



**37. ORSZÁGOS
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA 2025**

XXXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Magyarországon elpusztult denevérek veszettség vírusainak vizsgálata, Lyssavírus passzív monitoring

Készítette:

Szabó Anna

Biológus MSc II. évfolyamos hallgató

Témavezetők:

Dr. Görföl Tamás

Tudományos munkatárs

Dr. Lanszki Zsófia

Tanársegéd

PTE TTK Molekuláris Biológiai és Mikrobiológiai Tanszék



Pécs, 2024

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
I.1. A denevérek és vírusaik bemutatása	4
I.2. A veszettségről általánosan.....	5
I.3. A veszettségvírusok rendszertana	6
I.4. A veszettségvírusok morfológiája, genomi szerkezete	8
I.5. A veszettségvírusok replikációja	9
I.6. A veszettségvírusok patogenezise és tünetei	10
I.7. A veszettség elleni védekezés	12
I.8. A veszettség epidemiológiája, előfordulása.....	13
I.9. Célkitűzés.....	18
II. Anyag és módszer.....	19
II.1. Mintagyűjtés	19
II.2. Boncolás	19
II.3. Nukleinsav kivonás.....	21
II.4. PCR reakció	21
II.5. Agaróz-gélelektroforézis, Sanger-szekvenálás.....	22
II.6. Filogenetikai analízis részleges nukleoprotein génre	22
II.7. Vírus enrichment kezelés.....	23
II.8. NGS-Illumina szekvenálás	23
II.9. Filogenetikai analízis teljes genomra	23
III. Eredmények és értékelésük	24
IV. Diskusszió	27
V. Köszönetnyilvánítás.....	29
VI. Hivatkozott irodalmak jegyzéke.....	30

Absztrakt

A felbukkanó fertőző betegségek jelentik az egyik legnagyobb kihívást az emberiség számára, elég akár csak a COVID-19 pandémiára gondolnunk. A denevérek számos olyan vírus rezervoárjai, amelyek bennük nem okoznak megbetegedést, de más állatokra és emberekre is áterjedhetnek és ott súlyos – esetenként letális – fertőzést is indukálhatnak. Ezek közül a legismertebbek a koronavírusok, veszettségvírusok, filovírusok (Ebola és Marburg) és a paramyxovírusok (Nipah és Hendra).

Magyarországon 28 denevérfaj él, amelyekből korábban veszettségvírust (EBLV-1), filovírust, adenovírusokat, calici-, rota-, astro-, korona- és más vírusokat mutattak ki célzott virológiai vizsgálatokkal. A nemzetközi gyakorlatban bevett passzív surveillance módszer során sérülés vagy legyengülés következtében elpusztult állatok virológiai vizsgálata történik. Ez a módszer kiemelkedően fontos, hiszen a valamilyen okból elpusztult és megtalált állatok egy részénél betegséget okozó vírusok lehetnek a felelősök a tünetek kialakulásáért. Hazánkban csak elvétve alkalmazták a módszert, elsősorban veszettség-gyanús egyedek esetében.

Célunk egy olyan magyarországi passzív denevér lyssavírus surveillance rendszer kialakítása volt, aminek segítségével nyomon tudjuk követni a hazai denevérállományban előforduló veszettségvírusok prevalenciáját, az érintett fajok számát és a területi előfordulásokat. Vizsgálatunk során eddig 11 faj 85 példányát vizsgáltunk meg. Az állatok 2018-2023 között pusztultak el, Magyarország egész területéről kerültek összegyűjtésre. A vizsgált 85 egyedből két pozitív mintát találtunk, a vírusok teljes genomjának meghatározását követően az Európai denevérveszetttség vírus-1 (EBLV-1) filocsoport EBLV-1a filogenetikai klaszterébe sorolódtak.

A veszettség vírusok a legfontosabb vírusos zoonózisok közé tartoznak, és világszerte jelentős veszélyt jelentenek a közegészségügyre. A vadon élő kutyák és kistestű ragadozók számára, illetve a háziállatok védelmére kifejlesztett vakcinázási módszerek denevérek esetében nincsenek megszervezve. Ezt figyelembe véve, a vizsgálatunk során kapott eredmények figyelemfelhívásként szolgálhatnak, mind a lakosság, mind a denevérekkel foglalkozók számára, hogy fontos az elővigyázatosság a denevérekkel való kontaktus során. Az állatokat védőeszköz és megfelelő szakmai tudás mellett érdemes kezelni, ezzel is elkerülve az esetleges fertőzési eseményeket.

I. Bevezetés

I.1. A denevérek és vírusaik bemutatása

A denevérek (Chiroptera) rendje taxonómiaiilag rendkívül változatos, a Földön élő emlősök kb. 20%-a tartozik ide, több mint 1400 fajjal (Simmons & Cirranello, 2024). Egyedül a denevérek képesek az emlősök közül aktív repülésre. Kizárólag éjszakai (Peixoto et al., 2018) életmódot folytatnak, általában kis testű állatok, a legtöbbjük echolokációt használ a tájékozódáshoz és zsákmányszerzéshez. A denevérek rendje két alrendre tagolható: a Yinpterochiroptera alrendbe a repülőkutyák és pl. a patkósdenevérek, a Yangochiroptera csoportba pedig a kisdenevér családok többsége tartozik (Kunz et al., 2011).

A denevérek fajonként több zoonotikus tulajdonsággal rendelkező vírust hordoznak, mint a rágcsálók, és ma már a zoonózisok jelentős forrásaként ismerik el őket, amelyek közül néhány akár súlyos emberi betegségeket is okozhat (Luis et al., 2013). A denevérek gyakran nagy kolóniákban élnek, ezért közöttük a patogének viszonylag könnyen átadódhatnak, repülésüknek köszönhetően pedig jelentős távolságokra képesek terjeszteni az általuk hordozott vírusokat (Wynne & Wang, 2013).

A különböző antropogén tényezők, például a túlnépesedés, az urbanizáció és az ezzel járó emberi területek terjeszkedése, a természetes élőhelyek leromlása és a vadhús-fogyasztás növekedése miatt a denevérek és emberek közötti interakciók száma is egyre gyakoribb. Ezáltal a felbukkanó fertőző betegségek egyre nagyobb veszélyt jelentenek számunkra (Letko et al., 2020; Wong et al., 2007).

Az elmúlt évtizedekben egyre több denevér eredetű vírusjárvány alakult ki, mint pl. Ázsiában és Ausztráliában a COVID-19 pandémia és a Nipah és Hendra járványok, Afrikában az egyre gyakrabban felbukkanó Ebola járványok (Chu, et al., 2008; Rothan & Byraredddy, 2020).

A veszettség és a veszettséggel kapcsolatos vírusok a legfontosabb vírusos zoonózisok közé tartoznak, és világszerte veszélyt jelentenek a közegészségügyre. Míg a közismert veszettségvírus (RABV) az újvilági denevérekben fordul elő (több más emlőscsoport mellett), nagy számú különböző lyssavírus fordul elő denevérekben szerte a világon (Schatz et al., 2013). Denevérekből a lyssavírus fajok közül a Mokola- és az Ikoma veszettségvírusokon kívül mindet sikerült izolálni. A kutatásokból kiderült, hogy a lyssavírusok képesek klinikai betegséget okozni a denevérekben, viszont klinikai betegség hiányában is képesek lehetnek a denevérpopulációkon belül cirkulálni (Schatz et al., 2013).

Magyarországon, 28 denevérfaj található meg, melyek közül mind védett vagy fokozottan védett. Az európai denevérek körében az EBLV-1 és EBLV-2 veszettségvírusok a

legelterjedtebbek. Az EBLV-1 két különálló alcsoportra osztható, melyek átfedő földrajzi területeken oszlanak el Európán belül (EBLV-1a és EBLV-1b) (Amengual et al., 2007; Folly et al., 2021). Magyarországon korábban kettő EBLV-1-el fertőzött denevérből tudták megszekvenálni a vírust, 2011-ben és 2015-ben (Forró et al., 2018), ezek az EBLV-1a csoportba tartoznak.

Nyugat-Európában a lyssavírus monitoring denevérek esetében is egy működő módszer, azonban Közép- és Kelet-Európában a monitoring a vadon élő, illetve a háziállatok vizsgálatára összpontosul, ezáltal denevérveszetséges esetekről kevesebb információval rendelkezünk. A passzív monitoring egy jól működő módszer a ritka és védett fajok esetében is, hiszen az elpusztult egyedek vizsgálata segítségével megelőzhető a denevérek természetes élőhelyeiken való bolygatása. A tetemek vizsgálata olyan további információkat szolgáltathat számunkra, amik a természetben, az élő állatokon való vizsgálatok során nem elérhetők. Mivel a veszetség alacsony prevalenciával van jelen a denevéropulációkban, a nagy mintaszámban való gyűjtés lehetővé teszi az ilyen ritka kórokozók monitorozását is (Forró et al., 2018).

I.2. A veszetségről általánosan

A veszetség több mint három évezrede az egyik legismertebb és legrettegettebb emberi betegség. Bár a vírus által az emberekben okozott agyvelőgyulladás továbbra is kezelhetetlen, a fertőzés kiválóan megelőzhető (Baer, 1991).

A „veszettség” a görög „Lyssa” vagy „Lytta” szóból ered, aminek a jelentése örület, téboly. A latin „rabies” szó a szanszkrit „rhabas” szó fordítása, aminek a jelentése „erőszakot elkövetni”. Ezt a betegséget úgy írták le emberekben, mint hidrofóbia (víztől való félelem), amikor is az érintett személy egyszerre szomjazott és érzett félelmet a víztől. A görög mitológia szerint Arisaeus feladata volt az, hogy megelőzze a veszetséget, míg Artemis gyógyította azt. Feltételezhetően időszámításunk előtt 500 évvel születtek az első írásos feljegyzések kutyák veszetségéről, Democritus által. Arisztotelész a Krisztus előtti 4. században a Natural History of Animals c. művében említette, hogy elsősorban a kutyákat érinti a veszetség, és akit megharaptak szintén veszetté váltak. Hippokratész, Plutarkhosz, Cardano és Lukianosz szintén megemlíti az ókori időkben ezt a betegséget. A legelső nagy veszetség járványt 1271-ben írták le, veszett farkasok támadtak meg állatsordákat és nyájakat Frankföldön, ami több mint 30 ember halálát követelte. 1586-ra Flandriában, Ausztriában, Törökországban és Magyarországon is epizootikussá vált a veszetség kutyák körében (Baer, 1991).

Zinke 1804-ben kísérlettel bebizonyította, hogy a veszetségvírus nyállal tud terjedni. 1881-ben Pasteur rájött, hogy ez a vírus a központi idegrendszert érinti, illetve nyulakon végzett

kísérletekkel igazolta, hogy a betegség minden esetben a gazdaszervezet bénulásához vagy elhullásához vezet. El tudta különíteni a betegség kétféle változatát, a „csendes/paralitikus” veszettséget és a „dühöngő” veszettséget. A legyengített kórokozó segítségével sikeresen kifejlesztette az első veszettségvírus elleni vakcinát, amit egy kilenc éves, veszett állat által megharapott kisfiún sikeresen alkalmazott. 1978-ban humán diploid sejteken fejlesztették ki a veszettség elleni HDCV (Human Diploid Cell Vaccine) vakcinát (Baer, 1991). Magyarországon Högyes Endre vezette be a veszettség elleni védőoltást, az eredeti Pasteur-módszer (hígítási eljárás) módosításával (Takács & Kárpáti, 2010).

A denevérek szerepe a lyssavírus terjesztésében a 20. századig ismeretlen volt, majd (Carini, 1911) vetette fel a veszettség és a vámpírdenevérek harapása közötti kapcsolatot. További három évtizedbe telt azonban, mire a veszettséget a nem vérszívó denevérfajoknál is kimutatták. 1953-ban az USA-ban, Floridában írták le az első olyan humán veszettség esetet, amit rovarrevő denevér okozott (De Serres et al., 2008), míg Európában 1977-ben történt az első denevérveszetttség okozta humán haláleset (Franka et al., 2008).

