

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

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A nyugat-nílusi láz vírusának rezervoár fajai

Készítette: Iván Livia, V. évfolyamos állatorvostan hallgató

SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Bakonyi Tamás
egyetemi docens

Budapest

Lezárás dátuma: 2013. 11. 04.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
Bevezetés	3
1. Irodalmi áttekintés	3
1.1. A nyugat-nílusi láz előfordulása világszerte	3
1.2. A nyugat-nílusi láz hazai előfordulása	5
1.3. A vírus genetikai vonalai.....	6
1.4. Kóroktan.....	9
1.5. Járványtan.....	9
1.6. Klinikai tünetek	11
2. Anyag és módszer.....	11
2.1. Vizsgálati anyagok.....	11
2.2. Minták előkészítése.....	12
2.3. RNS izolálás, Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)	13
2.4. Agarózgél-elektroforézis	14
2.5. Szerológiai vizsgálat	14
3. Eredmények.....	16
4. Megbeszélés	21
5. Összefoglalás.....	26
6. Summary	27
7. Irodalomjegyzék	28
8. Köszönetnyilvánítás.....	32
9. Mellékletek.....	33

Rövidítések jegyzéke

Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság	ÁDI
dezoxi-nukleotid trifoszfát	dNTPS
„E” glycoprotein	pr-E
enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Japán encephalitis vírus	JEV
Koutango vírus	KOUV
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal	NÉBIH
optikai denzitás.....	OD
reverz transzkripció polimeráz láncreakció	RT-PCR
Saint Louis encephalitis	SLE
Trisz-acetát EDTA	TAE
West Nile vírus	WNV

Bevezetés

A nyugat-nílusi láz kórokozója a japán encephalitis vírus (JEV) komplex világszerte legelterjedtebb tagja. A *Flaviviridae* családba, ezen belül a *Flavivirus* nemzetséghez tartozik. A nyugat-nílusi láz zoonotikus betegség. A kórokozó vektorai szúnyogok, leginkább a *Culex* nemzetségbe tartozó fajok; gerinces rezervoár fajai különböző vadmadarak.

Hazánkban a nyugat-nílusi láz vírusa 2003 óta okoz diagnosztizált megbetegedéseket vadmadarakban, ludakban, juhban, lovakban, és emberekben. Az eddigi kutatások azt mutatták, hogy a 2004-ben felbukkant, kettes genetikai vonalhoz tartozó vírustörzs fordul elő az országban.

E kutatás célja meghatározni, hogy mely vadmadárfajok vehetnek részt a WNV fenntartásában és terjesztésében. Vizsgálataink során 2011 és 2013 között a hazai vadmadarak aktív és passzív monitorozását végeztük. Az aktív monitoring során élő állatokból vettünk mintát, a passzív során valamely okból elhullott egyedeket vizsgáltunk. A kutatásba beletartozott a monitoring hatékonyságának a felmérése is, illetve a nem vektoriális terjedés jelentőségének vizsgálata.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A nyugat-nílusi láz előfordulása világszerte

A nyugat-nílusi láz kórokozója, a nyugat nílusi vírus (West Nile virus, WNV) világszerte széles körben elterjedt. Előfordul Afrikában, Európában, Ázsiában, és Ausztráliában. A XX. század végén felbukkant Észak Amerikában és napjainkra elterjedt az amerikai kontinenseken is.

A kórokozót először 1937-ben sikerült kimutatni egy emberi megbetegedés során Uganda nyugat-nílusi térségében (Smithburn et al., 1940). Egyiptomban az 1950-es évek óta rendszeresen sikerült izolálni a kórokozót madarakból, szúnyogokból és humán betegekből (Taylor et al., 1956). 1975 és 1993 között azonban alig került dokumentációra nyugat-nílusi lázban komolyabb megbetegedett eset. Ezzel szemben 1994-től napjainkig a kórokozó világszerte jelentős megbetegedéseket okozott (Campbell et al., 2002).

Az USA-ban először 1999-ben New Yorkban izolálták, ekkor 59 személy került kórházba meningoencephalitis tüneteivel. A vírus nemsokára egész Észak-Amerikában

elterjedt. 1999 és 2001 között 149 humán megbetegedésről számoltak be, melyből 18 halálos kimenetelű volt (Zeller és Schuffenecker, 2004).

A New York-i esettel egy időben Oroszországban is megjelent a vírus (Platonov, 2001). Európában először 1958-ban mutattak ki a vírus ellen képződött ellenanyagokat két albán személy véréből (Bárdos, 1959). Magát a kórokozót 1963-ban sikerült izolálni betegekből és szúnyogokból a Rhône Delta vidékén (Hannoun et al., 1964). Eddig az egyik legjelentősebb járványát Romániában, Bukarestben és környékén okozta, ekkor több mint 500 ember betegedett meg, és sok volt a halálos áldozat (10%) (Tsai et al., 1998).

Napjainkig Európa szinte számos országban kimutatták a vírus jelenlétét: Franciaországban, Oroszországban, Spanyolországban, Romániában, Fehéroroszországban, Ukrajnában, Csehországban, Moldovában, Portugáliában, Szlovákiában, Ausztriában, és nem utolsósorban Magyarországon is (Hubálek és Halouzka, 1999). 2008-ban jelentős megbetegedéseket észleltek Olaszországban, Franciaországban, Romániában és Ausztriában. Az olaszországi fertőzés lovakat és embereket is érintett (Monaco et al., 2010). Ausztriában augusztusban számos vadmadárból sikerült kimutatni a kórokozót, annak ellenére, hogy az országban korábban sosem okozott megbetegedéseket a nyugat-nílusi láz vírusa (Bakonyi et al., 2013).

Izraelben először az 1950-es években mutatták ki a kórokozót. 1997-ben a WNV jelentős megbetegedést okozott fiatal ludakban (Guy és Malkinson, 2003). Az állományban magas volt a morbiditás (20-60%), a megbetegedett madarak jelentős része elpusztult. A ludak nagy többsége 3-8. élethetében járt. Az ország területén 1998-ban szokatlanul magas mortalitással járó nyugat-nílusi vírus okozta járványkitörést írtak le, amely vonuló ludakat (*Anser anser*) és gólyákat (*Ciconia ciconia*) érintett (Zeller és Schuffenecker, 2004). Ezek a gólyák azonban még Közép-Európában keltek ki, és valószínűleg az őszi viharos szelek sodorták el őket őszi vonulásuk során Izraelbe. 1997 és 2001 között, főleg augusztus közepe és november vége között is számos megbetegedést regisztráltak a régióban. A megbetegedések olyan lúdállományokat érintettek, amelyeket szabad tartásban neveltek, ennek következtében gyakrabban érthette őket szúnyog vektorok csípése. (Guy és Malkinson, 2003).

1.2. A nyugat-nílusi láz hazai előfordulása

A vírus előfordulását már harminc évvel a klinikai megjelenése előtt is sikerült igazolni Magyarországon, ekkor erdei rágcsálókból mutatták ki Veszprém megyében és az Ipoly mentén (Molnár et al., 1979).

A kórokozó egészen 2003-ig nem okozott klinikai megbetegedéseket hazánkban, annak ellenére, hogy a szomszédos Romániában ez többször is előfordult (1996, 1997). 2003-ban késő nyáron észlelték egy házi lúdállomány (*Anser anser domesticus*) megbetegedését. A madarak encephalitis tüneteit mutatták. Testtömegük csökkent, és változatos idegrendszeri elváltozásokat mutattak, úgymint torticollist, opisthotomust és paralyssist. Főleg a fiatal, 6 hetes egyedek betegedtek meg, jelentős volt az elhullás (14%). A kórszövettani, szerológiai vizsgálatok és a nukleinsav-kimutatás (RT-PCR) a nyugat-nílusi láz jelenlétét igazolta (Glávits et al., 2005). A kimutatott vírustörzs genetikailag az 1998-ban Izraelben, és 1999-ben az USA-ban megjelent vírustörzsekkel mutatott rokonságot (1-es genetikai vonalhoz tartozó törzs, Lineage 1) (Bakonyi et al., 2005). Ugyanebben az évben jegyezték fel az első humán eseteket is Magyarországon: a lúdállományt tartó család betegedett meg, mivel a mindennapi munka során közel kerültek a fertőzött madarakhoz és a környékükön élő ízeltlábú vektorokhoz. A fertőzést szerológiai vizsgálatokkal sikerült igazolni a betegség lefolyása után több hónappal. A család enyhe klinikai tünetekkel vészelte át a kórt (rosszullét, étvágytalanság, izomfájdalom, fejfájás) (Glávits et al., 2005).

Egy évvel később, 2004-ben, a Körös-Maros Nemzeti Park területén találtak két idegrendszeri tüneteket mutató héját (*Accipiter gentilis*). Egyiküknek sikerült átvészelnie a betegséget, az elhullott agyvelőmintájából pedig kórszövettani vizsgálattal és RT-PCR-rel kimutatták a vírust (Bakonyi et al., 2006).

2005-ben, szintén a Körös-Maros Nemzeti Park területén további fertőzött madarakat, pontosabban három héját (*Accipiter gentilis*) és két karvalyt (*Accipiter nisus*) találtak, melyekből ki tudták mutatni a vírust. Az öt madárból két héja és az egyik karvaly belepusztult a fertőzésbe (Bakonyi et al., 2006). Ugyanez év őszén egy négy éves anyajuh idegrendszeri tüneteket mutatott, és négy nap múlva el is pusztult. A juhállományt 75 anyajuh és 5 kos alkotta, a fent említett állaton kívül más megbetegedést nem tapasztaltak. Az elhullott állatból mintavételezés történt. Az agyvelőből kivont mintát sejtenyészetben izolálták. Az izolátumból RT-PCR-rel azonosították a nyugat-nílusi láz vírusát (Kecskeméti et al., 2007). A 2004/5-ös eseteket okozó vírustörzs azonban a 2003-assal ellentétben a 2-es genetikai vonalhoz

tartozott, amely genetikai vonal tagjai korábban csak Afrika Szaharától délre eső területein fordultak elő (Bakonyi et al., 2006).

2007-ben és 2008-ban lovakból, madarakból és humán betegekből sikerült kimutatni a vírusfertőzést. Egy passzív monitorozási program során összesen 91, 33 különböző fajba tartozó, elhullott vadmadarat vizsgáltak meg RT-PCR-rel. Összesen 26 egyed bizonyult pozitívnak, amelyből 18 héja (*Accipiter gentilis*) volt (Barna, 2010). Szerológiai módszerekkel megvizsgálták 27 ló savó- és liquormintáit, melyből 12 bizonyult pozitívnak (Bakonyi et al., 2013). A monitorozás 2009-ben tovább folytatódott, ekkor 118 madarat vizsgáltak meg, melyből 17 bizonyult pozitívnak (Barna, 2010), illetve 276 vizsgált lóból 79. 2008/9-ben összesen 33 humán megbetegedésről számoltak be (Bakonyi et al., 2013).

