

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

**A nyugat-nílusi vírus szerológiai összehasonlító vizsgálata
Magyarországon**

készítette: Kovács Kincső, VI. évfolyam
témavezető: Somhegyiné Barna Mónika doktorandusz
SzIE-ÁOTK, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2014
Budapest

Tartalomjegyzék:

I. Bevezetés	3
I.1. Flavivírusok szerkezete, kóroktan.....	3
I.2. Nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV)	4
I.2.1. Járványtan	4
I.2.2. Előfordulás	5
I.3. Kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis virus, TBEV).....	7
I.3.1. Járványtan	7
I.3.2. Előfordulás	8
I.4. Usutu vírus (USUV).....	9
I.4.1. Járványtan	9
I.4.2. Előfordulás	9
I.5. Diagnosztika.....	11
I.6. Célok	13
II. Anyag és módszer	14
II.1. Vizsgálati anyagok.....	14
II.2. Vizsgálati módszerek	16
II.2.1. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	16
II.2.2. Immunfluoreszcencia (IF).....	16
II.2.3. Haemagglutináció-gátlási próba (HAG)	17
II.2.4. Vírusneutralizációs próba (VN).....	18
III. Eredmények	19
IV. Megbeszélés	28
V. Összefoglalás	32
VI. Summary	33
VII. Irodalomjegyzék	34
VIII. Köszönetnyilvánítás	40

I.: BEVEZETÉS

A *Flaviviridae* család, *Flavivirus* nemzetségébe tartozó vírusok arbovírusok, amelyek széles körben elterjedtek a világon; egyesek számottevő köz- és állategészségügyi jelentőséggel bírnak. Magyarországon három flavivírus, a nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV), az Usutu vírus (USUV) és a kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) előfordulása ismert.

I.1. Flavivírusok szerkezete-kóroktan

A *Flaviviridae* családba egy szálú, pozitív irányítottságú, RNS genommal rendelkező vírusok tartoznak, melyet körülbelül 11000 nukleotid alkot. A kapszidjuk ikozaéder szimmetriájú és lipidburok veszi körül, a virionok körülbelül 40-50 nm átmérőjűek. Feltételezhetően egy közös ősvírusról származnak, mivel nagyfokú hasonlóság van a konzervatív szekvenciákban.

Háromfajta strukturális fehérjét tartalmaznak a flavivírusok: belső fehérjét (C), mátrix fehérjét (M) és burokf fehérjét (E), melyek a virális genom által kódoltak. Utóbbinak van mind biológiai, mind szerológiai szempontból a legfontosabb szerepe, mivel ez felelős a vírus haemagglutináló tulajdonságáért, a membránfúzióért és a gazdaszervezethez való kötődésért, valamint a fertőzött szervezet immunrendszere és ez ellen termel neutralizáló ellenanyagokat. A szerkezeti fehérjéken kívül 7 nem strukturális fehérjével is rendelkeznek, ezek a következők: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, valamint az NS5 fehérje (Petersen és Roehrig, 2001).

A család *Flavivirus* nemzetségébe sorolt vírusok közt keresztreakciókat figyeltek meg poliklonális ellenanyag tartalmú szérumot használva haemagglutináció-gátlási próbák során. A flavivírusok pontosabb besorolását, vagyis szerológiai alcsoportok képzését a specifikusabb neutralizációs tesztek tették lehetővé. Ezek alapján – szintén figyelembe véve a keresztreakciókat, melynek hátterében az E protein variabilitása áll – a vírusokat szerokomplexekbe lehet sorolni. A csoporton belül tehát az egyes vírusok közt szerológiai keresztreakciókat lehet megfigyelni. A Japán encephalitis vírussal közös csoportba tartozik a nyugat-nílusi vírus, a Cacipacore vírus, a Koutango vírus, a St. Louis encephalitis vírus, a Murray Valley encephalitis vírus, az Alfuy vírus, az Usutu vírus és a Yaounde vírus (Heinz *et al.* 2000).

A kullansencephalitis csoportba sorolható a kullansencephalitis vírus, a Louping-ill, a Langat vírus, a Kyasanur vírus, a Powassan vírus, a Karshi, és a Royal Farm vírusok.

I.2. Nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV)

I.2.1. Járványtan

A nyugat-nílusi vírus a *Flavivirus* nemzetségének széles földrajzi körben elterjedt tagja. Legfontosabb vektorai *Culex* szúnyogfajok, mint biológiai vektorok vesznek részt a vírus terjesztésében, de kullancsokból is izolálták már a vírust (Hubálek és Halouzka, 1999), valamint megfigyelték a viraemia szakaszában a nyers tejjel való továbbjutást is, sőt vértranszfúzió és szervátültetés kapcsán is leírták már a vírus terjedését (Kumar *et al.*, 2004). Egy izraeli libatenyésztő telepen kísérleti körülmények közt igazolták a vírus nem vektor-közvetített terjedését (Banet-Noach *et al.*, 2003).

A természetben a vírus fenntartásáért a vadmadarak és a madarak vérért szívó szúnyogok, mint közvetítő ágensek (vektorok) a felelősek. A vírus endémiás területeit főként a szúnyogoknak kedvező környezeti körülményeket teremtő nedves, mocsaras területeken lehet megfigyelni. A rezervoár szerepét tehát a madarak töltik be, a fertőzést általában tünetmentesen vészeli át, bár előfordulnak olyan fajok is (pl. bizonyos ragadozó madarak), amelyek érzékenyebben reagálnak a fertőzésre. Az emlősállatok és az ember a vírus alkalmi gazdáinak tekinthetők. A legfogékonyabbaknak a gerincesek között a ló és az ember bizonyult. A szúnyogok szaporodási dinamikájától függően augusztusban, illetve kora ősszel alakulnak ki a madarakat, lovakat és embereket érintő megbetegedések.

Kísérleti körülmények közt szúnyogcsípéssel kutyákat és macskákat is megfertőztek a vírussal (Austgen *et al.*, 2004). A kutyáknál rövid ideig tartó, nem túl magas viraemiás szakaszt figyeltek meg, de a fertőzés semmilyen klinikai formában nem nyilvánult meg. A kísérletek során a macskák is fogékonyak bizonyultak a WNV-ra, és az állatok között voltak olyanok, akik jellegtelen, nem idegrendszeri tüneteket is mutattak. Az átlagosan 14 napos lappangási időt követően a fertőzések zöme, mintegy 80%-ban tünetmentesen zajlik, az esetek 20%-ában azonban a nyugat-nílusi láz tünetegyüttese jelentkezik (WNF), ami enyhe lefolyású, kétfázisú lázzal, izom- és ízületi fájdalmakkal, hányingerrel, étvágytalansággal, levertséggel jár. Bizonyos fajokban, mint madarak, lovak és időnként a humán fertőzések esetében azonban súlyos idegrendszeri tüneteket okozhatnak a vírus neuroinvasív törzsei és a WNND (West Nile Neuroinvasive Disease) elnevezésű kórkép esetében encephalitist és meningitist vagy meningoencephalitist okoz a WNV, amely akár halálhoz is vezethet (Webster és Granhoff, 1994).

A filogenetikai vizsgálatok alapján legalább 7 féle WNV genetikai vonalat azonosítottak a világon (Mackenzie és Williams, 2009), amelyek közül az 1-es genetikai vonal (Lineage1) a legelterjedtebb, amely három további altípusra osztható: az egyes altípus (CladeA) Európában, Afrikában, Közel-Keleten valamint Amerikában okoz megbetegedéseket. A kettes altípust (Clade B) Ausztráliában külön néven, Kunjin vírusként említik, a hármas (Clade C) pedig Indiában izolálták.

A kettes genetikai vonal (Lineage 2) korábban a szub-szaharai Afrikára és Madagaszkárra volt jellemző, de mára már Európa szerte is elterjedt. Magyarországon először 2004-ben sikerült kimutatni idegrendszeri tüneteket mutató héjából (Bakonyi *et al.*, 2006).

Hatásos védekezési mód az emberek esetében még nincs a vírus ellen, a vektorok számának csökkentésével, szúnyogirtással és szúnyogriasztó anyagok használatával lehet megelőzni a terjedést. Lovak számára kifejlesztettek vakcinát, így ennél a fajnál hatásosabban lehet védekezni a vírus ellen.

I.2.2. Előfordulása

A vírust először 1937-ben, Uganda nyugat-nílusi vidékén izolálták enyhe lázas tüneteket mutató nő véréből (Smithsburn *et al.*, 1940). Később Egyiptomban, a Nílus deltájának vidékén egészséges gyermekek vérében végzett vizsgálatok során gyakori szeropozitivitást találtak, azonban a humán fertőzések hátterében a vírus jelenléte nem volt egyértelműen bizonyított. A vírust az 1950-es évektől kezdve vadmadarakból, szúnyogokból és lovakból is kimutatták, így a vizsgálatok és a jelzett betegséghez is vezető esetek alapján elmondható, hogy a flavivírusok közül a nyugat-nílusi vírus az egyik földrajzilag legelterjedtebb; kimutatták már Észak- és Dél-Afrikában, Ázsiában, Ausztráliában és 1999 óta Amerikában is. Európában az 1950-es évektől kezdve leginkább a mediterrán régióban és a nedvesebb területeken észlelték a vírust; bizonyítani tudták a jelenlétét Franciaországban, Görögországban, valamint Olaszországban és Portugáliában, ahol madarak és lovak mellett humán megbetegedések is történtek. Közép-Európában többek között Szlovákiában és Csehországban is kimutatták a vírust szerológiaiilag (Hubálek és Halouzka, 1999). Romániában 1996-ban jelentős járványkitörésről számoltak be, 393 humán esetből 352 ember került kórházba idegrendszeri tünetekkel, közülük 17-en meghaltak (Savage *et al.*, 1999). A következő években sem szűntek meg az embereket is érintő vírusfertőzések. 1999-ben Oroszország déli részén is kitört egy járvány, ami százakat betegített meg és 40 halálos áldozattal is járt. Ebben az esetben is bebizonyították

vírusneutralizációs próbával, illetve haemagglutináció-gátlási próba segítségével, hogy a nyugat-nílusi vírus felelős a megbetegedésekért (Lvov *et al.*, 2000).

A 2000-es évek elején további, lovakat és embereket is érintő vírusmegjelenésről számoltak be azokról a területekről, ahol a vírus a '90-es évek végén felbukkant és madarakban, lovakban, valamint emberekben váltott ki betegséget. Ilyen ország volt Olaszország, és Franciaország déli partja (Zeller *et al.*, 2004). Görögország északi részének folyami területein 2010-ben humán encephalitises eseteket regisztráltak, amiből később áldozatokat is követelő endémiás járvány tört ki (Kostas *et al.*, 2011). A járvány kitörése előtt pár nappal csapdázott *Culex pipiens* szúnyogokban meghatározták a WNV kettes genetikai típusú törzsek jelenlétét, ami nagy fokban megegyezett a Magyarországon 2004-ben kimutatott Lineage2 törzzsel (Papa *et al.*, 2011a). Korábban ezt a törzset nem mutatták ki Görögországban. 2011-ben bekövetkezett megjelenése után 2012-ben újabb behurcolt WNV-hez köthető lázas és idegrendszeri tünetekben megnyilvánuló esetekről számoltak be Németországban is (Gabriel *et al.*, 2013).

Az USA északi részén 1999-ben, New Yorkban jelent meg először a nyugat-nílusi vírus. A járvány során több ezer madár elhullott és több ló is olyan súlyosan megbetegedett, hogy nem tudott felépülni (Lanciotti *et al.*, 1999). A regisztrált emberi megbetegedések közt 7 halálos kimenetelű is volt. A járvány heveny szakában elpusztult állatok boncolása során szerzett agyvelőmintákból izolálták a nyugat-nílusi vírust (CDC Report, 2000). A tanulmány azt is kimutatta, hogy a járvány során izolált vírustörzs igen szoros genetikai kapcsolatban van az egyes genetikai vonalba tartozó izraeli törzzsel (Giladi *et al.*, 2001). A következő 5 évben rendkívül gyorsan elterjedt az egész észak-amerikai kontinensen, több mint 16000 megbetegedésről érkezett jelentés (Hayes *et al.*, 2005).

