

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Szúnyogok által terjesztett virális zoonózisok kimutatása Baranya megyében

Kemenesi Gábor, II. éves Biológus MSc hallgató

Pécsi Tudományegyetem,
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Szentágotthai János Kutatóközpont
Virologiai Kutatócsoport

Témavezető:
Dr. Jakab Ferenc
egyetemi docens

2013
PÉCS

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. INVAZÍV FAJOK	6
1.2. TAHYNA VÍRUS	10
1.3. USUTU VÍRUS	12
1.4. NYUGAT NÍLUSI VÍRUS	14
2. CÉLKITŰZÉSEK	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
3.1. TEREPI MINTAVÉTELEZÉS	18
3.2. VÍRUSOK KIMUTATÁSA	20
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	
4.1. TEREPI EREDMÉNYEK	22
4.2. LABORATÓRIUMI EREDMÉNYEK	23
5. ÖSSZEFOGLALÁS	26
6. REFERENCIÁK	27
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	32
8. HALLGATÓI NYILATKOZAT	33

1. Bevezetés

Zoonózisnak hívunk minden olyan betegséget és fertőzést, melyek természetes úton adódnak át gerinces állatokról emberre (WHO). Az átvitel történhet közvetlenül vagy közvetve, vektorszervezet által. Vírusok vektorszervezeteként funkcionálhatnak rovarok, ebben az esetben rovarok által terjesztett, úgynevezett arbovírusokról (arthropod-borne viruses) beszélünk. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) megfogalmazása szerint, az arbovírusok a természetben előforduló, biológiai transzmisszió által valamilyen vírusra fogékony gerinces gazdaszervezet és valamely vérszívó rovar között terjedő vírusok, amely a gerinces gazdában képesek viraemiát (vírus jelenléte a vérben) okozni és ezáltal a vérszívó rovarnak is átadódni. Az ízeltlábú vektorban a vírus szintén képes felszaporodni, így zárva természetes terjedési ciklusát (GRIFFIN 2007.). Számos ismert arbovírust szúnyogok terjesztenek, ezeket mobovírusoknak (mosquito-borne viruses) is nevezzük. A legismertebbek között szerepel a Sárgaláz vírusa, amely évente 200 000 embert betegít meg világszerte, ebből 30 ezer eset végződik halállal. A Dengue láz vírusa a WHO becslései szerint évi 50-100 millió megbetegedést okoz világszerte és a világ népességének körülbelül fele van kitéve a fertőzés kockázatának, ami a fertőzések kis hányadában Dengue Vérzéses Lázként manifesztálódik. A legtöbb mobovírus esetében nem rendelkezünk megfelelő vakcinálási lehetőséggel vagy hatékony antivirális terápiával, ezért a leghatékonyabb módszer a járványok megelőzésére a vektorállomány folyamatos vizsgálata és irtása. A szúnyogok által terjesztett vírusok természetes cirkulációját egy adott területen számos ökológiai faktor befolyásolja. Alapvető fontosságú a vektorszervezetek és a gerinces gazdaszervezetek abundanciája, az évi középhőmérséklet és csapadékmennyiség, a meleg, csapadékos nyarak, valamint a vándormadarakkal való kontaktus lehetősége. Öko-epidemiológiai szempontból fontos tényező a különféle, urbán környezethez köthető létesítmények jelenléte, például csatornák, vízelvezető árkok, nedves pincék, szennyvíztelepek és azok vízgyűjtő területei, továbbá a szúnyogok számára alkalmas, az emberi környezethez tartozó számos kisméretű potenciális tenyészhely (HUBÁLEK 2008.). Magyarországon napjainkig 49 őshonos szúnyogfajt írtak le, melyek közül számos faj vektorkompetenciája bizonyított (TÓTH 2004.). A növekvő mértékű globális kereskedelem és turizmus, a felmelegedés hatásaival együtt a különféle vektorok által terjesztett vírusos megbetegedések eddig nem tapasztalt térnyerését okozza. Egyre több olyan betegség jelenik meg Európában, melyek jelenlétét eddig csupán trópusi országokban igazolták. Példaként említhető az évről-évre hazánkban és a környező országokban is megbetegedéseket okozó Nyugat Nílusi láz vírusa, vagy a horvátországi Dengue-láz vírusos megbetegedések (ECDC, GJENERO-MARGAN et al. 2011.). Gautret és

munkatársai a 2008-2010 között Európába betegen hazatérő turisták adatait elemezve, kiemelik a behurcolt Dengue lázas esetek növekvő számát (GAUTRET et al. 2012.). A mobovírusok Európába történő behurcolásának számos lehetséges módja létezik: Betegen hazatérő viraemiás turisták által; Fertőzött gerincesek (háziállatok, hobbiállatok, állatkerti állatok) behozatala révén; A betegséget hordozó szúnyogok (pete, lárvá, imágó) behurcolásával; Természetes úton a vándorló vadmadarak által (HUBÁLEK 2008.). A különféle vándormadarak megszokott éves vándorlásuk során nagy földrajzi távolságokra képesek eljuttatni a kórokozókat. A fertőzési ciklus olyan tagjait, amelyek tünetmentesen hordozzák az adott vírust, rezervoár szervezeteknek nevezzük. Vírusonként eltérő rezervoárszervezetekről (amplifikációs gazdaszervezet) beszélhetünk, gyakoriak a különféle vándormadarak és rágcsálók. A szúnyogok a fertőzött madár véréből táplálkozva maguk is fertőzőképesé válnak. A fertőzött vér miután elérte a rovar bélrendszerét, az ott található epitheliális sejteken átjut a hemolimfába. A hemolimfa segítségével megfertőzi a rovar egyéb szöveteit is. Miután sikeresen eljutott és replikálódott a nyálmirigyben, a szúnyog a táplálkozása során elválasztott nyálával fertőz. Mivel a vírus a rovar egyéb szöveteibe is eljutott, például az ivarmirigyekbe, ezért szaporodási ciklusuk során a szúnyogok egymást is képesek megfertőzni, ezt horizontális transzmisszióknak nevezzük. A nőstény szúnyogok pedig, a fertőzött peték által az utódpopulációba is átörökítik a vírust, amit transzovariális transzmisszióknak nevezünk. Az ember a fertőzési ciklusban zsákutcaként szerepel, ugyanis emberről-emberre a mobovírusok nem terjednek, mivel a fertőzött emberben nem alakul ki olyan mértékű viraemia amely elegendő lenne további szúnyogok megfertőzéséhez. Az egyes szúnyogfajok eltérő mértékben fogékonyak a különféle vírusokra, vannak szúnyogfajok amelyek egynél több virális zoonózis vektorszervezeteként funkcionálnak és vannak olyanok melyek vektorkompetenciáját még nem sikerült igazolni egyetlen humánpatogén vírus esetében sem. Az egyik súlyos problémát az jelenti, hogy léteznek olyan kimagaslóan nagy közegészségügyi fenyegetéssel bíró szúnyogfajok, amelyek invazív fajokként agresszív földrajzi terjedést mutatnak, nagymértékű alkalmazkodóképességgel rendelkeznek, továbbá egy vagy több különösen veszélyes virális zoonózis hatékony vektorai. Hazánk és a környező országok szempontjából két ilyen fajról beszélhetünk, az Ázsiai tigrisszúnyogról (*Aedes albopictus*) és az *Aedes japonicus*-ról, melyek az utóbbi években egyre nagyobb földrajzi területekre terjedtek szét. Az *A. japonicus* jelenlétét 2012-ben hazánk nyugati határvidékén észlelték (szóbeli közlés DR. BAKONYI TAMÁS 2012). A Chikungunya vírus által okozott olaszországi járvány jól rávilágít az invazív szúnyogfajok (mint pl. a már említett *A. albopictus*, *A. japonicus*) potenciális járványügyi fenyegetésére, melyet a Chikungunya vírus és a Dengue láz vírusának hatékony vektoraként

jelentenek (ANGELINI et al. 2007.). Emberi tevékenység hatására, nem természetes útvonalon a különféle vírusok és az azokat hordozó fajok is nagy földrajzi távolságokra képesek eljutni. Valószínűleg, az Usutu vírus 2001-es ausztriai megjelenése is emberi befolyásnak köszönhető (WEISSENBOCK et al. 2002.). Az ismertett esetek jól példázzák, hogy milyen komoly közegészségügyi fenyegetést jelentenek a különféle vektorok által terjesztett vírusok és az azokat terjesztő invazív szúnyogfajok. A megfelelő vektorok jelenléte és a világ egyéb régióiban előforduló járványok révén komolyan fennáll a veszélye különféle vírusok európai meghonosodásának az elkövetkező években. Ezért fontos a földrajzi terjedésük nyomon követése, illetve az esetleg újonnan felbukkanó vírusok gyors észlelése, melyek leghatékonyabb módja a szúnyogállomány folyamatos monitorozása. A gyors adatnyerésnek köszönhetően, időben elrendelhetőek a szükséges közegészségügyi intézkedések, például a véradás korlátozása a régióban vagy a szúnyogok irtása az érintett területen. A szúnyogok által terjesztett vírusok folyamatos vizsgálata teszi lehetővé a nagyobb járványok megelőzését még a kitörésük előtt, mely a Nyugat Nílusi vírus és egyéb veszélyes vírusok (Dengue-, Usutu-, Chikungunya vírus) európai térnyerését figyelembe véve kimagaslóan fontos feladat.

