

Magyar Tudományos Akadémia

Agrártudományok Osztálya

Állatorvos-tudományi Bizottság

Csípőszúnyogok közvetítette flavivírus fertőzések Európában

MTA doktori értekezés

dc_1462_17

Bakonyi Tamás

2017.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés.....	6
1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Az arbovírusok.....	9
1.1.1. Az arbovírusok definíciója, terjedési módjai.....	9
1.1.2. Az arbovírusok gerinces gazdái.....	10
1.1.3. Az arbovírusok ízeltlábú vektorai.....	11
1.2. A flavivírusok.....	16
1.2.1. A <i>Flaviviridae</i> víruscsalád.....	16
1.2.2. A <i>Flavivirus</i> nemzetség.....	17
1.3. A nyugat-nílusi vírus.....	29
1.4. Az Usutu vírus.....	31
2. Anyag és módszer.....	33
2.1. Vizsgálati anyagok.....	33
2.1.1. Vírustörzsek.....	33
2.1.2. Gerinces gazdákból gyűjtött minták.....	33
2.1.3. Szúnyog vektorokból gyűjtött minták.....	34
2.2. Minták előkészítése, nukleinsav kivonás.....	35
2.3. Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció.....	36
2.4. Nukleinsav szekvencia meghatározás és filogenetikai elemzés.....	43
2.5. Vírusizolálás.....	44
2.6. Állatkísérletek.....	45
2.7. Szerológiai vizsgálatok.....	47
3. Eredmények.....	50
3.1. Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei.....	50
3.1.1. Az Usutu vírus genetikai tulajdonságai.....	50
3.1.2. Az Usutu vírus közép-európai előfordulása és terjedése.....	58
3.1.2.1. Ausztria.....	58
3.1.2.2. Magyarország.....	62
3.1.2.3. Olaszország.....	66
3.1.2.4. Svájc.....	68
3.1.2.4. Csehország.....	70
3.1.3. Az Usutu vírus gazdaspektruma és patogenitása.....	72
3.1.3.1. Az Usutu vírus <i>in vitro</i> sejt-spektruma.....	72
3.1.3.2. Az Usutu vírus pathogenitása szopósegérben.....	74
3.1.3.3. Az Usutu vírus patogenitása házityúban.....	78
3.1.3.4. Az Usutu vírus patogenitása házilúdban.....	79

3.2. A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei.....	81
3.2.1. A nyugat-nílusi vírus genetikai változatossága, európai előfordulása és terjedése.....	81
3.2.1.1. A nyugat-nílusi vírus 2000 előtt izolált, európai törzseinek genetikai jellemzése.....	81
3.2.1.2. A nyugat-nílusi vírus magyarországi felbukkanása és terjedése, törzseinek genetikai jellemzése.....	87
3.2.1.3. A nyugat-nílusi vírus Görögországban kimutatott törzsének genetikai jellemzése.....	101
3.2.1.4. A nyugat-nílusi vírus Csehországban, 2013-ban kimutatott törzsének genetikai jellemzése.....	104
3.2.1.5. A nyugat-nílusi vírus Törökországban kimutatott törzseinek genetikai jellemzése.....	106
3.2.2. A nyugat-nílusi vírus gazdaspektruma és patogenitása.....	109
3.2.2.1. A nyugat-nílusi vírus magyarországi törzsének patogenitása házilúdban.....	109
3.2.2.2. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása vadmadár-fajokban.....	110
3.2.2.3. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása juhban.....	115
3.2.2.4. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása lóban.....	116
4. Megbeszélés.....	120
4.1. Az Usutu vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink.....	120
4.2. A nyugat-nílusi vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink....	129
4.3. Az Usutu vírus és a nyugat-nílusi vírus járványtani és kórtani jelentőségének összehasonlítása.....	143
5. Új tudományos eredmények.....	146
6. Az értekezés alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke.....	148
Irodalmi hivatkozások.....	151
Köszönetnyilvánítás.....	172

Rövidítések jegyzéke

aa:	aminosav (amino acid)
ADE:	antigén-függő fertőződés fokozódás (antibody dependent enhancement)
ÁDI:	Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
Ae:	Aedes
An:	Anopheles
ÁOTK:	Állatorvos-tudományi Kar
BHK:	hőrcsög vese (baby hamster kidney)
BLAST:	szekvencia hasonlóság kereső algoritmus (basic local alignment search tool)
BSL:	biológiai biztonsági fokozat (biology safety level)
BTV:	Bluetongue vírus
C:	vírusmag (core)
CDC:	az Amerikai Egyesült Államok járványügyi központja (Centers for Disease Control and Prevention)
cDNS:	komplementer DNS (complementary DNA)
CHIKV:	Chikungunya vírus
Co:	Coquilletidia
CPE:	sejtkárosító hatás (cytopathic effect)
CRFK:	macska vese (Crandell Reese feline kidney)
Cx:	Culex
DK:	kutya vese (dog kidney)
DNS / DNA:	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
DPI:	fertőzés utáni nap (day post infection)
E:	burok (envelope)
ED:	ló bőr (equine dermis)
ELISA:	antigén/ellenanyag-kimutató módszer (enzyme-linked immunosorbent assay)
E-MEM:	Earle tápfolyadék (Earle's minimal essential medium)
ENSz:	Egyesült Nemzetek Szervezete
ER:	endoplazmatikus retikulum
FCS:	főtális borjúsavó (foetal calf serum)
HAG:	haemagglutináció gátlás
HeLa:	Henrietta Lacks
ICTV:	Nemzetközi vírustaxonomiai bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IFN:	interferon
IgA:	A típusú immunglobulin
IgG:	G típusú immunglobulin
IgM:	M típusú immunglobulin
IIF:	indirekt immunfluoreszcencia
IMD:	veleszületett immunitási rendszer (immune deficiency)
JAK-STAT:	veleszületett immunitási rendszer (Janus kinase – signal transducers and activators of transcription)
kDa:	kilodalton
LACV:	LaCrosse vírus
M:	membrán

MDBV:	szarvasmarha vese (Madin-Darby bovine kidney)
MDCK:	kutya vese (Madin-Darby canine kidney)
ME:	minimum evolution statisztikai módszer
MIR:	szűnyog fertőzöttségi ráta (minimal infection rate)
ML:	maximum likelihood statisztikai módszer
MP:	maximum parsimony statisztikai módszer
NAAT:	nukleinsav amplifikációs módszer (nucleic acid amplification test)
NCR:	nem kódoló régió (non coding region)
NÉBiH:	Nemzeti Élelmiszer-biztonsági Hivatal
NJ:	neighbor-joining statisztikai módszer
NS:	nem szerkezeti (non-structural)
nt:	nukleotid
Oc:	Ochlerotatus
OEK:	Országos Epidemiológiai Központ
OIE:	Állategészségügyi világszervezet (World Organisation for Animal Health, Office International des Epizooties)
PBS:	foszfátpuffer (phosphate buffered saline)
PCR:	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PFU:	plakkformáló egység (plaque forming unit)
PK:	sertés vese (porcine kidney)
prM:	pre-membrán
PRNT:	plakkredukciós neutralizációs próba (plaque reduction neutralisation test)
RdRp:	RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA polymerase)
RK:	nyúl vese (rabbit kidney)
RNS / RNA:	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
RT:	reverz transzkripció
SBV:	Schmallenberg vírus
SINV:	Sindbis vírus
SPF:	specifikus kórokozótól mentes (specified pathogen free)
SzIE:	Szent István Egyetem
TCID:	szövettenyészetet fertőző mennyiség (tissue culture infective dose)
TH:	teknős szív (turtle heart)
TUNEL:	sejt apoptózist kimutató módszer (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
UPGMA:	unweighted pair group method with arithmetic mean statisztikai módszer
UTR:	lefordítatlan régió (untranslated region)
UV:	ultraibolya (ultraviolet)
Vero:	zöldmájom vese (verda reno)
VLP:	vírus-szerű részecske (virus-like particle)
WHO:	Egészségügyi világszervezet (World Health Organisation)

A *Flavivirus* nemzetségbe sorolt vírusok neveinek rövidítéseit az 1. táblázat tartalmazza.

A törzsfákban használt vírus rövidítések feloldását az ábrák magyarázatai vagy hivatkozott táblázatok tartalmazzák.

Bevezetés

Az állategészségügyi jelentőségű kórokozók között különös figyelem irányul a zoonotikus (állatokat és embereket egyaránt fertőző) ágensekre. Elsősorban azért, mert a házasított és vadon élő állatfajokban okozott betegségekből fakadó gazdasági kártételek mellett közvetlen veszélyt jelenthetnek az emberek egészségére is. Másodsorban talán azért, mert a szélesebb gazdaspektrum miatt gyakran jóval bonyolultabb ezeknek a kórokozóknak az ökológiája és a betegségek járványtana, ami gyakran befolyásolja mind a diagnosztikai munka hatékonyságát, mind pedig a védekezés és megelőzés lehetőségeit. A széles gazdaspektrumú kórokozók által okozott fertőzések legnagyobb részénél az ágens terjedése, a fertőződés folyamata és a szervezetre kifejtett hatás (betegség kialakulása) szempontjából jelentős különbségeket lehet megfigyelni a gazdafajok között. Gyakran előfordul, hogy a kórokozó bizonyos gazdafajokban tünetmentes, jellemzően tartós hordozással és ürítéssel járó fertőzést okoz (ún. rezervoár gazda), míg más fajokban tünetekkel, akár elhullással járó betegséget idéz elő, ám nem feltétlenül ürül gazdából. Így ezeknek az ún. alkalmi gazdáknak a járványtani jelentősége csekély.

A széles gazdaspektrumú kórokozók között különös jelentőségűek a gerinctelen és gerinces fajokat egyaránt fertőzni képes ágensek, különösen azok, amelyek terjesztésében általában vérszívó ízeltlábúak (pl. szúnyogok, kullancsok stb.) játszanak szerepet. Az ilyen ízeltlábúak számos vírus, baktérium és egy- vagy többsejtű parazita közvetítői (vektori) lehetnek. Közegészségügyi szempontból, a legnagyobb problémát a malária jelenti globálisan (hozzávetőlegesen évi 200 millió emberi megbetegedés és 600 ezer haláleset; WHO, 2015); állategészségügyi szempontból viszont számos egyéb kórokozónak van kiemelkedő jelentősége. Az állategészségügyi világszervezet (World Organisation for Animal Health, OIE) listáján az emlősökben nagy gazdasági jelentőségű, 69 fertőző betegség közül 22 terjesztésében vagy kialakításában ízeltlábúak játszanak szerepet (OIE, 2017). Ezekből 15-öt vírusok okoznak és közülük nyolc zoonotikus jellegű. Emellett számos, ízeltlábú vektorok által terjesztett vírus (ún. arthropod-borne virus, arbovirus) okoz döntően emberi megbetegedéseket. Ezeknél a vírusoknál más gerinces gazdák gyakran természeti rezervoárjai a kórokozóknak.

Az arbovírusok és az általuk okozott betegségek előfordulása a meleg éghajlatú területeken gyakoribb. Ennek legkézenfekvőbb magyarázata az, hogy mind a vektor fajok (és gerinces gazdafajok) sokasága, mind az egyedek száma általában meghaladja a mérsékelt vagy hideg éghajlaton élőkét. Emellett, a hűvösebb éghajlatú területeken az ízeltlábú vektorok aktivitása jellemzően szezonális. A hideg időszakot (telet) különböző módokon és fejlődési stádiumokban vészelik át, ami befolyásolja az általuk terjesztett kórokozók fennmaradásának esélyeit is. Így az éghajlati tényezők (pl. fagyhatár) jelentős gátat szabnak bizonyos ízeltlábú vektorok és az általuk közvetített kórokozók földrajzi

elterjedésének. Ezt viszont rövidtávon az időjárás, közép- és hosszútávon pedig az éghajlat változásai befolyásolják, módosíthatják. Hasonlóan a téli hideg vektor- és kórokozó-áttelelést befolyásoló hatásához, a nyári meleg időjárás is hatással lehet a vektorok és a kórokozók aktivitására, szaporodási ciklusaira és ezáltal járványok kialakulására. A hőmérséklet mellett a csapadék (főként annak nyári hiánya) is jelentősen befolyásolhatja az arbovírusok aktivitását, elsősorban az ízeltlábú vektorok élőhelyeire, a lárvák továbbfejlődésére vagy az imágók túlélésére gyakorolt hatással. Európa kontinentális éghajlatú területein, így Magyarországon is leginkább az említett hőmérsékleti- és csapadékviszonyok befolyásolják az arbovírusok és vektoraik előfordulását és gyakoriságát.

Arbovírusok elsősorban a *Reo*-, *Toga*-, *Flavi*- és *Bunyaviridae* víruscsaládok vírusai között fordulnak elő, ám számos más víruscsaládban (pl. *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Orhomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*) is vannak ízeltlábú vektorok által terjesztett vírusok. Bár a vírusfajok túlnyomó része – a fent említett okok miatt – főként a trópusi és szubtrópusi területeken fordul elő, közülük néhány jelentős kórokozó Európában is. Egyesek, mint például a kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis virus, TBE; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), az ugróbetegség vírusa (Louping ill virus, LIV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), a Sindbis vírus (SINV, *Togaviridae*, *Alphavirus*) és számos bunyavírus (főként a *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus* és *Phlebovirus* nemzetségek tagjai) endémiás előfordulása Európa egyes területein évtizedek óta ismert. Ezek a kórokozók általában behatárolt földrajzi területeken fordulnak elő és jobbra sporadikus „gócfertőzéseket”, illetve alkalmanként kisebb-nagyobb járványokat okoznak (epidémiás ciklusok). Ezek mellett az utóbbi két évtizedben további, korábban nem endémiásnak tartott arbovírusok európai felbukkanását lehetett megfigyelni. Ezek közül egyesek, pl. a kéknyelv betegség vírusa (Bluetongue virus, BTV; *Reoviridae*, *Sedoreovirinae*, *Orbivirus*) vagy a Schmallenberg vírus (SBV, *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirinae*) gyorsan terjedő és szinte egész Európán átsöprő, jelentős járványokat okoztak. Mások, mint például az Usutu vírus (USUV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) és a nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*) kisebb kiterjedésű, lassabban terjedő, endémiássá váló kórokozókként viselkedtek. Emellett, főként emberi megbetegedéseket okozó arbovírusok „importált” (endémiás trópusi területekről fertőzöttek Európába utazó személyek által behurcolt) eseteinél is meg lehetett figyelni kismértékű helyi terjedést Európa mediterrán részein (pl. Chikungunya vírus, CHIKV; *Togaviridae*, *Alphavirus*; Dengue vírus, DENV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*); ám e kórokozók előfordulása egyelőre nem vált endémiássá a térségben.

Az Európában „egzotikus” (nem endémiásnak tekintett) arbovírusok behurcolása mind természetes úton, mind emberi közreműködés hatására bekövetkezhet. Az ízeltlábú vektorok aktív terjedése repülőképes fajok esetén is korlátozott. Ugyanakkor passzív úton (pl. szél, vándormadarak vagy emberi közlekedési eszközök segítségével) viszonylag rövid idő alatt nagy távolságokat is megtehetnek. Az arbovírusok természetes terjedésében nagyobb szerepet tulajdonítanak a (tünetmentesen) fertőzött gerinces gazdáknak, különösen a vonuló madárfajok fertőzött egyedeinek.

Ezt jelentősen befolyásolhatja az, hogy az arbovírusok a gerinces gazdák legnagyobb részében heveny fertőzést okoznak, így a trópusi telelőhelyeken fertőződött madarakban a vírus viszonylag rövid ideig képes fennmaradni, ami rövidebb lehet, mint a madárnak a mérsékelt égövi költőhelyre vonuláshoz szükséges idő.

Az emberi tevékenység is hat közvetlen vagy közvetett módon az arbovírusok terjedésére. A technikai fejlődéssel és globalizációval mind intenzívebbé és gyorsabbá válik az országok és kontinensek közötti személy- és áruforgalom, ami kedvező helyzetet teremthet az ízeltlábú vektorok és az általuk hordozott vírusok behurcolására. Az épített környezet (istálló, üvegházak, csatornahálózat, pincék, metróhálózatok stb.) fagymentes menedékhelyet biztosítanak a kontinentális éghajlaton áttelelésre képtelen, trópusokról behurcolt ízeltlábú-fajok számára. Egyre több adat támasztja alá, hogy a Föld átlaghőmérséklete gyorsabban emelkedik, mint az ipari forradalom előtti időkben. Ez a folyamat közép- és hosszútávon a klimatikus viszonyok változását, az éghajlat melegedését eredményezheti, ami a trópusi eredetű ízeltlábú fajoknak kedvező körülményeket teremthet túlélésük és terjedésük szempontjából a most még mérsékelt égövi területeken.

A közelmúltban több, egzotikus előfordulását arbovírus európai felbukkanását írták le. Ennek hátterében állhatnak a fent említett antropogén folyamatok, ám erre nehéz egyértelmű bizonyítékot találni. Figyelembe kell venni azt is, hogy az utóbbi két évtizedben az arbovírusokkal kapcsolatos tudományos ismeretek jelentősen bővültek, valamint a virológiai diagnosztikai módszerek forradalmi mértékű fejlődése (érzékeny, molekuláris biológiai alapú nukleinsav-kimutató eljárások elterjedése) hatására nagyobb esély nyílt az egzotikus eredetű arbovírusok jelenlétének felismerésére, a kórokozók kimutatására és azonosítására is. Mivel az arbovírusok jelentős része nem mindig okoz megbetegedéseket gerinces gazdáiban, valamint háziállatokat és embereket ritkábban fertőz, mint vadon élő fajokat, lehetséges, hogy ezek a kórokozók korábban is fel-felbukkantak Európában, csak kimutatásuk, azonosításuk akkoriban nem járt sikerrel. Jelen dolgozatban, csípőszúnyogok (Diptera: Culicidae) által terjesztett két flavivírus, a nyugat-nílusi vírus és az Usutu vírus közép-európai felbukkanásával és terjedésével kapcsolatos kutatásaink eredményeit foglalom össze, kiemelve az esetek hasonlóságait és eltéréseit, és a vizsgálatok eredményeiből levonható tanulságokat.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az arbovírusok

1.1.1. Az arbovírusok definíciója, terjedési módjai

Az ENSz Egészségügyi Világszervezete (World Health Organisation, WHO) részére készített szakértői jelentésben megfogalmazott definíció szerint az arbovírusok „Vírusok, amelyeknek környezeti fennmaradása alapvetően vagy jelentős mértékben függ a gerinces gazdafajok közötti biológiai átvitelt biztosító vérszívó ízeltlábúaktól. Ezek a vírusok szaporodnak és viraemiát okoznak a gerinces gazdáiban, szaporodnak az ízeltlábúak szöveteiben, és új gerinces gazdákra az ízeltlábúakban eltöltött külső inkubációs idő után, az ízeltlábú vektor szúrása/harapása útján jutnak át.” (WHO, 1967). Mint minden definíciónak és csoportosításnak, ennek is megvannak a maga korlátai. A definíciót megfogalmazó virológusok sem értettek teljes mértékben egyet vele, mivel volt, aki jobban ki kívánta hangsúlyozni azt, hogy ezeknek a vírusoknak az átvitelében is jelentős szerepet játszhat a cseppfertőzéses vagy alimentáris úton történő terjedés. Így a fertőzési lánc fennmaradásához sok esetben nem elengedhetetlen feltétel a kompetens ízeltlábú vektorok jelenléte. Másfelől, a definíció alapján csak azokat a vírusokat tekinthetjük arbovírusoknak, amelyek az ízeltlábú vektorban szaporodnak és az elszaporodás majd generalizáció után, általában a vérszívó ízeltlábú nyálával ürülő vírusok fertőzik a gerinces gazdát. Vannak azonban olyan esetek is, amikor a vérszívó ízeltlábúak mechanikus vektorként segítik elő a vírus terjedését. Ezekben az esetekben a vérszívás, vagy egyéb táplálkozási mód során az ízeltlábú testfelülete – leggyakrabban szájszerve – kontaminálódik a gerinces gazda vérében vagy szöveteiben jelen levő vírusokkal, és azokat képes átvinni egy másik, fogékony gerinces gazdára; amelyen táplálkozva – általában a táplálkozás során ejtett sérülés útján – elősegíti a vírus átjutását és így a gazda fertőződését. Ennél a fertőzési módnál az ízeltlábú tulajdonképpen „ragályfogó tárgynak” tekinthető, hiszen csupán közvetíti a vírusokat, de nem következik be aktív vírusszaporodás a sejtjeiben. Ez a körülmény meglehetősen behatárolja a mechanikus vírusterjesztés lehetőségeit, hiszen ilyenkor mind az ízeltlábú vektor útján átvitt vírus mennyisége, mind annak a környezeti túlélési időtartalma általában elmarad a valódi (biológiai) vektoroknál megfigyelhető, aktív vírusszaporodással összefüggő értékektől. Ennek az azonnali és rövid távú vektoriális átvitelnek is jelentős szerepe lehet egyes vírusos betegségek járványtanában. Számos, nagy gazdasági jelentőségű állatbetegség (pl. a lovak fertőző kevésvérűsége, a myxomatosis, az Aujeszky-betegség stb.) esetében az ízeltlábúak vírus-közvetítő szerepét mind a járványtani folyamatok megértése, mind a hatékony védekezés szempontjából figyelembe kell venni (Varga és mtsai., 1998).

