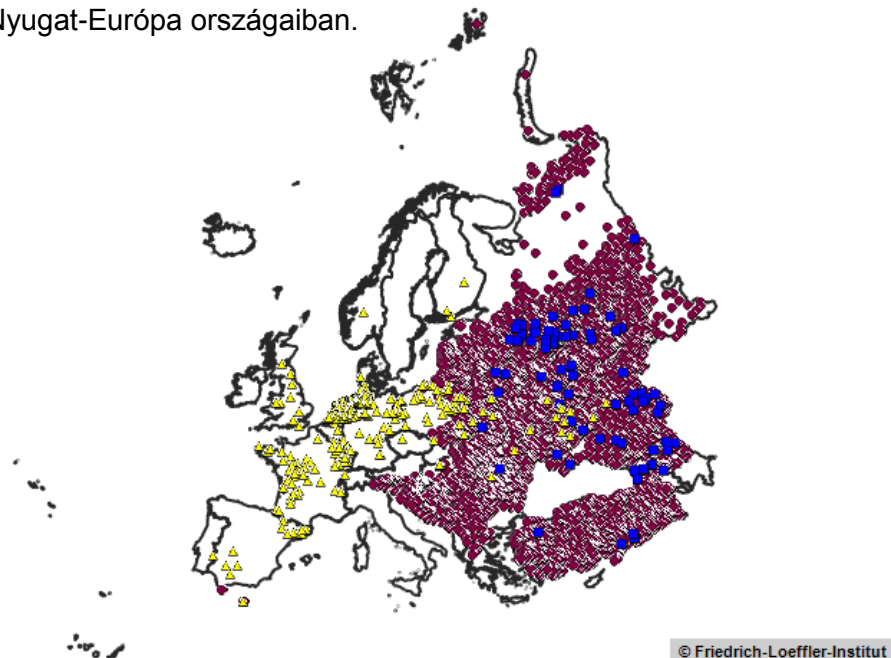
4.1 A veszettségről általánosságban

A veszettség az idegrendszert érintő zoonotikus fertőző betegség, amely agy- és gerincvelő gyulladás formájában jelentkezik emlősök esetében. A „Lyssa” görög eredetű szó jelentése düh, tombolás, őrjöngés, ami a betegség dühöngő lefolyású változatára utal. Az első írásos feljegyzések a betegségről idősámításunk előtt körülbelül a XXIII. századból származnak. Mezopotámiában kőtáblába vésett törvényben rendelkeztek a kárptlás mértékéről, amit a kutya tulajdonosának kellett megfizetni, ha állata a harapásával egy másik ember halálát okozta. A feljegyzések szerint imádkoztak két, a betegség kapcsán felelősnek vélt Istenhez, Aristeaushoz, aki megelőzte azt, és Artemishez, aki gyógyította. Valójában nem volt pontos diagnózis egészen a XIX. századig, nem tudták a kórokozót meghatározni, így megelőzni sem, és semmilyen hatékony kezelés nem állt rendelkezésre sem az állatok, sem az emberek számára (Jackson és Wunner, 2007). A középkor előtti időkből kevés veszettségvírus okozta esetről van információnk Európában. Az egyik első dokumentált járványt veszett farkasok okozták 1271-ben Frankföldön (a mai Bajorország északi része), amely több mint 30 ember halálához vezetett (Steele, 1975). A XVI. században Európa több országában is feljegyeztek kutyák terjesztette veszettség járványt, Belgiumban, Ausztriában, Magyarországon, Törökországban is dokumentáltak eseteket. A feljegyzések alapján az 1700-as évekre Európa-szerte gyakori volt a rókák és farkasok terjesztette veszettség (King és mtsai., 2004). Ekkor még nem ismerték fel a denevérek szerepét a lyssavírusok terjesztésében; erre a XX. századig kellett várni. Az 1950-es években írták le az első denevér okozta humán veszettség esetet az Egyesült Államokban (De Serres és mtsai., 2008), Európában pedig 1977-ben dokumentáltak első alkalommal denevérveszettség okozta emberi halálesetet (Franka és mtsai., 2008).

1804-ben Zinke kísérleti fertőzéssel bizonyította, hogy nyállal átvihető a vírus. Az 1880-as években Pasteur két meghatározó felfedezést tett, ezeknek köszönhetően fejlesztette ki az első veszettség elleni vakcinát. Rájött, hogy a gerincvelőben és az agyban található a betegség kórokozója és hogy nyulak agyába injektálva a vírust, a fertőzés minden esetben az állat paralizálásához és elhullásához vezet. Kísérletei során nyulakban termeltette a vírust és az elhullott állatok idegszövetét 5-10 napig szárította, hogy legyengítse a kórokozót. Az így kapott veszettség elleni vakcinát kutyákon tesztelte. A kifejlesztett vakcinát 1885-ben elsőként a világon sikeresen alkalmazta egy 9 éves fiún, akit veszett kutya támadott meg. Ezzel sikerült lefektetni a háziállatok és az ember veszettség elleni vakcinázásának alapjait. Az 1950-es évek második felére a fejlettebb országokban a kutyák terjesztette veszettség

visszaszorítása részben megoldódott, a vadon élő állatok által terjesztett veszettségre így több figyelem jutott. Európában többnyire rókák terjesztették a betegséget. Elkerülhetetlené vált egy új stratégia kidolgozása a vadon élő állatok vakcinázására. Egyértelmű volt, hogy nem lehetséges az összes vírusgazda beoltása, bár a 1980-as években, Kanadában, Torontó környékén nagyszámban befogtak és beoltottak borzokat, ezzel csökkentve a vadon élő állatok okozta megbetegedéseket (Rosatte és mtsai., 1986; 2001). Az első orális vakcinázási kampányt 1971-ben az Egyesült Államokban indították el és a sikeresnek ígérkező módszert 1978-ban Svájcban is elkezdték alkalmazni (Steck és mtsai., 1982). Kiepítették a vadon élő állatok aktív monitoringját is, melyhez Németország, Belgium, Franciaország és a többi európai állam is csatlakozott, köztük hazánk is 1992-ben (King és mtsai., 2004).

Európában vadon élő állatokban majdnem százezer esetet írtak le az elmúlt évtizedben és több, mint 10 emberi megbetegedésről számoltak be (Cliquet és mtsai., 2014). Az elmúlt 10 évben jelentett állati és humán megbetegedések eloszlását mutatja az 1. ábra, jól szemléltetve, hogy Nyugat-Európa, mind a vadon élő, mind pedig a háziállatok terjesztette veszettségtől mentes. A vírus monitoring Nyugat-Európában újabban denevér fajokra is kiterjed, így jelentős számú veszettség vírusfertőzést azonosítanak ezekben az állatokban. Közép-Kelet-Európában a vad- és háziállatok megbetegedésének gyakorisága igen magas és a humán esetek száma sem elenyésző. Ebben a régióban ugyan a monitoring nem a denevérekre összpontosít, feltehetően hasonló arányban fordulhatnak elő fertőzött denevérek, mint Nyugat-Európa országaiban.




















1. ábra: Az elmúlt 10 évben jelentett veszettség esetek Európában. Bordó kör mutatja a házi és vadon élő állati megbetegedéseket, a kék téglalap a humán eseteket szemlélteti, míg a sárga háromszög a denevérekben azonosított eseteket tünteti fel. (Forrás: <https://www.who-rabies-bulletin.org/>)

4.2 A veszettségvírus rendszertana

A veszettség kórokozója negatív polaritású egyszálú ribonukleinsav (RNS) genommal rendelkező vírus. A veszettségvírusok a *Mononegavirales* renden és a *Rhabdoviridae* családon belül a *Lyssavirus* nemzetségbe tartoznak. Az ICTV (Nemzetközi Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)) 2018-ban közzétett aktuális taxonómiai besorolása szerint jelenleg 16 lyssavírus fajt különítenek el ebben a nemzetségben, melyek a következők: *Rabies virus* (RABV), *Lagos bat virus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1), *European bat lyssavirus-2* (EBLV-2), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV), *West Caucasian bat virus* (WCBV), *Shimoni bat virus* (SHIBV), *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *Ikoma lyssavirus* (IKOV), *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV) és *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV) (Ceballos és mtsai., 2013; Afonso és mtsai., 2016; Gunawardena és mtsai., 2016). A közelmúltban leírt, ICTV által még elfogadásra váró lyssavírusok a Taiwan bat lyssavirus (TWBLV) és a Kotalahti bat lyssavirus (KBLV) (Hu és mtsai., 2018; Nokireki és mtsai., 2018). Egy fajba tartoznak a nemzetségen belül azok a vírusok, melyek nukleoprotein génje 80-82% nukleotid szintű azonosságot mutat, vagy konkatenált kódoló régióinak azonossága 80-81% felett van (Dietzgen és mtsai., 2012). A *Lyssavirus* nemzetség tagjai minimum két filogenetikai csoportba sorolhatóak a részleges nukleoprotein gén alapján végzett filogenetikai vizsgálatok és az antigén tulajdonságaik révén (1. táblázat). Az inaktivált vírus ellen egerekben termeltetett antitest kizárólag az egy filogenetikai csoportba tartozó törzseket képes neutralizálni. A WCBV ellen termeltetett antitestek nem képesek keresztneutralizálni a másik két filocsoportba tartozó vírusfajok képviselőit (Fooks és mtsai., 2005; Kuzmin és mtsai., 2005). A RABV vírusból származtatott postexpozíciós profilaxis hatékonysága megjósolható a keresztneutralizáció mértékéből (Fooks és mtsai., 2014; Banyard és mtsai., 2014; Fisher és mtsai., 2018). A rabies vírusból származtatott oltóanyag hatékony az azonos filogenetikai csoportba tartozó törzsekkel szemben.

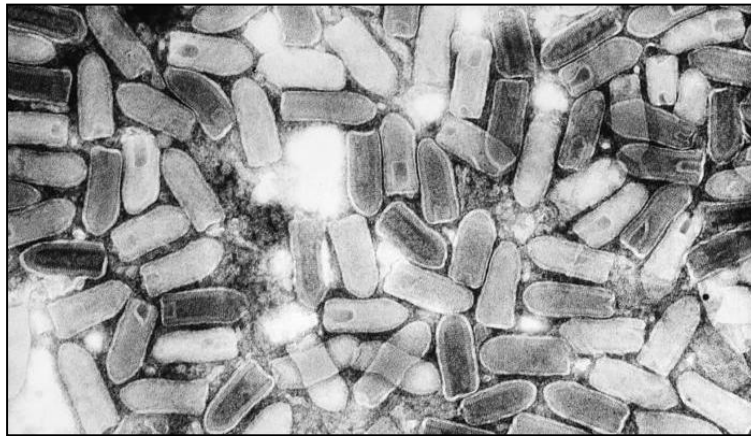
1. táblázat: A *Lyssavirus* nemzetség tagjai filogenetikai csoportonként. Elterjedésüket és előfordulásukat denevérben és emberben a piktogramok jelölik.

Filogenetikai csoportok	Vírus	Rövidítés	Elterjedés	
I. csoport	Aravan lyssavirus	ARAV	Eurázsia	
	Australian bat lyssavirus	ABLV	Eurázsia	
	Bokeloh bat lyssavirus	BBLV	Európa	
	Duvenhage lyssavirus	DUVV	Afrika	
	European bat lyssavirus-1	EBLV-1	Európa	
	European bat lyssavirus-2	EBLV-2	Európa	
	Irkut lyssavirus	IRKV	Eurázsia	
	Khujand lyssavirus	KHUV	Eurázsia	
	Rabies lyssavirus	RABV	Világszerte	
II. csoport	Lagos bat lyssavirus	LBV	Afrika	
	Mokola lyssavirus	MOKV	Afrika	
	Shimoni bat lyssavirus	SHIBV	Afrika	
Besorolás nélküli	Ikoma lyssavirus	IKOV	Afrika	-
	West Caucasian bat lyssavirus	WCBV	Eurázsia	
	Lleida bat lyssavirus	LLEBV	Európa	
	Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV	Ázsia	
	Taiwan bat lyssavirus	TWBLV	Ázsia	
	Kotalahti bat lyssavirus	KBLV	Európa	

A nemzetség típusfaja a RABV, ez a vírus világszerte előfordul a szárazföldi emlős fajokban; ezzel ellentétben a nemzetség többi tagjának gazdaspektruma és elterjedése szűkebb. A RABV felel a legtöbb emberi megbetegedésért, valamint a háziállatok körében megfigyelt veszettség esetekért egyaránt (Singh és mtsai., 2017). A *Lyssavirus* nemzetségbe tartozó vírusfajok ősi gazdájának a denevéreket tekintik, ezt alátámasztja, hogy a MOKV és az IKOV kivételével az összes lyssavírust kimutatták már denevérekben (1. táblázat) (Fooks és mtsai., 2014).

4.3 A veszettségvírus morfológiája, genomi szerveződése és életciklusa

A lyssavírusok virionja lipidburokkal rendelkezik és jellegzetes töltény alakú, méretét tekintve körülbelül 75 nm széles és 180 nm hosszúságú (2. ábra). A burok vastagsága 7,5-10 nm és ötven százalékát a gazdasejt membránjából származó lipid alkotja. A vírusburok felszínén 8,3-10 nm hosszúságú felületi nyúlványok találhatóak, amelyek a glikoprotein három molekulájából állnak.

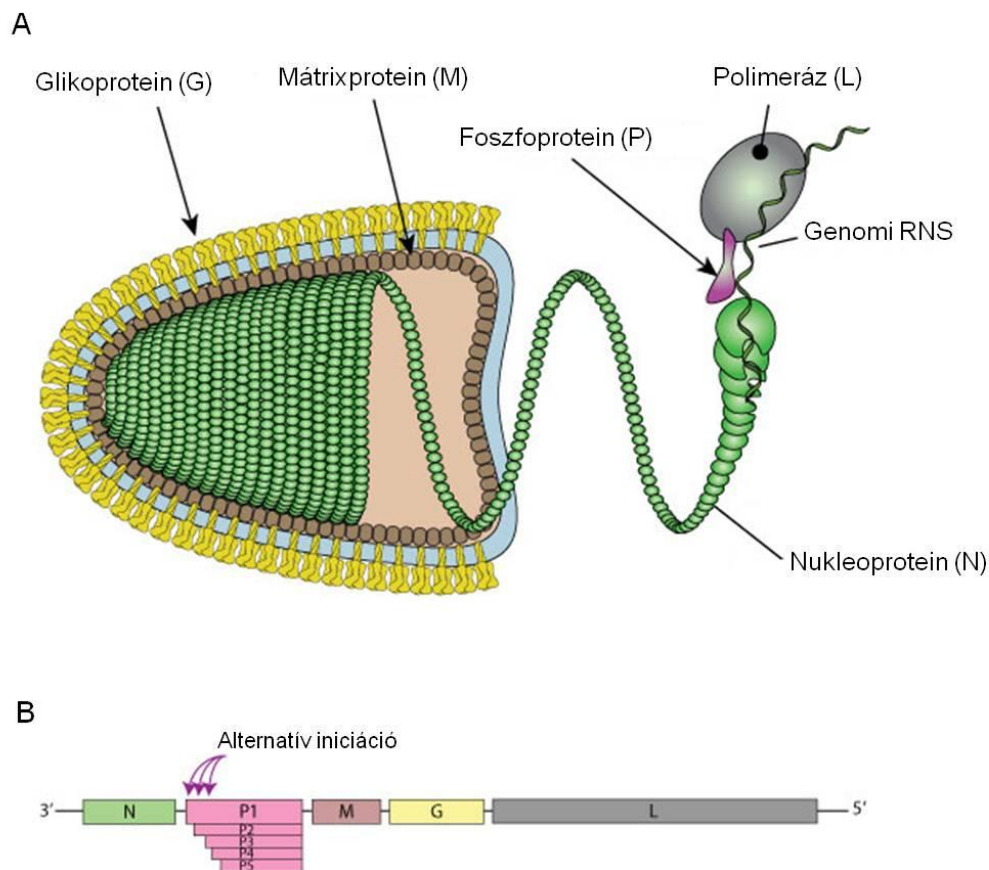


2. ábra: Rabies vírus elektronmikroszkópos felvétele.

(Forrás: <http://myplace.frontier.com/~dffix/medmicro/pix/rhabdo.png>)

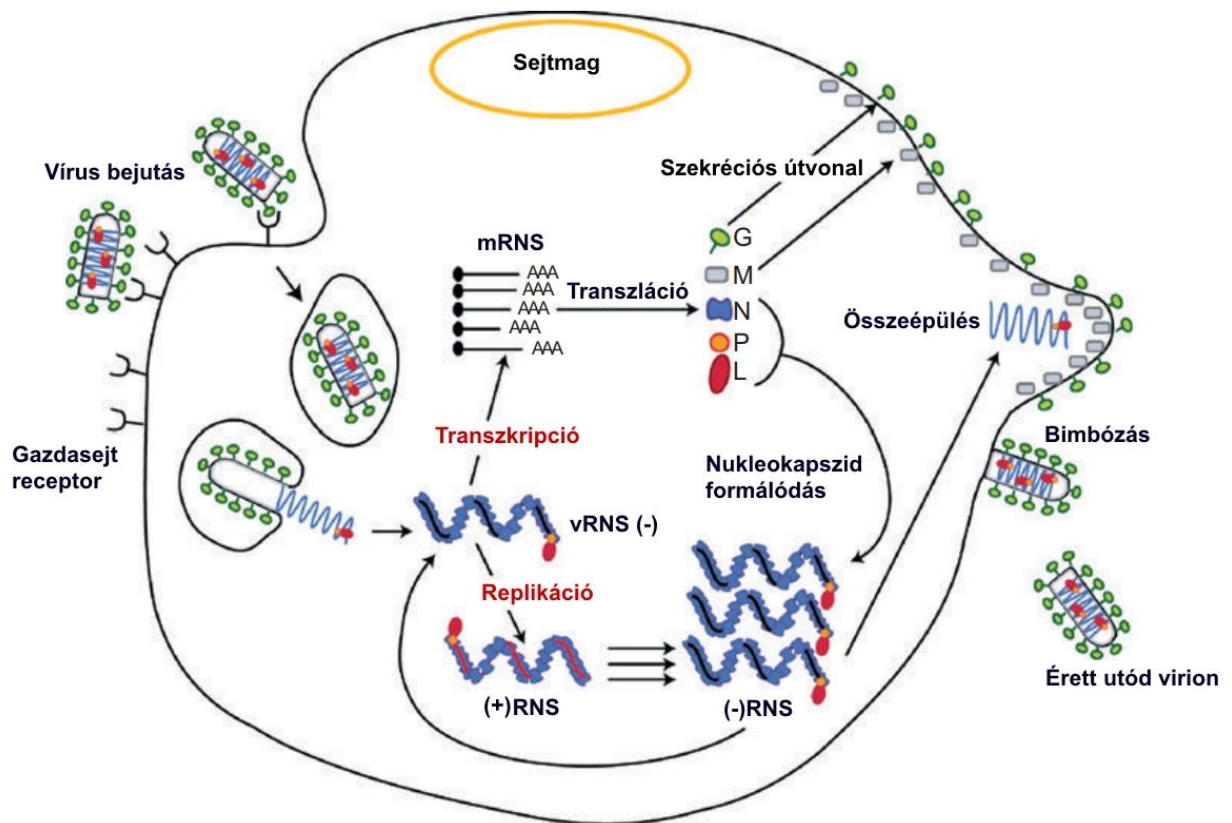
A belső szerkezetet a helikálisan feltekeredett ribonukleoprotein komplex (RNP) képezi, mely az RNS genomból és a hozzá szorosan kapcsolódó nukleoproteinből áll. A negatív polaritású egyszálú RNS genom nem szegmentált, lineáris, 11 kilobázis hosszú. A virális genom öt szerkezeti fehérjét kódol. Az N gén kódolja a nukleoproteint, ami a vírus nukleokapszidját képezi, a P génről íródik át a foszfoprotein (P), ami a transzkripcióban, replikációban és patogenezisben játszik szerepet. Az M gén kódolja a mátrix fehérjét. A G génről termelődik a transzmembrán glikoprotein, ami szerepet játszik a fertőzés során a fogékony gazdasejthez való kapcsolódásban, ezáltal ez a célpontja a vírus-neutralizációs antitesteknek. Az L gén kódolja az RNS szintézishez szükséges polimeráz enzimet (3. ábra). A géneket egymástól néhány nukleotid hosszúságú intergenikus régiók választják el. A G és L gén közötti intergenikus régió feltehetőleg egy pszeudogén (Tordo és mtsai., 1986).

A veszettségvírus életciklusának első fázisában a fogékony gazdasejt receptorához kötődik és endocitózissal bejut a sejtbe. A virális burok és az endoszomális membrán, alacsony pH függő fúzióját a G fehérje valósítja meg konformáció változás kíséretében. A transzkripció elindulásához az RNP komplex kiszabadulása szükséges az endoszomális vezikulákból. A transzkripciót a virionban lévő RNS-polimeráz irányítja, amely az RNS-N komplexeket ismeri fel. A transzkripció során egy pozitív szálú vezető (leader) RNS és öt, 5' sapkával és 3' poliadenilált farokkal rendelkező mRNS szintetizálódik. A transzkripció a genom 3' végén az Le+ (leader=vezető) régiótól halad az egymást követő öt monocisztronos mRNS molekula átírásával a genom 5' vége felé (Jackson és mtsai., 2011).



3. ábra: Lyssavírusok virionjának sematikus ábrázolása (A). A lineáris negatív egyszálú RNS vírusgenomot szemléltető rajz (B). (Forrás: <https://viralzone.expasy.org/>)

A virális RNS replikációjához szükség van folyamatban lévő protein szintézisre, hogy rendelkezésre álljon szabad nukleoprotein, ami komplexet képez az utód RNS-sel. Az RNS-polimeráz enzim átvált transzkripcióról replikációra, így az enzim ezt követően nem ismeri fel az iniciációs és terminációs szignálokat. Ezáltal a teljes hosszúságú RNS genom komplementer kópiájának szintézise zajlik, melynek során egy pozitív szálú antigeenom képződik, ami templátként szolgál az utód negatív szálú genom RNS termeléséhez. A virális fehérjék transzlációja során négy virális mRNS (N, P, M és L) szabad riboszómákon, míg a G mRNS membránhoz kötött riboszómákon transzlálódik. Az utód virionok összeépülése a megfelelő mennyiségű negatív szálú RNS és az N, P, L virális fehérjék jelenlétében kezdődik meg. Az M fehérje kötődésével kialakul a végleges szerkezet, ezt követően az érett virionok a membrán azon részén áthaladva veszik fel a lipid kettős réteget, ahol a G fehérje trimerek beágyazódtak. Az érett virionok bimbózása az extraneurális szövetekben citoplazmamembránon keresztül (4. ábra), míg az idegszövetekben elsődlegesen intracitoplazmatikusan zajlik (Jackson és mtsai., 2011).



4. ábra: Rabies vírus életciklusának sematikus ábrázolása (Forrás: Jackson és mtsai., 2011)

A lyssavírusok hasonló jellemvonásokat mutatnak morfológiájukban, biológiai, fizikokémiai tulajdonságaikban, genomszerveződésükben, virális életciklusukban. Azonban a strukturális fehérjék antigén tulajdonságai jelentősen különbözhetnek a vírusfajok között az eltérő poszttranszlációs módosítások következtében (Jackson és Wunner, 2007; Takács és mtsai., 2010).

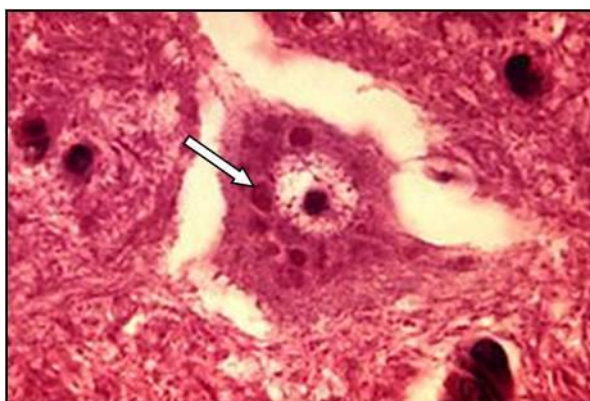
4.4 A veszettség patogenezise és immunológiája

A lyssavírusok többféle úton képesek fertőzni, a leggyakoribb szervezetbe jutási mód a veszett állat általi harapás. A nyállal bejutó kórokozó a bőr alatti kötőszövetbe és izomrétegbe kerül. Ritkábban előfordul, hogy a vírus sérült bőrfelülettel vagy közvetlenül a nyálkahártyával érintkezik, azonban sértetlen bőrfelületen nem tud átjutni. Lejegyeztek olyan eseteket is, amikor a vírus szájon át és az emésztőrendszeren keresztül vagy belélegezve jutott a gazda szervezetébe (Gibbons és mtsai., 2002; Manning és mtsai., 2008). Fertőzött donorból származó szerv transzplantációjával átadott veszettséget 2004-ben az USA-ban és 2005-ben Németországban is dokumentáltak (Bronnert és mtsai., 2007; CDC 2013).

A veszettségvírus neurotropizmusa példátlan, a vírus terjedése és replikációja az idegszöveti elemekhez kapcsolódik, így általában nincsen virémia. A sérülés helyén, vagy az

izomsejtekben lezajlott replikáció után jut a vírus a perifériás idegekbe, vagy közvetlenül is beléphet oda, például nagyobb számú sejtbe jutott víruspartikulum esetén (Murphy és mtsai., 1973; Charlton és mtsai., 1997). A perifériás idegvégződések nagy számban lefedettek Schwann sejtekkel. A Schwann sejtek nem fogékonyak a lyssavírus-fertőzésre, azonban a perifériás idegek végeiről hiányoznak ezek a sejtek (Cauna és mtsai., 1980). Ez a legvalószínűbb belépési kapu a vírus számára. Az idegsejtbe jutáshoz a lyssavírusnak szüksége van a megfelelő sejt felszíni receptorokra; a nikotin acetilkolin receptorra (Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)), a neuron sejt adhéziós molekulára (Neural cell adhesion molecule, (NCAM)) és a p75 neurotropin receptorra (p75NTR) (Gluska és mtsai., 2014). Ezek a receptorok kötik a vírus glikoproteinjét és elősegítik a vírus sejtbe jutását endocitózissal (Lafon, 2005). A gazdasejt endoszómális membránjának és a virális buroknak a fúziója alacsony pH-n (~6,3 pH), a glikoprotein konformáció változásának kíséretében valósul meg Gaudin és mtsai. szerint (1999; 2000). Kísérletekkel alátámasztották, hogy replikáció nélküli vírus lappangás is előfordulhat az izomsejtekben, ahonnan a perifériás neuronokba történő bejutást követően transzszinaptikus transzporttal migrál tovább a vírus a központi idegrendszer felé (Gillet és mtsai., 1986). Ez a centripetális terjedés, ami 50-100 mm/nap (3 mm/óra) sebességgel zajlik (Jackson és mtsai., 2011). Ebben az esetben a gerincvelői motoros neuronokba jutva kerül sor a veszettségvírus első nagyobb mértékű replikációjára. A központi idegrendszerben szinte kizárólag a neuronokban, a sejt mag környéki részeken és a dendritek proximális részein sokszorozódik a vírus (Begeman és mtsai., 2018). A fertőzött idegsejten belül a vírus intraaxonális transzporttal két irányba képes haladni. Az egyik irány a sejttest felé haladó mozgás (retrográd), a másik pedig a sejttesttől távolodó mozgás (anterográd), ami mikrotubulus-függő folyamat segítségével zajlik (Begeman és mtsai., 2018). Az inkubációs szakasz 2 héttől akár 2-3 hónapig is terjedhet, annak függvényében, hogy milyen testtájon és milyen mennyiségben jut a vírus a gazdaszervezetbe.

A fertőzés során kialakuló citoplazmatikus zárványok az utód virionokba be nem épülő vírus fehérje aggregátumok. Ezeket az ovális eozinofil zárványokat Negri-testeknek nevezzük (Whitfield és mtsai., 2001; Harper és mtsai., 2009) (5. ábra). A Negri-testek leggyakrabban az ammon-szarv, a kisagy Purkinje sejtjei és az agytörzs területén jelennek meg, diagnosztikai markereknek tekinthetők, azonban hiányuk nem zárja ki a lyssavírus jelenlétét. A központi idegrendszerből neuroanatómiai útvonalon a fej, nyak, mellkas és hasüreg irányába szóródik a vírus, ezt nevezik centrifugális szóródásnak. Először a nyelvpapillák, nyálmirigyek fertőződnek, viszont post-mortem vizsgálatokkal igazolták, hogy a vírusantigén szinte valamennyi zsigeri szervben megjelenik (Jackson és Wunner, 2007).



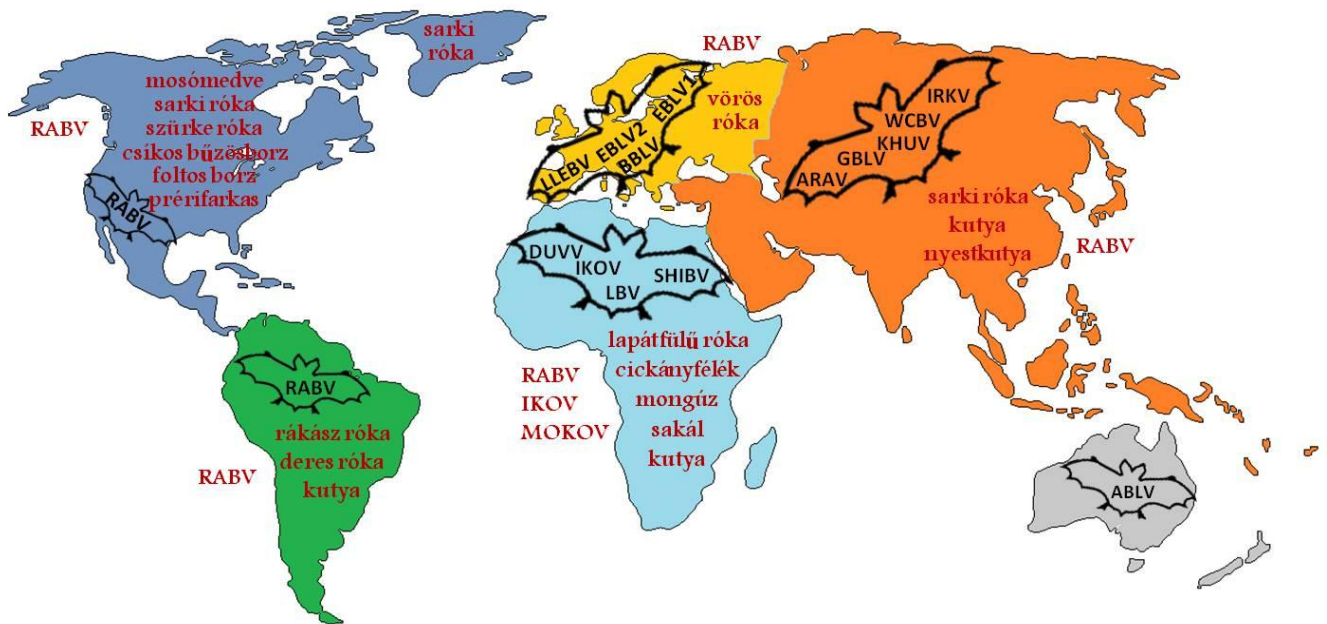
5. ábra: Negri-testek hematoxin-eozinnal történő festéssel megjelenítve fertőzött neuronban.(Forrás: <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html>)

A veszettségvírus neurotropizmusának és intraaxonális, transzszinaptikus terjedésének köszönhetően az antigén-prezentáció folyamata és az immunválasz kialakulása ténylegesen csak a vírus központi idegrendszerbe jutása után kezdődik el (Camelo és mtsai., 2001). A perifériás sérüléssel egyidejűleg nincsen antigén prezentáció az izomsejtekben történő vírusreplikáció esetében sem (Yamaoka és mtsai., 2013), tehát a celluláris immunválasz hiányzik vagy nagyon gyenge. A perifériás immunszuppressziót erősíti, hogy a veszettségvírus okozta encephalomyelitis nem citopatogén, fennmarad a fertőzött neuronok integritása. A vírus szóródása a szervezeten belül szintén transzszinaptikus, ezért késik a virális antigének bemutatása az antigénprezentáló sejtekben. Az antigénprezentáció és az immunválasz kialakulása ténylegesen csak a vírus központi idegrendszerbe jutását követően kezdődik el. A központi idegrendszer azonban lokális immunitással rendelkezik a relatív izoláltságának köszönhetően, amit a vér-agy gát endotélje biztosít. Ezért minimális az antigén stimulálója, az antitestek és naiv limfociták átjutása a vérből, így antigén hiányában a neuronok MHC I és MHC II (fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)) expressziója korlátozott. A központi idegrendszernek nincs nyirokkeringése sem. Az agyba bejutó T-limfociták pedig apoptózissal elpusztulnak. A gazda immunrendszerének kijátszásában közvetve vagy közvetlenül, de mind az öt vírusgenomban kódolt fehérje szerepet játszik. A foszfoproteinnek közvetlen szerepe van az interferon jelzőrendszer gátlásában (Johnson és mtsai., 2010; Rieder és mtsai., 2011; Scott és Nel, 2016). A foszfoprotein specifikusan kötődik az interferon-béta, myxovírus rezisztencia és az oligoadenilát szintetáz génekhez, ezzel csökkentve ezek expresszióját, blokkolja továbbá az I-es és III-as típusú interferon jelrendszert a STAT1-STAT2 fehérjék gátlásán keresztül (Srithayakumar és mtsai., 2014). A foszfoprotein C-terminális doménje képes kötődni a STAT1-STAT2 fehérjékhez (186-297 aminosavak). Kísérletesen bizonyították, hogy a foszfoprotein 186-297. as eltávolításával a vírus erősen attenuált lesz és nem okoz

neurologiai tüneteket egérben (Wiltzer és mtsai., 2013). A glikoprotein apoptózist indukál a T-sejtekben, makrofágokban, mikrogliaokban és oligodendrocitákban (Lafon, 2005; Scott és Nel, 2016). A nukleoprotein az RNP komplex részeként elrejti a virális RNS-t a gazda immunrendszerének vírusfelismerő elemei (Toll-szerű receptorok, TLRs) elől, továbbá gátolja a retin sav indukáló géneket, amelyek terméke képes lenne az I-es típusú interferon géneket aktiválni. A mátrix fehérje egyik doménje kötődik az ubiquitin ligázhoz, ami szerepet játszik a veleszületett immunrendszer jelátviteli útjának szabályozásában (Scott és Nel, 2016).

4.5 A veszettség epidemiológiája

A veszettségvírusok cirkulációjának három járványtani formáját különítjük el. A szilvaticus veszettség a vadon élő állatok között elterjedt, elsősorban húsevő emlősök és denevérek terjesztik. Kontinensenként eltérnek a rezervoár fajok, a leggyakoribbak a következők: mosómedve (*Procyon lotor*), nyestkutya (*Nyctereutes procyonoides*) mongúz (*Herpestes auropunctatus*), prérifarkas (*Canis latrans*), nyest (*Martes foina*), eurázsiai menyét (*Mustela nivalis*), eurázsiai borz (*Meles meles*), európai őz (*Capreolus capreolus*), és a vörös róka (*Vulpes vulpes*) (6. ábra). Az urbánus járványforma esetében a vadon élő állatok által megfertőzött háziállatokban cirkulál a vírus, ami továbbterjedhet az emberre. Leggyakoribb vírusgazdák a kutyák (*Canis lupus*) és macskák (*Felis catus*), ritkábban kecskék (*Capra aegagrus hircus*), juhok (*Ovis aries*), lovak (*Equus caballus*), szarvasmarhák (*Bos taurus*), házi sertések (*Sus scrofa*) is fertőződhetnek. A RABV-sal rokon lyssavírusok (például EBLV-1 és EBLV-2) rezervoárjai denevérek (vámírdenevérek-, rovar- és gyümölcssevő denevérek). A harmadik, denevérekhez köthető járványformában megfigyelhető a vírusvariánsok adaptálódása egyes denevérfajokhoz (Banyard és mtsai., 2014). A vírusok a gazdafajok életmódjából és táplálkozásából adódóan gyorsabban szóródnak, így a denevérek által terjesztett veszettség geográfiai értelemben nagyobb elterjedésű.



