

# **Állatorvostudományi Doktori Iskola**

## **A nyugat-nílusi vírus magyarországi előfordulásának és virulenciájának vizsgálata**

PhD értekezés tézisei

dr. Szentpáli-Gavallér Katalin

2018

I. **Bevezetés**

A nyugat-níluszi vírust (West Nile virus, WNV) napjainkban világszerte az egyik legelterjedtebb, szúnyog terjesztette flavivírusként tartják számon (Rossi és mtsai 2010; Weissenböck és mtsai 2010).

Magyarországon

2003-ban

házimadarakból és vadmadarakból mutatták ki a vírust, valamint 2004-ben Magyarországon izoláltak először 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírustörzset Afrikán kívül (Bakonyi és mtsai 2006). Az említett genetikai vonal európai megjelenésével szükségessé vált az izolált vírusok alapos vizsgálata, mivel ezek a vírusok patogénebbeknek bizonyultak, mint más afrikai törzsek (Beasley és mtsai 2002). A WNV enzootiás ciklusát vadmadarak mint amplifikációs gazdák és szúnyogok mint biológiai vektorok tartják fenn. Európában elsődleges vektornak bizonyultak a Magyarországon is széles körben elterjedt *Culex* fajok és a *Coquillettidia richiardii* (Hayes és mtsai 1989; Higgs és mtsai 2004).

A WNV magyarországi megtelepedésének alapfeltétele volt a megfelelő amplifikációs madárfajok és ízeltlábú vektorok jelenléte.

Számos tanulmány foglalkozik az 1-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek virulencia markereinek felderítésével (Liu és mtsai 2006; Rossi és mtsai 2007; Audsley és mtsai 2011; Donadieu és mtsai 2013). Reverz genetikai rendszerek alkalmazásával számos alacsony neurovirulenciát és neuroinvazivitást okozó nukleotid-, illetve aminosav-változást derítettek fel mind a strukturális, mind a nem strukturális fehérjéket (NSP) kódoló gének esetében is (Wicker és mtsai 2006; Puig-Basagioti és mtsai 2007; Audsley és mtsai 2011; Wicker és mtsai 2012). Ellentétben az 1-es genetikai vonal vírusaival, a 2-es

genetikai vonalat ilyen szempontból kísérletes úton korábban nem vizsgálták. Potenciális virulenciamarkerek felderítése csupán *in silico*, magas és alacsony patogenitású törzsek teljes genomjának elemzésével és összehasonlításával történt (Botha és mtsai 2008).

Vizsgálataink célja az utóbbi évtizedben Magyarországon kimutatott flavivírus-fertőzések – elsősorban a WNV – nyomor követése, a WNV törzsek genetika jellemzése, járványtani sajátosságai és állategészségügyi, illetve közegészségügyi jelentőségük felderítése volt. Ennek érdekében munkánk egy része a vírusok fenntartásában és terjesztésében kulcsszerepet játszó vadmadarak és ízeltlábú

vektorok vizsgálatára irányult, passzív és aktív monitoring rendszerek felállításával. Célunk volt továbbá a Magyarországon előforduló WNV 2-es genetikai vonalához tartozó egyik hazai vírustörzs patogenitással összefüggő virulenciamarkereinek azonosítása. Ennek feltétele a vírus genetikai anyagát tartalmazó, teljes hosszúságú fertőző klón előállítása volt, amely genomjának mutagenezissel történő módosításával lehetővé vált a rekombináns vírusok tulajdonságainak *in vitro*, illetve *in vivo* vizsgálata.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

A felmérő vizsgálatok passzív és aktív

monitoringot jelentettek.

A passzív monitoring fő eleme idegrendszeri tünetekben megbetegedett vagy elhullott gerinces gazdák, főként vadmadarak – a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (NÉBIH ÁDI) laboratóriumaiba küldött, nemzeti parkok munkatársai által gyűjtött, állatkertekben és madármentő-állomásokon kezelt, valamint solymászok által nevelt madarak – mintái voltak. 2009 és 2015 között ez évente 79, 335, 241, 336, 354, 83, illetve 54 madárhulla vizsgálatát jelentette. A NÉBIH ÁDI-ba érkezett vadmadár hullákat WNV mellett egyéb flavivírusok jelenlétére is vizsgáltuk. Kisebb részben a NÉBIH ÁD

laboratóriumaiba, valamint az Állatorvostudományi Egyetem laboratóriumaiba küldött, idegrendszeri tüneteket mutató lovak mintáit is vizsgáltuk WNV és ellenanyagainak jelenlétére.