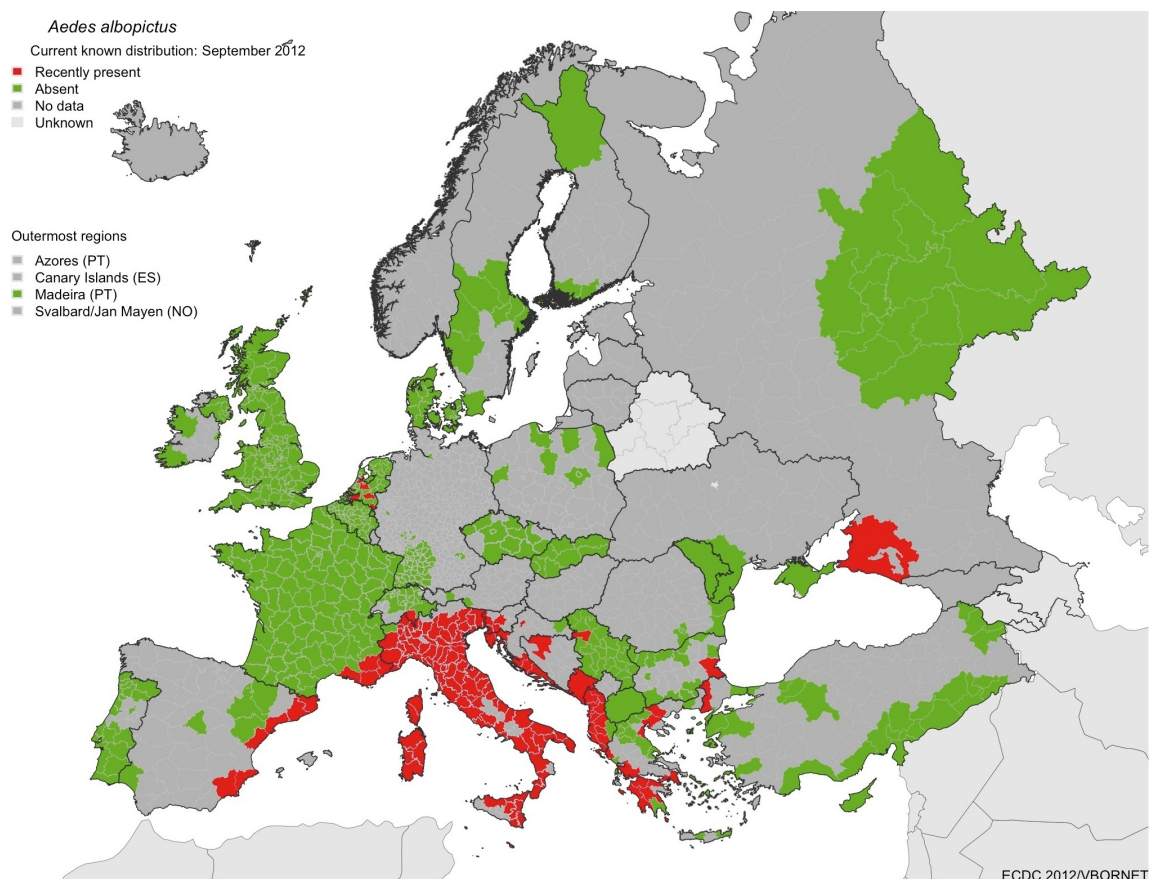
1.1. Invazív fajok

Egyre növekvő mértékű figyelem kíséri az invazív fajok Európai térnyerését, főként az Ázsiai tigrisszúnyog (*A. albopictus*) esetében, mely az európai invazív szúnyogfajok közül a leg súlyosabb közegészségügyi jelentőséggel bír, így a világ száz legveszélyesebb invazív faja közt tartják számon (ISSG 2009.). Eredeti élőhelye Délkelet-Ázsia, ahonnan az Antarktiszt kivételével mára eljutott az összes kontinens területére. Ez a nagymértékű földrajzi terjedés az elmúlt három évtized eredménye, az *Aedes aegypti* és a *Culex pipiens* után ez a harmadik szúnyogfaj, amely emberi tevékenységnek köszönheti elterjedését (PAUPY et al. 2009.). Európában először Albánia területén jelent meg 1979-ben, valószínűleg használt autógumi-abroncs kereskedelem révén. A 70-es éveket követő évtizedek során nagymértékű földrajzi terjedést mutatott és mára több európai országban stabil populációi találhatók. Jelenlegi, Európai Unión belüli elterjedése az 1. ábrán látható. A terjedési mintázata jól szemlélteti, hogy invazív fajként könnyen adaptálódik a lokális ökoszisztémához, továbbá sok helyi őshonos szúnyogfaj potenciális kompetitora, így hatékonyan alakít ki stabil populációkat új területeken. Valószínűleg ez a képessége vezetett az Olaszországban tapasztalható jelentős földrajzi elterjedtségéhez. Jelenleg Olaszország legtöbb 600 m alatti régiójában megtalálható, köztük számos nagyváros körzetében (VALERIO et al. 2009.). Lényeges tényező az emberi tevékenység hatása a faj terjedésére, olyan árucikkek kereskedelme révén, amelyek a faj számára potenciális és vonzó tenyészhelyként funkcionálnak (pl. autógumi abroncsok, szerencsebambusz fiolák). A nőstény szúnyogok természetes élőhelyükön előszeretettel petéznek különféle konténer jellegű habitatokba, mint például faodúk, bambusztuskók és egyéb apró vízgyűjtő helyek, melyekhez hasonló nagy számban található az emberhez köthető élőhelyeken. Ennek köszönhetően ugrásszerű, a természetes földrajzi barrieréken átívelő terjedést is mutat, melyre jó példa a faj 2012-es csehországi megjelenése, ahol invazív fajok monitorozása során, petézőcsapdák használatával sikerült befogni egy forgalmas határátkelő környékén (ŠEBESTA et al. 2012.), Hasonlóan fontos volt az a felfedezés is, aminek révén a fajt leírták Horvátország tengerparti régióján kívül, a főváros (Zágráb) környékén (1. ábra). A faj fiziológiai plaszticitása is fontos szerepet játszik a mérsékelt égövben való túlélésének és megtelepedésének. Nagymértékű lipidszintézise révén képes peteként dormancia állapotban áttelelni hűvösebb éghajlaton is, a peték nagyon ellenállóak a kiszáradással és vízhiánnyal szemben. Ezek a tulajdonságok mind hozzájárulnak a sikeres északi irányú terjedéshez Európában (PAUPY et al. 2009.; MEDLOCK et al. 2012.).

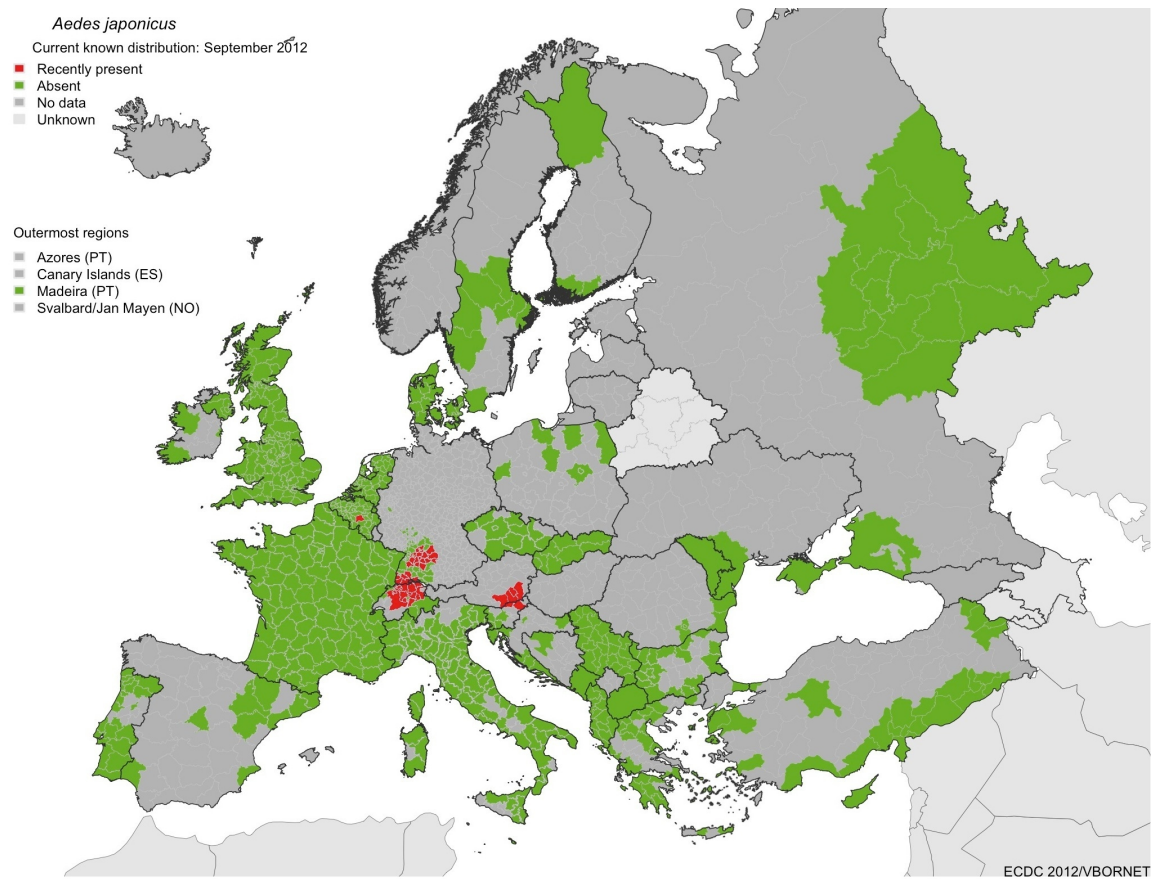
Azokon a területeken ahol megjelenik, jelentősen megnő a kockázata olyan exogén eredetű vírusok transzmissziójának, mint a Dengue láz vírusa (GJENERO-MARGAN et al. 2011.) vagy a Chikungunya vírus (ANGELINI et al. 2007.). További kockázatot jelent, hogy képes a Sárgaláz vírusának transzmissziójára, melyet kísérleti körülmények közt már alátámasztottak. A Sárgaláz vírus történelmi adatok szerint többször okozott járványokat Európában, a mérsékelt éghajlatú területeken és mediterrán régióban is (PAUPY et al. 2009.). Az *A. albopictus* és más invazív vektorszervezetek térnyerése növeli a behurcolt vírusok megtelepedésének kockázatát és olyan sikeresen eradikált vírusok újra felbukkanását, mint például a Sárgaláz vírusa vagy olyan újonnan felbukkanó vírusok megjelenését, mint a Chikungunya-, vagy a Dengue láz vírusa. Caminade és munkatársai által publikált éghajlati modellek alapján Magyarország dunántúli, dél-dunántúli régiója az elkövetkező évtizedekben alkalmas terület lesz az *A. albopictus* és hasonló trópusi eredetű szúnyogfajok hosszútávú megtelepedéséhez (CAMINADE et al. 2012.). A probléma megelőzésének és kezelésének leghatékonyabb módja a szúnyogállomány és a főbb szárazföldi kereskedelmi útvonalak folyamatos monitorozása, majd a szükséges irtások hatékony és gyors végrehajtása. Ezzel a módszerrel Franciaországban és Belgiumban időben észleltek és sikeresen kiirtottak behurcolt *A. japonicus* populációkat (SCHAFFNER et al. 2003; VERSTEIRT et al. 2009.).