6. ábra: Lyssavírusok elterjedése kontinensenként. A denevérekben előforduló törzsek denevér sziluettben kerültek feltüntetésre. Rabies vírus (RABV) előfordulása és leggyakoribb gazdafajai kontinensenként bordó színnel lettek jelölve.

A RABV eredetéről és evolúciójáról számos tanulmány született. Feltehetően, több gazdaváltás is történt a vírus evolúciója során, túlnyomórészt denevérek és egyéb emlősfajok között, ritkábban csak a röpképtelen emlősök között. Az egyik feltételezés szerint a RABV Afrikában, denevérekben evolválódott és terjedt el világszerte (Nel és Rupprecht, 2007). Afrikában és Európában azonban nem írtak le RABV törzset denevérekből, csak RABV-sal rokon lyssavírusokat (6. ábra), míg az észak- és dél-amerikai szubkontinensen denevérekéből és húsevő emlősökből is kimutatták. A fenti hipotézis alapján az óvilágban denevérekről ragadozókra történő feltételezett gazdaváltást követően, a RABV denevérben kihalt (Borucki és mtsai., 2013). Egy másik feltevés igyekszik alátámasztani, hogy a RABV húsevő emlősökben evolválódott az Óvilágban, miután a RABV-rokon lyssavírusokat hordozó denevérfajok négy lábú emlősöket fertőztek meg. A RABV az Újvilágba a gyarmatosítás során juthatott el, a gyarmatosítók hajóin átjutó RABV által fertőzött kutyák révén, ahol egy újabb gazdaváltással megjelent az amerikai denevérfajokban is (Fisher és mtsai., 2018; Troupin és mtsai., 2016). Az utóbbi feltevés egyik alapja az az egyedi megfigyelés, miszerint a közelmúltban Sri Lankán azonosítottak egy denevért, ami ragadozóból származó RABV hordozónak bizonyult (Matsumoto és mtsai., 2017). Egyes tanulmányok bizonyítják, hogy az amerikai denevérek populációiban a RABV elterjedése nem egyenletes, ami azt sejteti, hogy ezek a vírusok nem egyetlen közös ősi vírustól származnak. Felmérő vizsgálatok igazolják, hogy az amerikai kontinensen a RABV hordozó

denevérfajok száma napjainkban is növekszik (Shoji és mtsai., 2004). Ennek alapján feltételezhető, hogy az amerikai kontinensen az elszigetelt területeken élő denevérfajokhoz a RABV még nem jutott el. Ezekkel a megfigyelésekkel igyekeznek egyes kutatók alátámasztani, hogy a RABV a közelmúltban jelenhetett meg az amerikai denevérekben (Fisher és mtsai., 2018).

Napjainkban Európa középső és keleti régiójában továbbra is jelentős a veszettség előfordulása, amit többnyire vörös rókák terjesztenek. Ezzel szemben Nyugat-Európa már mentes a RABV okozta betegségtől. A WHO és az OIE előírása szerint az a terület nevezhető a betegségtől mentesnek, ahol egymást követő két évben nem regisztráltak veszettség esetet (<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/self-declared-disease-status/>). Az Európai Bizottság célul tűzte ki, hogy 2020-ra az Európai Unió valamennyi tagállamában felszámolják a RABV okozta veszettséget.

Európai denevér veszettség vírusok jelentős számban előfordulnak Nyugat-Európában napjainkban is. Közép- és Kelet-Európában denevérekben azonosított veszettség esetekről szórványos információkkal rendelkezünk, mivel ebben a régióban a denevér monitoring kevésbé szervezett.

4.6 A veszettség tünetei

A veszettség lappangási ideje emberek esetében igen változó, néhány nap és néhány év között változik, de általában 1-2 hónap. Miután a veszettségvírus elérte az ember központi idegrendszerét, megjelennek a klinikai tünetek, melyek kétfélek lehetnek. A megbetegedések nagyobb százalékában a dühöngő vagy klasszikus veszettség lép fel, amelynek során tiszta tudatú és hyperexcitábilis (túlingerelt) periódusok váltják egymást. Az utóbbi során hallucináció és agresszivitás jellemzi a beteget. További tünetek a magas láz, vegetatív zavarok, görcsök testszerte, hidro- és aerofóbia. A klinikai tünetek megjelenésétől számított két héten belül, paralitikus fázist és kómát követően bekövetkezik a halál. A másik kórforma, a paralitikus veszettség, ami a betegek 20 százalékában alakul ki. A mentális státusz ép, a sérült végtagtól kiindulva bénulással jár, ami tovább terjed a többi végtagra, míg végül a légzőizmok bénulása halálhoz vezet. A veszettségvírussal fertőzött betegek megmentését humán interferon adagolásával, ribavirinnel történő kezeléssel, továbbá a Milwaukee protokoll néven ismerté vált metódussal is megkísérelték. Az utóbbi során a beteget mesterséges kómában tartják és ez alatt antivirális terápiában részesítik (ketamine, ribavirin, amantadine). A kezelés alapja, hogy a csökkentett idegrendszeri aktivitás minimalizálja a vírus okozta károsodást, így idő nyerhető a beteg saját immunválaszának kialakulásához. Sajnos ez a módszer sem hozta meg a biztos sikert (26 esetből egyszer alkalmazták sikerrel) (Agarwal és mtsai., 2017). Veszettségből teljesen felgyógyuló

személyről egyetlen esetben számoltak be, ahol denevér volt a kór terjesztője és a beteg részesült postexpoziációs oltássorozatban. A további dokumentált túlélők minden esetben súlyos neurológiai szövődményekkel éltek tovább (Jackson és Wunner, 2007).

Háziállatok esetében is hasonló a kór lefolyása, noha a klinikai tünetekben fajonként megfigyelhetőek kisebb eltérések. Ezen felül ugyanazon fajba tartozó egyedek tünetei is eltérhetnek. Kutyák fertőződése esetén is két formáját különböztetjük meg a klinikai tüneteknek, a dühöngőt és a paralitikust. A kór lefolyásának kezdeti fázisa, azaz a túlingerelt peiódus egy hétig is eltarthat, de időnként a veszettséggel fertőződött állat egyből a paralitikus fázisba kerül. A kezdeti fázisban a kutyák viselkedése agresszívá és kiszámíthatatlanná válik és néhány napon belül bekövetkezik a paralitikus fázis, melyet légzőszervi elégtelenség és végül a halál beállta követ. Kutyák esetében a kór lefolyása tipikusan 3-8 napig tart. Macskák esetében hasonlóak a tünetek, bár jellemző, hogy a veszett macskák szeretnek elbújni félreeső, elhagyatott helyeken. Vadászgörények esetében a jellemző klinikai tünetek a következők: levertség, étvágytalanság, paralízis, ataxia, izomgyengeség, hypotermia, székrekedés, túlzott nyáltermelés, gyakori és szokatlan hangadás. A görények csupán 10%-a mutatott agresszív viselkedést kísérleti fertőzések során. Rágcsálók és nyúlalakúak fertőződése során az esetek többségében semmilyen klinikai tünet nem tapasztalható. Vörös rókák fertőződéskor csupán az esetek felében mutatnak agresszív tüneteket, a többi esetben paralízis, görcsös rohamok, félelemérzet hiány, remegés, hányás a jellemző megnyilvánulása a veszettségnek (Nigg és Walker, 2009).

4.7 A veszettség elleni védekezés és terápia

A veszettség profilaxisában fontos szerepet kap a rezervoár fajok vakcinázása. A szilvatikus veszettség visszaszorítása módosított élő rabies vírust tartalmazó csalétekvakcinák kihelyezésével történik. Az urbánus járványforma megelőzésében komoly szerepet kap a háziállatok inaktivált vakcinával történő oltása. Az emberi veszettség kivédésének érdekében preexpoziációs védőoltásban kell részesíteni minden olyan személyt (például: állatorvosokat, denevérvédelmi szakembereket, erdészeti dolgozókat, biológusokat), aki vírushordozó állattal vagy magával a kórokozóval rendszeresen érintkezhet. A RABV ellen adható humán diploid sejteken előállított vakcina (HDCV) az EBLV-1 és EBLV-2 ellen is védelmet nyújt, azonban másik filocsoportba tartozó vírusszerek (pl. IKOV) ellen nem véd (Brookes és mtsai., 2005; Horton és mtsai., 2014; Malerczyk és mtsai., 2014). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ajánlása szerint a profilaktikus oltóanyag izomba vagy bőr alá adható. A preexpoziáció során a vakcinát három adagban a 0., és 7. napon, valamint a 21. és 28. nap között, az ismétlést pedig egy év múlva kell beadni.

Amennyiben felmerül az expozíció esélye az érintett személyt időben megkezdett postexpozíciós oltásban kell részesíteni. A klinikai tünetek kifejlődését követően nincs hatékony terápiája a veszettségnek, ekkor a fertőzés letalitása már közel 100%. Postexpozíciós védőoltás során az izomba történő oltásnak két módja is elfogadott: az Essen-séma öt, a Zágráb-séma négy adag beadását írja elő (Essen: 0., 3., 7., 14. és 28. napokon egy-egy adag; Zágráb: 0. napon két, továbbá 7. és 28 napokon egy-egy adag) (Ren és mtsai., 2015). Amennyiben az érintett személyt nem részesítették preexpozíciós profilaxisban, rabies immunglobulint (RIG) kell kapnia, lehetőleg a védőoltás-sorozat megkezdésekor. Kétféle immunglobulint használnak világszerte: a fejlettebb országokban a HRIG (humán rabies immunoglobulin), a fejlődő országokban az ERIG (equine rabies immunoglobulin) az elterjedtebb. Az ERIG-et elsősorban ott használják, ahol a HRIG nem elérhető (Manning és mtsai., 2008; WHO 2017). A RIG egyidejű beadása a sérülés környékére az első vakcina dózissal az oltott személy passzív immunizálását biztosítja, neutralizálja a vírust és a perifériás idegrostokba való belépését akadályozza, a specifikus immunválasz kialakulásáig (WHO, 2017). Emberek immunizálására kizárólag inaktivált rabies vírust tartalmazó vakcinák adhatóak. Az inaktivált vírus elindítja a humorális és celluláris immunválaszt és a T-limfociták aktiválásával a vírusneutralizáló antitesteket termelő B-limfociták proliferációját megnöveli (Jackson és Wunner, 2007).

4.8 A veszettség laboratóriumi diagnosztikája

A veszettség diagnosztikája során alkalmazott módszerek közül azokat említem, melyek jelenleg a WHO által ajánlott veszettség kimutatására szolgáló diagnosztikai technikák között szerepelnek (WHO 2013; Mani és Madhusudana, 2013). Hagyományos módszerek közé tartoznak a következők:

1. Immunfluoreszcens ellenanyaggal történő teszt (Fluorescent Antibody Test (FAT)): Az immunfluoreszcens festés alkalmas mind a RABV, mind az EBLV-1 és EBLV-2 kimutatására. A módszer során a fertőzött állat agyszövetéből (ideértve a kisagy, ammon-szarv, agykéreg, híd, talamusz és a nyúltvelő régióit) lenyomatot készítenek, majd fixálást követően specifikus konjugátummal festik. Az alkalmazott specifikus konjugátum fluoreszceinnel (FITC) jelölt monoklonális ellenanyag, amely a vírusantigénhez kötődve immunkomplexet képez és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva sárgás-zöld, kerekded vagy ovális alakú, gyűrű alakban festődő képleteket (vírusreplikációs helyek) tesz láthatóvá a fertőzött sejtek citoplazmájában (Dean és Abelseth, 1973).
2. Kórszövetteni vizsgálat hematoxilinnal és eozinnal festett szövettani metszeteken: A kórszövetteni vizsgálatok során az agyvelő mintából paraffinos beágyazást követően

metszeteket készítenek. A hematoxilinnal és eozinnal festett metszeteken az agyvelőgyulladás jeleit keresik.

3. Virális N-antigén kimutatása enzimhez kötött immunoszorbens analízis (ELISA) teszttel (Rapid Rabies Enzyme Immuno-Diagnosis (RREID)) A RREID módszer lényege, hogy az agyhomogenizátumban lévő vírus, nukleoprotein fehérjék szilárd fázishoz rögzített poliklonális vagy monoklonális anti-N antitestekhez kötődnek. A kötődött antigének detektálásához peroxidázzal konjugált monoklonális vagy poliklonális antitestet vagy biotinilált N-antitestet adnak, amit sztreptavidinnel konjugált peroxidáz követ. Ezt a színreakciót biztosító aromás o-fenilén-diamin-dihidroklorid és hidrogén-peroxid hozzáadása követi (Perring és mtsai., 1986; Miranda és Robles, 1991).

4.-5. Egérrel végzett kísérleti állatoltás (Mouse Inoculation Test (MIT)) és vírusizolálás szövettenyészetben (Rapid Tissue Culture Infection Test (RTCIT)): A kísérleti egéroltás (Kuzmin, 2015) és szövettenyészet fertőzés (Madhusudana és mtsai., 2010) megerősítő tesztek arra az esetre, ha a korábban említett diagnosztikai módszerek pozitívak. Kísérleti átoltás során az egereket bódítás mellett, négy hetes korban intracerebrálisan oltják agyvelő-homogenizátummal, ezt követően 28 napig megfigyelik az állatokat. Az elhullott, vagy 28 nap leteltével túlaltatott egerekből nyert mintákat a korábban említett FAT módszerrel vizsgálják. A kísérleti átoltásnál olcsóbb és gyorsabb a szövettenyészet fertőzése, amihez rágcsáló neuroblasztóma sejtvonalat használnak (murine neuroblastoma cell line Neuro-2a (N2a)). Az RTCIT segítségével 24-48 órán belül eredményt kaphatunk, amit szintén a FAT vizsgálat követ.

Ezeket a post-mortem alkalmazott diagnosztikai módszereken felül vannak vírusneutralizáló antitestek kimutatására szolgáló módszerek agy-gerincvelői folyadékból vagy szérumból. Ilyenek a RFFI (Smith és mtsai., 1996) és a FAVN teszt (Cliquet és mtsai., 1998), amelyek során sejtkultúra fertőzésével megállapítják a vizsgált minta antitesttiterét. A sejtek fixálását követően a korábban említett FAT során alkalmazott fluoreszcinnel (FITC) jelölt monoklonális ellenanyaggal festik a szövettenyészetet.

A teljesség igénye nélkül néhány, a közelmúltban kifejlesztett módszert is érdemes megemlíteni. Újabb diagnosztikai módszerek közé tartoznak a vírusantigén kimutatására szolgáló tesztek. Ide tartozik a Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT) és az Indirect Rapid Immunohistochemistry Test (IRIT). A DRIT során rabies N proteint detektálnak formalinban fixált agyvelőkenetből. A nukleoprotein kimutatása biotinilált monoklonális antitest segítségével történik, amit streptavidinnel konjugált peroxidázzal kötnek és színreakció segítségével (amino-etil karbazol és hidrogén-peroxid) tesznek láthatóvá (Mani és Madhusudana, 2013). Az IRIT esetében agyvelő lenyomatot vagy egyrétegű sejtkultúrát fixálnak formalinban és festenek rágcsáló eredetű anti-nukleoprotein monoklonális antitesttel (mAb-N) és biotinnal jelölt kecske eredetű anti-egér antitesttel. Széles spektrumú,

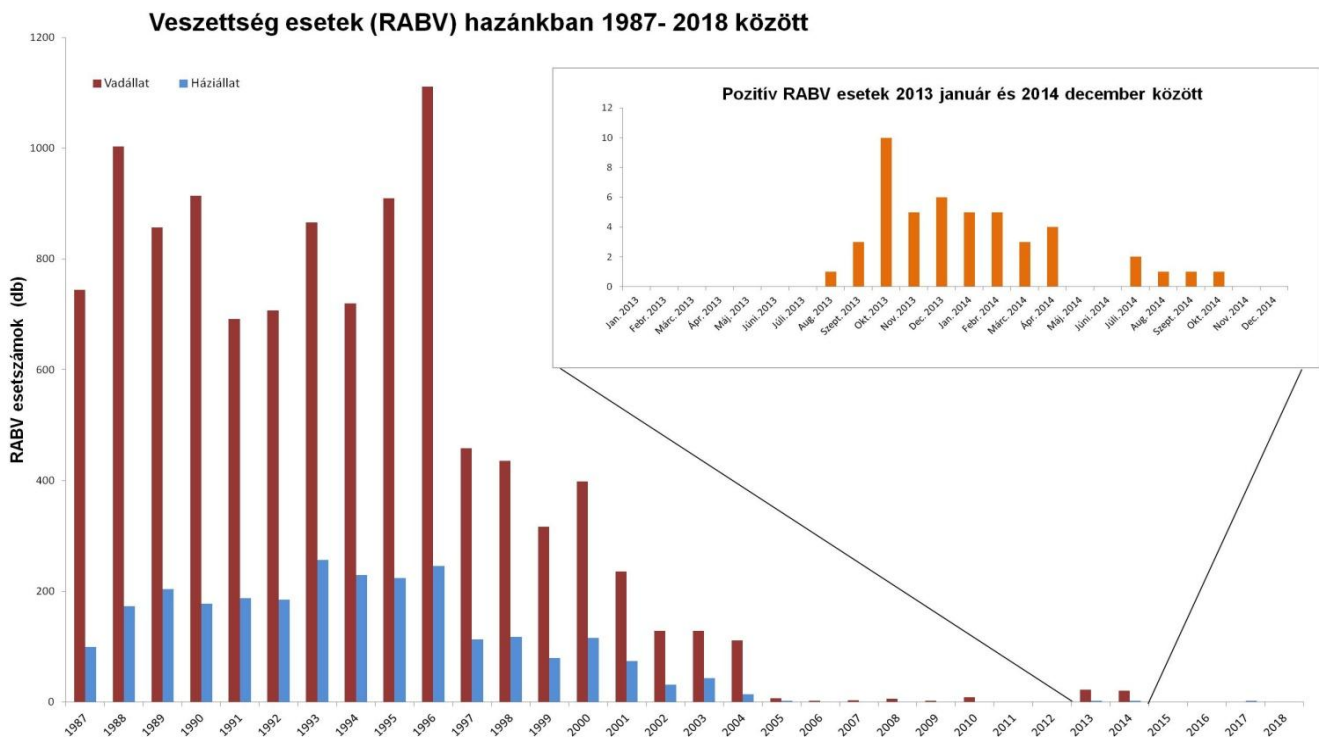
lényegében bármely genotípusba tartozó lyssavírus antigén kimutatására alkalmas szendvics ELISA teszt is elérhető (Xu és mtsai., 2007). Különböző molekuláris módszerekkel ante-mortem nyálból és agy-gerincvelői folyadékból is kimutatható a RABV genomi RNS; ezek közé tartoznak a gél-alapú és a valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakción (RT-PCR) alapuló módszerek (Crepin és mtsai., 1998; Nagaraj és mtsai., 2006).

4.9 A veszettségvírus hazai előfordulása

Az 1880-as évek végén hazánkban évente 500-600 humán veszettség-gyanús esetet dokumentáltak, melyek veszett kutyák terjesztette fertőzésekről szólnak (Lontai 1995, 1997). Dr. Hőgyes Endre lejegyzései szerint 1893-ban 647 kutya okozta emberi megbetegedés történt (King és mtsai., 2004.). Ebben az időben a vírus elleni védekezés egyetlen módja a kóbor kutyák befogása és leölése volt. Dr. Hőgyes Endre kutatásokat végzett hazánkban a Pasteur-féle veszettség vakcinával és sikerrel alkalmazta azt preexpozíció gyanánt kutyákon és postexpozícióként embereken is (King és mtsai., 2004). A hazai urbanikus veszettség elleni küzdelem következő mérföldkövét Hőgyes Endre tanítványa, Dr. Aujezky Aladár tette le azáltal, hogy elérte a kutyák vakcinázásának kötelezővé tételét hazánkban (Vitasek, 2004). Magyarország volt az első olyan ország a kontinensen, amely az 1930-as évek végére kontrollálni tudta az urbanikus veszettséget. Ennek ellenére még 2000-ben is diagnosztizáltak 24 veszett kutyát és 61 veszett macskát. Az urbanikus veszettség elleni védekezésben nagy felelősség terheli a háziállat-tartókat, különösen kutyák és macskák esetében, bár a macskák védőoltása nem kötelező hazánkban. A szilvaticus veszettség problémáját először 1954-ben ismerték fel hazánkban, mivel előtte a kutyaveszettséget kellett visszaszorítani a lakott területeken, ezért nem a róák voltak a vizsgálat fókuszában. 1954 és 1965 között feltehetőleg sporadikus volt a veszettséggel fertőzött róák előfordulása, évi maximum 20 esetről tudunk. 1967-ben azonban a diagnosztizált veszett róák száma 212-re nőtt az előző évi 17-hez képest. Ez a szám 772-re emelkedett 1968-ban. 1971-re az egész országban elterjedt a RABV és évente több mint 1000 veszett rókat azonosítottak.

A WHO RABV fertőzésekről készített adatbázisában 1987-ből származnak az első magyarországi vonatkozású adatok; eszerint háziállatokból 100, vadon élő állatokból 744 RABV esetet jelentettek a legelső esztendőben. A veszettséggel fertőzött esetek száma 1996-ban volt a legmagasabb, ekkor 246 háziállat és 1111 vadállat RABV fertőzöttségét diagnosztizálták (7. ábra). Háziállatok közül jellemzően kutyából, macskából és szarvasmarhából, ritkábban lóból, kecskéből, illetve házisertésből mutatták ki a veszettség vírusát. Vadon élő állatok közül legnagyobb arányban a vörös róák RABV fertőzöttségét

igazolták a vizsgálatok, csekélyebb számban a RABV fertőzöttséget nyestkutyából, borzából, vaddisznóból, európai őzből, gímszarvasból és menyétfélékből is leírták.



7. ábra: Magyarországon előforduló RABV esetek éves bontásban. A narancssárga szín a 2013-2014 során azonosított RABV eseteket jelöli.

Magyarországon a veszettség elleni orális vakcinázási program már a kezdetektől (1992) sikeresnek bizonyult a szilvaticus veszettség visszaszorításában. Az oltási kampányok során csalétekvakcinát helyeznek ki évente két alkalommal, egyszer ősszel és egyszer tavasszal, a leggyakoribb rezervoár faj, a vörös róka immunizálásához. A csalétek élő attenuált vakcina törzset tartalmaznak, ami a SAD (Street Alabama Dufferin) vírus izolátumból származtatott vakcina. A kezdeti időszakban SAD B19 (Fuchsoral), ezt követően SAD P5/88 (Rabifox) és SAG1 (SAG1 Oral Fox Vaccine) vakcina törzsek kerültek kihelyezésre. 2008-tól hazánkban SAD Bern törzset tartalmazó Lysvulpen vakcinát használnak (Vitasek és mtsai., 2004; European Commission 2012; Müller és mtsai., 2015). Passzív szűrővizsgálatok mellett az orális vakcinázási kampány keretében aktív monitoring is zajlik hazánkban, melynek során az Európai Unió szabályozásnak megfelelően (European Commission 2017) az immunizált területen 100 km²-enként legalább négy rókát lönek ki évente, egyenletes eloszlásban. A kilőtt állatokat a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának (NÉBIH-ÁDI) Virologiai laboratóriumába szállítják. Itt FAT analízist, tetraciklin marker (TCM) vizsgálatot és ELISA tesztet végeznek. A FAT célja, az esetleges veszettség vírus felbukkanásának kiszűrése az immunizált területeken. A TCM vizsgálatot megállapítják a rókák csalétekvakcina felvételét (tetraciklint tartalmazó csalétekvakcina elfogyasztása az állat szemfogának dentin régiójában sárga

elszíneződést eredményez, ami jól detektálható ultraibolya fényben), ELISA teszttel pedig információt kapnak arról, vajon kifejlődött-e a veszettség elleni immunitás. Továbbá kormeghatározást is végeznek a kilőtt állat szemfogának pulpa és cementállományának fénymikroszkópos vizsgálatával. Egy éves kor alatt még nincs cementállomány, viszont a pulpa üreg viszonylag nagy. Egy éves kor fölött a szemfog cementállományában a téli tápanyaghiány miatt kialakuló sötétebb gyűrűk számából következtetnek az állat életkorára vonatkozóan.

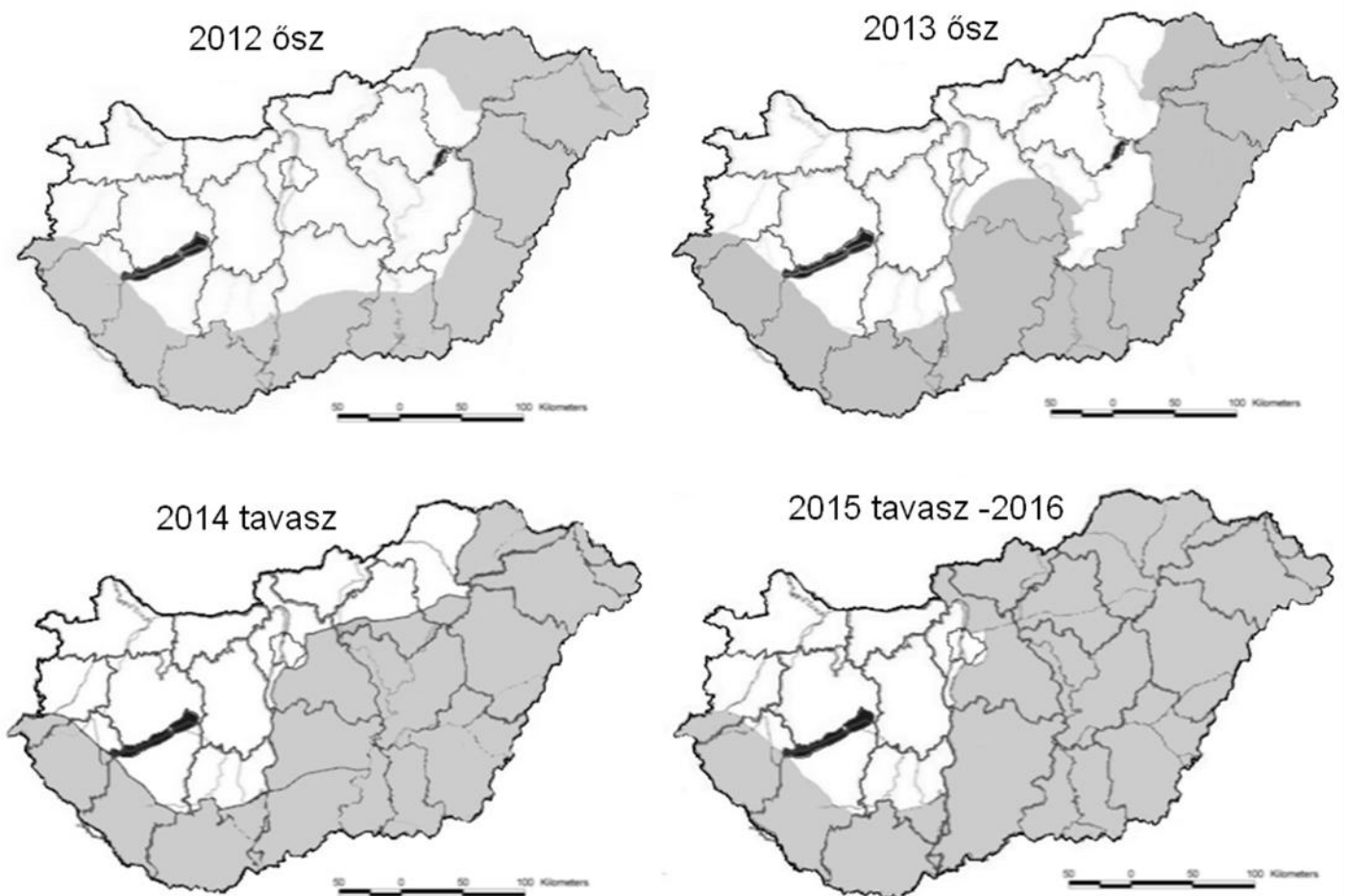
2006 óta állnak rendelkezésre részletes adatok a WHO rabies-re vonatkozó európai adatbázisában, amely szerint 2006 és 2018 között összesen 70 901 állattól vett mintát dolgoztak fel veszettséggyanú miatt vagy rutin szűrővizsgálat keretein belül. A 12. táblázatban azokat a gazdafajokat tüntettük fel, melyek közül legalább egy RABV-ra pozitív esetet leírtak. Ebben a szűkített adathalmazban a vizsgált állatok száma 68 770 volt.

12. táblázat: RABV előfordulása Magyarországon, különböző gazdafajokban, 2006-2018 között éves bontásban, a pozitív és negatív mintaszámok feltüntetésével.

Év	Háziállatok								Vadon élő állatok			
	kutya		macska		szarvasmarha		kecske, juh		vörös róka		európai őz	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
2006	0	312	0	456	1	35	0	28	2	6585	0	46
2007	0	195	1	286	0	29	0	29	3	5660	0	28
2008	1	253	0	464	0	21	0	29	6	8603	0	36
2009	0	293	0	389	0	22	0	17	2	7872	0	48
2010	1	257	0	303	0	16	0	23	9	5289	0	31
2011	0	315	0	366	0	27	0	55	0	4514	0	31
2012	0	284	0	348	0	22	0	16	0	4069	0	22
2013	0	203	0	272	2	13	0	22	22	2754	0	13
2014	1	235	0	388	0	34	1	42	20	3831	1	29
2015	0	193	0	323	0	28	0	51	0	3127	0	23
2016	0	177	0	384	0	27	0	32	1	3619	0	31
2017	0	210	0	346	0	25	2	39	1	3170	0	31
2018	0	39	0	75	0	10	0	7	0	1157	0	9

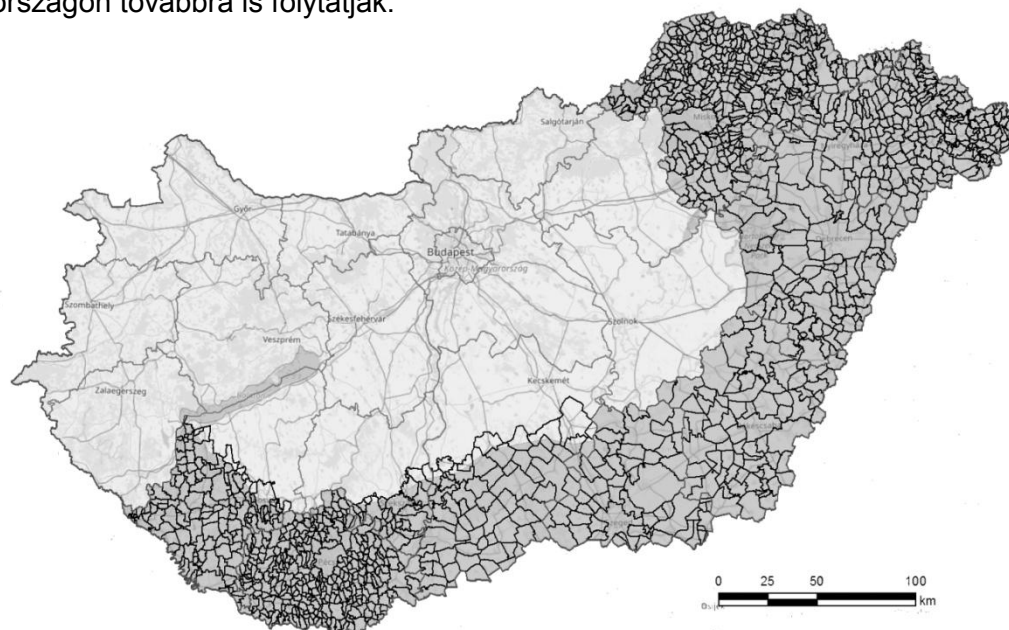
1992-ben Ausztriával és a Szlovéniával határos ~5 ezer km² területen helyeztek ki csalétekvakcinákat (Nagy és mtsai., 1995). A vakcinázási területet évről évre terjesztették ki a teljes dunántúli régióra, így 1996-2000 között már a teljes Dunántúl területén vakcináztak (Kerekes és mtsai., 2000). Ezt követően, 2001 és 2003 között a Duna-Tisza köze területén is történt csalétekvakcina kihelyezés. 2004-től 2007-ig már az egész ország területén vakcináztak. A vakcinázási terület megnövelésének köszönhetően a vadon élő állatok veszettség elleni immunizálására fordított erőfeszítések 5 év után eredményesen csökkentették a veszettséggel fertőzött esetek számát. 2005-ben csupán 7 veszett rókát és 2 fertőzött macskát azonosítottak (7. ábra). 2008-tól 2013 tavaszáig a déli és keleti

határszakaszokon (Szlovéniától Ukrajnáig) csak a határ menti 50 km-es zónában helyeztek ki csalétekvakcinát (8. ábra). Azért csökkentették le a vakcinázási területet, mert Ausztria addigra már felszámolta a veszettséget. Ausztriában 2006 óta nem detektáltak RABV fertőzést (www.who-rabies-bulletin.org). Hazánkban 2011 és 2012-ben nem találtak egyetlen szilvatikus veszettség esetet sem. Ezen előzmények ismeretében meglepő és riasztó volt, hogy 2013. augusztus 31-én, Kecskemét környékén kilőttek egy veszettséggel fertőzött rókát; az ezt követő vizsgálatok alapján ez az eset egy váratlanul fellobbanó járvány index esetének tűnt. Az intenzív monitoring nyomán 2013-ban 22, 2014-ben pedig 20 veszett rókáról számoltak be (12. táblázat). A járvány kitörése miatt 2013 őszén kiterjesztették a vakcinázási zónát Kecskemétre és környékére is (8. ábra), amit 2014-ben és 2015-ben tovább bővítettek. Ennek eredményeként a teljes keleti országrészen (a Dunától keletre), továbbá a szlovéniai és horvátországi határ mentén is (összesen 66.844 km²-en) kiszórásra kerültek élő vírust tartalmazó csalétekvakcinák.



8. ábra: Vakcinázási zónák Magyarországon 2012 és 2016 között. Szürke színnel jelöltük a csalétekvakcinák kihelyezésének területeit.

A 2013-2014-es járvány megfékezését követően 2015-ben nem jelentettek RABV esetet, azonban 2016 elején, a Borsod-Abaúj-Zemplén megyei Szerencs környékén lőttek egy veszett rókát. 2017 során Szerencs mellett, Bekecs községben azonosítottak egy veszettséggel fertőzött rókát és két RABV fertőzött kecskét is jelentettek. 2016 és 2017 során újra kiterjesztették a vakcinázást a teljes keleti országrészre, továbbá a szlovén-magyar határ menti területekre és a Dráva vonalában fekvő területekre egyaránt. 2018 első félévében nem adtak hírt veszettséggel fertőzött állatról hazánkban, emiatt a 2018. évi őszi vakcinázási zóna már kisebb területre terjedt ki (9. ábra). Nem vakcináztak Zala megyében, mivel a szomszédos országok közül Ausztria továbbra is mentes volt a RABV vírustól. Szlovéniában 2015-től 2017-ig nem azonosítottak RABV fertőzést, ellenben 2018-ban egy veszettséggel fertőzött borzot találtak (www.who-rabies-bulletin.org). 2015 óta Szlovákia is rabiestől mentesnek minősül, azonban többi szomszédunknál nem számolták még fel a szilvatikus veszettséget. A szomszédos országok felől (Horvátország, Szerbia, Románia, Ukrajna) a vadon élő állatok vándorlása nem kiküszöbölhető, ezért a rendszeres vakcinázást Magyarországon továbbra is folytatják.



