

***Lloviu cuevavirus* betegségökológiai célú vizsgálata**

TDK dolgozat

Készítette: Ábrahám Ágota

Biológus Msc.

Témavezető: Dr. Kemenesi Gábor



Pécsi Tudományegyetem

Természettudományi kar

Biológia intézet

Genetikai és Molekuláris biológiai tanszék

OTDK, 2023 Biológia szekció

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	3.
II. Bevezető	4.
III. Célkitűzések	13.
IV. Anyagok és módszerek	13.
V. Eredmények	19.
VI. Diskusszió	23.
VII. Összefoglalás	27.
VIII. Köszönetnyilvánítás	27.
IX. Irodalomjegyzék	28.
X. Függelék	34.

I. Rövidítések jegyzéke

ZEBOV – Zaire ebolavirus

MARV – Marburg Marburgvirus

LLOV – Lloviu cuevavirus

SUDV – Sudan ebolavirus

RESTV – Reston ebolavirus

TAFV – Tai Forest ebolavirus

GP – glikoprotein

M. sch – *Miniopterus schreibersii* , hosszúszérnyű denevér

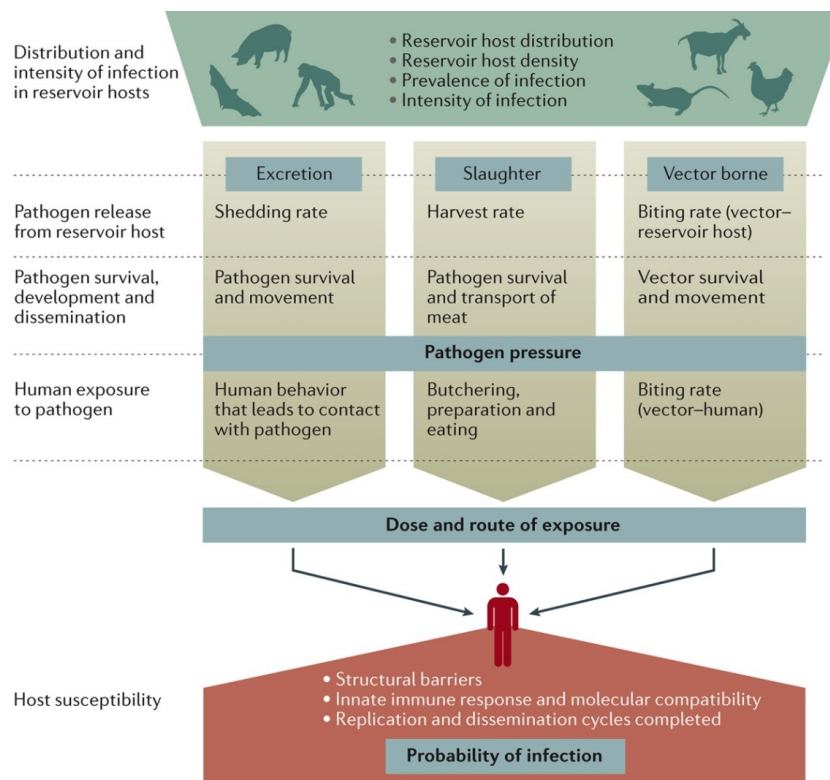
ONT – Oxford Nanopore Technologies

RNS-FISH – RNS fluoreszcens in situ hibridizáció

cDNS - copy DNS

II. Bevezető

A fertőző betegségek megjelenését, más fajokra történő ugrását, vagyis gazdaváltását és elterjedését számos tényező befolyásolhatja, mint például a gazdaállat elterjedése és ökológiai sajátosságai. A sok egyéb paraméter mellett, fontos szempont a patogén jelenléte, prevalenciája és szezonalitása is. Illetve a patogéneknek számos akadályon kell átjutniuk ahhoz, hogy tényleges fertőzést és megbetegedést tudjanak okozni. Ilyen barrierék többek között a patogén elterjedése, állatok közötti fertőzése, a gazdaállat általi ürítése, majd túlélése és kapcsolata az emberekkel(1.Ábra). Ezen tényezők vizsgálatával átfogó képet kaphatunk egyes kórokozókról és a fertőző betegségek által jelentett tényleges egészségügyi kockázatról is, és elősegítik a pandémiás felkészülést is. Ezen területeket és kérdésköröket szintetizáló tudományág a betegségökológia, mellyel lehetséges a zoonótikus fertőzések ökológiájának feltárása az ember-állat kapcsolati szinten is.



Nature Reviews | Microbiology

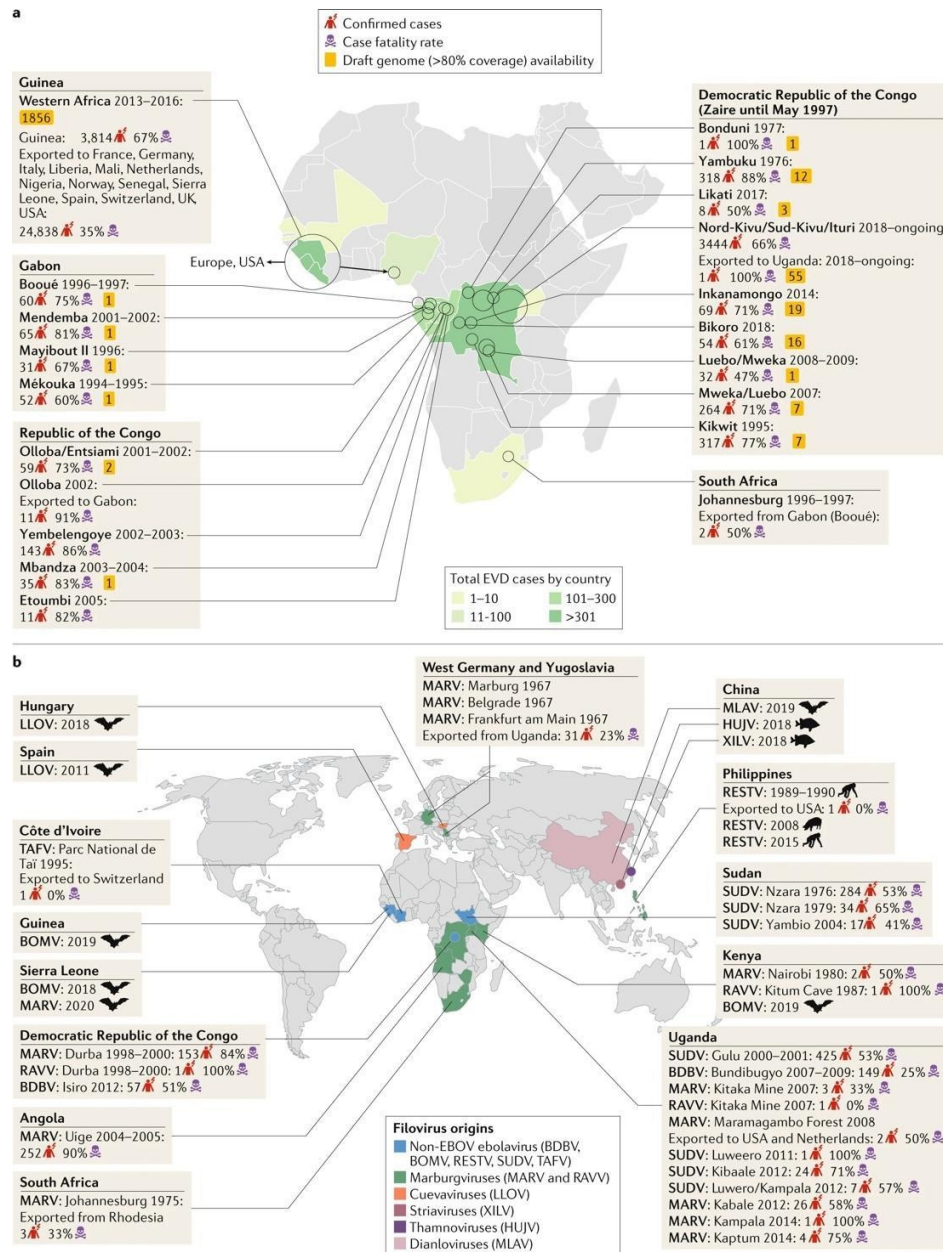
1.Ábra Egy átugrási esemény kockázatának összefoglalása (Plowright et al., 2017).

A zoonótikus képességű, tehát állatról emberre terjedő vírusok közé tartozó filovírusok felfedezésük óta világszerte ismertté váltak, leginkább az ebola vagy marburgvírusokhoz köthető vérzéses lázzal járó járványos megbetegedések miatt. A tudomány folyamatosan bővülő ismereteinek köszönhetően, mára már nem csupán Afrikához köthetően beszélhetünk ezekről a vírusokról. Ugyanakkor az emberi megbetegedések nagy része még mindig ott jelentkezik néhány ritka kivételtől, a kontinensről kihurcolt eseteket leszámítva. A legtöbb emberi megbetegedés az Ebolavírusok közé tartozó *Zaire ebolavirus*hoz (EBOV) és a Marburgvírusok közé tartozó *Marburg marburgvirus*hoz (MARV) köthető. A történelem eddigi legnagyobb filovírus járványát a Zaire ebolavírussal kapcsolatban ismerjük, amely 2013 és 2016 között több mint 28 ezer embert fertőzött meg. A filovírusokhoz köthető járványok továbbra is rendkívül jelentős egészségügyi problémát jelentenek Afrikában, melyre mi sem jobb példa, mint a közelmúltban, 2022. novemberében, Ugandában megbetegedéseket okozó *Sudan ebolavirus* (SUDV) járvány. Az elmúlt évtizedek munkájának köszönhetően azonban a filovírusok csoportja számos új taggal is bővül, nem csupán afrikai elterjedéssel. Mára már elmondható, hogy szinte minden kontinensen megtalálhatóak a csoport képviselői, igen változatos állatcsoportokban (2. Ábra).

A filovírusok felfedezésének körülményei következtében először majmokkal hozták kapcsolatba őket, mivel többek között a MARV, RESTV (Reston ebolavirus) és TAFV (Tai Forest ebolavirus) leírása is elsőként majmokból történt (Ristanović et al., 2020; Formenty et al., 1999). A filovírusok kapcsolatát a denevérekkel a MARV kutatása alapozta meg, mely során természetes paraméterek megfigyelésével és laboratóriumi kísérletek révén bebizonyosodott, hogy a *Rosettus aegyptiacus* a vírus természetes gazdaszervezete. A modern molekuláris biológiai és bioinformatikai lehetőségeknek köszönhetően egyéb filovírusok is, habár többségében csak genomszekvencia szinten, leírásra kerültek. Az utóbbi években az is bizonyossá vált, hogy nem csak melegvérű gerinces állatcsoportokban találhatóak meg a filovírusok családjának tagjai. Ilyenek például a *Tapjovirus bothropis*, Braziliában, kígyó mintából, vagy Svájcban édesvízi halakban leírt *Thamnovirus percae* (Hierweger et al., 2021; Horie, 2021).