Magyarország szempontjából a másik figyelemreméltó invazív szúnyogfaj az *A. japonicus*. Eredeti élőhelye Kelet-Ázsia, ahonnan mára széleskörűen elterjedté vált Észak-Amerikában és Európa bizonyos területein. Stabil populációi vannak Svájc területén, Dél-Németországban (WERNER et al. 2012.), Délkelet-Ausztriában és a szomszédos Szlovéniában (MEDLOCK et al. 2012.). Franciaországi és belgiumi megjelenése után sikeresen eradikálták (SCHAFFNER et al. 2003, 2009.). Jelenlegi európai elterjedését a 2. ábra jelöli. Az *A. albopictus* délről északi irányba való terjedésével ellentétben, itt egy nyugatról keleti irányba való terjedés figyelhető meg, melynek jelenlegi ismert határa éppen hazánk nyugati peremvidéke. Ebben az esetben is feltételezhető, hogy a fő terjedési módokat a különféle emberi tevékenységek jelentik, főként olyan árucikkek globális kereskedelme révén, melyek potenciális és vonzó petézőhelyként szolgálnak a faj számára. Az *A. albopictus*hoz hasonlóan, szintén a konténer jellegű tenyészhelyekben gazdag élőhelyekhez kötődő faj. Ez nagyban segíti az emberi környezetben való megtelepedését, ahol bőven találhatóak számára alkalmas petézőhelyek, valamint táplálékforrásként szolgáló célszervezetek (az ember és jelenlétéhez kötődő állatok). Az emberi környezethez való kötődése és a széles gazdaspecifitása közegészségügyi szempontból ezt a fajt is kiemelt fontosságúvá teszi. Különböző tanulmányokban számos arbovírus esetén bizonyították a faj vektorkompetenciáját, illetve terepi gyűjtések során is találtak Nyugat

Nílusi vírust hordozó egyedeket az Egyesült Államok területén. Néhány más vírus esetében is bizonyítást nyert vektor szerepe, például a Japán encephalitis vírus és a Keleti ló-encephalitis esetében. Kevés adat áll rendelkezésre azonban a faj által természetes körülmények között hordozott vírusokról (MEDLOCK et al. 2012.).



1. ábra Az *Aedes albopictus* európai elterjedése 2012-ben. (forrás: ECDC)



2. ábra Az *Aedes japonicus* európai elterjedése 2012-ben. (forrás: ECDC)

1.2. Tahyna vírus

A Tahyna vírus (TAHV) az első, Európában kimutatott, szúnyogok által terjesztett humánpatogén vírus. A Kalifornia antigéncsoport tagja, közeli rokona az észak-amerikai LaCrosse és Snowshoe Hare vírusoknak és az észak-európai Inkoo vírusnak. A *Bunyaviridae* családon belüli *Orthobunyavirus* genusba tartozó, három-szegmensű, egyszálú RNS genommal rendelkező burkos vírus (KALLIO-KOKKO et al. 2005.). Tahyna és Krizany kelet-csehszlovákiai falvak környékén gyűjtött *Aedes vexans* és *Ochlerotatus caspius* szúnyogfajokból izolálták 1958-ban (BÁRDOS et al. 1959.). Európán kívül Ázsiában (Dél-Szibéria, Távolkelet, Törökország, Azerbajdzsán, Tadzsikisztán, Üzbekisztán) és Afrikában (Tunézia, Marokkó, Egyiptom, Etiópia, Mozambik, Uganda, Kenya, Angola, Dél-Afrika, Nyugat-Afrika) fordul elő. Ízeltlábú vektoraként 2008-ig az *A. vexans*, *Aedes cinereus*, *O. caspius*, *Ochlerotatus cantans*, *Ochlerotatus punctor*, *Ochlerotatus communis*, *Ochlerotatus flavescens*, *Ochlerotatus excrucians*, *Culiseta annulata*, *Culex modestus*, *C. pipiens* és az *Anopheles hyrcanus* szúnyogfajokat írták le. Fő gerinces gazdaszervezetei a nyúlalakúak (pl. *Lepus europaeus*), sündisznó félék (pl. *Erinaceus roumanicus*) és rágcsálók (*Rodentia*). Transzovariális transzmissziót írtak le *A. vexans* és *C. annulata* esetében, illetve áttelelő *C. modestus* és *C. annulata* fajokból is kimutatták a vírust. A humán esetek általában influenzaszerű tünetegyüttessel jelentkeznek. A megbetegedések legtöbbször nyáron, illetve kora ősszel, a szúnyogok tenyészidőszakában jelentkeznek, főként gyermekek körében. A tünetek hirtelen kialakuló lázzal, fejfájással, rossz közérzettel kezdődnek, amelyek 3-5 napig tartanak, majd kialakulhat kötőhártya-gyulladás, torokgyulladás, izomfájdalom-izomfájás, hányinger, gastrointestinalis zavarok, nyakmerevség és egyéb kifejeződései az idegrendszeri érintettségnek (meningitis), melyek jellemzően gyermekekben alakulnak ki. A legtöbb emberi megbetegedés azonban tünetmentesen vagy enyhe tünetekkel zajlik le. 1986 és 1993 között a volt Csehszlovákia területén összesen 263 Kalifornia szerocsoport általi megbetegedést regisztráltak (HUBÁLEK 2008.). 2002-ben nagymértékű áradás volt Csehország Melnik tartományában, ami jelentős mértékben megnövelte a helyi szúnyogállomány egyedszámát. Ebben az évben Hubálek és munkatársai szerológiai vizsgálatokat végeztek különféle morbovírusok átvészelttségére a lakosság körében. Tahyna vírusra a vizsgált személyek 16,5%-a rendelkezett neutralizáló antitestekkel (HUBÁLEK et al. 2002.). Az endemikus régiókban, a lakosság idősebb korosztályának 60-80%-a rendelkezett neutralizáló antitestekkel Tahyna vírusra (BÁRDOS 1974.; HUBÁLEK et al. 1979.). Kazdová és munkatársai 2006 és 2008 között Csehország Morávia régiójában, gyűjtött szúnyogmintákból, Vero sejt kultúrán sikeresen

izoláltak két Tahyna vírustörzset (KAZDOVÁ et al. 2010.). Szintén Csehországban, ugyanebben az időszakban történő monitorozás eredményeként Hubálek és munkatársai *A. vexans*, *Ochlerotatus sticticus* és *C. modestus* szúnyogfajokban is igazolták a vírus jelenlétét (HUBÁLEK et al. 2010.). Calzolari és munkatársai 2007-2008-ban Olaszország északi részén gyűjtött szúnyogmintákból RT-PCR segítségével sikeresen mutatták ki a vírust *O. caspius* szúnyogfajban (CALZOLARI et al. 2010.). Egy 1984 és 1988 között folytatott kutatás eredményeként horvátországi kutatók Tahyna vírus szeropozitivitást mutattak ki az általuk vizsgált állatok (*Ursus arctos*) vérmintáiban (MADIC et al. 1993.). Magyarországon 1967-ben Murakeresztúron gyűjtött *Culiseta annulata* szúnyogfajból izolálták a kórokozót (MOLNÁR 1982.). Mivel a vírus kutatására az elmúlt évtizedekben kevés figyelmet fordítottak, viszonylag kevés friss adat áll rendelkezésünkre a közép-európai térség érintettségéről. Nem szabad figyelmen kívül hagyni azt a tényt, hogy a megbetegedések döntő hányada szubklinikai fertőzések formájában jelentkezik (HUBÁLEK 2008.) ezért nem zárható ki a leírtnál jóval nagyobb földrajzi elterjedés Európában, beleértve hazánkat is.

1.3. Usutu vírus

Az Usutu vírus (USUV) egy afrikai eredetű, a Szubszahara régióban előforduló, *Flavivirus* genusba tartozó, szúnyogok által terjesztett vírus (VÁZQUEZ et al. 2011.). A Japán encephalitis antigéncsoport tagja, közeli rokona a Nyugat Nílusi láz vírusának. Először 1959-ben izolálták Dél-Afrikában a *Culex neavei* szúnyogfajból. (WILLIAMS et al. 1962.). Európában elsőként 2001-ben észlelték Bécs környékén, ahol jelentős madárpusztulást okozott (WEISSENBOCK et al. 2002.). A vírus főleg a *Passeriformes* rendbe tartozó madarakat betegíti, melyek közül a feketetergő (*Turdus merula*) a legfogékonyabb. Az elmúlt évek során elhullott madarakban vagy szúnyogokban igazolták a vírus jelenlétét, Ausztria, Magyarország, Olaszország, Svájc és Spanyolország területén. Vadmadarakon végzett szerológiai vizsgálatokkal kimutatták Csehországban, Angliában, Németországban, Olaszországban, Lengyelországban, Spanyolországban és Svájcban. Újra megjelenése évek óta tapasztalható Ausztria, Magyarország, Olaszország és Spanyolország területén, mely valószínűleg a vírushordozó szúnyogok sikeres áttelelésének köszönhető és kevésbé valószínű az évről-évre történő újra behurcolása (VÁZQUEZ et al. 2011.). Európa különböző országaiban, izolált törzsek genetikai analízise során 99%-nál nagyobb homológiát mutattak ki, ami azt bizonyítja, hogy Európában a 2001-ben Bécs környékén megjelent vírustörzs terjed és nincs szó újra behurcolásról (STEINMETZ et al. 2011.), bár le kell szögeznünk, hogy ezek az eredmények nem egyértelműek a túl kevés rendelkezésre álló európai szekvencia és használható filogenetikai marker miatt (PELETTA et al. 2012.). Az eddigi filogenetikai elemzések és felbukkanásának körülményei alapján azonban feltételezhető, hogy emberi tevékenység hatására jelent meg Bécs környékén, ahol a számos légi és szárazföldi kereskedelmi - és utasforgalmi útvonal találkozása lehetővé teszi ezt. További terjedésében valószínűleg fontos szerep juthatott az Európán belül vándorló és megpihenő madaraknak. Az USUV afrikai vektorszervezetei főként ornitofil szúnyogok, mint a *Culex univittatus*, *Culex perfuscus*, *Coquillettidia aurites*, *Mansonia africana*. Ausztriában Usutu vírus RNS-t mutattak ki *C. pipiens*, *Culex hortensis*, *Culex territans*, *C. annulata*, *A. vexans* és *Aedes rossicus* szúnyogfajokból, de magát a vírust izolálni egyik esetben sem sikerült. Gerinces gazdái madarak. Nagyfokú patogenitást mutat a *Passeriformes* rend néhány fajára és ragadozó madarakra. (WEISSENBOCK et al. 2007.). Az Usutu vírus humánegészségügyi szempontból elhanyagolható, bár a vírushoz köthetően, idegrendszeri érintettséggel járó megbetegedéseket már leírtak immunszupresszált betegeken (PECORARI et al. 2009.) és májtranszplantációt követően (CAVRINI et al. 2009.). Allering és munkatársai Usutu fertőzés gyanúval kezelt betegek szérummintáit, illetve több ezer egészséges vérdonor mintáit tesztelték