1.1.2. Az arbovírusok gerinces gazdái

A fenti definíció szerint az arbovírusoknak az ízeltlábúak biológiai vektorai, vagyis ezek a vírusok egyaránt képesek fertőzni gerinces és gerinctelen szervezetek sejtjeit. Mivel a vírusok a gazdasejtekhez specifikus receptorokon keresztül kapcsolódnak, ezeknek a vírusoknak olyan sejtfelszíni receptorokhoz kellett adaptálódniuk, amelyek egyaránt jelen vannak az egymástól jelentős evolúciós távolságra levő gazdákban és vektorokban. Az ilyen, „ősi”, „univerzális” receptorok használata magyarázatot adhat arra, hogy az arbovírusok jelentős részének tág a gazdaspektruma (euryxen fajok). Számottevő különbségeket lehet megfigyelni viszont az egyes vírusszerepekre jellemző gerinces gazdák és ízeltlábú vektorok körében. A legtöbb esetben csupán néhány ízeltlábú faj játszik jelentősebb szerepet az adott vírus természeti ciklusában, valamint a gerinces gazdák köre is gyakran behatárolt. Számos alkalommal ezekben a gerinces gazdákban a vírushordozásnak nincsenek jelentős, betegségben megnyilvánuló következményei, ugyanakkor a vírusok hatékonyan szaporodnak a gazda sejtjeiben és általában magas szintű viraemiát alakítanak ki, amely hatékony módja az ízeltlábú vektorok fertőzésének. Ezeket a fajokat általában „felszaporító gazdának” (amplification host) tekintik, és fontos szerepet játszanak a vírus fennmaradásában az adott ökoszisztémában. Ezeket a gazdákat azonban mégsem lehet fenntartó (rezervoár) fajoknak tekinteni, mivel bennük a vírus jelenléte általában átmeneti és rövid távú; az immunválasz kialakulását követően a vírus kiürül a szervezetükből és védetté válnak. (Ezzel szemben a valódi rezervoárok általában tartós hordozói és ürítői a vírusnak, pl. ahogy egyes rágcsálók hantavírusok rezervoárjai.) Ezek a fajok valószínűleg a patogén – gazda párhuzamos evolúciójának évezreidei vagy évmilliói során olyan mértékben adaptálódtak egymáshoz, hogy végül bennük a vírusok jelenléte nem idéz elő komoly károsodásokat. Vannak viszont olyan gerinces fajok, amelyekben a vírushordozás hatására gyakrabban alakul ki klinikai tünetekben is megnyilvánuló betegség. Számos esetben ezekben az alkalmi gazdákban is tünetmentes a fertőzések lefolyása, míg gyakran általános lázas tünetek, ritkábban súlyos, akár végzetes kimenetelű kórképek (pl. érfal-károsodások miatt vérzéses lázak, központi idegrendszeri gyulladásos folyamatok) a fertőzés következményei. Az alkalmi gazdákban a vírusszaporodás hatékonysága korlátozott lehet; bennük nem mindig alakul ki olyan szintű viraemia, ami lehetővé tenné az újabb vérszívó ízeltlábú fertőződését. Ezért az ilyen fajok fertőzött egyedei a vírus terjedése szempontjából „zsákutcának” (dead end host) tekinthetők (Kuno, 2016). Valószínű, hogy a gerinces fajok fertőzésre fogékonysága szempontjából a vírus fajspektrumának receptoriális hátterén túl a vírus sejten belüli szaporodásakor lezajló folyamatok eltérései, a komplett és inkomplett utódvirionok képződésének arányai, a vírusok kijutása a fertőzött sejtekből, valamint a gazdaszervezet veleszületett és adaptív védekező rendszerei is jelentős befolyásoló hatással vannak (Hall és mtsai., 2016, Kuno, 2016). Ezt támasztja alá az is, hogy az arbovírusok jelentős részével mesterséges úton (nagy vírusszámmal vagy a természetestől eltérő fertőzési móddal) a gerinces fajok jóval tágabb köre fertőzhető, mint amelyek természeti ciklusban fertőződnek a vírussal. Ezt a jelenséget a

diagnosztikában már évtizedek óta kihasználják (pl. az arbovírusok izolálásakor szopósegerek intracerebrális oltásával). Ez a módszer igen hatékonynak bizonyult az arbovírusok elszaporítására és számos vírustörzs esetén még ma is használatos (Lambert és Lanciotti, 2016).

Amennyiben az ember is fogékony az adott arbovírus-fertőzésre, a közegészségügyi jelentőség miatt általában fokozott figyelem irányul a kórokozóra. Az arbovírusok jelentős részét először emberi fertőzésekből mutatták ki; manapság is van számos olyan arbovírus, amelynél az emberen kívüli gerinces gazdák köre kevésbé ismert. A túlnyomórészt embereket fertőző arbovírusok (pl. sárgaláz vírus, dengue vírus, chikungunya vírus stb.) nagyobb népsűrűségű emberi közösségekben gyakran képesek endémiás (ún. urbánus) ciklust kialakítani, amikor más gerinces gazdák nem játszanak jelentősebb szerepet (Hall és mtsai., 2016). Ezekben az esetekben a járványtani / higiéniai módszerek alkalmazásával (pl. a fertőzött személyek gyors diagnosztizálása és elkülönítése), az ízeltlábú vektorok gyérítésével, személyi védőeszközök használatával, valamint az emberek minél nagyobb részének immunizálásával – kellő kitartás mellett – elérhető, hogy a vírusűrítő és fogékony személyek száma, valamint a fertőzött vektorok csípésszáma olyan mértékben csökken, hogy a fertőzés reprodukciós ráta (basic reproduction rate, R_0) értéke 1 alá csökken és így a járvány előbb-utóbb véget ér. Az ízeltlábú vektorokban jelen levő és vertikálisan átadott vírusok a fent említett intézkedések ellenére is fennmaradhatnak az urbánus ciklusban, ezért a vektorok gyérítésének hatékonysága alapvetően befolyásolja a védekezés sikerességét. Amennyiben az arbovírusnak az emberen kívül más gerinces fajok is gyakori gazdái, általában természeti (szilvatus) ciklusokban enzoociás a kórokozó. Ilyenkor az ember gyakran alkalmi gazdaként fertőződik és a ciklus fennmaradása szempontjából nincs különösebb jelentősége. A védekezés lehetőségei ebben az esetben jóval korlátozottabbak, mivel általában nincs lehetőség az urbánus környezetben használt leküzdő és megelőző módszerek alkalmazására vadon élő gerinces gazdákon, valamint a vektorok gyérítése nehezebben kivitelezhető és kevésbé hatékony. Ilyenkor az emberi fertőzések esélyének csökkentésére a fertőzött területek elkerülése a legnyilvánvalóbb megoldás. Ha ez nem lehetséges, az egyéni védekezésre (védőruházat, repellens szerek használata, védőoltások) hárul nagyobb szerep. A kétféle ciklus közötti kapcsolat kialakításában a háziállatoknak, illetve az ember közelében élő (szinantrop) további, gerinces fajoknak nagy lehet a jelentősége. Különösen a nagyobb egyedszámú állatcsoportok (pl. baromfitelepek, városi kolóniákat alkotó madarak) lehetnek olyan járványkitörések gócai, amelyek az emberi fertőzések forrásául is szolgálhatnak (Ritchie és Devine, 2016).

1.1.3. Az arbovírusok ízeltlábú vektorai

Az arbovírusok ízeltlábú vektorai egyrészt a Hatlábúak (Hexapoda) altörzs, Rovarok (Insecta) osztály, Kétszárnyúak (Diptera) rend, igazi szúnyogok vagy csípőszúnyogfélék (Culicidae), púposszúnyogfélék (Simuliidae), törpeszúnyogfélék (Ceratopogonidae) és lepkeszúnyogfélék (Psychodidae) családjaiba sorolt fajok. Másrészt a Csáprágósok (Chelicerata) altörzs, Pókszabásúak

(Arachnida) osztály, Kullancsalakúak (Ixodida) rend, Kullancsok (Ixodidae) család néhány faja. Meglepő módon, más rendszertani csoport, pl. a Légyalkatúak (Brachycera) alrend, a Tetvek (Phthiraptera) rend, a Bolhák (Siphonaptera) rend, a Rablópoloskafélék (Reduviidae) család vérszívó ízeltlábú fajtái, amelyek baktériumok vagy paraziták vektoraiként ismertek, nem töltenek be jelentős biológiai vektor szerepet arbovírusok terjesztésében. A közelmúltban egyes kutatások eredményei alapján felmerültek olyan feltételezések, hogy az ágyi poloska (*Cimex lectularius*) bizonyos vírusok (pl. alphavírusok, bunyavírusok) biológiai vektora lehet (Adelman és mtsai., 2013), valamint, hogy egyes atkák (Bársonyatkák – Trombidiidae, és Tetűatkák – Laelapinae) hantavírusok vektorai lehetnek (Yu és Tesh, 2014). A fecskékben és verebekben a Buggy Creek vírus (*Togaviridae, Alphavirus*) vektorának az *Oeciacus vicarius* (Cimicidae) poloska fajt tartják (Hopla és mtsai., 1993).

Az ízeltlábú vektorok a jellemzően vérszívás során veszik fel a vírusokat, amelyek az emésztőcső közepéből traktusában fertőzik a bélhámsejteket. Ennek az eredményességét több tényező is befolyásolja. A bél lumenében termelődő peritrofikus membrán egyes feltételezések szerint szűrőként szolgálhat a vírusok átjutásával szemben. Az enterociták mikrobolyhaihoz eljutó vírusok közül viszonylag kevés tudja fertőzni a sejteket (Franz és mtsai., 2015), ám a sikeres fertőzés intenzív vírusszaporodást eredményez. A termelődött vírusok az enterociták bazális labirintusába kerülnek, és onnan juthatnak tovább a keringésbe. Az egyik kijutási út az alaphártyán keresztül vezet. Több kutatás bizonyította, hogy az alaphártya vastagsága és ellenálló képessége befolyásolja a vírusok átjutásának esélyeit (Romoser és mtsai., 2004; Zhang és mtsai., 2010). Az alaphártyán átjutó vírusok a vérnyirokba (haemolympha) jutva szabadon, vagy keringő sejtekkel szóródnak a szervezetben. Emellett a vírusok a bél nyálkahártyát behálózó tracheák endothelsejtjeinek fertőzésével is továbbjuthatnak a haemocolebe. A generalizáció során további szövetek, így pl. a zsírtest sejtjei is fertőződnek és a vírusok tovább szaporodnak az ízeltlábú szervezetében. A következő fontos lépés a nyálmirigy sejtjeinek fertőzése, amelyet befolyásol az alaphártya átjárhatósága és a felszíni receptorok elérhetősége. A nyálmirigy epithelsejtjeiben elszaporodó vírusok a nyállal ürülve jutnak be a vérszívás során a következő gerinces gazdába. Ezek a folyamatok általában több napot, esetenként több hetet is igénybe vesznek, valamint hatékonyságukat és időtartamukat a környezeti hőmérséklet is befolyásolja. A vírusok bélből nyálba jutásának számos fizikai és funkcionális akadály van, amelyet középbél bejutási és kijutási akadállynak (Midgut Infection Barrier és Midgut Escape Barrier), valamint nyálmirigy bejutási és kijutási akadállynak (Salivary Gland Infection Barrier és Salivary Gland Escape Barrier) neveznek. Ezeknek az akadályoknak a létezését számos vírusszaporodás vonatkozásában bizonyították, és úgy tűnik, hogy jelentős szerepet töltenek be abban, hogy melyik ízeltlábú fajok kompetens vektorai az egyes arbovírusoknak.

A vérszíváshoz kötődő vírusátvitelen túl egyes ízeltlábú vektorokban nagy jelentősége van a vertikális átvitelnek is (Tesh és mtsai., 2016). A vírus transzovariális úton képes lehet átjutni a nőtényekből a petékbe, valamint az egyes fejlődési alakok közötti (trasztadiális) átvitel teszi lehetővé, hogy a

vírusfertőzés fogékony gerinces gazdák hiányában is fenn tudjon maradni a vektorokban. A transzovariális átjutásnak két formája ismert. Az egyik lehetőség, hogy a nőstény vektorban kialakuló viraemiát követően a vírus fertőzi a petefészket és bejut a petékbe. A másik lehetőség, hogy a vírus a viraemia során a tojócsőbe jutva a már kialakult peték felszínére tapad és a lárvá kikelésekor fertőzi azt („trans-egg transmission”). Először Carlos Finlay feltételezte azt 1881-ben, hogy a sárgaláz kórokozóját szúnyogok terjeszthetik. Finlay később úgy gondolta, hogy a vektorok vertikálisan is átadhatják a kórokozókat (Finlay, 1903; Finlay, 1937). Az elméletet évtizedekig nem sikerült kísérleti úton meggyőzően bizonyítani. Az utóbbi évtizedek kutatásai számos arbovírus és baktérium vonatkozásában igazolták a vertikális átvitel lehetőségét, ám ennek egyedi gyakoriságát viszonylag alacsonynak találták, és a járványtani jelentőségével kapcsolatos nézetek megoszlanak. A vertikális terjedés lehetőséget teremt nem vérszívó egyedek (pl. hímek) fertőződésére is. A vírus kimutathatóságát hímekből vagy vért nem fogyasztott nőstényekből többen a vertikális átvitel bizonyítékának tartják. A hím egyedek vertikális fertőződése egyben lehetőséget teremt a vírus további, venereális (horizontális) terjedésére is. Azt, hogy hím szúnyogok képesek párzás során fertőzni nőstény egyedeket kísérletesen bizonyították pl. a La Crosse vírus (LACV, *California encephalitis virus*; *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*; Thompson és Beaty, 1977; 1978), a St. Louis encephalitis vírus (SLEV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*; Nayar és mtsai., 1986, Shroyer, 1990), Japán encephalitis vírus (JEV, *Flaviviridae*, *Flavivirus*; Mourya és Soman, 1999) és egy szúnyog-specifikus flavivírus esetében is (Bolling és mtsai., 2012), bár ezt a terjedési módot nem tartják jelentősnek.

A vírus transzstadiális átvitele első megközelítésben nem túl meglepő, hiszen ilyenkor ugyanazon szervezet sejtjeiben marad fenn a vírusfertőzés a különböző fejlődési szakaszokon keresztül. Az egyes fejlődési stádiumok közötti átalakulás során azonban olyan mélyreható folyamatok következnek be az ízeltlábúak szervezetében, amelyek valamilyen módon befolyásolják a vírusok fennmaradását is. Ennek eredményeképpen előfordul, hogy a vírusok nem képesek transzstadiális úton átjutni (pl. a nyugat-nílusi vírus egyes óvantag fajokban, Abbassy és mtsai., 1993) vagy az átjutás hatékonysága viszonylag alacsony (pl. SLEV *Aedes aegypti*-ben, Collins, 1962; Powassan vírus [POW, *Flaviviridae*, *Flavivirus*] ixodid kullancsokban, Ebel és Kramer, 2004). A vírusok horizontális terjedésének egy speciális formáját is megfigyelték, ami a vektorok együtt táplálkozásakor (co-feeding) következik be. Ilyenkor a gerinces gazdán szoros fizikai közelségben vért szívó vektorok között közvetlenül és azonnal is átjuthat a vírus (vagy baktérium), még azelőtt, hogy a gerinces gazdában elszaporodna. Ennek a terjedési módnak nagy jelentőséget tulajdonítanak pl. a kullancsencephalitis vírus transzstadiális átvitelében. A vírus elsődleges vektoraként számon tartott *Ixodes ricinus* kullancsfaj különböző fejlődési alakjai (nimfa, adult) ugyanazon gerinces gazdán gyakran egymás közvetlen közelében szívnak vért, és ilyenkor a fertőzött kullancs nyálával ürülő vírusokat a még nem fertőzött képes felvenni (Aleksseev és Chunikhin, 1990; Labuda és mtsai., 1993, 1996, 1997; Slovák és mtsai., 2014). Hasonló folyamatot lehetett megfigyelni, amikor fogékony kísérleti egerekből egyidőben

szívtak vért nyugat-nílusi vírussal fertőzött és nem fertőzött *Culex pipiens quinquefasciatus* fajba tartozó szúnyogok: az utóbbiak 5,8%-a fertőződött az együtt táplálkozás alkalmával (Higgs és mtsai., 2005). Más vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a vírusátvitel akkor következhet be, ha a fertőzött és nem fertőzött szúnyog legfeljebb 40 mm távolságra egymástól és legfeljebb 45 perc eltéréssel szív vért ugyanabból az egérből, valamint hogy *Aedes albopictus* szúnyogfaj esetében is előfordul ilyen átvitel (McGee és mtsai., 2007). Egy másik tanulmány viszont arra a következtetésre jutott, hogy ebben az esetben is kialakul viraemia; ami azzal magyarázható, hogy a kompetens szúnyog vektorok nyálával magas titerben jut be az egérbe a vírus, és annak egy része közvetlenül a keringésbe jutva fertőzni tudja a korábban nem fertőzött szúnyogot (Reisen és mtsai., 2007). Ezt az elméletet alátámasztja az a kutatási eredmény is, miszerint a szúnyogok jelentős része akár $\sim 10^2$ PFU mennyiségű nyugat-nílusi vírust juttat közvetlenül a keringésbe (Styer és mtsai., 2007), ami nagyobb számú fertőzött szúnyog csípése esetén – az egér viszonylag alacsony vértérfogata miatt – elérheti azt a szintet, ami már elegendő a szúnyog fertőzéshez. Bizonyos szempontból a co-feeding jelenségét a mechanikus vektorok vírusterjesztésénél megfigyelt folyamat fordítottjaként lehet felfogni, hiszen ilyenkor a gerinces gazdában (még) nem szaporodik a vírus, csupán mechanikusan közvetíti azt az egyik vektorból a másikba.

Az arbovírusok jelentős része betegséget okoz a gerinces gazdában, ezért kézenfekvő kérdés, hogy a vírusfertőzéseknek vannak-e káros hatásai az ízeltlábú vektorokra is. Legtöbbször az arbovírusokat ízeltlábúak esetében apatogénnek tekintik (Ciota és Kramer, 2013). Hozzá kell tenni, hogy a klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások a szúnyogokban általában szegényesek és nehezen megfigyelhetők. A *Culex. tarsalis* szúnyogok nyugat-nílusi vírussal végzett kísérletes fertőzését követően azt tapasztalták, hogy a fertőzött szúnyogok kevesebb petét raktak és rosszabb volt a peték kelési aránya, viszont gyakrabban szívtak vért, mint fertőzetlen társaik (Styer és mtsai., 2007). Hasonló folyamatot figyeltek meg *Aedes*-fajok LACV fertőzését követően (Jackson és mtsai., 2012). Nyugat-nílusi vírusfertőzést követően *Cx. quinquefasciatus* szúnyogokban a középbél sejteinek fokozott apoptózisát (Vaidyanathan és Scott, 2006), illetve a nyálmirigy szöveteinek károsodását írták le (Girard és mtsai., 2005). Több kutatás kimutatta, hogy egyes vírusok (nyugat-nílusi vírus, Dengue vírus, ló encephalomyelitis vírusok) hatására csökkenhet a szúnyogok élettartama (Scott és Lorenz., 1998; Moncayo és mtsai., 2000; Mahmood és mtsai., 2004; Ciota és mtsai., 2011; Maciel de Freitas és mtsai., 2011). Azt is megfigyelték, hogy a vírusfertőzés ellen rezisztens szúnyogok élettartama rövidebb lehet, mint a fogékonyaké (Ciota és mtsai., 2011, 2013). Ezt azzal magyarázzák, hogy a vírusfertőzés elleni védekezésre fordított energia/evolúciós befektetés következménye az élettartam csökkenése (az ellenállás ára, „survival cost of resistance”, Ciota és mtsai., 2013.). Az ízeltlábúak az arbovírusokkal szemben az immunrendszerük segítségével is védekeznek. Az ízeltlábúak immunrendszere sok ponton eltér ugyan a gerincesekétől (pl. immunglobulinok és immun-memória hiánya); viszont bennük is számos, összetett rendszer szolgálja a védekezést. Ezek a rendszerek

használnak a gerincesek veleszületett immunitási (innate immunity) rendszereihez. A vírusok ellen főként a Toll rendszer, az IMD rendszer és a JAK-STAT rendszer szolgál. Emellett a vírusok elleni védekezésben az RNS interferenciának tulajdonítanak kiemelkedő jelentőséget ízeltlábúakban (Blair és Olson, 2015). Bár az ízeltlábúak immunrendszerének működése még sok ponton nem ismert, az eddig feltárt folyamatok részletezése meghaladja jelen dolgozat kereteit és számos szemleci, könyvfejezet és könyv tárgyalja azt. Újabb kutatások kimutatták azt is, hogy például a nyugat-nílusi vírusfertőzéseknek, valószínűleg az immunrendszer modulálásán keresztül, hatása van a szúnyogokból kimutatható baktériumok faji változatosságára (Zink és mtsai., 2015.). Emiatt lehetséges, hogy a vírusfertőzések egy összetettebb rendszer részeként hatnak a vektorokra. A szúnyogok arbovírus fertőzéseivel összefüggésben az utóbbi években különös figyelem irányult a vektorok *Wolbachia* (Rickettsiaceae) fertőzöttségére. Ezek az intracelluláris baktériumok széles körben előfordulnak a különböző ízeltlábú fajokban és az úgynevezett citoplazmatikus inkompatibilitáson keresztül hatást gyakorolhatnak egyes ízeltlábúak szaporodóképességére (hímek elpusztítása, sterilitás, feminizáció, parthenogenesis elősegítése). Több kutatás igazolta, hogy a wolbachiaknak vírusellenes hatása is van *Drosophila*-fajokban és egyes szúnyogfajokban (Glaser és Meola, 2010.; Rainey és mtsai., 2014.). Ezért ezeket a baktériumokat egyesek lehetséges módszernek találják egyes szúnyogfajok és az általuk terjesztett arbovírusok elleni biológiai védekezésben (Hoffmann és mtsai., 2011.; Nguyen és mtsai., 2015.). Újabb kutatások arra hívják fel a figyelmet, hogy például a *Culex*-fajokban a wolbachiak hatására kialakuló, nyugat-nílusi vírus elleni rezisztencia csak bizonyos populációkban figyelhető meg (Micieli és Glaser, 2014), továbbá, hogy a vírus átvitel aránya a *Wolbachia*-fertőzött szúnyogokban növekedhet (Dobson és mtsai., 2016.).

Járványtani szempontból az ízeltlábú vektorok szerepének és jelentőségének leírására a vektoriális kapacitás mértékét szokták leginkább figyelembe venni, amit számos tényező befolyásol. Ezek közé tartozik a vektor kompetencia (az ízeltlábú vektor milyen mértékben fogékony az adott vírusra, illetve milyen intenzitással szaporodik benne és ürül belőle a vírus), a „külső inkubációs idő” (az az időtartam, ami a vektor fertőződése és vírusürítése között eltelik), a vektorfajok populációinak a sűrűsége, élettartama, áttelelési képessége, vérszívási tulajdonságai (milyen gazdafajokat részesít előnyben, milyen gyakorisággal szív vért, stb.), a korábban említett vírus-vektor kölcsönhatások (élettartam csökkenés, immunrendszerre kifejtett hatás) és mikrobiális kölcsönhatások (vírus és baktérium társfertőzések) (Ciota és Kramer, 2013). Ezeket a paramétereket számos környezeti tényező, elsősorban az időjárás (főként a hőmérséklet és páratartalom) befolyásolja. Ezzel függ össze, hogy például egy adott vírusnak eltérő földrajzi területeken mások lehetnek az elsődleges vektorai, még akkor is, ha a potenciális vektorok mindkét régióban előfordulnak (Ciota és Kramer, 2013).

Állat- és/vagy közegészségügyi jelentőségű arbovírusok elsősorban a *Togaviridae* család *Alphavirus* nemzetségében, a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségében, a *Bunyaviridae* család *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* és *Nairovirus* nemzetségében, a *Reoviridae* család *Orbivirus* és

Coltivirus nemzetségében, a *Rhabdoviridae* család *Vesiculovirus* és *Ephemerovirus* nemzetségében, az *Orthomyxoviridae* család *Thogotovirus* nemzetségében, valamint az *Asfarviridae* család *Asfivirus* nemzetségében fordulnak elő (Hubálek és mtsai., 2014a). Jelen dolgozat egyes flavivírusok vizsgálatát ismerteti, ezért a továbbiakban ezeknek a vírusoknak a tárgyalására szorítkozik az irodalmi áttekintés.