A filovírusok (Order: *Mononegavirales*; Family: *Filoviridae*) jelenleg 8 nemzetségben sorolhatóak, és negatív- egyszálú, nem szegmentált RNS genommal rendelkező vírusokat foglalnak magukba. Genomméretük átlagosan 18-20000 bp melyen 7 gén található. Ezek gének

kódolják a nukleoproteint (NP), több virális fehérjét (VP 35, VP 30, VP 24, VP40), glikoproteint (GP) és az RNS-függő RNS-polimerázt (L). Nevüket a latin *fillum* szóból eredeztetve kapták, mivel strukturálisan fonalas szerkezetűek (1.kép)



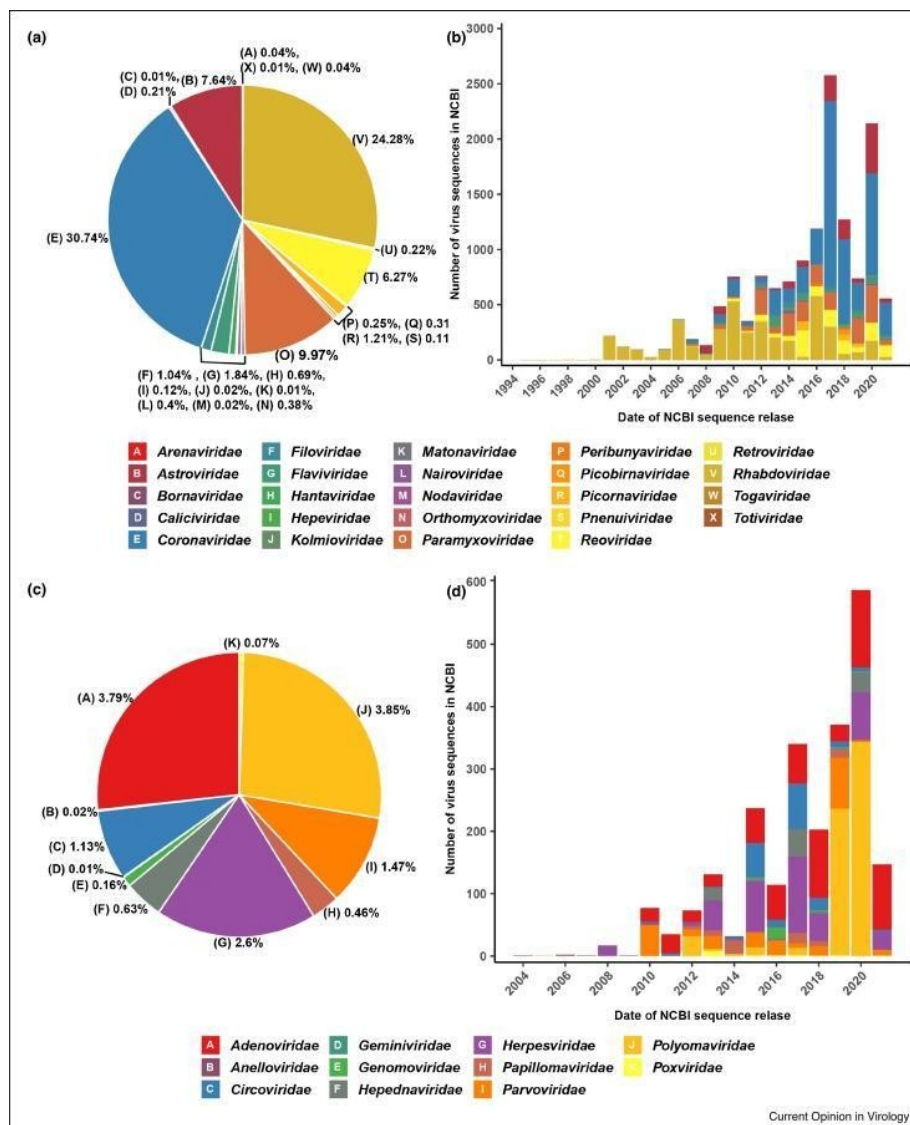
2.Ábra Filovírusok leírásának helyszínei, illetve az élőlény feltűntetése, amiben azonosították. A) Zaire ebolavírus (EBOV) okozta megbetegedések helyszínei és esetszámai. B) Nem EBOV-hoz köthető filovírus detektálási események, és az esetleges megbetegedések. Az itt látható adatok 2020-ig leírt eseményeket foglalják össze. (Di Paola et. al.)



1.Kép Magyarországi Lloviu cuevavirus izolátum elektronmikroszkópos képe. (Boston University, Mühlberger lab.)

Virológiai szempontból rendkívül érdekes emlőscsoportot alkotnak a denevérek, többek között a bennük fellelhető kimagasló vírusdiverzitás miatt, amelybe több ismert zoonózis is beletartozik (Lvov et al., 1973; Shipley et al., 2019). Számos fiziológiai, genetikai és immunológiai faktort valószínűsítenek a kiváló vírusgazda tulajdonságok összességéként denevérekben. A denevérek az egyetlen olyan emlős csoport mely képes az aktív repülésre, amihez több szervezeti és funkcionális tulajdonságuk járul hozzá. Ide tartozik a megemelkedett testhőmérséklet, ami a hatalmas energiaigényhez kapcsolható, vagy az immunrendszerük egyedülálló adaptációi, mint például az interferon gének számbeli redukciója vagy a rendkívül hatékony vírusellenes immunomodulációs képesség (Van Brussel & Holmes, 2022; (Wang et al., 2021). Emellett szociális paramétereik, kolóniaformálási szokásuk is rendkívül alkalmas vírusgazdává teszi őket (3.Ábra). Rengeteg faj alkot hatalmas, akár milliós példányszámú kolóniákat, de bizonyos európai fajok is több tízezres egyedszámú kolóniákat képesek alkotni. Illetve az aktív repülésnek és testfelépítésüknek köszönhetően képesek nagy távolságokra is elrepülni, így találkozva más kolóniákkal és fajokkal (Shipley et al., 2019). Ha ezeket a tényeket vesszük alapul, látható, hogy milyen transzmissziós lehetőségek rejlenek pusztán a denevérek életmódjából adódóan. A nagy kolóniákban, nagy egyedsűrűségben élő fajok egyedei között az

egyes vírusok, és akár más kórokozók, átadása és cirkulációjára rendkívül hatékonyan megtörténhet. Az a képességük, hogy nagy távolságokat tudnak repülve megtenni, magába foglalja azt a lehetőséget is, hogy új kolóniákba könnyedén vihetnek be egyes vírusokat is. A naív egyedek az egyes kolóniákon belül is rendkívül jó pontjai az újabb fertőzéseknek, legyen az horizontális transzfer vagy az újszülöttek megfertőződése. Ehhez kapcsolódó eseteket leírtak *Rosettus aegyptiacus* kolóniákban is, ahol a születési periódusokban időszakosan megnövekszik a MARV prevalencia (Hayman, 2015).



3.Ábra A tudomány jelenlegi ismeretei alapján felvázolt vírusdiverzitás denevérekben. A vírusok taxonómiai megoszlását és felfedezésük időbeliségét szemléltetik az ábrák. A-B) RNS vírusok, C-D) DNS vírusok. (Van Brussel & Holmes, 2022)

Denenvírusok körében külön figyelmeztetést érdemel a jelen dolgozat tárgyát is képező filovírusok családja. Habár a szekvencia adatok alapján mindössze 1%-át teszik a denevérekben fellelhető vírusok között (Van Brussel & Holmes, 2022), mégis egészségügyi hatásuk nagyon jelentős a leginkább MARV és EBOV-al kapcsolatban tapasztalt emberi járványok miatt. Ráadásul a velük kapcsolatos járványok frekvenciája és intenzitása is egyre nő (Schmidt et al., 2017).

A denevér-filovírus kapcsolatoknak több tudományosan vizsgálható szintje különböztethető meg, melyek feltérképezése nukleinsav, antitestek kimutatásával, illetve vírus izolációjával közelíthetőek meg. A virális RNS kimutatásának következményeként tekinthetünk az adott denevérfajra feltételes gazdaként, viszont a tényleges gazda- vagy akár rezervoár szerep meghatározásához még további kísérletekre van szükség. Az egyes vírusok izolálásával alátámasztható az infektiós patogén jelenléte a denevér szervezetében. Az RNS kimutatásával párhuzamosan folyhat az anti-filovírus antitestek felderítése is, melyek jelenlétükkel további indikációként szolgálnak a denevér-vírus kapcsolathoz. Filovírusok esetében antitestek és RNS kimutatása afrikai gyümölcsevő denevérekből volt az első bizonyíték arra, hogy a denevérek lehetnek a természetes gazdái lehetnek a filovírusoknak (He et al., 2015). Az első bizonyított filovírus rezervoár szervezet, tehát tünetmentes hordozó és ürítő, az afrikai *Rosettus aegyptiacus* volt, melyből MARV vírust izoláltak, illetve a közeli rokon RAVV-al is sikerrel jártak. Emellett a kulcsfontosságú lépésnek számító sikeres vírus izolálással a MARV nyitotta meg a denevérekből izolált filovírusok sorát (Towner et al., 2009).

EBOV-al kapcsolatban nem ennyire jól definiált a denevérek és a vírus kapcsolata. Jelen álláspont szerint nem felderített az EBOV gazdaszervezete. Denevérekhez a kapcsolata viszont megnyilvánul afrikai gyümölcsevő fajokban detektált anti-EBOV antitestek kimutatásával (Hayman et al., 2012), illetve virális RNS kimutatásával (Pigott et al., 2014).

