

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

A nyugat-nílusi vírus virulencia markereinek vizsgálata

Készítette: Kuczmog Zita

Témavezetők:

dr. Szentpáli-Gavallér Katalin
laboratóriumi állatorvos, NÉBIH, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Baromfi és
Sertés Viroológiai Laboratórium

dr. Bakonyi Tamás
egyetemi docens, SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Budapest
2014.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Történet, elterjedés.....	2
2.2. Terjedési módok, gazdák.....	3
2.3. Nagyobb járványok.....	6
2.4. A nyugat-nílusi vírus Magyarországon.....	8
2.5. A vírus szerkezete és életciklusa.....	8
2.6. Filogenetika.....	10
2.7. Klinikai tünetek.....	12
2.8. Patogenezis.....	14
2.9. Patológia.....	15
2.10. Immunitás.....	16
2.11. Diagnosztika.....	17
3. Anyag és módszer.....	18
3.1. A kiindulási vírus elszaporítása.....	18
3.2. RNS kivonás és komplementer DNS (cDNS) szintézis.....	18
3.3. Plazmid és kompetens sejtek.....	18
3.4. A teljes hosszúságú duplaszálú DNS előállítása fúziós PCR-ek alkalmazásával.....	19
3.5. A teljes hosszúságú fertőző klón előállítása hagyományos klónozási lépések által.....	20
3.6. Szekvencia analízis.....	22
3.7. Pontmutációk létrehozása a WNV genomban.....	22
3.8. Transzkripció.....	23
4. Eredmények.....	25
4.1. A nyugat-nílusi vírus teljes hosszúságú fertőző klónjának előállítása.....	25
4.2. A klónvírusok kifejeződése sejtvonalakon.....	26
5. Megbeszélés.....	29
6. Összefoglalás.....	32
7. Summary.....	33
8. Irodalomjegyzék.....	34

8.1. Folyóirat cikkek	34
8.2. Könyvek	39
9. Köszönetnyilvánítás	40

Rövidítések jegyzéke

A: adenin / alanin

BAC: bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial artificial chromosome)

BHK: újszülött hörcsög vese (baby hamster kidney)

C: citozin / cisztein

cDNS: komplementer DNS

CMV: cytomegalovírus

CNS: központi idegrendszer (central nervous system)

CPCV: Cacipacore vírus

CPE: citopatogén hatás (cytopathogen effect)

DNS: deoxiribonukleinsav

E: glutaminsav

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

ER: endoplazmatikus retikulum

FBS: főtális borjúsavó (fetal bovine serum)

G: guanin / glicin

H: hisztidin

HAG: hemagglutináció gátlási próba

JEV: a Japán encephalitis vírus

KOUV: Koutango vírus

L: leucin

MEM: minimum essential medium

MVEV: Murray Valley encephalitis vírus

NS: nemstrukturális (nonstructural)

nt: nukleotid

RdRp: RNS dependens RNS polimeráz

+ssRNS: pozitív irányítottágú szimplaszálú RNS

P: prolin

PBS: foszfátpuffer (phosphate buffered saline)

PCR: polimeráz láncreakció

PRNT: plakk redukciós neutralizációs teszt

RNS: ribonukleinsav

RT: reverz transzkripció

S: szerin

SLEV: St. Louis encephalitis vírus

T: timin

TLR: toll-like receptor

T_m: olvadási hőmérséklet (melting temperature)

TNF: tumor nekrosis faktor (tumor necrosis factor)

U: uracil

USUV: Usutu vírus

UTR: nemkódoló régió (untranslated region)

Vero: afrikai zöld majom vese epithel (African green monkey kidney epithel)

WNV: West Nile virus, nyugat-nílusi vírus

YAOV: Yaoundo vírus

1. Bevezetés

A nyugat-nílusi vírust az első leírását követő időkben nem tekintették jelentős kórokozónak, hiszen az esetek többségében a fertőzés tünetmentes maradt (MONINI, et al., 2010) vagy enyhe lefolyású, influenzaszerű tünetekkel járó, lázas megbetegedést okozott (HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999; ROSSI, et al., 2010). A későbbiekben a nyugat-nílusi vírus számos - halálos áldozatokat is követelő - agyvelőgyulladással járó megbetegedést okozott emberekben és lovakban, így a kórokozó egyre inkább az orvosi és állatorvosi érdeklődés középpontjába került (MONINI, et al., 2010).

Egy évtizeddel ezelőttig Afrikán kívül csak az egyes genetikai vonalhoz tartozó törzseket találták meg, azonban 2004-ben Magyarországon is igazolták egy, a kettes genetikai vonalhoz tartozó vírustörzs jelenlétét (BAKONYI, et al, 2006). A kettes genetikai vonal európai megjelenésével szükségessé vált a vírus ide tartozó törzseinek alapos vizsgálata is, hiszen a kettes genetikai vonalba tartozó törzsek jelentős eltéréseket mutatnak az egyes genetikai vonal törzseihez képest patogenitásukat, elsősorban neuroinvazivitásukat tekintve.

Vizsgálatunk célja egy, a nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalához tartozó, teljes hosszúságú fertőző klón létrehozása, majd ezt követően - a vírus genetikai anyagának módosításával - olyan virulencia markerek vizsgálata volt, amelyek irodalmi adatok alapján az egyes genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsekben attenuálódáshoz vezettek *in vitro*, illetve *in vivo*. A kiválasztott virulencia markerek magyarországi izolátumokban való azonosítása után hat különböző molekuláris klón felépítését és jellemzését tűztük ki célul.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Történet, elterjedés

A nyugat-nílusi vírust (West Nile virus, WNV) elsőként Uganda West Nile tartományában, 1937-ben Smithburn és munkatársai izolálták egy lázas tüneteket mutató őslakos nő véréből. Különböző állatfajok egyedeit mesterségesen fertőzték a vírussal, és ezt követően megbetegedést tapasztaltak a fertőzött egerekben és *Rhesus* majmokban (ez utóbbiakban agyvelőgyulladás alakult ki), ugyanakkor a kísérletbe bevont tengerimalacok, nyulak, sünök és *Cercopithecus* majmok tünetmentesek maradtak. Az érintett egerek szérumból specifikus ellenanyagokat tudtak kimutatni, melyeket vírus neutralizációs próba segítségével vizsgálva immunológiai rokonságot fedeztek fel a WNV és a japán encephalitis vírus között (SMITHBURN, et al., 1940). A következő évtizedekben a WNV jelenlétét az Óvilág jelentős részén leírták: Afrikában, a Közel-Keleten, Ázsia és Európa számos pontján és Ausztráliában is (Kunjin vírus szubtypus) (GOULD és FIKRIG, 2004). Az 1950-es évek elején Egyiptomban emberekből, madaraktól, lovakból és szúnyogokból is izolálták (HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999), és a Nílus-delta területén a humán populációnak kb.40%-át szeropozitívnak találták WNV ellenanyagokra nézve (RAPPOLE, et al., 2000). A nyugat nílusi vírus európai jelenlétét 1958-ban igazolták először, amikor Albániában két ember vérében találtak specifikus WNV ellenanyagokat. 1963-ban magát a kórokozót is sikerült izolálni emberekből és szúnyogokból a Rhône-deltában (Camargue tartomány, Franciaország), valamint emberekből és *Hyalomma marginatum* kullancsokból a Volga-deltában. A következő években a vírus jelenlétét Európa számos országában kimutatták (HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999). A nyugat nílusi vírus az 1990-es évek végén az Újvilágban is leírásra került: 1999 augusztusának végén Queens északi részének egyik kórházában egy fertőző betegségekre specializálódott orvos figyelt fel két idős, meningoencephalitiszes páciensre, majd értesítette a New York-i Egészségügyi Minisztériumot. Ezt követően hat hasonló esetet találtak a környező kórházakban. A haematológiai vizsgálatok és a liquorminták vizsgálata alapján vírusos megbetegedést állapítottak meg a meningoencephalitis háttérben, mind a nyolc páciensnél. ELISA vizsgálat segítségével az összes mintát pozitívnak találták St.Louis encephalitis vírus ellenanyagokra. A klinikai tünetek, a laboratóriumi vizsgálatok és a járványtani viszonyok (a St.Louis encephalitis enzootiás Észak-Amerikában) alapján az eseteket egy St.Louis encephalitis járványnak vélték. Az emberi megbetegedésekkel egy időben számos amerikai rövidcsőrű varjú (*Corvus brachyrhynchos*) elhullását tapasztalták New York-szerte, és tömeges

megbetegedést észleltek a Bronx Zoo egzotikus madarainak körében (NASH, et al., 2001; BRAULT, et al., 2007). Az elhullott madarak kórbonctani vizsgálata során encephalitist diagnosztizáltak, de a tetemekből vett mintákat negatívnak találták az elterjedt madárpáthogénekre nézve (NASH, et al., 2001). Kezdetben nem feltételeztek kapcsolatot a madarak elhullása és az emberi megbetegedések között, mivel a St.Louis encephalitis általában nem jár fatális következményekkel madarakban. A későbbiekben sikerült izolálni a WNV-t a madártetemekből. A humán esetek további szerológiai és virológiai vizsgálatával bebizonyosodott, hogy mind az emberi megbetegedések, mind a madarak körében tapasztalt elhullások hátterében a WNV áll (NASH, et al., 2001; BRAULT, et al., 2007). Első újkövületi felbukkanását követően az amerikai kontinens egyre nagyobb részén írták le a WNV jelenlétét. 2003 végére már 48 amerikai tagállamban kimutatták a vírus jelenlétét. Kanadában 2001-ben madaraktól, 2002-ben pedig emberektől is izolálták a vírust. 2002-ben vírusneutralizációs próba segítségével WNV ellenanyagokat mutattak ki Jamaicában és a Dominikai Köztársaságban madaraktól, valamint Mexikóban lovakból. Ezt követően egy emberi megbetegedést is leírtak a Karib-térségben (GOULD és FIKRIG, 2004).

2.2. Terjedési módok, gazdák

A nyugat-nílusi láz kórokozója az arthropode-borne vírusok (arbovírusok) közé tartozik, vagyis a gerinces gazdák közötti átvitelében az ízeltlábú vektorok kulcsfontosságúak. A WNV legfontosabb vektorai a *Culex* szúnyogok, de a kórokozó jelen van többek között az *Anopheles*, *Aedes*, *Coquillettidia* és *Ochlerotatus* fajokban is (GOULD és FIKRIG, 2004). Eddig világszerte több mint 70 különböző szúnyogfajból sikerült izolálni a WNV-t, de csak egy részüknek tulajdonítanak jelentőséget vektorként. Egy szúnyog akkor lehet kompetens biológiai vektor, ha képes megfertőződni a vírussal, a vírus el tud benne szaporodni és a szúnyog a nyálmirigyében hordozott kórokozót át tudja adni a fogékony gazdának (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; MONINI, et al., 2010). A szúnyogban történő replikáció, valamint a nyálmirigybe való behatolás időtartamát jelentősen befolyásolja a környezeti hőmérséklet és páratartalom: meleg időben a folyamat nagyjából két hetet vesz igénybe. A vektorok szaporodására, aktivitására is nagy hatással vannak a környezeti körülmények, így a mérsékelt égövi területeken a nyugat nilusi láz járványok kifejezett szezonális mutatókat mutatnak (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). A legtöbb eset júliustól szeptemberig figyelhető meg, amely egybeesik a szúnyogok maximális aktivitásának időszakával (HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999).

A vírus a természetben *sylvaticus* (enzootiás, *exoanthropicus*) ciklus formájában marad fenn, melynek kialakításában vadmadarak és *ornithophil* szúnyogok (*Cx.univittatus*, *Cx.tarsalis*, *Cx.modestus*) vesznek részt. Emellett egy urbán (epizooticus, *synanthropicus*) ciklus is létezik, amelyben az emberi környezetben élő madarak és olyan szúnyogok szerepelnek, melyek madarakon és emlősökön egyaránt tudnak táplálkozni (*Cx.pipiens pipiens*, *Cx.quinquefasciatus*)(HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999; MONINI, et al., 2010). A *Cx.pipiens* két formája (*pipiens* és *molestus*) valamint a *Cx.quinquefasciatus* közeli rokon fajok (a *Cx.pipiens* komplex tagjai). Ezen fajok a mérsékelt és a trópusi égövben egyaránt elterjedtek, a városi és a vidéki környezetben is. A *Cx.pipiens* elsősorban *ornithophil* (madarakon táplálkozó) szúnyognak tartották, így leginkább a *sylvaticus* ciklus fenntartásában tulajdonítottak neki kiemelt jelentőséget. Az utóbbi években az Egyesült Államokban leírták a *Cx.pipiens* két formájának intenzív hibridizációját és megállapították, hogy az olyan hibridek, amelyek ősei között több a *molestus*, szívesebben táplálkoznak embereken vagy egyéb emlősökön. Ezen eredmények ismeretében a kutatók egyre inkább úgy gondolják, hogy a *Cx.pipiens* fontos „bridge vector”, vagyis jelentős szerepe van a nyugat-nílusi láz kórokozójának madarokról emberekre (és más emlősökre) történő átvitelében (FARAJOLLAHI, et al., 2011). A WNV vertikális terjedését (a kórokozónak a fertőzött nőstény szúnyogból az utódaiba történő átjutását) számos szúnyogfaj esetében igazolták (GODDARD, et al., 2003). Továbbá a WNV-t sikerült kimutatni hibernálódott szúnyogokból is, ami bizonyítja, hogy a kórokozó képes áttelelni a fertőzött vektorokban (CALISTRI, et al., 2010; FARAJOLLAHI, et al., 2011; HAYES, et al., 2005). A WNV-t megtalálták már óvantagokban és kullancsokban is. Laboratóriumi körülmények között az óvantagok közé tartozó *Argas arboreus* képes volt átvinni a WNV-t csirkékre, illetve különböző *Ornithodoros* fajok egereket tudtak fertőzni. Az *Amblyomma*, *Dermacentor* és *Ixodes* kullancsok fertőződtek ugyan a vírussal, de a későbbi vérszívás alkalmával nem oltották át a kórokozót a fogékony gazdáikba. Így valószínűtlen, hogy az óvantagok és a kullancsok jelentős szerepet játszanának a vírus átvitelében (HAYES, et al., 2005).

A WNV elsődleges gazdái a madarak. Szemben a lúdalakúakkal (*Anseriformes*) és a harkályalakúakkal (*Piciformes*) a verébalakúak (*Passeriformes*), a lilealakúak (*Charadriiformes*), a bagolyalakúak (*Strigiformes*) és a sólyomalakúak (*Falconiformes*) amplifikációs gazdák, vagyis bennük a vírus elég magas titert ér el ahhoz, hogy a rajtuk vért szívó szúnyogok fertőződjenek (HAYES, et al., 2005). Európában és az Egyesült Államokban egyaránt a házi verébnek (*Passer domesticus*) tulajdonítanak fontos szerepet a vírus járványmenetében, hiszen ez a madár nagy számban él az emberi környezetben (CASTILLO-

OLIVARES és WOOD, 2004). A madarak általában tünetmentes hordozók, de a közel-keleti és a New York-i West Nile encephalitis járványok idején számos madár elhullását figyelték meg (LANGEVIN, et al., 2005), továbbá 2003 nyarán Magyarországon 14%-os mortalitást tapasztaltak hathetes házi ludak (*Anser anser domesticus*) között, valamint egy évvel később - szintén Magyarországon - egy héja hullott el a WNV által előidézett idegrendszeri megbetegedésben (BAKONYI, et al., 2006). Amerikai rövidcsőrű varjakban (*Corvus brachyrhynchos*) a WNV bizonyos törzsei magas szintű virémiát és nagyarányú elhullást okoznak (BRAULT, et al., 2004). Ezen madarak „sentinel fajként” használhatók a WNV aktivitásának vizsgálata során, köszönhetően a vírus iránti magas fogékonyságuknak és annak, hogy nagy számban élnek az emberek közvetlen környezetében (BRAULT, et al., 2007).