9. ábra: Veszettség elleni vakcinázási zóna Magyarországon, 2018 őszén. A sötétszürke terület szemléletli a csalétekvakcina kihelyezési területét, a körülhatárolt kis régiók az ebzárlattal érintett települések. (Forrás: <http://portal.nebih.gov.hu/-/veszettseg-ellen-vakcinazzak-a-rokakat>).

A denevérvesztség hazai előfordulásáról nyert ismereteinket passzív surveillance-ből származó vizsgálatokból szereztük. 1977 és 2017 között 144 denevérminta feldolgozását és veszettségvírusra irányuló vizsgálatát végezte el a NÉBIH-ÁDI.

4.10 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 vakcina-eredetű 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.

5. Anyag és módszer

5.1 A 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 és 2 EBLV-1 izolátumot, továbbá 5 csalétekvakcinát, 1 rókából kimutatott RABV vakcina törzset és ennek tovább szaporított mintáit. Az általunk vizsgált, veszettségvírusokra (RABV, EBLV-1) pozitív minták származási helyét, a beküldés időpontját, a vírus gazdafaját és a minta azonosítóját a 2. táblázat tartalmazza. A vakcina mintákról részletesen a 3. táblázat tájékoztat.

2. táblázat: A dolgozatban bemutatott minták listája és részletes információk bemutatása (származási hely, beküldés dátuma, vírusgazda, mintaazonosító).

Vírus faj	Származási hely	Dátum	Gazdafaj	Mintaazonosító
RABV	Páhi	1996	házimacska	10244
	Nyírlugos	2006.10.30	vörös róka	18537
	Piricse	2007.01.22	vörös róka	12408
	Nagyhegyes	2007.08.29	vörös róka	12496
	Bocskaikert	2008.03.10	vörös róka	5247
	Pusztaradvány	2008.10.29	vörös róka	18072
	Makó	2009.01.13	vörös róka	1545
	Szamosangyalos	2009.12.14	vörös róka	44190
	Pocsaj	2010.01.13	vörös róka	893
	Kübekháza	2010.02.15	vörös róka	2690
	Kecskemét	2013.08.31	vörös róka	21068
	Kiskunfélegyháza	2013.09.04	vörös róka	21541
	Kiskunfélegyháza	2013.09.18	vörös róka	22329
	Lakitelek	2013.09.24	vörös róka	22934
	Pálmonostora	2013.10.01	vörös róka	23335
	Tiszajenő	2013.10.08	vörös róka	15582
	Kecskemét	2013.10.17	vörös róka	24936
	Kecskemét	2013.10.17	vörös róka	24951
	Kiskunfélegyháza	2013.10.17	vörös róka	24956
	Tiszajenő	2013.10.20	vörös róka	16374
	Tiszavárkony	2013.10.25	vörös róka	25611
	Tizsakécske	2013.10.29	vörös róka	25987
	Kecskemét	2013.10.29	vörös róka	25992
	Lakitelek	2013.10.31	vörös róka	26301
	Kőröstetétlen	2013.11.05	vörös róka	26627
	Kecskemét	2013.11.05	vörös róka	26631
	Kiskunfélegyháza	2013.11.05	vörös róka	26636
	Kecskemét	2013.11.08	vörös róka	27089
	Dánszentmiklós	2013.11.28	vörös róka	29628
	Tizsakécske	2013.12.02	vörös róka	29504
	Nagykörös	2013.12.09	vörös róka	31167
Kocsér	2013.12.14	szarvasmarha	30856	
Kalocsa	2013.12.16	vörös róka	31168	

RABV	Kecskemét	2013.12.16	szarvasmarha	31183
	Törtel	2013.12.29	vörös róka	755
	Kocsér	2014.01.07	vörös róka	1606
	Jászkarajenő	2014.01.07	vörös róka	1608
	Tizsakécske	2014.01.13	vörös róka	1816
	Kecskemét	2014.01.13	vörös róka	1322
	Petőfiszállás	2014.01.14	európai őz	1801
	Vácszentlászló	2014.02.03	vörös róka	4834
	Fajsz	2014.02.05	vörös róka	5695
	Petőfiszállás	2014.02.10	vörös róka	6003
	Törtel	2014.02.16	vörös róka	6917
	Mikebuda	2014.02.27	vörös róka	9435
	Tizsakécske	2014.03.10	vörös róka	10436
	Törtel	2014.03.20	vörös róka	13070
	Szentmártonkáta	2014.03.29	vörös róka	13961
	Kecskemét	2014.04.07	vörös róka	14940
	Cegléd	2014.04.12	vörös róka	16367
	Jászberény	2014.04.14	vörös róka	16663
	Kecskemét	2014.04.18	vörös róka	17182
	Cegléd	2014.07.02	vörös róka	33424
	Szentmártonkáta	2014.07.14	vörös róka	35313
	Tóalmás	2014.08.28	vörös róka	41108
	Csemő	2014.09.15	kecske	42708
	Cegléd	2014.10.06	kutya	46293
	Szerencs	2016.02.03	vörös róka	5666
	Bekecs	2017.02.27	vörös róka	8656
	Bekecs	2017.03.16.	kecske	170317/1
	Bekecs	2017.03.16	kecskegida	170317/2
Vakcina eredetű RABV	Csabaszabadi	2015. 11	róka	64362
	Csabaszabadi	-	egér*	-
	Csabaszabadi_N2a/1	-	szövettenyészet	-
	Csabaszabadi_N2a/2	-	szövettenyészet	-
EBLV-1	Budapest	2011	közönséges kései denevér	22540
	Budapest	2015	közönséges kései denevér	52206

*A 64362 számú eredeti róka agy homogenizátumból nyert vírus oltott mintája egérbe.

3. táblázat: Vakcina minták azonosítója és felhasználásának ideje.

Minta név és azonosító	Felhasználás ideje	Minta típusa
Lysvulpen_0519	2012.04.16	csalétekvakcina
Lysvulpen_1819	2012.09.10	csalétekvakcina
Lysvulpen_6321	2015.01.12	csalétekvakcina
Lysvulpen_0922	2015.07.27	csalétekvakcina
Lysvulpen_0622	2015.07.30	csalétekvakcina

5.2 A vírusmintákhoz használt molekuláris vizsgálatok

5.2.1 Lyssavírus genomi RNS felerősítése RT-PCR módszerrel

Biobiztonsági okokból a virális RNS tisztítását a NÉBIH-ÁDI víruslaborjában végeztük. Ennek során 1 ml roncsolt agyhomogenizátum felülúszójához adtunk 1 ml 1X foszfáttal pufferelt sóoldatot (PBS), vortexelést követően 6000 x g relatív centrifugális erővel 3 percig centrifugáltuk, majd 0,45 µm pórusméretű filteren szűrtük. A kapott szűrletből a QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával RNS-t tisztítottunk a gyári protokollnak megfelelően. A későbbiekben a molekuláris munka felgyorsítása érdekében MagNA Pure LC 2.0 (Roche Life Science, Penzberg, Németország) típusú RNS kivonó géppel zajlott a nukleinsav tisztítás.

Két lépésben végeztük a kivont RNS feldolgozását. Először SuperScript III (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) reverz transzkriptáz segítségével az RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk, ezt követően a kapott virális cDNS-t Phusion DNS Polimeráz enzimmal (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) PCR segítségével sokszoroztuk fel. A RABV és EBLV törzsek nukleinsav állományának felerősítéséhez egymással átfedő primer párokat terveztünk, amelyek használatával a teljes genomot lefedő ampikonokat kaptunk (4. táblázat). Pozitív kontroll gyanánt a veszettségvírus diagnosztikája során használt, N és G gén szakaszokon tapadó primerek szolgáltak (Picard-Meyer és mtsai., 2004 és Sato és mtsai., 2004).

4. táblázat: A teljes genom felerősítéséhez használt primerek szekvenciái.

Primer név	Primer szekvencia (5'-3')	Primer tapadási helye (nt)	Írányultság
RabV_F1	CAA CAA AAT CAD AGA AGA ARC AGA CA	1 – 26	+
RabV_R1	GAC GAG ATA TAY TCT GGG AAT CAT AG	2728 – 2753	-
RabV_F2	ACA GGC AAC ACC ACT GAT AAA ATG AAC	2470 – 2496	+
RabV_R2	GGG TCA TCT AAG CTT TTC AGT CGA GAA	5319 – 5345	-
RabV_F3	AAG AGT CAT GAG ACT TTC ATT AA TC	4999 – 5023	+
RabV_R3	GAT CTA YTA TTC RGA CAG ATC AGA C	7382 – 7406	-
RabV_F4	TAT GAR AAG TGG AAC AAY CAT CAA AG	7260 – 7285	+
RabV_R4	GAC ATA AGG RCC CTC TCT AAG AG	10 374 – 10 396	-
RabV_F4/2	ATG TCR GTA CAG GCA GTC TTY CAC TAC	7965 – 7991	+
RabV_R4/2	TCA GAG CTG GTA CAG AGA GAC ACA AGG	11 087 – 11 116	-
RabV_F5	GAT GTT CAG AAT GGG TCT GCT	10 297 – 10 317	+
RabV_R5	TTT RTT GKT THT TTG TTA AGC GT	11 899 – 11 921	-
EBLV_F1	ACG CTT AAC AAC AAA AWC AAA AAA GGG	1 – 27	+
EBLV_R1	CCT TAC AGC TCT TAA CAA TTT TCC G	2535 – 2559	-
EBLV_F2	AGG TTC CAA ATT CTA GTC AAT TCG GCG	2351 – 2377	+
EBLV_R2	GTC TGC TTC TGG CTC AAC AGG ATC	5529 – 5552	-
EBLV_R2/2	CAC ATT RCA GMG DTT TCA CAT GTG AAG	3279 – 3305	-
EBLV_F3	GTC AAT AGT GTA CAC TAA CTA CAT CGG	5243 – 5269	+
EBLV_F3/2	CTC ATG GAA GCW GAT GCY CAT TAC AAG	4364 – 4390	+
EBLV_R3	ACG ATT TTT GGA AGA ACT CGT GTG	7444 – 7467	-
EBLV_R3/2	CAT GAS ACY CTG GCC CAT CTC TTA G	7909 – 7933	-
EBLV_F4	ATT ATT CCC GGG TGA CTT ATG CAT TCC	7312 – 7338	+
EBLV_F4/2	CAG GGR GAC AAY CAA GTC TTG TGC	7671 – 7694	+
EBLV_R4	CTT CCG TGA CAC TCT CTT ACT TGG AC	10 354 – 10 379	-
EBLV_R4/2	TCA ACT TGT AAT GAG CWC CWG TKG CCC	10 525 – 10 551	-
EBLV_F5	AGG AGY ATA AAG ATG ACC TAT CTA AC	10 089 – 10 114	+
EBLV_R5	ACG CTT AAC AAA AAA AAC AAA AAA AAC	11 986 – 12 012	-
JW12	ATG TAA CAC CYC TAC AAT G	55 – 73	+
JW6	CAY AAR ATG TGY GCB AAY TG	641 – 660	-
Ga3222_40	CGC TGC ATT TTR TCA RAG T	3220-3238	+
Gb4119_39	GAK ACC AAA TGG TGC CCT CC	4115-4134	-

A reakcióelegyeket az 5. táblázatban foglaltak szerint állítottuk össze. A cDNS szintézis és PCR hő profilját a 6. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Az cDNS szintézis és a PCR összetétele.(dNTP: dezoxiribonukleotid trifoszfátok; DTT: dithiothreitol)

Reakció	Reagens	Térfogat (µl)
cDNS szintézis	RNS	5
	random hexamer (50µM)	1 (2 µM)
	SuperScript III (200U/µl)	1 (4 U/ µl)
	Ribolock (40U/ µl)	1 (1,6 U/µl)
	dNTP (10mM)	1 (400 µM)
	DTT (0.1 M)	1 (4 mM)
	5X First-Strand puffer	5
	Nukleáz mentes víz	10
	végtérfogat:	25
PCR	Phusion polimeráz (2U/µl)	0,25 (0,02 U/µl)
	Forward primer (10µM)	0.5 (200 nM)
	Reverse primer (10µM)	0,5 (200 nM)
	dNTP (10mM)	0,5 (200 µM)
	5X Phusion Green HF puffer	5
	Nukleáz mentes víz	16,25
	cDNS (az előző lépésben átfírt)	2
		végtérfogat:

6. táblázat: A cDNS szintézis és a PCR programok paraméterei.

cDNS szintézis				PCR			
Lépés	°C	perc/mp.	Ciklus szám	Lépés	°C	perc/mp	Ciklus szám
Denaturáció	65	5:00	1X	Kezdeti denaturáció	98	0:30	1X
Hűtés	0	1:00		Denaturáció	98	0:10	40X
Reverz transzkripció	25	5:00		Primer kötődés	53/55/58*	0:30	
	50	60:00		Szintézis	72	2:00	
Inaktiválás	70	15:00		Végső szintézis	72	10:00	1X

*58°C RabV_F2-R2, 55°C RabV_F4/2 - R4/2 és 53°C az összes többi primer esetében.

5.2.2 PCR termékek tisztítása

A PCR termékek detektálását 1%-os agaróz gélen végeztük TBE pufferben (Tris-Borate-EDTA). További molekuláris munkák előtt a PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, New Taipei, Taiwan) segítségével. A tisztított PCR termékeket -20 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

5.3 Lyssavírusok kimutatása TaqMan RT-PCR módszerrel

DIVA TaqMan 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 (7. táblázat). A degenerált primerek 113 nukleotid hosszú szakaszt erősítenek fel a polimeráz génen. A vakcina próba kizárólag vakcina törzshöz tapad, míg a konzervatív próba, mind a vad RABV, mind pedig a vakcina törzsekhez kötődik. A RT-PCR során Rotor-Gene Probe RT-PCR kittel (Qiagen, Hilden, Németország), Mic qPCR cyclor (Bio Molecular Systems, Upper Coomera, Ausztrália) készülékekkel dolgoztunk. Az RT-PCR program paramétereit és a reakcióelegy összetételét a 8. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: TaqMan Real-Time PCR-hez felhasznált primerek és próbák.

Primer/próba neve	Primer/próba szekvencia 5'-3'	Primer/próba tapadási helye (nt)	Irányultság
TaqMan_F2	ATG TCT GAY TTR ACY CAA GAC GGG	9216 – 9239	+
TaqMan_R2	CAT CYG GRA AMT CGA AGA TCT GAG	9400 – 9423	-
Konzervatív_próba	HEX–TCA GAG CTG GTA CAR AGA GAC ACA AGG CT–BHQ1	9294 – 9322	+
Vakcina_próba	FAM–TGT GAG ACC CAT TGA CGA CGT GAC CCT GG–BHQ1	9365 – 9393	+

8. táblázat: Az TaqMan RT-PCR összetétele és a program paramétereit.

Reagens	Térfogat (µl)
RNS	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 (1,5mM)
Rotor Gene RT mix	0,25
Vakcina_próba (10µM)	1 (400 nM)
Konzervatív_próba (10µM)	1 (400 nM)
TaqMan_F2 primer (10µM)	2 (800 nM)
TaqMan_R2 primer (10µM)	2 (800 µM)
2x Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mix	12,5
Nukleáz mentes víz	2,75
végtérfogat:	25

Lépés	°C	min: sec	Ciklus szám
Reverz transzkripció	50	10:00	1X
PCR kezdeti aktiválás	95	5:00	1X
Denaturálás	95	0:05	40X
Primer kötés/szintézis	60	0:10	

5.4 Új generációs szekvenálás

A RABV (n=61), RABV vakcina (n=9) és EBLV-1 (n=2) mintákból nyert és felerősített amplikonokat (cDNS szakaszok) mintánként megközelítőleg azonos koncentrációban mértük össze, agaróz gélben látható jelintenzitás alapján. Teljes genom szekvenáláshoz Ion Torrent-kompatibilis könyvtárat készítettünk, NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep kit (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) és Ion Torrent Xpress Barcode adapterek (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) használatával, a gyártó által javasolt arányok figyelembe vételével, de felére redukált térfogatban. A keletkezett termékek méretszelekciója E-gél-ben (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) történt. Az emulziós PCR Ion OneTouch 200 Template Kit (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével One Touch v.2 berendezésben zajlott. Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) félvezető szekvenálóval, 200 bázispáros szekvenáló protokoll használatával, 316-os chipen (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) történt a minták szekvenálása.

5.5 Sanger-féle szekvenálás

Sanger szekvenálást alkalmaztunk a kapott teljes genomok homopolimer régióinak validálására azokban a genomi régiókban, ahol a megfelelő lefedettség ellenére sem volt egyértelmű a konszenzus nukleotid sorrendje. A genomok homopolimer régióinak ellenőrzésére tervezett primereket a 9. táblázat mutatja. A szekvenálási reakciót korábban generált PCR amplikonokon BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) végeztük. A szekvenálásra előkészített PCR termékek nátrium-acetátos és etil-alkoholos tisztítását követően a Delta Bio 2000 Kft.-hez küldtük kapilláris gélelektroforézisre.

Az EBLV-1 minták esetében a teljes genom szekvenálását követően kaptunk alacsony lefedettségű régiókat illetve hiányzó szakaszokat is. Ezek kiegészítésére és ellenőrzésére további primereket terveztünk (9. táblázat) és a fent említett módon Sanger szekvenálást hajtottuk végre.

9. táblázat: Sanger-féle szekvenáláshoz használt primerek.

Primer név	Primer szekvencia (5'-3')	Primer tapadási helye (nt)	Irányultság
Rabv_validF1	GCT AAG TAA AAT CAT GCA GGA TGA TTT G	2352 – 2379	+
Rabv_validR1	CTC GGR TTG ACG ARA ATC TTG CTC ATA	1506 – 1533	-
Rabv_validF2	GTG CCA TTA AAC CGC TGC ATT TTA TCA	3202 – 3228	+
Rabv_validR2	CTA GCA TCT TGA TRT AGG BTT YAG GAT G	5385 – 5412	-
Rabv_validF3	GAG GAG TCT CTA CAY AAY CCG TAC CCT G	3693 – 3721	+
Rabv_validF4	GTA CAA CAG GTG GAT CAC CCT MGA GG	11 720 – 11 745	+
EBLV-1_52206F1	GCC TCA AGA AAG TAT TCT CTC GGA CAC AC	7379 – 7408	+
EBLV-1_52206R1	GTT CAA TCC GGA CGA CAG CAT GTA AGT C	7658 – 7685	-
EBLV-1_52206F2	GGC AAT GTC AAG GAT AAT TTA TCT GGA CC	8111 – 8139	+
EBLV-1_52206R2	CAA TAT AAA GTT GTC TCT GTG TGT CTT GG	8470 – 8498	-

5.6 Bioinformatikai módszerek

5.6.1 Szekvenciaillesztés és annotálás

A kapott „nyers” szekvencia részleteket szekvenálást követően minőségi ellenőrzésnek vetettük alá. Kiszűrtük a túl rövid vagy rossz minőségű nukleotid szakaszokat és levágtuk az adapter régiókat. Referenciához történő szekvenciaillesztéssel állítottuk össze a teljes genomokat. RABV minták esetében a 31183-as mintához JQ944708 GenBank-i azonosítójú genomot használtuk referenciaként. 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) (Kearse és mtsai., 2012) program segítségével hajtottuk végre.

5.6.2 Evolúciós és filogeográfiai elemzések

A kapott teljes genomok egymáshoz illesztését MAFFT algoritmus segítségével a Geneious 9.1.8 szoftverrel végeztük. Esetleges rekombinációt vizsgáltunk az RDP4 (Martin és mtsai., 2015) programmal. Nukleotid diverzitást a DnaSP6 (Rozas és mtsai., 2017) segítségével számoltunk. Szelekciós nyomás vizsgálatához a Datamonkey webszerver programjait használtuk (Delpont és mtsai., 2010). Filogenetikai fa generálásához a MEGA 6.06 programot hívtuk segítségül (Tamura és mtsai., 2013). Filogeográfiai elemzéshez az adatainkra legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell kiválasztását a Jmodeltest (Darriba és mtsai., 2012) és a MEGA 6.06 (Tamura és mtsai., 2013) programokkal végeztük. Bayes alapú módszerrel szimulációt végeztünk a BEAST v1.10.0 (Drummond és Rambaut, 2007;

Suchard és mtsai., 2018) programcsomaggal. A program Markov chain Monte Carlo (MCMC) módszert használ a filogenetikai rekonstrukcióhoz és lehetővé teszi evolúciós modellek tesztelését. Az MCMC olyan statisztikai algoritmusok összessége, ami valószínűségi eloszlás segítségével végez becslést véletlen mintavételi eljárás keretében. A BEAUti v1.10.0 használatával beállítottuk az adathalmaznak megfelelő szubsztitúciós modellt, szekvenciáinkkal együtt elemzendő jellegzetességeket (esetünkben mintavétel dátuma, mintavétel helye), molekuláris órát, a populáció „prior”-ját és a megfelelő iterációt. BEAGLE (Drummond és Rambaut, 2007) segítségével gyorsabb és hatékonyabb BEAST futást értünk el. Az eredmények elemzéséhez a BEAST output log fájljainak egyesítésében és tömörítésében LogCombiner v1.10.0 segített (Drummond és Rambaut, 2007). A Tracer v 1.6 (Rambaut és mtsai., 2018) programmal ellenőriztük a Markov-láncok konvergenciáját az ESS (Effectiv Sample Size) értékek alapján és leolvastuk a kapott szubsztitúciós rátákat. A feldolgozott adatokhoz legjobban illeszkedő modelleket adathalmazonként a 11. táblázat mutatja. A BEAST programmal végzett számításból kapott „tree-output” tömörítését a LogCombiner v1.10.0 szoftverrel végeztük, ezt követően a TreeAnnotator-ral (Drummond és Rambaut, 2007) összegeztük az adatokat és Maximum clade credibility (MCC) fát generáltunk, ami a Bayes-i filogenetikai számítások eredményeinek összegzése. A MCC filogenetikai fákát a FigTree v 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) segítségével ábráztuk. A kapott eredményeket SpreaD3 (Bielejec és mtsai., 2016) programmal illesztettük Európa térképére.

A BEAST programcsomag szoftvereit több számítógépen futattuk párhuzamosan, mindegyik gépen 64-bites operációs rendszert használtunk (Windows 7 és 10). A gépek paramétereit 10. táblázat tartalmazza. A futási idő az adathalmaz méretének és a rendelkezésre álló számítógép teljesítményének függvényében változott, pontos adatokat a 11. táblázat tartalmaz.

10. táblázat: Az evolúciós becslésekhez használt számítógépek paramétereit.

Számítógép	Memória (GB)	Processzor	Órajel (GHz)
1.	512	Intel Xeon E5-2630v4 (x2)	2,20
2.	32	Intel Core I7-3770K	3,50
3.	32	Intel Core I5-4460	3,20
4.	8	Intel core i5-3450	3,10

11. táblázat: A BEAST programcsomag MCMC szimulációhoz használt beállítások adathalmazonként.

Elemzett adathalmaz	Szubsztitúciós modell	Molekuláris óra	Populáció prior	MCMC iteráció	Számítási idő (nap)
RABV magyarországi 2006-2017 teljes genomok	GTR+G+I	strict	constant size	150 millió	~7,85
RABV magyarországi 2006-2017 (szegmentált)	GTR+G+I	strict	constant size	150 millió	~2,5
RABV magyarországi 2013-2014 teljes genomok (csak róka)	GTR+G+I	strict	constant size	300 millió	~3,5
RABV európai és magyarországi részleges N CDS	GTR+G+I	strict	constant size	200 millió	~1,8
RABV európai és magyarországi részleges G CDS	GTR+G+I	strict	constant size	200 millió	~1,8
EBLV-1 európai és magyarországi teljes genomok	GTR+G	strict	constant size	150 millió	~5,3
EBLV-1 európai és magyarországi (kódoló régióként szegmentált)	GTR+G	strict	constant size	300 millió	~2,9
EBLV-1a és EBLV-1b európai és magyarországi (kódoló régióként szegmentált)	GTR+G	strict	constant size	150 millió	~1,2
EBLV-1 európai és magyarországi (klaszterek)	GTR+G	strict	constant size	150 millió	~4,1

5.6.3 Fehérje szintű elemzések

Az aminosav sorrend meghatározását a nukleotid sorrend alapján a G9.1.8 programmal végeztük. Az eltérő leszármazási vonalba tartozó glikoproteinek harmadlagos szerkezetének vizsgálatához az I-Tasser (Zhang, 2008; Roy és mtsai., 2010; Yang és mtsai., 2015) online programot és a SwissModel (Waterhouse és mtsai., 2018) szoftvert használtuk. A kapott pdb kiterjesztésű modelleket a Chimera 1.11 (Pettersen és mtsai., 2004) segítségével vizualizáltuk.

6. Eredmények

6.1 Magyarországi RABV törzsek molekuláris epidemiológiája és evolúciója (2006-2018)

6.1.1 Magyarországi RABV genomok általános jellemzői (2006-2018)

A 2000-es évek előtti időkből a GenBank-ban hat, magyarországi eredetű RABV genomot (KX148136–KX148139; KX148143; KX148160) helyeztek el; a kérdéses mintákkal kapcsolatban az év és a gazdafaj adatok ismertek, azonban nem ismerjük sem az azonosítás helyét, sem annak pontos dátumát. Az általunk feldolgozott minták közül a legkorábbi Páhiból származott, 1996-ból (pontos dátum ismeretlen). A mintavétel idejét tekintve a következő RABV genom, amit szekvenáltunk egy 2006-ban lőtt rókából származott. Az 1990-es évekből származó minták hiányos háttéradatai miatt úgy döntöttünk, hogy a legtöbb hazai vonatkozású filogenetikai számításnál csak a 2006 után kimutatott vírusok szekvenciáit (n=60) használjuk fel.

A 2006-2018-ból származó teljes RABV genomokból készített szekvenciaillesztés hossza 11 799 nukleotid volt; a 3' és 5' végeken lévő primer tapadási helyeket levágtuk. A RABV genomok azonossága 94,36% és 100% között változott, a GC tartalma egységesen 45% volt. A hazai RABV genomok fehérjekódoló kapacitása megegyezést mutatott más RABV genomokéval és a vizsgált genomok többségénél (n=56) a kódoló régiók (CDS) elhelyezkedése 3' irányból haladva konzervatív képet festett (N CDS, 17–1369 nt; P CDS, 1460–2353 nt; M CDS, 2442–3050 nt; G CDS, 3262–4836 nt; L CDS, 5355–11738 nt). Négy genom esetében (18537_Nyírlugos, 12408_Piricse, 5247_Bocskai kert és 44190_Szamosangyalos) a P gént követő intergenikus régióban a 2367. nt pozícióban egy timin inszerciót azonosítottunk, emiatt az M (2443–3051 nt), G (3263–4837 nt) és L (5356–11739 nt) CDS-ek leolvasási kerete egy nukleotiddal jobbra tolódott. A leghosszabb intergenikus régió (518 nt) a G és L CDS-ek közötti szakasz volt. A magyarországi RABV genomok elemzésekor megfigyeltük, hogy az N és P CDS-ek, valamint a P és M CDS-ek közötti intergenikus szakaszok variábilisabbak, mint a másik két intergenikus régió (13. táblázat). A CDS-ek nukleotid szintű vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy 93%-94% körüli a minimális hasonlóság a kódoló régiókon belül, azonban a foszfoprotein esetében a mutációk többsége aminosav változást eredményezett (nem szinonim mutáció). A kódoló régiók aminosav szintű összehasonlításából kiderült, hogy a foszfoprotein és a glikoprotein belüli aminosav szekvencia azonosság a legalacsonyabb (13. táblázat). A teljes genomokat

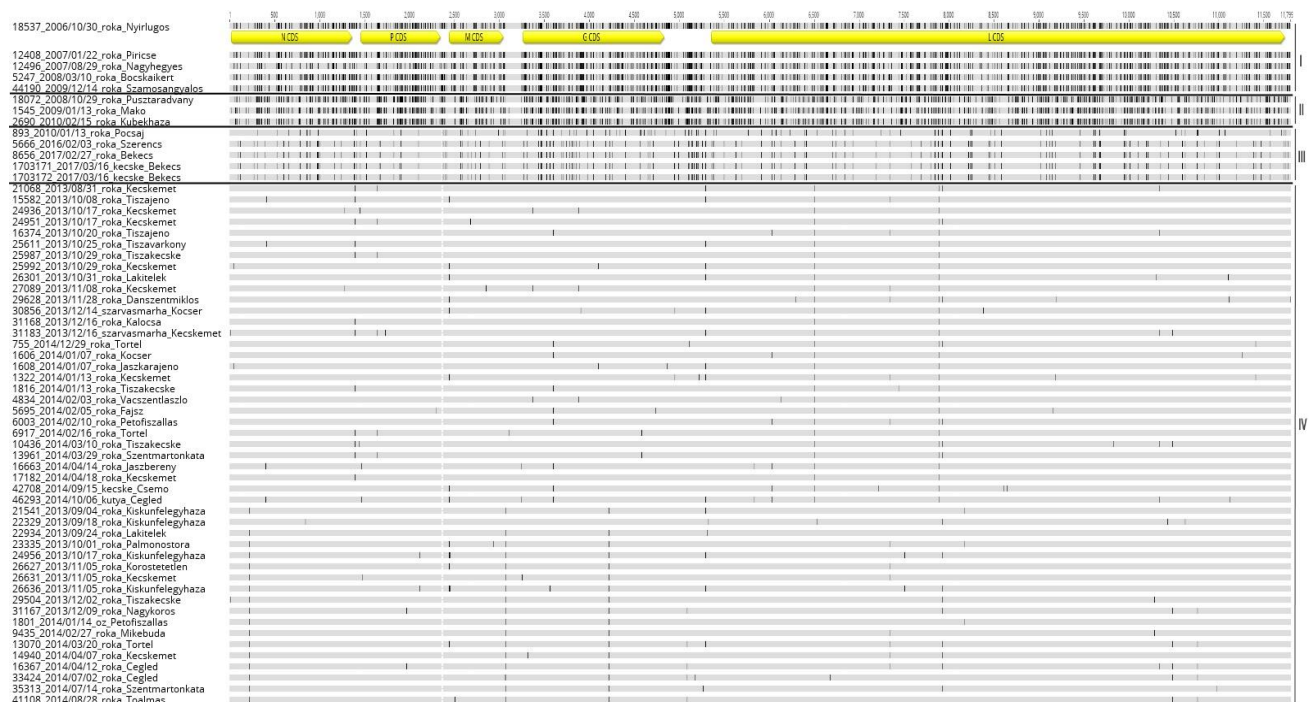
vizsgálva jelentős szekvencia homogenitást észleltünk, amit a 60 RABV genomra számított nukleotid diverzitás értéke ($\pi=0,01615$) is alátámaszt.

13. táblázat: Kódoló és intergenikus régiók összehasonlítása a 2006-tól 2018-ig terjedő RABV adathalmazban.

	Kódoló régiók (CDS)					Intergenikus régiók			
	N	P	M	G	L	N-P	P-M	M-G	G-L
Nukleotid hossz	1353	894	609	1575	6384	90	88 (89)*	211	518
Min. nukleotid azonosság (%)	93,9	93,5	94,4	93,4	94,8	87,8	87,5 (86,5)	97,2	90,3
SNP	128	93	55	170	562	18	18 (19)	10	87
Min. aminosav azonosság (%)	97,5	94,6	96,5	95,0	98,3	-	-	-	-
Aminosav eltérés	13	27	13	41	57	-	-	-	-

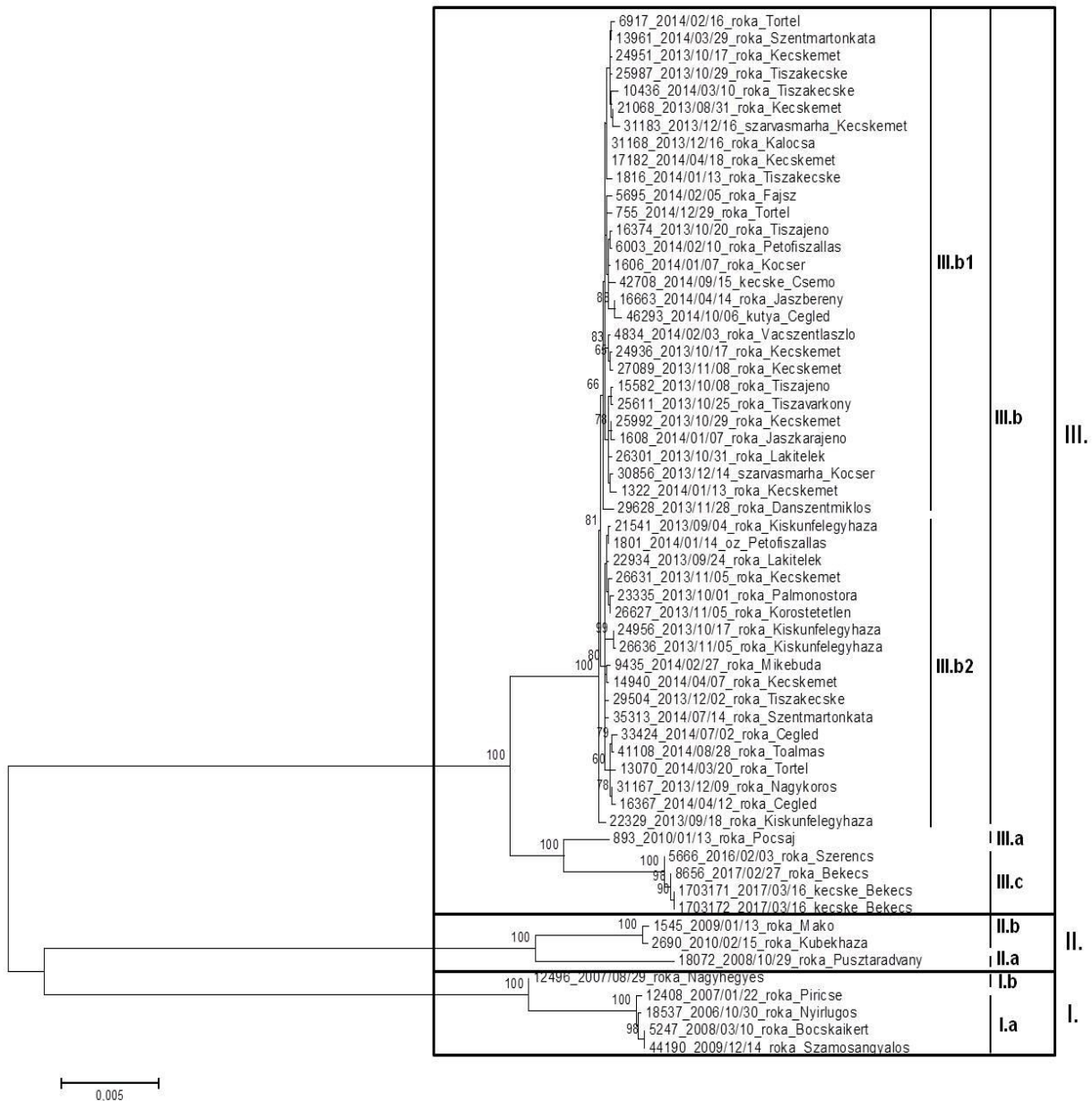
*Négy minta esetében ebben a régióban egy timin inszerció található.