Mindemellett, Dévaványai Tűzokmentő Állomáson nevelt tűzokokból többször (2006-ban, 2009-ben és 2011-ben) vért vettek szerológiai vizsgálat céljából. A madarak mind klinikailag egészséges, kiengedés előtt álló fiatal tűzokok voltak. A mintákból madárinfluenza-, baromfipestis-, orthoreovírus- és nyugat-nílusi láz-fertőzöttséget vizsgáltak. Az eredmények minden esetben negatívak lettek az első három betegséget illetően, azonban mindhárom évben több madár bizonyult nyugat-nílusi láz szeropozitívnak (Sós et al., 2012). 2006-ban 7 egyedből 2-ből, 2009-ben mind a kilencből, 2011-ben 11 egyedből 3-ból sikerült kimutatni a vírus ellenanyagát.

1.3. A vírus genetikai vonalai

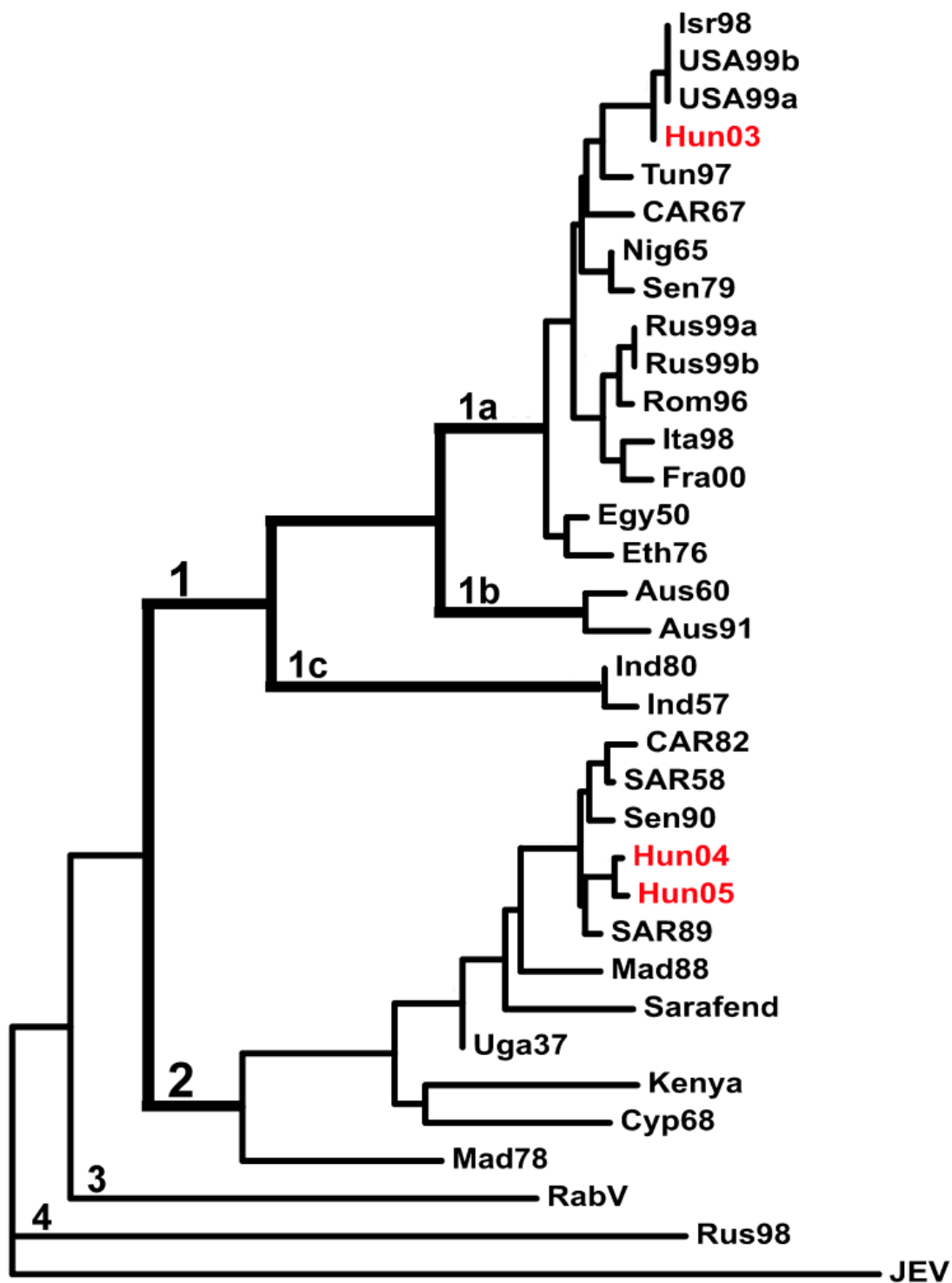
A nyugat-nílusi vírus törzsei nagyfokú genetikai változatosságot mutatnak (Berthet et al., 1997). A törzseket két fő és számos kisebb genetikai vonalhoz sorolták (1. ábra).

Az 1-es genetikai vonal ezen belül három fő csoportra osztható, egyrészt genetikai, másrészt földrajzi elterjedési okokból. Az „A” csoport tagjai Európában, Közép-Keleten, Ázsiában és Amerikában fordulnak elő. A „B” Ausztráliában, ezt nevezik Kunji törzsnek is. A harmadik, „C” csoport Indiában fordul elő (Lanciotti et al., 2002).

A 2-es genetikai vonalhoz tartozik többek között az elsőként izolált nyugat-nílusi vírustörzs (B956). Ez a genetikai vonal eredetileg csak Közép-és Dél-Afrika területén fordult elő. 1968-ban kimutattak ugyan cipruson egy 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírust egy egészséges, vonuló madárból, ez azonban nem bizonyult neuroinvazívnak. Idegrendszeri tüneteket is okozó és ebbe a genetikai vonalba tartozó vírus Európában először Magyarországon bukkant fel 2004-ben. Az azóta végzett vizsgálatok során hazánkban kizárólag 2-es vonalhoz tartozó WNV-t mutattak ki. A 2003-as, 1-es vonalhoz tartozó vírusnak valószínűleg nem sikerült áttelelnie (Bakonyi et al., 2006).

A fent említett két fő vonalon kívül öt további genetikai vonalat különböztetnek meg; ezek azonban, bár WNV vírusok, genetikailag kevésbé hasonlatosak az 1-es és 2-es vonalhoz. Felmerült az is, hogy nem WNV vírusok, csupán a japán encephalitis víruskomplex tagjai (Bakonyi et al., 2005). A 3-as vonalat (Rabensburg vírus) szúnyogokból izolálták a cseh-osztrák határ környékén. A 4-es vonalat a Kaukázus környékén írták le kullancsokból. További két vírustörzsről sikerült megállapítani, hogy valamelyest rokonságot mutatnak a nyugat-nílusi vírussal, de egyik eddig leírt lineage-el sem állnak közeli filogenetikai kapcsolatban. Ezek közül az egyik a malajziai KUN MP502–66 vírus, a másik az afrikai Koutango vírus (KOUV). Az ötödik törzset 2006-ban izolálták Spanyolországban egy nőstény *Culex pipiens* szúnyogból (Vázquez et al., 2010).

A WNV törzsek jelentősen eltérnek virulenciájukat illetően. Korábban csak az 1-es genetikai vonal egyes törzseiről mutatták ki, hogy azok neuroinvazívak, és a 2-es vonalhoz tartozó törzseket kevésbé virulensnek tartották. Nemrégiben azonban Afrika területén számos, igen virulens, neuroinvazív tulajdonságokkal rendelkező 2-es vonalhoz tartozó törzset azonosítottak. A 2004-ben Magyarországon felbukkant törzs is gyakran okozott idegrendszeri megbetegedéseket. Ugyanakkor az emberi megbetegedések számában és súlyosságában jelentős eltéréseket figyeltek meg. Hazánkban eddig csupán egyetlen halálos kimenetelű emberi WNV fertőzést igazoltak. A vírustörzs 2010-ben felbukkant Görögországban is, ahol viszont 191 emberi megbetegedést és 32 halálos esetet regisztráltak (Papa et al., 2011).



1. ábra: A nyugat-nílusi vírusok filogenetikai kapcsolata. A három betűs rövidítések az egyes országokat, illetve városokat jelölik, ahonnan az adott törzset kimutatták. A betűk után következő számok az adott vírustörzs első kimutatásának évét adják meg (Bakonyi et al., 2006; Barna, 2010)

1.4. Kóroktan

A nyugat-nílusi vírus a japán encephalitis vírus komplexbe tartozik. Ennélfogva közeli rokonságban áll a Murray-völgyi encephalitis és a Saint Louis encephalitis (SLE) vírusaival. Örökítő anyaga lineáris, pozitív irányítottágú, egyszálú RNS, genomja körülbelül 11 000 nukleotidból épül fel (Campbell et al., 2002). Ikozaéder szimmetriájú kapsziddal rendelkezik, kb. 40-60 nm átmérőjű. A vírust a környezeti hatásokra érzékeny lipidburok veszi körül. Ebbe ágyazottan található a fő „E” (envelope) glycoprotein (pr-E), amely a sejtreceptorhoz való kötődésért felel, illetve egy kisebb méretű, „M” (membrán) glycoprotein. (Kanai et al., 2006). A vírus genomja egy 5’ nem kódoló régióval kezdődik, mely körülbelül 100 nukleotidot tartalmaz. Ezt egy nyitott leolvasási keret követi, amely három strukturális vírusfehérjét (kapszid-membrán-burok) és hét nem strukturális fehérjét kódol (NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5), majd a sort a 3’ nem kódoló, körülbelül 600 nukleotidot tartalmazó régió zárja (Campbell et al., 2002). A receptorhoz való kötődést követően a vírus endocytosis segítségével behatol a sejtbe, lipidmembránja fuzionál az endoszómával, és így örökítő anyaga a citoplazmába kerül. Itt történik a replikáció, majd a víruspartikulumok összeépülése, míg végül a vírus kiszabadul a sejtéből, és új ciklusba kezd.

Az E és az M fehérjék a vírus lényeges tulajdonságait határozzák meg, mint például a gazdaspektrumot, felelősek a T-és B-sejtek stimulálásáért és az immunválasz kialakításáért, illetve a vírus replikációjáért és az összeépülésért (Campbell et al., 2002).

1.5. Járványtan

A nyugat-nílusi láz vírusának legfőbb terjesztői a szúnyogok, több mint 60 fajból kimutatták (Sárdi et al., 2012). Ezen belül Európában és Észak-Amerikában legjelentősebb a *Culex* nemzetségbe tartozó *Culex pipiens* (Zeller és Schuffenecker, 2004).