Az 1950-es évekre a vadon élő állatok terjesztette veszettség visszaszorítása került a figyelem középpontjába, Európában elsősorban a rókák terjesztették a legnagyobb mértékben a betegséget. Ennek okán vakcinázási stratégiákat szerettek volna kifejleszteni, például Kanadában, az 1980-as években tömegesen fogtak be és oltottak borzokat, csökkentve ezzel a vadonban élő állatok között terjedő veszettséget (Rosatte et al., 2001; Rosatte et al., 1986). A vadon élő állatok aktív monitoringja egy másik jó lehetőség az ilyen fertőző betegségek követésének és visszaszorításának, amit Németország, Belgium és Franciaország is alkalmaz (Johnston, 2004). Európában a denevér lyssavírus monitoring nem ugyanolyan elterjedt, a nyugati területeken nagyobb hangsúlyt kap és nagyobb számban is azonosítanak veszett állatokat. Közép- és Kelet-Európában a denevérekben azonosított veszettség esetekről szórványos információval rendelkezünk, ami betudható annak, hogy ezeken a területeken nincs megszervezve és alkalmazva egy jól működő passzív monitoring rendszer (Forró et al., 2018), bár humán érintettség (harapás) esetén az állatok hatósági vizsgálata megoldott.

I.3. A veszettségvírusok rendszertana

A veszettségvírusok közé egyszálú, negatív polaritású nem szegmentált örökítő anyaggal rendelkező RNS (ribonukleinsav) vírusok tartoznak. A *Lyssavirus* a *Mononegavirales* renden belül a *Rhabdoviridae* családban található nemzetség. Összesen 17 fajt sorolnak a *Lyssavirusok* közé, amiket a transzmembrán glikoproteint kódoló gén genetikai eltérései alapján különítenek el (Badrane et al., 2001; Černe et al., 2023). Az ICTV (Nemzetközi

Vírusrendszertani Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)) által a következő veszettségvírusok kerültek elfogadásra: Aravan lyssavirus (ARAV), Australian bat lyssavirus (ABLV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), Duvenhage lyssavirus (DUVV), European bat lyssavirus-1 (EBLV-1), European bat lyssavirus-2 (EBLV-2), Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV), Ikoma lyssavirus (IKOV), Irkut lyssavirus (IRKV), Khujand lyssavirus (KHUV), Lagos bat lyssavirus (LBV), Lleida bat lyssavirus (LLEBV), Mokola lyssavirus (MOKV), Rabies lyssavirus (RABV), Shimoni lyssavirus (SHIBV), West Caucasian bat lyssavirus (WCBV) és a Taiwanese bat lyssavirus (TBLV) (Banyard, & Fooks, 2021). Egy nemzetségbe tartoznak azok a lyssavírus fajok, amelyek nukleoprotein génje (N-gén) legalább 80-82%-os hasonlóságot mutat (legjobban konzervált gén) vagy a kódoló régiók hasonlósága eléri a 80-81%-ot (Dietzgen et al., 2012; Zandi et al., 2021).

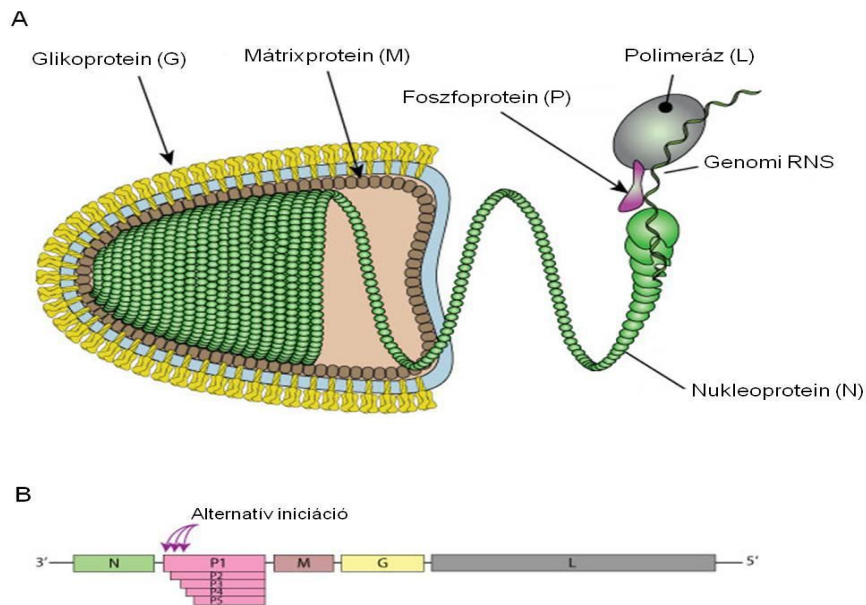
Kettő további lyssavírus fajt azonosítottak, amelyek genetikailag a lyssavírusok nemzetségébe tartoznak, de ideiglenes fajok maradnak további karakterizálásig, ezek a Kotalhti bat lyssavirus (KBLV) és a Matlo bat lyssavirus (MBLV) (Dietzgen et al., 2012). Filogenetikai analízisek alapján a lyssavírus nemzetségen belül két fő és egy további potenciális filocsoportot különítettek el. Az 1-es filocsoport az ABLV, ARAV, BBLV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, GBLV, IRKV, KBLV, KHUV és RABV genotípusokat tartalmazza. A 2-es filocsoportban a LBV, MOKV és SHIBV genotípusok találhatók (Černe et al., 2023). Immunogenitási és patogenitási vizsgálatokból kiderült, hogy az 1-es filocsoport vírusaival (RABV és EBLV-1) intracerebrális és intramuszkuláris injekcióval is meg tudtak fertőzni egereket, míg a 2-es filocsoport vírusai csak intracerebrális útvonalon betegítették meg a kísérleti állatokat. Az egyes filocsoportokon belül a glikoprotein ektodomain aminosav-szekvenciája legalább 74%-ban azonos volt, és az antitestek keresztneutralizációt mutattak. A filocsoportok között azonban az azonosság kevesebb mint 64,5% volt, és a keresztneutralizáció hiányzott, ami megmagyarázza, hogy a klasszikus veszettség (RABV) elleni vakcinák (1-es filocsoport) miért nem nyújtanak védelmet a 2-es filocsoportba tartozó lyssavírusok ellen. (Badrane et al., 2001).

A nemzetség tagjainak gazdaspektruma viszonylag szűk, egyedüli típusfaja a RABV fordul elő világszerte, számos szárazföldi fajban. A lyssavírusok közül a RABV felelős a legtöbb emberi megbetegedésért valamint a háziállatok körében előforduló esetek többségéért is (Singh et al., 2017).

I.4. A veszettségvírusok morfológiája, genomi szerkezete

Az összes lyssavírus töltény alakú morfológiát mutat, általában merev, rúdszerű struktúrájuk van, egyik végük kúp alakú, míg a másik lapos. A vírus megközelítőleg 75 nm széles és 180 nm hosszú. Lipidburok veszi körül, amit a vírus a gazdasejt plazmamembránjából hoz létre. A burok vastagsága 7,5-10 nm, felszínén 8,3-10 nm hosszúságú felületi nyúlványok találhatóak, amelyek a glikoprotein három molekulájából állnak. Minden egyes vírus partikula egy 30-35-szörösen feltekeredett nukleoproteint tartalmaz. A lyssavírus genom egy egyszálú negatív, nem szegmentált ssRNS molekula, ami nagyjából 11,9-12,3 kb nukleotidból áll (Kuzmin, 2014) (1. ábra). A RABV genomja egy 58 nt-os leader szekvenciával kezdődik, amit öt strukturális fehérje gén követ 3'-N-P-M-G-L-5' sorrendben, amelyeket intergenikus régiók választanak el egymástól, majd ezt egy 57-70 nt-os trailer szekvencia követ (Jackson, 2014).

A genom a következő öt virális fehérjét kódolja: nukleoprotein (N), foszfoprotein (P), mátrixprotein (M), glikoprotein (G), nagy polimeráz fehérje (L) (1. ábra). A nukleoprotein gén a vírust körülvevő nukleokapszidot képezi, a foszfoprotein szükséges a transzkripcióhoz, replikációhoz és a patogenezishez is. A G-génről transzmembrán glikoprotein termelődik, ami a fertőzés során a fogékony gazdasejthez való kapcsolódásért felel, míg az L-gén kódolja az RNS-szintézishez szükséges polimeráz enzimet. A mátrix protein kölcsönhatásba lép az RNP-vel (ribonukleoprotein) és a G-proteinnel is. A morfogenezisnek ez a formája kulcsfontosságú a vírus összeszerelésének folyamatában, bimbózásának és fertőzőképességének sikerességében, mivel M-protein hiányában a virion részecskék gyenge felszabadulása figyelhető meg, erősen csökkentve a fertőzőképességet. Az N, M és L fehérjék méretben és struktúrában is konzerváltak a lyssavírus fajok között, míg a P és G fehérjék hosszúságában tapasztalhatunk eltéréseket (Banyard & Fooks, 2019; Baer, 1991; Schatz et al., 2013).



1. ábra: A Lyssavírusok sematikus ábrája (A). A virális negatív egyszálú RNS genom sematikus ábrája (B). (Forrás: <https://viralzone.expasy.org/>)

A veszettség vírus létre tud hozni DI (defective interfering) partikulákat, amik az eredeti vírus hosszának az 1/3-át vagy 2/3-át teszik ki, de az eredeti alakot megtartják, míg a genomjuk is az eredeti felére rövidül és csak a strukturális fehérjéket tartalmazzák (Baer, 1991; Wiktor et al., 1977).

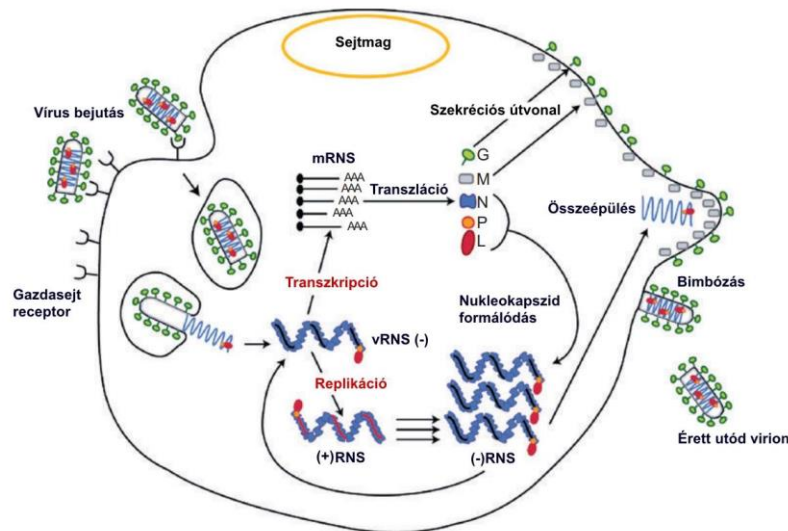
A konzervált génsorrendnek a fehérjék kifejeződésének szabályozásában van szerepe. A lyssavírusok genomja teljes egészében a nukleokapszid burokból található, ezáltal a vírus RNS védett a gazdasejt lebontó folyamatai ellen (Banyard & Fooks, 2019).

I.5. A veszettségvírusok replikációja

A fertőzés kezdeti lépéseként a vírusnak a G-proteinjein keresztül a sejtfelszíni receptorokhoz kell kötődnie, majd endoszomális transzport úton (endocitózis) keresztül a sejtbe jutnia. A vírusgenom transzkripciójakor a virionban lévő RNS-polimeráz felszabadul, amely a P-L komplex öt monocisztronos, 5' sapkával és 3' poliadenilált farokkal rendelkező mRNS-t hoz létre és egy pozitív szálú vezető „leader” RNS-t szintetizál, amit a transzkriptáz-komplex tud feldolgozni (Banyard & Fooks, 2019).