Az aktív monitoring során szúnyogokat gyűjtöttük a 2011 és 2012 év során, Magyarország öt földrajzi területén, összesen 24 gyűjtési ponton. A szúnyogok szezonális aktivitását figyelembe véve a gyűjtés május és szeptember hónapok között történt, bizonyos pontokon téli mintagyűjtéssel kiegészítve. A két év alatt összesen 23 193 szúnyogot (645 poolban) vizsgáltunk meg WNV jelenlétére. Ez 2011-ben 11 728, 24 különböző fajhoz tartozó szúnyogot, 2012-ben pedig 11 465, 18 különböző fajú szúnyogot jelentett. A



szúnyogok fajmeghatározása után az egyedeket faj, nem, gyűjtési hely és idő szerint csoportosítottuk, és maximum 50 egyedet tartalmazó poolokba rendeztük. A vadmadár és ló minták egyesével kerültek feldolgozásra. A minták homogenizálása után a virális RNS kivonása következett, majd a WNV nukleinsavát RT-PCR (reverz transzkripció polimeráz láncreakció) módszerrel mutattuk ki. A NÉBIH ÁDI-ba érkezett, heveny idegrendszeri tüneteket mutató lovakból gyűjtött savómintákat WNV elleni IgM-típusú ellenanyagok jelenlétére vizsgáltuk ELISA módszerrel.

**2.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenezise, *in vitro* és *in vivo***

## **patogenitás kísérletek**

A WNV-578/10 elnevezésű (GenBank azonosító: KC496015) vírustörzset egy 2010-ben a SZIE ÁOTK Üllői Nagyállatklinika idegrendszeri tüneteket mutató és végstádiumban leölt ló agyvelejéből származott. A vírustörzs legközelebbi genetikai rokonságban a Magyarországon 2004 óta cirkuláló, 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsekkel állt.

A vírus elszaporítása és koncentrációja után RNS-ének kivonása, majd a genomjáról készült teljes hosszúságú egyszálú komplementer DNS (cDNS) előállítását történ reverz transzkripció rendszerrel és genomspecifikus primerrel. A teljes hosszúságú fertőző klón előállítását két

módszerrel, egymással párhuzamosan történt. Az első módszer esetén a teljes hosszúságú kétszálú (ds) DNS-t fúziós PCR-ek alkalmazásával állítottuk elő. A módszer lényege a vírus teljes genomját lefedő, egymást átfedő polimeráz láncreakciók termékeiből felépülő fúziós PCR-ek sorozata volt. A második módszer hagyományos klónozási lépésekből állt. Lényege a vírus teljes genomját tartalmazó komplementer DNS alacsony kópiaszámú plazmidba való beépítése volt. A klónozáshoz Bálint és munkatársai (2012) által módosított pBeloBAC TGE (Wang és mtsai 1997) bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) vektort használtunk. A kiválasztott aminosav-változások eléréséhez szükséges pontmutációk meghatározása után a kívánt

nukleotid eltéréseket PCR alapú mutagenézissel hoztuk létre. A kívánt mutációt tartalmazó fragmentet restriktációs enzimes vágás majd ligálás útján jutattuk a plazmidba. A mutációk és a genomban elfoglalt helyük a következők voltak: C<sub>3218</sub>T az NS1 fehérje génben (P<sub>250</sub>L), G<sub>3613</sub>C az NS2A fehérje génben (A<sub>30</sub>P), C<sub>5357</sub>A az NS3 fehérje génben (P<sub>249</sub>H), és három mutáció az NS4B fehérje génben: CC<sub>7030-31</sub>GG (P<sub>38</sub>G), G<sub>7223</sub>C (C<sub>102</sub>S) és A<sub>7664</sub>G (E<sub>249</sub>G).

A vírusok transzfekciója BHK-21 sejtekbe történt, majd a keletkezett vad-típusú és módosított genommal rendelkező rekombináns RNS vírusokat *azin vitro* és *in vivo* kísérletekhez elegendő mennyiségben Vero E6 sejteken szaporítottuk el. Az *in vitro*

illetve *in vivo* kísérletek megkezdése előtt a vírusszuspenziók genomjának szekvenálásával ellenőriztük az adott mutáció meglétét.