Magyarországon a vírus jelenléte az 1960-as évek óta bizonyított volt, szerológiai vizsgálatok során igazolták az antitestek jelenlétét humán vérsavókban (Koller *et al.*, 1969), vírusizolációval pedig kimutatták rágszálókból (Molnár, 1982), ám klinikai tünetekben megnyilvánuló betegséget nem diagnosztizáltak. A fordulópont 2003-ban következett be, mikor egy helyi járvány során 14 %-os mortalitást figyeltek meg egy dél-alföldi libaállományban. Kórszövettani, szerológiai vizsgálatokat végeztek az elhullott állatokon és RT-PCR technikával diagnosztizálták, hogy a WNV egyes genetikai vonalához tartozó kórokozó okozott megbetegedéseket és elhullásokat az állatok körében (Glávits *et al.*, 2005). Ezzel egy időben 14 humán esetben WNV által okozott encephalitis és meningitis tüneteit is megfigyelték (Ferenczi *et al.*, 2005). A következő évben, Magyarország dél-

keleti régiójában, egy idegrendszeri tüneteket mutató héja elhullásának a hátterében igazolták a nyugat-nílusi vírus jelenlétét, azonban ez a törzs a korábbi évvel ellentétben a kettes genetikai vonalba tartozott. Ez volt az első leírt eset Európában, amikor a kettes genetikai vonalhoz tartozó WNV idegrendszeri tüneteket és elhullást okozott (Bakonyi *et al.*, 2006).

A vírus 2007-ben is okozott megbetegedéseket madarak és lovak között, ezek a fertőzések is szintén az ország dél-keleti régiójában fordultak elő. 2008-ban a vírus nagyarányú terjedését tapasztalták hazánkban. A korábbi években megfigyelt, szűk földrajzi elterjedésével ellentétben már Budapest környékén, a Dunántúlon, sőt Ausztria keleti részén is okozott megbetegedéseket és elhullásokat a vírus. 25 ragadozó madár, 17 ló és 22 emberi, idegrendszeri tüneteket mutató megbetegedés hátterében igazolták a nyugat-nílusi vírus szerepét. Ma már a vírus endémiásnak mondható Magyarországon, hiszen 2004 óta, a 2006-os év kivételével minden évben okozott megbetegedéseket (Bakonyi- Erdélyi, 2011). A 2009-es évben újabb madarakat, lovakat és embereket betegített meg a kettes genetikai vonalba tartozó, neuroinvaszív típusa (Bakonyi *et al.*, 2013).

A filogenetikai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy ez a törzs jutott el a Balkánig és okozott súlyos emberi járványt Görögországban 2010-ben: 197 regisztrált idegrendszeri elváltozásokban szenvedő betegből 33 nem épült fel (Papa *et al.*, 2011b).

2012 decemberéig 244 bejelentett humán fertőzés történt az EU-ban és további 621 a környező országokból, ebből 161 görög eset (Papa, 2013; Gabriel *et al.*, 2013).

I.3. Kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis virus, TBEV)

I.3.1. Járványtan

A kullancsencephalitis vírus is a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségének tagja, egyik legfontosabb encephalitist okozó, embereket is betegítő vírus Európában. TBEV antigén komplex csoportjába kullancs által közvetített vírusok tartoznak. Először *Ixodes persulcatus*-ból, később közeli rokonából, az *I. ricinus*-ból izolálták a kórokozót. A fertőzések és a klinikai tünetek felbukkanásának idejét nagyban befolyásolja a vektor kullancsfajok életciklusa és szezonális aktivitása. A kullancsok vektor szerepük mellett rezervoárjai is a kórokozónak, nemzedékeik közt transzovariálisan és transztadiálisan is átadhatják a vírust, sőt a hím egyedeknek is lehet szerepe a fertőzés továbbításában.

Megfigyeltek olyan eseteket is, mikor a vírus nyers kecske- vagy tehéntej elfogyasztásával került az emberek szervezetébe (Lindquist-Vapalahti, 2008). Magyarországon is történt hasonló eset 2011 őszén az ország nyugati felén, mikor négy

ember került kórházba a betegség tüneteivel. Mindegyikük ugyanattól a gazdától vásárolt pasztörözetlen házi tehéntejet fogyasztott (Caini *et al.*, 2012).

A kullancsencephalitis vírusának elsődleges gerinces gazdái a kistrágyaságok, de megbetegít más emlősöket, denevért, vízimadarakat, kérődzőket és az embert is. Kutya is rendkívül fogékonyak a vírusfertőzésre, több ízben írták le az elmúlt 30 évben a betegség idegrendszeri formáját, bár náluk a tünetmentes fertőzés fordul elő gyakrabban. A tünetekben megnyilvánuló esetek a vektorok aktivitásától függően koratavasztól nyár elejéig, majd októberben fordulnak elő leginkább (Leschnik *et al.*, 2002).

A kutya, mivel a nyugati kultúrában társállatként szerepelnek, a vírus elterjedtségének és emberi TBE fertőzések jelzésül szolgálhatnak. Embereknél is előfordulnak tünetmentes fertőzések is, de gyakoribb, hogy a neurotróp vírus a beoltás helyéről az idegszövet felé vándorol, és akár súlyos elváltozásokat, vagyis meningitist, meningoencephalitist, meningoencephalomyelitist vagy meningoradiculoneuritist okoz a központi idegrendszerben (TBE).

A vírusnak három altípusa létezik: Európai (TBEV-Eu), Távol-keleti (Far Eastern, TBEV-Fe) és Szibériai (TBEV-Sib). Ezek nagyon szoros, 95%-os szerológiai hasonlóságot mutatnak, így nem csak keresztreakciók figyelhetők meg a szerológiai vizsgálatok során, de a kifejlesztett vakcinák is keresztvédettséget biztosítanak (Holzmann *et al.*, 1992). Ezek közül, a Magyarországon is előforduló közép-európai típussal való fertőződés eleinte influenzaszerű tünetekkel, kétfázisú lázzal jár, amit agyhártyagyulladás követ, valamint esetleg bénulások jelenségei kísérhetik. A meningitis a legtöbb esetben jóindulatú, azonban főleg fiatal és gyengült immunképességű embereknél halálos kimenetelű is lehet.

Endémiás területeken a megbetegedések számának csökkentésére hatékony vakcinát fejlesztettek ki a TBEV ellen, amivel megelőzhető az idegrendszeri betegség kialakulása.

I.3.2. Előfordulás

Először a korábbi Szovjetunió területén, Szibériában izoláltak egy vírust 1937-ben, amit később az ország nyugatibb területén is sikerült kimutatni (Zilber, 1939). Hamarosan rájöttek a kutatók arra, hogy az embereken encephalitist okozó vírus antigén tulajdonságaiban rokonságot mutat a Skóciában jelen lévő juhokat betegítő Louping-ill vírusával (Casals és Webster, 1944). Az Orosz tavaszi-nyári encephalitis vírus (RSSEV), *Ixodes persulcatus*-ban közvetítette ágens, de közeli rokonában, az *I. ricinus*-ban is megtalálták a korábbi Szovjetunió nyugati és keleti régióiban, ezért ezeket gyakran a

TBEV nyugati ill. keleti altípusaként említik. Utóbb kiderült, hogy a nyugati altípus Európában és a Skandináviában is felelős a kullancs által terjesztett megbetegedésekért, így a Közép-európai Encephalitis Vírus (CEEV) törzset először 1948-ban mutatták ki Csehszlovákia területén (Hloucla *et al.*, 1949).

Magyarországon először 1952-ben izolálták a vírust (Fornosi és Molnár, 1954).

Az utóbbi 20-30 évben sok európai országban endémiássá vált a vírus és a többszörösére emelkedett a TBE-s esetek száma: Svédországban háromszorosára, megduplázódott Csehországban, de kiemelkedően magas a megbetegedések aránya a többi országhoz képest Szlovéniában, Lettországon és Litvániában is, míg Magyarországon és Ausztriában a 2000-es évek elejére némi csökkenés volt észlelhető az 'International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis' felmérési adatai alapján. Csehországban egy kutatást is végeztek a kullancsok fertőzöttségi arányának meghatározására. A különböző területekről gyűjtött állatokban 5,9 és 11,1% közötti fertőzöttséget találtak (Danielova *et al.*, 2002).

Összességében a kullancsencephalitiszes regisztrált esetek száma növekszik Európa szerte, mintegy 3-4 ezer új megbetegedést jelentenek évente. Az International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis csoport ezért évente rendezvényeket tart, amiken napirendre kerülnek a TBE vírussal kapcsolatos aktuális problémák.

I.4. Usutu vírus (USUV)

I.4.1. Járványtan

Flaviviridae család *Flavivirus* nemzetség tagja, azon belül is a Japán encephalitis szerocsoportba sorolható. Ennek a flavivírusnak is leginkább a *Culex* szúnyogfajok a vektorai, amelyek elsődlegesen madarakon szívnak vért. Néhány madárfaj érzékenyebb a vírusfertőzéssel szemben, a verébalakúakra nézve bizonyul a legpatogénebbnek.

Ha a fertőzött szervezetben el tud szaporodni a kórokozó, súlyos tünetekkel járó betegség alakulhat ki. Ide tartozik a magas láz, izomfájdalmak, az encephalitis, a myocarditis, és hepatitis, valamint elhullott madár tetemekben a májban és a lépben is elhalásos területeket írtak le.

I.4.2. Előfordulás

Az Usutu vírust 1959-ben sikerült izolálni először Dél-Afrikában *Culex neavei* szúnyogfajból. A következő évtizedekben ritkán találtak ezzel a vírussal, csupán egy

humán megbetegedést regisztráltak Afrikában, illetve két alkalommal sikerült bizonyítani a jelenlétét. A humán esetben a tünetek láz és kiütések voltak (Woodhall *et al.*, 1964).

A vírus Afrikán kívüli területen való előfordulását első ízben 2001 nyarán írták le. Bécs körül megszorodott a vadmadár elhullások száma, főleg a feketeterigókat tizedelte meg a járvány. A boncolások és kórszövettani vizsgálatok eredményei alapján encephalitisben pusztultak el a madarak, amit először nyugat-nílusi vírusfertőzésnek gondoltak, de madaraktól kinyert mintákon elvégzett genetikai meghatározás alapján 97%-os egyezést találtak az afrikai Usutu vírussal (Weissenböck *et al.*, 2002). Egy évvel később szintén történtek megbetegedések madarak közt és már egy humán mintából is kimutatták a vírust Ausztriában (Weissenböck *et al.*, 2003). A történetek miatt egy széleskörű megfigyelőprogramot indítottak a vírus terjedésének detektálására Ausztriában és Magyarországon 2003-2006 között. Magyarországon 52 madárfaj került be a felmérésbe, de a vírust legelőször egy Budapesten talált elhullott feketeterigó szemeiből mutatták ki a vírus nukleinsavát reverz transzkripció PCR használatával. Az eredményt megerősítették immunhisztokémiai módszerrel és *in situ* hibridizációval. 2006 júliusában és augusztusában újabb 6 budapesti feketeterigó szemeiből mutatták ki az Usutu vírust. Genomszekvenálás során 99,9%-os egyezést találtak a 2001 óta Ausztriában jelenlévő vírusvonallal, így feltételezhető, hogy onnan került hazánkba, nem pedig Afrikából terjedt át (Bakonyi *et al.*, 2007).

Hazánk és szomszédunk mellett több európai országban is vizsgálatokkal igazolták szúnyogokban illetve madarakban az Usutu vírus jelenlétét: Spanyolországban 2006 és 2009-ig többször is (Busquets *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2011), Svájcban 2006-ban (Steinmetz *et al.*, 2011), valamint Csehországban 2012-ben (Hubálek *et al.*, 2012) és Németországban 2011-ben (Jöst *et al.*, 2011).

Az Usutu vírus jelenlétét Ausztria déli szomszédjánál, Olaszország északi részén szerológiai vizsgálatokkal először 2005-ben bizonyították be egy baromfiállományban (Rizzoli *et al.*, 2007), habár egy retrospektív vizsgálat során a vírus jelenléte az országban már 1996-tól valószínűsíthető. A vizsgálat során 1996-ban elhullott madarak konzervált szemeiben találták meg az Usutu vírust (Weissenböck *et al.*, 2013). Az első neurológiai tüneteket mutató humán megbetegedést 2009-ben regisztrálták az országban. Az eredendően gyengült immunrendszerű beteg nyáron került kórházba lázas tünetekkel, és meningoencephalitist diagnosztizáltak nála. A betegről lumbalpunkcióval nyert liquor mintát, valamint szérummintáját is megvizsgálták RT-PCRrel és pozitívnak bizonyult

Usutu vírusra. A vírus részleges genomszekvenciája és az NS5 régió megegyezett a Közép-Európában keringő vírustörzsével (Pecorari *et al.*, 2009).

A vírus megjelenésére közvetett módon, szerológiai kimutatásokkal Lengyelországban és Angliában (Buckley *et al.*, 2003) is találtak bizonyítékot.

A vírus többször megjelent az egymást követő években 2003 óta Ausztriában Magyarországon, Olaszországban és Spanyolországban ugyanazokon a területeken, ami alapján feltételezhető, hogy áttelelő szúnyogokban túlél.

I.5. Diagnosztika

Flavivírusok erős antigének, a velük való fertőződés gyors és hatékony választ vált ki az immunrendszerből, így az esetek nagy százalékában az állatok és az emberek tünetmentesen, vagy enyhe tünetekkel vészeli át azt. Bár a celluláris immunválasz is hozzájárul a felépüléshez, a fő szerep a humorális immunválaszé. Először és legnagyobb mértékben a megtámadott szervezet a vírus burok antigénje (E) ellen termel ellenanyagokat, majd a mátrixfehérje (M) és egy nem strukturális protein, a NS1 ellen képződnek antitestek (Webster és Granhoff, 1994).