A vírus természetes ciklusa során a fertőzött vért szívott szúnyog bélhámsejtjeiben aktívan elszaporodik, majd a haemolympha útján többek közt a rovar nyálmirigyében telepszik meg, és a vérszívás során innen kerül át az esetek többségében az elsődleges gazdába. Ez általában valamilyen vadmadarat jelent. Magyarországon az eddigi kutatások alapján főleg a ragadozó madarak érzékenyek a vírusra, míg Amerikában leggyakrabban a varjak és a kék szajkók elhullásait okozta (Komar et al., 2003). A vírus a szervezetbe kerülve viraemiát okoz, amely esetenként igen sokáig (20-100 napig) eltarthat úgy, hogy az állat eközben nem mutat klinikai tüneteket. Ezzel magyarázható a vírus terjedése, hiszen a vándorló, vírusfertőzött vadmadarak igen nagy távolságokra képesek szállítani a kórokozót. A viraemia során a vírus eljut az idegrendszerbe, ahol az idegsejtek apoptosist és gyulladást okoz.

folyamatokat okozhat. A vérben az ellenanyagok kb. a 7-11. napon jelennek meg. A madarak egy része átvészeli a fertőzést, és élete végéig szeropozitív marad, másik része azonban elpusztul, így a vírus egyes védett madárfajokat is veszélyeztethet. A madarakon kívül a vírus különféle emlősfajokban is előfordul, úgymint kistrágcásákban, juhokban, lovakban és az emberben is. Ebben az esetben változó mértékben betegítheti meg az adott egyedet (legjelentősebb ilyen szempontból a ló és az ember), azonban nem képes olyan szintű és hosszan tartó viraemiát kialakítani, mint madarakban, ezért ezek az alkalmi gazdafajok nem képesek tovább fertőzni a szúnyogokat.

A nyugat-nílusi láz vírusának terjedését nagymértékben az időjárás is befolyásolja. Mivel a szúnyogoknak fejlődésükhöz vízre van szükség, ezért a csapadékosabb években gyakoribb a fertőzés. Ez történt hazánkban a 2005-ben, amikor a csapadékos tél és tavasz jelentős árvizeket eredményezett. Mivel ebben az évben nyáron is sokat esett az eső, a megemelkedett vízszintek hatására a vektor szúnyogfajok nagy mértékben el tudtak szaporodni (Bakonyi et al., 2006). A megbetegedések ezen túl szezonalitást is mutatnak, főleg nyár végén és ősszel lehet találkozni nyugat-nílusi lázzal Magyarországon (Bakonyi et al., 2013). Mocsaras, vizes élőhelyek környékén gyakoribb a vírusfertőzés, és a fertőzési gócpontok általában itt alakulnak ki. A vírus terjedésének legaktívabb időszaka a meleg nyári hónapok. Egyrészt nagyobb melegben a szúnyogok szaporodási ciklusa. Másrészt ilyenkor a vírus gyorsabban képes fejlődni a vektorban. A gyorsabb fejlődéssel a vírusnak megnő az esélye, hogy idejében elérje a fertőzőképes állapotot, amikor a szúnyog még javában vért szív, így biztosítva a terjedést (Epstein, 2001).

A szúnyogok segítette terjedés mellett előfordulhat a kórokozó nem vektoriális átvitele is. Az amerikai járvány során leírtak humán fertőződéseket, melyek vérátömlesztés, szervátültetés, méhen keresztül, illetve szoptatás útján mentek végbe (Sárdi et al., 2012). Emiatt már hazánkban is előfordult, hogy korlátozták a véradást. Emellett felmerült, hogy a ragadozó madarak szájon át is fertőződhetnek abban az esetben, ha az általuk elfogyasztott préda WNV fertőzött volt, és nagy mennyiségben tartalmazta a vírust. Ez esetben a predáció során a ragadozó madár nyálkahártya-sérülésein keresztül is bejuthat a vírus, és fertőzést okozhat.

1.6. Klinikai tünetek

Madaraknál a vírus főleg a fiatal egyedekben képes súlyos klinikai tüneteket, esetenként elhullást okozni. A fertőzött madaraknál meningoencephalitis alakul ki, ennek következtében többek között ataxia, opisthotonus, torticollis és paralysis figyelhető meg. Az állatok testtömege csökken, általános állapota romlik. Egyes esetekben előfordulhat tünetmentes fertőzés is (Glávits et al., 2005).

Lovaknál szintén az idegrendszeri tünetek dominálnak, klinikai megbetegedés azonban ritkán fordul elő, az állatok nagy része (90%) tünetmentesen vészeli át a fertőzést (Sárdi et al. 2012). A megbetegedett egyedekben a viraemia során meningoencephalitis alakul ki, amely klinikailag paralysissel (főleg a hátsó végtagon), ataxiával, gyengeséggel és hyperaesthesiával jár. Az ilyen lovak körülbelül 30-40%-a elhullik, a gyógyultak között pedig számos egyedben mozgászavarok maradnak vissza (Sárdi et al., 2012).

Emberben gyakori (75%) a tünetmentes fertőzöttség. Enyhe megbetegedés esetén láz (nyugat-nílusi láz, West Nile fever), fejfájás, izomgyengeség, rosszullét, étvágytalanság tapasztalható. Ez a fertőzött személyek kb. 20-25%-át érinti. Legyengült immunrendszer esetén súlyosabb, idegrendszeri tünetek jelentkezhetnek a kialakult meningoencephalitis következtében, amely akár a beteg halálához vezethet, ez azonban átlagosan az esetek 1%-ban fordul elő (Papa et al., 2011).

2. Anyag és módszer

2.1. Vizsgálati anyagok

A kutatáshoz szükséges vizsgálati anyagokat Magyarország különböző pontjairól gyűjtöttük be. Garat-szájüregi és cloaca-bélsár tamponmintákat, illetve elhullott vadmadár egyedeket gyűjtöttünk az Ócsai Madárvártán. Az tamponmintákat gyűrűzésre befogott madaraktól vettük, bódítás nélkül (2. ábra). Mintavételezésre steril kisméretű tamponokat használtunk, melyet a mintavétel után steril foszfátpuffer oldatban, 1 ml-es mikrocentrifuga csövekben, -70°C-on tároltunk. Az elhullott egyedeket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságánál (ÁDI) történő kórbonctani vizsgálatig -20°C-on tároltuk.

A Fővárosi Állat-és Növénykert állatmentő központjából összesen 26, főképp ragadozó madaraktól származó vérmintát gyűjtöttünk. A mintavételezéshez az esetek többségében a szárnyvénát (*v. cutanea ulnaris*) vettük igénybe, néhány madárnál pedig a lábvénát (*v. medialis metatarsalis*) vagy a nyaki vénát (*v. jugularis*). Bőrfertőtlenítést

követően, nyílt rendszerű vérvételi technikával dolgoztunk, a levett mintákat 1 ml-es csövekbe gyűjtöttük, majd a minták feldolgozásáig -70°C-on tároltuk. A jelöletlen madarak a vérvétel után microchipet is kaptak az egyszerűbb nyomon követés végett (3. ábra).

Nagy segítséget kaptunk különböző nemzeti parkoktól, ahonnan vérmintákat és elhullott vadmadarakat kaptunk. 2013-ban Csepelről összesen 61, elvéreztetett galamb fejét bocsátották rendelkezésünkre a vizsgálatok céljából. Az élő állatból történő mintavételezés során egyik madár sem szenvedett komoly sérüléseket.



2. ábra: Száj-garatüreg tamponminta vételezése barátposztából (*Sylvia atricapilla*).



3. ábra: Microchip behelyezése egerészölyvbe (*Buteo buteo*) a vérvételt követően

2.2. Minták előkészítése

Az elhullott egyedeket kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá. Meghatároztuk minden állat faját, és feljegyeztük a madarak azon adatait, melyeket az ornitológusok juttattak el hozzánk (ivar, kor, elhullás helye és ideje), a boncolás során talált elváltozásokat, illetve ahol találtunk, az állatok gyűrű-illetve chipszámát. A vizsgálat során mintát vettünk az agyvelőből vírus nukleinsav kimutatására, illetve különböző szervekből (agy, lép, máj, vese, bél, bursa Fabricii, tüdő, szív) immunhisztokémiai és szövettani vizsgálatok elvégzéséhez.

Az agymintákat az előkészítés során steril fülkében, dörzsmozsárban, steril kvarchomok segítségével homogenizáltuk, foszfátfuffer (phosphate-buffered saline, PBS) hozzáadása mellett. A sejtek sejthártyái a folyamat során sérültek, és a sejtekből kiszabadultak az alkotóelemeik, így az esetlegesen bennük található vírusok szabaddá váltak. A mintákat ezután 10 percig 1500 $\times g$ fordulatszámon centrifugáltuk, így különválasztva a kvarchomokos, durvább törmelékeket az esetlegesen vírust tartalmazó, kisebb sűrűségű fázistól. A továbbiakban a felülúszót használtuk fel.

2.3. RNS izolálás, Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RNS izoláláshoz a QIAamp Virus RNA Mini Kitet vettük igénybe (Qiagen, Hilden, Németország), a gyártó utasításai szerint. Ehhez 140 µl-nyi agyvelő homogenizátumból indultunk ki. A folyamat végére 60 µl-nyi, RNS-t tartalmazó oldatot kaptunk.

Az mintákból izolált RNS nukleinsavakon reverz transzkripció polimeráz láncreakciót (RT-PCR) hajtottunk végre. A reakciókhoz a QIAGEN OneStep RT-PCR Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk, a gyártó utasításai szerint.

A folyamat során először egy törzsoldatot készítettünk, amely mintánként 5,7 µl-nyi tisztított, RN-áz-mentes vizet tartalmazott, továbbá 2 µl-nyi ötszörös koncentrációjú pufferoldatot (melyben egységenként 25 mM $MgCl_2$ volt), 0,4 µl-nyi dezoxi-nukleotid trifoszfát keveréket (dNTPS), 0,1 µl-nyi RN-áz inhibitor (Promega), 0,4 µl-nyi Quiagen enzim mixet (reverz transzkriptáz és Taq DNS polimeráz) és 0,4 µl-nyi genomikus és reverz oligonukleotid primerek keverékét. A reakciókban a JEV szerokomplex számos vírusának kimutatására alkalmas, univerzális, degenerált primerpárt használtunk (Weissenöck et al., 2001, Bakonyi et al., 2004). A primerek (genomikus: WNV 3f: 5'-GARTGGATGACVACRGAAGACATGCT-3'; komplementer: WNV 2r: 5'-GGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT-3') a vírus 3' nem kódoló szakaszához tapadnak és 754 bázispár hosszúságú szakaszt erősítenek fel. A törzsoldatból 9-9 µl-nyi elegyet adtunk 1-1 µl-nyi RNS mintához, illetve egy pozitív és egy negatív kontrollhoz. Az folyamat során az egyes komponenseknek folyamatos hűtést biztosítottunk jégágyon.