Németországban szerológiai módszerekkel az átvészelttség felmérésére. A beteggyanús páciensek mintái negatívnak bizonyultak, azonban egy egészséges vérdonor esetében USUV IgG és IgM pozitivitást találtak (ALLERING et al. 2012.). A vírust kiemelt figyelem kísérik, hiszen a Nyugat Nílusi vírus Amerikai Egyesült Államok béli terjedéséhez hasonló, agresszív földrajzi terjedést mutat Európában. A gyors terjedése, hatékony adaptációja az európai szúnyogfaunához és a folyamatos jelenléte, illetve közeli rokonsága a WNV-hoz potenciális veszélyt rejt magában, amelyet az egyelőre kis számban leírt humán esetek is bizonyítanak. Új területeken való megjelenését általában nagymértékű madárpusztulás jelzi, melynek fő áldozata a feketeterigó, Olaszországban, Németországban, Csehországban, Svájcban elhullott példányaiban és néhány más madárfajban kimutatták a vírus jelenlétét (MANAROLLA et al. 2010., BECKER et al. 2012., HUBALEK et al. 2012., STEINMETZ et al. 2011.). Bakonyi és munkatársai 2003 és 2006 között Budapesten és környékén gyűjtött elhullott madarakat vizsgáltak Usutu vírus kimutatása céljából. 2005-ben Budapest területén feketeterigó elhullást észleltek, melynek eredményeként 6 esetben sikeresen igazolták a vírusfertőzést, illetve izolálták a vírust. Filogenetikai analízisek alapján 99%-os homológiát találtak a 2001-ben Bécs környékén megjelent Usutu vírustörzsszel, ezért feltételezhető, hogy Ausztiából terjedhetett át Magyarországra és nincs szó Európába történt újra behurcolásról (BAKONYI et al. 2007.). Szúnyogokból Németországban (JÖST et al. 2011.) és Olaszországban (TAMBA et al. 2011., SAVINI et al. 2011.) mutatták ki a vírust.

1.4. Nyugat Nílusi vírus

A Nyugat Nílusi láz vírusa (West Nile virus – WNV) a *Flaviviridae* családon belüli *Flavivirus* genusba tartozó, szúnyogok által terjesztett virális zoonózis. Pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkező burkos vírus, mely a Japán encephalitis antigéncsoport tagja (FERENCZI 2010.). Először 1937-ben izolálták egy lázas nő vérmintájából Uganda nyugat-nílusi körzetéből (SMITHBURN et al. 1940.). Hamarosan a legszéleskörűbben elterjedt Flavivírussá vált Afrikában, Európában, Ausztráliában és az 1999-es New York-i megjelenését követően Észak-Amerikában (HUBÁLEK 2008.). A 2012-ben regisztrált Nyugat Nílusi láz vírusos megbetegedések földrajzi eloszlása Európában a 3. ábrán látható. Közép-európai jelenléte régóta ismeretes, az elmúlt 50 évben számos kutatás során igazoltak szeropozitivitást különféle gerinces szervezetekben Ausztria, Csehország, Magyarország és Szlovákia területén, illetve néhány esetben sikeresen izolálták a vírust szúnyogokból, rágcsálókból vagy vándormadarakból (HUBÁLEK et al. 1999.). Az Európai Unió és a szomszédos országok területén három nagyszámú megbetegedéssel járó Nyugat Nílusi vírushoz köthető járvány volt. 1996-ban Romániában 17 halálessel és 352 a vírushoz köthető idegrendszeri megbetegedéssel. A vírust sikeresen kimutatták *C. pipiens* szúnyogokban, melyet a vírus egyik fő vektorszervezeteként ismerünk (TSAI et al. 1998.). 2010-ben Görögországban összesen 197 beteget jelentettek a vírushoz köthető idegrendszeri megbetegedéssel, melyből 33 eset halálos kimenetelű volt. Ezt megelőzően nem írtak le Nyugat Nílusi lázas megbetegedést az országban (DANIS et al. 2011.). Szerbia területén 2012-ben 70, a vírushoz köthető megbetegedést regisztráltak (ECDC 2012.). Szerbia esetében ez volt az első év, amikor Nyugat Nílusi lázas humán eseteket írtak le, ezt megelőzően lovakon végzett szerológiai vizsgálatokkal igazolták csak a vírus jelenlétét (LUPULOVIC et al. 2011.).

Európában *C. pipiens*, *C. modestus* és *Coquillettidia richiardii* ornitofil szúnyogfajokból izolálták a vírust. További vektorai lehetnek az *O. cantans* és az *Anopheles maculipennis* szúnyogfajok, illetve száraz éghajlatú területeken bizonyos kullancsfajok is (*Hyalomma sp.*, *Argas sp.*, *Ornithodoros sp.*). Gerinces gazdái főleg madarak. Európában sikeresen izolálták *Ardeola ralloides*, *Plegadis falcinellus*, *Anas querquedula*, *Fulica atra*, *Tringa ochropus*, *Vanellus vanellus*, *Larus ridibundus*, *Streptopelia turtur*, *Corvus corone*, *Corvus frugilegus* és *Sturnus vulgaris* madárfajokból. Alkalmi vírusgazdaként funkcionálhatnak emlősök (macska, ló) vagy kétélűek (HUBÁLEK 2008.). A kétélűek lehetséges rezervoár szerepét Kostyukov és munkatársai kísérleti körülmények közt bizonyították *Rana ridibunda* békafajon (KOSTYUKOV et al. 1985.).

A vírus emberekben és lovakban okoz megbetegedést, természetes cirkulációjában zsákutcaként szerepelnek, mivel nem képesek egymást vagy újabb vektorokat tovább fertőzni. Lovakban a vírusfertőzés halálozási aránya elérheti a 25%-ot. Észak-Amerikában, madarakban (főként a *Corvidae* családból) is okoz végzetes kimenetelű encephalitist. Humán megbetegedés esetén a tünetek mérsékelt vagy magas, 3-6 napon át tartó lázzal kezdődnek, amit fejfájás, hátfájás, hányás, kötőhártyagyulladás, maculopapulosus kiütések (a törzsről terjednek az arc és végtagok irányába), esetenként encephalitis követ (HUBÁLEK 2008.). A Nyugat Nílusi vírus földrajzi terjedésében több faktor játszik szerepet. Fő terjesztői a vándormadarak, melyek a megfelelő környezetbe érve sikeresen hurcolhatják új területekre a vírust. Valószínűleg a nagyobb esetszámmal járó európai felbukkanásai is ennek köszönhetőek, hiszen mindegyik járvány olyan területhez köthető, amely fontos állomása valamelyik fő madárvonulási útvonalnak. Észak-Amerikában fontos szerep jutott az urbán környezetnek és az ahhoz adaptálódott, a vírusra különösen fogékony *C. pipiens* szúnyogfajnak és számos szintén urbán környezethez adaptálódott madárfajnak a vírus rohamos földrajzi terjesztésében. 1999-es New York állam-béli felbukkanását követően 10 év alatt az Amerikai Egyesült Államok teljes területére eljutott. Az itt tapasztalt gyors koevolúció a vírus és gazdái közt valószínűleg a közös evolúciós múlt hiányának tudható be (KILPATRICK et al. 2011.).

A Nyugat Nílusi láz vírusa komoly közegészségügyi jelentőséggel bír, Magyarországon és az Európai Unió más országaiban is évről-évre okoz megbetegedéseket (ECDC). A vírus monitoringját az EDENext Európai Unió pálya keretein belül, számos európai ország kutatói együttműködésben, évek óta végzik.

Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries
Transmission season 2012; latest update: 30/11/2012



3. ábra Nyugat Nílusi lázas esetek az Európai Unióban és a környező országokban 2012-ben
(forrás: ECDC)

2. Célkitűzések

Kutatásunk fő célja egy folyamatos monitorozási program létrehozása a Baranya megyei szúnyogpopulációk virológiai vizsgálatára. Első körben, a szúnyogok terepi mintavételezése során felmérni a szúnyogfauna összetételét. Ezáltal fontos információkhoz juthatunk a vizsgált terület szúnyogállományának, a különféle vírusokra mutatott fogékonyságáról, illetve jelenlét/hiány adatokat kaphatunk a térségben előforduló invazív fajokra vonatkozóan. Ezek az adatok hozzájárulnak az invazív fajok földrajzi terjedésének nyomon követéséhez, melyet az Európai Járványügyi Központ (ECDC) is kiemelt feladatnak tekint. Az így nyert adatok tárolására és elemzésére, létre hoztak egy adatbázist (VBORNET), amelybe az uniós országok szakemberei feltölthetik a kutatásaik során nyert adataikat. Egyik fő célunk tehát a terepi munka során nyert faunisztikai adatok megosztása a VBORNET adatbázisban és Magyarország jelenlegi „adathiányos” állapotának megszüntetése.