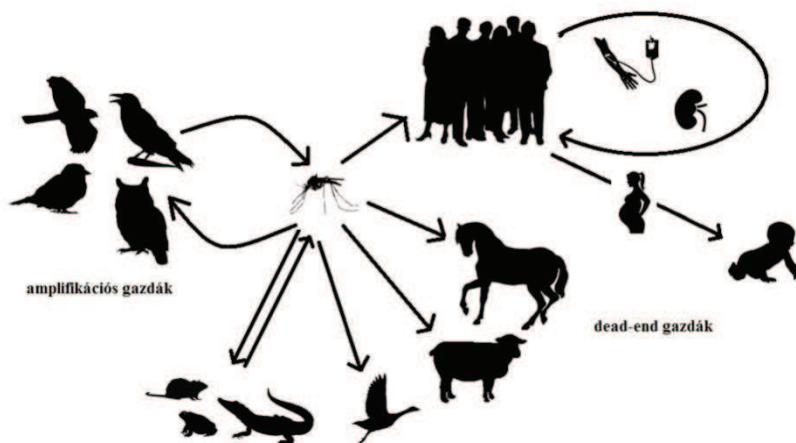
Számos emlős, hüllő és kétéltű fogékony a természetes és kísérletes WNV fertőzésekre, de a többségük (az ember és a ló is) csak alkalmi, véletlenszerű, „dead-end” gazda, vagyis bennük a vírus titere nem ér el kellően magas értéket ahhoz, hogy a rajtuk vért szívó szúnyogok fertőződjenek (MONINI, et al., 2010; ROSSI, et al., 2010). Azonban bizonyos rágszáló, nyúl, mókus fajok, a mississippii alligátor (*Alligator mississippiensis*) és a kacagó béka (*Rana ridibunda*) is kompetens rezervoárnak bizonyult (HAYES, et al., 2005; MONINI, et al., 2010).

A WNV terjedésében a vándormadaraknak fontos szerepet tulajdonítanak: a madarak az afrikai telelőhelyeken fertőződhetnek, majd tavasszal visszatérnek Európába és így behurcolhatják a kórokozót a kontinensre. A városok közelében található vizes élőhelyek lehetőséget teremtenek a vándormadarak, a vektorok és a helyi településeken élő madarak találkozására. A madarak áprilisi, májusi megérkezését követően a szúnyogok fertőződnek, bennük a vírus amplifikálódik, majd bekerül a helyi - az emberi településeken is nagy számban megtalálható - madarak populációjába, vagyis a sylvaticus ciklus mellett az urbán ciklus is kialakul. Mindezek eredményeként nyár végén vagy ősz elején kialakulnak a járványok az emberek és a lovak körében. Ezt az elméletet támasztja alá az a megfigyelés, hogy a járványok leggyakrabban folyótorkolatok, lápok, árterek közelében, júliustól szeptemberig jelentkeznek (HUBÁLEK és HALOUZKA, 1999; HAYES, et al., 2005; MONINI, et al., 2010).

Több feltételezett válasz is van arra a kérdésre, hogy a WNV hogyan került be az Egyesült Államokba. Behurcolhatták állatkerteknek, állatkereskedéseknek szállított vagy az Atlanti-óceánt átrepülő madarak, repülőgépeken megbújó szúnyogok is (GOULD, 2003). Ezek közül a vándormadarakkal kapcsolatos elméletet tartják a legkevésbé valószínűnek,

hiszen az eurázsiai madarak fő telelőhelye Nyugat-Afrikában van, így ezek a madarak legnagyobb valószínűséggel a vírusnak a nyugat-afrikai formáját hurcolhatták volna be az amerikai kontinensre, ugyanakkor a New York-i járványokat okozó vírustörzs egy közeli törzzsel mutat szoros genetikai rokonságot. Ez utóbbi pedig jelentősen eltér a nyugat-afrikai törzstől (RAPPOLE, et al., 2000).

A WNV fennmaradásában és terjedésében tehát a szúnyogoknak kulcsszerepe van, de léteznek egyéb, a szúnyogoktól független átviteli utak is. 2002-ben egy, a második trimeszterben járó várandós nő fertőződött a West Nile vírussal, és intrauterin módon átadta a kórokozót a gyermekének, aki súlyos agyi rendellenességekkel született. Az újszülött szérumból és cerebrospinális folyadékából WNV - specifikus ellenanyagokat tudtak kimutatni. Szintén 2002-ben anyatejjel, vérátömlesztéssel és szervátültetéssel történő fertőzéseket is leírtak (GOULD és FIKRIG, 2004; KRAMER, et al., 2007). A WNV lehetséges terjedési módjait és gazdáit az 1. ábra mutatja.



1. ábra A nyugat-nílusi vírus lehetséges terjedési módjai és gazdái

2.3. Nagyobb járványok

Az első nagyobb nyugat-nílusi láz járványt 1957-ben írták le Izraelben. Ekkor 419 emberi megbetegedést állapítottak meg. 12 esetben encephalitis is kialakult, és 4 ember belehalt a fertőzésbe (SOLOMON, et al., 2003). Ezt követően 1962 és 1965 között a franciaországi Camargue tartományban, a Rhône-delta vidékén 14 humán esetet regisztráltak, valamint közel 80 lónál encephalitis alakult ki. Egy ember meghalt, a lovak között pedig 25-30%-os mortalitást tapasztaltak (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). 1974-ben Dél-Afrikában közel 18000 emberi megbetegedés történt, de ennek a járványnak nem voltak halálos áldozatai (SOLOMON, et al., 2003). 1994-ben Algériában 50 humán esetet írtak le, melyből 12 neuroinvazív volt, és a járványnak 8 halálos áldozata volt (CALISTRU, et al., 2010). 1996-ban Bukarestben és környékén 835 megbetegedést regisztráltak, 352 embernél

tapasztaltak idegrendszeri tüneteket, 17-en életüket veszítették a járványban (SOLOMON, et al., 2003; CALISTRI, et al., 2010). 1998-ban Olaszországban 14 lónál idegrendszeri tüneteket jelentkeztek, 6 állat elhullott. A járvány körzetében tartott lovak között 58%-os szeropozitivitást tapasztaltak. Emberi megbetegedést ekkor nem írtak le (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; CALISTRI, et al., 2010). 1998 és 2000 között Izraelben 417 szerológiailag igazolt humán esetet dokumentáltak, és 75 lónál encephalitist állapítottak meg. A járványban 33 ember életét veszítette, 15 ló elpusztult. Ekkor - szokatlan módon - a madarak között is nagy pusztítást végzett a vírus: több száz házilúd (*Anser anser domesticus*) is elhullott (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). 1999-ben Volgograd térségében 826 ember esetében írtak le nyugat-nílusi lázat, ekkor 40-en veszítették életüket (CALISTRI, et al., 2010). Ebben az évben volt az első járvány az Amerikai Egyesült Államokban: New York térségében 619 humán megbetegedést regisztráltak, ebből 62 esetben szerológiai vizsgálattal is igazolták a nyugat-nílusi vírus fertőzést, heten meghaltak. 20 lónál alakult ki encephalitis, számos amerikai rövidcsőrű varjú (*Corvus brachyrhynchos*) és állatkerti madár is elhullott. 2000-ben Camargue tartományban 131 lónál alakultak ki idegrendszeri tünetek (NASH, et al., 2001; CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; BRAULT, et al., 2007). 2002-ben az Egyesült Államokban alakult ki az eddigi legnagyobb encephalitis járvány: 4156 szerológiailag igazolt emberi megbetegedést dokumentáltak, 2946 esetben jelentkeztek idegrendszeri tünetek, 284-en meghaltak. 15000 lónál alakult ki encephalitis, 16500 madár elhullott (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; ROSSI, et al., 2010). Ugyanebben az évben Izraelben 233 szerológiai vizsgálattal is igazolt emberi megbetegedést tapasztaltak, 33-an meghaltak (SOLOMON, et al., 2003). A következő évben az Egyesült Államokban 9862 humán esetet írtak le, 2866 páciensnél idegrendszeri tünetek is kialakultak, 264-en életüket veszítették a járványban. Közel 4000 lónál encephalitis jelentkezett (ROSSI, et al., 2010). 2008-ban Olaszországban 794 szeropozitív lovat találtak, 32-nél klinikai tünetek is jelentkeztek, 5 állat elhullott. 9 humán esetet is leírtak ekkor, amelyből 4 neuroinvazívnek bizonyult (CALISTRI, et al., 2010). Görögországban 2010-ben okozott először emberi megbetegedést a nyugat-nílusi vírus: 191 idegrendszeri érintettséggel is járó esetet írtak le, ebből 77-et szerológiai vizsgálattal is alátámasztottak. A járványban 32-en életüket veszítették (PAPA, et al., 2011). Törökországban 2010-ben 47 esetet dokumentáltak (12 szerológiailag is igazolt), amelyből 40 neuroinvazív volt. Ekkor tízen haltak meg (KALAYCIOGLU, et al., 2012). Észak-Olaszországban 2012-ben 13 szerológiailag is igazolt humán esetet regisztráltak: öt betegnél idegrendszeri tünetek jelentkeztek, három embernél lázas tüneteket észleltek, és öt WNV pozitív vérdonort is találtak (BARZON, et al., 2012).

2.4. A nyugat-nílusi vírus Magyarországon

Az elmúlt 40 évben Magyarországon, és más közép-európai országokban (Ausztriában, Csehországban, Szlovákiában) is kimutattak specifikus WNV elleni ellenanyagokat emberekből és egyéb gerinces gazdákból, valamint számos vírustörzset izoláltak szúnyogokból, rágcsálókból és vándormadarakból (BAKONYI, et al., 2005), azonban 2003 előtt nem tapasztaltak klinikai tüneteket sem állatokban, sem embereken (BAKONYI, et al., 2006). 2003 nyarának végén egy hathetes házilúd-állományban (*Anser anser domesticus*) zajló encephalitis járvány során 14%-os mortalitást tapasztaltak. Kórszövettani eljárással, szerológiai vizsgálatokkal és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciós (RT-PCR) módszerrel WNVfertőzést állapítottak meg (circovírus társfertőzéssel) az elhullások hátterében. A teljes genom szekvencia meghatározása és a filogenetikai analízis alapján a ludakból származó izolátum nagyfokú hasonlóságot mutatott az 1998-ban Izraelben illetve az 1999-ben az Egyesült Államokban talált, az 1a genetikai csoportba tartozó vírustörzsekkel. Ugyanebben az időben 14 humán WNV encephalitis illetve meningitis esetet is leírtak Magyarországon (BAKONYI, et al., 2006). 2004 augusztusában Magyarország délkeleti részén találtak két fertőzött, idegrendszeri tüneteket mutató héját (*Accipiter gentilis*). Itt is kórszövettani vizsgálattal és RT-PCR módszerrel igazolták a WNV jelenlétét. A szekvenálást követően megállapították, hogy a héjából származó izolátum az 1937-ben, Ugandában talált törzssel mutat szoros rokonságot, vagyis a kettes genetikai vonalba tartozik. Ez volt az első olyan eset, melyben a lineage2 jelenlétét Európában igazolták. Ezt megelőzően a kettes genetikai vonalat csak Afrikában és Madagaszkáron találták meg (BAKONYI, et al., 2006). 2005-ben négy héjából, egy karvalyból (*Accipiter nisus*) és egy elhullott juhból is kimutatták a lineage2-be tartozó kórokozót ugyanazon a területen, ami arra enged következtetni, hogy a kórokozó a fertőzött szúnyogokban áttelelhet (BAKONYI, et al., 2006). 2007-ben Kelet-Magyarországon a kettes genetikai vonalba tartozó vírust találtak héjából, háziludakból, kék vércséből (*Falco vespertinus*) és egy lóból származó mintákban is. Ezt követően minden évben országszerte kimutatták a lineage2 vírus jelenlétét különböző elhullott madarakból, szúnyogokból, és klinikai tüneteket mutató lovakból is (KUTASI, et al., 2011; BAKONYI, et al., 2013).

2.5. A vírus szerkezete és életciklusa

A WNV virionja 45-50 nm átmérőjű. Kívülről burok (envelope) borítja, ezen belül helyezkedik el a nukleokapszid. A burok tulajdonképpen egy gazdasejt eredetű kettős lipid membrán, amelybe két virális glikoprotein van beágyazva, az 53 kDa-os E-protein és a 8 kDa-

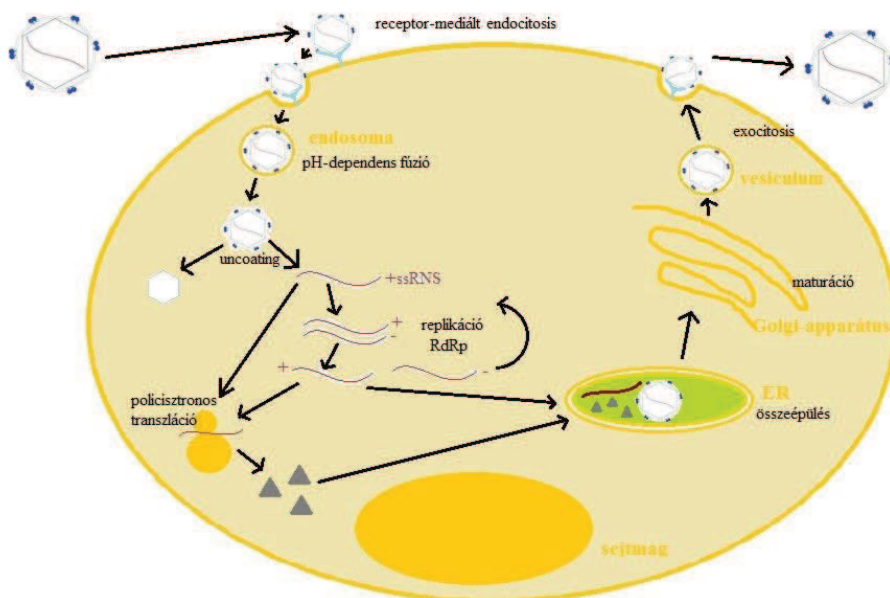
os M protein. Az E-proteinnek sokféle szerepe van: antigén, hemagglutinin, valamint a vírus gazdasejtbe kötődést mediáló molekula is (PETERSEN és ROEHRIG, 2001). A 30-35 nm-es, ikozaéder szimmetriájú nukleokapszid egy 12 kDa-os kapszid proteinből és egy 11 kilobázis hosszúságú, pozitív irányítottágú szimplaszálú RNS-ből (+ssRNS) áll. Az 5' végén egy 96 nukleotid hosszúságú UTR található, ezt követi a 10302 nukleotid hosszúságú nyitott leolvasási keret, amely a polyproteint kódoló szakasz, majd a 3' vég előtt egy újabb, 621 nukleotidból álló UTR. A kódoló szakasz három struktúrfehérje, valamint hét nemstruktúrális fehérje génjét tartalmazza. A virion felépítésében szerepet játszó struktúrfehérjék a C (kapszid fehérje), az E (envelope) és a 18-20 kDa-os prM (prekurzor membrán protein), melynek későbbi enzimatis hasításával keletkezik a burok membránjába integrált, 8 kDa-os M-protein. A nemstruktúrális (NS) fehérjék - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5 - nélkülözhetetlenek a sikeres replikációhoz. Az NS1 a fertőzött sejtek felszínén expresszálódó glikoprotein, melynek az immunrendszer elleni elrejtőzésben van szerepe. Az NS2A részt vesz a vírus összeépülésében, valamint az IFN β promoterének aktivitását gátolja. Az NS2B a virális NS3 proteáz kofaktora. Az NS3 gén különféle enzimeket kódol, úgy mint trypsin-like szerin proteáz, RNA trifoszfátáz, NTPáz és helikáz. Az NS4A gátolja az interferon szignalizációt, illetve az endoplazmatikus retikulum (ER) módosításával elősegíti a replikációs domének beágyazódását. Az NS4B fehérjének kritikus szerepe van a sejt antivirális válaszában blokkolásában, interferon antagonistaként viselkedik (MUÑOZ-JORDAN, et al., 2005). Az NS5 fehérje egyrészt metiltranszferáz aktivitással rendelkezik (az 5' vég metilezésével kialakítja a metilsapkát), másrészt pedig RNS-dependens RNS-polimeráz (RdRp) (PETERSEN és ROEHRIG, 2001; ROSSI, et al., 2010). A 3'UTR régió speciális harmadlagos szerkezettel rendelkezik, amely fontos szabályozó funkciót tölt be a vírus replikációjában és összeépülésében (BRINTON, et al., 2002). A WNV genomjának vázlatát a 2. ábrán látható.