A vad, illetve a rekombináns mutáns vírusok növekedési görbéit Vero E6 sejttenyészetben, 37°C-on, MOI (multiplicity of infection) = 0,1 mellett határoztuk meg. A felülúszókból egyrészt a fertőző vírustitert határoztuk meg, másrészt RNS-t vontunk ki. Bizonyos mintavételi időpontokban, ugyancsak RNS kivonás céljából, a sejtek is felvételre kerültek. Az RNS kópiák számát szál-specifikus qRT-PCR-rel határoztuk meg (Lir és mtsai 2013).

A *z in vivo* virulencia vizsgálatokhoz hathetes nőstény C57BL/6 egereket (Harlar

Laboratories B.V., Venray, Hollandia) intraperitoneálisan (i. p.) fertőztünk alacsonyabb (kb.  $10^1$ ) és magasabb (kb.  $10^4$ ) TCID<sub>50</sub> mennyiségű vad-típusú, illetve mutáns klón-eredetű nyugat-nílusi vírusokkal (8 egér/klón/dózis). Az elhullott (vagy eutanázián átesett) egerek agyát, majd a kísérlet végén az összes egér agyát és a magasabb dózisú vírussal fertőzöttek esetén a veséket is összegyűjtöttük. Az állatkísérlet engedélyét az Erasmus Medical Centre, Animal Ethics Committee állította ki (protokoll szám: 122-13-19).

### 3. **Eredmények**

#### **3.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok**

A vizsgált időszakban minden évben

sikerült a WNV nukleinsavát kimutatnunk, összesen 32 (évenként: 16, 6, 3, 2, 3, 1, 1) vadmadár mintából. A vizsgálati időszakban 416, heveny idegrendszeri tüneteket mutató, nyugat-nílusi vírusfertőzésre gyanús lóból gyűjtött savómintából pedig 74 esetben tudtunk WNV elleni IgM-típusú ellenanyagokat detektálni. A nyugat-nílusi vírussal rokon Usutu vírus (USUV) RNS-ét 5 fekete- és 5 fenyőrigó szerveiből sikerült kimutatni.

A kétéves (2011–2012) szúnyog felmérő vizsgálatok során a WNV kimutatására irányuló RT-PCR 2011-ben három pool esetében adott pozitív eredményt: egy Fényeslitkén júniusban gyűjtött közepes méretű (4–19 egyedet tartalmazó) nőstény *Ochlerotatus annulipes* pool, egy ugyancsak

közepes méretű, júliusban a debreceni Fancsika-tónál gyűjtött *Coquillettidia richiardii* pool, továbbá szeptemberben, egy 20–50 nőstény *Culex pipiens*-t tartalmazó, Kardoskút közelében található kékvércse fészkelő helyen gyűjtött pool esetében. A 2011-ben gyűjtött hím szúnyogok, mint ahogyan a 2012 évi összes szúnyog is, negatív eredményt adott.

A MIR (fertőzött szúnyogok aránya 1000 szúnyogra vetítve) számítások 2011-ben, amikor a három pozitív poolt találtuk, a következő eredményt adták: az összes szúnyogra együttesen számítva a MIR 0,25; fajonként pedig *Ochlerotatus annulipes* esetében 2,03, *Coquillettidia richiardii* esetében 0,63 és *Culex pipiens* esetében



2,70 lett.

### **3.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenezise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás vizsgálata**

A WN-NY99 vírustörzs (GenBank azonosító AF202541) és az 578/10-es vírustörzs (GenBank azonosító KC496015) teljes genomjának összehasonlítása során 2236 nukleotid (nt) eltérést (21%) találtunk. A nt és aminosav (AS) különbségek megfeleltek az 1-es és 2-es genetikai vonalú vírusok között általában mérhető eltéréseknek.

Annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon az 1-es genetikai vonalhoz tartozó WNV-okban azonosított virulenciamarkerek befolyásolják-e a magyarországi neuroinvazív,

2-es genetikai vonalhoz tartozó vírus virulenciáját, fertőző cDNS klónokat állítottunk elő és transzfektáltunk BHK-21 sejtekbe. Az *in vivo* transzkripciót követően az NS1 mutációt tartalmazó víruskészlet titere  $10^{4,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL maradt a kívánt  $6 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL helyett, ugyanis további passzálás esetén minden alkalommal elvesztettük a kívánt mutációt. Az NS4B102 mutációt tartalmazó rekombináns vírus pedig nem tudott megfelelő mennyiségben elszaporodni, ezért a további vizsgálatokból kizártuk.