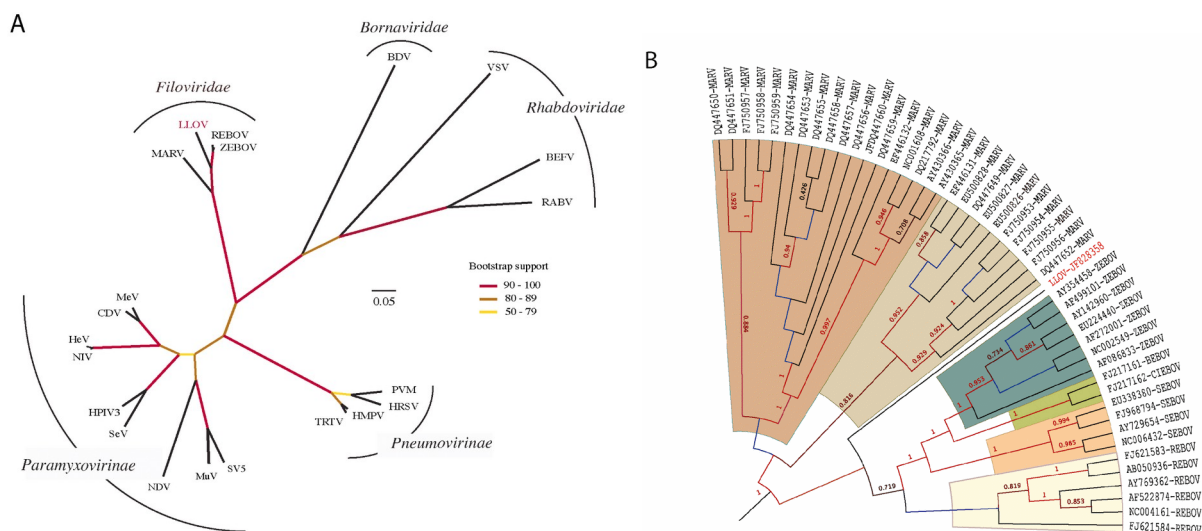
Ugyanakkor nem csak a MARV vagy EBOV filovírusok köthetőek a denevérekhez az utóbbi évek tanulmányai alapján. Sierra Leone-i denevér mintából azonosították az Ebola vírusok nemzetségébe tartozó *Bombali ebolavirus*-t (Goldstein et al., 2018), Kínából származó denevérmintákban pedig új filovírus nemzetséghez tartozó *Mengla dianlovirus*-t (Genus:

Dianlovirus) (Yang et al., 2019) azonosították, illetve nem utolsó sorban ausztráliai denevérfajokból pedig EBOV és RESTV reaktív antitesteket mutattak ki (Barr et al., 2022).

A denevérekhez köthető filovírusok közé tartozik a *Lloviu cuevavirus* is (LLOV, genus: *Cuevavirus*). Első megjelenése és egyben a vírus leírása 2003-ban történt, Spanyolországban a Cueva del Lloviu barlangnál, ahol egy jelentős denevérelhullás során azonosítottak LLOV RNS-t *Miniopterus schreibersii* denevér tetemekből vett mintákban. Ezután 2016-ban Magyarországon bukkant fel a vírus a Zempléni-hegységben, szintén *M. schreibersii* denevérekben.

Az előbbiekből tisztán látszik, hogy a denevér-filovírus kapcsolat több szinten nyilvánul meg. Ezt a kapcsolatot támasztják alá azok a módszerek, amik az alap kutatás részét képezik. Ide tartozik az antitestek detektálása szerológiai módszerekkel, RT-PCR és qRT-PCR-es diagnosztikával nukleinsav kimutatás, ezt követően a virális genom szekvenálása és a végül az infektív víruspartikulák kimutatását szolgáló in vitro vírus izolálás. Utóbbi minden esetben kulcsfontosságú eredmény lehetővé teszi a vad típusú vírus szerteágazó in vitro és in vivo vizsgálatát, patomechanizmusának és egyéb paramétereinek kísérletes körülmények közt történő megértését. A hagyományos diagnosztikai és virológiai eljárásokon túl is több eszközzel vizsgálhatóak a vírusok különféle in vitro és in vivo tulajdonságai. Rekombináns technológia segítségével, klónozási kísérletek során létrehozhatóak fertőzőképes vírus klónok. A *Lloviu cuevavirus* esetében Hume és munkatársai hasonló kísérletek során írták le elsőként a LLOV potenciális zoonótikus jellegét (Hume et al., 2022). Minigenom rendszerekkel pedig külön-külön is vizsgálhatóak az egyes virális gének funkciója, amiből szintén értékes következtetések vonhatóak le (Manhart et al., 2018). A minigenom technológián alapuló kísérletek nagyban megkönnyítik a veszélyesebb kórokozókval való kutatást mivel, az ezzel a technológiával előállított szekvencia nem tartalmazza a teljes genomot csak bizonyos részeit, illetve az átíráshoz szükséges fehérjéket, ami által nem termelődhet teljes értékű, fertőzőképes vírus. Manhart és munkatársai rekombináns LLOV minigenom alapú kísérletek során írták le, hogy a LLOV inkább EBOV-hoz hasonlóan replikálódik, sem mint MARV-hoz hasonlóan (Manhart et al., 2018).

Nem csupán az előzőekben ismertetett funkcionális, vagy zoonótikus képeességre vonatkozó hasonlóságot mutatja az ebola vagy marburg vírusokkal, de filogenetikai pozícióját tekintve is a két nemzetség között helyezkedik el a *Lloviu cuevavirus* is magába foglaló *Cuevavirus* nemzettség. (Negredo et al., 2011, 4.Ábra).



4.Ábra. A) *Lloviu cuevavirus* (genus: *Cuevavirus*) filogenetikai elhelyezése a *Mononegavirales* renden belül az RdRp gén konzervált szekvenciája alapján. B) *Lloviu cuevavirus* elhelyezése a filovírusok között teljes genom alapján (Negredo et al., 2011).

A LLOV zoonótikus természetére már több tanulmány is rámutatott, mind rekombináns vírust, mind pedig vad típusú törzset alkalmazva. (Hume et al., 2022; Kemenesi et al., 2022). Az in vitro humán fertőzőképesség demonstrációján kívül sikerült a patomechanizmusra vonatkozó egyik jelentős kérdést is vizsgálni. Hume és munkatársai emberi makrofágokban kísérletesen vizsgálták a *Lloviu cuevavirus* fertőzés hatását és azt találták, hogy az nem indukálta a humánpatogén ebolavírusokra jellemző választ. Ezek alapján jelen tudományos ismeretek alapján a LLOV valószínűleg tünetmentes fertőzés okozására lehet képes egészséges embereken (Hume et al., 2022).

A vírus ellenes immunitásban főszerephez jut a glikorpotein, mivel a neutralizáló antitestek ehhez kötnek a fertőzések során. Ezáltal a vírsnak erre a részére esik a legnagyobb szelekciós nyomás, ami miatt tapasztalható a nagyszámú mutációk jelenléte a GP szekvenciában. Azért is kiemelten fontos a GP, mivel a gazdaszervezet receptorához, filovírusok esetében a Niemann-Pick C receptorhoz (NPC1), ezáltal tud kötődni a vírus, ami elengedhetetlen a bejutáshoz. Ezáltal a GP szekvenciájában történő mutációk azonosítása elengedhetetlen lépés, mivel a már aminosav szekvencia szinten is megjelenő változások befolyásolhatják a patogén-gazda interakcióját, akár növelhetik is a vírus affinitását a receptorhoz akár csökkenthetik, de mindenképp szem előtt kell

tartani ezeket a lehetőségeket. A GP-NPC1 kapcsolat kutatásáról több tanulmány is született, melyek szintén kiemelik a GP fontosságát (Carette et al., 2011; Goldstein et al., 2018; Takadate et al., 2020; Ng et al., 2014; Yang et al., 2019).

III. Célkitűzések

A munkánk során elsődlegesen azt a hipotézist kívántuk tesztelni, hogy a LLOV elterjedése egybeesik-e a hosszúszárnyú denevér, azaz a feltételezett gazdaszervezet, elterjedésével.

A felvázolt hipotézis teszteléséhez az alábbi paraméterek mérését végeztük el

- a vírus földrajzi elterjedése
- a vírus időbeli és térbeli prevalenciája
- a vírus gazdaszervezetének sajátosságai
- a vírus evolúciós filogenetikai vizsgálata
- a vírus *in vitro* vizsgálata

A kutatáshoz szükséges módszertani háttér optimalizációja és használatának demonstrációja is a munka részét képezte. Munkánk fő koncepcionális háttérét a pandémiás felkészülés adta, egy potenciális zoonótikus vírus tulajdonságainak mélyebb megértése a lehetséges átugrási események megelőzését szolgálva.