2. ábra A nyugat-nílusi vírus genomjának felépítése

A WNV életciklusának - mint a 3. ábrán is látható - négy fő állomása van: adszorpció és penetráció, transzláció, replikáció, végül pedig összeépülés és kiszabadulás. A vírus receptor-mediált endocitózissal jut be a gazdasejtbe, de az érintett receptorok még ismeretlenek. A gazdasejtbe kerülve a vírus endoszómákba transzportálódik, amely kompartmentek savasságának hatására az E-proteinben olyan konformációváltozások

következnek be, melyek eredményeképpen a virális és az endoszómális membrán fúzionál, és így a nukleokapszid a citoplazmába jut. A citoplazmában a kapszid és az RNS disszociál. A virális +ssRNS szerkezete az mRNS-éhez hasonló, így a gazdasejt mechanizmusait és enzimeit felhasználva zajlik róla a policisztronos transláció, vagyis a kódoló régióról egyetlen precursor polipeptid keletkezik, amely a későbbiekben érési folyamaton esik át, vagyis celluláris és virális proteázok hatására tíz - struktúrális és nemstruktúrális - fehérjére válik szét. Ezzel párhuzamosan - szintén a citoplazmában - zajlik a replikáció, a virális proteinek által megalapozott speciális doméneken, virális eredetű RNS-dependens RNS-polimeráz (RdRp) segítségével. Az RdRp a +ssRNS-t kiegészíti duplaszálúvá, amely replikációs intermedier kettéválik, majd a leváló -ssRNS egészül ki duplaszálúvá, végül ez is szétválik. A folyamat sokszor ismétlődik. A keletkező -ssRNS-ek templátként szolgálnak a RdRp számára a következő ciklusban, a +ssRNS-ek pedig bekapcsolódnak a translációba. Végül a keletkező +ssRNS-ek és a struktúrfehérjék az ER-ba jutnak, ahol megtörténik a vírus összeépülése, majd az ER-Golgi-apparátus szekréciós úton az utódvirionok exocitózissal vagy bimbózással elhagyják a gazdasejtet, miközben átesnek az utolsó érési fázisokon is (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; ROSSI, et al., 2010).

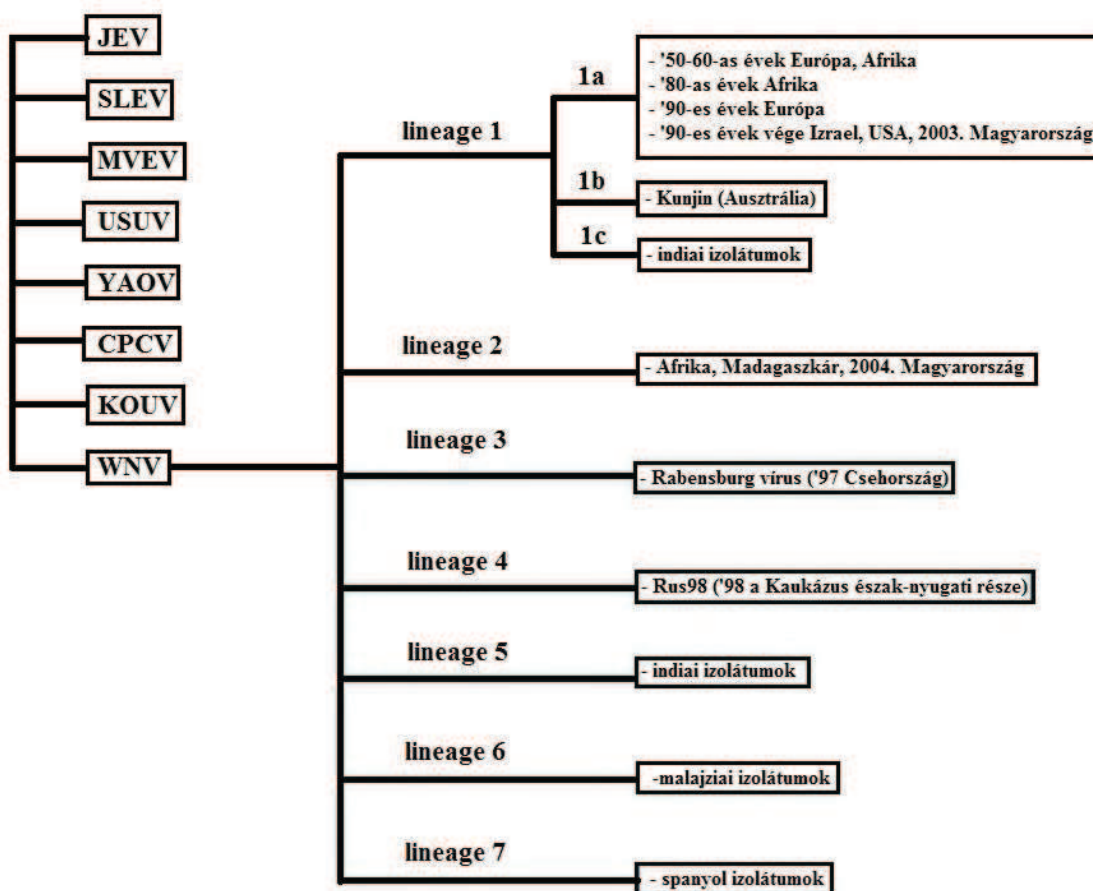


3. ábra A nyugat-nílusi vírus életciklusa

2.6. Filogenetika

A nyugat-nílusi vírus a *Flaviviridae* családon belüli *Flavivirus* nemzetség tagja. Haemagglutináció gátlási és keresztneutralizációs próbák alapján a Japán encephalitis vírus szerokomplexebe sorolják, melynek további - a 4. ábrán is látható - tagjai a Japán encephalitis

vírus (JEV), a St.Louis encephalitis vírus (SLEV), a Murray Valley encephalitis vírus (MVEV), az Usutu vírus (USUV), a Yaoundo vírus (YAOV), a Cacipacore vírus (CPCV), valamint a Koutango vírus (KOUV).



4. ábra A nyugat-nílusi vírus genetikai vonalai és a Japán encephalitis vírus szerokomplex tagjai.

JEV- Japán encephalitis vírus, SLEV - St.Louis encephalitis vírus, MVEV - Murray Valley encephalitis vírus, USUV - Usutu vírus, YAOV - Yaoundo vírus, CPCV - Cacipacore vírus, KOUV - Koutango vírus

Az egyes WNV törzsek jelentős különbségeket mutatnak mind a nukleinsav, mind az aminosav-szekvenciák tekintetében. Az E-proteint kódoló gén egy 225 nukleotid hosszúságú szakaszának szekvenálása alapján a WNV törzseket két genetikai vonalra sorolták, melyek között hozzávetőlegesen 75% nukleotid-azonosságot találtak. A lineage 1-be sorolt törzseket a világ számos pontján izolálták, a lineage 2-be tartozó törzseket azonban 2004-ig csak Afrikában és Madagaszkáron találták meg, míg 2004-ben két Magyarországon elhullott hétéves kutyából is ehhez a genetikai vonalhoz tartozó vírust sikerült azonosítani (LANCIOTTI, et al., 2002; BAKONYI, et al., 2006). A lineage 1-en belül három clade-et különítenek el: 1a, 1b és 1c. Az 1a-n belül európai, afrikai és amerikai törzsek is vannak, az 1b clade az ausztráliai Kunjin vírustörzset, az 1c pedig indiai izolátumokat tartalmaz (LANCIOTTI, et al., 2002;

BAKONYI, et al., 2005).Az utóbbi években talált újabb törzsek filogenetikai vizsgálata alapján felmerült legalább öt további genetikai vonal létezése is. A lineage 3-ba az 1997-ben Csehországban *Culex pipiens* szúnyogokból izolált Rabensburg vírust (RabV-97-103), a lineage 4-be a Kaukázus észak-nyugati részén 1998-ban *Dermacentor reticulatus* kullancsokból izolált Rus98 vírust (LEIV-Krnd88-190), a lineage 5-be indiai, míg a lineage 6-ba malajziai, a lineage 7-be pedig spanyol izolátumokat soroltak(BAKONYI, et al., 2005; BONDRE, et al., 2007; MACKENZIE és WILLIAMS, 2009; VÁZQUEZ, et al., 2010). A WNV eddig azonosított genetikai vonalait a 4. ábra szemlélteti.

2.7. Klinikai tünetek

A nyugat-nílusi vírus által előidézett klinikai tüneteket leginkább emberekben, lovakban és madarakban tanulmányozták részletesen, hiszen ezen élőlények körében fordul elő a legtöbb megbetegedés. A WNV-sal fertőzött embereknek csupán 20-40%-a mutat klinikai tüneteket, leggyakrabban önlimitáló nyugat-nílusi láz formájában. Miután a fertőzött szúnyog beoltja a vírust a szervezetbe, 2-14 nap hosszúságú lappangási időszak következik. Ezután jelennek meg az influenzaszerű megbetegedésre jellemző tünetek. Idegrendszeri megbetegedés csak a fertőzött emberek kevesebb, mint egy százalékában alakul ki (KRAMER, et al., 2007). Ebből a szempontból a növekvő életkor a fő kockázati tényező (MONINI, et al., 2010), pl. a 2002-ben az Egyesült Államokban lezajlott járvány esetén a WNV okozta agyvelőgyulladásban meghalt betegek átlagéletkora 79 év volt (GOULD, 2003). Ugyanakkor nagyobb az esély az idegrendszert érintő megbetegedés kialakulására szervátültetésen átesett személyekben, cukorbetegben, magas-vérnyomás betegségben vagy rosszindulatú daganatokban szenvedőknél. Egerekben a súlyos idegrendszeri megbetegedések iránti genetikai hajlamot is kimutattak (a 2'-5'-oligoadenilát-szintetáz hiánya), de emberekben ezt nem sikerült igazolni (HAYES, et al., 2005). A neuroinvazív megbetegedések alapvetően három formában jelentkezhetnek: meningitis, encephalitis vagy akut petyhüdt bénulás (KRAMER, et al., 2007). Az idegrendszeri tünetek általában 1-7 nappal az influenzaszerű megbetegedés kialakulását követően jelentkeznek (GOULD, 2003). Meningitis esetén a láz mellett az agyhártya-irritáció tipikus jelei figyelhetők meg: fejfájás, a nyakizmok és a tarkó merevsége, photophobia (KRAMER, et al., 2007). Az encephalitis legjellemzőbb tünetei a disorientáció, a tudatzavar, a remegés, az ataxia, az önkéntelen mozgások és a parkinsonismus. Az influenzaszerű és az idegrendszeri megbetegedéseken kívül a fertőzött emberekben ritkán egyéb kórképek is kialakulhatnak: myositis, rhabdomyolysis, myocarditis, hepatitis, pancreatitis, orchitis, chorioretinitis, uveitis, vitritis. Emberek esetében a WNV által

előidézett megbetegedések kimenetele jelentős egyedi változatosságot mutat, de általánosságban elmondható, hogy az agyvelőgyulladásal járó esetekben súlyosabb komplikációk alakulnak ki, és magasabb a mortalitás, mint az agyhártyagyulladásban szenvedő pácienseknél. Az agytörzs, illetve a gerincvelő bizonyos területeinek érintettsége esetén a rekeszizom és a bordaközi izmok bénulása is bekövetkezhet, amely légzési elégtelenséghez és halálhoz vezethet (HAYES, et al., 2005). A bénult betegek egy része hetek alatt teljesen felépül, míg mások több hónapig tolószékhez kötöttek (KRAMER, et al., 2007). A nyugat-nílusi lázban szenvedő, de idegrendszeri tüneteket nem mutató embereknél a gyógyulási idő átlagosan 7-10 nap (MONINI, et al., 2010). Az emberekhez hasonlóan a lovakban is tünetmentes marad a legtöbb WNV fertőzés (NIELSEN, et al., 2008), viszont az idegrendszeri tünetek kialakulásának nagyobb a valószínűsége (10%), mint embereknél (1%), és az idegrendszeri tünetekben megnyilvánuló súlyos betegség 40% körüli elhulláshoz vezet (WARD, et al., 2006). A betegség a szúnyogcsípést követő 3-15 napos inkubációs idő után lázas általános tünetekkel (a láz nem feltétlen tünet lovak esetében- OIE Manual) és gyengeséggel kezdődik. A gerincvelő-károsodásra visszavezethető idegrendszeri tünetek 1-2 héttel az elsődleges tünetek után jelentkeznek ataxia, egy-vagy kétoldali (legtöbbször a hátsó lábakat érintő) paresis, esetleg négyláb paralysis formájában, gyakran bőr túlérzékenységgel, izommerevséggel vagy izomremegéssel kísérve (WEESE, et al., 2003; WARD, et al., 2004). Bizonyos esetekben az agyi érintettségre utaló tünetek is megjelennek: dysmetria, mentális zavarok, aluszékonyság, hyperexcitatio, agresszió, hyperaesthesia. A VII., IX., XII. agyidegek érintettsége miatt kialakulhat faciális-bénulás, a nyelv lógása, dysphagia is. A megbetegedett lovak egy része spontán elhullik, de gyakori az eutanázia is. A halálozási ráta a 2000-es Egyesült Államokbeli járvány esetén 38%, ugyanebben az évben a franciaországi járványban 57,1%, míg az 1998-as olaszországi járványban 42% volt (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). Madarak esetében jelentős faji eltéréseket tapasztalhatunk a WNV iránti fogékonyságot, a vírus patogenitását, és így a klinikai tünetek jelenlétét, valamint a fertőzés kimenetelét érintően. Vannak alacsony fogékonyságú fajok (pl. házityúk) és magas fogékonyságú fajok (pl. varjúfélék családja). A WNV patogenitását eddig több mint 57 madárfajban dokumentálták. A klinikai tünetek kialakulásának oka a központi idegrendszer és egyéb szervek (máj, lép, vese, szív) fertőződése. Általában a vírus beoltását követő ötödik napon jelentkeznek a nem specifikus tünetek: depressio, anorexia, dehidratio, csapzott tollazat, vonaglász, ataxia, rendellenes fejtartás, remegés, inkoordinált repülés, paresis, disorientatio. Ragadozó madarakban jellemző a vakságig fokozódó látásromlás, az idegrendszeri tünetek, tollfejlődési zavarok kialakulása, valamint az élettartam csökkenése. A

magas fogékonyságot mutató madárfajokban az elhullás gyakran a klinikai tünetek jelentkezését követő 24 órán belül jelentkezik. A fatális kimenetel sokszor nem a vírusfertőzés által előidézett szervi elváltozások közvetlen következménye, hanem különféle bakteriális, gombás, parazitás társfertőzések hatása (GAMINO és HÖFLE, 2013).