A virális fehérjék transzlációja során négy virális mRNS (N, P, M és L) szabad riboszómákon, míg a G mRNS membránhoz kötött riboszómákon transzlálódik. Az elsődleges transzkripciót követően, a fertőzés egy bizonyos pontján a vírus transzkriptáz komplexe replikatív üzemmódra vált, amely lehetővé teszi az egyes génhatárokon jelenlévő intergenikus kontrollrégiók átírását, ezáltal létrehozza a teljes génállományt, ami egy pozitív szálú replikatív

RNS (anti-genom) lesz. Végül különböző molekuláris kölcsönhatások után az érett virion a gazdasajt membránján keresztül történő bimbózással megszerzi a burkát és kiszabadul a sejtől (Jackson, 2011) (2. ábra).



2. ábra: A lyssavírusok replikációjának sematikus ábrája (Jackson, 2011).

A lyssavírusok morfológiája, működése, fizikokémiai tulajdonsága, genomszerveződése és életciklusa is hasonlóságokat mutat. Azonban a különböző strukturális fehérjéken létrejött poszttranszlációs módosítások következtében az antigén tulajdonságok vírus fajoként eltérőek lehetnek (Jackson & Wunner, 2010).

I.6. A veszettségvírusok patogenezise és tünetei

A veszettségvírusok patogenezisével kapcsolatos ismereteink nagy részét általában rágcsálókön végzett állatkísérleti vizsgálatokból tudtuk meg (Jackson, 2011). A vírus több úton is be tud jutni a szervezetbe, a leggyakoribb a fertőzött állat általi harapással, a sérült bőrfelületen keresztül, fertőzött nyállal való terjedés egyik gazdaszervezetből a másikba. A bejutott vírus a bőr alatti kötőszövetbe vagy izomszövetbe kerül. Leírtak olyan eseteket is, amikor a fertőzött nyál közvetlenül a nyálkahártyán keresztül, emésztőrendszeren, szájon vagy légúton keresztül jutott a gazdaszervezetbe (Gibbons, 2002; Manning et al., 2008).

A szervezetbe való bejutást követően a RABV jellemzően az izomsejteket fertőzi meg. Alacsony replikáció után a perifériás idegsejt nyúlványba feltételezhetően a nikotinos acetilkolin-receptoron (Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)) keresztül jut be (Rabies Virus Receptors, 2005). A vírus változó ideig marad a bejutás helyén, ami hozzájárulhat a

veszettségre jellemző változó lappangási időhöz. Ezzel szemben magasabb titerű inokulum esetén a RABV képes megfertőzni a motoros véglemezeket anélkül, hogy az izomban kellene szaporodnia (Charlton et al., 1997). Ehhez, szüksége van a neuron sejt adhéziós molekulára (Neural cell adhesion molecule, (NCAM)) és a p75 neurotrophin receptorra (p75NTR) (Gluska et al., 2014), amik megkötik a vírus felszíni glikoproteinjeit, ezzel segítve a bejutáshoz szükséges endocitózist (Lafon, 2005). A RABV a perifériás idegrendszerbe (PNS) a neuromuszkuláris junkció motoros véglemezein keresztül jut be, de a vírus internalizációjának pontos módja továbbra is kevésbé ismert (Scott & Nel, 2021). Mivel a fertőzött egyedben a vírus közvetlenül lép be a perifériás idegekbe, vagy az izomsejtekben lezajlott replikáció után kerül be, ezáltal a vírus virémiát nem alakít ki a szervezetben (Takács & Kárpáti, 2010).

A vírus retrográd axoplazmán keresztüli transzporttal (3 mm/óra) kerül a perifériás idegekből a központi idegrendszer sejtjeibe. *In vivo* a veszettség vírus az idegrostokban és a központi idegrendszer neuronjaiban intraaxonális transzporttal halad a sejttest felé (retrográd) vagy a sejttesttől távolodva (anterográd), mikrotubulus függő folyamatok segítségével. Minél nagyobb a vírustiter/inokulum és az idegsejtek sűrűsége a harapás helyén, illetve minél közelebb van a harapás helye az idegrendszerhez, annál nagyobb a fertőzés kockázata (Gibbons, 2002). A vírus az agyvelőből a nyálmirigyekbe is eljut, de csak a lappangási időszak végén, a tünetek megjelenése előtt 5-8 nappal (Takács & Kárpáti, 2010).

Amint az életképes vírus elért egy neuront, az infekció és a klinikai betegség ki fog alakulni. A lyssavírusoknak a minimális infekciós dózisa szorosan köthető a vírus fennmaradásához és transzmissziójához a szervezetben. Egérben végzett kísérleteknél azt tapasztalták, hogy 4 db fertőzőképes vírus partikula adja a minimális infekciós dózist, perifériás inokulációkor. Bár ez egy kísérleti fertőzés, mégis látható, hogy a lyssavírus kis mennyiségben is képes a fertőzésre (Banyard, Healy, et al., 2014).

A klinikai betegség kialakulását megelőző lappangási időszak kialakításában, a fertőző dózis mértéke és a fertőzéskor előforduló sejtípusok játszanak szerepet. A lappangási idő általában két hét és két hónap között változik, de eltarthat akár évekig is (Shankar et al., 2012). A vírusnak a különböző sejtípusok megfertőzésére való képessége valószínűleg szorosan összefügg a preklinikai időszak hosszával. Ez az időtartam nagyon változó még azonos állatcsoportok esetén is, például kísérleti fertőzés alkalmával közönséges késeidenevéreket fertőztek EBLV-1 vírussal, ahol a lappangási időszak 7-26 napig tartott, a beinjektálás helyétől függően (Freuling et al., 2009). Vízi denevéreknél (*Myotis daubentonii*) a fertőzés 32 nap alatt alakult ki (Johnson et al., 2008). Eddig egy alkalommal tudtak leírni, szintén vízi denevérből, egy természetes úton kialakult veszettség fertőzési inkubációs periódust, mely során kilenc

hónapos izolációban eltöltött idő után alakultak ki tünetek. Az alacsony patogenitás és a hosszú lappangási idő kedvez a vírus populáción belüli fennmaradásának, mivel gátolja azt, hogy a gazdaegyed hirtelen eltűnjön a kolóniából (Boots & Sasaki, 1999).

A betegség lefolyásának négy szakaszát lehet elkülöníteni: az első, azaz bevezető szakasz 1-3 napig tart, az állat elveszíti a félelemérzetét, étvágytalanság vagy túlzott étvágy, tompultság jellemzi. A második, úgynevezett izgatottsági szakaszban túlzott ingerlékenység, dühödt viselkedés, állandó vándorlási vágy alakul ki. Ezt a bénulásos szakasz követi, amikor a szemmozgató izmokat, garat- és nyelvizmokat mozgató idegek károsodnak, ezáltal az állatot megváltozott hangadás és fájdalmas nyelés jellemzi. Az utolsó szakaszban a nyúltagyvelő károsodása miatt bekövetkezik a légzőizmok bénulása, és az állat elhullása (Takács & Kárpáti, 2010).

A Negri-testek klasszikus hisztopatológiai tünetei a veszettségnek. Ezek a képződmények az idegsejtek perikarionjában és dentritjeiben figyelhetők meg. Leggyakrabban a hippokampusz nagy motoros neuronjainál (Ammon-szarv), a kisagy Purkinje-sejtjeiben és az agytörzsi sejtmagoknál fordulnak elő. 1-20 μm átmérőjűek, kerek vagy ovális alakkal rendelkeznek, élesen körülhatároltak, eozinofil festődést mutatnak. A fertőzött sejteknek azonban csak egy adott részhalmaza tartalmaz Negri-testeket. Immunhisztokémiai teszttel mutathatók ki ezek a képződmények, ami a veszettség diagnosztikájának egy megerősítő lépése (Hatanpaa & Kim, 2014; Takács & Kárpáti, 2010).

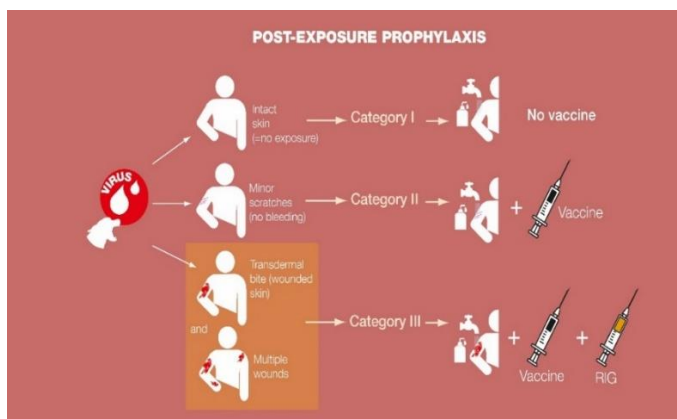
A kísérleti és a természetes úton fertőzött állatok vizsgálatából egyértelműen kiderül, hogy a vírus a betegség késői stádiumában több szervben is kimutatható, feltehetően az agytól távolabbi helyeket is elérve a centrifugális terjedés következtében (Johnson et al., 2008).

I.7. A veszettség elleni védekezés

A veszettség megelőzésében kiemelt jelentősége van a rezervoár fajok vakcinázásának, a rókák körében is terjedő Szilvatikus veszettség (RABV) elleni védekezést csalétekvakcinák kihelyezésével lehet elvégezni. A háziállatok immunizálása inaktivált vakcina beadásával történik. Hazánkban az ebek oltása az 1930-as évek óta kötelező, évente egyszer (Magyar Állatorvosi Kamara rendelete).

A veszettséggel való lehetséges érintkezéssel járó sebek helyi kezelése minden esetben fontos, vízzel és szappannal 15 percig ajánlott a sebesült felületet tisztítani. Emberek immunizálására inaktivált rabies vírust tartalmazó vakcina adható (WHO). A RABV ellen humán diploid sejteken állítottak elő vakcinát (HDCV), ami képes védelmet nyújtani a denevérek által hordozott EBLV-1 és EBLV-2 ellen is. A lyssavírus nemzetségen belül más

filocsoportba tartozó vírus fajok ellen azonban ez nem véd (Brookes et al., 2005; Horton et al., 2014; Malerczyk et al., 2014). Az emberi veszettség kivédése érdekében a preexpozíciós oltás felvétele 3 dózisban történik, a 0. napon, 7. napon és a 21-28. nap között, majd egy év múlva az emlékeztető vakcina beadása következik a WHO ajánlása alapján. A továbbiakban 5 évente történik az oltás ismétlése. A klinikai tünetek megjelenését követően nincs lehetőség veszettség elleni terápiára, a fertőzés letalitása szinte 100% (Maurya et al., 2015). A WHO ajánlása alapján egyszeri vagy többszörös transzdermális harapás vagy karmolás, nyállal való nyálkahártyaszennyeződés, sérült bőrfelületen történő állat általi nyalás vagy denevérekkel való érintkezés esetében azonnali oltás és veszettség elleni immunglobulin (RIG) beadása javasolt. Kétféle immunglobulint használnak világszerte: a fejlettebb országokban a HRIG (Human Rabies Immunoglobulin), a fejlődő országokban az ERIG (Equine Rabies Immunoglobulin) az elterjedtebb (Manning et al., 2008; WHO, 2017).