Az így elkészített mintákat a PCR készülékbe helyeztük, és elindítottuk a WNV vírusára szerkesztett programot. A reakció első lépésében 50°C-on 30 perc alatt a reverz transzkriptáz enzim segítségével az RNS szál komplementer DNS-szárra íródott át. Ezt követően 94°C-on 15 perc alatt a reverz transzkriptáz enzim denaturálódott, a transzkripció leállt, és a Taq polimeráz enzim aktiválódott. A második lépés során a Taq polimeráz segítségével negyven ciklusban ismételt színtetizálódott a primerek tapadása közötti genomszakasz. Először 94°C-on, 40 másodperc alatt szétváltak a szintetizál DNS szálak, majd 57°C-ra hűlve 50 másodperc alatt hozzájuk tapadtak a specifikus primerek, majd 72°C-ra melegítve 1 percig zajlott a szálszintézis, melynek során a képződött DNS-ek nagy része dupla szálúvá alakult. A negyven ciklust követően 72°C-on hét percig zajlott a végső szálszintézis, melynek célja az volt, hogy minden DNS dupla szálát alkosson. A reakció végeztével az elegyeket a készülék leállítási 4°C-on tárolta.

2.4. Agarózgél-elektroforézis

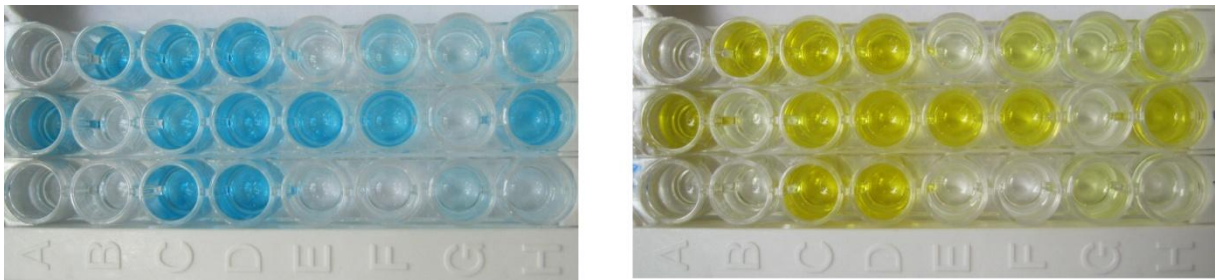
A képződött termékek elkülönítését, detektálását és molekulatömegük meghatározását agarózgél-elektroforézissel végeztük. Az agarózgél elkészítéséhez 0,6 g agarózt 35 ml Trisz-acetát EDTA (TAE) pufferben kevertük el, majd felforraltuk. A gél kb. 40°C-ra lehűlése után 3 µl-nyi Green Safe festéket adtunk az oldathoz. Az így elkészült oldatot gélformába öntöttük, és 30 percig vízszintes felületen állni hagytuk. A gél megszilárdulását követően azt a futtatókádba helyeztük, melyet TAE pufferrel töltöttünk fel. A minták számának megfelelően Parafilmre 1,5 µl-nyi felvivőpuffert (DNA Loading) cseppentettünk. Minden egyes pufferhez 5 µl-nyi mintát kevertünk, és az elegyet a gélben található zsebekbe mértük. A középső zsebekbe 5 µl-nyi molekulatömeg marker került. Az elektródák csatlakoztatása után 8 V/cm feszültség mellett elektroforetizáltuk a gélt, amíg a brómfenolkék jelzőfesték a kiindulási ponttól legalább 2-3 cm távolságra el nem futott (25-30 perc). Amint ez megtörtént, lekapcsoltuk az áramot, és a gélt UV átvilágítással vizsgáltuk. Az eredményeket digitális kamerával és számítógépes programmal dokumentáltuk.

2.5. Szerológiai vizsgálat

A szerológiai vizsgálatokhoz a vérminták a Körös-Maros Nemzeti Park területéről, illetve a Fővárosi Állat-és Növénykert madármentő állomásáról származtak. Centrifugálást követően a mintákból 50 µl-nyi savót használtunk fel a szerológiai vizsgálatokra.

A vizsgálatokat kompetitív ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) módszerrel végeztük, az ID Screen West Nile Competition Multi-species kittel (ID-VET, Franciaország), a gyártó utasításai szerint. A vizsgálat során a madarak vérsavójában található, nyugat-nílusi láz vírusának antigénjeként ható E-burokfehérjéje (pr-E) ellen képződött immunglobulinokat mutattuk ki. A 96 cellából álló ELISA lemez mikrocelláinak mindegyikét a nyugat-nílusi láz tisztított fehérjekivonatával (pr-E) vonták be. Minden cellát 50µl-nyi pufferoldattal töltöttünk fel, majd egy-egy cellákra a pozitív, illetve negatív kontrollokat mértük (50–50µl), a többibe pedig a tesztelésre szánt savókat. A lemezt ezután 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezalatt a pozitív minták ellenanyagai a cellákban található vírusfehérjéhez kötődtek. Az inkubációs idő letelte után a mintákat mosófolyadékkal háromszor átmostuk, majd 100-100 µl-nyi konjugátumot adtunk hozzájuk. Ez egy anti-pr-E ellenanyag peroxidáz konjugátum, mely a cellákban szabadon maradt pr-E fehérjéhez kapcsolódik, egy antigén-konjugátum-peroxidáz komplexet hozva létre. 30 percnyi inkubáció után a cellákat ismét háromszor mostuk, és 100-100 µl-nyi szubsztrát-

oldatot adtunk hozzájuk. A szubsztrát és a peroxidáz kémiai reakciója következtében azon cellákban, melyekben nem vagy csak kevés ellenanyag volt, kék elszíneződés vált láthatóvá. A szín intenzitásából arra is lehetett következtetni, hogy mekkora mennyiségű ellenanyag volt az egyes savómintákban. A reakció végbemenetelének idejére a lemezt 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ennek leteltével minden cellába 100-100 µl-nyi savas kémhatású „STOP”oldatot mértünk, amely leállította a reakciót, és az eddig kéken elszíneződött elegyeket sárgává alakította (4. ábra). A mikrocellák kiértékelését ezek után 450 nm-es hullámhossz alatt végeztük Multiscan EX spektrofotométer segítségével (Labsystems, Finnország). A spektrofotometria révén meg tudtuk állapítani az egyes cellákban található minták optikai denzitását (OD). Ezeket az értékeket összevetettük a pozitívnak minősíthető eredmény küszöbértékével. Ha az OD a küszöbérték alatt volt, tehát csekély volt a színreakció, mert kevés ellenanyag kapcsolódott az eredetileg a mikrocellákon található pr-E kivonathoz, akkor a mintát pozitívnak minősíthettük.



4. kép: A kompetitív ELISA vizsgálat. A mikrocellában a Fővárosi Állat-és Növénykertből gyűjtött minták láthatók.

3. Eredmények

A kutatás során 2011. szeptember 6-a és 2013. október 4-e között összesen 1023, 79 fajhoz tartozó mintát vizsgáltunk meg.

1. táblázat: A vizsgálatba bevont madárminták

Az egyes cellákban látható szám adatok közül az első a pozitív mintákat jelöli, a második az adott vizsgálati módszer szerinti vizsgált egyedek számát összesen.

Latin név	Magyar név	Egyedek száma	Tamponminta (PCR)	Szervminta (PCR)	Vérsavó (ELISA)
<i>Accipiter gentilis</i>	héja	3/14	0/0	3/14	0/0
<i>Accipiter nisus</i>	karvaly	2/7	0/0	0/4	2/3
<i>Aegithalos caudatus</i>	őszapó	0/9	0/9	0/0	0/0
<i>Acrocephalus melanopogon</i>	fülemülesitke	0/6	0/4	0/2	0/0
<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	foltos nádiposzáta	0/59	0/57	0/2	0/0
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	cserregő nádiposzáta	0/9	0/7	0/2	0/0
<i>Anthus trivialis</i>	erdei pityer	0/7	0/7	0/0	0/0
<i>Anser albifrons</i>	nagy lilik	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Asio flammeus</i>	régi fülesbagoly	1/1	0/0	0/0	1/1
<i>Asio otus</i>	erdei fülesbagoly	0/5	0/0	0/4	0/1
<i>Athene noctua</i>	kuvik	1/2	0/0	1/1	0/1
<i>Apus apus</i>	sarlósfecské	0/2	0/0	0/2	0/0
<i>Buteo buteo</i>	egerészölyv	4/12	0/1	0/3	4/8
<i>Buteo rufinus</i>	pusztai ölyv	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Carduelis carduelis</i>	tengelic	0/5	0/2	0/3	0/0
<i>Carduelis chloris</i>	zöldike	0/28	0/12	0/16	0/0
<i>Carduelis spinus</i>	csíz	0/5	0/5	0/0	0/0
<i>Certhia brachydactyla</i>	rövidkarmú fakusz	0/3	0/2	0/1	0/0
<i>Certhia familiaris</i>	hegyi fakusz	0/2	0/2	0/0	0/0
<i>Ciconia ciconia</i>	fehér gólya	0/2	0/0	0/1	0/1
<i>Circus aeruginosus</i>	barna rétihéja	1/1	0/0	0/0	1/1
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	meggyvágó	0/2	0/2	0/0	0/0
<i>Columba livia</i>	házi galamb	2/66	0/0	1/66	1/61*
<i>Coracias garrulus</i>	szalakóta	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Corvus cornix</i>	dolmányos varjú	1/2	0/0	1/2	0/0
<i>Corvus frugilegus</i>	vetési varjú	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Crex crex</i>	haris	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Delichon urbicum</i>	molnárfecské	0/1	0/0	0/1	0/0

* A vizsgált házi galambok közül 61-ből kompetitív ELISA-és RT-PCR segítségével is vizsgáltuk a vírus vagy ellenanyagainak jelenlétét.