2.8. Patogenezis

Nehéz a nyugat-nílusi vírus patogenezisének pontos folyamatát megismerni, hiszen a különféle törzsek virulenciájában jelentős különbségek lehetnek, sok a tünetmentes fertőzés, valamint a kórfejlődés módját a gazdafaj is befolyásolja: fontos eltérések vannak az emberek, a lovak, a madarak illetve a kísérleti állatok (egerek, patkányok, hörcsögök) között is. Általánosságban elmondható, hogy a vírus a fertőzött szúnyog nyálával jut a szervezetbe, majd a beoltás helyén kezd replikálódni a bőr Langerhans sejtjeiben (dendriticus sejtek), amelyekkel a lokális nyirokcsomókon keresztül a nyirokáramba, onnan pedig a vérbe jut, vagyis kialakul az (emberekben és lovakban általában alacsony szintű) elsődleges virémia. A virémia során a vírus a különféle szervekbe (lép, máj, vesék) jut, ahol további amplifikáció zajlik (KRAMER, et al., 2007; ROSSI, et al., 2010). Madarakban már a szúnyogcsípést követően 30-45 perccel is sikerült a vírust detektálni a perifériás vérből, tehát ezen állatokban nem feltétlenül szükséges az elsődleges viraemiát megelőző helyi vírusszaporodás (GAMINO és HÖFLE, 2013).

Az idegrendszerbe való bejutás módja egyelőre ismeretlen, alapvetően három feltételezés van ezzel kapcsolatban: passzív transzport a vér-agy gáton át, annak károsodásával vagy károsodása nélkül, a vér-agy gáton való aktív átjutás, illetve retrográd terjedés a perifériás idegek axonjai mentén (KRAMER, et al., 2007; ROSSI, et al., 2010; GAMINO és HÖFLE, 2013). A vér-agy gáton való passzív transzportot egérkísérletek alapján feltételezik: a magas szintű virémia kialakulása elősegíti a vér-agy gát károsodását, és ezáltal a vírusnak a központi idegrendszerbe való bejutását, ugyanakkor a magas vírustiter önmagában nem predisponálja a neuroinvaszivitást. A vér-agy gát károsodása nélkül is bejuthat a vírus a központi idegrendszerbe, melyhez a gazda válaszreakciói is hozzájárulnak: WNV-sal kísérletesen fertőzött egerekben azt tapasztalták, hogy megnőtt az agyban a TLR-3 kifejeződése, és ezen keresztül a TNF- α mennyisége is, amely kapilláris-szivárgáshoz, tehát a vér-agy gát áteresztő képességének növekedéséhez vezetett. Ugyanakkor nem minden lethális egérfertőzésben tapasztaltak emelkedett permeabilitást, sőt hörcsögökben a megnövekedett permeabilitás nem feltétlenül okozott WNV-indukált elhullást. Azokban az állatokban (egerek, madarak), amelyek vérében a vírus magas titert képes elérni, a vírus vér-agy gáton

való átjutása jóval nagyobb mértékű, mint pl. lovakban és emberben, ahol a virémia jelentősen kisebb mértékű. Ez esetben a CNS-be való bejutásban a perifériás neuronok mentén történő retrográd vírustranszportnak lehet fontos szerepe (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004; KRAMER, et al., 2007; ROSSI, et al., 2010). Madarakban feltételezik a vér-agy gáton keresztüli aktív átjutást is: ezen állatokban immunhisztokémiai módszerekkel sikerült az endothel sejtekben WNV-antigéneket detektálni (GAMINO és HÖFLE, 2013).

A WNV perzisztálhat is a fertőzött szervezetben. Kísérletesen fertőzött hörcsögökben és majmokban a klinikai gyógyulást követően öt hónappal is sikerült WNV-t illetve virális antigéneket kimutatni az agyszövetből. Ezen felül a hörcsögök egy részében krónikus vesefertőzést észleltek: a vírus nyolc hónapon keresztül ürült a vizelettel. Ezt a jelenséget emberekben is leírták: a virális RNS hat évvel a fertőzödést követően kimutatható volt a vizeletből (MONINI, et al., 2010). Madarakban vírus tartósan megtelepedhet a vesén és az agyon kívül a lépben, a bőrben valamint a szemben is (GAMINO és HÖFLE, 2013).

2.9. Patológia

Madarakban a WNV-ra széles sejti és szöveti tropizmus jellemző, így a kórbonctani kép is rendkívül változatos. A nem jellegzetes, makroszkóposan megfigyelhető elváltozások (lesoványodás, dehydratio, testszerte jelentkező vérzések, splenomegalia, hepatomegalia, a myocardium sápadtsága, halvány foltok jelenléte a májban, a lépben, a vesében, cerebriális atrophia és malatia) azokban a fajokban alakulnak ki, amelyek viszonylag hosszabb ideig (akár hónapokig) túlélnek a fertőzést (pl. szalagos bagoly, *Strix varia*), azonban a magas fogékonyságú fajokban (pl. a verébalakúak rendje) - a sokszor peracut módon bekövetkező elhullás miatt - erre nincs idő. Mikroszkópos laesiók viszont minden elhullott madárban megfigyelhetők, elsősorban a CNS-ben, de egyéb szervekben is vannak celluláris szintű elváltozások. Ezek egyrészt a vírus közvetlen károsító hatása miatt jönnek létre, másrészt a gazdaszervezet immunválasza is fontos szerepet játszik a kialakulásukban. A központi idegrendszerben limpho-plasmo-histiocytás meningoencephalitis jelei láthatóak: perivascularis infiltratio, gliosis, gliahegek. Immunhisztokémiai módszerekkel vírusantigéneket tudtak kimutatni az idegsejtekből, a gliasejtekből, a gyulladós sejtekből, valamint az endothelsejtekből is. Ragadozó madarakban a szem és a perifériás idegrendszer is érintett lehet: jellemző a limpho-plasmo-histiocytás infiltráció a retinában, valamint a proventriculáris és a ventriculáris ganglionokban, továbbá a retinasejtek necrosis (és esetleges mineralizációja). A WNV fertőzés esetén a legtöbb madárban a szívben, a májban, a vesékben, a lépben és egyéb lymphoid szervekben, valamint az emésztőtraktusban, a tüdőben

és a vázizmokban is vannak kórszövettani elváltozások (GAMINO és HÖFLE, 2013). A madarakkal szemben lovakban nem alakulnak ki szignifikáns elváltozások az extraneurális szövetekben, csak a központi idegrendszer érintett. A vezető elváltozások enyhébb-súlyosabb mértékű polioencephalomyelitis perivascularis lymphocytás beszűrődéssel, gliasejtes góccokkal, esetleg neurophagiával és vérzésekkel. Elsősorban az agytörzs és a bazális ganglionok érintettek, illetve sokszor található elváltozás a gerincvelő ventrális szarvában az ágyéki, keresztcsonti és háti szakaszaiban (CANTILE, et al., 2001), de létrejöhetnek a kisagy és az agykéreg területén is (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). Emberekben encephalitis, meningitis és poliomyelitis is kialakulhat (ez utóbbi áll az akut petyhüdt bénulás hátterében). Elsősorban a thalamus, az agytörzs illetve a kisagy területén alakul ki perivascularis lymphocytás-macrophagos beszűrődés, az astrocyták szelektív proliferációja, necrosis, valamint poliomyelitis esetén a gerincvelőelülső szarvában található motoros neuronok destrukciója és a terület gyulladásoos sejtes infiltrációja (KRAMER, et al., 2007).

2.10. Immunitás

WNV fertőzés esetén a replikáció és a szétterjedés megakadályozásában a veleszületett és a szerzett immunitásnak is fontos szerepe van. Az immunrendszer sejtes és humorális részének megfelelő működése is nélkülözhetetlen a vírus elleni sikeres védekezéshez. A fő végrehajtó mechanizmusok: a citotoxikus T-sejtek, a vírusneutralizáló ellenanyagok, a nem neutralizáló ellenanyag-válasz, valamint az ellenanyag-dependens sejt közvetítette citotoxicitás (CASTILLO-OLIVARES és WOOD, 2004). A humorális immunválasz kontrollálja a periférián történő vírusszaporodást, a T-sejtek pedig a központi idegrendszerbe bejutott vírust pusztítják el. Ezt támasztja alá, hogy T-sejt deficienciás páciensekben gyakrabban alakulnak ki neuroinvazív, illetve halálos megbetegedések (MONINI, et al., 2010). A neutralizáló ellenanyagok nagy része a vírus struktúrális E-proteintjét ismeri fel, de a NS1-protein elleni ellenanyagok is protektívek a WNV ellen. Az NS3 és NS5 fehérjék ellen is kialakul ellenanyag válasz, de ennek a szerepe még ismeretlen. Az immundomináns E-proteinnek 3 doménje van (DI., DII., DIII.), melyeken legalább tizenkét epitópot azonosítottak. *In vitro* vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a DIII-hoz kötődő ellenanyagoknak van a legerősebb neutralizáló hatása, ugyanakkor a vírus neutralizációja egy összetett jelenség, többféle ellenanyag együttes jelenléte szükséges hozzá. Az ellenanyag a vírushoz való kötődéssel neutralizálhatja a vírust direkt módon, pl. az internalizációhoz szükséges receptorok blokkolásával. A neutralizáció indirekt úton is végbemehet, vagyis az

ellenanyag kötődése gátolja azokat a konformáció változásokat, melyek a dekaptsidációhoz és a citoplazmába való penetrációhoz szükségesek (MONINI, et al., 2010).

2.11. Diagnosztika

A definitív diagnózis felállításához nélkülözhetetlen különféle laboratóriumi tesztek elvégzése, hiszen a klinikai tünetek, a kórbonctani és kórszövettani elváltozások sem patognomikusak. A laboratóriumi vizsgálatok általában vérszérumból vagy liquorból történnek. Direkt módszerekkel magát a vírust vagy annak nukleinsavát, indirekt módszerekkel a vírus ellen termelt ellenanyagokat lehet kimutatni. Jól alkalmazható klasszikus virológiai módszer a vírusizolás, majd ezt követően a vírus meghatározása WNV-specifikus monoclonális ellenanyagokkal vagy RT-PCR-rel (GOULD, 2003). A RT-PCR az idegrendszeri tünetek jelentkezésekor, a sokszor alacsony szintű virémia esetén is eredményre vezethet (HAYES, et al., 2005). A szerológiai vizsgálatok, mint a HAG vagy az ELISA nem elég specifikusak: sok a lehetséges keresztreakció más flavivírusokkal (JEV, MVEV, SLEV, USUV). A PRNT esetén kevesebb a keresztreakció, savópár-vizsgálatokkal és a szóba jövő keresztreakáló vírusokkal történő szimultán titrálással eredményre vezethet a diagnózisban (GOULD, 2003; MONINI, et al., 2010). Lovak esetében a lázas általános tünetekkel induló betegség során a vírus a rövid virémia miatt általában az idegrendszeri tünetek megjelenésekor már vérből direkt módon nem mutatható ki, ilyen esetben a vér szerológiai vizsgálata során indirekt módon igazolható a fertőzöttség. A vizsgálatra elérhető IgM illetve IgG kimutatására alkalmas ELISA is, tehát a friss fertőzöttség is megállapítható. IgM típusú ellenanyagok a fertőzödést követő 7 nap alatt megjelennek, 2-3 hónapig kimutathatók, míg a később, 10. nap körül megjelenő IgG típusú ellenanyagok 1-3 évig is perzisztálhatnak a vérben. Ha korán felmerül a gyanú WNV okozta megbetegedésre, cerebrospinális folyadékból RT-PCR vizsgálattal esély lehet a vírus direkt kimutatására. Elhullott állatból főként az agyvelőből (agytörzs, nagyagy), gerincvelőből lehet vírust kimutatni RT-PCR reakcióval, illetve az idegszövetekből immunhisztokémiai módszerekkel is.

3. Anvag és módszer

3.1.A kiindulási vírus elszaporítása

A kiindulási vírus egy Magyarországon 2010-ben izolált, kettes genetikai vonalhoz tartozó WNV volt. A vírust egy idegrendszeri tüneteket mutató ló agyvelejéből izoláltuk, miután az Üllői Nagyállat Klinikán elpusztult. A szekvencia analízis során kiderült, hogy az izolált vírus a Magyarországon 2004-óta cirkuláló WNV törzsekre nagymértékben hasonlító, magas patogenitású törzs. A vírus elszaporítása Afrikai zöld majom vese epithel (Vero) sejteken történt. A sejtvonat a NÉBIH ÁDI szövettényésztő laboratóriumában, szövettényésztő palackban fenntartott egyrétegű sejt kultúra volt. Tápfolyadéként Eagle's MEM szövetfenntartó folyadékot használtunk (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), kiegészítve 10% kolosztrummentes főtális borjúsavóval (FBS), 0,3 mg/ml glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomycinnel és 0,25 µg/ml amphotericin B-vel, (Sigma-Aldrich). Négy nappal az egyrétegű szövettényésztet fertőzése után, a maximális citopatogén hatás elérésekor a palackok háromszori fagyasztása és olvasztása történt, majd alacsony fordulatszámú centrifugálás ($1000 \times g$) 20 percig, a szövettörmelék és a felülúszóban maradó vírus elkülönítéséhez. Végül a felülúszó további ultracentrifugálásával ($50000 \times g$, 8 óra) a vírust pelletizáltuk és kis mennyiségű foszfátpufferben (PBS) vettük fel.

3.2. RNS kivonás és komplementer DNS (cDNS) szintézis

Az RNS kivonását az ultracentrifugált vírus szuszpenzióból QIAamp Viral RNA Mini Kit-tel (QIAGEN, Hilden, Germany) végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az egyszálú cDNS előállítására SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reverz transzkripció rendszerrel és genomspecifikus primerekkel történt (3' XbaSacIIR illetve 3'30bR).

3.3. Plazmid és kompetens sejtek

A pBeloBAC TGE (Wang et al., 1997) plazmidot L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Department of Molecular and Cell Biology, Madrid, Spain) bocsátotta rendelkezésünkre, amelyet Bálint és munkatársai (BÁLINT, et al., 2012) egy a 3' járulékos szekvenciák utáni XhoI restrikciós enzim vágóhely törlésével, valamint egy SfiI, SfoI, BstBI, ClaI, BamHI, XhoI, AsiSI, AvrII és SacII restrikciós enzim vágóhelyeket tartalmazó többszörös klónozó hely (multiple cloning site) beépítésével módosítottak, így létrehozva a pBeloBAC FP, bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) vektort. Megfelelő mennyiségű plazmidot Max Efficiency DH10B kompetens Escherichia coli baktériumok (Invitrogen)

hősokk általi transzformációjával állítottunk elő. A táptalajhoz kevert klóramfenikol lehetővé tette a plazmidot felvett baktériumok szelektív növekedését, mivel a pBeloBAC FP tartalmazott klóramfenikol rezisztenciáért felelős szakaszt. A kompetens sejtekből a transzformációt követően egy éjszakán át tartó növekedés után QIAGEN Large Construct Kit (QIAGEN) segítségével nyertük ki a kiindulási, illetve a klónozási lépések során előállított rekombináns plazmidokat (6. ábra).

