

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

37. OTDK Biológia Szekció

HANTAVÍRUSOK IZOLÁLÁSÁNAK MÓDSZERTANI FEJLESZTÉSE



Témavezető: DR. MADAI MÓNICA
Tudományos munkatárs

Készítette: VARGA GRÉTA
BIOLÓGUS MSc II. évfolyam

PÉCS, 2025.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
I. Bevezetés	5
I. 1. Általános vírustörténet	5
I. 2. Hantavírusok általános jellemzése	5
I. 3. Hantavírusok szerkezete	7
I. 4. Klinikai sajátosságok	10
I. 5. Laboratóriumi diagnosztika	13
II. Célkitűzések.....	15
III. Anyag és módszer	16
III. 1. Rágcsáló szervek eredete.....	16
III. 2. Pilot projekt	16
III. 3. Sejtek előkészítése.....	16
III. 4. Mintafeldolgozás	17
III. 5. Sejtek fertőzése	17
III. 6. Nukleinsav extrakció.....	18
III. 7. PCR teszt	18
III. 8. Agaróz gélelektroforézis	20
IV. Eredmények	21
IV. 1. Vírus izolálására szánt minták kiválasztása	21
IV. 2. Pilot projekt eredményei	21
IV. 3. Módszerfejlesztés.....	22
IV. 3. 1. P1 fertőzés mikroszkópos eredményei.....	22
IV. 3. 2. Fertőzés PCR eredményei	24
V. Diskusszió.....	25
VI. Köszönetnyilvánítás	28
VII. Irodalomjegyzék	29

Rövidítések jegyzéke

ANDV	Andes vírus (<i>Orthohantavirus andesense</i>)
BMBL	Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories
bp	bázispár
CDC	Centers for Disease Control
CP/CPE	citopátiás hatás / Cytopathic effect
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	dezoxiribonukleziód-trifoszfát
DOBV	Dobrava-Belgrade vírus (<i>Orthohantavirus dobravaense</i>)
dpi	day post infection (fertőzést követő nap)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal Bovine Serum
Fw	forward primer
HCPS	hantavírus kardiopulmonális szindróma
HEK 293	humán embrionális vese (epithel) sejtvonal
HFRS	haemorrhagiás láz veseszindrómával
HNTV	Hantaan vírus (<i>Orthohantavirus hantanense</i>)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses – Nemzetközi Vírus Taxonómiai Bizottság
IFA	indirect immunfluorescent assay
NE	nephropathia epidemica
NF H ₂ O	nukleázmentes víz
NVAV	Nova vírus (<i>Orthohantavirus novaense</i>)
p#	passzázsszám
Pen/Strep	penicillin-streptomycin
PUUV	Puumala vírus (<i>Orthohantavirus puumalaense</i>)
RdRp	RNS-függő RNS-polimeráz
Rev	reverse primer
SEOV	Seoul vírus (<i>Orthohantavirus seoulense</i>)
SNV	Sin Nombre vírus (<i>Orthohantavirus sinnombreense</i>)
SWSV	Seewis vírus (<i>Orthohantavirus seewisense</i>)

TULV	Tula vírus (<i>Orthohantavirus tulaense</i>)
Vero E6	Szavannacerkóf majom vese (epithel) sejtvonat
VNL	Virologiai Nemzeti Laboratórium
WHO	World Health Organization - Egészségügyi Világszervezet

I. Bevezetés

I. 1. Általános vírustörténet

A történelem során a vírusok számtalan alkalommal formálták az emberi civilizációt: a fekete himlőtől a spanyolnáthán át egészen a modern kor koronavírus-járványáig. Bár nem élőlények, mégis sokak sorsát megváltoztathatják, képesek pusztítani, de gyógyítani is, melyek miatt mélyreható megismerésük elengedhetetlenül szükséges és kiemelt fontosságú.

A vírusok által okozott megbetegedések rendkívül különbözőek lehetnek, ennek ellenére alapvető jellemzőikben megegyeznek, úgy mint: nanométeres nagyságrendűek, és szerkezetükre jellemző a fehérjeburokkal (kapszid) körülvett DNS- vagy RNS-genom. Nem tartalmaznak riboszómákat, mitokondriumokat, illetve egyéb sejtorganellumokat. Egyes képviselőik lipidburokkal is rendelkeznek, mint például a hantavírusok és flavivírusok. Mivel replikációjukhoz gazdaszervezetre van szükségük, teljes mértékben parazitaként viselkednek. Terjedésük számos módon történhet, többek között levegőbe jutó aeroszolokkal, testnedvekkel, ürülékkel fertőzött élelmiszerekkel vagy tárgyakkal, illetve állatokkal való érintkezés útján. Az állatról emberre terjedő fertőzéseket zoonózisnak nevezik (Taylor, 2014).

Az emberek többsége élete során bizonyos formában kapcsolatba kerül állatokkal. Az újonnan megjelenő fertőző betegségek 75%-a zoonótikus eredetű, az emberi megbetegedést előidéző fertőzések 60%-át szintén zoonózisnak tekinthetjük. Az éghajlatváltozás, urbanizáció, turizmus és környezetszennyező antropogén tevékenységek mind hozzájárulnak a patogének elterjedéséhez és újbóli megjelenéséhez, mivel ezen tényezők elősegítik az emberek és a vadon élő állatok érintkezését, megváltoztatva a fertőző ágensek terjedési mintázatát és eloszlását.

A zoonózisok komoly közegészségügyi kihívást jelentenek, különösen az alacsony és közepes jövedelmű országokban, ahol jelenlétük súlyos következményekkel jár. Becslések szerint évente 2,4 milliárd megbetegedést és 2,7 millió emberi halálestet okoznak. Nagy esetszámú fertőzést okozó kórokozók például a veszettség, az Ebola vírus, a Nyugat-nílusi láz vírusa és a hantavírusok, melyek közül Magyarországon az utóbbi kettő is cirkulál (Rahman és mtsai., 2020).

I. 2. Hantavírusok általános jellemzése

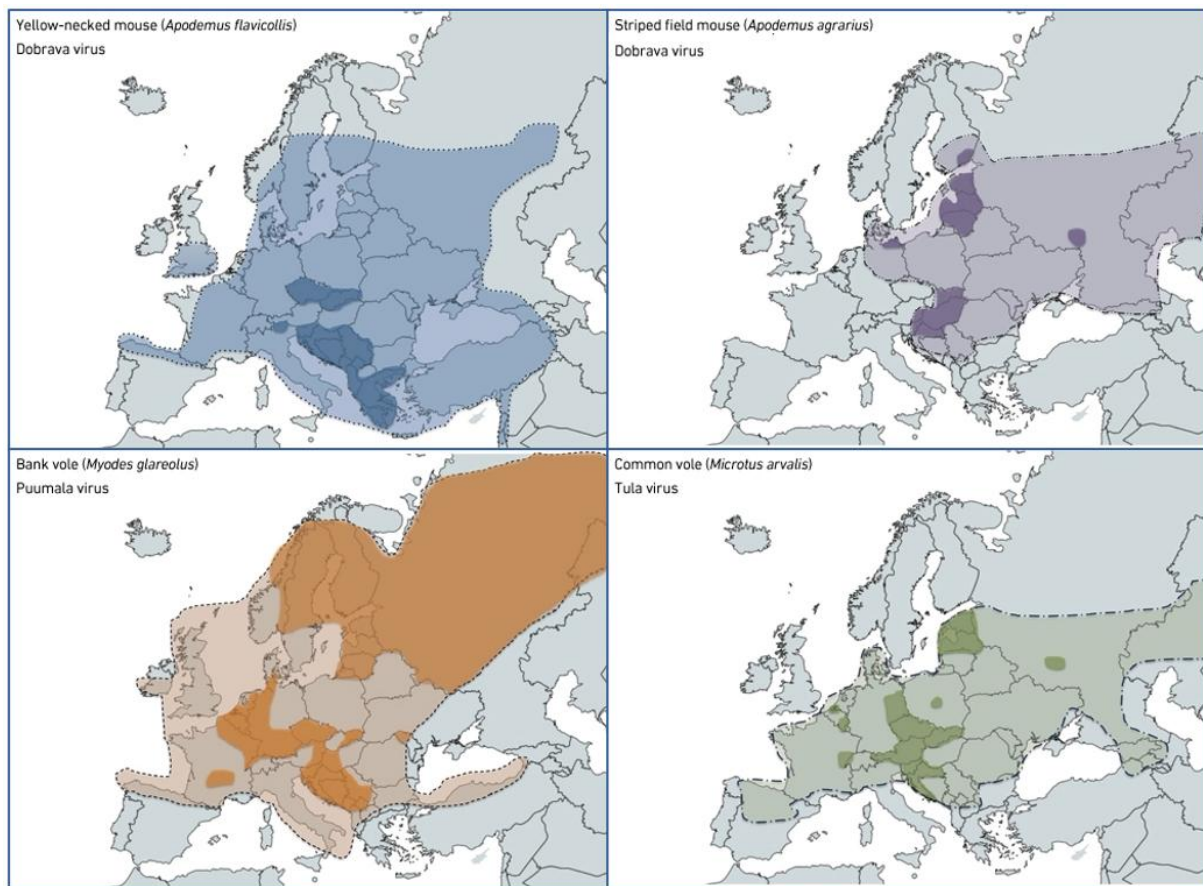
A hantavírusok első hivatalos említésére 1976-ban került sor, miután a dél-koreai Han folyó mentén befogott pirok erdeieger (*Apodemus agrarius*) szervmintáiból azonosították a vírust, melyet a folyó után Hantaan-nak (HNTV) neveztek el. 1981-ben a vírust tüdő szövetből

izolálták, majd Vero E6 sejtkultúrán sikeresen szaporították, további lehetőséget teremtve a kórokozó részletes genetikai és morfológiai vizsgálatára. 1987- től a *Hantavirus* nemzetség, rendszertanilag a *Bunyaviridae* család részét képezi (Kuhn és mtsai., 2023; Lee és mtsai., 2014).