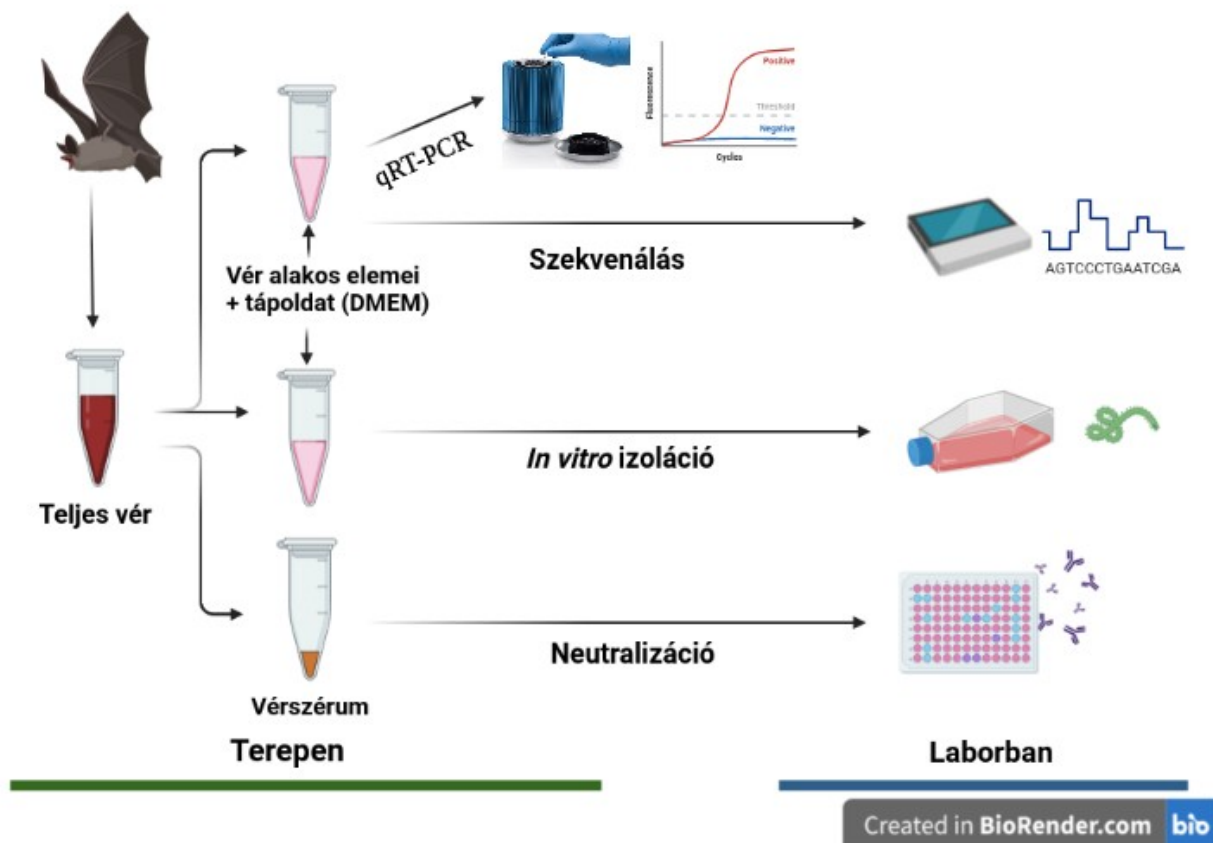
IV. Anyag és módszer

Mintavétel

A Magyarországi minták gyűjtése a Zempléni-hegységben történt 2016. februártól 2022. októberig történt, havi rendszerességgel, leszámítva a születési és nevelési időszakot, illetve a hibernációs periódust. Emellett 2022.09.07-12 Bulgáriában és Szerbiában, 2022.10.04. Szlovákiában, 2022.09.22.-24 Romániában/Erdélyben is sor került élő denevérek mintázására. Elsősorban Hosszúszárnyú denevérekből gyűjtöttünk mintákat, (de némely esetben sor került más azonos szálláshelyet használó faj mintázására is). A terepmunka során begyűjtött minták a következők voltak: vérminta, ektoparaziták (denevérlegyek és kullancsok), vizelet, guanó. A vér vétele 27G-s tűvel és Minivette POCT 100 µl (Sarstedt) kapillárisokkal történt, majd a folyamat végén Emofix vérzéscsillapító krémmel kezeltünk. Egy-egy mintázás során maximálisan 50-100 µl vérvétele történt állatonként, majd a vér 0,5 ml eppendorf csőbe került. Az ektoparaziták

gyűjtése minden esetben steril csipesszel történt, majd külön 2 ml-es csőbe kerültek a denevérlegyek és kullancsok. A vizelet is Minivette POCT 100 µl (Sarstedt) kapillárisal került begyűjtésre, és natívan 0,5 ml-es eppendorf csőbe került tárolásra. A guano gyűjtése részben 1,5 ml-es PBS-el töltött eppendorf csőbe történt, részben natívan kerültek 2 ml-es csövekbe. A vérminták ülepítése centrifugálással még a mintázás helyszínén megtörtént minden esetben. Ezután a szérum átmérésre kerültek új 0,5 ml-es eppendorf csövekbe, és a vér maradékát felvettük 200 µl DMEM-be vagy EMEM-be, és alapos szuszpendálás után két 0,5 ml-es csőbe lettek kimérve (~100 µl-100 µl a csövekbe).

Minden minta tárolása folyékony nitrogénben történt a további feldolgozásig, amennyiben terepen lehetőséget biztosítottunk a vérminták vizsgálatára úgy csak az egyik cső került fagyasztásra, míg a másik a mobil molekuláris biológiai laboratóriumban a helyszínen feldolgozásra került.



4.Ábra Terepi mintavételezés és feldolgozás folyamatábrája (Created with BioRender.com).



2-3. Képek. Bal oldal: vérvétel denevérből; Jobb oldal: *Miniopiterus schreibersii* (hosszúszárnyú denevér)

Nukleinsav kivonás

A LLOV RNS extrakciót a gyártó leírása alapján végeztük el a Direct-Zol RNA MiniPrep kit-el (Zymo) és a QIAamp Viral RNA mini kit-el (Qiagen). Ehhez a Direct-Zol-os nukleinsav kivonáshoz 100 µl tápoldatban oldott vérmintát használtuk fel, ami 300 µl TRI reagensbe került az inaktiváláshoz, amihez következő lépésben 400 µl ET-OH-t adtunk. A következő mosási lépéseket és DNase kezelést a gyártó protokollja alapján végeztük el, majd az elució a javasolt 50 µl helyett 40 µl nukleáz mentes vízbe és nukleáz mentes 1,5 ml-es csőbe történt, a minta koncentráció végett. A QIAamp kit-el végzett extrakcióhoz 140 µl vérminta került 560 µl lízis pufferbe, amihez 10 perc inkubáció után 560 µl ET-OH-t adtunk a teljes inaktiváláshoz. A mosási lépésekhez a gyártó előírt lépéseket alkalmaztuk. Az elúcióhoz 50 µl eluciós puffert alkalmaztunk (AVE, Qiagen). Mindkét kivonási módszer végén az eluálás előtt a 1,5 ml-es csőbe

kimértünk 1,5 µl RNase-out reagenst (Invitrogen, USA), ami elősegíti az RNS mintánk stabilitását, és így kevésbé degradálódik amíg nem kerül sor a -80 °C-os tárolásra. Az RNS minták tárolása 4°C -on történt a PCR reakció elvégzéséig.

qRT-PCR (valós idejű reverz-transzkripció polimeráz láncreakció) diagnosztika

A qRT-PCR-t 20 µl-es reakcióra optimalizálva, 15 µl master mix és 5 µl minta felhasználásával végeztük. A LLOV RNS kimutatásához Brilliant III ultra-fast PCR kit-et (Agilent technologies) alkalmaztuk; reakciónként : 10 µl 2x Brilliant mix, 1 µl RT/RNase block, 0,5 µl (500 nM) Forward primer, 0,5 µl (500nM) Reverse primer, 0,25 µl próba (250 nM), 2,55 µl nukleáz mentes víz, 0,2 µl DTT. A qRT-PCR program egy RT lépést, kezdeti denaturálás, majd két lépésű amplifikációt foglal magába: 50°C 10 perc, 95°C 3 perc, majd ezt követte 50 ciklus 95°C 5 mp denaturáció és 60 °C 30 mp annealing és elongáció, a fluoreszcencia detektálása a 60°C-os lépésnél történt. A reakciót MyGo Pro és MyGo Mini rendszeren végeztük. A primerek és a próba az RdRp (L) gén konzervált régiójára lettek tervezve.

Az amplifikáláshoz használt primerek szekvenciája a következő volt:

- LLOV_scr1F : 5' -AAG CAT TTC CGA GTA ATA TGA TCG TTG- 3'
- LLOV_scr1R : 5' -TAC ATG GTC TCC TAG ATT GCC CTG- 3'
- A kimutatáshoz használt TaqMan próba szekvenciája:
- LLOV_scr1P : 5' -/56-**FAM**/CCT GAT GAA /**ZEN**/GGA GAG TTT

Virális genom szekvenálása

A fent leírt módon izolált nukleinsavból ONT (Oxford Nanopore Technologies) MinION rendszeren, „ARTIC-like” ampikon alapú szekvenálással történt a LLOV genom szekvenálása a munkacsoport által korábban kidolgozott „*Lloviu cuevavirus* sequencing protocol” ([Lloviu cuevavirus sequencing protocol](#)) eljárás szerint. Az izolált RNS-ről első lépésben cDNS írása történt SuperScript IV enzimmel (Invitrogen, USA) és RandomHexamer mix (Invitrogen, USA) felhasználásával. Az így kapott cDNS amplifikálása 3 primer készlettel párhuzamosan történt

(LLOV_400bp pool , LLOV_500bp pool, LLOV_2000bp pool; primerek: 400bp, 500bp, 2000bp), azonos reakció hőmérsékleten, Q5 Hot Start HF Polymerase enzimmal. A PCR reakció lépései a következők voltak: 98 °C hőaktiválás 30 mp, majd ezt 25-40 ciklus 98°C 15 mp denaturálás és 65°C 5 p annelaing és lánchosszabbítás követte. A ciklus szám meghatározása úgy történt, hogy a qRT-PCR-rel azonosított pozitív minta ciklus számához + 3 ciklust adtunk.

A pool 1 és 2 mind a három primer szett esetében összemérésre került, ami így a további lépésekhez három mintát eredményezett. Az ampikon PCR termékeket 0,6x-os AMPure gyöngyös (AMPure XP beads, Beckman Coulter) tisztítással készítettük elő a további reakciók elvégzéséhez. Az így kapott eluátumok nukleinsav koncentrációját Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) segítségével Qubit 3 Fluorométeren (Thermo Fisher) mértük meg. A koncentráció mérése után a következő lépésben az ampikonok vég javítási lépése következett NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module (New England Biolabs, USA) használatával majd, az így előkészített mintákhoz kerültek hozzáadásra az egyedi “barcode” szekvenciák (EXP-NBD196, ONT). A barcodolási lépés után a munkafolyamat további részéhez már összemérhetőek a minták egy csőbe, mivel az egyedi szekvenciák miatt már elkülöníthetőek lesznek a szekvenálásból kapott adatok elemzése során. Majd az utolsó ligálási lépésben került hozzáadásra az AMX-F (SQK-LSK110, ONT) szekvenáló adapter. Az így előkészített minták SPRI gyöngyös mosás után eluciós pufferben (Elution Buffer, SQK-LSK110, ONT) vettük fel.

A szekvenálás R9.4.1 típusú flowcell-en történt MK1C rendszeren, 24-72 órás futásidővel.

Szekvenálási adatok bioinformatikai feldolgozása

A szekvenálás során elvezetésekből generált adatokból (fast5) a nukleinsav szekvencia meghatározása guppy (Guppy Basecalling Software, Version 6.4.2; ONT)) segítségével, a “super-accuracy basecaller” (dna_r9.4.1_450bps_sup.cfg) modelt alkalmazva történt. Az így kapott fastq formátumú leolvasások minőség ellenőrzéséhez NanoPlot (NanoPlot 1.30.1) alkalmazást használtuk, ezt követően a minőség alapú szűrést Nanofilt programmal végeztük. A szekvenciák szétválogatása, és egyben az adapter és “barcode” szekvenciák levágása “guppy

barcode” algoritmussal (Guppy Basecalling Software, Version 6.4.2; ONT) történt az alkalmazott “barcoding kit” (EXP-NBD196) alapján. A kiméra szekvenciák kiszűrésére ezután van lehetőségünk hossz alapján Nanofilt alkalmazásával, mivel ismertek az amplikonok méretei (~ 400bp, ~ 500bp, ~ 2000bp). A kapott szekvenciák térképezéséhez Minimap2 (v2.24) programot használtuk, amivel referencia genomhoz (NCBI adatbázisban: NC_016144) illesztettük a feldolgozott szekvenciákat így előállítva a templát konszenzust. A templát konszenzust a nyers adatok felhasználásával políroztuk a Medaka 1.7.2-es verziójával. A végső konszenzust manuálisan ellenőriztük, különös tekintettel az egy nukleotidból álló repetitív szakaszokra.

Minden bioinformatikai műveletet Ubuntu Linux 20.04.5 LTS operációs rendszer alatt futtattuk.