<i>Dendrocopos major</i>	nagy fakopáncs	0/4	0/2	0/2	0/0
<i>Dendrocopos minor</i>	kis fakopáncs	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Emberiza schoeniclus</i>	nádi sármány	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Erithacus rubecula</i>	vörösbegy	0/72	0/66	0/6	0/0
<i>Falco biarmicus</i>	Lanner sólyom	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Falco luggeri</i>	Lugger sólyom	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Falco tinnunculus</i>	vörös vércse	1/7	0/0	0/3	1/4
<i>Falco vespertinus</i>	kék vércse	0/4	0/0	0/4	0/0
<i>Ficedula hypoleuca</i>	kormos légykapó	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Fringilla coelebs</i>	erdei pinty	0/14	0/13	0/1	0/0
<i>Fringilla montifringilla</i>	fenyőpinty	0/3	0/0	0/3	0/0
<i>Garrulus glandarius</i>	szajkó	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Haliaeetus albicilla</i>	régi sas	1/1	0/0	0/0	1/1
<i>Hirundo rustica</i>	füstifecske	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Ixobrychus minutus</i>	törpegém	0/2	0/0	0/2	0/0
<i>Lanius collurio</i>	tövisszúró gébics	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Locustella luscinioides</i>	nádi tücsökmadár	0/8	0/2	0/6	0/0
<i>Luscinia luscinia</i>	nagy fülemüle	0/4	0/4	0/0	0/0
<i>Luscinia megarhynchos</i>	fülemüle	0/5	0/3	0/2	0/0
<i>Luscinia svecica</i>	kékbegy	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Merops apiaster</i>	gyurgyalag	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Muscicapa striata</i>	szürke légykapó	0/2	0/2	0/0	0/0
<i>Panurus biarmicus</i>	barkós cinege	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Parus ater</i>	fenyves cinege	0/4	0/4	0/0	0/0
<i>Parus caeruleus</i>	kékcinege	0/80	0/68	0/12	0/0
<i>Parus major</i>	széncinege	0/160	0/147	0/13	0/0
<i>Passer domesticus</i>	házi veréb	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Passer montanus</i>	mezei veréb	0/7	0/6	0/1	0/0
<i>Pernis apivorus</i>	darázsölyv	1/2	0/0	0/0	1/2
<i>Perdix perdix</i>	fogoly	0/2	0/0	0/2	0/0
<i>Phoenicurus ochruros</i>	házi rozsdafarkú	0/5	0/4	0/1	0/0
<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	kerti rozsdafarkú	0/4	0/4	0/0	0/0
<i>Phylloscopus collybita</i>	csilcsalpfüzike	0/61	0/56	0/5	0/0
<i>Phylloscopus trochilus</i>	fitiszfüzike	0/16	0/16	0/0	0/0
<i>Picus viridis</i>	zöld küllő	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Prunella modularis</i>	erdei szürkebegy	0/45	0/44	0/1	0/0
<i>Remiz pendulinus</i>	függőcinege	0/3	0/3	0/0	0/0
<i>Regulus regulus</i>	sárgafejű királyka	0/1	0/1	0/0	0/0
<i>Saxicola torquata</i>	cigánycsuk	0/3	0/3	0/0	0/0
<i>Scolopax rusticola</i>	erdei szalonka	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Strix aluco</i>	macskabagoly	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Sturnus vulgaris</i>	seregély	0/1	0/0	0/1	0/0

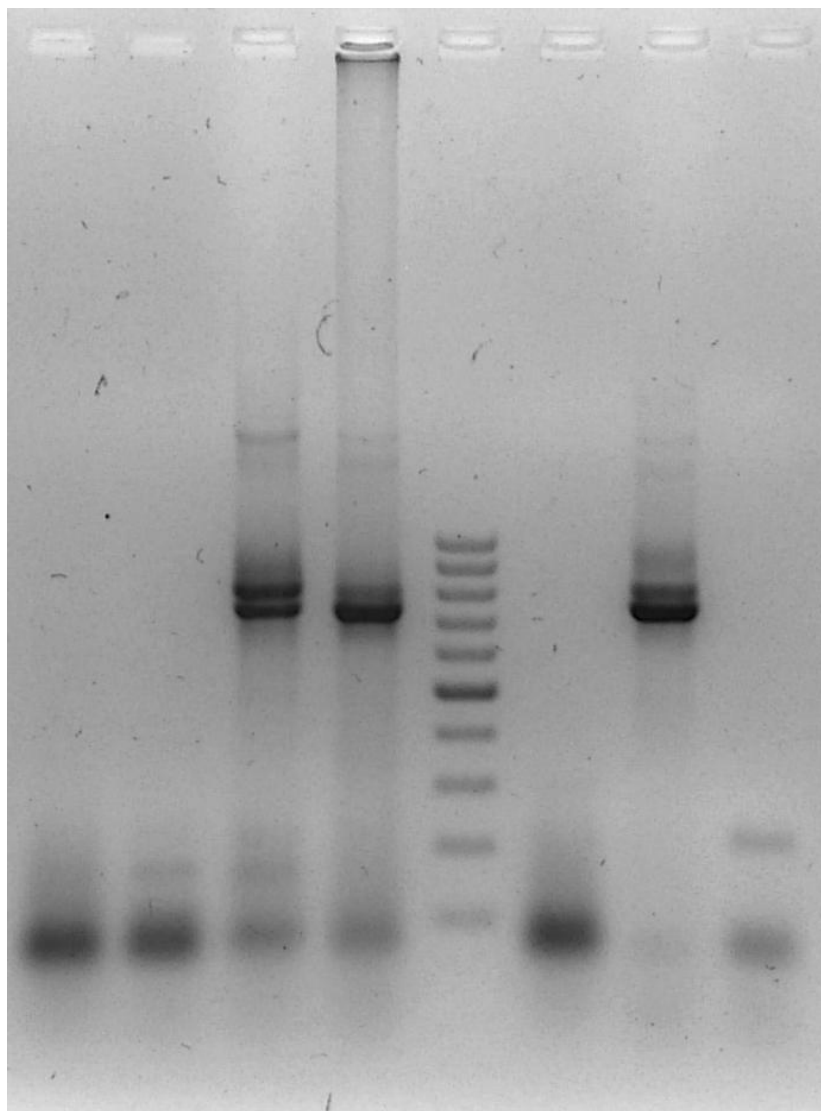
<i>Sylvia atricapilla</i>	barátposzáta	0/180	0/173	0/7	0/0
<i>Sylvia borin</i>	kerti poszáta	0/5	0/5	0/0	0/0
<i>Sylvia communis</i>	mezei poszáta	0/2	0/2	0/0	0/0
<i>Sylvia curruca</i>	kis poszáta	0/6	0/5	0/1	0/0
<i>Troglodytes troglodytes</i>	ökörzem	0/2	0/1	0/1	0/0
<i>Turdus merula</i>	feketerigó	0/22	0/19	0/3	0/0
<i>Turdus philomelos</i>	énekes rigó	0/12	0/11	0/1	0/0
<i>Turdus pilaris</i>	fenyőrigó	0/1	0/0	0/1	0/0
<i>Tyto alba</i>	gyöngybagoly	1/3	0/0	0/2	1/1
Összesen	79	19/1023	0/779	6/218	13/87

Az Ócsai Madárvártárról összesen 779 vadmadárból gyűjtöttünk száj-garat tamponmintát, illetve ahol volt rá lehetőség, cloaca-bélsármintát. Az első mintát 2012. május 5-én vettük le, az utolsót 2012. október 13-án. A mintákat RT-PCR segítségével vizsgáltuk meg, az eredmények kivétel nélkül negatívak lettek. A vizsgált vadmadarak egy héja kivételével mind kisméretű énekes madarak voltak.

Összesen 218 elhullott madár agyvelejét vizsgáltuk WNV nukleinsav jelenlétére. A legkorábban elhullott madár 2009. november 29-én pusztult el, a legkésőbbi 2013. augusztus 27-én.

2011-ben két pozitív egyedet találtunk. Mindkét madarat 2011. október 5-én kaptuk a Hortobágyi Nemzeti Parkból. Egyikük egy juvenilis házi galamb volt, a másik egy gyenge általános állapotban levő kuvik. Utóbbiban a kórbonctani vizsgálat során bőr alatti ödémát és a sokk jeleit fedeztük fel. Továbbá az állat egyik lába sérült volt, parenchymás szervei bővérűek, a bél pedig önemésztett, hurutos tartalommal telt.

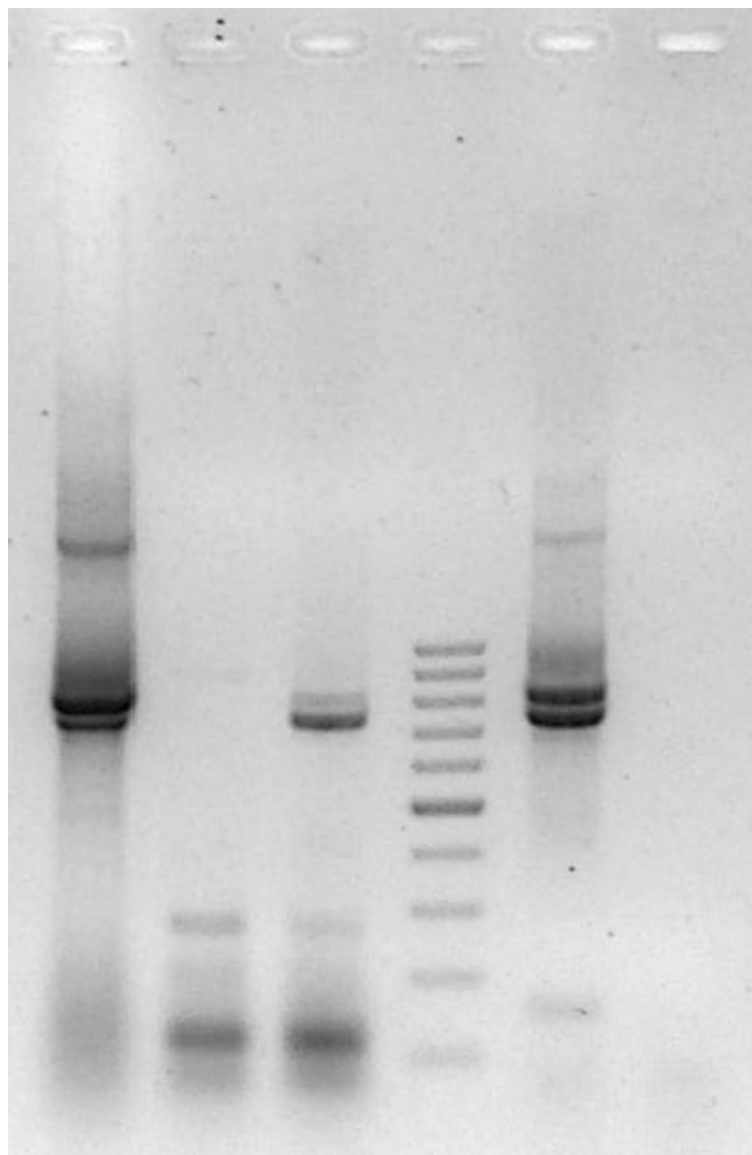
A 2012-ben elpusztult madarak között két pozitív egyedet találtunk (5. ábra). Mindkét esetben Maglódról beérkező héjátetemről volt szó. Az első, H 00 0924/11/05 gyűrűjelzéssel ellátott madár elhullásakor közepesen jó kondícióban volt. A kórbonctani vizsgálat során azt fedeztük fel, hogy az állat szíve fakó, tarkázott, lépe duzzadt, babszemnyi tarkázottsággal, gyomra üres, bélcsatornája rendes, mája duzzadt, bővérű, tüdeje bővérű, veséje pedig kissé duzzadt, bővérű. A második, igen gyenge kondícióban levő madáron gyűrűt nem találtunk. A kórbonctani vizsgálat során megállapítottuk, hogy lépe borsónyi, máj bővérű, veséje szemcsézett, bővérű, tüdeje bővérű, önemésztett, gyomra és bélcsatornája pedig üres, rendes.



