

dc_1462_17

dc_1462_17 – MTA doktori értekezés tézisei – Bakonyi Tamás

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományok Osztálya

Állatorvos-tudományi Bizottság

Csípőszúnyogok közvetítette flavivírus fertőzések Európában

MTA doktori értekezés tézisei

Bakonyi Tamás

2017.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. A kutatások céljai.....	4
3. Anyag és módszer.....	4
4. Eredmények.....	7
4.1. Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei.....	7
4.2. A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei.....	14
5. Megbeszélés.....	25
5.1. Az Usutu vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink...	25
5.2. A nyugat-nílusi vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink.....	26
5.3. Az Usutu vírus és a nyugat-nílusi vírus járványtani és kórtani jelentőségének összehasonlítása.....	28
6. Új tudományos eredmények (tézispontok).....	30
7. Az értekezés és a tézisek alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke.....	32
Köszönetnyilvánítás.....	35

1. Bevezetés

A fertőző betegségek között különös jelentőséget tulajdonítunk a zoonózisoknak, vagyis azoknak, amelyek kórokozói különböző állatfajokat és embereket egyaránt képesek fertőzni. Ennek egyik oka az, hogy az állatokban okozott betegségek gazdasági kártétele mellett közegészségügyi problémát is jelentenek. A másik ok, hogy ezeknek a betegségeknek a járványtana általában jóval összetettebb, hiszen a különböző gerinces gazdák eltérő szerepet tölthetnek be a kórokozó fenntartásában és terjesztésében, valamint változatosabb formában és gyakorisággal betegedhetnek meg. A kórokozó ökológiáját tovább bonyolítja, ha a terjesztésében vérszívó ízeltlábú vektorok is szerepet játszanak. Számos zoonotikus vírus terjesztői ízeltlábúak (ún. arbovírusok.) Ezek a vírusok főként a *Bunyavirales* rend, valamint a *Flaviviridae*, *Reoviridae* és *Togaviridae* víruscsaládok tagjai, de számos más vírus átvitelében is szerepet játszhatnak vérszívó ízeltlábúak. A vektorok leggyakrabban szúnyogok (pl. csípő-, törpe-, púpos-, valamint lepkeszúnyogok) vagy kullancsok. Magyarországon a közegészségügyi szempontból legjelentősebb, arbovírus okozta betegség a kullancsencephalitis, amelynek kórokozója egy flavivírus (Tick-borne encephalitis vírus, TBEV); ám ez a vírus állatokban nagyon ritkán okoz megbetegedéseket. Az ezredfordulóig hazánkban nem diagnosztizáltak olyan, állatokban és emberekben egyaránt előforduló megbetegedéseket, amelyeket szúnyogok által terjesztett vírusok okoztak volna, annak ellenére, hogy felmérő vizsgálatok (szerológiai vizsgálatok, góckutatások) kimutatták ilyen vírusok jelenlétét.

Vadmadarak, különösen feketeterigók (*Turdus merula*) fokozott elhullásait figyelték meg 2001 nyár végén Bécs és Alsó-Ausztria területén. A madarak kórszövettani vizsgálata agyvelőgyulladásos elváltozásokat mutatott ki és a mintákból egy vírust sikerült izolálni. Genetikai vizsgálatokkal igazolták, hogy a törzs az Usutu vírus (USUV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) fajhoz tartozik. Ezt a vírust korábban csak Afrika Szaharától délre fekvő területeiről mutatták ki, és kevés adat állt rendelkezésre genetikai tulajdonságairól, fajspektrumáról, köz- és állategészségügyi jelentőségéről.

Két évvel később Magyarország délkeleti részén, egy lúdállományban figyeltek meg idegrendszeri tünetekkel és jelentős elhullásokkal járó járványkitörést. A kórszövettani vizsgálatok lymphocytás encephalitis jeleit tárták fel; szerológiai és genetikai vizsgálataink a nyugat-nílusi vírus (West Nile vírus, WNV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) jelenlétét mutatták ki. A ludak megbetegedéseivel egyidőben idegrendszeri megbetegedéseket diagnosztizáltak a madarak tartási helye környezetében élő emberekben is, és szerológiai vizsgálatok igazolták a WNV kóroki szerepét. A következő évben idegrendszeri megbetegedést követően elhullott héja (*Accipiter gentilis*) mintáiból tudtuk kimutatni a nyugat-nílusi vírus jelenlétét. A doktori értekezésben bemutatott kutatásaink során a nyugat-nílusi vírus és az Usutu vírus középeurópai felbukkanását és terjedését, valamint a vírusok genetikai és kórtani tulajdonságait vizsgáltuk.

2. A kutatások céljai

- Az Európában felbukkanó USUV és WNV törzsek genetikai jellemzése, rokonsági viszonyaik becslése, genetikai változatosságuk feltárása.
- Az USUV és a WNV előfordulási gyakoriságának vizsgálata gerinces gazdákban és ízeltlábú vektorokban; aktivitásuk és terjedésük nyomon követése.
- A vírustörzsek gazdaspektrumának, patogenitásának, állategészségügyi jelentőségének vizsgálata.
- A vírusfertőzések kimutatására alkalmas diagnosztikai módszerek kifejlesztése.

3. Anyag és módszer

A kutatást széles körű hazai és nemzetközi együttműködésben végeztük. A hazai eredetű vírustörzseket az Országos Epidemiológiai Központ és a Debreceni Állategészségügyi Intézet munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. A gerinces gazdákban (madarakból, lovakból) származó minták jelentős része az Országos Állategészségügyi Intézet (jelenleg Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) kórbonctani osztályáról származik, és nagyszámú vadmadár mintát köszönhetünk az Ócsai Madárvárta, a Körös-Maros Nemzeti Park, a Hortobágyi Nemzeti Park, a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, a Fővárosi Állat- és Növénykert, valamint a Szegedi Vadaspark munkatársainak. A lovakból származó minták döntő többségét a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar Nagyállatklinikájának munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. A csípőszúnyog minták gyűjtését és a gyűjtött egyedek meghatározását a Természetudományi Múzeum Állattára, a Debreceni Egyetem, Természetudományi Kar, valamint a Pécsi Egyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont munkatársai végezték.

A külföldi eredetű minták a Bécsi Állatorvosi Egyetem, Virologiai Intézet és Patológiai Intézet; a Cseh Tudományos Akadémia, Emlősbőlógiai Intézet; a Hacettepe Egyetem (Ankara); a Duna Delta Intézet (Tulcea); a Milánói Tudományegyetem, Állatorvosi Patológia Tanszék; a Camerino Egyetem, Állattudományi Tanszék (Matelica); a Pisai Egyetem, Állatorvosi Patológia Tanszék; a Zürichi Egyetem, Állatkerti-, egzotikus- és vadállatok klinikája; az ausztriai vöröskereszt; az Arisztotelész Egyetem (Thessaloniki); valamint a Barcelonai Egyetem, Állategészségügyi Kutatóközpontjának munkatársaival együttműködésben kerültek feldolgozásra.

Gerinces gazdák élő egyedeiből elsősorban vér és cerebrospinális folyadék (liquor) mintákat vizsgáltunk. Elhullott állatok kórbonctani feldolgozását követően az agy- és gerincvelő szöveteiből, illetve egyéb zsigeri szervekből gyűjtöttünk mintákat. A csípőszúnyogokat különböző módszerekkel (fénycsapda, aspirátor, testre szálló szúnyog)

gyűjtötték entomológus kollégáink. A vírusok előfordulásának feltárása és terjedésük nyomon követése céljából passzív és aktív felmérő vizsgálatokat végeztünk Magyarország és Ausztria területén vadmadarak, lovak és csípőszúnyogok bevonásával. A passzív vadmadár monitoring során vadmadarak idegrendszeri tüneteket mutató vagy elhullott egyedeit vizsgáltuk flavivírus fertőzöttség tekintetében. Aktív, szerológiai és virológiai felmérő vizsgálatokat végeztünk vadmadarak gyűrűzési célból befogott egyedei vérmintáinak, garat- és kloáka-tamponmintáinak feldolgozásával. Idegrendszeri tüneteket mutató lovak vérét és cerebroszpinális folyadékát, valamint elpusztult vagy euthanizált lovakból gyűjtött agy- és gerincvelő szövetmintákat is vizsgáltunk flavivírusok jelenlétére. Aktív felmérő vizsgálatok során egészséges lovakból gyűjtöttünk vérmintákat és flavivírusok elleni ellenanyagok jelenlétére vizsgáltuk őket. Aktív vektormonitoring keretében csípőszúnyogokat gyűjtöttünk az ország különböző, döntően vizes élőhelyein és flavivírusok jelenlétére vizsgáltuk őket.

A vírusok kimutatására elsősorban reverz-transzkripció polimeráz láncreakción (RT-PCR) alapuló módszereket alkalmaztunk. A felmérő vizsgálatokhoz olyan, a flavivírusok NS5 fehérje gént kódoló és 3' nem kódoló (UTR), erősen konzervált genomszakaszára tervezett, univerzális primereket használtunk, amelyek számos flavivírus (saját vizsgálataink alapján az USUV, a WNV különböző genetikai vonalai, a Japán encephalitis vírus, a Dengue vírus 2. szerotípusa és a Tembusu/Baiyangdian vírus) kimutatására alkalmasak. A vírusfaj-specifikus PCR vizsgálatokhoz további, nagyszámú primert terveztünk és használtunk gél-alapú (végpont) valamint kvantitatív (valós idejű) RT-PCR rendszerekben. A vírusok részleges vagy teljes genom nukleotid-szekvenciáinak meghatározását RT-PCR módszerrel előállított, átfedő amplifikációs termékek közvetlen, Sanger-módszer szerinti szekvenálásával végeztük. A szekvenciákat génbanki adatbázisokba helyezve tettük nyilvánossá. A szekvenciák közötti genetikai rokonságot – a szekvenciák pozicionális illesztéseit követően – különböző filogenetikai statisztikai algoritmusok (elsősorban neighbor-joining és maximum likelihood módszerek) segítségével elvégzett törzsfarekonstrukciós-vizsgálatokkal becsültük.

Kórszövettani mintákat immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltunk a WNV és az USUV antigénjeinek kimutatására. Ebből a célból az USUV elleni, homológ, poliklonális ellenanyagokat tartalmazó savót termeltünk nyulak kísérletes fertőzésével.

A PCR és immunhisztokémiai vizsgálatokkal pozitív minták jelentős részénél vírusizolálást is végeztünk sejtvonalak (pl. Vero, PK-16), primer lúd embrionális fibroblaszt szövettenyészet, embrionált tyúk- és lúdtojás, vagy szopósegér intracerebrális oltásával.

A szerológiai felmérő vizsgálatokhoz elsősorban a WNV elleni, IgG típusú ellenanyagok kimutatására kifejlesztett, kompetitív ELISA módszert használtuk. A flavivírusok közötti antigénrokonság miatt ez a próba keresztreakciókat mutat a WNV, az USUV és a TBEV elleni ellenanyagok jelenléte esetén, ezért az ELISA vizsgálatokkal

pozitívnak talált savómintákat – indokolt esetben – további, plakkredukciós vírusneutralizációval vizsgáltuk, szimultán, a fenti vírusok elleni neutralizáló ellenanyagtiterek meghatározása és összehasonlítása céljából. A savómintákat vizsgáltuk a WNV elleni ellenanyagok jelenlétére indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel is, valamint haemagglutinációgátlási próbát adaptáltunk az USUV elleni ellenanyagok kimutatására.

Az USUV biológiai tulajdonságainak pontosabb megismerése érdekében emlős (egér) és madár (tyúk, lúd) modellben vizsgáltuk a vírus szaporodóképességét és patogenitását. Az egérkísérletek (MÁB engedély szám: 70/2003) során egyhetes életkorú, SPF státuszú, NMRI vonalhoz tartozó egereket oltottunk *i.p.* az USUV 2001-ben, Ausztriában izolált törzsével (939/01). Az egereket a fertőzést követően naponta vizsgáltuk klinikai tünetek megjelenésére, megmértük a testtömegüket, a súlyos tüneteket mutató állatokat extermináltuk. Az egereket felboncoltuk és szövetmintákat gyűjtöttünk részben kórszövettani, immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatra, részben virológiai vizsgálatokra. Az USUV patogenitását a baromfi fajok közül házityúkban és házilúdiban vizsgáltuk a Bécsi Állatorvosi Egyetemen. A tyúk fertőzési kísérlethez (állatkísérleti engedély szám: 68.205/100-BrGt/2002) kéthetes korú, SPF státuszú csirkéket használtunk fel. A csirkéket *i.v.* fertőztük 10^3 TCID₅₀ mennyiségű USUV 939/01 törzsszel. A fertőzött madarakat és fertőzetlen társaikat izolált állatszobában együtt tartottuk; további, nem fertőzött kontroll csirkéket egy másik helyiségben neveltünk. A madarakat rendszeres klinikai vizsgálatnak vetettük alá a fertőzést követő 14 napig, valamint a fertőzött és kontakt-kontroll egyedekből kloáka-, garattampon mintákat és vérmintákat gyűjtöttünk. Két-két fertőzött csirkét és egy-egy fertőzetlen kontroll csirkét elvéreztettünk 3., 5., 7., 10. és 14. napon. A kontakt kontroll madarakat a 14. napon véreztettük el. A kórbonctani vizsgálatok során szövetmintákat gyűjtöttünk az agyból és a zsigeri szervekből, amelyeket kórszövettani, immunhisztokémiai, virológiai és vírusszerológiai vizsgálatoknak vetettünk alá. A lúd fertőzési kísérletet (állatkísérleti engedély száma: 68.205/128-BrGT/2004) köztenyésztésből származó libákon végeztük, a tyúkkísérlethez hasonló séma szerint.