3.4. A teljes hosszúságú duplaszálú DNS előállítása fúziós PCR-ek alkalmazásával

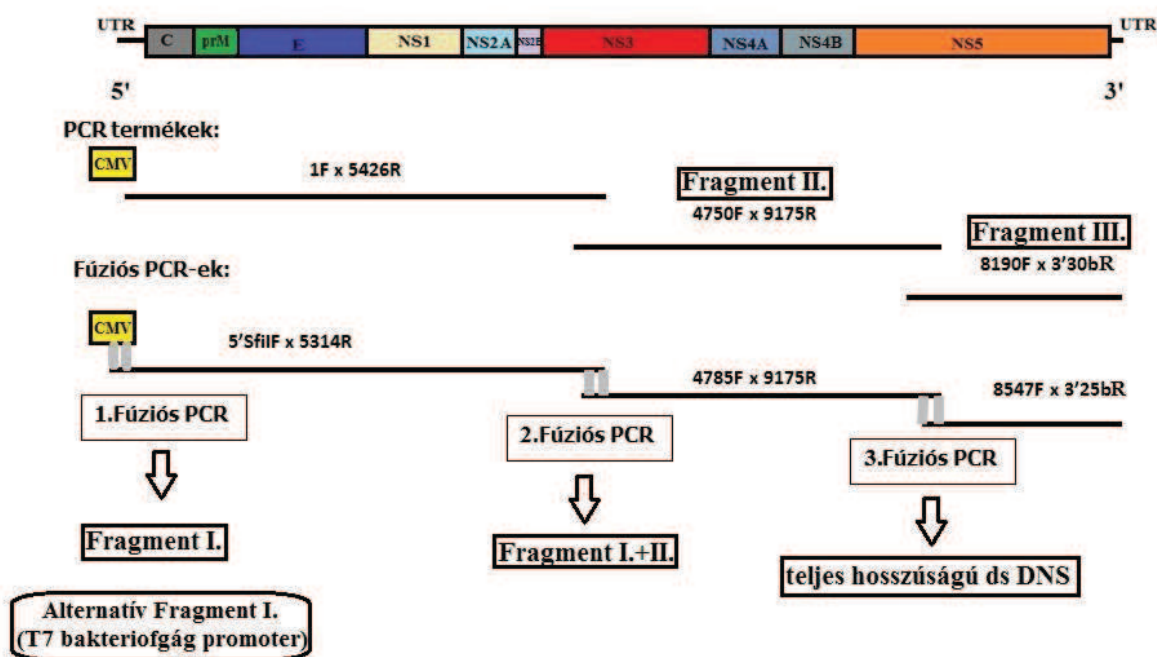
Az 5. ábrán is látható módszer lényege a vírus teljes genomját lefedő, egymással átfedő polimeráz láncreakciók termékeiből felépülő fúziós PCR-ek sorozata. A polimeráz láncreakciókhoz az első táblázatban feltüntetett genomspecifikus primereken kívül Phusion Hot Start High-Fidelity DNS polimerázt (Finnzymes, Espoo, Finland) alkalmaztunk, amely enzim nagyon kis hibaszázalékkal dolgozik és kifejezetten alkalmas hosszú DNS szakaszok felerősítéséhez. A genomspecifikus primereket a PrimerSelect (Lasergene, WI, USA) programmal terveztük és ellenőriztük.

1. táblázat Genomspecifikus primerek

NÉV	NUKLEOTID SORREND
1F	GAGCTCGTTTAGTGAACCGTAGTAGTTCGCCTGTGTGAGC
T7F	ATGGCCCGGGCGGCCTAATACGACTCACTATAGAGTAGTTCGCCTGTGTGAGCT
1FRC	GCTCACACAGGCGAACTACTACGGTTCACTAAACGAGCTC
4750F	CACACACTATGGCACACCACTAAGG
5314R	CCTCAGACATCTCAGCAGCAACGAC
5426R	GACATCAGCCTGTGTGTGAGAGTGG
8190F	AGACTGGCTGCACAGAGGACCTAAG
9175R	GGTCTTCATTGAGGAATCCGAGAGC
3'25bR	AGATCCTGTGTTCTAGCACCACCAG
3'30bR	AGATCCTGTGTTCTAGCACCACCAGCCACC
3' XBASacIIR	ATCCGCGGTCTAGAGATCCTGTGTTCTAGCACCACAG

Az első lépés a CMV (cytomegalovírus) promoter szekvencia kinyerése volt a pBeloBAC FP plazmidból PCR-el (5'SFI1F*1FRC). Ezután genomspecifikus primerek segítségével (1F*5426R) a vírus első 5426 nukleotidjának felerősítése következett, ugyancsak PCR-el. Az előbb említett két PCR termékből fúziós PCR-el állítottuk elő az I-es Fragmentet, kihasználva hogy 1F és 1FRC egymás reverz komplementerei voltak. A reakcióhoz 5'SFI1F és 5314R oligókat és a következő protokollt használtuk: 98°C 30 másodpercig; majd 30 cikluson keresztül ismételve 98°C 10 másodpercig a duplaszálú DNS denaturációjához, 60°C 30 másodpercig az annealinghez és 72°C 3 percig az extenzióhoz; végül 72°C 7 perc a végső lánccépléshez. A specifikus primereket az első négy ciklus lefutása után adtuk a reakcióhoz, ezzel elősegítve a részben egymást átfedő templát összetapadását. Ezzel egy időben egy

alternatív I-es Fragmentet is előállítottunk egy speciális forward primer segítségével, amely a vírus 5' végének és a T7 bakteriofág promoternak a szekvenciáját tartalmazta. A továbbiakban a vírus középső körülbelül 4500, illetve utolsó körülbelül 3000 nukleotidjának felerősítése során jött létre a II-es és III-as Fragment (4750F*9175R; 8190F*3'25bR). A második fúziós PCR során az egymást részben átfedő I-es és II-es Fragment összeillesztése következett, így létrehozva Fragment I+II-t. A reakcióhoz 5'SF11F /T7F és 9175R oligókat és a fent említett protokollt használtuk, 4 perc extenzióval. A teljes hosszúságú komplementer DNS előállításának utolsó lépése Fragment I+II és Fragment III összekapcsolása volt, ugyancsak fúziós PCR segítségével. A reakció az előzőekben leírthoz hasonlóan folyt, de ciklusonként 7 perc extenzióval, valamint 5'SF11F /T7F és 3'30bR primerek felhasználásával. Valamennyi fragment és a végső teljes hosszúságú ds DNS elkülönítése agaróz gélelektroforézissel, majd tisztítása a 0,8%-os gélből QIAquick Gel Extraction Kit-tel (QIAGEN) történt.



5. ábra A teljes hosszúságú DNS előállítása fúziós PCR-ek alkalmazásával

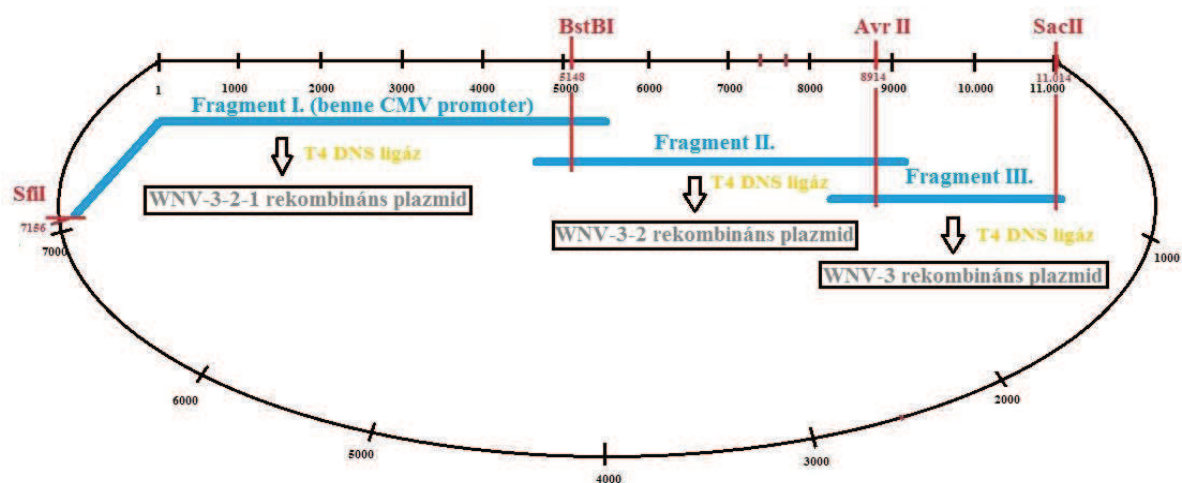
3.5. A teljes hosszúságú fertőző klón előállítása hagyományos klónozási lépések által

A 6. ábra segítségével szemléltetett módszer lényege a vírus teljes genomját tartalmazó dupla szálú DNS -pBelobac FP- alacsony kópiaszámú plazmidba való beépítése.

A vírus teljes genomját lefedő, egymást átfedő PCR termékek (Fragment I, II és III) előállítása az előbbieken leírtak szerint történt. A III-as Fragment esetében reverz primerként egy olyan speciális oligonukleotidot alkalmaztunk, amely a vírus 3' végének nukleotidjait,

valamint két extra restrikciós enzimvágóhely (XbaI és SacII) szekvenciáját is tartalmazta. Az I-es Fragmentet csak a CMV promoterral kapcsoltuk össze, *in vitro* transzkripció ebben az esetben nem történt.

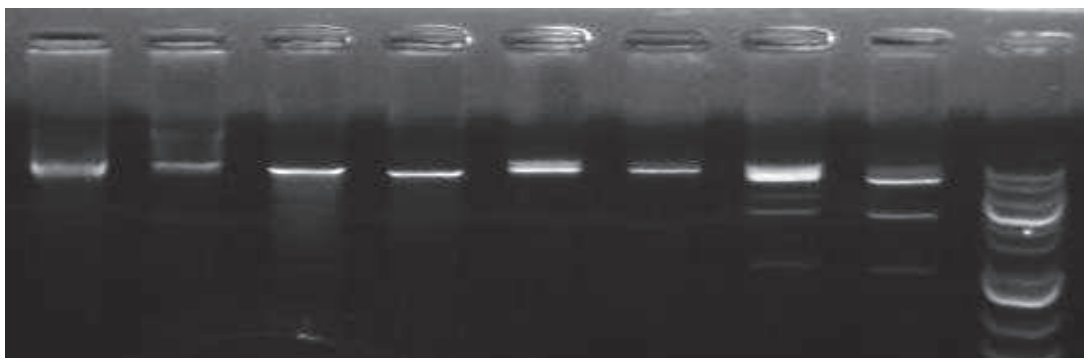
A klónozási lépések a következők szerint történtek. Első lépésben Fragment III-at és pBeloBac FP-t emésztettük AvrII és SacII restrikciós enzimekkel, majd az agaróz gélen szétválasztott és tisztított, ragadós véggel rendelkező fragmenteket T4 DNA Ligáz enzimmel (Invitrogen Life Technologies), ligálással illesztettük össze, így előállítva CMV-WNV-3 rekombináns plazmidot. A következő lépéshez szükséges mennyiségű CMV-WNV-3 plazmidot DH10B kompetens *Escherichia coli* baktériumokban szaporítottuk fel, majd QIAGEN Large Construct Kit (QIAGEN) segítségével nyertük ki tiszta, koncentrált formában. Második lépésben a Fragment II beillesztése következett az előbbi plazmidba (WNV-3) ligálással, BstBI és AvrII restrikciós enzimes emésztés után. Az így előállított rekombináns plazmid a CMV-WNV-3-2 elnevezést kapta. Az utolsó lépésben került sor Fragment I és WNV-3-2 emésztésére SfiI és BstBI restrikciós enzimekkel, hogy ligálással való összeillesztésük következtében létrejöjjön CMV-WNV-3-2-1, teljes hosszúságú klón.



6. ábra A teljes hosszúságú duplaszálú DNS előállítása hagyományos klónozási lépések által

Az összes előállított rekombináns plazmid a kompetens baktériumokban stabilnak mutatkozott, toxicitásra utaló jel nem volt látható. A restrikciós enzimes emésztések illetve a klónozás egyéb lépései a standard protokollok alapján történtek (SAMBROOK et al., 2001).

Valamennyi rekombináns plazmid szekvenciáját restrikciós enzimes térképezéssel (7. ábra) és polimeráz láncreakciók termékeinek szekvencia analízisével ellenőriztük.



7. ábra Restriktációs enzimes térképezés.

Balról jobbra: NS4B-102 klón: intakt plazmid, NS4B-249 klón: intakt plazmid, NS4B-102 klón: BstBI-el emésztett, NS4B-249 klón: BstBI-el emésztett, NS4B-102 klón: SfiI-el emésztett, NS4B-249 klón: SfiI-el emésztett, NS4B-102 klón: SfiI-el és XbaI-el emésztett, NS4B-249 klón: SfiI-el XbaI-el emésztett

3.6. Szekvencia analízis

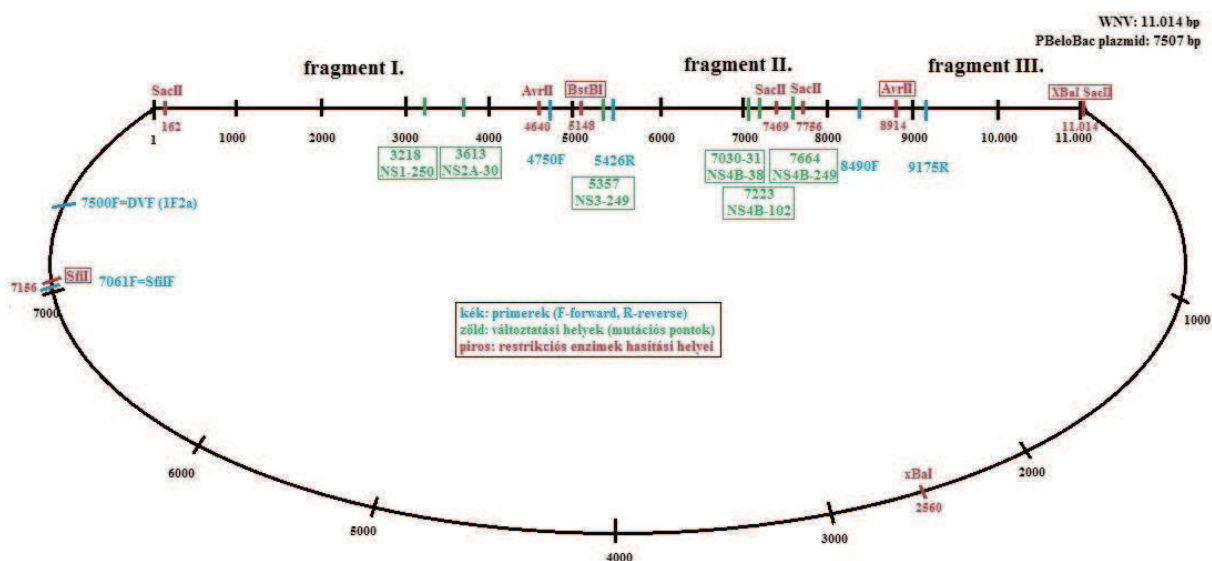
A kiindulási vírus és az elkészült klónozott vírus teljes genomszekvenciáját ABI Prism Big Dye Terminator cycle szekvenáló kit (Perkin-Elmer) felhasználásával automata ABI Prism 310 szekvenáló berendezéssel (Perkin-Elmer) határoztuk meg. A klónozás során Phusion Hot Start High-Fidelity DNS polimerázzal (Finnzymes, Espoo, Finland) előállított átfedő PCR termékek nukleotid sorrendjét BigDye V3.1 Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és automata ABI 377 DNS szekvenáló berendezés (Applied Biosystems) segítségével ellenőriztük. A szekvenciák elemzéséhez és összehasonlításához a SeqMan és MegAlign programokat (Lasergene, Madison, WI, USA) használtuk.