Filogenetikai analízis

A filogenetikai elemzést MrBayes programmal végeztük, Bayesian analízis alkalmazásával. Az elemzéshez használt filovírus szekvenciák a következőek voltak: Bundibugyo ebolavirus (NC 014373), Tai Forest ebolavirus (NC 014372), Zaire ebolavirus (NC 002549), Bombali ebolavirus (NC 039345), Reston ebolavirus (NC 004161), Sudan ebolavirus (NC 006432), Lloviu cuevavirus (Spanyolország (NC 016144)), Lloviu cuevavirus (Magyarország (MW775011)), Lloviu cuevavirus Italy, Mengla dianlovirus (NC 055510), Marburg marburgvirus (Ravn virus (NC 024781)), Marburg marburgvirus (NC 001608), Bulgáriai 3 pozitív minta szekvenciái.

Izoláció és RNS-FISH

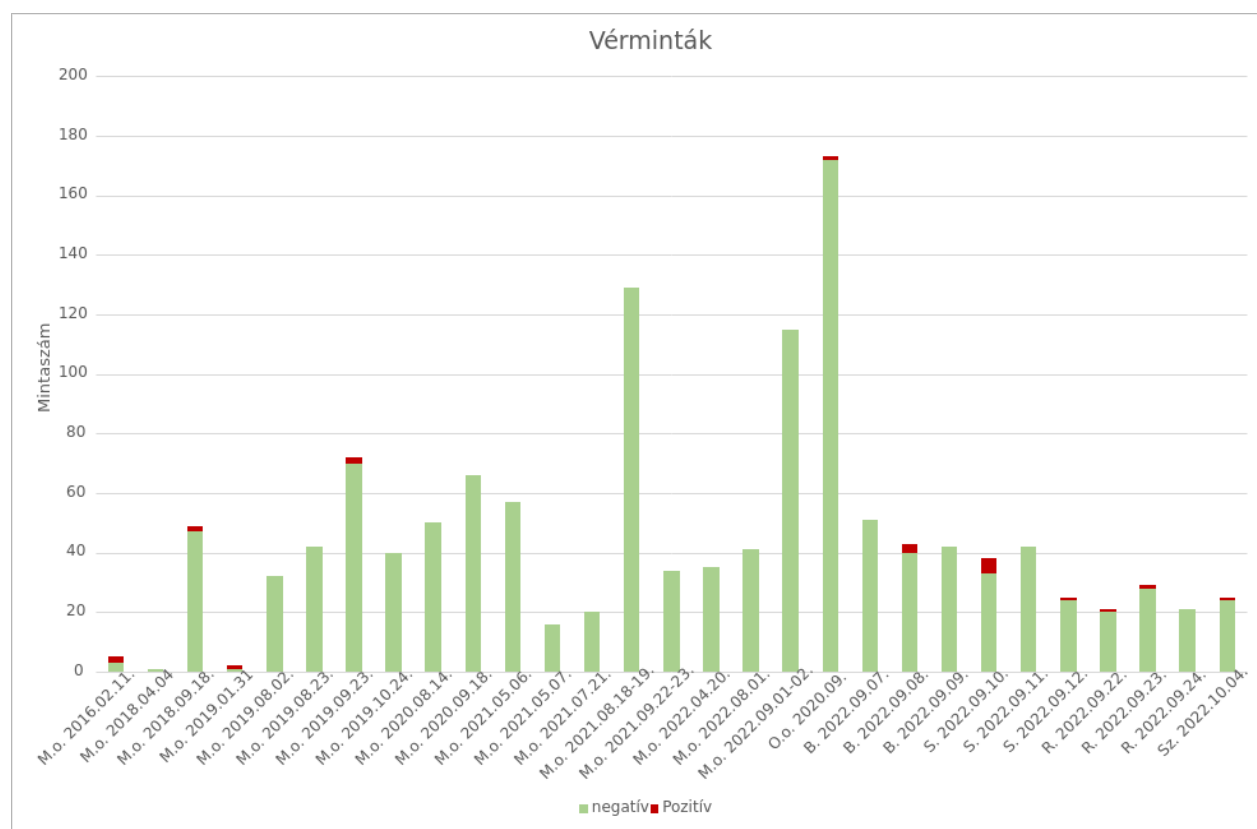
Az olaszországi pozitív minta izolálása SubK12-08 sejtvonalon történt, majd 2 nappal a fertőzés után 10%-os formalinba került fixálásra. Az RNS-FISH RNAscope Multiplex Fluorescent V2 kit (Advanced Cell Diagnostics)-el lett kivitelezve. A próbák specifikusan LLOV VP35 mRNS-re és a negatív szálú LLOV genom NP génre lettek tervezve (referencia szekvencia: NC016144.1). A VP35 mRNS detektálása Opal 520 fluorophore (Perkin-Elmer)-al, a negatív szálú genom NP része Opal 690 fluorophore (Perkin-Elmer)-al, a sejtmagok kontrasztosítása pedig DAPI-val történt. A képek 40x-es nagyítással készültek (4.Kép)

V. Eredmények

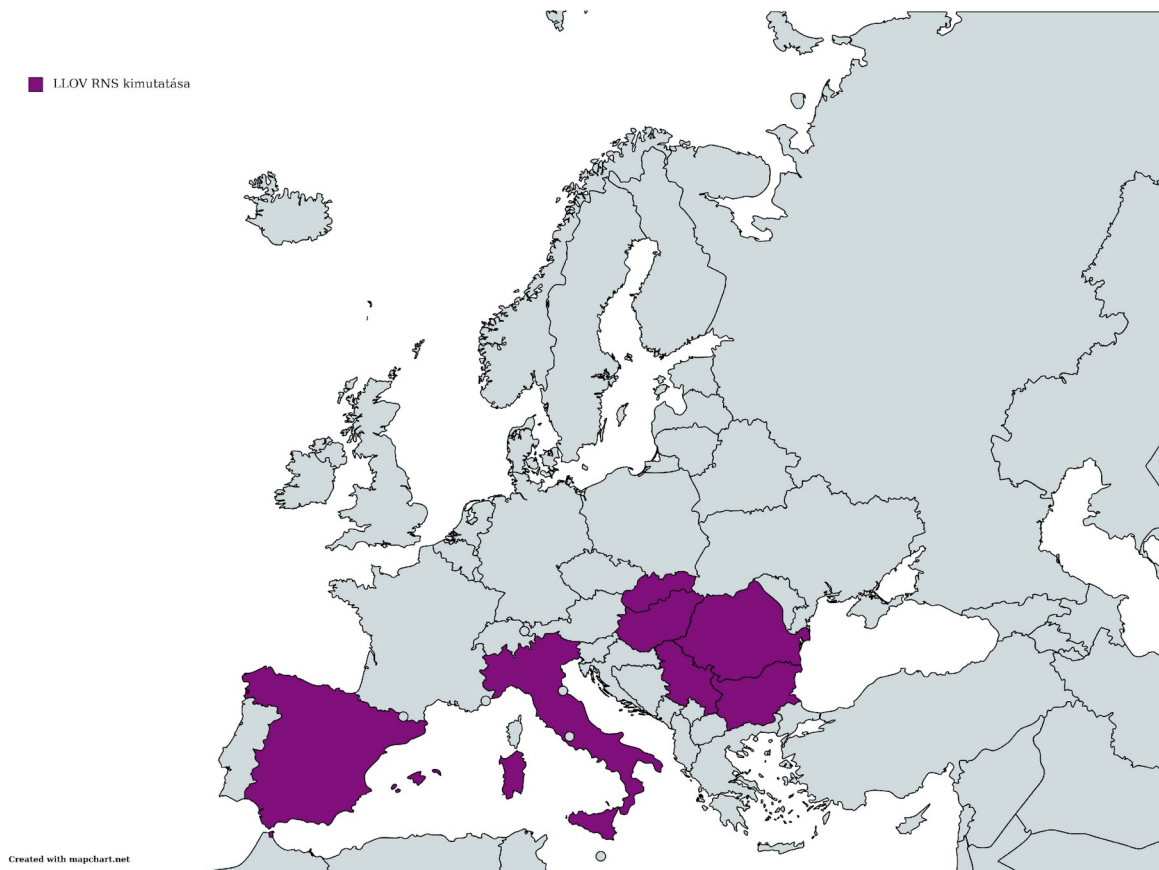
A kutatásainkhoz elengedhetetlen a megbízható LLOV specifikus PCR diagnosztika kialakítása. Esetünkben ezt az RdRp gén konzervált szakaszára tervezett primerekkel és próbával valósítottuk meg.

A qRT-PCR-es módszerrel vizsgált 1316 mintából 20 bizonyult pozitívnak. Ezek hat országból kerültek begyűjtésre (Magyarország, Olaszország, Bulgária, Szerbia, Románia, Szlovákia) (5.Ábra). A kimutatást követően a LLOV jelenlétének megerősítése a vírus genom szekvenálásával történt (a dolgozat elkészítéséig Szerbiából, Romániából és Szlovákiából származó pozitív minták kimutatása kizárólag qRT-PCR-el). Emellett elmondható, hogy minden pozitív minta szeptember-októberi időszakból és hosszúszárnýú denevérből származik (Ábra 5.).

A pozitív minták Ct (cycle threshold) értékei 21 és 39,26 közöttiek voltak, amik kópia számban $3,86 \cdot 10^9$ - $1,9 \cdot 10^5$ kópia/ml vírus mennyiséget jelentenek (Függelék).