3. ábra: A lyssavírus expozíciót követő kezelésre vonatkozó ajánlások a veszettséggel gyanúsított állattal való érintkezés típusától függően. Forrás: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/rabies/vaccinations-and-immunization>

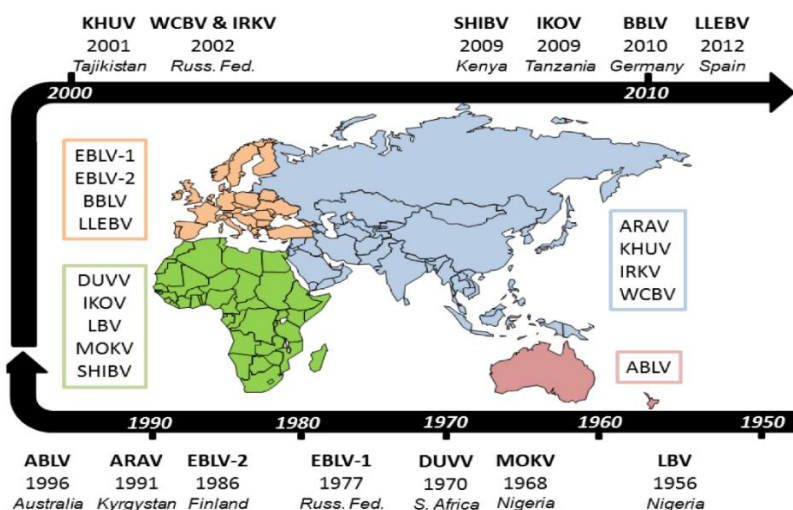
I.8. A veszettség epidemiológiája, előfordulása

A veszettségvírusok terjedését három járványtani formára oszthatjuk: szilvatus, urbánus és egy, a denevérekhez köthető terjedési típus. A szilvatus veszettség elsősorban vadon élő emlősök között cirkulál, mint például a mosómedve (*Procyon lotor*), a nyest (*Martes foina*), az eurázsiai borz (*Meles meles*), az eurázsiai menyét (*Mustela nivalis*), az európai őz (*Capreolus capreolus*) és a vörös róka (*Vulpes vulpes*), de a denevérek is lehetnek terjesztők. Amennyiben a vadon élő állat képes megfertőzni háziállatokat, ami bennük a vírus cirkulációjához vezet, urbánus járványformáról beszélhetünk. Ebben az esetben van a legnagyobb esélye a humán fertőzéseknek is. Leggyakoribb vírusgazdák a kutyák (*Canis lupus*) és macskák (*Felis catus*), de akár juhok (*Ovis aries*), szarvasmarhák (*Bos taurus*) és lovak

(*Equus caballus*) is megfertőződhetnek. A denevérekhez köthető terjedési forma kevésbé nyomon követhető a gazdafajok rejtett életmódja miatt és humán fertőzésekre is kisebb az esély (Banyard et.al., 2014).

A lyssavírus nemzetségbe tartozó vírusfajok ősi gazdájának a denevéreket tekintik, ezt alátámasztja, hogy a MOKV és az IKOV kivételével minden lyssavírust kimutatták már denevérekből (Fooks et al., 2014). Míg egyes lyssavírusok a denevérfajok széles körét képesek megfertőzni, mások csak bizonyos denevérfajokra korlátozódnak (Banyard et al., 2014).

A RABV Ausztrália, Antarktisz, Európa egyes részei és néhány sziget kivételével az egész világon jelen van (Rupprecht et al., 2018). Az LBV, a DUVV és a MOKV csak Afrikában van jelen, egy Franciaországba behurcolt, LBV-vel fertőzött gyümölcssevő denevér esetét leszámítva (Müller et al., 2002). Ausztráliában az ABLV-t a *Pteropus* nemzetségbe tartozó gyümölcssevő denevérekből mutatták ki (Fraser et al., 1996) (4.ábra).



4. ábra: Lyssavírus fajok előfordulási helyei és az első vírus izolálási dátumok. Forrás: (Banyard et al., 2014)

Az amerikai kontinensen denevérekből a leggyakrabban a RABV mutatható ki, a karibi területeken a rőt vérszopódenevér (*Desmodus rotundus*) a fő terjesztője a vírusnak (Davis et al., 2012; Seetahal et al., 2018). Denevérekből RABV-t eddig csak az amerikai kontinensen mutattak ki, Eurázsia, Afrika és Ausztrália téréségében még nem írták le a vírust ezekben az állatokban (Banyard, Evans, et al., 2014).

A veszettség Afrikában több száz éves múltra tekint vissza. A kontinensen legalább négy különböző lyssavírus faj fordul elő ragadozók, denevérek és más emlősök között. Mind a Duvenhage-, mind a Lagos denevér veszettségvírus denevérekhez alkalmazkodott, de járványtanuk – a Mokola veszettségvírussal együtt – kevésbé ismert (Nel & Rupprecht, 2007)

(4.ábra). A 2003-2018 között Dél-Afrikában mintavételezett rovarevő denevérekben filogenetikai elemzéssel azonosították a Duvenhage veszettségvírust és egy potenciálisan új, ideiglenesen Matlo bat lyssavírusnak (MBLV) nevezett ágenszt, amely a West-Caucasian denevér veszettségvírussal áll rokonságban (Coertse et al., 2020)

Európában a denevéreket érintő vizsgálatok által megállapítható, hogy a veszettség esetek többségét EBLV-1 és EBLV-2 okozta. 1968-ban és 1985-ben veszettségvírust tudtak izolálni Németországban és Dániában is, amiket később EBLV-1-ként azonosítottak (Bourhy et al., 1992; Dietzschold et al., 1988). Az EBLV-1 a közönséges késeidenevérekhez (*Eptesicus serotinus*) köthető, de találták már meg közönséges denevérben (*Myotis myotis*), horgasszörű denevérben (*M. nattereri*), hosszúszárnyú denevérben (*Miniopterus schreibersii*) és nagy patkósdenevérben (*Rhinolophus ferrumequinum*) is (Serra-Cobo et al., 2002). Az EBLV-2 rezervoár szervezete két, a *Myotis* nemzetséghez tartozó denevérfaj: a vízi denevér (*M. daubentonii*) és a tavi denevér (*M. dasycneme*).

Bár a veszettségvírus genotípusai szorosan kötődnek specifikus gazdaszervezetekhez, esetenként a rezervoárjuktól eltérő fajokat is megfertőzhetnek, például az EBLV-1 esetében arra találtak példát, hogy a vírus képes volt áttejedni négy juhra Dániában (Müller et al., 2002), míg Németországban EBLV-1-el fertőzött nyesteket találtak (Müller et al., 2004).

Az EBLV-1 két fő altípusra osztható: EBLV-1a és EBLV-1b. Az első európai EBLV-1 esetet 1954-ben Németországban, Hamburgban dokumentálták, amikor is egy kisfiút megharapott egy rovarevő denevér (Jelesic & Nikolic, 1956). Az elpusztult állat agyát megvizsgálva nem találtak fertőzésre utaló Negri-testeket, viszont az agyhomogenizátumot egérben inokulálva megjelentek a fertőzés jelei (Mohr, 1957).

Több denevérfajnál is figyeltek meg EBLV-1-el való fertőzést Európában (Fooks et al., 2003; Picard-Meyer et al., 2004). Hollandiából, Németországból, Franciaországból, Spanyolországból, Svájcban, Magyarországról, Lengyelországból, Dániából, Litvániából, Oroszországból, Ukrajnából, Szlovákiából, Finnországból és az Egyesült Királyságból is jelentettek denevérveszetséget (Stantic-Pavlini, 2005).

Az első hazai denevér veszettséges esetet 1999-ben jelentették (Molnár et al., 2008). A (Forró et al., 2018) által elvégzett 1999-2015 közötti denevér veszettség monitoring során 7 esetben regisztráltak pozitív mintát. Szekvencia elemzésük eredményeként, mind a hét közönséges késeidenevér által hordozott vírus az EBLV-1a klaszterbe tartozott (Forró et al., 2018).

Spanyolországban nested RT-PCR módszerrel vizsgált *M. myotis* fajok esetében is találtak EBLV-1 pozitív egyedeket (Amengual et al., 2007). Szintén Spanyolországban *E.*

isabellinus fajból is ki tudták mutatni a vírust (Vazquez-Moron et al., 2011), valamint 2007-ben ebből a fajból izolálták és Illumina-szekvenálták is az EBLV-1 teljes genomját (Marston et al., 2015). Egy 2004-2012 közötti vizsgálati időszakban 5 különböző denevérfaj 71 egyedeinek vérmintája pozitív eredményt mutatott, EBLV-1 neutralizáló antitestek jelenlétére (Lopez-Roig et al., 2014).

Franciaországban 1989 óta folyik megszervezett denevér veszettség vírus monitoring. 2013-ig 3176 denevér került vizsgálat alá, aminek eredményeképpen 48 egyed bizonyult pozitívnak, amiből két vírusfajt tudtak izolálni. Az összes veszettségvírust hordozó állat közönséges késeidenevér volt, mind az EBLV-1a és EBLV-1b vírust ki tudták belőlük mutatni. Az Európai denevérveszetttség vírus kimutatásokon kívül 2012-ben *Myotis nattereri*-ben a egy új vírus, a BBLV (Bakeloh bat lyssavirus) izolálása történt meg, a minta Északkelet-Franciaországból származott (Picard-Meyer et al., 2014).

Hollandiában 1984-óta kötelező a beteg vagy egy másik állat által elkapott denevért a CIDC Lelystad (Institute for Disease Control) virológiai osztályának beszolgáltatni lyssavírus antitest szűrésre, aminek eredményeként a 2003-ig tartó denevér monitoring során két fajban találták meg az EBLV-t. 251 közönséges késeidenevér és 5 tavi denevér (*Myotis dasycneme*) volt veszettséggel fertőzött (Van der Poel et al., 2005).

A 2018-2020 között Németországban elvégzett lyssavírus passzív monitoring során az 1236 vizsgált denevérből 15 közönséges késeidenevér bizonyult EBLV-1a pozitívnak. A denevér agy mintákat RT-qPCR segítségével vizsgálták. FAT (Fluoreszcens Antitestteszt) módszerrel két törpedenevér (*Pipistrellus*) fajból is ki tudták mutatni a vírust. Az EBLV-1-nek az áterjedése *E. serotinus* vagy *E. isabellinus*-tól eltérő denevérfajokba ritkán fordul elő. A talált törpedenevér egyedeket azonban, a Baden-Württemberg délkeleti szövetségi államban találták, egy olyan régióban, ahol az EBLV-1 eddig nem volt ismert. Eredményeik azt mutatják, hogy az EBLV-1 eddig nem észlelt előfordulási helyein is megfigyelhetők áterjedési események (Klein et al., 2021).

Ázsiában, Vietnám északi részén mintázott 789 denevér 142 vérmintájából tudtak kimutatni EBLV-1 elleni antitesteket, 2011-ben. A vírus izolálása azonban sikertelen volt az állatokból, a pozitív antitest jelenlétét okozhatta más vírusok általi keresztneutralizáció is (Nguyen et al., 2014). Kambodzsában 2000-2001 között mintázott gyümölcs- és rovarévó denevérekből is EBLV-1 neutralizáló antitesteket tudtak kimutatni (Reynes et al., 2004)

A denevérek által hordozott EBLV-1 képes más emlősfajokra, így az emberre is áterjedni, őket megbetegíteni. 1977 óta négy olyan esetet detektáltak, amikor emberi EBLV fertőződés történt. A denevérek védett státusza miatt Európában a tudásunk az EBLV

prevalenciájáról és epidemiológiájáról korlátozott ezeknek az állatoknak a körében. Lehetséges, hogy az EBLV-vel fertőzött denevér esetek emiatt alulreprezentáltak és ezek a tényleges számnak csak kis hányadát képviselik (Fooks et al., 2003).

I.9. Célkitűzés

Fő célunk egy magyarországi passzív denevérvírus monitorozó rendszer kialakítása volt, mely lehetőséget ad a legyengülve kézre került és elpusztult vagy eleve elhullva megtalált denevérek virológiai vizsgálatára. Kiemelten foglalkozunk az elpusztult állatok veszetség szűrésével, hogy feltérképezzük hazánk denevérvírus helyzetét, az érintett fajok körét és a vírusok prevalenciáját a mintázott fajokon belül. A munka során célunk volt a kimutatott vírusok teljes genom szekvenálása, valamint filogenetikai jellemzése, illetve olyan javaslatok megfogalmazása a sérült, legyengült és elpusztult denevérek kezelésével kapcsolatban, melyek segítségével elkerülhetők a humán fertőzések. A passzív denevérvírus surveillance nem csak a veszetségvírusokkal, hanem több más víruscsoporttal kapcsolatban is fontos eredményekkel szolgálhat.

