

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**Magyarországi humánpatogén hantavírusok időbeli fertőzés
dinamizmusa és szervtropizmusának meghatározása
rágcsálókban**

PhD értekezés

Madai Mónika

PÉCS, 2022

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Magyarországi humánpatogén hantavírusok időbeli fertőzés dinamizmusa és szervtropizmusának meghatározása rágcsálókban

PhD értekezés

Madai Mónika

Témavezető:
Prof. Dr. Jakab Ferenc
habilitált egyetemi tanár

.....
Témavezető aláírása

.....
Iskolavezető aláírása

PÉCS, 2022

"A dolgok nem mindig azok, aminek látszanak."

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. Történeti áttekintés.....	9
2.1.1. <i>Hantavírusok Európában</i>	12
2.1.2. <i>Hantavírusok Magyarországon</i>	12
2.2. Hantavírusok általános jellemzői	14
2.3. Hantavírus fertőzés rágcsálókban	16
2.4. Hantavírus fertőzés emberben.....	18
2.4.1. <i>Hemorrhágiás láz vese szindrómával</i>	19
2.4.2. <i>Hantavírus kardiopulmonális szindróma</i>	22
2.5. Laboratóriumi diagnózis	23
2.5.1. <i>Szerológiai tesztek</i>	23
2.5.2. <i>Molekuláris vizsgálatok</i>	24
3. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSEK	25
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	26
4.1. Vizsgált rágcsálók	26
4.2. Mintavételi területek.....	26
4.3. Csapdázási metodika.....	27
4.4. Vérvétel és a vérminták feldolgozása.....	28
4.5. Boncolás	28
4.6. Virális nukleinsav izolálása	29
4.7. Polimeráz láncreakció.....	29
4.8. Agaróz gél elektroforézis, fotódokumentáció	31
4.9. Szekvenálási reakció	31
4.10. Szerológiai vizsgálatok	32
4.10.1. <i>ELISA</i>	32
4.10.2. <i>Western-blot</i>	33
4.11. Statisztikai vizsgálatok.....	33
4.12. Anyai antitest (AAT) jelenlétének meghatározása	34
5. EREDMÉNYEK	35
5.1. Előzetes kísérletek.....	35
5.1.1. <i>Csapdázás és vírus detektálás</i>	35
5.1.2. <i>ELISA rendszer fejlesztése</i>	35
5.2. Rágcsálók szerológiai vizsgálata	36

5.2.1. Vizsgált fajok	36
5.2.2. Teljes monitorozási időszak statisztikai elemzése	37
5.2.3. Évenkénti statisztikai elemzés	38
5.2.4. Szezonális fertőzést befolyásoló hatásai	40
5.2.5. Hantavírus fertőzöttség nemi megoszlása	43
5.2.6. Lineáris regressziós modell	45
5.2.7. Szerokonverziós és szeroreverziós események	50
5.2.8. Hantavírus gazdaszervezetek téli túlélése	52
5.2.9. Anyai antitestek jelenléte.....	54
5.3. Hantavírusok kimutatása molekuláris biológiai és szerológiai módszerekkel rágcsáló szervekből és vizeletből	55
5.3.1. Vizsgált fajok	55
5.3.2. Virális nukleinsav kimutatása és szerológiai vizsgálat eredményei	56
5.3.3. Szekvenálási eredmények	59
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	60
6.1. Fertőzés dinamizmus vizsgálat eredményeinek értékelése.....	60
6.2. Hantavírusok kimutatásának hatékonysága (szervtropizmusa) rágcsáló szervekből és vizeletből.....	63
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	66
8. SUMMARY	69
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	71
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	83

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAG	<i>Apodemus agrarius</i>
AFL	<i>Apodemus flavicollis</i>
ANDV	<i>Andes vírus</i>
AMRV/SOOV	<i>Amur/Soochong vírus</i>
ASIV	<i>Asikkala vírus</i>
bp	bázispár
BSA	bovine serum albumin
BSL	Biosafety level
CMR	capture- mark- recapture (fogás- jelölés- visszafogás)
CO	cut- off
DOBV	<i>Dobrava- Belgrade vírus</i>
ELISA	enzimhez kapcsolt immun assay
FA	fluoreszcens antitest
HCPS	hantavírus kardiopulmonális szindróma
HFRS	hemorrhágiás láz veseszindrómával
HTNV	<i>Hantaan vírus</i>
IBA	immunoblot assay
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> – Nemzetközi Vírus Taxonómiai Bizottság
IFA	immunfluoreszcens assay
IgG	immunglobulin G
IgM	immunglobulin M
KHF	koreai hemorrhágiás láz
MAG	<i>Microtus agrestis</i>
MAR	<i>Microtus arvalis</i>
MGL	<i>Myodes glareolus</i>
MNA	minimum number of alive (minimum ismert egyedszám)
MNI	minimum number of infected (minimum ismert fertőzöttek egyedszáma)

NE	nephropathia epidemica
nt	nukleotid
NVAV	<i>Nova vírus</i>
nRT-PCR	nested RT- PCR
OD	optikai denzitás
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - foszfát puffer
PHV	<i>Prospect Hill vírus</i>
PCR	polymerase chain reaction- polimeráz láncreakció
PUUV	<i>Puumala vírus</i>
RT-PCR	reverz- transzkripció polimeráz láncreakció
SAAV	<i>Saaremaa vírus</i>
SEOV	<i>Seoul vírus</i>
SNV	<i>Sin Nombre vírus</i>
SWSV	<i>Seewis vírus</i>
THAIV	<i>Thailand vírus</i>
TMPV	<i>Thottapalayam vírus</i>
TULV	<i>Tula vírus</i>
WB	western- blot

1. BEVEZETÉS

Napjainkban kiemelt figyelemmel tekintünk a zoonózisokra. Zoonózisnak nevezünk minden állatról emberre terjedő fertőzést, melynek kórokozói lehetnek baktérium-, vírus-, vagy parazita eredetűek. A fertőzés létrejöhet közvetlen és közvetett érintkezés (élelmiszer, víz) útján is. Taylor és munkatársai által végzett tanulmány szerint az emberek megfertőzésére képes, több, mint 1400 patogén közül 61% zoonótikus eredetű (Taylor és mtsai., 2001). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint, az elmúlt két évtized újonnan megjelenő fertőző betegségei 75%-a zoonózisnak tekinthető, melynek háttérben számos ok állhat úgy, mint a klímaváltozás, a népsűrűség növekedése, a növekvő urbanizáció általi erdőirtások, illetve a felgyorsult világunk utazási szokásainak megváltozása. Az elmúlt 100 évben számos járványkitörés történt, melyek kórokozója zoonótikus patogén volt. Az első világháború alatt és után a világ minden tájáról érkező katonák mozgása által terjedő, 1918-19-es influenza (spanyolnátha) járvány idején 500 millió ember fertőződött meg, 20-50 millió ember halálát okozva. Így ezt a történelem legpusztítóbb járványának tekinthetjük. A 37 országot érintő 2002-es SARS koronavírus járvány után, 2009-ben ismét egy influenza vírus, a négyszeres reasszortáns H1N1 okozott világjárványt több, mint 18 ezer halálessel. A magas halálozási rátával járó, de szerencsére kevés megfertőződést okozó 2013-as MERS koronavírus járvány után a nyugat-afrikai Ebola-járvány szedte áldozatait összességében 11 ezret meghaladó halálessel. Nem szabad megfeledkeznünk a 20. század csendes gyilkosaként ismert, ugyancsak zoonótikus HIV vírusról. Ahogy a jelenleg is tartó, 2020. március 11-én a WHO által világjárványnak minősített SARS2 koronavírus járványról sem, mely a világ összes országát érinti, és az új mutánsok megjelenésével, valamint gyors terjedésükkel nem tudhatjuk, meddig fog tartani.

Magyarországon számos zoonózis ismertén jelen van, mint például a szúnyogok által terjesztett Nyugat-nílusi láz vírusa, a kullancsok által hordozott Krími-kongói láz vírusa vagy a rágcsálók, cickányok által terjesztett hantavírusok is. A hantavírusok világszerte és hazánkban is jelentős kóroki szerepet betöltő patogének, mivel bár nem túl magas számú az évi megbetegedések száma, viszont nagyon súlyos lefolyású betegségeket okozhatnak. A betegségek megjelenése összefüggésbe hozható a gazdaszervezetek egyedsűrűségével, illetve fertőzöttségük mértékével. Jelen disszertációban egy több éven át tartó, rágcsálók körében végzett hantavírus monitorozás vizsgálat eredményeit mutatom be, amely eredmények alapján pontosabb képet kaphatunk a hantavírus fertőzések dinamikájáról.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Történeti áttekintés

A hantavírusok története meglehetősen régre nyúlik vissza, ennek ellenére nagy figyelmet csak a 20. század közepétől kaptak. 1913-ból származó kelet-szibériai feljegyzésekben már említést tesznek egy, a mai nevén hemorrhágiás lázzal járó veseszindróma (HFRS) nevű betegségről, sőt, i.sz. 960 körüli kínai orvosi leírásokban is feljegyeztek hasonló betegséget (Casals és mtsai., 1970; Lee és mtsai., 1982). A 20. századi katonai konfliktusok kiemelkedő szerepet játszottak a HFRS etiológiájának, klinikai evolúciójának, epidemiológiájának és ökológiájának feltárásában. Az első világháború során valószínűleg hantavírus fertőzés okozta mind a német, mind a szövetséges katonákat érintő betegséget, melyet akkor „mezei vesegyulladásnak” neveztek. Japán katonáorvosok Mandzsúria megszállása után, az 1930-as években találtak a betegséggel, a finn és német katonák a második világháború alatt, majd az ENSZ csapatai a koreai háború (1951-1953) során (Johnson, 2001; Smadel, 1953). Több, mint 3000 ENSZ katona betegedett meg a koreai hemorrhágiás lázként (KHF) ismert betegségben. A betegség kórokozója azonban az 1970-es évek végéig ismeretlen maradt, majd Lee és munkatársainak a Han folyó közelében befogott pirók erdejéger (*Apodemus agrarius*) tüdejéből sikerült kimutatniuk fluoreszcens antitest (FA) technikát alkalmazva a vírust, melyet *Hantaan vírus*-nak (HTNV) neveztek el, utalva ezzel az egér befogásának helyére (Lee és mtsai., 1978). Pár évvel később, Szöulban befogott városi patkányokból (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*) izoláltak egy újabb hantavírust, mely a *Seoul vírus* (SEOV) nevet kapta (Lee és mtsai., 1982).

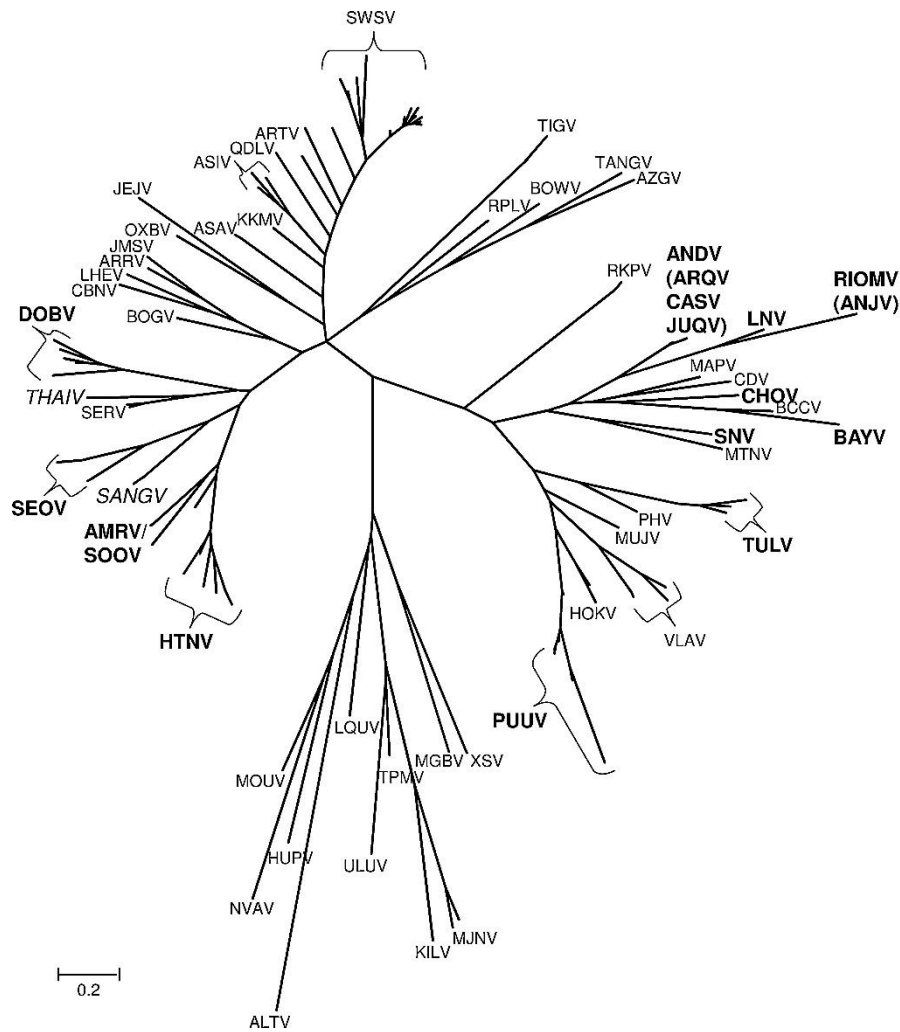
A HFRS enyhébb formája a nephropathia epidemica (NE) már az 1930-as évek eleje óta ismert Fennoskandiában, míg etiológiai ágensét, a Puumala vírust (PUUV) csak 1980-ban mutatták ki a finnországi Puumala település környékén befogott vöröshátú erdei pockok (*Myodes glareolus*) tüdejéből (Brummer-Korvenkontio és mtsai., 1980). Az Európában legsúlyosabb HFRS-t okozó vírust 1992-ben az akkori Jugoszlávia területéről egyszerre két helyről is kimutatták: a Dobrava-ban befogott sárganyakú erdei egerből (*Apodemus flavicollis*), illetve egy belgrádi kórházban fekvő, HFRS-ben szenvedő beteg véréből és vizeletéből. A vírus kimutatási helyének megfelelően *Dobrava-Belgrade vírus*-nak (DOBV) nevezték el (Avsic-Zupanc és mtsai., 1992; Gligic és mtsai., 1992). 1993-ig több új hantavírust is dokumentáltak, melyek közé tartozott a korábban Indiában *Suncus murinus* cickányból izolált *Thottapalayam vírus* (TMPV), valamint a thaiföldi *Bandicota indica*

patkányból a *Thailand vírust* (THAIV). Míg a hantavírus kutatók az eurázsiai vírusok kutatására koncentráltak, addig az amerikai kontinensen 1993-ban egy addig ismeretlen járvány tört ki.

1993. májusában az Egyesült Államok Four Corners régiójában (Új-Mexikó, Arizona, Colorado, Utah), egymás után pár napon belül több fiatal, addig egészséges Navajo indián halt meg súlyos tüdőbetegség következtében. A megbetegedéseket a *Sin Nombre vírus* (SNV) okozta, melynek azonosítása egy hónapon belül megtörtént, végül pedig a gazdaszervezetet is meghatározták, ami a szarvasgér (*Peromyscus maniculatus*) volt (Johnson, 2001). A betegséget hantavírus kardiopulmonális szindrómának (HCPS) nevezték el, amelynek a mortalitása közel 40%-os volt (Chandy és Mathai, 2017). Bár az USA területén korábban már izoláltak hantavírust közönséges réti pocokból (*Microtus pennsylvanicus*), mely a *Prospect Hill vírus* (PHV) nevet kapta, de az első, ismert, hantavírus eredetű emberi megbetegedések az indiánrezervátumban történtek (Childs és mtsai., 1994; Lee és mtsai., 1985; Nichol és mtsai., 1993). Az *Andes vírus* (ANDV) egy dél-amerikai szerotípus, mely különlegessége, hogy egy perui megbetegedésláncolat azt feltételezi, hogy a vírus képes emberről emberre terjedni (Chandy és Mathai, 2017; Wells és mtsai., 1997). 2012-ben a kaliforniai Yosemite Nemzeti Park látogatói között jelent meg hantavírus fertőzés. A vizsgálatok 10 fertőzöttet azonosítottak, akik közül öten intenzív gépi lélegeztetési ellátást igényeltek, és hárman életüket veszítették (Núñez és mtsai., 2014).

Az indiánrezervátumban kitörő járvány megváltoztatta az addig Európában és Ázsiában vesebetegséget okozó hantavírusok történetét, így a földrajzi elterjedésük alapján két nagy csoportba soroljuk a hantavírusokat. Az eurázsiai, óvilági (Old World) vírusok az emberben a HFRS tünetegyüttest okozzák, míg az amerikai kontinensen lévő újvilági (New World) hantavírusok, a hantavírus kardiopulmonális szindrómát (HCPS). Számos hantavírust kimutattak rágcsálók, cickányok, és denevérek Afrikában is, melyek filogenetikai elemzése alapján, az eurázsiai törzsekkel mutatnak nagyobb rokoni kapcsolatot (Witkowski és mtsai., 2014).

A Nemzetközi Vírustaxonómia Bizottság (ICTV) adatai alapján 47 emlősökből kimutatható hantavírus fajt ismerünk, melyek közül 2 Loanvírus-, 5 Mobatvírus-, 38 Orthohantavírus és 2 Thottimvírus fajt különböztetünk meg. A gazdaszervezet rendszertani besorolása szerint is csoportosíthatjuk a vírusokat: így megkülönböztetünk hörcsögfélék, egérfélék, cickányfélék, vakondfélék és denevérek által hordozott hantavírusokat (1. ábra).



1.ábra: A rágcsálók, cickányok és denevérek által terjesztett hantavírusok filogenetikai fája (Kruger és mtsai., 2015). Azoknak a vírusoknak a nevei, melyek humán patogenitása szerológiailag és molekulárisan is igazolt, vastag betűvel került feltüntetésre, míg a szerológiailag igazolt vírusoké dőlt betűvel. A filogenetikai fa részleges *L* szegmens szekvenciák (306 nukleotid) alapján készült a MEGA6 programban a Maximum Likelihood (GTR + G evolúciós modell) alkalmazásával. A skála a szekvencia pozíciókénti 0,2 szubsztitúciós evolúciós távolságát jelzi.

AMRV/SOOV, Amur/Soochong vírus; ALTV, Altai vírus; ANDV, Andes vírus; ANJV, Anajatuba vírus; ARQV, Araraquara vírus; ARRIV, Ash River vírus; ARTV, Artybash vírus; ASAV, Asama vírus; ASIV, Asikkala vírus; AZGV, Azagny vírus; BAYV, Bayou vírus; BCCV, Black Creek Canal vírus; BOGV, Boginia vírus; BOWV, Bowé vírus; CADV, Cano Delgadito vírus; CASV, Castelo dos Sonhos vírus; CBNV, Cao Bang vírus; CHOV, Choclo vírus; DOBV, Dobrava-Belgrád vírus; HOKV, Hokkaido vírus; HUPV, Huanqpi vírus; HTNV, Hantaan vírus; JEJV, Jeju vírus; JMSV, Jemez Springs vírus; JUQV, Juquitiba vírus; KILV, Kilimandzáró vírus; KKMV, Kenkeme vírus; LHEV, Lianghe vírus; LNV, Laguna Negra vírus; LQUV, Longquan vírus; MAPV, Maporal vírus; MGBV, Magboi vírus; MJNV, Imjin vírus; MOUV, Mouyassué vírus; MTNV, Montano vírus; MUJV, Muju vírus; NVAV, Nova vírus; OXBV, Oxbow vírus; PHV, Prospect Hill vírus; PUUV, Puumala vírus; QDLV, Qiandao Lake vírus; RIOMV, Rio Mamore vírus; RKPV, Rockport vírus; RPLV, Camp Ripley vírus; SANGV, Sangassou vírus; SEOV, szöuli vírus; SERV, Serang vírus; SWSV, Seewis vírus; SNV, Sin Nombre vírus; THAIV, Thaiföld vírus; TGNV, Tanganya vírus; TPMV, Thottapalayam vírus; TULV, Tula vírus; ULUV, Uluguru vírus; VLAIV, Vlagyivosztozk vírus; XSV, Xuan Son vírus.

2.1.1. Hantavírusok Európában

Európában évente több, mint 9000 HFRS esetet diagnosztizálnak, és ez a szám folyamatosan növekszik. Észak-Európában a HFRS járványok ciklusa 3-4 éves, mely megegyezik a rágcsáló populációk ciklikusságával. Bár az esetszámok országonként különbözőek, de a HFRS-t előidéző hantavírusok Európa-szerte jelen vannak (Heyman és mtsai., 2011).

Általánosságban elmondható, hogy Nyugat- és Észak-Európában a *Myodes glareolus* által terjesztett PUUV, míg Délkelet-Európában az *Apodemus* fajok által terjesztett DOBV-fertőzések dominálnak. A PUUV a HFRS enyhébb formájának, a nephropathia epidemica-nak a kórokozója, mely szinte egész Európában jelen van. Finnországban, Németországban, Svédországban és Oroszország európai részén több ezer PUUV-eset fordulhat elő a járványos években (Krüger és mtsai., 2013; Vaheri és mtsai., 2013). A megközelítőleg 12%-os HFRS halálozási ráta nagy részét a DOBV fertőzés okozza (Papa, 2012). A legtöbb DOBV fertőzés túlnyomórészt Délkelet-Európában, a balkáni országokban és Oroszországban fordul elő. Európában először 2012-ben mutatták ki a SEOV-t. 2012-ben az Egyesült Királyságban akut veseelégtelenségben szenvedő férfinél diagnosztizáltak SEOV fertőzést, illetve vadon élő patkányokból (*Rattus norvegicus*) is kimutatták a vírust. Pár hónappal később Wales-ből és Svédországból is hasonló eseteket jelentettek, mely során a fertőzést a hobbiállatként tartott patkányaitól kapták el a betegek (Jameson és mtsai., 2013a, 2013b; Lundkvist és mtsai., 2013). A *Tula vírust* (TULV) sok esetben nem sorolják a patogén kórokozók közé, viszont több esetet is leírtak, melyeknél valószínűsítik a TULV patogenitását (Schultze és mtsai., 2002; Zelená és mtsai., 2013). Több hantavírust, így a *Seewis* (SWSV), *Asikkala* (ASIV) és *Nova vírust* (NVAV) mutattak ki cickány- és vakondfélékből, de klinikai relevanciájuk ezidáig nem tisztázott (Klempa és mtsai., 2013).

2.1.2. Hantavírusok Magyarországon

Magyarországról először Gajdusek tett említést egy 1962- ben, vérzések lázakról írt tanulmányában, melyben felsorolás szinten említette, hogy hazánkban is voltak HFRS-es megbetegedések (Gajdusek, 1962). Több, mint 30 évvel később, 1999-ben Scharninghausen és munkatársai Taszár közelében, a NATO által használt területen végeztek vizsgálatokat: két *Apodemus agrarius*-ból hantavírus RNS-t izoláltak, mely a *Dobrava*-val mutatott

hasonlóságot (Scharninghausen és mtsai., 1999). Az első nagyobb hantavírus tanulmányt 1992-2000 között gyűjtött humán savók, valamint rágcsáló szervek és rágcsáló savók vizsgálatával végezték Ferenczi és munkatársai. Az eredmények azt mutatták, hogy a rágcsálók körében a humánpatogén hantavírusok elleni antitestek prevalenciája mintegy 7,25%. A szerológiai módszereket kiegészítették nukleinsav detektálással is, mellyel megállapították, hogy a DOBV és a PUUV fajok is jelen vannak az országban (Ferenczi és mtsai., 2003). Majd 2007-ben a Dunántúlon *Apodemus* egereket vizsgáltak PCR-rel: az egerek 13,6%-a pozitívást mutatott DOBV RNS-re (Jakab és mtsai., 2007). 2009-ben Plyusnina és munkatársai szerológiai és molekuláris vizsgálatokkal alátámasztva a DOBV, PUUV és *Saaremaa* (SAAV) együttes jelenlétét írták le hazánkban (Plyusnina és mtsai., 2009). Időközben felmerült, hogy a DOBV tényleges prevalenciáját alábecsülik, mivel ritka a molekuláris biológiai és szerológiai vizsgálatok egyidejű alkalmazása, bár a két módszer lényegesen pontosabb eredményt adhatna (Németh és mtsai., 2011). A TULV-t először 2008-ban azonosították. Két dél-dunántúli területen a 46 mezei pocok (*Microtus arvalis*) közül 17 bizonyult pozitívnak TULV RNS-re specifikus PCR alkalmazásával (Jakab és mtsai., 2008). Magyarországon is kimutattak nem rágcsálók által hordozott hantavírus fajokat: 2009-ben Kang és munkatársai erdei cickányból (*Sorex araneus*) és közönséges vakondból (*Talpa europea*) SWSV-t és NVAV-t detektáltak (Kang és mtsai., 2009a, 2009b).

A hantavírus gazdaszervezetek vizsgálatán kívül klinikai vizsgálatokat is végeztek Magyarországon. Az első hivatalos HFRS eset tanulmány 1971-ből származik, viszont mivel a hantavírusok azonosítása csak hét évvel később történt, ezért a szerzők a HFRS-en kívül egyéb információt nem említettek (Trencseni és Keleti, 1971). 1995-ben szerológiai vizsgálattal 55 olyan betegnél mutatták ki a vírus elleni antitesteket, akiknél 1987 és 1993 között HFRS-t diagnosztizáltak (Faludi és Ferenczi, 1995). Néhány évvel később egy országos, hantavírus szerológiai felmérésben több, mint kétezer 20 év feletti állampolgárt vizsgáltak. Az eredmények azt mutatták, hogy az egészséges emberek körülbelül 10%-ának szervezetében jelen voltak a hantavírus ellenes antitestek (Ferenczi és mtsai., 2005, 2003). Oldal és munkatársai 2014-ben egy átfogó, egész országot lefedő, szerológiai vizsgálatot végeztek erdészeti dolgozók körében, mely során 4,6%-os szeroprevalenciát állapítottak meg (Oldal és mtsai., 2014).