3.7. Pontmutációk létrehozása a WNV genomban

Az irodalmi adatok alapján kiválasztott potenciális virulencia markerek azonosítása után a teljes genom szekvencia ismeretében kijelöltük a mutagenézis lókuszeit, és meghatároztuk az aminosav változtatásokhoz szükséges nukleotid cseréket. A mutációkat tartalmazó primereket az Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer programjával ellenőriztük. A mutációk és a genomban elfoglalt helyük a következők voltak: C₃₂₁₈T az NS1 fehérje génben (P₂₅₀L), G₃₆₁₃C az NS2A fehérje génben (A₃₀P), C₅₃₅₇A az NS3 fehérje génben (P₂₄₉H), és három mutáció az NS4B fehérje génben: CC₇₀₃₀₋₃₁GG (P₃₈G), G₇₂₂₃C (C₁₀₂S) és A₇₆₆₄G (E₂₄₉G). A mutációk helye a 8. ábrán látható.

A pontmutációkat PCR alapú mutagenézissel illesztettük a genomba, olyan komplementer forward és reverz primerek segítségével, amelyek tartalmazták a kívánt nukleotid eltérést. A mutáns fragmenteket két darabban állítottuk elő, egyrészt az adott fragment 5' végéről induló forward primer és a módosítást tartalmazó reverz primer, másrészt

a módosított forward primer és az adott fragment 3' végéről induló reverz primer közötti szekvenciák felerősítésével polimeráz lánreakció során. A két terméket agaróz gélből való tisztítást követően fúziós PCR-el illesztettük össze, így létrehozva az új, kívánt mutációt tartalmazó fragmentet. Ezután WNV-3-2-1 rekombináns plazmidból a mutáció pozíciójától függően Fragment I illetve Fragment II kivágása következett restriktív enzimekkel. A cserélni kívánt fragment és a rekombináns plazmid tisztítása agaróz gélelektroforézis után QIAquick Gel Extraction Kit-tel (QIAGEN) történt, majd az újonnan szintetizált, módosított szekvenciával rendelkező Fragment I-et vagy II-öt a tisztított, ragadós végű plazmidba ligálással illesztettük.

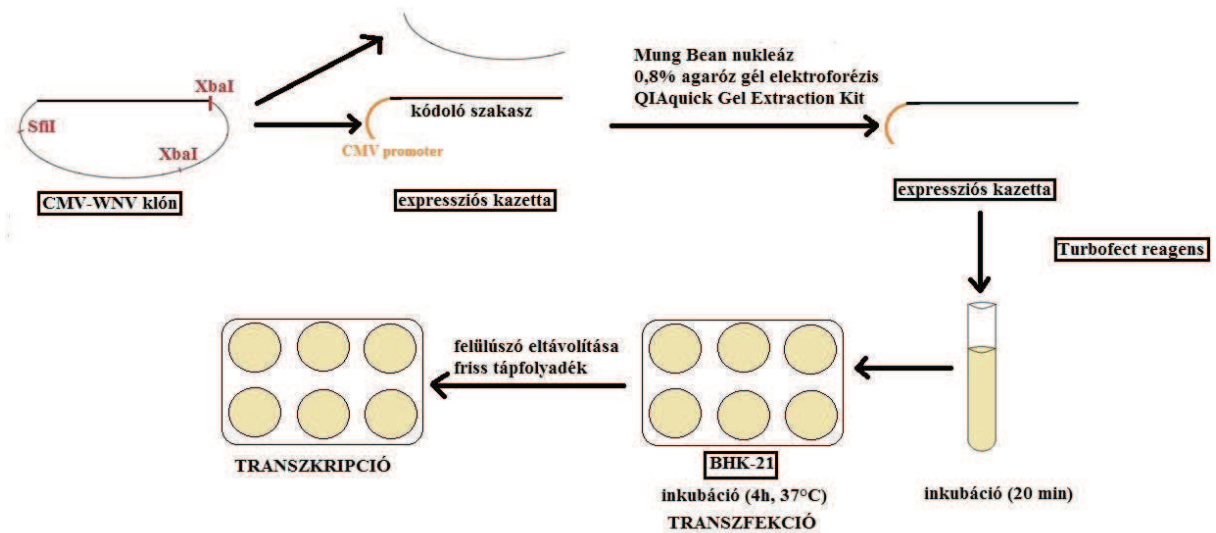


8. ábra CMV-WNV-3-2-1, teljes hosszúságú fertőző klón a pontmutációkat tartalmazó genomszakaszokkal

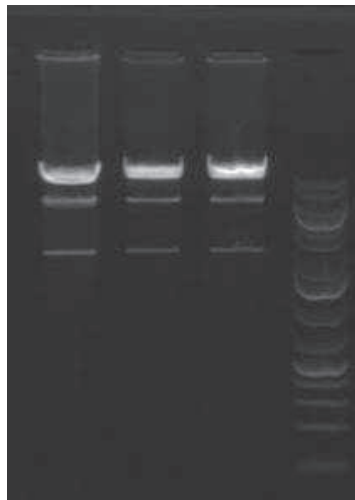
3.8. Transzkripció

A CMV-WNV-3-2-1 teljes hosszúságú fertőző klón *in vivo* transzkripciójához négy mikrogramm duplaszálú DNS-t transzfektáltunk BKH-21 sejtekbe Turbofect *in vitro* transzfekciós reagens segítségével (Thermo Scientific). A transzfekció előtt a CMV klónból expressziós kazettát vágunk ki SfiI és XbaI restriktív enzimes emésztéssel, majd Mung Bean nukleázzal kezeltük az egyszálú ragadós vég eltávolításához. Az emésztések után az expressziós kazettát és az egyéb termékeket 0,8%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk szét (10. ábra), és a kazettát a transzfekció előtt QIAquick Gel Extraction Kittel (QIAGEN) tisztítottuk. A négy mikrogramm DNS-t Turbofect reagenssel való 20 perces inkubáció után szövettenyésztő lemezen 24 órája növekedő, körülbelül 60%-ban összefüggő BKH-21 sejtekhez adtuk. Ezután a lemezeket 37°C-on inkubáltuk 4 órán keresztül, majd a felülúszót eltávolítottuk, és friss 10% borjúsavót tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle

Medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) tápfolyadékot mértünk a sejtekre. Transzkripció *in vivo*, a CMV promoter közreműködésével a BHK-21 sejtekben történt. Látható citopatogén hatás (CPE) 48-96 órával a transzfekció után jelent meg. Az itt leírt módszert a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra Az *in vivo* transzkripció



10. ábra Expressziós kazetták emésztése SfiI és XbaI restriktív enzimekkel

Balról jobbra: NS4B-38 klón, NS4B-102 klón, NS4B-249 klón

A T7-WNV klón *in vitro* transzkripciójához a mMMESSAGE mMACHINE T7 Kit-et (Ambion) használtuk, a gyártó utasításai szerint. Az *in vitro* átírt, szintetikus cap-el ellátott RNS transzfekciója az *in vivo* módszernél leírttal megegyezően folyt. Citopatogén hatást 48-72 órával a transzfekció után tapasztaltunk.

4. Eredmények

4.1. A nyugat-nílusi vírus teljes hosszúságú fertőző klónjának előállítása

A genetikailag módosított vírusok létrehozásához és kifejezéséhez választott módszereink alapja a +ssRNS vírus genomjából előállított teljes hosszúságú komplementer DNS BHK-21 sejtekbe történt transzfekció utáni *in vivo*, illetve T7 RNS polimeráz általi *in vitro* transzkripciója, majd életre keltése.

A klónozási stratégia kiválasztásakor figyelembe vettük a kiindulási lineage 2-es WNV izolátum genomjában eredetileg is előforduló restriktív enzim vágóhelyeket, illetve a pBeloBAC FP kiindulási plazmid többszörös klónozó helyének vágóhelyeit. A fragmentek hosszúságát ez, és a polimeráz láncreakciókban való könnyebb kezelhetőség, továbbá a változtatni kívánt részek elhelyezkedése határozta meg. Így a III. Fragment esetén SacII és AvrII, a II. Fragmentnél AvrII és BstBI, az I-es Fragment kialakításánál pedig BstBI és SfiI restriktív enzimeket használtunk. A klónozási sorrend, azaz a III – II – I Fragmente sorban történő beillesztése a pBeloBAC FP plazmidba nem volt véletlen, ugyanis a SacII restriktív enzim a tervezett klónozáshoz használandó lókuszon kívül még három helyen (162, 7469, 7756. nt), az AvrII restriktív enzim pedig még egy helyen (4640. nt) bevágott a kiindulási WNV genomba. Ahhoz, hogy az egyes fragmentek beillesztésénél a restriktív enzimek ne hasítsák föl az extra vágóhelyeken is a genomot, a III – II – I Fragment sorrend betartása elengedhetetlen volt.

A vírus 3' végének kialakítására egy speciális primert terveztünk, amely a klónozáshoz szükséges SacII restriktív enzim vágóhelyén kívül egy XbaI vágóhelyet is tartalmazott. Ez azért volt szükséges, mert a WNV nem rendelkezik poli A farokkal, viszont utolsó nukleotidjai nagyon konzervatívak. 3' XBASacIIR primer nukleotid szekvenciája úgy lett kialakítva, hogy pontosan a vírus 3' végének utolsó nukleotidja mögött vágja el a ds DNS-t az expressziós kazetta CMV-WNV-3-2-1 plazmidból történő kivágása során. A levágott szakasz a pirossal jelölt, az aláhúzott az XbaI vágóhely szekvenciája: **ATCCGCGGICTAG**AGATCCTGTGTTCTAGCACCACAG.

A mutációkat tartalmazó primerek tervezése esetében a változtatni kívánt lókuszhely elhelyeződése adott volt, így az olvadási hőmérséklet (T_m) és a GC százalék tervezésénél ezeket figyelembe kellett venni. A kívánalmak a következők voltak: a mutáció körülbelül a primer közepén helyezkedjen el, a primer hossza lehetőleg ne lépje túl az 45-50 nukleotidot, hajtú struktúrák ne alakuljanak ki, a GC százalék maximum 52% legyen, az olvadási hőmérséklet pedig 65°C alatt maradjon. A minimum 40 nukleotid hosszúság a fúziós PCR-

ekhez szükséges, ugyanis a templátok ezeken a szakaszokon komplementerei egymásnak, az első 4 PCR ciklus alatt itt tapadnak össze. A primerek tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze. A reverz párok ugyanezen tulajdonságokkal rendelkeznek, mivel a forward primerek reverz komplementerei. Látható, hogy minden oligó esetében a Tm 65°C fölötti érték volt, sőt a 102NS4B primer esetében a Tm 75°C fölé emelkedett. Ugyanezen primer mutatta a legrosszabb GC%-ot is, továbbá a GC% és a Tm további emelkedésének megakadályozása miatt 54 nukleotidnál nem lehetett rövidebbre tervezni.

A polimeráz láncreakciók során végül minden oligó működőképesnek bizonyult, a standard protokollok lényeges változtatása nélkül.

2. táblázat Mutációs primerek tulajdonságai

piros: mutációt tartalmazó triplet

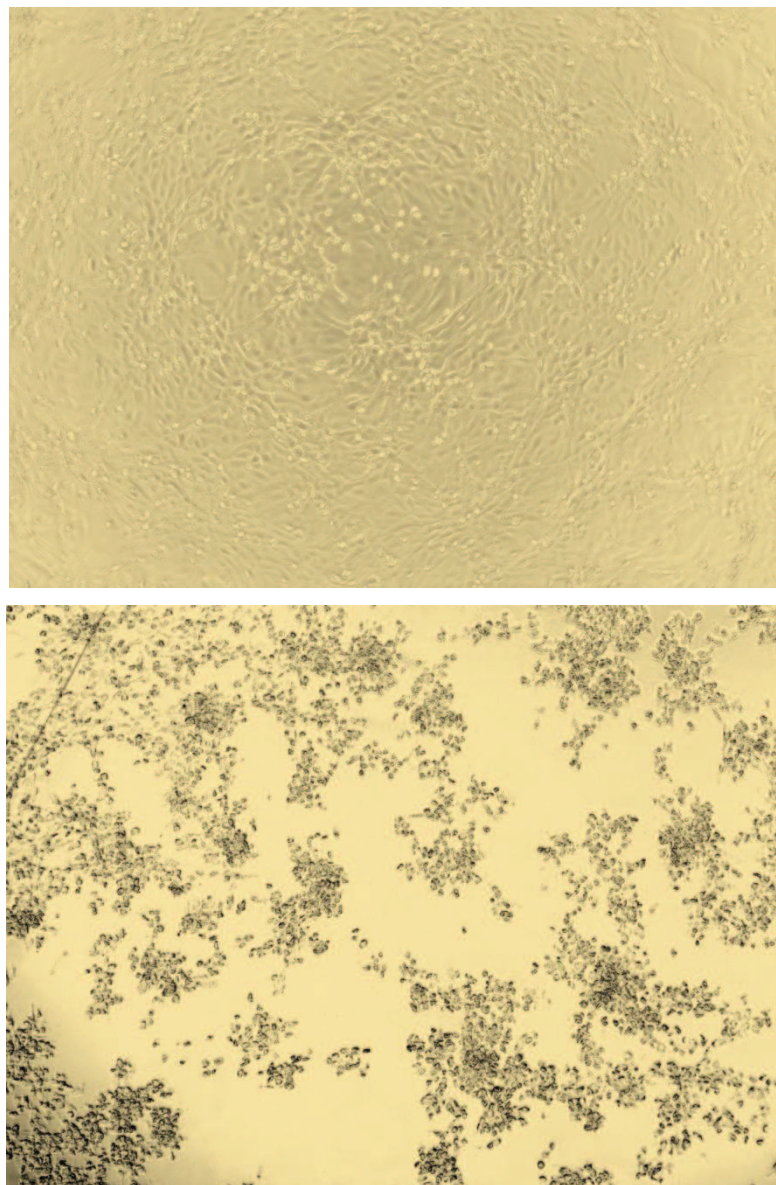
név	nukleotid sorrend	hossz (nt)	GC %	Tm (°C)
NS1-F	CATCACCTTGGCAGGACTCAGAAGCAATCATAACAGGAGACC	42	50,0	66,8
NS2A-F	TTCGCAAGAGGTGGACGCCAAGATCAGCATTCAGCTATCA	42	52,4	69,6
NS3-F	GGTACCAAACCTCAGCAGTGACAGAGAGCACAGTGAAAATGA	43	51,2	68,6
38NS4B-F	TTCTTGCTTGATCTGCGGGGGCTACAGCATGGTCTCTCTAT	42	52,4	69,3
102NS4B-F	TCAGCTCTCTTGCTGGCGGCCGGGTCTGGGGCCAAGTGACCCTGACTGTGACT	54	64,8	76,4
249NS4B-F	GGACTCTCATCAAAAACATGGGAAACCAGGCCTCAAGA G	40	50,0	66,6

Az instabilitási problémák elkerülése céljából pBeloBac alacsony kópiaszámú plazmidot és olyan kompetens sejteket (Max Efficiency DH10B *Escherichia coli* baktériumok) használtunk, amelyek kifejezetten nagyméretű plazmidok felvételére és stabil megtartására alkalmasak. A rekombináns plazmidokat a hősokk általi transzformáció során 10-40%-ban vették föl a DH10B *Escherichia coli* kompetens sejtek, amelyekben az összes rekombináns plazmid stabilnak mutatkozott.

4.2. A klónvírusok kifejeződése sejtvonalakon

Az előállított teljes hosszúságú, változatlan genommal rendelkező vagy a kívánt mutációt tartalmazó teljes hosszúságú DNS-ek transzkripcióját *in vivo* és *in vitro* módszerekkel is véghezvittük. Az *in vivo* transzkripciót először Vero sejtekben szándékoztunk megvalósítani, azonban a transzfekció többszöri próbálkozás és a protokoll változtatása után sem volt sikeres. A Vero sejteken 96 órával a transzfekció után sem láttunk citopatogén hatást. Látható CPE-t, vagyis a sejtek először plakkokban, majd diffúzan való lekerekedését végül BHK-21 sejtek transzfekciója után 48 órával sikerült észlelnünk.