4. Eredmények

4.1. Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei

Kutatásaink kezdetén az Usutu vírus Ausztriában, feketerigóból izolált törzsének (939/01) és a Dél-Afrikában, *Culex neavei* csípőszúnyogokból izolált referencia törzsének (SA Ar 1776) teljes genomszekvencia meghatározását végeztük el. Ehhez a Japán encephalitis vírus (JEV), a murray-völgyi láz vírusa (MVEV) és a nyugat-nílusi vírus teljes genomszekvenciáinak pozicionális illesztése alapján kiválasztott, konzervált genomszakaszokhoz tapadó (gyakran degenerált) primerek segítségével felerősítettük az USUV genom egyes szakaszait, majd azok nukleotidszekvencia meghatározását követően, további, specifikus primerekkel előállított, átfedő PCR-ermékek segítségével határoztuk meg a többi genomterület szekvenciáját is. A 939/01 törzs esetén 11066 nt, a SA Ar 1776 törzsnél pedig 11064 nt hosszúságú genomszakasz nukleotidsorrendjét tártuk fel. A szekvenciák elemzése során egy feltételezett nyitott leolvasási keretet azonosítottunk a 97. és 10. 401. nukleotidpozíció között. Meghatároztuk a 3434 aa hosszúságú polipeptid prekursor származtatott aminosav szekvenciáját, feltártuk az egyes fehérjék, konzervált szerkezeti elemek és feltételezett enzim motívumok helyeződését. A két USUV törzs nukleotidszekvenciája 97%-os, az aminosav-szekvenciák 99%-os hasonlóságot mutattak egymással. A többi flavivírus közül a legnagyobb hasonlóságot a JEV szerokomplex vírusaival találtuk: MVEV 73%, JEV 71%, és WNV 68% (Bakonyi és mtsai., 2004). Későbbi kutatásaink során ugyanezzel a módszerrel meghatároztuk egy Spanyolországban, 2006-ban gyűjtött, *Cx. pipiens* poolból kimutatott USUV (MB119/06) teljes genomszekvenciáját, majd illesztettük azt a génbanki adatbázisokban hozzáférhető teljes és részleges nukleotidszekvenciákhoz és filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a rokonsági viszonyok becslésére. Megállapítottuk, hogy a vírus közelebbi genetikai rokonságban áll a Dél-Afrikai Köztársaságban izolált, referencia törzshöz (SA Ar 1774, 96,9%-os hasonlóság), mint az Európában addig kimutatott USUV-k szekvenciáihoz (Bakonyi és mtsai., 2014).

Az USUV ausztriai előfordulásának megismerése és terjedésének nyomon követése céljából felmérő vizsgálatokat végeztünk 2003 és 2005 között. A kutatás során 504 vadmadár tetemét vizsgáltuk meg és 107-ben mutattuk ki az USUV jelenlétét. A 2003-ban megvizsgált, 27 fajhoz tartozó, 177 madár 52%-a (92) volt USUV-fertőzött. A legtöbb pozitív madár feketerígó volt (87); egyéb fajok (széncinke, csuszka, énekes rigó és vörösbegy) fertőzöttségét is megállapítottuk. 2004-ben 30 faj 224 tetemének vizsgálatára került sor. 11 feketerígó (5%) mintából lehetett a vírus jelenlétét kimutatni. 2005-ben 103 madártetemet (19 faj) vizsgáltunk, amelyek közül négy feketerígó esetében lehetett kimutatni a vírus jelenlétét. Meghatároztuk 12 mintából kimutatott USUV-k részleges

nukleotid szekvenciáit, amelyek 99,7-100% hasonlóságot mutattak a 2001-ben izolált törzssel (939/01 (Chvala és mtsai., 2007)). A passzív surveillance mellett szerológiai felmérő vizsgálatokat is végeztünk 2003 és 2006 között ausztriai vadmadarokból gyűjtött savómintákkal. Összesen 442 madár mintáját vizsgáltuk meg (2003.: 113, 2004.: 109, 2005.: 197, 2006. január-május: 23). A savómintákat haemagglutináció-gátlási próbával vizsgáltuk, a pozitív (titer $\geq 1:20$) mintákat PRNT próbával vizsgáltuk tovább USUV, WNV és TBEV elleni ellenanyagok jelenlétére. A haemagglutináció gátló ellenanyag-titerek 1:20 és 1:1280 között szóródtak, mértani átlaguk 1:51,8 volt. Egy savóminta kivételével az összes haemagglutináció-gátlási próbával pozitív eredményt a PRNT vizsgálat is megerősítette. Ugyanazon madarak tavaszi és őszi vérmintáinak vizsgálatai során számos esetben tapasztaltunk szerológiai áthangolódást vagy titeremelkedést (Meister és mtsai., 2008). Jelentős vadmadár-elhullásokat a 2005. évet követő tíz évben nem jelentettek Ausztriában, 2016-ban viszont ismét feltűnő mértékű feketerígó elhullásokról számoltak be az ország keleti részén. A vizsgálatra érkezett három madártetem közül kettőből kimutattuk az USUV nukleinsavának és antigénjeinek jelenlétét. Meghatároztuk az egyik vírus teljes nukleotidszekvenciáját és filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az eltér az Ausztriában 2001-ben felbukkant törzstől, és a vírus kettes genetikai vonalához sorolt, olaszországi eredetű törzsekkel áll a legközelebbi genetikai rokonságban (Bakonyi és mtsai., 2017a). Ausztriában, 2017 júliusában és augusztusában véradás során gyűjtött minták WNV jelenlétére irányuló szűrővizsgálatai hét mintánál pozitív reakciót eredményeztek. Ezeket a mintákat megvizsgáltuk specifikus primerekkel, valós idejű és konvencionális RT-PCR módszerrel WNV és USUV nukleinsav jelenlétére. Egy mintánál a vizsgálatok igazolták a WNV kontaminációt, a többi hat esetben viszont az USUV nukleinsavát lehetett kimutatni a mintákból. Emellett a 2016-ban, véradókból gyűjtött és WNV pozitívnak diagnosztizált plazmaminták ismételt vizsgálatával egy további mintából is az USUV RNS jelenlétét mutattuk ki. Meghatároztuk egy vírus teljes és öt vírus részleges nukleotidszekvenciáját. Filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a vírusok a 2016-ban, Ausztriában, feketerigóból kimutatott Usutu vírussal állnak a legközelebbi genetikai rokonságban (Bakonyi és mtsai., 2017b).

Az ausztriai felmérésekkel egyidőben Magyarországon is megkezdtek elhullott vadmadarak USUV-fertőzöttségre irányuló vizsgálatainkat a vírus hazai felbukkanásának felismerése és terjedésének nyomon követése céljából. 2003. és 2006. között összesen 52 faj 332 egyedét dolgoztuk fel. A 2003-ban és 2004-ben gyűjtött madártetemek mindegyikének vizsgálata negatív eredménnyel zárult. 2005 augusztusában egy feketerígó tetemet találtak Budapest XI. kerületében és vizsgálatra eljuttatták az Országos Állategészségügyi Intézetbe. RT-PCR vizsgálatokkal igazoltuk az USUV RNS jelenlétét a madár szöveteiben. 2006-ban további hat feketerígó mintájából tudtuk kimutatni az USUV nukleinsavát. A madarakat Budapest XVI. és XVIII. kerületében találták.

Meghatároztuk a 2005-ben kimutatott USUV teljes genomszekvenciáját, amely 99,9% hasonlóságot mutatott az ausztriai víruséhoz és 97% hasonlóságot a dél-afrikai víruséhoz. A 2006-ban kimutatott vírusok részleges nukleotidszekvenciái leginkább a magyarországi és ausztriai vírusokéhoz hasonlítottak (Bakonyi és mtsai., 2007). A következő években folytattuk az USUV-fertőzésre gyanús madarak vizsgálatát. 2010. és 2015. között öt feketerigó és egy fenyőrigó szervmintáiból tudtuk kimutatni a vírus jelenlétét. A pozitív feketerigó tetemeiket az ország középső (2010.: Kunadacs, 2011.: Vác, 2012.: Kecskemét, 2013.: Kiskunfélegyháza) és keleti részein (2015.: Fábánháza) találták. A fenyőrigó viszont az ország nyugati részéről, Lovászból származott. A következő évben (2016.) az ország középső részén, Imrehegyen gyűjtött szajkóból és Kecskeméten talált seregélyből lehetett kimutatni USUV-fertőzést. Halmozott feketerigó-elhullásokat figyeltek meg 2016 nyarán az ország nyugati részén, elsősorban Zala és Győr-Moson-Sopron megyében. Az Usutu vírusfertőzést tíz feketerigó mintájából mutattuk ki. Meghatároztuk egy, Zalaegerszegen, 2016-ban gyűjtött feketerigóból származó USUV nukleotidszekvenciáját a poliprotein kódoló régióban, valamint további kilenc vírus részleges nukleotidszekvenciáit. Filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a 2010. és 2015. között, az ország középső részéről gyűjtött madarakból kimutatott vírusok a 2001-ben Ausztriában, illetve 2005-ben Magyarországon kimutatott Usutu vírusokkal álltak a legközelebbi rokonságban; a 2015-ben és 2016-ban, az ország nyugati részéről származó mintákból kimutatott vírusok viszont az Ausztriában, 2016-ban, feketerigóból kimutatott USUV-hoz, illetve olaszországi eredetű törzsekhez hasonlítottak leginkább (Bakonyi és mtsai., 2017a).

Egy Milánó közelében található vadasparkban tartott 32 bagolyfaj 70 egyedéből álló gyűjtemény hat szakállas baglya 2006 nyár végén elhullott. A baglyok szerveinek RT-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatával megállapítottuk az USUV fertőzés tényét. A következő év nyarán nyolc gatyáskuvik, egy európai törpekuvik és egy karvalybagoly elhullását tapasztalták, valamint az egyik milánói parkban röpképtelen feketerigót fogtak be, amely a begyűjtést követő néhány percen belül elhullott. 2008-ban egy elhullott feketerigót találtak a vadaspark területén. Ezenél a madaraknál is diagnosztizáltuk az USUV-fertőzést. A különböző években elhullott madarakból kimutatott USUV-k nukleinsavait RT-PCR segítségével felerősítettük négy genomterületen (az E-NS1 régió, NS3 régió, NS5 régió, és 3'UTR egyes részein), és meghatároztuk a nukleotid szekvenciákat. A szekvenciák 99,8-100%-ban megegyeztek az ausztriai (939/01) USUV törzs szekvenciájával (Manarolla és mtsai., 2010).

Az USUV olaszországi kimutatását követően felmerült annak a gyanúja, hogy a vírus esetleg korábban is okozott már vadmadár-elhullásokat az országban, azonban akkor oki diagnózist nem sikerült felállítani. Toszkána tartományban, Firenze és Pistolia közelében 1996 kora őszen jelentős vadmadár-elhullásokat figyeltek meg. Elsősorban a feketerigók száma fogyatkozott meg, de más fajok is érintettek voltak. A kórbonctani vizsgálatok

főként máj- és lépduzzanatot állapítottak meg; a bakteriológiai, virológiai és toxikológiai vizsgálatok alapján nem sikerült az elhullások okát kideríteni, a parazitológiai vizsgálatok több esetben bélféreg-fertőzöttséget tártak fel. A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szervmintákat megőrizték és azokat 2012-ben bocsátották kutatócsoportunk rendelkezésére. A szövetekből készített metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk az USUV-antigének kimutatására, valamint a paraffin eltávolítását követően a szövetekből RNS-t vontunk ki és valós idejű RT-PCR módszerrel vizsgáltuk a vírus nukleinsavának felerősítése céljából. Kimutattuk az USUV antigénjeit egy feketerigó vese- és három feketerigó agymintából. A vírus nukleinsavát az említett mintákon túl kimutattuk feketerigók mirigyes- és zúzógyomor-, vese- és májmintáiból is. A valós idejű RT-PCR segítségével felerősített genomszakasz (NS5 régió) megegyezett az USUV génbanki adatbázisban hozzáférhető szekvenciáival. Egyes, a valós idejű RT-PCR vizsgálattal legerősebb jelet adó mintákat rövid (<300) nukleinsavat felerősítő, konvencionális RT-PCR módszerrel is megvizsgáltunk (NS5 régió, és 3'UTR régió). Az NS5 régió nukleinsav-szekvenciái megegyeztek az Ausztriában 2001-ben, Olaszországban és Svájcban 2006-ban kimutatott vírusokéval, és 98,7-99,3%-ban hasonlítottak további, Ausztriában, Olaszországban, Magyarországon és Németországban kimutatott USUV szekvenciákhoz. A spanyolországi (MB119/06) USUV szekvenciájához 95,6%-ban, a dél-afrikai (SA Ar-1776) szekvenciához 96,2%-ban hasonlított az olaszországi szekvencia. A törzsfa-rekonstrukciós vizsgálat is az USUV olaszországi és közép-európai genotípusaihoz tartozó vírusokhoz becsülte a legközelebbi rokonságot (Weissenböck és mtsai., 2013).

Az olaszországihoz hasonló vadmadár-elhullásokat figyeltek meg 2006 nyarán a zürichi állatkert fogságban tartott madarai és a környéken élő vadmadarak (főként veréb- és bagolyalkatúak) körében. Az elhullott madarak szerveiből gyűjtött minták madárinfluenza vírusra, baromfipestis vírusra és nyugat-nílusi vírusra irányuló vizsgálatai negatív eredménnyel zárultak. Felmerült az USUV fertőzés gyanúja, ezért a tetemekből (n=113) gyűjtött mintákat megvizsgáltuk a vírus nukleinsavának és antigénjeinek jelenlétére. Megállapítottuk az USUV-fertőzést 7 madárfaj 43 egyedében. A következő évben 19, 2009-ben pedig 3 madárban diagnosztizáltunk USUV-fertőzést. A különböző években gyűjtött pozitív mintákból meghatároztuk egyes vírusgenom-szakaszok (E, NS5 gén és 3'UTR régió) részleges nukleotidszekvenciáit. Az összehasonlító vizsgálatok alapján a svájci vírusok az USUV ausztriai, magyarországi és olaszországi genotípusaihoz hasonlítottak leginkább (>99,9% hasonlóság) (Steinmetz és mtsai., 2011).