A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (ICTV) legutóbbi átcsoportosítása alapján az *Elliovirales* rendbe, a *Hantaviridae* családba sorolták a hantavírusokat. A *Mammantavirinae* alcsaládon belül négy genust különböztetünk meg: a *Loanvírus*, a *Mobatvírus*, az *Orthohantavírus* és a *Thottimvírus* genusokat (Kuhn és mtsai., 2024). Napjainkig 38 hantavírus faj került azonosításra, melyek közül 24 bizonyítottan humánpatogén (Sehgal és mtsai., 2023).

A hantavírusokat földrajzi előfordulásuk alapján két csoportba sorolhatjuk: az Óvilági képviselőik Európában, Ázsiában és Afrikában fordulnak elő, míg az Újvilágiak Észak- és Dél-Amerikában találhatók. Az általuk előidézett betegségek változatosak, és a tünetek jellege attól függ, hogy melyik vírus a betegség okozója. A hantavírus fertőzések következtében két fő betegséget különböztetünk meg: a haemorrhagiás láz veseszindrómával (HFRS), amelyet Ázsiában a Hantaan és a Seoul vírus (SEOV), míg Európában a Dobrava-Belgrade vírus (DOBV) okoz, valamint a hantavírus kardiopulmonális szindrómát (HCPS), melynek legjelentősebb képviselői a Sin Nombre (SNV) és az Andes vírus (ANDV). Ezek mellett fontos megemlíteni a HFRS enyhébb formáját, a nephropathia epidemica-t (NE), melynek évi többeszes esetszámaért a Puumala vírus (PUUV) felelős. A PUUV-endémiás területek közé tartozik Észak-Európa nagy része (Balti-országok), Belgium bizonyos régiói, Északkelet-Franciaország és Nyugat-Németország, ahol a vírus mind a rezervoár, mind az humán populáció körében elterjedt (Brummer-Korvenkontio és mtsai., 1980; Jiang és mtsai., 2017; Murri és mtsai., 2020). A Tula vírus humánpatogenitása sokáig kérdőjeles volt, azonban egyre több tanulmány erősíti meg ennek ellenkezőjét. Németországban egy HFRS-ben szenvedő beteg vérsavójában TULV-specifikus, neutralizáló antitesteket mutattak ki, úgy, mint német erdészeti munkások és cseh véradók mintáiban is (Schmidt és mtsai., 2016).

Hazánkban ezidáig a Puumala, Dobrava-Belgrade, Nova (NVAV), Seewis (SWSV) és Tula vírusok kerültek azonosításra. A Puumala vírus természetes gazdaszervezete a vöröshátú erdeipocok (*Myodes glareolus*), míg a Dobrava-Belgrade vírust a közönséges erdeieger (*Apodemus sylvaticus*), a sárganyakú erdeieger (*Apodemus flavicollis*), valamint a pirók erdeieger (*Apodemus agrarius*) terjeszti. Az említett rágcsálók Magyarország erdős területeinek fő populációit alkotják. A hazai kisemlős populációkban cirkulál továbbá a Nova, a Seewis és a Tula vírus. Ez utóbbit a mezei pocok (*Microtus arvalis*) és a csaltitjáró pocok (*Microtus agrestis*) hordozza (1. ábra) (Kang és mtsai., 2009; Madai és mtsai., 2021).



1.ábra: Hantavírusok elterjedése Európában

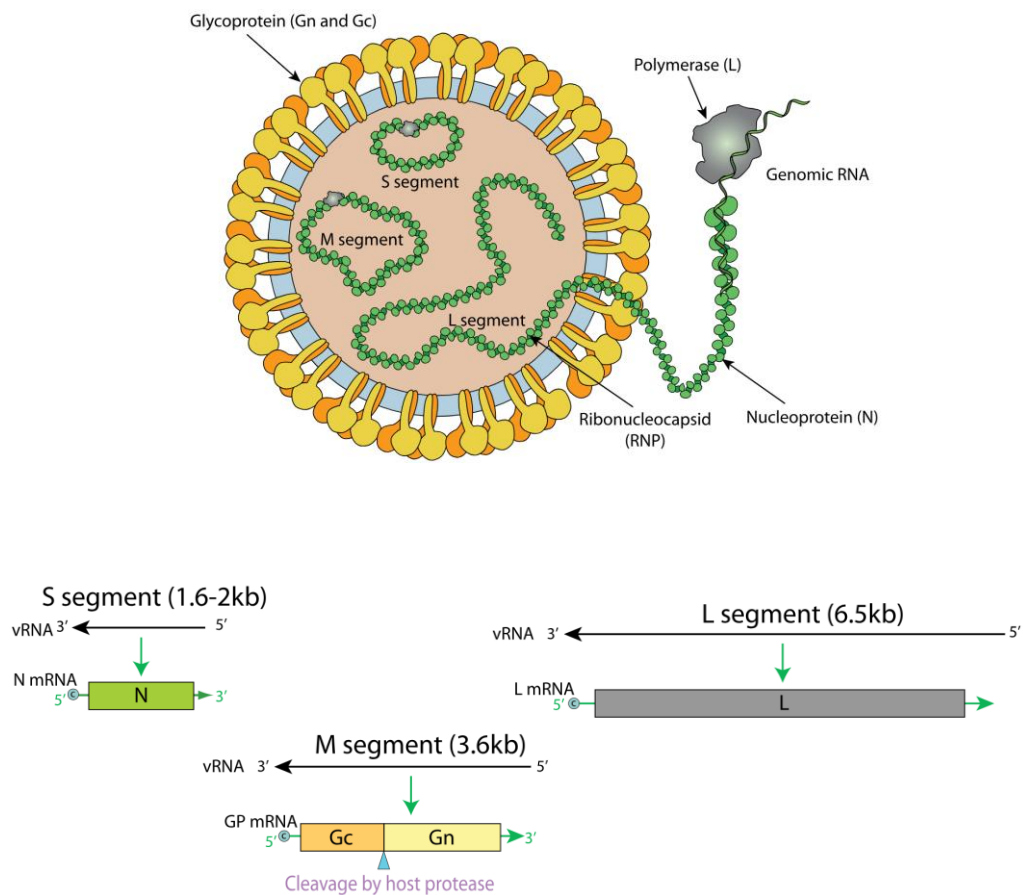
(https://microbiologysociety.org/resource_library/knowledge-search/hantaviruses-neglected-zoonoses-zoonotic-diseases.html)

A világosabb színű területek a rezervoár fajok elterjedését, a sötétebbek a vírusok azonosításának helyét jelzik.

2007. óta számos új hantavírus fajt fedeztek fel, melyek gazdaszervezetei nem rágcsálók, hanem cickányok, vakondok és denevérek, azonban klinikai jelentőségük egyelőre még nem tisztázott (Kruger és mtsai., 2015).

I. 3. Hantavírusok szerkezete

A hantavírusok negatív egyszálú RNS-vírusok. Gömb alakú virionjaikat kettős lipdréteg burkolja, átlagos átmérőjük 80-120 nm. Genomjuk három szegmensre tagolható, melyek eltérő méretűek és más-más feladattal bíró fehérjét kódolnak: az S (small, kicsi) a nukleokapszid fehérjét (N), az M (medium, közepes) a glikoprotein prekurzorokat (Gn, Gc), míg az L (large, nagy) az RNS-függő RNS-polimerázt (RdRp) (2. ábra).

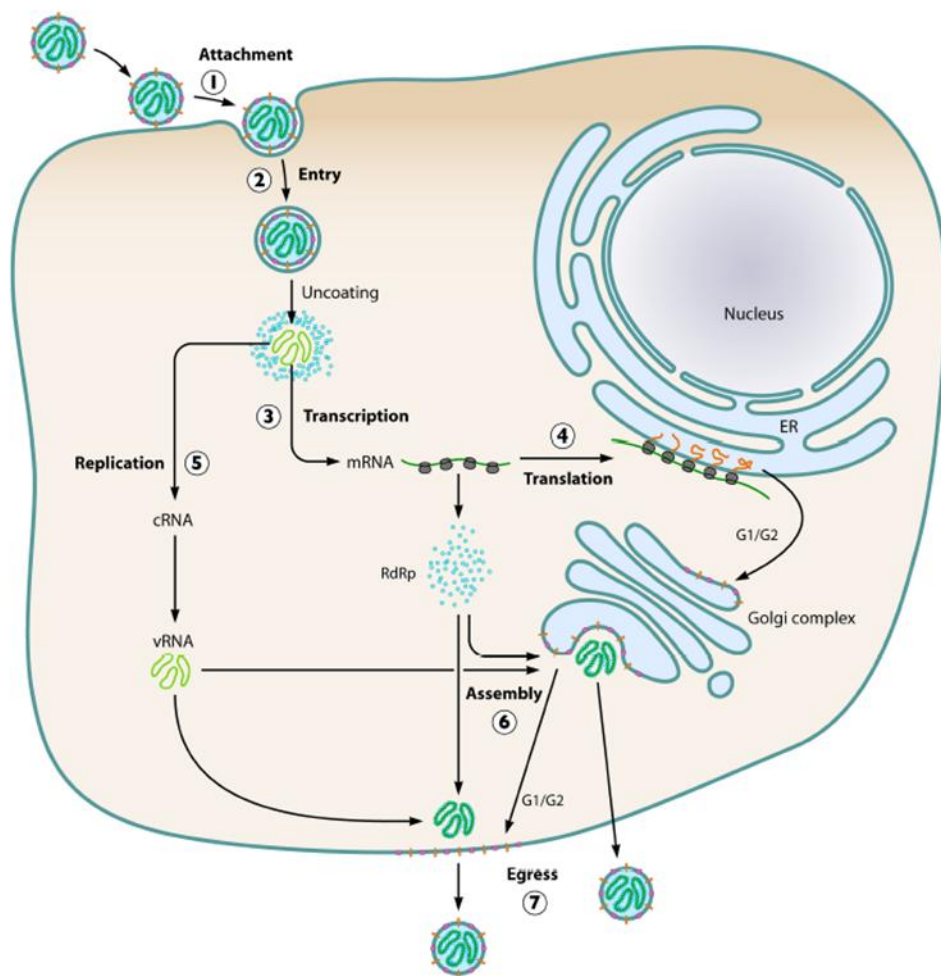


2. ábra: A vírus felépítése (<https://viralzone.expasy.org/213>)