Egyszerűsített genom szekvenciaillesztéseket készítve (10. ábra) feltüntettük a kódoló régiók elhelyezkedését és az egymás alá illesztett genomokban található pontmutációk helyét (függőleges vonalak). A pontmutációk csoportosulása alapján négy fő mintázatot azonosítottunk. A csoportokon belüli variabilitás nem érzékelhető teljes mélységében a pontmutációkat bemutató ábrából, mivel az illesztést végző algoritmus a legnagyobb mértékben azonos régiókat illeszti egymáshoz, azok homogenitását kiemelve, így a pontmutációt csak a kisebb reprezentáltságú genomi régiókban jelöli.



10. ábra: Pontmutációk elhelyezkedése a RABV (2006-2018) teljes genomokban, filogenetikai csoportonként rendezve.

Filogenetikai fát generáltunk az általunk vizsgált RABV genomokból, hogy szemléltessük a négy klaszter egymáshoz viszonyított hasonlóságát és képet kapjunk a csoportok közötti lehetséges leszármazási irányokról (11. ábra). A maximum likelihood módszerrel generált filogenetikai fa topológiája megerősítette a hasonló szekvenciák közös klaszterbe tartozását és látszólag 4 klaszter létezését is. A IV. klaszter szekvenciáinak elágazásaiban alacsony bootstrap értékeket tapasztaltunk, amit magyarázhat e csoport homogenitása (klaszteren belüli nukleotid szintű azonosság > 99,8%; nukleotid diverzitás érték $\pi=0,00087$). Az I. ($\pi=0,00259$) II. ($\pi=0,00855$) és III. klaszter ($\pi=0,00294$) nukleotid diverzitás értékük alapján is jóval variábilisabbak a IV. klaszternél. A legkisebb intraklaszter nt azonosság érték 98,75% volt (II. klaszter), a legnagyobb interklaszter nt azonosság érték pedig 99,03% volt (III. és IV. klaszter) (14. táblázat; részben nem mutatott adatok). Ez utóbbi értékeket figyelembe véve úgy ítéltük meg, hogy a III és IV klaszter inkább egy közös leszármazási vonal (azaz klaszter) variánsai és megalapozottabbnak tűnik a két csoport tagjainak azonos klaszterbe sorolása (továbbiakban III. klaszter). A II. és III. klaszter nt diverzitás értékek és a 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. Ebben a kalkulációban a legnagyobb interklaszter szekvencia hasonlósági érték (95,26%) nem fedett át a legkisebb intraklaszter hasonlósági értékkel (98,64%; 14. táblázat). Ezen adatok alapján a három magyarországi RABV klaszter felállítása megalapozottnak tűnt. Ezen felül a filogenetikai fa topológiája azt mutatta, hogy mindhárom klaszteren belül további alcsoportok jelölhetőek ki, melyeket betűvel, illetve betűvel és arab számmal és betűvel jelöltünk (11. ábra).



11. ábra: 2006-2018 között azonosított RABV vírus genomokból készített filogenetikai fa (maximum likelihood módszerrel, GTR G+I szubsztitúciós modell és 1000 bootstrap beállítással készült).

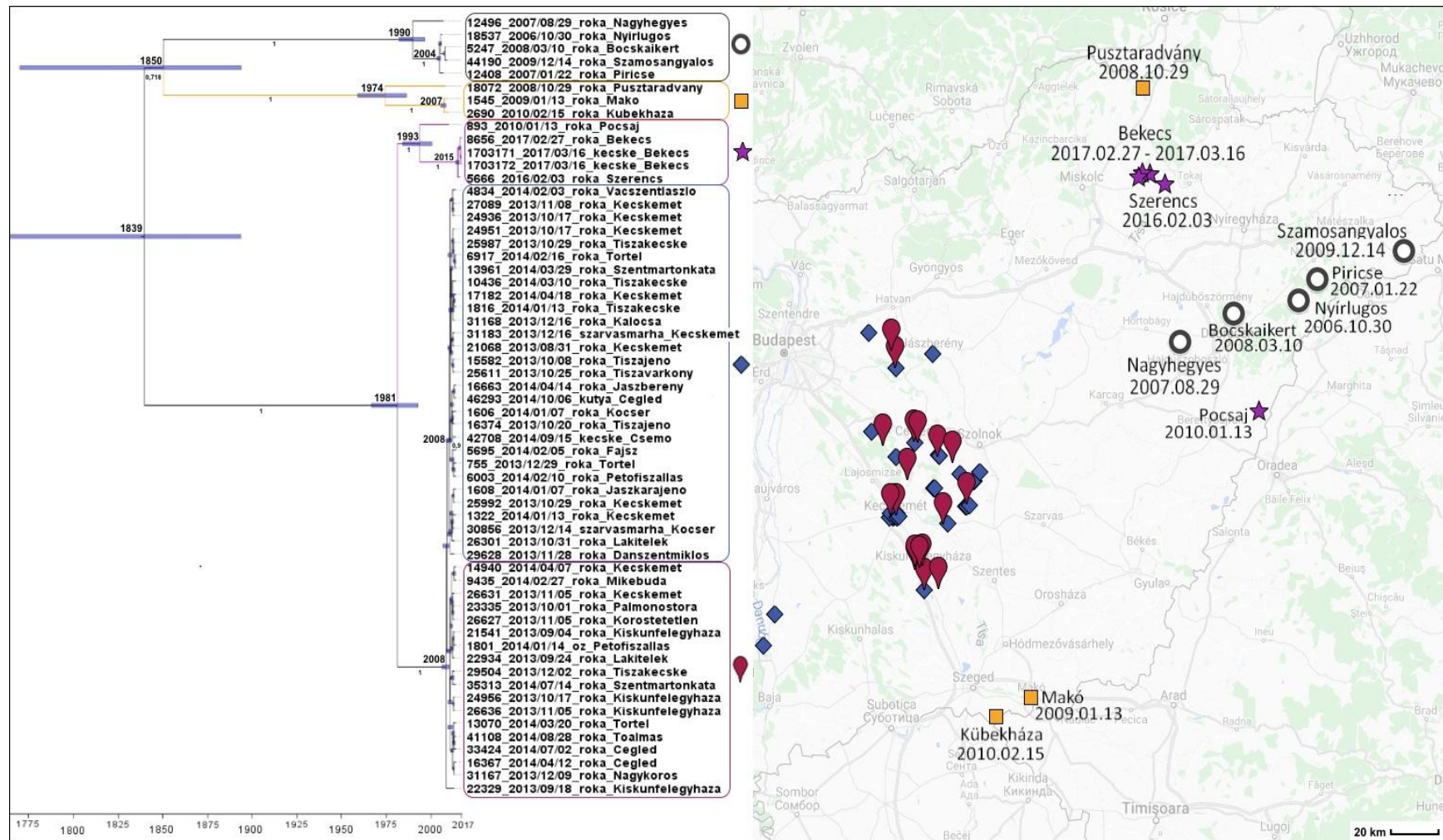
14. táblázat: 2006-2018 között kimutatott RABV genomok nukleotid szintű százalékos hasonlósága klasztereken belül és azok között.

Klaszterek	I. klaszter	II. klaszter	III. klaszter
I. klaszter	99,4 – 100	-	-
II. klaszter	94,64 – 95,26	98,75 – 99,94	-
III. klaszter	94,36 – 95,2	94,4 – 94,67	98,64 – 100

6.1.2 Magyarországi RABV törzsek evolúciós változásainak elemzése (2006-2018)

A 2006 és 2018 közötti RABV esetek származási helyét térképen ábrázoltuk (12. ábra). A kérdéses időszakban bejelentett RABV esetek kizárólag a Dunától keletre eső területekről kerültek elő; a 2013 előtt és 2015 után gyűjtött minták a keleti országrészből, a 2013-2014-ban kimutatott esetek a Duna-Tisza köze területéről származtak.

A mélyebb szintű filogenetikai és evolúciós elemzéseket megelőzően vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a magyarországi RABV genomokban fellelhetők-e a múltban lejátszódott rekombinációs események; ennek lehetőségét azonban a tesztek kizárták (nem mutatott adatok). Ezt követően időskálázott fákat generáltunk, hogy megbecsülhessük a magyarországi RABV törzsek leszármazási vonalainak szétválási idejét és ezzel jobban megértsük a járványügyi vizsgálatok mögött húzódó törvényszerűségeket. A becsült évszámokat az MCC fák csomópontjain tüntettük fel. A Magyarországon 2006 óta azonosított RABV törzsek közös őse 170-180 évvel ezelőtt válhatott szét a ma ismert I., II., és III. klaszterre, bár az 1840-1850-re tehető szétválás időszaka széles tartományban mozog (1765-1894). Ennél pontosabb becsléssel számolhatunk a III.a és III.b klaszter szétválását illetően, melyre körülbelül 40 (± 13) évvel ezelőtt kerülhetett sor. Érdekes megemlíteni a leszármazási vonalak területi eloszlását is. Az I. leszármazási vonalhoz tartozó RABV mintákat azonosítási helyük szerint egymáshoz közelítőleg ~100 km-es távolságból jelentették (Nagyhegyes - Szamosangyalos között), 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, közel azonos időszakban identifikált képviselőjétől (12. ábra). A II. klaszterbe tartozó RABV szekvenciákat vizsgálva érdemes kiemelni, hogy a csoport legkorábbi hazai képviselője Pusztaradványból (Északkelet-Magyarország) származott, míg az ezt követő két évből jelentett RABV eseteket innen ~ 250 km-re Dél-Magyarország területéről azonosították. A pusztaradványi RABV különálló ágat képviselt és már az 1970-es években szétválhatott a II. klaszter többi, hazánkban azonosított képviselőjétől. 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 2013-ban kitört járvány a Duna-Tisza közén lokalizálódott. Bár a járványkitörést klonális eredetűnek írtuk le eredetileg, a teljes genomszekvenciák meghatározása után végzett elemzések szerint két leszármazási vonal létrejött (III.b1 és III.b2), melyek ráadásul nem is a járványos időszak során, hanem korábban, 2008 (95%HPD, 2007-2010) körül különültek el. A becslés pontosságára utaló valószínűségi tartományokat (95%HPD: legmagasabb posteriori sűrűség) kék sávval jelöltük a szétválási pontokon (12. ábra).



12. ábra: Magyarország térképén jelöltük a 2006-2018 során azonosított RABV esetek származási helyét és beküldés időpontját. A bal oldali MCC fán látható a különböző klaszterek szétválásának becsült időpontja. A csomópontokon lévő kék sáv a szétválás dátumának valószínűségi intervallumát jelzi. A különböző klaszterekbe tartozó minták jelölése megegyezik a filogenetikai fán és a térképen. (I. klaszter: kör, II. klaszter: sárga négyzet, III.a és III.c. klaszter: lila csillag, III.b. klaszter mintáit alcsoportonként külön tüntettük fel III.b1. klaszter: kék rombusz, III.b2. klaszter: bordó fordított csepp.)

A 2006 és 2018 között azonosított veszettségvírusok genomszekvenciáiból szubsztitúciós (vagy evolúciós) 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 szubsztitúciós rátákat kiszámítottuk külön-külön az egyes RABV génekre is, amellyel vizsgálni tudtuk a különböző gének evolúciójának sebességét (15. táblázat). 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), míg az M gén ennek az értéknek a kétszeresét mutatva a leggyorsabban ($4,52E-4$ nukleotidcsere/hely/év) változó fehérje kódoló szakasznak tűnt a genomokon belül.

15. táblázat: 2006-2018 között hazánkban azonosított RABV genomok kódoló régióinak szubsztitúciós rátái.

CDS	Szubsztitúciós ráta (95%HPD)
N	3,35E-4 ($2,16E-4 - 4,70E-4$)
P	3,52E-4 ($2,14E-4 - 4,99E-4$)
M	4,52E-4 ($2,65E-4 - 6,48E-4$)
G	3,07E-4 ($1,98E-4 - 4,28E-4$)
L	2,17E-4 ($1,49E-4 - 2,85E-4$)

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 az 2006-2018 között gyűjtött RABV CDS-ein belül mely kodonokon érvényesül pozitív szelekciós nyomás. A kérdés megválaszolásához kiszámoltuk a nem szinonim (azaz aminosav változással járó) és a szinonim (azaz aminosav változással nem járó) mutációk arányát (dN/dS), továbbá alkalmaztuk a Datamonkey webszerver négy algoritmusát (SLAC, FEL, MEME, FUBAR) (16. táblázat). A teljes genomra (azaz az 5 fehérjekódoló gén konkatenálásával kapott szakaszra) vonatkozó dN/dS mutációs ráta 0,104 volt. A kódoló régiónkénti vizsgálatból egy kivétellel minden esetben 1-nél kisebb értékeket kaptunk, ami arra utal, hogy a vizsgált genomi régiókra nem hat pozitív szelekciós nyomás (Jeffares és mtsai., 2015). A III.b. klaszter M CDS-ének dN/dS értéke meglepően magas volt; ennek hátterében az állt, hogy a vizsgált 47 mátrixprotein szekvenciában 5 nukleotid eltérés található és mind az öt aminosav változást okozott. Mind az I. klaszter, mind a II. klaszter esetében találtunk egy-egy aminosav pozíciót, ami a MEME algoritmus alapján pozitív szelekció alatt áll. Ez az algoritmus egyaránt képes detektálni a tartós és az epizodikus szelekciós nyomás alatt álló genomi régiókat. A MEME algoritmussal azonosított aminosavak egyetlen szekvenciában vannak jelen (I. klaszter,

12408_piricsei RABV szekvencia, nukleoprotein 332. aminosav (alanin→treonin); II. klaszter, 1545_makói RABV szekvencia, nukleoprotein 3. aminosav (alanin→valin), ezért feltételezhető, hogy ezek csupán epizodikus szelekciós nyomás alatt állhatnak. Nem mindegyik kódoló régióban tudtuk megvizsgálni csoportokon belül a szelekciós nyomás jelenlétét, mivel legalább három eltérő szekvencia szükséges a vizsgálat elvégzéséhez. Összefoglalva a fentieket, a 2006-2018 között hazánkban kimutatott RABV törzsek fehérje kódoló régióin nem érvényesül tartós pozitív szelekció.

16. táblázat: RABV (2006-2018) genomok kódoló régióira ható pozitív szelekciós nyomás klaszterenkénti vizsgálatának eredménye.

CDS	I. klaszter (n=5)					CDS	II. klaszter (n=3)				
	SLAC ^a	FEL ^a	MEME ^a	FUBAR ^b	dN/dS		SLAC ^a	FEL ^a	MEME ^a	FUBAR ^b	dN/dS
G*	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	0,12
P	-	-	-	-	0,153	P*	-	-	-	-	-
N	-	-	332	-	0,0665	N	-	-	3	-	0,0424
M*	-	-	-	-	-	M*	-	-	-	-	-
L	-	-	-	-	0	L	-	-	-	-	0,0848
CDS	III.a/III.c klaszter (n=5)					CDS	III.b klaszter (n=47)				
	SLAC ^a	FEL ^a	MEME ^a	FUBAR ^b	dN/dS		SLAC ^a	FEL ^a	MEME ^a	FUBAR ^b	dN/dS
G*	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	0,13
P	-	-	-	-	0,612	P	-	-	-	-	0,701
N*	-	-	-	-	-	N*	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	0,105	M	-	-	-	-	27,4
L*	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	0,0877

*Minimum három eltérő szekvencia szükséges a vizsgálat elvégzéséhez, ezek a CDS-ek nem feleltek meg ennek a kritériumnak.

^a Kodonok P értéke <0,1

^b Kodonok posteriori valószínűsége > 0,9

6.1.3 Patogenitásban szerepet játszó fehérjék klaszterenkénti variabilitása

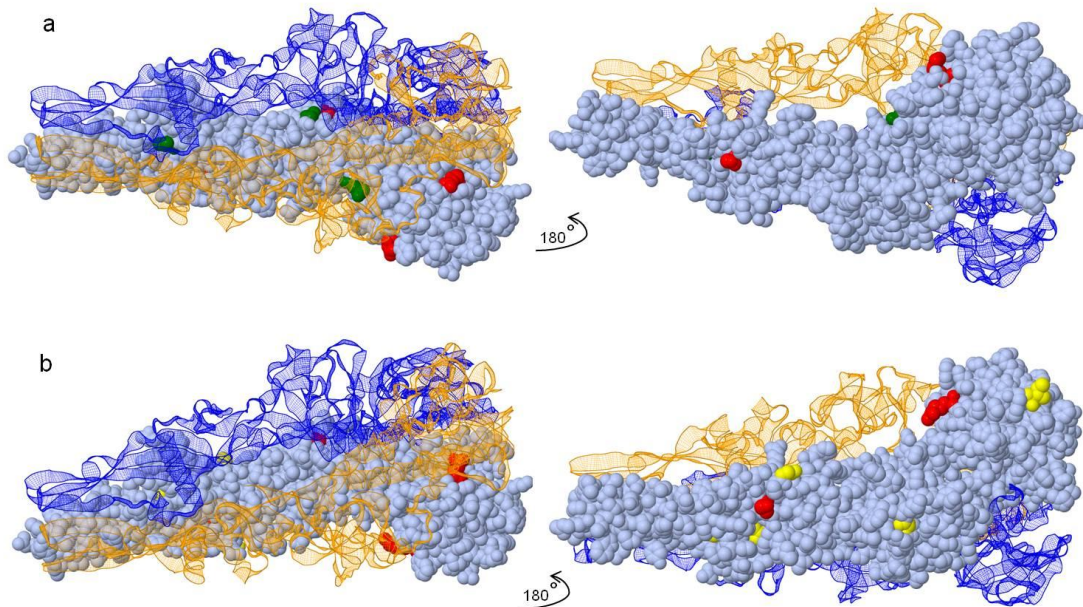
A RABV genomok kódoló régióinak elemzése azt mutatta, hogy a glikoprotein és a foszfoprotein a két legvariábilisabb CDS (13. táblázat). Mivel ezek a fehérjék a vírus-gazda kölcsönhatásban kiemelt szerepet töltenek be, ezért külön figyelmet szenteltünk e fehérjék bioinformatikai vizsgálatának.

Az általunk vizsgált foszfoprotein szekvenciák között klaszterre jellemző eltérést néhány aminosav pozícióban találtunk (17. táblázat), azonban nem mutatkozott különbség a C-terminális doménen. Korábban megállapítottuk, hogy az IIIa./IIIc. és IIIb. klaszterbe tartozó RABV genomok egymáshoz nukleotid szinten jobban hasonlítanak, mint az I. és II. klaszterekbe csoportosuló. A klaszterekre jellemző eltéréseket a foszfoproteinek aminosav változásai is tükrözik.

17. táblázat: A 2006-2018 közötti RABV foszfoprotein szekvenciáinak klaszterenkénti összehasonlítása aminosav (as) pozícióként. Pirosal jelöltük az egyes klaszterekre jellemző egyedi eltéréseket, kék és piros szín mutatja az I.-II. és III. csoportok eltérő mintázatát.

As pozíció	I. klaszter	II. klaszter	III. klaszter
30	K	R	K
60	D	E	D
67	G	G	D
69	M	M	K/M
86	G	G	E
136	P	P	S
138	G	G	R
149	T	V	P
160	T	N	T
166	S	S	G

A glikoprotein a gazda sejt felszíni receptoraihoz kötődik és endocitózist indukál. A glikoprotein kötődni képes a nikotin acetil-kolin (nAChR) receptorhoz (189. as; 214. as) és a p75 neurotrophin receptorhoz (318. as; 352. as), ezzel elősegítve a rabies vírus bejutását a sejtbe (Lentz és mtsai., 1990; Langevin és mtsai. 2002). Modelleztük a glikoprotein felszíni régióját a VSV (hólyagos szájgyulladás vírusa (vesicular stomatitis virus)) glikoproteinjét referenciaként használva (13. ábra).



13. ábra: Az I. klaszterbe tartozó glikoprotein virion felszíni régiójának modellje (a). Zölddel jelöltük a klaszterre jellemző eltéréseket. A II. klaszterhez csoportosuló glikoprotein virion felszíni régiójának modellje (b). Sárga színnel a klaszterre jellemző eltérések láthatóak. Piros színnel jeleztük az nAChR és a p75 receptorok kötőhelyeit.

A glikoprotein szekvenciákban található klaszterenként jellemző eltérést mutató aminosavakat a 18. táblázatban gyűjtöttük össze. A glikoprotein mind a négy szerkezeti egységében megmutatkoznak klaszterekre jellemző as eltérések. Klaszterre jellemző eltérést az I. és II. RABV csoport szekvenciáiban figyeltünk meg. Az I. klaszterből a 12496_Nagyhegyes (13a. ábra), a II. klaszterből a 1545_Makó (13b. ábra) genomok glikoproteinjének (a virion felszíni régiókban) szemléltetjük a kizárólag arra a klaszterre jellemző aminosav eltérések helyét a homotrimer egyik láncán (13. ábra). A vizsgált RABV glikoprotein szekvenciák konzervatívák mind az nAChR, mind a p75 neurotropin-kötő helyeken, melyeket piros színnel tüntettünk fel a 13. ábrán látható virion felszíni modelleken. A glikoprotein vizsgálatok azt tapasztaltuk, hogy a klaszterekre jellemző eltéréseken felül az I – II és III.a/III.c. – III.b filogenetikai csoport egymással nagyobb hasonlóságot mutat (18. táblázat).

18. táblázat: A 2006-2018 közötti RABV glikoprotein szekvenciáinak klaszterenkénti összehasonlítása aminosav pozícionként. Pirosal jelöltük az egyes klaszterekre jellemző egyedi eltéréseket, kék és narancssárga szín mutatja az I.- II. és III.a/III.c- III.b csoportok eltérő mintázatát.

Elhelyezkedés	As pozíció	I. klaszter	II. klaszter	III.a/III.c klaszter	IIIb. klaszter
Signal peptid (1-19 as)	2	F	V	V	V
	5	A	A	T	A
	8	F	F	L	L
	10	S	P	P	P
	13	V	V	G	G
Virion felszíni régió (20-549 as)	30	L	I	L	L
	72	A	A	S	S
	102	K	K	R	R
	152	I	V	I	I
	175	S	G	S	S
	198	M	L	M	M
	202	L	P	L	L
	2012	I	T	T	T
	268	T	A	T	T
	357	I	I	V	V
	361	K	K	R	R
404	M	M	I	I	
Transzmembrán (460-480 as)	464	A	A	A	V
	473	I	I	I	T
	477	L	M	I	I
Intravirion (481-524 as)	483	V	V	I	V
	484	S	N	N	N
	489	S	P	S	S
	491	H	R	R	R
	493	L	F	L	L
	494	G	G	R	R
	496	K	T	A	A
	497	G	R	G	G
	504	P	S	S	S
	506	S	G	S	S

6.2 Egy váratlan veszettségjárvány vírusizolátumainak jellemzése

A 2013-2014 során kitört veszettségjárvány idején azonosított RABV genomszekvenciák a III.b klaszterbe csoportosultak (11. ábra). Ezekből a mintákból (n=47) készített szekvenciaillesztés 11 799 nukleotid hosszúságú genomokat eredményezett, a genomszekvenciáik közötti azonosság értéke 99,8% és 100% közöttinek bizonyult. A génekre vonatkozó információk azonosak a 2006-2018 szekvenciákat tartalmazó veszettség genomok bemutatásánál leírtakkal. A kódoló régiók nt szintű azonossága mind az öt gén esetében 99,67% feletti, azonban az as szintű eltérések alapján a nukleoprotein és a polimerázt kódoló régiók a leghasonlóbbak ($\geq 99,9\%$). A nukleotid, illetve aminosav szintű eltéréseket a kódoló és intergenikus régiókban, a 19. táblázatban foglaltuk össze. Eszerint a G és L CDS-ek közötti intergenikus régió mutatja a legnagyobb azonosságot (99,03%), míg az N–P intergenikus szakasz tér el leginkább ebben a filogenetikai csoportban ($\geq 96,6\%$ nt azonosság). A III.b klaszterbe tartozó RABV genomok további két csoportba (III.b1 és III.b2 szubklaszter) sorolhatóak. A pontmutációs mintázatot szubklaszterenként ábráztuk, hogy érzékeltessük a 2013-2014-es járvány RABV genomjainak jelentős homogenitását (14. ábra). Az ábrázolt szekvenciaillesztésből jól kivehető a két genetikai vonalra jellemző SNP mintázat. Érdeemes megfigyelni, hogy a III.b2 szubklaszter második mintája (22329_Kiskunfélegyháza) erre a klaszterre jellemző pontmutációk közül három esetben eltért (220nt N, 3071nt M–G, 4221nt G), ez a variabilitás azt eredményezte, hogy a 2006-2018 adathalmazból készített filogenetikai fán ez a vírus a III.b2 leszármazási vonalhoz tartozott (11. ábra), ugyanakkor elkülönült a kérdéses csoport tagjainak szekvenciáitól.

19. táblázat: Kódoló régiók szekvencia eltéréseinek összehasonlítása a 2013-2014-es RABV járvány mintáiban.

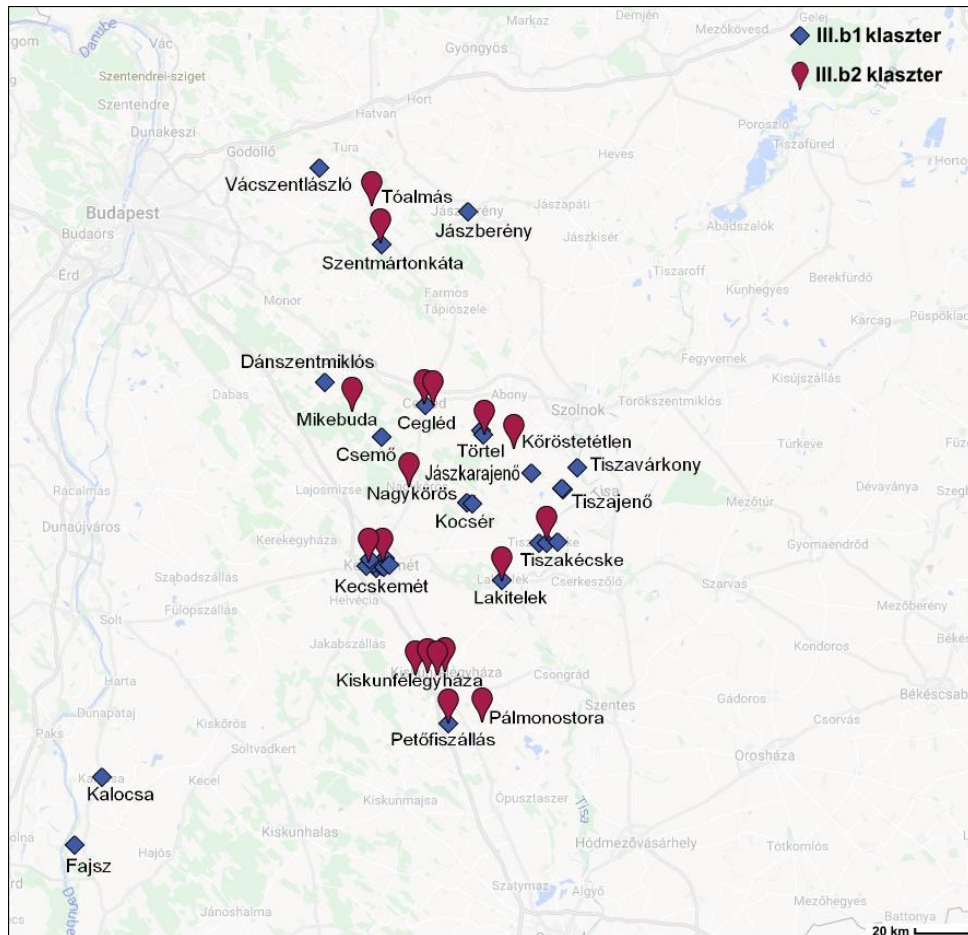
	Kódoló régiók (CDS)					Intergenikus régiók			
	N	P	M	G	L	N–P	P–M	M–G	G–L
Nukleotid hossz	1353	894	609	1575	6384	90	88	211	518
Min. nukleotid azonosság (%)	99,85	99,67	99,67	99,75	99,83	96,67	98,86	98,58	99,03
SNP	6	7	5	11	35	3	1	5	10
Min. aminosav azonosság (%)	100	99,33	99	99,62	99,9	-	-	-	-
Aminosav eltérés	0	4	5	2	8	-	-	-	-



14. ábra: A 2013-2014 során kimutatott RABV teljes genomokban látható pontmutációs mintázat szubklaszerenként, időrendben listázva.

6.2.1 A 2013-2014 évi járvány során azonosított RABV genomok evolúciós változásainak elemzése

A 15. ábra Magyarország Duna-Tisza köze régióját ábrázolja, ahol elhelyeztük a 2013-2014-es járvány során feldolgozott RABV törzsek mintavételi helyeit, filogenetikai csoportonként különböző jelöléssel. A térkép bemutatja, hogy mind a 47 azonosított eset a Duna és a Tisza által jól körülhatároltan az M3-as autópályától délre lokalizálódott. A 47 eset többségét vörös rókából mutatták ki, emellett két szarvasmarhát (30856_Kocsér; 31183_Kecskemét), egy-egy esetben pedig európai őzet (1801_Petőfiszállás), kutyát (46293_Cegléd) és kecskét (42708_Csemő) érintő elhullás is történt.

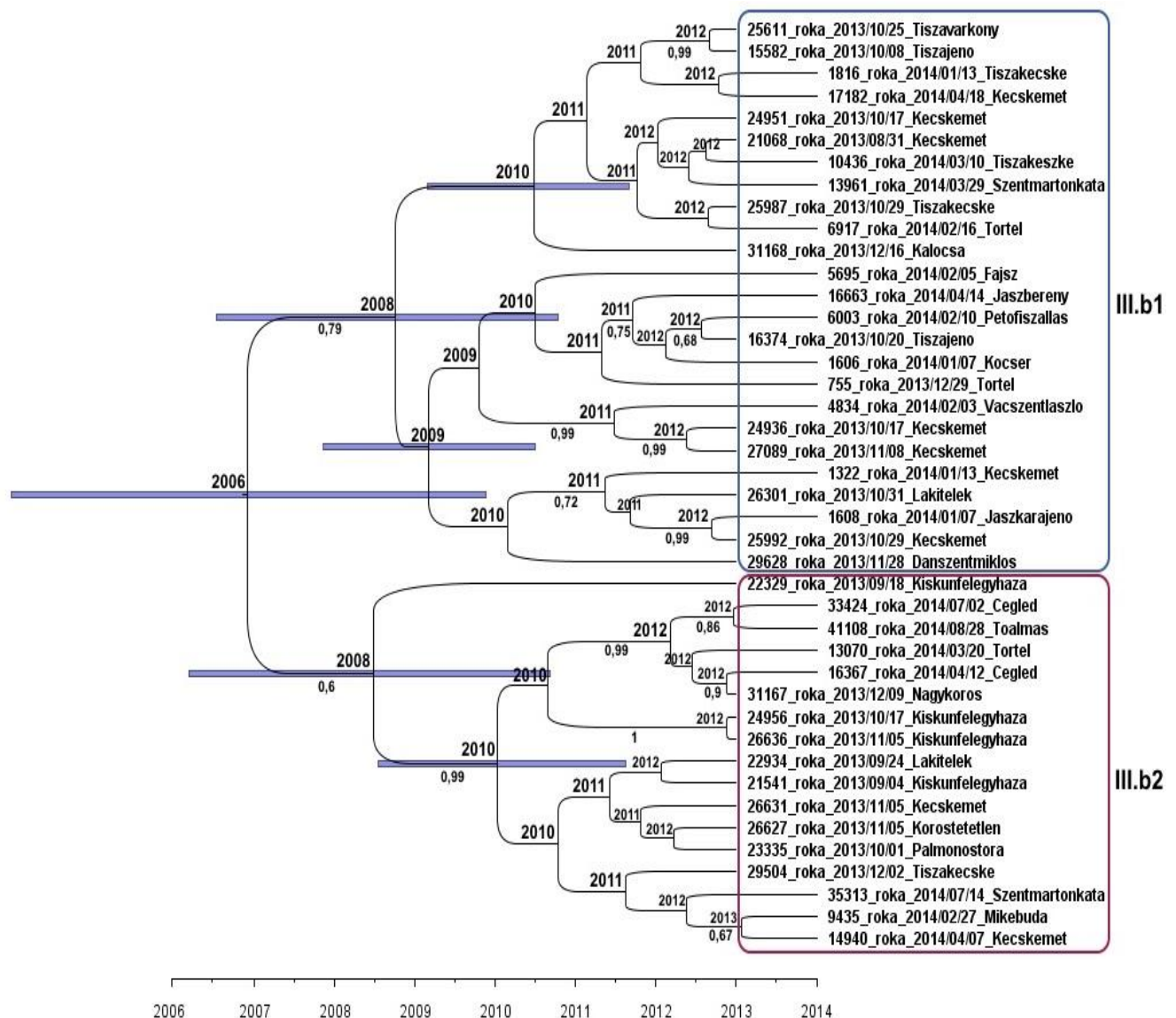


15. ábra: A 2013-2014 során fellobbanó RABV járvány mintáinak származási helyei, az MCC fán két klaszterbe csoportosuló minták külön jelöléssel feltüntetve.

Evolúciós számításokat végeztünk és időskálázott fát generáltunk, hogy megbecsülhessük a 2013-ban kitört járvány leszármazási vonalainak szétválási idejét, melyhez a rókákból azonosított genomokat ($n=42$) használtuk fel. Ez az adathalmaz nagyon homogénnek bizonyult, amit a fenti elemzések is alátámasztottak, és időben, legalábbis evolúciós léptékben mérve, rendkívül rövid intervallumot (2 év) fedett le. Ezért a 2013-2014-es járvány önálló jellemzésére készített MCC fa egyes ágainak szétválására adott becslések valószínűségi intervalluma (95% HPD) viszonylag széles tartományban mozgott (adatok nincsenek mutatva). Ugyanakkor a számítások ugyanarra az időintervallumra tették a két szubklaszter szétválásának idejét (2006; 95%HPD: 1998-2010) (16. ábra), mint amit a teljesebb, 2006-2018 adathalmaznál a III.b klaszterre becsültünk (2008; 95%HPD: 2007-2010) (12. ábra).

Az időskálázott fa azt sejtette, hogy a két szubklaszter képviselői már évekkel korábban a térségben cirkulálhattak. Ezért a vírus Duna-Tisza köze területén jellemző terjedésének dinamikáját vizsgáló filogeográfiai elemzést végeztünk. Ehhez a becsléshez a minták származási helyeinek koordinátáit használtuk, folyamatos változónak tekintve

azokat. A többi elemzés során a szekvenciákra jellemző adatok, mint például beküldés ideje, helye, gazdafaja diszkrét változóként voltak kezelve. Tekintettel arra, hogy a különböző gazdafajok körében a vírusterjedés a hordozó állat eltérő viselkedésbiológiai tulajdonságai miatt torzulásokat okozhattak volna a számításokban, csak a 42 vörös róka eredetű szekvenciákat vettük figyelembe. 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 figyelembevételével azt sejtette, hogy a vírus nem a járványkitörés észlelt időszakában, hanem annál korábban terjedhetett szét a Duna-Tisza közén.



16. ábra: 2013-2014 során hazánkban kimutatott, kizárólag rókából származó RABV genomokból készített MCC fa. A csomópontok felett látható a szétválás dátuma, az ágak alatt a 0,6-nál magasabb posteriori valószínűséget tüntettük fel.