Az USUV közép-európai terjedésének nyomon követésére irányuló felmérő vizsgálatok során Brno egyik városrészén, 2011 májusában talált feketerigó teteméből izoláltunk egy vírust. A specifikus pimerekkel végzett RT-PCR vizsgálatok mind a rigó szervminták, mind az oltott egerek agyvelő-mintái esetében az USUV nukleinsavát mutatták ki. Az E-NS1 régióban felerősített genomszakasz nukleotidszekvenciája 99,7 %-

ban hasonlított az ausztriai, 939/01 izolátuméhoz; az NS5-3'UTR régióban meghatározott szekvencia 100%-ban megegyezett a magyarországi, 2005-ben kimutatott USUV szekvenciájával. 2012 augusztusában további két, Brno városban talált feketerigó mintáiból sikerült kimutatni USUV fertőzést (Hubálek és mtsai., 2014). A flavivírusok szúnyog vektorokban való előfordulásának felmérése céljából csehországi kollégáink góckutatást végeztek három dél-morvországi halastónál 2010 és 2014 között. A szúnyogmintákat WNV és USUV jelenlétére vizsgáltuk RT-PCR segítségével. A vizsgálatok négy éve alatt 61 770 szúnyogot gyűjtöttek és rendeztek 1243 pool-ba kollégáink. Egy 2013 augusztusában gyűjtött, *Culex modestus* nőstényeket tartalmazó pool vizsgálata pozitív eredménnyel zárult. Meghatároztuk a vírus részleges genomsekvenciáját öt régióban. A szekvencia 99,7%-ban hasonlított az Ausztriában felbukkant USUV törzs (939/01) szekvenciájához és 99,78%-ban a csehországi feketerigóból kimutatott törzséhez (Rudolf és mtsai., 2015).

Az Usutu vírus gazdaspektrumának és patogenitásának jobb megismerése céljából vizsgáltuk a vírus *in vitro* szaporodóképességét 13 permanens sejt vonal (Vero E6, PK-15, HeLa, ED, MDBK, RK-13, MDCK, DK, CRFK, BHK-21, BF, C6 és TH1) és három primaer szövettenyészet (csikó vese, lúdembrío fibroblaszt és csirkeembrió fibroblaszt) sejtjein. Az egybefüggő, egyrétegű tenyészeteket képező sejteket az USUV 939/01 törzs háromszoros mennyiségével fertőztük és 3-5 napig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket fixáltuk, hematoxylin-eosinnal festettük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk sejtkárosító hatásokat (CPE) jelenlétére. A vírusfehérjék kimutatására immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A fertőzést követő 2-4. napon kifejezett CPE volt megfigyelhető a Vero E6 és PK-15 sejt vonalak, valamint a lúdembrío fibroblaszt szövettenyészet sejtjein. Az első, gócos sejtlekerekedéseket és leválásokat a 2-3. napon lehetett megfigyelni. További 48 órán belül a tenyészetek sejtjeinek 90-100%-a lekerekedett és elpusztult. A kontroll tenyészetekben nem lehetett megfigyelni sejtkárosodásokat. A többi tenyészet sejtjei a fertőzést követő 5 napig nem mutattak specifikus elváltozásokat. Az immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével a csirkeembrió fibroblaszt szövettenyszet kivételével mindegyik vizsgált sejttípusban ki lehetett mutatni az USUV antigénjeinek jelenlétét. A pozitív sejtek gyakorisága ugyanakkor jelentős eltéréseket mutatott (pl. DK – a sejtek kb. 1%-a, lúdembrío fibroblaszt – a sejtek kb. 50%-a) (Bakonyi és mtsai., 2005b).

Az USUV egér-patogenitását egyhetes egerek kísérletes fertőzésével vizsgáltuk. Előkísérletek segítségével megállapítottuk, hogy a 939/01 jelű USUV törzs 1000 TCID₅₀ mennyiségű vírust tartalmazó szuszpenzióját intraperitoneálisan oltva az egerek megbetegszene, kéthetes egerekben viszont nem alakultak ki tünetek az említett dózisonál. 100 TCID₅₀ dózissal vírussal a mortalitás nem érte el az 50%-ot. Intracranialis oltással (1000 TCID₅₀) 3 hónapos egerek is megbetegedtek. A főkísérletek során a fertőzést követően 12 óránként megfigyeltük a klinikai tünetek kialakulását és jellegét, valamint minden napon két fertőzött és egy kontroll egeret feldolgoztunk. A fertőzést

követő 6. napon hét fertőzött egéren levertség és tájékozódási zavar jeleit lehetett látni. A 7. napon további három, a 8. napon egy, a 9. napon három, a 10. és 11. napon egy-egy fertőzött egérben alakultak ki a fenti tünetek. A tünetek a megjelenésüket követő 24-48 órán belül súlyosbodtak, a végtagok gyengesége és bénulása, majd kóma alakult ki. A végső stádiumú tüneteket mutató állatokat extermináltuk. A második főkísérletben a fertőzés hatására kialakuló gerincvelői elváltozásokat kívántuk részletesebben vizsgálni. A központi idegrendszer kórszövettani vizsgálatainak eredményei alapján az ötödik naptól a leölt vagy elhullott, fertőzött egerek agyában gócos vagy diffúz idegsejtelhalást lehetett megfigyelni. A neuronok túlnyomó részében apoptotikus folyamatok (DNS-töredezés) indultak meg. Az 5-6. napon az elváltozások enyhe-közepes mértékűek voltak és főként a nyúltagyi területekre, a kisagy Purkinje-sejtjeire és a középagy egyes részeire szorítkoztak. A 7-9. napon gyűjtött mintákban az elváltozások nagyobb agyi területeket érintettek (beleértve az agykérget is), diffúzan jelentkeztek és súlyosabb fokúak voltak. A 10-12. napon feldolgozott egerekben az idegrendszeri elváltozások enyhébbek voltak az előző napok mintáiban megfigyeltékhez viszonyítva. Gócos elváltozások voltak főként a kisagyban, az agytörzsben és a nyúltagban. Az elváltozások mértéke jelentős egyedi változatosságot mutatott. A demyelinizáció a 7. napig csak enyhe fokú volt, a 8. naptól viszont, főként a kisagy állományában kifejezetté vált. Az idegszálak kimutatására irányuló immunhisztokémiai festés emellett nem mutatta az axonok károsodását vagy megfoggyatkozását, ami primeaer demyelinizációra utal. A demyelinizációval érintett területeken gyakoriak voltak az apoptotikus sejtek. Csak enyhe gyulladásos sejt perivaszkuláris infiltrációt lehetett megfigyelni és nem tapasztaltunk felismerhető gliasejt-szaporodást. A vírus antigénjeit és nukleinsavát a fertőzést követő 5. naptól lehetett kimutatni a neuronokban, főként az agyi területeken. A vírusalkotók jellemzően a sejtmag körüli területeken fordultak elő. A vírusfertőzött és apoptotikus területek általában egybeestek, de a vírussal fertőzött sejtek száma jelentősen meghaladta az apoptotikus sejtekét. A Purkinje-sejtek gyakran voltak vírusfertőzöttek, de nem mutattak pozitívítást a TUNEL festéssel. A fehérállományban a demyelinizáció jelenlététől függetlenül, általában csak kis mennyiségben volt jelen a vírus. A gerincvelőben a vírus jelenlétét leggyakrabban a szürkeállomány ventrális szarva neuronjainak citoplazmájában lehetett megfigyelni. Emellett góckban előfordultak a fehérállomány ép és demyelinizált területein is, valószínűleg oligodendrocitákban. A fertőzött egerek szervmintáin végzett RT-PCR vizsgálatok minden mintában, így a fertőzést követő 1-4. napon is kimutatták a vírus nukleinsavának jelenlétét (Weissenböck és mtsai., 2004).

Az USUV szaporodó- és kórokozóképességét házityúkban kéthetes csirkék *i.v.* fertőzésével vizsgáltuk. A fertőzést követő 14 napig a madarak egyike sem mutatott klinikai tüneteket. A kórbonctani vizsgálatok során a fertőzött madarakban enyhe lépmegegyesedést lehetett megfigyelni. Közepes vagy súlyos fokú mononukleáris gyulladásos sejt beszűrődés fordult elő a fertőzött madarak begyének tunica muscularis

rétégeiben és a mirigyegységek lamina propria részében. A fertőzést követő 7-14. napon vizsgált csirkek lépében a tüszők megnagyobbodását és a májban gócos lymphocytás infiltrációt találtunk. Egy, a 7. napon leölt csirke agyában lehetett enyhe, gócos lymphocytás érköpenyt és endothel-szaporodást megfigyelni. Vírusfehérjét egyik madár szervmintáiból sem lehetett kimutatni immunhisztokémiai módszerrel. A vírus nukleinsavát hat madár egyedenként egyesített szervmintáiból (DPI 3, 5, 7), valamint két fertőzött madárnak a fertőzést követő 5. napon gyűjtött kloákatampon-mintájából és egy madár 7. napon gyűjtött garat- és kloákamintájából mutattuk ki. Két madár 7. napon gyűjtött keringő fehérvérsejtjeiből is kimutattuk a vírusnukleinsav jelenlétét RT-PCR segítségével. A vírust egyik mintából sem sikerült izolálni. Egyetlen fertőzött csirke savómintáiban lehetett USUV elleni haemagglutináció-gátló ellenanyagokat kimutatni a 10. napon 1:40 titerben, a 14. napon 1:20 titerben. A kontakt kontroll madarak mindegyike szeronegatív maradt (Chvala és mtsai., 2005). Az USUV szaporodóképességét csirkeembrióban is vizsgáltuk. SPF állományból származó tojások allantoisz üregébe oltottuk az USUV 939/01 törzset a keltetés 10. napján. A tojásokat további négy napig keltettük, majd felbontottuk és kórszövettani, immunhisztokémiai és RT-PCR módszerrel vizsgáltuk őket. Az embriókban nem fordultak elő kórbontani és kórszövettani elváltozások és az immunhisztokémiai vizsgálatok is negatív eredménnyel zárultak (Bakonyi és mtsai., 2005a).

Az USUV szaporodó- és kórokozóképességét házilúdban kéthetes korú, köztenyésztésből származó libák *i.m.* fertőzésével vizsgáltuk. A fertőzést követő 2. napon elhullott egy fertőzött és egy kontakt kontroll liba, a 3. napon pedig egy fertőzött liba. Egy további, fertőzött madár a 16. napon hullott el. A kórbontani vizsgálatok során néhány madárban sárgásfehér gócot lehetett megfigyelni a légkamrák felszínén. Egyéb kórbontani elváltozások nem voltak felismerhetők. Egy, a fertőzést követő 5. napon leölt madár agyában gliaszaporodást lehetett látni. A fertőzést követő 3. napon elhullott liba májában és lépében heveny, gócos koagulációs necrosis jelei látszottak. A többi, fertőzött és fertőzetlen kontroll lúd vizsgált szerveiben nem voltak kóros elváltozások. Az USUV antigénjeit egyik madár mintáiból sem lehetett kimutatni immunhisztokémiai vizsgálattal. A fertőzést követő 2. napon elhullott, fertőzött madár vékonybeléből nagyszámú *Escherichia coli* és kisszámú *Clostridium perfringens* baktériumot lehetett kitenyészteni. A 2. napon elhullott, kontakt kontroll madár vékonybeléből nagyszámú *E. coli* és *Cl. perfringens*, valamint a szívből közepes számú *Staphylococcus sp.* baktériumot lehetett kitenyészteni. A 3. napon elhullott, fertőzött madár májából nagyszámú *Pseudomonas aeruginosa* baktériumot lehetett kitenyészteni. További öt, tünetmentesen leölt, fertőzött vagy kontroll állat egyes szerveiből (főként a vékonybélből) lehetett még a fent említett baktériumok valamelyikét kisszámban kitenyészteni. A vírus nukleinsavát a 11 fertőzöttből 9 liba egyedenként egyesített szervmintáiból (DPI 2-16), valamint egy fertőzött madár, a fertőzést követő 5. és 8. napon gyűjtött kloákatamponmintájából

mutattuk ki. Ugyanennek a madárnak az 5. napon gyűjtött keringő fehérvérsejtjeiből is kimutattuk a vírus nukleinsav jelenlétét RT-PCR segítségével. A vírust egyik mintából sem sikerült izolálni. USUV elleni, haemagglutináció-gátló ellenanyagokat mutattunk ki két fertőzött liba 10. napon gyűjtött savómintájából (1:80 és 1:20 titerben) és a vírusűrítőnek talált madár 10. napon (1:40 titer) és 22. napon (1:20 titer) gyűjtött mintáiból. A kontroll madarak mindegyike szeronegatív maradt (Chvala és mtsai., 2006). Az USUV szaporodóképességét lúdembrióban is vizsgáltuk. Köztenyésztésből származó lúdtojások allantoisz üregébe oltottuk az USUV 939/01 törzset a keltetés 12. napján. A tojásokat további négy napig keltettük, majd kórbontani, kórszövettani és immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk őket. Az embriókban nem voltak kórbontani és kórszövettani elváltozások. Az immunhisztokémiai vizsgálatok a vírusantigén gócos előfordulását mutatták ki a retinában, autonóm idegdúcokban, az izomszövetben, kötőszöveti sejtekben, valamint a vese tubuláris hámsejtjeiben (Chvala és mtsai., 2006).

4.2. Az nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei

A nyugat-nílusi vírus első hazai izolálásáról az 1970-es években, arbovírusok előfordulására irányuló góckutatásokkal kapcsolatban számoltak be. A Gic környékén, 1972-ben gyűjtött erdei pocok mintából a Csehszlovák Tudományos Akadémia pozsonyi virológiai intézetében izolált, és az Országos Epidemiológiai Központ részére visszajuttatott törzs (WN_{ml}) részleges genomszekvenciáját 7 genomterületen (az M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b, NS5 gének és a 3'-UTR régió egyes szakaszaiban) határoztuk meg. A feltárt szekvenciák teljes hossza 6085 nt, a vírusgenom 55,2%-a. A szekvenciák a legnagyobb hasonlóságot a WNV Eg 101 referencia törzséhez mutatták. A vizsgált szakaszokon a WN_{ml} jelű törzs szekvenciája 4 nukleotidban tér el a referencia törzstől. A szubsztitúciók egyike sem eredményezett változást a vírus származtatott aminosav-szekvenciájában.