A nukleokapszid fehérje N-terminálisa 100 aminosavból épül fel, amely erős antigénként viselkedik, így a szervezetben gyors és erőteljes immunválaszt idéz elő. A hantavírusok ezen tulajdonsága lehetőséget ad különböző diagnosztikai eljárások alkalmazására. A Gn és Gc felszíni glikoproteinek kettős funkciót látnak el: egyrészt a célsejt receptoraihoz kapcsolódnak, másrészt kijelölik a sejten belül azt a helyet, ahol a virion összeépül. Az RNS-függő RNS-polimeráz a vírusreplikációt irányítja, melyhez felhasználja az endonukleáz, transzkriptáz, replikáz és RNS-helikáz enzimaktivitásait. (Khaiboullina és mtsai., 2005).

A vírusa gazdasejt (epithel sejtek, limfociták, makrofágok) sejt felszíni receptoraihoz való kötődése után endocitózissal jut a sejtbe. A membránfúziót követően a vírus dekapszidálódik, majd a citoplazmában megkezdődik a virális RNS mRNS-sé történő átírása, amelyhez az RdRp endonukleáz aktivitása által a gazdasejt mRNS-ének 5' végéről lehasított nukleotidokat használja fel.

Az S és L szegmensekről képződött mRNS-ek a citoplazma szabad riboszómáin transzlálódnak, míg az M mRNS transzlációja a membránhoz kötött riboszómákon zajlik. A burkot alkotó fehérjék glikolizációja a Golgi-komplexbe érve fejeződik be. A virion összeépülése a Golgi membránján történik melyről, leválva és vezikulákba csomagolódva transzportálódik a plazmamembrán felé. Az újonnan létrejött, érett virion végül exocitózissal távozik a gazdasejtből (3. ábra) (Chandy és Mathai, 2017; Jonsson és mtsai., 2010; Khaiboullina és mtsai., 2005).



3. ábra: A fertőzés mechanizmusa (Jonsson és mtsai., 2010)

A hantavírussal fertőzött állatok aeroszolizált exkrétumainak (vér, nyál, vizelet, ürülék) belégzése révén indirekt módon képesek az emberi szervezet fertőzésére, illetve az direkt úton a fertőzött állat harapásával is bekövetkezhet. A vírus az állatok között tartósan fennmarad, melyet vizeletük, nyáluk és ürülékük által egész életük során üríthetnek (Madai és mtsai., 2021).

I. 4. Klinikai sajátosságok

A hantavírus fertőzés két súlyos betegség kialakulását eredményezheti: a haemorrhagiás lázat veseszindrómával (HFRS) és a hantavírus kardiopulmonális szindrómát (HCPS). A két tünetegyüttes földrajzilag elkülönül egymástól, tekintve, hogy a rezervoár fajok elterjedése és eloszlása eltérő. A HFRS elsősorban Euráziában fordul elő, míg a HCPS az amerikai kontinensen jellemző (Ioannou és mtsai., 2017; Sehgal és mtsai., 2023).

A HFRS-t Ázsiában a Hantaan és a Seoul vírus, míg Európában a Dobrava-Belgrade vírus okozza. Európán belül a legelterjedtebb a Puumala hantavírus, amely a HFRS enyhébb formáját, a nephropathia epidemica-t idézi elő. A Tula vírus humánpatogenitása egyelőre nem teljesen tisztázott, de számos példa támasztja alá ennek bizonyosságát (Hofmann és mtsai., 2021; Reynes és mtsai., 2015).



4. ábra: HCPS és HFRS előfordulása (Kim és mtsai., 2021)

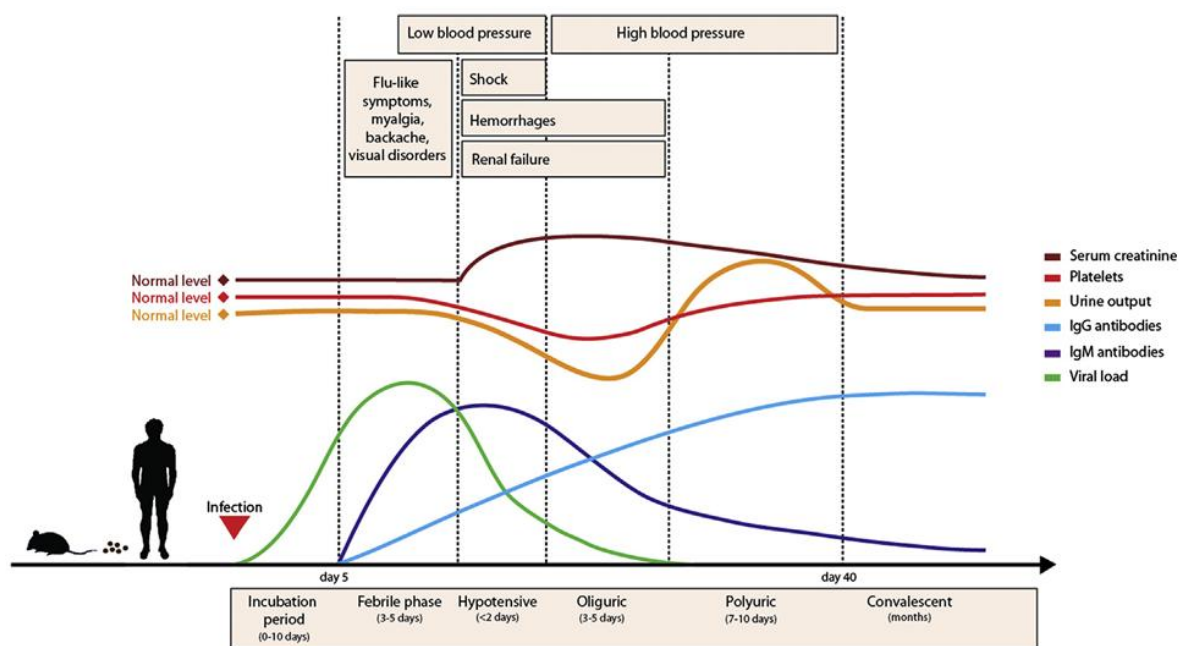
A HFRS fertőzés alapvetően 5 szakaszra osztható, 2-4 hetes lappangási időt követően. A fertőzés kezdeti fázisában influenzaszerű tünetek jelennek meg, úgy, mint a láz, fejfájás, rossz közérzet, izomfájdalom, étvágytalanság és szemfájdalom, mely általában 3-5 napig tart. Ehhez vérzéses tünetek is társulhatnak, mint például kötőhártya alatti vérzés vagy petechiák megjelenése. Puumala vírussal fertőzött egyéneknél fényérzékenység alakulhat ki, illetve a fellépő idegrendszeri zavarok epilepsziás rohamot, agyvelőgyulladást, hemiparézist vagy egyéb bénulásokat idézhetnek elő. Bizonyos tanulmányok szerint az említett tünetek a szervezet autoimmun mechanizmusainak részét képezik a vírusfertőzés elleni védekezésben.

A második szakasz a hipotenzív (alacsony vérnyomás) fázis, mely 1-2 napig tart. Ebben az időszakban a hipovolémiás sokk a legjellemzőbb tünet, melyet a betegek 21-28%-a megtapasztal. Ezt gyakran gastrointestinális panaszok, például hasfájás, hányinger és hányás kísérik.

A harmadik fázis az oliguria szakasza, amelyet 3-5 napig tartó csökkent vizeletképződés jellemez. Ez idő alatt különböző súlyosságú veseelégtelenség alakulhat ki, és a fertőzöttek körülbelül 13-47%-a hemodialízisre szorul, valamint EKG-rendellenességek is előfordulhatnak, melyek háttérében ritmuszavarok és ingerületvezetési problémák állnak.

A negyedik szakasz a poliuria fázisa, amelyben az előbbiekkal ellentétben fokozott vizeletürítés lép fel, naponta akár 3-6 liter mennyiségben, amely a szervezet homeosztázisának és elektrolit-egyensúlyának felborulásához vezet.

Az ötödik, egyben utolsó fázis a lábadozás szakasza, mely során a beteg állapota fokozatosan javul, ugyanakkor a teljes felépülés akár hetekig, hónapokig is eltarthat (5. ábra).



5. ábra: A fertőzés és a kialakuló HFRS szakaszokra bontva (láz, hipotenzív, oliguria, poliuria és lábadozás) (Avšič-Županc és mtsai., 2019)

A PUUV-fertőzés okozta nephropathia epidemica a HFRS-hez hasonló, de annál enyhébb tünetekkel jár, többek között lázzal, has- és hátfájással, valamint vesekárosodással, ennek ellenére a betegség prognózisa általában kedvező. A nephropathia epidemica előfordulása ciklikus, 3-4 évente figyelhetőek meg a fertőzési csúcsok, melyek összefüggésben áll a hordozófajok abundanciájának ciklikusságával (Ahlm és mtsai., 1994).