A teljes genom-analízis során három mutáns klón esetében találtunk a kívánt mutáción felül még egy-egy nt eltérést, amelyből csak egy járt AS-szubsztitúcióval is. A két csendes nt változás a következő volt:

G-ről A-ra cserélődés a 627. nt helyen az NS1 klón esetében; A-ról G-re cserélődés a 6768. nt helyen az NS4B38 klón esetében. Az AS változással – valinról (V) izoleucin (I) – járó nukleotid cserét (G-ről A-ra a 7480. nt helyen), az NS4B249 klón NS4B fehérjéjének 188. helyén találtuk.

A rekombináns vírusok növekedési görbéjének statisztikai elemzése során az egy irányú ANOVA teszttel mintavételi időpontoként csoportosan vizsgálva, a mutáns rekombináns vírusok infektív titereinek átlaga minden mintavételi időpontban (12 óra p. i. – 96 óra p. i.) szignifikáns különbséget mutatott ( $p < 0,02$ ). Az egyes vírusok páronkénti statisztikai összehasonlítása a következő eredményeket adta: a vad-típusú

(WT) vírus 24 órával a fertőzés után mindegyik mutáns vírus, 72 óra eltelte után már csak az NS1 mutáns vírushoz hasonlítva ért el szignifikánsan magasabb titert. Az NS1 mutáns vírus nem csak a WT-hez viszonyítva, hanem minden mintavételi időpontban más mutáns vírusokhoz viszonyítva is szignifikánsan alacsonyabb titerben szaporodott el. Az RNS kópiák mennyiség meghatározásához az *in vitro* szaporított vírus meghatározott mintavételi időpontjaiban a felülúszóból és a sejtekből is elkülönítettünk megfelelő mennyiséget a szál-specifikus qRT-PCR vizsgálatokhoz. A WT és NS1 mutáns vírus felülúszóiban mért +RNS szálak mennyisége a fertőzés utáni 36 óráig növekvő különbséget mutatott, és bár a különbség ezután csökkent, még 96 órával p. i. is

szignifikánsnak bizonyult. Az intracelluláris +RNS szálak mennyiségének vizsgálatakor 24 óra p. i. már 0,9 log<sub>10</sub> nagyságrenddel magasabbnak mutatkozott a titere a WT vírus esetén mint az NS1-nél mért. A különbség a maximumát a felülúszóhoz hasonlóan 36 órával a fertőzést követően érte el, majd a különbség lassan csökkent, de végig szignifikáns maradt. Az intracellulárisan mért –RNS kópiák mennyisége már az első mintavételkor (12 óra p. i.) is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az NS1 vírus esetében, mint a WT vírusnál. A különbség szignifikáns maradt 24 óra p. i. és 36 óra p. i. mintavételi időpontokban is. 48 órával a fertőzést követően a szignifikáns különbség eltűnt.

A *z in vivo* kísérletet követően minden elhullott egér agyvelejéből kimutatható volt a virális RNS, a szekvenálás eredménye pedig igazolta a mutáció jelenlétét. A reziduális vírusfenmaradás felderítésének céljából a túlélő egerek agyából és veséjéből qRT-PCR-t végeztünk. Az NS1 vírusfertőzést túlélő 8 egér közül egy agyban találtuk meg a vírust, amely az eredeti formára revertálódott. Az NS2A, NS3 és NS4B249 vírusokkal való fertőzést túlélő egerek szerveiből izolált vírusok minden esetben megőrizték az általunk előidézett AS változást.

# I. Megbeszélés

## 4.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

A nyugat-nílusi vírus passzív monitorozása az utóbbi 15 évben előforduló WNV esetek és járványok kapcsár létjogosultságot nyert hazánkban. Az általunk vizsgált elhullott madarak változatos fajmegoszlást mutattak. A héjafélék érzékenységét bizonyítja, hogy az izolált 32 vírusból 14 héjából (*Accipiter gentilis*) származott. Európában a vírus járványmenetében fontos szerepet tulajdonítanak a házi verébnek (Castillo-Olivares és Wood 2004), amellyel összhangban van, hogy a Magyarországon végzett monitoring vizsgálataink során is

sikerült ebből a fajból WNV-t kimutatni. A feketerigó fogékonysága más flavivírusok irányába (pl. az USUV) ismert (Bakonyi és mtsai 2017), de úgy tűnik Európa területén a WNV terjesztésében is fontos szerepet játszik ez a madárfaj. Mindkét állítással összhangban vannak a vizsgálataink, ugyanis az elhullott madarak pan-flavi RT-PCR-es vizsgálata során, a WNV-n kívül a vele rokon USUV RNS-ét is sikerült detektálni feketerigókbar (*Turdus merula*).