1.2. A flavivírusok

1.2.1. A *Flaviviridae* víruscsalád

Az első emberi vírust Walter Reed fedezte fel 1901-ben, amikor sárgalázban szenvedő beteg vérsavójából készített, baktériummentes szűrlettel fertőzni tudott egészséges embert (Lindenbach és mtsai., 2007). A sárgaláz vírusa (Yellow fever virus, YFV) a *Flaviviridae* család prototípusa és névadó vírusa, a sárgaláz latin neve, *Febris flava* alapján. A flavivírusokat korábban a *Togaviridae* családba sorolták morfológiai és kórtani hasonlóságok alapján. A genomszerveződés, a nukleinsav-szekvencia eltérések és filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján azonban 1984 óta önálló víruscsaládként tartják számon őket (ICTV, 1984). Jelenleg a *Flaviviridae* családba sorolt vírusokat négy elfogadott nemzetségbe osztották. A döntően arbovírusokat tartalmazó *Flavivirus* nemzetség mellett a *Pestivirus*, *Hepacivirus* és *Pegivirus* nemzetség alkotja a családot. A *Pestivirus* nemzetségbe négy, állategészségügyi szempontból jelentős vírusfaj, a szarvasmarha vírusos hasmenés vírusának két típusa (Bovine viral diarrhoea virus 1 és 2), a klasszikus sertéspestis vírus (Classical swine fever virus) és a juhok border betegségének vírusa (Border disease virus) soroltatik. A *Hepacivirus* nemzetségben jelenleg 14 elfogadott faj (Hepacivirus A – N) közül a legismertebb az emberi hepatitis C kórokozója (Hepatitis C virus). A többi hepacivírust a közelmúltban házi- és vadon élő állatfajból (ló, szarvasmarha, rágcsálók, denevérek, főemlősök) mutatták ki (szemleci: Pybus és Thézé, 2015). A *Pegivirus* nemzetség alapítására tett javaslatot 2012-ben fogadta el a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság. A nemzetségbe jelenleg 11 fajt sorolnak. A legismertebbek a Pegivirus A, amelyet főemlősökből izoláltak (szinonimái: hepatitis G vírus, GB vírus, stb.) és a Pegivirus B, melynek prototípusát indiai repülőkutya (Pteropus giganteus) mutatták ki (Stapleton és mtsai., 2012). A többi faj képviselőit főemlősökből, lovakból, denevérekből, rágcsálóból és sertésből mutatták ki. A pegivírusok kórtani jelentősége egyelőre nem tisztázott, de valószínűleg perzisztáló fertőzést alakítanak ki a májsejtekben (Stapleton és mtsai., 2011.) A *Flavivirus* nemzetség a legnépesebb genusa a családnak. Jelenleg 53 fajt különítenek el ebben a nemzetségben (ICTV 2016). A szakirodalomban fellelhető, külön névvel ellátott és önálló fajként bemutatott flavivírusok száma ezt meghaladja (több mint 70), ám számos vírus esetében a tudományos ismeretek hiánya miatt nem lehetett egyértelműen eldönteni, hogy önálló fajnak tekinthetők-e (Calisher és Gould, 2003).

A *Flaviviridae* családba sorolt vírusok közös jellemzői, hogy kb. 40-60 nm átmérőjű, burkos virionokat alkotnak, kapszidjuk ikozaéder szimmetriájú, genetikai állományuk pedig pozitív irányítottaságú, egyszálú, lineáris RNS. A genom mérete 9,6 és 12,3 kilobázis között változik; minden

flavivírus kódol egy kapszidfehérjét, kettő vagy három membránfehérjét, valamint nem strukturális fehérjéket, szerin proteáz, RNS helikáz és RNS-függő RNS polimeráz enzimaktivitással. A genomszerveződésük hasonló a flavivírusoknak, ugyanakkor jelentős eltérések vannak a genom kifejeződése (mono- ill. policisztronos), a gének száma és a nem-kódoló régiók felépítése terén. Az ugyanazon nemzetségbe sorolt vírusok között – egyes fehérjék antigenitási hasonlóságai miatt – szerológiai keresztreakciókat lehet megfigyelni, ami különböző nemzetségbe sorolt flavivírusok vonatkozásában nem fordul elő (Calisher és mtsai., 1989). Emellett az egyes nemzetségek képviselői filogenetikailag is egymástól jól elkülönülő csoportokat képeznek (Gould és mtsai., 2003; Lindenbach és mtsai., 2007). A flavivírusok a burok (E) fehérje, mint felületi antireceptor segítségével kapcsolódnak a gazdasejt felszínéhez, majd endocitózissal jutnak a sejtbe. Az endoszómában kialakuló alacsony pH hatására a vírus burka fuzionál az endoszóma membránjával és a víruskapszid a citoplazmába kerül. A dekapszidációt követően a vírus RNS közvetlenül kötődik a riboszómák felszínéhez. A legtöbb esetben policisztronos kódolással egy prekursor poliprotein képződik, amelyet kezdetben sejtes majd virális proteáz enzimek darabolnak aktív fehérjékké. A genom másolását végző replikáz komplex a maghártya közelében helyeződik. Az E burokfehérje érési folyamataiban a glikozilációnak nagy szerepe van. A virionok összeépülése után az endoplazmatikus retikulum üregébe való bimbózással szereznek burkot a vírusok. A virionok ürülése a sejtől aktív szekrécióval következik be (Lindenbach és mtsai., 2007, Brinton, 2013). A flavivírusok jelentős része nem okoz citopatogén hatást a gazdasejtben, perzisztáló fertőzést idézhet elő szövettenyészetekben és egyes esetekben, a gazdaszervezetben is (pl. egyes pestivírusok, Hepatitis C vírus).

1.2.2. A *Flavivirus* nemzetség

A *Flavivirus* nemzetség vírusainak döntő többsége arbovírus. Ökológiai szempontból három fő csoportba sorolták őket: szúnyogok-terjesztette flavivírusok, kullancsok-terjesztette flavivírusok és ízeltlábú vektor nélküli flavivírusok (Gould és mtsai., 2001). Ez a csoportosítás azonban viszonylag szabadon értelmezett, mivel több flavivírus terjesztésében szerepet játszhatnak mind szúnyogok, mind kullancsok, valamint nem vektoriális átvitel is előfordulhat. Ízeltlábú vektor nélküli flavivírusokat kisemlősökből (rágcsálókból, denevérekből) mutatták ki és törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok alapján valószínűleg szúnyogok-terjesztette flavivírusokból fejlődtek ki (Gould és mtsai., 2003). Ezek mellett az utóbbi években mind nagyobb figyelem irányul az úgynevezett ízeltlábú-specifikus („insect-specific” vagy „mosquito-only”) flavivírusokra. Ezeket a vírusokat elsőként különböző szúnyogfajokból mutatták ki világszerte, viszont gerincesek sejtjeiben sem *in vitro*, sem *in vivo* kísérletes fertőzések során nem lehetett őket elszaporítani, valamint filogenetikailag többé-kevésbé elkülönülnek a gerinces gazdákat is fertőző flavivírusoktól. Egyes vélemények szerint jelenlétük a szúnyog vektorokban befolyásolhatja a gerinces-patogén flavivírusok szaporodását is, aminek a vírushatások elleni biológiai védekezésben lehet jelentősége. A témát több, a közelmúltban megjelent szemleci is részletesen tárgyalja (Cook és mtsai., 2012; Blitvich és Firth, 2015; Bolling és

mtsai., 2015). A nemzetségen belül a szerológiai keresztreakciók mértéke alapján szerocsoportokba (szerokomplexekbe) csoportosították a vírusfajokat. A kullancsok-terjesztette flavivírusok csoportján belül az emlősöket fertőző és a tengeri madarakat fertőző vírusok külön szerocsoportokat alkotnak. A szúnyogok-terjesztette flavivírusokat hét szerocsoportra osztották, az ízeltlábú vektor nélküli flavivírusok körében pedig három szerocsoportot alakítottak ki. Egyes vírusoknál a földrajzi elterjedésben megfigyelt eltérések vagy egyéb biológiai tulajdonságok alapján altípusokat is megkülönböztetnek. Az nemzetségen belül kialakított ökológiai és szerológiai csoportokat és az ezekbe sorolt vírusfajokat, illetve ezek altípusait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A *Flavivirus* nemzetség vírusai.

Flavivirus nemzetség

Kullancsok-terjesztette flavivírusok

Emlősök kullancsok terjesztette flavivírusainak szerocsoportja

Gadgets Gully virus (GGYV)
Kadam virus (KADV)
Kyasanur Forest disease virus (KFDV)
Langat virus (LGTV)
Omsk hemorrhagic fever virus (OHFV)
Powassan virus (POWV)
Royal Farm virus (RFV)
 Karshi vírus
Tick-borne encephalitis virus (TBEV)
 Európai altípus
 Távol-keleti altípus
 Szibériai altípus
Louping ill virus (LIV)
 Ír altípus
 Brit altípus
 Spanyol altípus
 Török altípus

Tengeri madarak kullancsok terjesztette flavivírusainak szerocsoportja

Meaban virus (MEAV)
Saumarez Reef virus (SREV)
Tyuleniy virus (TYUV)

Szúnyogok-terjesztette flavivírusok

Aroa vírus szerocsoport

Aroa virus (AROAV)
 Bussuquara vírus (BSQV)
 Iguape vírus (IGUV)
 Naranjal vírus (NJLV)

Dengue vírus szerocsoport

Dengue virus (DENV)
 Dengue vírus szerotípus 1 (DENV-1)
 Dengue vírus szerotípus 2 (DENV-2)
 Dengue vírus szerotípus 3 (DENV-3)
 Dengue vírus szerotípus 4 (DENV-4)
Kedougou virus (KEDV)

- Japán encephalitis vírus szerocsoport
 - Cacipacore virus* (CPCV)
 - Koutango virus* (KOUV)
 - Japanese encephalitis virus* (JEV)
 - Murray Valley encephalitis virus* (MVEV)
 - Alfuy vírus (ALFV)
 - St. Louis encephalitis virus* (SLEV)
 - Usutu virus* (USUV)
 - West Nile virus* (WNV)
 - Kunjin vírus (KUNV)
 - Rabensburg vírus (RABV)
 - Yaounde virus* (YAOV)
- Kokobera vírus szerocsoport
 - Kokobera virus* (KOKV)
 - Stratford vírus (STRV)
- Ntaya vírus szerocsoport
 - Bagaza virus* (BAGV)
 - Ilheus virus* (ILHV)
 - Rocio vírus (ROCV)
 - Israel turkey meningoencephalomyelitis virus* (ITV)
 - Ntaya virus* (NTAV)
 - Tembusu virus* (TMUV)
 - Baiyangdian vírus (BYDV)
 - Perak vírus (PEV)
- Spondweni vírus szerocsoport
 - Zika virus* (ZIKV)
 - Spondweni vírus (SPOV)
- Sárgaláz vírus szerocsoport
 - Banzi virus* (BANV)
 - Bouboui virus* (BOUV)
 - Edge Hill virus* (EHV)
 - Jugra virus* (JUGV)
 - Saboya virus* (SABV)
 - Potiskum vírus (POTV)
 - Sepik virus* (SEPV)
 - Uganda S virus* (UGSV)
 - Wesselsbron virus* (WESSV)
 - Yellow fever virus* (YFV)
- Ízeltlábú vektor nélküli flavivírusok
 - Entebbe bat vírus szerocsoport
 - Entebbe bat virus* (ENTV)
 - Sokoluk vírus (SOKV)
 - Yokose virus* (YOKV)
 - Modoc vírus szerocsoport
 - Apoi virus* (APOIV)
 - Cowbone Ridge virus* (CRV)
 - Jutiapa virus* (JUTV)
 - Modoc virus* (MODV)
 - Sal Vieja virus* (SVV)
 - San Perlita virus* (SPV)
 - Rio Bravo vírus szerocsoport
 - Bukalasa bat virus* (BBV)
 - Carey Island virus* (CIV)
 - Dakar bat virus* (DBV)
 - Montana myotis leucoencephalitis virus* (MMLV)
 - Phnom Penh bat virus* (PPBV)
 - Batu Cave vírus (BCV)
 - Rio Bravo virus* (RBV)

Ízeltlábú-specifikus flavivírusok

Klasszikus (egygazdás), ízeltlábú-specifikus flavivírusok

Aedes flavivírus (AEFV)
 Aedes galloisi flavivírus (AGFV)
 Calbertado vírus (CLBOV)
 Cell fusing agent vírus (CFAV)
 Culex flavivírus (CXFV)
 Culex theileri flavivírus (CTFV)
 Hanko vírus (HANKV)
 Kamiti River vírus (KRV)
 Nakiwogo vírus (NAKV)
 Nienokoue vírus (NIEV)
 Palm Creek vírus (PCV)
 Quang Binh vírus (QBV)

Kétgazdás, ízeltlábú-specifikus flavivírusok

Barkedji vírus (BJV)
 Chaoyang vírus (CHAOV)
 Donggang vírus (DONV)
 Ilomantsi vírus (ILOV)
 Lammi vírus (LAMV)
 Marisma mosquito vírus (MMV)
 Nanay vírus (NANV)
 Nhumirim vírus (NHUV)
 Nounané vírus (NOUV)

Az ICTV által elfogadott vírusfajok nevei dőlt betűvel szerepelnek, Calisher és Gould (2003), ICTV (2016) és Blitvich és Firth (2015) alapján, módosításokkal. Megjegyzendő, hogy a nemzetség (genus) és faj (species) közötti, valamint a faj alatti csoportosítások a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság szabályai szerint hivatalosan nem elfogadott rendszertani kategóriák.

A flavivírusok virionjai kb. 50 nm átmérőjű, gömbölyű részecskék, amelyeknek kb. 30 nm-es elektrondenz magját lipidburok veszi körül (Murphy, 1980). A virionok ülepedési állandója 170S és 210S között helyezkedik; úszósűrűségük 1,19 és 1,23 g/cm³ között változik, a lipidburok összetételétől függően (Russell és mtsai., 1980). A virionok felületén két fehérje található: a burokfehérje (envelope glycoprotein, E) a fő antigén determináns, amely a gazdasejt felszínéhez kapcsolódásért felelős (így neutralizáló antigén is), valamint a vírus burka és az endoszóma membránjának fúziójának kiváltásával a vírus dekapzidációjában is szerepet játszik. Az E fehérje (~ 53 kDa) egyes típusú (type I) membránfehérje, 12 konzervált cisztein reziduummal, amelyek diszulfid hidak segítségével alakítják ki a fehérje másodlagos szerkezetét (Heinz és Allison, 2003). Az E fehérje számos flavivírusban N-glikozilált, bár a glikoziláció mértékében fajok között jelentős eltérések figyelhetők meg. Egyes esetekben a glikoziláció fajon belül, egyes vírustörzsekben is különböző mértékű, amely gyakran összefüggésbe hozható a vírustörzs virulenciájával (Heinz és Allison, 2003, Lindenbach és Rice, 2003). A fehérje a „fej-farok” pozícióban homodimert képez. A fehérje három szakaszra osztható (domain I, II és III). Az első és a harmadik szakasz hidrofób, a második hidrofil oldalláncokat tartalmaz. A második szakasz egyes részeinek alfa-hélix struktúráján kívül a fehérje döntően béta-lemez térszerkezetet vesz fel (Heinz és Allison, 2003). A sejtfelszíni receptor kapcsolódásban a harmadik szakasznak van a szerepe, míg a membránfúzióért a második szakasz felelős. Alacsony pH környezetben a dimerek trimerekké alakulnak és úgy váltják ki a lipidmembránok összeolvadását. Az

E fehérje a flavivírusok legfontosabb felszíni antigénje. Monoklonális ellenanyagokkal végzett epitop-térképezési vizsgálatok feltárták, hogy ez ellen a burokfehérje ellen termelődnek a vírusneutralizáló, haemagglutináció-gátló és membránfúzió-gátló ellenanyagok. Ugyanakkor az E fehérje epitopjainak megfelelő kifejeződéséhez szükséges a prM fehérje jelenléte is. A vírusneutralizáló ellenanyagok egy része fajspecifikus, míg mások kereszt-reagálnak rokon flavivírusok burokfehérjéivel. A vizsgálatok azt is igazolták, hogy nem minden, E burokfehérjéhez kapcsolódó ellenanyagnak van vírusneutralizáló hatása (Roehrig, 2003). A legfontosabb B sejt epitop régiókat számos flavivírus E fehérje esetében meghatározták. További kutatások azt is megállapították, hogy az E fehérje fúziós szakasza felelős a T helper sejtek aktivációjáért, míg a citotoxikus T sejtek aktiválódását az NS3 nem szerkezeti fehérje konzervált epitopjai váltják ki (Roehrig, 2003).

A másik felszíni fehérje a membrán (M) fehérje, amely a prekursor (prM) fehérjéből (~ 26 kDa) proteolitikus hasítás során keletkezik. A prM fehérje N-terminális része szintén N-glikozilált és hat, konzervált cisztein reziduum között kialakuló diszulfid hidak alakítják ki a szerkezetét. A prM fehérje a virion összeépülése során fontos szerepet játszik az E fehérje másodlagos szerkezetének kialakításában és stabilizálásában. Ebben a stádiumban a prM fehérje heterodimert képet az E fehérjével. A virionok érési folyamata során a Golgi apparátusból származó furin, vagy egyéb, furin-szerű proteázok hasítják a prM fehérjét. Az M fehérje beépül a vírus burkába, a pr szakasz pedig kiválasztódik. A prM és E fehérje együttes kifejeződése a gazdasejtben 20-30 nm átmérőjű, vírusszerű részecskék (recombinant subviral particles) képződését eredményezi (Lorenz és mtsai., 2003). Ezek a részecskék felszínükön hordozzák az E és M fehérjéket, így alegység-vakcinák alapjául szolgálhatnak (Merino-Ramos és mtsai., 2014).

A flavivírusok kb. 30 nm átmérőjű, T=1 ikozaéder szimmetriájú kapszidját a C (core) fehérje (~ 11kDa) alkotja. A C fehérje N- és C-terminális végei a vírus RNS-hez kötődnek, míg a belső, hidrofób szakasz a burokhoz kapcsolódik. A C fehérje képződésekor C-terminális, hidrofób szakasszal kapcsolódik az endoplazmatikus reticulum membránjához (anchored C). Ezt a csatoló szakaszt az NS2A/NS3 fehérje proteáz aktivitása hasítja és így jut a fehérje a citoplazmába. A C fehérje főként alfa-hélix szerkezetű és valószínűleg dimereket képezve alakítja ki a vírus kapszidot (Kiermayr és mtsai., 2004). Egyes flavivírusoknál (pl. TBEV) a fehérje N-terminális részén jelentősebb deléciók következhetnek be (Kofler és mtsai., 2002). A C fehérjék mesterségesen szintetizált vírus RNS-sel összekeverve vírus-szerű részecskéket (virus-like particle, VLP) alkotnak (Kiermayr és mtsai., 2004). A virionok összeépülésének módja még nem tisztázott pontosan, de úgy tűnik, hogy az RNS replikációs komplexhez kapcsolódó C fehérje, valamint a két membránfehérje együttesen szabályozza folyamatot.

A virionok belsejében kb. 11.000 nukleotid hosszúságú, egyszálú, pozitív irányítottágú RNS genom (+ssRNS) helyezkedik. A genom 5' végén egyes típusú (type 1) sapkastruktúra (m⁷GpppAmpN₂)

található, bár egyes esetekben, fertőzött sejtekben az N₂ reziduum további metilációja is kimutatható (kettes típusú sapkastruktúra) (Cleaves és Dublin, 1979). Szemben számos más +ssRNS vírussal, a genom 3' vége nem poli-adenilált. A flavivírus genom egyetlen nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) kódol, amelyet az 5' végen kb. 100 nukleotid hosszúságú, a 3' végen pedig kb. 400-700 nukleotid hosszúságú, nem kódoló régió (noncoding region, NCR, vagy untranslated region, UTR) egészít ki. Az 5' NCR szakasz szekvenciája a különböző flavivírus fajokban eltérő, viszont hasonló másodlagos szerkezeti elemeket alkot. A hurok (stem-loop) struktúrájának valószínűleg az RNS replikációjában van szerepe. Ez a régió szolgál riboszomális kötőhelyül a transzláció megindításához is, valamint egyes gazdasejt fehérjék kötődni tudnak az RNS ezen részéhez (Lindenbach és Rice, 2003). A nyitott leolvasási keret 5' része kódolja a szerkezeti fehérjék génjeit (C-prM-E sorrendben) majd ezeket követik a nem szerkezeti (non-structural, NS) fehérjék génjei (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5 sorrendben). A 3' NCR hurokstruktúrát alkotva jelentős szerepet játszik a nukleinsav replikációban. Kötőhelyül szolgál az NS3 és NS5 fehérjék alkotta replikációs komplexnek. A hurokstruktúrán túl, legalább kettő, erősen konzervált szakaszt lehet felismerni a 3' NCR területén. A szűnyogok és a kullancsok közvetítette flavivírusok szekvenciái jelentősen eltérnek ezen a szakaszon (Tsetsarkin és mtsai., 2016). A 3' nem kódoló régió szerkezetének szerepet tulajdonítanak a flavivírusok gazdafaj-adaptációjában is (Villordo és mtsai., 2016). Az ORF-ről a transzláció során képződő prekursor polipeptidet először sejt eredetű furin proteáz hasítja a C-prM, prM-E, E-NS1 fehérjék határain és az NS4A C-terminális részén. Virális szerin proteáz hasítási hely található az NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4A-NS4B és NS4B-NS5 fehérjék határain (Roby és mtsai., 2015). Az NS1-NS2A szétválasztását valószínűleg gazdasejt-eredetű enzim végzi (Addis és mtsai., 2015).

A nem szerkezeti fehérjék közül az NS1 fehérje szerepe még pontosan nem tisztázott. Ez a fehérje szükséges mind a vírus replikációjához, mind a virionok összeépüléséhez. A monomerek gyűrű-szerű hexamerré épülnek össze, amelyek lipidmembránokhoz és a vírus szerkezeti fehérjéihez tudnak kapcsolódni (Akey és mtsai., 2014, Scaturro és mtsai., 2015). A fehérjének immunmodulátor szerepet is tulajdonítanak (Akey és mtsai., 2014). A vírusfertőzött sejtek aktívan kiválasztják a fehérjét (Alcalá és mtsai., 2016), amely immunválaszt vált ki (szolubilis, komplement-fixáló antigén).

Az NS2 fehérje az NS3 fehérjével közreműködve lényeges szerepet tölt be az RNS virionba épülése és a kapszidfehérje érési folyamatai során (Khromykh és mtsai., 2001, Voßmann és mtsai., 2015). Az NS2B fehérje lipidmembránhoz kapcsolódik és az NS3 fehérje kofaktoraként szükséges a szerin proteáz aktivitáshoz, valamint szerepet játszik a virion összeépülés folyamatában is (Yu és mtsai., 2013, Li és mtsai., 2016). Az NS3 fehérje, nagyméretű, számos enzimatisz aktivitást mutató molekula. Az N-terminális szakasza tripszin-szerű szerin proteázként a prekursor polipeptid hasítását végzi (Luo és mtsai., 2015). A C-terminális szakasz RNS helikáz motívumot tartalmaz, amelynek

segítségével a fehérje a 3' NCR hurokstruktúrájához kapcsolódik és az NS5 fehérjével a replikációs komplexet képezi (Klema és mtsai., 2015).

Az NS4A és NS4B transzmembrán fehérjék kapcsolatban állnak az NS2 fehérjével és valószínűleg a transzmembrán komplex kialakításával segítik a nem membrán-asszociált fehérjék (NS3 és NS5) működését (Yu és mtsai., 2013). Egyes flavivírusokban az NS4A és NS4B fehérjék közé ékelődik egy 2 kilodalton méretű fehérje (2K), amely az endoplazmatikus membránhoz kapcsolódva megváltoztatja annak térszerkezetét (Campbell és mtsai., 2014).

Az NS5 fehérje N-terminális része az RNS sapkastruktúrához képes kapcsolódni és S-adenozil-metionin függő metiltranszferáz enzimotívumot tartalmaz. A C terminális rész a szekvenciája az RNS-függő RNS polimeráz (RdRp) szupercsalád erősen konzervált szekvencia elemeit (DEAK) tartalmazza, valamint virális RNS replikáz aktivitása kísérletesen is bizonyított (Lindenbach és Rice, 2003, Klema és mtsai., 2016).