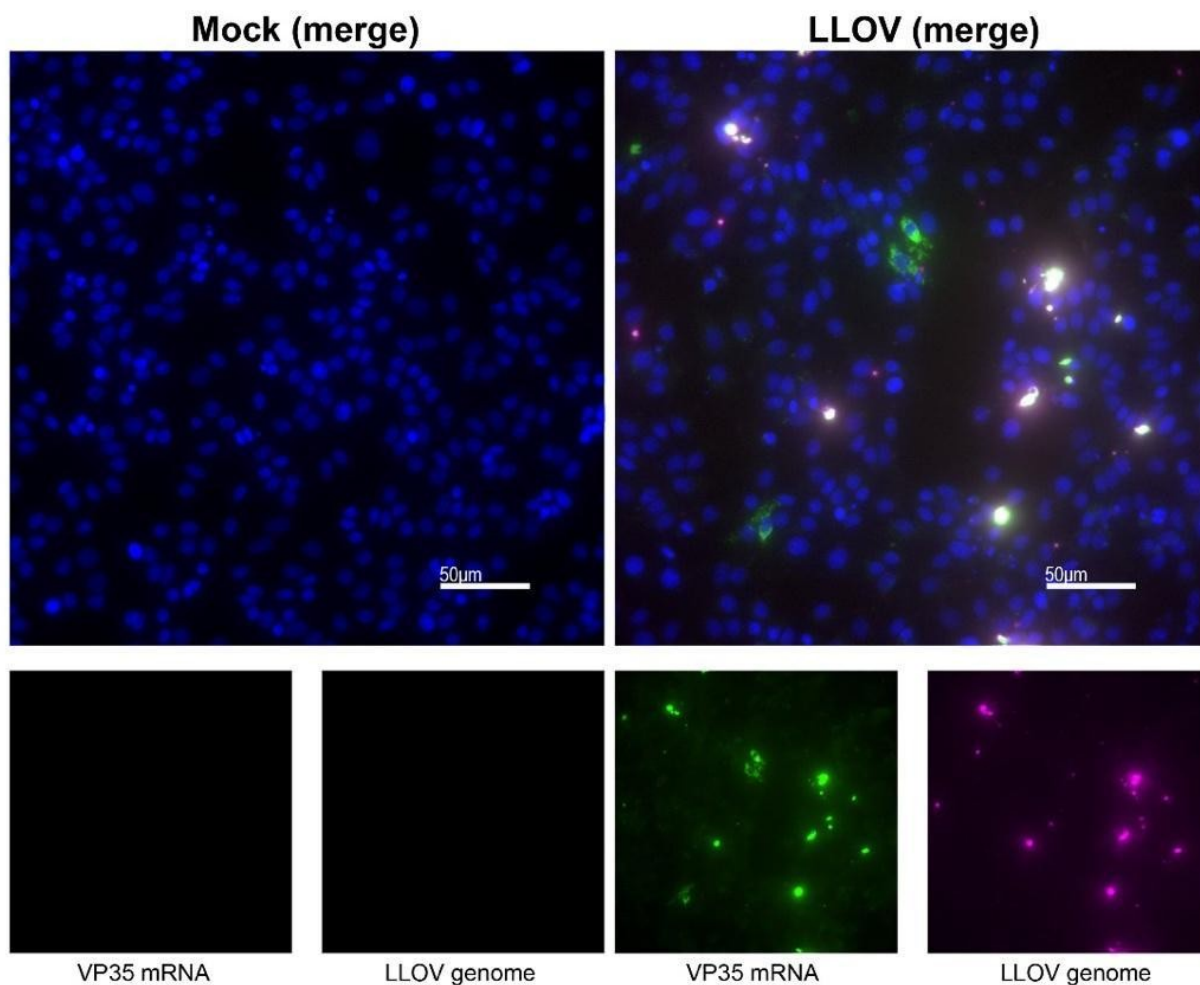


5.Ábra. A vérminták PCR diagnosztikai szűrésének eredményei. (M.o. - Magyarország, O.o. - Olaszország, B. - Bulgária, S. - Szerbia, R. - Románia, Sz. - Szlovákia)



6.Ábra. LLOV jelenlegi elterjedése; PCR diagnosztikával és/vagy szekvenálással megerősítve. (Spanyolország, Negredo et al. 2002; LLOV kimutatás a többi helyszínről Pécsen, a Virologiai Nemzeti Laboratóriumban történt.)

A virális RNS kimutatásán és genomszekvenáláson kívül az infekatív vírusok kimutatását *in vitro* izolációs kísérletekkel végeztük SuBK12-08 sejtvonalon. A vírus a munkacsoport korábbi munkája során magyarországi mintából már izolációra került (Kemenesi et al., 2022). Jelen dolgozatban tárgyalt mintaállomány felhasználásával egy újabb sikeres izolációs kísérletet végeztünk, ezúttal Olaszországból származó vérmintából. A sikeres vírusreplikáció megerősítésére RNS-FISH-t végeztünk, mellyel a VP35 mRNS-t és ezzel párhuzamosan a virális nukleoproteint kódoló génszakaszt jelöltük a fertőzött, majd előzetesen fixált SuBK12-08 sejtvonalon (Ábra).



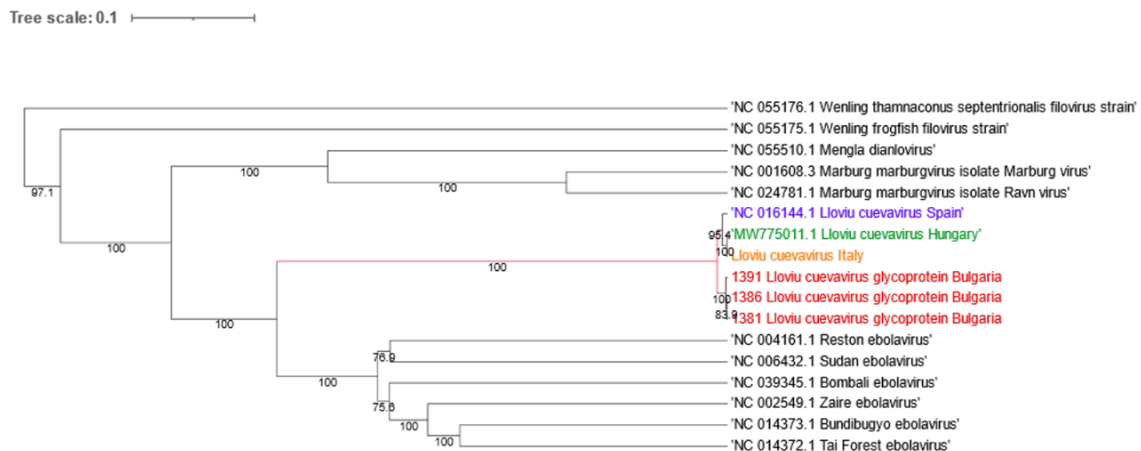
4.Kép. Olaszországi Lloviu cuevavírus *in vitro* izolációjának megerősítése RNS-FISH- Zöld: VP35 mRNS jelölése. Magenta: LLOV nukleoprotein génszakasz jelölése (Tóth et al., 2022)

A virális genomszekvenálási adatok alapján azonosított mutációkat, illetve aminosav cseréket a spanyolországi (2002), magyarországi (2019) és Olaszországi (2021) LLOV minták összehasonlításában az 1.Táblázatban foglaltuk össze. A legtöbb mutáció a glikoproteint kódoló gén viszonylatában látható, de egyéb génszakaszokon is megfigyeltünk változásokat.

Gene	Nucleotide position	aa position	Spanish aa position	Hungarian aa position	Italian aa position	Hungarian substitution per kb	Hungarian dN/dS ratio	Italian substitution per kb	Italian dN/dS ratio
NP	1229	410	N	T	T	2,22	0,50	2,22	0,56
NP	1336	446	S	P	P				
NP	1859	620	N	S	S				
NP	2005	669	E	K	K				
NP	2111	704	I	T	T				
VP35	487	163	A	T	A	2,08	1,00	1,04	1,00
VP35	622	208	L	F	F				
VP40	101	34	P	L	L	1,01	0,10	1,01	0,10
GP	493	165	H	Y	Y	8,36	1,38	9,75	1,50
GP	1071	358	S	P	P				
GP	1095	366	A	T	T				
GP	1249	417	S	N	N				
GP	1269	424	E	K	K				
GP	1333	445	L	P	P				
GP	1339	447	L	P	P				
GP	1383	462	S	P	P				
GP	1393	465	V	A	A				
GP	1394	465	V	A	A				
GP	1399	467	Y	H	H				
GP	1431	478	T	P	P				
GP	1439	480	L	P	P				
GP	1446	483	P	S	S				
GP	1462	488	I	I	T				
GP	1463	488	I	I	T				
GP	1476	493	S	P	P				
GP	1537	513	V	A	A				
GP	1584	529	H	H	Y				
GP	2058	687	T	A	A				
GP	2076	693	I	V	V				
VP30	583	195	A	T	T	1,01	0,50	1,01	0,50
VP24	46	16	F	L	L	3,98	0,33	3,98	0,27
VP24	472	158	D	N	N				
VP24	554	185	C	Y	Y				
L	237	79	I	I	M	0,76	0,23	1,06	0,30

1. Táblázat A magyarországi és olaszországi LLOV genom kódoló szakaszának mutációinak összehasonlítása a spanyolországi szekvenciával.

A munkánk során generált újabb genomikai adatok filogenetikai eloszlását vizsgálva a vírus több kládon való csoportosulása figyelhető meg. A Bulgáriában azonosított LLOV minták egyértelműen elkülönülnek a korábban Spanyolországban, Magyarországon és Olaszországban leírt törzsektől.



7.Ábra. Lloviu cuevavirus, beleértve a bulgáriai pozitív mintákból származó szekvencia adatok alapján, elhelyezése a filovírusok között, a valószínűség értékek feltüntetésével.

VI. Diszkusszió

Az itt bemutatott munka több olyan paramétert és eredményt is felmutat, amellyel komplexebb képet alkothatunk a Lloviu cuevavírus betegségökológiai paramétereiről, így jobban megérthetjük a vírus által jelentett gyakorlati zoonótikus kockázatot is.

Elsődleges hipotézisünk alátámasztást nyert, hiszen a vírust az eddig sporadikus esetekkel ellentétben számos új földrajzi régióban diverz filogenetikai megjelenéssel sikerült kimutatnunk (6.Ábra). A glikoprotein alapú filogenetikán bemutatott két párhuzamos filogenetikai klád megjelenése egy folyamatosan cirkuláló, valószínűleg enzootikus vírus képét festi. A vírussal feltételesen összefüggésbe hozott elhullási események ennek az enzootikus megjelenésnek

lehetnek epizootikus eseményei, melyek háttérében egyelőre ismeretlen faktorok állnak. Ilyen epizootikus eseménynek valószínűsítjük a 2013-as magyarországi vagy a vírus felfedezésével kapcsolatos 2002-es spanyolországi elhullást is (Görföl et al., 2022; Negredo et al., 2011).

A korábbi magyarországi vizsgálatok adatai alapján és a denevérek zavarásának minimalizálása mentén határoztuk meg (Kemenesi et al., 2022). A LLOV prevalencia csúcsát ezek alapján és a munkacsoport további megfigyelései szerint szeptemberre valószínűsítjük. Ezt a feltevést igazolják a Balkán térségből, Szlovákiából származó pozitív minták is, illetve az olaszországi pozitív minta is szeptemberi időpontban lett begyűjtve. Ugyanakkor vizsgálatunk egyik limitációja az időben nem homogén mintagyűjtés, így a szeptemberi vírups prevalencia csúcs valószínűsítésén túl egyelőre nem tehetünk magabiztos kijelentést. A szeptember-októberi prevalencia csúcsot magyarázhatja az őszi nász időszakban történő kolóniák közötti mozgás. Habár a rendelkezésünkre álló adatok ezt támasztják alá nem elvetendő elmélet, miszerint feltételezhető egy másik prevalencia csúcs is a születési időszakban a MARV-nál tapasztaltak alapján (Amman et al., 2012).