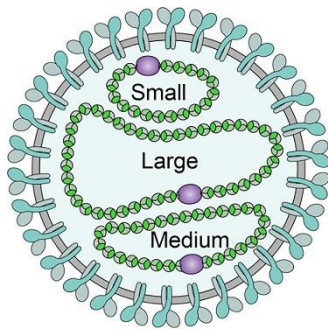
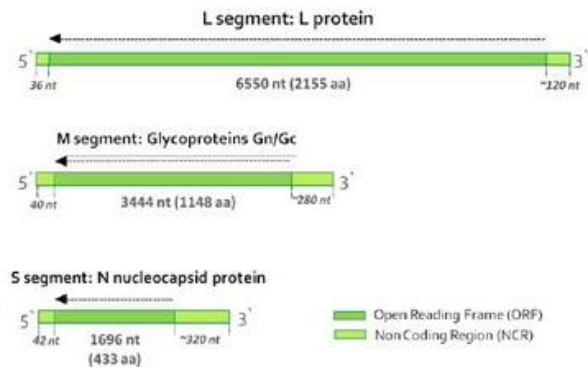
2.2. Hantavírusok általános jellemzői

Az ICTV által 2019-ben módosított, jelenlegi hantavírus taxonómia az S és M genomiális szegmens által kódolt fehérjék aminosavszekvenciáin alapul. A hantavírusokat a *Bunyavirales* rendbe és a *Hantaviridae* családba sorolták. A *Mammantavirinae* alcsaládon belül *Loanvírus*, *Mobatvírus*, *Orthohantavírus* és *Thottimvírus* nemzetségekbe csoportosították a hantavírus fajokat. Az emlősök által hordozott 38 hantavírus fajon kívül három alcsaládba sorolták a nyálkahalak, halak és hüllők által hordozott 6 hantavírus fajt (Laenen és mtsai., 2019).

A hantavírusok gömb alakú, kettős lipidréteggel borított, 80-120 nm átmérőjű kórokozók. Három szegmensből álló, negatív egyszálú RNS genommal rendelkeznek, mely megközelítőleg 12 kilobázis (kb) hosszúságú (Schmaljohn és Dalrymple, 1983).

A kicsi (small, S) szegmens a nukleokapszid fehérjét kódolja és 1600-2000 nukleotid (nt) hosszúságú, a genom legvariábilisabb részeként ismerjük. A közepes (medium, M) szegmens, kb. 3600 nt hosszúságú, a Gn és Gc glikoproteineket egyetlen nyílt leolvasási keretben kódolja. A két glikoprotein hasítási helye erősen konzervált, ennek ellenére nagyon változóak, akár 60 %-os eltérés is megfigyelhető az egyes hantavírus fajok között. A nagy (large, L) szegmens megközelítőleg 6500 nt hosszúságú, és az RNS függő RNS polimerázt (RdRp) kódolja. Ez a szegmens a genom legkonzerváltabb részeként ismert.

Mindegyik szegmens rendelkezik egy 3'-terminális nukleotid szekvenciával, melyhez a komplementer, 5' végi szekvenciák bázispárosodással kapcsolódnak, így hozzák létre a nem kovalensen zárt cirkuláris RNS struktúrákat (Plyusnin és mtsai., 1996) (2. ábra).

A**B**

2. ábra: Hantavírus szerkezete (D'Souza és Patel, 2020)

A. A hantavírus virion sematikusán ábrázolva. A vírus külső részét a lipidburokba ágyazott Gc és Gn glikoprotein tüskék alkotják. Az RNS genom három cirkuláris szegmensből áll: kicsi (S, small), közepes (M, medium) és a nagy (L, large).

B. A hantavírus genom szegmensei. S szegmens a nukleoproteint (nucleocapsid protein) kódolja, az M a Gn és Gc glikoproteineket, az L pedig az RNS függő RNS polimerázt (L protein) kódoló gént tartalmazza. A szegmensek nagysága nukleotidban (nt) és az általuk kódolt fehérjék nagysága aminosavakban (aa) van megadva az ábrán.

A hantavírusok mind az állatban, mind az emberben túlnyomórészt az endotél sejteket, makrofágokat, valamint az epitel sejteket fertőzi és replikálódik bennük (Easterbrook és Klein, 2008; Ferluga és Vizjak, 2008; Noack és mtsai., 2020; Pensiero és mtsai., 1992). A vírusok szaporodása mindig a célsejtek citoplazmájában játszódik le. A vírus felszínén található glikoprotein tüskék a gazdasejt sejt felszíni receptoraihoz kötődnek, majd a vírus endocitózissal a gazdasejtbe jut, mely során a virális membrán fuzionál az endoszóma membránal. A membránfúziót követően zajlik az mRNS szintézise. A transzláció az S és L szegmensek esetében a szabad riboszómákon, míg az M szegmensé a membránhoz kötött riboszómákon megy végbe. Ezt követően a burokfehérjék glikolizációja a Golgi komplexbe jutva befejeződik. A Golgi membránján megtörténik a virion összeépülése, ahonnan leválva, vezikulumokba csomagolva transzportálódik a membrán felé, majd exocitózissal kijut a gazdasejtből (Jonsson és mtsai., 2010).

A hantavírusok hőhatásra érzékenyek, az elfogadott inaktiválási protokoll szerint a sejtkultúrából izolált vírus 30 perces 60°C-os inkubálás során elveszíti fertőzőképességét, de

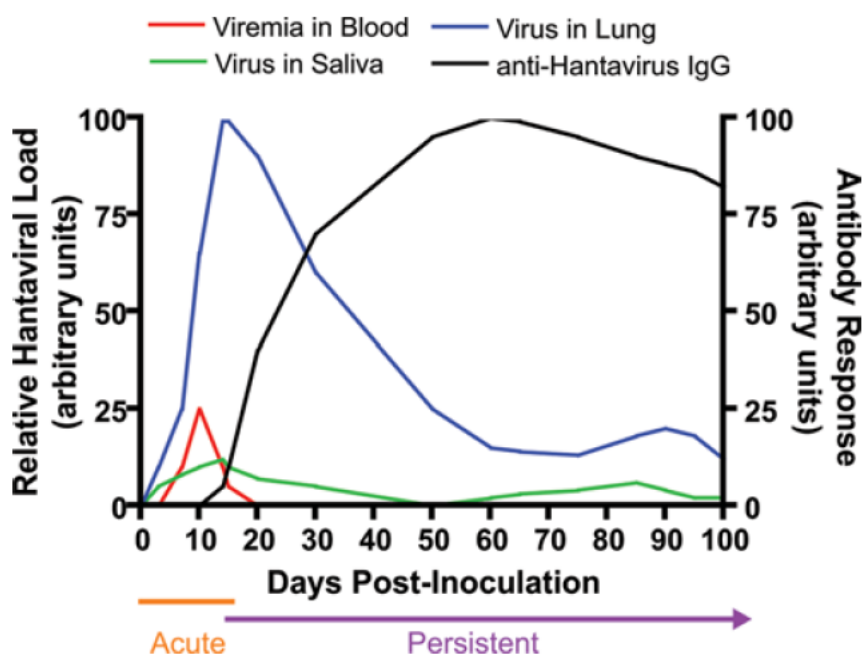
pl. a PUUV már 15 perces 56°C-os hőkezelés során is inaktiválható. Szobahőmérsékleten a gazdaszervezetből származó vírus 12-15 napig képes fertőzőképességét megőrizni, mely a vírus terjedése szempontjából kiemelt fontosságú (Kallio és mtsai., 2006).

2.3. Hantavírus fertőzés rágcsálókban

Más Bunyavírusokkal ellentétben, a hantavírus fertőzés átvitele emberre mind a rovarvők, rágcsálók és denevérek esetében is ízeltlábú vektor nélkül történik, emiatt a hantavírusok ökológiája és földrajzi elterjedése szorosan összefügg a gazdaszervezet elterjedésével. A hantavírusok általában szorosan kapcsolódnak egyetlen rágcsáló (rovarvő, denevér) fajhoz, ami a vírus és a gazdaszervezet koevolúciójának eredménye (Plyusnin és Morzunov, 2000).

Más állatok, mint például a jávorszarvas, a vörös róka, vagy a házimacska és a kutya fertőződése ún. spillover folyamatnak tekinthető (vírus egyik fajról, másik fajra kerül át), amely során nagyon kevés, illetve elhanyagolható mértékű az emberi fertőződés kockázata (Ahlm és mtsai., 2000; Dobby és mtsai., 2012a; Escutenaire és mtsai., 2000b; Khaiboullina és mtsai., 2005; Leighton és mtsai., 2001). Ezzel ellentétben a gazdaszervezetek spillover eseménye meglehetősen gyakorinak tűnik, így ezek az események lehetővé teszik az új hantavírus fajok természetes átrendeződését és létrejöttét, mely a közegészségügy szempontjából is fontos lehet (Hjelle és Yates, 2001; Klingström és mtsai., 2002; Zou és mtsai., 2008). A vírus a fertőzött állat vizeletében, székletében, nyálában egyaránt megtalálható, melyet akár életük végéig üríthetnek (Bernshtein és mtsai., 1999). A vírusok az exkrétumok vaporizációjával és harapás útján juthatnak állatokba vagy emberbe (Chandy és Mathai, 2017). Általánosan elfogadott tény, hogy a gazdaszervezetben nem okoz betegséget a vírus, ennek ellenére számos tanulmány említi, hogy megjelenhetnek patológiai elváltozások illetve növekedésbeli eltérések a rágcsálókban (Kallio és mtsai., 2006). Baltimore-ban vándorpatkányok vizsgálata során nem észleltek hatást sem a túlélési arányban, sem az ivarérési időben, de a súlygyarapodás lassabb volt (Childs és mtsai., 1989). Mononukleáris sejt infiltrációt és ödémás alveoláris szeptumokat mutattak ki, mind a természetes úton *New York vírus*-al (NYV) fertőződött *Peromyscus leucopus*-ban, mind a SNV-vel fertőzött *P. maniculatus*-ban (Lyubsky és mtsai., 1996; Netski és mtsai., 1999). A rágcsálók kísérleti fertőzése a legtöbb modellben tünetmentes, azonban újszülött egerekre letális lehet (Kim és McKee, 1985; Xiao és mtsai., 1991; Yanagihara és mtsai., 1985).

A rágcsálókban a kezdeti akut fázis, illetve a virémia után a vírus a célszervekben (tüdő, vesék, máj, lép, nyálmirigyek) szaporodik, majd a replikáció ugyan lecsökken, viszont folyamatos marad, annak ellenére, hogy a vírus ellenes antitestek ekkor már nagy mennyiségben jelen vannak az állat szervezetében (Easterbrook és Klein, 2008) (3. ábra).



3.ábra: Hantavírus fertőzés kinetikája rágcsálókban az antitestválasz és a vírus titer függvényében. Görbék színekódolása: virémia (piros), vírus mennyisége a nyálban (zöld), tüdőben (kék), anti-hantavírus IgG (fekete) (Easterbrook és Klein, 2008)

Laboratóriumi és természetes fertőződés vizsgálatakor is kimutatták, hogy a hímek fogékonyabbak a fertőzésre a nőstényeknél, melynek oka lehet a nemi hormonok különbözősége, ami a hímek agresszív magatartásáért is felel (Bernshtein és mtsai., 1999; Klein és mtsai., 2001; Schmaljohn és Hjelle, 1997).

A vírus vertikálisan nem terjed a rágcsálók között, viszont a hantavírus ellenes anyai antitestek jelenléte nagymértékben befolyásolja a fertőződést, mivel az állatok életük első 6-12 hetében ezáltal védettek a fertőzéssel szemben (Borucki és mtsai., 2000; Jonsson és mtsai., 2010; Kallio és mtsai., 2010).

A területek hantavírus fertőzöttségének mértékét több tényező együttesen befolyásolja, melyek közül a legfontosabbak a rágcsálók abundanciája, életkora, neme, valamint a környezeti tényezők, így az éghajlat, hőmérséklet és a táplálék mennyisége (Heyman és mtsai., 2011; Khalil és mtsai., 2014). Egy finn tanulmány szerint az előbb említett tényezőkön kívül a hantavírus fertőzés negatívan befolyásolja az állatok téli túlélését (Kallio és mtsai., 2007).

2.4. Hantavírus fertőzés emberben

A hantavírusok világszerte okoznak emberi megbetegedéseket. A fertőzés mértéke meglehetősen széles skálán mozog, mivel tünetmentes és halálos kimenetelű is lehet. Azt meg kell említeni, hogy a vírus számára az ember zsákutcát jelent, bár Argentínában leírtak már emberről emberre történő fertőzést az *Andes vírus* (ANDV) esetében (Wells és mtsai., 1997). A 47 emlősökből kimutatott hantavírusok közel fele humánpatogén. (1. táblázat).

1. táblázat: Klinikai szempontból jelentős hantavírusok (Chandy és Mathai, 2017)

Hantavírus okozta betegség, vírusfajok és rövidítései, gazdaszervezetük, valamint földrajzi elterjedésük szerint csoportosítva.

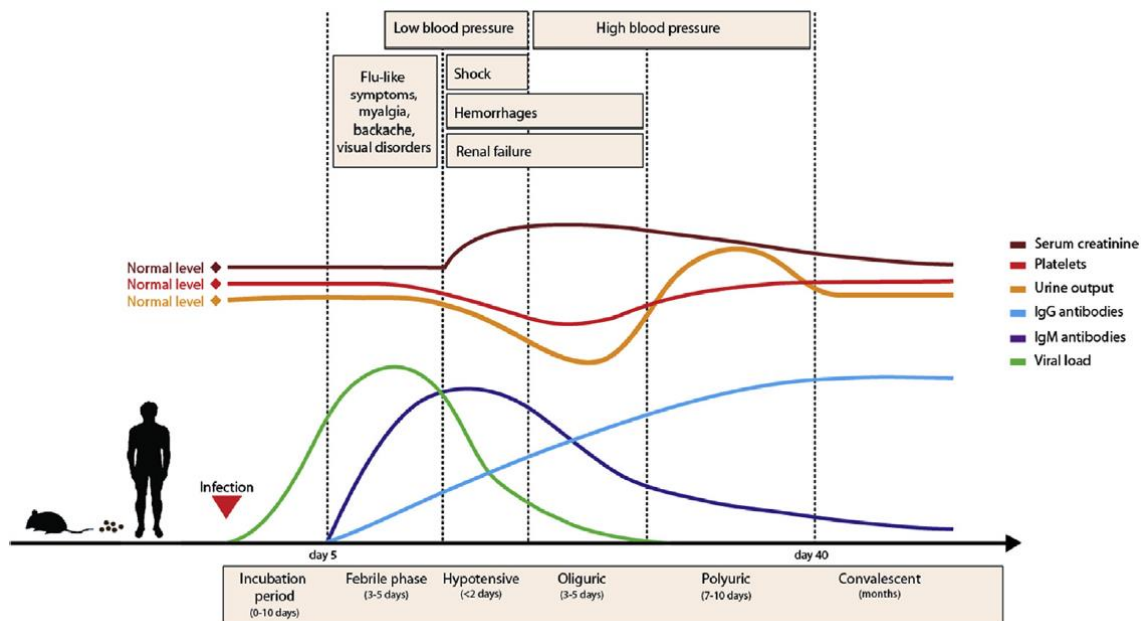
Disease/ continent	Virus	Abbreviation	Rodent host	Geographic distribution
Old World Hantavirus HFRS/ Eurasia	Dobrava Belgrade viruses	DOBV		
		DOBV-Aa	Apodemus agrarius	Central Europe, Balkans
		DOBV-Af	A. flavicollis	Balkans
		DOBV-Ap	A. ponticus	Russia
	Saaremaa	SAAV	A. agrarius	Estonia, Europe
	Puumala	PUUV	Myodes glareolus	Europe, Asia
	Hantaan	HTNV	Apodemus agrarius	Russia, China, Korea
	Amur/Soochong	AMRV/SOOV	A. peninsulae	Far East Russia
	Seoul	SEOV	Rattus spp.	South Korea
	Tula	TULV	Microtus arvalis	Europe, Russia
	New World Hantaviruses HCPS/ Americas	Andes	ANDV	Oligoryzomys longicaudatus
Oran		ORNV	O. longicaudatus	Argentina
Bermejo		BMJV	O. chacoensis	Argentina
Lechiguanas		LECV	O. flavescens	Argentina
Rio Mamore		RIOMV	O. microtis	Bolivia, Peru
Choclo		CHOV	O. fulvescens	Panama
Laguna Negra		LNV	Calomys laucha	Argentina, Bolivia, Paraguay
Araraquara		ARAV	Bolomys lasiurus	Brazil
Juquitiba		JUQV	O. nigripes	Brazil
Bayou		BAYV	Oryzomys palustris	North America
Black Creek Canal		BCCV	Sigmodon hispidus	North America
Sin Nombre		SNV	Peromyscus maniculatus	North America
New York		NYV	P. leucopus	North America

Az emberi hantavírus fertőzések esetében három klinikai kórképet különböztetünk meg: az óvilági vírusok által okozott (1) HFRS-t és (2) NE-t, valamint az újvilági hantavírusok által kiváltott (3) HCPS-t. A szindrómák közötti fő különbséget az okozza, hogy a HFRS/NE során a vese kapillárisai, míg a HCPS esetében pedig a pulmonális kapillárisok az elsődlegesen érintett szervek. Azonban a fertőzés kezdeti tünetei hasonlóak, beleértve a hirtelen fellépő magas lázat, rossz közérzetet, izomfájdalmat és más influenzaszerű tüneteket, valamint a megnövekedett vaszkuláris permeabilitást, mely hypotenzióhoz, thrombocytopeniához és leukocitózishoz vezet (Khaiboullina és mtsai., 2005; Schmaljohn és Hjelle, 1997; Schönrich és mtsai., 2008).

2.4.1. Hemorrhágiás láz vese szindrómával

HFRS klinikai megjelenése lehet enyhe, közepesen súlyos vagy súlyos, részben a betegség kórokozójától függően. Általánosságban elmondható, hogy a HTNV, *Amur/Soochong vírus* (AMRV/SOOV) vagy DOBV által okozott HFRS súlyosabb, a halálzási arány 5-15%, míg a SEOV mérsékelt, a PUUV pedig enyhe betegségeket okoz, amelyek halálzási aránya <1%. Mindazonáltal a PUUV-fertőzés egyes esetei lehetnek súlyosak, illetve a HTNV-fertőzések között is vannak enyhe lefolyásúak (Jonsson és mtsai., 2010; Vaheri és mtsai., 2013).

Az átlagosan 10 napos inkubációs idő után, a HFRS lefolyása öt fázisra osztható, a lázas (1), hipotenzív (2), oligurikus (3), poliuriás (4) és konvaleszcens (5) (4. ábra).



4. ábra: Az emberi hantavírus fertőzés kinetikájának sematikus ábrázolása.

A HFRS tipikus lefolyása öt különböző fázisra osztható: lázas, hipotenzív, oligurikus, poliuriás és konvaleszcens. A fertőzés után a vírus mennyisége tetőzik, és az első klinikai tünetek megjelenésekor az antitestek szintje megemelkedik. A HFRS kialakulásával a vérlemezkek és a vizelet mennyiségének csökkenése, valamint a szérum kreatininszint emelkedése figyelhető meg (Avsic-Zupanc és mtsai., 2015).

A fázisok jobban elkülöníthetőek a HTNV és a DOBV által okozott súlyos betegségekben.

1. A 2-4 hetes lappangási idő után a betegség hirtelen kezdődik magas lázzal, hidegrázással, fejfájással, hátfájással, hasi fájdalmakkal, hányingerrel és hányással. Gyakran beszámolnak aluszékonyságról és látászavarról (homályos látás). Ez a lázas fázis általában 3-7 napig tart. Ennek a fázisnak a vége felé kötőhártya vérések és a szájpadláson apró petechiák jelentkeznek.
2. A hipotenzív (alacsony vérnyomás) szakasz több órától 2 napig tarthat. Súlyos esetekben hipotenzió, sőt sokk is gyorsan kialakulhat (a HFRS halálozások egyharmada fulmináns, irreverzibilis sokkhoz kapcsolódik) ebben a szakaszban. A trombocitopenia (csökkent vérlemezkeszám) és a leukocitózis (emelkedett fehérvérsejtszám) jellemző erre a fázisra, és ha súlyos vérzéses megbetegedés lép fel, akkor az ebben a szakaszban kezdődik. A vérzéses megnyilvánulások közé

tartozhatnak a bőrön és a nyálkahártyán lévő petechiák, kötőhártya vérzések, orrvérzés, véres vizelet megjelenése, és végzetes koponyaűri vérzések.

3. A 3-7 napig tartó oliguriás (kevés vizelet) fázisban a vérnyomás normalizálódik, míg a vesefunkció átmenetileg csökken, ami oliguriához vagy akár anuriához vezet (proteinuria és haematuria megjelenik). Az oligurikus fázisban, amelyet általában has- vagy hátfájdalmak kísérnek, a súlyos tünetekkel küzdő betegeket hemodialízissel kell kezelni. A halálesetek fele ebben a fázisban következik be. A tipikus laboratóriumi eredmények a szérum kreatinin és karbamid szintjének emelkedése.
4. A poliurikus fázisban a veseműködés helyreáll, és a vizeletkibocsátás nő. A diuretikus fázis kezdete pozitív prognosztikai jel a beteg számára. Napokig vagy hetekig tarthat, és a betegek naponta több liter vizeletet ürítenek.
5. A gyógyulás, amelyet a klinikai és laboratóriumi markerek helyreállása jellemez, általában elhúzódó, és akár 6 hónapig is eltarthat.

Általában eléri a teljes gyógyulást, a hosszan tartó szövődmények – például a krónikus veseelégtelenség és a magas vérnyomás – ritkák (Klempa és mtsai., 2013; Krüger és mtsai., 2001; Mccaughey és Hart, 2000).

Gyermekeknél a klinikai kép nagyon hasonló a felnőttekéhez, de a legtöbb esetben kevésbé súlyosak. A hasi panaszokat azonban gyakrabban regisztrálják (Ferrés és Vial, 2004; Overturf, 2005). A SEOV által okozott HFRS enyhébb formáiban, illetve a PUUV által okozott NE-ben a HFRS öt fázisát nehéz elkülöníteni. A PUUV fertőzés klinikai képe alapvetően hasonló a DOBV-hez, de a tünetek enyhébbek, mely alacsonyabb halálozási arányt (0,1%) eredményez. NE-ben súlyos vérzéses megnyilvánulások és sokk általában nem fordulnak elő, de enyhe vérzéses tünetek, például petechiák a betegek körülbelül egyharmadánál megfigyelhetők. Bár a legtöbb betegnél veseelégtelenség jelei mutatkoznak, ez általában kevésbé szembetűnő, mint a virulensebb hantavírusok által okozott HFRS-ben. Az oliguria vagy anuria a betegek kevesebb, mint felénél jelentkezik. Súlyosabb NE-ben idegrendszeri panaszok, illetve látászavarok megjelenhetnek. Összességében, mivel az NE klinikai lefolyása enyhe, és inkább hasonlít egy hasi fájdalommal járó lázas betegségre, gyakran nem diagnosztizálják NE-ként (Hautala és mtsai., 2021; Kanerva és mtsai., 1998; Settergren, 2000).

2.4.2. Hantavírus kardiopulmonális szindróma

A HFRS-hez képest a HCPS egy súlyosabb betegség, melynek halálozási rátája mintegy 30-50%-os. A HCPS klinikai lefolyása általában három fázisból áll: prodromális (1), kardiopulmonális (2) és konvaleszcens (3), a klinikai megnyilvánulások pedig az enyhe hipoxémiától a kardiogén sokkal járó légzési elégtelenségig változhatnak (Enria és mtsai., 2000).

1. A prodromális fázis általában egy rövid, nem specifikus betegség influenzaszerű tünetekkel, mint például magas láz, hidegrázás, izomfájdalom, hányinger, fejfájás, hányás, hasi fájdalom és hasmenés.
2. Az első fázist követi a kardiopulmonális fázis, hirtelen fellépő progresszív köhögéssel, légszomjjal és tachycardiával. A betegeknél akut, nem szív eredetű tüdőödéma és hipotenzió alakul ki. A bilaterális beszűrődések gyorsan fejlődnek, néha pleurális folyadékkal társulva, ami légzési elégtelenséget okoz, és kötelezővé teszi a gépi lélegeztetést. Súlyos esetekben ezt a szakaszt kardiogén sokk, tejsavas acidózis és masszív hemokoncentráció bonyolítja. A betegek a kórházi kezelés ellenére is órákon belül meghalhatnak.
3. Azok a betegek, akik túléltek a betegség akut fázisát, a poliuriás stádiumba kerülnek, amelyet a tüdőödéma megszűnése kísér.

Noha a lábadozás lassú, és a betegek gyakran panaszkodnak gyengeségről, fáradtságról és csökkent terhelési toleranciáról, a felépülés általában teljes, szövődmények nélküli (Enria és mtsai., 2000; Jonsson és mtsai., 2008; Schönrich és mtsai., 2008).

Bár a vesebetegséget általában a HFRS-hez, a tüdőbetegséget pedig a HCPS-hez sorolják, a HFRS és a HCPS klinikai lefolyásával kapcsolatos megnövekedett orvosi ismeretek alapján a két szindróma részben átfedi egymást, folyamatosan növekszik a bejelentett tüdőérintett HFRS és vese- és/vagy vérzéses érintettségű HCPS esetek száma (Hjelle és Torres-Pérez, 2010).

A fertőzés kezelése csak tüneti és nincs egyértelműen jóváhagyott terápiás lehetőség. Igaz, korlátozott bizonyítékokkal, de számos vírusellenes szer azonban hatásos lehet ezekre a kórokozókra. A legtöbb adat in vitro vizsgálatokból és állatmodellekből származik, ezért humán kísérletekre van szükség ahhoz, hogy új ismereteket szerezzünk e terápiák klinikai hatékonyságáról és biztonságosságáról. Az olyan vírusellenes szerek, mint a ribavirin, amelyek hatásosnak bizonyultak a kezeléseik során, könnyen beszerezhetőek a

kereskedelemben. Több olyan vakcinajelölt is létezik, amelyek hosszú védelmet nyújthatnak a hantavírusok ellen. Ezek egy részét Koreában és Kínában évek óta alkalmazzák (Avsic-Zupanc és mtsai., 2015). A nagyobb engedélyező hatóságok, például az FDA még nem hagyta jóvá, a WHO-nak pedig még előminősítenie kell egy hantavírus elleni vakcinát. Több klinikai vizsgálati adatra van szükség a vakcinákhoz és a terápiákhoz, hogy biztosítsák azok szélesebb körű hozzáférhetővé tételét és felhasználását (Dheeraseskara és mtsai., 2020).