Az aktív monitoring 2 éve alatt 3 szúnyog poolból mutattuk ki a WNV RNS-ét. Mindhárom szúnyogfaj széles körben elterjedt Európában és Magyarországon is, valamint áttelelni is képesek kontinentális éghajlaton. Ebből 2 fajt, a *Culex pipienst*, és a



*Coquillettidia richiardii* a nyugat-nílusi vírus elsődleges vektorának tekintjük Európában (Higgs és mtsai 2004; Reiter és mtsai 2010). Míg *C. pipiens* elsősorban ornitofil faj (Apperson és mtsai 2004), a *Coquillettidia richiardii* és az *Ochlerotatus annulipes* fő célpontja az emlősök, köztük az ember. Kisebb részben madaraktól is szívják vért, így a WNV szempontjából lehetséges közvetítő, „bridge vektorok” madarak és emlősök között (Kulasekera és mtsai 2001; Becker és mtsai 2003).

A magyarországi MIR adatok összhangban vannak az európai adatokkal, azonban a különböző tanulmányokban kapott eltérő MIR értékek összehasonlításával körültekintőnek kell lenni, mert

nagymértékben függenek a gyűjtés időpontjától, módjától és különböző környezeti tényezőktől is. Eltérő vektorkompetenciát nem csak a szúnyogfajok között, hanem fajon belül eltérő genotípusok (eltérő földrajzi helyekről gyűjtött szúnyogok) esetén is kimutattak (Richards és mtsai 2014). Az európai szúnyogok WNV fertőzést közvetítő szerepében az egyik legfontosabb korlátozó tényező valószínűleg a hőmérséklet. Ahhoz, hogy egy új vírus endémiássá váljon egy számára új területen, az elfogadható időjárási viszonyokon túl szüksége van megfelelő ízeltlábú vektorra és fogékony amplifikációs gazdára élelciklusának fenntartásához. Vizsgálataink eredménye alapján, a hazánkban minden évben vadmadarakban, lovakban és emberekben megjelenő

ugyanazon vírustörzs, továbbá az áttelelni képes szúnyogfajok potenciális vektorszerepének felderítése arra enged következtetni, hogy a WNV 2-es genetika vonalhoz tartozó törzse endémiássá vált Magyarországon és Közép-, illetve Dél-Európában.

#### **4.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenézise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás kísérletek**

A 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV-k sokáig nem tűntek olyan patogénnek, mint az 1-es vonalhoz tartozók, az elmúlt 10 évben hazánkban is megfigyelt esetek alapján azonban bebizonyosodott, hogy ehhez a genetikai vonalhoz is tartoznak neuroinvazív,

erősen patogén törzsek.

Munkánk során, egy Magyarországon izolált vírustörzs teljes hosszúságú fertőző klónját állítottuk elő reverz genetikai módszerekkel, és genomjában pontmutációkat idéztünk elő. Olyan AS változásokat váltottunk ki az NSP-ket kódoló genomszakaszokban, amelyek attenuáló hatásai az 1-es genetikai vonalban már ismertek voltak.)

A flavivírusok NS fehérjéi számos funkciót látnak el. Az NS1 nem strukturális fehérje nélkülözhetetlen a virális RNS replikációjában, illetve immunmoduláns funkciói vannak. A WNV 1-es genetikai vonalához tartozó vírusokkal kapcsolatos kísérletekben a P250L mutáció következtében

egyrészt a fehérje konformációja megváltozik, a dimer forma helyett monomer forma szekretálódik a sejt felszínére, másrészt a sérült NS1 génnel rendelkező WNV ugyan lefordítódik, de nem képez szabályos replikációs komplexet, így replikációja nagymértékben lelassul (Hall és mtsai 1999). Kísérleteinkben *in vitro* és *in vivo* is szignifikáns attenuációt tapasztaltunk a P250L mutációt tartalmazó vírus esetében. A neurovirulencia olyannyira lecsökkent, hogy sem alacsonyabb, sem magasabb dózissal fertőzött egerek közül egyetlen egy nem pusztult el. A WNV-1-es vírusoknál megfigyelt és a mi kísérleteink során tapasztalt, eltérő attenuáló képességet azonban befolyásolhatta az *in vivo* kísérletekben használt egértörzs vagy az egerek különböző

életkora is. Az sem kizárható, hogy az NS1 mutáns vírus teljes genom szekvenálása során talált további csendes nukleotid mutáció (G627A) hatással volt a vírus attenuálódására. Nem utolsó sorban pedig az 1-es és 2-es genetikai vonal vírusai közötti egyéb genetikai eltéréseknek (kb. 25% AS eltérés) is szerepe lehet egy-egy genetikai marker virulenciára kifejtett hatásában. A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az NS1 fehérje P250L mutációja attenuáló hatású, illetve, hogy az NS1 fehérjének a WNV replikációjában szerepe van.