Immunológiai és fiziológiás szempontból a denevérek életciklusában kiemelt időszak a kölyöknevelési vagy a mérsékelt övön a hibernációs időszakok. Az új egyedek születésével megnő az vírusfertőzés szempontjából naív egyedek száma, amely időszakos vírups prevalencia növekedéshez vezethet. Ezt a forgatókönyvet korábban már dokumentálták a MARV esetében *Rousettus aegyptiacus* denevérekben. Ráadásul a vírups prevalencia megnövekedését összefüggésbe tudták hozni az emberre történő átugrási események idejével is. Amman et al., 2012

A téli hibernációs időszak szerepe rendkívül különleges lehet és ezidáig nem vizsgált a vírusfertőzések szempontjából. A magyarországi elhullási események regisztrált időpontjai a szakirodalmi adatok alapján a hibernációs időszak végére tehetőek. Hasonló megfigyelést denevérek esetén ez idáig csupán a fehér orr-szindróma esetében közöltek, melynél a telelési ciklus során a denevérek gombafertőzés hatására történő megváltozott fiziológiás állapota vezet el a kimerülésig és pusztulásig. A Lloviu cuevavírus esetében a tél végi elhullások tudományos háttérének feltárása még további kutatásokat tesz indokolttá.

Ilyen időszakok a téli hibernációs hónapok, illetve a születési és kölyök nevelési idő, ami áprilistól júliusig tart, amikor denevér védelmi szempontból nem előnyös kitenni a denevéreket a mintázással járó, ugyan minimális de nem elhanyagolható, stressznek.

A szeptember-októberi prevalencia csúcsot magyarázhatja az őszi nász időszakban történő kolóniák közötti mozgás. Erre alkották meg a “Swarming hipotézist”, miszerint az európai veszettség 2-nek a kolónián belüli fenntartásához a nász alatti “rajzás” elengedhetetlen (Horton et al., 2020). Habár a rendelkezésünkre álló adatok ezt támasztják alá nem elvetendő elmélet, miszerint feltételezhető egy másik prevalencia csúcs is a születési időszakban a MARV-nál tapasztaltak alapján (Amman et al., 2012).

Korábbi tanulmányok alapján a mai napig kizárólagosan csak hosszúszárnyú denevérből volt sikeres a LLOV kimutatása (Negredo et al., 2011, Kemenesi et al., 2022). Ezen adatok alapján kutatásunk során célzottan az említett fajt mintáztuk. Kis mintaszámban azonban sor került egyéb, ko-habitáló fajok mintázására is, viszont a csekély mintaszám miatt nem összevethető a hosszúszárnyú denevér mintákból származó adatokkal. Ezekből a fajokból nem sikerült azonosítanunk a vírust ám az alacsony mintaszám miatt mélyebb következtetések levonását mellőzzük.

Az egyes fertőző betegségek ökológiai sajátosságaiban rendkívül fontos szerepet játszik maga a gazdaszervezet, hiszen az ő elterjedésétől nagyban függeni fog a kórokozó elterjedése is. A LLOV esetében a legvalószínűbb gazdaszervezet a rendelkezésre álló adatok és az eddigi kísérletek alapján a hosszúszárnyú denevér. A virális RNS jelenléte, az in vitro vírusizolációval alátámasztott aktív virémiás állapot a denevérekben, vagy a szakirodalomban közölt, neutralizáló entitestek jelenléte is egy lehetséges gazdaszervezet képét mutatja (Kemenesi et al., 2022). A vírus izoláció során alkalmazott SubK12-08 (Miniopterus sejtvonal) fogékonysága a LLOV-ra emiatt is lehet kimagasló mivel a mintázott állat is Miniopterus faj. A vírusok vizsgálatában technikai mérföldkőnek számító eredmény a sikeres izolálás, hiszen ez által már olyan kísérletek végezhetőek, amivel a valósághoz közelebbi képet kaphatunk a vírus tényleges működéséről in vitro és in vivo mechanizmusairól, továbbá utat nyit a terápiás kísérletek számára is. Az olaszországi mintából történő ismételt sikeres vírus izolálás alapján elmondható, hogy az alkalmazott miniopterus sejtvonal (SubK12-08) renkívül megfelelő a vírus in vitro izolációjára.

A glikoprotein génszekvencia és a belőle készült filogenetikai elemzés alapján is nagyon hasonló képet mutat a Lloviu cuevavírus evolúciója, mint más filovírusoké. A vírusellenes immunitás fő célpontjának számító GP génben halmozódik fel a legtöbb mutáció, így alkalmas finomabb felbontású evolúciós filogenetikai elemzések elvégzésére (Jing et al., 2016). A nukleinsav szekvencia mutációi lehetnek szinoním mutációk, vagy nem szinoním mutációk aszerint, hogy az egyes nukleotid változások okoznak-e aminosav cserét vagy sem. Ezen mutációk arányát a dN/dS értékkel jellemezhetjük, ahogyan a jelen adatokban is látható (1. Táblázat). Aszerint, hogy kapott érték 1-nél kisebb, azonos vagy nagyobb következtethetünk a szelekció/evolúció irányára. A nem-szinoním mutációk/szinoním mutációk aránya a glikoprotein esetében 1 felett van (magyarországi :1,38, olaszországi :1,5; mindkét esetben az eredeti spanyolországi szekvenciához viszonyítva), ami azt jelenti, hogy pozitív szelekció alatt van a régió. A többi régiónál viszonylag kis értéket kapunk, ami beleillik a fehérjét kódoló régiók sajátosságaiba. A glikoprotein kiemelt fontosságú régió, amire mutat a dN/dS aránya is, mivel ez az a kódoló régió, mely a vírus azon részét határozza meg, amely szükséges a receptorhoz (filovírus specifikusan ez a receptor a Niemann-PickC-1 receptor) való kötődéshez a fertőzés során. A receptor kötés elengedhetetlen ahhoz, hogy a vírus be tudjon jutni a sejtbe, mivel csak így fog tudni replikálódni és emellett fertőzést okozni bizonyos esetekben.

A filogenetikai elemzés alapján elmondható, hogy a bulgáriai LLOV külön kládot képez, tehát evolúciója elkülönülten halad a korábbi LLOV-okhoz képest. Ez alapján azt valószínűsítjük, hogy az európai hosszúszárnyú denevérek körében egyszerre több, némileg eltérő szelekciós nyomás alatt álló LLOV törzs is kóciakulál. Ez tovább erősíti a dolgozat fő hipotéziseként feltételezett széleskörű és állandó elterjedésre vonatkozó álláspontot, hiszen egy folyamatosan cirkuláló enzootikus vírus képe rajzolódik ki.

VII. Összefoglalás

Kutatásainkkal a jelenkori kutatási trendek mentén vizsgáltuk egy lehetséges új zoonózis tulajdonságait, ezzel hozzájárulva a vírus jobb megértéséhez és a hatékonyabb kockázatértékeléshez.

Eredményeink alapján sikerült kiterjeszteni a LLOV ismert geográfiai elterjedését több európai országra is, tovább bővíteni a vírus evolúciós változásairól alkotott képünket és létrehozni egy második vad típusú izolátumot. Mindezen eredmények rendkívül nagy hozzájárulást jelentenek a jövőbeni kutatások számára, hogy egyrészt a Lloviu cuevavírusról alkotott képünk egyre széleskörűbbé váljon, másrészt pedig az egyéb, denevérekhez köthető filovírusokat is jobban megérthessük.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kemenesi Gábornak és a Virologiai Nemzeti Laboratórium munkatársainak a szakmai útmutatásért és támogatásért. Köszönettel tartozom továbbá a nemzetközi kollaborációs partnereknek és denevéreszeknek .

TDK munkám során nemzetközi kutatásban vehettem részt amiért szintén köszönettel tartozok.

Irodalomjegyzék

- Adjemian, J., Farnon, E. C., Tschiko, F., Wamala, J. F., Byaruhanga, E., Bwire, G. S., Kansiime, E., Kagirita, A., Ahimbisibwe, S., Katunguka, F., Jeffs, B., Lutwama, J. J., Downing, R., Tappero, J. W., Formenty, P., Amman, B., Manning, C., Towner, J., Nichol, S. T., & Rollin, P. E. (2011). Outbreak of Marburg Hemorrhagic Fever Among Miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(suppl_3), S796–S799. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir312>
- Amman, B. R., Carroll, S. A., Reed, Z. D., Sealy, T. K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B. R., Comer, J. A., Campbell, S., Cannon, D. L., Khristova, M. L., Atimmedi, P., Paddock, C. D., Kent Crockett, R. J., Flietstra, T. D., Warfield, K. L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., ... Towner, J. S. (2012). Seasonal Pulses of Marburg Virus Circulation in Juvenile *Rousettus aegyptiacus* Bats Coincide with Periods of Increased Risk of Human Infection. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877>
- Barr, J., Boyd, V., Todd, S., Smith, I., Prada, D., O’Dea, M., Jackson, B., Pearce, L., Adams, T. E., Vanderduys, E., Westcott, D., McKeown, A., Baker, M. L., & Marsh, G. A. (2022). Detection of filovirus-reactive antibodies in Australian bat species. *Journal of General Virology*, 103(8). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001785>
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A. I., Kranzusch, P. J., Griffin, A. M., Ruthel, G., Cin, P. D., Dye, J. M., Whelan, S. P., Chandran, K., & Brummelkamp, T. R. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature*, 477(7364), 340–343. <https://doi.org/10.1038/nature10348>

Di Paola, N., Sanchez-Lockhart, M., Zeng, X., Kuhn, J. H., & Palacios, G. (2020). Viral genomics in Ebola virus research. *Nature Reviews Microbiology*, 18(7), 365–378.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0354-7>

Formenty, P., Boesch, C., Wyers, M., Steiner, C., Donati, F., Dind, F., Walker, F., & Le Guenno, B. (1999). Ebola Virus Outbreak among Wild Chimpanzees Living in a Rain Forest of Cote d'Ivoire. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(s1), S120–S126.

<https://doi.org/10.1086/514296>

Goldstein, T., Anthony, S. J., Gbakima, A., Bird, B. H., Bangura, J., Tremeau-Bravard, A., Belaganahalli, M. N., Wells, H. L., Dhanota, J. K., Liang, E., Grodus, M., Jangra, R. K., DeJesus, V. A., Lasso, G., Smith, B. R., Jambai, A., Kamara, B. O., Kamara, S., Bangura, W., ... Mazet, J. A. K. (2018). The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nature Microbiology*, 3(10), 1084–1089. [https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2)

[2](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2)

Hayman, D. T. S. (2015). Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1803), 20142591.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2591>

Hayman, D. T. S., Yu, M., Crameri, G., Wang, L.-F., Suu-Ire, R., Wood, J. L. N., & Cunningham, A. A. (2012). Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Ghana, West Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 18(7), 1207–1209. <https://doi.org/10.3201/eid1807.111654>

Hierweger, M. M., Koch, M. C., Rupp, M., Maes, P., Di Paola, N., Bruggmann, R., Kuhn, J. H., Schmidt-Posthaus, H., & Seuberlich, T. (2021). Novel Filoviruses, Hantavirus, and Rhabdovirus in Freshwater Fish, Switzerland, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 27(12), 3082–3091.