A rágcslóírtás, valamint a népegészségügyi oktatás és promóció fontos szerepet játszanak a hantavírus fertőzések megelőzésében.

2.5. Laboratóriumi diagnózis

2.5.1. Szerológiai tesztek

A hantavírus fertőzések pusztán klinikai alapon történő diagnosztizálása szinte lehetetlen, különösen az enyhe és közepesen súlyos klinikai tünetek esetén, mivel a betegség korai jelei nem specifikusak (Bi és mtsai., 2008). Az akut hantavírus fertőzés laboratóriumi diagnosztikája szerológián alapul, mivel gyakorlatilag minden beteg rendelkezik a vírus ellen termelődött immunglobulin M (IgM) és általában immunglobulin G (IgG) antitestekkel is. A vírushatőzések során elsősorban a nukleokapszid és a glikoproteinek váltanak ki specifikus antitest termelést a rágcslók és az emberek esetében is. A legáltalánosabb szerológiai vizsgálati módszer az ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), IBA (Immunoblot assay) és az IFA (Immunofluorescence assay) (Munir és mtsai., 2021). Az IFA a hantavírus diagnosztikában nem elterjedt módszer, mivel minimum BSL-3-as szintű laboratóriumra van szükség az elvégzéséhez. Az ELISA és IBA (Western-blot (WB), Dot-blot) vizsgálatok hátránya, hogy kevés cég gyárt specifikus hantavírus tesztet, illetve meglehetősen drágák, valamint nagyrésze állatok vizsgálatára nem alkalmas. Az ELISA tesztek gyártása során a rekombináns DNS technológia alkalmazásával antigén alapú teszteket fejlesztenek. A hantavírusok esetében ez általában a rekombináns nukleokapszid protein. Több organizmusban előállítottak ilyen fehérjéket, így baktériumban, élesztőben, rovar sejtekben baculovírus rendszer segítségével, valamint növényekben is (Kehm és mtsai., 2001; Okumura és mtsai., 2007). A víruskutatással foglalkozó kutatócsoportoknak lehetőségük van az előbb említett technológia alkalmazásával ún. „házi készítésű” szerológiai tesztek (ELISA, WB, IFA) fejlesztésére, mely rutin diagnosztikában többnyire

nem alkalmazható, de kutatásra teljes mértékben megfelel (Földes és mtsai., 2019; Németh és mtsai., 2011; Oldal és mtsai., 2014).

A klinikumban ma már számos országban elérhetőek az IgM alapú, 5 perc alatt eredményt adó gyorsteszték (lateral flow) is (Hjelle és mtsai., 1997; Hujakka és mtsai., 2003).

2.5.2. Molekuláris vizsgálatok

A molekuláris elemzésen alapuló diagnosztikai technikákat nagy pontossággal és specifitással széles körben alkalmazzák. Az RT-PCR mint molekuláris technika a hantavírus azonosítására és a virális nukleinsav mennyiségének meghatározására is szolgál vérből, szérumból, vagy szervekből (Jonsson és mtsai., 2010). A PCR termék tovább használható a vírus genom szekvenálására és filogenetikai analízisére. Ezen túlmenően a PCR fő előnye a hantavírus RNS azonosításában, hogy képes a fertőző ágens kimutatására akár a tünetek megjelenését követő hét-tíz napon belül. A PCR vizsgálat eredménye 12-24 órán belül elérhető lehet. Az ilyen technikák tehát nagyon hasznosak azoknak a vírusoknak az azonosításában, amelyek néhány órán belül halállal végződhetnek. A vérminták felhasználásával végzett PCR azonban csak a fertőzés korai szakaszában hasznos, mivel a hantavírusok rövid ideig és relatív alacsony vírustiterrel okoznak virémiát (Munir és mtsai., 2021).

3. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSEK

Az értekezés egyik fő célja a Kőszegi-forrás Erdőrezervátum területén rágcsálófajokban detektált két humánpatogén hantavírus időbeli fertőzés dinamizmusának vizsgálata, mely az alábbi kutatási részfeladatok és kérdések alapján valósult meg:

- rágcsálófajok többéves monitorozása elevenfogó csapdázással;
- a befogott egyedekből havi egyszeri vérvétel a retroorbitális vénából;
- DOBV és PUUV ellen termelt antitestek kimutatására alkalmas ELISA tesztek elvégzése;
- DOBV és PUUV szeroprevalencia meghatározásával vizsgálni a gazdaszervezet populáció karakterisztikái és a hordozott vírusfertőzöttség mértéke közötti összefüggéseket, illetve különbségeket.

Kérdések:

- A fertőzöttség változása függ-e a gazdaszervezet egyedsűrűségétől?
- A szeroprevalencia időbeli változása mutat-e szinkronizációt a hantavírus fajok összehasonlításában?
- A fertőzés idődinamizmusában érvényesül-e a szezonális hatása?
- Van-e a nemek közt különbség a fertőzés tekintetében?
- A fertőzés befolyásolja-e az állatok téli túlélésének esélyeit?

A disszertáció másik fő célja a Magyarországon előforduló hantavírusok szövettropizmusának vizsgálata, amely az alábbi protokollt követte:

- elhullott állatok boncolása, különös tekintettel a vizelet eltávolítására;
- hantavírusok kimutatása és meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel a különböző szervekből, valamint vizeletből;
- hantavírus specifikus szerológiai teszt alkalmazása;

A feni protokoll alapján egyrészt a rágcsáló gazdaszervezetek 'élethosszig tartó vírusürítés' hipotézisét vizsgáltuk. Másrészt ez a vizsgálat arra a metodikai problémára is fókuszált, hogy a gazdaállat melyik szerve az, amelyből a leghatékonyabb a vírusok kimutatása, mely hozzájárul a boncolások, illetve a szervpreparátumok gyűjtésének optimalizációjához.

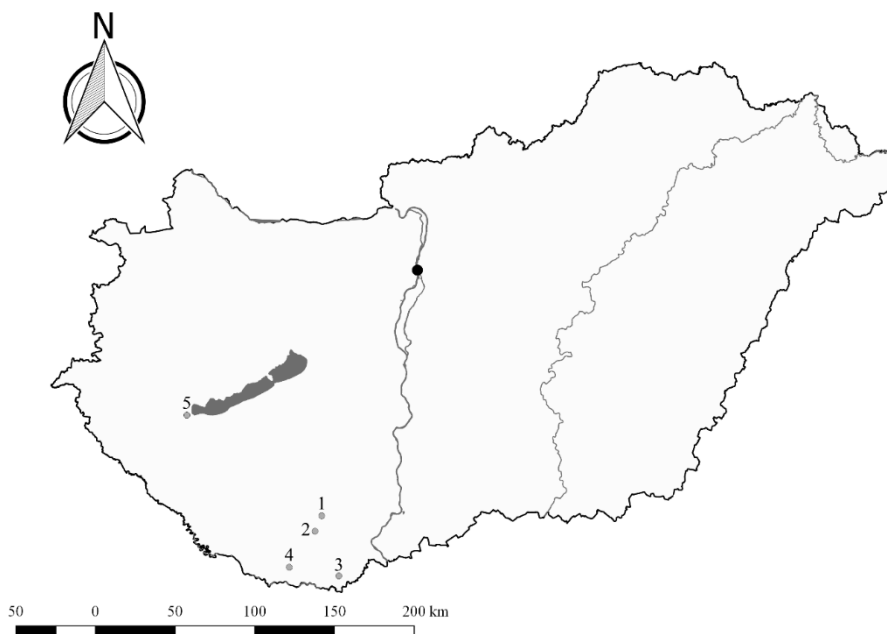
4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgált rágcsálók

Hantavírus kutatásaink során elsősorban azon rágcsálófajokat vizsgáltuk, melyek ismert hordozószervezetei a vírusnak. A kisemlősök csapdázását és felmérését a PTE TTK Biológiai Intézet Ökológiai Tanszék Kisemlős Kutatócsoportjának munkatársai végezték, mely egy biodiverzitás monitorozási programhoz kapcsolódva, az ország számos területét érintette. Az ökológusok a csapdában elhullott állatokat a PTE TTK Biológiai Intézet / PTE SZKK Virologiai laboratóriumába szállították, ahol az állatok boncolása történt. Mivel az egyes csapdázási területek domináns rágcsálófajai eltérnek egymástól, így a laboratóriumban nem csak a potenciálisan hantavírus gazdaszervezetként ismert kisemlős fajok elhullott egyedeitől álltak rendelkezésünkre minták a boncoláshoz.

4.2. Mintavételi területek

A fertőzésdinamizmus vizsgálathoz az ökológusok négy éven keresztül a Mecsek hegységben elhelyezkedő Kőszegi-forrás Erdőrezervátum területén ($46^{\circ}09'28.88''$ N, $18^{\circ}17'09.90''$ E) végeztek csapdázásokat. Ezen kívül Pécsről, Beremendről, Vajszlóról és a Kis-Balatonról származó rágcsálók mintáit dolgoztuk fel (5.ábra).



5. ábra: Mintavételi helyek (1. Kőszegi- forrás Erdőrezervátum Pécs-Árpádtető; 2. Pécs; 3. Beremend; 4. Bükkhát Erdőrezervátum Vajszló; 5. Kis-Balaton)

4.3. Csapdázási metodika

A PTE TTK Biológiai Intézet Ökológiai Tanszékének munkatársai 2011- 2014 között végeztek kisemlős monitorozó vizsgálatokat Pécs-Árpádtetőn a Kőszegi-forrás erdőrezervátumban, melybe kutatócsoportunk is bekapcsolódott. Ezen a területen a legelterjedtebb rágcsáló fajok a sárganyakú erdeieger (*Apodemus flavicollis*), a pirók erdeieger (*Apodemus agrarius*), a közönséges erdeieger (*Apodemus sylvaticus*) és a vöröshátú erdeipocok (*Myodes glareolus*). Az Erdőrezervátum 320-400 m tengerszint feletti magasságon helyezkedik el, melynek magterülete 33 ha, míg a pufferzóna 116,2 ha. Az általunk vizsgált közel 10 hektárnyi területen 13 kvadrátot jelöltünk ki, ahol minden évben márciustól októberig végeztük az állatok monitorozását (6.ábra). Az elevenfogó dobozcsapdákat egymástól 5 m-es távolságban helyeztük el, 6×6-os csapdahálót alkalmazva. Csalétekként szalonnát, ánizskivonattal és növényi olajjal megkevert gabona magvakat használtunk, így a csapdázhatóság szempontjából fontos csalizás módszere mind a nyolc hónapban megegyezett. Fogás-jelölés-visszafogás (capture-mark-recapture= CMR) módszert alkalmaztunk, így az állatok fertőzöttségét hónapról hónapra nyomon tudtuk követni. Minden hónapban 5 éjszakai periódusokban csapdáztunk, az állatok egyedi jelöléséhez az ujjpercek tetoválását alkalmaztuk. A mintavételezésnél reggelente ellenőriztük a csapdákat. A csapdázások során feljegyeztük az állatok nemét (nőstényeknél a graviditást, laktálást is feltüntetve), korát, tömegét, csapdaszámát és egyéni kódját.



6. ábra: Kvadrátok elhelyezkedése a Kőszegi forrás Erdőrezervátum területén

Az ökológusok Pécsen, Beremenden, Vajszlón és a Kis-Balatonnál is kvadrát csapdázási technikát alkalmaztak az állatok monitorozására. Egy területen egyszerre 5-13 kvadrátot jelöltek ki. A csapdázás menete teljesen megegyezett az Árpádtetőn végzett módszerekkel.

4.4. Vérvétel és a vérminták feldolgoása

A Kőszegi forrás Erdőrezervátum (Pécs-Árpádtető) területén történő csapdázás során minden befogott állattól havonta egyszer vért vettünk. Az állatok retroorbitális vénájából üvegkapillárisal 50- 200 µl vért tudunk venni. A virológiai laboratóriumba érkezésig hűtve tároltuk a csöveket. A mintákat 6000 g fordulaton 6 °C-on 10 percig (Hermle Z 233 MK-2) centrifugáltuk. A vérsavó leszívása után a mintákat -20 °C-on tároltuk.

4.5. Boncolás

Az élvefogó csapdázási módszer alkalmazása során is előfordulhat, hogy az állatok elpusztulnak a csapdában. A csapdában elpusztult állatok szerveit további kísérletekhez fel tudtuk használni, így a rágesálókön boncolást végeztünk.

A potenciális fertőzés, illetve a kontamináció veszélye miatt a boncoláskor betartottuk a szükséges előírásokat. Az állati tetemek feldolgozását BSL-2 Class A2 típusú lamináris biztonsági elszívó fülkében, valamint BSL-3 szintű laboratóriumban végeztük. Fertőtlenítéshez Incidin[®] Rapid fertőtlenítő 2,5%-os oldatát használtuk. A személyi védelem megteremtése mellett a minta védelmére is törekedtünk, így minden állatot külön, előre sterilizált eszközökkel boncoltunk. Egy eszközzel (olló, csipesz) minden esetben csak egy állatot dolgoztunk fel. A kísérleti állatokat fertőtlenített papírtörülkövel fedett bonctálon háti oldalukkal lefelé helyeztük el, majd a két mellső végtagot letűztük. A hasi oldalon az állat mellsontján caudalis irányban található kardnyúlványt fedő szöveteken bemetszést végeztünk. A bordákat cranio-lateralis irányban átvágva, a felnyitott mellkasból a szívet, tüdőt eltávolítottuk és külön-külön előre megjelölt, mikrocentrifuga csövekbe helyeztük. A hasfalat mediansagitalis síkban, caudalis irányban felnyitottuk. A hasüregből kiemeltük a májat, lépét és a veséket. Ha lehetőség volt rá, inzulinos fecskendővel a húgyhólyagban lévő vizeletet is leszívtuk, majd mikrocentrifuga csövekbe helyeztük. Az enzimaktivitás

csökkentése érdekében a csöveket a boncolás ideje alatt jégben tartottuk. A boncolás végeztével a mintákat -80 °C-on tároltuk.

4.6. Virális nukleinsav izolálása

A virális nukleinsav tisztítása Geneaid virális nukleinsav extrakciós kittel (Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II, Geneaid Biotech Ltd.) történt a gyártó által megadott felhasználási utasítás alapján:

A szövetekből egy kisebb darabot (~50 mg) mikrocentrifuga csőbe tettünk, majd 500 µl 1×PBS hozzáadásával szuszpenziót készítettünk homogenizátor (Minilys, Bertin Technologies) és üvegyöngy (d=2,5-2,8 mm) felhasználásával. A mintákat vortexeltük és 10 percig centrifugáltuk (4°C, 10 000 g) (Hermle Z 233 MK-2).

A tüdőszuszpenzió felülúszójából 200 µl-t mikrocentrifuga csövekbe mértünk és 400 µl VB lízis puffert adtunk hozzá, majd a csöveket vortexeltük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után 450 µl AD puffert adtunk a lizátumhoz és rövid vortexelést követően az oszlopra mértünk 600 µl-t, melyet 1 percig centrifugáltunk (20°C, 15000 g), majd ezt a lépést megismételtük a maradék lizátummal. Ezt követően az oszlopra 400 µl W1 puffert mértünk és 30 másodpercig centrifugáltuk (20°C, 15000 g). A gyűjtőcső kiürítése után a membránt 600 µl Wash puffer hozzáadásával mostuk és 30 másodpercig centrifugáltuk (20°C, 15000 g), majd egy további 3 perces centrifugálási lépéssel (20°C, 15000 g) kiszárítottuk a membránt. Az oszlopot mikrocentrifuga csőbe helyeztük és 30 µl nukleázmentes vizet mértünk a membránra, 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 1 percig centrifugálással (20°C, 15000 g) eluáltuk a nukleinsavat, amit és felhasználásig -80 °C- on tároltuk.

4.7. Polimeráz lánreakció

A mintákban jelen lévő vírus kimutatására nested rendszerű, RT-PCR-t (nRT-PCR) végeztünk. A PCR reakcióhoz, a hantavírusok L szegmensére specifikus degenerált primerpárokat használtunk, melyekkel 380 bp tudunk amplifikálni [HAN-L-F1: 5'-ATGTAYGTBAGTGCWGATGC- 3' HAN-L-R1 5'- AACCADTCWGTYCCRTCATC- 3'

HAN-L-F2 5'- TGCWGATGCHACIAARTGGTC- 3' HAN-L-R2 5'- GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA- 3'] (Klempa és mtsai., 2006).

A nested rendszer első körében QIAGEN OneStep RT- PCR Kit- et (Qiagen) használtunk, míg a második körben GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Kit- tel (Promega) tudtuk amplifikálni a várt terméket. A reakciókat 25 µl végtérfogatban végeztük az alábbi összetétellel (2. táblázat).

2. táblázat: Az nRT-PCR során felhasznált kitek, valamint a reagenseiből egy mintára felhasznált mennyiségek

OneStep RT- PCR Kit (Qiagen)		GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Kit (Promega)	
Buffer 5×	5 µl	Buffer 5×	5 µl
H ₂ O	13 µl	H ₂ O	13,25 µl
dNTP	1 µl	dNTP	1 µl
Primer Fw	0,5 µl	MgCl ₂	2,5 µl
Primer Rev	0,5 µl	Primer Fw	0,5 µl
Enzim	1 µl	Primer Rev	0,5 µl
Templát	4 µl	Enzim	0,25 µl
		Templát	2 µl
Összesen	25 µl	Összesen	25 µl

A PCR reakciókat ABI 2720 (Applied Biosystems) típusú készülékkel végeztük. Az első kör programja reverz-transzkripció lépéssel indult, mely 50 °C- on 30 percig tartott, majd a kezdő enzim aktiváció 95 °C-on 15 percig. A 40 ciklusból álló polimeráz lánreakció során a denaturálási lépés 94 °C-on 1 percig, a primerek kapcsolódása 53 °C-on 30 másodpercig, míg az elongáció 72 °C-on 1 percig zajlott. A második körben az elődenaturáció 95 °C-on 5 percig tartott, melyet a 40 ciklusból álló reakció követett. Ennek során a denaturáció 94 °C- on 1 percig, az annealáció 52 °C-on 45 másodpercig, az elongáció 72 °C-on 1 percig tartott. Mindkét körben a végső elongálási lépés 72 °C-on 10 perc alatt játszódott le.

4.8. Agaróz gél elektroforézis, fotódokumentáció

Az amplikonok elektroforézis vizsgálata 2%-os agaróz (Lonza) gélben, TBE (Tris-Borát-EDTA pH 8,0) puffer felhasználásával, GRgreen (Lab Supply Mall) festéssel történt. A PCR termékek futtatását 100 V konstans feszültségen 60- 90 percig végeztük. A gélek fotózásához *Cleaver microDOC* fotódokumentációs rendszert (Cleaver Scientific Ltd.) használtunk.

4.9. Szekvenálási reakció

A szekvenáláshoz használandó PCR termékeket Geneaid Gel/PCR Fragments Kittel (Geneaid) tisztítottuk ki az agaróz gélből, a gyártó utasításai alapján. A szekvenálási reakciót BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems) végeztük. A reakcióhoz összemért keverék (10 µl) a következő reagenseket tartalmazta: 2 µl BigDye™ Terminator v1.1, 1 µl 10 mmol primer, 6 µl nukleázmentes víz (Promega) és 1 µl előzőleg megtisztított nukleinsav templát (20 ng/µl). A pontosabb eredmények elérése érdekében a génspecifikus termékek mindkét szálát szekvenáltuk. A szekvenálási PCR első lépése a kezdő denaturáció 96 °C-on 1 perc alatt játszódott le, ezt 25 ciklusból álló amplifikációs ciklus követte, melyben a denaturáció 96 °C-on 20 másodperc alatt, a primerek kapcsolódása 50 °C-on 5 másodperc alatt ment végbe, majd az elongáció 60 °C- on 4 perc alatt játszódott le. A reakciót követően standard, nátrium-acetátos kicsapást végeztünk. A nukleinsav visszaoldása 20 µl Hi-Di™ Formamide-ban (Applied Biosystems) történt. A szekvenálást automata ABI Prism 310 (Applied Biosystems) DNS szekvenáló készülékkel végeztük.

4.10. Szerológiai vizsgálatok

A rágszáló vérmintákban jelen lévő DOBV és PUUV ellen termelt immunglobulin G (IgG) antitestek kimutatását kutatócsoportunk által fejlesztett ELISA rendszerrel végeztük (Németh és mtsai., 2011; Oldal és mtsai., 2014). Az eredményeket Western-blottal erősítettük meg. Kísérletünkben, közel 4000 rágszáló savó mintával dolgoztunk. Ha külön tesztekben vizsgáljuk a két vírust akkor az ELISA tesztek számát megdupláztuk volna. Mivel az általunk vizsgált fajok alapján jól elkülöníthetőek a vizsgált vírus fajok, így a két fehérjét keverve alkalmaztuk, ahogy ezt tették korábban ELISA alkalmazása során Bossé valamint Grøndahl-Hansen és munkatársai (Bossé és mtsai., 1993; Grøndahl-Hansen és mtsai., 2003). A kísérlet előtt, előzőleg már ismert DOBV és PUUV IgG pozitív mintákkal leellenőriztük a rendszerünket, hogy biztosan alkalmazható- e így a technika.

4.10.1. ELISA

A vérminták vizsgálata során indirekt ELISA módszert alkalmaztunk. A teszteléshez 96 lyukú mikrotiter lemezeket használtunk (Maxisorp NUNC- Immuno Plate, Nunc), melyeket *Escherichia coli* expressziós rendszer segítségével előállított DOBV és PUUV rekombináns nukleokapszid fehérjék keverékével (50 ng/well) érzékenyítettük (100 µl), 2 órán át, 37 °C-on. A nem specifikus kötőhelyek blokkolását 5%-os tejport (Blotting- Grade Blocker, BIO- RAD) és szukrózt (Merck) tartalmazó PBS (phosphate- buffered saline) oldattal (200 µl) végeztük. A rágszáló savókat 2,5%-os tejpor tartalmú PBS-ben, 1:100 arányban hígítva vittük a lemezekre (100 µl), majd 37 °C- on 1 órán át inkubáltuk. Az inkubáció lejárta után, 5×5 percig tartó mosási lépést végeztünk 0,05 %- os Tween 20-at (Sigma) tartalmazó PBS-el (300 µl PBS-T). A HRP-vel konjugált, szekunder, anti-egér IgG antitestet (Dako) 1:1500 arányban hígítva, 2,5%-os tejport tartalmazó PBS-ben vittük a lemezre (100 µl). Egy órán át tartó, 37 °C-os inkubáció lejárta után, ismét 5×5 perces PBS-T-vel történő mosás után a lemezek előhívása 3,3'-5,5' tetrametilbenzidin szubsztrát (BD OptEIA) hozzáadásával (100 µl) történt sötétben, szobahőmérsékleten, 15 percig. A színreakciót 2M-os kénsavval állítottuk le (100 µl) és az eredményeket microplate spektrofotométerrel (Thermo Electron Corporation), 450 nm hullámhosszon mértük. A cut-off (CO) érték meghatározása Dobby és mtsai által leírtak alapján történt (Dobby *et al.* 2012a).

4.10.2. Western-blot

A szerológiai módszerek közül az egyik legpontosabb eredményt a Western-blot technika alkalmazásával érhetjük el. Egy időben viszonylag kevés mintát lehet vizsgálni, így nagy mintaszámú vizsgálatokhoz nem alkalmas, viszont az eredmények megerősítésére, ill. a CO érték közelében lévő OD értékű minta hantavírus pozitív vagy negatív csoportba sorolására, a legjobb szerológiai módszer. Az DOBV és PUUV nuklokapszid fehérjét gélelektroforézis alkalmazásával Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) előregyártott poliakrilamid gélen választottuk el, és az elektroblottolás során nitrocellulóz membránra (0,45µm; Bio-Rad) juttattuk át Semi-Dry transzfer készülékkel (Bio-Rad) 0,12 A áramerősséggel, 30 percen keresztül. A blottolás sikerességét Ponceau S (Sigma-Aldrich) festéssel ellenőriztük. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására TBS- ben (Tris-Buffered Saline; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) oldott tejport (Blotting- Grade Blocker, Bio-Rad) használtunk 5%-os hígításban egy órán át. A rágsáló vérsavókat 1:100 hígításban 0,1% BSA- t (Sigma-Aldrich) és 0,05% Tween® 20- at (Sigma-Aldrich) tartalmazó TBS- ben (pH 7,5) hígítottuk, melyeket elsődleges antitestként használtunk. A 30 perces inkubációs idő lejárta után a membránokat 0,05% TBS–Tween® 20- al (TBS–T) mostuk 3×10 percig. Másodlagos antitestként tormaperoxidázzal (HRP) konjugált, nyúlban termeltetett anti-egér IgG-t (Dako) használtunk. Az antitestet 0,05% BSA-t tartalmazó TBS- T-ben hígítottuk (1:800). A 30 perces inkubációs idő lejárta után ismét 3×10 percig mostuk a membránokat TBS-T-ben, majd egy újabb 10 perces mosás következett, melyet TBS-el végeztünk. A reakciót TBS-ben oldott 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Bio-Rad) és hidrogén-peroxid (Sigma-Aldrich) reakcióval tettük láthatóvá a gyártó (Bio-Rad) utasításai alapján.

4.11. Statisztikai vizsgálatok

A tesztelt és fertőzött állatok genusonkénti (*Apodemus*, *Myodes*) egyedszáma közti különbségek, összefüggések, évi, valamint szezonális elemzését STATISTICA 12 szoftverrel végeztük Pearson- féle Khi négyzet-, Wald Wolfowitz- és Kruskall- Wallis tesztek alkalmazásával. A szeroprevalencia értékek ábrázolásához boxplot diagrammot alkalmaztunk. A szignifikancia értékét $P \leq 0,05$ határoztuk meg minden elvégzett teszt esetében (Sokal és Rohlf, 2012).