Az NS2A kisméretű fehérje, szerepe van a vírus összeépülésében és a veleszületett immunitás gátlásában. Az A30P mutációnak a

WNV-1 törzsekben eltérő attenuáló hatást tulajdonítanak a különböző tanulmányokban (Rossi és mtsai 2007; Audsley és mtsai 2011). Kísérleteinkben sem a replikációs kinetikában, sem pedig az egérfertőzési kísérletekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást a vad típusú vírushoz viszonyítva.

Az NS3 fehérje multifunkcionális enzim, így fontos szerepe van a virális poliprotein hasításában, az RNS érésében és replikációjában. A WNV-1-es vírusokkal folytatott kísérletekben *in vivo* jelentős attenuálódás jelentkezett a P249T mutáció hatására varjufélékben (Braut és mtsai 2007). Egér modellben viszont ugyanezen mutációnak minimális hatása volt a virulenciára (Langevin és mtsai 2014).

Vizsgálatainkban a 578/10-es törzsben előforduló P-t H-ra cseréltük. (Ezt az is indokolta, hogy míg a 2004-es első WNV 2-es héjából izolált vírus ezen a helyen H-t, a Görögországban 2010-ben súlyos emberi járványt okozó törzs P-t tartalmaz). Kísérleteinkben *in vivo* részleges, de nem szignifikáns attenuációt tapasztaltunk, annak ellenére, hogy az *in vitro* kísérletben a Vero sejtek fertőzése után 3 mintavételi időpontban is szignifikánsan alacsonyabb titert mértünk. Úgy tűnik, az NS3 fehérje 249. aminosavának virulenciára kifejtett hatása valószínűleg csak madarakban jelentős.

Az NS4B fehérje az NS4A és NS2A fehérjékkel együttműködve az interferon-szignalizációs kaszkád gátlásán keresztül



jelentős interferon-antagonista hatású. A P38G mutáció *in vitro* hőérzékenységgel, *in vivo* nagyfokú attenuációval társult WNV-1-es törzsek vizsgálatakor (Welte 2011, Wicker 2012). Kísérleteinkben a P38G mutáció nem volt hatással a vírus replikációjára Vero sejteken, és annak ellenére, hogy ugyanazon egérvonalban és ugyanolyan életkorban fertőztük az egereket, mint Welte és mtsai (2011), *in vivo* attenuálódást sem tapasztaltunk. Úgy tűnik ennek a mutációnak nincs jelentős szerepe a WNV 2-es vírus virulenciájának meghatározásában, azonban nem zárhatjuk ki a további mutációk (WNV-1 és 2 esetében is), illetve a két genetikai vonal egyéb genombeli eltérésének befolyásoló hatását.

Az NS4B fehérje C102S mutációja WNV-1-es vírusoknál hőérzékenységgel és *in vivo* attenuációval társult (Wicker és mtsai 2006). Az 578/10-es törzs szaporodása drámai módon lecsökkent, olyannyira, hogy a sejttenyészeteken nem volt CPE és nem lehetett fertőző titert mérni a mutáns vírus transzfektálása után.

Az NS4B fehérje E249G mutációja számos WNV törzsben természetesen is előfordul. Virulenciára kifejtett hatásának megítélése a WNV-1-es törzseknél változatos (Puig-Basagioti és mtsai 2007, Rossi és mtsai 2007). Kísérleteink során *in vitro* a WT vírushoz hasonló titert mértünk, *in vivo* pedig kis mértékben (nem szignifikánsan) alacsonyabb mortalitást tapasztaltunk.

Összességében a kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a két genetikai vonal (1-es és 2-es) vírusai ugyan részben hasonlítanak egymásra, patogenitásukat nem feltétlenül ugyanazok a genetikai tényezők befolyásolják.