Egy dél-alföldi lúdállományban 2003 nyarán idegrendszeri megbetegedéseket és fokozott elhullásokat figyeltek meg 6 hetes libákban. A ludakat a Duna árterében, más baromfifajoktól elkülönítve tartották, de vadmadarakkal érintkezésben kerülhettek. Ugyanabból a szülőállományból származó, máshol nevelt libákban nem tapasztaltak megbetegedéseket, viszont circovírus fertőzést mind az érintett állományban, mind a máshol nevelt libákban kimutattak. A megbetegedések a 6 hetes korban kezdődtek és kb. 6 hétig tartottak. A napi elhullás 5-15 egyed volt, a betegség teljes időszaka alatt 564 liba (az állomány 14%-a) pusztult el. A betegség főbb tünetei ataxia, torticollis, opisthotonus, inkoordináció, clonicus kényszermozgások és kényszer-testtartások voltak. A tüneteket mutató madarak döntő többsége 4-5 napon belül elhullott. A kórbontani vizsgálat során jellegtelen elváltozásokat lehetett látni. A bursa Fabricii fala vékonyabb és petyhüdtebb volt, mint a hasonló korú, egészséges állatoké. A kórszövettani vizsgálatok mindegyik

vizsgált madárban lymphocytás agyvelőgyulladást tártak fel. Emellett a vizsgált állatok lymphoid szerveiben (bursa Fabricii, lép, thymus) jelentős lymphocytakiürülést és histiocytosist lehetett látni, gyulladásos reakciók nélkül. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal 12-14 nm átmérőjű, helyenként parakristályos formába rendeződött, kerekded virionokat lehetett kimutatni. Az elhullott madarak szerveiből nem lehetett patogén baktériumokat kitenyészteni. A lépminták lúd circovírus DNS kimutatására irányuló PCR vizsgálata pozitív eredményt adott. A kórszövettani elváltozások és a szerológiai vizsgálatok alapján nyugat-nílusi vírus-fertőzés gyanúja merült fel. A JEV-csoport vírusai nukleinsavának kimutatására alkalmas primerpárral vizsgáltuk az elhullott libák agyvelő-homogenizátumaiból kivont RNS-t RT-PCR módszerrel, és több mintánál is specifikus amplifikációs terméket detektáltunk. A termék szekvenciájának meghatározását követő BLAST keresés a WNV egyes genetikai csoportú (lineage 1) vírusainak szekvenciáihoz találta a legnagyobb hasonlóságot. Meghatároztuk a vírus (WNV goose-Hungary/03) teljes genomszekvenciáját (10969 nt). A genom nukleotidszinten 98%-ban, származtatott aminosav-szekvencia illesztéssel 99%-ban hasonlított az Izraelben kimutatott, IS-98 ST1 törzs és az 1999-ben az Egyesült Államokban kimutatott WNV törzsek szekvenciáihoz. A teljes genomszekvenciák bevonásával végzett filogenetikai vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy a hazai lúd megbetegedésekből kimutatott vírus az említett izraeli és amerikai vírustörzsekkel monofiletikus csoportot alkot. Hozzájuk legközelebbi rokonságban egy Tunéziában, 1997-ben, emberi megbetegedésből izolált vírustörzs áll. Az európai (franciaországi, olaszországi, romániai és oroszországi) WNV törzsek elkülönülő, közös genetikai ágat alkottak (Bakonyi és mtsai., 2006).

A ludakban megfigyelt nyugat-nílusi encephalitis járványkitörést követő év (2004.) augusztusában egy központi idegrendszeri tüneteket mutató, fiatal hénát találtak a Körös-Maros Nemzeti Park munkatársai. A gyógykezelési próbálkozások ellenére a madár elhullott. A kórbonctani vizsgálatok során kóros makroszkópos elváltozásokat nem lehetett megfigyelni, a kórszövettani vizsgálatok a központi idegrendszerben multifokális, lymphocytás panencephalitist tártak fel. Idegsejt-degenerációt, -elhalást és neuronocytophagiát, kifejezett gliasarjadzást lehetett megfigyelni a madár agyvelejének különböző részein, valamint a lépben a lymphoid sejtek kiürülése és reticulocytaproliferáció, a szívizomzatban lympho-histiocytás gyulladás, a májban vérzéses és lympho-histiocytás gyulladásos góccok fordultak elő. Emellett gócos, interstitiális, lympho-histiocytás vesegyulladás, enyhe, lymphocytás mirigyegysígyomor- és bélgyulladást, tüdőbővítés és másodlagos, gócos, fibrines bronchopneumonia is kialakult. A kórszövettani vizsgálatok felvetették a nyugat-nílusi vírushatás gyanúját. A WNV elleni monoklonális ellenanyagokkal végzett immunhisztokémiai vizsgálatokkal a vírusantigént az agy és a lép sejtjeiben lehetett leginkább kimutatni, de más szervek egyes szövetei és sejtjei is pozitívítást mutattak. Az agyban a neuronok, a gliasejtek és a Purkinje-sejtek

citoplazmájában, a macrophagokban, a keringő monocytákban, a szívizomsejtekben, a fibroblastokban, a vese tubuláris hámsejtekben, az endothel sejtekben, a kiserek simaizom sejtjeiben, a levegőkapillárisok epithel sejtjeiben, a vékonybél nyálkahártya hámsejtjeiben és simaizom sejtjeiben, a hasnyálmirigy külső elválasztású sejtjeiben, a májsejtekben és a pajzsmirigy tüszők hámsejtjeiben is ki lehetett mutatni a vírusantigén jelenlétét (Erdélyi és mtsai., 2007). Az RT-PCR vizsgálatok is pozitív eredménnyel zárultak. Az amplifikációs termékek szekvenciája eltért a 2003-ban, lúdból kimutatott vírusétól és a WNV kettes genetikai csoportjához (lineage 2) tartozó ugandai prototípus törzzsel (B956) mutatta a legnagyobb genetikai hasonlóságot. Meghatároztuk a vírus (WNV goshawk-Hungary/04) teljes genomszekvenciáját (11028 nt) amely egy nyitott leolvasási keretben, a 97. és a 10401. nukleotid között kódolja a 3434 aminosavból álló prekursor poliproteint. A szekvencia BLAST kereséssel a B956 törzs szekvenciájához volt leginkább hasonló (96%); a származtatott aminosav-szekvenciák hasonlósága 99%-os volt. A vizsgálatok idején a WNV lineage-2 csoportba sorolt vírusok közül csupán további két, közép-afrikai izolátumból, az E fehérje gén részleges nukleotid szekvenciái álltak rendelkezésre. Ezek a szekvenciák 97-98%-ban hasonlítottak, a származtatott aminosav-szekvenciák 100%-ban megegyeztek a hazai hénából kimutatott vírus szekvenciájának homológ szakaszával. A teljes genomszekvencia filogenetikai vizsgálatának eredménye is megerősítette, hogy a hénából kimutatott WNV a vírus lineage-2 genetikai vonalához tartozik. A vírus kimutatását követő év (2005.) augusztusában további ragadozó madarakban figyeltek meg idegrendszeri megbetegedéseket a Körös-Maros Nemzeti Park területén. A park munkatársai gondozásába került, három beteg hén és két beteg karvaly közül két hén és egy karvaly elhullott. Az elhullott madarak idegrendszeréből és a túlélő madarak fehérvérsejtjeiből ki lehetett mutatni a WNV nukleinsavát. A genom részleges nukleotidszekvenciája (NS5-3'UTR régió, ~1000 nt) csupán egy nukleotidban tért el a 2004-ben kimutatott vírusétól (Bakonyi és mtsai., 2005b). Az esetek részletesebb vizsgálata során a vírus hosszabb (1918 nt) genomszakaszának szekvenciáját határoztuk meg, ami további három nukleotid-szubsztitúció jelenlétét tárta fel az NS5 gén és a 3'UTR régiók területén. A fertőzést 2005-ben túlélő hén és karvaly keringő fehérvérsejtjeiből kivont RNS-ből is kimutattuk a vírus RNS jelenlétét RT-PCR segítségével, valamint a vírust szaporítógér-agyban és Vero sejttenyésztésben izoláltuk (Erdélyi és mtsai., 2007).

A vadmadarakban megfigyelt nyugat-nílusi encephalitis esetektől kb. 30 km-re tartott juhállományban, 2005 őszén az egyik négy éves anyajuh idegrendszeri tüneteket mutatott. A nyáj többi tagja nem szenvedett idegrendszeri betegségben sem 2005-ben, sem a korábbi években, valamint elhullások sem fordultak elő 2005-ben. A beteg állat tüneti kezelése hatástalan volt, a juh néhány napon belül elpusztult. A kórbonctani vizsgálat során makroszkópos kóros elváltozások nem voltak, az állat fejét a NÉBIH ÁDI debreceni intézetébe küldték kórszövettani vizsgálatra és a bejelentési kötelezettség alá tartozó,

fertőző betegségek kizárása céljából. A kórszövettani vizsgálatok során az agy minden részében lymphocytás polio- és leucoencephalitist lehetett megfigyelni. A bakteriológiai vizsgálatok negatív eredménnyel zárultak. A veszettség vírus jelenlétét direkt immunfluoreszcenciás módszerrel, a surlókórt pedig a kórszövettani lelet alapján lehetett kizárni. A juh agyszövetének homogenizátumával oltott Vero és BHK-21 sejtvonalak sejtjein az inokulációt követő 48-72 óra múlva mindkét sejttypusban diffúz citopatogén hatást (sejtlekerekedés) lehetett megfigyelni. A sejtenyésztés-felülszókából vett minták 9 napos embrionált tyúktojások allantoisz üregébe oltását követően az embriók 72 órán belül elpusztultak, súlyos fokú oedema, a bőr alatti kötőszövetben vérzések és májkárosodás alakult ki bennük. A vírusizolátumot szopósegér-agyba oltva, az egerek az oltást követő 4-6. napon idegrendszeri tüneteket mutattak, és néhány óra múlva elhullottak. Kórszövettani vizsgálatokkal lymphocytás agyvelőgyulladás lehetett felismerni az elhullott egerek agyvelőmintáiban. Az izolátumot azonosítás céljából megvizsgáltuk JEV csoportba tartozó flavivírusok kimutatására alkalmas RT-PCR módszerrel. Az ampifikáció során képződött DNS-termék szekvenciája a legnagyobb (99,5%-os) hasonlóságot a WNV goshawk-Hungary/04 vírustörzs homológ szakaszához mutatta (Kecskeméti és mtsai., 2007).

A SzIE ÁOTK üllői nagyállatklinikájára 2007 szeptember elején láz és jellegtelen, kólikás nyugtalanság tünetei miatt vettek fel egy öt éves, fríz, melegvérű kancát. A lovat a 2005-ben diagnosztizált juh WNV agyvelőgyulladásos eset helyszínétől kb. 20 km-re nyugatra tartották. A kórházi felvétel időpontjában a ló izommerevség tüneteit mutatta, remegés és a hátsó végtagok nehezített mozgása volt megfigyelhető. Az állapota néhány órán belül romlott; a járászavarok a mellő lábaknál is jelentkeztek, valamint a mélyérzés zavarai is kialakultak. Egy napon belül zavart tudat, fogcsikorgatás, feji remegés jelentkezett, és segítséggel sem volt képes többé lábra állni. A betegség végső stádiumában izomgörcsök voltak megfigyelhetők. A ló súlyos és gyorsan romló állapota miatt a kezelőorvosok euthanasia mellett döntöttek. A kórbonctani vizsgálatok során makroszkópos kóros elváltozásokat nem lehetett felismerni. Az agyvelő kórszövettani vizsgálata során lymphocytás-plasmocytás érköpenyt, gliasejt-sarjadzást, gócos, neutrophil granulocytás infiltrációt és neuronelhalást lehetett megfigyelni az agytörzs területén. Lymphocytás-plasmocytás érköpeny és gliasejt-sarjadzás fordult elő a gerincvelő szürke- és fehérállományában, legsúlyosabb mértékben a nyaki és ágyéki szakaszon. RT-PCR vizsgálattal a nyugat-nílusi vírus nukleinsavát lehetett kimutatni a ló máj-, agy- és gerincvelőmintáiból, valamint immunhisztokémiai vizsgálattal a vírusantigén jelenlétét a gerincvelő fehérállományából. A vírus-RNS részleges nukleotidszekvenciája a legnagyobb (99,7%) hasonlóságot a Magyarországon, 2004-ben és 2005-ben kimutatott nyugat-nílusi vírusok szekvenciáihoz mutatta. A következő év (2008.) augusztusa és októbere között 17 idegrendszeri tünetet mutató, nyugat-nílusi vírusfertőzésre gyanús lovat vizsgáltunk. Az érintett lovakat (8 kanca, 6 herélt és 3 mén, 6