A tesztelt és fertőzött állatok egyedszáma, valamint a kumulatív adatokból nyert szeroprevalencia értékek közötti különbség értékeléséhez Pearson- féle Khi négyzet tesztet alkalmaztunk (Kjær és mtsai., 2020). Egy komplexebb sorozateszt, a Wald-Wolfowitz teszt alkalmazásával erősítettük meg az egyedszám, valamint a szeroprevalencia közötti összefüggéseket a két vizsgált genus esetében. A tesztelt állatok havi adatai alapján lineáris regressziós modellt alkalmazva vizsgáltuk a fertőzött állatok és a hantavírus prevalencia időbeli változását mindkét rágszálócsoport esetében. Ezzel a módszerrel elemeztük a hím és nőstény egyedek szeroprevalencia értékeinek időbeli változását mindkét állatcsoport esetében. A számított hantavírus szerokonverziós értékek átlagos megoszlását boxplot diagrammon ábráztuk +/- standard hiba és a 95%-os konfidencia intervallum megadásával. Az adatok normalitásának hiánya miatt (Shapiro-Wilk teszt) a Kruskal-Wallis teszt felhasználásával vizsgáltuk a szerokonverzió szezonális és éves különbségeit.

4.12. Anyai antitest (AAT) jelenlétének meghatározása

Szerológiai vizsgálat során az eredmények értékelésénél meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy nem anyai antitesteket detektáltunk a fiatal állatokban. Ehhez felállítottunk egy feltételrendszert, melyeknek ha megfelelt az állat, akkor anyai antitest általi szeropozitivitásnak nyilvánítottuk (Kallio és mtsai., 2010).

- Tömeg 16 gramm alatti, csak 1 csapdázási adat áll rendelkezésre (állat korára utaló jelzés bár nincs, de valószínűsíthető, hogy fiatal állatról van szó)
- 16-25 gramm közötti tömeg, az első befogásnál pozitív az állat, majd a következő befogások során már szeronegatív, az állat korára utaló jelzés nincs
- 25 gramm alatti tömeg, az állat kora fiatal és az első befogásnál pozitív az állat, majd a következőktől szeronegatív
- Az egymást követő befogások során, az OD érték csökkenő tendenciát mutat

5. EREDMÉNYEK

5.1. Előzetes kísérletek

5.1.1. Csapdázás és vírus detektálás

A PTE TTK Biológiai Intézet Ökológiai Tanszékének munkatársai megközelítőleg 20 éve kezdték kisméltők monitorozását a Kőszegi-forrás Erdőrezervátum (Pécs, Árpádtető) területén. A csapdázások során élvefogó csapdákat alkalmaztak, de a megfelelő odafigyelés ellenére is előfordult, hogy elpusztultak állatok a csapdában. Ezeket a rágcsálókat kezdte vizsgálni 2008-ban kutatócsoportunk. Megfelelően optimalizált, nested rendszerű PCR technika alkalmazásával az eredmények azt mutatták, hogy az Erdőrezervátum területén mind a DOBV, mind a PUUV hantavírusok is jelen vannak.

5.1.2. ELISA rendszer fejlesztése

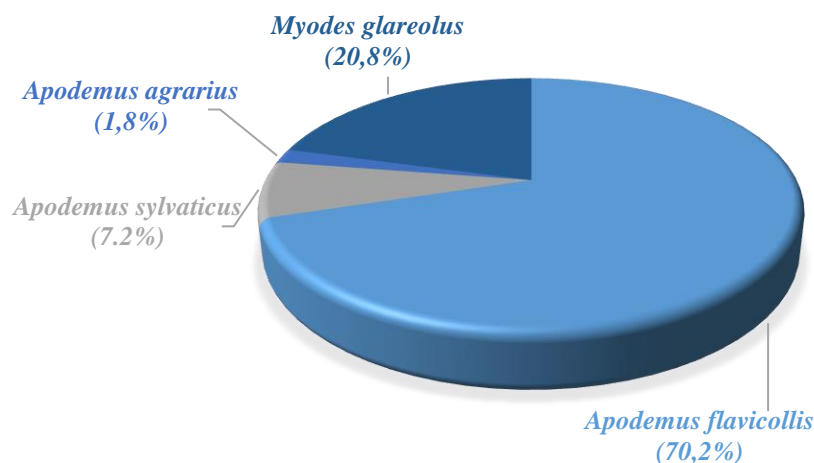
Kutatócsoportunk, korábbi években *Escherichia coli* expressziós rendszer segítségével DOBV és PUUV rekombináns nukleokapszid fehérjéket állított elő, melyek használatával ún. „házi készítésű” ELISA rendszert tudunk létrehozni (Németh és mtsai., 2011; Oldal és mtsai., 2014). Vizsgálatainkban ezt a jól optimalizált ELISA rendszert használtuk fel. A fehérjéket keverve, tehát a lemez érzékenyítése során a DOBV és PUUV fehérjéket együtt használtuk. A rendszer arra nem ad teljes bizonyossággal lehetőséget, hogy eldöntsük, hogy a vérsavóban a DOBV vagy a PUUV ellen termelt antitesteket mutattuk ki, mert a szétválasztás után (csak a DOBV és csak a PUUV fehérjék ellen vizsgáljuk a vérsavókat), az esetek 20%-ban keresztreakciót figyeltünk meg (OD értékük közel azonos volt).

Az előzőek miatt a rágcsáló fajok szerint különítettük el a két hantavírus fajt. Irodalmi adatokra támaszkodva a DOBV-t Európában az *Apodemus* fajok hordozzák, míg a PUUV gazdaszervezete a *Myodes glareolus* (Chandy és Mathai, 2017).

5.2. Rágcsálók szerológiai vizsgálata

5.2.1. Vizsgált fajok

Előzetes hantavírus kutatási eredményeinkre támaszkodva, 2011 márciusától 2014 őszéig vérvétellel kiegészítve folytatták az ökológusok a rágcsálók monitorozását. A négy évet átölelő csapdázási időszak alatt összesen 140 napot töltöttünk csapdázással. A vírusfertőzöttség szempontjából vizsgált négy faj 2491 egyedétől 3598 vérmintát vizsgáltunk. Vizsgálatunk egyedeinek faji megoszlása a következőképpen alakult: 1749 (70,2%) *Apodemus flavicollis*, 517 (20,8%) *Myodes glareolus*, 180 (7,2%) *Apodemus sylvaticus* és 45 (1,8%) *Apodemus agrarius* (7. ábra).



7. ábra: Vizsgált fajok eloszlása kördiagrammon ábrázolva

A nemek eloszlása mind a négy faj esetében közel egyenlő volt. A DOBV-t terjesztő *Apodemus* fajok egyedszámbeli eltérése az előzetes vizsgálatokkal megegyezően, szignifikáns különbséget mutatott ($\chi^2=1276,185$; $df=1$; $P<0.001$). Mivel mindhárom faj a *Dobrava* vírus gazdaszervezete, ezért genus szinten csoportosítottuk őket, így a további elemzéseket a DOBV-t hordozó *Apodemus* fajok és a PUUV- t terjesztő *Myodes glareolus* között végeztük el (3. táblázat).

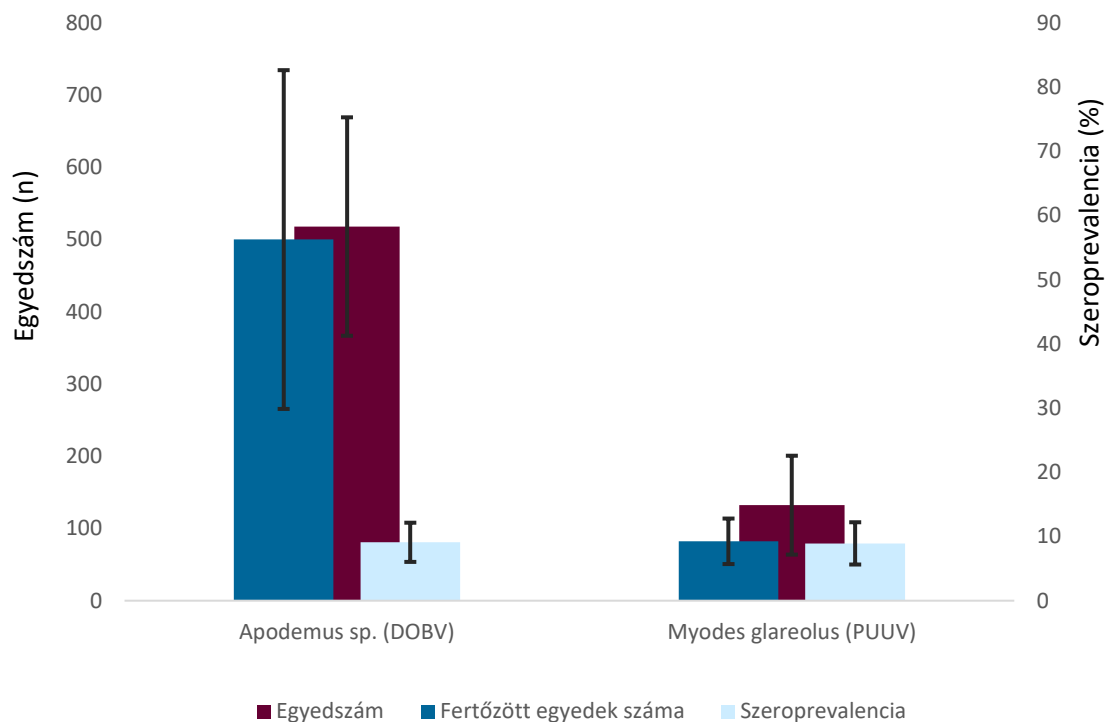
3. táblázat: Vizsgált fajok egyedszámainak megoszlása nemenként és genusonként

Fajok	Egyedszám	Nemek		Genusonkénti egyedszám
		Hím	Nőstény	
<i>Apodemus agrarius</i>	45	25	20	
<i>Apodemus flavicollis</i>	1749	840	909	1974
<i>Apodemus sylvaticus</i>	180	97	83	
<i>Myodes glareolus</i>	517	240	277	517
Összesen	2491	1202	1289	2491

5.2.2. Teljes monitorozási időszak statisztikai elemzése

A négy év alatt vizsgált egyedek közül az *Apodemusok* szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen, mint a *Myodesek* ($\chi^2=852.207$; $df=1$; $P<0.001$). Az összes vizsgált egyed (2491 db) közül 254 (10,2%) mutatott szeropozitivitást hantavírusra. További 31 (1,2%) állat bár szeropozitivitást mutatott, de ezek egyértelműen anyai antitestekkel rendelkező egyedek voltak, így a további elemzésekből ezeket az állatokat kihagytuk. Szignifikáns különbséget ($\chi^2=127,559$; $df=1$; $P<0,001$) tudunk kimutatni a szeropozitív egerek (217; 11%) és pockok (37; 15%) egyedszáma között, viszont a négy évre összesített átlagos hantavírus szeroprevalencia közel azonos volt ($\chi^2=0,001$; $df=1$; $P=0,968$) (8. ábra).

A havi adatok Wald-Wolfowitz teszttel végzett elemzése megerősítette ezeket az eredményeket, mivel a vizsgált minták összlétszámának ($Z=2,12$, $P<0,05$) és a fertőzött állatok számának ($Z=3,18$, $P<0,01$) eloszlása szignifikánsan különbözött a két vizsgált állatcsoportban. Ezzel szemben nem volt szignifikáns különbség a szeroprevalencia értékek megoszlásában az *Apodemusok* és a *Myodesek* között ($Z=1,59$, $P=0,112$).

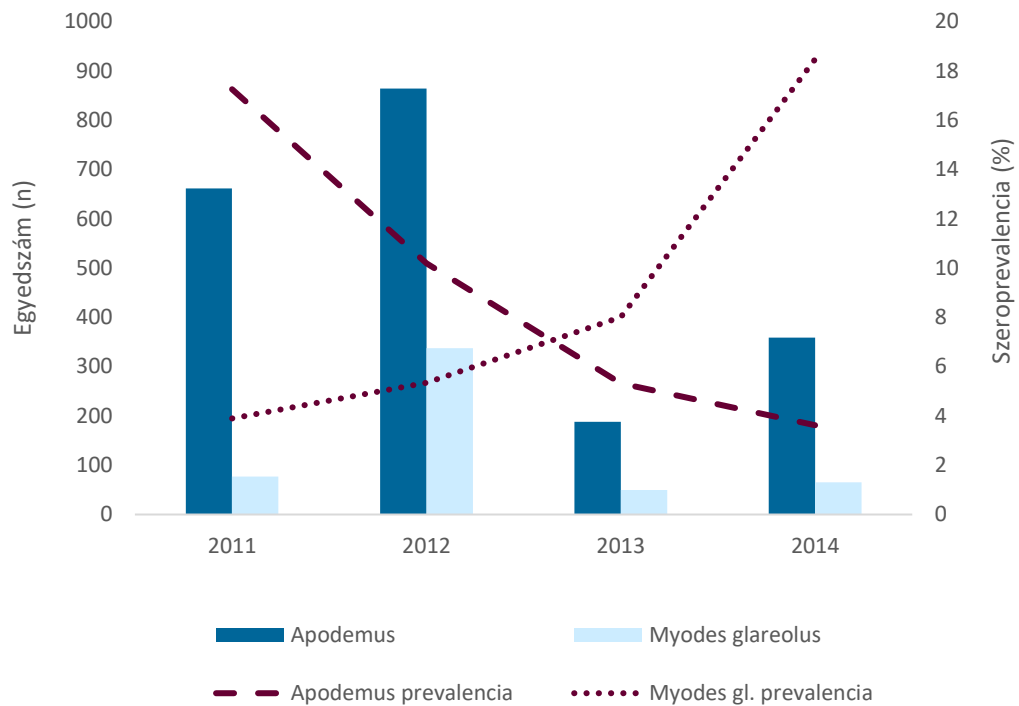


8. ábra: A 4 év alatt vizsgált állatok egyedszáma, fertőzött egyedek száma és szeroprevalencia értékek oszlopdiagrammos ábrázolása a két vírus hordozószervezeteinek függvényében

5.2.3. Évenkénti statisztikai elemzés

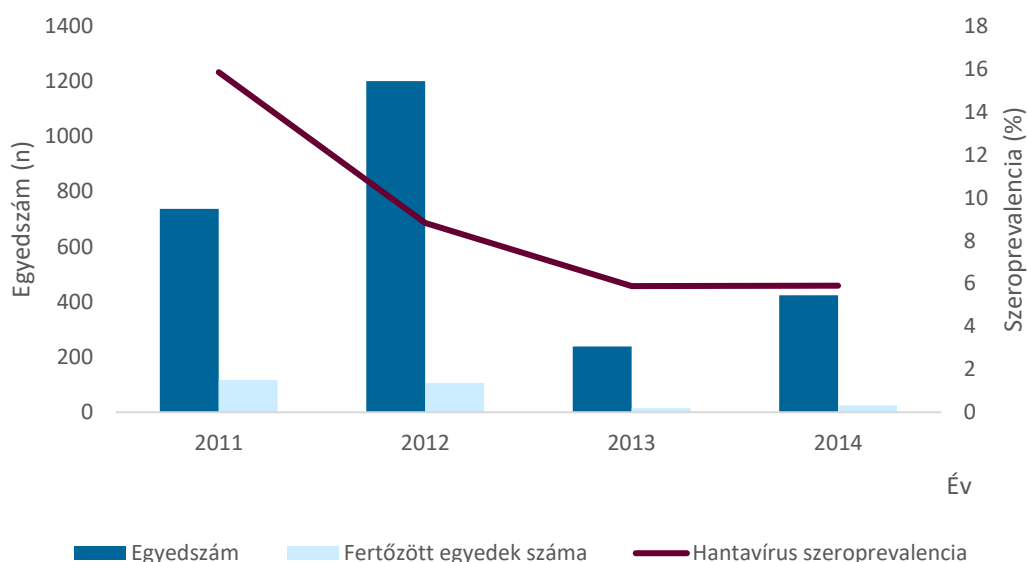
A különböző években gyűjtött állatok száma között nagy eltérést figyelhettünk meg. Ez visszavezethető a rágcsálók populációdinamizmusára. Az első két évben átlagosan 1000 állatot tudtunk vizsgálni, míg a harmadik évben a populációk abundanciájának csökkenése során mindkét genus esetében az egyedszám az előző évek harmadára csökkent, majd a negyedik évben már szignifikáns növekedést ($\chi^2=43,811$; $df=1$; $P<0,001$) tapasztaltunk. A monitorozás első évében, az *Apodemus* egerek 17,25%-a (114/661) szeropozitivitást mutatott, míg a *Myodes glareolus* esetében a szeroprevalencia csak 3,9% (3/77) volt. 2012-ben szignifikánsan magasabb ($\chi^2=110,556$; $df=1$; $P<0,001$) volt a vizsgált egyedek száma, viszont a DOBV szeroprevalencia 10,2%-ra (88/864) csökkent, míg a PUUV esetében enyhe növekedést figyelhettünk meg (5,3% 18/337). A populációk összeomlása érdekes változást hozott, mivel 2013-ban a DOBV-t hordozó *Apodemusok* fertőzöttsége lecsökkent 5,3%-ra,

míg ez az érték tovább nőtt a Myodeseknél (8%). A 2014. évi *Apodemus* populáció növekedés ellenére a DOBV szeropozitivitása tovább csökkent (3,6%), ezzel ellentétben bár a *Myodes* populáció abundanciájában nem volt szignifikáns növekedés észlelhető, a PUUV fertőzöttség az előző évhez képest megduplázódott (18,5 %). (9. ábra)



9. ábra: A vizsgált rágcsálócsoportok egyedszáma (n), és hantavírus szeroprevalencia (%) értékeinek évi változása a négy év során

Az adatok éves elemzése alapján a terület hantavírus fertőzöttsége bár csökkent, de nem esett 5% alá, melynek oka az lehet, hogy a két vizsgált rágcsáló csoport szeroprevalenciája ellentétesen alakult a négy év során, így a területen bár csökkent a fertőzöttség, de nem szűnt meg (10. ábra).



10.ábra: Összes vizsgált rágcsáló egyedszáma (n), fertőzött egyedek száma (n) és hantavírus szeroprevalencia értékei a négyéves vizsgált időszak alatt

5.2.4. Szezonális fertőzést befolyásoló hatásai

Az *Apodemus* hantavírus fertőzöttségében szezonális különbségek a vizsgált éven belül nem voltak kimutathatóak. A 2014 őszen kapott magas szeroprevalencia értéket figyelmen kívül hagytuk, mivel az alacsony egyedszám torzíthatja az eredményeket. A *Myodes glareolus* esetében is az első három évben hasonló eredményt kaptunk, mint az egerek esetében, ezzel szemben a 2014-es év a szezonális különbséget tekintve eltérést mutatott. Tavasszal szignifikánsan magasabb, 16,9% volt a szeroprevalencia, míg nyáron és ősszel 0% ($\chi^2=25,35$; $df=1$; $P<0.001$). Igaz, az utóbbi két évszakban nagyon alacsony volt az egyedszám, mégis, mivel 2 évszakot érint ez az alacsony szám, így nem hagytuk ki az elemzéseinkből (4. táblázat).

Ha a különböző évi, de azonos évszakok fertőzöttségét hasonlítjuk össze, az *Apodemusok* esetében megfigyelhető a csökkenő tendencia. A nyári évszakot vizsgálva megfigyelhetjük, hogy az első két évben bár számottevő a különbség, de nem szignifikáns, viszont, ha az első évet hasonlítjuk a harmadikhoz, akkor már szignifikáns csökkenést tapasztalunk a fertőzöttségben ($\chi^2=7,67$; $df=1$; $P<0,01$), mely a 2014-es év nyarán is megmarad. Ugyanez a csökkenés az őszi időszak szeroprevalencia adataiban is megjelenik, míg 2011-ben 23%-os volt, addig 2012-2013-ban 5-9% volt a szeroprevalencia, mely szignifikáns csökkenést jelent ($\chi^2=5,98$; $df=1$; $P<0,05$). Az egerek száma nagyon alacsony volt 2014 őszén, így statisztikai elemzésre nem volt alkalmas.

A *Myodes glareolus* fertőzöttségének évenkénti szezonális összehasonlítása során megfigyelhetjük, hogy a fertőzött pockok száma 2014 tavaszán nagymértékben megemelkedett ($\chi^2=10,49$; $df=1$; $P<0,01$). A nyári évszak esetében három évig fokozatos növekedést mutatnak a prevalencia értékek. 2014 nyarán és őszén nagyon kevés egyedet tudtunk csapdázni, így ezeket az adatokat a statisztikai elemzésből kihagytuk.

4. táblázat: Szezonális eredményeket összefoglaló táblázat. *A vizsgált rágcsálók száma a visszafogások miatt, nem egyezik meg az éves egyedszámmal (ugyanazt az állatot a különböző évszakokban többször befoghattuk).

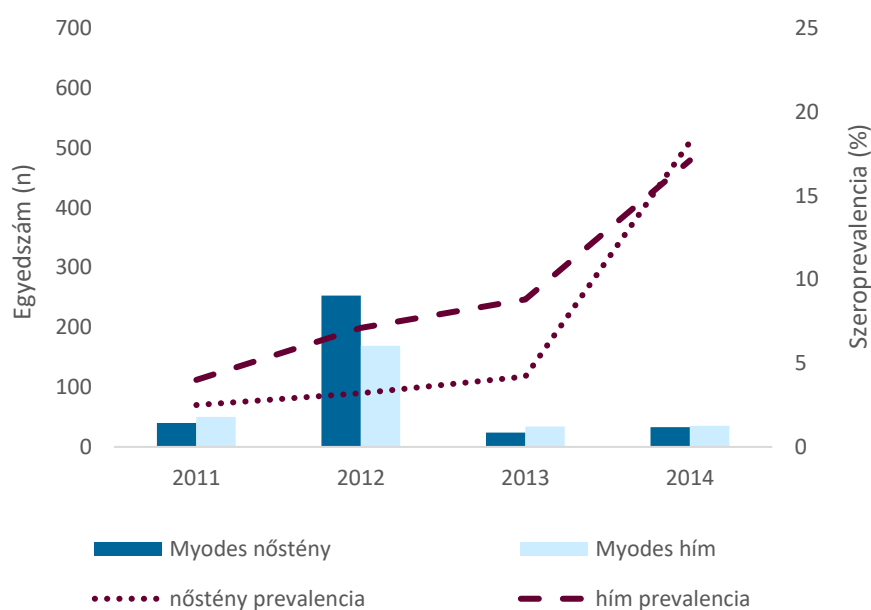
Év/Évszak	<i>Apodemus spp.</i>			<i>Myodes glareolus</i>			Összesen	
	Egyedszám*	Fertőzött egyedek*	Szeroprevalencia (%)	Egyedszám*	Fertőzött egyedek*	Szeroprevalencia (%)	Fertőzött/Tesztelt egyedek száma*	Szeroprevalencia (%)
2011 Tavaszi	395	54	13.7	28	1	3.6	55/423	13
2011 Nyári	417	66	15.8	49	0	0	66/466	14.2
2011 Őszi	13	3	23.1	4	0	0	3/17	17.6
Részösszesítés	825	123	14.9	81	1	1.2	124/906	13.7
2012 Tavaszi	301	33	10.9	51	3	5.8	36/352	10.2
2012 Nyári	467	36	7.7	172	8	4.7	44/639	6.9
2012 Őszi	228	21	9.2	153	4	2.6	25/381	6.6
Részösszesítés	996	90	9	376	15	4	105/1372	7.7
2013 Tavaszi	47	3	6.4	38	1	2.6	4/85	4.7
2013 Nyári	109	4	3.6	14	1	7.1	5/123	4.1
2013 Őszi	53	3	5.6	3	0	0	3/56	5.4
Részösszesítés	209	10	4.7	55	2	3.6	12/264	4.5
2014 Tavaszi	305	7	2.3	59	10	16.9	17/364	4.7
2014 Nyári	62	3	4.8	5	0	0	3/67	4.5
2014 Őszi	6	2	33.3	1	0	0	2/7	28.6
Részösszesítés	373	12	3.2	65	10	15.3	22/438	5.0
Összesen	2403	235	9.8	577	28	4.9	263/2980	8.8

5.2.5. Hantavírus fertőzöttség nemi megoszlása

A havi adatokból származtatott eredmények azt mutatják, hogy a 2012-es évben csapdázott állatok nemi megoszlása a *Myodes glareolus* esetében szignifikánsan különbözött, ezáltal az összesített egyedszámban (mely magába foglalja a 2012-ben befogott összes állatot) is, szignifikáns különbség volt a hím és nőstény állatok esetében. A visszafogások miatt nem egyezik az eredmény a négyéves összesített nemi megoszlással, mely alapján nem volt szignifikáns eltérés egyik csoport esetében sem.

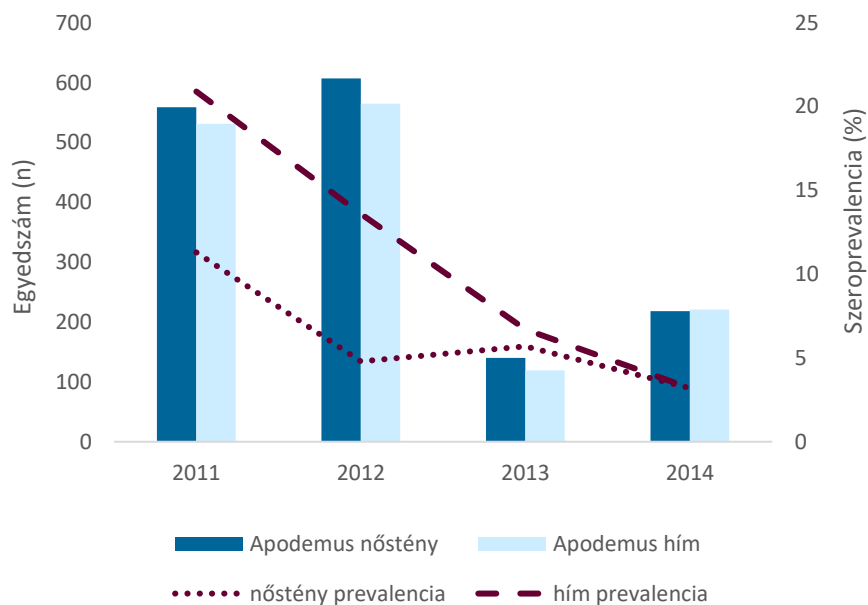
Az *Apodemus* esetében egyik évben sem mutat a nemek egyedszámbeli eltérése szignifikáns különbséget.