5. ábra – a 2012-ben Maglód környékén elpusztult héjából származó minták RT-PCR eredménye.

1-2. és 6. oszlop: negatív minták; 3-4. oszlop: pozitív minták; 5. oszlop: molekulatömeg marker; 7. oszlop: pozitív kontroll; 8. oszlop: negatív kontroll.

2013-ban egy héja és egy dolmányos varjú bizonyult pozitívnak (6. ábra). Mindkét madár a Hortobágyi madárkórházból származott, és augusztus 27-én pusztult el. A 2215-ös jelzésű, gyenge kondícióban levő juvenilis héja korbonctani vizsgálat során körülírt gócos tüdőmikózist is találtunk. Ezen kívül mája és veséje kissé duzzadt, bővérű volt, szíve kitágult, tüdeje bővérű, lépe nagy, borsónyi. Gyomra, bélcsatornája önemésztett volt, gyomrában pépes, rostos tartalmat találtunk. Begye telt volt, benne húscscafatokkal. A jelzés nélküli dolmányos varjú senyves állapotban pusztult el. Szíve tág volt, lekerekedett, veséje duzzadt, bőnedvű. Tüdeje bővérű, mája petyhüdt, önemésztett volt, gyomrában, bélcsatornájában vérzéses diathesist figyeltünk meg. Gyomra üres volt.



6. ábra: a 2013. augusztus 27-én elhullott madaraktól származó minták RT-PCR eredménye. 1. oszlop: pozitív minta héjából; 2. oszlop: negatív minta dolmányos varjúból; 3. oszlop: pozitív minta dolmányos varjúból; 4. oszlop: molekulatömeg marker; 5. oszlop: pozitív kontroll; 6. oszlop: negatív kontroll

A Fővárosi Állat-és Növénykert madármentő állomásáról 2013-ban 26 egyedből vettünk vérmintát és vizsgáltuk meg kompetitív ELISA segítségével.

Árpilis 4-én tizenhat madárból vettünk vért: három karvalyból, egy nagy lilikből, egy réti fülesbagolyból, egy erdei fülesbagolyból, két egerészölyvből, egy barna rétihéjából, három vörös vércséből, két darázsölyvből, egy macskabagolyból és egy gyöngybagolyból. Ezen egyedek közül hét bizonyult pozitívnak - két karvaly, a réti fülesbagoly, egy egerészölyv, a barna rétihéja, az egyik darázsölyv és a gyöngybagoly.

Június 18-án további tíz egyedből vettünk mintát: egy kuvikból, hat egerészölyvből, egy fehér gólyából, egy vörös vércséből, és egy réti sasból. Közülük a vörös vércse, a rétisas, és három egerészölyv bizonyult pozitívnak, illetve egy egerészölyv kétesnek.

2013. június 7-edike és augusztus 14-edike között összesen hatvanegy galambból származó mintát kaptunk Csepelről. Az állatokat eredetileg prédaállatként tenyésztették az ottani, fogságban tartott ragadozó vadmadarak számára. A vágás során kivéztették őket, fejüket eltávolították. Vizsgálatainkhoz vérmintákat és az eltávolított fejeket használtuk fel. A vérmintákat kompetitív ELISA teszttel vizsgáltuk, a fejekből pedig agyvelőmintát gyűjtve RT-PCR vizsgálatnak vetettük alá. Egyetlen, augusztus 14-én beérkezett felnőtt madárból sikerült csak kimutatni a nyugat-nílusi vírus ellen termelt ellenanyagokat kompetitív ELISA segítségével.

4. Megbeszélés

A fertőző betegségek előfordulásának és terjedésének nyomon követése a járványtan egyik fő feladata. Egy adott kórokozó aktivitásával kapcsolatos naprakész adatok mind a fertőzések és betegségek diagnosztizálása, mind pedig a megelőzés és leküldés szempontjából nagy segítséget nyújthatnak. A kórokozók jelentősen eltérnek „életformájuk”, ökológiájuk szempontjából, ami nagymértékben befolyásolja a járványtani felmérés és nyomon követés (surveillance és monitoring) lehetőségeit, módszereit és hatékonyságát. Az olyan kórokozóknál, amelyek csak egy bizonyos fajt, vagy a fajok szűk körét fertőzik, a terjedésükhöz jól követhető, közvetlen vagy közvetett kapcsolat szükséges, és a fertőzések az esetek nagy részében klinikai tünetekben is megnyilvánuló betegség kialakulásával járnak, a járványtani nyomon követés általában hatékonyan működik. Különösen igaz ez olyan esetekben, amikor a gazdafaj jelentősége nagy és a megbetegedések jelentős része diagnosztizálásra kerül (pl. emberi kórokozók vagy társ- és haszonállatok kórokozói). A nyugat-nílusi vírus számottevő köz- és állategészségügyi jelentőségű vírus. Ökológiája azonban jóval összetettebb annál, mint hogy egyszerű járványtani módszerekkel könnyen nyomon lehetne követni a vírus terjedését és aktivitását. A vírus természetes ciklusának vadmadár gazdák és (döntően) szúnyog vektorok a résztvevői. Mindkét csoportra a nagyfokú fajgazdagság, magas egyedszám, dinamikus helyváltoztató képesség és korlátozott hozzáférhetőség jellemző. Továbbá, a természetes, gerinces gazdafajokban a WNV fertőzés csak ritkán nyilvánul meg klinikai megbetegedésben, ritkábban elhullásban, és még ennél is ritkábban felismert (diagnosztizált) formában. Ízeltlábú vektor fajokban a fertőzés nem okoz felismerhető elváltozásokat, így csak virológiai laboratóriumi vizsgálatokkal nyílt mód a fertőzöttség kimutatására. Bár a nyugat-nílusi vírus mind emberekben, mind jelentős egyedi értékű háziállatokban (pl. lovakban) képes súlyos, akár halálos kimenetelű megbetegedéseket

előidézni, ezekben a fajokban is tünetmentesen zajlik le a fertőzések túlnyomó része. Amennyiben súlyos, idegrendszeri tüneteket mutató emberekből vagy háziállatokból kerül kimutatásra a vírusfertőzés, a kórokozó már általában hetekkel vagy hónapokkal korábban megkezdte aktivitását a természetes ciklusban, és akkorra az alkalmi gazdák körében is nagyarányú fertőzések fordulnak elő. A nyugat-nílusi vírus aktivitás évszaki szezonalitást mutat; főként nyáron és koraősszel alakulnak ki járványok. A vírusaktivitás nyomon követése az adott évben jelentősebb járvány kialakulásának korai előrejelzése szempontjából alapvető fontosságú. A járványtani vizsgálatok eszköztárában passzív és aktív felmérő és nyomon követő módszerek vannak. A passzív monitoring lényege, hogy a már bekövetkezett megbetegedések / elhullások oki diagnózisa alapján állapítja meg a kórokozó előfordulását, aktivitását az adott régióban és időszakban. Az aktív monitoring során egészséges egyedek vizsgálatával keressük a vírusfertőzés közvetlen (pl. a kórokozó vagy valamely alkotójának kimutatása) és / vagy közvetett jeleit (pl. a kórokozó elleni ellenanyagok kimutatása) az egyes fajokban.

A nyugat-nílusi vírus előfordulását és aktivitását mind a közegészségügyi, mind az állategészségügyi szolgálatok figyelemmel kísérik. A humán előjelző rendszer alapvetően passzív (a megbetegedések diagnosztizálása alapján működő) és főként indirekt módszereket (ellenanyagok kimutatása) vesz igénybe. A legnagyobb előnye az, hogy a kiterjedt és jól felszerelt humán-egészségügyi ellátó és diagnosztikai hálózatoknak köszönhetően a megbetegedések jelentősen nagyobb aránya kerül diagnosztizálásra, mint az állati megbetegedések esetében. Ugyanakkor, mivel embereknél a WNV fertőzéseknek – szerencsére – csak kis hányada vezet idegrendszeri tünetekhez, az általános-lázás megbetegedéseknél pedig ritkábban fordulnak orvoshoz a betegek, illetve még ritkábban jut el az eset az oki diagnózis felállításához, a rendszer érzékenysége és korai előrejelző képessége mérsékelt. Járványhelyzetben aktív felmérések is irányulnak az emberi fertőzések kimutatására, például véradók vagy szervdonorok szűrésével. Ezeknek a vizsgálatoknak közvetlen gyakorlati jelentősége van a vírus nem-vektoriális terjedésének megelőzése szempontjából.

Haszonállatok (pl. lovak) megbetegedéseire szintén lehet felmérő vizsgálatokat alapozni. Az előnyei és hátrányai ennek a módszernek sokban hasonlítanak a humán monitoringnál leírtakhoz. A haszonállatok általában jobban kitettek a fertőzés (szúnyogcsípés) esélyének, és olykor a klinikai tünetek is gyakoribbak vagy súlyosabbak lehetnek, mint embereknél. Diagnosztizálásra viszont ritkábban kerül sor, mint emberi esetek alkalmával. Lehetőség van aktív felmérő (pl. szerológiai) vizsgálatokra is, bár ezeket viszonylag ritkán

alkalmazzák. Jó lehetőség volna például járványidőszakok kezdetén az egyéb diagnosztikai vizsgálat céljára küldött vérmintákat nyugat-nílusi vírus elleni (IgM típusú) ellenanyagokra is megvizsgálni. Sajnos ilyen vizsgálatokra ritkán áll rendelkezésre anyagi forrás.

A szúnyogok vizsgálatára alapozott, aktív felmérő vizsgálatok hatékonysága jelentős. Ezzel a módszerrel mint a vírus endémiás jellege, mind az aktivitás fokozódása feltárható. Sajnos ez az egyik legköltségesebb módja a vírusaktivitás nyomon követésének, mivel speciális hálózatok kialakítása és működtetése szükséges hozzá. Kellő entomológiai ismeretek és megfelelő eszközök szükségesek a legjelentősebb vektorfajok hatékony és szelektív gyűjtéséhez. A teljes populációhoz viszonyítva a gyűjtött egyedek száma viszonylag csekély, viszont az egyedi határozás (faj, ivar, stb.) és vizsgálat (pl. víruskimutatás PCR módszerrel) költségei szempontjából gyakran a túl magas mintaszám jelent gondot.