Flavivírusokkal való fertőzöttség esetén gyakran nincs lehetőség direkt vírus kimutatási módszerek használatára, mivel az ellenanyagok a vérben hamar megjelennek.

A flavivirus genuson belül a szerológiai vizsgáló módszerek használata során keresztreakciók figyelhetők meg az egyes vírusok ellen termelődött ellenanyagok között a rokon vírusok nagyfokú antigenitásbeli hasonlósága miatt, megnehezítve ezzel az adott flavivirus által okozott betegség pontos detektálását.

Miután Magyarországon a nyugat-nílusi víruson kívül két másik flavivirus, a kullancsencephalitis vírus, valamint az Usutu vírus is jelen van, a diagnosztika komoly nehézségekbe ütközik a fent említett ok miatt.

WNV fertőzés szerológiai kimutatására a legegyszerűbb rutin módszer az Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) módszer használata. Ez történhet akut fertőzéskor IgM ellenanyagok kimutatása szérumból vagy plazmából, de gyakoribb az IgG ellenanyagok jelenlétének igazolására a módszer kompetitív formájának használata, ami szintén kapható kereskedelmi forgalomban. Az ellenanyagok a fertőzéstől számított második héttől akár egy évig is jelen lehetnek. Kiegészítő vizsgálatnak ajánlatos indirekt immunfluoreszcens (IIF) próbával is megvizsgálni a mintákat. Németországban készítettek egy tanulmányt az ELISA és az IIF módszer összehasonlításáról. Három csoportba osztották a természetes úton fertőződött emberi esetekből gyűjtött savómintákat. Az első

csoport egyedeiből fertőzés okozta influenzaszerű tünetek megjelenését követő 2-9 napon vett vérmintákat IgM ellenanyag jelenlétére vizsgálták. ELISA-val 38%, IIF-fel 50 %-os volt a pozitivitás. A második csoportba IgM pozitív betegek kerültek, az ő mintáikban IgG ellenanyagot kerestek és 90%-os pozitivitást találtak. Összesen a két csoport betegeiben antitesteket mutattak ki 86%-ban ELISA-val és 95%-ban IIF-fel. Antitesteket mutattak ki 100%-ban a harmadik csoport mintáiban, ahol 6-12 hónappal a tünetek megjelenését követően vettek mintát. Ezzel a WNV-vel való fertőződésnek az idejét lehet behatárolni (Levett *et al.*, 2005).

Egy másik elemzésben is a leggyakrabban használt IgG indirekt ELISA és IIF módszert hasonlították a vírusneutralizációs próbához (Niedrig *et al.*, 2007). A szerológiai próbák eredményei 99,5 %-ban (ELISA), valamint 100%-ban egyeztek a korábban már elvégzett vírusneutralizációs teszt eredményeivel. A próbákkal továbbá a keresztreakciókat kívánták vizsgálni; már ismert antigén pozitivitású szérummintákat használtak főleg dengue vírus, sárgaláz vírus és kullancsencephalitis vírus ellen és tesztelték őket WNV ELISA-val és IIF-val. Az IgM-re nézve az esetek 0-18,2 %-ában mutattak ki keresztreakciót, míg IgG ellenanyagok keresésekor 15,7-100% átfedést írtak le.

Egy másik, holland tanulmányban egy új IF tesztet hasonlítottak össze a klasszikus ELISA-val, IgM és IgG ellenanyagok kimutatására (dengue-, sárgaláz-, Japán encephalitis-nyugat-nílusi vírusokkal vizsgálva). Arra az eredményre jutottak, hogy IgM ellenanyagok esetében az IF teszt jelentősen nagyobb specifitást mutatott, mint az ELISA, mivel a keresztreakciók aránya az elsónél 4-10% körül mozgott, utóbbinál 30-44% közt. IgG-nél azonban mindkét próba esetében magas volt a keresztreakciók aránya: 16-71% (Koraka *et al.*, 2002).

Usutu fertőzés kimutatására a World Organisation of Animal Health ajánlásával a plak-redukciós vírusneutralizációs próbát, vagy mikroneutralizációt kell használni az előzetesen haemagglutináció-gátlási próbával való 1:20-nál nagyobb titerű pozitív eredménykor.

Humán kullancsencephalitis vírus fertőzések kimutatására régóta használnak szerodiagnosztikai módszereket. A kimutatás alapja a specifikus IgM és IgG antitestek detektálása a fertőződésre gyanús egyed szérumában, vagy agy-gerincvelői folyadék mintájában ELISA, IIF vagy HAG teszt használatával.

Amint az eddig leírtakból is látszik, rutin szerológiai tesztekkel nehezen állapítható meg pontosan, hogy egy adott mintában melyik flavivírus ellen termelődött ellenanyag,

mivel a flavivírusok közt, különösen a szerokomplexen belül gyakoriak a keresztreakciók. Akár több fajta vizsgálat elvégzése ajánlott a biztosabb diagnózis érdekében.

I.6. Célok:

A flavivírusok közül a nyugat-nílusi vírusfertőzéseknek növekvő jelentőséget kell tulajdonítani Európában, mivel egyre több humán neurológiai tünetekben is megnyilvánuló, akár halállal végződő megbetegedést regisztrálnak. A fent említett csoporton belüli keresztreakciók miatt azonban nehéz diagnosztizálni szerológiailag a WNV-t, ezért a kutatás során négy különböző diagnosztikai módszer érzékenységét és specifikusságát kívántuk megvizsgálni abból a célból, hogy kiderüljön melyik az a rutinszerűen használható módszer, ami megbízhatóan alkalmazható a WNV diagnosztikájában. A vizsgálatokba kutyasavókat is bevontunk azzal a szándékkal, hogy megállapítsuk vajon játszanak-e valamilyen szerepet társállatként a nyugat-nílusi vírus ciklusában.

II. ANYAG ÉS MÓDSZER

II.1. Vizsgálati anyagok

A kutatás során 2011 és 2013 között gyűjtött vérsavókat használtunk, emellett a korábbi évek során (2007, 2009) pozitívnak igazolt savókat is bevontunk a szerológiai vizsgálatokhoz. A savók pontos megjelölését és adatait az 1. táblázat tartalmazza. A minták az ország különböző területeiről származtak és vagy kifejezetten a kutatás céljára vettünk vért az állatokból, vagy állatorvos küldte be őket diagnosztikai vizsgálatra, ilyenek voltak főként a lovak mintái.

A madaraktól vérmintához a nemzeti parkok, az Ócsai Madárvárta és a Fővárosi Állat- és Növénykert munkatársainak és állatorvosainak segítségével jutottunk. Galambból vett vérminták Körösladányból, Kardoskútról, Dévaványáról és Ócsáról származtak. Ragadozó madarak közül héjától és parlagi sastól küldtek be vért szintén Körösladányból.

A vizsgált ló vérminták Pest megyéből és környékéről származtak. A kutyák mintái a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar Kisállat Klinikájának betegei közül kerültek ki, amelyek az ország különböző területeiről érkeztek.

Madaraknál a vérvétel helye a szárnyvéna volt, ebeknél a *v. antebrachii*, lovaknál pedig a *v. jugularis*. A vérmintákból centrifugálással (800 ×g, 10 perc) nyertük ki a savókat, amelyeket felhasználásig -20°C-on tároltunk.

Összesen 462 savó mintát vontunk be a kísérletbe. A minták állatfajonkénti eloszlása a következő volt: galamb (n=171), kékvércse (n=141), héja (n=5), parlagi sas (n=1), túzok (n=27), ló (n=25) valamint kutya (n=92).

1. táblázat: Az összehasonlító vizsgálatok során használt savók összesített adatai

Sorszám	Mintaazonosító	Vérvétel időpontja	Faj/Fajta	Tartási hely
1.	gólya	2007.09.21	fehér gólya	NA
2.	karvaly	2007.09.10	karvaly	NA
3.	Kleopátra	2012.09.27	ló	NA
4.	JT 41/11	2011.08.24	ló	NA
5.	JT 2011/70/6	2011.11.07	ló	NA
6.	JT 2011/70/9	2011.11.07	ló	NA
7.	T66	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
8.	225272	2012.10.15	kutya/pireneusi	Piliscsaba, és környéke
9.	220815	2012.06.21	kutya/keverék	Füzesabony, Budapest
10.	224522	2012.09.10	kutya/német juhász	Budapest
11.	186654	2012.09.28	kutya/labrador	Budapest, egész országban járt
12.	56637	2012.08.22	kutya/szak.collie	Budapest, III. kerület
13.	222848	2012.06.14	kutya/keverék	Füzesabony, Budapest
14.	223746	2012.07.30	kutya/bull masztiff	Tahi, Duna part, Balaton
15.	223422	2012.07.12	kutya/am.staffordshire	Budapest, Délegyházi-tavak,Duna
16.	217130	2012.07.26	kutya/német dog	NA
17.	sWA8	2011.07.	kékvércse	Kardoskút
18.	sKL8	2011.07.	kékvércse	Kardoskút
19.	gólya	2008.06.04	fehér gólya	NA
20.	T74	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
21.	224258	2012.08.29	kutya/német dog	NA
22.	218966	2012.07.03	kutya/beagle	Dunakeszi, Auricoop kft.
23.	T47	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
24.	Néger	2009.10.13	ló	NA
25.	221277	2012.06.12	kutya/keverék	Mezőkövesd, Budapest
26.	73/09	2009.	galamb	NA
27.	T20	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
28.	T41	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
29.	T42	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.
30.	225033	2012.10.03.	kutya/rottweiler	Budapest, XX. Kerület
31.	161503	2012.09.28.	kutya/golden retriever	Galgamácsa
32.	170711	2012.10.07.	kutya/keverék	Budapest, VII. kerület
33.	179294	2012.09.08.	kutya/német juhász	NA
34.	207725	2012.11.05.	kutya/ír szetter	Budapest, XXIII. Kerület
35.	208915	2012.10.29.	kutya/border collie	Tárnok, környék
36.	224811	2012.09.28.	kutya/bassethound	NA
37.	224867	2012.10.07.	kutya/keverék	NA
38.	225269	2012.10.15.	kutya/keverék	Füzesabony, Budapest
39.	225114	2012.11.07.	kutya/keverék	Mogyoród, erdő
40.	T69	2011.07.	ló	Telivér farm Kft.

II.2. Vizsgálati módszerek

II.2.1. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

A WNV ELISA vizsgálatokat az ID Vet indirekt IgG kompetitív ELISA kitjével hajtottuk végre (ID Vet, Franciaország). A teszt kivitelezése a gyártó utasítása szerint történt. A 96 lyukú mikrolemez minden cellájának alja tisztított WNV E fehérjével van fedve. Ezekre mértük rá megfelelő sorrendben és az inkubációs időket betartva a savómintákat és a szükséges oldatokat. A teszt lényege, hogy mintákban jelenlévő E burokfehérje ellen termelődött ellenanyagok kötődni képesek a cellákban lévő vírusantigénhez. Ha a savókban nem található, vagy csak kis mennyiségben vannak jelen az antitestek, akkor a szabadon maradt antigénekhez a konjugátum – ami peroxidáz enzimmel jelölt WNV ellenanyagot tartalmaz – kötődni tud. Az enzim szubsztrátjának rámerése után azoknál a savómintáknál, amik nem, vagy csak kis mennyiségben tartalmaztak az E fehérje ellen termelődött ellenanyagot, ott a lemez celláiban színreakciót tudtunk megfigyelni. Minél több ellenanyagot tartalmazott a savó, annál kevésbé tapasztaltunk elszíneződést a cellákban.

Ezután a lemezt 450 nm-es hullámhosszon Multiscan EX spektrofotométerrel (Labsystems, Finnország) leolvastuk és meghatároztuk az optikai denzitás mértékét (OD), majd az eredményeket kiértékeltek a szintén gyártó által megadott OD küszöbértékekhez mérten.

Indirekt kompetitív ELISA vizsgálatnál tehát akkor mondható egy eredmény pozitívnak, ha kismértékű, vagy semmilyen színreakciót nem tapasztalunk, hiszen az azt jelenti, hogy a savó tartalmazott elegendő ellenanyagot ahhoz, hogy azok lefedjék a vírusantigéneket.

A WNV pozitív kutyasavókon elvégeztünk egy TBEV antigéneket használó kompetitív Ig ELISA vizsgálatot is (TEST-LINE Clinical Diagnostics Ltd, Csehország). A vizsgálat kivitelezése a gyártó utasításai szerint történt, menete hasonló a WNV ELISA-hoz.