A négyéves vizsgálat alapján megállapíthatjuk, hogy a 2011-ben csapdázott *Myodesek* fertőzöttségének mértékében minimális különbség volt, majd a hímek fertőzöttsége emelkedést mutatott 2012-ben annak ellenére, hogy a csapdázott állatok többsége nőstény volt. 2013-ban a szeroprevalencia eredmények az előző évhez képest minimális különbséget mutattak, majd 2014-ben erős fertőzöttségbeli emelkedés során ez a különbség kiegyenlítődt. (11. ábra)



11. ábra: Vizsgált *Myodes glareolusok* egyedszámának (n) és hantavírus szeroprevalenciájának változása négy év alatt nemek szerinti csoportosításban

Az *Apodemus*-ok esetében a *Myodes*-el ellentétes folyamat játszódott le. Az első évben a hímek fertőzöttsége közel kétszer akkora volt, mint a nőstényeké, amely bár csökkenő tendenciát mutatva, de a két nem közti különbséget a következő évben is tartotta. Majd 2013-ban a populációk összeomlása során az egerek fertőzöttsége tovább csökkent, és végül a negyedik évre kiegyenlítődt. (12. ábra)



12. ábra: Vizsgált *Apodemus*ok egyedszámának (*n*) és hantavírus szeroprevalenciájának változása négy év alatt, nemek szerinti csoportosításban

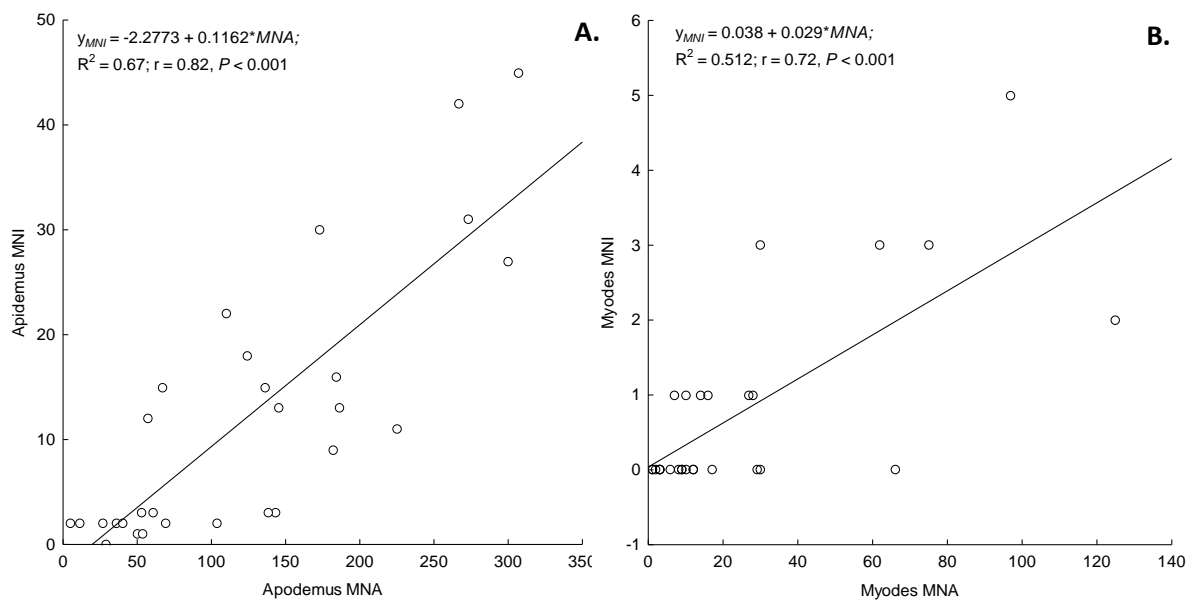
Az *Apodemus* és *Myodes* rágcsálók egyedszámát összesítve a szeroprevalencia görbék lefutása szinte teljesen megegyezik az *Apodemus*ok esetében megfigyeltekkel.

5.2.6. Lineáris regressziós modell

A CMR (fogás-jelölés-visszafogás) adatokból számított MNA (minimum ismert egyedszám) és MNI (minimum ismert fertőzöttek egyedszáma), valamint a hantavírus szeroprevalencia havi értékei alapján mindkét rágcsáló csoportnál lineáris regressziós módszerrel vizsgáltuk a populációk abundanciája (MNA), illetve a fertőzött állatok száma (MNI), valamint az MNA és szeroprevalencia közötti összefüggéseket.

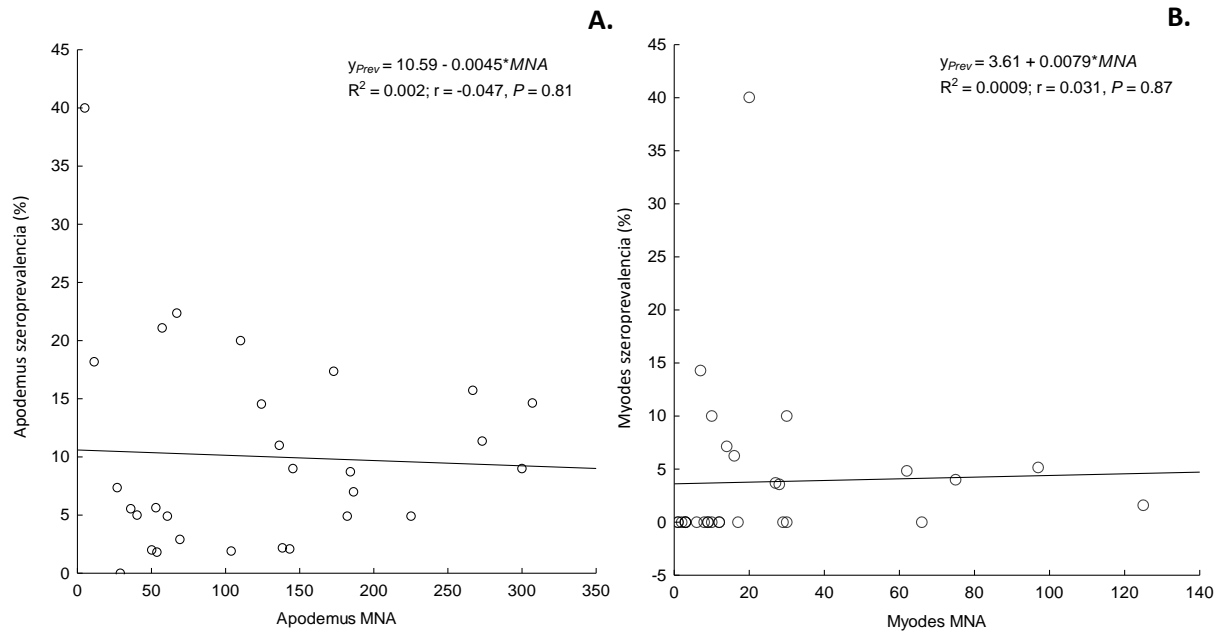
A tesztelt állatok havi adatai alapján lineáris regressziós módszert alkalmazva vizsgáltuk a fertőzött állatok és a hantavírus szeroprevalencia időbeli változását mindkét rágcsálócsoport esetében.

A befogások havi adatai alapján eredményeink szignifikáns lineáris regressziót mutattak a rágcsálós szám (MNA) és a fertőzött állatok száma (MNI) között mindkét nemzetségben, bár a kapcsolat erősebb volt az *Apodemus* esetében, amit a nagyobb regressziós együttható is mutat (13. ábra/A, B).



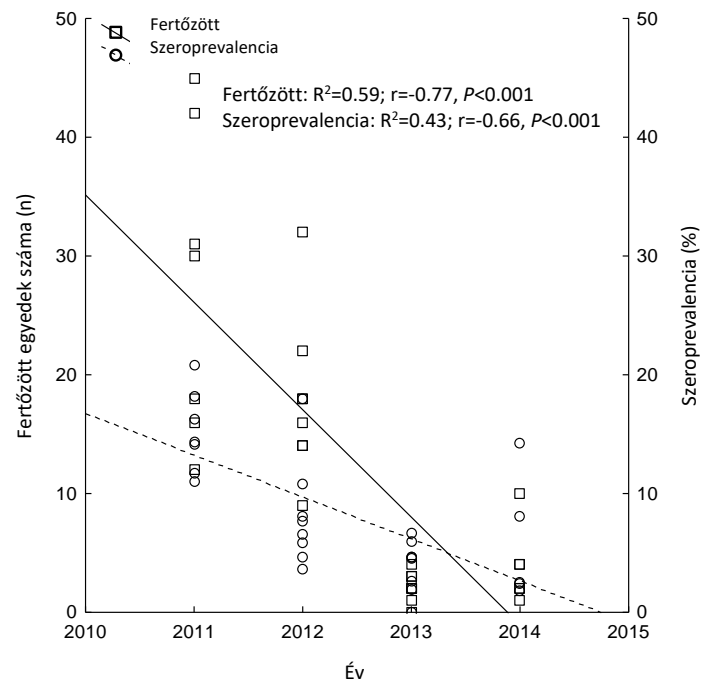
13. ábra: Az egyes rágcsálócsoportok (*Apodemus*, *Myodes*) minimum ismert fertőzött egyedei számának (MNI) viszonyítása a vizsgált rágcsálók abundanciájához (MNA)

A hantavírusok szeroprevalenciája azonban mindkét nemzetség esetében független volt a populációk abundanciájától (MNA) (14. ábra/A, B).



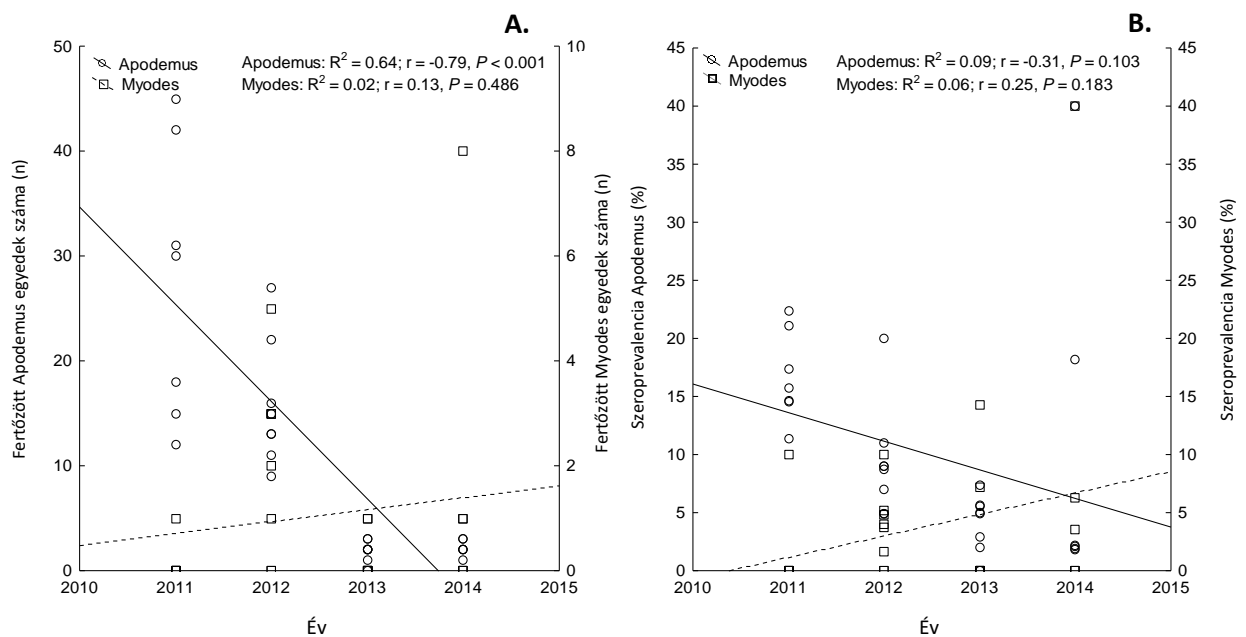
14. ábra: Az *Apodemus* (A) és a *Myodes* (B) rágcsáló csoportok által hordozott hantavírusok szeroprevalenciájának abundancia függése

A négy év alatt gyűjtött rágcsálók adatai alapján a fertőzött egyedek száma és a szeroprevalencia éves változása szignifikáns csökkenést mutat ($R^2=0,59$; $P<0,001$; $R^2=0,43$; $P<0,001$). A csökkenés mértéke kisebb volt a prevalencia esetében (fertőzött egyedek számához viszonyítva), melyet a függvények meredeksége is mutat (15. ábra).



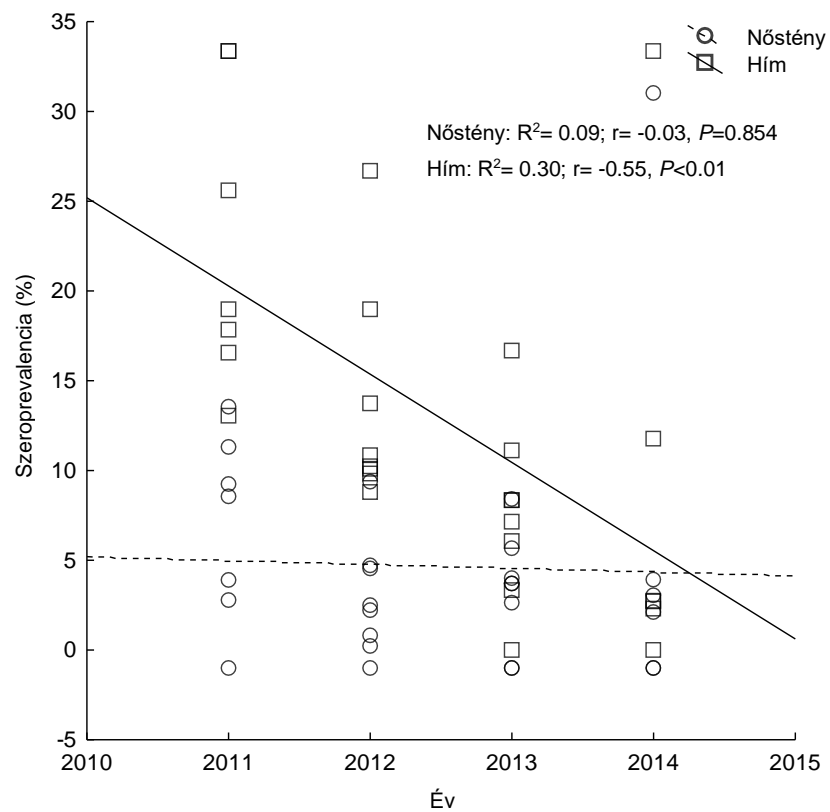
15. ábra: *Hantavírus fertőzött egyedek számának éves változása a szeroprevalencia függvényében*

A két nemzetséget külön elemezve, az MNI és a hantavírus szeroprevalencia változása különbséget mutatott az *Apodemusok* és a *Myodesek* összehasonlítása során. Az *Apodemusok* esetében a fertőzött egyedek száma szignifikáns, lineárisan csökkenő tendenciát követett, míg a fertőzött pockok száma enyhén pozitív, de nem szignifikáns tendenciát mutatott a négy év során (16/A. ábra). A két nemzetség hantavírus szeroprevalenciája is ellentétes tendenciát mutatott, mely azonban nem bizonyult szignifikánsnak sem az *Apodemusok*, sem a *Myodesek* esetében (16/B ábra).



16. ábra: A fertőzött *Apodemus* és *Myodes* rágcsálók egyedszámának (A) és szeroprevalenciájának (B) összehasonlítása az idő függvényében

Az összes vizsgált állatot figyelembe véve, jelentős különbséget tapasztaltunk a nemek között a szeroprevalencia éves változásában. A hímek esetében szignifikánsan csökkent a szeroprevalencia, míg a nőstények esetében a regressziós elemzés elhanyagolható mértékű csökkenést mutatott és a 2014-es évre kiegyenlítődőtt (17. Ábra).



17. ábra: A nőstény és hím állatok hantavírus szeroprevalenciájának éves változása

5.2.7. Szerokonverziós és szeroreverziós események

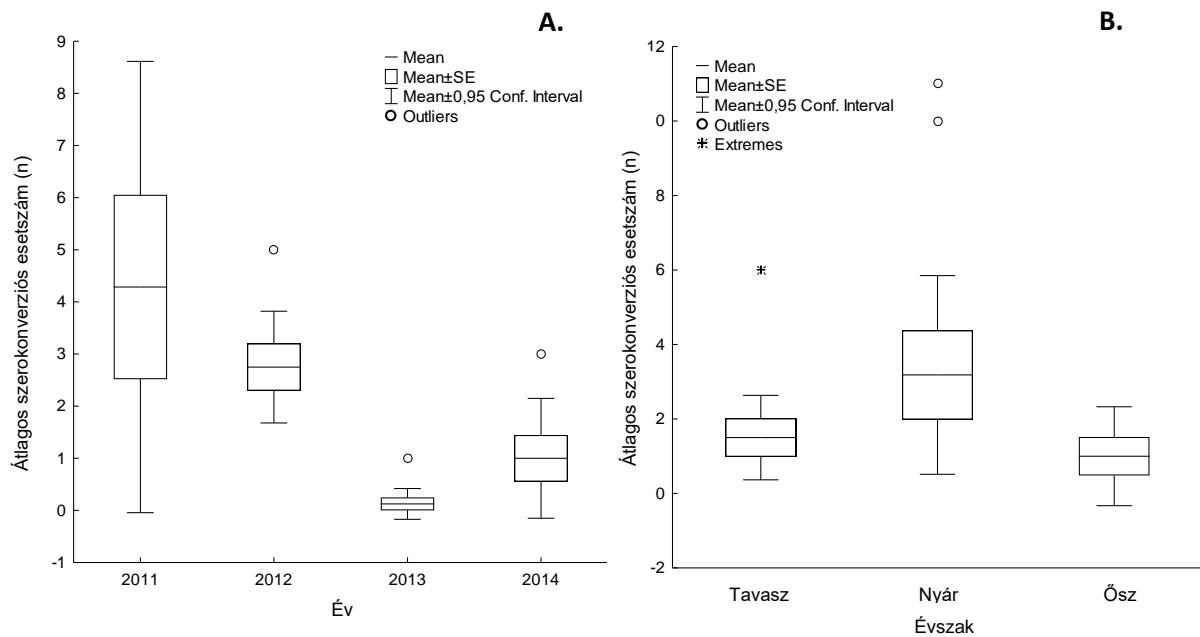
A CMR módszer alkalmazásával végzett csapdázás során, bár az állatok 2/3-át (1746/2491) csak egyszer tudtuk befogni, de 745 állat esetében lehetőségünk volt két vagy több alkalommal is vizsgálni őket, így hónapról hónapra követni tudtuk a rágcsálókban lejátszódó szerokonverziót, illetve szeroreverziót. Szerokonverzió 56 *Apodemus* és 2 *Myodes* esetében következett be. (5. táblázat)

5. táblázat: Szerokonverzió átesett egyedek száma éves és szezonális bontásban

Év	<i>Apodemus spp.</i>			<i>Myodes glareolus</i>		
	Tavaszi	Nyári	Őszi	Tavaszi	Nyári	Őszi
2011	7	22	1	0	0	0
2012	5	11	5	0	0	0
2013	0	0	0	0	1	0
2014	4	1	0	1	0	0

Az egyes évek összehasonlítása során szignifikáns különbségeket figyelhetünk meg a szerokonverziós esetszámokban (Kruskal-Wallis teszt $H(3, 29)=15,17$; $P<0,01$). 2013-ban egyetlen pocok esetében volt szerokonverzió megfigyelhető, valamint 2014-ben is csak 6 esetben, így szignifikánsan alacsonyabb számban fordult elő szerokonverzió, mint 2011-ben (Dunn's test: $z=2,81$, $P<0,05$) és 2012-ben (Dunn's test: $z=3,48$, $P<0,01$) (18/A. ábra).

A szezonális összegzés alapján megfigyelhető, hogy nyáron bár nem szignifikánsan (Kruskal-Wallis test: $H(2, 29)=1.39$; $P=0.497$), de magasabb számban következett be szerokonverzió. (18/B. ábra)



18. ábra: Az átlagos hantavírus szerokonverziós esetszámok éves (A) és szezonális (B) eloszlása

A nemi megoszlásban nem volt különbség a szerokonverzió átesettek között (25 hím vs. 33 nőstény; $\chi^2=1,1$; $df=1$; $P=0,29$).

Három *Apodemus flavicollis* esetében szeroreverziót figyelhettünk meg, melyek közül két rágcásáló szeropozitivitást mutatott már az első befogásnál is, és 13-15 hónappal később egy ismételt csapdázás során már szeronegativitást detektáltunk. Viszont a harmadik állatot szeronegativként fogtuk be először, majd egy hónappal később szeropozitivvá vált, és a 12 hónappal későbbi visszafogás során ismét szeronegativ eredményt kaptunk.

5.2.8. *Hantavírus gazdaszervezetek téli túlélése*

Az ősszel befogott állatok 9,1%-át (41/451) a következő tavasszal ismét vissza tudtuk fogni (6. táblázat). A *Myodesek* téli túlélése az *Apodemus* egerekével összehasonlítva kisebb mértékű volt, de ez lehet a *Myodesek* alacsony fogási eredményei miatt, mivel csak a 2012/2013-as évről volt elegendő adat az elemzéshez. Ebben az évben a hantavírussal fertőzött állatok egyikét sem tudtuk tavasszal ismét befogni, míg a szeronegatív egyedek 3,4%-át sikerült visszafogni 2013. tavaszán. A pockok esetében nem volt szignifikáns különbség a téli túlélésben a nemek között ($\chi^2=3,38$; $df=1$; $P=0,066$).

Az *Apodemusok* esetében 2011-ben szignifikáns különbséget figyelhettünk meg, mivel a hantavírus szeropozitív egyedek nagyobb mértékben éltek túl a telet ($\chi^2=33,3$; $df=1$; $P<0,001$), viszont az eredményeinket torzíthatja az alacsony fogási szám. A 2012-ben és 2013-ban a fertőzött és nem fertőzött egerek száma közel egyenlő volt.

A szeronegatív rágcsálók között nem volt szignifikáns különbség a hímek és a nőstények téli túlélésében ($\chi^2=1,11$; $df=1$; $P=0,29$), míg a telet túlélő szeropozitív hímek száma szignifikánsan magasabb volt, mint a nőstényeké ($\chi^2=7,1$; $df=1$; $P<0,01$).

A 2011-es és 2012-es évek telét túlélő állatok prevalencia értékei közel azonosak voltak, 5,9% (1/17) és 5,3% (20/378), míg 2013 telét követően szignifikánsan magasabb, 35,7% (20/56) ($\chi^2=21,35$, $df=1$, $P<0,001$) értéket kaptunk.

6. táblázat: Hantavírus fertőzött / nem fertőzött Apodemus és Myodes rágcsálók téli túlélése, [őszől (szeptember, október) a következő év tavaszáig (március- májusig)], nemi és évi eloszlásban (Na: Nincs adat)

		2011/2012						2012/2013						2013/2014															
Genus	Nemek	Tesztelt állatok egyedszáma / Türelt állatok egyedszáma		Türelt állatok prevalenciája (%)		Vírus pozitívítás szerinti csoportosítás		Türelt állatok prevalenciája (%)		Gemusonkénti csoportosítás		Türelt állatok prevalenciája (%)		Tesztelt állatok egyedszáma / Türelt állatok egyedszáma		Türelt állatok prevalenciája (%)		Vírus pozitívítás szerinti csoportosítás		Türelt állatok prevalenciája (%)		Gemusonkénti csoportosítás		Türelt állatok prevalenciája (%)		4 év alatti összes tesztelt állat egyedszáma / Türelt állatok egyedszáma		Türelt állatok prevalenciája (%)	
Apodemus -	♂	5/0	0	10/0	0	13/1	7.7	87/4	4.6	206/14	6.8	227/15	6.6	21/7	33.3	50/19	38	53/20	37.7	293/36	12.3								
	♀	5/0	0					119/10	8.4					29/12	41.3														
Apodemus +	♂	3/1	33.3	3/1	33.3			14/1	7.1	21/1	4.8			1/1	100	3/1	33.3												
	♀	Na	Na					7/0	0					2/0	0														
Myodes -	♂	1/0	0	4/0	0	4/0	0	65/4	6.2	147/5	3.4	151/5	3.3	1/0	0	3/0	0	3/0	0	158/5	3.2								
	♀	3/0	0					82/1	1.2					2/0	0														
Myodes +	♂	Na	Na	Na	Na			1/0	0	4/0	0			Na	Na	Na	Na												
	♀	Na	Na					3/0	0					Na	Na														

5.2.9. Anyai antitestek jelenléte

A fertőzött nőtények anyai antitesteket vihetnek át az utódaikra, melyek átmenetileg védettek lehetnek azokkal a fertőzésekkel szemben melyekkel az anyaállat előzőleg találkozott. Ez a védettség a hantavírus esetében 1-3 hónapon keresztül fennmaradhat.

A teljes 4 éves monitorozási időszakot vizsgálva 31 egyednél mutattuk ki az anyai antitest jelenlétét. A szezonális adatokból viszont kitűnik, hogy a visszafogások miatt 2 állat esetében egymást követő évszakban tudtuk kimutatni az anyai antitestet így 33 anyai antitest mintával végeztük az elemzéseket. Mind a *Myodesek*, mind az *Apodemusok* esetében is a hímekben több esetben volt kimutatható az anyai antitest jelenléte, bár Khi négyzet teszt alapján ez a különbség nem volt szignifikáns ($\chi^2=2,45$; $df=1$; n.s.). A továbbiakban a genusok között nem tettünk különbséget, együtt elemeztük. A szezonaritást vizsgálva a tavasz volt az az időszak, amikor az állatokban minden évben ki tudtuk mutatni az anyai antitestek jelenlétét. 2012-ben mindhárom általunk vizsgált évszakban befogásra kerültek olyan állatok, melyek anyai antitesteket hordoztak, viszont 2011-ben és 2013-ban, ezt csak a tavaszi és nyári évszakban tapasztaltuk. Arra vonatkozólag, hogy az anyai antitestek jelenléte befolyásolta-e a következő évben a hantavírus fertőződés mértékét nem végeztünk vizsgálatot, mert a statisztikai kiértékeléshez nem állt rendelkezésre elegendő adat (7.táblázat).