Gerinces gazdáiban a flavivírusok elsődleges gazdasejtjei a bőr dendritikus sejtjei (Lindenbach és mtsai., 2007). Az E fehérje III. domain kapcsolódik a sejtfelszíni receptorokhoz, amelyek gazdafajtól és vírusfajtól függően változatosak és sok esetben kevésbé ismertek. Erősen szulfatált, negatív töltésű glikozaminoglikánok (pl. heparin szulfát) elősegítik az E fehérje sejtfelszíni kapcsolódását (Chen és mtsai., 1997; Germe és mtsai., 2002; Kroschewski és mtsai., 2003, Lee és Lobigs, 2008). A dendritikus sejtek felszínén található sejtközi kötőfehérjék (DC-SIGN és DC-SIGNR) a flavivírusok feltételezett elsődleges receptorai (Lozach és mtsai., 2005; Davis és mtsai., 2006). Ezek a C típusú lektinek mannózban gazdag N-glikánokhoz kapcsolódnak és szerepüket igazolták pl. a DENV és a WNV kapcsolódásában (Lozach és mtsai., 2005; Davis és mtsai., 2006). A virion sejtbe jutása receptor-mediált endocitózissal történik. A folyamatban közrejátszik (vagy közrejátszhat) az E fehérje II. domain és sejtfelszíni mannóz receptor közti kapcsolat (Miller és mtsai., 2008); az E fehérje III. domain „RGD” motívuma és sejtfelszíni integrin kapcsolódása (van der Most és mtsai., 1999). További kutatások kimutatták a laminin receptor (Thepparit és Smith, 2004) és különböző hősokk-fehérjék szerepét is a kötődésben (Reyes-Del Valle és mtsai., 2005, Salas-benito és mtsai., 2007, Das és mtsai., 2009). Specifikus ellenanyagok jelenlétében a flavivírusok vírusreceptor-független kapcsolódása is előfordulhat. Ilyenkor a vírusantigénekhez kötődő, IgG típusú ellenanyagok Fc γ receptorait kötik meg monociták és makrofágok, amelyek a fagocitózis során fertőződnek a vírusokkal (ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás; antibody-dependent enhancement, ADE) (Boonnak és mtsai., 2013). A receptorokhoz kapcsolódott virionok klatrin-függő endocitózissal endoszómákba jutnak (van der Schaar és mtsai., 2008). Az endoszómában uralkodó enyhén savas környezet (~pH 6.6) hatására az E fehérjén végbemenő konformációs változások a vírusburok és az endoszóma membránjai közötti fúziós pórusok kialakulását eredményezi, amelyen keresztül a virális RNS a citoplazmába kerül (van der Schaar és mtsai., 2008). A vírusgenom közvetlenül kapcsolódik az endoplazmatikus

retikulum (ER) felszínén található riboszómákhoz és megtörténik róla a prekursor polipeptid transzlációja. A polipeptidből a fent említett proteáz enzim hasítást követően alakulnak ki a funkcionális vírusfehérjék, amelyet az ER üregében az éretlen virionok összeépülése követ, valamint a virionok az ER membránján áthaladva öltik fel lipidburkukat. A transz-Golgi apparátuson keresztülhaladva a vírusok további érési folyamatokon esnek át (E fehérje glikozilációja, átrendeződése, a prM fehérje hasítása). Az érett (fúzióra képes) virionok exocitózissal jutnak ki a gazdasejtéből (Kaufmann és Rossmann, 2011).

A vektor csípése során a bőrbe kerülő vírusok első szaporodási ciklusa a fent említett dendritikus sejtekben következik be. A fertőzött dendritikus sejtek a regionális nyirokcsomókba jutnak, ahol a vírus szaporodás második ciklusa a lymphoid szövetekben alakul ki. Ezt követően viraemiával szóródik a vírus a szervezetben. A legtöbb flavivírus változatos célsejteket képes fertőzni, de a makrofágok, monociták, B és T lymphociták, májsejtek, endotheliális sejtek, epitheliális sejtek, fibroblastok és neuronok fertőződésének van a legnagyobb kórtani jelentősége (Ceccaldi és mtsai., 2004; Kaufmann és Rossmann, 2011).

A flavivírus fertőzések gyakran tünetmentesen vagy heveny, általános lázas tünetek formájában jelentkeznek (Heinz és Stiasny, 2012). Az egyes flavivírus fajok okozta betegségek kórfejlődése változatos és számos ponton nem ismert (Müllbacher és mtsai., 2003). A flavivírusok virulenciáját számos genetikai marker befolyásolja (Hurrelbrink és McMinn, 2003; Donadieu és mtsai., 2013). Ezek elsősorban az E fehérje glikozilációját, a nem-strukturális fehérjéket, illetve az 5' és 3' NCR hurokstruktúrákat érintik. Az itt bekövetkező mutációk gyakran a vírustörzsek attenuálódásához vezetnek (Hurrelbrink és McMinn, 2003). Klinikai tünetek szempontjából a flavivírusok okozta betegségeket három nagy csoportba lehet sorolni: kiütéses lázak (pl. dengue), vérzéses láz és májgyulladás (pl. sárgaláz) és agyvelőgyulladás (pl. kullancsencephalitis) (Gubler és mtsai., 2007). Mindemellett, számos flavivírus többféle tünet-együttest is kialakíthat (pl. nyugat-nílusi láz és agyvelőgyulladás). A flavivírusok okozta betegségek általában heveny formában zajlanak le, bifázisos lázzal. Az első lázas periódus gyakran enyhe, influenza-szerű általános tünetek kísérik, a második lázas periódusban vagy azt követően alakulnak ki a specifikusabb tünetekkel (bőrkiütések, vérzések, sárgaság, idegrendszeri tünetek) járó megbetegedések (Heinz és Stiasny, 2012). A tünetek főként idegrendszeri megbetegedések és vérzéses lázak esetén végzetes kimenetelűek lehetnek. A betegség átvészélése főként agy- és gerincvelő-gyulladások esetében maradványtünetekkel járhat (Patel és mtsai., 2015). Elhullásra vezető flavivírus okozta betegségeknel a kórbonctani kép általában szegényes. Testszerte vérzések, máj- és lépelváltozások (duzzanat, bővérűség) előfordulhatnak, de nem kórjelző értékűek. Jellegzetesebb kórszövettani elváltozások különösen idegrendszeri betegségek esetén figyelhetők meg (lymphocytás agy- és gerincvelő-gyulladás) (Murphy és mtsai., 1999).

A különböző gerinces gazdafajok és ízeltlábú vektorok eltérő mértékben fogékonyak az egyes flavivírus fertőzésekre. A rezisztencia genetikai hátterének egyes részleteit sikerült már feltárni (Brinton és Perelygin, 2003, Mashimo és mtsai., 2008). A szervezet flavivírusokkal szembeni védekezésében a veleszületett (innate) immunitás hatása is jelentős (Suthar és mtsai., 2013, Lazear és Diamond, 2015), de gerincesekben elsősorban a szerzett (adaptív) immunválasz játssza a központi szerepet (Diamond és mtsai., 2003, Samuel és Diamond, 2006; Rothman, 2011). A flavivírus fertőzések mind I. típusú interferonok (IFN α és β), mind II. típusú interferonok (IFN γ) termelését kiválthatják (Müllbacher és mtsai., 2003, Lobigs és mtsai., 2003). Az IFN γ immunaktivátor hatásán túl, nitrogén oxid gyökök felszabadításával közvetlen gátló hatást is kifejt egyes flavivírusok szaporodására (Saxena és mtsai., 2001). A természetes ölüsejtek szerepe nem teljesen tisztázott; egyes kutatások eredményei arra utalnak, hogy az flavivírus-fertőzéseket követően az agyban aktiválódó természetes ölüsejtek (NK sejtek) elpusztítják az astrocitákat, így a szervezetre káros hatásuk is lehet (Liu és mtsai., 1989). A flavivírusok többsége erős immunogén. Kísérletes fertőzést követően általában 4-6 nap múlva jelennek meg neutralizáló IgM típusú ellenanyagok. Az IgG típusú ellenanyagok néhány nappal később termelődnek, viszont jelenősen hosszabb ideig (hónapokig, évekig, akár élethosszig) perzisztálnak, szemben az IgM típusú ellenanyagokkal amelyek 6 hónappal a fertőzést követően már általában nem mutathatók ki (Gubler és mtsai., 2007). IgA típusú ellenanyagok általában a primer fertőzést követő 2-3 hónapig mutathatók ki, míg IgE típusú ellenanyagok a heveny fázisban termelődnek és titerük gyorsan csökken az átvészelést követően. Ismételt fertőzések jelentősen magasabb ellenanyagszintek kialakulását eredményezik. Dengue haemorrhagiás lázban vagy dengue shock szindrómában szenvedő betegekben magas IgA és IgE ellenanyagszinteket mértek, ezért ezeknek az ellenanyagoknak is szerepet tulajdonítanak a betegség kórfejlődésében. A prM és E szerkezeti fehérjék mellett az NS1 fehérje (és kis mértékben az NS3 fehérje) ellen termelődnek ellenanyagok. Neutralizáló ellenanyagokat az E mindhárom domainje ellen kimutattak. Monoklonális ellenanyagokkal végzett antigén térképezéssel számos flavivírus E fehérje antigénszerkezetét jellemezték (Roehrig 2003). Hasonlóan számos más vírusfertőzéshez a celluláris (T-sejtes) immunitásnak alapvető szerepe van a flavivírus-fertőzések átvészelésében. Mind a CD4+ mind a CD8+ T sejtes immunválasz számos ponton képes befolyásolni a sejtek fertőződését illetve a fertőzött sejtek citolízisét (Müllbacher és mtsai., 2003, Gubler és mtsai., 2007, Netland és Bevan, 2013). A flavivírusokban a gazdaszervezet immunrendszerének védekezése ellen számos immunmodulációs stratégia fejlődött ki, amelyek az interferon-válasz, a komplement rendszer, a természetes ölüsejtek valamint a B- és T-lymphociták működésének gátlására irányulnak (King és mtsai., 2003, 2007; Ye és mtsai., 2013). Emellett a flavivírus fertőzések kapcsán kialakuló betegségek egy részének kórfejlődésében immunopathológias folyamatok állnak, amelyek közül a legjelentősebb az ellenanyag-függő fertőződés fokozódása (antibody dependent enhancement, ADE) (Peiris és mtsai., 1981). Ez leggyakrabban ismételt DENV fertőzések során alakul ki (Rothman, 2003; Yakoub és mtsai., 2013, Rothman és mtsai., 2014; Srean és mtsai., 2015). A DENV négy szerotípusa közötti

antigénrokonság miatt heterológ ellenanyagok is képesek a vírusokhoz kapcsolódni. Primer DENV fertőzés általában enyhébb, lázas tünetekkel jár. Ha átvészelést követően a DENV egy másik szerotípusával fertőződik a gazdaszervezet, az előző fertőzés kapcsán termelődött ellenanyagok kapcsolódnak a vírusokhoz, ám nem képesek hatékonyan neutralizálni azokat. Az ellenanyagokkal jelölt vírusokat falósejtek fagocitálják és így fokozott mértékben fertőződnek. A heterológ szekunder DENV fertőzések gyakran súlyosabb tünetekkel járnak (Boonnak és mtsai., 2013; Martina, 2014). Ez a folyamat az egyik fő akadálya a DENV elleni vakcinák kifejlesztésének. A jelenség *in vitro* más flavivírusok esetében is megfigyelhető (Peiris és mtsai., 1981), ám *in vivo*, klinikai jelentősége nem kellően bizonyított.

A flavivírus-fertőzések kórjelzésében számos klasszikus virológiai és molekuláris biológiai módszert használnak. A kórelőzményi adatoknak nagy jelentősége lehet a flavivírus-fertőzések gyanújának megfogalmazásához, mivel egyes vírusok földrajzi elterjedése jellegzetes. Különösen a humán diagnosztikában fontos az utazási kórelőzmény feltárása például sárgaláz, dengue láz, Japán encephalitis, Zika vírusfertőzés vagy egyéb trópusi flavivírus fertőzés gyanúja esetében (Guzman és Harris, 2015; Petersen és mtsai., 2016). Ezt a szempontot állatoknál leggyakrabban versenylovak flavivírussal endémiásan fertőzött országokból való visszatérésekor célszerű megfontolni, de más fajok (pl. kutyák) külföldi utaztatásai során is előfordulhat (Sugiura és Shimada, 1999; Egberink és mtsai., 2015). Haszonállatok, kedvtelésből tartott, vagy állatkerti bemutatás céljára, flavivírussal endémiás országokból beszerzett állatok karanténozása során is felmerülhet egyes flavivírusoktól való mentesség igazolására irányuló vizsgálatok igénye. Az endémiásan előforduló flavivírusok okozta fertőzéseknél a szezonális, az időjárás és a vektorok aktivitása szintén megfontolandó szempontok a gyanú megfogalmazásakor (Zöldi és mtsai., 2013; Conte és mtsai., 2015). A vektorok jelenlétének megfigyelése a gazdaszervezeten főként kullancsok által terjesztett flavivírusok esetében, és emberek vagy kedvtelésből tartott állatok érintettsége során merül fel. Számos vírus- és gazdafaj esetében a fertőzést követően klinikai tünetek nem alakulnak ki, illetve ha kialakulnak, azok messze nem kórjelző értékűek (pl. láz, kiütések, vetélés, idegrendszeri tünetek). Elhullásra vezető flavivírus fertőzések főként agyvelőgyulladások kapcsán fordulnak elő. Ilyen esetekben a kórbonctani elváltozásokat ritkán lehet megfigyelni, a kórszövettani elváltozások pedig vírusos agy- és gerincvelő-gyulladás képét mutatják (citoplazma-zárványok, neuronelhalás, lymphoid sejtes infiltráció, gliasejt-proliferáció), így ezek a leletek is csak a gyanú megfogalmazását erősítik (Williams és mtsai., 2014).

A flavivírusok direkt kimutatására számos módszer alkalmas lehet. A vizsgálati minták élő állat esetében főként alvadásban gátolt vér (a lázas periódusban), cerebrospinális folyadék (heveny idegrendszeri tünetek esetében), illetve vizelet (különösen nyugat-nílusi vírus fertőzésnél) (Nagy és mtsai., 2016). Elhullott állatok esetében a (kórszövettani) elváltozásokat mutató szervek, elsősorban az agy- és gerincvelő, valamint a máj, a lép és a vese a leginkább alkalmas vizsgálati minták (Erdélyi és mtsai., 2007). Emellett flavivírusok kimutathatók ízeltlábú vektorok különböző fejlődési alakjaiból is,

különösen az imágókból (Busquets és mtsai., 2008). A klasszikus vírusizolálási technikák közül a kísérleti állatoltásnak, különösen szopósegerek intracerebrális oltásának napjainkban is nagy a jelentősége, mivel a legérzékenyebb módszerként gyakran olyan mintákból is elszaporítható a vírus, amelyeknél más próbálkozások kudarcot vallanak (Hubálek és mtsai., 2010). Emellett szúnyog imágók torába való oltással is el lehet szaporítani egyes flavivírusokat (Rosen és Gubler, 1974). Az embrionált tyúktojás allantoisz vagy aminionüregébe oltott flavivírusok általában a membránok és az embrió sejtjeiben elszaporodva elhullást és vérzéseket okoznak. Egyrétegű szövettényezeteken számos flavivírus izolálható. Leggyakrabban Vero (*Cercopithecus aethiops* vese epithel eredetű) sejtvonalat használnak, de számos más sejtben is szaporodhatnak flavivírusok. Szúnyogok terjesztette flavivírusokat szúnyog eredetű sejtvonalakban (pl. C6/36 *Aedes albopictus* lárv sejtvonala) is lehet szaporítani. Sejtkárosító hatások (cytopathic effect, CPE) nem minden esetben jelentkeznek; illetve ha vannak, általában jellegtelenek (sejtlekerekedés, lízis). A CPE jellegét befolyásolhatja a gazdasejt, a vírusfaj és a vírusok mennyisége is (Chu és Ng, 2003). Az izolált vírusok azonosításában jól használható a haemagglutinációs próba. A vírusizolálás hatékonyságát jelentősen befolyásolja a mintagyűjtés időpontja is. A heveny, viraemiás fázisban kialakuló lázas tüneteket különösen állati fertőzések esetében ritkán veszik észre. Az idegrendszeri tünetek viszont a félheveny stádiumban szoktak kialakulni, amikor a megjelenő ellenanyagok hatására a vérben a vírusok mennyisége jelentősen lecsökken. Az ilyen állatokból a cerebrospinális folyadék vizsgálatával van a legnagyobb esélye a sikeres vírusizolálásnak, ám az ilyen minta gyűjtése – különösen heves tüneteket mutató vagy kritikus állapotú állat esetén – nem kockázatmentes. A vírus antigénjeinek kimutatására jellegzetesen specifikus ellenanyagokat alkalmazó, jelöléses technikákat (pl. immunfluoreszcencia, immunperoxidáz festés, direkt ELISA) használnak. Ezek közül a kórszövettani metszetek immunhisztokémiai vizsgálatainak van a legnagyobb gyakorlati jelentősége (Weissenböck és mtsai., 2002; Erdélyi és mtsai., 2007). A rokon flavivírusok közötti antigenitásbeli hasonlóságok ugyanakkor keresztreakciókat eredményeznek, amelyek megnehezíthetik a pontos, faj szintű azonosítást (Weissenböck és mtsai., 2002). A flavivírusok nukleinsavának kimutatására az utóbbi két évtizedben számos, főként polimeráz láncreakcióra alapuló diagnosztikai rendszert dolgoztak ki (Gubler és mtsai., 2007). Ezek a módszerek kellően érzékenyek és specifikusak, különösen, ha az amplifikációs termékek szekvenciájának részleges vagy teljes azonosításával egybekötötték (pl. TaqMan próba-hidrolízisre alapuló valós idejű RT-PCR módszerek, vagy a termék direkt nukleotid-szekvencia meghatározása). A szekvencia-meghatározás és -elemzés általában lehetőséget ad a vírustörzsek genetikai rokonsági viszonyainak, esetleg eredetük becslésére, járványtani nyomozások végzésére is (Lanciotti és mtsai., 1999; Ciccozzi és mtsai., 2013).

A flavivírus fertőzések kimutatásában indirekt (szero-) diagnosztikai módszereket gyakrabban alkalmaznak, mint direkt módszereket. Szerológiai vizsgálatokat főként vérsavó mintákon végeznek, de idegrendszeri tünetek esetén cerebrospinális folyadék vizsgálata is indokolt lehet. A tradicionális

módszerek főként haemagglutináció-gátlási próbák (Casals és Brown, 1954, Clarke és Casals, 1958) és komplement-kötési próbák (Ajello és mtsai., 1975). Egyes vírusok esetében az indirekt immunfluoreszcenciás módszer is megbízhatóan használható a rutin diagnosztikában (Niedrig és mtsai., 2007). Gyakorlati szempontokból, napjainkban leginkább ELISA próbákat használnak a flavivírusok szerodiagnosztikájában (Niedrig és mtsai., 2007). Amennyiben különböző fajok ellenanyagait szeretnék ugyanazzal a módszerrel kimutatni, általában kompetitív ELISA rendszereket használnak (García-Bocanegra és mtsai., 2011). A heveny fertőzések kórjelzésére alkalmazható az IgM típusú ellenanyagok kimutatása a savómintákból (Papa és mtsai., 2010; Papa és mtsai., 2011b). A szerológiai próbák specifikussága eltérő, az azonos szerokomplexbe tartozó vírusok között keresztreakciók gyakoriak, ami megnehezíti a pontos oki diagnózis felállítását (Mansfield és mtsai., 2011; Papa és mtsai., 2011b). Ilyen esetekben a leginkább specifikusnak tartott vírusneutralizációs próba, illetve annak a plak-redukciós formája használható a keresztreakció-gyanús vizsgálati eredmények tisztázására. Ám ehhez a kérdéses savómintát szimultán kell vizsgálni a számításba jövő / elkülönítendő vírusokkal és legalább két kitevőjű (négyeszeres) ellenanyag-titer eltérés esetében lehet megbízható módon beazonosítani a szerokonverziót kiváltó, homológ vírust (Weingart és mtsai., 2003). A vírusneutralizációs próba ugyanakkor meglehetősen időigényes, kivitelezése költséges, és zoonotikus flavivírusok esetében általában csak magas biológiai biztonsági fokozatú laboratóriumban (Biology Safety Level 3, BSL-3) hajtható végre.

A flavivírusok által okozott betegségek gyógykezelésében elsősorban a tünetek enyhítésére és a gyógyulás támogatására alkalmas eszközök állnak rendelkezésünkre. Így a heveny lázas stádiumban nem szteroid gyulladáscsökkentők, idegrendszeri tünetek esetén nyugtatók és B vitamin terápia jótékony hatású lehet. Specifikus vírusellenes szerek alkalmazása az állatgyógyászatban csak ritkán fordul elő. Szövettenyészetekben vagy kísérleti állatokban több antivirális szer flavivírus szaporodást gátló hatását is kimutatták már (pl. Ribavirin: Jordan és mtsai., 2000; Favipiravir: Morrey és mtsai., 2008), ám a gyakorlati alkalmazás, főként a mellékhatások súlyossága és a terápia költségei miatt még emberi esetekben is ritkán fordul elő (Leyssen és mtsai., 2003). A flavivírusok elleni antivirális szerek kutatásában eddig elért eredményeket és perspektívákat Baharuddin és mtsai., 2014 és Kok, 2016 szemleciikiei foglalják össze.

A flavivírus fertőzések elleni hatékony védekezés főként az ízeltlábú vektorok gyérítésére és a csípések elkerülésére alapul (pl. zárt tartás, zárt ruházat, szúnyogháló, repellens szerek használata). Mivel a fenntartó gazdáknál klinikai tünetek ritkán alakulnak ki, a tüneteket mutató egyedek pedig gyakran nem közvetítik a vírusokat (alkalmi gazdák), a járványtani módszerek (pl. zárlati intézkedések, tüneteket mutató egyedek leölése) sok esetben kevésbé hatékonyak. A flavivírusok okozta betegségek megelőzésére az aktív immunizálás a legelterjedtebb módszer. Számos, elsősorban emberi flavivírus ellen fejlesztettek ki és forgalmaznak oltóanyagokat (Eckels és Putnak, 2003). Ezek közül a legrégebben használt a sárgaláz elleni, 17D vírustörzset vagy annak leszármazottait

tartalmazó, gyengített élővírusos vakcinák (Dick és Gee, 1952). Emellett inaktivált teljes vírust tartalmazó vakcinák használhatók például a Japán encephalitis vírus, a kullancsencephalitis vírus és a nyugat-nílusi vírus ellen (Eckels és Putnak, 2003). Rekombináns alegységvakcinák, vektorvakcinák és DNS vakcinák is fejlesztés alatt állnak vagy forgalomba kerültek számos flavivírus (pl. Japán encephalitis vírus, St. Louis encephalitis vírus, kullancsencephalitis vírus, nyugat-nílusi vírus, murray-völgyi vírus, louping ill vírus, stb.) ellen (Saluzzo, 2003; Putnak és mtsai., 2003). A közelmúltban tetravalens oltóanyagot hoztak forgalomba a Dengue vírus négy szerotípusa elleni védekezésre (Pitisuttithum és Bouckennooghe, 2016). Az aktív immunizálással az esetek nagy részében magas szintű és tartós védettséget lehet kialakítani, amely képes megakadályozni a vadvírus fertőzést követő súlyos klinikai tünetek kialakulását. Ugyanakkor mind a hatékonyság, mind a biztonság kérdésében számos oltóanyag esetén, időről-időre problémák merülnek fel, ezért a kutatás és fejlesztés a témában folyamatos és intenzív (Ishikawa és mtsai., 2014).