A halálozási ráta jelentős eltérést mutat a különböző hantavírusok esetében: a Puumala vírussal fertőzött betegek körében rendkívül alacsony, 1-2%-os, míg a Dobrava-Belgrade vírusfertőzések 10-15%-a halálos kimenetelű (Ioannou és mtsai., 2017; Krüger és mtsai., 2001; Schönrich és mtsai., 2008).

A hantavírus kardiopulmonális szindróma (HCPS) a HFRS-hez képest jóval súlyosabb betegség, melynek halálozási rátája 30-50% között mozog. A betegség lefolyásában három szakaszt különíthetünk el: a prodromális, a kardiopulmonális és a lábadozási (konvaleszcens) periódusokat. A betegség tünetei széles skálán mozognak, az enyhe hypoxaemiától egészen a kardiogén sokkal járó légzési elégtelenségig, amely életveszélyes állapotot jelent (Avšič-Županc és mtsai., 2019; Jonsson és mtsai., 2008).

A fertőzés kezdeti szakasza általában rövid ideig tart, többnyire influenzaszerű tünetekkel jár, mint például láz, hidegrázás, izomfájdalom, fejfájás, hasfájás, hányinger, hányás és hasmenés. Ezt követően viszonylag gyorsan kezdetét veszi a második fázis, melyet hirtelen fellépő, egyre erősödő köhögés, légszomj és megnövekedett pulzusszám (tachycardia) jellemez. Ebben a szakaszban gyakran jelentkezik alacsony vérnyomás (hipotenzió) és tüdőödéma, mely a felszaporodott szövetnedv miatt mellhártyagyulladásához vezethet, légzési elégtelenséget eredményezve, amely szükségessé teszi a lélegeztetőgép használatát. Súlyosabb esetekben a beteg állapota tovább romlik kardiogén sokk, tejsavas acidózis és a fokozódó hemokoncentráció megjelenésével. A fertőzés néhány óra leforgása alatt végzetes lehet. Az akut fázist követően fokozott mennyiségű vizelet távozik a szervezetből, amely a tüdőödéma megszűnését eredményezheti. A lábadozás hosszadalmas és lassú, valamint ebben az időszakban gyakori panaszok közé tartozik a fáradtság, csökkent fizikai teherbírás, ám az esetek többségében a felépülés teljes, maradandó következmények nélkül (Avšič-Županc és mtsai., 2019; Schönrich és mtsai., 2008).

Annak ellenére, hogy a vese megbetegedéseit általában a HFRS-hez, a tüdő érintettségét pedig a HCPS-hez kötik, az orvostudomány fejlődése rávilágított arra, hogy a két szindróma részben átfedést mutat. A HFRS-es betegeknél egyre gyakrabban észlelnek tüdőfertőzéseket, míg HCPS-es esetekben növekvő számban jelennek meg veserendellenességek (Ahlm és mtsai., 1994).

A hantavírus fertőzések megelőzésére jelenleg nincs az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által jóváhagyott vakcina. Továbbá nem áll rendelkezésre olyan antivirális szer, amely a hantavírus fertőzések kezelésére teljes mértékben megfelelő lenne. A ribavirin, amely egy vírusreplikáció gátlásán alapuló antivirális gyógyszer, a HFRS kezelésében bevett terápia, azonban kevésbé hatásos a HCPS tüneteinek enyhítésében.

Napjainkban a kutatók a monoklonális antitestterápia (MAb) előnyeire hívják fel a figyelmet, mivel az antitestterápia alkalmazásával kiváló eredményeket értek el a betegség kezelésében. (Aviziniéné és mtsai., 2023; Chandy & Mathai, 2017; Sehgal és mtsai., 2023).

I. 5. Laboratóriumi diagnosztika

A hantavírus-fertőzés diagnosztizálására szerológiai tesztek használhatóak, amelyek alkalmasak a vírus nukleokapszid fehérjéje és glikoprotein tüskéi ellen termelődött antitestek, elsősorban az IgM és/vagy IgG kimutatására, jelen lehetnek a rágcsálók, valamint a betegek szervezetében is.

A leggyakrabban használt szerológiai vizsgálati módszerek az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) és az IFA (indirect immunofluorescent assay). Az elsőként elterjedt szerológiai teszt az IFA volt, amely során tárgylemezhez fixált, vírussal fertőzött sejteket használtak a vírus ellen termelt specifikus antitestek kimutatására. Bár az IFA pontos és megbízható eredményeket ad, a rutin diagnosztikában ritkán alkalmazzák idő- és munkaigényessége miatt. Ezzel szemben az ELISA a klinikai laboratóriumok legelterjedtebb diagnosztikai módszerévé vált, mivel egyszerűbb, gyorsabb és nagyobb mintaszám feldolgozására alkalmas.

A laboratóriumi kutatásokban gyakran alkalmazott neutralizációs tesztek alkalmazásával a vírust semlegesítő antitestek jelenléte és mennyisége egyszerre detektálható. Ezek a tesztek alapvető fontosságúak a vírusok elleni immunválasz tanulmányozásában és a vakcinák hatékonyságának mérésében. A neutralizációs tesztek elvégzéséhez leggyakrabban a Vero E6 sejtvonalat használják, mely a virológiai kutatások egyik legelterjedtebb és legmegbízhatóbb sejtvonala (Hooper és mtsai., 2013; Jonsson és mtsai., 2010; Sundström és mtsai., 2011).

A szavannacerkóf majom (*Cercopithecus aethiops*) veséjéből származó Vero E6 sejtvonal a legtöbb vírus számára ideális sejtmodellnek bizonyul, hiszen a sejtekben nem működik az I. típusú interferon válasz. Az interferon válasz a gazdasejtek egyik legfontosabb védekezési mechanizmusa a vírusfertőzésekkel szemben, mivel az interferonok olyan vírusellenes géneket aktiválnak, amelyek képesek gátolni a vírusok szaporodását. A Vero E6 sejtek esetében azonban az I. típusú interferon gének (IFN- α és IFN- β 1) delécioja miatt ez a védekező mechanizmus nem működik. Ennek eredményeként a vírusok akadálytalanul replikálódhatnak, amely különösen alkalmassá teszi ezt a sejtvonalat a legtöbb vírus szaporítására és kutatási célú vizsgálatára (Osada és mtsai., 2014).

Általánosságban elmondható, hogy a hantavírusokat nehéz sejtkultúrán szaporítani, mert, *in vitro* körülmények között a különböző sejtvonalakon (pl: Vero E6) nem okoz jellegzetes citopátiás hatást (CPE), ezzel megnehezítve a vírusizolálást. (Nusshag és mtsai., 2023; Seto és mtsai., 2011). A HEK 293 sejtvonal, mely humán embrió veséből származik jóval ígéretesebb sejtes modell lehet a hantavírus okozta CPE megfigyelésére. (Markotic és mtsai., 2003).

A hantavírusok viszonylag alacsony vírustiterrel és igen rövid ideig okoznak virémiát, ezáltal a vírus vérből való kimutatására leginkább a fertőzés korai szakaszában van lehetőség. A virális RNS detektálása RT-PCR segítségével szérumból, vizeletmintából is elvégezhető (Jonsson és mtsai., 2010; Takács Mária, 2022).

A diagnosztika fejlesztése céljából az elmúlt évtizedben több próbálkozást tettek a kutatók, annak érdekében, hogy olyan módszereket fejlesszenek, melyek nemcsak a hantavírusok kimutatására alkalmasak, hanem mennyiségi meghatározást is lehetővé tesznek. Ennek egyik példája a vírusgenom L-szegmensére (legkonzerváltabb régió) tervezett primerek használata és a kvantitatív real-time PCR protokolljának kialakítása (Mohamed és mtsai., 2012). Az előbbieket ellenére a tapasztalat azt mutatja, hogy még napjainkban sem áll rendelkezésre univerzális (minden hantavírust kimutató) real-time rendszer.

II. Célkitűzések

A hantavírusok kutatása már az 1970-es évek közepétől zajlik és bár azóta, az évtizedek alatt számos kérdésre sikerült megtalálni a választ, de közel sem tudunk eleget ahhoz, hogy ne fordítsunk kutatásukra elegendő figyelmet.

Tekintve, hogy a hantavírus fertőzések ellen nincs az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által elfogadott, engedélyezett vakcina forgalomban, emellett nincs olyan antivirális szer, amely alkalmas lenne a hantavírus fertőzések teljeskörű kezelésére, annak ellenére, hogy a vírusfertőzés akár egész életen át tartó szövődeményekkel járhat, kiemelt jelentőségű a hantavírusok alapos és átfogó vizsgálata.

A Virologiai Nemzeti Laboratórium (VNL) munkatársai korábbi kutatásaik során több hantavírus fajjal is foglalkoztak. A CDC által kiadott BMBL szerint a DOBV 3-as szintű kórokozó, emiatt csak BSL-3/4-es szintű laboratóriumban dolgozhatunk vele, míg a PUUV és TULV azon fertőző ágensek közé tartoznak, melyekkel BSL-2 szintű feltételek mellett is végezhetünk kísérleteket. A kísérlet során, bár kis mennyiségű mintával dolgozunk, BSL-2 szinten is követjük a BSL-3-as laboratóriumi protokollokat. Ezen okok miatt jelenleg (MSc hallgatóként) csak az utóbbi két patogén vizsgálatait végeztem el.