7.táblázat: Anyai antitesttel (AAT) rendelkező egyedek száma (évszak szerint, nemenként és összegezve)

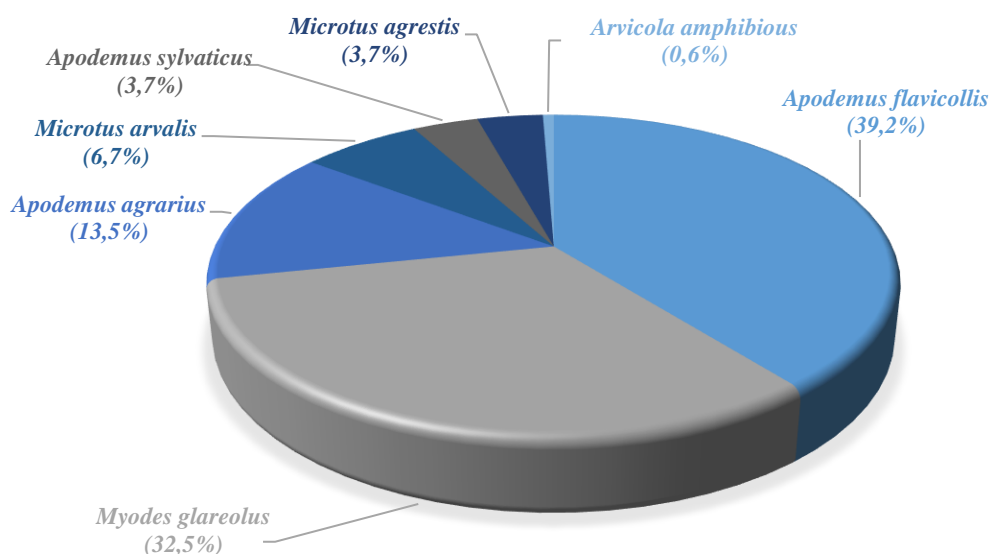
Év	Évszak	Egyedszám (AAT) nemenként		Össz. egyedszám (AAT)
		♀	♂	
2011	Tavaszi	5	8	13
	Nyári	2	2	4
	Őszi	0	0	0
2012	Tavaszi	2	1	3
	Nyári	0	3	3
	Őszi	1	2	3
2013	Tavaszi	0	2	2
	Nyári	0	2	2
	Őszi	0	0	0
2014	Tavaszi	2	1	3
	Nyári	0	0	0
	Őszi	0	0	0
Összesen		21	12	33

5.3. Hantavírusok kimutatása molekuláris biológiai és szerológiai módszerekkel rágcsáló szervekből és vizeletből

Az Ökológiai Kutatócsoport több éven át tartó és jelenleg is folyó kisemlős monitorozásai során az élvefogó csapdák alkalmazása mellett is számos esetben előfordult, hogy a csapdában elpusztultak az állatok. Ezeket az állatokat a Viroológiai Kutatócsoport tovább vizsgálta. Boncolások során eltávolítottuk az állatok tüdejét, máját, veséit, és ha lehetséges volt, a húgyhólyagban lévő vizeletet. A szervekből és a vizeletből izolált nukleinsavval, valamint a szívből/tüdőből származó vérrel végeztünk további vizsgálatokat.

5.3.1. Vizsgált fajok

Az ökológusok 2011-2015 között öt dél-dunántúli területen végeztek kisemlős monitorozást 25 183 fogásszámmal, melyet követően 665 elhullott állat került boncolásra. 163 állat húgyhólyagjában találtunk vizeletet, így a továbbiakban ezt a 163 állatot vizsgálva végeztük a kutatásunkat. A vizsgált állatok 7 különböző faj egyedei voltak: 22 (13,5%) *Apodemus agrarius*, 64 (39,2%) *Apodemus flavicollis*, 6 (3,7%) *Apodemus sylvaticus*, 53 (32,5%) *Myodes glareolus*, 6 (3,7%) *Microtus agrestis* (csalítjáró pocok), 11 (6,7%) *Microtus arvalis* (mezei pocok) és 1 (0,6%) *Arvicola amphibious* (közönséges kószapocok/vízipocok) (19.ábra).



19.ábra: Vizsgált rágcsálófajok százalékos megoszlása

5.3.2. Virális nukleinsav kimutatása és szerológiai vizsgálat eredményei

A 163 rágcsáló közül 25 (15,3%) esetben tudtuk kimutatni a hantavírus jelenlétét és/vagy a vírus ellen termelt IgG antitestet az állatban. 19 állat az *Apodemus* fajok közé tartozik, míg 4 rágcsáló a *Microtusok* közül került ki és a *Myodes glareolusok* közül 2 állat mutatott hantavírus pozitivitást.

Nested RT-PCR módszer alkalmazásával 20 állat esetében tudtuk a boncolt szervekből (tüdő, máj, vese) vagy a vizeletből kimutatni a vírus jelenlétét.

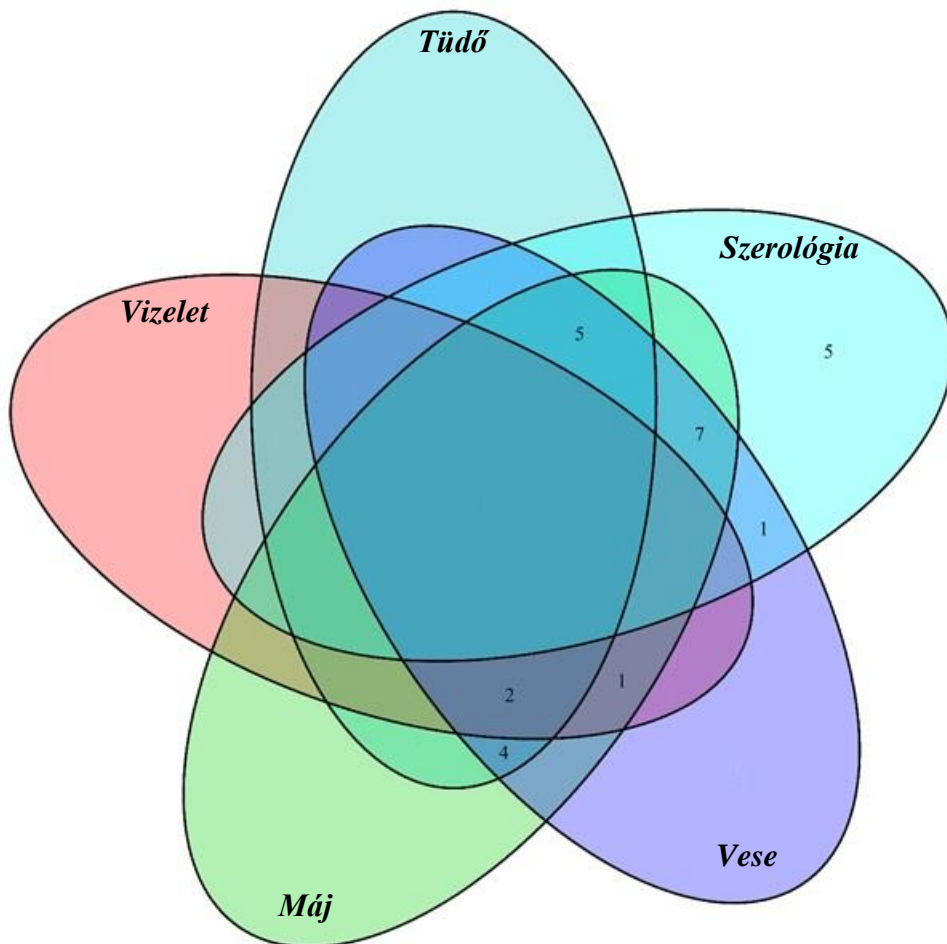
A vizsgált szervek közül az összes veséből (20/20; 100%) ki tudtuk mutatni a virális nukleinsavat, míg a tüdőből csak 11 esetben (11/20; 55%). Valószínűleg a vizeletben csak rövid ideig van jelen a vírus, mivel a húsz vizeletből csak 3 esetben tapasztaltunk hantavírus pozitivitást (3/20; 15%). (8. táblázat)

8. táblázat: Különböző rágcsálófajokból származó szervek és vizeletminták molekuláris biológiai (nRT-PCR), szekvenálási, valamint Western blot (WB) szerológiai eredményei. (Rövidítések: AAG: *Apodemus agrarius*, AFL: *Apodemus flavicollis*, MAR: *Microtus arvalis*, MAG: *Microtus agrestis*, MGL: *Myodes glareolus*, nt.: szerológiailag nem tesztelt, * csak szeropozitív rágcsálók)

PCR pozitív állatok							
Rágcsáló faj	Tüdő	Máj (nRT-PCR)	Vese	Vizelet	Szerológia (IgG) (Western-blot)	Vírus faj	
1	AAG	Poz	Poz	Poz	-	-	
2	AAG	-	Poz	Poz	Poz	-	
3	AAG	Poz	Poz	Poz	-	Poz	
4	AAG	Poz	Poz	Poz	-	Poz	
5	AAG	-	Poz	Poz	-	Poz	Dobrava-
6	AAG	-	Poz	Poz	-	Poz	Belgrade
7	AAG	-	Poz	Poz	-	Poz	
8	AAG	-	Poz	Poz	-	Poz	
9	AAG	-	-	Poz	-	Poz	
10	AFL	Poz	Poz	Poz	-	-	
11	AFL	Poz	Poz	Poz	-	Poz	
12	AFL	Poz	Poz	Poz	-	Poz	Dobrava-
13	AFL	Poz	Poz	Poz	-	Poz	Belgrade
14	AFL	-	Poz	Poz	-	Poz	
15	AFL	-	Poz	Poz	-	Poz	
16	MAG	Poz	Poz	Poz	Poz	nt.	Tula
17	MAR	Poz	Poz	Poz	-	nt.	
18	MAR	Poz	Poz	Poz	-	nt.	Tula
19	MAR	Poz	Poz	Poz	Poz	nt.	
20	MGL	-	Poz	Poz	-	Poz	Puumala
Total	11/20	19/20	20/20	3/20	13/16		
Szeropozitív állatok							
21	AFL	-	-	-	-	Poz*	
22	AFL	-	-	-	-	Poz*	Dobrava-
23	AFL	-	-	-	-	Poz*	Belgrade
24	AFL	-	-	-	-	Poz*	
25	MGL	-	-	-	-	Poz*	Puumala
Total	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5		

A szerológiai vizsgálatok során, csak a *Dobrava* és a *Puumala* vírus ellen termelt antitestek kimutatására alkalmas teszt állt rendelkezésünkre, így a *Microtus* fajokkal melyek a *Tula* vírus gazdaszervezetei, nem végeztünk szerológiai vizsgálatot, ezen okból a további szerológia elemzésben az összes egyedszám 21 db.

Western-blot technikával végzett szerológiai vizsgálat során a 21 hantavírus pozitív mintából 18 esetben detektálni tudtuk a vírus ellen termelt IgG antitestet, míg 3 állatban csak a vírus volt kimutatható. Öt állat esetében csak antitestet tudtunk kimutatni, a vírus nukleinsavat nem, így ezek az egyedek csak szeropozitívak voltak. Az anyai antitest jelenléte kizárható volt, mivel a vizsgált rágcsálók mindegyike felnőtt állat volt. 13 esetben mind a hantavírus nukleinsav, mind a vírus ellen termelt IgG antitest is jelen volt (20. ábra).



20. ábra: A rágcsálókból származó szerv- és vizeletminták PCR és szerológiai eredményei Venn- diagrammon ábrázolva

Nem találtunk egyértelmű összefüggést a tüdőben kimutatott vírus jelenléte és a szeropozitivitás között. Két esetben negatív szerológiai eredményt kaptunk annak ellenére, hogy a tüdőben kimutatható volt a vírus. Ezzel szemben 13 szeropozitív állat tüdejéből nem tudtuk kimutatni a vírust.

A máj és a vese esetében eltérő pozitívítási arányt figyeltünk meg. Három olyan szeronegatív állatot vizsgáltunk, melyek veséjében és májában is kimutatható volt a vírus. Emellett 12 állat májában és 13 veséjében a vírus jelen volt, és szeropozitív is volt az állat.

Fajra specifikus különbségeket is megfigyelhetünk: a négy *Microtus* faj eredményei alapján minden szervben egyidőben jelen van a vírus és a vizeletek 50%-ban is. A kisszámú minta miatt az eredmény azonban statisztikailag nem megerősíthető.

A fertőzés időpontját nem tudjuk megállapítani ezáltal azt sem, hogy a fertőzés melyik stádiumában voltak, mivel a csapdázás során elpusztult állatokkal dolgoztunk. További *in vivo* vizsgálatok szükségesek lehetnek, mellyel több információhoz juthatnánk az egyes hantavírus fajokra jellemző szövettropizmusról.

5.3.3. Szekvenálási eredmények

Sanger szekvenálás alkalmazásával, minden állatban meghatároztuk a fertőzést okozó hantavírus fajokat. Az *Apodemus* egerekben kivétel nélkül *Dobrava-Belgrade*-ot, a *Myodes glareolus*-ban *Puumala* vírust, míg a *Microtus* pockokban *Tula* vírust mutattunk ki, 89%, 95%, és 100%-os homológiával. (8. táblázat)

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. Fertőzés dinamizmus vizsgálat eredményeinek értékelése

Az irodalomban kevés olyan hosszú távú tanulmány található, melyek egy adott mintavételi területen a *Dobrava* és *Puumala* vírusok egyidejű jelenlétének vizsgálatát végezték szerológiai módszerekkel (Hukić és mtsai., 2003). Ezzel szemben számos észak- és nyugat-európai tanulmányban leírták az ott jelenlévő hantavírusok fertőzés dinamikáját (Dobly és mtsai., 2012b; Kallio és mtsai., 2010, 2009; Reil és mtsai., 2017; Voutilainen és mtsai., 2016; Weber de Melo és mtsai., 2015). Bár ismert tény, hogy a hantavírusok jelen vannak Közép-Európában, viszont erre a területre vonatkozó, fertőzés dinamikai tanulmányokat eddig még nem végeztek. Így egy olyan négy évig tartó fertőzés dinamikai tanulmányt terveztünk, mely alkalmas arra, hogy megfigyeljük a különböző, potenciálisan hantavírusokat hordozó rágcsálók fertőződésének változásait, valamint, hogy melyek azok a tényezők, melyek befolyásolhatják ezeket a változásokat.

Egy lengyel tanulmányban Sadkowska-Todys és mtsai. három éves tanulmány keretén belül megállapították a vizsgált területek hantavírus szeroprevalenciáját, mely során az 564 tesztelt állatból (egerek és pockok) 55 esetben tudták kimutatni a hantavírus ellen termelt antitestet (Sadkowska-Todys és mtsai., 2015). A mi vizsgálatunkhoz hasonlóan a vizsgált, lengyel területeken az uralkodó faj az *Apodemus flavicollis* volt. További adatok összehasonlítására nem alkalmas ez a tanulmány az eltérő csapdázási-periódusok és technikák alkalmazása miatt.

Két belga tanulmányban Dobly, valamint Escutenaire és mtsai. két rágcsálófaj (*Apodemus sylvaticus* és *Myodes glareolus*) egyidejű hantavírus fertőzöttségét vizsgálták három, illetve négy éven keresztül. A vizsgált területeken a vöröshátú erdeipocok volt a domináns rágcsálófaj. Mindkét tanulmányban a PUUV szeroprevalenciája bár ingadozott, de szignifikánsan magasabb pozitívást mutatott a DOBV-val szemben (Dobly és mtsai., 2012b; Escutenaire és mtsai., 2000a). Ezzel ellentétben a mi vizsgálataink során négy éven keresztül az *Apodemus* fajok voltak jelen mint domináns fajok, és bár szignifikánsan magasabb volt a fertőzött egerek száma, de a DOBV és PUUV szeroprevalenciában nem találtunk szignifikáns különbséget a 4 éves vizsgált időszak alatt. Sőt, függetlenül az abundanciától, az egerek szeroprevalenciája folyamatos csökkenést mutatott, míg a pockoké végig növekedett, ezzel elérve azt, hogy a területen a hantavírus fertőzöttség folyamatosan fennmaradt. Az eredmények alapján, ha az egyik hantavírus faj gyakorisága lecsökken a

területen, akkor a másik faj prevalenciájának növekedése figyelhető meg. Mivel az irodalomban a miénkkel ennyire hasonló kísérlet még nem áll rendelkezésre, így nem tudjuk ezt a tényt egyértelműen megerősíteni, mivel kísérletünk hiányossága a pontos genetikai karakterizálás, mely alapján biztosan el tudnánk különíteni a két hantavírus fajt. A két vírusfajt a gazdaszervezetek alapján különítettük el, mivel az ELISA eredmények erre nem adtak lehetőséget a két fehérje keresztreakciója miatt. Irodalmi adatok alapján felmerülhet a spillover jelensége, mely során nincs kizárva, hogy az adott fajban nem a gazdaszervezetre jellemző vírusfaj van jelen (Chandy és Mathai, 2017; Dobly és mtsai., 2012b; Escutenaire és mtsai., 2000a; Heyman és mtsai., 2002; Spengler és mtsai., 2013). Eddigi kísérleteink alatt, mely sok éves múltra tekint vissza, ezen a területen soha nem tapasztaltunk spillovert, így feltételezzük, hogy nem ez az oka az általunk tapasztaltaknak.

Az irodalomban számos tanulmány áll rendelkezésre, melyekben több éven keresztül egy rágcsálófaj hantavírus szerológiai vizsgálatát végezték. Finn és német kutatók PUUV fertőzést vizsgáltak pockokban az endémiás területeken. Weber de Melo és mtsai. szerint a 8 éven át tartó vizsgálataik azt mutatták, hogy a PUUV szeroprevalencia nincs összefüggésben a gazdaszervezet abundanciájával (Weber de Melo és mtsai., 2015). A finnek 6 éven át tartó vizsgálataik során ciklikus ingadozást írtak le a gazdaszervezet abundanciájában, mely ingadozást követte a fertőzési dinamika is (Voutilainen és mtsai., 2016).

Khalil és mtsai. összefoglaló tanulmányukban meghatározták azokat a tényezőket, melyek egyértelműen befolyásolják a hantavírus fertőzöttség mértékét. Ezek közül a legfontosabbak: 1. nem, 2. életkor és 3. egyedsűrűség (abundancia) voltak (Khalil és mtsai., 2014). A hantavírus fertőzések aránya általában a hímekben magasabb, mint a nőstényekben, melynek oka a nemre jellemző viselkedés lehet, úgy mint az agresszió és a harapás (Escutenaire és mtsai., 2002). Tanulmányunk első három évi adatai ezt alátámasztják, viszont a negyedik évre a két nem fertőzöttsége közti különbség kiegyenlítődött, így egyértelműen nem tudjuk Khalil és mtsai. eredményét megerősíteni.

Az anyai antitestek jelenléte, melyek a rágcsálók 1-3 hónapos koráig képesek megvédeni az állatot a fertőzéstől döntő fontosságú lehet, így az életkor valóban fontos kockázati tényező. Emiatt a gazdaszervezet életkorának meghatározása fontos kérdés a szeroprevalencia eredmények helyes értelmezéséhez (Bernshtein és mtsai., 1999; Kallio és mtsai., 2010). A legtöbb virológiai és ökológiai vizsgálat/modellzés az állatok életkorát testtömegük alapján határozza meg, ami arra utal, hogy a kisebb súlyú, szeropozitív rágcsálók anyai antitesteket hordoznak. A vizsgálatunkban alkalmazott kormeghatározási

módszer és a visszafogási adatok elegendő adatot szolgáltatottak ahhoz, hogy egyértelműen meg tudjuk különböztetni az anyai antitestek jelenlétét a hantavírus fertőzés utáni természetes immunválasztól. Egyes esetekben hantavírussal fertőzésen átesett szeropozitív felnőtt egyedeket azonosítottunk, még akkor is, ha testsúlyuk alacsony volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kizárólag testtömeg mérésen alapuló módszer nem elegendő az életkorfüggő anyai antitestek jelenlétének helyes meghatározásához, hanem figyelembe kell venni a csapdázást végző ember által megadott életkort, valamint a visszafogási adatokat és ezeket együtt kell kiértékelni.

Számos tanulmányban foglalkoztak a rágcsálók hantavírus fertőzöttségének szezonális változásaival. Belga és német kutatásokban magasabb hantavírus szeroprevalenciát figyeltek meg a tavaszi évszakban, mikor a pockok abundanciája is magasabb volt (Dobly és mtsai., 2012b; Reil és mtsai., 2017). Az egyik magyarázat erre az volt, hogy tavasszal többségben voltak az áttelelő idősebb pockok, melyek nagyobb valószínűséggel estek át a fertőzésen. Reil és mtsai. is hasonlóan vélekedtek, mely szerint a magasabb tavaszi abundancia számmal van összefüggésben a magasabb tavaszi szeropozitivitás. Egy 3 évet áttelelő belga tanulmány szerint a hantavírus szeroprevalencia magas volt az első év őszen (20,1%), majd a következő évben csökkenés volt tapasztalható és a harmadik év tavaszán ismét emelkedést figyeltek meg (Escutenaire és mtsai., 2000a). Tanulmányunkban az adott éveken belül bár nem volt számottevő különbség az évszakok között, viszont az egymást követő évek azonos évszakai között szignifikáns különbségeket találtunk, melyek Escutenaire és mtsai. eredményeit megerősítik. Míg az *Apodemusok* hantavírus szeroprevalenciája 2011 őszen magas volt, majd 2013 ősziére lecsökkent, addig *Myodes* pockok szeroprevalenciája 2014 tavaszán volt a legmagasabb.

A négyéves analízis – mely a szerokonverzió havi adatain alapul – azt mutatja, hogy a hantavírus fertőzés magasabb volt nyáron, mint a többi évszakban, viszont szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető. Hasonló megfigyeléseket tettek Bernshtein és mtsai. is (Bernshtein és mtsai., 1999). Tanulmányukban a legtöbb szerokonverziót a tenyésztési időszak alatt tapasztalták, és ezalatt több hím vált szeropozitívvá, melyet mi nem tapasztaltunk a négyéves megfigyelésünk során.

A vizsgált időszak alatt 41 esetben sikerült téli túlélést megfigyelnünk. Bár a pockok esetében kevés adat állt rendelkezésre, de alacsony túlélési gyakoriságot figyeltünk meg a telet túlélő szeropozitív állatok között. Kallio és mtsai. hasonló eredményeket prezentáltak tanulmányukban (Kallio és mtsai., 2007). Az *Apodemus* egerek között nem tudtunk hasonló különbséget kimutatni, mivel a szeropozitív egerek között magasabb vagy közel azonos volt

a téli túlélők gyakorisága, mint a szeronegatívok esetében. Továbbá a szeropozitív hím egerek téli túlélése nagyobb számban volt jelen, míg a szeronegatív egerek esetében a nőstények túlélése volt gyakoribb.

6.2. Hantavírusok kimutatásának hatékonysága (szervtropizmusa) rágcsáló szervekből és vizeletből

A hantavírus fertőzés a rágcsálók perzisztens fertőzésének számítanak. Az irodalomban számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a hantavírusok mely szervekben, szövetekben és exkrétumokban (nyál, vizelet, széklet) vannak jelen (Bernshtein és mtsai., 1999; Lee és mtsai., 1981; Meyer és Schmaljohn, 2000; Safronetz és mtsai., 2005; Voutilainen és mtsai., 2015; Yanagihara és mtsai., 1985). Kevés tanulmány foglalkozik a természetes úton fertőződött rágcsálók vizsgálatával, alátámasztva azt a feltevést, hogy különbségek vannak a természetes úton és a laboratóriumi körülmények között fertőzött rágcsálók vírus ürítésében (Voutilainen és mtsai., 2015).

Tanulmányunkban természetes úton fertőződött, a dobozcsapdákban elpusztult állatokat vizsgáltuk. Éveken keresztül tartotta magát az a vélemény, mely szerint a hantavírus kimutatására a legalkalmasabb szerv a rágcsálókban a tüdő (Botten és mtsai., 2003; Hjelle és Torres-Pérez, 2010; Lee és mtsai., 1981; Yanagihara és mtsai., 1985). A vizsgált 163 állatból 20 esetben igazoltuk PCR módszerrel a hantavírus jelenlétét valamelyik szervből. A 20 PCR pozitív állat közül csak 11 (55%) esetben tudtuk kimutatni a vírust a tüdőből. Ezzel ellentétben 19 (95%) májból és 20 (100%) veséből sikerült detektálni a vírust.

A perzisztens fertőzést okozó *Puumala* vírust Yanagihara és mtsai. valamint Gavrilovskaya és mtsai. közel egy évig ki tudták mutatni a fertőzött állatok tüdejéből. Ezzel szemben a vírust a veséből nem sikerült kimutatniuk (Botten és mtsai., 2003; Gavrilovskaya és mtsai., 1990; Hjelle és Torres-Pérez, 2010; Yanagihara és mtsai., 1985). Kutatásunk ezzel ellentétes eredményt mutatnak, a DOBV tekintetében biztosan, a PUUV- al kapcsolatban kevés adat állt rendelkezésünkre, mivel csak 2 pozitív *Myodes glareolus*- al tudtunk dolgozni. Lee és mtsai. Hantaan vírussal fertőzött *Apodemus agrarius*okat vizsgáltak, melyek vizelettel és nyállal képesek voltak megfertőzni ketrectársaikat (Lee és mtsai., 1981). Kísérletünk eredménye rámutat arra, hogy ha a vesében jelen van a vírus, az nem biztos,

hogy kimutatható a vizeletből is. Mivel kevés pozitív mintánk volt, ennek a jelenségnek a tisztázására hosszabb idejű *in vivo* kísérletre lenne szükség. Jóllehet kísérletünkkel alá szerettük volna támasztani Voutilainen és mtsai. eredményét az élethosszig tartó vizelettel való vírusürítésről (vöröshátú erdei pocokban), de erre vonatkozóan nem áll rendelkezésünkre elegendő adat (Voutilainen és mtsai., 2015). Ezzel szemben vizsgálatunkban az *Apodemus* egerek esetében bár tény, hogy nem ismerjük a fertőződés kezdetét, de csekély mennyiségű adataink arra engednek következtetni, hogy nem tart élethosszig a vírus ürítés.