A vadmadár gazdák fertőzéseire irányuló felmérő vizsgálatok során mind passzív, mind aktív módszereket lehet használni. A kettes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírus okozta első, hazai agyvelőgyulladásos eseteket is vadmadarakban sikerült diagnosztizálni. Az azóta rendszeresen végzett vadmadár-monitoring segítségével (2006 kivételével) minden évben kimutatásra került a vírus beteg vagy elhullott egyedekből. Jelen kutatás három éve alatt (2011-2013) is folytattuk a vadmadarak WNV-re irányuló vizsgálatait. Ebben az időszakban megvizsgáltunk 218 elhullott madarat és 6 esetben mutattuk ki valamelyik szervből (főként a központi idegrendszerből) a vírus jelenlétét RT-PCR módszer segítségével. A passzív monitoring hatékonyságát ugyanakkor számos tényező befolyásolta. Leggyakrabban a járványidőszak előtt vagy alatt gyűjtött, ragadozó madarak mintáiból lehetett kimutatni a vírus jelenlétét. Ezeknek az egyedeknek a megtalálása és begyűjtése jelentős szervezőmunkát, a természetvédelmi szakemberekkel, solymászokkal, ornitológusokkal kialakított intenzív munkakapcsolatot igényelt. Bizonyos ragadozó madár fajok, különösen a vágómadár-alakúak (*Accipitriformes*) rendjéhez tartozó héják és karvalyok, fokozottan érzékenyek tűnnek a vírusfertőzésre. A megbetegedett és elhullott madarak közül – a korábbi évekhez hasonlóan – a vizsgálati időszakban is ezekhez a fajokhoz tartozó egyedekből lehetett a legnagyobb gyakorisággal kimutatni a vírus jelenlétét. Ennek magyarázatára kétféle elméletet állítottunk fel. Az egyik szerint faji jellegzetesség lehet a fokozott érzékenység. A másik elmélet szerint ezek a madarak nem felétlenül a szúnyog vektoroktól, hanem akár közvetlenül, fertőzött prédák elfogyasztásával fertőződhetnek. A préda-madarak lehetnek tünetmentes fertőzöttek; de az még valószínűbb, hogy az általános-lázás, vagy kezdődő idegrendszeri tünetek miatt nem képesek olyan hatékonyan menekülni, mint az egészséges társaik, ezért a ragadozók nagyobb eséllyel ejtik el őket. A prédákban

jelen levő vírus a táplálékfelvétel során kialakuló nyálkahártya-sérüléseken keresztül bejuthat a ragadozó madarak keringésébe. Az idegrendszeri tüneteket mutató madarak agy- és gerincvelő mintáiból nagy mennyiségben lehet kimutatni a vírus jelenlétét. Az ilyen szövetek elfogyasztása ezért nagy dózisu vírus felvételével jár, ami fokozhatja a fertőzés súlyosságát. Az említett ragadozó madarak ugyanakkor valószínűleg kevésbé jelentősek rezervoár szerepben, mivel megbetegedésük és elhullásuk miatt nem alkalmasak a vírus hosszabb idejű fenntartására és terjesztésére. Ezeknek az elméleteknek a bizonyítására valószínűleg héják vagy karvalyok kísérletes fertőzése adhatna választ.

A kutatásnak az egyik fő célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a vadmadarakra irányuló aktív módszerek mennyire alkalmasak a vírusaktivitás nyomon követésére. Mivel a vadmadarak természetvédelmi oltalom alatt állnak, nem invazív mintagyűjtést lehetett csak alkalmazni, a sérülések és károsodások elkerülése céljából. Szakirodalmi adatok alapján egyes madarak a fertőzés heveny stádiumában váladékaikkal, bélsarukkal/vizeletükkel ürítik a nyugat-nílusi vírust (McLean et al., 2001). Ezért száj-garat és cloaca tampon-mintákat (vagy friss ürüléket) vizsgáltunk a vírus jelenlétére PCR módszer segítségével. Több mint 750, gyűrűzési célból befogott, jobbára egészséges madárból gyűjtöttünk mintát. A mintavétel helyén (Ócsai Madárvárta) a korábbi években kimutattuk a vírus jelenlétét. Ennek ellenére mindegyik minta vizsgálata negatív eredménnyel zárult. A sikertelenség magyarázata az lehet, hogy még ha volt is a vizsgált madarak között rezervoárnak tekinthető, a fertőzöttek aránya csekély és a vírusürítés átmeneti, rövid idejű és alacsony titerű lehet. Ezért vagy nagyon nagyszámú mintát kell megvizsgálni, vagy jelentősen a szerencse kérdése is az, hogy ki lehet-e mutatni a vírust a minták valamelyikéből. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy az aktív, direkt monitoring hatékonysága messze elmarad a passzívétól. Az aktív, indirekt (szerológiai) vizsgálatok ugyanakkor hatékonyabbnak bizonyultak. A kutatások három éve alatt megvizsgált 87 madár savómintákból 13 esetben lehetett vírusok elleni ellenanyagokat kimutatni. Sajnos, a vizsgálatok jellege (egyszeri mintavétel, IgG [IgY] típusú ellenanyagok kimutatása) miatt nem lehetett azt megállapítani, hogy a közelmúltban, vagy régebben bekövetkezett fertőzés hatására termelődtek-e az ellenanyagok. Ezért ezek a vizsgálatok a fertőzéssel érintett fajok körének a meghatározására inkább alkalmasak, mint a vírus-aktivitás szezonális előrejelzésére.

A nyugat-nílusi vírus potenciális rezervoár vadmadár-fajainak azonosítására céljából a passzív és az indirekt, aktív felmérő vizsgálatok eredményeiből indultunk ki. A szeropozitív ragadozó madarak (*Accipitriformes*, *Strigiformes*), valamint a dögevő szokású dolmányos varjak esetében a fent említett, nem vektoriális átvitel lehetősége is felmerült. Az Egyesült

Államokban megfigyelt WNV járvány során szintén varjak voltak az egyik leggyakoribb áldozatai a vírusfertőzésnek (Brault et al., 2004). Ezért a varjak potenciális szerepét hazai viszonyok és kettes genetikai vonalhoz tartozó vírus esetében sem lehet kizárni. A prédaállatok közül házigalambokból lehetett a WNV fertőzést mind direkt, mind indirekt módszerekkel kimutatni. Ezek a madarak gyakori táplálék-forrásai a héjáknak és karvalyoknak. (Solymászkok is leggyakrabban galambokkal etetik vadászmadaraikat.) Ezért a galambok potenciális rezervoár szerepe valószínűsíthető. Folyamatban levő, vagy közeljövőben tervezett állatkísérletek szolgálják majd a *Corvidae* család és *Columbiformes* rend egyes tagjai rezervoár szerepének tisztázását. A további gyakori préda-fajok (pl. énekesmadarak) nagyobb számú mintájának vizsgálatára sajnos csak az aktív, direkt monitoring (tamponminták vizsgálata) útján nyílt mód. Ez a módszer viszont, a fent említettek miatt, kis hatékonyságú, így nem lehetett a segítségével további, potenciális rezervoárt azonosítani.

Kutatásaink eredményei alátámasztották azt az elvet, hogy a nyugat-nílusi vírus előfordulására, terjedésére és szezonális aktivitásának korai előrejelzésére irányuló felmérő vizsgálatoknál az integrált (humán, háziállat és vadmadár gazdákra, valamint szúnyog vektorokra irányuló), az aktív és passzív módszereket racionálisan ötvöző előjelző rendszertől várható el a legnagyobb hatékonyság. Ehhez a köz- és állategészségügyi hatóságok, klinikus állatorvosok és orvosok, ornitológusok, természetvédelmi szakemberek, entomológusok és virológusok szoros munkakapcsolata, együttműködése szükséges.

5. Összefoglalás

A kutatás a nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV) hazai fennmaradásában szerepet játszó gazdafajok azonosítására irányul. A kórokozó a *Flavivirusok* nemzetségébe tartozó, zoonotikus RNS vírus. Világszerte elterjedt, Európában a sporadikusan okoz megbetegedéseket. Magyarországon az utóbbi hat évben halmozottan fordultak elő idegrendszeri tünetekkel járó WNV fertőzések vadmadarakban, lovakban és emberekben.

A vírus természeti ciklusában döntően vadmadár gazdafajok és szúnyog vektorok vesznek részt. Korábban azt feltételezték, hogy a vonuló madarak időről-időre behurcolják a WNV-t Európába, ám az itt nem képes tartósan fennmaradni. Az utóbbi években Magyarországon kimutatott WNV törzsek genetikai összehasonlításának eredményei viszont arra utalnak, hogy ugyanaz a vírustörzs fordul elő és okoz évről-évre megbetegedéseket az országban.

A kutatás során 2011 és 2013 között 79 különböző fajba tartozó, összesen 1023, vadmadárban kerestük a vírusfertőzés jeleit, hogy meghatározhassuk, mely madárfajok játszhatják a kulcsszerepet a kórokozó fenntartásában. A vizsgálatokat a minták minőségétől függően kompetitív ELISA-teszttel (vérminták) vagy RT-PCR-rel (tamponminták, elhullott egyedek) végeztük. A pozitívnak bizonyuló madarak döntő többsége a vágómadár-alakúak rendjébe (*Accipitriformes*) tartozott, emellett a bagolyalakúak rendjének (*Strigiformes*) több képviselőjét is pozitívnak találtuk.

Az RT-PCR-el végzett vizsgálatok során 2011-ben sikerült kimutatnunk a vírust egy galambból (*Columba livia*) és egy kuvikból (*Athene noctua*). Mindkét madár a Hortobágyi Nemzeti Parkból származott. 2012-ben két, Maglódról származó héjából (*Accipiter gentilis*) mutattuk ki a vírust, 2013-ban pedig szintén egy héjából (*Accipiter gentilis*) és egy dolmányos varjúból (*Corvus cornix*), melyeket a Hortobágyi Madárkórházból küldtek be.

A kompetitív ELISA teszt során pozitívnak bizonyult két karvaly (*Accipiter nisus*), egy réti fülesbagoly (*Asio flammeus*), négy egerészölyv (*Buteo buteo*), egy barna rétihéja (*Circus aeruginosus*), egy vörös vércse (*Falco tinnunculus*), egy rétisas (*Haliaeetus albicilla*), egy darázsölyv (*Pernis apivorus*) és egy gyöngybagoly (*Tyto alba*).

A ragadozó madarak nagyarányú fertőzöttsége és az idegrendszeri betegség kialakulásának gyakorisága miatt valószínűsíthető, hogy egyes zsákmány-madarak (pl. házigalambok) közvetlen fertőzési források lehetnek.

6. Summary

The aim of this study was to identify the wild bird species maintaining the West Nile virus (WNV) in Hungary. The causative agent of the West Nile fever is a zoonotic RNA virus belonging to the *Flavivirus* genus. The virus has spread worldwide and has caused sporadic cases in Europe too. In Hungary, it has caused several outbreaks with central nervous system illness in wild birds, horses and human beings for the last six years.

The natural cycle of the virus involves wild birds as reservoirs and mosquitoes as vectors. Previously it has been assumed that WNV is introduced to Europe from time to time by migrating wild birds, but it is not able to subsist in the area. Genetic comparisons of WNV strains detected in Hungary, however, revealed that the same virus strain is circulating in the country since 2004.

In this study we have tested 1,023 wild birds, belonging to 79 species to determinate which species may play key roles in the maintenance of WNV in Hungary. We used competitive ELISA (serum samples) or RT-PCR (saliva and faecal samples, cadavers), depending on the type of the specimen. The majority of the positive birds belonged to the Accipitriformes and Strigiformes genera.