II. Anyag és módszer

II.1. Mintagyűjtés

A magyarországi lyssavírus passzív monitoring vizsgálatba 2018-2023 között elpusztult egyedeket vontunk be, az ország egész területéről. A példányok főként a Fővárosi Állat- és Növénykertből, mentőhelyekről, nemzeti park igazgatóságoktól vagy állatorvosi rendelőkben érkeztek hozzánk.

Összesen több mint 200 egyed került be a laboratóriumunkba a következő 11 fajból: rőt koraidenevér (*Nyctalus noctula*), alpesi denevér (*Hypsugo savii*), szürke hosszúfülű-denevér (*Plecotus austriacus*), fehértorkú denevér (*Vespertilio murinus*), vízi denevér (*Myotis daubentonii*), közönséges késeidenevér (*Eptesicus serotinus*), fehérszélű törpedenevér (*Pipistrellus kuhlii*), bajuszos denevér (*Myotis mystacinus*), horgasszörű denevér (*Myotis nattereri*), kis patkósdenevér (*Rhinolophus hipposideros*) és hegyesorru denevér (*Myotis blythii*) (1. táblázat). A vizsgálatunkba, a jelen dolgozat elkészültéig 85 egyedet vontunk be.

Mivel a hazai denevérek mindegyike védett vagy fokozottan védett, ezért a tetemek tárolásához és vizsgálatához rendelkezünk az illetékes természetvédelmi hatóság engedélyével. Vizsgálatunkat a Magyar Természettudományi Múzeum (Budapest) bevonásával végezzük.

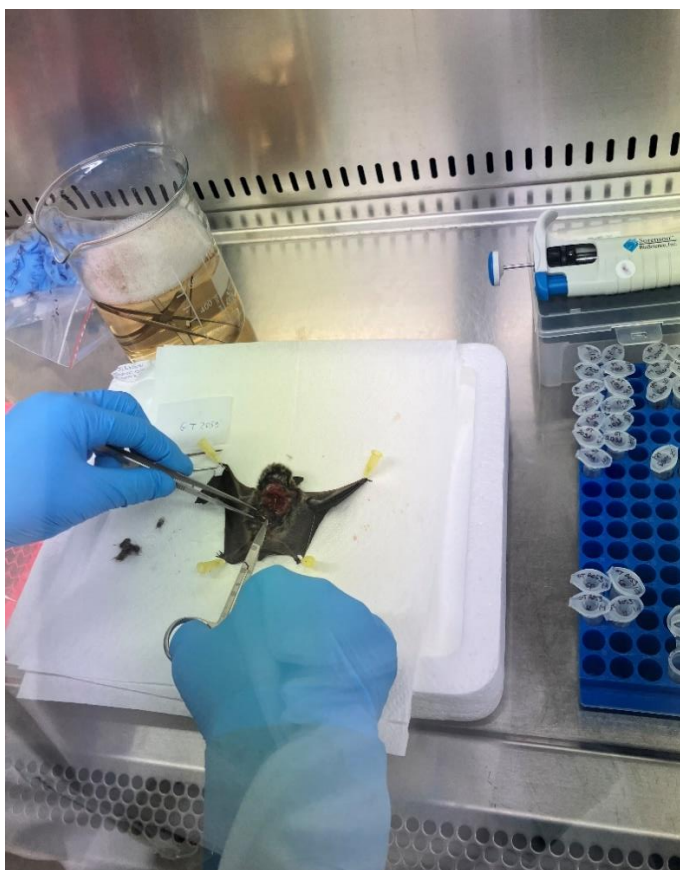
1. táblázat: A 2018-2023 között gyűjtött denevérfajok és példányszámaik

	<i>Nyctalus noctula</i>	<i>Hypsugo savii</i>	<i>Plecotus austriacus</i>	<i>Vespertilio murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	<i>Eptesicus serotinus</i>	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	<i>Myotis mystacinus</i>	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	<i>Myotis nattereri</i>	<i>Myotis blythii/myotis</i>
2018							1				
2019							1	1			
2020	2	2			1	1	2				1
2021	19		3	4		3	9			1	
2022	3	5	1	1	1	5	15		1		
2023						2					
össz.	24	7	4	5	2	11	28	1	1	1	1

II.2. Boncolás

A denevérek vizsgálata a Pécsi Tudományegyetem, Virologiai Nemzeti Laboratóriumban (VNL) történt. A boncolás – tekintve a potenciális humán patogének jelenlétét – ennek megfelelő biológiai biztonsági szinten és egyéni védőfelszerelés használata mellett történt (5. ábra). A vizsgált denevéreket feldolgozásig -80 °C-os fagyasztóban tároltuk.

Az állat méretétől függően a kiolvadási idő eltérő volt, igyekeztünk a boncolást 30-60 perccel az állatok fagyasztóból való kivételét követően megkezdeni, elkerülve a vírus nukleinsavak degradációját. A kiboncolt szervek a következők voltak: agy, tüdő, szív, máj, lép, vese, herék és izom. Ezek a szervek későbbi virológiai vizsgálatokban is felhasználhatóak. A boncolás alatt steril eszközöket használtunk, az agy és a többi szerv boncolása között eszközcseré is történt. Minden szervből két külön 1,5 ml-es Eppendorf csőbe került minta, a vizsgálat megismételhetőségének érdekében, ezzel is csökkentve az olvasztás-fagyasztási ciklusok számát, amely RNS vírusok esetében kiemelt fontosságú, mivel ez a mintákban lévő nukleinsav bontó enzimek aktivációjához és jégkristályok képződéséhez vezethet, melyek mind károsíthatják az örökítőanyagot. A kiboncolt mintákat minden esetben natív módon -80 °C-on tároltuk további feldolgozásig, kivéve a heréket, mivel ebben az esetben az egyiket 6%-os formaldehidben fixáltuk, későbbi antitestvizsgálatokhoz. Boncolás előtt és alatt is feljegyeztük az állatokon látható külső és belső jegyeket (nem, kor, belső szervek állapota), elváltozásokat.



5. ábra: Denevérboncolás. Forrás: Saját kép

II.3. Nukleinsav kivonás

A veszettségvírus szűréshez az agymintákat használtuk fel, pozitív agyminta esetén az adott példány összes többi mintáját is ellenőriztük. A natív mintához 300 µl foszfátpufferelt sóoldatot (PBS) és 2 db üveggyöngyöt adtunk, majd Qiagen TissueLyser II homogenizátor (Qiagen, Németország) segítségével homogenizáltuk, ezt követően 5 percig 15.000 rpm mellett 18 °C-on centrifugáltuk. A homogenizátum 100 µl felülúszóját 300 µl lízispufferben szuszpendáltuk és vortexeltük. A virális RNS tisztítását Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, USA) segítségével végeztük el a gyártó protokollja szerint. A nukleinsavat 40 µl nukleáz-mentes vízben oldottuk fel.

II.4. PCR reakció

A vírus kimutatására RT-nPCR (Reverz Transzkripció nested-PCR) rendszert alkalmaztunk (2. táblázat). A nested, vagyis kétkörös PCR előnye, hogy egyrészt degenerált primereket lehet alkalmazni, és ezért a mintákból jó eséllyel minden lyssavírus nemzetségbe tartozó vírus kimutatható aspecifikus termékek keletkezése nélkül, másrészt az első körben keletkező PCR termékek második körben való felhasználása érzékenyebbé teszi a vizsgálatot és kevesebb fals negatív eredményünk lesz.

Vizsgálatainkhoz a lyssavírus nemzetség képviselőinek nukleoprotein (N) gén egy viszonylag konzervált szakaszát felsokszorozó primereket használtunk (Vazquez-Moron et al., 2006):

GRAB1F: AARATNGTRGARCAYCACAC

GRAB1R: GCRTTSGANGARTAAGGAGA

GRAB2F: AARATGTGYGCIAAYTGGAG

GRAB2R: TCYTGHCIGGCTCRAACAT

Az **1. kört** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, USA) segítségével végeztük el. Használt mennyiségek egy PCR reakcióra: Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix: 10 µl, Luna Warm Start RT Enzyme Mix: 1 µl, forward primer (GRAB1F): 0,5 µl, reverse primer (GRAB1R): 0,5 µl, nukleáz-mentes víz: 2 µl. 20 µl végtérfigat, 5 µl templát RNS (minta nukleinsav). (PCR program: 2. táblázat).

A **2. kört** GoTaq PCR Core System (Promega, USA) segítségével végeztük el. A használt mennyiségek egy PCR reakcióra: 5x Green GoTaq Flexi Buffer: 5 µl, MgCl₂: 3 µl, dNTP: 1 µl, forward primer (GRAB2F): 0,5 µl, reverse primer (GRAB2R): 0,5 µl, GoTaq DNA Polimerase: 0,25 µl, nukleáz-mentes víz: 12,75 µl 2 µl templát DNS (1.PCR kör terméke). Végtérfigat 25 µl. (PCR program: 2. táblázat).

A pozitív veszettségvírus kontroll izolátumot (CVS) a NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc- biztonsági Hivatal) biztosította számunkra.

2. táblázat. Lyssavírus RT-nPCR program

1. kör						
55 °C	95 °C	95 °C	53 °C	60 °C	60 °C	4 °C
10 p	1 p	10 mp	30 mp	1 p	6 p	∞
		30X				
2. kör						
94 °C	94 °C	53 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
2 p	1 p	1 p	1 p	5 p	∞	
	25X					

A vizsgálat során pozitívnak bizonyuló agyminták esetében, az adott egyed további boncolt szerveit, a fent leírt lyssavírus RT-nPCR módszerrel szintén megvizsgáltuk.

II.5. Agaróz-gélelektroforézis, Sanger-szekvenálás

A PCR termékek láthatóvá tétele 1,5%-os agaróz-gélen történt 0,5% TBE puffer (Tris-Borate-EDTA) és 15 µl SYBR Safe DNA gel stain festék (Invitrogen, USA) segítségével. A mintáinkat 100 bp DNS létrához viszonyítottuk. A fragmentek mozgását 90 V feszültséggel értük el, majd a futási idő leteltével, UV-fény segítségével értékeltük ki az eredményt. A 2. PCR program során felsokszorozott DNS amplikonok mérete 260 bp volt.

A PCR termékek agaróz-gélből való tisztítását Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, USA) segítségével végeztük el a gyártó utasításai szerint. Mind az első, mind a második kör PCR amplikonjait tisztítottuk, amiket 20 µl nukleáz-mentes vízben oldottunk fel. Qubit Fluorometer 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével lemértük a minta DNS koncentrációját és hígítással optimalizáltuk a későbbi Sanger szekvenáláshoz.

A minták Sanger szekvenálását mindkét irányban egy szekvenáló cég (Mycrosynth, Amplikon Kft.) végezte el.

II.6. Filogenetikai analízis részleges nukleoprotein génre

A szekvenátorból kapott kétirányú szekvenciákat illesztettük és manuálisan javítottuk a Staden programcsomag Pregap és GAP programjaival. A nukleoprotein gén 361 bp hosszú szekvenciáit ezután az NCBI Genbank BLAST homológiakeresővel vizsgáltuk. A Genbankból további rövid szekvenciákat töltöttünk le és MEGA 11 program segítségével többszörös

illesztést végeztünk. Az esetlegesen túlnyúló szekvencia részeket levágtuk, majd a beépített Maximul Likelihood (ML) modelltesztelés segítségével kiválasztottuk az adott szekvencia alignment-re leginkább megfelelő szubsztitúciós modellt (LG+I+G). A MEGA 11 program segítségével ML törzsfát generáltunk az adatainkból, 1000 bootstrap érték mellett.