Az *Apodemus* egerek eredményeit figyelembe véve, feltételezzük, hogy az immunrendszer képes eltávolítani a vírust a gazdaszervezetből (Asada és mtsai., 1987; Easterbrook és Klein, 2008; Ermonval és mtsai., 2016).

Meyer és Schmaljohn összefoglaló tanulmánya rámutat arra, hogy különbség van az egyes szervezetben való vírus detektálásának időbeli hosszában az egyes hantavírus fajok között, mivel esetükben a PUUV antigén perzisztencia a tüdőben közel egy évig volt kimutatható, míg a HNTV antigén mindössze 14 napig.

Ezek az adatok alátámaszthatják annak a lehetőségét, hogy az emberben a HFRS-t okozó vírus a gazdaszervezetei veséjében sokáig kimutatható marad, míg a HCPS-t okozó fajoknál a vírus hosszú ideig a tüdőben lesz jelen. A HFRS nagyon súlyos veseelégtelenséget okoz, míg a HCPS esetében a szív- és légúti szervek súlyos megbetegedése figyelhető meg. Ha ez így lenne a PUUV és TULV vírusok kivételek lehetnének, mivel enyhe vagy tünetmentes megbetegedést okoznak az emberben, így ezirányban további vizsgálatok szükségesek még.

A *Microtus* pocokból, melyek a *Tula hantavírus* gazdaszervezetei, kevés adat áll rendelkezésünkre. Mégis feltűnő, hogy az összes szervben kimutatható a vírus, valamint a vizeletből is 50%-ban. Ezirányban további vizsgálatok szükségesek, de alátámaszthatják Meyer és Schmaljohn megfigyelését (Meyer és Schmaljohn, 2000).

Easterbrook és Klein, valamint kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai szerint a hantavírus elleni IgG szerológiai vizsgálatok a fertőzés kezdetén negatív eredményt adnak, míg ugyanekkor a PCR már pozitívítást igazol (Easterbrook és Klein, 2008; Németh és mtsai., 2011). Ez összhangban van jelen kísérletünk eredményeivel, mivel a vizsgált egyedek 14%-a, a PCR pozitívítás mellett szeronegatív volt. A vizsgált állatok nagy része szeropozitív, valamint PCR pozitív is volt egyben (62%).

Szekvenálási eredményeink alátámasztották az irodalom szerinti gazdaspecificitást, spillovert nem tapasztaltunk.

Vizsgálatunk eredményei alapján, ha hantavírus fertőzés kimutatása a cél, akkor először szerológiai teszttel javasolt szűrni az állatokat, majd a szeropozitív rágcsálók esetében a májból, de még előnyösebb, ha a veséből végzünk nukleinsav extrakciót és PCR vizsgálatot.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban a Magyarországon hantavírus fertőzést okozó vírusok gazdaszervezeteit tanulmányoztam több szempontból. A Kőszegi-forrás Erdőrezervátum területén négy évig tartó fertőzés dinamikai vizsgálatot végeztünk, valamint a kisemlős monitorozás során a csapdákból elpusztult állatokat vizsgáltunk molekuláris biológiai és szerológiai módszerek alkalmazásával hantavírus fertőzés kimutatására.

A Kőszegi-forrás Erdőrezervátum területén két különböző hantavírus faj szeroprevalenciájára, időbeli dinamikájára és kockázati tényezőire vonatkozó új megfigyeléseket végeztünk, amelyeket Közép-Európa-szerte még nem kutattak.

2011-2014 között, minden évben márciustól októberig, havi 5 napos csapdázással a kisemlős monitorozást az Ökológiai kutatócsoport munkatársai végezték. A csapdázások során az állatok retroorbitális vénájából vért vettek, majd a vérsavók felhasználásával szerológiai vizsgálatokat (ELISA) végeztünk annak érdekében, hogy a fertőzésen átesett egyedekben kimutassuk a hantavírus ellen termelődött antitesteket. A fogás-jelölés-visszafogás (CMR) technika alkalmazásával a hantavírus fertőzés dinamikáját, valamint befolyásoló tényezőit meg tudtuk határozni, az ELISA tesztek eredményeit statisztikailag elemeztük.

Vizsgálatunk során négy faj egyedeinek (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*) vérmintáit vizsgáltuk, melyeket genus szinten csoportosítottunk, így az *Apodemus* egérfajok együtt alkottak egy csoportot. Az *Apodemus* fajok a Dobrava-Belgrade (DOBV) hantavírus, míg a *Myodes glareolus* a Puumala hantavírus gazdaszervezetei.

Az *Apodemusok* szeroprevalenciája az első évben viszonylag magasnak mondható volt (17,2%) majd a következő három évben folyamatosan csökkent, 2014-ben a szeroprevalencia már csak 3,6% volt. Ezzel szemben a vöröshátú erdei pócok fertőzöttsége 2011-ben 3,9 %-os volt, majd 2014-re 18,5%-ra növekedett. Bár a két csoport abundanciája szignifikánsan eltért egymástól, a hantavírus szeroprevalencia közel azonos volt. Ezzel rámutattunk arra, hogy a hantavírus szeroprevalenciája nem függ egyértelműen a gazdaszervezet egyedszámától, így nem állíthatjuk, hogy a nagy rágcsálósűrűség növeli a hantavírus fertőzés kockázatát a gazdaszervezetben. CMR módszer alkalmazásával 56 esetben figyeltünk meg szerokonverziót és 3 esetben szeroreverziót tapasztaltunk. Az egerek téli túlélésében csak az első tél után tapasztaltunk különbséget a fertőzött és nem fertőzött

egyedek között, mely szerint a szeropozitív állatok nagyobb eséllyel éltek túl a telet. A nemek szerinti túlélés vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a szeropozitív hímek szignifikánsan magasabb számban éltek túl a telet, mint a nőstények. Vizsgáltuk a hantavírus ellen termelt anyai antitestek jelenlétét, mely összességében megerősíti az irodalmi adatokat, tavasszal nagyobb gyakorisággal fordult elő, ami az irodalom szerint közel 3 hónapig védi az állatokat a hantavírus fertőzéstől. Tanulmányunk első két évében szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a fertőzött hímek és nőstények egyedszáma között. A harmadik és negyedik évben azonban a két nem fertőzöttsége egyenlő volt, ami felveti azt a kérdést, hogy egyértelműen kijelenthető-e a hím egyedek fertőzés dominanciája. Bár a legtöbb tanulmányban valóban bebizonyosodott a tavaszi és őszi szezonális jelentősége a vírusfertőzés tekintetében, ezt a konkrét szempontot jelen vizsgálatunkban nem tudtuk megerősíteni.

A hantavírus detektáláshoz szükséges legalkalmasabb rágcsáló szerv megállapítására, illetve a vizelettel való élethosszig tartó vírusürítés (tényként való) megerősítésére az alábbi vizsgálatokat végeztük. Dél-dunántúli kismélt monitorozások során az élvefogó csapdában elpusztult állatokat boncoltuk, és szerveik közül a tüdőt, májat, vesét eltávolítottuk. Ha vizeletet találtunk a húgyhólyagban, fecskendővel eltávolítottuk, valamint a szívből és a tüdőből kis mennyiségű vért vettünk. A vért szerológiai vizsgálatokhoz használtuk (WB), míg a szerveken és a vizeleten hantavírus specifikus, nested rendszerű, RT-PCR vizsgálatot végeztünk. A vizsgálat során a 665 boncolt állat közül 163 egyed esetében tudtuk a vizeletet is eltávolítani, így ezeknek az állatoknak a szerveit, illetve vizeletét, véréit vizsgáltuk tovább. 25 állat esetében tudtunk szeropozitivitást és/vagy PCR pozitív kimutatni. A pozitív állatok az *Apodemus*, *Microtus* és *Myodes glareolus* fajokból tevődtek össze. Szekvenálási reakcióval meghatároztuk az állatokban talált vírusfajokat, melyek az irodalmi adatokat alátámasztják. Az *Apodemus* fajokból *Dobrava-Belgrade* vírust, a *Microtus* fajokból *Tula* vírust, míg a *Myodes glareolus*-ból *Puumala* vírust mutattunk ki. A szervek közül a tüdőből tudtuk legkevésbé kimutatni a vírust (55%), mely számos eddigi irodalmi adatot megcáfol. A májból 95%-ban, míg a veséből 100%-ban tudtuk kimutatni a vírust. A vizeletből csak 15%-ban detektáltuk a hantavírust, ezáltal bár kevés adat áll rendelkezésünkre, de nem tudjuk egyértelműen a vizeleten keresztüli élethosszig tartó vírusürítés tényét.

A szeropozitív állatok 62%-a PCR pozitív is volt egyben. Az rágcsálók 14%-ában a fertőzés kezdeti szakaszát detektáltuk, a vírus PCR-rel történő direkt kimutatása mellett az állatok szerokonverzióját még nem tudtuk kimutatni.

A hantavírus PCR módszerekkel történő kimutatására a legmegfelelőbb szerv a rágcsálók esetében a vese, azonban, ha a vesében a vírust detektáljuk, nem lehetünk teljesen biztosak abban, hogy a vizeletben is jelen van a vírus. Eredményeink alapján további hosszú távú kísérletek végezhetők vad, természetesen fertőzött rágcsálókon a vírushatás részletes jellemzőinek megismerése érdekében.

8. SUMMARY

In my dissertation I studied the hosts of viruses causing hantavirus infection in Hungary from several aspects. In the area of Kőszegi- forrás Forest Reserve, a four-year infection dynamic study was performed, and during the mammal monitoring, the animals perished in the traps were examined using molecular biological and serological methods to detect hantavirus infection.

In the area of Kőszegi- forrás Forest Reserve, we made new observations on the seroprevalence, temporal dynamics and risk factors of two different hantavirus species, which have not yet been researched throughout Central Europe.

From 2011 to 2014, every year from March to October, the mammal monitoring was carried out by the staff of the Ecological Research Group with a 5-day trap per month. During the traps, blood was taken from the retroorbital vein of the animals and serological tests (ELISA) were performed using serum to detect antibodies to hantavirus in infected individuals. Using the capture-mark-recapture (CMR) technique, we were able to determine the dynamics of hantavirus infection as well as its influencing factors, and the results of ELISA tests were statistically analyzed.

In our study, we examined blood samples from individuals of four species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*), which were grouped at the genus level, so that the *Apodemus* mice together formed a group. The *Apodemus* are hosts of the *Dobrava-Belgrade* (DOBV) hantavirus, while *Myodes glareolus* is the host of the *Puumala* hantavirus. The seroprevalence of *Apodemus* was relatively high in the first year (17.2%) and then decreased continuously over the next three years, to 3.6% in 2014. In contrast, the infection of bank vole was 3.9% in 2011 and then increased to 18.5% by 2014. Although the abundance of the two groups differed significantly, hantavirus seroprevalence was nearly identical. Thus, we pointed out that the seroprevalence of hantavirus does not clearly depend on the number of individuals in the host, so we cannot claim that high rodent density increases the risk of hantavirus infection within the host. Using the CMR method, seroconversion was observed in 56 cases and seroreversion was observed in 3 cases. Regarding winter survival of mice, we found a difference between infected and uninfected individuals only after the first winter, according to which seropositive animals were more likely to survive the winter. In a winter survival study, we found that seropositive males survived the winter in significantly higher numbers than females. We examined the

presence of maternal antibodies against hantavirus, which, in general, confirms the literature data. It occurred with a higher frequency in the spring, which according to the literature it protects animals from hantavirus infection for nearly 3 months. In the first two years of our study, we found significant differences between the number of infected males and females. However, in the third and fourth years, the infectivity of the two sexes was equal, which raises the question of whether the dominance of infection in males can be clearly stated. Although most studies have indeed demonstrated the importance of spring and autumn seasonality for viral infection, we were unable to confirm this specific aspect in our present study.

In parallel, the following studies were performed to determine the most suitable rodent organ for hantavirus detection and to confirm lifelong virus shedding by urine. During the monitoring of small mammals in South Transdanubia, the animals that died in the live trap were dissected and the lungs, liver and kidneys were removed from their body. If urine was found in the bladder, it was removed with a syringe and a small amount of blood was taken from the heart and lungs. Blood was used for serological tests (WB), while hantavirus-specific nested PCR was performed on organs and urine. During the study, we were able to remove urine from 163 of the 665 dissected animals, so these animals' organs, urine and blood were used for further investigation. Seropositivity and / or PCR positivity could be detected in 25 animals. Positive animals were composed of *Apodemus*, *Microtus*, and *Myodes glareolus* species. Sequencing was used to determine the virus species detected in the animals, which was in accordance with the literature data. *Dobrava-Belgrade* virus was detected from *Apodemus* species, *Tula* virus from *Microtus* species and *Puumala* virus from *Myodes glareolus*. We were able to detect the virus only in 55% of harvested lungs, which refutes many of the literature data so far. Similarly, we were able to detect the virus in 95% of the liver and 100% of the kidneys. Hantavirus was detected in only 15% of the urine, so although small amount of data is available, we do not clearly confirm the life-long virus shedding by urine. 62% of seropositive animals were also PCR positive too. Initial infection was detected in 14% of rodents, which is likely due to the fact that PCR already detects the infection, but the serological result is still negative. The most suitable organ for detecting hantavirus by PCR in rodents is the kidney, however, if the virus is detected in the kidney, we cannot be absolutely sure that the virus is also present in the urine. Based on our results, further long-term experiments can be performed on wild, naturally infected rodents to understand the detailed characteristics of the viral infection.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahlm, C., Wallin, K., Lundkvist, Å., Elgh, F., Juto, P., Merza, M., Tärnvik, A., 2000. Serologic evidence of puumala virus infection in wild moose in Northern Sweden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 106–111. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.106>
- Asada, H., Tamura, M., Kondo, K., Okuno, Y., Takahashi, Y., Dohi, Y., Nagai, T., Kurata, T., Yamanishi, K., 1987. Role of T lymphocyte subsets in protection and recovery from Hantaan virus infection in mice. *J. Gen. Virol.* 68, 1961–1969. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-7-1961>
- Avsic-Zupanc, T., Saksida, A., Korva, M., 2015. Hantavirus infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 1–14. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Avsic-Zupanc, T., Xiao, S. -Y., Stojanovic, R., Gligic, A., van der Groen, G., Leduc, J.W., 1992. Characterization of Dobrava virus: A hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J. Med. Virol.* 38, 132–137. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890380211>
- Bernshtein, A.D., Apekina, N.S., Mikhailova, T. V., Myasnikov, Y.A., Khlyap, L.A., Korotkov, Y.S., Gavrilovskaya, I.N., 1999. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 144, 2415–2428. <https://doi.org/10.1007/s007050050654>
- Bi, Z., Formenty, P.B.H., Roth, C.E., 2008. Hantavirus infection: a review and global update. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2, 3–23. <https://doi.org/10.3855/jidc.317>
- Borucki, M.K., Boone, J.D., Rowe, J.E., Bohlman, M.C., Kuhn, E.A., DeBaca, R., St. Jeor, S.C., 2000. Role of Maternal Antibody in Natural Infection of *Peromyscus maniculatus* with Sin Nombre Virus. *J. Virol.* 74, 2426–2429. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2426-2429.2000>
- Bossé, J.T., Friendship, R., Rosendal, S., Fenwick, B.W., 1993. Development and evaluation of a mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, and 7 infections in commercial swine herds. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 5, 359–362. <https://doi.org/10.1177/104063879300500309>
- Botten, J., Mirowsky, K., Kusewitt, D., Ye, C., Gottlieb, K., Prescott, J., Hjelle, B., 2003. Persistent Sin Nombre virus infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model: sites of replication and strand-specific expression. *J. Virol.* 77, 1540–1550. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.1540>
- Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C.H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N., Lähdevirta, J., 1980. Nephropathia

- epidemic: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J. Infect. Dis.* 141, 131–134. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.2.131>
- Casals, J., Henderson, B.E., Hoogstraal, H., Johnson, K.M., Shelokov, A., 1970. A review of soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *J. Infect. Dis.* 122, 437–453. <https://doi.org/10.1093/infdis/122.5.437>
- Chandy, S., Mathai, D., 2017. Globally emerging hantaviruses: An overview. *Indian J. Med. Microbiol.* 35, 165–175. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_429
- Childs, J.E., Glass, G.E., Korch, G.W., Leduc, J.W., Baltimore, O., Leduc, J.W., 1989. Effects of Hantaviral Infection on Survival, Growth and Fertility in Wild Rat (*Rattus Norvegicus*) Populations of Baltimore, Maryland Effects of Hantaviral Infection on Survival, Growth and Fertility in Wild Rat (*Rattus Norvegicus*) Populations. *J. Wildl. Dis.* 25, 469–476. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-25.4.469>
- Childs, J.E., Ksiazek, T.G., Spiropoulou, C.F., Krebs, J.W., Morzunov, S., Maupin, G.O., Gage, K.L., Rollin, P.E., Sarisky, J., Enscore, R.E., Frey, J.K., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1994. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *J. Infect. Dis.* 169, 1271–1280. <https://doi.org/10.1093/infdis/169.6.1271>
- D'Souza, M.H., Patel, T.R., 2020. Biodefense Implications of New-World Hantaviruses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00925>
- Dheeraseskara, K., Sumathipala, S., Muthugala, R., 2020. Hantavirus Infections—Treatment and Prevention. *Curr. Treat. Options Infect. Dis.* 12, 410–421. <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00236-3>
- Dobly, Cochez, C., Goossens, E., Bosschere, H. De, Hansen, P., Roels, S., Heyman, P., 2012a. Research in Veterinary Science Sero-epidemiological study of the presence of hantaviruses in domestic dogs and cats from Belgium. *Res. Vet. Sci.* 92, 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.003>
- Dobly, Yzard, C., Cochez, C., Ducoffre, G., Aerts, M., Roels, S., Heyman, P., 2012b. Spatiotemporal dynamics of Puumala hantavirus in suburban reservoir rodent populations. *J. Vector Ecol.* 276–284. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00228.x>
- Easterbrook, J.D., Klein, S.L., 2008. Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *PLoS Pathog.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000172>
- Enria, D.A., Briggiler, A.M., Pini, N., Levis, S., 2000. Clinical manifestations of new world

- hantaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256, 117–134.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_7
- Ermonval, M., Baychelier, F., Tordo, N., 2016. What Do We Know about How Hantaviruses Interact with Their Different Hosts ? <https://doi.org/10.3390/v8080223>
- Escutenaire, S., Chalon, P., De Jaegere, F., Karelle-Bui, L., Mees, G., Brochier, B., Rozenfeld, F., Pastoret, P.P., 2002. Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg. Infect. Dis.* 8, 930–936. <https://doi.org/10.3201/eid0809.010537>
- Escutenaire, S., Chalon, P., Verhagen, R., Heyman, P., Thomas, I., Karelle-Bui, L., Avsic-Zupanc, T., Lundkvist, Å., Plyusnin, A., Pastoret, P.P., 2000a. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.* 67, 91–107. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00136-2)
- Escutenaire, S., Pastoret, P.P., Sjölander, K.B., Heyman, P., Brochier, B., Lundkvist, Å., 2000b. Evidence of Puumala Hantavirus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Belgium. *Vet. Rec.* 147, 365–366. <https://doi.org/10.1136/vr.147.13.365>
- Faludi, G., Ferenczi, E., 1995. Serologically verified hantavirus infections in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung.*
- Ferenczi, E., Rácz, G., Faludi, G., Czeglédi, A., Mezey, I., Berencsi, G., 2005. Natural Foci of Classical and Emerging Viral Zoonoses in Hungary. *Emerg Biol. Threat.*
- Ferenczi, E., Rácz, G., Szekeres, J., Balogh, K., Tóth, E., Takács, M., Csire, M., Mezey, I., Berencsi, G., Faludi, G., 2003. Újabb adatok a hazai hantavírusok népegészségügyi jelentőségének vizsgálatához. *Orv. Hetil.* 467–474.
- Ferluga, D., Vizjak, A., 2008. Hantavirus nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1653–1658. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007091022>
- Ferrés, M., Vial, P., 2004. Hantavirus infection in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 16, 70–75. <https://doi.org/10.1097/00008480-200402000-00013>
- Földes, F., Madai, M., Németh, V., Zana, B., Papp, H., Kemenesi, G., Bock-Marquette, I., Horváth, G., Herczeg, R., Jakab, F., 2019. Serologic survey of the Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection among wild rodents in Hungary. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 101258. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.07.002>
- Gajdusek, D.C., 1962. Virus hemorrhagic fevers. *J. Pediatr.* 60, 841–857. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(62\)80170-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(62)80170-x)
- Gavrilovskaya, I.N., Apekina, N.S., Bernshtein, A.D., Demina, V.T., Okulova, N.M.,

- Myasnikov, Y.A., Chumakov, M.P., 1990. Pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome virus infection and mode of horizontal transmission of hantavirus in bank voles. *Arch. Virol.* 57–62. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9091-3_7
- Gligic, A., Dimkovic, N., Xiao, S.Y., Buckle, G.J., Jovanovic, D., Velimirovic, D., Stojanovic, R., Obradovic, M., Diglisic, G., Micic, J., Asher, D.M., LcDuc, J.W., Yanagihara, R., Carleton Gajdusek, D., 1992. Belgrade virus: A new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in yugoslavia. *J. Infect. Dis.* 166, 113–120. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.1.113>
- Grøndahl-Hansen, J., Barfod, K., Klausen, J., Andresen, L.O., Heegaard, P.M.H., Sørensen, V., 2003. Development and evaluation of a mixed long-chain lipopolysaccharide based ELISA for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 6 and 12 in pig herds. *Vet. Microbiol.* 96, 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00208-6)
- Hautala, N., Partanen, T., Kubin, A.M., Kauma, H., Hautala, T., 2021. Central nervous system and ocular manifestations in puumala hantavirus infection. *Viruses* 13, 1–10. <https://doi.org/10.3390/v13061040>
- Heyman, P., Ceianu, C.S., Christova, I., Tordo, N., Beersma, M., Alves, M.J., Lundkvist, A., Hukic, M., Papa, A., 2011. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe , 2005 – 2010 2005–2010.
- Heyman, P., Escutenaire, S., Sjo, K.B., Jaegere, F. De, Henttonen, H., Klingstro, J., 2002. Rodent Host Specificity of European Hantaviruses : Evidence of Puumala Virus Interspecific Spillover 588, 581–588. <https://doi.org/10.1002/jmv.10232>
- Hjelle, B., Jenison, S., Torrez-Martinez, N., Herring, B., Quan, S., Polito, A., Pichuantes, S., Yamada, T., Morris, C., Elgh, F., Lee, H.W., Artsob, H., Dinello, R., 1997. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 600–608. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.600-608.1997>
- Hjelle, B., Torres-Pérez, F., 2010. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. *Viruses* 2559–2586. <https://doi.org/10.3390/v2122559>
- Hjelle, B., Yates, T., 2001. Modeling hantavirus maintenance and transmission in rodent communities. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256, 77–90. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_5
- Hujakka, H., Koistinen, V., Kuronen, I., Eerikäinen, P., Parviainen, M., Lundkvist, Å.,

- Vaheri, A., Vapalahti, O., Närvänen, A., 2003. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: Specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. *J. Virol. Methods* 108, 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00282-3)
- Hukić, M., Muzaferović, Š., Tulumović, D., Čalkić, L., Šabović, S., Karakaš, S., Sabitović, D., Pavić, G., Osmančević, E., 2003. Puumala and Dobrava viruses in the northeastern and central regions of Bosnia. *Acta Med Croat.* 57, 373–380.
- Jakab, F., Horváth, G., Ferenczi, E., Sebők, J., Szűcs, G., 2008. First detection of Tula hantaviruses in *Microtus arvalis* voles in Hungary. *Arch. Virol.* 153, 2093–2096. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0216-5>
- Jakab, F., Horváth, G., Ferenczi, E., Sebők, J., Varcza, Z., Szűcs, G., 2007. Detection of Dobrava hantaviruses in *Apodemus agrarius* mice in the Transdanubian region of Hungary. *Virus Res.* 128, 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.04.015>
- Jameson, L.J., Logue, C.H., Atkinson, B., Baker, N., Galbraith, S.E., Carroll, M.W., Brooks, T., Hewson, R., 2013a. The continued emergence of hantaviruses: Isolation of a seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Eurosurveillance* 18, 1–4. <https://doi.org/10.2807/ese.18.01.20344-en>
- Jameson, L.J., Taori, S.K., Atkinson, B., Levick, P., Featherstone, C.A., van der Burgt, G., McCarthy, N., Hart, J., Osborne, J.C., Walsh, A.L., Brooks, T.J., Hewson, R., 2013b. Pet rats as a source of hantavirus in England and Wales, 2013. *Eurosurveillance* 18, 8–10. <https://doi.org/10.2807/ese.18.09.20415-en>
- Johnson, K.M., 2001. Hantaviruses : History and Overview.
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T.M., Vapalahti, O., 2010. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 412–441. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
- Jonsson, C.B., Hooper, J., Mertz, G., 2008. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 78, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.012>
- Kallio, E.R., Begon, M., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2010. Hantavirus infections in fluctuating host populations: The role of maternal antibodies. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 3783–3791. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1022>
- Kallio, E.R., Begon, M., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2009. Cyclic hantavirus epidemics in humans - Predicted by rodent host dynamics. *Epidemics* 1, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2009.03.002>