II.2.2. Immunfluoreszcencia (IF)

A vizsgált minták közül a legnagyobb pozitivitást mutató 40 savót vettük be a további szerológiai módszereket összehasonlító vizsgálatokba. Az indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatokat az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) Általános Vírusdiagnosztikai Osztályán hajtottuk végre.

Az intézet BSL3-as laboratóriumában előállított WNV-vel, TBEV valamint USUV vírussal fertőzött és egészséges sejtsuszpenziót tartalmazó tárgylemezeket -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Az indirekt IF eljárásban a savókban lévő ellenanyagokat, az ellenük termelt specifikus, festékkel jelölt ellenanyagok segítségével tudjuk kimutatni.

A vizsgálandó savókból PBS puffer hozzáadása után hígítási sort készítettünk 1:10-től 1:320-as hígításig, majd 10-10 µl-t pipettáztunk minden hígításból az adott vírust tartalmazó fixált sejtekre. Negatív kontrollnak és WNV pozitív kontrollnak humán savót használtunk, TBEV pozitív kontrollként egy már korábban bizonyítottan pozitív mintát használtunk, míg Usutu vírus ellen előzőleg immunizált nyulak savóit használtunk. Rámérés után egy egész éjszakán át inkubáltuk a lemezeket 4°C-on nedves kamrában.

Másnap a mosási folyamatot követően konjugátumot mértük a sejtekre. A konjugátumok (Bethyl Laboratories, Inc, USA) fajspecifikus ellenanyag ellen termelt ellenanyagok, amik fluoreszkáló festékkel (fluorescens izotiocianát, FITC) vannak jelölve. Amennyiben a vizsgált savómintákban előfordulnak ellenanyagok, azok specifikusan kötődnek a vírussal fertőzött sejtekhez és ezután a konjugátum hozzá tud kötődni az ellenanyagokhoz.

Előírt inkubációs idő és további mosások után a lemezeket lefedtük PBS tartalmú glicerinnel, majd fluoreszcens mikroszkóppal kiértékeljük a mintákat.

II.2.3 Haemagglutináció-gátlási próba (HAG)

A haemagglutináció-gátlási próba gyakori módja az indirekt víruskimutatásnak. A flavivírus nemzetségbe tartozó vírusok a liba vörösvérsejteket képesek agglutinálni. A fertőzésen átesett vérsavóban található specifikus ellenanyagok meggátolják a vírus hatására létrejövő haemagglutinációt, így a vörösvérsejtek képesek leülepedni a mikrotiter lemez aljára. Ha nem tartalmaz antigéneket a savó, akkor a vírusantigének megkötik a felszínükön a vörösvérsejteket és így kialakul a vérsejtek közötti hálós szerkezet, ami megváltoztatja a vörösvérsejtek ülepedési képét homorú felszínű lemezen.

A vizsgálat egyik előkészítő lépéseként a haemagglutináló reakciókhoz felhasznált antigént előzőleg az OEK BSL3-as biztonsági fokú laboratóriumában vírussal oltott szopós egéragyak feldolgozásával állítottuk elő, majd -80°C-on hűtve tároltuk felhasználásig. Az antigén mennyiségét titrálással határoztuk meg optimális pH-n. Ez WNV és TBEV esetében 6,4 pH, Usutunál 6,2 pH-t jelent. Ezután hígítási sort készítettünk az antigénekből Takátsy lemezen, majd vörösvértesteket adtunk a cellák tartalmához és inkubáció után,

kontroll vörösvértesteket tartalmazó cellák mellett leolvastuk az eredményt és meghatároztuk az antigén megfelelő munkahígítását. Az antigént ellenőrzésképpen, hogy valóban tartalmazza a 4 haemagglutináló egységet, másnap visszatitráltuk.

A próbához használt vért egy kísérleti célokra tartott liba szárnyvénájából vettük le, 2ml alvadásgátló folyadékot (Alsever) tartalmazó fecskendőbe, majd centrifugálással mostuk. A vért 1:40 hígításban fiziológiás sóoldatban lehet tárolni későbbi felhasználásra is.

A haemagglutináció-gátlás technikájának kivitelezésekor V-alakú Takátsy-féle lemezt használtunk. A nem specifikus gátlás megelőzésére minden esetben szükséges az aspecifikus inhibitorok eltávolítása a vizsgálandó vérsavókból, kaolin hozzáadásával. ezután a kezelt savókba egy-két csepp tömény libavért csepegtettünk, inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk a felülúszót, ami az ellenanyagot tartalmazza, és tiszta kémcsőbe öntöttük.

A lemez minden sorába a puffer folyadék felvitele után az első sorba bemértünk a vizsgálandó savókból, majd kettes alapú hígítási sorokat készítettünk belőlük. Ezt követően a kontroll sort kihagyva minden cellába 4 egység antigént mértünk be. Az inkubáció után bemértük az elegyekbe a megfelelő vérmennyiséget, és vérkontroll mellett egy órán át állni hagytuk a lemezeket, majd elbíraltuk az eredményt. A savó ellenanyag titerének az értéke a savónak az a legmagasabb hígítása, ahol még gátolja a vírus által okozott haemagglutinációt.

II.2.4.: Vírusneutralizációs próba

A vírusneutralizáció lényege, hogy a vírus nem képes fertőzni a sejteket, ha a vizsgált savómintában jelen vannak a semlegesítő ellenanyagok.

A teszt során a 96 lyukú lemez rekeszeibe a tápfolyadékot mértük, majd a vizsgálandó savókból kettes alapú hígítási sort hoztunk létre. Ezekre egységesen 100 TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose 50, a beoltott szövettenyészetek 50%-át fertőző dózis) vírusszupenziót pipettáztunk és inkubáltuk a mintákat. A lemez vírus kontroll részén a vírus visszatitralásához tízszeres hígítási sort készítettünk. A következő lépésben a Vero sejteket pipettáztunk a lemezre, majd 3-5 nap inkubáció után mikroszkóp alatt bíraltuk az egyes hígításoknál a vírusok által okozott sejtkárosító hatásokat (cytopathic effect, CPE). A savónak az a legnagyobb hígítása, ahol még képes neutralizálni a vírus hatását, adja a neutralizációs titerét.

III. EREDMÉNYEK

A Magyarországon is egyre nagyobb jelentőségű nyugat-nílusi fertőzések legpontosabb indirekt diagnosztikai módszerének megtalálásához négy szerológiai eljárást vetettünk össze. A vizsgálatba összesen 462 vérsavót vontunk be, melyek 2011 és 2013 között az ország különböző pontjairól érkeztek.

Első körben a legelterjedtebben használt kompetitív **IgG ELISA** kittel néztük meg a mintákat, amellyel a WNV E burok antigénje ellen kerestünk a savókban ellenanyagot. A minták vizsgálatának összesítő eredményét a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: IgG ELISA-val vizsgált savók száma

	Vizsgált mintaszám	Pozitív mintaszám	%-os pozitivitási arány
galamb	171	33	19,3
kékvércse	141	35	24,8
túzok	27	14	51,8
héja	5	0	0
parlagi sas	1	1	100
ló	25	5	20
kutya	92	32	34,8
összesen	462	120	26

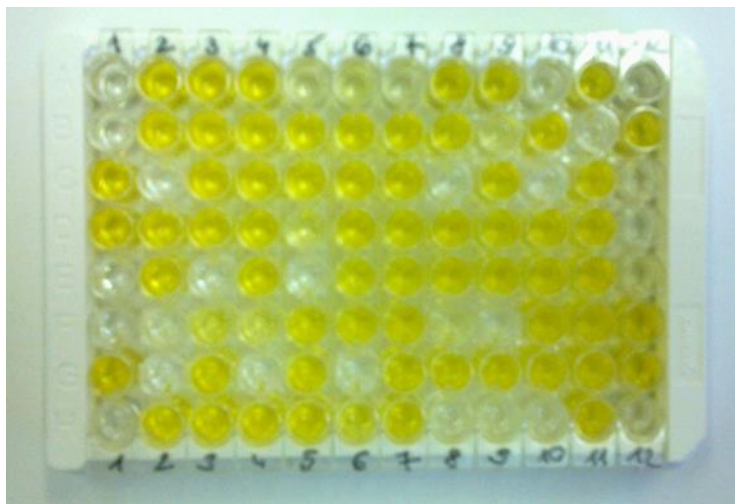
A gyártó által meghatározott validitási értékek alapján valamennyi elvégzett vizsgálat validnak volt tekinthető.

A 2011-ben végzett vizsgálatban 51 galamb, 141 kékvércse, 27 tűzok, 5 héja, egy parlagi sas és 18 ló mintája szerepelt (243 minta). Ezek közül 72 minta bizonyult pozitívnak. A 35 pozitív, a vizsgálat szerint WNV fertőzésen átesett kékvércse mindegyike Kardoskútról származott. A madarak közül a többi pozitív eredményt 19 dévaványai, körösladányi és kardoskúti galamb, 14 tűzok valamint a szintén Körösladányból származó parlagi sas mintája adta. Ezek közül az egyik körösladányi galamb idegrendszeri tüneteket is mutatott. A héják közül mindegyikük negatív eredményt mutatott. A vizsgált lovak közül két állatnál kaptunk pozitív eredményt.

2012-ben összesen 41 savó szerepelt a vizsgálatokban: 38 galamb, valamint 3 ló. A madarak közül csupán 1 pozitív és 3 kétesnek értékelhető eredményt kaptunk, amiknek vizsgálatát ezért később megismételtük. Akkor negatív eredményeket kaptunk. Egy ló mintája lett pozitív. A pozitív galamb mintája az Ócsai Madárvártából származott, ott jártunkkor az állatnál semmilyen tünetet nem tapasztaltunk. A kétes állatok mintái Dévaványáról származtak, a ló vérének Üllőről hoztuk.

A következő vizsgálatokat 2013-ban végeztük 82 galamb és 4 ló bevonásával. Pozitív eredményt tapasztaltunk 13 galamb és egy ló esetében. A galambok Csepelről, valamint Körösladányból, a ló mintája pedig Üllőről származott.

Ebben az évben került sorra 92 db kutyasavó vizsgálata is (1. ábra), amelyek vizsgálata során 32 bizonyult pozitívnak. A kutyák az ország számos pontjáról, 2012 júniusa és novembere közt kerültek be a Szent István Egyetem Kisállat klinikájára.



1. ábra: kutyasavók ELISA vizsgálata

Azoknál a kutyáknál, ahol pozitív eredményt tapasztaltunk, kíváncsiak voltunk a kutyák élőhely körülményeire is, hiszen fontos lehet az ismerete annak, hogy találkozhattak-e a vizsgált vírusok vektorainak valamelyikével. A gazdától kapott információk alapján mindegyik kutya járt már élete során városon kívüli zöld környezetben, így lehetséges, hogy valahol kullancscsípés érte őket. Tehát nem zárható ki csak ezen az egy teszt alapján, hogy nem kullancsencephalitis vírusfertőzésen estek át valamikor korábban. 7 állatnál kullancscsípésről is beszámoltak az elmúlt időszakban. További 5 állatnál babesiosist diagnosztizáltak az állatorvosok. Egy állat Horvátországban is járt gazdájával. Három állat esetében tudtuk meg biztosan, hogy rendszeresen jár vízpartra, ezért nagyobb az esélye hogy szúnyogcsípés érte őket. Kilenc esetben szerepelt a kórtörténetben láz, vagy hőemelkedés. Két állattal kapcsolatban írtak le idegrendszeri tüneteket, de egyiküket fejtrauma érte, így nem zárható ki, hogy az onnan szerzett sebesülések a kiváltó okai az elváltozásnak. A másik ebnél izomrángásokat regisztráltak.

Tekintve a nagyszámú pozitív eredményt és a kutyák kórelőzményében leírtakat, a TBE vírussal való keresztreakció kizárására elvégeztünk egy TBEV ELISA vizsgálatot is.

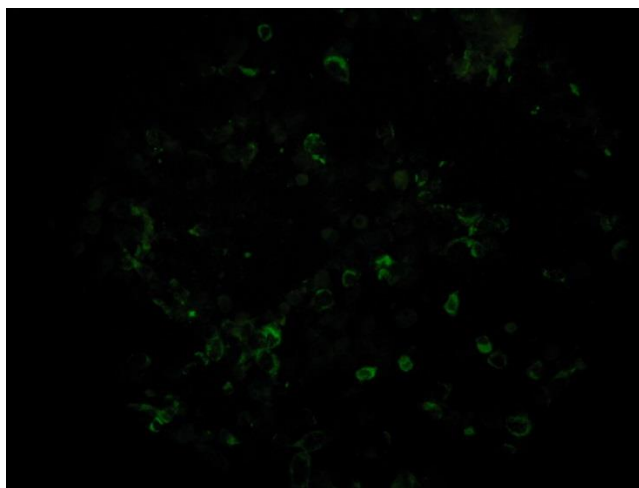
Az így elvégzett teszt szerint valamennyi, a további vizsgálatokban résztvevő kutya negatívnak mondható TBE vírusra nézve az ELISA vizsgálat alapján.