1.3. A nyugat-nílusi vírus

A nyugat-nílusi vírus elsősorban lovakban, emberekben és madarakban okoz lázas általános tünetekkel és bőrkiütésekkel járó megbetegedést, valamint az esetek egy részében agy- és gerincvelő-gyulladást, amely az állatok elhullásához és az emberek halálához vezethet.

A vírust először 1937-ben izolálták egy lázas tüneteket mutató nő véréből, Uganda nyugat-nílusi tartományában (Smithburn és mtsai., 1940). Később Afrika számos országában (Algéria, Botswana, Dél-Afrikai Köztársaság, Egyiptom, Elefántcsontpart, Etiópia, Kenya, Kongói Demokratikus Köztársaság, Közép-Afrikai Köztársaság, Madagaszkár, Marokkó, Mozambik, Nigéria, Szenegál, Szudán és Tunézia) kimutatták sporadikus emberi vagy állati esetekből. Nagyobb arányú megbetegedéseket okozott 1951-ben Egyiptomban emberek és madarak körében, valamint szünyogokból is izolálták a járványkitörés során (Melnick és mtsai., 1951). Európai előfordulását először 1958-ban, szerológiai módszerekkel igazolták Albániában, (Bárdos és mtsai., 1959) Az első Európában izolált törzs a 1962 nyarán és őszén Franciaországban a Rhone delta vidékén, lovakban megfigyelt járványból származik. 1967 és 1970 között Portugáliában lovak, vadmadarak és emberek, Görögországban 1970 és 1978 között pedig madarakat betegített meg a vírus (Hubálek és Halouzka, 1999). 1970-1973 között Szlovákiában is kimutatták a vírus jelenlétét (Labuda és mtsai., 1974). Romániában 1996-ban okozta a XX. század egyik legjelentősebb emberi arbovírus-járványát, több mint 500 igazolt esettel és 10%-hoz közeli letharitással (Savage és mtsai., 1999). A vírus elsősorban a mediterrán térségben és Közép-Kelet Európában fordul elő. A fent említett országokon túl a XX. században igazolták előfordulását Bulgáriában, Cipruson, Csehországban, Fehéroroszországban, Jugoszláviában, Lengyelországban, Magyarországon, Moldovában, Olaszországban, Oroszországban, Spanyolországban és Ukrajnában is. Ázsiában kimutatták jelenlétét Azerbajdzsánban, Borneón, a Fülöp-szigeteken, Grúziában, Indiában, Irakban, Izraelben, Kazahsztánban, Kínában, Libanonban,

Malajziában, Oroszország ázsiai területein, Örményországban, Pakisztánban, Sri Lankán, Tadzsikisztánban, Thaiföldön, Törökországban, Türkmeniában és Üzbegisztánban. Ausztráliában Kunjin vírus néven ismert az előfordulása (Hubálek és Halouzka, 1999). Jelentősebb járványokat Izraelben és Oroszország dél-nyugati részein figyeltek meg (Malkinson és mtsai., 2002, Lvov és mtsai., 2000; Platonov és mtsai., 2001).

A vírus 1999 augusztusában felbukkant az Egyesült Államokban is. New York Queens negyedében az év októberéig 62 igazolt emberi esetet diagnosztizáltak. Emellett több ezer vadmadár, elsősorban rövidcsőrű varjú (*Corvus brachyrhynchos*) elhullását figyelték meg, valamint számos madárfaj idegrendszeri tünetek mutatott és elpusztult a bronxi állatkert gyűjteményében (Rappole és mtsai., 2000). A vírustörzs sikeresen fennmaradt az amerikai kontinensen és robbanásszerű terjedésbe kezdett. 2000-ben már 12 államban tudták igazolni a vírus jelenlétét. A tavaszi időszakban inkább az északi részekben, míg ősszel a déli államokban tapasztaltak vírusaktivitást, ami jól igazolja azt, hogy a vonuló madarak hordozhatják a kórokozót. Az amerikai és izraeli vírustörzsek között igen nagyarányú genetikai hasonlóságot mutattak ki, ami alapján feltételezhető, hogy az 1998-ban, Izraelben megjelent vírust hurcolták be az Újvilágba, de az átjutás pontos módját nem sikerült kideríteni (Petersen és Roehrig, 2001; Gilaldi és mtsai., 2001; Charrel és mtsai., 2003). A vírustörzs néhány év alatt elterjedt az Egyesült Államok összes államában, valamint megjelent Kanadában, Közép- és Dél-Amerikában. Argentínában is kimutatták jelenlétét (Morales és mtsai., 2006). A WNV a legjelentősebb arbovírus járványt okozta az Egyesült Államokban az utóbbi száz évben. Az emberi megbetegedések száma 1999 és 2014 között meghaladta a 41 ezret és több mint 1700 halálesetet okozott (CDC, 2015). Hasonló arányban okozott megbetegedéseket és elhullásokat lovakban is; míg a vadmadarakban bekövetkezett elhullások mértékéről csak becslések vannak.

A nyugat-nílusi vírusnak a XX. században két fő genetikai vonalát ismerték fel. Az egyes genetikai vonal (Lineage1) világszerte elterjedt; jelenlétét kimutatták már Afrikában, Ázsiában, Európában, Közel-Keleten, Ausztráliában valamint ehhez a vonalhoz tartozó törzset hurcoltak be Amerikába is. Az egyes genetikai vonalat felosztották további három csoportra. Az 1A alcsoportba (Clade1a) európai, afrikai, közel-keleti, oroszországi és amerikai vírustörzseket soroltak (Lanciotti és mtsai., 1999; Prilipov és mtsai., 2002). Külön alcsoportot alkotnak az ausztráliai, úgynevezett Kunjin (Clade1b), valamint az indiai (Clade1c) vírustörzsek is. A kettes genetikai vonal főként a Szaharától délre fekvő területeken, valamint Madagaszkáron fordul elő (Lanciotti és mtsai., 2002). Ebbe a csoportba tartozik az 1937-ben izolált ugandai, prototípus vírustörzs is.

A kórokozó terjesztésében olyan vektorok játszanak fő szerepet, amelyek a madarak vérével táplálkoznak. A *Culex* nembe sorolt szúnyogfajok a fő vektorai a vírusnak, de néhány esetben kullancsokból is kimutatták a vírus jelenlétét. A nyugat-nílusi vírus elsődleges gazdái vadmadarak. Sok esetben nem is mutatnak tüneteket, hosszan tartó viraemia alakulhat ki bennük és így tudják

hordozni a kórokozót a kontinensek közötti vándorlásaik során, ezért nagy szerepük lehet a vírus hosszú távú terjesztésében (Hubálek és Halouzka, 1999). Bizonyos madárfajok azonban különösen érzékenyen reagálnak a fertőzésre. Az Egyesült Államokban a rövidcsőrű varjak mellett főként kék szajkók (*Cyanocitta cristata*) estek áldozatul a fertőzésnek. Európában madárelhullásokat a XX. században ritkán hoztak összefüggésbe WNV fertőzéssel.

Az emlősök közül lovakban és emberekben okoz leggyakrabban tünetekben is megnyilvánuló betegséget a WNV, de számos más emlősfajból (pl. juh, kutya, szarvasmarha, teve, különböző rágcsáló-fajok) is kimutatták már a vírus jelenlétét (Hubálek és Halouzka, 1999). Jelenlegi ismereteink alapján az emlősökben nem alakul ki olyan szintű viraemia, hogy azok képesek volnának ízeltlábú vektorokat fertőzni, ezért járványtani szempontból az emlősök zsákutcának tekinthetők, a vírus továbbterjesztésében nem játszanak szerepet. Lovaknál súlyosabb esetekben agy- és gerincvelő-gyulladást, agyhártya-gyulladást tud kialakítani a vírus. A hátsó testfél gyakran bénul, illetve a bőr túlérzékenységet lehet tapasztalni (Varga és Fodor, 2003). Emberekben a fertőzések kb. 80%-a tünetmentesen zajlik le, és csupán a szerológiai áthangolódás alapján ismerhető fel. A fennmaradó 20%-ban általános lázas tüneteket és influenza-szerű tüneteket (izomfájdalmakat, remegést, torokfájást, fejfájást, hátfájást) lehet megfigyelni. A fertőzések kb. 1%-ában központi idegrendszeri megbetegedés, lymphocytás agy- és gerincvelő-gyulladás alakul ki (Hubálek és Halouzka, 1999).

A WNV hazai előfordulását elsőként szerológiai módszerekkel igazolták 1969-ben (Koller és mtsai., 1969). A '70-es években rágcsálók zoonotikus vírusfertőzöttségének feltárására irányuló góckutatások kapcsán jelentették a WNV izolálását 1972-ben Gic környékén gyűjtött erdei pocok (*Clethrionomys glareolus*) mintából, illetve 1976-ban a Királyréten gyűjtött erdei egér (*Apodemus flavicollis*) mintából (Molnár, 1982). Klinikai tünetekben megnyilvánuló hazai betegségek háttérében 2003-ig nem mutatták ki a nyugat-nílusi vírus kóroki szerepét. A 2003-ban és 2004-ben Magyarországon felbukkant nyugat-nílusi vírustörzsek részletes vizsgálata a jelen dolgozat egyik fő témája.

1.4. Az Usutu vírus

Az Usutu vírus prototípus törzsét (SA Ar 1776) *Culex univittatus* fajba tartozó szúnyogokat tartalmazó pool-ból izolálta Bruce M. McIntosh 1959-ben (McIntosh, 1985). A szúnyogokat az Usutu folyónál gyűjtötték a Dél Afrika Natal régiójában található Ndumu nemzeti parkban, (Woodall, 1964; Williams és mtsai., 1964). A vírust Afrikában kimutatták még *Coquillettidia (Mansonia) aurites*, *Mansonia africana*, *Aedes minutus* és *Culex perfuscus* szúnyogfajokból, valamint *Culex* fajokból Ugandában, Szenegálban és a Közép-Afrikai Köztársaságban (Adam és Diguette, 2005). Gerinces gazdák közül izolálták a vírust vöröscsőrű rigóból (*Turdus libyanus*) Nigériában, fütyülő szarvascsőrűből (*Bycanistes fistulator sharpii*) a Közép-Afrikai Köztársaságban, zöld bülbülből (*Andropadus virens*) Nigériában (Weissenböck és mtsai., 2007). A XX. században csupán egy emberi megbetegedésről számoltak be Afrikában: egy kiütésszerű lázas betegből izoláltak Usutu vírust a Közép-Afrikai

Köztársaságban (Adam és Diguette, 2005). Afrikában sohasem figyeltek meg USUV fertőzéssel összefüggésbe hozható, jelentősebb (járványos) megbetegedéseket vadon élő vagy háziállatokban; így a vírust a JEV-szerokomplex egy kevésbé jelentős, afrikai tagjának tekintették és csekély tudományos érdeklődés irányult felé (Nikolay és mtsai., 2011).

Jelentős vadmadár elhullásokat figyeltek meg 2001 nyár végén és ősszel Bécsben, a városi parkokban és kertekben (Weissenböck és mtsai., 2002). A bécsi állatorvosi egyetem patológiai osztályára beküldött madártetemekben lymphocytás agyvelőgyulladást diagnosztizáltak. A járványtani helyzet (nyár végi tömeges madárelhullás) és a kórszövettani lelet (encephalitis) nagyon hasonlított a WNV amerikai felbukkanásakor megfigyeltekhez, ezért WNV-elleni ellenanyagokkal immunhisztokémiai vizsgálatot végeztek a vírusantigének kimutatására. A vizsgálatok pozitív eredményt adtak. A JEV-szerokomplexbe sorolt vírusok konzervált genomterületére (NS5-3'UTR) tervezett primerpárokkal sikerült specifikus terméket amplifikálni, ám a nukleotid-szekvencia meghatározását és azonosítását követően kiderült, hogy nem a WNV, hanem az USUV bukkant fel Ausztriában. Főként helyben telelő madárfajokat, elsősorban feketeregőket (*Turdus merula*) érintett a járvány, de a Bécsi Állatkertben nevelt szakállas baglyok (*Strix nebulosa*) is a járvány áldozatául estek. A vírus váratlan felbukkanása Ausztriában állat- és közegészségügyi, valamint természetvédelmi aggályokat vetett fel. Intenzív kutatások indultak a vírus tulajdonságainak, előfordulásának és terjedésének vizsgálatára. Jelen dolgozat ezeknek a kutatásoknak az eredményeit is hivatott bemutatni.

2. Anyag és módszer

2.1. Vizsgálati anyagok

2.1.1. Vírustörzsek

A genetikai vizsgálatokhoz a vírustörzseket hazai és külföldi együttműködő partnerek bocsátották rendelkezésünkre. A nyugat-nílusi vírus 1972-ben, erdei pocokból a Csehszlovák Tudományos Akadémia pozsonyi virológiai intézetében izolált, és az Országos Epidemiológiai Központ (Budapest) részére visszajuttatott törzsét (WN_{m1}, „Gresiková”) (Molnár, 1982) Dr. Ferenczi Emőke jóvoltából vizsgálhattuk. Egy mezőtúri nyájban, 2004-ben idegrendszeri tüneteket követően elhullott juhból a Debreceni Állategészségügyi Intézetben izolált WNV törzset Dr. Kecskeméti Sándor küldte genetikai vizsgálatra. A WNV egy Csehországban izolált vírustörzsét (Rabensburg vírus) Dr. Zdenek Hubálek (Cseh Tudományos Akadémia, Emlősbiológiai Intézet, Brno, Csehország) adta át részünkre. A WNV törökországi izolátumait Dr. Koray Eygunar (Hacettepe Egyetem, Ankara, Törökország) biztosította vizsgálatainkhoz. Az Usutu vírus Ausztriában, 2001-ben feketeterítő agyvelőből izolált törzse (939/01) Dr. Norbert Nowotny-tól (Bécsi Állatorvosi Egyetem, klinikai virológiai osztály) származik. Az Usutu vírus csehországi izolátumát szintén Dr. Zdenek Hubálekkel együttműködésben vizsgáltuk. Az USUV dél-afrikai, prototípus törzsét (SA Ar 1776) Dr. Ernest Gould (Centre for Ecology and Hydrology, Natural Environment Research Council, Oxford, Egyesült Királyság) bocsátotta rendelkezésünkre.

2.1.2. Gerinces gazdákból gyűjtött minták

A kutatások kezdetén elsősorban elhullott vagy klinikai tüneteket mutató házi- vagy vadmadaraktól származó mintákat vizsgáltunk. A minták legjelentősebb része az Országos Állategészségügyi Intézet (jelenleg Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) kórbonctani osztályaira érkezett, és kutatási együttműködésben Dr. Ivanics Éva, Dr. Glávits Róbert, Dr. Erdélyi Károly, Dr. Dán Ádám és Dr. Ursu Krisztina közvetítette a genetikai vizsgálatokhoz. Az aktív és passzív felmérő (surveillance és monitoring) vizsgálatokhoz a hazai vizsgálati anyagokat az ország számos pontjáról gyűjtöttük be. A vadmadár-minták egyik legjelentősebb forrása az Ócsai Madárvárta volt (Dr. Csörgő Tibor, ELTE TTK jóvoltából). Emellett számos mintát gyűjtöttünk a Körös-Maros Nemzeti Park környezetéből (Puskás László, Körösladány szíves közreműködésével), a kardoskúti kékvércse kolóniából, és a Hortobágyi Nemzeti Park területéről. További vadmadár minták érkeztek az Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület munkatársaitól, a Fővárosi Állat- és Növénykertből (Dr. Sós Endre és Dr. Molnár Viktor jóvoltából) és a Szegedi Vadasparkból (Veprik Róbert közvetítésével). A külföldi madárminták legnagyobb része Dr. Herbert Weissenböck (Bécsi Állatorvosi Egyetem, Patológiai Intézet) közvetítésével került virológiai vizsgálatra. A keákból (*Nestor notabilis*) gyűjtött mintákat Dr. Gyula Gajdon (Bécsi Állatorvosi Egyetem, Messerli Kutatóintézet) bocsátotta rendelkezésünkre. Egy nemzetközi kutatási projekt (EDENext EU FP7)

keretében nagyszámú vadmadár-minta vizsgálatát végeztük el. Ezeket Spanyolországban (Dr. Jordi Figuerola, CSIC, Doñanai Biológiai Állomás) és Romániában (Dr. Kiss Botond és Dr. Mihai Marinov, Duna Delta Intézet, Tulcea) gyűjtötték. Usutu vírussal fertőzött olaszországi vadmadár mintákat Dr. Giovanni Manarolla (Milánói Tudományegyetem, Állatorvosi Patológia Tanszék), Giacomo Rossi (Camerino Egyetem, Állattudományi Tanszék, Matelica) és Paolo Mani (Pisai Egyetem, Állatorvosi Patológia Tanszék) küldött vizsgálatra. Az USUV svájci felbukkanásával kapcsolatos kutatáshoz Dr. Hanspeter W. Steinmetz (Zürich-i Egyetem, Állatkerti-, egzotikus- és vadállatok klinikája) szolgáltatta a vizsgálati mintákat. Elhullott vadmadarak tetemei mellett olykor vérmintákat, garat-szájüregi és cloaca-bélsár tamponmintákat is gyűjtöttünk élő madarakból. A vérvételekhez az esetek többségében a szárnyvénát (*v. cutanea ulnaris*) vettük igénybe, néhány madárnál pedig a lábvényt (*v. medialis metatarsalis*) vagy a nyaki vénát (*v. jugularis*). Bőrfertőtlenítést követően, nyílt rendszerű vérvételi technikával dolgoztunk, a levett mintákat 1 ml-es csövekbe gyűjtöttük, majd a minták feldolgozásáig hűtve tároltuk. A levett vér mennyiségénél mindig figyelemmel voltunk a madár testméretére. Az tamponmintákat gyűrűzésre befogott madarakból vettük, bódítás nélkül. Mintavételezésre steril, kisméretű tamponokat használtunk, melyet a mintavétel után steril foszfátpuffer oldatban, 1 ml-es mikrocentrifuga csövekben, -70°C-on tároltuk. Az elhullott madarak tetemeit a kórbonctani vizsgálatig -20°C-on tároltuk. A mintavételezések minden esetben hatósági engedély birtokában és az illetékes nemzeti parki igazgatóság értesítését követően végeztük. A mintagyűjtések kapcsán a madarak nem károsodtak.

Emlősök közül a legtöbb vizsgálati minta lovakból származott. A minták döntő többségét Dr. Kutasi Orsolya (SzIE, ÁOTK, Nagyállatklinika, Üllő) és munkatársai (Dr. Molnár Beáta, Dr. Sárdi Sára) gyűjtötte. Élő lovakból elsősorban vér és cerebrospinalis folyadék (liquor) mintákat kaptunk. A mintavételezések az állatorvosi szakma szabályai szerint, a lótulajdonosok beleegyezésével történtek. Az üllői nagyállat klinikán elpusztult vagy oda kórbonctani vizsgálatra küldött lovakból Dr. Biksi Imre gyűjtött szövetmintákat virológiai vizsgálatok céljára. Ausztriai véradókból gyűjtött plazmamintákat az ausztriai vöröskereszt felkérésére vizsgáltuk flavivírusok jelenlétére.

2.1.3. Szúnyog vektorokból gyűjtött minták

A nyugat nílusi vírus és az Usutu vírus elterjedtségének és vektor fajainak felmérése céljából csípőszúnyog mintákat gyűjtöttünk. A magyarországi szúnyoggyűjtéseket entomológus kollégák, elsősorban Dr. Papp László és Dr. Soltész Zoltán (Természettudományi Múzeum, Állattár) végezték. Jelentős számú szúnyogmintát gyűjtött még Antal László és Tóth Mihály (Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar), Kemenesi Gábor (Pécsi Egyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont) és Sáringer-Kenyeres Marcell (SzIE, ÁOTK, Biológiai Intézet). A gyűjtéseket elsősorban az év legnagyobb szúnyogaktivitást mutató időszakában, májustól szeptemberig végeztük, bár egyes esetekben betelelő, áttelelő, vagy tavasszal aktívvá váló szúnyogokat is gyűjtöttünk, hogy a vírus

áttelelésének egyes kérdéseit vizsgáljuk. A legátfogóbb hazai felmérést 2011 és 2012 években végeztük (Szentpáli-Gavallér és mtsai., 2014). Az ország hat megyéjében, összesen 21 gyűjtőhelyen folytak a mintagyűjtések: Baranya megyében négy helyen (Pécs környéki halastavak, sumonyi madárvárta, mohácsi Duna holtág, a Dráva ártere Drávaszabolcsnál), Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében öt helyen (a Tisza árterében két helyen, két mocsaras területen és a kisvárdai víztározónál), Hajdú-Bihar megyében hat helyen (Debrecen városközpontjában, Debrecen-környéki erdőkben két helyen, két halastónál, valamint a Hortobágyi Nemzeti Park szikes pusztáján), Békés megyében négy helyen (Kardoskút közelében egy kékvércse kolóniánál és egy juhhodályban, egy körösladányi udvar galambdúcában és egy dévaványai udvar tyúkóljában és sertésóljában), Pest megyében egy helyen (ócsai borospincénél), és Bács-Kiskun megyében további egy helyen (felsőereki kacsatelepen). Az áttelelő szúnyogokat baromfiólakban, pincékben, hodályokban és tehénistállókban gyűjtötték. A gyűjtésekhez különböző módszereket (fénycsapda, aspirátor, testre szálló szúnyog) szimultán alkalmaztak. A szúnyogokat feldolgozásig élve vagy fagyasztva tárolták és szállították.

Külföldi szúnyogmintákat Dr. Bernhard Seidel (Persenbeug, Ausztria), Dr. Zdenek Hubálek, Dr. Anna Papa (Arisztotelész Egyetem, Thessaloniki, Görögország) és Dr. Núria Busquets (Állategészségügyi Kutatóközpont, Barcelonai Egyetem, Cerdanyola del Valle`s, Spanyolország) bocsátott rendelkezésünkre.

2.2. A minták előkészítése, nukleinsav kivonás

A gerinces gazdafajok elhullott egyedeit kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá. Vadmadarak esetében részben ellenőriztük és rögzítettük a madarak azon adatait, melyeket az ornitológusok juttattak el hozzánk (faj, ivar, kor, elhullás helye és ideje), a boncolás során megfigyelt elváltozásokat, illetve ahol találtunk egyedi jelölést, az állatok gyűrű, illetve chipszámát. A vizsgálat során mintát vettünk az agyvelőből vírus nukleinsav kimutatására, illetve különböző szervekből (agy, lép, máj, vese, bél, bursa Fabricii, tüdő, szív) immunhisztokémiai és szövettani vizsgálatok elvégzéséhez. Lovak esetében a kísérőiraton szereplő, azonosító és kórelőzményi adatok mellett feljegyeztük a kórbonctani vizsgálatok során esetleg megfigyelhető elváltozásokat. Vírusizolálásra, nukleinsav-kimutatásra, illetve kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokra elsősorban az idegrendszer szöveteiből (az agy és a gerincvelő különböző területeiről) valamint egyes zsigeri szervekből (főként máj, lép, vese, tüdő, nyirokcsomók) gyűjtöttünk mintákat. A szúnyogmintákat először entomológus kollégák sztereomikroszkóp segítségével, morfológiai jegyek alapján (Becker és mtsai., 2003; Kenyeres és Tóth, 2008) egyedileg azonosították, illetve faj, ivar, gyűjtési hely és időpont alapján maximum 50 egyedet tartalmazó csoportokba (pool) rendezték. A mintákat további feldolgozásig -80°C hőmérsékleten tárolták.