hónapostól 16 évesig) az ország különböző részein tartották. A leggyakoribb tünet a járászavar (ataxia) és gyengeség volt (13/17). Emellett ferde testtartást, a triceps, quadriceps, fej- és nyakizmok remegését, izommerevséget, viselkedészavarokat, rágás- és nyelészavart, valamint egyoldali facialis bénulást lehetett megfigyelni egyes állatokban. A 17 ló közül 5 elhullott vagy túllattatásra került; a túlélők közül 9 két hónapon belül teljesen felgyógyult, 3 maradványtünetként facialis bénulást és ataxiát mutatott a heveny stádium után hat hónappal is. A szerológiai vizsgálatok mindegyik ló esetében WNV elleni ellenanyagok jelenlétét mutatták ki. A neutralizáló ellenanyagok titere 1:10 és 1:270 között változott. Emelkedett fehérvérsejtszámot és neutrophiliát három, elhullásra vezető esetben lehetett megfigyelni. A plazma metabolikus profilvizsgálatai során a mért értékek az egészséges tartományban maradtak, csak két ló esetén volt emelkedett plazmafehérje szint (>8,9 g/dl) és emelkedett kreatinin-kináz szint (>3,233 NE/l). A cerebroszpinális folyadékban két lónál lehetett emelkedett fehérjeszintet (>210 mg/dl), emelkedett neutrophil granulocytá és kis lymphocytá számot megállapítani. Az elhullott állatok makroszkópos kórbonctani vizsgálatai során kóros elváltozásokat nem lehetett megfigyelni. A kórszövettani vizsgálatok főként lymphocytás-plazmasejtes érköpenyt, gliasarjadzást, gócos neutrophil granulocytás infiltrációt és idegsejt-degenerációt tártak fel ezekben az esetekben is. Az elváltozások főként az agytörzsben, a nyúltvelőben és a gerincvelő szürke- és fehérállományában fordultak elő. A legsúlyosabb gerincvelői elváltozások a nyaki-háti és ágyéki szakaszokon voltak. A vírus-RNS jelenlétét két ló agyvelő- és egy ló fehérvérsejt-mintáiból mutattuk ki RT-PCR módszerrel. A vírusok részleges nukleotidszekvenciái a legnagyobb (>99%) hasonlóságot a 2008-ban, vadmadarokból kimutatott nyugat-nílusi vírusokkal mutatták (Kutasi és mtsai., 2011). Emellett szerológiai vizsgálatnak vetettünk alá 27, idegrendszeri tünetet mutató lóból gyűjtött vérsavó mintát. Az IgG ellenanyagok kimutatására irányuló ELISA vizsgálattal pozitívnak talált mintákat indirekt immunfluoreszcenciás, haemagglutináció-gátlási és plakkredukciós neutralizációs próbával is megvizsgáltuk. A szerológiai vizsgálatok 12 lónál mutattak ki WNV antigénnel reaktív ellenanyagokat. 2009-ben 40, idegrendszeri betegségben szenvedő ló mintáit vizsgáltuk. A vírus jelenlétét kimutattuk négy, súlyos tünetek miatt euthanisált ló agyvelő mintájából. Ezek közül az egyik lóból a betegség korai stádiumában gyűjtött fehérvérsejtekből is kimutattuk a vírust. Ebben a lóban IgM ellenanyagok jelenlétét, és a savópárban IgG ellenanyagtiter-emelkedést (<1:10 – ≥ 1:640) tapasztaltunk. Egy mintából járt sikerrel a vírusizolálás. IgG ELISA módszerrel megvizsgáltunk egészséges lovakból, 2009-ben gyűjtött 276 savómintát, melyek közül 79 mintánál kaptunk pozitív eredményt (28%), viszont a megerősítő immunfluoreszcenciás és plakkredukciós vírusneutralizációban két savómintát a kullansencephalitis vírussal szemben magasabb titerben reagált, mint a WNV-vel szemben (Bakonyi és mtsai., 2013).

A passzív vadmadár-monitoring vizsgálataink során 2008-ban jelentős számú megbetegedést tapasztaltunk, és a WNV számottevő földrajzi terjedését figyeltük meg.

Összesen 33 fajhoz tartozó 91 vadmadár tetemét vizsgáltuk meg abban az évben, valamint fehérvérsejt- és vérsavó-mintákat gyűjtöttünk héjából, házigalambokból és barna rétihéjából. A mintákat RT-PCR segítségével vizsgáltuk JEV szerokomplexhez tartozó vírusok nukleinsavának jelenlétére. A pozitív mintákat immunhisztokémiai módszerrel is megvizsgáltuk, valamint megkíséreltük a vírusok izolálását az arra alkalmas mintákból (Bakonyi és Erdélyi, 2011). A vadmadár-monitoring vizsgálatokat 2009-ben is folytattuk. Abban az évben 31 madárfaj 70 elhullott egyedének mintáit vizsgáltuk a júniustól októberig terjedő időszakban. A két évben összesen 37 hazai madár mintájából mutattuk ki a WNV jelenlétét. Az immunhisztokémiai vizsgálatok minden olyan esetben alátámasztották az RT-PCR pozitív eredményét, amikor a szövetminták mennyisége és állapota lehetővé tette a vizsgálat elvégzését. A vírust 13 mintából sikerült izolálni. Magyarországi vadmadarakból gyűjtött 20 vérsavóminta vizsgálata során 8-ból lehetett WNV antigénnel reagáló ellenanyagokat kimutatni. Házigalambokból 2009-ben gyűjtött 29 vérsavó mintából 25 bizonyult pozitívnak a szerológiai vizsgálatok során. Közülük 20 mintát olyan galambokból gyűjtöttünk, amelyeket a WNV 2004-es felbukkanásának helyén tartottak. A 2008-ban megfigyelt esetek földrajzi eloszlása jelentősen szélesebb körű volt, mint a 2003-2007 között diagnosztizált fertőzéseké. A korábban érintett országgrész (a Nagyalföld déli és keleti régiói) mellett a vírust kimutattuk az ország középső és dunántúli területein is. Egy átfogó állategészségügyi monitoring program részeként, tojásmentést követően a Dévaványai Tűzokmentő Állomáson kelteztet és felnevelt tűzokkokból szabadon engedésük előtt vérmintákat gyűjtöttünk. A vérvételeket 2006-ban, 2009-ben és 2011-ben, július-augusztus hónapokban végeztük; a minták klinikailag egészséges tűzokkokból származtak. A vérsavómintákat IgG ELISA módszerrel vizsgáltuk nyugat-nílusi vírus elleni ellenanyagok jelenlétére. A 2006-ban gyűjtött 7 savóminta közül 2, a 2009-ben gyűjtött 9 savóminta mindegyike, valamint a 2011-ben gyűjtött 11 savóminta közül 3 bizonyult pozitívnak WNV IgG ellenanyagok jelenlétére (Sós és mtsai., 2012).

A nyugat-nílusi vírus hazai szúnyog vektorainak pontosabb meghatározása, és bennük a WNV előfordulási gyakoriságának megismerése céljából felmérő vizsgálatokat végeztünk. Az első vizsgálatok során egy Kardoskút közelében található vörös vércse kolóniában 2008-ban *Cx. pipiens* szúnyogokat gyűjtöttünk. Összesen 19 pool-t vizsgáltunk meg RT-PCR módszerrel és egy pool-ból tudtuk kimutatni a WNV RNS jelenlétét. Kiterjedtebb felmérő vizsgálatba kezdtünk 2011-ben, amikor Magyarország hat, keleti és déli megyéjében, összesen 24 gyűjtőhelyen, 24 szúnyogfaj, 11 728 egyedét gyűjtöttük be, majd gyűjtési hely, faj és ivar alapján 1-50 egyedet tartalmazó, 362 pool-ba rendeztük. Ugyanezek a gyűjtőhelyek, 2012-ben befogott 18 szúnyogfaj 11 465 egyedéből képeztünk 283 pool-t. A gyűjtött szúnyogok közül 23 095 volt nőstény és 68 hím *Culex pipiens*; emellett 30 *Anopheles maculipennis* hím egyedet is gyűjtöttünk 2011 telén. A szúnyog pool-ok homogenizátumait megvizsgáltunk WNV RNS jelenlétére valós idejű

RT-PCR módszerrel. A 2011-ben gyűjtött szúnyogok közül három pool-ból mutattuk ki a vírus jelenlétét: egy Fényeslitkén gyűjtött, *Ochlerotatus annulipes* nőstényeket tartalmazó pool-ból, egy Debrecen közelében gyűjtött, *Coquillettidia richiardii* nőstényeket tartalmazó pool-ból, és egy kardoskúti kékvércse-kolóniánál gyűjtött, *Culex pipiens* nőstényeket tartalmazó pool-ból. A Baranya megyében 2011–2013-ban gyűjtött szúnyog pool-okat tovább vizsgáltuk, a flavavírusok még szélesebb körét kimutató, „univerzális” primereket használó, nested RT-PCR segítségével. Az egyik, a pellerdi halastavaknál 2011 augusztusában, fehér fénycsapdával gyűjtött, 32 *Uranotaenia unguiculata* nőstényt tartalmazó pool homogenizátumából felerősített, 250 bp hosszúságú amplifikációs termék szekvenciája BLAST kereséssel a legnagyobb hasonlóságot a génbanki adatbázisban elhelyezett, WNV_8_1-05-Uu jelű törzs szekvenciájához mutatta. Ezt a vírust szintén *Uranotaenia unguiculata* nőstényeket tartalmazó pool-ból mutatták ki 2005-ben Oroszország Volgográd régiójában. A hazai mintából kimutatott vírus (WNV/189/Uu/2011, „Pellérd vírus”) részleges nukleotidszekvenciáját két szakaszon sikerült meghatározni. Az E fehérje gén részleges szekvenciája 79,6%-ban az NS5 gén részleges szekvenciája pedig 82,5%-ban hasonlított az oroszországi genotípuséhoz. A filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a Pellérd vírus a WNV 4. genetikai vonalához sorolt vírusokkal áll a legközelebbi genetikai rokonságban, ám azoktól is meglehetősen elkülönül, ezért indokolt lehet egy további (lineage-9) genetikai vonal képviselőjének tekinteni.

A 2008-ban megfigyelt, jelentős hazai földrajzi terjedés mellett a WNV vírustörzs felbukkant Ausztria északkeleti részén (Alsó-Ausztria tartományban) is, ahol 11 héjából, egy északi sólyomból, egy saskeselyűből és egy keából sikerült kimutatni RT-PCR és immunhisztokémiai módszerrel. Három héja szövetmintából izoláltuk a vírust. Emellett Bécs, Alsó-Ausztria, Felső-Ausztria, Burgenland és Stájerország szövetségi tartományokban gyűjtött, 138 pool-ba csoportosított szúnyogminták vizsgálata során 7, *Cx. pipiens* nőstényeket tartalmazó pool-ból lehetett kimutatni a vírus jelenlétét. Mindegyik pozitív pool Alsó-Ausztriából, a vadmadár-esetek közeléből származott. További vadmadár-esetek fordultak elő 2009-ben Ausztriában: hat héja, egy kea és egy hóbagoly szövetmintáiból tudtuk a vírus jelenlétét kimutatni RT-PCR és immunhisztokémiai módszerekkel (Bakonyi és mtsai., 2013).

Annak megállapítására, hogy a 2008-ban és 2009-ben kimutatott megbetegedéseket okozó WNV-k milyen rokonsági viszonyban állnak a korábbi években kimutatott vírusokkal, meghatároztuk 22, Magyarországon és Ausztriában gyűjtött mintából kimutatott vírus a részleges nukleotidszekvenciáját az E fehérje gén régiójában és 18 vírus részleges nukleotidszekvenciáját az NS5-3'UTR régióban. A törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok eredményei alapján az összes vizsgált vírus a WNV goshawk-Hungary/04 genotípussal állt a legközelebbi genetikai rokonságban (Bakonyi és mtsai., 2013).

A vírustörzs ausztriai felbukkanása során megbetegedéseket tapasztaltak a Konrad Lorenz Etológiai Intézet Bécshez közeli kísérleti telepén nevelt keák körében. A 24 madarat (13 hím és 11 tojó) tartalmazó csoportból hat hím állat idegrendszeri tüneteket mutatott 2008. augusztus végén. Az egyik idősebb madár tünetei súlyosbodtak, euthanasiát kellett alkalmazni. Mind a tüneteket mutató, mind az egészséges madarakból mintákat gyűjtöttek; az elhullott állatot kórbonctani és kórszövettani vizsgálatoknak vetették alá, valamint a nyugat-nílusi vírushozzás fertőzés kimutatása céljából direkt és indirekt vizsgálatokat végeztünk. Az elhullott kea kórbonctani és kórszövettani vizsgálata során közepes súlyosságú máj- és lépduzzanatot, a májban multiplex elhalásos gócoakat, és számos egyéb szervben nem-gennyes gyulladásos folyamatokat lehetett felismerni. Az agyban nem voltak kórszövettani vizsgálattal kimutatható kóros elváltozások. Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal a nyugat-nílusi vírus antigénjeit lehetett kimutatni nagy mennyiségben a madár máj-, lép- és vázizomsejtjeiben (az agyszövetben viszont nem). RT-PCR segítségével a kea minden vizsgált szövetmintájából (agy, máj, lép, vese, tüdő, szívizom, bél) és keringő fehérvérsejtjeiből is ki lehetett mutatni a WNV RNS jelenlétét. A többi beteg madár tünete és támogató kezelés mellett, több hét után meggyógyult. Szerológiai (ELISA) vizsgálatokkal mindegyikük savómintájából WNV elleni, IgG típusú ellenanyagokat lehetett kimutatni. A primer fertőzés után egy évvel, 2009 szeptemberében az egyik keában kiújultak az idegrendszeri tünetek és olyan mértékben súlyosbodtak, hogy euthanasia mellett döntött az ellátó állatorvos. Néhány héttel később egy másik keában is kiújultak a tünetek, ami miatt 2010 januárjában kellett végleg elaltatni. 2011 márciusában egy harmadik kea idegrendszeri tünetek nélkül, néhány napon belül elhullott. A negyedik, a heveny betegségből felgyógyult kea tünetei 2011 júliusában újultak ki, és leromlása miatt ez a madár is euthanasiában részesült. Az utolsó, heveny betegségt átvészelt kea tünetei 2014 nyarán újultak ki és augusztusban vált szükségessé az euthanasia. Az elpusztult madarak közül három tetemét tudtuk kórbonctani, kórszövettani és virológiai vizsgálat alá vetni. A madarakban makroszkópos kórbonctani elváltozásokat nem lehetett felismerni. Kórszövettani vizsgálatokkal az agyszövetekben különböző súlyosságú, lymphocytás agyvelőgyulladást (multiplex gócos gliasejt-sarjadzás, lymphoidsejtes érköpenyek, gócos demyelinizáció) találtunk. Az elváltozások leginkább az agytörzs és a kisagy területén fordultak elő. A kisagy Purkinje-sejtjeinek pusztulása és a molecularis réteg vékonyodása jellemző elváltozás volt. A WNV antigénjeit sem az agyszövetből sem a zsigeri szervekből nem lehetett kimutatni immunhisztokémiai módszerrel. Az RT-PCR vizsgálatokkal a vírus RNS-ét mindhárom madár agyszövetmintáiból ki lehetett mutatni, a zsigeri szervek viszont negatívnak bizonyultak. A vírusizolálási próbálkozások egyik kea mintája esetében sem jártak sikerrel. A heveny fertőzést követően évente savómintákat gyűjtöttünk a betegségen átesett állatokból. Mindegyikükben magas (1:64 – 1:640) titerben lehetett WNV elleni neutralizáló ellenanyagokat kimutatni PRNT módszerrel. Meghatároztuk a pozitív