Tekintve a nagyarányú szeropozitivitást és mivel a *Flavivirus* nemzetségen belül gyakoriak a szerológiai vizsgálatoknál megfigyelt keresztreakciók, kíváncsiak voltunk, hogy mennyire specifikusak a kapott eredmények. Ezért további vizsgálatokat végeztünk, összehasonlítva az ELISA módszert másik három szerológiai teszttel.

A vizsgálatok következő részében az ELISA által pozitívnak ítélt minták közül választottuk ki a nagyobb OD aránnyal rendelkezőket, illetve az összehasonlító vizsgálatokba kontroll minták céljára korábbi évek során már pozitívnak bizonyult állatoktól való mintákat is felhasználtunk. Így a vizsgálatokba 2 kékvércse, egy galamb, 22 kutya, 12 ló, valamint 2 fehér gólya és egy karvaly mintáit vettük bele, összesen tehát 40 mintán végeztük el a másik három szerológiai diagnosztikai próbát is.

Az **immunfluoreszcenciás (IF)** vizsgálatnál azt szerettük volna megtudni, hogy az előző eredmények specifikusnak mondhatóak-e nyugat-nílusi vírusra, ezért a másik két Magyarországon előforduló flavivírus, az Usutu vírus és a kullancsencephalitis vírus antigénjeit tartalmazó lemezeket is használtunk.

Az IF vizsgálatnál a lemezekre kettes alapú hígítású savókat csepegtettünk, majd a hozzájuk kötött ellenanyag ellen termelt, festékkel jelölt specifikus ellenanyag segítségével fluoreszcenciás mikroszkóp segítségével elbíraltuk az eredményt. Az 2. ábrán egy WNV ellen pozitívnak bizonyult savóminta fluoreszcens képe látható.



2. ábra: WNV pozitív minta immunfluoreszcenciás képe

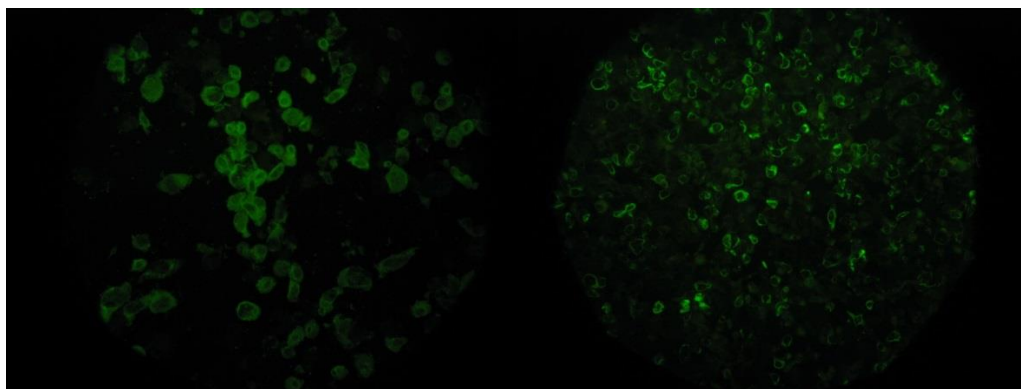
Mind a három vírus elleni próba eredményeire igaz, hogy a vizsgált savók gyengébb mértékben jeleztek pozitivitást, mind az ELISA próbánál. WNV ellenében a titerértékek 1:10 és 1:320 között mozogtak, TBEV ellenében 1:10 és 1:320, USUV ellenében pedig 1:10 és 1:80 között. Mivel a felhasznált savók mindegyik vírus elleni

vizsgálatnál pozitivitást jeleztek, nagyon erős keresztreakcióról beszélhetünk. WNV ellenanyagokra vizsgálva 8 minta esetében, TBEV ellen 19 esetben, USUV ellen 13 esetben tapasztaltunk keresztreakciót. A vizsgált savók titerértékeit a 3. ábra szemlélteti.

Szerológiai keresztreakciók tisztázására irányuló vizsgálatoknál az az elfogadott elv, hogy akkor tekinthető az adott vírussal szemben specifikusnak a reakció, ha legalább 2 hígítással magasabb (négyeszeres) ellenanyag-titer eredményt mutat a specifikus antigénnel szemben a savó, mint a többi vizsgált, rokon antigénnel. Ez az IF próbáknál WNV és TBEV összevetésében 15 mintára volt igaz. Ez állatfajokra és titer különbségekre lebontva 5 hígításnyi titer eltérést jelentett a két gólya esetében. A karvaly savója 4 hígításnyi eltéréssel volt WNV pozitív. Egy lóé, és két kutyáé 3 hígításnyi titer különbséget mutatott. A ló Budapest környékéről származik, valamint az egyik kutya is Budapesten élt. 2 hígításnyi titer különbséget 9 esetben észleltünk 3 kutya és 6 ló esetében. A kutyasavók Galgamácsáról és Füzesabonyból származtak. A lovakat Budapest környékén tartották.

A minták közül csupán nyolcnál észleltünk csak egy hígításnyi titer eltérést WNV irányába, illetve 16 esetben nem volt különbség a két vírus antigénre adott reakciója közt. Egy német dog egy hígítás titer eltéréssel pedig kullancsencephalitisre bizonyult pozitívnak.

WNV és USUV összevetésében 13 esetben tapasztaltunk egyértelmű WNV-re adott pozitív válaszreakciót, azaz minimum két hígításnyi titer eltérést. A két gólya jelen esetben is 5 hígításnyi eltérést mutatott, a karvaly itt is négyet, emellett szintén 4 hígításnyi titer eltérés volt egy kutyánál is. Két hígításnyi titer különbséget találtunk 9 állat savójánál: 3 lóról és 6 kutyáról van szó, és egyik esetben az Usutu vírus ellen találtunk nagyobb mértékű ellenanyag szintet. Csupán egy hígításnyi titer különbséget adott 14 minta, ezek közül 2 ló és 2 kutya az Usutu vírus ellen mutatott pozitívabb eltérést. A lovak Budapest környékéről, a kutyák egyike Mogyoródról származik. Nem volt titerbeli különbség 13 mintánál, tehát ezeknél nem lehetett ez alapján a vizsgálat alapján megállapítani, hogy melyik vírussal fertőződtek korábban.



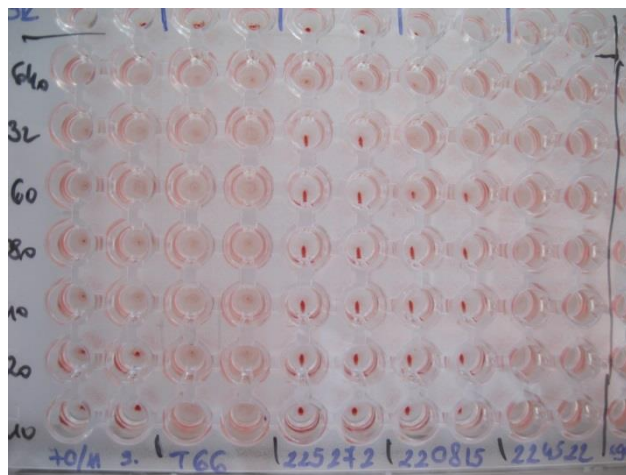
4. ábra: Usutu és TBEV pozitív minta fluorescens mikroszkópos képe

Összesen az volt megfigyelhető, hogy az WNV pozitív eredményeknél mind a TBEV, mind az Usutu vírussal végzett összehasonlító vizsgálatoknál mindössze 10 savónál lehetett egyértelműen meghatározni, hogy WNV fertőzésen eshettek át. Ezek két gólya, egy karvaly, 3 ló és 4 kutya savómintái voltak, ami a 40 vizsgálati minta számát tekintve 25%-os pozitivitásnak mondható eredmény az ELISA-val való pozitivitáshoz viszonyítva. A pozitív eredmények képét a 4. ábra szemlélteti.

A harmadik általunk vizsgált szerológiai módszer a **haemagglutináció-gátlási próba (HAG)**. Ebben az esetben pozitívnak tekinthető egy eredmény, ha a savóban van elég ellenanyag, ami gátolja a vírus haemagglutináló tulajdonságát, így a cellák aljára le tudnak üledni a vörösvértestek. Az 5. ábrán a vizsgálatok egy részének eredménye látható. Ennél a próbánál is számos esetben figyelhattunk meg keresztreakciókat mindhárom vírus elleni ellenanyagokra való vizsgálatkor. A HAG próbánál is akkor mondható egyértelműen, hogy a vizsgált WNV ellen termelődtek az ellenanyagok, ha az ellenanyag szintek közt legalább 2 hígításnyi titer a különbség.

Ilyen esetet WNV és TBEV összehasonlításában 35 mintánál figyeltünk meg.

Hat hígításnyi titer ellenanyagszint különbség volt 3 kutyánál (a már korábban is említett füzesabonyi és galgamácsainál). 5 hígításnyi eltérést mértünk 4 esetben, szintén kutyáknál. 4 hígításnyi titer különbség volt a karvalynál, egy kékvércsénél, a két gólyánál, 3 lónál valamint 10 kutyánál. 3 hígításnyi titer eltérés volt 7 esetben: egy galambnál, 4 lónál és két kutyánál. Két hígításnyi titer eltérést tapasztaltunk továbbá 4 savónál, amik egy kékvércséhez, egy lóhoz és két kutyához tartoztak. Ezen kívül 5 savónál észleltünk csupán egy hígításnyi titer eltérést.



5. ábra: Haemagglutináció gátlási próba eredménye WNV antigének ellen (70/11 9. és T66-os minták lovaktól, míg a 225272, 220815, és a 224522 minták kutyáktól származtak)

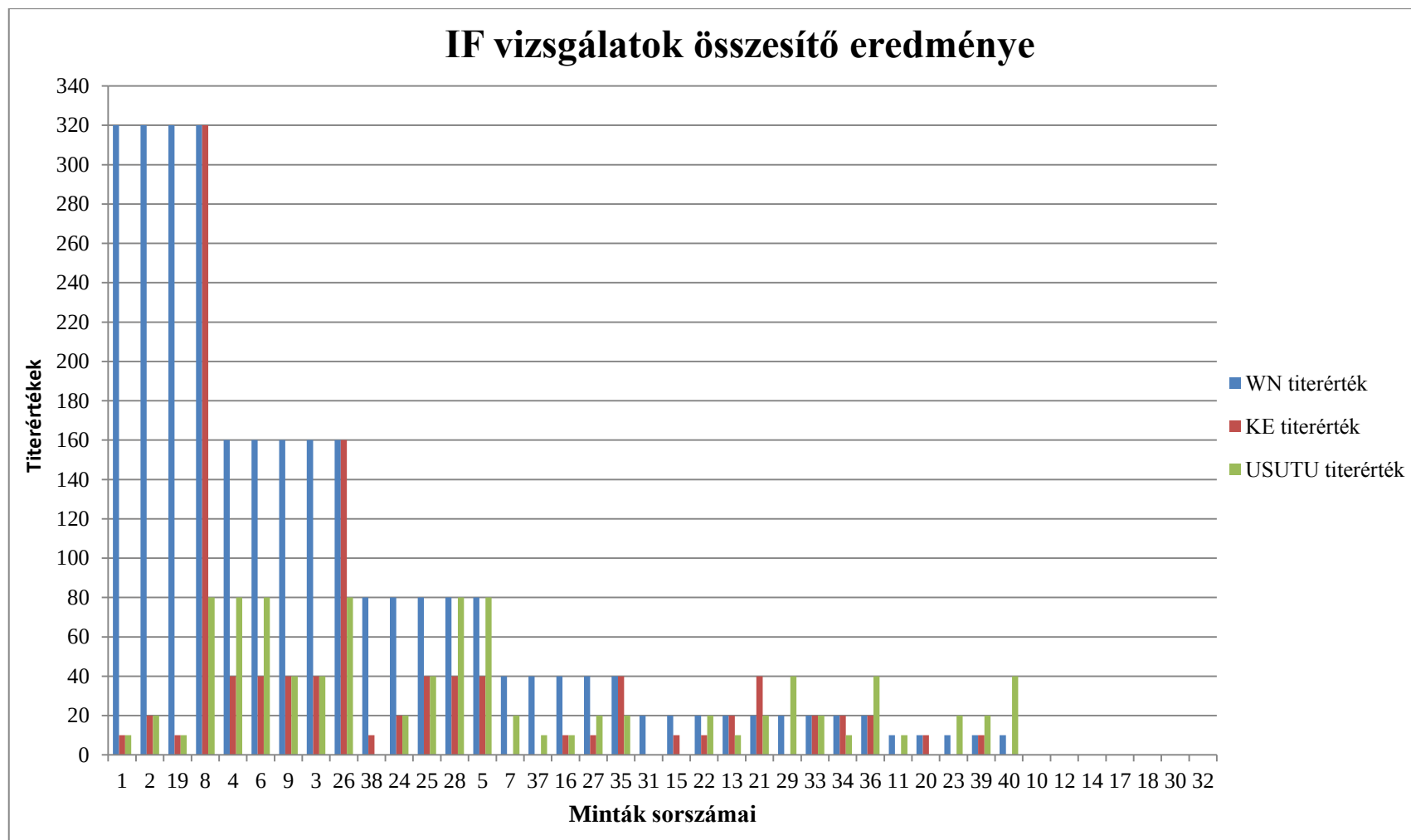
A HAG próbával WNV-re pozitív savók közt Usutu vírus ellenében egyértelmű pozitivitásról 18 esetben számolhatunk be. Négy hígításnyi titer különbséget találtunk két savónál. A minták egy gólyától és egy kutyától származtak. Három hígításnyi volt a különbség 7 esetben: 2 galambnál valamint 5 kutyánál. Két hígításnyi titer eltérést figyeltünk meg 9 savó esetében. Ezek egy karvaly, egy kékvércse, egy galamb egy ló és 5 kutya voltak. 12 esetben volt csak egy hígításnyi titer az eltérés, 10 mintánál nem találtunk titerbeli különbséget. 2 kutyánál egy hígításnyi titerrel Usutu vírus ellen találtunk több ellenanyagot a savójukban.