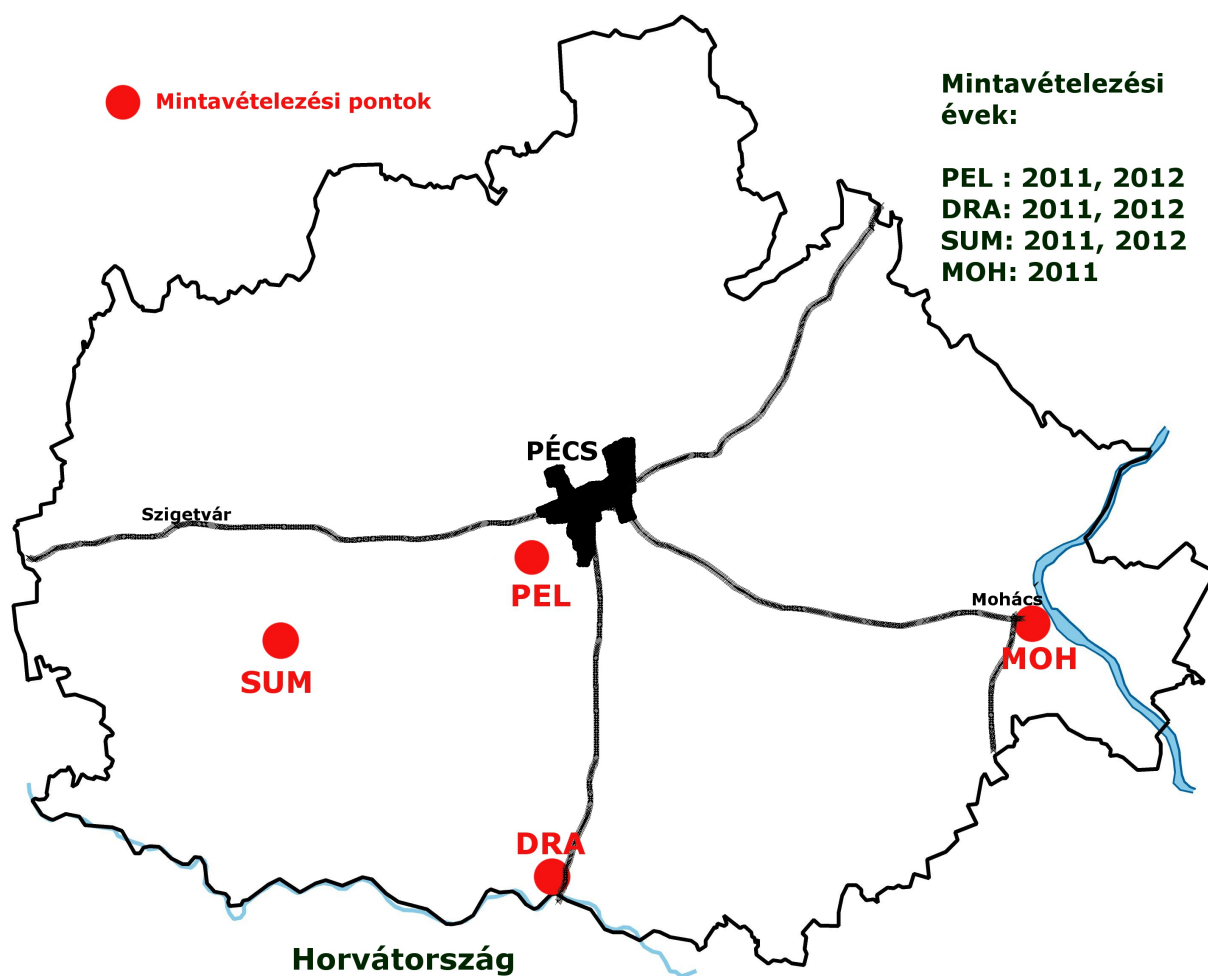
Továbbiakban, a terepi mintavételezés során gyűjtött szúnyogok virológiai vizsgálata a térségben előforduló három legfontosabb morbovírusra. A Nyugat Nílusi láz vírusa évről évre okoz megbetegedéseket hazánkban, ezért kutatása alapvető fontosságú. Az Usutu vírus esetében, Magyarország déli régiójának érintettségéről nem rendelkezünk adatokkal, valamint a Tahyna vírus kutatása is igen kevés figyelmet kapott hazánkban az elmúlt évtizedekben, pedig a hosszú ideje tartó jelenléte a közép-európai régióban, szükségessé teszi friss kutatások elvégzését a témában.

Fontos célunk kutatói együttműködések létrehozása, ezért az általunk gyűjtött mintákat megosztjuk az Európai Unió EDENext programjával, melynek keretein belül, a szúnyogmintáink vizsgálatát Nyugat Nílusi láz vírusára, Dr. Bakonyi Tamás és munkatársai végzik Budapesten. Dolgozatomban az általunk végzett Usutu és Tahyna vírusok kimutatásának bemutatására koncentráltunk.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Terepi mintavételezés

A terepi mintavételezést 2011-ben és 2012-ben, a szúnyogok tenyésztési időszakában, májustól szeptemberig végeztük, Baranya megye főbb madárvonulási pihenőhelyein és a nagyobb, szúnyogok számára alkalmas tenéshelyeken. Gyűjtéseink során az adott terület vízállásait is figyelembe vettük (4. ábra). A szúnyogokat Hall-Mendelin és munkatársai nyomán, saját készítésű akkumulátoros dobozcsapdákkal (HALL-MENDELIN et al. 2010.) és kézi szippantó csővel gyűjtöttük. A csapdában fényforrást alkalmaztunk csalogatásként, ami nem igényel utántöltést, mint a szén-dioxid csalogatás használata esetén, bár kevésbé hatékony és nem szelektív (sok egyéb rovar is a csapdába vonz). A csapdák a nap 24 órájában üzemeltek, így a nappal és éjjel aktív fajok gyűjtésére egyaránt módunk volt. A csapdákat 5 naponta ürítettük, a begyűjtött szúnyogokat kloroformmal altattuk, majd azokat 4°C-on (hűtőtaszában) a laboratóriumba szállítottuk, ahol -20°C-on tároltuk további feldolgozásig. A kézi szippantó csővel gyűjtést 18-22 óráig végeztük a csapdák ürítésekor (5 naponta). A szippantó csővel, csípés közben gyűjtött szúnyogokat élve szállítottuk a laboratóriumba, majd -20°C-on eltároltuk.



4. ábra Terepi mintavételezési pontok (SUM → Sumonyi madárgyűrűző állomás;
PEL → Pellérdi láprét; DRA → Dráva árterület; MOH → Mohács-Kölked dunai holtágak)

3.2. Vírusok kimutatása

A terepi mintavételezés során begyűjtött szúnyogokat először ivaruk alapján elkülönítettük, majd a nőstény szúnyogokat morfológiai bélyegeik alapján sztereomikroszkóp segítségével faj szinten meghatároztuk (BECKER et al. 2003., KENYERES et al. 2008.). Az egyazon területről származó és egyazon fajhoz tartozó szúnyogokat maximum 50 egyedet tartalmazó csoportokba rendeztük. Az így létrehozott csoportok képezték a további kísérleteink során megvizsgált mintákat. Homogenizálás előtt minden 25 egyednél több szúnyogot tartalmazó csőbe 600 µl steril 1x PBS-t, a 25 egyednél kevesebb szúnyogot tartalmazó csőbe 400 µl-t adtunk. A minták homogenizálását Qiagen Mixer Mill MM 300 diszruptor használatával végeztük, 5 percig 30 Hz-es frekvencián. A homogenizátumokat 15000 rpm-en 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót külön csövekbe leszívtuk. A törmeléket eltároltuk -80°C-on, a felülúszókból pedig 140 µl-t felhasználtunk a virális RNS extrakciójához, majd a maradékot szintén -80°C-on eltároltuk. Az RNS extrakciót QIAGEN - QIAamp Viral RNA Mini Kit használatával végeztük a gyártó által előírt protokollt követve. Az így nyert RNS mintákat megosztottuk Dr. Bakonyi Tamás kutatócsoportjával, akik a Nyugat Nílusház vírusának vizsgálatát végzik.

Az Usutu és Tahyna vírusok kimutatásához az RNS mintákat hármassával összevontuk, minden egyedi RNS mintából 10µl-nyit összemérve, 30µl-nyi kevert mintát kaptunk. Ezzel jelentősen redukáltuk a PCR reakciók számát. A RT-PCR reakcióhoz Tahyna- (HUBÁLEK et al. 2010.) és Usutu specifikus (BAKONYI et al. 2004.) oligonukleotid primereket használtunk. A RT-PCR reakciót QIAGEN OneStep RT-PCR Kit használatával végeztük, minden egyes 25 µl-es reakciómix 5 µl 5x buffert, 1 µl dNTP-ot, minkét primerből 25-25 pmol-nyit és 1 µl enzim mixet tartalmazott. Minden reakciómixhez 6 µl templátot adtunk az összevont RNS mintákból. A reverz-transzkripció reakciót 50°C-on 30 percig végeztük, amit egy 95°C-os 15 percen át tartó denaturációs lépés követett. A cDNS amplifikációját 40 ciklusos PCR reakcióval végeztük: denaturáció 94°C 40 sec, annealing 57°C 50 sec, extenzió 72°C 1 min, a reakciót egy 7 perces extenziós lépés zárta. Az így nyert RT-PCR reakciótermékeket felhasználtuk további nested-PCR reakciókhoz, melyekhez általunk tervezett oligonukleotid primereket használtunk. Ezek a következők voltak: TAHV-Nested-F (5' ACC CAA TTG ATA ACA ACG ATC 3'), TAHV-Nested-R (5' AGT CTG ATT CCA AAT TTC TGC 3'), illetve USUV-Nested-F (5' CAA TCA TTG AGC TGA CCT ACA 3') és USUV-Nested-R (5' GTT CTC ACA GCG TAT TTG GTT 3'). A nested-PCR reakcióhoz DiaTaq Kit-et (NAA200L) használtunk. A 25 µl-es végtérfogatú reakcióelegyek 2,5 µl templát DNS-t tartalmaztak a RT-PCR termékekből. Az alkalmazott PCR program a következő: 95°C 5 min;