madarak agyvelő mintáiból kimutatott WNV-k teljes genomszekvenciáit és filogenetikai vizsgálatokat végeztünk. A törzsfa-rekonstrukciós számítások alapján a négy, keából kimutatott szekvencia Ausztriában és Csehországban, 2008. és 2014. között kimutatott WNV szekvenciákkal helyeződik közös ágon. A filogramon a kea-eredetű szekvenciák genetikai távolsága feltételezett közös őstől a primer fertőzéstől eltelt idővel arányosan meghosszabbodott. A származtatott aminosav-szekvenciák alapján készített törzsfa topológiája hasonlított a nukleotidszekvenciák alapján készítettékéhez. Megjegyzendő azonban, hogy míg három szekvenciánál a WNV esetében jellemző, 3434 aminosav hosszúságú prekurzor polipeptid szekvenciát lehetett lefordítani, az egyik, 2011-ben elhullott kea agyából kimutatott szekvencia eredeti, kezdő metionin ATG kódja ACG-re változott, így a szekvencia a töle 45 nukleotidra helyeződő, alternatív transláció-iniciációs helyről íródhatott át, az N-terminális részen 15 aminosavval rövidebb polipeptidet eredményezve (Bakonyi és mtsai., 2016).

A dél-kelet morvaországi Lanzhot közelében 1997-ben egy flavivírust izoláltak nőstény *Cx. pipiens* szúnyogokból, amely vírusneutralizációs vizsgálatokkal a nyugat-nílusi vírushoz mutatta a legnagyobb antigénrokonságot, szopósegerekben viszont csekélyebb virulenciát mutatott, mint a WNV referencia törzse. A törzset a szúnyogminta gyűjtésének helyéhez legközelebb fekvő, ausztriai település után Rabensburg vírusnak (RabV) nevezték el. Az 1997-es izolátummal szerológailag és patogenitásban megegyező vírust izoláltak 2 évvel később, ugyanarról a gyűjtőhelyről, *Cx. pipiens*-ből. A vírus részletes genetikai jellemzése céljából meghatároztuk a 1997-ben izolált vírustörzs teljes genomszekvenciáját. A vizsgálatok során feltárt, 10 972 nukleotid hosszúságú vírusgenom egy 3433 aminosav hosszúságú nyitott leolvasási keretet kódol a 97. nukleotid pozícióval kezdődően. A származtatott aminosav-szekvencia vizsgálatával meghatároztuk az egyes vírusfehérjék lokalizációját. A JEV szerokomplex vírusaira jellemző, konzervált szekvencia-motívumokat a RabV származtatott aminosav-szekvenciájában is megtaláltuk. A vírustörzs szekvenciáját összehasonlítottuk a génbanki adatbázisban (a vizsgálatok időpontjában) hozzáférhető 16 teljes WNV genom, illetve a JEV szerokomplex vírusainak teljes és részleges szekvenciáival. A szekvencia-hasonlósági adatok alapján a RabV a legközelebbi genetikai rokonságban a WNV-vel áll (75-77%), ám a hasonlóság mértéke elmarad a WNV 1-es és 2-es genetikai vonalain belüli hasonlósági értékektől (>90%). A törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok eredményei alapján a RabV genetikailag jelentősen eltér a WNV két, korábban ismert genetikai vonalához tartozó vírusoktól, és a genetikai távolság a RabV és a többi WNV között meghaladja a WNV két genetikai vonala közötti távolságot. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a RabV a WNV egy korábban nem ismert genetikai vonalának képviselője („lineage-3”), vagy a WNV-vel rokon, új flavivírus faj. A filogenetikai vizsgálatok feltárták azt is, hogy egy másik, WNV-ként azonosított vírustörzs (WNV LEIV-Krmd88-190) génbankba elhelyezett szekvenciája is jelentősen eltér mind a WNV

korábban ismert, 1-es és 2-es genetikai vonalához sorolt vírusoktól, mind pedig a RabV-tól, így új genetikai vonalba sorolása („lineage-4”) indokolt. Ezt a vírustörzset a Kaukázusban izolálták 1998-ban, *Dermocentor marginatus* kullancsból. Az NS5 gén részleges nukleotidszekvenciái segítségével készített törzsfá alapján a RabV monofiletikus csoportot alkot a WNV lineage-1 és lineage-2 törzseivel. A LEIV-Krmd88-190 törzsnek legközelebbi közös őst a Koutango vírussal valószínűsítette a vizsgálat. A RabV 1999-ben izolált törzsének részleges genomszekvenciáját is meghatároztuk. A vizsgált szakaszok (a C-M, NS3, NS4b-NS5 gének) >99% hasonlóságot mutattak a 1997-ben izolált törzs szekvenciájának homológ szakaszaival (Bakonyi és mtsai., 2005b). A dél-morvaországi gyűjtőhelyen további szúnyogmintákat gyűjtöttek 2006 és 2008 között. Az egyik, 2006 júniusában gyűjtött, *Aedes rossicus* nőtényt tartalmazó szúnyog pool-ból sikerült vírust izolálni szopósegerek intracerebrális oltásával, amely kereszt-neutralizációs vizsgálatokkal a RabV-hez mutatta a legközelebbi antigén-hasonlóságot. Meghatároztuk a vírustörzs nukleotidszekvenciáját az 5'UTR-C-M-E-NS1 szakaszon, ami >99,9%-ban hasonlított a RabV 1997-ben izolált törzsének homológ szakaszához.

A csehországi szúnyog-arbovírus monitoringvizsgálatok keretében, a dél-morvaországi tavak közelében 2013 júliusa és augusztusa során 32 500 nőtény *Cx. modestus* szúnyog egyedét gyűjtöttek cseh kutató partnereink. A 650 pool-ba rendezett szúnyogminta, kettes genetikai vonalhoz tartozó WNV RNS jelenlétére irányuló RT-PCR vizsgálata négy pool esetében pozitív eredménnyel zárult. Három mintából a vírust izolálták szopósegér intracranialis oltással. Meghatároztuk az izolált vírusok teljes genomszekvenciáját és összehasonlítottuk kettes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok szekvenciáival. A törzsfá-rekonstrukciós vizsgálatok eredményei alapján a csehországi vírusok szekvenciái két ágat alkottak, és az Olaszországban, 2013-ban, emberi megbetegedésekből kimutatott, kettes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusokkal van feltételezett legközelebbi közös ősök. A törzsfá topológiája alapján a csehországi és egyéb, 2008. és 2013. között Közép-Európában kimutatott WNV-k szekvenciái a 2004-ben felbukkant, magyarországi vírusával állnak a legközelebbi genetikai rokonságban (Rudolf és mtsai., 2014).

Görögország észak-keleti részén jelentős számú emberi esettel járó nyugat-nílusi encephalitis járványt figyeltek meg 2010 nyarán és őszén. A járványidőszakban 191 esetet diagnosztizáltak, amelyek közül 32 halálos kimenetelű volt. Az első emberi megbetegedéseket követően szúnyogokat gyűjtöttek a járvánnyal érintett településeken és WNV RNS jelenlétére vizsgálták őket RT-PCR segítségével. Egy 2010 augusztusában Nea Santa településen gyűjtött, 50 *Cx. pipiens* nőtény szúnyogot tartalmazó pool vizsgálata pozitív eredménnyel zárult. Az NS5 gén területén felerősített, 146 nt hosszúságú genomszakasz nukleotidsorrendje a legnagyobb hasonlóságot a Magyarországon, 2004-ben elpusztult héjából származó nyugat-nílusi vírus szekvenciájához mutatta. Meghatároztuk a vírus (Nea-Santa-Greece-2010) teljes

genomszekvenciáját és filogenetikai vizsgálatokat végeztünk. A legnagyobb nukleotidhasonlóságot (99,6%) ebben az esetben is a magyarországi héjából kimutatott, „goshawk-Hungary-2004” vírus szekvenciájával találtuk. A törzsfán a görögországi és magyarországi eredetű vírusok különálló ágat alkottak, közeli feltételezett közös őssel. Hozzájuk legközelebb Dél-Afrikában kimutatott WNV törzsek szekvenciái álltak (Papa és mtsai., 2011).

A nyugat-nílusi vírus közelmúltban izolált törzseinek genetikai jellemzésére irányuló kutatásaink keretében, együttműködésben törökországi kutatókkal, meghatároztuk egy Törökország közép-anatóliai térségében tartott, idegrendszeri tüneteket mutató lóból 2011-ben izolált WNV törzs (T2) teljes genomszekvenciáját. A génbanki adatbázisokban végzett BLAST homológia-keresés eredménye szerint a genomszekvencia a legnagyobb hasonlóságot (99,3%) a WNV egyes genetikai vonalához tartozó, ArB310/67 vírustörzs szekvenciájához mutatta. Ezt a vírust a Közép-Afrikai Köztársaságban izolálták 1967-ben. A T2 törzs mellett további 37, Törökországban 2011. és 2013. között izolált WNV részleges genomszekvenciáját (E fehérje kódoló régió) is meghatároztuk és filogenetikai analízisnek vetettük alá. A szekvenciák egy kivételével a legnagyobb hasonlóságot (98,8-100%) a T2 és ArB310/65 törzsek szekvenciáihoz, valamint egymáshoz mutatták. A filogenetikai analízis segítségével készített törzsfán a vizsgált 37 vírus közül 36 szekvenciája a T2 víruséval képez monofiletikus ágat, egy viszont a Nigériában, 1965-ben izolált IBAN7019 törzsszel és a Szenegálban, 1979-ben izolált ArD27875 törzsszel került közös ágra. Az egyes genetikai vonalban virulencia markernek feltételezett aminosavszubsztitúciók a T2 törzsnél nem fordultak elő, viszont a WNV kettes genetikai vonalában, *Cx. pipiens*-ben rövidebb replikációs idővel összefüggésbe hozott E fehérje V₁₅₉A szubsztitúció V₁₅₉F formában volt jelen (Ergunay és mtsai., 2015).

5. Megbeszélés

5.1. Az Usutu vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink

Kutatásaink kezdetén (2001-ben) kevés adat állt rendelkezésre ezzel a vírussal kapcsolatban. A teljes genomszekvencia meghatározása egyrészt elősegítette a vírus pontosabb megismerését és igazolta annak közeli rokonságát a nyugat-nílusi víruséhoz, másrészt lehetőséget teremtett molekuláris diagnosztikai módszerek kifejlesztésére a vírusfertőzés megbízhatóbb kórjelzéséhez. Ezeknek a módszereknek a segítségével végzett, aktív és passzív felmérő vizsgálatainkkal igazolni tudtuk, hogy az USUV fennmaradt Ausztriában, valamint a következő években felbukkant/elterjedt Közép- és Dél-Európa számos országában (Magyarországon, Olaszországban, Svájcban, Csehországban), valamint más kutatócsoportok később kimutatták az előfordulását további, nyugat-európai országokban is (Németországban, Belgiumban, Franciaországban, Hollandiában). Retrospektív vizsgálatokkal azt is igazolni tudtuk, hogy a vírus már a 2001-es ausztriai felfedezését megelőzően is jelen volt Európában, mivel az 1996-ban, Olaszországban tapasztalt madárelhullásokból gyűjtött mintákból is ki lehetett mutatni a nukleinsavát. Az elmúlt több mint 20 év folyamán az USUV közép-európai törzse számos genetikai változáson ment keresztül, ami többé-kevésbé elkülönülő genetikai csoportok kialakulását eredményezte. Legutóbbi vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy Magyarországon és Ausztriában a korábban domináló genotípus mellett egy másik is megjelent, amelynek legközelebbi rokonait Olaszországban mutatták ki először, 2009-2010-ben. Az új törzsek felbukkanásának hátterében a madárvonulások szerepe feltételezhető. Vizsgálataink azt is feltárták, hogy az USUV egy másik genetikai vonalához tartozó vírus fordul elő Spanyolországban, amelyet eddig nem hoztak összefüggésbe gerincesek megbetegedéseivel. Valószínű, hogy a különböző genetikai vonalak között számottevő virulencia-eltérések is vannak. Az USUV bizonyos madárfajokban, különösen feketerigóban és bagolyfélékben okoz gyakrabban megbetegedéseket, de számos más madárfajban is előfordulnak esetek. A vadmadarakban megfigyelhető, halmozott megbetegedések és elhullások mellett a fogékony fajok számos egyede átvészeli a fertőzést, amely tartós és populáció-szintű immunológiai védetség kialakulásához vezet, így a járvány véget ér. Mindemellett a vírus tovább cirkulál a gerinces gazdáiban és szúnyog vektorokban, és amikor a fogékony gazdafajok új generációi szeronegatív egyedeinek aránya elér egy kritikus pontot, újabb járványkitöréseket lehet megfigyelni. Kísérleti állatfertőzéseink eredményei alapján házityúkban és házilúdiban az USUV nem okoz megbetegedést. Az USUV emlősöket is fertőz. Egérmodellben végzett vizsgálataink igazolták neuroinvasivitását és németországi kutatók természetes úton fertőződött denevérek elhullásának hátterében is kimutatták a

vírus szerepét. A vírus képes embereket is fertőzni és eddig legalább két esetben igazolták kóroki szerepét súlyosan immunszuppresszált betegek idegrendszeri megbetegedéseiben. Emellett számos kutatás, köztük saját vizsgálataink is feltárták viraemiával járó, tünetmentes emberi USUV fertőzések előfordulását. Ennek elsősorban a véradók flavivírus-fertőzöttségre irányuló szűrése szempontjából van jelentősége, mivel amennyiben súlyosan immunszuppresszált betegek (pl. szervátültetés során, leukémia kezelésekor) kapnak Usutu vírussal kontaminált vért, bennük az idegrendszeri megbetegedések kockázata magas lehet.