- Kallio, E.R., Klingstro, J., Gustafsson, E., Manni, T., Vaheri, A., Henttonen, H., Vapalahti, O., 2006. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment Printed in Great Britain 2127–2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81643-0>
- Kallio, E.R., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 88, 1911–1916. <https://doi.org/10.1890/06-1620.1>
- Kanerva, M., Mustonen, J., Vaheri, A., 1998. Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev. Med. Virol.* 8, 67–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199804/06\)8:2<67::AID-RMV217>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199804/06)8:2<67::AID-RMV217>3.0.CO;2-U)
- Kang, H.J., Arai, S., Hope, A.G., Song, J.W., Cook, J.A., Yanagihara, R., 2009a. Genetic diversity and phylogeography of seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virol. J.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-208>
- Kang, H.J., Bennett, S.N., Sumibcay, L., Arai, S., Hope, A.G., Mocz, G., Song, J.-W., Cook, J.A., Yanagihara, R., 2009b. Evolutionary Insights from a Genetically Divergent Hantavirus Harbored by the European Common Mole (*Talpa europaea*). *PLoS One* 4, e6149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006149>
- Kehm, R., Jakob, N.J., Welzel, T.M., Tobiasch, E., Viczian, O., Jock, S., Geider, K., Süle, S., Darai, G., 2001. Expression of immunogenic Puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. *Virus Genes* 22, 73–83. <https://doi.org/10.1023/A:1008186403612>
- Khaiboullina, S., Morzunov, S., St. Jeor, S., 2005. Hantaviruses: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* 5, 773–790. <https://doi.org/10.2174/156652405774962317>
- Khalil, H., Hörnfeldt, B., Evander, M., Magnusson, M., Olsson, G., Ecke, F., 2014. Dynamics and Drivers of Hantavirus Prevalence in Rodent Populations. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 537–551. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1562>
- Kim, G.R., McKee, K.T., 1985. Pathogenesis of Hantaan virus infection in suckling mice: clinical, virologic, and serologic observations. *Am J Trop Med Hyg.*
- Kjær, L.J., Klitgaard, K., Soleng, A., Edgar, K.S., Lindstedt, H.E.H., Paulsen, K.M., Andreassen, Å.K., Korslund, L., Kjelland, V., Slettan, A., Stuen, S., Kjellander, P., Christensson, M., Teräväinen, M., Baum, A., Jensen, L.M., Bødker, R., 2020. Spatial patterns of pathogen prevalence in questing *Ixodes ricinus* nymphs in southern Scandinavia, 2016. *Sci. Rep.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76334-5>

- Klein, S.L., Bird, B.H., Glass, G.E., 2001. Sex differences in immune responses and viral shedding following Seoul virus infection in Norway rats. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.57>
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., Ter Meulen, J., Krüger, D.H., 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 838–840. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
- Klempa, B., Radosa, L., Kruger, D.H., 2013. The broad spectrum of hantaviruses and their hosts in Central Europe. *Acta Virol.* 57, 130–137. https://doi.org/10.4149/av_2013_02_130
- Klingström, J., Heyman, P., Escutenaire, S., Brus Sjölander, K., De Jaegere, F., Henttonen, H., Lundkvist, Å., 2002. Rodent host specificity of european hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J. Med. Virol.* 68, 581–588. <https://doi.org/10.1002/jmv.10232>
- Kruger, D.H., Figueiredo, L.T.M., Song, J.W., Klempa, B., 2015. Hantaviruses-Globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 64, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>
- Krüger, D.H., Ulrich, R., Lundkvist, Å., 2001. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect.* 3, 1129–1144. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01474-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01474-5)
- Krüger, D.H., Ulrich, R.G., Hofmann, J., 2013. Hantaviruses as zoonotic pathogens in Germany. *Dtsch. Arztebl. Int.* 110, 461–467. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0461>
- Laenen, L., Vergote, V., Calisher, C.H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J.H., Maes, P., 2019. Hantaviridae: Current classification and future perspectives. *Viruses* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3390/v11090788>
- Lee, H.W., Baek Luck Ju, Johnson, K.M., 1982. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J. Infect. Dis.* 146, 638–644. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.5.638>
- Lee, H.W., Lee, P.W., Baek, L.J., Song, C.K., Seong, I.W., 1981. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.1106>
- Lee, H.W., Lee, P.W., Johnson, K.M., 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever 1978. *J. Infect. Dis.* 137. <https://doi.org/10.1093/infdis/190.9.1711>
- Lee, P.W., Amyx, H.L., Yanagihara, R., Gajdusek, D.C., Goldgaber, D., 1985. Partial characterization of prospect hill virus isolated from meadow voles in the united states. *J. Infect. Dis.* 152, 826–829. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.4.826>

- Leighton, F.A., Artsob, H.A., Chu, M.C., Olson, J.G., 2001. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can. J. Public Heal.* 92, 67–71. <https://doi.org/10.1007/bf03404848>
- Lundkvist, Å., Verner-Carlsson, J., Plyusnina, A., Forslund, L., Feinstein, R., Plyusnin, A., 2013. Pet rat harbouring Seoul hantavirus in Sweden, June 2013. *Eurosurveillance* 18, 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.27.20521>
- Lyubsky, A., Gavrilovskaya, I.N., Luft, B., Mackow, E., 1996. Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: Pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Lab. Investig.* 627–33.
- Mccaughey, C., Hart, C.A.Ã., 2000. *Hantaviruses* 49.
- Meyer, B., Schmaljohn, C., 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol.* 8, 61–67.
- Munir, N., Jahangeer, M., Hussain, S., Mahmood, Z., Ashiq, M., Ehsan, F., Akram, M., Ali Shah, S.M., Riaz, M., Sana, A., 2021. Hantavirus diseases pathophysiology, their diagnostic strategies and therapeutic approaches: A review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 48, 20–34. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13403>
- Németh, V., Madai, M., Marácz, A., Bérczi, B., Horváth, G., Oldal, M., Kisfali, P., Bányai, K., Jakab, F., 2011. Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 156, 1655–1660. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1013-0>
- Netski, D., Thran, B.H., St. Jeor, S.C., 1999. Sin Nombre Virus Pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J. Virol.* 73, 585–591. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.585-591.1999>
- Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., Peters, C.J., 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* (80-.). 262, 914–917. <https://doi.org/10.1126/science.8235615>
- Noack, D., Goeijenbier, M., Reusken, C.B.E.M., Koopmans, M.P.G., Rockx, B.H.G., 2020. Orthohantavirus Pathogenesis and Cell Tropism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 399. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00399>
- Núñez, J.J., Fritz, C.L., Knust, B., Buttke, D., Enge, B., Novak, M.G., Kramer, V., Osadebe, L., Messenger, S., Albariño, C.G., Ströher, U., Niemela, M., Amman, B.R., Wong, D., Manning, C.R., Nichol, S.T., Rollin, P.E., Xia, D., Watt, J.P., Vugia, D.J., 2014. Hantavirus infections among overnight visitors to Yosemite National Park, California,

- USA, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 386–393. <https://doi.org/10.3201/eid2003.131581>
- Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R., Arikawa, J., 2007. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne hantavirus. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 173–181. <https://doi.org/10.1128/CVI.00347-06>
- Oldal, M., Németh, V., Madai, M., Pintér, R., Kemenesi, G., Dallos, B., Kutas, A., Sebök, J., Horváth, G., Bányai, K., Jakab, F., 2014. Serosurvey of pathogenic hantaviruses among forestry workers in Hungary. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 27, 766–773. <https://doi.org/10.2478/s13382-014-0308-2>
- Overturf, G.D., 2005. Clinical sin nombre hantaviral infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 373–374. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000159892.32202.60>
- Papa, A., 2012. Dobrava-Belgrade virus : Phylogeny , epidemiology , disease. *Antiviral Res.* 95, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.011>
- Pensiero, M.N., Sharefkin, J.B., Dieffenbach, C.W., Hay, J., 1992. Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J. Virol.* 66, 5929–5936. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.10.5929-5936.1992>
- Plyusnin, A., Morzunov, S.P., 2000. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256, 47–75. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_4
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., Vaheri, A., 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 77, 2677–2687.
- Plyusnina, A., Ferenczi, E., Rácz, G.R., Nemirov, K., Lundkvist, Å., Vaheri, A., Vapalahti, O., Plyusnin, A., 2009. Co-circulation of three pathogenic hantaviruses: Puumala, Dobrava, and Saaremaa in Hungary. *J. Med. Virol.* 81, 2045–2052. <https://doi.org/10.1002/jmv.21635>
- Reil, D., Rosenfeld, U.M., Imholt, C., Schmidt, S., Ulrich, R.G., Eccard, J.A., Jacob, J., 2017. Puumala hantavirus infections in bank vole populations: Host and virus dynamics in Central Europe. *BMC Ecol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s12898-017-0118-z>
- Sadkowska-Todys, M., Dudek-Godeau, D., Kamińska, S., Baumann-Popczyk, A., Czerwiński, M., Kucharczyk, B., Zieliński, A., 2015. Occurrence and maintenance of hantavirus infections among rodent populations in their natural habitat-results of a field study from Podkarpackie province, Poland 2010-2012. *Przegl. Epidemiol.* 69, 283–288.
- Safronetz, D., Lindsay, R., Dibernardo, A., Hjelle, B., Xiao, R., Artsob, H., Drebot, M.A.,

2005. A preliminary study of the patterns of Sin Nombre Viral Infection and shedding in naturally infected deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 127–132.
- Scharninghausen, J.J., Meyer, H., Pfeffer, M., Davis, D.S., Honeycutt, R.L., 1999. Genetic evidence of Dobrava virus in *Apodemus agrarius* in Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 468–470. <https://doi.org/10.3201/eid0503.990324>
- Schmaljohn, C., Dalrymple, J.M., 1983. Analysis of Hantaan Virus RNA: Evidence for a New Genus of Bunyaviridae. *Virology* 491, 482–491.
- Schmaljohn, C., Hjelle, B., 1997. Hantaviruses: A Global Disease Problem. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 95–104.
- Schönrich, G., Rang, A., Lütke, N., Raftery, M.J., Charbonnel, N., Ulrich, R.G., 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol. Rev.* 225, 163–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00694.x>
- Schultze, D., Lundkvist, Å., Blauenstein, U., Heyman, P., 2002. Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 304–306. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0705-5>
- Settergren, B., 2000. Clinical aspects of nephropathia epidemica (Puumala virus infection) in Europe: A review. *Scand. J. Infect. Dis.* 32, 125–132. <https://doi.org/10.1080/003655400750045204>
- Smadel, J.E., 1953. Epidemic hemorrhagic fever. *Am. J. Public Health.* <https://doi.org/10.1097/00000441-195306000-00011>
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2012. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 4. ed. W. H. Freeman and Co.: New York. 937 pp.
- Spengler, J.R., Haddock, E., Gardner, D., Hjelle, B., Feldmann, H., Prescott, J., 2013. Experimental Andes Virus Infection in Deer Mice: Characteristics of Infection and Clearance in a Heterologous Rodent Host. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055310>
- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E.J., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 356, 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
- Trencseni, T., Keleti, B., 1971. Clinical Aspects and Epidemiology of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome. Analysis of Clinical and Epidemiological Experiences in Hungary. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Vaheri, A., Henttonen, H., Voutilainen, L., Mustonen, J., Sironen, T., Vapalahti, O., 2013.

- Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev. Med. Virol.* 23, 35–49. <https://doi.org/10.1002/rmv.1722>
- Voutilainen, L., Kallio, E.R., Niemimaa, J., Vapalahti, O., Henttonen, H., 2016. Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/srep21323>
- Voutilainen, L., Sironen, T., Tonteri, E., Bäck, A.T., Razzauti, M., Karlsson, M., Wahlström, M., Niemimaa, J., Henttonen, H., Lundkvist, Å., 2015. Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *J. Gen. Virol.* 96, 1238–1247. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000076>
- Weber de Melo, V., Sheikh Ali, H., Freise, J., Kühnert, D., Essbauer, S., Mertens, M., Wanka, K.M., Drewes, S., Ulrich, R.G., Heckel, G., 2015. Spatiotemporal dynamics of Puumala hantavirus associated with its rodent host, *Myodes glareolus*. *Evol. Appl.* 8, 545–559. <https://doi.org/10.1111/eva.12263>
- Wells, R.M., Estani, S.S., Yadon, Z.E., Enria, D., Padula, P., Pini, N., Mills, J.N., Peters, C.J., Segura, E.L., 1997. An Unusual Hantavirus Outbreak in Southern Argentina: Person-to-Person Transmission? *Emerg. Infect. Dis.* 3, 171–174. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970210>
- Witkowski, P.T., Klempa, B., Ithete, N.L., Auste, B., Mfunne, J.K.E., Hoveka, J., Matthee, S., Preiser, W., Kruger, D.H., 2014. Hantaviruses in Africa. *Virus Res.* 187, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.039>
- Xiao, S. -Y, Yanagihara, R., Godec, M.S., Eldadah, Z.A., Johnson, B.K., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., 1991. Detection of hantavirus RNA in tissues of experimentally infected mice using reverse transcriptase-directed polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 33, 277–282. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890330413>
- Yanagihara, R., Amyx, H.L., Gajdusek, D.C., 1985. Experimental Infection with Puumala Virus , the Etiologic Agent of Nephropathia Epidemica , in Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Virol.* 55, 34–38.
- Zelená, H., Mrázek, J., Kuhn, T., 2013. Tula hantavirus infection in immunocompromised host, Czech Republic. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1873–1876. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130421>
- Zou, Y., Hu, J., Wang, Z. hao-X., Wang, D.-M., Yu, C., Zhou, J.-Z., Fu, Z., Zhang, Y.-Z., 2008. Genetic Characterization of Hantaviruses Isolated from Guizhou, China: Evidence for Spillover and Reassortment in Nature. *J. Med. Virol.*

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon segítettek abban, hogy e disszertáció elkészüljön.

Elsősorban, nagyon szépen köszönöm Prof. Dr. Jakab Ferencnek, hogy biztosította munkámhoz azt a laboratóriumi háttérrel, mely évekkel ezelőtt még csak az álmaim részét képezte. Hálásan köszönöm szakmai segítségét, iránymutatását és támogatását, Nélküle, ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Szeretnék köszönetet mondani a Természettudományi Kar, Ökológiai Tanszék Kisemlős Kutatócsoport valamennyi munkatársának, hogy négy éven keresztül, biztosították számunkra a disszertáció alapjául szolgáló vérmintákat.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Horváth Győzőnek, Dr. Herczeg Róbertnek és Somogyi Baláznak a statisztikai elemzésben nyújtott fáradhatatlan segítségükért.

Szeretném megköszönni a Virologiai Kutatócsoport valamennyi munkatársának, Dr. Földes Fanninak, Dr. Kemenesi Gábornak, Dr. Kuczmog Anettnek, Dr. Kurucz Kornéliának, Lanszki Zsófiának, Nyári Viktóriának, Papp Henriettának, Tóth Endre Gábornak, Varga Zsaklinnak, Zana Brigittának és Zeghbib Safiának laboratóriumi munkám során tanúsított segítségüket és baráti támogatásukat, melyre mindig számíthattam.

Külön köszönettel tartozom korábbi munkatársaimnak, Dr. Németh Viktóriának és Dr. Oldal Miklósnak a rekombináns fehérjék előállításáért, valamint szakmai és baráti támogatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni férjemnek és kisfiamnak a türelmüket és szeretetüket mely által e disszertáció elkészülhetett. Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, akik támogatták egyetemi tanulmányaimat és Nélkülük ezen dolgozat nem készülhetett volna el.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló, tudományos közlemények:

Madai M, Németh V, Oldal M, Horváth Gy, Herczeg R, Kelemen K, Kemenesi G, Jakab F: Temporal Dynamics of Two Pathogenic Hantaviruses Among Rodents in Hungary *Vector Borne Zoonotic Dis*, DOI: 10.1089/vbz.2019.2438 (2019) IF: 1,939

Madai M, Horváth Gy, Herczeg R, Somogyi B, Zana B, Földes F, Kemenesi G, Kurucz K, Papp H, Zeghib S, Jakab F: Effectiveness Regarding Hantavirus Detection in Rodent Tissue Samples and Urine *Viruses*, DOI: 10.3390/v13040570 (2021) IF: 5,048

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek:

Madai M, Németh V, Oldal M, Horváth Gy, Herczeg R, Jakab F: Két human patogén hantavírus fertőzés dinamizmus vizsgálata rágcsálókban *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése*, Eger 2018.október 17-19.

Madai M, Németh V, Oldal M, Horváth G, Herczeg R, Pintér R, Kutas A, Dallos B, Bányai K, Jakab F: Serological survey of hantavirus infection among rodents in Hungary. *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance*; Vienna, Austria, November 4-7, 2016

Madai M, Németh V, Oldal M, Horváth G, Herczeg R, Pintér R, Kutas A, Dallos B, Jakab F: Hantavírus fertőzöttség vizsgálata egy magyarországi rágcsáló közösségben. *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi Nagygyűlése*, Keszthely 2016.október 19-21.

Egyéb tudományos közlemények

- Bereczki I, Papp H, Kuczmog A, **Madai M**, Nagy V, Agócs A, Batta G, Milánkovits M, Ostorházi E, Mitrović A, Kos J, Zsigmond Á, Hajdú I, Lőrincz Z, Bajusz D, Keserű GM, Hodek J, Weber J, Jakab F, Herczegh P, Borbás A. Natural Apocarotenoids and Their Synthetic Glycopeptide Conjugates Inhibit SARS-CoV-2 Replication *.Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Oct 30;14(11):1111. doi: 10.3390/ph14111111.PMID: 34832893
- Papp H, Zeghib S, Földes F, Banfai K, **Madai M**, Kemenesi G, Urbán P, Kvell K, Jakab F. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection triggers the upregulation of the Wnt signaling pathway inhibitor genes. *Virus Genes*. 2020 Aug; 56(4):508-514. doi: 10.1007/s11262-020-01759-z. Epub 2020 Apr 25.PMID: 32335793
- Földes F, **Madai M**, Papp H, Kemenesi G, Zana B, Geiger L, Gombos K, Somogyi B, Bock-Marquette I, Jakab F Small interfering RNAs are highly effective inhibitors of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication *in vitro*. *Molecules* 25, 5771 (2020)
- Zeghib S, Herczeg R, Kemenesi G, Zana B, Kurucz K, Urbán P, **Madai M**, Földes F, Papp H, Somogyi B, Jakab F: Genetic characterization of a novel picornavirus in Algerian bats: co-evolution analysis of bat-related picornaviruses *Scientific Reports* 9 December (2019)
- Zana B, Kemenesi G, Buzás D, Csorba G, Görföl T, Khan AA, Diyana NF, Tahir A, Zeghib S, **Madai M**, Papp H, Földes F, Urbán P, Herczeg R, Tóth G, Jakab F: Molecular Identification of a Novel Hantavirus in Malaysian Bronze Tube-Nosed Bats (*Murina aenea*) *Viruses* 11(10):887 (2019)
- Földes F, **Madai M**, Németh V, Zana B, Papp H, Kemenesi G, Bock- Marquette I, Horváth Gy, Herczeg R, Jakab F: Serologic survey of the Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection among wild rodents in Hungary *Ticks and Tick-borne Diseases* 10(6) 2019
- Kurucz K, **Madai M**, Bali D, Hederics D, Horváth Gy, Kemenesi G, Jakab F: Parallel Survey of Two Widespread Renal Syndrome-Causing Zoonoses: *Leptospira* spp. and Hantavirus in Urban Environment, Hungary *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 18(4) (2018)
- Oldal M, Sironen T, Henttonen H, Vapalahti O, **Madai M**, Horváth Gy, Dallos B, Kutas A, Földes F, Kemenesi G, Németh V, Bányai K, Jakab F: Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 1 (1): 1-1. (2015)

- Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Boldog S, Estók P, Kurucz K, Oldal M, Németh V, **Madai M**, Bányai K, Jakab F: Novel European lineages of bat astroviruses identified in Hungary *Acta Virologica* 58(1): 95-98. (2014)
- Oldal M, Németh V, **Madai M**, Pintér R, Kemenesi G, Dallos B, Kutas A, Sebők J, Horváth Gy, Bányai K, Jakab F: Serosurvey of pathogenic hantaviruses among forestry workers in Hungary. *Int J Occup Med Environ Health* 27(5): 766-773. (2014)
- Oldal M, Németh V, **Madai M**, Kemenesi G, Dallos B, Péterfi Z, Sebők J, Wittmann I, Bányai K, Jakab F: Identification of hantavirus infection by Western blot assay and TaqMan PCR in patients hospitalized with acute kidney injury. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79(2): 166170. (2014)
- Pintér R, **Madai M**, Horváth Gy, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, Jakab F: Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus in rodents captured in the Transdanubian region of Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14(8): 621-624. (2014)
- Pintér R, **Madai M**, Vadkerti E, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Gyuranecz M, Kiss G, Bányai K, Jakab F: Identification of tick-borne encephalitis virus in ticks collected in southeastern Hungary. *Ticks Tick Borne Dis* 4(5): 427-431. (2013)
- Németh V, Oldal M, **Madai M**, Horváth Gy, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, Jakab F: Molecular characterization of Dobrava and Kurkino genotypes of Dobrava-Belgrade hantavirus detected in Hungary and Northern Croatia: *Virus Genes* 47(3): 546-549. (2013)
- Németh V, **Madai M**, Maráczai A, Bérczi B, Horváth G, Oldal M, Kisfali P, Bányai K, Jakab F: Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arch Virol*; 156(9):1655-60. (2011)
- Jakab F, Sebők J, Szántó Z, Hang D, Imre M, Németh V, **Madai M**, Oldal M, Kovács T, Wittmann I: Dobrava-Belgrade hantavirus infection mimics acute appendicitis. *J Clin Virol*; 50(2): 164-6. (2011)

Egyéb előadások és poszterek

Földes F, **Madai M**, Papp H, Kemenesi G, Zana B, Geiger L, Gombos K, Jakab F Krími-kongói vérzések láz vírus replikációjának gátlása siRNS-ekkel. XVIII. Szentágotthai János Multidiszciplináris Konferencia és Hallgatói Verseny Absztrakt kötet XVIII. János Szentágotthai Multidisciplinary Conference and Student Competition Book of Abstracts Pécs, Magyarország, János Szentágotthai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, 2020 pp. 19-20. 2 p.

Zana B, Buzás D, Kemenesi G, Görföl T, Csorba G, **Madai M**, Jakab F: Molecular identification of a presumably novel hantavirus in bronze tube-nosed bat (*Murina aenea*) in Malaysia *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance*; Vienna, Austria, November 9- 12, 2018

Kurucz K, **Madai M**, Hederics D, Bali D, Kemenesi G, Jakab F: Molecular survey of zoonotic agents in rodents from an urban environment, Hungary *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance*; Vienna, Austria, November 9- 12, 2018

Földes F, **Madai M**, Németh V, Horváth Gy, Herczeg R, Jakab F: Krími-kongói vérzések láz vírusfertőzés szerológiai felmérése a magyarországi rágcsáló populációkban *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése*, Eger 2018.október 17-19.

Zana B, Buzás D, Kemenesi G, Görföl T, Csorba G, **Madai M**, Jakab F: Új hantavirus molekuláris azonosítása Malajziából származó *Murina Aenea* denevérfajból *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése*, Eger 2018.október 17-19.

Oldal M, Németh V, **Madai M**, Kemenesi G, Horváth G, Bányai K, Jakab F: Hantavirus seroprevalence among forestry workers in Hungary. *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance*; Vienna, Austria, October 31-November 3, 2014

Jakab F, Németh V, Oldal M, **Madai M**, Horváth G, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K: Molecular characterization of Dobrava and Kurkino genotypes of Dobrava-Belgrade hantavirus detected in Hungary and Northern Croatia. *4th Ceform*, Keszthely, Hungary, 16-18 October 2013.

Jakab F, Oldal M, Németh V, **Madai M**, Kemenesi G Dallos B, Péterfi Z, Sebők J, Bányai K, Wittmann I: Identification of hantavirus infection by western blot assay and TaqMan

PCR in patients hospitalized with acute renal failure. *4th Ceform*, Keszthely, Hungary, 16-18 October 2013.

Oldal M, Németh V, **Madai M**, Dóró R, Kemenesi G, Pintér R, Bányai K, Jakab F: Detecting Dobrava-Belgrade and Puumala virus infections in Hungarian forestry workers by ELISA and Western Blot analyses. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa*; Keszthely, 2012. október 24-26.

Madai M, Oldal M, Németh V, Horváth G, Dóró R, Kemenesi G, Pintér R, Bányai K, Jakab F: Prevalence of shrew-borne hantaviruses among insectivores captured in the transdanubian region of Hungary. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa*; Keszthely, 2012. október 24-26.

Németh V, **Madai M**, Bérczi B, Marácz A, Horváth G, Oldal M, Bányai K, Jakab F: Detection of Dobrava-Belgrade hantaviruses among *Apodemus* mice in Hungary and Northern Croatia. *6th European Congress of Mammalogy (ECM)*; Paris, France, 19-23 July, 2011.

Németh V, **Madai M**, Bérczi B, Marácz A, Horváth G, Oldal M, Kovács T, Bányai K, Jakab F: Serologic and genetic evidence of Dobrava- Belgrade and Saaremaa hantaviruses among *Apodemus* mice in Hungary and Northern Croatia. *International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance*; Vienna, Austria, 4- 7 February, 2011

Németh V, **Madai M**, Bérczi B, Marácz A, Horváth G, Oldal M, Kovács T, Jakab F: High prevalence of Dobrava-Belgrade and Saaremaa hantaviruses among *Apodemus* mice in Hungary and Northern Croatia. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa*, Keszthely, 2010. október. 12-15.

Németh V, **Madai M**, Bérczi B, Marácz A, Horváth G, Oldal M, Kovács T, Jakab F: Seroprevalence and genetic characterization of Dobrava and Saaremaa hantaviruses among rodents (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*) in Hungary and Northern Croatia. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Vienna, Austria, 10-13 April 2010.

Madai M, Bérczi B: Magyarországi és horvátországi erdei egerek (*Apodemus*) által hordozott Dobrava hantavírusok kimutatása és genetikai variabilitásának vizsgálata.

XXIX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció Veszprém, 2009. április 8-10.

Jakab F, **Madai M**, Bérczi B, Maráczai A, Horváth G, Ferenczi E: Genetic variability of Dobrava hantaviruses carried by Apodemus mice in Hungary and Croatia. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Kongresszusa, Keszthely, 2008. október 15-17.*