A virológiai vizsgálatok jelentős részéhez vírus izolátumok előállítására van szükség. A tapasztalat és az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a hantavírusokat nehéz sejtkultúrán szaporítani, de nem lehetetlen, így elsődleges célom volt rágcsló gazdaszervezetek különböző szervmintáiból történő Puumala és Tula vírusok izolálása, citopátiás hatásuk összehasonlítása Vero E6 és HEK 293 sejtvonalon, továbbá a vírusok jelenlétének kimutatása különböző molekuláris biológiai módszerekkel, bizonyítva a fertőzés sikerét.

Mindezek által a korábbi eredményeinket alapul véve, a meglévő módszerek tökéletesítésén és fejlesztésén keresztül egy megbízható metodika kialakítása a célom, mely a jövőbeni hantavírus kutatások, mint például antivirális hatóanyagok tesztelése, vakcinafejlesztés, állatkísérletek biztos alapjául szolgálhat.

III. Anyag és módszer

III. 1. Rágcsáló szervek eredete

Kutatásunk során olyan rágcsáló szervmintákat használtunk, melyekről korábban a Virologiai Nemzeti Laboratórium (VNL) munkatársai PCR- rel bizonyították a hantavírus- pozitivitás tényét és eredményeiket publikálták (Madai és mtsai., 2021). Mivel egyes minták közel 10 éve fagyaszttva voltak, ezért ismét nukleinsav extrakciót végeztünk, majd hantavírus- specifikus PCR-rel bizonyítottuk a vírusok (PUUV, TULV) jelenlétét. Az ezt követő kísérleti munkát, mind a pilot projekt, mind a módszerfejlesztés esetén, a megerősített pozitív szervszuszpenziók felhasználásával végeztük.

III. 2. Pilot projekt

A módszertani fejlesztés előtt egy előkísérletet végeztünk, mellyel meghatároztuk az izolálás kritikus pontjait. Laboratóriumi tapasztalatok alapján, fontos fertőzést befolyásoló tényező lehet a sejtek életkora és konfluenciája, valamint a sejtvonal típusa. A kísérlet modelljeként a Vero E6 sejtvonalat választottuk, mivel a korábbi tapasztalatok nagyon vegyes eredményt mutattak, mely nem egyértelműen negatívak voltak, valamint ezen kísérlet elvégzésekor nem állt rendelkezésünkre HEK 293 sejtvonal. Az életkor tekintetében a fiatal 14- es passzázsú (p# 14) és idős p# 30- as sejtek hatékonyságát vizsgáltuk, valamint a konfluencia fertőzést befolyásoló hatásának igazolására 50-60%, illetve 90-100%-os konfluenciájú sejtekkel dolgoztunk.

III. 3. Sejtek előkészítése

A kísérletekhez a Vero E6 és HEK 293 sejtvonalat használtuk, melyeket kétféleképpen (fertőzés típusának megfelelően) készítettünk elő, külön-külön 96 lyukú, TPP gyártmányú sejtenyésző lemezekben. A sejteket 10%-os hőinaktivált FBS-sel (Fetal Bovine Serum, Gibco) kevert DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, high glucose, Merck) és 1% Penicillin-Streptomycint (Merck) tartalmazó sejtenyésző médiumban 37°C-on CO₂ (5%) termosztátban tartottuk.

Mind a Vero E6, mind a HEK 293 sejtvonal esetén a fertőzéshez 50-60%-os konfluenciájú monolayer elérése volt a cél. Ennek megfelelően, mindkét sejtípusból 20 000 sejt került az

egyres wellekbe. A hagyományos fertőzés (lásd alább) során a Vero E6 sejteket a fertőzést megelőző napon készítettük elő, míg a HEK 293 sejteket két nappal a kísérlet megkezdése előtt. A sejtszuspenziós típusú fertőzés során a vírust tartalmazó szervszuspenzióval összekeverve került a fertőzés előtt leszámolt 20 000 sejt a wellekbe (lásd alább). A P0-ás (fertőzést tekintve 0 passzázs) kísérlet során 12- es passzázsú (p #12), míg a P1-es fertőzés során p #14 sejteket használtunk mindkét kísérletben.

III. 4. Mintafeldolgozás

A vizsgálatok során az állatok veséjét dolgoztuk fel Class II A2 biztonsági fülke (BioBase) alatt. A -80°C-on lévő szerveket felolvasztottuk, majd 100 µl PBS (Merck) hozzáadásával szuszpenziót készítettünk belőle Bertin Minilys használatával. A mintákat vortexeltük, majd centrifugáltuk 8000 g- n, 10 percig, 4°C-on. A centrifugálás után a felülúszót használtuk a sejtek (P0-ás kísérlet) fertőzésére.

III. 5. Sejtek fertőzése

A munkafolyamat III-as biztonsági szintű, negatív nyomású, kesztyűvel ellátott „Glovebox” (BioBase BSC-1500III-X) fülkében zajlott.

a) Hagyományos, 1 órás fertőzés:

A lemezekről leszívtuk a tenyésztő médiumot, majd 40 µl fertőző felülúszót mértünk a sejtekre, valamint a kiszáradás elkerülése érdekében további 50 µl 1% Pen/Strep- t tartalmazó DMEM-mel fedtük be a sejteket. A lemezeket 1 órára 37°C-os CO₂ (5%) termosztátba helyeztük. Az inkubációs idő letelte után a fertőző tápfolyadékot eltávolítottuk és 280 µl fenntartó médiumot (2% FBS, 1% Pen/Strep, DMEM) mértünk a sejtekre.

b) Sejtszuspenzió „kevert” fertőzése:

A hagyományos fertőzés során felhasznált sejtekkel megegyező passzázs számú, sejtenyésztő aszisztens által a kísérlet előtt megfelelően leszámolt sejtszuspenzióból 40 µl- t Eppendorf csövekbe összemértünk a 20 µl fertőző szervhomogenizátummal, és 220 µl fenntartó médiummal, majd az így kapott 280 µl térfogatú keverék került az egyes wellekbe.

A fertőzést követően a lemezeket 6 napon keresztül inkubáltuk termosztátban 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett. Eközben a 3. és 6. fertőzést követő napon (dpi) ellenőriztük a citopátiás hatás létrejöttét Cytosmart Omni készülékkel, majd a lemezeket -80°C-os fagyasztóba helyeztük.

A P0-ás fertőzés során a szervszuszpenzió felülúszójával végeztük a kísérletet, míg, a P1-es kísérlet esetén a P0-ás lemez fagyasztását, majd felolvasztását követően a sejtek centrifugált (8000 g, 10 perc, 4°C) felülúszójával történt. Negatív kontrollként minden esetben megfelelő térfogatú fenntartó médium került a sejtekre.

III. 6. Nukleinsav extrakció

A virális nukleinsav kivonása, TRIzol alapú RNS kivonó kit (Direct-zol RNA Miniprep Kit, Zymo) használatával történt, a gyártói protokoll utasításait követve. Glovebox fülkében a -80°C-ról felolvasztott sejttenyésztő lemezen lévő felülúszóból 100 µl-t Eppendorf csövekbe mértünk, majd ezekbe további 300 µl TRIzol került. Ezt követően az extrakció további lépései vegyi fülkében zajlottak, az eluátumokat későbbi felhasználásig -80°C-on tároltuk.

III. 7. PCR teszt

A vírusfertőzés kimutatására nested rendszerű PCR-t végeztünk, mely a hantavírusok L szegmenséből 396 bp-t amplifikál (Klempa és mtsai. 2006).

Az alábbi két primerszettet használtuk a PCR-hez:

HAN-L-F1: 5'- ATGTAYGTBAGTGCWGATGC- 3'

HAN-L-R1: 5'- AACCADTCWGTYCCRTCATC- 3'

HAN-L-F2: 5'- TGCWGATGCHACIAARTGGTC- 3'

HAN-L-R2: 5'- GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA- 3'

A nested rendszer első körében OneStep RT-PCR Kit-et (Qiagen) használtunk, míg a második, nested körben, a várt terméket GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase Kit-tel (Promega) amplifikáltuk.

Minden egyes reakciót az alábbi mennyiségekkel mértük össze (1. táblázat):

1. táblázat: A PCR mix összetétele egy mintára vetítve, nested rendszerű PCR esetén

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

A polimeráz láncreakciók futtatása ABI 2720 (Applied Biosystems) típusú készülékkel történt. Az első kör programja reverz transzkripció lépéssel indult, mely 30 percig 50°C-on történt, melyet a táblázatban (2-3. táblázat) felsorolt lépések követtek.

2. táblázat: A nested rendszerű PCR program első köre

Lépési	Hőmérséklet	Időtartam
1. Elődenaturáció	95°C	15 perc
2. Denaturáció	94°C	1 perc
3. Annealing	53°C	30 mp
4. Extenzió	72°C	1 perc
5. Utóelongáció	72°C	10 perc

3. táblázat: A nested rendszerű PCR program második köre

Lépési	Hőmérséklet	Időtartam
1. Elődenaturáció	95°C	5 perc
2. Denaturáció	94°C	1 perc
3. Annealing	52°C	45 mp
4. Extenzió	72°C	1 perc
5. Utóelongáció	72°C	10 perc

Mindkét kör esetében a polimeráz láncreakció 40 ciklusból állt, amely 2-4. lépésig ismétlődött az elődenaturációt követően, végül a reakció az utóelongáció szakaszával zárult.

III. 8. Agaróz gélelektroforézis

A One-Step és nested rendszerű PCR termékek vizualizálásához agaróz gélelektroforézist végeztünk 2%-os agaróz géllel, TBE (Tris-Borát-EDTA, 1,5x, pH 8,0) puffer és SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) festék hozzáadásával. A minták futtatása 90 V konstans feszültségen 70-90 percig zajlott, majd a fotodokumentáció Chemidoc (Bio-Rad) használatával történt.