A szervmintákat és a szűnyogmintákat az előkészítés során steril fülkében, dörzsmozsárban, steril kvarchomok segítségével homogenizáltuk és 1:10 arányban hígítottuk foszfátpufferrel (phosphate-buffered saline, PBS). A homogenizátumokat 10 percig 1500 $\times g$ gyorsuláson centrifugáltuk. A vírus kimutatására irányuló vizsgálatokat a felülúszókból végeztük. A tamponmintákhoz 1,5 ml PBS-t adtunk és rázó-keverőgép (vortex) segítségével kimostuk belőlük a váladékot, majd a fent leírt sejtmentesítő centrifugálást követően a felülúszókat vizsgáltuk. Az alvadásban gátolt vérmintákból fehérvérsejteket tisztítottunk: 10 percig tartó 1500 $\times g$ gyorsuláson végzett centrifugálást követően a fehérvérsejtek rétegét (buffy coat) pipetta segítségével összegyűjtöttük. A szennyező vörösvérsejtektől haemolízis sokk módszerrel tisztítottuk meg a fehérvérsejtben gazdag frakciót: steril desztillált vízből 9 ml-t mértünk a vérsejtekre és 40 másodpercig kevertük. Ez követően 1 ml 10 $\times$ töménységű PBS oldattal állítottuk vissza a fiziológiás ozmotikus nyomást. Centrifugálást követően (10', 1500 $\times g$) az üledéket alkotó fehérvérsejteket PBS-ben vagy tápfolyadékban reszuszpendáltuk. A szerológiai vizsgálatok céljára gyűjtött véreket az alvadást követően centrifugáltuk (5', 2000 $\times g$), a savókat összegyűjtöttük és további vizsgálatokig -20°C hőmérsékleten tároltuk.

A mintában vírus-nukleinsav jelenlétének kimutatására irányuló vizsgálatokhoz RNS kivonást végeztünk. Leggyakrabban a QIAamp Virus RNA Mini Kitet használtuk (Qiagen, Hilden, Németország), a gyártó utasításai szerint. A mintákból vett 140 μl mennyiségű, sejtmentes felülúszókból először alkalikus lízis segítségével roncsoltuk a vírusfehérjéket és kiszabadítottuk a vírusok nukleinsavát. Ez követően etanollal precipitáltuk a nukleinsavakat és kromatográfiás módszerrel tisztítottuk. Végül 60 μl térfogatú eluáló pufferrel oldottuk le a vírusRNS-t az oszlopok mátrixáról. Nagyszámú minta feldolgozása, különösen a szűnyogminták vizsgálatra előkészítése során automatizált rendszereket használtunk: félautomata szövethomogenizáló (Qiagen) segítségével tártuk fel a mintákat, melyeket 10.000 $\times g$ gyorsulással centrifugáltunk 10 percig. A vírus RNS kivonása 100 μl felülúszóból automata X-tractor Gene nukleinsav kivonó robottal (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Ausztrália) és a Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével történt.

2.3. Reverz-transzkripció polimeráz láncreakció

A direkt víruskimutatási módszerek közül leggyakrabban a reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével vizsgáltuk a mintákban flavivírusok (WNV és USUV) jelenlétét. A konvencionális (endpoint) RT-PCR vizsgálatokhoz főként a QIAGEN OneStep RT-PCR Kit-et használtuk, a gyártó utasításai szerint. A reakcióelegyek a flavivírus-specifikus, oligonukleotid primereket 0,8 μM koncentrációban tartalmazták. A gerinces gazdákból származó mintákat (döntően szöveti homogenizátumokat vagy fehérvérsejteket) elsősorban a WNV, JEV és MVEV genomszekvenciáinak illesztése segítségével azonosított, az NS5 gén és a 3'UTR régió területén található, erősen konzervált genomszakaszok szekvenciái alapján tervezett, degenerált primerpár

(WNV3f: 5'- GARTGGATGACVACRGAAGACATGCT-3'; és WNV2r: 5'- GGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT-3'; Weissenböck és mtsai., 2002) segítségével vizsgáltuk. Egyes esetekben a vírusok teljes genomszekvenciáinak meghatározását végeztük el. Ehhez a genom átfedő szakaszait vírus-specifikus oligonukleotid primerekkel felerősítettük, majd az amplifikációs termékek szekvenciáit meghatároztuk és azokat az átfedő területek segítségével összefüggő szekvenciává alakítottuk. Az USUV és a WNV egyes törzseinek teljes genomszekvencia meghatározásához használt primerek szekvenciáit a 2.–5. táblázatok tartalmazzák.

2. táblázat: Az Usutu vírus teljes genomszekvenciáinak felerősítésére és szekvenálására használt oligonukleotid primerek.

Név ^a	Szekvencia (5' – 3')	A termék mérete (bázispár)
<i>Usu1f</i>	AGWMGTTYRYCTGCGTGARC	740 ^b
<i>Usu603f</i>	TGTGAKGAYACYATCACKTA	1112
<i>Usu1714r</i>	GTGGCRTGHGSYTCTTCAAA	
<i>Usu2328f</i>	CTCTTTGGRGGRATGTCHTG	818
<i>Usu3145r</i>	GTGCADGATTTKACYTCTCC	
<i>Usu3606f</i>	AAGAGGTGGACGGCCARRHT	1152
<i>Usu4759r</i>	GTGTGCCAYAGYGTGTGGAA	
<i>Usu4251f</i>	ATGTTYGCCATYGTWGGDGG	1142
<i>Usu5392r</i>	TGGCACATSACATCMACKAT	
<i>Usu5454f</i>	ATGGATGAAGCYCATTTAC	337
<i>Usu5790r</i>	GGTAYTCYGTMTCATAGGAC	
<i>Usu6585f</i>	ATGGCTCTYGARGARCTRCC	773
<i>Usu7357r</i>	TTCATKATDCCAGCVGCTGT	
<i>Usu10596f</i>	GWAAGCCTCYCAGAACCGTCTCGGAAG	419
<i>Usu11014r</i>	AGATCCTGTGKTCTWSYYCMCCAYCAG	
<i>Usu306r</i>	TTGCCGTGGTCTTGTTGATG	328 ^c
<i>Usu731r</i>	CGCTTCGAGTGTCTGGTTCT	740 ^d
<i>Usu488f</i>	GACCATCAACGCGACTGATA	914
<i>Usu1401r</i>	CAGAGCTGGTAGAACCATGT	
<i>Usu1155f</i>	CTAGCCACTGTCTCATATGT	425
<i>Usu1600r</i>	ATGTAGTATGCCTCGGTGTT	
<i>Usu1537f</i>	GGTTGAACACCGAGGCATAC	973
<i>Usu2505r</i>	CTTGTCACACAGCGCAACTCT	
<i>Usu2383f</i>	ATCGCACTGGTGATGTTAGC	625
<i>Usu3098r</i>	CAGCCGTCCCAATTATTGAG	
<i>Usu3067f</i>	TGACTGAGACAGCTCAATAA	692
<i>Usu3666r</i>	TAAGCAGGTCAGTGTAAGTG	
<i>Usu3653f</i>	CACTGACCTGCTTAGGTATG	1943
<i>Usu5645r</i>	GCACCTCAGCTTGTATGTCT	
<i>Usu3657f</i>	GACCTGCTTAGGTATGTTCT	1493
<i>Usu5204r</i>	ATCACTGTCAGCTGCTTCTT	
<i>Usu4005f</i>	TGGCATGAGACTGCTCTACC	515
<i>Usu4519r</i>	ATGCCGTCATACGGATGACC	
<i>Usu4403f</i>	CAGCCAACGCCTAGATGTAA	656
<i>Usu5358r</i>	CCACTATCTCTGTGCCACTA	
<i>Usu4763f</i>	TGGTGAAGGAAGGCTCACTC	318
<i>Usu5080r</i>	ACGATGGCACTGACATACGA	
<i>Usu5201f</i>	AGAAGCAGCTGACAGTGATG	465
<i>Usu5625r</i>	GCACCTCAGCTTGTATGTCT	

Usu5569f	CCAATGCACCAAGTTACAGAC	702
Usu6270r	ACTTCCTGTCGGTGTACTGT	
Usu5709f	TCGTCGCTAGTGTGAAGATG	1572
Usu7303r	CCGCAGTGATCAGAGTTGTT	
Usu6217f	ACTGCAGACCTGCCAGTGTG	392
Usu6607r	AGAGCGTCCGGCAACTCTTC	
Usu6522f	TATCTGGTGGCGACAGCTGA	433
Usu6954r	GTTGACGTGTGCTGGAGAAT	
Usu7272f	CCAAGTGTCTGTTAACAACCTC	1984
Usu9175r	TTCAACACCTCCTCCAGAAT	
Usu7314f	AGAACAGCGGCCGGAATCAT	720
Usu8033r	GACAAGGTTCAGCCATAGC	
Usu7757f	AAGAGGCCATCACTGAAGTC	843
Usu8599r	TTCCGTGGTAGGTCCAGGTC	
Usu8044f	GCGGAGTGGACGTGTATTAT	546 ^e
Usu9179f	AGGAGGTGTTGAAGGACTTG	436
Usu9614r	CCAGGTTCTCACAGCGTATT	
Usu9600f	GCTGTGAGAACCTGGCTCTT	685
Usu10257r	CCTGGTTAATGGCTGCGTAG	
Usu10746f	CAAGCGAACAGACGGTGATG	270 ^f
SAAR544f	ACCAGTGCTGGATTAGAG	855 ^g
SAAR6804r	CATGAGCAGAGCCAGCAATA	477 ^h
SAAR9532f	AACATTGCCGTCCAGCTCAT	617
SAAR10124r	TCCACACTTGTCCACACTTC	
WNV9031f	TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA	1085
WNV10091r	AGCATGTCTTCYGTBGTCTATCCAYT	
WNV10090f	GARTGGATGACVACRGAAGACATGCT	753 ⁱ
WNV10807r	GGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT	
WNV10460f	GCCACCGGAAGTTGAGTAGA	442
WNV10889r	GCTGGTTGTGCAGAGCAGAA	

^a *dőlt betűvel szedett*: degenerált, JEV-szerokomplex-specifikus primerek

SAAR: primerek az SA Ar-1776 törzs egyes genomterületeinek felerősítésére használt primerek

WNV: WNV-specifikus primerek (Weissenböck és mtsai., 2002)

A számok a primer szekvenciák hozzávetőleges helyét mutatják a MVV, JEV és WNV szekvenciák illesztésével készített, konszenzus szekvenciában

f: genomikus (forward) primer; r: komplementer (reverse) primer

^b Az Usu731r primerrel alkalmazott primer

^c Szekvenáló primer az Usu1f-Usu731r amplikonon

^d Az Usu1f primerrel alkalmazott primer

^e Szekvenáló primer az Usu7757f-Usu8599r amplikonon

^f Szekvenáló primer az Usu10596f-Usu11014r amplikonon

^g Szekvenáló primer az Usu488f-Usu1401r amplikonon

^h Szekvenáló primer az Usu5709f-Usu7303r amplikonon

ⁱ A diagnosztikában WNV3f és WNV2r néven használt primerpár

3. táblázat: Az egyes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzsek teljes genomszekvenciáinak felerősítésére és szekvenálására használt oligonukleotid primerek

Név ^a	Szekvencia (5' – 3')	A termék mérete (bázispár)
WNVI 1f	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGC	388
WNVI 388r	GCCGATTGATAGCACTGGTC	
WNVI 82f	AGCACGAAGATCTCGATGTC	986
WNVI 1067r	ATGATAGTCACGCAGCTGTC	
WNVI 1005f	AGGAGTGTCTGGAGCAACAT	995
WNVI 1999r	AAGCCACTGACGAGATAGGA	
WNVI 1864f	ACAACCTATGGCGTCTGTTC	1049
WNVI 2912r	CGATTCTGAGTCGGACATTC	
WNVI 2847f	AGAACTCGCCAACAACACCT	774
WNVI 3620r	ATCTTGGCTGTCCACCTCTT	
WNVI 3502f	CTCGTGCAGTCACAAGTGAA	957
WNVI 4458r	ATCAAGCCGCACATCAACTC	
WNVI 4524f	GGTCTGTCTCGCGATTAGTG	500
WNVI 5023r	GTGAGCCTGATGTTCCAGTG	
WNVI 5300f	CTGAGATGGCTGAAGCACTG	858
WNVI 6157r	TCTCACGCTCTGGTTGGTAG	
WNVI 5303f	AGATGGCTGAAGCACTGAGA	162
WNVI 5464r	CCATCACGAACAGGTTGTAG	
WNVI 6009f	GTCGCAAGTTGGTGATGAGT	228
WNVI 6236r	TCTGCAGTCCTCAACAGTTC	
WNVI 6119f	ACGGACTGATCGCTCAATTC	1151
WNVI 7269r	AAGGAGTGTTGCCGCTGTTA	
WNVI 7177f	TTCGTCGATGTTGGAGTGTC	993
WNVI 8169r	CCGAATCGTCCTATGCTCTT	
WNVI 8112f	TTGTGACATCGGAGAGTCCT	1068
WNVI 9179r	AGCCAGTGGTCTTCATTGAG	
WNVI 8950f	GCCAGAGAAGCAGTTGAAGA	305
WNVI 9254r	CCAACCTCACGCAGGATGTA	
WNVI 9134f	TTCTGGAGTTCGAGGCTCTG	1186
WNVI 10319r	CCGATGATTGCTCTGACTTG	
WNVI 9445f	GGAAGAACCGTCATGGATGT	466
WNVI 9910r	GAGCTCTGCCTACCAATTCA	
WNVI 10524f	CGCCACCGGAAGTTGAGTAG	501
WNVI 11024r	CTGTGTTCTCGCACCACCAG	

^a *dőlt betűvel szedett*: degenerált, JEV-szerokomplex-specifikus primerek (ld. 2. táblázat)

WNV: WNV-specifikus primerek. A számok a primerek 5' végi nukleotidjának pozíciójára utalnak a WNV NY

2000-crow3356 vírustörzs (GenBank azonosító: AF404756) alapján.

f: genomikus (forward) primer; r: komplementer (reverse) primer

4. táblázat: A kettes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzsek teljes genomszekvenciáinak felerősítésére és szekvenálására használt oligonukleotid primerek

Név ^a	Szekvencia (5' – 3')	A termék mérete (bázispár)
WNVII 1f	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGC	200
WNVII 200r	AGCATAGCCCTCTTCAGTCC	
WNVII 81f	TGGCACGAAGATCTCGATGT	874
WNVII 954r	TGCCACCAGGAGCAATAGAA	
WNVII 870f	CCTCGTTGCAGCTGTCATTG	761
WNVII 1630r	TCCATGGCAGGTTTCAGATCC	
WNVII 1584f	CTTCCTGGTTCACCGAGAAT	908
WNVII 2491r	CTTGCCTGCCAATGTCAATG	
<i>Usu 2328f</i>	CTCTTTGGRGGRATGTCHTG	818
<i>Usu 3145r</i>	GTGCADGATTTKACYTCTCC	
WNVII 3027f	CAACATGGCTGTGCATAGTG	673
WNVII 3699r	GCCGACGAGAATGACATATC	
<i>Usu 3606f</i>	AAGAGGTGGACGGCCARRHT	1152
<i>Usu 4759r</i>	GTGTGCCAYAGYGTGTGGAA	
WNVII 3861f	GGCTTACTATGACGCCAAGA	594
WNVII 4454r	CCATCATCATCCAGCCTAAC	
<i>Usu 4251f</i>	ATGTTYGCCATYGTWGGDGG	1142
<i>Usu 5392r</i>	TGGCACATSACATCMACKAT	
WNVII 5294f	TTGCTGCTGAGATGTCTGAG	324
WNVII 5617r	TGTCCGAGATAGGAGCATTG	
<i>Usu 5454f</i>	ATGGATGAAGCYCATTTTAC	337
<i>Usu 5790r</i>	GGTAYTCYGTMTCATAGGAC	
WNVII 5629f	GCCTGGAACACTGGATATGA	616
WNVII 6245r	TAAGCGAGCCAGACTGGTAA	
WNVII 6127f	TATCAGCCTGAGCGCGAGAA	932
WNVII 7058r	ACGGCTGTCGTTACGGCATA	
WNVII 6935f	ATGACATTGGCAGCCTGTTG	672
WNVII 7606r	ATCCTCCTCGCATGATGTGA	
WNVII 7505f	GAGAGGCTGGAATTCTGACT	653
WNVII 8158r	GTTCTTCTACCTCGGCACTT	
WNV 8078f	CATCAGAAGCGAGCGACACA	744
WNV 8821r	ACAGCCAGTTCGTGGTCTCA	
WNV 8723f	TCGGTCAACAACGAGTGTTT	739
WNV 9461r	GAGATGACGTCCATCACAGT	
WNV 9368f	TAGCGCGGTCCATCATCGAG	733
WNV 10100r	CCAACGTTTCGACCGGAGTCT	
WNVII 10023f	CTGTTCCGCTGTGCCTGTCA	519
WNVII 10541r	CGTGGATCACCTCGCAGCTT	
<i>WNV 9031f</i>	TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA	1061
<i>WNV 10091r</i>	AGCATGTCTTCYGTBGTTCATCCAYT	
WNV 10460f	GCCACCGGAAGTTGAGTAGA	430
WNV 10889r	GCTGGTTGTGCAGAGCAGAA	
<i>Usu 10596f</i>	GWAAGCCTCYCAGAACCGTCTCGGAAG	419
<i>Usu 11014r</i>	AGATCCTGTGKTCTWSYYCMCCAYCAG	

^a *dőlt betűvel szedett*: degenerált, JEV-szerokomplex-specifikus primerek (ld. 2. táblázat)

WNV: WNV-specifikus primerek. A számok a primerek 5' végi nukleotidjának pozíciójára utalnak a WNV B956 vírustörzs (GenBank azonosító: NC_001563) alapján.

f: genomikus (forward) primer; r: komplementer (reverse) primer

5. táblázat: A hármas genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzsek teljes genomszekvenciáinak felerősítésére és szekvenálására használt oligonukleotid primerek

Név ^a	Szekvencia (5' – 3')	A termék mérete (bázispár)
<i>Usu1f</i>	AGWMGTTYRYCTGCGTGARC	386
Rab386r	CTACTGATGGCGTTGGTGAG	
WNV82f	GGCACGAAGATCTCGATGTC	683
Rab764r	CCATGAGTCTGAACCGTAAG	
<i>Usu603f</i>	TGTGAKGAYACYATCACKTA	1112
<i>Usu1714r</i>	GTGGCRTGHGSYTCTTCAAA	
Rab1560f	GTCAGTTGGCTCCAAGTCAT	836
Rab2401r	GTGCAATGGACTTGTCTCTG	
<i>Usu2328f</i>	CTCTTTGGRGGRATGTCHTG	818
<i>Usu3145r</i>	GTGCADGATTTKACYTCTCC	
Rab3037f	GTGCATAGCGACCTGTCTTA	691
Rab3728r	CACCTGAGTTGGCTTCCATA	
<i>Usu3606f</i>	AAGAGGTGGACGGCCARRHT	1166
<i>Usu4759r</i>	GTGTGCCAYAGYGTGTGGAA	
<i>Usu4251f</i>	ATGTTYGCCATYGTWGGDGG	1142
<i>Usu5392r</i>	TGGCACATSACATCMACKAT	
Rab5283f	AGCTGCAGAGATGGCAGATG	704
Rab5919r	CGTCCTTCTCCTTCAGTGAT	
Rab5416f	CCACAGAGTTCCGAACACTACA	1331
Rab6748r	CAGCCATCCAACAGAAGAAC	
<i>Usu6585f</i>	ATGGCTCTYGARGARCTRCC	764
<i>Usu7357r</i>	TTCATKATDCCAGCVGCTGT	
Rab6851f	CTGGCGGTGTTCTTAATATG	555
Rab7405r	GATTGGAGTCGTGCGTTCTA	
Rab7290f	GATGGCAAGCTGAAGCTATG	856
WNV8144r	TCTTCTACCTCGGCACTTGA	
Rab8058f	ATGTGTTCTACCGGACCTCA	1110
Rab9181r	CAAGCCAGTGGTCTTCATTC	
WNV8723f	TCGGTCAACAACGAGTGTTT	739
WNV9461r	GAGATGACGTCCATCACAGT	
WNV9368f	TAGCGCGGTCCATCATCGAG	818
Rab10100r	CCAACGTTTCGACCGGAGTCT	
Rab9480f	AGCGGACAAGTGGTAACCTA	828
Rab10307r	GATTATCGAACGGACCTGAC	
WNV10090f	GARTGGATGACVACRGAAGACATGCT	740
WNV10807r	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTT	
<i>Usu10596f</i>	GWAAGCCTCYCAGAACCGTCTCGGAAG	427
<i>Usu11014r</i>	AGATCCTGTGKTCTWSYYCMCCAYCAG	

^a *dőlt betűvel szedett*: degenerált, JEV-szerokomplex-specifikus primerek (ld. 2. táblázat)

WNV: WNV lineage 1 és lineage 2 -specifikus primerek (ld. 3. és 4. táblázat).

f: genomikus (forward) primer; r: komplementer (reverse) primer

A primereket a Primer Designer 4.0 (Scientific and Educational Central) program segítségével terveztük és különböző szolgáltatóktól (Sigma-Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok; Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium, Microsynth AG, Balgach, Svájc, stb.) szereztük be. Az RT-PCR reverz transzkripció lépését (50°C, 30 perc) 94°C-on 15 perc inkubáció követte a reverz transzkriptáz enzim inaktiválása és a HotStarTaq DNS polimeráz aktiválása céljából. A cDNS amplifikációja 94°C, 40 másodperc denaturáció, 57°C, 50 másodperc primertapadás és 72°C, 1 perc láncszintézis lépésekkel, 40 ismétléssel történt. A reakciókat 72°C, 7 perc végső szálszintézis lépés zárta le, amelyet követően az elegyeket a készülék leállításaig 4°C-on tárolta. A reakciókban pozitív kontrollként szövettenyészetten elszaporított vírustörzsekből kivont RNS-t, negatív kontrollként vizet használtunk. Az amplifikációs termékek kimutatására 5 µl terméket 1 µl 6× töménységű felvivőpufferrel (Promega) összekeverve, 1,4%-os agaróz-gélben elektroforetizáltuk, 8 V/gélcm feszültség mellett, 70 percig. A termékek hozzávetőleges méretét molekulatömeg marker (100 bp Ladder, Promega) segítségével határoztuk meg. A nukleinsavat etídium bromid vagy azzal ekvivalens DNS festék (Greensafe, NZYTech, Lisszabon, Portugália) segítségével festettük meg és UV fényben, 312 nm hullámhosszon vizsgáltuk. Az eredményeket elektronikusan dokumentáltuk és tároltuk (Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System, Kodak, Rochester, USA).