We have detected WNV RNA in 2011 in a dove (*Columba livia*) and a little owl (*Athene noctua*). Both birds were collected in the Hortobágy National Park. In 2012, we found the virus in two goshawks (*Accipiter gentilis*) stemming from Maglód, and in 2013 in a goshawk (*Accipiter gentilis*) and a crow (*Corvus cornix*) sent from the Avian Hospital of Hortobágy.

Among the samples examined with competitive ELISA, we found anti-WNV antibodies in two sparrow-hawks (*Accipiter nisus*), a short-eared owl (*Asio flammeus*) four common buzzards (*Buteo buteo*), a western marsh-harrier (*Circus aeruginosus*), a common kestrel (*Falco tinnunculus*), a white-tailed eagle (*Haliaeetus albicilla*), a European honey buzzard (*Pernis apivorus*) and a barn owl (*Tyto alba*).

Because birds of prey were frequently positive for WNV, and developed central nervous illness, it is likely that certain prey birds (i.e. doves) could be the sources of direct infections.

7. Irodalomjegyzék

Bakonyi T., Ferenczi E., Erdélyi K., Kutasi O., Csörgő T., Seidel B., Weissenböck H., Brugger B., Bán E., Nowotny N.: Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*. 2013. vol. 165, p. 61–70.

Bakonyi T., Gould E. A., Kolodziejek J., Weissenböck H., Nowotny N.: 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; vol. 328, no. 2, p. 301-310.

Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N.: Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; vol. 11, p. 225–31.

Bakonyi T., Ivanics É., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi L., Weissenböck H., Nowotny N.: Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; vol. 12, no. 4, 618-623.

Barna M.: Vadmadarak nyugat-nílusi fertőzőttségének vizsgálata. SZIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, 2010.

Bárdos V., Adamcová, J., Dedei, S., Gjini, N., Rosický, B., Simková, A.: Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology (Prague)* 1959; vol. 3, p. 277-282.

Berthet, F.X., Zeller, H.G., Drouet, M.T., Rauzier, J., Digoutte, J.P., Deubel V.: Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *Journal of general virology*. 1997; vol. 78, p. 2293–2997.

Brault, A. C., Langevin, S. A., Bowen, R. A., Panella, N. A., Biggerstaff, B. J., Miller, B. R., Komar, N.: Differential Virulence of West Nile Strains for American Crows. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; vol. 10, no. 12, p. 2161-2168.

Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S., Gubler, D. J.: West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002; vol 2, p. 519-529.

Epstein, P. R.: West Nile virus and the climate. *Journal of Urban Health*. 2001; vol. 78, no. 2, p. 368-371.

Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Szeredi L., Rátz F., Skáre J., Bakonyi T.: Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2007; vol.7, no. 2, p.181–188.

Glávits R., Ferenczi E., Ivanics É., Bakonyi T., Mató T., Zarka P., Palya V.: Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathology*. 2005; vol. 34, no. 5, p.408-414.

Hannoun, C., Panthier, R., Mouchet, J., Eouzan, J.P.: Isolement en France du virus West Nile à partir de malades et du vecteur *Culex molestus* Ficalbi. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences*. 1964; vol. 259, p. 4170-4172.

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

Kanai, R., Kar, K., Anthony, K., Gould, L. H., Ledizet, M., Fikrig, E., Marasco, W. A., Koski, R. A., Modis, Y.: Crystal Structure of West Nile Virus Envelope Glycoprotein Reveals Viral Surface Epitopes. *Journal of Virology*. 2006; vol. 80, no. 22, p. 11000–11008.

Kecskeméti S., Bajmócy E., Bacsadi Á, Kiss I., Bakonyi T.: Encephalitis due to West Nile virus in a sheep. *The Veterinary Record*. 2007; vol. 161, p.568-569.

Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., Bunning, M.: Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; vol. 9, p. 311–322.

Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M.B., Kramer, L.D., Roehrig J. T.: Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*. 2002; vol. 298, p. 96–105.

McLean, R. G., Ubico, S. R., Docherty, D. E., Hansen, E. R., Sileo, L., McNamara, T. S.: West Nile Virus Transmission and Ecology in Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001; vol. 951, p. 54–57.

Monaco, F., Lelli, R., Teodori, L., Pinoni, C., Di Gennaro, A., Polci, A., Calistri, P., Savini, G.: Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health*. 2010; vol. 57, p.476–486.

Mullarney, K., Svensson, L., Zetterström, D., Grant, P. J.: Madárhatározó. Európa és Magyarország legátfogóbb terepi határozója. Budapest, Park Könyvkiadó, 2007.

Papa A., Bakonyi T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N.: Genetic Characterization of West Nile Virus Lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; vol. 17, no. 5, p.920-922

Platonov, A. E.: West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: Were we ready? Are we ready? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001; vol. 951: p. 102–16.

Paul R. E.: West Nile Virus and the Climate. *Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 2001; vol. 78, no. 2, p. 367-371.

Robert G. Webster, Allan Granoff: *Encyclopedia of Virology*. Volume 1. London, Academic Press Limited, 1994.

Sárdi S., Szentpáli-Gavallér K., Bakonyi T., Szenci O., Kutasi O.: Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelő-gyulladás. *Irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja*. 2012; vol. 134, p.707-717.

Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul, J.H.: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1940; vol 20: p. 471–92.

Sós E., Molnár V., Dandár E., Bálint Á., Bakonyi T.: Szerológiai vizsgálatok hazai tüzök- (Ovis montanus) állományokban. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2012; vol. 134, p. 361-365.

Taylor, R.M., Work, T.H., Hurlbut, H.S., Rizk, F.: A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1956; Vol. 5, p.579-620.

Tsai, T.F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G.L., Nedelcu, N.I.: West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*. 1998; vol. 352, p. 767-71.

Varga J., Tuboly S., Mészáros J.: A háziállatok fertőző betegségei. *Állatorvosi járványtan II*. Budapest, Mezőgazda kiadó 1999, p. 412.

Vázquez, A. , Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G., Tenorio, A.: Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; vol. 16, no. 3, 549-552.

Weissenböck, 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. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; vol. 8, no. 7, p.652-6.

Zeller, H. G., Schuffenecker, I.: West Nile Virus: An Overview of Its Spread in Europe and the Mediterranean Basin in Contrast to Its Spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; vol. 23, p. 147–156.

8. Köszönetnyilvánítás

A kutatás az Európai Unió által támogatott EDENext projekt keretében folyt, és részben a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0011 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” c. pályázat támogatásával valósult meg.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Bakonyi Tamásnak (Szent István Egyetem, Állatorvos Tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék), továbbá Dr. Erdélyi Károlynak (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága), Dr. Sós Endrének (Fővárosi Állat-és Növénykert), Dr. Csörgő Tibornak (Eötvös Lóránd Tudományegyetem), valamint azoknak a szakembereknek és madarászoknak, akik segítséget nyújtottak a nyugat-nílusi vírus monitorozásában.

Kiemelt köszönettel tartozom a Szent István Egyetem, Állatorvos Tudományi Kar, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak, úgy mint Bakonyi Győzőnek, Dr. Forgách Petrának és Somhegyiné Barna Mónikának.

Emellett szeretnék köszönetet mondani dr. Borissza Endre biológia-kémia szakos középiskolai tanárnak (ELTE Apáczai Csere János Gyakorlógimnázium), aki megalapozta biológia-kémia tudásomat, és Molnár Lászlóné Kata nélinek, aki bevezetett a vadmadarak világába.

9. Mellékletek

A vadmadarak boncolása során pozitívnak bizonyuló egyedek adatai:

Szám	Jelzés	Dátum	Származás	Faj	Nem/Kor		Boncolás	WNV	Kondíció
							dátum		
2011/29		2011.10.05	Hortobágy	<i>Columba livia</i>		juv	2011.10.12	pozitív	
				házi galamb					
2011/31		2011.10.05	Hortobágy	<i>Athene noctua</i>			2011.10.12	pozitív	gyenge
				kuvik					
2013/18	H 00 0924/11/05	2012	Maglód	<i>Accipiter gentilis</i>	♂		2013.02.28	pozitív	kp. jó
				héja					
2013/19		2012	Maglód	<i>Accipiter gentilis</i>	♂		2013.02.28	pozitív	gyenge
				héja					
2013/41	2215	2013.08.27	Hortobágy Madárkórház	<i>Accipiter gentilis</i>	♂	juv.	2013.09.10	pozitív	gyenge
				héja					
2013/43		2013.08.27	Hortobágy Madárkórház	<i>Corvus cornix</i>	♂		2013.09.10	pozitív	senyves
				dolmányos varjú					

A 2013-ban a Fővárosi Állat-és Növénykertben vizsgált egyedek adatai és eredménye

Sorszám:	Chip:	Faj:	Vérvétel dátuma:	Savózás dátuma:	ELISA dátuma:	WNV:
1	348094100038881 HUN	<i>Circus aeruginosus</i> Barna rétihéja	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
2	348094100040068 HUN	<i>Pernis apivorus</i> Darázsölyv	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
3	348094100038885 HUN	<i>Asio flammeus</i> Réti fülesbagoly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
4	348094100038889 HUN	<i>Tyto alba</i> Gyöngybagoly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
5	348094100038805 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
6	348094100038802 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
7		<i>Strix aluco</i> Macskabagoly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
8		<i>Pernis apivorus</i> Darázsölyv	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
9	348094100038808 HUN	<i>Asio otus</i> Erdei fülesbagoly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
10	348094100038882 HUN	<i>Anser albifrons</i> Nagy lilik	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
11	939000010343232	<i>Accipiter nisus</i> Karvaly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
12	348094100038801 HUN	<i>Accipiter nisus</i> Karvaly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
13	348094100040070 HUN	<i>Accipiter nisus</i> Karvaly	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	pozitív
14	348094100038884 HUN	<i>Falco tinnunculus</i> Vörös vércse	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
15	348094100038890 HUN	<i>Falco tinnunculus</i> Vörös vércse	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
16	348094100041017 HUN	<i>Falco tinnunculus</i> Vörös vércse	2013.04.07	2013.04.10	2013.05.15	negatív
17	348094100040753 HUN	<i>Falco tinnunculus</i> Vörös vércse	2013.06.18	2013.06.18	2013.05.15	pozitív
18	348094100040756 HUN	<i>Athene noctua</i> Kuvik	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	negatív
19	972600000149619	<i>Haliaeetus albicilla</i> Rétisas	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	pozitív
20	348094100040741 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	kétes
21	348094100040728 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	negatív
22	96100100047167	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	pozitív
23	348094100040665 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	pozitív
24	348094100040730 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	pozitív
25	348094100040721 HUN	<i>Buteo buteo</i> Egerészölyv	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	negatív
26	348094100040722 HUN	<i>Ciconia ciconia</i> Fehér gólya	2013.06.18	2013.06.18	2013.08.27	negatív