6.3 Európai és magyarországi részleges RABV nukleoprotein és glikoprotein szekvenciák filogeográfiai elemzése

A 2006-2018 közötti időintervallumból származó magyarországi RABV genomok elemzése alapján nem kaphattunk képet arról, hogy a hazai RABV törzsek mely környező országokból származó RABV törzsekkel állnak genetikai rokonságban. Így ennek tisztázására további elemzéseket végeztünk. A felmerülő kérdés megválaszolásához reprezentatív számú GenBank-i szekvencia adatot gyűjtöttünk európai országokból származó RABV vírustörzsekről. Mindehhez nem csupán a vizsgált területet, hanem a vizsgált időintervallumot is bővítettük; ennek megfelelően a 1990-es évekből származó magyarországi RABV minták szekvenciáit is bevontunk az elemzésbe, beleértve a GenBankban 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 szekvenciáit tudtuk csak felhasználni; a szakirodalomban ezeket a genomi régiókat használják molekuláris epidemiológiai és evolúciós vizsgálatokhoz (Davis és mtsai., 2007; Talbi és mtsai., 2009; Ming és mtsai., 2010; McElhinney és mtsai., 2011, Fusaro és mtsai., 2013).

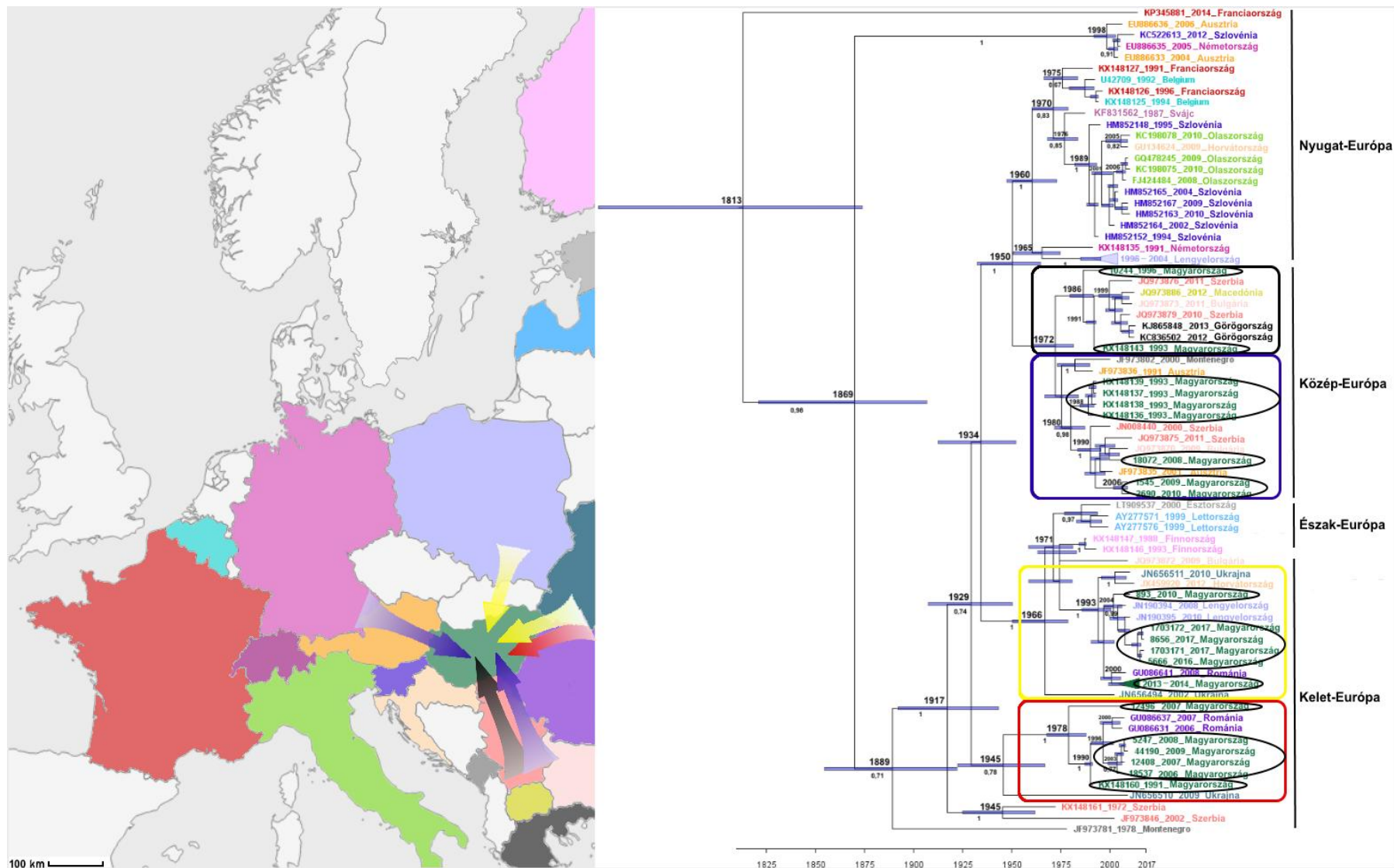
Először a RABV részleges nukleoprotein génszekvencia (n=123; 571 nt hosszúságú szakasz) illesztésével kapott adathalmazzal végeztünk evolúciós számítást. A GenBank-ban fellelhető európai RABV N fehérjét kódoló szekvenciák 20 országból, 1972-től 2017-ig terjedő időintervallumban gyűjtött mintákból származtak. Az illesztett szekvenciák nt szintű azonossága 88,9%-100% közöttinek bizonyult. A részleges nukleoprotein szekvencia adatokra számított szubsztitúciós ráta $3,52E-4$ nukleotidcsere/hely/év (95% HPD: $2,55E-4$ - $4,55E-4$) értéket mutatott, ami közel azonos a hazai, teljes hosszúságú nukleoprotein génre számított szubsztitúciós ráta értékkel ($3,36E-4$ nukleotidcsere/hely/év). Az N gén alapú időskálázott fán (17. ábra) származási országuk alapján színekkel láttuk el a vizsgálatban szereplő RABV szekvenciákat. A Kuzmin és munkatársai által is használt geográfiai régiókat feltüntettük az MCC fa mellett (Bourhy és mtsai., 1999; Kuzmin és mtsai. 2004). Ez alapján a három fő genetikai vonalhoz tartozó, Magyarországon izolált RABV törzsek közép- és kelet-európai, valamint balkáni eredetű veszettségvírus mintákkal csoportosultak. Közelebbről megvizsgálva a magyarországi származású szekvenciákat tartalmazó legkisebb filogenetikai csoportokat a 1993-1996 között azonosított magyarországi szekvenciák szerbiai, bulgáriai és ausztriai mintákkal (fekete és kék nyíl), míg a II. klaszterhez sorolható RABV vírus szekvenciák szintén ausztriai, szerbiai és bulgáriai szekvenciákkal csoportosultak. A 2006 és 2010 között azonosított magyarországi vírusok közül az I. klaszterbe tartozók Romániában gyűjtött vírustörzsekkel mutattak rokonságot (piros nyíl). 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, és ha így van, hosszú vándorlás révén juthattak hazánkba. Az elmúlt években (2016-2017) kimutatott magyarországi RABV szekvenciák lengyelországi, ukrainai és romániai mintákkal mutattak rokonságot (sárga nyíl). A RABV N génszekvenciákon alapuló Kuzmin-féle rendszerezést (2004) figyelembe véve az 1990-es évektől napjainkig hazánkban azonosított és genetikailag jellemzett RABV törzsek két nagyobb kládba sorolhatóak, a közép-európai és a kelet-európai kládba. Az MCC fa topológiájából azonban jól látszik, hogy a hazai törzsek eredete és járványtörténete ennél sokkal részletgazdagabb. 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. Közép-európai klád monofiletikus csoport, amelynél a ma ismert törzsek és a nyugat-európai klád közös őse az 1950-es évek elején válhatott szét. Ezen belül a hazánkban is kimutatott közép-európai klád ma ismert genetikai csoportja (II. klaszter) az egyetlen recens hazai képviselője a kládnak. A klád 1990-es évekből ismert hazai képviselői itthonról kiszorultak (feltételezhetően kihaltak), azonban recens leszármazottaik a balkánon még az elmúlt 5 évben is cirkuláltak. A Kuzmin-féle kelet-európai klád nem monofiletikus; az I. klaszter leválása a 1920-es évek végén időben egybeesett a III.a és III.c valamint a III.b klaszter képviselőinek leválásával, de a kérdéses hazai klaszterek szétválása a közös pán-európai ágról egymástól független esemény volt (17. ábra).

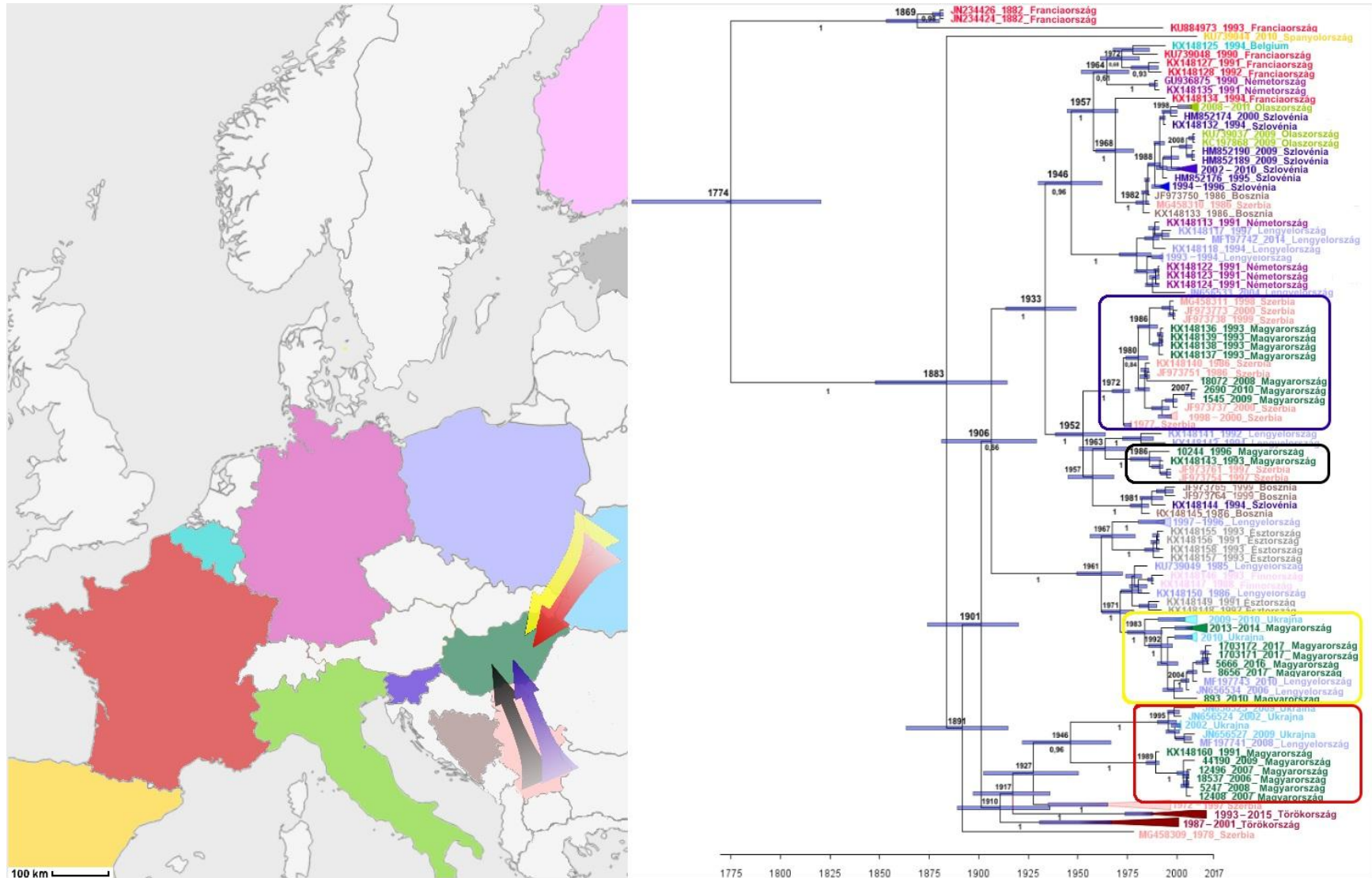
A RABV részleges (672 nukleotid hosszú) glikoprotein szekvenciáit elemezve (n=198) a szekvenciák nukleotid szintű azonossága 91,4%-100% volt, ezek tartalmazták a hazai (1991-2017) és a GenBank-ban fellelhető európai szekvenciákat (1882-2017) és területi megoszlás szerint 14 országot reprezentáltak. A részleges glikoprotein evolúciós rátája alapján $2,59E-4$ nukleotidcsere/hely/év (95%HPD: $2,03E-4$ - $3,18E-4$), ami a teljes génre számított szubsztitúciós rátánál ($3,07E-4$) lassabb evolúciót mutat. A G CDS részleges szekvenciákból készített MCC fa alapján (18. ábra) a magyarországi szekvenciákat tartalmazó legkisebb filogenetikai csoportokat vizsgálva, az 1993-1996 közötti és a II. klaszterhez sorolható hazai RABV vírus szekvenciák szerbiai mintákkal (kék és fekete nyíl) csoportosulnak. A II. klaszterbe és az 1990-es évekből származó hazánkban azonosított minták (kék és fekete keretben) esetében valószínűsíthető a Szerbiából Magyarországra irányuló behurcolás. A 2006 és 2010 közötti magyarországi RABV szekvenciák közül az I. klaszterbe tartozók ukrainai és lengyelországi származású mintákkal mutattak rokonságot (piros nyíl). A 2013-2018 során detektált magyarországi szekvenciák szintén Lengyelországból, Ukrajnából kerülhettek hazánkba (sárga nyíl). A 2013-2014-ben kirobbanó hazai RABV járvány lehetséges forrásait illetően az N génre kapott adatokkal látszólagos

ellentmondásokat fedeztünk fel; az ellentmondás fő forrása feltehetően az volt, hogy romániai RABV glikoprotein szekvenciák nem voltak elérhetőek a GenBank-ban.

A leszármazási vonalak szétválásának idejére irányuló evolúciós becslések génenként eltérést mutattak (17.-18. ábra), ami részben abból adódik, hogy a RABV genom egyes részei eltérő ütemben evolválódnak, részben pedig abból, hogy a szomszédos országokból származó RABV génszekvenciák nem egységesek (általában vagy N, vagy G génre elérhetőek), teljes genomszekvenciák pedig alig találhatóak a GenBank-ban. Megfelelő mennyiségű nemzetközi vonatkozású szekvencia-adat híján jelen dolgozat írásakor nem adható meg pontosan, hogy a hazai előfordulású RABV esetek és a szomszédos országokban leírt RABV esetek között milyen irányú volt a törzsek terjedése.



17. ábra: Európai és magyarországi RABV részleges nukleoprotein szekvenciák leszármazási vonalai MCC filogenetikai fa alapján. A csomópontokon lévő kék sáv a szétválás dátumának valószínűségi intervallumát jelzi, csomópontok felett a szétválás dátuma látható.



18. ábra: Európai és magyarországi RABV részleges glikoprotein szekvenciák leszármazási vonalai MCC filogenetikai fa alapján. A csomópontokon lévő kék sáv a szétválás dátumának valószínűségi intervallumát jelzi, csomópontok felett a szétválás dátuma látható.

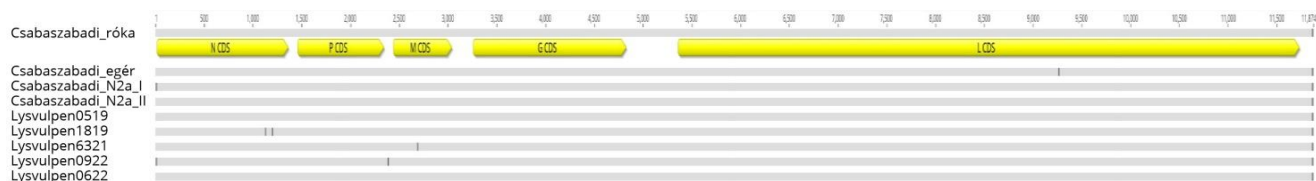
6.4 RABV vakcina vírus kimutatása vörös rókából

2015 novemberében a Békés megyei Csabaszabadin egy másfél éves vörös rókát lőttek ki, mert szokatlan imbolygó járással mozgott és bizonytalan viselkedést mutatott. A kilőtt állatból a NÉBIH-ÁDI munkatársai veszettség vakcinavírust mutattak 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. Az így kapott genomok illesztése (11 874 nukleotid) 99,9%-100% közötti nt szintű azonosságot mutatott (GC tartalom 45,1%). A genomok CDS-einek általános bemutatását a 20. táblázat tartalmazza, ahol feltüntettük a genomban kódolt öt gén pozícióját 3'-5' irányban. A Lysvulpen vakcinavírus genomok kódoló régióiban csupán három pontmutáció fordult elő, míg a Csabaszabadi eredetű RABV genomok esetében mindössze egy pontmutációt találtunk (20. táblázat). A pontmutációk elszórta lokalizálódtak a virális genomokban. A nukleoproteint megelőző szekvencia régióban található egyetlen pozícióban találtunk SNP-t. Az N CDS területén, két helyen volt pontmutáció. Az N–P intergenikus régióban, egyetlen pozícióban, míg az M és L CDS-ekben egy-egy helyen találtunk SNP-t. A polimeráz kódoló genomi szakaszt követően szintén egy pozícióban volt pontmutáció (19. ábra).

20. táblázat: Az általunk szekvenált Lysvulpen és Csabaszabadi eredetű RABV genomok, CDS-einek általános bemutatása. (Azon sorokat kézzel emeltük ki, ahol pontmutációt azonosítottunk.)

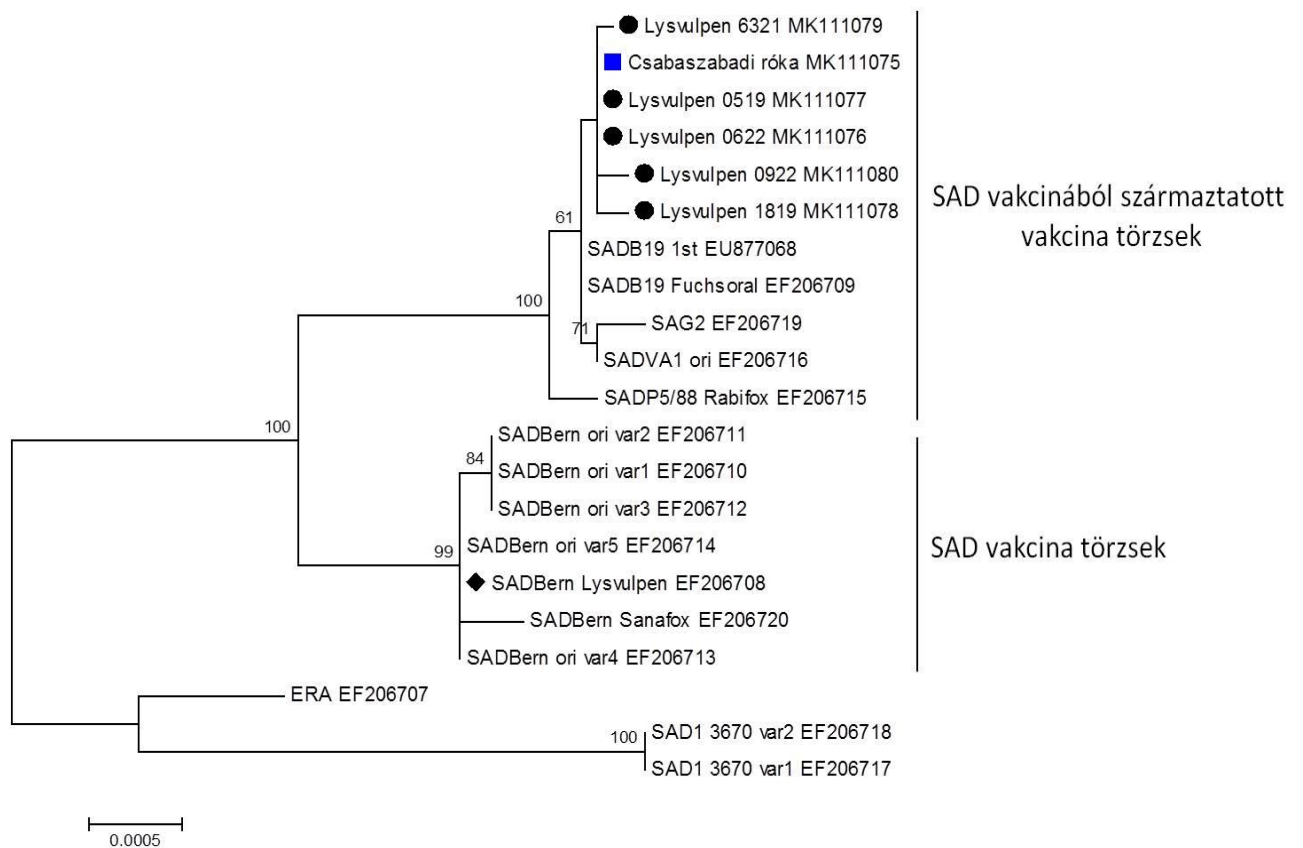
Mintanév és azonosító	CDS név	CDS hossz (nt)	ORF genomi pozíciója	SNP száma
Lysvulpen_0519	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Lysvulpen_1819	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	2
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Lysvulpen_6321	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	1
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Lysvulpen_0922	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0

Lysvulpen_0622	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Csabasabadi_róka	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Csabasabadi_egér	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	1
Csabasabadi_N2a/1	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0
Csabasabadi_N2a/2	Nukleoprotein (N)	1353	17 - 1369	0
	Foszfoprotein (P)	894	1460 - 2353	0
	Mátrix protein (M)	609	2442 - 3050	0
	Glikoprotein (G)	1575	3263 - 4837	0
	Polimeráz enzim (L)	6384	5360 - 11743	0



19. ábra: Az öt RABV vakcina genom és a négy Csabasabadi izolátum genomjának illesztése pontmutációk feltüntetésével.

Filogenetikai fát készítettünk a Magyarországon alkalmazott vakcina törzsek és a GenBank-ban fellelhető referencia vakcina törzsek teljes genomjának összehasonlításához (20. ábra). A filogenetikai fa alapján 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 (köztük 27-30 nt eltérést figyeltünk meg a teljes genom mentén, ami megfelel 99,72%-99,76% nt azonosságnak).



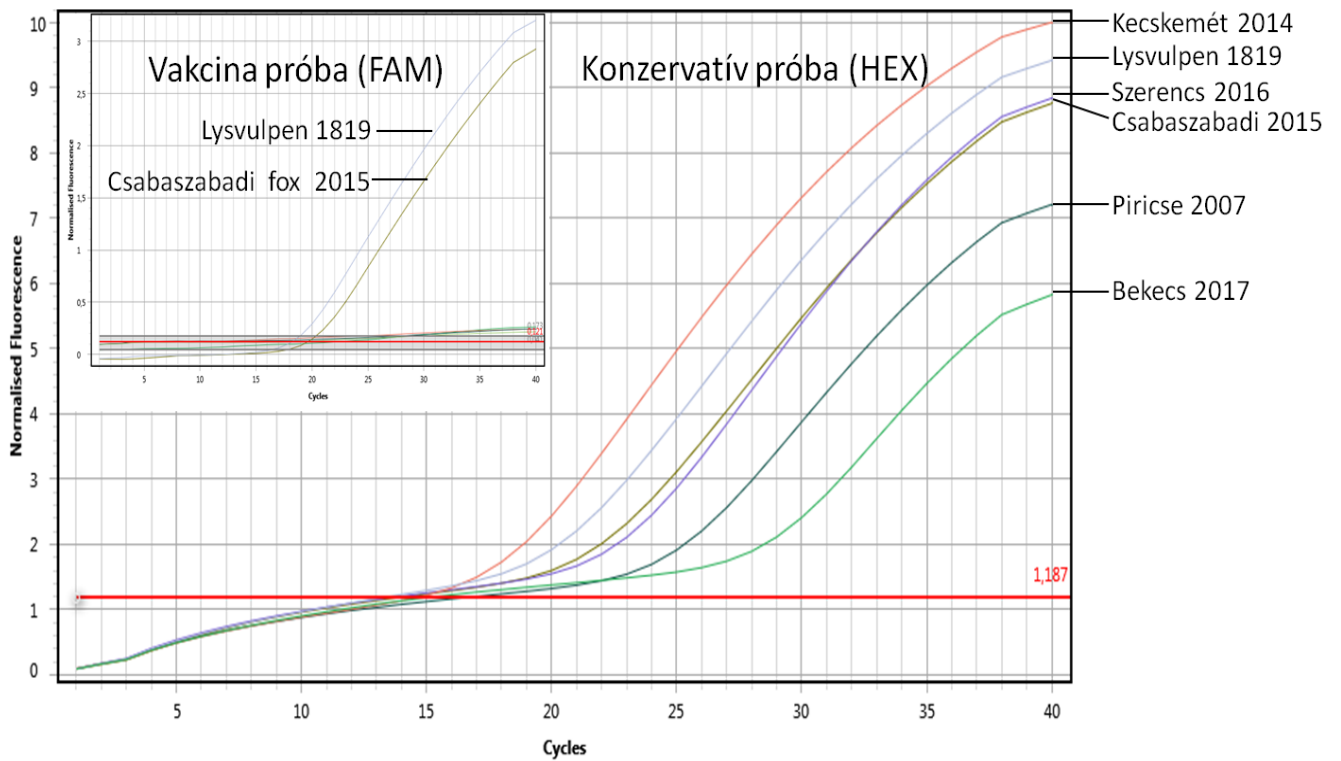
20. ábra: Filogenetikai fa a maximum likelihood módszerrel, Tamura 3 szubsztitúciós modell és 1000 bootstrap beállítással készült. Hazánkban használt Lysvulpen vakcina törzsek (fekete kör) és a rókából izolált Csabaszabadi vakcina genom a SAD vakcinából származtatott vakcinák közé sorolódnak ellentétben az eredeti Lysvulpen (fekete rombusz) GenBank-i vakcina törzssel.

A kelet-európai RABV és a vakcina törzsek gyors meghatározására DIVA-TaqMan RT-PCR módszert fejlesztettünk. A GenBank-ban megtalálható RABV vakcina genomok és kelet-európai vad RABV törzsek (RABV_KE) illesztése alapján terveztük a próbákat (21. ábra). A tervezett próbák és primerek a polimeráz enzimet kódoló genomi régióban tapadnak (21. ábra). A 'vakcina próba' a vakcina törzshöz tapad, míg a 'konzervatív próba' a vad és a vakcina vírus törzsek felsokszorosítását is segíti. A duplex RT-PCR rendszer (FAM, vakcina próba; HEX, konzervatív próba) kidolgozásához a Csabaszabadi vakcina-eredetű törzs mellett a rendelkezésünkre álló összes vakcina törzset (6321, 0922, 0622, 0519, 1819) és az általunk szekvenált vad típusú vírus törzsek közül négy mintát (12408_Piricse, 14940_Kecskemét, 5666_Szerencs, 8656_Bekecs) használtuk fel. A vakcinavírus eredetű RNS-eket közvetlenül csalétekvakcinából, a vad típusú vírus RNS-t agyhomogenizátumból tisztítottuk. A módszer optimalizálása során a vizsgálatokat minden törzssel három

párhuzamos futtatásban végeztük. A multiplex RT-PCR rendszer diagnosztikai kiértékelésének ábrázolásához készítettük a 22. ábrát, amelyen a jobb láthatóság kedvéért a párhuzamos futtatásokból egyet-egyét jelöltünk. A vírusvakcina mintákból szintén egyet, a 1819-es törzset tüntettük fel az ábrán. A fluoreszcens szignált két különböző csatornán detektáltuk.



21. ábra: A DIVA-TaqMan RT-PCR módszer fejlesztéséhez használt genomi régiók és az általunk tervezett primerek és próbák kötőhelyének sematikus ábrázolása. A DIVA-TaqMan rendszer alkalmas a kelet-európai RABV (RABV_KE) és a vakcina törzsek elkülönítésére.

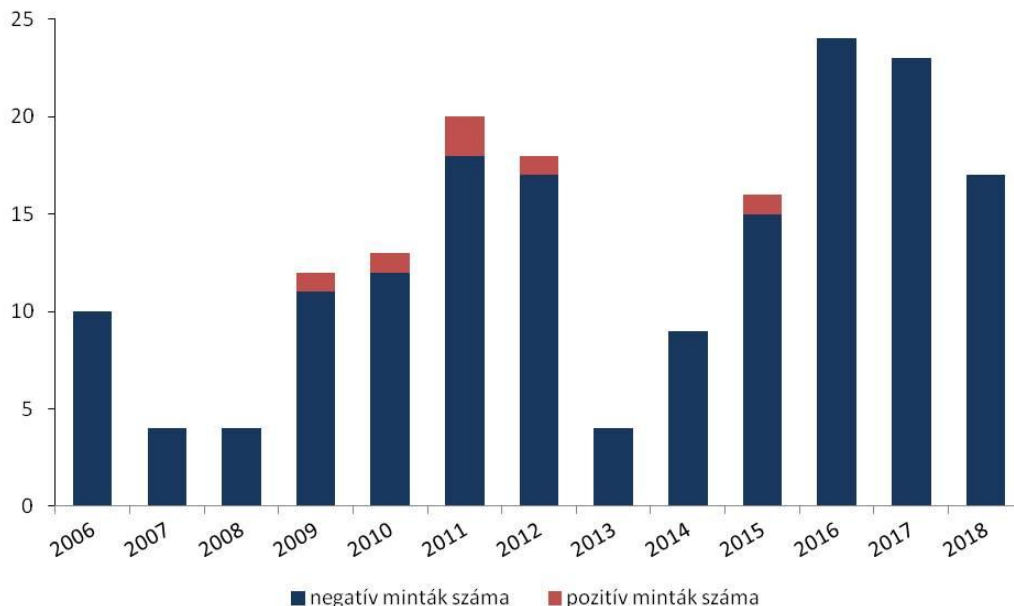


22. ábra: DIVA-TaqMan RT-PCR módszer a SAD vakcinából származtatott vírus törzsek és Kelet-Európában cirkuláló vad rabies vírus törzsek elkülönítésére. Az ábrán két különböző csatornán (FAM, HEX) detektált ciklusonként normalizált fluoreszcencia látható. A vakcina próba kizárólag a vakcina vírusgenomjához köt (kisebb ábra), míg a konzervatív próba mind a vad, mind pedig a vakcina vírus genomhoz képes kötődni (nagyobb ábra).

6.5 EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata

6.5.1 Hazai EBLV-1 esetek összefoglaló bemutatása

A denevérvészesség hazai előfordulásáról kapott ismereteinket passzív szűrővizsgálatokból nyertük (23. ábra). 1977 és 2017 között 144 denevér mintából hét bizonyult denevérvészességre pozitívnak. Az első hazai esetet 1999-ben azonosították (Molnár és mtsai., 2008), az ezt követő 10 évben egyetlen denevér esetet sem dokumentáltak. 2009-től az évenként vizsgált 4-24 mintából átlagosan egy-két denevérben sikerült denevérvészesség fertőzöttséget igazolni egészen 2015 végéig (23. ábra). A napjainkig kimutatott hazai denevérvészesség esetek mindegyike közönséges késeidenevérhez (*Eptesicus serotinus*) volt köthető.

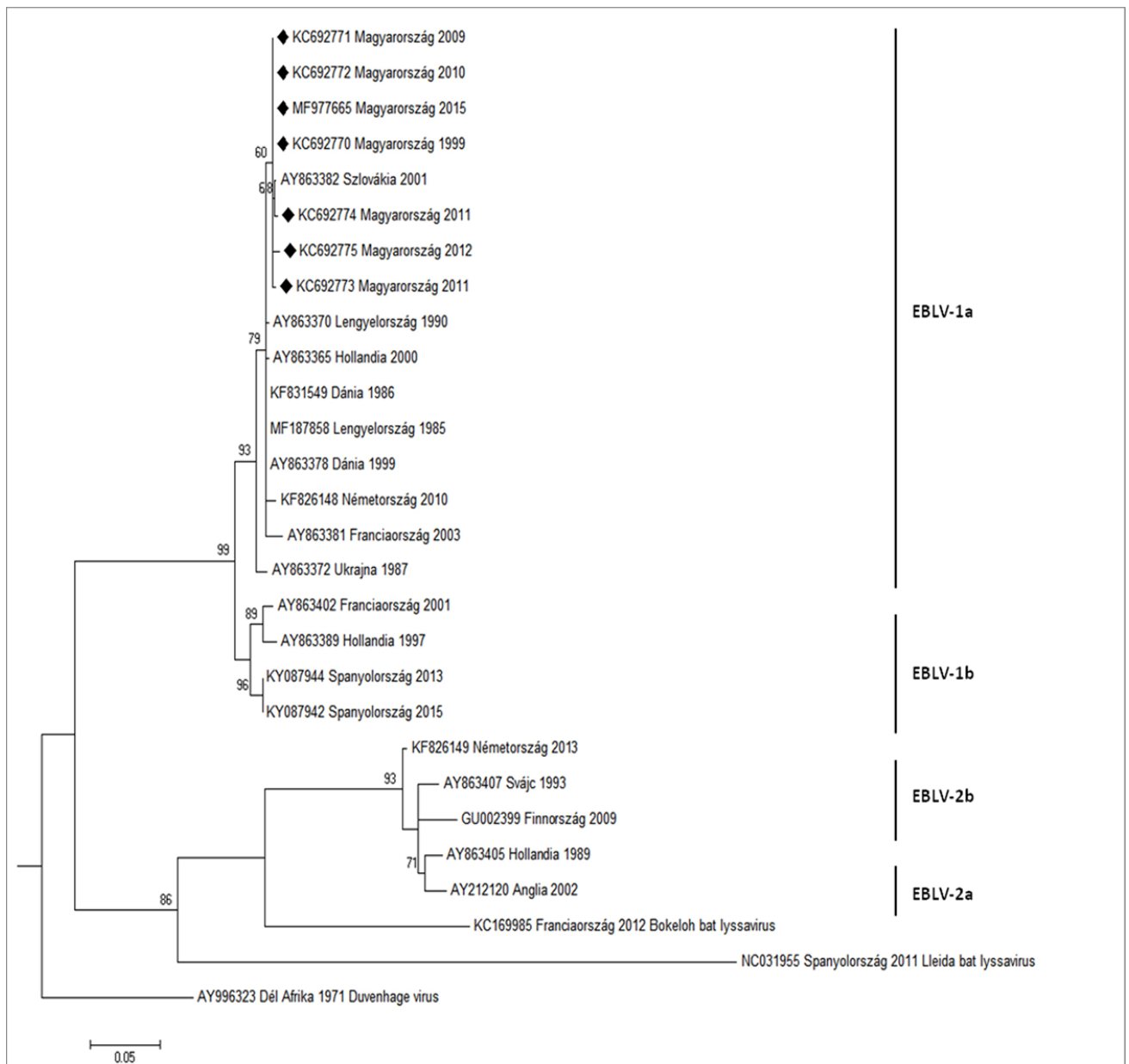


23. ábra: Denevérvészességre vizsgált minták száma hazánkban 2006 és 2018 között.