IV. Eredmények

IV. 1. Vírus izolálására szánt minták kiválasztása

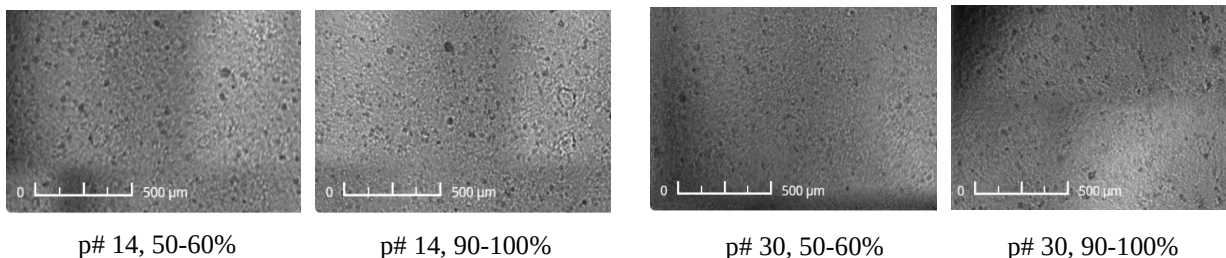
A rágcáló szervek több éven át -80°C-on voltak tárolva, ezért először meg kellett győződnünk arról, hogy a vírus még kimutatható-e, kizárva ezzel a virális nukleinsav degradációját. A PCR-pozitivitás esetében csak feltételeztük, hogy a mintákban fertőzőképes víruspartikulák is jelen lehetnek. A vizsgálatok során megerősítettük az RNS jelenlétét, majd további vizsgálat céljából három mintát választottunk ki (4. táblázat).

4. táblázat: A kísérlet során használt minták

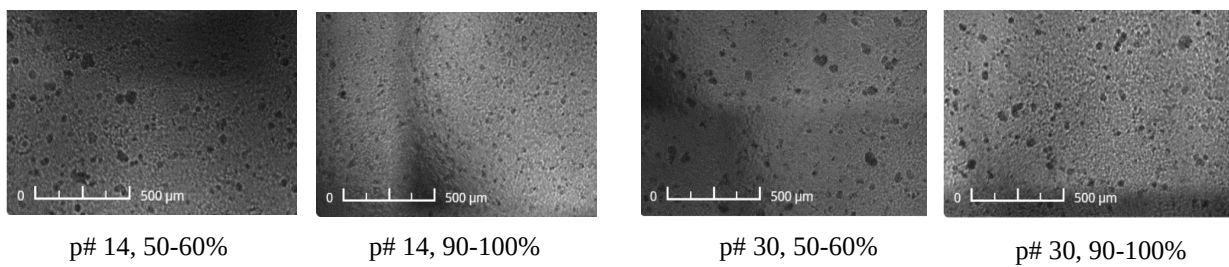
Gazdaszervezet	Szerv	Vírus	Egyedi azonosító
<i>Myodes glareolus</i>	vese	PUUV	b48/d
<i>Microtus arvalis</i>	vese	TULV	c287/d
<i>Microtus agrestis</i>	vese	TULV	b104/d

IV. 2. Pilot projekt eredményei

A mikroszkópos felvételek alapján elmondható, hogy a sejtek életkora nem tartozik az izolálást befolyásoló tényezők közé, ezzel szemben a sejtek konfluenciája, meghatározhatja a fertőzés sikerességét, melynek hatását a Tula vírussal fertőzött fiatal sejtek CPE vizsgálata során figyelhetjük meg. Bár a fenti képek a well viszonylag kis területéről készültek, a teljes wellt látva egyértelmű eredményt mutatnak (6-7. ábra).



6. ábra: PUUV fertőzött Vero E6 sejtek



7. ábra: TULV fertőzött Vero E6 sejtek

IV. 3. Módszerfejlesztés

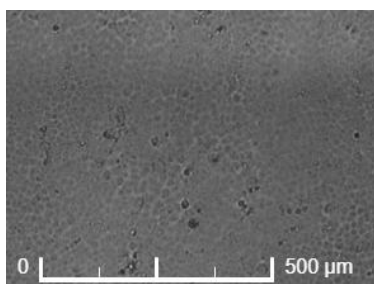
A P0 és a P1 fertőzés mikroszkópos eredményei (CPE vizsgálat) között nem tapasztaltunk eltérést, így a P1 kísérletről készült Cytosmart Omni felvételeket használok a dolgozatomban.

IV. 3. 1. P1 fertőzés mikroszkópos eredményei

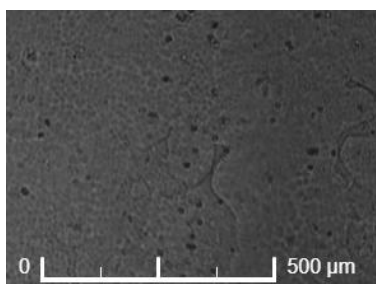
A mikroszkópos vizsgálatokat a fertőzést követő harmadik és hatodik napokon végeztük el, mely során megállapítottuk, hogy három nap alatt a vírus még nem okoz citopátiás hatást, ezért további inkubáció szükséges, míg a 6 dpi- n már a vírus képes olyan mértékű fertőzésre, mely CPE- t mutat.

A Puumala vírussal történő hagyományos fertőzés során megfigyelhetjük, hogy a a fertőzött és a negatív kontroll sejtenyészet nagyon hasonló mikroszkópos képet mutat, tehát nem látható egyértelműen meghatározható CPE, ezzel szemben a Tula vírussal fertőzött sejtek esetében megfigyelhető morfológiai változás, de igen kismértékű.

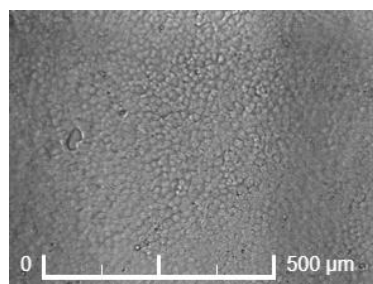
A sejtszuszpenzió fertőzés módszerét alkalmazva, viszont mindegyik vírusfertőzés hatására megjelenik a jellegzetes, „szederszerű” CPE. Ismert tény, hogy a Vero E6 túlnövése is okoz hasonló morfológiai eltérést a sejteken, de ebben az esetben egyértelműen látható, hogy nem a sejt túlnövése okozza, mivel a negatív kontrollokon nem figyelhető meg ilyen elváltozás (8-9. ábra).



Puumala fertőzött sejtek

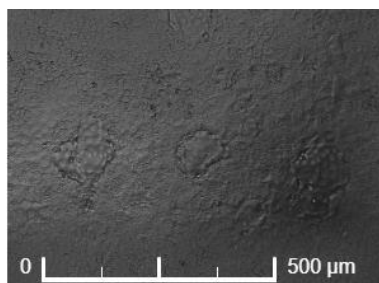


Tula fertőzött sejtek

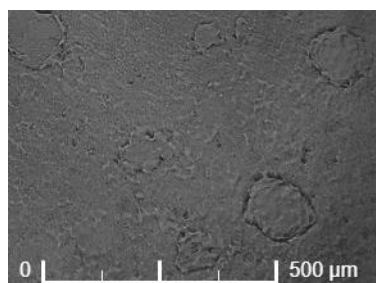


Negatív kontroll

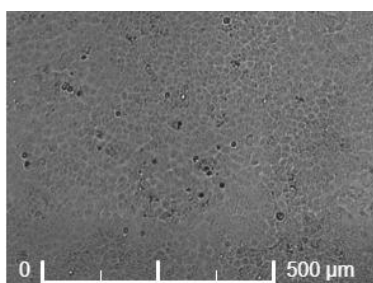
8. ábra: Vero E6 sejtek hagyományos fertőzésének mikroszkópos felvételei a 6 dpi- n



Puumala fertőzött sejtek



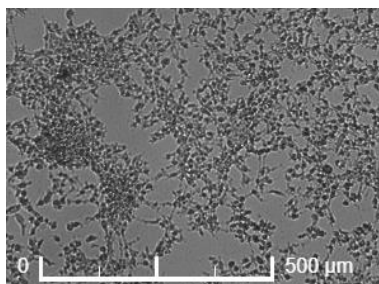
Tula fertőzött sejtek



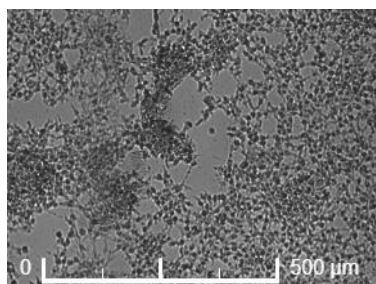
Negatív kontroll

9. ábra: Vero E6 sejtek sejtuszpenziós fertőzésének mikroszkópos felvételei a 6 dpi- n

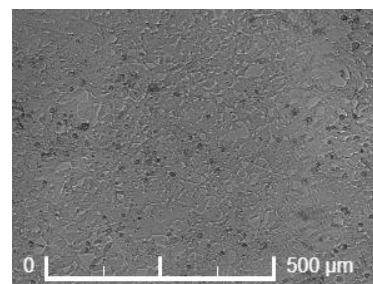
A HEK 293 sejtek fertőzésénél sokkal szembetűnőbb eredményeket kaptunk, mivel itt jellegzetes sejtpusztulás figyelhető meg. Látható, hogy mindkét fertőzési módszerrel, a PUUV és TULV esetén is megfigyelhető a várt citopátiás hatás, míg a negatív kontroll wellékben ez nem jelenik meg (10-11. ábra).