II.7. Vírus enrichment kezelés

Annak érdekében, hogy az újgenerációs szekvenálás (Illumina platform) előtt kiszűrjük a gazda genom és esetlegesen jelen lévő más, nem virális szervezeteket, virális dúsítást végeztünk a mintáinkon. A minta homogenizátumokat 16000 g-vel 10 percen keresztül centrifugáltuk. A minta 160 µl felülúszóját átszűrtük egy 0,45 µm lyukátmérőjű szűrőn (Ultrafree-CL Centrifugal Filter, Merck, USA). Ezután a mintából 150 µl-t 2 órán keresztül 37 °C-on, 1 µl micrococcal nuclease-al (Thermo Fisher), 2 µl benzoázzal (Merck, USA), 4,5 µl Turbo DNase-al és 15,5 µl Turbo DNase Pufferrel (Invitrogen, USA) kezeltünk. Végül Direct-Zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, USA) segítségével történt az extrakció.

II.8. NGS-Illumina szekvenálás

Az RNS könyvtár generálása NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep for Illumina (New England Biolabs, USA) segítségével készült el. 10 ng teljes RNS-t használtunk a fragmentációs lépéshez, a cDNS előállítását véletlenszerűen generált primerek (random primer) használatával végeztük el. A könyvtárak minőségét az Agilent 4200 TapeStation System rendszeren ellenőriztük D1000 Screen Tape (Agilent Technologies, USA) segítségével, a mennyiséget Qubit Fluorometer 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) műszerrel mértük meg. Az Illumina szekvenálást NovaSeq 6000 platformon (Illumina, USA) végeztük 2×151 bp futtatási konfigurációval.

II.9. Filogenetikai analízis teljes genomra

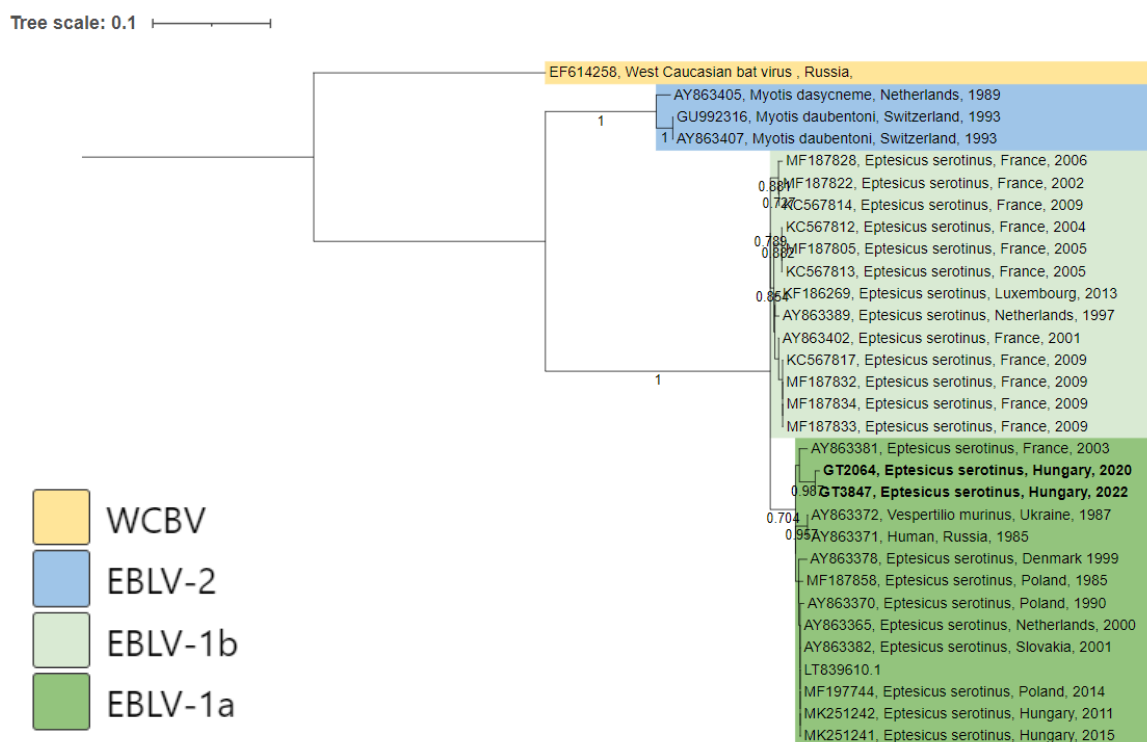
Az Illumina szekvenálás során kapott readeket (szekvenciákat) Geneious v2024.0.4 programban illesztettük a legközelebbi teljes veszettségvírus genomokra. Manuális javítások után megkaptuk a teljes genomokat, melyeket más, a Genbankból letöltött teljes veszettség genomokkal illesztettünk MAFFT v7.505 szoftver segítségével. Az illesztésre legjobban alkalmazható szubsztitúciós modell kiválasztása MrModelTest v2.4 segítségével történt, majd a törzsfát MrBayes v3.2.7a program segítségével (10.000.000 generáció, 25% burn-in) készítettük el. A törzsfák megjelenítése az iTol v6.9 online program segítségével történt.

III. Eredmények és értékelésük

A vizsgálati programunk keretén belül több mint 200 denevér érkezett hozzánk 2018-2023 között. Eddig összesen 11 faj 85 egyede került feldolgozásra (1. táblázat).

A PCR vizsgálatok során két pozitív mintát találtunk, mindkettő közönséges késeidenevérből származott. Az egyik egy nőstény egyed, mely 2020-ban került be Sukoróról a Fővárosi Állat- és Növénykert mentőhelyére és ebben az évben el is pusztult. A példányt egy béka fogta meg, ezért vitték be a mentőhelyre, ahol több hónapon keresztül tünetmentesen élt. A másik egyed egy 2022-ben elpusztult hím denevér volt, melyet Budapesten találtak és egy állatorvosi rendelőből került a Virologiai Nemzeti Laboratóriumba.

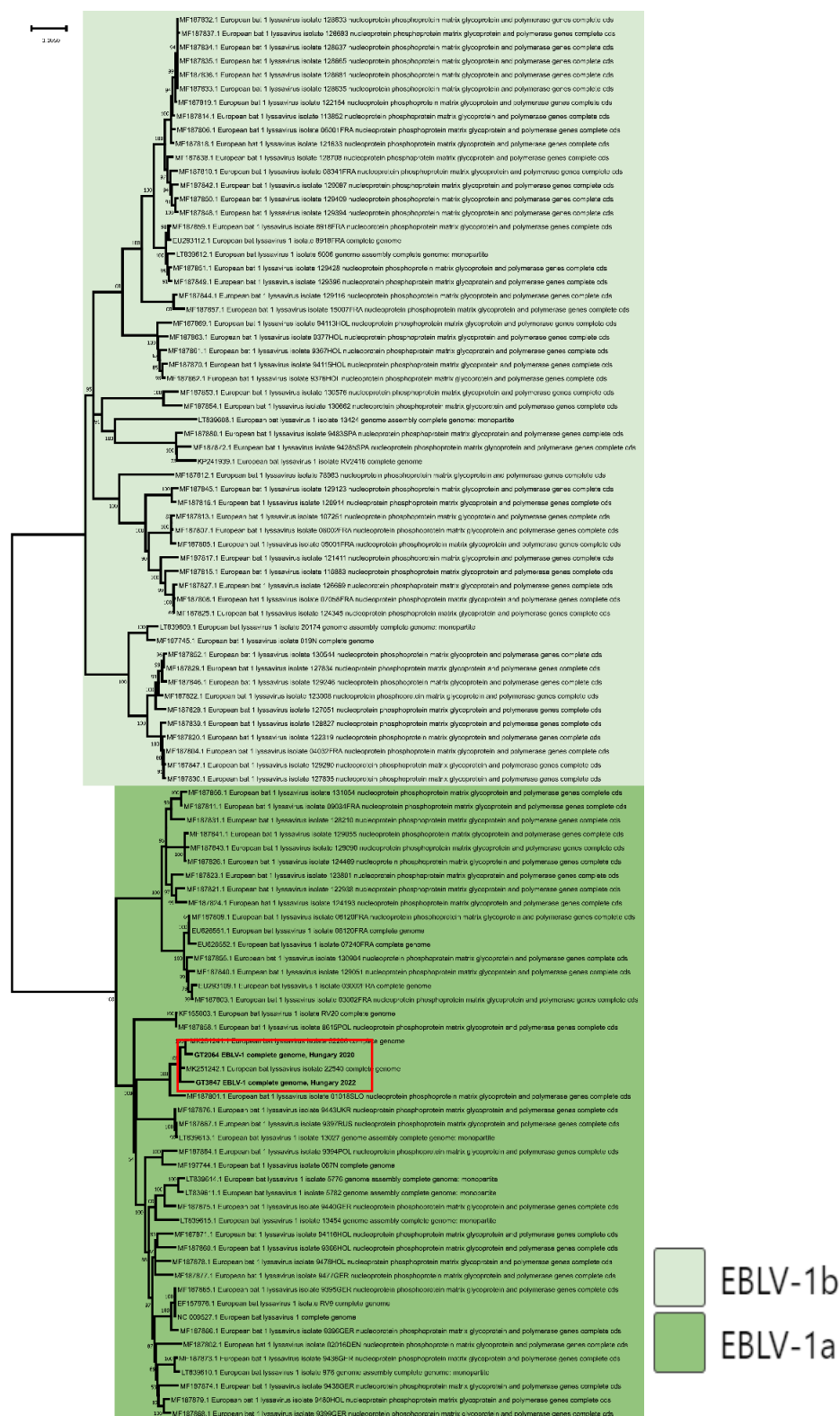
A Sanger-szekvenálás során kapott részleges nukleoprotein szekvencia elemzése alapján mindkét újonnan talált vírus az EBLV-1 fajba tartozik (6. ábra). A szekvenciák alapján az is megállapítható volt, hogy a kérdéses vírusok a hazánkból már korábban kimutatott EBLV-1a csoportba sorolódnak, melynek gazdái között fehértorkú denevér is előfordul, és humán halálozást is okozott.



6. ábra. Az általunk kimutatott két részleges veszettségvírus genom (GT2064, GT3847) filogenetikai besorolása.

A vírus genom jobb megismerése és az evolúciós törzsfán való elhelyezkedés pontosabb meghatározása érdekében mindkét pozitív mintából teljes genomot is szekvenáltunk. A

filogenetikai elemzés megerősíti az N gén alapján látható adatokat, miszerint mindkét vírus az EBLV-1a csoportba tartozik és a 2015-ben és 2011-ben szintén Magyarországon mintázott közönséges késeidenevérekből származó vírusokhoz helyezkednek el a legközelebb (7. ábra).



7. ábra. Az általunk talált két veszettségvírus teljes genom szekvenciáinak (GT2064, GT3847) filogenetikai besorolása.

A pozitív állatok egyéb szerveit is megvizsgáltuk az agymintánál alkalmazott RT-nPCR segítségével. A nőstény egyed lép mintáján kívül az összes többi (szív, tüdő, máj, vese, here) szerv pozitívnak bizonyult, mely általánosan megfelel az irodalomban tapasztaltnak. A szakirodalom szerint viszont szignifikáns különbség tapasztalható az agy és nyelvmirigyekben vizsgált, valamint a többi szerv közötti virális RNS tartalomban (Amengual et al., 2007; Banyard et al., 2009; Serra-Cobo et al., 2002). Az általunk vizsgált egyik lép minta eltérést mutatott a szakirodalomban bemutatott eredményektől. A denevér lép minták a legtöbb kísérleti fertőzést vizsgáló tanulmányban, ahol a többi szerv is vizsgálatra kerül és pozitív eredményt ad, pozitívnak bizonyultak, magas titerű virális RNS tartalommal (Fooks et al., 2009; Franka et al., 2008; Freuling et al., 2009). Az itt említett vizsgálatok pontos mennyiségi eredményekkel szolgálnak, míg a mi esetünkben, a végpont PCR módszer, csak egy pozitív/negatív eredményt nyújtott a vizsgált szervek virális tartalmával kapcsolatban.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az elpusztult denevérek tetemeinek vizsgálata hatékony módszer a bennük cirkuláló veszettségvírusok vizsgálatára. Külön figyelemre érdemes, hogy a módszert védett és fokozottan védett fajoknál is alkalmazni lehet, mivel ezek elpusztítása a legtöbb európai országban, így hazánkban is tilos. A veszettség alacsony prevalenciában van jelen, a nagy mintaelemszámban történő gyűjtés jó lehetőséget biztosít a ritka betegségek monitorozására is.