A vírussal kapcsolatos kutatásaink során meghatároztuk a virológiai diagnosztikában széles körben használt sejtvonalak fogékonyságát, új, molekuláris diagnosztikai módszereket (RT-PCR, qRT-PCR) fejlesztettünk ki, valamint adaptáltuk az immunhisztokémiai és haemagglutinációs próbákat a vírus antigénjeinek és a vírus elleni ellenanyagoknak a kimutatása céljából.

5.2. A nyugat-nílusi vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink

A nyugat-nílusi vírus hazai előfordulására először az 1960-as években végzett szerológiai vizsgálatok adatai utaltak. Az 1970-es években góckutatások során gyűjtött kisméltóságok mintáiból két esetben is izolálták a vírust, de annak genetikai azonosítására korábban nem került sor. A hazai eredetű izolátumként számon tartott törzs (WN_{m1}) részleges genetikai vizsgálatával megállapítottuk, hogy az közel azonos a virológiai laboratóriumokban világszerte használt, Eg 101 referencia törzsszel. Ez felveti annak a gyanúját, hogy a korabeli izolálás során laboratóriumi kontamináció, vagy egyéb félreértés folytán végül az egyiptomi eredetű referencia törzs (Eg 101) került a hazai diagnosztikai intézet (OEK) birtokába. Ez olyan szempontból viszont megnyugtató, hogy az utóbbi negyven évben valóban nyugat-nílusi vírussal történtek a hazai diagnosztikában a szerológiai vizsgálatok. Az azonosságnak lehet egy másik magyarázata is, amely szerint a vírus egyes törzsei meglepő mértékű genetikai stabilitást mutathatnak. Erre példa lehet egy másik vizsgálatunk eredménye, amely szerint a WNV egy Törökországban, 2011-ben, lóól izolált törzsének teljes genomszekvenciája 99,9%-ban hasonlít a vírus 1967-ben a Közép-Afrikai Köztársaságban izolált törzsének szekvenciájához. (Ebben az esetben a kontamináció lehetőségét ki lehetett zárni.) A megfigyelés rávilágít arra, hogy a WNV ökológiájának és járványtanának számos részlete még tisztázatlan.

Klinikai tünetekben megnyilvánuló WNV-fertőzést először libákban, 2003-ban, sikerült igazolni Magyarországon. Ez a vírustörzs az Izraelben, 1998-ban felbukkant, valamint az Amerikai Egyesült Államokban 1999-ben megjelent, egyes genetikai vonalhoz sorolt vírusokkal áll a legközelebbi genetikai rokonságban. A vírust Izraelben először olyan fiatal fehér gólyák elhullott egyedeinek mintáiból mutatták ki, amelyek valószínűleg Közép-Európában keltek 1998-ban, és őszi vonulások idején viharos szelek

elsodorták őket Izrael partjaihoz. Ezért feltételezhető, hogy a 2003-ban, hazánkban kimutatott vírus ősei korábban is jelen voltak a régióban. Ez azért is érdekes, mert a WNV Amerikában felbukkant törzsének eredete tisztázatlan. Mivel a legközelebbi ismert rokona az izraeli törzs, széles körben elfogadott vélekedés, hogy onnan jutott át Amerikába. A kutatás eredményei alapján viszont nem lehet azt kizárni, hogy Közép-Európából származik. A törzset csak egy alkalommal lehetett kimutatni hazai mintákból, 2004-ben már egy másik vírustörzs bukkant fel, és okozott megbetegedéseket és elhullásokat héjájában. Ez a vírus a WNV kettes genetikai vonalához tartozik, amelynek képviselőit korábban csak Afrika, Szaharától délre eső területeiről izolálták. Vizsgálataink igazolták, hogy a vírustörzs képes volt áttelelni a hazai éghajlati viszonyok között, endémiássá vált és a megjelenését követő három évben sporadikus megbetegedéseket okozott vadmadarakban, juhban és lovakban. 2008-ban viszont országsszerte elterjedt, jelentő számú állati és emberi megbetegedést okozott, valamint fennmaradt az ország területén és minden évben kimutatható volt állati és emberi idegrendszeri megbetegedések háttérében. Emellett a vírus átterjedt Ausztria, Görögország, Olaszország, Szerbia, Csehország, Szlovákia és Törökország területére is, és egyes országokban nagyszámú emberi megbetegedésekkel és jelentős arányú halálozással járó járványokat okozott.

A vírustörzs vadmadarak közül egyes ragadozó fajokat (főként héjákat) betegít meg. Ennek háttérében állhat ezeknek a gazdafajoknak a fokozott érzékenysége, de az is, hogy a vektorok útján terjedés mellett a ragadozó madarak vírussal fertőzött zsákmányuk elfogyasztása során, alimentáris úton fertőződnek, és a nagy mennyiségű vírus felvétele miatt alakulnak ki a súlyosabb megbetegedések. A nyugat-nílusi vírus által okozott fertőzések többsége nem jár klinikai tünetek kialakulásával. Az idegrendszeri megbetegedéseket eredményező (neuroinvazív) fertőzések kialakulásának pontos mechanizmusa még nem ismert. A korábbi vélekedéseket, miszerint a kettes genetikai csoporthoz tartozó WNV-k nem neuroinvazívak, saját vizsgálataink eredményei is egyértelműen cáfolják. A virulencia genetikai markereinek azonosítására számos kutatás folyik. Emellett gazda-eredetű faktorok, különösen a vér-agy gát integritását rontó tényezők (pl. magas vérnyomás, egyes parazitózisok) és immunszuppresszív hatások (pl. circovírus fertőzés) is elősegíthetik a vírus központi idegrendszerbe jutását. Bár a vírus döntően heveny megbetegedéseket okoz, vizsgálataink azt is kimutatták, hogy bizonyos fajokban (pl. keában) perzisztáló idegrendszeri fertőzés alakulhat ki, amely hónapokkal vagy évekkkel később kiújulva okozhatja a madarak elhullását.

A WNV korábban leírt, két genetikai vonalán túl, kutatásaink eredményei további genetikai vonalak elkülönítését tették indokolttá. Ezen genetikai vonalak képviselőinek elterjedtsége viszont sokkal korlátozottabb, mint a két fő genetikai vonalé. A cseh-osztrák határ közelében *Culex* fajokból kimutatott, harmadik genetikai vonalhoz sorolt Rabensburg vírus a területen endémiás előfordulásának tekinthető; de úgy tűnik, hogy kevésbé hatékonyan szaporodik gerinces gazdák sejtjeiben és betegséget sem okoz. A

négyes (kilences) genetikai vonalhoz sorolt és Magyarországon is kimutatott WNV jóval szélesebb körben elterjedt, hiszen előfordulása a Kaukázustól Ausztriáig ismert. Ezt a vírust viszont csak *Uranotaenia unguiculata* szúnyogokból sikerült eddig kimutatni, és emlős vagy madár eredetű sejtekben nem szaporodott. Mivel az említett szúnyogfaj leggyakrabban békák vérével táplálkozik, lehetséges, hogy ez a vírus egy sajátos ökológiai ciklust tart fenn. A genetikai vizsgálatok eredményei felhívják arra a figyelmet, hogy a nyugat-nílusi vírus genetikai változatossága sokkal nagyobb, mint ahogy azt korábban gondolták, valamint különböző genetikai vonalak képviselői egyidőben előfordulnak azonos földrajzi területeken, így hazánkban is.

5.3. Az Usutu vírus és a nyugat-nílusi vírus járványtani és kórtani jelentőségének összehasonlítása

Vizsgálataink eredményei alapján megállapítható, hogy mindkét vírussal endémiás jelleggel előfordul a mediterrán térség és Közép-Európa számos országában, így Magyarországon is. A két vírus ökológiai ciklusa nagyon hasonló, mivel elsődleges vektorai csípőszúnyogok (főként a *Culex pipiens*), fenntartó gerinces gazdái pedig (vad)madarak. A két vírus virulenciája és gazdaspektruma ugyanakkor némileg eltér. Madarakban az USUV főként feketerigókban és bagolyfélékben okoz megbetegedést, a WNV hazai, kettes genetikai vonalhoz tartozó törzse pedig inkább a vágómadár-alakúakat betegíti meg. Ugyanakkor, számos madárfajban okoz mindkét vírus tünetmentes fertőzést. Az emlősök mindkét vírus esetén alkalmi gazdáknak tekinthetők, ezért ezeknek a gazdáknak nincs különösebb szerepük a fertőzési lánc fenntartásában és a vírusok terjesztésében. Az USUV emlősökben nagyon ritkán okoz megbetegedést, a WNV viszont halmozottan okozhat idegrendszeri kórképeket, főként lovakban és emberekben. A két vírus közötti antigén-hasonlóságok egyrészt diagnosztikai problémákat okoznak, mivel a szerológiai próbák elbírálhatóságát a keresztreakciók megnehezítik. Másrészt, a közös gazdáknál esetlegesen kialakuló keresztvédelem miatt befolyásolhatják egymás ökológiai ciklusait is, bár erre egyértelmű bizonyítékok még nem állnak rendelkezésre. A két vírus hasonlósága miatt az ellenük való védekezés elvei is hasonlóak. A fogékony egyedek immunizálásának lehetőségei azért korlátozottak, mert a fenntartó fajokban (vadmadarakban) ez a módszer a gyakorlatban nem alkalmazható. Forgalomban vannak lovak számára kifejlesztett, WNV elleni vakcinák, amelyek jól használhatók az egyedi védekezésben. Humán gyógyászati célú WNV vakcinák kifejlesztés alatt állnak. A jelenlegi ismereteink alapján az USUV ellen nem indokolt vakcinák kifejlesztése és alkalmazása. A fertőzési lánc megszakításának másik lehetséges módszere a vektorok gyérítése. Erre elsősorban az emberek és gazdasági haszonállatok élőhelyein van lehetőség, és egyes védekezési módszerek számottevő károkat okoznak az élővilág más tagjaiban. Ezért a biológiai és alternatív gyérítési módszerek előtérbe helyezése fontos

szempont. A vírusaktivitással érintett területeken végzett, célzott és időzített beavatkozásokkal lehet a leghatékonyabban, a legkisebb járulékos veszteségekkel és környezeti károkozással fellépni a csípősszúnyog vektorok ellen. Ehhez viszont arra van szükség, hogy szervezett és következetes felmérő vizsgálatok kövessék nyomon ezeknek a vírusoknak a térbeli és időbeli aktivitását. A kutatásaink során kifejlesztettünk és a gyakorlatban alkalmaztunk ilyen felmérő vizsgálati rendszereket, valamint jelenleg is teszünk erőfeszítéseket további, költséghatékonyabb és gyakorlatban jobban használható módszerek kialakítására. Az ilyen monitoring rendszerek üzemeltetése a már ismert vírusok aktivitásának nyomon követése mellett új kórokozók (pl. Dengue vírus, Zika vírus, Chikungunya vírus, stb.) hazai felbukkanásának korai felismerésére is alkalmas lehet, vagy alkalmassá tehető.

6. Új tudományos eredmények (tézispontok)

Az értekezés alapjául szolgáló kutatások során munkatársaimmal a következő, a tudomány számára új eredményeket értük el, és az alábbi fontosabb megállapításokat tettük:

1. Meghatároztuk az Usutu vírus ausztriai és dél-afrikai referencia törzseinek teljes genomszekvenciáit; megállapítottuk a feltételezett gének, enzim-motívumok és konzervált genomszakaszok helyeződését.
2. Kimutattuk az Usutu vírus felbukkanását vadmadarakban és szúnyogokban, Magyarországon, Olaszországban, Svájcban és Csehországban; valamint retrospektív vizsgálatokkal igazoltuk az Usutu vírus nukleinsavának jelenlétét Olaszországban, 1996-ban elhullott vadmadarak szövetmintáiban.
3. Filogenetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a Közép-Európában és Olaszországban előforduló Usutu vírusok közeli rokonságban állnak egymással, viszont egy Spanyolországban, *Culex pipiens* szúnyogokból kimutatott USUV genomszekvenciája jelentősen eltér a vírus közép-európai és olaszországi törzseitől, illetve a dél-afrikai referencia törzstől.
4. Meghatároztuk az Usutu vírus fertőző- és szaporodóképességét különböző szövetenyészetek sejtjeiben, egérmodellben, valamint házityúkban és házilúdiban. Megállapítottuk, hogy a vírus ezekben a baromfi fajokban nem okoz betegséget.
5. Az Usutu vírus kimutatására alkalmas, gyors és érzékeny molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereket fejlesztettünk ki és alkalmaztunk a vírus előfordulásának és terjedésének nyomon követésére, valamint szerológiai vizsgálómódszereket fejlesztettünk ki a vírus elleni ellenanyagok kimutatására. Megállapítottuk, hogy az ausztriai járványkitörést követően nagyarányú szeropozitivitás alakult ki a vadmadár populációban.