<https://doi.org/10.3201/eid2712.210491>

Horie, M. (2021). Identification of a novel filovirus in a common lancehead (*Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758)). *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(9), 1485–1488.

<https://doi.org/10.1292/jvms.21-0285>

Horton, D. L., Breed, A. C., Arnold, M. E., Smith, G. C., Aegerter, J. N., McElhinney, L. M., Johnson, N., Banyard, A. C., Raynor, R., Mackie, I., Denwood, M. J., Mellor, D. J., Swift, S., Racey, P. A., & Fooks, A. R. (2020). Between roost contact is essential for maintenance of European bat lyssavirus type-2 in *Myotis daubentonii* bat reservoir: ‘The Swarming Hypothesis’.

Scientific Reports, 10(1), 1740. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58521-6>

Hume, A. J., Heiden, B., Olejnik, J., Suder, E. L., Ross, S., Scoon, W. A., Bullitt, E., Ericsson, M., White, M. R., Turcinovic, J., Thao, T. T. N., Hekman, R. M., Kaserman, J. E., Huang, J., Alysandratos, K.-D., Toth, G. E., Jakab, F., Kotton, D. N., Wilson, A. A., ... Mühlberger, E.

(2022). Recombinant Lloviu virus as a tool to study viral replication and host responses. *PLOS Pathogens*, 18(2), e1010268. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010268>

Jing, Y. X., Wang, L. N., Wu, X. M., & Song, C. X. (2016). Positive evolution of the glycoprotein (GP) gene is related to transmission of the Ebola virus. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017173>

Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E. H., Machalaba, C. C., Thomas, M. J., & Heymann, D. L. (2012). Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)

Kemenesi, G., Tóth, G. E., Mayora-Neto, M., Scott, S., Temperton, N., Wright, E., Mühlberger, E., Hume, A. J., Suder, E. L., Zana, B., Boldogh, S. A., Görföl, T., Estók, P., Szentiványi, T., Lanszki, Z., Somogyi, B. A., Nagy, Á., Pereszlényi, C. I., Dudás, G., ... Jakab, F. (2022).

Isolation of infectious Lloviu virus from Schreiber's bats in Hungary. *Nature Communications*, 13(1), 1706. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29298-1>

Lvov, D. K., Karas, F. R., Timofeev, E. M., Tsyarkin, Yu. M., Vargina, S. G., Veselovskaya, O. V., Osipova, N. Z., Grebenyuk, Yu. I., Gromashevski, V. L., Steblyanko, S. N., & Fomina, K. B. (1973). ?Issyk-Kul? Virus, a new arbovirus isolated from bats and argas (Carios) vespertilionis (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 42(2), 207–209. <https://doi.org/10.1007/BF01270841>

Manhart, W. A., Pacheco, J. R., Hume, A. J., Cressey, T. N., Deflubé, L. R., & Mühlberger, E. (2018). A Chimeric Lloviu Virus Minigenome System Reveals that the Bat-Derived Filovirus Replicates More Similarly to Ebolaviruses than Marburgviruses. *Cell Reports*, 24(10), 2573–2580.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.008>

Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F., Dopazo, H., Molero, F., Juste, J., Quetglas, J., Savji, N., de la Cruz Martínez, M., Herrera, J. E., Pizarro, M., Hutchison, S. K., Echevarría, J. E., Lipkin, W. I., & Tenorio, A. (2011). Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>

Ng, M., Ndungo, E., Jangra, R. K., Cai, Y., Postnikova, E., Radoshitzky, S. R., Dye, J. M., Ramírez de Arellano, E., Negredo, A., Palacios, G., Kuhn, J. H., & Chandran, K. (2014). Cell entry by a novel European filovirus requires host endosomal cysteine proteases and Niemann–Pick C1. *Virology*, 468–470, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.019>

Olival, K., & Hayman, D. (2014). Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*, 6(4), 1759–1788. <https://doi.org/10.3390/v6041759>

Pattyn, S., Groen, G. vander, Jacob, W., Piot, P., & Courteille, G. (1977). ISOLATION OF MARBURG-LIKE VIRUS FROM A CASE OF HÆMORRHAGIC FEVER IN ZAIRE. *The Lancet*, 309(8011), 573–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)92002-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92002-5)

Pigott, D. M., Golding, N., Mylne, A., Huang, Z., Henry, A. J., Weiss, D. J., Brady, O. J., Kraemer, M. U., Smith, D. L., Moyes, C. L., Bhatt, S., Gething, P. W., Horby, P. W., Bogoch, I. I., Brownstein, J. S., Mearns, S. R., Tatem, A. J., Khan, K., & Hay, S. I. (2014). Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *ELife*, 3, e04395. <https://doi.org/10.7554/eLife.04395>

Plowright, R. K., Parrish, C. R., McCallum, H., Hudson, P. J., Ko, A. I., Graham, A. L., & Lloyd-Smith, J. O. (2017). Pathways to zoonotic spillover. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 502–510. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>

Ristanović, E. S., Kokoškov, N. S., Crozier, I., Kuhn, J. H., & Gligić, A. S. (2020). A Forgotten Episode of Marburg Virus Disease: Belgrade, Yugoslavia, 1967. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(2), e00095-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00095-19>

Schmidt, J. P., Park, A. W., Kramer, A. M., Han, B. A., Alexander, L. W., & Drake, J. M. (2017). Spatiotemporal Fluctuations and Triggers of Ebola Virus Spillover. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 415–422. <https://doi.org/10.3201/eid2303.160101>

Shipley, R., Wright, E., Selden, D., Wu, G., Aegerter, J., Fooks, A. R., & Banyard, A. C. (2019). Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 31. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010031>

Takadate, Y., Manzoor, R., Saito, T., Kida, Y., Maruyama, J., Kondoh, T., Miyamoto, H., Ogawa, H., Kajihara, M., Igarashi, M., & Takada, A. (2020). Receptor-Mediated Host Cell

Preference of a Bat-Derived Filovirus, Lloviu Virus. *Microorganisms*, 8(10), 1530.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101530>

Tóth, G. E., Hume, A. J., Suder, E. L., Zeghib, S., Ábrahám, Á., Lanszki, Z., Varga, Z., Tauber, Z., Földes, F., Zana, B., Scaravelli, D., Scicluna, M. T., Pereswiet-Soltan, A., Görföl, T., Terregino, C., De Benedictis, P., Garcia-Dorival, I., Alonso, C., Jakab, F., ... Kemenesi, G. (2022). *Isolation and genome characterization of Lloviu virus from Italian Schreibers' bent-winged bats* [Preprint]. Microbiology. <https://doi.org/10.1101/2022.12.05.519067>

Towner, J. S., Amman, B. R., Sealy, T. K., Carroll, S. A. R., Comer, J. A., Kemp, A., Swanepoel, R., Paddock, C. D., Balinandi, S., Khristova, M. L., Formenty, P. B. H., Albarino, C. G., Miller, D. M., Reed, Z. D., Kayiwa, J. T., Mills, J. N., Cannon, D. L., Greer, P. W., Byaruhanga, E., ... Rollin, P. E. (2009). Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000536. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536>

Van Brussel, K., & Holmes, E. C. (2022). Zoonotic disease and virome diversity in bats. *Current Opinion in Virology*, 52, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.008>

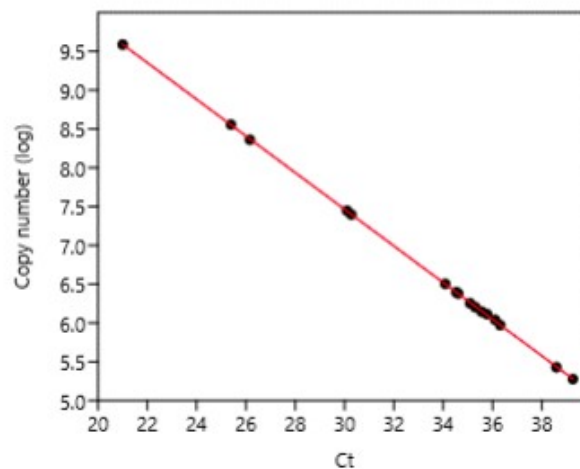
Wang, L.-F., Gamage, A. M., Chan, W. O. Y., Hiller, M., & Teeling, E. C. (2021). Decoding bat immunity: The need for a coordinated research approach. *Nature Reviews Immunology*, 21(5), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00523-0>

Yang, X.-L., Tan, C. W., Anderson, D. E., Jiang, R.-D., Li, B., Zhang, W., Zhu, Y., Lim, X. F., Zhou, P., Liu, X.-L., Guan, W., Zhang, L., Li, S.-Y., Zhang, Y.-Z., Wang, L.-F., & Shi, Z.-L. (2019). Characterization of a filovirus (Měnglà virus) from Rousettus bats in China. *Nature Microbiology*, 4(3), 390–395. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0328-y>

X. Függelék

Jelen tanulmányhoz feldolgozott minták Ct értékei 21 és 39,26 között változtak, melyekhez tartozó vírusrészecskék értékei a munkacsoport korábbi adataira készített kalibrációs görbe alapján lettek meghatározva (Kemenesi et al., 2022).

Ct	Kópiaszám/mL	kópiaszám/mL (log)
25,39	360000000	1,404662701
26,16	230000000	1,41763774
30,1	28000000	1,478566496
30,27	25000000	1,481012421
34,08	3200000	1,532499586
34,53	2500000	1,538196578
34,61	2400000	1,539201599
35,09	1800000	1,545183368
35,3	1600000	1,547774705
35,56	1400000	1,550961752
35,78	1300000	1,553640336
36,1	1100000	1,557507202
36,31	940000	1,560026249
38,59	270000	1,586474779



meredekség: -0,23586; metszéspont: 14,54 ; (PAST 4.11)

egyenestegyenlete : $y = -0,23486 X + 14,54$

21 Ct : $y = -0,23486 * 21 + 14,54$, $y = 9,5861$; ami számszerint $10^{9,5861} = 3855671276$ kópia/mL

39,26 Ct : $y = -0,23486 * 39,26 + 14,54$, $y = 5,278566$; ami számszerint $10^{5,278566} = 189917,944$ kópia/mL