Nagyszámú minta vizsgálata, illetve a mintákban jelen levő WNV vagy USUV nukleinsav mennyiségi meghatározása céljából TaqMan módszerre alapuló valós idejű (real-time) RT-PCR rendszereket dolgozunk ki. A 2004-ben Magyarországon felbukkant, kettes genetikai vonalú WNV törzs teljes genomszekvenciája (GenBank azonosító: DQ116961) alapján tervezett primerek (WNV 5009f, GAACGTCAGGTTCCCCCATT) és (WNV 5103r, GGCGCTTATGTATGAACCATTAGG) 95 nukleotid hosszúságú genomszakaszt erősítenek fel a NS3 fehérje gén területén. A TaqMan probe (WNV 5050p, FAM-ATTGGATTGTATGGGAACGGCGTCATC-TAMRA) a termékre tapad és a reakció során hidrolizálódik. A rendszert a későbbiekben annyival módosítottuk, hogy TAMRA helyett Black Hole Quencher molekulát használtunk. A primereket és a probe-ot az AbiPrism Primer Express 2.0.0 software (Applied Biosystems, USA) segítségével terveztük. SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System kitet (Invitrogen, USA) használtunk a reakciók során, a gyártó utasításai szerint. A reakcióelegyek 5 pmol genomikus és reverz primert, valamint TaqMan probe-ot tartalmaztak. Az amplifikációt Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System készülékben végeztük. Minden mintát kétszer mértünk fel a lemezre. A reakció hőprogramja: reverz transzkripció: 48°C, 15 perc, reverz transzkriptáz denaturáció és Taq polimeráz aktiváció: 95°C, 2 perc, [denaturáció: 95°C, 15 másodperc és primertapadás+láncszintézis: 60°C, 30 másodperc] 45 ismétléssel. A fluoreszcenciát az elongációs lépés alatt mértük. A nukleinsav mennyiségét abszolút kvantifikációs módban határoztuk meg, az 578/10 WNV törzsből tisztított RNS 1:10 arányú hígítási sorához viszonyítva. Az USUV nukleinsavának kimutatására kifejlesztett TaqMan real-time RT-PCR próbában a genomikus (5'- GCCAATGCCCTGCACTTT -3') és komplementer (5'-

TCCCGAGGAGGGTTTCCA -3') primerek az NS5 fehérje gén területén erősítik fel a 9721 és 9795 nukleotid pozíció közötti területet (GenBank azonosító NC_006551). A TaqMan probe (FAM- 5'-CGATGTCCAAGGTCAGAAAAGACGTGC-3'-TAMRA) a 9746 és 9773 közötti nukleinsav szekvenciával hibridizál. A reakciókat ebben az esetben is SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System kittel végeztük; a reakcióelegy 0,2 μ M koncentrációban tartalmazta a primereket és a probe-ot. Az alkalmazott hőprogram: 48°C, 15 perc; 95°C, 2 perc; 45× [95°C, 15 másodperc; 60°C, 30 másodperc]. Ezt a módszert használtuk szűnyogminták vizsgálatára is, mivel a fent leírt, konvencionális RT-PCR módszerrel aspecifikus termékek képződését tapasztaltuk; valamint kórszövettani mintákból a vírusRNS kimutatására, mivel azokban a formalinos fixálás hatására a nukleinsav töredezhette, így a nagyobb méretű termékeket amplifikáló diagnosztikai PCR rendszerek nem mindig voltak megbízhatóan használhatók.

2.4. Nukleinsav szekvencia meghatározás és filogenetikai elemzés

Az RT-PCR segítségével felerősített vírusgenom-szakaszok szekvenciáit a Sanger-féle, szálépítésre alapuló szekvenálási eljárással határoztuk meg. Amennyiben csak egyféle termék képződött az amplifikáció során, a szekvenáló reakciót megelőzően Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns (Bio-Rad, Hercules, USA) kit segítségével tisztítottuk az amplikont. Ha több terméket is megfigyeltünk az agarózgél-elektroforézis során, akkor a megfelelő méretű terméket szikével kivágtuk és QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével kitisztítottuk a gélből. A fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi nukleotidok beépítésére szekvenáló reakciókat hajtottunk végre mindkét irányban a PCR termékeken. A szekvenáló reakcióhoz az AmpliTaq DNS polimeráz tartalmú ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kitet (Applied Biosystems, USA) használtuk a gyártó utasításai szerint. A szekvenáló PCR során 30 ciklusban ismételtük a következő lépéseket: 96°C, 30 másodperc (denaturáció), 50°C, 10 másodperc (primer tapadás) és 60°C, 4 perc (DNS szintézis). A reakciót követően a be nem épült, fluoreszcensen jelölt nukleotidokat a DyeEX 2.0 Spin Kit (Qiagen) segítségével távolítottuk el. Röviddel az elektroforézis előtt a reakcióelegyeket 100°C-os vízfürdőbe helyeztük 2 percre, majd jégen lehűtöttük. A szekvenciák leolvasásához ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) automata szekvenáló készüléket használtunk. Nagyobb számú PCR termék szekvenciáinak meghatározásához szekvenáló szolgáltatást is igényben vettünk (Microsynth, Balgach, Svájc).

A nukleotid szekvenciák azonosítása céljából a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) szekvencia összehasonlító program segítségével összevetettük azokat a génbanki adatbázisokban elhelyezett szekvenciákkal. A szekvenciákat egymáshoz illesztettük az Align Plus 4 for Windows 95 (Scientific and Educational Software, version 4.00) és a ClustalX Multiple Sequence Alignment (version 1.81) programok segítségével. A törzsfá-rekonstrukciós vizsgálatokhoz általában a neighbor-joining statisztikai algoritmust (Saitou és Nei, 1987) használtuk a

MEGA6 (Tamura és mtsai., 2013) program segítségével. A törzsfa stabilitásának vizsgálatára bootstrap újramintázási vizsgálatokat végeztünk 1000-szer ismételt törzsfa-számítással. A törzsfákat a TreeView (Win32) program 1.6.6-os verziója segítségével ábráztuk.

2.5. Vírusizolálás

A nyugat nílusi vírus és az Usutu vírus izolálására és mesterséges elszaporítására az egyes kísérletekben különböző módszereket használtunk, olykor egymással párhuzamosan. Kísérleti állattoltásos izoláláshoz leggyakrabban újszülött egereket használtunk. A vírustartalmú mintákból 1:10 arányú PBS hígítással készített homogenizátumokat baktérium-mentesítő centrifugálás ($1500 \times g$, 10 perc) és szűrés (220 nm pórusátmérőjű szűrő) után 0,4% szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin, BSA) és antibiotikumokkal egészítettük ki. Két napos, ismert kórokozótól mentes (specified pathogen free, SPF) ICR egereket intracranialisan oltottunk 20 μ l mintával. Az egereket naponta kétszer vizsgáltuk klinikai tünetek kialakulása szempontjából. A súlyos idegrendszeri tüneteket mutató egereken euthanasiát hajtottunk végre (isofluran altatást követő cervicalis dislocatio). A leölt vagy elhullott egerek agyvelő szövetéből a fent leírtak szerint homogenizátumot készítettünk és azt vagy tovább passzáltuk (egérben vagy szövettenyészetben) vagy felhasználtuk a vizsgálatok céljaira (genetikai jellemzések). A baktérium-mentességet hús-pepton és thioglikolát tartalmú táptalajra oltást követően, 37°C-os inkubációval ellenőriztük (Bakonyi és mtsai., 2005a; Hubálek és mtsai., 2010, Rudolf és mtsai., 2014). Embrionált tyúktojásban történő vírusszaporításhoz SPF állományból származó (VALO, Lohmann, Cuxhaven, Németország), 10 napos keltetési idejű tyúktojásokat, valamint köztenyésztésből származó, 8-10 napos keltetési idejű lúdtojásokat használtunk. A tojáshéj fertőtlenítését követően az allantoisüregekbe 500 μ l inokulumot juttattunk steril injekciós tű és fecskendő segítségével. A méshéj steril zárását követően a tojásokat 37,5 °C hőmérsékleten tovább keltettük és naponta lámpázással vizsgáltuk. Az embriók elpusztulásakor vagy az oltást követő negyedik napon a tojásokat 4°C-ra hűtöttük, majd felboncoltuk. Az allantoisz folyadékot összegyűjtöttük. Az esetek egy részében az embriókat 4%-os pufferolt paraformaldehid oldatban fixáltuk, a későbbiekben pedig zsigeri szerveiket kórszövettani és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk (Bakonyi és mtsai., 2005b). A vírusok *in vitro* szaporításához elsősorban afrikai zöld majom (*Cercopithecus aethiops*) vese (Vero E6), és sertés vese (PK-15) eredetű permanens sejtvonalakat, valamint lúd embrió fibroblaszt primaer szövettenyészet sejtjeit használtuk. Az USUV sejt spektrumának megismerése érdekében emberi méhnyakrák hám (HeLa), ló bőrhám (ED), szarvasmarha vese (MDBK), nyúl vese (RK-13), kutya vese (MDCK, DK), macska vese (CRFK), aranyhőrcsög vese (BHK-21, BF), patkány glioma (C6), karolinai dobozteknős (*Terrapene carolina*) szív (TH1) eredetű sejtvonalakat, valamint csikó vese és csirke embrió fibroblaszt primaer szövettenyészeteket is felhasználtunk (Bakonyi és mtsai., 2005b). A sejteket általában 10% főtális borjúsavó (FCS), L-glutamin és antibiotikum tartalmú tápfolyadékban (Earle's minimal essential medium [E-MEM], Gibco - Thermo Fischer Scientifics, Waltham, USA) szaporítottuk 37°C-on, 5%

parciális CO₂ nyomású légkörben. Rendszerint egy napos, 70-100%-os fedettségű szövettényészeteket fertőztünk a vírustartalmú mintákkal, adszorpciós technikával (Kecskeméti és mtsai., 2007, Bakonyi és mtsai., 2007). A tápfolyadékot eltávolítottuk a szövettényészetekről, inokulummal fedtük a sejteket és 30-60 percig inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően az inokulumot tápfolyadékkal lemostuk, majd 2% FCS tartalmú tápfolyadékkal fedtük a sejteket és tovább inkubáltuk őket (37°C, 5% CO₂). A sejttényészeteket inverz fénymikroszkóp segítségével naponta vizsgáltuk sejtkárosító hatások megjelenésére. A CPE azonosítását fertőzetlen kontroll sejttényészetekkel összehasonlítva végeztük. Amennyiben CPE-t figyeltünk meg, a vizsgálat célja függvényében jártunk el. Infektív titer meghatározásakor a CPE-t mutató sejttényészeteket feljegyeztük; vírusizolálási vagy vírusszaporítási cél esetében a 70-100 %-os CPE-t mutató szövettényészetek sejtjeit steril eszközzel eltávolítottuk a tenyésztőedény faláról, rázó-keveréssel homogenizáltuk és további felhasználásig -80°C hőmérsékleten tároltuk. Ha nem tapasztaltunk sejtkárosító hatást, akkor az inkubáció 4-5. napján a szövettényészetet a fenti módon eltávolítottuk a tenyésztőedényből, majd a sejtek egyszeri fagyasztásos-olvasztásos feltárását és ülepitő centrifugálását követően a felülúszóból új sejttényészetre oltottunk (vakpasszázs). A sejspektrum meghatározására irányuló vizsgálatok során a sejttényészeteket üveg tárgylemez (chamber slide) felületén szaporítottuk, majd a vírushordozó sejttényészeteket -20°C-os acetonnal fixáltuk. A sejteket hematoxin-eosin festést követően fénymikroszkóppal vizsgáltuk további sejtkárosító hatások (pl. zárványok) jelenlétére, valamint immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk a vírusantigének kimutatására (Bakonyi és mtsai., 2005b).

2.6. Állatkísérletek

Az előző fejezetben említett, kísérleti állatoltásos vírusizolálási eljárásokon túl, az Usutu vírus biológiai tulajdonságainak pontosabb megismerése érdekében emlős (egér) és madár (házityúk, házilúd) modellben vizsgáltuk a vírus szaporodó képességét és patogenitását. Az egérkísérletekhez egy hetes életkorú, SPF státuszú, NMRI vonalhoz tartozó egereket (Charles River Magyarország Kft., Budapest) használtunk. Az állatokat a SzIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének állatházában tartottuk, a hatályos állatkísérleti és állatvédelmi előírások betartásával (MÁB engedély szám: 70/2003). A fertőzéshez az USUV 939/01 törzset használtuk. Ezt a vírustörzset 2001-ben izolálták Vero sejtvonalon Bécsben gyűjtött, elhullott feketeterítő (*Turdus merula*) agyszövetéből. Az előkísérletek során egy- és kéthetes, valamint három hónapos egereket oltottunk 100, 1.000 és 10.000 TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50%) mennyiségű vírussal hasüregbe (*intraperitoneal*, *i.p.*), 100 µl térfogatú inokulummal, illetve agyba (*intracranial*, *i.c.*), 250 TCID₅₀ mennyiségű vírussal 25 µl térfogatú inokulummal. Az oltóvírus maradékát a fertőzés után Vero sejttényészetten titrálassal ellenőriztük. A főkísérletben az egereket 100 µl tápfolyadékban elkevert 1.000 TCID₅₀ mennyiségű vírussal fertőztük, *i.p.*. A kontroll egereket 100 µl vírusmentes tápfolyadékkal oltottuk. Az első főkísérlet során 28 egeret fertőztünk és 14 kontroll állatot tartottunk. Az egereket a fertőzést követően naponta vizsgáltuk klinikai tünetek megjelenésére, megmértük a testtömegüket, a súlyos tüneteket

mutató állatokat CO₂ segítségével extermináltuk. Emellett naponta 2 fertőzött és 1 kontroll egeret extermináltuk a kísérlet 14 napja során. A második főkísérletben 10 állatot fertőztünk és extermináltuk a klinikai tünetek megjelenésekor, hogy a gerincvelői elváltozásokat pontosabban tudjuk vizsgálni. Az első kísérlet során exterminált egereket felboncoltuk és az agy, tüdő, szív, máj, lép, vese és vékonybél szövetekből mintát gyűjtöttünk részben kórszövettani, immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatra (4%-os pufferolt formaldehid oldatban), részben virológiai vizsgálatokra. A virológiai vizsgálatokhoz gyűjtött mintáknál állatonként és szervenként külön, steril eszközöket használtunk és a szövetmintákat feldolgozásig -80°C hőmérsékleten tároltuk. A második kísérlet során csak agy- és gerincvelő mintákat gyűjtöttünk kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokra (Weissenböck és mtsai., 2004). Az USUV patogenitását a háziszármazások közül tyúkban és lúdban vizsgáltuk a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetemen (Chvala és mtsai., 2005; Chvala és mtsai., 2006). A tyúk fertőzési kísérlethez (állatkísérleti engedély szám: 68.205/100-BrGt/2002) két hetes korú, SPF státuszú csirkék (VALO; Lohmann, Cuxhaven, Németország) 18 egyedét használtuk fel. Tíz csirkét intravénás úton (*i.v.*) fertőztünk 10³ TCID₅₀ mennyiségű USUV 939/01 törzsszel, 100 µl inoculomban. A fertőzött madarakat és három fertőzetlen csirkét (kontakt kontroll) izolált állatszubában együtt tartottuk. További öt, nem fertőzött kontroll csirkét egy másik helyiségben neveltünk. A madarakat naponta klinikai vizsgálatnak vetettük alá a fertőzést követő 14 napig, valamint a fertőzött és kontakt-kontroll egyedekből kloáka és garat-tamponmintákat gyűjtöttünk az 1., 2., 3., 4., 5., 7. 10. és 14. napon. Vérmintákat gyűjtöttünk a fertőzött és kontakt-kontroll egyedekből az 1., 3., 5., 7., 10. és 14. napon. A 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 leölt állatokat felboncoltuk, kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá és szövetmintákat gyűjtöttünk az agyból, szívből, tüdőből, májból, lépből, veséből, vékonybélből, mirigyes- és zúzógyomorból, valamint a hasnyálmirigyből. A mintákat részben 7%-os pufferolt formalinban fixáltuk szövettani vizsgálatokra, részben -80°C-on tároltuk virológiai vizsgálatokra. A lúd fertőzési kísérletet (állatkísérleti engedély száma: 68.205/128-BrGT/2004) köztenyésztésből származó kislibákon végeztük. A származási állományban a tenyészállatokat megvizsgáltuk flavivírusok elleni ellenanyagok jelenlétére és negatívnak találtuk őket. Napos korú libák húsz egyedét elkülönített (BSL-2 biztonsági szintű) helyiségekben neveltünk. Tizennégy napos korban 11 libát fertőztünk 5×10⁴ TCID₅₀ mennyiségű USUV 939/01 törzsszel, mellizomba oltva (intramuscular, *i.m.*), 500 µl inoculommal. A fertőzött állatokat együtt neveltük öt kontakt-kontroll libával. További négy nem fertőzött madarat külön helyiségben neveltünk. A fertőzést követően a madarakat naponta klinikai vizsgálatnak vetettük alá. Vérmintákat gyűjtöttünk a 3., 5. és 10. napon; kloáka és garat tamponmintákat pedig a 3., 5., 8., és 10. napon. Három fertőzött és két kontroll libát leöltünk az 5. napon; három fertőzött, két kontroll és két kontakt kontroll-libát pedig leöltünk a 10. napon. A kísérletet a 22. napon zártuk le a megmaradó madarak elvéreztetésével. A viraemia és az ellenanyagok megjelenésének vizsgálatára 500 µl alvadásban gátolt vért gyűjtöttünk minden madár szárnyvénájából a fent említett időpontokban. A vérek ülepitő centrifugálását (6.700 ×

g gyorsuláson, 5 perc) követően a plazmákat összegyűjtöttük és -80°C -on tároltuk. Az elpusztult vagy leölt madarakat kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá és mintákat gyűjtöttünk az agy, szív, máj, lép, vese, tüdő, vékonybél, hasnyálmirigy, Fabrícus-féle bursa és csecsemőmirigy szöveteiből valamint a szemekből. A mintákat a fent leírtak szerint, mind kórszövettani, mind virológiai vizsgálatokra alkalmas körülmények között tároltuk. Véletlenszerűen kiválasztott nyolc liba szervmintáiból bakteriológiai vizsgálatokat is végeztünk.

A nyugat-nílusi vírussal végzett állatkísérleteink (vakcina-hatékonysági kísérlet lovakban, Minke és mtsai., 2011; patogenitás vizsgálata házigalambban, Forgách és mtsai., 2015; virulencia markerek vizsgálata egérmodellben; Szentpáli-Gavallér és mtsai., 2016) nem képezik jelen dolgozat alapját, ezért az alkalmazott módszerek részletes ismertetésére nem kerül sor.

2.7. Szerológiai vizsgálatok

A nyugat nílusi vírus és az Usutu vírus elleni ellenanyagok kimutatására többféle módszert is alkalmaztunk. Kutatásaink kezdetén a szakirodalomban nem állt rendelkezésre USUV-fertőzések indirekt diagnosztikájára kidolgozott módszer, ezért más flavivírusok szerodiagnosztikájában használatos módszereket adaptáltunk. Vírus-neutralizáló ellenanyagok kimutatására módosított plak-redukciós vírusneutralizációs próbát (plaque reduction neutralisation test, PRNT) alkalmaztunk (De Madrid és Porterfield, 1974; Hubálek és mtsai., 1979). A vérsavó mintákat 56°C hőmérsékleten 30 perces inkubálással inaktiváltuk, majd 1:10-es alaphígítást követően 1:2 arányú hígítási sort készítettünk belőlük, EMEM hozzáadásával. A savóhígításokból 30 μl mennyiségeket összekevertünk 30 μl , 8-10 PFU₅₀ mennyiségű USUV 939/01 törzset tartalmazó vírusszuspenzióval és 30-60 percig inkubáltuk 37°C -on. Ezt követően 60 μl , 3% főtális borjúsavót tartalmazó, EMEM tápfolyadékkal készített sejt szuszpenziót (PK-15, Vero vagy lúd embrió fibroblaszt sejtek) adtunk a savó-vírus keverékekhez és 37°C -on 4 órán át inkubáltuk őket, majd 120 μl 2% karboxi-metilcellulóz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) tartalmú tápfolyadékot adtunk a sejtenyészetekhez és 37°C -on, 5% CO₂ tartalmú légkörben inkubáltuk őket 3-4 napig. A vizsgált savómintákkal párhuzamosan fertőzetlen kontroll sejteket is szaporítottunk a tenyésztőlemezekben. A savók esetleges sejt-toxikus hatásának vizsgálatára az alaphígításokat vírus hozzáadása nélkül is inkubáltuk sejtenyészeteken. Az alkalmazott vírus mennyiségének ellenőrzésére vírustitrlást is végeztünk a lemezekben, valamint ismert ellenanyag titerű savót tartalmazó pozitív kontroll mintákat is felmértünk. A szövetenyészeteket naponta, fénymikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük. Az inkubációs idő letelte után a tápfolyadékokat eltávolítottuk és 150 μl , 0,1% Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich) oldattal megfestettük a sejteket (40 perc inkubáció). Ezt követően a festéket eltávolítottuk, a szövetenyészeteket csapvízzel, kíméletesen öblítettük és UV-fény alatt megszáritottuk őket. A próbát fénymikroszkópos vizsgálattal bíráltuk el. A titrlásnál megfigyelt PFU mennyiséghez viszonyított 50, 70 és 90%-os plakszám-csökkenést mutató hígításokat feljegyeztük (Meister és mtsai, 2008).

Az USUV haemagglutináló antigénjei ellen termelődött ellenanyagok kimutatására haemagglutináció gátlási (HAG) próbát dolgoztunk ki a Japán encephalitis vírus szerodiagnostikájában használt protokoll alapján (OIE, 2016). A haemagglutinációs próba előtt a szövettenyészeten elszaporított, USUV 939/01 vírusszuspenzióból 4% BSA tartalmú borát pufferrel (pH 9) 1:2 arányú hígítási sort készítettünk és 0,5% mosott lúd vörösvérsejt-szuszenziót adtunk a hígításokhoz. Az optimális pH-t különböző pH-jú vörösvérsejt-hígító oldatokkal határoztuk meg. A vírushígításokat haemagglutinációs mikrolemezen 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk a vörösvérsejtekkel. A vörösvérsejtek leülepedését követően elbíráltuk a haemagglutináció kialakulását az egyes hígításokban. A vírusszuspenzió 16 haemagglutináló egység vírust tartalmazott pH 6,2 kémhatású próbában. A haemagglutináció-gátlási próbákhoz a savómintákat 56°C hőmérsékleten 30 perces inkubálással inaktiváltuk. A nem specifikus haemagglutináló hatást kaolinnal és mosott lúd vörösvérsejtekkel merítettük ki. A savókból 1:2 arányú hígítási sorokat készítettünk, majd minden savóhígításhoz 8 haemagglutináló egység mennyiségű antigént adtunk. A keverékeket 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 0,5% mosott lúd vörösvérsejt szuszpenziót adtunk a savó-vírus keverékekhez. További, 30 perces inkubálást követően bíráltuk el a próbákat. A vizsgált savók haemagglutináció-gátló ellenanyag titereként azt a legnagyobb savóhígítást tekintettük, amelyiknél még nem alakult ki agglutináció (Chvala és mtsai, 2005).