Puumala fertőzött sejtek

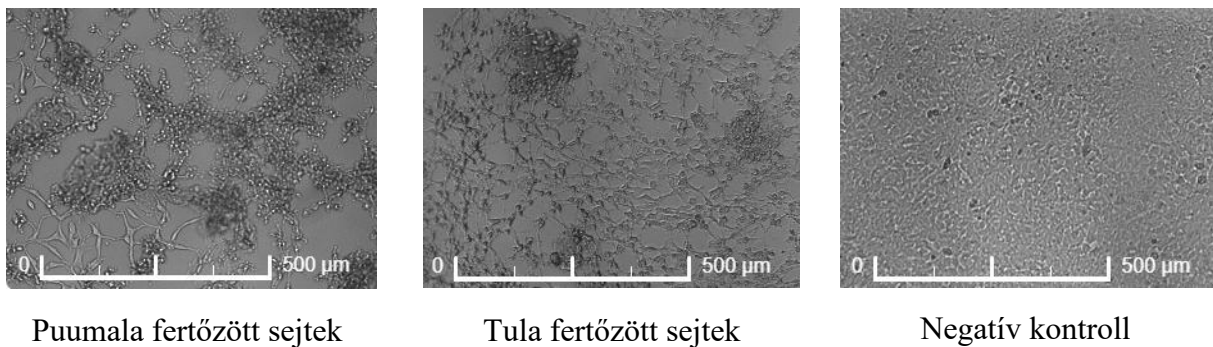


Tula fertőzött sejtek



Negatív kontroll

10. ábra: HEK 293 sejtek hagyományos fertőzésének mikroszkópos felvételei a 6 dpi- n



11. ábra: HEK 293 sejtek sejtszuspenziós fertőzésének mikroszkópos felvételei a 6 dpi- n

IV. 3. 2. Fertőzés PCR eredményei

A mikroszkópos vizsgálat eredményeinek megerősítéseként, univerzális, hantavírus L szegmens specifikus, nested rendszerű PCR-t alkalmaztunk, mely ~396 bp méretű terméket amplifikál.

Az agaróz gélelektroforézis gélképe alapján eltérő eredményeket kaptunk az egyes vírusok tekintetében.

A Tula vírussal, hagyományos módon fertőzött Vero E6 sejtek esetén negatív, míg azok sejtszuspenziós fertőzési technika alkalmazásával pozitív eredményt kaptunk a P0 és a P1 fertőzés esetében is. Ezzel szemben, a HEK 293 sejteken mind a hagyományos, mind a sejtszuspenziós fertőzési protokoll alapján elvégzett kísérletünk pozitív PCR eredményt adott.

A Puumala vírussal való fertőzés negatív PCR eredményt mutat, mind a Vero E6, mind a HEK 293sejtvonalon, mindkét fertőzési technika alkalmazása során, annak ellenére, hogy a mikroszkópos felvételek CPE- t igazoltak.

V. Diszkusszió

A hantavírusok világszerte jelen vannak, hiszen minden kontinensen megtalálhatóak és súlyos betegséget okozhatnak a humán populációban, így egyértelműen szükség van az alaposabb vizsgálatokra. A fertőzés megelőzésére vakcina még a mai napig sem áll rendelkezésre, valamint olyan hatásos antivirális szer sincs forgalomban, mely a hantavírus fertőzések minden típusára és minden stádiumában alkalmazható lenne, ezért a vírus természetének megismerése kiemelt fontosságú, melyhez *in vitro* és *in vivo* kísérletek elvégzése szükséges.

Jelen kutatásomban célunk az volt, hogy a már meglévő módszereket tökéletesítsük, ezáltal *in vitro* vizsgálhassuk a hantavírus fertőzést Vero E6 és HEK 293 sejtvonalon, vírus izolátumok készítése révén.

Először szükséges volt meggyőződnünk a már több éve lefagyasztott, rágcslókból származó szervekben található virális nukleinsav jelenlétéről PCR vizsgálattal, melyet követően három (egy PUUV és kettő TULV által fertőzött) mintát választottunk ki a további sejtes munkákhoz, a pilot projekthez és a módszerfejlesztéshez egyaránt.

Az előkísérlet arra szolgált, hogy meghatározzuk az izolálás kritikus pontjait, melyhez Vero E6 sejtvonalon végeztünk vizsgálatokat, mivel ez a legelterjedtebben használt sejtvonal, bár irodalmi adatok szerint nem a legjobb sejtvonal típus a hantavírus fertőzés detektálására (). A kísérletek során sikerült összehasonlítani a sejtek korát (fiatal, p# 14 és idős, p# 30), illetve konfluenciáját (50-60% vagy 90-100%), mely által meghatároztuk a fertőzéshez szükséges sejtenyészet paramétereit. A kísérleti eredményeink bizonyítják, hogy a sejtek kora nem, viszont a konfluencia annál inkább befolyásolja az izolálás sikerességét, ezáltal meghatároztuk, hogy az 50-60%-os sejteloszlás a legmegfelelőbb. Ezen kísérlet eredményeit felhasználva terveztük meg a módszerfejlesztési kísérletsorozat lépéseit, kiegészítve azt irodalmi adatok alapján hantavírus izolálásra megfelelő sejtvonal használatával (HEK 293) (Marcotic). A különböző sejtípusok vizsgálatán felül még két fertőzési technika alkalmazásával egészítettük ki tanulmányunkat.

A módszerfejlesztés során két különböző fertőzési módszert alkalmaztunk, melyek közül a hagyományos monolayer, valamint a sejtszuspenzió fertőzési protokoll hantavírus fertőzésre való alkalmasságát vizsgáltuk. A P0 lemez fertőzése, az állatok kiboncolt veséjéből készült szervhomogenizátummal, míg a P1 kísérlet során, a P0-ról származó felülúszóval történt. A fertőzés okozta morfológiai elváltozásokat mikroszkópos vizsgálatokkal (Cytosmart Omni) követtük nyomon, mely során megállapítottuk, hogy mind a P0, mind a P1 kísérlet hasonló

eredményeket mutat, viszont a fertőzést követő harmadik napon még nem látható citopátiás hatás, míg a 6 dpi alkalmas volt a CPE ellenőrzésére.

A Vero E6 sejtvonal Puumala vírussal való hagyományos fertőzése során nem láttunk egyértelműen meghatározható CPE- t, míg a sejtszuspenziós fertőzési mód alkalmazása során a 6 dpi- re megjelennek azok a „szederszerű” sejtelváltozások, melyek a fertőzés jelenlétére utalnak és a negatív kontrollon nem láthatóak. Hasonló eredményre jutottunk a Tula vírussal fertőzött Vero E6 sejtek esetében is, viszont a morfológiai elváltozások jóval erősebbek voltak, mint a PUUV fertőzésnél.

A HEK 293 sejtvonal PUUV és TULV fertőzése során egyértelműbb eredményeket kaptunk, mivel ezen sejtvonalon teljesen más morfológiájú elváltozásokat okoznak a vírusok. Mind a PUUV, mind a TULV vírus esetén, mindkét fertőzési módszer sikeresnek bizonyult, a P0 és P1 fertőzések esetében, mivel olyan jellegzetes sejtelhalást figyelhettünk meg, amit korábban a Vero E6 esetében nem tapasztaltunk és természetesen a negatív kontrollon sem volt jelen. A mikroszkópos fotók alapján elmondhatjuk, hogy mindkét fertőzési módszer alkalmas lehet hantavírus fertőzések vizsgálatára, de a sejtszuspenziós módszer ebben az esetben is hatékonyabbnak tűnik.

A mikroszkópos vizsgálat eredményeinek megerősítéseként hantavírus L szegmens specifikus, nested rendszerű polimeráz láncreakciót végeztünk, mely nagy pontossággal és érzékenységgel képes kimutatni a virális RNS jelenlétét. A gélfotók alapján elmondhatjuk, hogy nagy különbségeket tapasztaltunk a különböző vírusok tekintetében. A Puumala vírussal való fertőzés eredménye negatív a Vero E6 és a HEK 293 sejtvonalon is, mind a hagyományos mind a sejtszuspenziós fertőzés típus esetében, annak ellenére, hogy a mikroszkópos fényképeken láthatóak a sejtek negatív kontrolltól eltérő, morfológiai elváltozása. A Tula vírussal hagyományos módon fertőzött Vero E6 sejtek esetén negatív, míg a sejtszuspenziós fertőzési technikával végzett kísérlet esetében pozitív eredményt kaptunk mindkét víruspasszázs során (P0 és P1). Ezzel szemben a HEK 293 sejteken, a Tula vírussal való hagyományos és sejtszuspenziós fertőzés során is, sikerült PCR- rel igazolnunk a fertőzést.

Az elvégzett módszerfejlesztési vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy hantavírus fertőzéshez *in vitro* modellként a HEK 293 sejtvonal használata javasolt. A legjobb eredményeket a sejtszuspenzió fertőzésével érték el, így izolátum készítéséhez ez a módszer lehet a legalkalmasabb, míg antivirális szerek teszteléséhez a hagyományos módszer lesz megfelelő, mivel ebben az esetben többnyire egy monolayer fertőzésére van szükség, azonban kizárólag a két nappal a fertőzést megelőzően lemezre vitt HEK 293 sejtvonallal érdemes dolgozni.

A két hantavírus fajt összehasonlítva a Tula vírus esetén minden esetben látható citopátiás hatás, melyet a PCR eredmények is megerősítenek, ezzel szemben a Puumala vírus esetében a PCR nem adott pozitív eredményt mely nem magyarázza a mikroszkópos felvételeken látott morfológiai változásokat, így ezen összeférhetetlenséget okozó tényezők felkutatása jövőbeni céljaink egyike, mely során olyan hantavírus fertőzési protokollt tudunk kifejleszteni, mely teljeskörűen használható és további kutatásaink alapját képezheti.