Vizsgálatunk eredményeiből megállapítható, hogy az EBLV-1 továbbra is jelen van Magyarországon, a korábbi eredményekhez hasonlóan közönséges késeidenevérekben mutattuk ki. A mentőhelyekre, állatorvosokhoz vagy denevérvédelmi szakemberekhez került denevérek többsége emberközelben él, épületlakó faj. Ez nem meglepetés, hiszen az elsősorban természetes környezetben élő fajok ritkábban találkozhatnak az emberekkel. Ennek is lehet a következménye, hogy az urbanizálódott közönséges késeidenevérben előforduló EBLV-1 vírust találtuk meg, az egyébként európai denevérekben előforduló egyéb veszettségvírusokat pedig nem mutattuk ki.

Fontos kiemelni, hogy az irodalmi adatok és a saját új eredményeink alapján is a közönséges késeidenevér az EBLV-1 legfontosabb gazdafaja. Mivel viszonylag gyakran kerül elő településekről, ezért e faj esetében különösen oda kell figyelni a harapás, valamint a testváladékokkal való kontaktus elkerülésére. A menhelyekre került denevéreket érdemes úgy kezelni, mint potenciális hordozói a veszettségvírusnak, ezzel is elkerülve az esetleges fertőzési eseményeket. A denevérekkel foglalkozó szakemberek számára mindenképpen ajánlható a preexpozíciós veszettség elleni vakcinázás, mivel irodalmi adatok alapján a leggyakrabban előforduló denevérveszteségek ellen védettséget biztosít az oltás.

A munkát folytatni kívánjuk további elpusztult denevérek gyűjtésével, a meglévő és az újonnan bekerült példányok veszettségvírus szűrésével és a pozitív minták behatóbb vizsgálatával. Tervezzük továbbá, hogy mintáinkat nem csak veszettségvírusokra, hanem további – elsősorban humánegészségügyi szempontból fontos – víruscsoportokra is megvizsgáljuk.

IV. Diszkusszió

A denevéreket több olyan vírus rezervoárjának tartják, melyek komoly humánegészségügyi jelentőséggel bírnak, beleértve a veszettségvírusokat is (Letko et al., 2020). Európában, így Magyarországon is, a közönséges késeidenevért tekintik az EBLV-1 vírus elsődleges hordozó szervezetének, ami vírus ritka esetekben akár szárazföldi emlősökre is áterjedhet, beleértve a házi állatokat, vadon élő állatokat és az embereket is (Fooks et al., 2003). Európában eddig a legtöbb EBLV-1 izolátumot közönséges késeidenevérekből mutatták ki, míg az EBLV-2 a *Myotis* fajokkal hozható összefüggésbe. A Magyarországon található denevérek védett státusza következtében korlátozottak az ismereteink az EBLV-1 prevalenciájáról és terjedésének epidemiológiájáról ezeknél az állatoknál.

Kutatási munkám értékes betekintést nyújthat a magyar denevérpopulációkban előforduló lyssavírusok jelenlétébe, annak faji eloszlásába. A kutatás egy passzív megfigyelési rendszer létrehozásával és átfogó virológiai vizsgálatok elvégzésével, alapvető adatokat szolgáltat számunkra. A hatékony veszettség elleni védekezési intézkedésekre való figyelemfelhívás mind a közegészségügyi szakemberek, mind a lakosság számára, az emberi fertőzések kockázatának mérséklése érdekében egy nagyon fontos feladata ennek a munkának.

Az elpusztult denevérek tetemeinek vizsgálata jó módszer a ritka és védett fajok esetében, ezáltal csökkentve a természetben való zavarásukat és az okozott stresszt. Olyan beteg, sérült vagy ezeknek a következtében elhullott állatokat van lehetőség vizsgálni, amelyeket természetes élőhelyeiken nehezen vagy egyáltalán nem lehetséges elérni. A passzív monitoring módszer, amely Európa nyugati területein számos egyedből veszettségvírus kimutatást eredményezett, Magyarországon is képes az ilyen ritka kórokozók jelenlétét bizonyítani. A rendszer működésének sikerességéhez szükség van a megfelelő tudással rendelkező és gyakorlatban is jártas denevérkutatók és természetvédelmi szakemberek munkájára, a mentőhelyeken és nemzeti parkokban dolgozók közreműködésére és a lakosság segítségére az állatok beszolgáltatásának érdekében. Tapasztalatunk szerint érdemes minél több információt rögzíteni a denevérek megtalálásának körülményeivel kapcsolatban, mivel ezek is fontos információkkal szolgálhatnak, akár a kórokozók jelenlétével kapcsolatban.

Vizsgálatunkként teljeskörű veszettségvírus vizsgálatot végeztük el a laboratóriumunkba került 85 denevéren, boncolásuk és agymintából való nukleinsav extrakció után, RT-nPCR módszerrel felsokszorozott részleges vírus genomokat Sanger-szekvenálás és bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk. A pontosabb eredmény érdekében Illumina-szekvenálást és további *in silico* analízist végeztünk, aminek eredményeként két közönséges késeidenevér agy mintájából EBLV-1a teljes genomokat tudtunk szekvenálni. Vizsgálatunk azonban nem reprezentálja a vadon élő denevérekben a lyssavírus jelenlétét, hiszen a sérült, gyenge egyedek kerülnek be a denevérmertő állomásokra, a természetben keringő, tünetmentes egyedeket így nem lehetséges a mintázásba bevonni.

A passzív megfigyelési rendszerek fontos és hatékony módszerek a denevérek által terjesztett vírusok keringésének tanulmányozására, különösen városi környezetben. Korábban, Magyarország területén mintázott denevérekből veszettségvírust tártak fel, eredményünkből megállapítható, hogy a korábbi tapasztalatokat megerősítve, az EBLV-1 még mindig jelen van hazánkban, közönséges késeidenevérekben.

V. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Görföl Tamásnak és Dr. Lanszki Zsófiának a laboratóriumi munkám során nyújtott szakmai segítségükért.

Köszönet illeti a denevérmentő állomások és állatorvosi rendelők munkatársait, denevérkutatókat és természetvédelmi szakembereket, akik segítettek a denevérek gyűjtésében, illetve köszönettel tartozunk a Magyar Természettudományi Múzeum segítségéért is.

Szeretném megköszönni Dr. Kemenesi Gábornak és a Pécsi Tudományegyetem, Virologiai Nemzeti Laboratóriumának, hogy elvégezhettem laboratóriumukban a kutatásomat.

VI. Hivatkozott irodalmak jegyzéke

- Amengual, B., Bourhy, H., Lopez-Roig, M., & Serra-Cobo, J. (2007). Temporal Dynamics of European Bat Lyssavirus Type 1 and Survival of *Myotis myotis* Bats in Natural Colonies. *PLOS One*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000566>
- Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., & Tordo, N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of Virology*, 75(7) 3268–3276. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3268-3276.2001>
- Banyard, A. C., Evans, J. S., Luo, T. R., & Fooks, A. R. (2014). Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses-Basel*, 6(8) 2974–2990. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
- Banyard, A. C., & Fooks, A. R. (2019). Rabies and the Lyssaviruses. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20936-9>
- Banyard, A. C., & Fooks, A. R. (2021). Rabies and Other Lyssaviruses (Rhabdoviridae). *Encyclopedia of Virology*, 2, 738–746. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20936-9>
- Banyard, A. C., Healy, D. M., Brookes, S. M., Voller, K., Hicks, D. J., Nunez, A., & Fooks, A. R. (2014). Lyssavirus infection: ‘Low dose, multiple exposure’ in the mouse model. *Virus Research*, 181, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.029>
- Banyard, A. C., Johnson, N., Voller, K., Hicks, D., Nunez, A., Hartley, M., & Fooks, A. R. (2009). Repeated detection of European bat lyssavirus type 2 in dead bats found at a single roost site in the UK. *Archives of Virology*, 154(11) 1847–1850. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0504-8>
- Boots, M., & Sasaki, A. (1999). ‘Small worlds’ and the evolution of virulence: Infection occurs locally and at a distance. *The Royal Society*, 266(1432), 1933–1938. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0869>
- Bourhy, H., Kissi, B., Lafon, M., Sacramento, D., & Tordo, N. (1992). Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2419–2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.9.2419-2426.1992>
- Brookes, S., Parsons, G., Johnson, N., McElhinney, L., & Fooks, A. (2005). Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. *Vaccine*, 23(32) 4101–4109. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.037>
- Carini, A. (1911). Sur une grande Épidémiologie de rage. *Annales de L’Institut Pasteur (Paris)*, 25, 843-846.
- Černe, D., Hostnik, P., Toplak, I., Presetnik, P., Maurer-Wernig, J., & Kuhar, U. (2023). Discovery of a novel bat lyssavirus in a Long-fingered bat (*Myotis capaccinii*) from Slovenia. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 17(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011420>
- Charlton, K. M., Nadin-Davis, S., Casey, G. A., & Wandeler, A. I. (1997). *The long incubation period in rabies: Delayed progression of infection in muscle at the site of exposure*. *Acta neuropathologica*, 94, 73–77. <https://doi.org/10.1007/s004010050674>

- Chu, D. K. W., Poon, L. L. M., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2008). Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *Journal of Virology*, 82(18), 9107–9114. <https://doi.org/10.1128/JVI.00857-08>
- Coertse, J., Grobler, S. C., Sabeta T. C., Seemark, C.J. E., Kearney, T., Paweska T. J., Markotter W. (2020). Lyssavirus in Insectivorous Bats, South Africa, 2003–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12) 3056–3060. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203592>
- Davis, A., Gordy, P., Rudd, R., Jarvis, J. A., & Bowen, R. A. (2012). Naturally Acquired Rabies Virus Infections in Wild-Caught Bats. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1) 55–60. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0674>
- De Serres, G., Dallaire, F., Cote, M., & Skowronski, D. M. (2008). Bat rabies in the united states and Canada from 1950 through 2007: Human cases with and without bat contact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(9) 1329–1337. <https://doi.org/10.1086/586745>
- Dietzgen, Ralf G., & Kuzmin, I. V. (2012). Rhabdoviruses: Molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control. *Caister Academic Press*. <https://doi.org/10.21775/9781912530069>
- Dietzschold, B., Rupprecht, C. E., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T. J., & Koprowski, H. (1988). Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: Implications for epidemiology and control of rabies. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 785–798. https://doi.org/10.1093/clinids/10.Supplement_4.S785
- Folly, A. J., Marston, D. A., Golding, M., Shukla, S., Wilkie, R., Lean, F. Z. X., Núñez, A., Worledge, L., Aegerter, J., Banyard, A. C., Fooks, A. R., Johnson, N., & McElhinney, L. M. (2021). Incursion of European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1) in Serotine Bats in the United Kingdom. *Viruses*, 13(10), 1979. <https://doi.org/10.3390/v13101979>
- Fooks, A. R., Brookes, S. M., Johnson, N., McElhinney, L. M., & Hutson, A. M. (2003). European bat lyssa viruses: An emerging zoonosis. *Epidemiol Infect.*, 131(3), 1029–1039. <https://doi.org/10.1017/s0950268803001481>
- Fooks, A. R., Johnson, N., Mueller, T., Vos, A., Mansfield, K., Hicks, D., Nunez, A., Freuling, C., Neubert, L., Kaipf, I., Denzinger, A., Franka, R., & Rupprecht, C. E. (2009). Detection of High Levels of European Bat Lyssavirus Type-1 Viral RNA in the Thyroid Gland of Experimentally-Infected *Eptesicus fuscus* Bats. *Zoonoses and Public Health*, 56(6–7) 270–277. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01203.x>
- Forró, B., Bányai, K., Sós, E., & Hornyák, Á. (2018). A denevérvészesség aktuális helyzete Magyarországon. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 140(8), 485–494.
- Forró, B., Marton, S., Fehér, E., Domán, M., Kemenesi, G., Cadar, D., Hornyák, A., & Bányai, K. (2021). Phylogeny of Hungarian EBLV-1 strains using whole-genome sequence data. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3)1323–1331. <https://doi.org/10.1111/tbed.13789>
- Franka, R., Johnson, N., Mueller, T., Vos, A., Neubert, L., Freuling, C., Rupprecht, C. E., & Fooks, A. R. (2008). Susceptibility of North American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1. *Journal of General Virology*, 89(8)1998–2010. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83688-0>