Jelen próbánál a másik két flavivírushoz képest WNV elleni egyértelmű pozitivitást 18 minta esetében írtunk le, ez 45%-os eredmény az ELISA-hoz viszonyítva. Az eredmények összesítő grafikonját a 6. ábra szemlélteti.

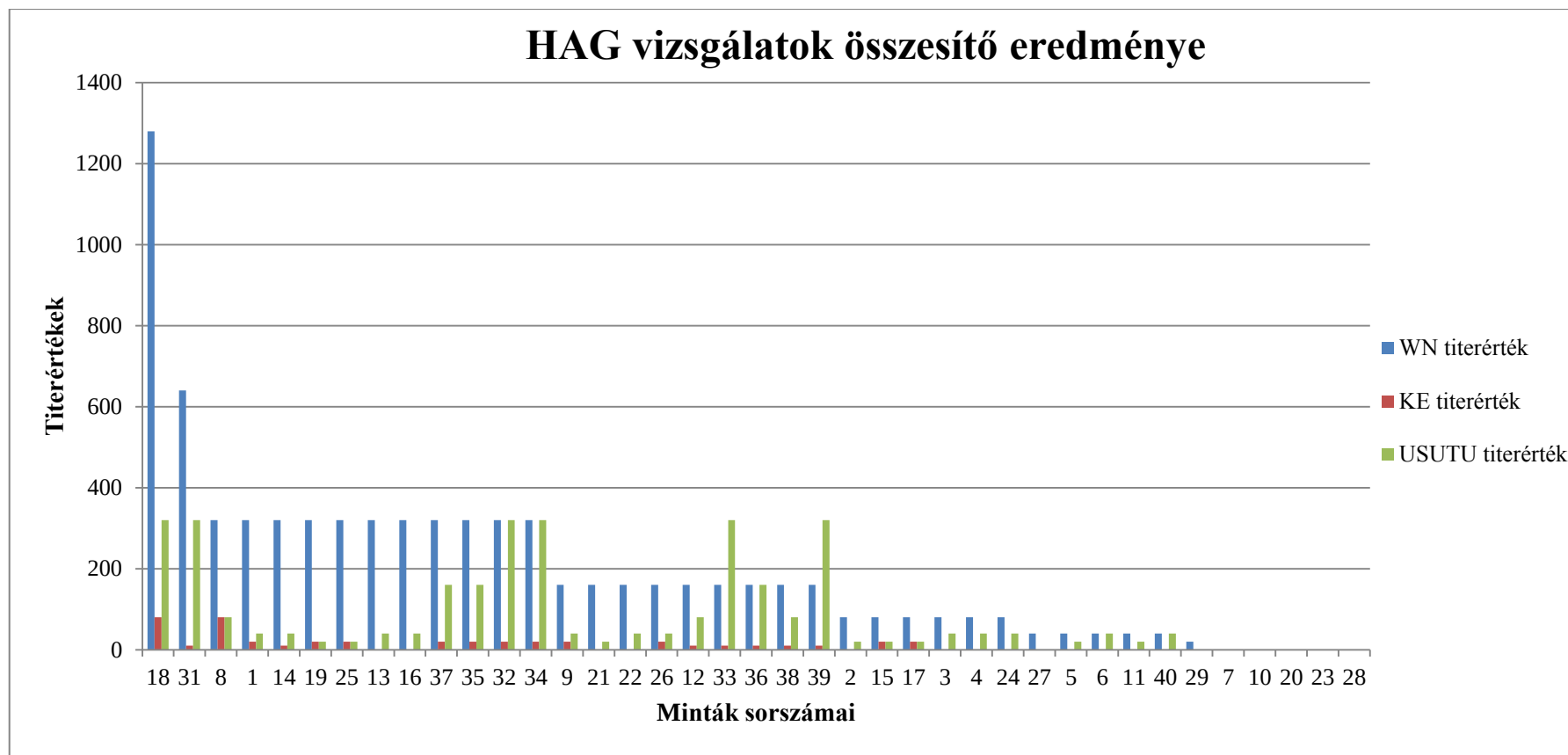
A negyedik, a **vírusneutralizációs próba** során a savóminták neutralizációs titerértékét mértük kettesalapú hígításban, a vírus sejtekre gyakorolt károsító hatásának tekintetében.

A vizsgálatban WNV és USUV elleni neutralizáló ellenanyagok jelenlétét vizsgáltuk. TBEV esetében azért nem tudtuk elvégezni a vírusneutralizációs próbákat, mert a laboratóriumban használt Vero sejtvonalakon nem mutat sejtkárosító hatást az intézetben rutinszerűen használt vírustörzs. A próbák során az előző három módszerhez képest kevesebb savónál találtunk pozitív eredményt. WNV ellenében pozitívnak tekinthető minták között a titerértékek 1:20 és 1:1280 között mozogtak, USUV ellenében pedig 1:20 és 1:320 között. Nyugat-nílusi vírus ellen termelődött ellenanyagokat összesen 25 mintánál tudtunk kimutatni. Azonban az eredményeket összehasonlítva az Usutu vírus elleni vizsgálatokkal összesen 19 állat mintája volt WNV-ra pozitívnak tekinthető az észlelt

(legalább két hígításnyi titer) ellenanyagszint különbségek miatt (3 madár, 3 ló és 13 kutya mintái). Az Usutu vírus ellen végzett vizsgálatok során összesen 8 mintánál tudtunk kimutatni ellenanyagokat, 2 kutya esetében az eredményeket összehasonlítva a WNV vírusneutralizációs eredményekkel Usutu vírus elleni ellenanyagokat sikerült kimutatni 1:40 és 1:80 titerértékekkel, míg egy esetben nem specifikus reakciót tapasztaltunk. Egy fehér gólya mintáját nem tudtuk bevonni a vírusneutralizációs vizsgálatokba elégtelen mennyiségű savó miatt. Keresztreakciót jóval kisebb számban figyeltünk meg a vírusneutralizációs vizsgálatok során.



3.ábra: Az ábrán az összehasonlító vizsgálatokba bevont 40 savó ellenanyagszint értékeit tüntettük fel a 3 vírussal végzett vizsgálatok alapján. Legalább 2 hígításnyi titereltérés különbséget kaptunk az 1., 2., 3., 9., 16., 19., 24., 31., 37., és a 38. sorszámú savómintáknál



6.ábra: Az ábrán az összehasonlító vizsgálatokba bevont 40 savó ellenanyagszint értékeit tüntettük fel a 3 vírussal végzett vizsgálatok alapján. Legalább 2 hígítási titereltérés ellenanyagszint különbséget diagnosztizáltunk az 1., 2., 8., 9., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 21., 22., 25., 26., 27., és a 29.. sorszámú minták esetében

IV. MEGBESZÉLÉS

A nyugat-nílusi vírus egyre szélesebb körben terjed el Európa szerte. Hazánkban a vírus jelenléte ma már endémiásnak mondható, hiszen a kettes genetikai vonal 2004-es felbukkanása óta minden évben regisztrálnak megbetegedéseket (Bakonyi *et al.*, 2013). Súlyosabb tüneteket és elhullást főleg madarakban és lovakban észleltek. A betegségnek, lévén zoonózis, jelentős közegészségügyi kockázata van. Az European Centre for Disease Prevention and Control jelentése szerint 2014 október közepéig 11 humán WNV-hez köthető megbetegedést jelentettek az ország középső és dél-keleti régióiból.

A fertőzéshez társuló rövid virémiás szakasz miatt gyakran csak közvetetten lehet bebizonyítani, hogy egy állat vagy ember átesett a fertőzésen, tehát szerodiagnosztikai módszerek használata szükséges (Hayes *et al.*, 2005).

Magyarországon a WNV mellett másik két, a flavivírus nemzetségbe sorolt vírus, a kullancsencephalitis vírus és az Usutu vírus is jelen van, ami a diagnosztikai vizsgálatok során nehézségeket okoz, mivel a flavivírusok között nagyarányú keresztreakciók figyelhetők meg.

Annak kiderítésére, hogy a jelenleg használt ellenanyag-detektálási módok közül melyik a legspecifikusabb a nyugat-nílusi vírusra nézve, a kutatásunk során négy diagnosztikai módszert hasonlítottunk össze. Ezek a legismertebb és leggyakrabban használt kompetitív IgG ELISA, az indirekt immunfluoreszcenciás eljárás a haemagglutináció-gátlási és vírusneutralizációs próbák voltak. Az első három módszer viszonylag egyszerű, és a vizsgálatok gyorsan kivitelezhetők, illetve a konkrét vizsgálati szakaszban már nem igényelnek BSL3 biztonsági szintű laboratóriumot, valamint az ELISA kit kereskedelmi forgalomban is kapható.

A WNV szerológiai felmérő vizsgálataink céljára kórtani vizsgálatok nélkül kiválasztott mintákat használtunk fel, összesen 462-t, melyek az ország különböző pontjairól érkeztek és más-más állatfajokból származtak. Az állatok közt szerepelt 6 vadmadárfaj, valamint lovak és kutyák.

Legalább 2 hígításnyi titer ellenanyagszint különbség kell ahhoz, hogy egyértelműen meg lehessen állapítani, hogy valóban az adott vírus ellen termelődtek a kimutatott ellenanyagok. Az összehasonlító vizsgálatainkba bevont 40 savóminta eredményei arra utalnak, hogy a négy vizsgálat során az egyes vírusok között csak kis

arányban tapasztaltunk egyértelmű, 2 hígításnyi titer kitevőnél nagyobb eredménykülönbséget.

Az indirekt immunfluoreszcenciás tesztnél a savókban megtalálható ellenanyagokat az ellenük termelt specifikus, festékkel megjelölt ellenanyagok segítségével tudjuk kimutatni. Összesen a vizsgált 40 ELISA pozitív savó közül csak 10-ről lehetett egyértelműen megállapítani, hogy WNV fertőzés ellen termelt ellenanyagok találhatók bennük, nem pedig TBEV-vel vagy USUV-val fertőződtek előzetesen az állatok, tehát gyakran észleltünk keresztreakciót. A pozitív minták közt három madár, három ló és négy kutya mintája szerepelt.

A haemagglutináció-gátlási próbánál a szintén 40 ELISA pozitív savó közül 18 mintáról állapítottuk meg, hogy bennük WNV ellen termelődtek ellenanyagok, ezek 6 madár, 2 ló és 10 kutya mintái voltak. Itt is a két hígításnyi titer eltérést mutató savók voltak nagyobb számban, ami a határértéknek tekinthető, tehát a próbák bizonytalanságát és a keresztreakciók meglétét tételezi fél. A vizsgált minták több mint a felénél nem volt egyértelmű az eredmény, azaz hogy melyik vírus ellen termelődhetek korábban az ellenanyagok.

A vírusneutralizációs próba az előző vizsgálatokhoz képest időigényesebb és BSL-3 biztonsági laboratórium szükséges az elvégzéséhez, viszont a vizsgálataink során pontosabb eredményeket kaptunk ezzel a módszerrel. Kevesebb aspecifikus reakciót és keresztreakciót figyeltünk meg, hiszen 19 mintánál jegyeztünk egyértelmű WNV pozitivitást és keresztreakciót csak 4 esetben láttunk. A módszerek eredményeit összevetve csak 3 savó (7,5%), egy madár és két kutya mintája lett mind a négy vizsgálat során egyértelműen WNV pozitív.