6.5.2 EBLV-1 filogenetikai vizsgálatok részleges kódoló régiók alapján

Hazánkban leírt hét denevérvészesség vírus törzs Sanger-féle szekvenálási módszerrel kapott részleges nukleoprotein (570 nukleotid) régióját összevetettük a környező országok GenBank-ban található szekvenciáival. A filogenetikai elemzésből kiderült, hogy az EBLV szekvenciák további két-két klaszterre válnak szét, az EBLV-1a és EBLV-1b leszármazási vonalakra, továbbá EBLV-2a és EBLV-2b csoportokra. A hazai denevérvészesség minták mind az EBLV-1 fajba, azon belül is az EBLV-1a leszármazási

vonáshoz tartoztak (24. ábra). Az EBLV-1a klaszteren belül a filogenetikai vizsgálatban felhasznált szekvenciák azonossága 97,2% és 100% között változott, míg az EBLV-1a és 1b klaszterek között a szekvencia azonossági érték 94,3% – 96,1% közé estek.



24. ábra: A filogenetikai fa EBLV részleges nukleoprotein szekvenciák alapján (maximum likelihood módszer, Tamura-Nei szubsztitúciós modell, 1000 bootstrap). A hazánkban detektált EBLV vírusok (fekete rombusz) az EBLV-1a leszármazási vonalhoz csoportosulnak.

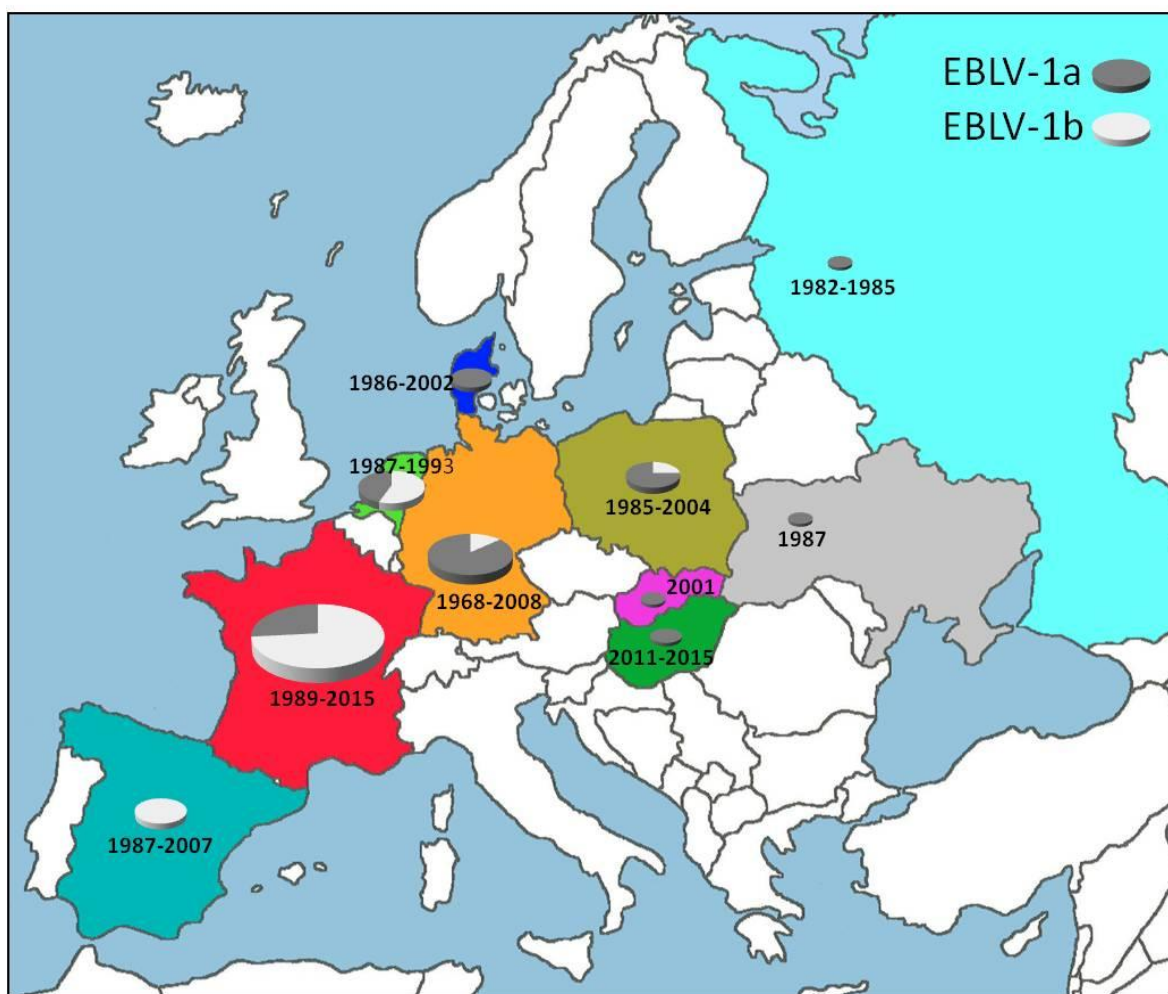
6.6 EBLV-1 törzsek evolúciós elemzése teljes genom szekvenciák alapján

6.6.1 EBLV-1 teljes genomok általános vizsgálata

A hazai minták közül a 22540_2011 és az 52206_2015 törzsek teljes genom szekvenálását és a kapott szekvenciák szoftveres illesztését végeztük el, annak érdekében, hogy kiterjedtebb összehasonlítást tudjunk végezni a környező országokból publikált EBLV-1 genomokkal. Az általunk megszekvenált két EBLV-1 genom 11935 nukleotid hosszú (44,7% GC) volt, mely öt vírus proteint kódolt. 3' irányból haladva a kódoló szakaszok mérete és helyzete konzervatív. A kódoló régiók a következőképpen helyezkednek el a genomban: N CDS, 49–1404 nt; P CDS, 1495–2391 nt; M CDS, 2475–3083 nt; G CDS, 3295–4869 nt; L CDS, 5430–11813 nt). A 22540_2011 és az 52206_2015 genomok között 99,84% nt szintű azonosságot mértünk, ami 19 pontmutációban, a kódoló régiók esetében 16 SNP-ben (N (4); P (2); M (0); G (2); L (8)) és a glikoprotein gén esetében 1 aminosav eltérésben mutatkozott meg.

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 (25. ábra). A GenBank-ban fellelhető EBLV-1 genomok közül a legtöbb Franciaországból (n=60) származik, amely az országban végzett kiterjedt aktív szűrővizsgálatoknak köszönhető (Picard-Meyer és mtsai., 2011). A Nyugat-Európában (Spanyolország, Franciaország, Hollandia) azonosított EBLV-1 genomok többsége az EBLV-1b leszármazási vonalba tartozott, míg Közép- és Kelet-Európában az EBLV-1a klaszterbe tartozó esetek voltak a dominánsak (25. ábra).

Az EBLV-1 genomok molekuláris tulajdonságainak vizsgálatára szükség volt a későbbi epidemiológiai elemzésekhez, ezért összevetettük a 100 EBLV-1 genomban lévő kódoló régiók elhelyezkedését és az aminosav szintű eltérések számát (21. táblázat). A CDS-ek nukleotid szintű elemzéséből látható, hogy a polimerázt kódoló régió a legkonzervatívabb, míg a többi (N, P, M, G) kódoló régió belül ~94%-os a nt szintű hasonlóság. Aminosav szinten vizsgálódva a foszfoprotein bizonyult a legvariábilisabbnak. Az általunk vizsgált EBLV-1 genomok nukleoprotein és glikoprotein között található intergenikus régiója a legváltozatosabb (minimális nt hasonlóság 79,17%). A Bayesian vizsgálathoz használt EBLV-1 genomokból készített szekvenciaillesztés hossza 11 944 nukleotid, GC tartalma 44,9% volt.



25. ábra: 1968 és 2015 között detektált EBLV-1 genomok származási helye és ideje.

21. táblázat: EBLV-1 (1968-2015) szekvenciák kódoló régióinak hossza és aminosav szintű eltérések száma.

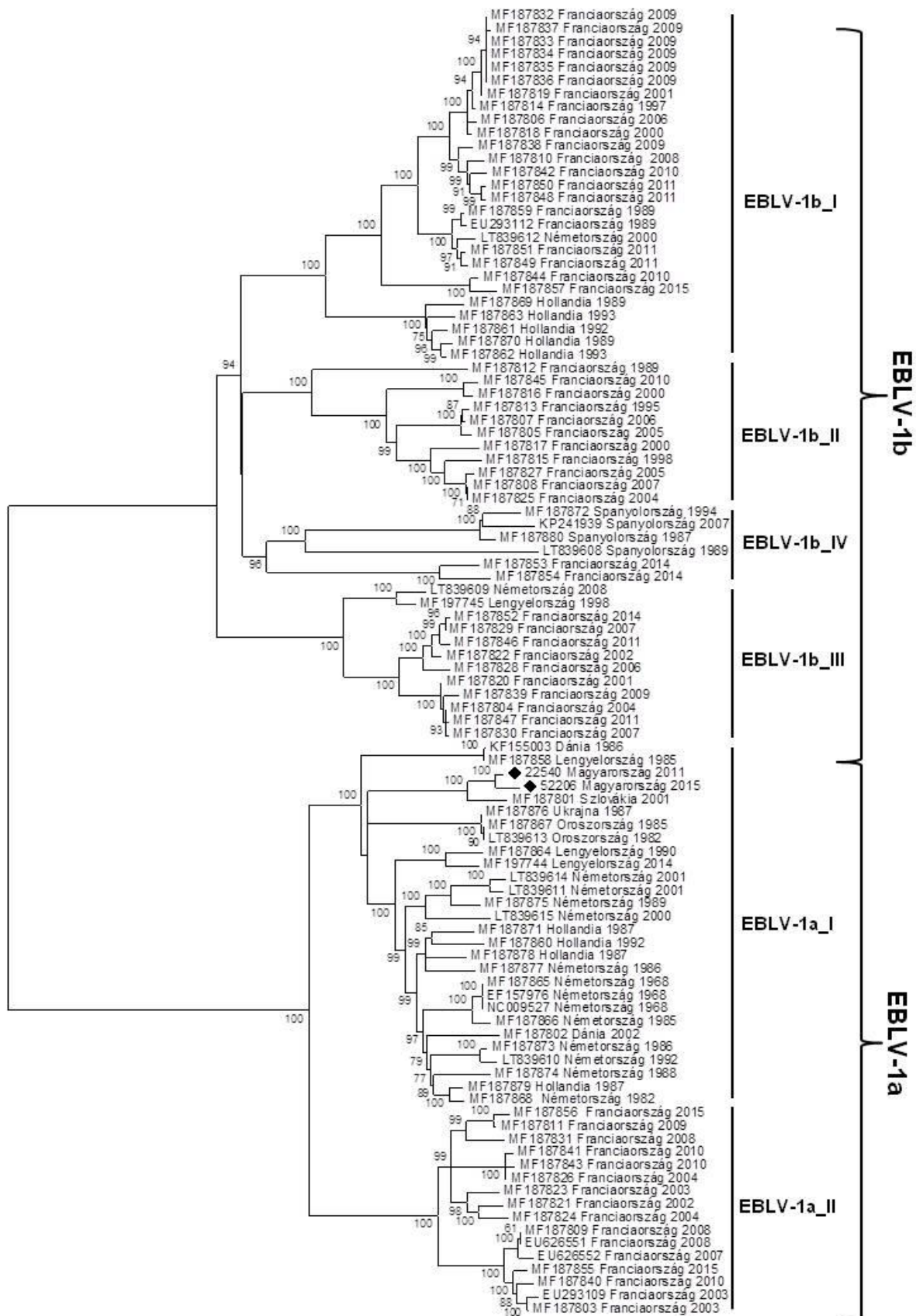
	Kódoló régiók (CDS)					Intergenikus régiók			
	N	P	M	G	L	N-P	P-M	M-G	G-L
Nukleotid hossz	1353	894	609	1575	6384	97	83	212	561
Min. nukleotid azonosság (%)	94,84	94,3	94,74	94,67	95,31	79,17	81,93	96,68	86,42
Min. aminosav azonosság (%)	98,9	95,3	96,04	97,32	99,05	-	-	-	-
Aminosav eltérés	8	45	28	45	104	-	-	-	-

A vizsgált adathalmazban található denevérvészesség genomok pontmutációs mintázatát a 26. ábrán szemléltetjük külön az EBLV-1a és EBLV-1b leszármazási vonalakra. Jól látható, hogy klaszterenként kirajzolódik egy, az adott szubklaszetre jellemző pontmutációs mintázat.



26. ábra: Az EBLV-1a (felül) és az EBLV-1b (alul) vírus genomok szubklasztéréinek pontmutációs mintázata látható.

Az EBLV-1 leszármazási vonalainak kapcsolatrendszeréről filogenetikai elemzés segítségével győződünk meg (27. ábra). A filogenetikai rekonstrukció szerint az általunk felhasznált EBLV-1 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 (EBLV-1a_I és EBLV-1a_II), míg az EBLV-1b klasztert reprezentáló genomok négy kisebb filogenetikai csoportba sorolódtak (EBLV-1b_I; EBLV-1b_II; EBLV-1b_III; EBLV-1b_IV). Mindkét hazai vizsgált denevérvészesség vírus az EBLV-1a_I szubklaszterhez tartozott (27. ábra).



27. ábra: EBLV-1 (1968-2015) teljes genomokkal készített filogenetikai fa (maximum likelihood módszerrel, GTR G szubsztitúciós modell és 1000 bootstrap beállítással készült). A vizsgált Magyarországról származó EBLV-1a szekvenciákat fekete rombuszsal jelöltük.

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. A szubklaszterek jóval homogénebbeknek bizonyultak, de a diverzitás értékekben voltak eltérések (például 1,5X-os különbséget figyeltünk meg az EBLV-1a törzsek között és maximum 3,6X-os különbséget egyes EBLV-1b klaszterek között). Összességében, az EBLV-1b_II csoport bizonyult a legvariábilisabb szubklaszternek (22. táblázat).

22. táblázat: Az EBLV-1 genomok (1968-2015) nukleotid diverzitása elkülönülő genetikai csoportonként feltüntetve.

Klaszterek	EBLV-1a	EBLV-1a_I	EBLV-1a_II	EBLV-1b	EBLV-1b_I	EBLV-1b_II	EBLV-1b_III	EBLV-1b_IV
Nukleotid diverzitás (π)	0,01309	0,00576	0,00910	0,01798	0,00735	0,01745	0,00791	0,00484

A vizsgált EBLV-1 vírus genomok nt szinten 95,13%-100% közötti azonosságot mutattak egymással. Az EBLV-1a és EBLV-1b leszármazási vonalak között a legkisebb nt szintű azonosság 95,13% körül alakult, míg klasztereken belül legalább 97,61% volt a genomok szekvencia hasonlósága. A szubklaszterek közül az EBLV-1b_II csoport a legvariábilisabb (23. táblázat), amit a többi leszármazási vonalhoz viszonyítottan magas nukleotid diverzitása is alátámaszt.

23. táblázat: EBLV-1 genomok (1968-2015) nukleotid szintű azonosságának összevetése klasztereken belül és azok között. A táblázat százalékos értékeket tartalmaz.

	EBLV-1a_I	EBLV-1a_II	EBLV-1b_I	EBLV-1b_II	EBLV-1b_III	EBLV-1b_IV
EBLV-1a_I	99,14 – 100	-	-	-	-	-
EBLV-1a_II	97,69 – 98,35	98,34 – 100	-	-	-	-
EBLV-1b_I	95,27 – 95,98	95,37 – 95,9	98,49 – 100	-	-	-
EBLV-1b_II	95,41 – 95,95	95,45 – 95,84	97,55 – 97,97	97,61 – 99,65	-	-
EBLV-1b_III	95,55 – 96,08	95,62 – 95,94	97,58 – 97,96	97,65 – 97,95	99,04 – 99,99	-
EBLV-1b_IV	95,13 – 95,85	95,23 – 95,76	97,34 – 97,88	97,44 – 97,76	97,32 – 97,77	99,02 – 99,18

6.6.2 EBLV-1 teljes genomok evolúciós elemzése

Az általunk elemzett EBLV-1 genomok becsült szubsztitúciós rátájának értéke $3,583E-5$ (95%HPD: $2,55E-5$ - $4,61E-5$). Klaszterenként is számítottunk szubsztitúciós rátákat, azonban az EBLV-1a két szubklaszterének vizsgálata nem adott megfelelően behatárolható becslést, így ezeket az értékeket nem vettük figyelembe (24. táblázat). A legmagasabb evolúciós rátát ($8,75E-5$) az EBLV-1b_II leszármazási vonalnál láttunk, ez a csoport jóval (~2-4X) gyorsabban evolválódott, mint a többi EBLV-1b szubklaszter vagy az EBLV-1a klaszter (24. táblázat).

24. táblázat: 1968–2015 között azonosított EBLV-1 szekvenciák szubsztitúciós rátái klaszterenként.

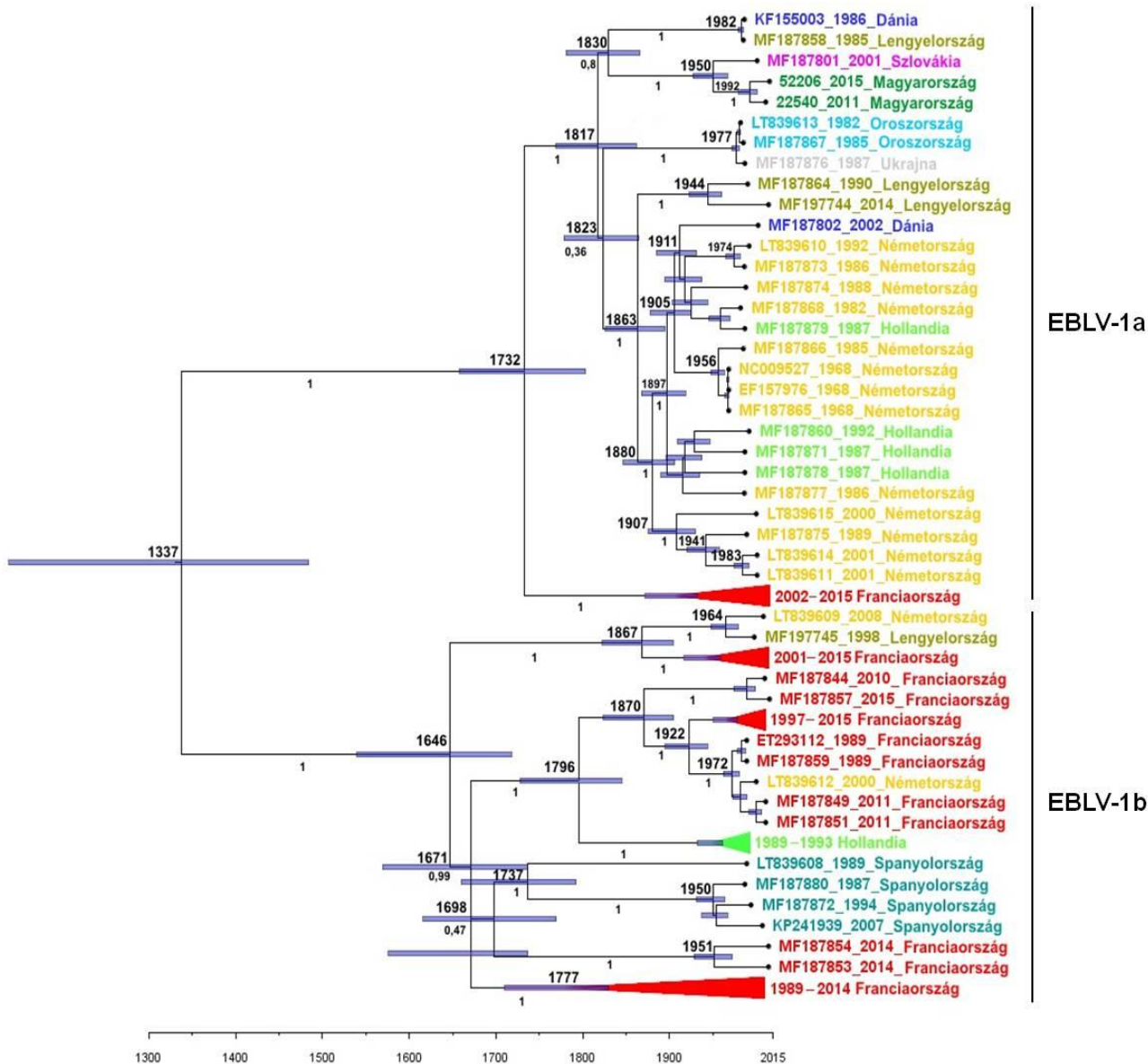
Klaszterek (n)	Szubsztitúciós ráta (95% HPD)
EBLV-1a (44)	3,45E-5 ($1,82E-5$ – $5,01E-5$)
EBLV-1b (56)	4,04E-5 ($2,19E-5$ – $5,86E-5$)
EBLV-1b_I (27)	4,04E-5 ($2,19E-5$ – $5,86E-5$)
EBLV-1b_II (6)	8,75E-5 ($3,23E-5$ – $1,37E-4$)
EBLV-1b_III (11)	2,94E-5 ($1,09E-5$ – $4,91E-5$)
EBLV-1b_IV (12)	2,19E-5 ($6,45E-5$ – $3,95E-5$)

Az EBLV-1 esetében is elvégeztük az 5 virális gén evolúciós sebességének számításait (25. táblázat). Az elemzés alapján a foszfoprotein, a mátrixprotein és a glikoprotein gyorsabban evolválódik, mint a nukleoprotein és polimeráz enzimet kódoló L CDS, a különbség azonban elenyésző (legfeljebb 1,2X). Kíváncsiak voltunk az EBLV-1a és EBLV-1b klaszterek CDS-einek szubsztitúciós rátáira külön-külön is (25. táblázat). Az EBLV-1a és 1b klaszterek esetében hasonló eredményt kaptunk, mint az összes EBLV-1 CDS vizsgálatokor és a két klaszter képviselőinek különböző génekre vonatkozó evolúciós rátáiban nem találtunk lényeges különbségeket (25. táblázat).

25. táblázat: Az EBLV-1 és EBLV-1a, EBLV-1b genomok (1968-2015) kódoló régióinak szubsztitúciós rátái.

CDS	Szubsztitúciós ráta (95% HPD)	Szubsztitúciós ráta (95% HPD)	Szubsztitúciós ráta (95% HPD)
	EBLV-1	EBLV-1a	EBLV-1b
Nukleoprotein (N)	5,43E-5 (3,96E-5 – 6,89E-5)	5,45E-5 (3,47E-5 – 7,55E-5)	5,60E-5 (3,65E-5 – 7,80E-5)
Foszfoprotein (P)	6,77E-5 (4,83E-5 – 8,65E-5)	7,20E-5 (4,49E-5 – 1,00E-5)	6,47E-5 (4,06E-5 – 9,13E-5)
Mátrixprotein (M)	6,21E-5 (4,28E-5 – 8,23E-5)	7,09E-5 (4,02E-5 – 1,03E-4)	6,89E-5 (4,13E-5 – 9,87E-5)
Glikoprotein (G)	5,95E-5 (4,42E-5 – 7,52E-5)	7,13E-5 (4,75E-5 – 9,67E-5)	5,35E-5 (3,53E-5 – 7,30E-5)
Polimeráz enzim (L)	5,46E-5 (4,33E-5 – 6,48E-5)	6,06E-5 (4,59E-5 – 7,63E-5)	5,32E-5 (3,89E-5 – 6,80E-5)

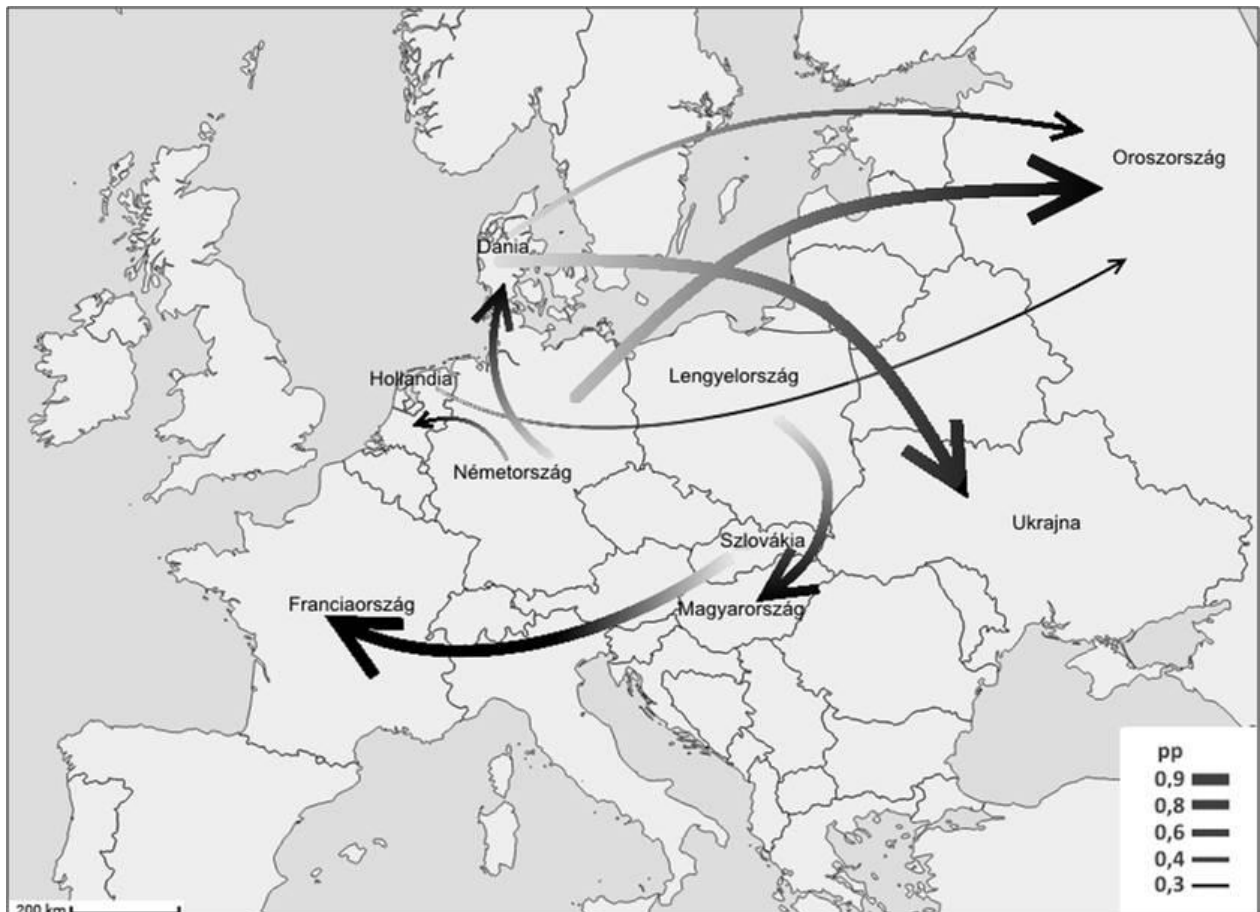
Az EBLV-1 fejlődéstörténetének megértése érdekében és annak kiderítésére, hogy hazánkba közelítőleg mikor és milyen irányból érkezett a vírus, időskálával ellátott fát generáltunk (28. ábra). Az MCC fán látható, hogy az 1300-as évek környékén válhatott el az EBLV-1 két szubtípusa egymástól. A magyarországi származású szekvenciák szlovákiai, lengyelországi és dániai mintákkal csoportosultak és a szlovákiai mintától ~1950-es években válhattak el. A két nagy klaszter, azaz EBLV-1a és EBLV-1b ~1337 körül válhatott szét. A filogenetikai fán és az MCC fán is megfigyelhető, hogy az EBLV-1a csoportba tartoztak kelet-európai genomok is, míg az EBLV-1b leszámazási vonalba tartozó minták Nyugat-Európából származtak. Az EBLV-1b leszámazási vonalhoz csoportosult egy Lengyelországban azonosított denevérvészesség szekvencia, mely ebben a csoportban földrajzilag a legkeletebbre eső minta. Ezek alapján nyugatról kelet felé mutató vírus terjedési irányt sejtet a denevérvészesség genomok csoportosulása az EBLV-1b leszámazási vonalon belül.



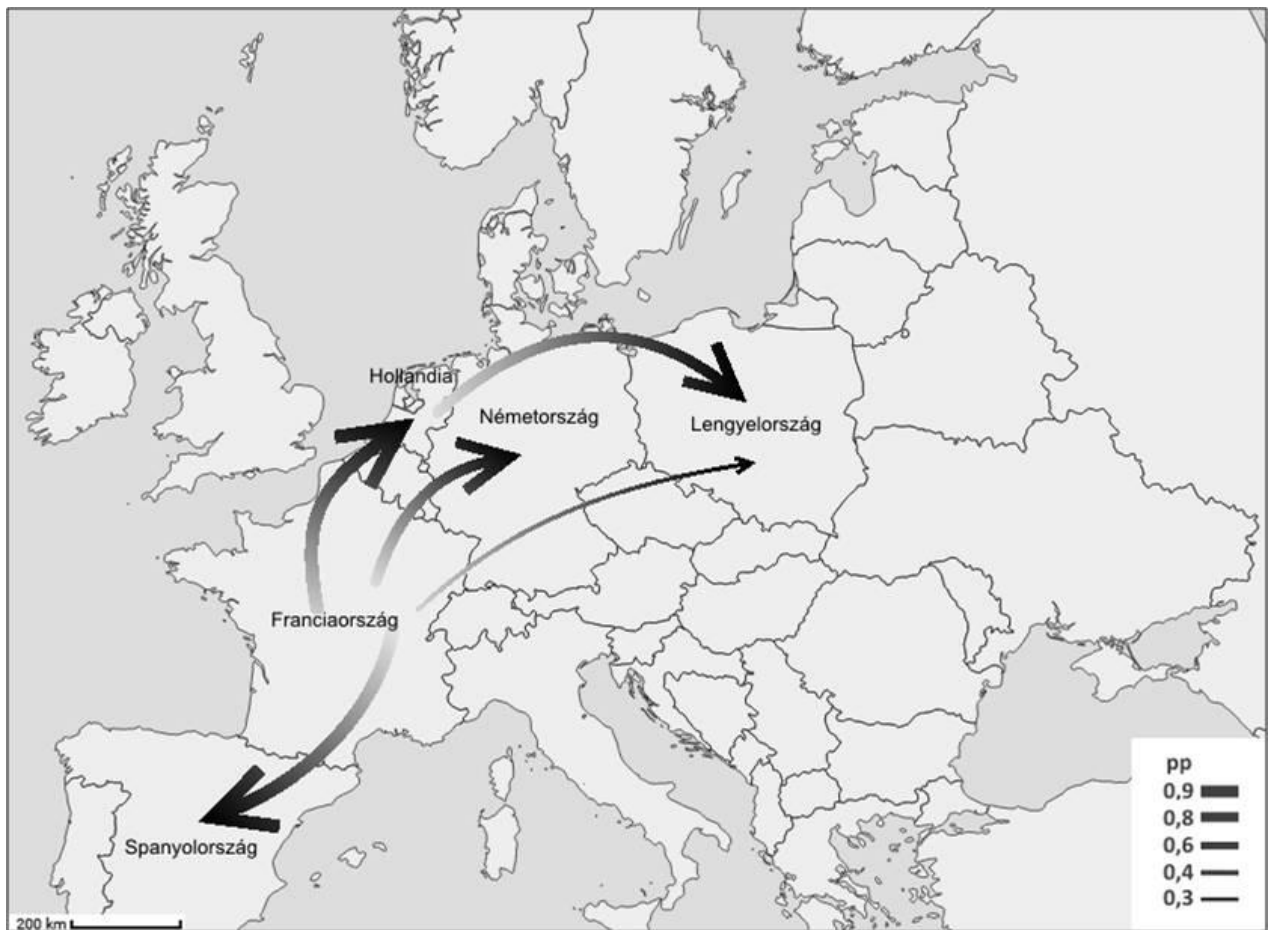
28. ábra: Az MCC fán látható az EBLV-1a és EBLV-1b leszármazási vonalak elkülönülése (az országok eltérő színnel jelölve). A csomópontokban a becsült szétválás dátuma látható, a kék sáv a szétválás dátumának valószínűségi intervallumát jelzi. Az ágakon a posteriori valószínűség értékek találhatóak.

Az EBLV-1 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 és megjelenítettük Európa térképén (29.-30. ábra). A terjedési irányok valószínűségét megkaptuk posteriori valószínűség és a Bayes-faktor értékek formájában egyaránt. A könnyebb ábrázolhatóság végett az EBLV-1a és -1b vírus csoportok terjedési irányait a posteriori valószínűségekre (pp.) támaszkodva különböző vonal vastagsággal jelenítettük meg. Az EBLV-1a klaszterbe tartozó vírusminták Közép-Európából főleg keleti

irányba terjedtek. Érdekes kiemelni, hogy bár az MCC fa alapján a magyarországi származású genomok genetikailag közelebb állnak a szlovákiai mintához, mégis alacsony posteriori valószínűséget kaptunk a Szlovákiából Magyarország felé irányuló terjedésre (0,134 pp), mint a Lengyelországból hazánkba mutató irányra (0,862 pp). Emiatt feltételezhető, hogy Magyarországon azonosított EBLV-1a vírusok Lengyelországból kerülhettek hazánkba (29. ábra). Az EBLV-1b Nyugat-Európából terjedt tovább kelet felé (30. ábra).



29. ábra: EBLV-1a vírus terjedési irányai Európában posteriori valószínűség (pp) alapján. A nyilak vastagsága arányos a számított posteriori valószínűségekkel.



30. ábra: EBLV-1b vírus terjedési irányai Európában posteriori valószínűség (pp) alapján. A nyilak vastagsága arányos a számított posteriori valószínűségekkel.

Vizsgáltuk az EBLV-1 génekre ható szelekciós erők hatását. A Datamonkey webszerver négy algoritmusát (FEL, SLAC, MEME, FUBAR) vettük igénybe a kérdés megválaszolásához. Az eredményt a 26. táblázatban foglaltuk össze. A dN/dS arányt a SLAC algoritmussal vizsgáltuk. Ez az érték 1 alatt maradt, ami arra utal, hogy a vizsgált genomi régiókra nem hat jelentős pozitív szelekciós nyomás. A kodon alapú vizsgálómódszerek pozitív szelekciós nyomás érvényesülését igazolták a 141. (FEL, FUBAR) és a 244. (FEL, MEME, FUBAR) aminosav pozíciókban. Troupin és munkatársai (2017) is vizsgálták az EBLV-1 genomokban érvényesülő szelekciós nyomást és szintén arra következtettek, hogy a 244. aminosav pozitív szelekció alatt áll.

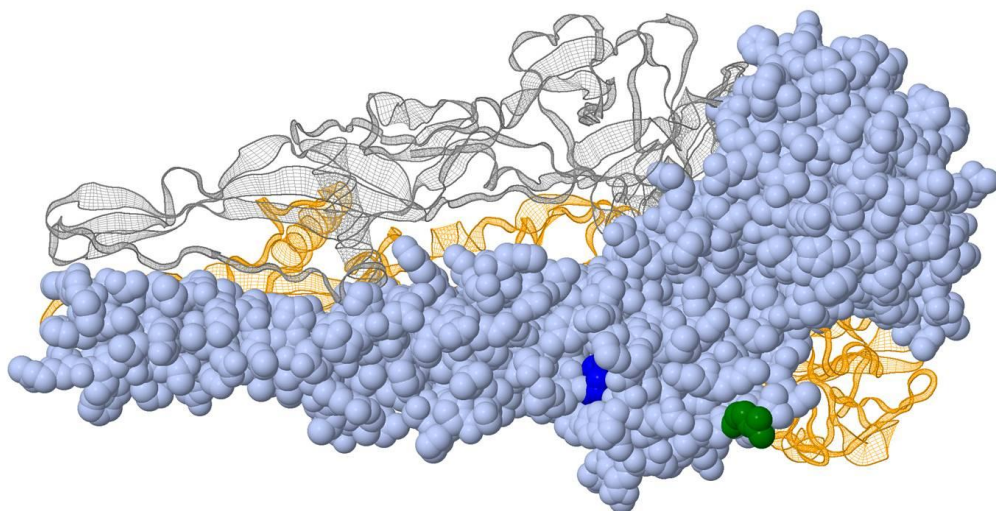
26. táblázat: EBLV-1 (1968-2015) genomok kódoló régióira ható pozitív szelekciós nyomás klaszterenkénti vizsgálatának eredménye.