40x 94°C 30sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 5 min. A nested-PCR reakció termékeit 1,5%-os agaróz gélben szeparáltuk GelGreen interkaláló festék használatával. A PCR reakciókhoz használt pozitív kontroll RNS minták vírustörzsei: USUV 939/01 – 2001-ben Bécs környékén gyűjtött feketeterigóból izolált vírustörzs; TAHV T19 – 1967-ben Murakeresztúron fogott *Culiseta annulata* szúnyogból izolált vírustörzs. Az RNS extrakció, a PCR és a PCR utáni lépések külön helyiségben zajlottak a kontamináció elkerülése érdekében.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Terepi eredmények

Terepi mintavételezésünk eredményeként 2011-ben 9429 (247 csoport) és 2012-ben 10 304 (259 csoport), összesen 19 733 nőstény szúnyogot gyűjtöttünk. A begyűjtött szúnyogfajok listáját az 1. táblázat tartalmazza. Az adatokból kitűnik, hogy az általunk vizsgált területek szúnyogfaunája több ismert mobovírus számára kompetens fajokat tartalmaz. Invazív fajok jelenlétét nem tapasztaltuk egyik vizsgálati időszakban sem, ez azonban nem jelenti azt, hogy nincsenek jelen. Terveink közt szerepel továbbiakban olyan csapdázási módszerek alkalmazása más hasonló célú kutatások nyomán (ŠEBESTA et al. 2012.; WERNER et al. 2012.), amelyekkel nagymértékben növelhetjük az invazív fajok befogásának esélyét.

1. táblázat: A vizsgálati területeken gyűjtött szúnyogfajok listája és egymáshoz viszonyított százalékos arányuk (a domináns fajokat vastagon szedve).

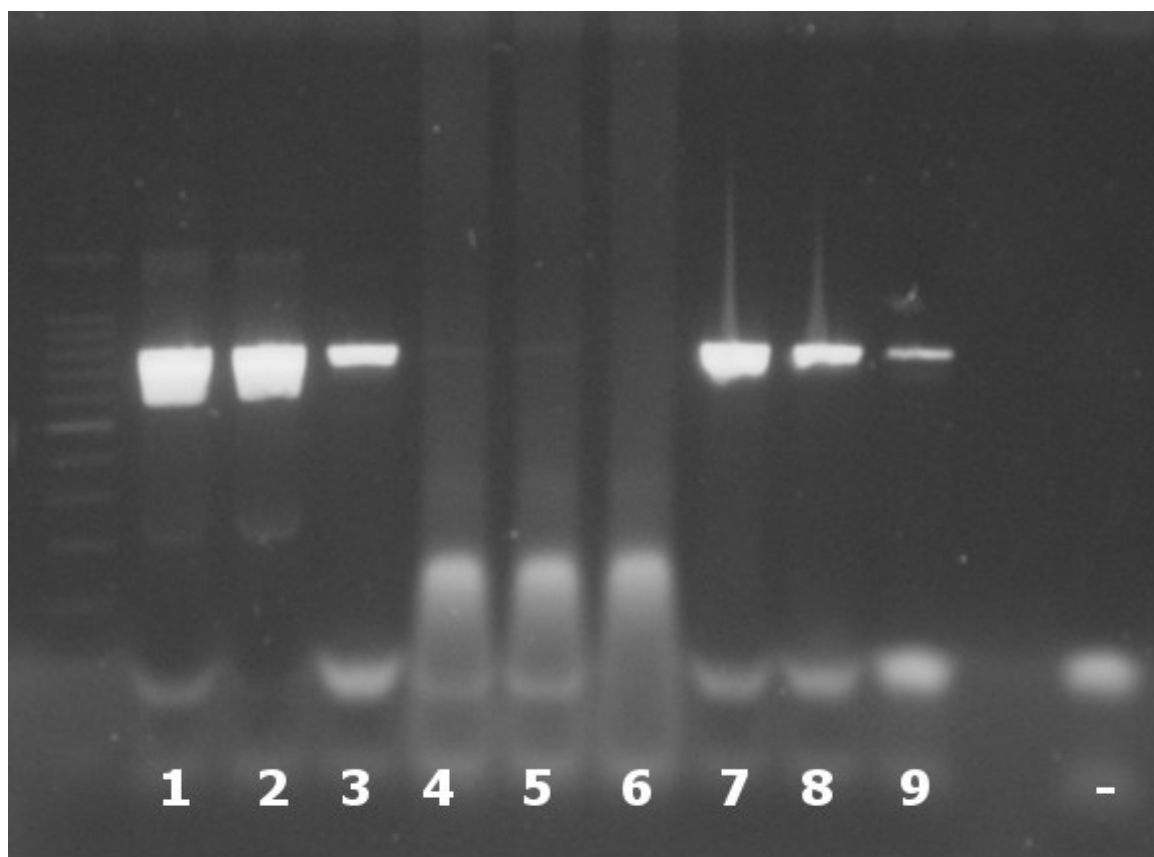
	A fajok listája és egymáshoz viszonyított százalékos arányuk			
	2011		2012	
Pellérdi láprét	<i>Aedes cinereus</i>	22,76	<i>Aedes cinereus</i>	7,45
	<i>Aedes rossicus</i>	0,58	<i>Aedes rossicus</i>	5,13
	<i>Aedes vexans</i>	46,63	<i>Aedes vexans</i>	44,05
	<i>Anopheles algeriensis</i>	0,01	<i>Anopheles algeriensis</i>	0,17
	<i>Anopheles claviger</i>	0,17	<i>Anopheles claviger</i>	0,02
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	1,22	<i>Anopheles hyrcanus</i>	2,65
	<i>Anopheles maculipennis</i>	0,90	<i>Anopheles maculipennis</i>	0,13
	<i>Anopheles plumbeus</i>	0,22	<i>Anopheles plumbeus</i>	0,10
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	1,42	<i>Coquillettidia richiardii</i>	3,62
	<i>Culex martinii</i>	0,08	<i>Culex hortensis</i>	0,02
	<i>Culex modestus</i>	0,01	<i>Culex martinii</i>	0,02
	<i>Culex pipiens</i>	0,84	<i>Culex modestus</i>	0,05
	<i>Culex territans</i>	0,07	<i>Culex pipiens</i>	0,38
	<i>Culex torrentium</i>	0,10	<i>Culiseta alaskaensis</i>	0,02
	<i>Ochlerotatus annulipes</i>	3,75	<i>Ochlerotatus annulipes</i>	1,77
	<i>Ochlerotatus cantans</i>	0,50	<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	0,08
	<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	0,04	<i>Ochlerotatus rusticus</i>	0,63
	<i>Ochlerotatus rusticus</i>	0,05	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	32,94
	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	19,52		
	<i>Uranotaenia unguiculata</i>	0,44		

Dráva ártér	<i>Aedes vexans</i>	50,14	<i>Aedes rossicus</i>	0,12
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	10,47	<i>Aedes vexans</i>	50,38
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	16,53	<i>Anopheles hyrcanus</i>	0,17
	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	22,87	<i>Coquillettidia richiardii</i>	0,12
			<i>Culex modestus</i>	0,69
			<i>Ochlerotatus rusticus</i>	0,52
			<i>Ochlerotatus sticticus</i>	47,98
Sumonyi madárgyűrűző állomás	<i>Aedes cinereus</i>	1,42	<i>Aedes cinereus</i>	1,39
	<i>Aedes vexans</i>	10,50	<i>Aedes vexans</i>	28,7
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	47,15	<i>Anopheles hyrcanus</i>	22,22
	<i>Anopheles maculipennis</i>	0,09	<i>Coquillettidia richiardii</i>	28,7
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	26,07	<i>Culex modestus</i>	4,63
	<i>Culex modestus</i>	1,07	<i>Ochlerotatus annulipes</i>	0,93
	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	13,70	<i>Ochlerotatus rusticus</i>	2,31
Mohács-Kölked dunai holtágak	<i>Aedes vexans</i>	0,32	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	11,11
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	0,32		
	<i>Anopheles maculipennis</i>	11,29		
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	0,32		
	<i>Culex modestus</i>	86,77		
	<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	0,32		
	<i>Ochlerotatus sticticus</i>	0,65		

4.2. Laboratóriumi eredmények

A molekuláris biológiában általánosan ismert tény, hogy a nukleinsav izoláció során visszamaradó szöveti eredetű nukleinsav és fehérje molekulák a PCR reakció során gátló hatást fejthetnek ki. Kísérleteinkben a virális nukleinsav extrakcióját a gyártó által (Qiagen) előírt protokollt szigorúan betartva végeztük. Tekintettel arra, hogy a víruskimutatásra használt minták igen nagy mennyiségben, több egyedtől származó szövetet tartalmaztak, nem zárhattuk ki a szövetekből származó, zavaró molekulák jelenétét. A nukleinsav kivonás után a szöveti RNS molekulák eltávolítása a tisztán virális RNS molekuláktól jelen kísérleti rendszerben nem megoldható, így módszerünket kellett a lehető legérzékenyebbre optimalizálni. Mivel igen kis mennyiségű virális RNS-t szeretnénk volna kimutatni, ki kellett zárunk az említett zavaró molekulák miatt kialakuló hamis negatív eredményeket. Módszerünk optimalizálásakor egy egyszerű kísérlettel vizsgáltuk meg molekuláris módszerünk érzékenységét. Ennek során két véletlenszerűen kiválasztott RNS mintákat szennyeztünk az általunk pozitív kontrollként használt Tahyna vírus RNS-ből készített hígítási sorral (töménység, 10^{-1} , 10^{-2}). A kísérlet eredményét az 5. számú ábra szemlélteti. Jól látszik, hogy a két minta közül az egyik esetében a vártnál gyengébb jelet kaptunk, míg a tömény kontroll minta, illetve a másik RNS minta esetében megfelelő erősségű jelintenzitást

tapasztaltunk. Kísérletünkkel, tehát igazoltuk azt a tényt, miszerint az RT-PCR reakciókat bizonyos esetben a túlzott nukleinsav és/vagy fehérje szennyeződés zavarhatja, esetleg teljesen blokkolhatja is. Mivel a vizsgált mintákban csak csekély mennyiségű virális RNS jelenlétét sejtettük, módszerünket tovább optimalizáltuk, hogy lehetőség szerint minél biztosabban ki tudjuk mutatni a vizsgált kórokozók örökítőanyagát. Ennek érdekében, egy nested-PCR rendszert terveztünk, amivel már a legkevesebb virális RNS is nagy hatékonysággal kimutatható volt, az esetleges zavaró anyagok jelenlétében is. A nested PCR során, a zavaró anyagok kihígulnak, a one-step RT-PCR során kapott – akár csekély mennyiségű – termék pedig jelentősen feldúsul a mintában. Természetesen mind az Usutu, mind pedig a Tahyna vírusok esetében elvégeztük a fent említett kísérletet, és mindkét vírus kimutatására optimalizált nested PCR rendszert dolgoztunk ki.