Összességében elmondható, hogy az ELISA eredményekhez képest az IF és HAG próbáknál jóval kevesebb esetben kaptunk olyan eredményt, ami azt igazolná, hogy az állatok valóban nyugat-nílusi vírusfertőzésen estek át. A vizsgálatok során szinte minden esetben tapasztaltunk keresztreakciót is, vagyis mind nyugat-nílusi-, mind kullancsencephalitis-, és Usutu vírus ellen is mutattak a minták ellenanyagszintet eltérő mértékben. Gyakoribb keresztreakciót figyeltünk meg WNV és Usutu vírusok között. A vírusneutralizációs vizsgálatok során az előbbi 3 módszerhez viszonyítva sokkal kevesebb esetben tapasztaltunk keresztreakciót, ami ennek a módszernek a megbízhatóságát igazolja.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a fent említett módszerek közül az egyszerűsége és gyorsasága miatt leggyakrabban használt ELISA vizsgálat elsősorban nagyobb számú minta felmérésére, szűrésére alkalmas. A pozitívnak ítélt mintákat

neutralizációs próbával is meg kell vizsgálni az eredmények hitelesítése, a keresztreakciók kizárása céljából. Az IF és HAG próbák hátránya, hogy gyakran mutatnak keresztreakciót a vizsgált flavivírusok esetében. Ugyan a vírusneutralizációs módszer kivitelezése speciális laboratóriumot igényel valamint minimum 5 nap szükséges a diagnózis felállításához mégis ez a vizsgálat adja a legbiztosabb eredményt a nyugat-nílusi vírus szerológiai diagnosztizálása során. A vizsgálatok során nagyszámú kutya savó vizsgálatakor találtunk jelentős titeremelkedést. Ezek alapján felmerült a kérdés, hogy a kutyáknak lehet-e szerepe a WNV fenntartásában, vagy akár az embereket érintő megbetegedések előrejelzésében.

Európában már használnak állatokat a vírusok terjedésének megfigyelésére és az emberi megbetegedések indikátoraként. Olaszországban például egy átfogó program keretén belül, ami a vektorok által közvetített vírusok terjedésének útját hivatott megfigyelni, 2001 óta tyúkokat (ú.n. sentinel állatokat) vizsgálnak olyan területek határában, ahol korábban felbukkantak vagy kimutattak flavivírusokat. Rendszeresen vesznek vérmintát az állatoktól, és indirekt ELISA-val, illetve plak-redukciós neutralizációs próbával vizsgálják az esetleges antitestek szintjét TBEV, WNV és USUV ellen. Ennek segítségével előrejelzést lehet kapni arról, hogy milyen arányban várhatóak az adott vírusok által okozott, embereket érintő megbetegedések az adott régiókban (Lelli *et al.*, 2008).

Sziciliában is készült egy retrospektív felmérés 2009. január és 2010 szeptembere között annak felderítésére, hogy vajon már korábban is jelen volt-e a szigeten a vírus (mivel az ezt megelőző időszakban klinikai tüneteket mutató helyi lovakat találtak), illetve bejutott-e a városi területekre is, veszélyeztetve az ott élő embereket. 182 kutyából vett vérmintát dolgoztak föl szerológiai diagnosztikai módszerrel, vírus neutralizációs próbával. 11 kutyát találtak pozitívnak, 1:10-1:80 titerrel (Purpari *et al.*, 2012).

A kutyák nyugat-nílusi vírusfertőzésre való fogékonyságát alátámasztja egy korábbi dél-afrikai tanulmány is (Blackburn *et al.*, 1989), ahol 377 kutyasavót vetettek alá szerológiai vizsgálatoknak, és 37%-ban WNV pozitivitást találtak. Ez az eset is jól tükrözi, hogy bár a kutyák a vírus járványtani ciklusában alkalmi gazdáknak tekinthetők, mindenképpen érdemes figyelembe venni a kutyák esetleges indikátor szerepét a vírus megjelenésében és az emberi megbetegedések előre jelzéséhez.

A vizsgálatainkba bevont kutyák mintáinál a kórelőzményben csak néhány esetben szerepel a láz, kiütésük, és egyértelműen a fertőzés miatt kialakult idegrendszeri tünetük nem volt ezeknek az állatoknak. Kutyák gazdáinál és családtagjaiknál sem tapasztaltak semmilyen tüneteket. Közép-Európa egyes országaiban, közöttük Magyarországon is a

kullancsencephalitis vírus a legrégebb óta ismert és a leginkább elterjedt flavivírus. Emberek körében a TBE-elleni szeropozitivitás arányát tovább növeli az, hogy számos országban átfogó vakcinázási programot indítottak, vagy ajánlottak, mint például Ausztriában, ahol a program végére a lakosság 88%-a kapott oltást. A környező országokban történt felmérések alapján 2003 és 2007 között több humán megbetegedést regisztráltak Csehországban (666 az 5 éves átlag), Szlovéniában (261/év az 5 év alatt), Szlovákiában (66), Horvátországban (27) míg Magyarországon az 5 év alatt a szeropozitivitási arány 1 fő a 200000-ből (Süss *et al.*, 2008).

Csehországban végeztek felmérő vizsgálatot kutyák körében is kullancsencephalitisel való korábbi fertőződés megítélésére. Savómintákat vizsgáltak Brno környékéről, Morvaország és Bohémia területeiről haemagglutináció-gátlási próbával WNV és TBE ellen. Az 5 pozitív állat közül háromnál klinikai tünetek, encephalitis vagy meningoencephalitis is jelentkeztek. Egyik kutyánál a próba WNV-re is magas eredményeket adott, de valószínűsíthetően keresztreakcióról volt szó (Klimes *et al.*, 2001).

Átgondolva azt, hogy a vizsgált kutyák egyharmadánál WNV elleni ellenanyagot mutattunk ki a vizsgálataink során, valamint néhányánál a titerérték különbségek arra utaltak, hogy tünetmentes vírusfertőzésen estek át, figyelembe kell venni, hogy a kutyák indikátorai lehetnek a vírusfertőzések terjedésének, vagy az emberi megbetegedések veszélyforrásainak felméréséhez.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Flaviviridae család *Flavivirus* nemzetségébe számos köz- és állategészségügyi jelentőségű vírus tartozik. Ezek közül Magyarországon a nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV), a kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis vírus, TBEV) és az Usutu vírus (USUV) előfordulása ismert. A flavivírusoknak közös felszíni antigénjeik vannak, és emiatt egyes szerológiai diagnosztikai próbák során keresztreakciók figyelhetők meg a rokon flavivírusok között, melyek megnehezítik az adott vírus pontos beazonosítását.

Jelen kutatás során 2011 és 2013 között, Magyarország különböző területeiről gyűjtött savóminták összehasonlító vizsgálatát végeztük el ELISA, indirekt immunfluoreszcencia (IF), haemagglutináció-gátlási próba (HAG) és vírusneutralizációs (VN) eljárásokkal, azzal a szándékkal, hogy megtaláljuk a nyugat-nílusi vírusfertőzés diagnosztizálására legbiztosabban használható szerológiai módszert. Összesen 462 savó mintát vizsgáltunk meg WNV kompetitív IgG ELISA-val, amelyek közül 120 bizonyult pozitívnak: 83 madár, 5 ló valamint 32 kutya mintája. Az összehasonlító vizsgálatokba 40, WNV ELISA-val pozitívnak talált savót vontunk be (6 madár, 12 ló és 22 kutya mintája). Ezeket IF és HAG módszerrel mindhárom vírus antigénjeivel, VN módszerrel WNV és Usutu vírus antigénnel is megvizsgáltunk. IF módszerrel 10, HAG eljárással 18, míg VN alkalmazásával 19 mintát találtunk WNV pozitívnak. Az eredmények tükrében elmondhatjuk, hogy bár az ELISA, IF, és HAG módszerek kivitelezése egyszerűbb és gyorsabb, mint a VN próba, ezek a szerológiai vizsgálatok a keresztreakciók miatt csak előzetes felmérésre alkalmasak. A pozitív eredmények igazolására el kell végezni a VN vizsgálatokat is. A megvizsgált kutyák egyharmadából flavivírus-elleni ellenanyagokat mutattunk ki. Ezek közül néhányánál a titerérték eltérések arra utalnak, hogy tünetmentes nyugat-nílusi vírusfertőzésen estek át. Ezért a kutyák indikátorok lehetnek a WNV előfordulásának és az emberi fertőződés veszélyének felméréséhez.

VI. SUMMARY

Several important human and animal pathogen viruses belong to the family of *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. Three of them have been detected in Hungary: the West Nile virus (WNV), the Tick-borne encephalitis virus (TBEV) and the Usutu virus (USUV). Since flaviviruses have common surface antigens, cross-reactions can be observed during certain serological diagnostic tests, making the exact identification of these viruses difficult.

In this study serum samples were collected in different regions of Hungary between 2011 and 2013. We have conducted serological comparative survey using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IF), haemagglutination inhibition (HI) and virus neutralisation (VN) to find the most appropriate test for WNV sero-diagnosis. By competitive IgG WNV ELISA from 462 samples, 120 proved to be positive against WNV: 83 birds, 5 horses and 32 dogs. For further comparative investigations we have chosen 40 samples which were found positive WNV antibodies in ELISA (6 bird, 12 horse and 22 dog samples), and we have tested their reactivity to all three virus antigens with HI and IF assays, and to WNV and Usutu virus antigens with VN. Using IF assay, 10 samples were found positive, whereas 18 samples were proven positive using HI assay and 19 using VN.

The results of this comparative study indicate that although ELISA, IF and HI assays are faster and simpler methods than the VN, their specificity is rather low, therefore positive results must be validated by VN test.

We have found antibodies against flaviviruses in one third of the tested dog samples. Some of the samples showed at least fourfold higher titres against WNV than against TBEV and USUV; which indicate that these dogs were infected with WNV without any clinical signs. Therefore dogs may be used as indicators to survey the presence of WNV and to assess the risk of human exposure.

VII. IRODALOMJEGYZÉK:

- AUSTGEN, L. E., BOWEN, R. A., Bunning, M. L., Brent, Davis, S., Mitchell, C. L., Chang, G. JJ. 2004: Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 10, no. 1 p. (82-86)
- BAKONYI T., IVANICS E., ERDELYI K., URSU, K., FERENCZI E., WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, N. 2006: Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases* vol.12, no., 4 p. (618–623)
- BAKONYI T., ERDELYI K. 2011: Increased bird of prey mortality in Hungary due to West Nile virus infection. *Ornis Hungarica*, vol.19, p. (1–10)
- BAKONYI T., ERDELYI K., URSU K., FERENCZ E., CSÖRGŐ T., LUSSY, H., CHVALA, S., BUKOVSKY, C., MEISTER, T., WEISSENBOCK, H., NOWOTNY, H. 2007: Emergence of Usutu Virus in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 12, p. (3870–3874)
- BAKONYI, T., FERENCZI E., ERDELYI K., KUTASI O., CSÖRGŐ T., SEIDEL, B., WEISSENBOCK H., BRUGGER K., BÁN E., NOWOTNY N. 2013: Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
- BANET-NOACH C., SIMANOV, L., MALKINSON M. 2003: Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathology*, vol. 32, no.5, p.489-494
- BLACKBURN N. K., REYERST, F., BERRY, W. L., SHEPHERD, A. J. 1989: Susceptibility of Dogs to West Nile Virus: A Survey and Pathogenicity Trial. *Journal of Comparative Pathology*, vol. 100
- BUCKLEY, A., DAWSON, A., MOSS, S. R., HINSLEY, S. A., BELLAMY, P. E., GOULD, E. A. 2003: Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology*, vol. 84, p. 2807–2817. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679615> 2014.09.17
- BUSQUETS N., ALBA A., ALLEPUZ A., ARANDA C., NÚÑEZ J. I. 2008: Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 5, p. 861-863. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2600269/2014.09.15>.
- CAINI, S., SZOMOR K., FERENCZI E., SZÉKELYNÉ GÁSPÁR Á., CSOHÁN Á., KRISZTALOVICS K., MOLNÁR Z., J HORVÁTH J. K. 2012: Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveillance*, vol. 17, no. 12, p.(2012-2018)