VI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Jakab Ferencnek, hogy megmutatta számomra a vírusok színes világát, és Dr. habil. Kemenesi Gábornak hogy lehetőséget adott szakdolgozatom elkészítésére, biztosítva a laboratóriumi háttérrel munkámhoz.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Madai Mónikának, aki nem csak témavezetőként, de egyúttal példaképként vezetett a kutatás során, mely által egyaránt szakmailag és emberileg is sokat fejlődtem. Nélküle ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Hálás vagyok a Virologiai Nemzeti Laboratórium munkatársainak türelmükért, hasznos tanácsaikért és segítségükért, akik lehetővé tették számomra a munka zökkenőmentességét. Külön köszönet illeti Potzné Árvai Zitát és Ábrahám Ágotát mérhetetlen segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar, Ökológiai Tanszék Kisemlős Kutatócsoport valamennyi munkatársának, hogy biztosították számomra a kísérlet során felhasznált mintákat.

VII. Irodalomjegyzék

- Ahlm, C., Linderholm, M., Juto, P., Stegmayr, B., & Settergren, B. (1994). Prevalence of serum IgG antibodies to Puumala virus (haemorrhagic fever with renal syndrome) in Northern Sweden. In *Epidemiol. Infect* (Köt. 113).
- Avižinienė, A., Kučinskaitė-Kodžė, I., Petraitytė-Burneikienė, R., Žvirblienė, A., Mertens, M. L., Schmidt, S., Schlegel, M., Lattwein, E., Koellner, B., & Ulrich, R. G. (2023). Characterization of a Panel of Cross-Reactive Hantavirus Nucleocapsid Protein-Specific Monoclonal Antibodies. *Viruses*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/v15020532>
- Avšič-Županc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. In *Clinical Microbiology and Infection* (Köt. 21, o. e6–e16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Bradfute, S. B., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., Laenen, L., Tischler, N. D., & Maes, P. (2024). ICTV virus taxonomy profile: Hantaviridae 2024. *Journal of General Virology*, 105(4). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001975>
- Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C. H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N., & Lähdevirta, J. (1980). Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *Journal of Infectious Diseases*, 141(2), 131–134. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.2.131>
- Chandy, S., & Mathai, D. (2017). Globally emerging hantaviruses: An overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 35(2), 165–175. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_429
- Hofmann, J., Kramer, S., Herrlinger, K. R., Jeske, K., Kuhns, M., Weiss, S., Ulrich, R. G., & Krüger, D. H. (2021). Tula virus as causative agent of hantavirus disease in immunocompetent person, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 27(4), 1232–1234. <https://doi.org/10.3201/eid2704.203996>
- Hooper, J. W., Josleyn, M., Ballantyne, J., & Brocato, R. (2013). A novel sin nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine*, 31(40), 4314–4321. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.025>
- Ioannou, A., Andreou, M., Watson, D. C., Chra, P., & Panos, G. (2017). Hantavirus Infections in the European Region: A Mini-Review of the Literature. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 5(1). <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00139>
- Jiang, H., Zheng, X., Wang, L., Du, H., & Wang, P. (2017). *Hantavirus infection : a global zoonotic challenge*. 32(1), 32–43. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>
- Johansson, P., Yap, G., Low, H., Siew, C., Kek, R., Ng, L., & Bucht, G. (2010). *Molecular characterization of two hantavirus strains from different rattus species in Singapore*. 1–9.
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 412–441. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
- Jonsson, C. B., Hooper, J., & Mertz, G. (2008). Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, 78(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.012>
- Kang, H. J., Bennett, S. N., Sumibcay, L., Arai, S., Hope, A. G., Mocz, G., Song, J.-W., Cook,

- J. A., & Yanagihara, R. (2009). Evolutionary Insights from a Genetically Divergent Hantavirus Harbored by the European Common Mole (*Talpa europaea*). *PLoS ONE*, 4(7), e6149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006149>
- Khaiboullina, S., Morzunov, S., & St. Jeor, S. (2005). Hantaviruses: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis. *Current Molecular Medicine*, 5(8), 773–790. <https://doi.org/10.2174/156652405774962317>
- Kim, W.-K., Cho, S., Lee, S.-H., No, J. S., Lee, G.-Y., Park, K., Lee, D., Jeong, S. T., & Song, J.-W. (2021). Genomic epidemiology and active surveillance to investigate outbreaks of Hantaviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.532388>
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., Ter Meulen, J., & Krüger, D. H. (2006). Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 838–840. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
- Kruger, D. H., Figueiredo, L. T. M., Song, J. W., & Klempa, B. (2015). Hantaviruses-Globally emerging pathogens. *Journal of Clinical Virology*, 64, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>
- Krüger, D. H., Ulrich, R., & Lundkvist, Å. (2001). Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*, 3(13), 1129–1144. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01474-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01474-5)
- Kuhn, J. H., Bradfute, S. B., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Laenen, L., Palacios, G., Schmaljohn, C. S., Tischler, N. D., & Maes, P. (2023). Pending Reorganization of Hantaviridae to Include Only Completely Sequenced Viruses: A Call to Action. *Viruses*, 15(3), 660. <https://doi.org/10.3390/v15030660>
- Laenen, L., Vergote, V., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., & Maes, P. (2019). Hantaviridae: Current classification and future perspectives. *Viruses*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/v11090788>
- Lee, H. W., Vaheri, A., & Schmaljohn, C. S. (2014). Discovery of hantaviruses and of the Hantavirus genus: Personal and historical perspectives of the Presidents of the International Society of Hantaviruses. *Virus Research*, 187, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.019>
- Madai, M., Horváth, G., Herczeg, R., Somogyi, B., Zana, B., Földes, F., Kemenesi, G., Kurucz, K., Papp, H., Zeghib, S., & Jakab, F. (2021). Effectiveness regarding hantavirus detection in rodent tissue samples and urine. *Viruses*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/v13040570>
- Madai, M., Németh, V., Oldal, M., Horváth, G., Herczeg, R., Kelemen, K., Kemenesi, G., & Jakab, F. (2020). Temporal Dynamics of Two Pathogenic Hantaviruses among Rodents in Hungary. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(3), 212–221. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2438>
- Markotic, A., Hensley, L., Geisbert, T., Spik, K., & Schmaljohn, C. (2003). Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *Journal of General Virology*, 84(8), 2197–2202. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19090-0>
- Murri, S., Madrières, S., Tatard, C., Piry, S., Benoit, L., Loiseau, A., Pradel, J., Artige, E., Audiot, P., Leménager, N., Lacôte, S., Vulin, J., Charbonnel, N., Marianneau, P., & Castel,

- G. (2020). Detection and genetic characterization of puumala orthohantavirus s-segment in areas of france non-endemic for nephropathia epidemica. *Pathogens*, 9(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090721>
- Nusshag, C., Schreiber, P., Uhrig, J., Zeier, M., & Krautkrämer, E. (2023). In-cell western assay to quantify infection with pathogenic orthohantavirus Puumala virus in replication kinetics and antiviral drug testing. *Virus Research*, 337, 199230. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199230>
- Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., & Hanada, K. (2014). The genome landscape of the African Green Monkey Kidney-derived Vero Cell Line. *DNA Research*, 21(6), 673–683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., Zowalaty, M. E. E., Rahman, A. M. M. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms*, 8(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Reynes, J. M., Carli, D., Boukezia, N., Debruyne, M., & Herti, S. (2015). Tula hantavirus infection in a hospitalised patient, France, June 2015. *Eurosurveillance*, 20(50), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30095>
- Schmidt, S., Saxenhofer, M., Drewes, S., Schlegel, M., Wanka, K. M., Frank, R., Klimpel, S., von Blanckenhagen, F., Maaz, D., Herden, C., Freise, J., Wolf, R., Stubbe, M., Borkenhagen, P., Ansorge, H., Eccard, J. A., Lang, J., Jourdain, E., Jacob, J., ... Ulrich, R. G. (2016). High genetic structuring of Tula hantavirus. *Archives of Virology*, 161(5), 1135–1149. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2762-6>
- Schönrich, G., Rang, A., Lütke, N., Raftery, M. J., Charbonnel, N., & Ulrich, R. G. (2008). Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunological Reviews*, 225(1), 163–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00694.x>
- Sehgal, A., Mehta, S., Sahay, K., Martynova, E., Rizvanov, A., Baranwal, M., Chandy, S., Khaiboullina, S., Kabwe, E., & Davidyuk, Y. (2023). Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Asia: History, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment, and Prevention. In *Viruses* (Köt. 15, Szám 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v15020561>
- Seto, T., Tkachenko, E. A., Morozov, V. G., Tanikawa, Y., Kolominov, S. I., Belov, S. N., Nakamura, I., Hashimoto, N., Kon, Y., Balakiev, A. E., Dzagurnova, T. K., Medvedkina, O. A., Nakauchi, M., Ishizuka, M., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Ivanov, L. V., Arikawa, J., Takashima, I., & Kariwa, H. (2011). An efficient in vivo method for the isolation of Puumala virus in Syrian hamsters and the characterization of the isolates from Russia. *Journal of Virological Methods*, 173(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.12.019>
- Sundström, K. B., Stoltz, M., Lagerqvist, N., Lundkvist, Å., Nemirov, K., & Klingström, J. (2011). Characterization of Two Substrains of Puumala Virus That Show Phenotypes That Are Different from Each Other and from the Original Strain. *Journal of Virology*, 85(4), 1747–1756. <https://doi.org/10.1128/jvi.01428-10>
- Takács Mária. (2022). *Orvosi virológia*.
- Taylor, M. W. (2014). What Is a Virus? In *Viruses and Man: A History of Interactions* (o. 23–40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07758-1_2