CDS	FEL ¹	SLAC ¹	MEME ¹	FUBAR ²	dN/dS
N	-	-	-	18	0,0221
P	<u>141</u>	-	155	<u>141</u>	0,144
M	-	-	-	-	0,148
G	<u>244</u>	-	<u>244</u> , 488	<u>244</u>	0,0831
L	-	-	168/980/1597/1754	-	0,0404

¹p érték >0,1 ²posterior probability = 0,9

Tudni akartuk, hogy a fentebb bemutatott aminosavakat érintő pozitív szelekciós nyomás az EBLV-1a és/vagy az EBLV-1b genomokban érvényesül. Ezért a fenti elemzést lefutattuk külön az EBLV-1a és az EBLV-1b genomok CDS-ein is. Csak az EBLV-1a glikoprotein szekvenciákban kaptuk meg ismét a 244. as-ról, hogy pozitív szelekció hat rá. Az EBLV-1a klaszterben a filogenetikai csoportosulásoktól függetlenül a 244. as a genomok többségében (n=40) leucint, ritkábban (n=3) (1968-as német minták) glutamint, egyetlen esetben arginint (1986-os német minta) kódol. A foszfoprotein 141. as-a kizárólag az EBLV-1b szekvenciákban 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 (szignál peptid) az EBLV-1a leszármazási vonalban alanin, míg az EBLV-1b csoportban glicin. A 224. pozícióban EBLV-1a klaszterben arginin, EBLV-1b esetében lizin kódolódik. A 224. és 244. as a virion felszíni régiójában helyezkednek el (31. ábra).



31. ábra: A 52206 EBLV-1a minta glikoproteinjének homotrimer modellje látható, melynek egyik láncán jelöltük a 224. aminosavat, ami klaszterenként eltérést mutat (zöld) és a 244. aminosavat, amin pozitív szelekciós nyomás érvényesül (kék).

7. Megbeszélés

A veszettség a leginkább rettegett fertőző betegségek közé tartozott egykor és tartozik ma is. Rabies vírus fertőzésben, napjainkban is közelítőleg 59 000 ember hal meg világszerte minden esztendőben. Magyarországon a veszettség tanulmányozása érdemben a XIX. század végén kezdődött és olyan ikonikus személyekhez köthető, mint Hőgyes Endre, és tanítványa, Aujeszky Aladár. Hazánkban a XXI. század elejére a hatékony megelőzési programoknak köszönhetően az emberi veszettség esetek már eltűntek és szerencsére a háziállatokat is csak elenyészően kis számban betegíti meg a vírus; a vadon élő állatok jelentette járványügyi kockázat azonban ma sem lebecsülendő. Jelen korszakban a betegség tanulmányozásának újabb aspektusait kínálják a modern laboratóriumi technikák és a számítógép kínálta matematikai modellezés lehetőségei. PhD munkám során megkíséreltem az új módszerekre építve a korábban elérhetetlennek tűnő genomi epidemiológiai módszertant alkalmazni a veszettség járványtanának jobb megértése érdekében. Dolgozatom Megbeszélés fejezetében is leginkább erre fogok fókuszálni, remélve, hogy be tudom majd mutatni, hogy a legújabb módszertani megközelítések alkalmazása sok esetben elkerülhetetlen egy-egy járványkitörés hátterének jobb megismeréséhez.

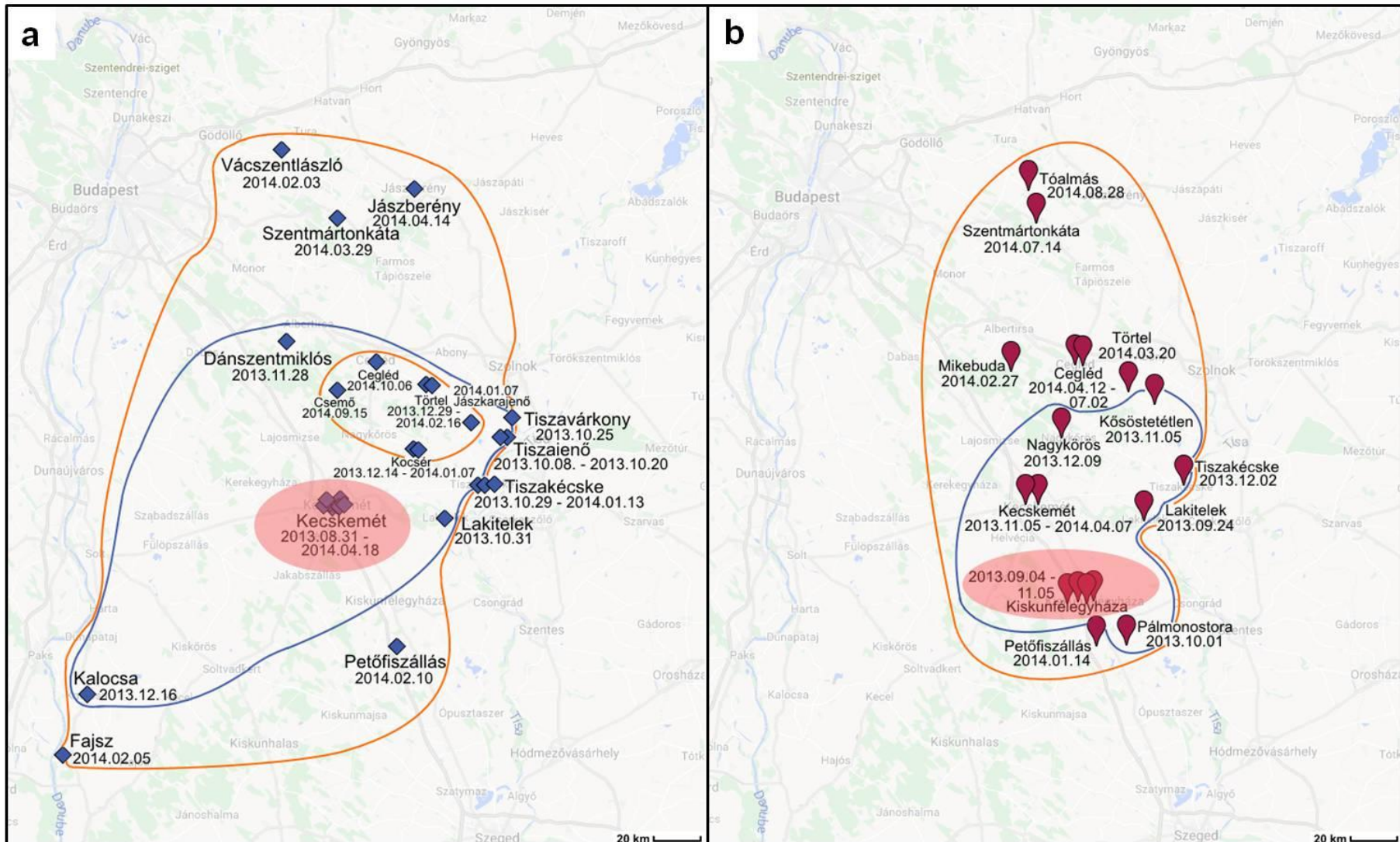
7.1 RABV fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata

Rabies vírussal kapcsolatos vizsgálataim egy magyarországi veszettségjárvány lecsengése után kezdődtek; e járvány feldolgozása jelentette a központi pillérét a témával kapcsolatos tudományos munkámnak.

A 2013-2014-es veszettség járványt a Duna-Tisza közén azonosították, és a járvány során felderített esetek alapján a vírus egy ~10 000 km² méretű területen cirkulált. Ebben a régióban nem vakcináztak 2008 óta egészen a járvány kitöréséig. 2008-2013 között csupán a déli és keleti határszakaszokon, a határ menti 50 km-es zónában helyeztek ki csalétekvakcinát. 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 járvány első feldolgozása során, figyelembe véve a részleges szekvenciákkal jellemzett törzsek genetikai homogenitását, arra a következtetésre jutottunk, hogy a 2013-2014-es magyarországi járványban egy korábban nem identifikált vírustörzs gyors klonális diffúziója volt felelős az azonosított esetekért. Az akkor elérhető adatok alapján megválaszolatlan maradt a kérdés,

hogyan lehetséges, hogy az immunizálási zónán kívül az ország közepén üti fel a fejét egy RABV járvány úgy, hogy azt megelőző két évben egyetlen veszettséggel fertőzött állatot sem találtak hazánkban.

Hogy a kérdés megoldásához közelebb jussunk, a járványból kimutatott összes RABV minta közel teljes hosszúságú genomszekvenciáját meghatároztuk. Ennek a korábbinál jóval részletesebb adathalmaznak az elemzése rámutatott, hogy a 2013-2014-es járványban azonosított RABV genomok valójában két klaszterbe csoportosultak, melyek 2008 környékén válhattak szét. A két klaszter szétválásának becsült időpontja valamelyest eltért a különböző elemzésekben, attól függően, hogy hány szekvenciát vontunk be a számításokba, ezek eredete milyen időtartamot ölelt fel és mely genomi régiókkal végeztük a becslést. Összességében, a becslések eredményei azt mutatták, hogy a 2013-2014 során azonosított közép-magyarországi rabies járvány előhírnökei már évekkel korábban két genetikai ágra váltak szét és ez a folyamat akár korábbi hazai, surveillance alá nem vont területeken is lezajlódhatott. A teljes genomszekvenciákon alapuló vizsgálatok egyben arra is rámutattak, hogy a járvány eredete nem klonális, mint azt a részleges szekvenciák alapján egyik cikkünkben feltételeztük. A két leszármazási csoportba tömörülő mintákat származási helyük szerint térképén ábrázoltuk. A III.b1 csoportba sorolható szekvenciák mintavételi helyeit a 31.a ábra szemlélteti. A korai adatok azt sejtették és a térképes ábra is arra utal, hogy Kecskemét volt a járvány gócpontja, ahol az index-esetet is leírták, hat másik fertőzéssel egyetemben. Azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni a tényt, hogy Kecskemét a térség legnépesebb települése, ahol egy, a veszettség jeleit mutató róka valószínűleg könnyebben feltűnést kelt, mint valamely kevésbé sűrűn lakott vagy lakatlan területen. Mindenesetre, a kecskeméti index-eset azonosítását követő és a térségre gyorsan kiterjesztett aktív szűrővizsgálat a veszett állatok széles körű elterjedését mutatták, melynek – szerencsére – a természetes földrajzi akadályok (a Duna és a Tisza), valamint ember alkotta akadályként az M3-as autópálya gátat szabtak. A 2013-ban kecskeméti centrummal jelzett (32. ábra, kék vonal) ellipszis átmérője a következő évben tovább tágult (narancssárga vonal), ugyanakkor számos új esetet azonosítottak a 2013-ban megállapított elterjedési zónában is. A III.b2 szubklaszterbe tartozó törzsek első képviselői szintén 2013 során kerültek elő Kiskunfélegyháza környékéről. Innen, mint lehetséges gócpontból terjedt tovább a vírus és 2014-ben már nagyobb sugárban észak-déli irányú szóródást mutattak az ebbe a leszármazási vonalba tartozó vírusok (32.b. ábra). E törzsek diszperzióját is meggátolták a fent említett természetes és épített akadályok.



32. ábra: Az III.b1 és III.b2 szubklaszterekbe tartozó törzsek terjedési zónái a 2013-2014-es RABV járvány során. Kékkel a 2013-as narancssárgával a 2014-es terjedési zónákat jelöltük.

Mivel a kapott eredmények ellentmondtak a korábbi feltételezésnek a járványtörzsek klonális eredetére vonatkozóan, további elemzéseket végeztünk a teljes genomszekvenciákkal, melyben vizsgáltuk a RABV terjedési sebességét. Matematikai modellekből már ismert és általánosan elfogadott becslés szerint a vörös róák által terjesztett rabies évenként 30-60 km-t is nyomulhat előre (Murray és mtsai., 1986; Murray és Seward, 1992). Ezt az értéket természetesen számos tényező (domborzat, időjárás, populációsűrűség, rabies elleni vakcinázás) befolyásolhatja. A kevésbé fogékony (azaz vakcinázott) róák esetében például 10-25 km/év a szakirodalmi adat a vírus terjedési sebességre (Murray és mtsai., 1986; 1992). Ha a teljes genomszekvencia-adatokra nem támaszkodhatnánk, arra a következtetésre kellene jutnunk, hogy a Kecskemét környéki gócpontból a még azonosított legtávolabbi területek irányába (délen Fajs, északon Vácszentlászló) a fertőzés fél év alatt 90-100 km-re jutott. A genomszekvenciákra és a törzsek származási idejére és helyére épülő számítások azonban jóval lassúbb terjedésről (~17 km/év) árulkodtak a hazai 2013-2014-es járványkitörésnél, ami jócskán alatta marad a fenti durva számítással levezetett értéknek és a publikált adatokhoz (10-60 km/év Murray és mtsai., 1986; 1992) is közelebb áll. Mindezt csak úgy lehetséges értelmezni, ha a vírus évekig cirkulált észrevétlenül az érintett területen. A Bayes-i számításokon alapuló becslést jól alátámasztja a vörös róák vándorlásáról és területfoglalásáról felhalmozott ismeretanyag is. Nevezetesen, a róák mozgáskörzete a populációsűrűség függvényében 30-1300 hektárnyi terület között mozog. A populációsűrűség növekedésével csökken a róák mozgáskörzete (Jensen, 1973). A fiatal állatok szeptember közepétől október végéig elhagyják születési helyüket és a következő szaporodási ciklusig igyekeznek saját territóriumot találni. Dániában végzett visszafogásos vizsgálat alapján a vörös róák 64%-a 5 km-nél kisebb, 15%-a 5-14 km közötti, 7%-a 15-25 km közötti távolságban, míg 14%-a 25 km-nél távolabb telepedett meg a születési területétől (Jensen, 1973).

Arra a kérdésre, hogy miért az ország közepénél tört ki a 2013-as járvány az egyik lehetséges magyarázat szerint vízi életmódot is folytató kisemlősökben (hód, vidra, pézsmapocok) lappanghatott és terjedhetett a vírus, mivel ezek a fajok képesek lehetnek a Tiszán könnyedén átkelni (Fishbein és mtsai., 1986; Serfass és mtsai., 1995; Krebs és mtsai., 2003). Azt sem lehet kizárni, hogy borzban, nyestben, nyestkutyaiban, mosómedvében is lappanghatott a vírus (Smith és mtsai., 2002); ez esetben azzal kell kalkulálni, hogy ezeknek a gazdaállatoknak több időt vehetett igénybe eljutni arra a Duna-Tisza közei területre, ahol a járványkitörés lezajlott. A hazai aktív monitoring kizárólag vörös rókára terjed ki, azonban passzív szűrővizsgálat során minden lehetséges gazdafajt megvizsgálunk. Az utóbbi vizsgálatoknak köszönhetően 1987-től 2018-ig tudomásunk van hazai eredetű veszettséggel fertőzött nyestkutya (n=1), borz (n=9) és kistrágyacsáló (n=59) esetekről (<https://www.who-rabies-bulletin.org>). A kisemlősök mozgáskörzete jóval szűkebb,

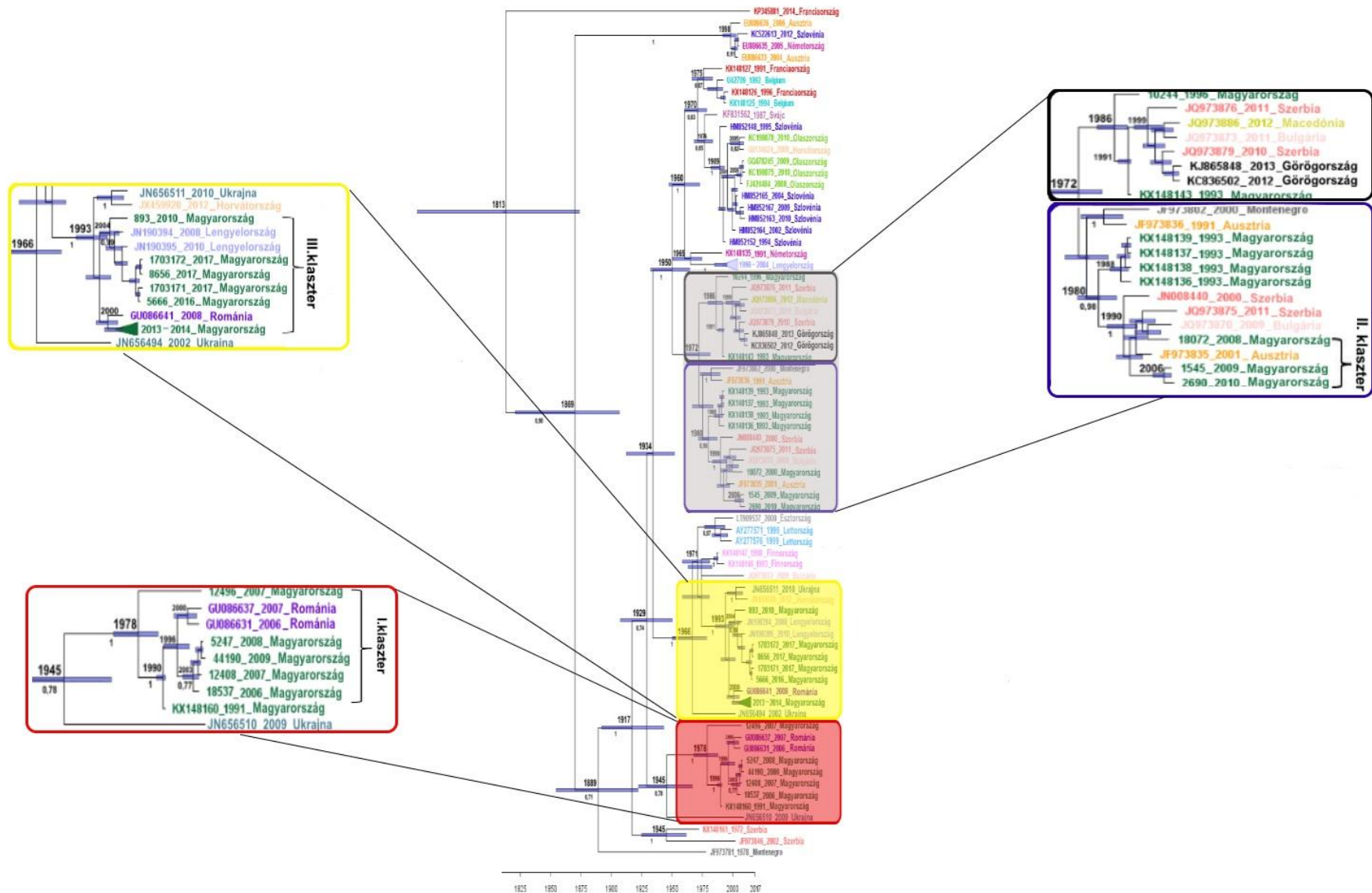
például a pézsmapocok 1 ha területen, a menyétek nőstényei 1-5 ha, míg a hímek 15-20 ha területen mozognak. A pézsmapocok fiatal egyedei többnyire tavasszal vándorolnak, míg a menyétek télen is aktívan terjeszkednek, amit az elérhető táplálékállatok nagyban meghatároznak. Az eurázsiai borz 3–90 hektárnyi területet jár be, de egyes hónapokban ez akár 100–200 hektárra is nőhet (Lüps és Wandeler, 1993). A kisemlősök vándorlásának sajátosságai, továbbá az a tény, hogy a csalétekvakcina elsősorban rókák számára vonzó (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 kisemlősök 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 (<https://www.who-rabies-bulletin.org>), 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). 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) (11. ábra). 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 genomszekvenciákon 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. Ennek a kérdésnek a megválaszolása alapvető fontossággal bír a hazai és nemzetközi rabies elimináció sikerének szempontjából egyaránt. Számításokat végeztünk száznál több európai és 67 hazai RABV genomszekvencia bevonásával. Bár az elsődleges szándékunk a teljes genomszekvenciákon alapuló számítások szisztematikus alkalmazása volt, hamar szembesültünk azzal, hogy balkáni, közép- és kelet-európai RABV genomszekvencia adatok a miénkhez mérhető nagyságrendben ma nem állnak rendelkezésre, és ezen adatok híján ez a cél nehezen valósítható meg. Végül a kérdés megválaszolásához részleges RABV nukleoprotein és glikoprotein szekvenciákkal végeztünk filogeográfiai vizsgálatokat. Azért

elemztük mindkét gént, mert egy-egy országból és adott időszakból sok esetben vagy az egyik, vagy a másik RABV géntre vonatkozó szekvencia adat volt csak elérhető. A két génnel párhuzamosan elvégzett vizsgálatokat ennek megfelelően egymást kiegészítő elemzéseként kell értelmeznünk.

Az 1990-es években hazánkból származó RABV törzseket a 2000-es évek közepétől Magyarországon már nem lehetett kimutatni. Keveset tudunk a Dunántúlon egykor keringő RABV törzsek genetikájáról. Ugyanakkor az 1990-es évekből ismert RABV vírusok háttérbe szorulása/eltűnése csak részben magyarázható azzal, hogy a Dunántúl időközben RABV mentessé vált, hiszen az 1996-os Páhi macska RABV izolátum a Duna-Tisza közéről került elő. A részleges nukleoprotein és glikoprotein szekvenciákból kapott MCC fa alapján a 2006-2017 között kimutatott három magyarországi RABV klaszter (33. ábra) további szubklasztterekre volt tagolható. Az 1970-1980-as évekre tehető az I. és II. klaszter kialakulása; az I. klaszterben a hazai törzsek mellett ukrainai és romániai törzseket találunk, a II. klaszterben a magyarországi törzseken kívül balkáni és ausztriai RABV törzsek vannak (Turcitu és mtsai., 2010; McElhinney és mtsai., 2011; Picard-Meyer és mtsai., 2012). Az 1990-es években levált III. klaszterbe tartozó RABV törzsek külföldi képviselőit megtaláljuk Lengyelországtól, Ukrainán és Románián keresztül egészen Horvátországig (Turcitu és mtsai., 2010; Picard-Meyer és mtsai., 2012; Cvetnic, 2013; Orłowska és Zmudzinski, 2014). Feltételezésünk szerint az utóbbi idők hazai járványaiban ezeknek a RABV klasztereknek részben egymástól független behurcolásait sikerült dokumentálni. Attól függően, hogy a közös szubklaszterbe tartozó vírusok eltérő időben, de azonos földrajzi régióban történő felbukkanását hogyan értelmezzük (azaz független eseményként vagy egy járványként) eltérő eredményeket kaphatunk a behurcolások számát illetően. Abban az esetben, ha szubklaszterenként az azonosítás idejétől függetlenül egy-egy járványnak tekintve elemzzük az adatokat, 7 RABV behurcolást állapíthatunk meg. Független eseményeknek kezelve az eltérő időpontban azonosított eseteket 11 behurcolás történhetett. 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. A részleges N és G RABV szekvenciákkal kapott MCC fákban eltérő szétválási időket figyeltünk meg és eltérő szubsztitúciós rátákat kaptunk az elemzésekben. 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.



33. ábra: RABV N részleges szekvenciákból nyert MCC filogenetikai fa, a magyarországi vonatkozásokat kiemelve. A 2006-2018-ból hazánkából származó genomokkal végzett vizsgálatokból kapott klasztereket is feltüntettük.

A betegség jelentőségéhez mérten ma a teljes genomszekvenciákon alapuló molekuláris epidemiológiai elemzések elérhető célkitűzésnek tűnnek nemcsak technikai, de anyagi szempontból is. Adatelemzéseinkből jól látszik, hogy amennyiben csak részleges génekkel végezzük a statisztikai becsléseket, nem kapunk a vizsgált vírusra vonatkozatható egyértelmű TMRCA értékeket.

Molekuláris epidemiológiai vizsgálataink további érdekessége volt egy vakcina-eredetű rabies azonosítása. Bár hasonló eseteket korábban az amerikai kontinensen és Európában is dokumentáltak már (Fehlner-Gardiner és mtsai., 2008; Müller és mtsai., 2009a; Hostnik és mtsai., 2014; Vuta és mtsai., 2016; Pfaff és mtsai., 2018;), jelen dolgozat jelenti az első hazánkból származó leírást. A csalétekkel kihelyezett vakcinák élő, attenuált vírustörzset tartalmaznak, mely képes lehet neuroinvaszív fenotípusban megnyilvánulni és megbetegedést okozni bizonyos körülmények között (WHO, 2013). Laboratóriumi kísérletek is alátámasztják a fenti állítást. Attenuált SAD Bern és SAD B19 vakcinák a beadás módjától függetlenül virulensek lehetnek néhány rágcsáló faj esetében (Artois és mtsai. 1992; Bingham és mtsai., 1992; European Commission, 2002; Müller és mtsai., 2009b; Vos és mtsai. 1999). 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 (Wandeler és mtsai., 1988; Vuta és mtsai. 2016; Pfaff és mtsai., 2018).

A Csabaszabadi mellett lőtt vörös rókából származó vírusminta és a korábbi vakcinázási kampányok során kihelyezett Lysvulpen vakcina vírustörzsek 99,9% feletti genom szintű azonossága, továbbá a pozitív TCM teszt alátámasztja, hogy nagy valószínűséggel a korábbi vakcinázási kampány során kihelyezett vírustörzs okozta ezt a fertőzést. Nem volt lehetőségünk megvizsgálni a Csabaszabadinál lőtt róka nyálmirigyeit, így nincs információnk arra vonatkozóan, hogy az állat tudta-e terjeszteni a vírust. A csalétekvakcinázás során kihelyezett SAD Bern vakcina indukálta veszettség esetek ritkasága ellenére fontos az ilyen jellegű esetek azonosítása és monitorozása. Ezért éreztük szükségét egy olyan módszer kifejlesztésének, mely képes meghatározni és elkülöníteni a kelet-európai vad RABV törzsektől a vakcina törzseket. A kifejlesztett DIVA TaqMan assay integrálását a rutin diagnosztikai eljárásba azonban még meg kell, hogy előzze a módszer teljesebb validálása is, amire a jövőben szeretnék több figyelmet szentelni.

A teljes RABV genom szekvenciákkal végzett filogenetikai elemzés alapján a magyarországi vakcina törzsek, melyeket a korábbi kampányok során alkalmaztak, és a rókából származó izolátum közelebbi rokonságot mutat a SAD-ból származtatott vakcina törzsekkel ($\geq 99.9\%$ nt azonosság), mint az eredeti Lysvulpen vakcina (EF206708) vonallal ($\sim 99.7\%$ nt azonosság). Korábbi kutatások is beszámolnak hasonló tapasztalatokról a SAD Bern törzsek és a terepi vakcina izolátumok genetikai kapcsolatát tekintve (Cliquet és mtsai.,

2013; Pfaff és mtsai., 2018). Ezt a jelenséget korábban azzal magyarázták, hogy a SAD Bern-ből származtatott vakcina törzsek képesek nagyszámú nukleotid mutációt felhalmozni. Ezzel ellentmondó adatokat kaptunk azonban saját elemzéseink során. A különböző sarzsszámú, hazánkban felhasznált Lysvulpen vakcina törzsek genomja mindösszesen hat nukleotid szubsztitúciót tartalmazott és egy-egy nukleotid változást figyeltünk meg a csabaszabadi RABV-pozitív minta egérbe oltását és szövettanyészeten való izolálását követően is, ami nem utal arra, hogy a nukleotid szubsztitúciók felhalmozódása a korábban feltételezett ütemben új filogenetikai vonal kialakulásához vezethet. Minthogy azonban a vakcinákban alkalmazott vírusok genetikai stabilitása elengedhetetlen a biztonságos alkalmazáshoz, a SAD Bern és a SAD vakcina törzsekből származtatott vírusok genetikai stabilitásának vizsgálatára további figyelmet kell fordítani.

Az intenzív magyarországi rabies eliminációs program továbbra is sikeres. A szomszédos országokban azonban (Ukrajna, Románia, Szerbia), a veszettség-mentesítési programok kevésbé hatékonyak. Amíg ez a helyzet nem oldódik meg, továbbra is számítani lehet arra, hogy a szilvatikus 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 (European Commission 2012). 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 szempontjából 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. Egy adott gazdafajhoz adaptálódott RABV variáns ugyan kevésbé valószínűen fertőz meg egy idegen gazdafajt, azonban a hazánkban előforduló RABV variánsok esetében ma nem ismerjük a teljes gazdafaj-spektrumot.

7.2 EBLV-1 fertőzések molekuláris epidemiológia vizsgálata

Nyugat-Európában, ahol a RABV okozta járványokkal már nem kell számolni, a veszettség szűrővizsgálata a denevérekben előforduló lyssavírusokra irányul (Echevarría és mtsai., 2001; Müller és mtsai., 2007; Picard-Meyer és mtsai., 2011). Ennek köszönhetően az európai denevérvészesség járványtanáról ma ezekből az országokból rendelkezünk megfelelő mélységű adatokkal. Közép- és kelet-európai denevérvészesség esetekről szórványos információval bírunk, mivel ebben a régióban a denevérvészesség monitoringja

kevésbé szervezett. Hazánkban a NÉBIH ÁDI munkatársai az elmúlt 40 évben mindössze hét veszettségre pozitív denevért azonosítottak. A részleges génszekvencia vizsgálatok mind a hét esetben EBLV-1 vírus jelenlétét mutatták. Megállapítottuk, hogy az EBLV-1 fajon belül a hazai törzsek az EBLV-1a genetikai vonalhoz tartoznak. 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 $4,07E-5$) (Troupin és mtsai., 2017).

Az EBLV-1 két szubtípusának (EBLV-1a és EBLV-1b) térhódítása feltételezhetően kétirányú folyamat; az EBLV-1b Észak-Afrika irányából Dél-Spanyolországon keresztül terjedt Európa, nyugati országaiba, míg az EBLV-1a esetében nyugat-keleti irányú elterjedés figyelhető meg (Amengual és mtsai., 2007; Davis és mtsai., 2005; Eggerbauer és mtsai., 2017). Franciaországban és Hollandiában mindkét genetikai csoport reprezentatív törzseit megtalálták (Davis és mtsai., 2005; Picard-Meyer és mtsai., 2011). 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 szubtípus 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 (*Eptesicus serotinus*) mutatták ki (Echevarría és mtsai., 2001; Davis és mtsai., 2005; Müller és mtsai., 2007; Schatz és mtsai., 2014), 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 (Davis és mtsai., 2005).

Denevérveszethez hazánkban nincsenek biztos, naprakész adataink, mert azokat csupán passzív szűrővizsgálatokból nyerik. 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.

8. 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 vonalakat 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 szekvenanciaadatok 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.

9. Irodalomjegyzék

- Afonso C.L., Amarasinghe G.K., Bányai K., Bào Y., Basler C.F., Bavari S., Bejerman N., Blasdel K.R., Briand F.X., Briese T., Bukreyev A.: **Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016**, Arch. Virol., 161. 2351-2360, 2016.
- Agarwal A.K.: **The 'Milwaukee protocol' (MP) hope does not succeeds for rabies victim**, Med. J. DY. Patil. Univ., 10. 184-186, 2017.
- Amengual B., Bourhy H., López-Roig M., Serra-Cobo J.: **Temporal dynamics of European bat Lyssavirus type 1 and survival of Myotis myotis bats in natural colonies**, PloS One., 2. e566, 2007.
- Artois M., Guittre C., Thomas I., Leblois H., Brochier B., Barrat J.: **Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison**, Vaccine., 10. 524-528, 1992.
- Banyard A., Evans J., Luo T., Fooks A.: **Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat, Viruses, nd bats: emergence and zoonotic threat**, Viruses., 6. 2974-2990, 2014.
- Begeman L., GeurtsvanKessel C., Finke S., Freuling C.M., Koopmans M., Müller T., Ruigrok T.J., Kuiken T.: **Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans**, Lancet Infect. Dis., 18. e147-e159, 2018.
- Bielejec F., Baele G., Vrancken B., Suchard M.A., Rambaut A., Lemey P.: **SpredD3: interactive visualization of spatiotemporal history and trait evolutionary processes**, Mol. Biol. Evol., 33. 2167-2169, 2016.
- Bingham J., Foggin C.M., Gerber H., Hill F.W.G., Kappeler A., King A.A., Perry B.D., Wandeler A.I.: **Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (Papio ursinus)**, Vet Rec., 1992.
- Borucki M.K., Chen-Harris H., Lao V., Vanier G., Wadford D.A., Messenger S., Allen J.E.: **Ultra-deep sequencing of intra-host rabies virus populations during cross-species transmission**, PLoS Negl. Trop. Dis., 7. e2555, 2013.
- Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., Tordo N., Zmudzinski J.F., Holmes E.C.: **Ecology and evolution of rabies virus in Europe**, J. Gen. Virol., 80. 2545-2557, 1999.
- Bronnert J., Wilde H., Tepsumethanon V., Lumlerdacha B., Hemachudha T.: **Organ transplantations and rabies transmission**, Travel. Med. Infect. Dis., 14. 177-180, 2007.
- Brookes S.M., Parsons G., Johnson N., McElhinney L.M., Fooks A.R.: **Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune**

- responses against European and Australian bat lyssaviruses**, *Vaccine.*, 23. 4101-4109, 2005.
- Camelo S., Lafage M., Galelli A., Lafon M.: **Selective role for the p55 Kd TNF- α receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis**, *J. Neuroimmunol.*, 113. 95-108, 2001.
- Cauna N.: **Fine morphological characteristics and microtopography of the free nerve endings of the human digital skin**, *Anat. Rec.*, 198. 643-656, 1980.
- CDC: **Human Rabies Due to Organ Transplantation** Questions and Answers, 2013. <https://www.cdc.gov/rabies/resources/news/2013-03-15.html>
- Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., Nevado C.R., Setién Á.A., Echevarría J.E.: **Novel lyssavirus in bat, Spain**, *Emerg. Infect. Dis.*, 19. 793, 2013.
- Charlton K.M., Nadin-Davis S., Casey G.A., Wandeler A.I.: **The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure**, *Acta Neuropathol.*, 94. 73-77, 1997.
- Cliquet F., Aubert M., Sagne L.: **Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody**, *J. Immunol. Methods.*, 212. 79-87, 1998.
- Cliquet F., Robardet E., Meyer E.P.: **Genetic strain modification of a live rabies virus vaccine widely used in Europe for wildlife oral vaccination**, *Antiviral. Res.*, 100. 84-89, 2013.
- Cliquet F., Picard-Meyer E., Robardet E.: **"Rabies in Europe: what are the risks?."**, *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 12. 905-908, 2014.
- Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C., Bourhy H.: **Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid**, *J. Clin. Microbiol.*, 36. 1117-1121, 1998.
- Cvetnic Z.: **Clinical rabies in cattle imported into Croatia**, *Vet. Rec.*, 2013.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.: **jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing**, *Nat. Methods.*, 9. 772, 2012.
- Davis P.L., Holmes E.C., Larrous F., Van der Poel W.H., Tjørnehøj K., Alonso W.J., Bourhy H.: **Phylogeography, population dynamics, and molecular evolution of European bat lyssaviruses**, *J. Virol.*, 79. 10487-10497, 2005.
- Davis P.L., Rambaut A., Bourhy H., Holmes E.C.: **The evolutionary dynamics of canid and mongoose rabies virus in Southern Africa**, *Arch. Virol.*, 152. 1251-1258, 2007.
- De Serres G., Dallaire F., Côte M., Skowronski D.M.: **Bat rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: human cases with and without bat contact**, *Clin. Infect. Dis.*, 46. 1329-1337, 2008.