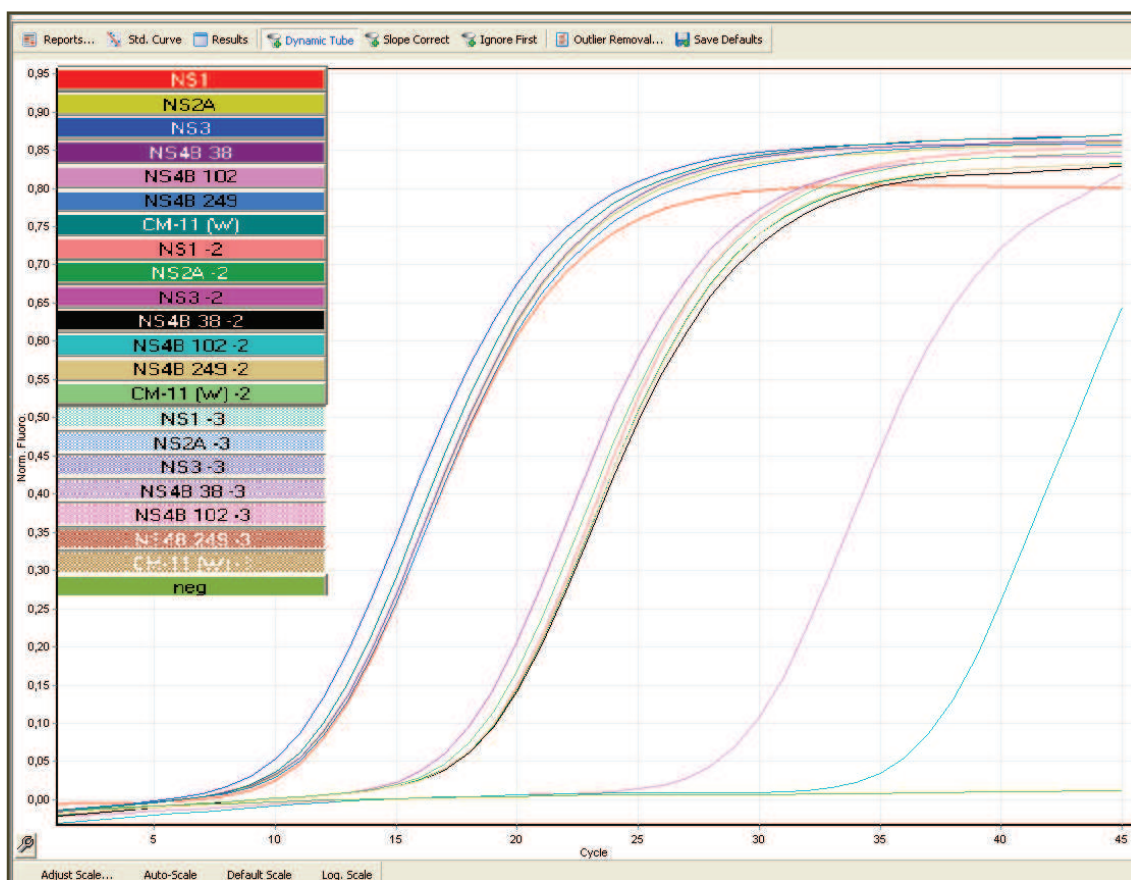
Az *in vitro* transzkripció lehetőség az esetlegesen fellépő splicing mechanizmusok elkerülése céljából (amire később gyanút keltett a Vero sejteken történt sikertelen próbálkozás is), illetve az irodalomban fellelhető módszerek összehasonlítása céljából merült föl. Az *in vitro* átírt RNS transzfekciója azonos módon, Turbofect *in vitro* transzfekciós reagens segítségével történt. Ebben az esetben is a látható CPE (a sejtek lekerekedése) közel azonos időben, körülbelül 48 órával a transzfekció után jelent meg a BHK-21 sejteken, és maximumát körülbelül 48 órával később érte el. A két módszer során kapott eredmények között szignifikáns különbséget nem láttunk. Minden esetben a BHK-21 sejteken életre keltett vírusok passzálása Vero sejtekre történt, amelyen a jellemző CPE-ta 11. ábra szemlélteti.



11. ábra Egyrétegű Vero sejttenyészet (natív)

Felső: negatív kontroll, alsó: NS4B-38 klónvírus általi citopatogén hatás, 72h pi.

A továbbiakban Vero sejteken elszaporított vírusok növekedése hasonló lefutást mutatott - egy kivételével - a különböző mutációkat tartalmazó vírusok esetében. Nagy fokban lelassult a növekedése, illetve alacsony titerben szaporodott el Vero sejteken az NS4B fehérje 102. aminosavának helyén cisztein helyett szerint tartalmazó vírus (G₇₂₂₃C mutáció), amelyet a 96 órával a sejtek fertőzését követően készült real-time RT-PCR eredményét megjelenítő 12. ábrán is láthatunk. Az amplifikáció során a szövetfelülúszóból kivont RNS-t használtuk templátként a WNV lineage 2 vírusok NS3 kódoló régiójára tevezett TaqMan alapú real-time RT-PCR rendszerünkben.



12. ábra Klónvírusok amplifikációs görbéi

jelmagyarázat: -2: 100×hígított RNS-ből kiindulva

A mutációk meglétét a Vero sejteken elszaporított vírusokban szekvencia analízissel ellenőriztük. Minden esetben a megváltoztatott genomot kaptuk vissza, vagyis a mutációk a vírus többszörös passzálása során is stabilnak mutatkoztak.

5. Megbeszélés

A reverz genetikai rendszerek, mint a fertőző DNS klónok is, manapság elengedhetetlen eszközök a vírusok genetikájának, virulenciájának, vagy akár replikációjának vizsgálatához (DAVIS, et al., 2001; SCHOLLE, et al., 2004; ROSSI, et al., 2005). A WNV kettes genetikai vonalához tartozó vírusok 2004 óta rendszeresen előfordulnak hazánkban és a környező országokban, enyhébb-súlyosabb megbetegedéseket okozva (BAKONYI, et al., 2013). A kettes genetikai vonalhoz tartozó afrikai WNV törzseket – valószínűleg a diagnosztikai hiányosságai miatt - sokáig alacsony patogenitásúnak tartották, azonban az utóbbi időben számos neuroinvasív, súlyos megbetegedést okozó tagjukat izolálták lovakból és emberekből is Afrikában (VENTER és SWANEPOEL, 2010). Mivel a közép-európai WNV törzsek is magas patogenitásúnak tűnnek, fontos a virulencia genetikai markereinek azonosítása.

A flavivírusok nemstrukturális fehérjéi összetett funkcióval rendelkeznek. Elengedhetetlen eszközei a normális vírus replikációnak, részt vesznek a virion összeépülésében (ROSSI, et al., 2010, SHIRYAEV és STRONGIN, 2010) és különböző módokon az immunrendszer kijátszásában is. Az egyik legfontosabb és leghatékonyabb, virulenciát meghatározó képesség az interferonok blokkolásán alapul, mivel vírusfertőzés esetén az interferonok az első immunmediátorok (SAMUEL, és DIAMOND, 2005; KELLER, et al. 2006; SUTHAR, et al. 2012). Az I-es típusú interferonok szignalizációjának gátlásában többek között részt vesz az NS2A (LIU, et al. 2006), NS2B, NS3, NS4A (LIU, et al. 2005), NS4B (MUÑOZ-JORDÁN, et al. 2005; EVANS és SEEGER, 2007) és az NS5 fehérje is (LAURENT-ROLLE, et al, 2010). Bizonyos mutációk során változások léphetnek fel a fehérje szerkezetében, polaritásában, amely az enzimtevékenységének vagy egyéb funkciójának csökkenését idézheti elő.

Célunk olyan aminosav változások vizsgálata volt a genomban, amelyek korábbi tanulmányok alapján az egyes genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsekben a patogenitással összefüggésben voltak. Ezekben a vírusokban egy - egy adott nemstrukturális fehérje egy aminosavának megváltoztatásával a vírus kisebb nagyobb mértékben attenuálódott, esetlegesen megváltozott a szövettenyészetben történő replikációja, plakk formáló képessége, *in vivo* pedig mindegyik mutációt tartalmazó vírus virulenciája csökkent egér modellben. A WNV egyes genetikai vonalához tartozó Kunjin vírus NS1 fehérjéjének 250. pozíciójában egy prolin – leucin aminosav csere a dimer szerkezet felbomlásához vezet, amely következtében a vírus replikációja lelassul, és tízszeres virulenciacsökkenés tapasztalható egérben. Vero

sejteken a két vírus azonos titert ér el, habár a mutációt tartalmazó vírus növekedése az első fázisban szignifikánsan lassabb (HALL, et al., 1999). Visszaállítva az eredeti helyzetet (250. aminosavhelyén prolin), a vírus visszanyeri a normál szaporodóképességét (LIU, et al., 2003). Ha a Kunjin vírus NS2A fehérjéjének 30. aminosavát alaninról prolinra cseréljük, a vírus teljesen elveszíti inhibitor hatását, amelyet normál esetben az IFN-beta promoterről történő transzkripcióra fejt ki (LIU, et al. 2004). A mutáció egérben erősen attenuált *in vivo*, azonban sejtvonalon replikációja a vad vírushoz hasonló volt (LIU, et al., 2006). Rossi és munkatársai tanulmányában a lineage 1-hez tartozó magas patogén NY99A30P mutációt tartalmazó törzs replikációja enyhén csökkent mértékű volt Vero sejteken, de egérben patogénnek mutatkozott (ROSSI, et al., 2007). Az NS3 fehérje multifunkcionális enzimaktivitással rendelkezik, így nukleotid szekvenciájában, és ennek következtében aminosav sorrendjében bekövetkező változás az enzimaktivitást nagymértékben befolyásolhatja. Brault és munkatársai kimutatták, hogy ha a NY99 vírustörzs 249. aminosava prolin (helikáz enzim része), a vírus magasan patogén amerikai varjakban (*Corvus brachyrhynchos*) és magas hőmérsékleten is képes gyorsan és tartósan replikálódni (BRAULT, et al., 2007). Az NS4B fehérje fő funkciója a STAT-1 foszforiláció blokkolásán keresztül megvalósuló interferon-indukált szignáltranszdukciós kaszkád inhibíciója. A P38G szubsztitúció a NY99 vírustörzsben kis plakkmérettel és egérben nagyfokban csökkent neuroinvasivitással társult (WELTE, et al., 2011; WICKER, et al., 2012). A C102S szubsztitúció során a fehérje funkciójában fontos szerepet betöltő négy cisztein egyike sérült, ami gyengébb növekedést, hőérzékenységet, egérben csökkent neuroinvasivitást és neurovirulenciát okozott (WICKER, et al., 2006). A 249. aminosav mutációja glutaminsavról glicinre a vírus attenuálódásához vezetett sejtvonalon és egérben is, az RNS szintézis és a replikáció lassításán keresztül, azonban az INF inhibíciót és a vírusösszeépülést nem befolyásolta (PUIG-BASAGIOTI, et al., 2007). Más szerzők szerint ez a mutáció csak kismértékben csökkentette a plakkméretet, és egérben hasonló virulenciájú volt, mint a kiindulási vírus (ROSSI, et al., 2007).

A munkánk során az előbbieken röviden bemutatott mutációk kettes genetikai vonalhoz tartozó vírusokban történő jellemzésének első lépését valósítottuk meg, vagyis a mutációkat tartalmazó teljes hosszúságú fertőző klónokat előállítottuk és sejtvonalon kifejeztük. A módosított genetikai anyaggal rendelkező vírusok tulajdonságait ezután szövettenyészetben *in vitro* illetve állatmodellek keretein belül *in vivo* lehet vizsgálni. Mivel az *in vitro* és *in vivo* tulajdonságok nem feltétlenül függenek össze, a vírusok átfogó jellemzéséhez elengedhetetlen az összetett, minden részletre kiterjedő vizsgálat, amelyet a közeljövőben tervezünk folytatni. Az elsődleges vizsgálatok alapján az NS4B C102S

mutációt tartalmazó vírus gyenge növekedést mutatott Vero sejteken és képtelen volt megfelelő titerben elszaporodni, míg a többi klónvírusnál ilyet nem tapasztaltunk. További részletesebb *in vitro* vizsgálatokkal, mint például növekedési görbék felállításával azonban finomabb eltéréseket is ki tudunk majd mutatni.

6. Összefoglalás

A WNV (WNV) egyes törzsei jelentős eltéréseket mutatnak neuroinvaszivitás vonatkozásában. A WNV kettes genetikai vonalához tartozó teljes hosszúságú fertőző klón előállításával lehetőség nyílik különböző, a vírus patogenitását esetlegesen befolyásoló genetikai markerek vizsgálatára, a vírus genetikai anyagának módosításával.

A teljes hosszúságú fertőző klón előállítása két különböző módszerrel, párhuzamosan történt. Első lépésként a Vero (afrikai zöldmajom vese epithel) sejteken elszaporított vírus tisztított RNS-éből egyszálú komplementer DNS készült, genomspecifikus primerek segítségével. A genomspecifikus primerek tervezése a kiindulási vírus szekvencia analízise alapján történt.

Az első módszer alapja a vírus teljes genomját lefedő, egymást átfedő polimeráz láncreakciók termékeiből felépülő fúziós PCR-ek sorozata volt. Az így kapott teljes hosszúságú, duplaszálú DNS másolat, kiegészítve a humán cytomegalovírus (CMV), illetve a T7 bakteriofág promoterral, került transzfekció útján BHK-21 (újszülött hörcsög vese) sejtekbe.

A második módszer lényege a vírus teljes genomját tartalmazó DNS pBeloBAC alacsony kópiaszámú plazmidba való beépítése volt. Az átfedő PCR termékek, illetve a plazmid restriktions enzimekkel való emésztése után a vírus teljes genomjának megfelelő DNS három darabban, ligálással került a plazmidba. A kiindulási plazmid tartalmazta a CMV promotert. Végül a vírus teljes genomját tartalmazó plazmid (CMV-WNV)*E. coli* DH10B kompetens sejtekben lett felszaporítva. A transzkripció *in vivo* (CMV promoter által, BHK-21 sejtekbe történt transzfekció után), illetve *in vitro* módszerrel (mMESSAGE mACHINE kit, Ambion) is történt.

A genom módosítása irodalmi adatok alapján olyan aminosav változtatásokra épült, amelyek lineage 1-hez tartozó WNV törzsekben különböző mértékű attenuálódáshoz vezettek *in vitro* illetve *in vivo* modellállatokban. A pontmutációk genomspecifikus primerekkel történtek, amelyek tartalmazták a kívánt nukleotid szekvenciát. A módosított genomszakasz a plazmid restriktions enzimekkel való emésztése és ligálás útján került a CMV-WNV plazmidba. A klónvírusok BHK-21 sejtekben *in vivo* transzkripció útján keltek életre.

Az *in vitro* jellemzés során, egyes aminosav változást tartalmazó vírusok növekedése Vero sejteken eltérést mutatott a kiindulási vírushoz képest.

A kutatás a VECTORIE EU FP7 projekt támogatásával történt.

7. Summary

Certain strains of the West Nile virus (WNV) are significantly different regarding their neuroinvasiveness. Construction of point-mutated infectious clones of a lineage 2 WNV strain that circulates in Eastern Europe allows us to identify possible genetic markers that can modify its virulence.