- CASALS, J, WEBSTER L.T. 1944: Relationship of the virus of louping –ill in sheep and the virus of Russian spring-summer encephalitis in man. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 79, no. 4 p. (45-63) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2135430/> 2014.09.15
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2000: Guidelines for surveillance, prevention and control of West Nile virus infections: United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 49, p. (25-28)
- DANIELOVA, V., HOLUBOVA J., DANIEL M. 2002: Tick-borne encephalitis virus prevalence in Ixodes ricinus ticks collected in high risk habitats of the south- Bohemian region of the Czech Republic. *Experimental and Applied Acarology* vol. 26 no.1–2 p.(145–151)
- DANIS, K., PAPA, A., THEOCHAROPOULOS, G., DOUGAS, G., ATHANASIOU, M., DETSIS, M., MELLOU, K., BONOVAS, S., PANAGIOTOPOULOS T. 2011: Outbreak of West Nile Virus Infection in Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases* vol. 17, no. 10, p. (1868-1872)
- FORNOSI F., MOLNÁR E. 1954: Kleshchevoy encephalitis v Vengrii. Isolaciya virusa i ego svoystva. *Acta Microbiol Acad Scie Hung*, vol. 1, p. (9-21)
- GABRIEL, M., SCHMIDT-CHANASIT J., MARTIN G., EMMERICH, P., FRANK C., FIEDLER, M., RASHIDI-ALAVIJEHC, J., JOCHUM, GÜNTHER, S., AUERHAMMER, K., RUPPRECHT, H., BLANK, R., SACHER, N., PERTZBORNE, L., STARK, K., SCHRAUZER, T., SCHMIDT-CHANASITA, J. 2013: Increase in West Nile virus infections imported to Germany in 2012. *Journal of Clinical Virology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.027>
- GILADI, M., METZKOR-COTTER, E., MARTIN, D. A., SIEGMAN-IGRA, Y., KORCZYN, A. D., ROSSO, R., BERGER, S. A., CAMPBELL, G., L., LANCIOTTI, R. S. 2001: West Nile Encephalitis in Israel, 1999: The New York Connection. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 7, no. 4 p.(659–661) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631756/pdf/11585528.pdf> 2014.09.05
- GLÁVITS R., FERENCZI E., IVANICS É., BAKONYI T., MATÓ T., ZARKA P., PALYA V. 2005: Co-Occurrence of West Nile Fever in a circovirus infected goose flock in Hungary. *Avian Pathology*. vol. 43, no.5, p. (408–414)
- HAYES, E. B., KOMAR, N., NASCI, R. S., MONTGOMERY, S. P., O’LEARY, D. R., CAMPBELL, G.L. 2005: Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 8
- HAYES, E. B., SEJVAR, J. J., ZAKI, S. R., LANCIOTTI, R. S., BODE, A. V., CAMPBELL, G. L. 2005: Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 8, p. (1174-1179)
- HEINZ, F. X., COLLETT, M. S., PURCELL, R. H., GOULD, E. A., HOWARD, C. R., HOUGHTON, M., MOORMANN, R. J. M., RICE, C. M., THIEL, H.-J. 2000:

- Flaviviridae. In van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C.V.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, A., McGeoch, D.J., Pringle, J.C.D., Wickner, R.B.: *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, San Diego: Academic Press. pp. (859–878)
- HLOUCLA, L., GALLIA, F. 1949: Epidemie neutropiho virohevo onemocneni na Strakonicku v r. 1948. *Sbornik lekarsky*. 51. 352.
- HOLZMANN, H., VOROBYOVA, M. S., LADYZHENSKAYA, I. P., FERENCZI E., KUNDI M., KUNZ, C., HEINZ F. X. 1992: Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine*, vol. 10, no. 5, p. (345-349)
- HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J. 1999: West Nile fever – a Reemerging Mosquito- Borne Viral Disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, vol.5 no.5 p. (643-650)
[URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627720/pdf/10511520.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627720/pdf/10511520.pdf)
2013.09.10
- HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., ČAPEK, M., BAKONYI T., BETÁŠOVÁ, L., NOWOTNY, N. 2012: Usutu Virus in Blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011–2012. *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 61, no. 3, p. (273–276)
- JÖST, H., BIALONSKI, A., MAUS, D., SAMBRI, V., EIDEN, M., GROSCHUP, M. H., GÜNTHER, S., BECKER, N., SCHMIDT-CHANASIT, J.: 2011: Short Report: Isolation of Usutu Virus in Germany. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.85 no.3, p. (551–553)
- KALLIO-KOKKO, H., UZCATEGUI, N., VAPALAHTI, O., VAHERI, A. 2005: Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, p. (1051–1077)
- KLIMES J., JURICOVA, Z., LITERAK, P., SCHANILEK, E., DE SILVA, T. 2001: Prevalence of antibodies to tickborne encephalitis and West Nile flaviviruses and the clinical signs of tickborne encephalitis in dogs in the Czech Republic. *Veterinary Record*, vol. 148, p. (17-20)
- KOLLER, M., GRESIKOVA, M., BERENCSI, Gy., SCHABLIK, M. 1969: Hemagglutination inhibition antibodies to arboviruses in the population of Hajdú-Bihar district, Hungary. *Folia Parasitologica*, vol. 16 p. (75–79)
- KORAKA, P., ZELLER, H., NIEDRIG, M., OSTERHAUS, A.D.M.E., GROEN, J. 2002: Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA; *Microbes and Infection*, vol. 4, p. (1209–1215)
- KUMAR D, PRASAD G.V., ZALTZMAN J., LEVY G.A., HUMAR A. 2004: Communityacquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation*, vol. 77, no.3, p. (399 – 402) [URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14966414) 2013.09.10

- LANCIOTTI, R. S., ROHRIG, J. T., DEUBEL, V., SMITH, J., PARKER, M., STEELE, K., CRISE, B., VOLPE, K. E., CRABTREE, M. B., SCHERRET, J. H., HALL, R. A., MACKENZIE, J. S., CROPP, S. B., PANIGRAHY, OSTLUND, E., SCHMITT, B., MALKINSON, M., BANET, C., WEISSMAN, J., KOMAR, N., SAVAGE, H. M., STONE, W., MCNAMARA, T., GUBLER D. J. 1999: Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, vol. 286 p. (2333-2337)
- LELLI, R., SAVINI, G., TEODORI, L., FILIPPONI, G., DI GENNARO, A., LEONE, A., DI GIALLEONARDO, L., VENTURI, L., CAPORALE, V. 2008: Serological Evidence of USUTU Virus Occurrence in North-Eastern Italy. *Zoonoses and Public Health*, vol. 55, no. 7, p. (361–367)
- LESCHNIK, M. W., KIRTZ, G. C., IHALHARNRNER J. G. 2002: Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 291, no. 33, p. (66-69)
- LEVETT, P. N., SONNENBERG, K., SIDAWAY, F., SHEAD, S., NIEDRIG, M., STEINHAGEN, K., HORSMAN, G. B., DREBOT M. A. 2005: Use of Immunoglobulin G Avidity Assays for Differentiation of Primary from Previous Infections with West Nile Virus, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 12, p. (5873–5875)
- LINDQUIST, L., VAPALAHTI, O. 2008: Tick-borne encephalitis. *Lancet*, vol. 371, p. (1861-1871)
- LVOV, D. K., BUTENKO, A. M., GROMASHEVSKY, V. L., LARICHEV, V. Ph., GAIDAMOVICH, S. Y., VYSHEMIRSKY, O. I., ZHUKOV, A. N., LAZORENKO, V. V., SALKO, V. N., KOVTUNOV, A. I., GALIMZYANOV, Kh. M., PLATONOV, A. E., MOROZOVA, T. N., KHUTORETSKAYA, N. V., SHISHKINA, E. O., SKVORTSOVA, T. M. 2000: Isolation of Two Strains of West Nile Virus during an Outbreak in Southern Russia, 1999. *Emerging Infectious Diseases* vol. 6, p. (373-379). [URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905970](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905970) 2013.09.10
- MACKENZIE J. S., WILLIAMS D. T. 2009: The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, vol. 56, no. 6-7, p. (338-356) [URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486319) 2013.09.09
- MAXMEN A. 2012: The hidden threat of West Nile virus. *Nature* vol. 489 p. (349–50)
- MOLNÁR E. 1982: Occurrence of tick-borne encephalitis and other arboviruses in Hungary. *Geographia Medica*, vol. 12, p. (78–120)
- NIEDRIG, M., SONNENBERG K., STEINHAGEN, K., PAWESKA, J. T. 2007: Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation. *Journal of Virological Methods*, vol. 139, p. (103–105)

- PAPA A., XANTHOPOULOU, K., GEWEHR S., MOURELATOS, S. 2011a: Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinic Microbiology and Infections*, vol. 17, no. 4 p. (1176-1180)
- PAPA, A. 2013: West Nile virus infections in humans—Focus on Greece. *Journal of Clinical Virology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.020>
- PAPA, A., BAKONYI T., XANTHOPOULOU, K., VÁZQUEZ, A., TENORIO, A., NOWOTNY N. 2011b: Characterization of West Nile Virus Lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 5, p. (920-922)
- PECORARI, M., LONGO, G., GENNARI, W., GROTTOLA, A., SABBATINI, A. M. T., TAGLIAZUCCHI, S., SAVINI, G., MONACO, F., SIMONE, M. L., LELLI, R., RUMPIANESI, F. 2009: First Human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *European Surveillancel*, vol. 14, no. 50, p. (1944-1946)
- PETERSEN, L.R., ROEHRIG, J.T. 2001: A Reemerging Global Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*. vol. 7., no. 4. 611-614.
- PURPARI G., SAVINI, G., MONACO, F., CALISTRI P., DI GENNARO, A., CANNELLA, V., VITALE, F., MIRA, F., DI BELLA, C., GUERCIO, A., LELLI, R. 2012: Importance of dogs as sentinels of West Nile Virus activity in urban and suburban areas. *International Journal of Infectious Diseases*, Poster Presentation, Final Abstract Number: 46.051
- RIZZOLI, A., ROSÁ, R., ROSSO F., BUCKLEY, A., GOULD, E. 2007: West Nile virus circulation detected in northern Italy in sentinel chickens. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, vol. 7, no. 3, p. (411–417) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767411> 2014.09.17
- SAVAGE, H.M., CEIANU, C., NICOLESCU, G., KARABATSOS, N., LANCIOTTI, R., VLADIMIRESCU, A., LAIV, L., UNGUREANU, A., ROMANCA, C., TSAI, T.F. 1999: Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania, 1996, with serologic and molecular characterization of a virus from mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 61, no. 4, p. (600-611) URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548295> 2013.09.10
- SMITHBURN, K.C., HUGHES, T.P., BURKE, A.W. , PAUL, J.H. 1940: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 20, p. (471–492)
- SÜSS J. 2008: Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *European Surveillance*, vol. 13, no. 26, p.(171-176) <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18916> 2013.10.20
- STEINMETZ, H.W., BAKONYI T., WEISSENBOCK, H., HATT, J.M., EULENBERGER, U., ROBERT, N., HOOP, R.K., NOWOTNY, N. 2011: 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. *Veterinary*

- Microbiology*, vol. 148, no. 2-4, p. (207-712)
<https://www.mysciencework.com/publication/read/7725691/2014.09.17>.
- VÁZQUEZ A., RUIZ S., HERRERO L., MORENO J., MOLERO F., MAGALLANES A. 2011: West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 85, no. 1, p. (178-181)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122364/> 2014.09.15
- WEBSTER, R. G., GRANHOFF A. 1994: Encephalitis viruses. In: Webster R.G., Granhoff, A.: *Encyclopedia of Virology*, volume1. San Diego: Academic Press Limited, p. (361-372)
- WEISSENBOCK, H., KOLODZIEJEK, J., FRAGNER, K., KUHN, R., PFEFFER, M., NOWOTNY, N. 2003: Usutu virus activity in Austria, 2001–2002. *Microbes and Infection*, vol.5, p. (113-1136)
- WEISSENBOCK, H., KOLODZIEJEK, J., URL, A., LUSSY, H., REBEL- BAUDER, B., NOWOTNY,N. 2002: Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 7, p. (652–656)
- WEISSENBOCK, H., BAKONYI T., ROSSI, G., MANI, P., NOWOTNY, N. 2013: Usutu Virus, Italy, 1996. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 2, p.(274-277)
- WOODHALL, J.P. 1964: The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proceedings of the East African Academy*, vol. 2, p. (141–146)
- World Health Organization: The vector-borne human infections of Europe- Their distribution and burden on public health. 2004
- ZELLER, H.G., SCHUFFENECKER, I. 2004: 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 & Infectious Deases* vol. 23, no.3, p. (147–156)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14986160> 2013.09.09
- ZILBER L. 1939: Spring-summer tick-borne encephalitis (in Russian). *Arkhir Biol Nauk* vol. 56, p. (255–261)

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

A kutatást a Vectorie 15610 EU FP7 project támogatta.

Szeretném megköszönni a segítséget témavezetőmnek,

Somhegyiné Barna Mónikának (Szie-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék),

továbbá Dr. Bakonyi Tamásnak (Szie-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék)

és Bakonyi Győzőnek (Szie-ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék), valamint

Dr. Erdélyi Károlynak (Országos Állategészségügyi Intézet). Köszönet jár Dr. Ferenczi

Emőkének és Némethné Dr. Szomor Katalinnak (Országos Epidemiológiai Központ,

Általános Vírusdiagnosztikai Osztály), továbbá Kaposi Tamásnének és Gáti

Ferencnének (Országos Epidemiológiai Központ, Általános Vírusdiagnosztikai

Osztály), Dr. Takács Máriának (Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai

Főosztály), valamint az állatorvosoknak és természetvédelmi szakembereknek, aki

közreműködtek a vizsgálati minták beszerzésében.