5. ábra Agaróz gélelektroforézis (1 – TAHV higítatlan pozitív kontroll; 2 – TAHV 10^{-1} higított pozitív kontroll; 3 – TAHV 10^{-2} higított pozitív kontroll; 4 – Első minta higítatlan TAHV pozitív kontrollal keverve; 5 – Első minta 10^{-1} higított TAHV pozitív kontrollal keverve; 6 – Első minta 10^{-2} higított TAHV pozitív kontrollal keverve; 7 – Második minta higítatlan TAHV pozitív kontrollal keverve; 8 – Második minta 10^{-1} higított TAHV pozitív kontrollal keverve; 9 – Második minta 10^{-2} higított TAHV pozitív kontrollal keverve; - Negatív kontroll

A gyűjtött szúnyogokból származó mintákkal végzett kísérleteink eredményeként, az agaróz gélelektroforézis során nem azonosítottunk kívánt méretű DNS fragmentet egyik vizsgált nested PCR reakciótermék esetében sem. A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált időszakban, az általunk vizsgált területeken nem volt kimutatható mértékű Usutu- és Tahyna vírus cirkuláció a helyi vektorállományban. Az eredmény természetesen nem zárja ki a keresett vírusok jelenlétét a területen élő gazdaszervezetekben vagy a vektorállomány elenyésző hányadában. Az ehhez hasonló kutatások azt mutatják, hogy nagy mennyiségű minta megvizsgálása során is csupán kevés esetben sikerül ezen vírusok jelenlétét igazolni a vektorpopulációban (CALZOLARI et al. 2010.; JÖST et al. 2011.; TAMBA et al. 2011.). Az eredmény nagyban függ a vizsgált mintaszámtól, a vizsgált időszak hosszától, az adott év csapadékviszonyaitól, a szúnyogok tenyészidőszakában tapasztalható hőmérsékleti értékektől és általánosságban a vektorpopuláció méretétől. A humán klinikai megbetegedések száma is jól szemlélteti az összefüggést a különböző évek csapadékviszonyai és a szúnyogok által terjesztett vírusok aktivitása közt. A Nyugat Nílusi vírus esetében évről-évre regisztrálnak hazai megbetegedéseket (OEK 2010.), melyek száma szoros korrelációt mutat a vektorpopuláció méretével.

Figyelembe véve, hogy eddigi kutatásaink során éppen olyan években gyűjtött mintákat vizsgáltunk, melyek igen rossz csapadékviszonyokkal rendelkeztek a szúnyogállomány számára, szükséges a monitorozás további folytatása a vizsgált vírusok aktivitásának pontosabb felméréséhez.

5. Összefoglalás

A növekvő mértékű globális kereskedelem és turizmus, a felmelegedés hatásaival együtt a különféle vektorok által terjesztett vírusos megbetegedések, és az azokat hordozó vektorszervezetek eddig nem tapasztalt térnyerését okozza. Egyre több olyan betegség jelenik meg Európában, melyek jelenlétét eddig csupán trópusi országokban igazolták. A vírusok terjedésében számos faktornak van szerepe, melyek közül az egyik legfontosabb a kompetens vektorszervezet jelenléte. Az elmúlt évtizedekben, Európában két invazív szúnyogfaj, az *Aedes albopictus* és az *Aedes japonicus*, valamint a hozzájuk köthető vírusos megbetegedések is megjelentek. Kiemelten fontos feladat tehát a vektorszervezetek terjedésének nyomon követése és ezzel egyidejűleg a lokális szúnyogfauna virológiai monitorozása. Az így nyert jelenlét/hiány adatok fontos információt nyújtanak a vírusok terjedési dinamikájáról, valamint hozzájárulnak a járványok prevenciójához. Hazai viszonylatban három jelentős, szúnyogok által terjesztett virális zoonózisról beszélhetünk. A Nyugat Nílusi láz vírusa, mely évről évre okoz megbetegedéseket Magyarországon, az Usutu vírus, amely agresszív térségbeli terjedési dinamikájának köszönhetően komoly fenyegetést rejt magában, illetve a Tahyna vírus, melynek kutatása hazánkban eddig kevés figyelmet kapott. Kutatásunk során létrehoztunk egy aktív monitorozási programot Baranya megyében, a közép-európai térség ismert morbovirusaira és invazív szúnyogfajaira. Terepi munkánk során olyan invazív fajok jelenlétét kutattuk, melyek a környező országokban már megjelentek és a dél-dunántúli éghajlati adottságoknak köszönhetően, ezen a területen is képesek lennének stabil populációkban fennmaradni. Invazív fajok jelenlétét nem sikerült igazolnunk, ez azonban nem bizonyítja hiányukat. Terveink közt szerepel olyan csapdázási módszerek bevezetése, melyek hatékony eszközül szolgálhatnak az invazív szúnyogfajok befogásához. Kutatásunk során 19 733 nőstény szúnyog virológiai vizsgálatát végeztük el Usutu és Tahyna vírusokra, melynek eredményeként egyik vírus jelenlétét sem sikerült igazolnunk. Vizsgálataink a pozitív eredmények hiányában is hozzájárulnak a két vírus földrajzi elterjedésének megismeréséhez, hiszen a negatív eredmény a vírusok ritkább elterjedését vagy a vizsgált időszakra vonatkozóan alacsony aktivitását sugallja a vizsgálati területen.

6. Referenciák

- ALLERING L, JÖST H, EMMERICH P, GÜNTHER S, LATTWEIN E, SCHMIDT M, SEIFRIED E, SAMBRI V, HOURFAR K, SCHMIDT-CHANASIT J. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Euro Surveill.* **2012.** 17(50)
- ANGELINI R, FINARELLI AC, ANGELINI P, PO C, PETROPULACOS K, MACINI P, FIORENTINI C, FORTUNA C, VENTURI G, ROMI R, MAJORI G, NICOLETTI L, REZZA G, CASSONE A. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill.* **2007**;12(36) Elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3260>
- BAKONYI T, ERDELYI K, URSU K, FERENCZI E, CSORGO T, LUSSY H, CHVALA S, BUKOVSKY C, MEISTER T, WEISSENBOCK H, NOWOTNY N. Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol* **2007.** 45 (12): 3870-3874.
- BAKONYI T, E A GOULD, J KOLODZIEJEK, H WEISSENBOCK, N NOWOTNY. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* **2004.** 328: 301-310.
- BÁRDOS V, DANIELOVÁ V. The Tahyna virus – a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **1959.** 3:264-276
- BÁRDOS V. Recent state of knowledge of Tahyna virus infections. *Folia Parasitol (Praha)* **1974.** 21(1):1-10.
- BECKER N, D PETRIC, C BOASE, J LANE, M ZGOMBA, C H DAHL, A KAISER. Mosquitoes and their control. *Kluwer Academic/Plenum Publisher*, New York. **2003.**
- BECKER N, JOST H, ZIEGLER U, EIDEN M, HOPER D, EMMERICH P, FICHET-CALVET E, EHICHIOYA D U, CZAJKA C, GABRIEL M, HOFFMANN B, BEER M, TENNER-RACZ K, RACZ P, GUNTHER S, WINK M, BOSCH S, KONRAD A, PFEFFER M, GROSCHUP M H, SCHMIDT-CHANASIT, J. Epizootic Emergence of Usutu Virus in Wild and Captive Birds in Germany. *PLoS ONE* **2012.** 7(2):32604
- CALZOLARI M, BONILAUDI P, BELLINI R, CAIMI M, DEFILIPPO F, MAIOLI G, ALBIERI A, MEDICI A, VERONESI R, PILANI R, GELATI A, ANGELINI P, PARCO V, FABBİ M, BARBIERI I, LELLI D, LAVAZZA A, CORDIOLI P, DOTTORI M. Arboviral survey of mosquitoes in two northern Italian regions in 2007 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010.** 10(9):875-84.
- CAMINADE C, MEDLOCK J M, DUCHEYNE E, MCINTYRE K M, LEACH S, BAYLIS M, MORSE A P. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface* **2012.** 9(75): 2708-2717.
- CAVRINI F, GAIBANI P, LONGO G, PIERRO AM, ROSSINI G, BONILAUDI P, GERUNDA GE, DI BENEDETTO F, PASETTO A, GIRARDIS M, DOTTORI M, LANDINI MP, SAMBRI V. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009 . *Euro Surveill.* **2009.** 14(50)

DANIS K, PAPA A, THEOCHAROPOULOS G, DOUGAS G, ATHANASIOU M, DETSIS M, BAKA A, LYTRAS T, MELLOU K, BONOVAS S, PANAGIOTOPOULOS T. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* **2011**. 17(10)1868-72.

ECDC: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx

FERENCZI E. Flavivírus nemzetség. In: Klinikai és Járványügyi Viroológia. *Vox Medicina Kiadói Kft. Veszprém* **2010**. pp: 261-269.