Construction of the full-length infectious clone was performed simultaneously in two different ways. First, the virus was propagated in African green monkey kidney epithelial (Vero) cells and a single-stranded complementary DNA (cDNA) was generated with genome-specific primers that were designed based on the the full-length genomic sequence of the virus. The principle of the first way was the amplification of long overlapping PCR products by polymerase chain reactions (PCRs) which were joined with subsequent fusion PCRs covering the whole genome. The prepared full-length double-stranded DNA was preceded by the human cytomegalovirus (CMV) promoter or the T7 bacteriophage promoter. The transcription was established *in vivo* by CMV promoter, after transfection into BHK-21 cells, while in the case of the T7 promoter transcription was performed *in vitro* using the mESSAGE mACHINE kit (Ambion) before transfection of baby hamster kidney BHK-21 cells. The basis of the second way was the incorporation of the DNA of the full-length virus into the low-copy number pBeloBAC plasmid that contained the CMV promoter. After digesting the overlapping PCR-products and the plasmid with the respective restriction enzymes, the DNA containing the whole genome of the virus was cloned into the pBeloBAC plasmid in three consecutive steps to obtain CMV-WNV plasmid. Finally, CMV-WNV plasmid was propagated in *E.coli* DH10B competent cells. The transcription was established *in vivo* (by CMV promoter, after transfection into BHK-21 cells).

Lineage 1 viruses that have phenotypes of reduced virulence in mice and inefficient growth in cell culture have already been identified. Applying reverse genetic methods, these single amino acid alterations that were previously proven to lead to attenuation *in vitro* and *in vivo*, were generated in our lineage 2 infectious clone. Point mutations were inserted in the genome of WNV using PCR-based mutagenesis with specific oligonucleotides (forward and reverse complement oligos) containing the altered nucleotides. The newly synthesized, modified fragments were placed into the CMV-WNV plasmid by digestion with restriction endonucleases followed by ligation. The *in vivo* transcription was applied after transfection of BHK-21 cells. Viruses with certain amino acid alterations showed different growth properties in Vero cells. The research was supported by the VECTORIE EU FP7 project.

8. Irodalomjegyzék

8.1. Folyóirat cikkek

BAKONYI, T., HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., NOWOTNY, N.: Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11. vol. 2. no. p. 225-331.

BAKONYI T., FERENCZI E., ERDÉLYI K., KUTASI O., CSÖRGŐ T., SEIDEL, B., WEISSENBÖCK, H., BRUGGER, K., BÁN E., NOWOTNY, N.: Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, 2013. 165.vol.1-2. no. p. 61-70.

BÁLINT, Á., FARSANG, A., ZÁDORI Z., HORNYÁK, Á., DENCŐ, L., ALMAZÁN, F., ENJUANES, L., BELÁK, S.: Molecular Characterization of Feline Infectious Peritonitis Virus Strain DF-2 and Studies of the Role of ORF3abc in Viral Cell Tropism. *J. Virology*, 2012. 86. vol. 11. no. p. 6258-6267.

BONDRE, V. P., JADI, R.S., MISHRA, A. C., YERGOLKAR, P. N., ARANKALLE V. A.: West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Journal of General Virology*, 2007. 88. vol. 3. no. p. 875-884

BRAULT, A. C., LANGEVIN, S. A., BOWEN, R. A., PANELLA, N. A., BIGGERSTAFF, B. J., MILLER, B. R., KOMAR, N.: Differential Virulence of West Nile Strains for American Crows. *Emerging Infectious Diseases*, 2004. 10. vol. 12. no. p. 2161-2168.

BRAULT, A. C., HUANG, C. Y-H., LANGEVIN, S. A., KINNEY, R. M., BOWEN, R. A., RAMEY, W. N., PANELLA, N.A., HOLMES, E. C., POWERS, A., M., MILLER, B. R.: A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nature Genetics*, 2007. 39. vol. 8. no. p. 1162-1166.

BRINTON, M.A.: The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Review of Microbiology*, 2002. 56.vol. p. 371-402.

CALISTRI, P., GIOVANNINI, A., HUBÁLEK, Z., IONESCU, A., MONACO, F., SAVINI, G., LELLI, R.: Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *The Open Virology Journal*, 2010. 4. vol. 2. no. p. 29-37.

CANTILE, C., DEL PIERO, F., DI GUARDO, G., ARISPICI, M.: Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Veterinary Pathology*, 2001. 38. vol. 4. no. p. 414-21.

CASTILLO-OLIVARES, J., WOOD, J.: West Nile virus infection of horses. *Veterinary Research*, 2004. 35. vol. 1.no. p. 467-483.

DAVIS, B. S., CHANG, G-J. J., CROPP, B., ROEHRIG, J. T., MARTIN, D. A., MITCHELL, C. J., BOWEN, R., BUNNING, M. L.: West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. 2001, *Journal of Virology*. 75. vol. 9. no. 4040-4047.

EVANS, J. D., SEEGER, C.: Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *Journal of Virology*, 2007. 81. vol. 21. no. p. 11809-11816.

FARAJOLLAHI, A., FONSECA, D. M., KRAMER, L. D., KILPATRICK, A. M.: „Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011. 11. vol. 7. no. p. 1577-1585.

GAMINO, V., HÖFLE, U.: Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Veterinary Research*, 2013. 44. vol. 1. no. p. 39.

GODDARD, L.B., ROTH, A.E., REISEN, W.K., SCOTT, T.W.: Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *Journal of medical entomology*, 2003. 40.vol. 6. no. p. 743-746.

GOULD, E.A.: Implications for Northern Europe of the Emergence of West Nile virus in the USA. *Epidemiology & Infection*, 2003. 131. vol. 1. no. p. 583-589.

GOULD, L.H., FIKRIG, E.: West nile virus: a growing concern? *The Journal of Clinical Investigation*, 2004. 113.vol. 8. no. p. 1102-1107.

HAYES, E. B., KOMAR, N., NASCI, R. S., MONTGOMERY, S.P., O’LEARY, D. R., CAMPBELL, G. L.: Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11. vol. 8. no. p. 1167-1173.

HALL, R. A., KHROMYKH, A. A., MACKENZIE, J. M., SCHERRET, J. H., KHROMYKH, T. I., MACKENZIE, J. S.: Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology*, 1999. 264. vol. 1. no. p. 66-75.

HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J.: West Nile Fever - a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 1999. 5. vol. 5. no. p. 643-650.

KELLER, B. C., FREDERICKSEN, B. L., SAMUEL, M. A., MOCK, R. E., MASON, P. W., DIAMOND, M. S., GALE, M. JR.: Resistance to Alpha/Beta Interferon Is a Determinant of West Nile Virus Replication Fitness and Virulence. *Journal of Virology*, 2006. 80. vol. 19. no. 9424-9434.

- KRAMER, L.D., Li, J., Shi, P-Y.: West Nile virus. *The Lancet Neurology*, 2007. 6. vol. 2. no. p. 171-181.
- KUTASI O., BAKONYI T., LECOLLINET, S., BIKSI I., FERENCZI E., BAHUON, C., SARDI S., ZIENTARA, S., SZENCI O.: Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2011. 25.vol. 3.no. p. 586-591.
- LANCIOTTI, R. S., EBEL, G. D., DEUBEL, V., KERST, A. J., MURRI, S., MEYER, R., BOWEN, M., MCKINNEY, N., MORRILL, W. E., CRABTREE, M.B., KRAMER, L.D., ROEHRIG, J. T. : Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of West Nile Virus Strains Isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 2002. 298. vol. 1. no. p. 96-105.
- LANGEVIN, S. A. , BRAULT, A. C., PANELLA, N. A., BOWEN, R. A., KOMAR, N.: Variation in Virulence of West Nile Virus Strains for House Sparrows (*Passer domesticus*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005. 72. vol. 1. no. p. 99-102.
- LAURENT-ROLLE, M., BOER, E. F., LUBICK, K. J., WOLINBARGER, J. B., CARMODY, A. B., ROCKX, B., LIU, W., ASHOUR, J., SHUPERT, W. L., HOLBROOK, M. R., BARRET, A. D., MASON, P. W., BLOOM, M. E., GARCÍA-SASTRE, A., KHROMYKH, A. A., BEST, S. M.: The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling. *Journal of Virology*, 2010. 84. vol. 7. no. p. 3503-3515.
- LIU, W.J., CHEN, H.B., KHROMYKH, A. A.:Molecular and Functional Analyses of Kunjin Virus Infectious cDNA Clones Demonstrate the Essential Roles for NS2A in Virus Assembly and for a Nonconservative Residue in NS3 in RNA Replication. *Journal of Virology*, 2003. 77. vol. 14. no.p. 7804-7813.
- LIU, W. J., CHEN, H. B., WANG, X. J., HUANG, H., KHROMYKH, A. A: Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the Flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *Journal of Virology*, 2004. 78. vol. 22. no. p. 12225-12235.
- LIU, W. J., WANG, X. J., MOKHONOV, V. V., SHI P-Y., RANDALL, R., KHROMYKH, A. A.: Inhibition of Interferon Signaling by the New York 99 Strain and Kunjin Subtype of West Nile Virus Involves Blockage of STAT1 and STAT2 Activation by Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, 2005. 79. vol. 3. no. p. 1934-1942.
- LIU, W. J., WANG, X. J., DAVID, C. C., LOBIGS, M., HALL, R. A., KHROMYKH, A. A.: A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A

Disables its Ability to Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice, *Journal of Virology*, 2006. 80. vol. 5. no. p. 2396-2404.

MACKENZIE, J. S. , WILLIAMS, D. T.: The zoonotic flaviviruses of southern, southeastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, 2009. 56. vol. 6-7. no. p. 338-356.

MONINI, M., FALCONE, E., BUSANI, L., ROMI, R., RUGGERI, F. M.: West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millenium World. *The Open Virology Journal*, 2010. 4. vol. 2. no. p. 42-51.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L., LAURENT-ROLLE, M., ASHOUR, J., MARTÍNEZ-SOBRIDO, L., ASHOK, M., LIPKIN, W. I., GARCÍA-SASTRE, A.: Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of Virology*, 2005. 79. vol. 13. no. p. 8004-8013.

NASH, D., MOSTASHARI, F., FINE, A., MILEER, J., O'LEARY, D., MURRAY, K., HUANG, A., ROSENBERG, A., GREENBERG, A., SHERMAN, M., WONG, S., CAMPBELL, G. L., ROEHRIG, J. T., GUBLER, D. J., SHIEH, W-J., ZAKI, S., SMITH, P., LAYTON, M.: The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *The New England Journal of Medicine*, 2001. 344. vol. 24. no. p. 1807-1814.

NIELSEN, C. F. , REISEN, W. K., ARMIJOS, M.V., MACHLACHLAN, N. J., SOTT, T.W.: High subclinical West Nile virus incidence among nonvaccinated horses in northern California associated with low vector abundance and infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008. 78. vol. 1. no. p. 45-52.

PETERSEN, L. R., ROEHRIG, J. T.: West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 2001. 7. vol. 4. no. p. 611-614.

PUIG-BASAGOITI, F., TILGNER, M., BENNET, C. J., ZHOU, Y., MUÑOZ-JORDÁN, J. L., GARCÍA-SASTRE, A., BERNARD, K. A., SHI, P-Y.:A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology*, 2007. 361. vol. 1. no. p. 229-241.

RAPPOLE, J.H., DERRICKSON, S.R., HUBÁLEK, Z.: Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*, 2000. 6. vol. 4. no. p. 319-328.

ROSSI, S. L., ZHAO, Q., O'DONNELL, W. K., MASON, P. W.: Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. *Virology*, 2005. 331. vol. 2. no. p. 457-470.

ROSSI, S. L., FAYZULIN, R., DEWSBURY, N., BOURNE, N., MASON, P. W.: Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. *Virology*, 2007. 364. vol. 1. no. p. 184-195.

ROSSI, S. L., ROSS, T. M., EVANS, J. D.: West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2010. 30. vol. 1. no. p. 47-65.

SAMUEL, M. A., DIAMOND, M. S.: Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival. 2005, *Journal of Virology*. 79. vol. 21. no. p. 13350-13361.

SCHOLLE, F., GIRARD, Y.A., ZHAO, Q., HIGGS, S., MASON, P. W.: *trans*-Packaged West Nile Virus-Like Particles: Infectious Properties in vitro and in Infected Mosquito Vectors. *Journal of Virology*, 2004. 78. vol. 21. no. p. 11605–11614.

SHIRYAEV, S., STRONGIN, A. Y.: Structural and functional parameters of the flaviviral protease: a promising antiviral drug target. *Future Virology*, 2010. 5. vol. 5. no. 593-606.

SMITHBURN, K. C., HUGHES, T. P., BURKE, A. W., PAUL, J. H.: A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine*, 1940. 20. vol. 4. no. p. 471-492 .

SOLOMON, T., OOI, M.H., BEASLEY, D.W.C., MALLEWA, M.: West Nile encephalitis. *British Medical Journal*, 2003. 326.vol. 1. no. p. 865-869.

SUTHAR, M. S., BRASSIL, M. M., BLAHNIK, G., GALE, M. JR.: Infectious Clones of Novel Lineage 1 and Lineage 2 West Nile Virus Strains WNV-TX02 and WNV-Madagascar. *Journal of Virology*, 2012. 86. vol. 14. no. 7704-7709.

VÁZQUEZ, A., SÁNCHEZ-SECO, M. P., RUIZ, S., MOLERO, F., HERNÁNDEZ, L., MORENO, J., MAGALLANES, A., TEJEDOR, C. G., TENORIO, A.: Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. 2010, *Emerging Infectious Diseases*. 16. vol. 3. no. 549-552.

VENTER, M., SWANEPOEL, R.: West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2010. 10. vol. 7. no. p. 659-664.

WARD, M. P., Levy, M., Thacker, H. L., Ash, M., Norman, S. K., Moore, G. E., WEBB, P. V.: Investigation of an outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2004. 225. vol. 1. no. p. 84-89.

WARD, M. P., SCHUERMANN, J. A., HIGHFIEL L.D., MURRAY, K. O.: Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Veterinary Microbiology*, 2006. 118. vol. 3-4. p. 255-259.

WEESE, J. S., BAIRD, J. D., DELAY, J., KENNEY, D. G., STAEMPFLI, H. R., VIEL, L., PARENT, J., SMITH-MAXIE, L., POMA, R.: West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. *The Canadian Veterinary Journal*, 2003. 44. vol. 6. no. p. 469-473.

WELTE, T., XIE, G., WICKER, J., WHITEMAN, M., LI, L., RACHAMALLU, A., BARRETT, A., WANG, T.: Immune responses to an attenuated West Nile virus NS4B-P38G mutant strain. *Vaccine*, 2011. 29. vol. 29-30. no. p. 4853-4861.

WICKER, J. A., WHITEMAN, M. C., BEASLEY, D. W. C., DAVIS, C. T., ZHANG, S., SCHNEIDER, B. S., HIGGS, S., KINNEY, R. M., BARRETT, A. D. T.: A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology*, 2006. 349. vol. 2. no. 245-253.

WICKER, J. A., WHITEMAN, M. C., BEASLEY, D. W. C., DAVIS, C. T., MCGEE, C. E., LEE, J. C., HIGGS, S., KINNEY, R. M., HUANG C. Y-H., BARRETT, A. D. T.: Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein, 2012, *Virology*. 426. vol. 1. no. p. 22-33.

8.2. Könyvek

SAMBROK, J., RUSSEL D.W.: *Molecular Cloning: A laboratory Manual (Third Edition)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni dr. Bakonyi Tamásnak, amiért lehetővé tette számomra a Tudományos Diákkörben való részvételt, dr. Szentpáli-Gavallér Katalinnak, amiért bekapcsolódhattam a munkájába, valamint a NÉBIH-ÁDI Baromfi és Sertés Virologiai Laboratórium dolgozóinak, amiért segítségünkre voltak a laboratóriumban végzett munka során.

A kutatás megvalósulását a VECTORIE EU FP7 projekt tette lehetővé.