## 5. Új tudományos eredmények

1. A magyarországi WNV passzív monitoring rendszerének felállítása, és ennek keretében két évig tartó szúnyoggyűjtés és vizsgálat megszervezése. A WNV kimutatása *Ochlerotatus annulipes*, *Coquillettidia richiardii* és *Culex pipiens* szúnyog vektorokból.
2. A hazai izolálású WNV 2-es genotípushoz tartozó WNV-578/10 vírustörzs teljes genomszekvenciájának meghatározása.

3. Az WNV-578/10 vírustörzs teljes hosszúságú fertőző klónjának előállítása, valamint mutagenézissel történő genetikai módosítása, és ennek során hat, egy-egy pontmutációt (NS1 (P250L), NS2A (A30P) NS3 (P249H) NS4B (P38G, C102S E249G)) tartalmazó klónvírus előállítása.
4. A vad típusú és rekombináns mutáns vírusok Vero E6 sejttenyészetben történt *in vitro* és egér modellben való *in vivo* virulencia vizsgálataival egy, a WNV-578/10 vírustörzs szignifikáns attenuációját okozó pontmutáció (NS1 P250L), valamint egy, a vírust szaporodásképtelenné tevő (NS4B C102S) és négy, a virulenciát kevésbé befolyásoló pontmutáció (NS2A A30P, NS3 P249H, NS4B P38G és E249G) hatásána

felderítése.

### 3. **A doktori kutatás eredményeinek közlései**

Referált szakfolyóiratban megjelent közlemények:

1. **Szentpáli-Gavallér K.**, Antal L., Tóth M., Kemenesi G., Soltész Z., Dán Á., Erdély K., Bányai K., Bálint Á., Jakab F., Bakonyi T.: Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011–2012 in Hungary. *Vector Borne and Zoon. Dis.*, 14(9). 648–655. 2014.
2. **Szentpáli-Gavallér K.**, Lim, S. M., Dencs L., Banyai K., Koraka, P., Osterhaus, A. D., Martina, B. E., Bakonyi T, Balint A.: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of Mutations in the NS Region of Lineage 2 West Nile

Virus Associated with Neuroinvasiveness in a Mammalian Model. *Viruses*, 8(2). 49. 2016.

3. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bálint Ádám, Somhegyiné Barna Mónika, Bakonyi Tamás: A nyugat-nílusi vírus hazai előfordulása szúnyogvektorokban és gerinces gazdáiban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138. 431–439. 2016.
4. Sárdi Sára, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Bakonyi Tamás, Szenci Ottó, Kutas Orsolya: Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy, és gerincvelő gyulladása. Irodalmi áttekintés. West Nile virus encephalomyelitis in horses. Literature review. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 134.

707–717. 2012.

5. Soltész Zoltán, Erdélyi Károly, Bakony Tamás, Barna Mónika, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Solt Szabolcs, Horváth Éva, Palatitz Péter, Kotymán László, Dán Ádám Papp László, Harnos Andrea, Fehérvár Péter: West Nile virus host–vector–pathogen interactions in a colonial raptor. *Parasites & Vectors*, 10(1). 449. 2017.

## Konferencia előadások, poszterek:

1. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bakonyi Tamás: A nyugat-nílusi vírus diagnosztikájában használt molekuláris biológiai módszerek összehasonlítása. MTA Akadémiai beszámoló. Budapest, 2011. jan. 25.
2. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Bálint Ádám, Dencső László, Dán Ádám, Erdélyi Károly Bakonyi Tamás. Nyugat-nílusi vírus teljes hosszúságú fertőző klónjának előállítása, patogenitás markerek vizsgálatának céljából. MTA Akadémiai beszámoló. Budapest, 2012. jan. 17.
3. Bakonyi Tamás, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Papp László, Soltész Zoltán, Kemenesi Gábor, Bernhard Seidel, Zdenek



Hubálek, Norbert Nowotny: Detection of West Nile virus in culicid mosquitoes in Central Europe. 6th European Mosquito Control Association Workshop (EMCA 2011). Budapest, 2011. szept. 12–15.

4. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Antal László, Tóth Mihály, Kemenesi Gábor, Soltész Zoltán, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bánya Krisztián, Bálint Ádám, Jakab Ferenc Bakonyi Tamás: Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011–2012, Hungary. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2013. évi nagygyűlése. Keszthely, 2013. okt. 16–18. (poszter)

## Irodalomjegyzék

- Apperson et al. 2004: Vector Borne Zoonotic Dis. 4:82.
- Audsley et al. 2011: Virology. 414:63–73.
- Bakonyi et al. 2006: Emerg. Infect. Dis. 12:618–623.
- Bakonyi et al. 2017: Emerg. Micr. Inf. 6:e85.
- Bálint et al. 2012: J. Virol. 86:6258–6267.
- Beasley et al. 2002: Virology. 296:17–23.
- Becker et al. 2003: Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York. 498.
- Botha et al. 2008: Emerg. Infect. Dis. 14:222–230.
- Brault et al. 2007: Nat. Genet. 39:1162–1166.
- Castillo-Olivares and Wood. 2004: Veterinary Research. 35:467–483.
- Donadieu et al. 2013: Viruses. 5:2856–2580.
- Hall et al. 1999: Virology. 264:66–75.

- Hayes et al. 1989: *Monath TP*. vol. V. Boca Raton (FL): CRC Press. 59–88.
- Higgs et al. 2004: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98:82–87.
- Kulasekera et al. 2001: *Emerg. Infect. Dis.* 7:722–725.
- Langevin et al. 2014: *PLoS One*. 9:e100802.
- Lim et al. 2013: *J. Virol. Methods*. 194:46–53.
- Liu et al. 2006: *J. Virol.* 80:2396–2404.
- Puig-Basagoiti et al. 2007: *Virology*. 361:229–241.
- Reiter. 2010: *Euro Surveill*. 15:19508.
- Richards et al. 2014: *Trop. Med. Int. Health*. 19:610–617.
- Rossi et al. 2007: *Virology*. 364:184–195.
- Rossi et al. 2010: *Clin. Lab. Med.* 30:47–65.
- Wang et al. 1997: *Biotechniques*. 23:992–994.

Weissenböck et al. 2010: *Vet. Microbiol.* 140:271–280.

Welte et al. 2011: *Vaccine.* 29:4853–4861.

Wicker et al. 2006: *Virology.* 349:245–253.

Wicker et al. 2012: *Virology.* 426:22–33.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bakonyi Tamás**nak, a kutatások alatt nyújtott segítőkézségéért, a pályázatok sikeres lebonyolításáért, és hogy lehetővé tette számomra a rotterdami EMC-ben elvégezni az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Dán Ádámnak** a szúnyog és vadmadár felmérő vizsgálatok során nyújtott segítségét és mindazt, amit a molekuláris biológia területén Tőle tanulhattam.

Hálával tartozom **Dr. Bálint Ádámnak**, aki idejét és energiáját nem sajnálva bevezetett a reverz genetika rejtelseibe, a sokszor nehézségekbe ütköző klónozási folyamat során mutatott szakmai iránymutatásáért, az

Ő segítségével nem jöhettek volna létre a WNV mutáns vírusok.

Köszönet illeti a rotterdami **Erasmus Medical Center** munkatársait, kiemelve **Dr. Byron E. Martinát** és **Penelope Korakát** a szakmai-, illetve **Stephanie Limet** az *in vitro* és *in vivo* kísérletekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm **Dr. Abonyi Tamásnak**, a NÉBIH-ÁDI igazgatójának hogy lehetőséget biztosított a kutatás elvégzésére és külföldi tartózkodásaimra.

Hálával tartozom **Dencső Lászlónak** a klónozási lépések szakszerű kivitelezéséért és hogy mindig rendelkezésre állt, amikor szükségem volt a segítségére.

Köszönettel tartozom **Dr. Bányai Krisztiánnak** a mindig gyors és magas színvonalú segítő munkájáért.

Köszönöm **Dr. Erdélyi Károlynak** a vadmadár minták rendelkezésemre bocsátását.

Külön köszönettel tartozom a **NÉBIH ÁD Sertés és Baromfi Virologiai Laboratórium**, valamint a **Molekuláris Biológiai Laboratórium** dolgozóinak minden segítségükért.

Köszönöm az entomológus szakembereknek, **Soltész Zoltánnak**, **Kemenesi Gábornak**, **Tóth Mihálynak**, **Jakab Ferencnek** és **Antal Lászlónak** a szúnyogminták csapdázását és azonosítását.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat fejezem ki a családomnak a támogatásért, türelemért és gondoskodásért, amit folyamatosan biztosítottak számomra.

A kutatásokat az „EDENext”

(FP7,HEALTH,2010/261504,  
<http://www.edenext.eu>) és a „VECTORIE  
(FP7,HEALTH,2010/261466,  
<http://vectorie.eu>), Európai Unió kutatási  
programok támogatásával végeztük.