6. Meghatároztuk a nyugat-nílusi vírus WN_{m1} jelű magyarországi törzsének részleges nukleotidszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az közel azonos a vírus Eg101 jelű referencia törzsével.
7. Meghatároztuk a nyugat-nílusi vírus csehországi törzsének (Rabensburg vírus) genomszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az jelentősen eltér a vírus korábban ismert törzseitől, ezért egy harmadik genetikai vonal képviselőjének tekinthető.
8. Meghatároztuk egy magyarországi lúdállományban 2003-ban felbukkant, megbetegedéseket és elhullásokat okozó nyugat-nílusi vírus genomszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az Izraelben, 1998-ban fehér gólyákból kimutatott, illetve 1999-ben az Amerikai Egyesült Államokban felbukkant, egyes genetikai vonalhoz tartozó törzsekkel áll a legközelebbi rokonságban.
9. Meghatároztuk egy magyarországi héjákban, 2004-ban felbukkant, megbetegedéseket és elhullásokat okozó nyugat-nílusi vírus genomszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az jelentősen eltér az Európában addig ismert törzsektől, és a kettes genetikai vonalhoz sorolt, afrikai törzsekkel áll közeli rokonságban. Kimutattuk a vírus előfordulását további hazai vadmadarakban, juhban és lovakban. Megállapítottuk, hogy 2004. és 2007. között a vírus endémiássá vált az országban és mérsékelten terjedt, amit 2008-ban jelentős, az ország területének nagy részére kiterjedő járvány követett, valamint a vírus felbukkant Ausztriában, Görögországban és Csehországban is.
10. Meghatároztuk a nyugat-nílusi vírus Törökországban, 2011-ben felbukkant törzsének teljes genomszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az a vírus Közép-Afrikában, évtizedekkel korábban kimutatott törzséhez mutat nagyfokú genetikai hasonlóságot.
11. Krónikus nyugat-nílusi vírusfertőzést mutattunk ki keákban. A teljes genomszekvenciák összehasonlításával megállapítottuk, hogy a vírus genetikai változásainak mértéke arányos a fertőződés időpontja és a madarak elhullása között eltelt idővel.

7. Az értekezés és a tézisek alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke

1. **Bakonyi T**, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. 2004: [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. 328:301-310.
IF: 3,071, Q1, független hivatkozás: 37
2. **Bakonyi T**, Lussy H, Weissenböck H, Hornyák A, Nowotny N. 2005a: [In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus](#). Emerg Infect Dis. 11:298-301.
IF: 5,308, D1, független hivatkozás: 9
3. **Bakonyi T**, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2005b: [Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe](#). Emerg Infect Dis. 11:225-231.
IF: 5,308, D1, független hivatkozás: 139
4. **Bakonyi T**, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. 2006: [Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe](#). Emerg Infect Dis. 12:618-623.
IF: 5,094, D1, független hivatkozás: 187
5. **Bakonyi T**, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgő T, Lussy H, Chvala S, Bukovsky C, Meister T, Weissenböck H, Nowotny N. 2007: [Emergence of Usutu virus in Hungary](#). J Clin Microbiol. 45:3870-3874.
IF: 3,708, D1, független hivatkozás: 62
6. **Bakonyi T**, Erdélyi K. 2011: [Increased bird of prey mortality in Hungary due to West Nile virus infection](#). Ornis Hungarica 19:1-10.
7. **Bakonyi T**, Ferenczi E, Erdélyi K, Kutasi O, Csörgő T, Seidel B, Weissenböck H, Brugger K, Bán E, Nowotny N. 2013: [Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009](#). Vet Microbiol. 165:61-70.
IF: 2,010, D1, független hivatkozás: 42
8. **Bakonyi T**, Busquets N, Nowotny N. 2014: [Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 14:324-329.
IF: 2,298, Q2, független hivatkozás: 6
9. **Bakonyi T**, Gajdon GK, Schwing R, Vogl W, Häbich AC, Thaller D, Weissenböck H, Rudolf I, Hubálek Z, Nowotny N. 2016: [Chronic West Nile virus infection in kea \(Nestor notabilis\)](#). Vet Microbiol. 183:135-139.
IF: 2,628, D1
10. **Bakonyi T**, Erdélyi K, Brunthaler R, Dán Á, Weissenböck H, Nowotny N. 2017a: [Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016](#). Emerg Microbes Infect. 6:e85.
IF: 5,605 (2016), D1
11. **Bakonyi T**, Jungbauer C, Aberle SW, Kolodziejek J, Dimmel K, Stiasny K, Allerberger F, Nowotny N. 2017b: [Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges](#). Euro Surveill. 22:pii 17-00644.
IF: 7,202 (2016), D1

12. Chvala S, **Bakonyi T**, Hackl R, Hess M, Nowotny N, Weissenböck H. 2005: [Limited pathogenicity of Usutu virus for the domestic chicken \(Gallus domesticus\)](#). Avian Pathol. 34:392-395.
IF: 1,789, D1, független hivatkozás: 15
13. Chvala S, **Bakonyi T**, Hackl R, Hess M, Nowotny N, Weissenböck H. 2006: [Limited pathogenicity of Usutu virus for the domestic goose \(Anser anser f. domestica\) following experimental inoculation](#). J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 53:171-175.
IF: 1,356, Q1, független hivatkozás: 10
14. Chvala S, **Bakonyi T**, Bukovsky C, Meister T, Brugger K, Rubel F, Nowotny N, Weissenböck H. 2007: [Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003-2005](#). Vet Microbiol. 122:237-245.
IF: 2,010, D1, független hivatkozás: 42
15. Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeredi L, Rátz F, Skáre J, **Bakonyi T**. 2007: [Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 7:181-188.
IF: 1,919, Q1, független hivatkozás: 54
16. Ergunay K, **Bakonyi T**, Nowotny N, Ozkul A. 2015: [Close relationship between West Nile virus from Turkey and lineage 1 strain from Central African Republic](#). Emerg Infect Dis. 21:352-355.
IF: 6,994, D1, független hivatkozás: 3
17. Hubálek Z, Rudolf I, Čapek M, **Bakonyi T**, Betášová L, Nowotny N. 2014: [Usutu virus in blackbirds \(Turdus merula\), Czech Republic, 2011-2012](#). Transbound Emerg Dis. 61:273-276.
IF: 2,944, D1, független hivatkozás: 7
18. Kecskeméti S, Bajmócy E, Bacsadi A, Kiss I, **Bakonyi T**. 2007: [Encephalitis due to West Nile virus in a sheep](#). Vet Rec. 161:568-569.
IF: 1,087, Q1, független hivatkozás: 14
19. Kutasi O, **Bakonyi T**, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S, Szenci O. 2011: [Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary](#). J Vet Intern Med. 25:586-591.
IF: 1,992, D1, független hivatkozás: 27
20. Manarolla G, **Bakonyi T**, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, Nowotny N. 2010: [Usutu virus in wild birds in northern Italy](#). Vet Microbiol. 141:159-163.
IF: 3,256, D1, független hivatkozás: 40
21. Meister T, Lussy H, **Bakonyi T**, Sikutová S, Rudolf I, Vogl W, Winkler H, Frey H, Hubálek Z, Nowotny N, Weissenböck H. 2008: [Serological evidence of continuing high Usutu virus \(Flaviviridae\) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria](#). Vet Microbiol. 127:237-248.
IF: 2,370, D1, független hivatkozás: 27
22. Papa A, **Bakonyi T**, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. 2011: [Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010](#). Emerg Infect Dis. 17:920-922.
IF: 6,169, D1, független hivatkozás: 81

23. Rudolf I, **Bakonyi T**, Sebesta O, Mendel J, Peško J, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Nowotny N, Hubálek Z. 2014: [West Nile virus lineage 2 isolated from Culex modestus mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North?](#) Euro Surveill. 19:2-5.
IF: 5,722, D1, független hivatkozás: 8
24. Rudolf I, **Bakonyi T**, Šebesta O, Mendel J, Peško J, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Nowotny N, Hubálek Z. 2015: [Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem](#). Parasit Vectors. 8:520.
IF: 3,234, Q1, független hivatkozás: 2
25. Sós E, Molnár V, Dandár E, Bálint Á, **Bakonyi T**. 2012: [Szerológiai vizsgálatok hazai tüzok- \(Otis tarda\) állományokban](#). Magyar Állatorvosok Lapja. 134: 361-365.
IF: 0,146, Q3
26. Steinmetz HW, **Bakonyi T**, Weissenböck H, Hatt JM, Eulenberger U, Robert N, Hoop R, 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](#). Vet Microbiol. 148:207-212.
IF: 3,327, D1, független hivatkozás: 40
27. Szentpáli-Gavallér K, Antal L, Tóth M, Kemenesi G, Soltész Z, Dán A, Erdélyi K, Bányai K, Bálint A, Jakab F, **Bakonyi T**. 2014: [Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011-2012 in Hungary](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 14:648-655.
IF: 2,298, Q2, független hivatkozás: 3
28. Weissenböck H, **Bakonyi T**, Chvala S, Nowotny N. 2004: [Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination](#). Acta Neuropathol. 108:453-460.
IF: 2,503, Q1, független hivatkozás: 22
29. Weissenböck H, **Bakonyi T**, Rossi G, Mani P, Nowotny N. 2013: [Usutu virus, Italy, 1996](#). Emerg Infect Dis. 19:274-277.
IF: 7,327, D1, független hivatkozás: 34

Köszönetnyilvánítás

A flavivírusokkal kapcsolatos kutatásokat széleskörű hazai és nemzetközi kutatási együttműködésben végeztem. A legtöbb hálával Norbert Nowotny professzornak tartozom, aki a Bécsi Állatorvosi Egyetemen felkeltette érdeklődésemet a flavivírusok iránt és lehetőséget teremtett az Usutu vírus, majd a nyugat-nílusi vírus vizsgálatára. Az általa rendelkezésemre bocsátott laboratóriumi háttér, anyagi támogatás, szakmai tudás és nemzetközi kapcsolatrendszer nélkül az értekezésben leírt kutatások töredékét tudtam volna csak elvégezni. A hazai kutatásokban alapvető szerepe volt dr. Erdélyi Károlynak (NÉBIH, ÁDI), aki mind a vizsgálati minták beszerzésében, mind azok feldolgozásában, valamint az eredmények értékelésében és a publikációk elkészítésében kulcsszerepet vállalt. Nagyon köszönöm, és bízom benne, hogy együttműködésünk a jövőben is fennmarad. Külön köszönet illeti dr. Ferenczi Emőké (OEK), aki a nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos kutatásaink kezdetétől példaértékű nyitottsággal, lelkesedéssel, segítőkészséggel és szakmai felkészültséggel vett részt a munkában. A laboratóriumi vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségért tanszéki kollégáimnak, dr. Forgách Petrának, Barna Mónikának, dr. Tapaszi Zsuzsannának, Kojnok Ádámnak, Stoll Gyulának, Hofbauer Gyöngyinek, Bakonyi Győzőnek és dr. Marosi Andrásnak, a szakdolgozatukat és TDK munkájukat készítő hallgatóknak, dr. Iván Líviának, dr. Kovács Kincsőnek, dr. Kuczmog Zitának, dr. Patkó Csillának, dr. Anna Bergenhemnek és dr. Majid Al-Qasimi-nek, valamint feltétlen támogatásáért dr. Fodor László tanszékvezetőnek jár köszönet. A kutatásokban jelentős szerepet vállaltak az Országos Állategészségügyi Intézet/NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság dolgozói, név szerint dr. Ivanics Éva, dr. Ursu Krisztina, dr. Szentpáli-Gavallér Katalin, dr. Glávits Róbert, dr. Kecskeméti Sándor, dr. Dán Ádám, dr. Hornyák Ákos, dr. Bajmócy Endre, dr. Bacsadi Árpád és dr. Kiss István; valamint az Országos Epidemiológiai központ munkatársai: Kaposi Tamásné, dr. Pályi Bernadett, dr. Takács Mária, dr. Bán Enikő, dr. Krisztalovics Katalin és dr. Kis Zoltán. Köszönet mondok a SZIE ÁOTK-n/Állatorvostudományi Egyetemen dolgozó kollégáimnak segítségükért, különösen dr. Korbacska-Kutasi Orsolyának, dr. Molnár Beátának, dr. Sárdi Sárának, dr. Rusvai Miklósnak, dr. Dobos-Kovács Mihálynak és dr. Biksi Imrének. A szúnyogminták gyűjtéséért és fajmeghatározásáért hálás vagyok dr. Papp Lászlónak, dr. Soltész Zoltánnak, Nyárády Katának, dr. Kemenesi Gábornak és dr. Jakab Ferencnek. A madár- és lóminták gyűjtésében nyújtott segítségért dr. Csörgő Tibornak, Halmos Gergőnek, dr. Sós Endrének, dr. Molnár Viktornak, dr. Harrach Balásznak, Veprik Róbertnek, dr. Szilvássy Leventének, Puskás Lászlónak valamint a Körös-Maros Nemzeti Park és a Hortobágyi Nemzeti Park további munkatársainak jár köszönet. Egyes vizsgálatok elvégzéséért dr.

Palya Vilmosnak, dr. Drén Csabának, dr. Bányai Krisztiánnak és Schindler Gábornak vagyok hálás.

Külföldi kollégáim közül, dr. Jolanta Kolodziejek, Helga Lussy, Sonja Chvala, Tania Meister, dr. Herbert Weißenböck, dr. Franz Rubel, dr. Gyula Gajdon, dr. Katharina Brugger, dr. Bernhard Seidel, dr. Núria Busquets, dr. Anna Papa, dr. Zdenek Hubálek, dr. Ivo Rudolf, dr. Giovanni Manarolla, dr. Hanspeter Steinmetz, dr. Stephanie Lim, dr. Penelope Koraka, dr. Byron Martina és dr. Albert Osterhaus munkájáért és segítségéért vagyok leginkább hálás.

A felsorolás nem teljes; hálás vagyok azoknak is, akik segítettek a munkában de névszerint nem említettem meg őket.

A kutatások anyagi támogatását az OTKA D 048647, OTKA K 67900, NKFIH K 120118, a „Bolyai János” Kutatói Ösztöndíj, a Magyar-osztrák bilaterális Tét A-9/2005, valamint a Vectorie, EDENext és EuroWestNile EU FP7 projektek biztosították.

A legnagyobb köszönetet családomnak szeretném mondani, türelmükért és támogatásukért, hogy a kutatói munka és az értekezés elkészítése miatt sokkal kevesebb időt és figyelmet tudtam rájuk fordítani, mint amennyit szerettem volna, illetve amennyit érdemelnének.