- Fraser, G. C., Hooper, P. T., Lunt, R. A., Gould, A. R., Gleeson, L. J., Hyatt, A. D., Russell, G. M., & Kattenbelt, J. A. (1996). Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 2(4), 327–331. <https://doi.org/10.3201/eid0204.960408>
- Freuling, C., Vos, A., Johnson, N., Kaipf, I., Denzinger, A., Neubert, L., Mansfield, K., Hicks, D., Nunez, A., Tordo, N., Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., & Mueller, T. (2009). Experimental infection of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a. *Journal of General Virology*, 90(10) 2493–2502. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011510-0>
- George M. Baer. (1991). *The Natural History Of Rabies*.
- Gibbons, R. (2002). Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. *Annals of Emergency Medicine*, 39(5)528–536. <https://doi.org/10.1067/mem.2002.121521>
- Gluska, S., Zahavi, E. E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., & Perlson, E. (2014). Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *Plos Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004348>
- Hatanpaa, K. J., & Kim, J. H. (2014). Neuropathology of viral infections. *Handbook of Clinical Neurology*, 123, 193–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00008-0>
- Horton, D. L., Banyard, A. C., Marston, D. A., Wise, E., Selden, D., Nunez, A., Hicks, D., Lembo, T., Cleaveland, S., Peel, A. J., Kuzmin, I. V., Rupprecht, C. E., & Fooks, A. R. (2014). Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus. *Journal of General Virology*, 95(5) 1025–1032. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061952-0>
- Jackson, A. C. (2011). Research advances in rabies. Preface. *Advances in Virus Research*, 79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00022-6>
- Jackson, A. C. (2014). Chapter 29—Rabies. *Handbook of Clinical Neurology*, 123, 601–618. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00029-8>
- Jackson, A. C., & Wunner, W. H. (2010). Rabies. *Academic Press*.
- Jelesic, Z., & Nikolic, M. (1956). Isolation of rabies virus from insectivorous bats in Yugoslavia. *World Health Organization Bulletin*, 14, 801–804.
- Johnson, N., Vos, A., Neubert, L., Freuling, C., Mansfield, K. L., Kaipf, I., Denzinger, A., Hicks, D., Nunez, A., Franka, R., Rupprecht, C. E., Mueller, T., & Fooks, A. R. (2008). Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Journal of General Virology*, 89(11) 2662–2672. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003889-0>
- King, A. A. Fooks, A. R. Aubert, M. (2004). Historical perspective of Rabies in Europe and the mediterranean basin.
- Klein, A., Calvelage, S., Schlottau, K., Hoffmann, B., Eggerbauer, E., Müller, T., & Freuling, C. M. (2021). Retrospective Enhanced Bat Lyssavirus Surveillance in Germany between 2018–2020. *Viruses*, 13(8), 1538. <https://doi.org/10.3390/v13081538>
- Kunz, T. H., Torrez, E. B. de, Baue, D., Lobova, T., & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 1–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x>

- Kuzmin, I. V. (2014). Chapter One—Basic Facts about Lyssaviruses. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*, 3–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00001-9>
- Lafon, M. (2005). Rabies virus receptors. *Journal of Neurovirology*, 11, 82–87. <https://doi.org/10.1080/13550280590900427>
- Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8)461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
- Lopez-Roig, M., Bourhy, H., Lavenir, R., & Serra-Cobo, J. (2014). Seroprevalence Dynamics of European Bat Lyssavirus Type 1 in a Multispecies Bat Colony. *Viruses-Basel*, 6(9) 3386–3399. <https://doi.org/10.3390/v6093386>
- Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 280(1756). <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Malerczyk, C., Freuling, C., Gniel, D., Giesen, A., Selhorst, T., & Mueller, T. (2014). Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(10) 2799–2804. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.972741>
- Manning, S. E., Rupprecht, C. E., Fishbein, D., Hanlon, C. A., Lumlerdacha, B., Guerra, M., Meltzer, M. I., Dhankhar, P., Vaidya, S. A., Jenkins, S. R., Sun, B., & Hull, H. F. (2008). Human rabies prevention—United States, 2008: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *U.S. Centers for Disease Control and Prevention*, 57, 1–28.
- Marston, D. A., Vazquez-Morón, S., Ellis, R. J., Wise, E. L., McElhinney, L. M., de Lamballerie, X., Fooks, A. R., & Echevarria, J. E. (2015). Complete Genomic Sequence of European Bat Lyssavirus 1, Isolated from *Eptesicus isabellinus* in Spain. *Microbiology Resource Announcements*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01518-14>
- Maurya, I., Vagholkar, K., Patel, B., Siddiqui, M., Tiwari, S., & Maurya, P. (2015). State of Globe: Rabies: The Lethality Since Antiquity! *Journal of Global Infectious Diseases*, 7(1), 1–2. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.150880>
- Molnár, V., Pálfi, V., Beregi, A., & Molnár, Z. (2008). Denevérvészetség hazai kimutatása. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 130, 629–634.
- Müller, T., Cox, J., Peter, W., Schafer, R., Johnson, N., McElhinney, L. M., Geue, J. L., Tjørnehøj, K., & Fooks, A. R. (2004). Spill-over of European Bat Lyssavirus Type 1 into a Stone Marten (*Martes foina*) in Germany. *Journal of Veterinary Medicine Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(2), 49–96.
- Müller, W. W., Cox, J. H., & Hohnsbeen, K.-P. (2002). Rabies Bulletin Europe. *WHO*, 26(2).
- Nel, L. H., & Rupprecht, C. E. (2007). Emergence of Lyssaviruses in the old world: The case of Africa. *Wildlife And Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and*

- Consequences of Cross-Species Transmission*, 315, 161–193.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-70962-6_8
- Nguyen, A. T. K., Nguyen, T. T., Noguchi, A., Nguyen, D. V., Ngo, G. C., Thong, V. D., Olowokure, B., & Inoue, S. (2014). Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 20(1) 161–163. <https://doi.org/10.3201/eid2001.130813>
- Peixoto, F. P., Braga, P. H. P., & Mendes, P. (2018). A synthesis of ecological and evolutionary determinants of bat diversity across spatial scales. *BMC Ecology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0174-z>
- Picard-Meyer, E., Barrat, J., Bruyere, V., Barrat, M. J., & Cliquet, F. (2004). Genetic analysis of European bat lyssa virus type 1 isolates from France. *Vet.Rec.*, 157(19), 589–95.
- Picard-Meyer, E., Robardet, E., Arthur, L., Larcher, G., Harbusch, C., Servat, A., & Cliquet, F. (2014). Bat Rabies in France: A 24-Year Retrospective Epidemiological Study. *Plos One*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098622>
- Reynes, J., Molia, S., Audry, L., Hout, S., Ngin, S., Walston, J., & Bourhy, H. (2004). Serologic evidence of lyssavirus infection in bats, Cambodia. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12) 2231–2234. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040459>
- Rosatte, R. C., Pybus, M. J., & Gunson, J. R. (1986). Population reduction as a factor in the control of skunk rabies in Alberta. *Journal of Wildlife Diseases*, 22(4), 459–467. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.4.459>
- Rosatte, R., Donovan, D., Allan, M., Howes, L. A., Silver, A., Bennett, K., MacInnes, C., Davies, C., Wandeler, A., & Radford, B. (2001). Emergency response to raccoon rabies introduction into Ontario. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(2), 265–279. <https://doi.org/doi:10.7589/0090-3558-37.2.265>
- Rothan, H. A., & Byraredy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>
- Rupprecht, C. E., Baghi, H. B., Vilas, V. D. R., Gibson, A., Lohr, F., Meslin, F.-X., Seetahal, J. F. R., Shervell, K., & Gamble, L. (2018). Historical, current and expected future occurrence of rabies in enzootic regions. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Epizooties*, 37(2) 729–739. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2836>
- Schatz, J., Fooks, A. R., McElhinney, L., Horton, D., Echevarria, J., Vazquez-Moron, S., Kooi, E. A., Rasmussen, T. B., Mueller, T., & Freuling, C. M. (2013). Bat Rabies Surveillance in Europe. *Zoonoses and Public Health*, 60(1) 22–34. <https://doi.org/10.1111/zph.12002>
- Scott, T. P., & Nel, L. H. (2021). Lyssaviruses and the Fatal Encephalitic Disease Rabies. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.786953>
- Seetahal, J. F. R., Vokaty, A., Vigilato, M. A. N., Carrington, C. V. F., Pradel, J., Louison, B., Van Sauers, A., Roopnarine, R., Gonzalez Arrebato, J. C., Millien, M. F., James, C., & Rupprecht, C. E. (2018). Rabies in the Caribbean: A Situational Analysis and Historic Review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(3). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3030089>
- Serra-Cobo, J., Amengual, B., Abellan, C., & Bourhy, H. (2002). European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4) 413–420. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010263>

- Shankar, S. K., Mahadevan, A., Sapico, S. D., Ghodkirekar, M. S. G., Pinto, R. G. W., & Madhusudana, S. N. (2012). Rabies viral encephalitis with probable 25 year incubation period! *Ann Indian Acad Neurol*, 15(3), 221–223. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.99728>
- Simmons, N. B., & Cirranello, A. L. (2024). Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database. Version 1.5.
- Singh, R., Singh, K. P., Cherian, S., Saminathan, M., Kapoor, S., Reddy, G. B. M., Panda, S., & Dhama, K. (2017). Rabies—Epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1) 212–251. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1343516>
- Stantic-Pavlini, M. (2005). Public health concerns in bat rabies across Europe. *Eurosurveillance*, 10(11).
- Takács, M., & Kárpáti, J. (2010). Klinikai és Járványügyi Virologia. *Vox Media Kiadó Kft*, 496–504.
- Van der Poel, W., Van der Heide, R., Verstraten, E., Takumi, K., Lina, P., & Kramps, J. (2005). European bat lyssaviruses, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12) 1854–1859. <https://doi.org/10.3201/eid1112.041200>
- Vazquez-Moron, S., Avellon, A., & Echevarria, J. E. (2006). RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *Journal of Virological Methods*, 135(2) 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.008>
- Vazquez-Moron, S., Juste, J., Ibanez, C., Berciano, J. M., & Echevarria, J. E. (2011). Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3) 520–523. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100894>
- Mohr, W. (1957). Die Tollwut. 52, 1057–1060.
- WHO. (2017). Guide for post-exposure prophylaxis,. <http://www.who.int/rabies/human/postexp/en/>
- Wiktor, T. J., Dietzschold, B., Leamson, R. N., & Koprowski, H. (1977). Induction and biological properties of defective interfering particles of rabies virus. *Journal of Virology*, 21(2), 626–635. <https://doi.org/10.1128/jvi.21.2.626-635.1977>
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., & Yuen, K.-Y. (2007). Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in Medical Virology*, 17(2) 67–91. <https://doi.org/10.1002/rmv.520>
- Wynne, J. W., & Wang, L.-F. (2013). Bats and Viruses: Friend or Foe? *Plos Pathogens*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003651>
- Zandi, F., Goshadrou, F., Meyfour, A., & Vaziri, B. (2021). Rabies Infection: An Overview of Lyssavirus-Host Protein Interactions. *Iranian Biomedical Journal*, 25(4), 226–242. <https://doi.org/10.52547/ibj.25.4.226>