- Dean D.J., Abelseth M.K.: **Laboratory techniques in rabies: the fluorescent antibody test**, Monograph Series. World Health Organization, 23. 73-84, 1973.
- Delpont W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky Pond S.L.: **Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology**, *Bioinformatics.*, 26. 2455-2457, 2010.
- Dietzgen R.G.: **Morphology, genome organization, transcription and replication of rhabdoviruses**, In: *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Host-Vector Interactions, Cytopathology and Control*, Szerk.: Dietzgen R.G., Kuzmin I.V. Caister Academic Press, 5-12, 2012.
- Drummond A.J., Rambaut A.: **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees**, *BMC Evol. Biol.*, 7. 214, 2007.
- Echevarría J.E., Avellón A., Juste J., Vera M., Ibáñez C.: **Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs**, *J. Clin. Microbiol.*, 39. 3678-3683, 2001.
- Eggerbauer E., Troupin C., Passior K., Pfaff F., Höper D., Neubauer-Juric A., Haberl S., Bouchier C., Mettenleiter T.C., Bourhy H., Müller T.: **The Recently Discovered Bokeloh Bat Lyssavirus: Insights Into Its Genetic Heterogeneity and Spatial Distribution in Europe and the Population Genetics of Its Primary Host**, *Adv. Virus. Res.*, 99. 199-232, 2017.
- European Commission: **The oral vaccination of foxes against rabies**, Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2002. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out80_en.pdf.
- European Commission: **Survey Program for Rabies Hungary**, Programmes for the eradication, control and monitoring of certain animal diseases and zoonoses, 2012. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_vet-progs_2012_dec-2011-807-ec_rabies_hun.pdf.
- European Commission: **Overview report Rabies Eradication in the EU**, 2017. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/diseases_erad_rb_report_rou_201710_pres-01.pdf.
- Fehlner-Gardiner C., Nadin-Davis S., Armstrong J., Muldoon F., Bachmann P., Wandeler A.: **ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004**, *J. Wildl. Dis.*, 44. 71-85, 2008.
- Fishbein D.B., Belotto A.J., Pacer R.E., Smith J.S., Winkler W.G., Jenkins S.R., Porter K.M.: **Rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1971–1984: increased cases in the woodchuck (*Marmota monax*) in mid-Atlantic states**, *J. Wildl. Dis.*, 22. 151-155, 1986.

- Fisher C.R., Streicker D.G., Schnell M.J.: **The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers**, *Nat. Rev. Microbiol.*, 16. 241, 2018.
- Fooks A.R.: **Rabies remains a 'neglected disease'**, *Euro. Surveill.*, 10. 211-212, 2005.
- Fooks A.R., Banyard A.C., Horton D.L., Johnson N., McElhinney L.M., Jackson A.C.: **Current status of rabies and prospects for elimination**, *Lancet.*, 384. 1389-1399, 2014.
- Franka R., Johnson N., Müller T., Vos A., Neubert L., Freuling C., Rupprecht C.E., Fooks A.R.: **Susceptibility of North American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1**, *J. Gen. Virol.*, 89. 1998-2010, 2008.
- Fusaro A., Monne I., Salomoni A., Angot A., Trolese M., Ferrè N., Mutinelli F., Holmes E.C., Capua I., Lemey P., Cattoli G.: **The introduction of fox rabies into Italy (2008–2011) was due to two viral genetic groups with distinct phylogeographic patterns**. *Infect. Genet. Evol.*, 17. 202-209, 2013.
- Gaudin Y., Tuffereau C., Durrer P., Brunner J., Flamand A., Ruigrok R.: **Rabies virus-induced membrane fusion**, *Mol. Membr. Biol.*, 16. 21-31, 1999.
- Gaudin Y.: **Rabies virus-induced membrane fusion pathway**, *J. Cell. Biol.*, 150. 601-612, 2000.
- Gibbons R.V.: **Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission**, *Ann. Emerg. Med.*, 39. 528-536, 2002.
- Gillet J.P., Derer P., Tsiang H.: **Axonal transport of rabies virus in the central nervous system of the rat**, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 45. 619-634, 1986.
- Gluska S., Zahavi E.E., Chein M., Gradus T., Bauer A., Finke S., Perlson E.: **Rabies virus hijacks and accelerates the p75^{NTR} retrograde axonal transport machinery**, *PLoS Pathog.*, 10. 1004348, 2014.
- Gunawardena P.S., Marston D.A., Ellis R.J., Wise E.L., Karawita A.C., Breed A.C., McElhinney L.M., Johnson N., Banyard A.C., Fooks, A.R.: **Lyssavirus in Indian Flying Foxes, Sri Lanka**, *Emerg. Infect. Dis.*, 22. 1456, 2016.
- Harper F., Gaudin Y., Blondel D., Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang, L.: **Functional Characterization of Negri Bodies**, *J. Virol.*, 83. 7948, 2009.
- Horton D.L., Banyard A.C., Marston D.A., Wise E., Selden D., Nunez A., Hicks D., Lembo T., Cleaveland S., Peel A.J., Kuzmin I.V.: **Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus**, *J. Gen. Virol.*, 95. 1025-1032, 2014.
- Hostnik P., Picard-Meyer E., Rihtarič D., Toplak I., Cliquet F.: **Vaccine-induced rabies in a red fox (*Vulpes vulpes*): isolation of vaccine virus in brain tissue and salivary glands**, *J. Wildl. Dis.*, 50. 397-401, 2014.

- Hu S.C., Hsu C.L., Lee M.S., Tu Y.C., Chang J.C., Wu C.H., Lee S.H., Ting L.J., Tsai K.R., Cheng M.C., Tu W.J.: **Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan**, *Emerg. Infect. Dis.*, 24. 782-785, 2018.
- Jackson A. C., Wunner H. (Szerk.): **Rabies**, Academic Press, 2007.
- Jackson A. C.: **Research advances in rabies**, Academic Press, 79, 2011.
- Jackson A.C., Kammouni W., Fernyhough P.: **Role of oxidative stress in rabies virus infection**, In: *Advances in virus research*. Szerk.: Jackson A.C. Academic Press, 127-138, 2011.
- Jeffares D.C., Tomiczek B., Sojo V., dos Reis M.: **A beginners guide to estimating the non-synonymous to synonymous rate ratio of all protein-coding genes in a genome**, In: *Parasite Genomics Protocols*. Szerk.: Peacock C. New York: Humana Press, 65-90, 2015.
- Jensen B.: **Movements of the red fox (*Vulpes vulpes* L.) in Denmark investigated by marking and recovery**, *Dan. Rev. Game Biol.*, 8. 20, 1973.
- Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R.: **The immune response to rabies virus infection and vaccination**, *Vaccine*, 28. 3896-3901, 2010.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T.: **Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data**, *Bioinformatics*, 28. 1647-1649, 2012.
- Kerekes B.: **Rabies – current situation**, *Magy. Allatorv. Lap.*, 122. 195-200, 2000.
- King A.A., Fooks A.R., Aubert M, Wandeler A.I. (Szerk.): **Historical perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin**, France, OIE, 2004.
- Krebs J. W., Williams S. M., Smith J. S., Rupprecht C. E., Childs J. E.: **Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000**, *J. Wildl. Dis.*, 39. 253-261, 2003.
- Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.A., Hughes G.J., Fooks A.R., Rupprecht C.E.: **Molecular epidemiology of terrestrial Rabies in the former Soviet Union**, *J. Wildl. Dis.*, 40, 617–631, 2004.
- Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D., Orciari L.A., Rupprecht C.E.: **Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition**, *Virus. Res.*, 111. 28-43, 2005.
- Kuzmin I.V.: **Virus Isolation in Animals: The Mouse Inoculation Test**, In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. Szerk.: Rupprecht C.E., Nagarajan T. Elsevier, Academic Press, 13-23, 2015.
- Lafon M.: **Rabies virus receptors**, *J. Neurovirol.*, 11. 82-87, 2005.

- Langevin C., Jaaro H., Bressanelli S., Fainzilber M., Tuffereau C.: **Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor**, *J. Biol. Chem.*, 2002.
- Lentz T.L.: **Rabies virus binding to an acetylcholine receptor α -subunit peptide**, *J. Mol. Recognit.*, 3. 82-88, 1990.
- Lontai I.: **Human rabies in Hungary**, *Rabies. Bull. Europe*, 4. 12-16, 1995.
- Lontai I.: **The current state of rabies prevention in Europe**, *Vaccine.*, 15. 16-19, 1997.
- Lüps P.J., Wandeler A.I.: **Meles meles (Linnaeus, 1758)–Dachs**, *Handbuch der Säugetiere Europas.*, 5. 856-906, 1993.
- Madhusudana S.N., Sundaramoorthy S., Ullas P.T.: **Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines**, *Int J. Infect. Dis.*, 14. 1067-1071, 2010.
- Malerczyk C., Freuling C., Gniel D., Giesen A., Selhorst T., Müller T.: **Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species**, *Hum. Vaccin. Immunother.*, 10. 2799-2804, 2014.
- Mani R.S., Madhusudana S.N.: **Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances**, *Sci. World. J.*, 2013.
- Manning S.E., Rupprecht C.E., Fishbein D., Hanlon C.A., Lumlerdacha B., Guerra M., Meltzer M.I., Dhankhar P., Vaidya S.A., Jenkins S.R., Sun B.: **Human rabies prevention—United States: recommendations of the advisory committee on immunization practices**, *MMWR Recomm. Rep.*, 57. 1-28, 2008.
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire, B.: **RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes**, *Virus. Evol.*, 1. 2015.
- Matsumoto T., Nanayakkara S., Perera D., Ushijima S., Wimalaratne O., Nishizono A., Ahmed K.: **Terrestrial animal-derived rabies virus in a juvenile Indian flying fox in Sri Lanka**, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 70. 693-695, 2017.
- McElhinney L.M., Marston D.A., Freuling C.M., Cragg W., Stankov S., Lalosević D., Lalosević V., Müller T., Fooks A.R.: **Molecular diversity and evolutionary history of rabies virus strains circulating in the Balkans**, *J. Gen. Virol.*, 92. 2171-2180, 2011.
- Ming P., Yan J., Rayner S., Meng S., Xu G., Tang Q., Wu J., Luo J., Yang X.: **A history estimate and evolutionary analysis of rabies virus variants in China**, *J. Gen. Virol.*, 91. 759-764, 2010.
- Miranda N.L., Robles C.G.: **A comparative evaluation of a new immunoenzymatic test (RREID) with currently used diagnostic tests (DME and FAT) for dog rabies**, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.*, 22. 46-50, 1991.

- Molnár V., Pálfi V., Beregi A., Molnár Z.: **Denevérveszétség hazai kimutatása**, *Magy. Allatorv. Lap.*, 130. 629-634, 2008.
- Murphy F.A., Bauer S.P., Harrison A.K., Winn Jr W.C.: **Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system**, *Lab. Invest.*, 28. 361, 1973.
- Murray J.D., Stanley E.A., Brown D.L.: **On the spatial spread of rabies among foxes**, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 229.111-150, 1986.
- Murray J.D., Seward W.L.: **On the spatial spread of rabies among foxes with immunity**, *J. Theor. Biol.*, 156. 327-348, 1992.
- Müller T., Johnson N., Freuling C.M., Fooks A.R., Selhorst T., Vos A.: **Epidemiology of bat rabies in Germany**, *Arch. Virol.*, 152. 273, 2007.
- Müller T., Bätza H.J., Beckert A., Bunzenthal C., Cox J.H., Freuling C.M., Fooks A.R., Frost J., Geue L., Hoeflechner A., Marston D.: **Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria**, *Arch. Virol.*, 154.1081-1091, 2009a.
- Müller T., Dietzschold B., Ertl H., Fooks A.R., Freuling C., Fehlner-Gardiner C., Kliemt J., Meslin F.X., Rupprecht C.E., Tordo N., Wanderler A.I.: **Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans**, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3. 542, 2009b.
- Müller T., Freuling C.M., Wysocki P., Roumiantzeff M., Freney J., Mettenleiter T.C., Vos A.: **Terrestrial rabies control in the European Union: historical achievements and challenges ahead**, *Vet. J.*, 203. 10-17, 2015.
- Nagaraj T., Vasanth J.P., Desai A., Kamat A., Madhusudana S.N., Ravi V.: **Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques**, *J. Clin. Virol.*, 36. 17-23, 2006.
- Nagy A., Kerekes B., Heltay I.: **Oral immunization of foxes (wildlife carnivores) - results in Hungary**, *Magy. Allatorv. Lap.*, 50. 95-100, 1995.
- Nel L.H., Rupprecht C.E.: **Emergence of lyssaviruses in the Old World: the case of Africa**, In: *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission*. Szerk.: Childs J.E., Mackenzie J.S., Richt J.A. Berlin, Heidelberg: Springer, 161-193, 2007.
- Nigg A.J., Walker P.L.: **Overview, prevention, and treatment of rabies. Pharmacotherapy**, *Pharmacotherapy.*, 29. 1182-1195, 2009.
- Nokireki T., Tammiranta N., Kokkonen U.M., Kantala T., Gadd T.: **Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland**, *Transbound. Emerg. Dis.*, 65. 593-596, 2018.
- Orłowska A., Żmudziński J.F.: **Molecular epidemiology of rabies virus in Poland**, *Arch. Virol.*, 159. 2043-2050, 2014.

- Perring P., Rolling P.E., Sureau P.: **A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies**, *Biologicals.*, 14. 217-222, 1986.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.: **UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis**, *J. Comput. Chem.*, 25. 1605-1612, 2004.
- Pfaff F., Müller T., Freuling C.M., Fehlner-Gardiner C., Nadin-Davis S., Robardet E., Cliquet F., Vuta V., Hostnik P., Mettenleiter T.C., Beer M.: **In-depth genome analyses of viruses from vaccine-derived rabies cases and corresponding live-attenuated oral rabies vaccines**, *Vaccine.*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.083>
- Picard-Meyer E., Bruyere V., Barrat J., Tissot E., Barrat M.J., Cliquet F.: **Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1: comparison with other rabies diagnostic methods**, *Vaccine.*, 22. 1921-1929, 2004.
- Picard-Meyer E., Dubourg-Savage M.J., Arthur L., Barataud M., Bécu D., Bracco S., Borel C., Larcher G., Meme-Lafond B., Moinet M., Robardet E.: **Active surveillance of bat rabies in France: a 5-year study (2004–2009)**, *Vet. Microbiol.*, 151. 390-395, 2011.
- Picard-Meyer E., Robardet E., Moroz D., Trotsenko Z., Drozhzhe Z., Biarnais M., Solodchuk V., Smreczak M., Cliquet F.: **Molecular epidemiology of rabies in Ukraine**, *Arch. Virol.*, 157.1689-1698, 2012.
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A.: **Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**, *Syst. Biol.*, 10. 2018.
- Ren J., Yao L., Sun J., Gong Z.: **Zagreb regimen, an abbreviated intramuscular schedule for rabies vaccination**, *Clin. Vaccine. Immunol.*, 22. 1-5, 2015.
- Rieder M., Brzózka K., Pfaller C.K., Cox J.H., Stitz L., Conzelmann K.K.: **Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity**, *J. Virol.*, 85. 842-852, 2011.
- Rosatte R.C., Pybus M.J., Gunson J.R.: **Population reduction as a factor in the control of skunk rabies in Alberta**, *J. Wildl. Dis.*, 22. 459-467, 1986.
- Rosatte R.C., Donovan D., Allan M., Howes L.A., Silver A., Bennett K., MacInnes C., Davies C., Wandeler A., Radford B.: **Emergency response to raccoon rabies introduction into Ontario**, *J. Wildl. Dis.*, 37. 265-279, 2001.
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y.: **I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction**, *Nat. Protoc.*, 5. 725, 2010.

- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A.: **DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets**, *Mol. Biol. Evol.*, 34. 3299-3302, 2017.
- Sato G., Itou T., Shoji Y., Miura Y., Mikami T., Ito M., Kurane I., Samara S.I., Carvalho A.A., Nociti D.P., Ito F.H.: **Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil**, *J. Vet. Med. Sci.*, 66. 747-753, 2004.
- Schatz J., Ohlendorf B., Busse P., Pelz G., Dolch D., Teubner J., Encarnação J.A., Mühle R.U., Fischer M., Hoffmann B., Kwasnitschka L.: **Twenty years of active bat rabies surveillance in Germany: a detailed analysis and future perspectives**, *Epidemiol. Infect.*, 142.1155-1166, 2014.
- Scott T.P., Nel L.H.: **Subversion of the immune response by rabies virus**, *Viruses.*, 8. 231, 2016.
- Serfass T. L., Whary M. T., Peper R. L., Brooks R. P., Swimley T. J., Lawrence W. R., Rupprecht C. E.: **Rabies in a River Otter (*Lutra canadensis*) Intended for reintroduction**, *J. Zoo. Wildl. Med.*, 26. 311-314, 1995.
- Shoji Y., Kobayashi Y., Sato G., Itou T., Miura Y., Mikami T., Cunha E.M., Samara S.I., Carvalho A.A., Nociti D.P., Ito F.H.: **Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp, in Brazil.)**, *Vet. Med. Sci.*, 66. 1271-1273, 2004.
- Singh R., Singh K.P., Cherian S., Saminathan M., Kapoor S., Manjunatha Reddy G.B., Panda S., Dhama K.: **Rabies—epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review**, *Vet. Q.*, 37. 212-251, 2017.
- Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M.: **A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody**, In: *Laboratory Techniques in Rabies (4th edition)*. Szerk.: Kaplan M.M., Koprowski H., Meslin F.X. Geneva, Switzerland: WHO, 181-191, 1996.
- Smith G.C., Wilkinson, D.: **Modelling disease spread in a novel host: rabies in the European badger *Meles meles***, *J. Appl. Ecol.*, 39. 865-874, 2002.
- Srithayakumar V., Sribalachandran H., Rosatte R., Nadin-Davis S.A., Kyle C.J.: **Innate immune responses in raccoons after raccoon rabies virus infection**, *J. Gen. Virol.*, 95. 16-25, 2014.
- Steck F., Wandeler A., Bichsel P., Capt S., Häfliger U., Schneider L.: **Oral immunization of foxes against rabies laboratory and field studies**, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 5. 165-171, 1982.
- Steele J.H.: **History of rabies and global aspects**, In: *The Natural History of Rabies*. Szerk.: Baer G.M. CRC Press., 1-24, 1975.

- Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A.: **Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10**, *Virus. Evol.*, 4. 016, 2018.
- Takács M (Szerk.): **Klinikai és Járványügyi virológia**, Vox Medica Kiadó, 2010.
- Talbi C., Holmes E.C., De Benedictis P., Faye O., Nakoune E., Gamatie D., Diarra A., Elmamy B.O., Sow A., Adjogoua E.V., Sangare O.: **Evolutionary history and dynamics of dog rabies virus in western and central Africa**, *J. Gen. Virol.*, 90. 783-791, 2009.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.: **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**, *Mol. Biol. Evol.*, 30. 2725-2729, 2013.
- Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F.: **Walking along the rabies genome: is the large GL intergenic region a remnant gene?**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83. 3914-3918, 1986.
- Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., Vignuzzi M., Duchene S., Holmes E.C., Bourhy, H.: **Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts**, *PLOS Pathog.*, 12. e1006041, 2016.
- Troupin C., Picard-Meyer E., Dellicour S., Casademont I., Kergoat L., Lepelletier A., Dacheux L., Baele G., Monchâtre-Leroy E., Cliquet F., Lemey P.: **Host genetic variation does not determine spatio-temporal patterns of European bat 1 lyssavirus**, *Genome. Biol. Evol.*, 9. 3202-3213, 2017.
- Turcitu M.A., Barboi G., Vuta V., Mihai I., Boncea D., Dumitrescu F., Codreanu M.D., Johnson N., Fooks A.R., Müller T., Freuling C.M.: **Molecular epidemiology of rabies virus in Romania provides evidence for a high degree of heterogeneity and virus diversity**, *Virus research.*, 150. 28-33, 2010.
- Vitasek, J.: **A review of rabies elimination in Europe**, *Vet. Med-Czech.*, 49, 171-185, 2004.
- Vos A., Neubert A., Aylan O., Schuster P., Pommerening E., Müller T., Chivatsi D.C.: **An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species**, *Epidemiol. Infect.*, 123. 165-175, 1999.
- Vuta V., Picard-Meyer E., Robardet E., Barboi G., Motiu R., Barbuceanu F., Vlagioiu C., Cliquet F.: **Vaccine-induced rabies case in a cow (Bos taurus): molecular characterisation of vaccine strain in brain tissue**, *Vaccine.*, 34. 5021-5025, 2016.
- Wandeler A.I., Capt S., Kappeler A., Hauser R.: **Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments**, *Rev. Infect. Dis.*, 10. 649-653, 1988.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R.: **SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes**, *Nucleic. Acids. Res.*, 2018.

- Whitfield S.G., Fekadu M., Shaddock J.H., Niezgodna M., Warner C.K., Messenger S.L., Hanlon T.R.W.G., Morrill P., Murray K., Orciari L., Rupprecht C.E.: **A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens**, J. Virol. Methods., 95. 145-151, 2001.
- WHO: **Expert Consultation on Rabies, second report**, 2013.
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85346/9789240690943_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- WHO: **Guide for post-exposure prophylaxis**, 2017.
<http://www.who.int/rabies/human/postexp/en/>
- Wiltzer L., Okada K., Yamaoka S., Larrous F., Kuusisto H.V., Sugiyama M., Blondel D., Bourhy H., Jans D.A., Ito N., Moseley G.W.: **Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease**, J. Infect. Dis., 209. 1744-1753, 2013.
- Xu G., Weber P., Hu Q., Xue H., Audry L., Li C., Wu J., Bourhy H.: **A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies**, Biologicals., 35. 297-302, 2007.
- Yamaoka S., Ito N., Ohka S., Kaneda S., Nakamura H., Agari T., Masatani T., Nakagawa K., Okada K., Okadera K., Mitake H.: **Involvement of rabies virus phosphoprotein gene in neuroinvasiveness**, J. Virol., JVI-02132, 2013.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y.: **The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction**, Nat. Methods., 12. 7, 2015.
- Zhang Y.: **I-TASSER server for protein 3D structure prediction**, BMC bioinformatics., 9. 40, 2008.

10. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

10.1 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

10.2 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

- Grózner 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

11. 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 bocsájtotta 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 Guti Csabát a dolgozatom lelkiismeretes átolvasásáért és „magyarítására” vonatkozó tanácsaiért.

Hálásan köszönöm családomnak, hogy elfogadják az érdeklődésiköröm és a „rendszámtáblás” gondolkodási módom. Köszönet illeti páromat, Guti Csabát a mindennapokban biztosított nyugodt és harmonikus háttérért. 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.

12. Függelék

12.1 Az evolúciós elemzésekhez használt genom szekvenciák GenBank-i azonosítói

GenBank-i azonosító	Belső azonosító	Származási hely	Faj	Izolálás dátuma
MK598338	18537	Nyírlugos	róka	2006.10.30
MK598339	12408	Piricse	róka	2007.01.22
MK598340	12496	Nagyhegyes	róka	2007.08.29
MK598341	5247	Bocskaikert	róka	2008.03.10
MK598342	44190	Szamosangyalos	róka	2009.12.14
MK598343	18072	Pusztaradvány	róka	2008.10.29
MK598344	1545	Makó	róka	2009.01.13
MK598345	2690	Kübekháza	róka	2010.02.15
MK598346	893	Pocsaj	róka	2010.01.13
MK598347	5666	Szerencs	róka	2016.02.03
MK598348	8656	Bekecs	róka	2017.02.27
MK598349	1703171	Bekecs	kecske	2017.03.16
MK598350	1703172	Bekecs	kecske	2017.03.16
MK598351	21068	Kecskemét	róka	2013.08.31
MK598352	15582	Tiszajenő	róka	2013.10.08
MK598353	24936	Kecskemét	róka	2013.10.17
MK598354	24951	Kecskemét	róka	2013.10.17
MK598355	16374	Tiszajenő	róka	2013.10.20
MK598356	25611	Tiszavárkony	róka	2013.10.25
MK598357	25987	Tizakécske	róka	2013.10.29
MK598358	25992	Kecskemét	róka	2013.10.29
MK598359	26301	Lakitelek	róka	2013.10.31
MK598360	27089	Kecskemét	róka	2013.11.08
MK598361	29628	Dánszentmiklós	róka	2013.11.28
MK598362	30856	Kocsér	szarvasmarha	2013.12.14
MK598363	31168	Kalocsa	róka	2013.12.16
MK598364	31183	Kecskemét	szarvasmarha	2013.12.16
MK598365	755	Törtel	róka	2014.12.29
MK598366	1606	Kocsér	róka	2014.01.07
MK598367	1608	Jászkarajenő	róka	2014.01.07
MK598368	1322	Kecskemét	róka	2014.01.13
MK598369	1816	Tizakécske	róka	2014.01.13
MK598370	4834	Vácszentlászló	róka	2014.02.03
MK598371	5695	Fajsz	róka	2014.02.05
MK598372	6003	Petőfiszállás	róka	2014.02.10
MK598373	6917	Törtel	róka	2014.02.16
MK598374	10436	Tizakécske	róka	2014.03.10
MK598375	13961	Szentmártonkáta	róka	2014.03.29
MK598376	16663	Jászberény	róka	2014.04.14
MK598377	17182	Kecskemét	róka	2014.04.18
MK598378	42708	Csemő	kecske	2014.09.15
MK598379	46293	Cegléd	kutya	2014.10.06
MK598380	21541	Kiskunfélegyháza	róka	2013.09.04
MK598381	22329	Kiskunfélegyháza	róka	2013.09.18
MK598382	22934	Lakitelek	róka	2013.09.24
MK598383	23335	Pálmonostora	róka	2013.10.01
MK598384	24956	Kiskunfélegyháza	róka	2013.10.17
MK598385	26627	Körösetetlen	róka	2013.11.05
MK598386	26631	Kecskemét	róka	2013.11.05
MK598387	26636	Kiskunfélegyháza	róka	2013.11.05
MK598388	29504	Tizakécske	róka	2013.12.02
MK598389	31167	Nagykőrös	róka	2013.12.09
MK598390	1801	Petőfiszállás	őz	2014.01.14
MK598391	9435	Mikebuda	róka	2014.02.27
MK598392	13070	Törtel	róka	2014.03.20
MK598393	14940	Kecskemét	róka	2014.04.07
MK598394	16367	Cegléd	róka	2014.04.12
MK598395	33424	Cegléd	róka	2014.07.02
MK598396	35313	Szentmártonkáta	róka	2014.07.14
MK598397	41108	Tóalmás	róka	2014.08.28
MK598398	10244	Páhi	macska	1905.06.18

12.2 Az evolúciós elemzésekhez használt részleges N szekvenciák GenBank-i azonosítói

GenBank-i azonosító	Származási hely	Faj	Izolálás dátuma
KX148127	Franciaország	róka	1991
KX148126	Franciaország	róka	1996
KP345881	Franciaország	ember/humán	2014
KF831562	Svájc	róka	1987
KX148135	Németország	róka	1991
EU886635	Németország	róka	2005
JF973836	Ausztria	ló	1991
JF973835	Ausztria	kutya	2001
EU886633	Ausztria	róka	2004
EU886636	Ausztria	róka	2006
U42709	Belgium	n.a	1992
KX148125	Belgium	róka	1994
FJ424484	Olaszország	róka	2008
GQ478245	Olaszország	kutya	2009
KC198075	Olaszország	róka	2010
KC198078	Olaszország	róka	2010
AY277571	Lettország	n.a	1999
AY277576	Lettország	n.a	1999
LT909537	Észtország	n.a	2000
KX148147	Finnország	nyestkutya	1988
KX148146	Finnország	róka	1993
JN190372	Lengyelország	róka	1996
JN190380	Lengyelország	róka	1999
JN190382	Lengyelország	róka	2001
JN190388	Lengyelország	róka	2004
JN190394	Lengyelország	róka	2008
JN190395	Lengyelország	róka	2010
HM852152	Szlovénia	nyest	1994
HM852148	Szlovénia	macska	1995
HM852164	Szlovénia	róka	2002
HM852165	Szlovénia	róka	2004
HM852167	Szlovénia	szarvasmarha	2009
HM852163	Szlovénia	róka	2010
KC522613	Szlovénia	róka	2012
JN656494	Ukrajna	róka	2002
JN656510	Ukrajna	macska	2009
JN656511	Ukrajna	kutya	2010
KX148161	Szerbia	róka	1972
JN008440	Szerbia	róka	2000
JF973846	Szerbia	róka	2002
JQ973879	Szerbia	kutya	2010
JQ973876	Szerbia	kutya	2011
JQ973875	Szerbia	róka	2011
JQ973870	Bulgária	róka	2009
JQ973872	Bulgária	róka	2009
JQ973873	Bulgária	róka	2011
GU086631	Románia	domestic cow	2006
GU086637	Románia	kutya	2007
GU086641	Románia	róka	2008
JF973781	Montenegro	szarvasmarha	1978
JF973802	Montenegro	ló	2000
JQ973886	Macedonia	farkas	2012
KC836502	Görögország	róka	2012
KJ865848	Görögország	szarvasmarha	2013
GU134624	Horvátország	farkas	2009
JX459920	Horvátország	tehén	2012
KX148160	Magyarország	humán	1991
MK598398	Magyarország	macska	1996
KX148143	Magyarország	róka	1993
KX148136	Magyarország	róka	1993
KX148138	Magyarország	róka	1993
KX148139	Magyarország	róka	1993
KX148137	Magyarország	róka	1993

12.3 Az evolúciós elemzésekhez használt részleges G szekvenciák GenBank-i azonosítói

GenBank-i azonosító	Származási hely	Faj	Izolálás dátuma
JN234426	Franciaország	szarvasmarha	1882
JN234424	Franciaország	szarvasmarha	1882
KU739048	Franciaország	róka	1990
KX148127	Franciaország	róka	1991
KX148128	Franciaország	róka	1992
KU884973	Franciaország	n.a.	1993
KX148134	Franciaország	róka	1994
KU739044	Spanyolország	kutya	2010
GU936875	Németország	róka	1990
KX148135	Németország	róka	1991
KX148113	Németország	róka	1991
KX148124	Németország	róka	1991
KX148123	Németország	róka	1991
KX148122	Németország	róka	1991
KC197875	Olaszország	róka	2008
KU739037	Olaszország	kutya	2009
KC197868	Olaszország	róka	2009
KC197956	Olaszország	róka	2009
KC197968	Olaszország	róka	2009
KC197966	Olaszország	róka	2010
KC197965	Olaszország	róka	2010
KC197963	Olaszország	róka	2010
KC197947	Olaszország	róka	2010
KC197959	Olaszország	róka	2010
KC197967	Olaszország	róka	2011
KX148125	Belgium	róka	1994
KX148144	Szlovénia	róka	1994
KX148132	Szlovénia	róka	1994
HM852175	Szlovénia	nyest	1994
KX148131	Szlovénia	róka	1994
HM852176	Szlovénia	róka	1995
HM852170	Szlovénia	róka	1996
HM852174	Szlovénia	borz	2000
HM852187	Szlovénia	róka	2002
HM852178	Szlovénia	róka	2003
HM852188	Szlovénia	róka	2004
HM852184	Szlovénia	ló	2007
HM852185	Szlovénia	ló	2008
HM852179	Szlovénia	kutya	2008
HM852183	Szlovénia	borz	2008
HM852189	Szlovénia	róka	2009
HM852190	Szlovénia	szarvasmarha	2009
HM852181	Szlovénia	szarvasmarha	2010
HM852186	Szlovénia	róka	2010
KU739049	Lengyelország	nyestkutya	1985
KX148150	Lengyelország	nyestkutya	1986
KX148141	Lengyelország	róka	1992
KX148121	Lengyelország	róka	1993
KX148119	Lengyelország	róka	1993
KX148120	Lengyelország	nyestkutya	1993
KX148142	Lengyelország	róka	1994
KX148118	Lengyelország	nyestkutya	1994
KX148153	Lengyelország	nyestkutya	1996
KX148152	Lengyelország	nyestkutya	1996
KX148151	Lengyelország	róka	1996
KX148117	Lengyelország	róka	1997
KX148154	Lengyelország	nyestkutya	1997
JN656533	Lengyelország	nyestkutya	2004
JN656534	Lengyelország	nyestkutya	2006
MF197741	Lengyelország	róka	2008
MF197743	Lengyelország	róka	2010
MF197742	Lengyelország	róka	2014
JN656532	Ukrajna	szarvasmarha	2002

GenBank-i azonosító	Származási hely	Faj	Izolálás dátuma
JN656531	Ukrajna	róka	2002
JN656530	Ukrajna	kutya	2002
JN656529	Ukrajna	róka	2002
JN656524	Ukrajna	róka	2002
JN656527	Ukrajna	macska	2009
JN656517	Ukrajna	macska	2009
JN656525	Ukrajna	kutya	2009
JN656522	Ukrajna	róka	2010
JN656521	Ukrajna	kutya	2010
JN656519	Ukrajna	nyest	2010
JN656518	Ukrajna	róka	2010
JN656516	Ukrajna	macska	2010
KX148149	Észtország	nyestkutya	1991
KX148156	Észtország	nyestkutya	1991
KX148148	Észtország	róka	1992
KX148158	Észtország	róka	1993
KX148157	Észtország	nyestkutya	1993
KX148155	Észtország	róka	1993
KX148147	Finnország	nyestkutya	1988
KX148146	Finnország	róka	1993
KX148161	Szerbia	róka	1972
JF973740	Szerbia	róka	1972
JF973741	Szerbia	róka	1976
JF973748	Szerbia	róka	1977
JF973742	Szerbia	róka	1977
JF973746	Szerbia	macska	1977
MG458309	Szerbia	kutya	1978
JF973751	Szerbia	ló	1986
MG458310	Szerbia	tehén	1986
KX148140	Szerbia	róka	1986
JF973752	Szerbia	róka	1986
MG458312	Szerbia	róka	1997
JF973760	Szerbia	róka	1997
JF973761	Szerbia	macska	1997
JF973754	Szerbia	macska	1997
MG458311	Szerbia	róka	1998
JF973738	Szerbia	róka	1999
JF973763	Szerbia	őz	1999
JF973773	Szerbia	róka	2000
JF973771	Szerbia	kutya	2000
JF973772	Szerbia	macska	2000
JF973737	Szerbia	róka	2000
JF973759	Szerbia	róka	1998
JF973750	Bosnia	kutya	1986
KX148133	Bosnia	róka	1986
KX148145	Bosnia	farkas	1986
JF973765	Bosnia	róka	1999
JF973764	Bosnia	róka	1999
KU888640	Törökország	róka	1987
KY860612	Törökország	kutya	1989
KX148167	Törökország	kutya	1993
KX148165	Törökország	kutya	1993
KY860584	Törökország	róka	1999
KY860604	Törökország	róka	2000
KY860611	Törökország	kutya	2001
KY860606	Törökország	róka	2001
KY860607	Törökország	kutya	2001
KY860587	Törökország	róka	2001
KY860588	Törökország	róka	2004
KY860589	Törökország	róka	2006
KY860590	Törökország	róka	2007
KY860591	Törökország	róka	2008
KY860592	Törökország	róka	2009
KY860593	Törökország	róka	2010
KY860595	Törökország	róka	2012
KY860602	Törökország	kutya	2014
KY860601	Törökország	róka	2014
KY860603	Törökország	róka	2015