GAUTRET P, CRAMER JP, FIELD V, CAUMES E, JENSENIUS M, GKRIANIA-KLOTSAS E, DE VRIES PJ, GROBUSCH MP, LOPEZ-VELEZ R, CASTELLI F, SCHLAGENHAUF P, HERVIUS ASKLING H, VON SONNENBURG F, LALLOO DG, LOUTAN L, RAPP C, BASTO F, SANTOS O'CONNOR F, WELD L, PAROLA P, for the EuroTravNet Network. Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill.* **2012**. 17(26)20205

GJENERO-MARGAN I, ALERAJ B, KRAJCAR D, LESNIKAR V, KLOBUČAR A, PEM-NOVOSEL I, KUREČIĆ-FILIPOVIĆ S, KOMPARAK S, MARTIĆ R, ĐURIČIĆ S, BETICA-RADIĆ L, OKMADŽIĆ J, VILIBIĆ-ČAVLEK T, BABIĆ-ERCEG A, TURKOVIĆ B, AVŠIĆ-ŽUPANC T, RADIĆ I, LJUBIĆ M, ŠARAC K, BENIĆ N, MLINARIĆ-GALINOVIĆ G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* **2011**;16(9)
Elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>

GRIFFIN D.E. Alphaviruses In: Knipe, D.M., Howely P.M., eds. *Fields Virology 5th Edition*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, **2007**. pp. 1023-1067.

HALL-MENDELIN S, RITCHIE SCOTT A, JOHANSEN CHERYL A, ZBOROWSKI PAUL, CORTIS GILES, DANDRIDGE SCOTT, HALL ROY A, ANDREW F. VAN DEN HURK. Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-borne pathogens. *PNAS Early Edition* **2010**. 107 (25) 11255-59

HUBÁLEK Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* **2008**. 103:S29-S43

HUBÁLEK Z, HALOUZKA J. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* **1999**. 5:643–50.

HUBÁLEK Z, BARDOS V, MEDEK M, KANIA V, KYCHLER L, JELINEK E. Tahyna virus -- neutralizing antibodies of patients in southern Moravia. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* **1979**. 28:87-96.

HUBÁLEK Z, ZEMAN P, HALOUZKA J, JURICOVÁ Z, STOVICKOVÁ E, BÁLKOVÁ H, SIKUTOVÁ S, RUDOLF I. Mosquitoborne Viruses, Czech Republic, 2002. *Emerging Infectious Diseases* **2005**. Vol.11. No.1.

HUBÁLEK Z, RUDOLF I, BAKONYI T, KAZDOVÁ K, HALOUZKA J, SEBESTA O, SIKUTOVÁ S, JURICOVÁ Z, NOWOTNY N. Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and Tahyna viruses in Central Europe. *J Med Entomol.* **2010**. 47(3):466-72.

HUBÁLEK Z, RUDOLF I, CAPEK M, BAKONYI T, BETASOVA L, NOWOTNY N. Usutu Virus in Blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011-2012. *Transbound Emerg Dis* **2012**.

ISSG (INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP) 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. Elérhető: <http://www.issg.org/database/species/search.asp?st=100ss>

JÖST HANNA, ALEXANDRA BIALONSKI, DEBORAH MAUS, VITTORIO SAMBRI, MARTIN EIDEN, MARTIN H. GROSCUP, STEPHAN GÜNTHER, NORBERT BECKER, JONAS SCHMIDT-CHANASIT. Isolation of Usutu Virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg* **2011**. 85(3):551-553

KALLIO-KOKKO H, UZCATEGUI N, VAPALAHTI O, VAHERI A. Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiol Rev* **2005**. 29(5): 1051-1077.

KAZDOVÁ K, HUBÁLEK Z. Examination of mosquitoes collected in southern Moravia in 2006-2008 tested for arboviruses. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. **2010**. 59(3):107-11.

KENYERES Z., TÓTH S. Csipőszúnyog határozó II. *Pannónia Központ Szakértői és Tanácsadói Koordinációs Kft. Keszthely* **2008**. ISBN 978 963 06 2308 7

KILPATRICK A M. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* **2011**. 334 (6054) 323-7

KOSTYUKOV MA, ALEKSEEV AN, BULYCHEV VP, GORDEEVA ZE. Experimental infection of *Culex pipiens* mosquitoes with West Nile virus by feeding on infected *Rana ridibunda* frogs and its subsequent transmission. *Med Parazitol* **1986**. (6) 76-78.

LUPULOVIC D, MARTIN-ACEBES M A, LAZIC S, ALONSO-PADILLA J, BLAZQUEZ A B, ESCRIBANO-ROMERO E, PETROVIC T, SAIZ J C. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2011**. 11(9) 1303-5

MADIC JOSIP, HUBER DJURO, LUGOVIC BRANKO. Serologic survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases* **1993**. 29(4) 572-576.

MANAROLLA G, BAKONYI T, GALLAZZ, D, CROSTA L, WEISSENBOCK H, DORRESTEIN G M, NOWOTNY N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol* **2010**. 141 (1-2): 159-163.

MEDLOCK JOLYON M, HANSFORD KAYLEIGH M, SCHAFFNER FRANCIS, VERSTEIRT VEERLE, HENDRICKX GUY, ZELLER HERVE, BORTEL VAN WIM. A review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **2012**. Vol.12. Num.6.

MOLNÁR E. Occurrence of tick-borne encephalitis and other arboviruses in Hungary. *Geogr Med*. **1982**. 12:78-120.

| OEK (Országos Epidemiológiai Központ). Az Országos Epidemiológiai Központ tájékoztatója a nyugat-nílusi lázról. Budapest, 2010.09.03.
Elérhető: <http://www.oek.hu/oek.web?to=1828&nid=931&pid=1&lang=hun>

PAUPY C, DELATTE H, BAGNY L, CORBEL V, FONTENILLE D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection* **2009**. 11:1177-1185.

- PECORARI M, LONGO G, GENNARI W, GROTTOLA A, SABBATINI AM, TAGLIAZUCCHI S, SAVINI G, MONACO F, SIMONE ML, LELLI R, RUMPIANESI F. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* **2009**;14(50)
- PELETTO S, LO PRESTI A, MODESTO P, CELLA E, ACUTIS P L, FARCHI F, CIOTTI M, ZEHENDER G, CICCOCCHI M. Genetic diversity of Usutu virus. *New Microbiol* **2012**. 35 (2):167-174.
- SAVINI G, MONACO F, TERREGINO C, DI GENNARO A, BANO L, PINONI C, DE NARDI R, BONILAUDI P, PECORARI M, DI GIALLEONARDO L, BONFANTI L, POLCI A, CALISTRI P, LELLI R. Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Vet Microbiol* **2011**. 151(3-4): 264-274.
- ŠEBESTA O, RUDOLF I, BETÁŠOVÁ L, PEŠKO J, HUBÁLEK Z. An invasive mosquito species *Aedes albopictus* found in the Czech Republic, 2012. *Euro Surveill.* **2012**. 17(43).
Elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20301>
- SCHAFFNER F, CHOUIN S, GUILLOTEAU J. First record of *Ochlerotatus* (Finlaya) *japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *J Am Mosq Control Assoc* **2003**. Vol 19. (1)1-5.
- SCHAFFNER F, KAUFMANN C, HEGGLIN D., MATHIS A. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Med Vet Entomol* **2009**. Vol. 23 (4) 448-51.
- SMITHBURN KC, HUGHES TP, BURKE AW, PAUL JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* **1940**. 20: 471-92.
- STEINMETZ H W, BAKONYI T, WEISSENBOCK H, HATT J M, EULENBERGER U, ROBERT N, HOOP R, NOWOTNY N. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland--genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol* **2011**. 148 (2-4):207-212.
- TAMBA M, BONILAUDI P, BELLINI R, CALZOLARI M, ALBIERI A, SAMBRI V, DOTTORI M, ANGELINI P. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2011**. 11(5): 551-557.
- TOTH S. Magyarország csípőszúnyog faunája. *Nat. Somogy.* 6. **2004**. ISBN 963 7212 43 4
- TSAI T F, POPOVICI F, CERNESCU C, CAMPBELL G L, NEDELCU N I. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **1998**. 352(9130)767-71.
- VALERIO L, MARINI F, BONGIORNO G. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* in urban and rural contexts within Rome Province, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2009**. 10:291-294.
- VÁZQUEZ A, JIMÉNEZ-CLAVERO MA, FRANCO L, DONOSO-MANTKE O, SAMBRI V, NIEDRIG M, ZELLER H, TENORIO A. Usutu virus – potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* **2011**;16(31)
Elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19935>

- VERSTEIRT V, SCHAFFNER F, GARROS C, DEKONINCK W, COOSEMANS M, VAN BORTEL W. Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J Med Entomol* **2009**. Vol. 46 (6) 1464-7.
- WEISSENBOCK H; CHVALA-MANNSBERGER S; BAKONYI T; NOWOTNY N. Emergence of Usutu virus in Central Europe: diagnosis, surveillance and epizootiology In: Takken W; Knols BGJ [Hrsg.]: Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. *Wageningen, Wageningen Academic Publishers*, **2007**. pp. 153-168. ISBN: 978-90-8686-053-1.
- WEISSENBOCK H, KOLODZIEJEK J, URL A, LUSSY H, REBEL-BAUDER B, NOWOTNY N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* **2002**. 8(7):652-656
- WERNER D, KRONEFELD M, SCHAFFNER F, KAMPEN H. Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Euro Surveill.* **2012**. 17(4)20067.
Elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20067>
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) <http://www.who.int/zoonoses/en/>
- WILLIAMS MC, SIMPSON DI, HADDOW AJ, KNIGHT EM. The isolation of West Nile Virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda. *Ann Trop Med Parasitol.* **1964**;58:367-74

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Jakab Ferencnek a munkámhoz nyújtott szakmai támogatásért és a laboratóriumi háttér biztosításáért, továbbá a Virologiai Kutatócsoport összes tagjának, Dallos Biankának, Dóró Renátának, Madai Mónikának, Németh Viktóriának, Pintér Rékának és Oldal Miklósnak a támogatásukért.

További köszönet illeti Dr. Bakonyi Tamást, aki vizsgálatainkhoz biztosította a Tahyna és Usutu pozitív kontroll RNS mintákat.

8. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott **KEMENESI GÁBOR** a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- terepi mintavételezést
- a minták morfológiai meghatározását
- homogenizációt, virális RNS extrakcióját
- RT-PCR és nested PCR reakciókat
- agaróz gélelektroforázist

végeztem el.

.....
aláírás

Pécs, 2013 január 09.