A nyugat-nílusi vírus elleni szerológiai vizsgálatokhoz a kutatásaink kezdetén az Országos Epidemiológiai Központban kifejlesztett, és a rutin diagnosztikában használt, indirekt immunfluoreszcenciás próbát alkalmaztuk. Vero E6 sejteket fertőztünk a WNV (WN_{m1}, „Gresikova”) jelű, lineage 1 törzsével (Molnár, 1982) és 3 nap inkubációt követően a sejteket tripszin-EDTA oldat segítségével leválasztottuk a tenyésztőedény faláról, majd centrifugálást és mosást követően tárgylemez felületére cseppentettünk a sejtszuszenziókból és acetonnal fixáltuk. Az IgG típusú ellenanyagok kimutatásához a savókból 1:10 arányú alaphígításokat követően 1:2 arányú hígítási sorokat készítettünk és minden hígításból 30 µl-t a tárgylemezre kötött, fertőzött sejtekre mértünk. Nedves kamrában inkubáltuk a tárgylemezeket 37°C-on, 60 percig, háromszor mostuk (PBS oldattal, 5-10 percig), majd fluoreszceinnel jelölt konjugátumot (30 µl) mértünk a sejtekre. A lúdsavók vizsgálatához Dr. Drén Csaba (MTA, Állatorvos-tudományi Kutatóintézet) bocsátotta rendelkezésünkre a fluoreszceinnel jelölt, anti-lúd konjugátumot. A ló és vadmadár savók vizsgálatához a Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA), az emberi savók vizsgálatához pedig a DAKO (Golstrup, Dánia) által előállított konjugátumokat használtuk. A konjugátum hozzáadását követően a lemezeket nedves kamrában inkubáltuk 37°C-on, 30 percig, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével bíráltuk el a próbákat. Pozitívnak értékeltük azokat a savóhígításokat, ahol a vírusszfertőzött sejtek citoplazmájában gócszerű, fluoreszcens fénylést lehetett látni, ami eltért a negatív savóval kezelt, fertőzött kontroll sejtekben esetlegesen megfigyelhetőtől. Az IgM típusú ellenanyagok kimutatására a savómintákat ioncserélő kromatográfiás módszerrel tisztítottuk (Nagy és Mezey, 1977),

1:10 és 1:20 arányú hígításokat 3 óráig inkubáltuk a fertőzött sejteken, majd a fent leírt lépésekkel folytattuk az indirekt immunfluoreszcenciás próbát (Kutasi és mtsai., 2011; Bakonyi és mtsai., 2013). A WNV elleni ellenanyagok kimutatására haemagglutináció gátlási próbát is alkalmaztunk, Clarke és Casals (1958) leírása alapján. A nyugat-nílusi vírus elterjedtségének szerológiai alapú felméréséhez a leggyakrabban ELISA módszert használtunk. Mivel a savómintákat különböző állatfajokból (vadmadarak, baromfi-fajok, lovak, kutyák) gyűjtöttük, a kompetitív ELISA rendszerek használata volt a legcélszerűbb, mivel azok bármilyen gazdafajból származó savóminta vizsgálatára alkalmasak. A kutatások során az ID-Screen West Nile Competition Multi-Species Kit (ID.Vet, Grabels, Franciaország), és az Ingezim WNV Compac assay (Inmunología y Genética Aplicada, SA, Madrid, Spanyolország) által gyártott kiteket használtuk. Heveny idegrendszeri tüneteket mutató lovakból vett vérmintákban IgM típusú ellenanyagok kimutatására az ID-Screen West Nile IgM Capture (ID.Vet) ELISA kiteket alkalmaztuk. A neutralizáló ellenanyagok kimutatására a fent leírt, PRNT próbát használtuk (Meister és mtsai., 2007). A WNV lineage 1 prototípus törzsét (Eg-101) sertés embrió vese (SPEV) sejtvonalon, a hazai izolálású, lineage 2 vírustörzset (578/10) Vero E6 sejtvonalon szaporítottuk el. A savómintákból 1:10 arányú alaphígításokat, majd 1:2 arányú hígítási sort készítettünk. A sejteket 4-5 napig inkubáltuk a savóhígításokat, vírust és karboxi-metilcellulóz tartalmazó tápoldattal. A titereket 50, 80 és 90%-os gátlási szinteken határoztuk meg.

3. Eredmények

3.1. Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei

3.1.1. Az Usutu vírus genetikai tulajdonságai

Az USUV ausztriai felbukkanása idején a vírus genetikai tulajdonságairól csak nagyon korlátozott adatok álltak rendelkezésre. A *Flavivirus* genus egyes tagjainak filogenetikai összehasonlításához meghatározták többek között az USUV dél-afrikai prototípus törzsének (SA Ar 1776) részeges genom szekvenciáját (1035 nt, NS5 – 3'UTR, génbanki azonosító: AF013412; Kuno és mtsai., 1998). A kutatásunk egyik célja a vírus prototípus törzsének és ausztriai izolátumának teljes genomszekvencia meghatározása és elemzése volt. A 2. táblázatban ismertetett primerek segítségével átfedő amplifikációs termékeket szintetizáltattunk az ausztriai (939/01, Vienna 2001-blackbird) és a dél-afrikai (SA Ar 1776) vírustörzsek nukleinsavából RT-PCR segítségével, majd a termékek nukleotid sorrendjét direkt szekvenálás segítségével meghatároztuk és a szekvenciák illesztését követően egybefüggő (konszenzus) szekvenciákat alakítottunk ki. A 939/01 törzs esetén 11066 nt, a SA Ar 1776 törzsnél pedig 11064 nt hosszúságú genomszakasz szekvenciáját határoztuk meg. A szekvenciák elemzése során egy feltételezett nyitott leolvasási keretet azonosítottunk a 97. és 10401. nukleotid pozíció között. Meghatároztuk a 3434 aa hosszúságú poliprotein prekursor származtatott aminosav szekvenciáját, és illesztettük azt a JEV szerokomplex egyes képviselőinek (WNV, MVEV és JEV) származtatott aminosav szekvenciáival az egyes fehérjék, konzervált szerkezeti elemek és feltételezett enzim motívumok helyeződésének azonosítása céljából. A szekvencia hasonlóságok alapján a vírusfehérjék génjeinek sorrendjét, helyeződését, valamint a fehérjék méretét és helyeződését az 5. táblázat szemlélteti.

Az USUV és rokon flavivírusok származtatott aminosav szekvenciáinak pozícionális illesztése segítségével homológ szakaszokat azonosítottunk a rokon vírusok már ismert, konzervált szekvencia motívumaival. A flavivírusok burokfehérjéjében előforduló 12 cisztein reziduum (aa pozíciók: 3, 30, 60, 74, 92, 105, 116, 121, 190, 287, 304 és 335), az integrin kötőhely (Arg₃₈₇-Gly₃₈₈-Asp₃₈₉), a vírus receptorfehérje sejtfelszíni szulfatált proteoglikánokhoz kötődésében részt vevő, Glu₃₀₆ és Asp₃₈₉ reziduumok, megőrzöttek voltak. Hasonló módon az NS1 fehérje diszulfid-hidakat képző 12 cisztein reziduuma (aa pozíciók: 4, 15, 55, 143, 179, 223, 280, 291, 312, 313, 316 és 329); az NS3 protein, N-terminális harmadában helyeződő, tripszin-szerű szerin proteáz katalitikus triádja (His₄₇, Asp₇₅ és Ser₁₃₅) és szubsztrát kötőhelye (Gly₁₃₃, Ser₁₃₅, Gly₁₃₆, Gly₁₄₈, Leu₁₄₉ és Gly₁₅₃), a C-terminális harmadban helyeződő RNS helikáz motívum (Asp₂₈₅-Glu₂₈₆-Ala₂₈₇-His₂₈₈); valamint az NS5 fehérje C-

terminális részén található RNS-függő RNS polimeráz motívum (Gly₆₆₇-Asp₆₆₈-Asp₆₆₉) is homológiát mutatott a rokon flavivírusok szekvenciáival.

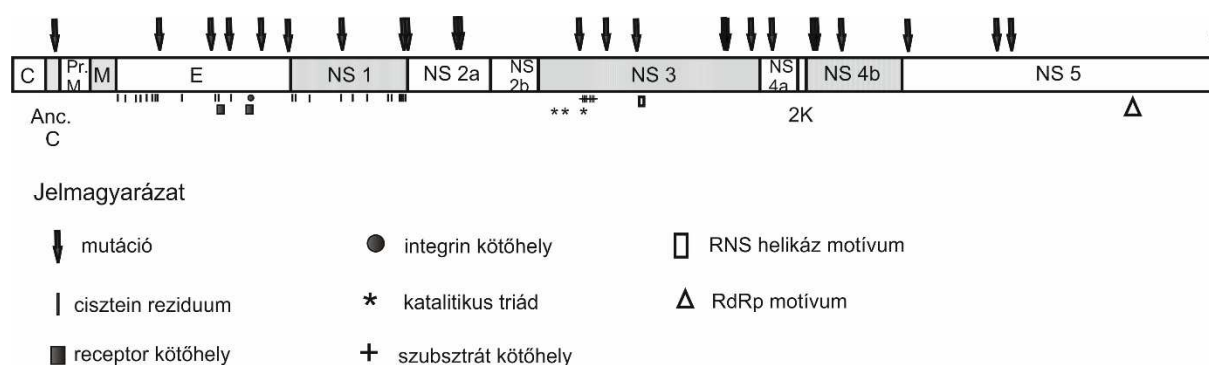
5. táblázat: Az USUV genomszerveződése

Fehérje neve	Nukleotid pozíció*	Perkurzor poliprotein pozíció**	A peptid mérete (aa)
anchored C	97-474	1-126	126
C	97-408	1-104	104
preM	475-975	127-293	167
M	751-975	219-293	75
E	976-2475	294-793	500
NS1	2476-3531	794-1145	352
NS2A	3532-4212	1146-1372	227
NS2B	4213-4605	1373-1503	131
NS3	4606-6462	1504-2122	619
NS4a	6463-6840	2123-2248	126
2k	6841-6909	2249-2271	23
NS4b	6910-7683	2272-2529	258
NS5	7684-10398	2530-3434	905

*Az NC_006551 génbanki azonosítójú nukleotid szekvencia szerint

**Az YP_164264 génbanki azonosítójú aminosav szekvencia szerint

A két USUV törzs nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása során nukleotid szubsztitúciókat azonosítottunk. A 96 nt hosszúságú 5'UTR szakaszon három eltérést találtunk (nt pozíció: 31, 32 és 38.). A nyitott leolvasási keret szekvenciái 306 nukleotidban tértek el egymástól, amelyek közül 25 eredményezett aminosav szubsztitúciót. Ezeknek az eltéréseknek az eloszlását, valamint a megőrzött motívumok helyeződését az 1. ábra és a 6. táblázat szemlélteti.



1. ábra: Az USUV két törzse aminosav szekvenciáinak eltérései és megőrzött szekvencia szakaszai

6. táblázat: Az USUV két törzse és rokon flavivírusok aminosav szekvenciáinak eltérései (A) és megőrzött szekvencia szakaszai (B)

A

régió	Anch. C	E					NS1		NS2a			NS3						NS 4a	NS4b			NS5			
aa pozíció	120	419	569	615	716	790	939	1117	1146	1267	1268	1618	1635	1779	2030	2032	2106	2166	2287	2290	2367	2530	2803	2849	3427
relatív aa pozíció	16	126	276	320	423	457	146	324	1	122	123	115	192	276	527	529	603	44	16	19	96	21	274	320	898
USUV Vienna	V	M	G	G	T	N	A	R	H	N	F	I	L	A	R	E	A	L	I	S	F	K	T	S	N
USUV SAAr	A	V	S	S	P	S	V	K	Y	D	L	V	M	V	I	Q	S	F	M	G	L	R	A	G	D
MVEV	L	A	S	.	.	.	S	T	F	E	L	.	.	V	.	.	S	.	L	K	L	.	.	.	H
JEV	.	I	S	.	.	.	E	.	F	Q	I	V	.	V	.	.	.	.	M	G	L	R	S	.	L
WNV	L	T	S	.	.	.	.	Q	Y	K	W	V	.	V	.	.	S	.	L	-	V	.	S	.	I

B

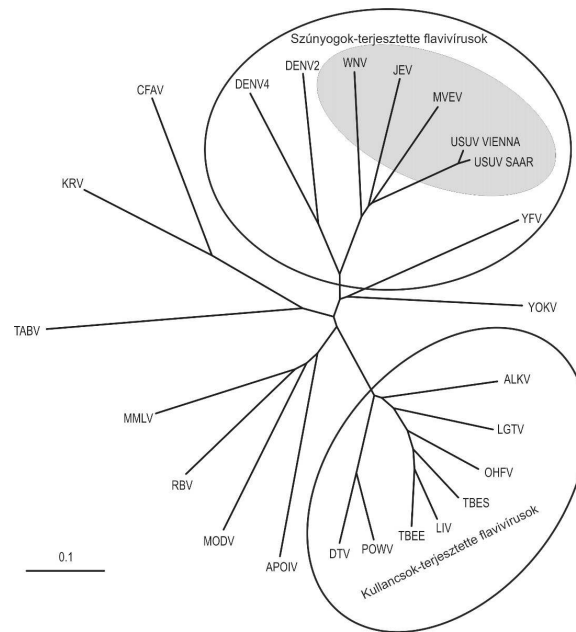
régió	E				NS3												NS5		
aa pozíció	599	680	681	682	1550	1578	1636	1638	1639	1651	1652	1654	1788	1789	1790	1791	3196	3397	3198
relatív aa pozíció	306	387	388	389	47	75	133	135	136	148	149	151	285	286	287	288	667	668	669
szekvencia	E	R	G	D	H	D	G	S	G	G	L	G	D	E	A	H	G	D	D
megőrzött motívum	integrin kötőhely				szubsztrát kötőhely								RNS helikáz motívum				RdRp motívum		
	■			■	*	*		*											

A: Az USUV Vienna (939/01) aminosav szekvenciájával homológ aminosavat pont, deléciót kötőjel jelöli.

B: ■: : szulfatált proteoglikán kötőhely; *: tripszin-szerű szerin proteáz katalitikus triádja

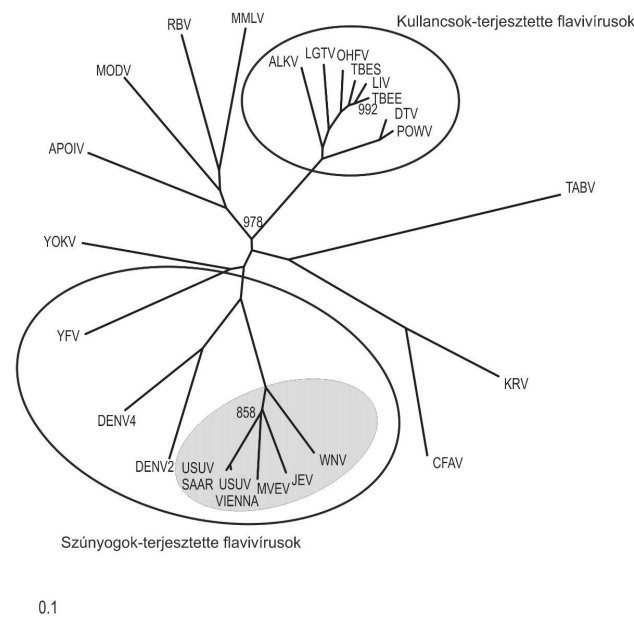
A 3'UTR régióban a két USUV törzs 21 nukleotidban tér el egymástól (6. A táblázat). A 10945. és 10951. pozíció közötti, oligo-A szakaszon az USUV 939/01 törzs genomja két nukleotiddal hosszabb. A JEV csoportra jellemző, 3' hurokstruktúrák (CS2, RCS2 és TL2) kialakításában résztvevő nukleotidok (nt pozíciók 10908 – 10929, 10830 – 10851 és 10886 – 10894) az USUV törzsekben is megtartottak voltak. A két USUV törzs aminosav szekvenciái a C, preM, M, NS2b, és 2K protein területén homológiát mutattak. Bár az anchored C régióban a JEV komplex vírusai között nagy változatosságot lehet megfigyelni, az USUV törzsek csupán egy aminosavban (Val/Ala₁₆) tértek el ezen a területen. Az E fehérje szakaszán öt eltérést lehetett azonosítani; ezek közül háromnál (Gly₃₂₀, Thr₄₂₃, és Asn₄₅₇) a 939/01 törzs homológ a MVEV, JEV és WNV szekvenciákkal, míg a Gly₂₇₆ pozícióban a SAAR törzs homológ azokkal. A Met₁₂₆ pozícióban mind az öt szekvencia eltért a többitől. Az NS1, NS2a, és NS4b régióban nyolc szubsztitúció található, melyek nagy része különbözik a többi JEV-csoportba tartozó vírustól is. Az NS3 és NS4a régiókban hét aminosavban tért el egymástól a két törzs. A JEV szerokomplex vírusainál általában változatos NS4b szakaszon két aminosav eltérést lehetett találni, míg a legnagyobb (905 aa) NS5 fehérje csekély változatosságot mutatott (5 aa szubsztitúció). A két USUV törzs nukleotid és származtatott aminosav szekvenciáit illesztettük egymáshoz, valamint a génbanki adatbázisban elhelyezett 22 flavivírus genom szekvenciához. A két USUV törzs nukleotid szekvenciái 97%-os, aminosav szekvenciái 99%-os hasonlóságot mutattak egymáshoz. A többi flavivírus közül a legnagyobb hasonlóságot a JEV szerokomplex vírusaival találtuk: MVEV 73%, JEV 71%, és WNV 68%. A legnagyobb eltérés az USUV szekvenciáktól a Tamana bat vírus (TABV, 43% hasonlóság) esetében mutatkozott. A teljes nukleotid és aminosav szekvenciák alapján neighbor-joining statisztikai módszerrel számított rokonsági viszonyokat a 2. és 3. ábrán bemutatott törzsfák ábrázolják (Bakonyi és mtsai., 2004b).

Az USUV részleges nukleotid szekvenciáját mutatták ki egy észak-kelet spanyolországi település (Viladecans, Katalónia) központjában, 2006-ban gyűjtött, *Cx. pipiens* poolból (Busquets és mtsai., 2008). A mintából (MB119/06) RT-PCR módszerrel felerősített, átfedő, USUV-specifikus nukleinsavszakaszok segítségével meghatároztuk a vírus teljes genom szekvenciáját, majd illesztettük azt a génbanki adatbázisokban hozzáférhető teljes és részleges nukleotid szekvenciákhoz és filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a rokonsági viszonyok becslésére (Bakonyi és mtsai., 2014). Hasonlóan az USUV dél-afrikai prototípus törzséhez (SA Ar 1776), a spanyolországi vírus (MB119/6) genomja 11064 nukleotidból áll és 3434 aminosav hosszúságú poliprotein prekursor kódot. A korábbi vizsgálataink során azonosított és fent részletezett, megőrzött szekvencia szakaszokat az MB119/06 törzsben is megtaláltuk, bár az NS3 fehérje RNS-helikáz motívuma (DEAH/DEAD) utolsó aminosava (H₁₇₉₁D) eltért az összes többi vizsgált USUV törzsetől.



2. ábra: Flavivírusok teljes genom nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá.

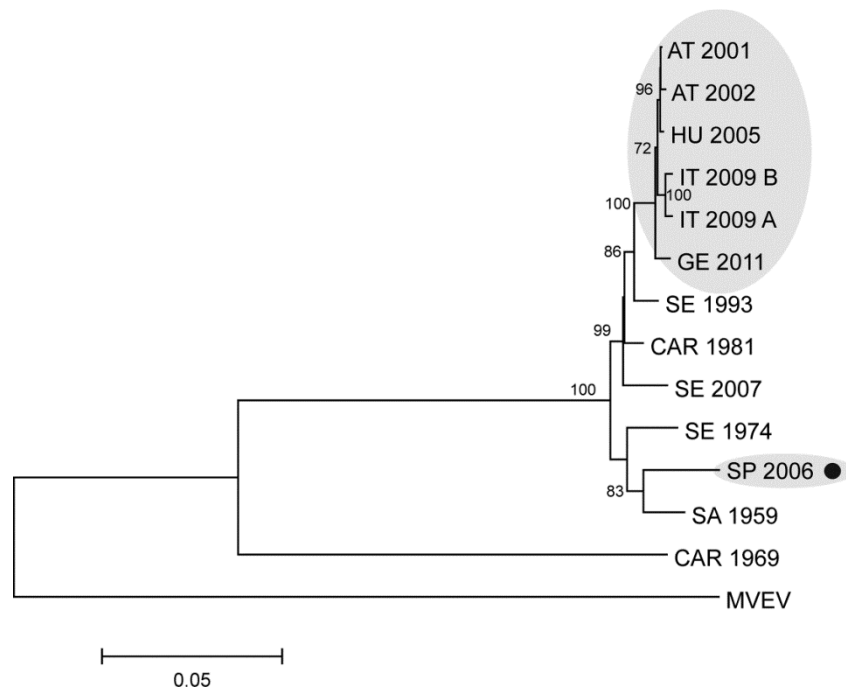
A vírusfajok rövidítéseit az 1. táblázat tartalmazza. A JEV szerokomplex vírusait szürke háttér emeli ki. A bal alsó sarokban szereplő vonal a genetikai távolságot mutatja. A bootstrap analízis mindegyik elágazásnál 1000/1000 értéket mutatott, kivéve az MVEV – USUV elágazást (970/1000).



3. ábra: Flavivírusok poliprotein prekursor származtatott aminosav szekvenciái alapján készített törzsfá.

A vírusfajok rövidítéseit az 1. táblázat tartalmazza. A JEV szerokomplex vírusait szürke háttér emeli ki. A bal alsó sarokban szereplő vonal a genetikai távolságot mutatja. Az 1000 ismétléses bootstrap analízis értékeit az elágazásoknál szereplő számok mutatják. A nem jelölt elágazásoknál a bootstrap érték 1000.

Az MB119/06 és további 12 USUV törzs teljes genomszekvenciáját, valamint további két törzs részleges nukleotid szekvenciáját (7. táblázat) összehasonlítottuk. A nukleotid hasonlóság 96,9% (SA Ar 1774, Dél-Afrikai Köztársaság, 1959) és 78,3% (ArB1803, Közép-Afrikai Köztársaság, 1969) közötti értékeket mutatott, míg a származtatott aminosav szekvenciák hasonlóságai 98,8% (939/01, Ausztria, 2001) és 94,4% (ArB1803, Közép-Afrikai Köztársaság, 1969) között voltak. A filogenetikai analízist ötféle statisztikai algoritmussal (Tamura-Nei modellre alapuló maximum likelihood módszer [ML], neighbor-joining módszer [NJ], minimum evolution módszer [ME], unweighted pair group method with arithmetic mean módszer [UPGMA] és maximum parsimony módszer [MP]) elvégeztük. A különböző statisztikai feldolgozások alapvetően hasonló szerkezetű törzsfákat eredményeztek, csupán a bootstrap értékekben voltak eltérések. Az egyik legjobb felbontású és statisztikai támogatottságú, ML módszerrel készített törzsfát az 4. ábra mutatja be.



4. ábra: Usutu vírusok teljes genom nukleotid szekvenciái alapján készített törzsfá.

Az USUV szekvenciák kódjait a 7. táblázat tartalmazza. Az Európában kimutatott vírusokat szürke háttér emeli ki. A bal alsó sarokban szereplő vonal a genetikai távolságot mutatja. Az 1000 ismétléses bootstrap analízis százalékos értékeit az elágazásoknál szereplő számok mutatják. A MVEV szekvenciája kútagként a filogram gyökerének becsléséhez szerepel a törzsfán.

7. táblázat: A filogenetikai vizsgálatokba bevont USUV szekvenciák

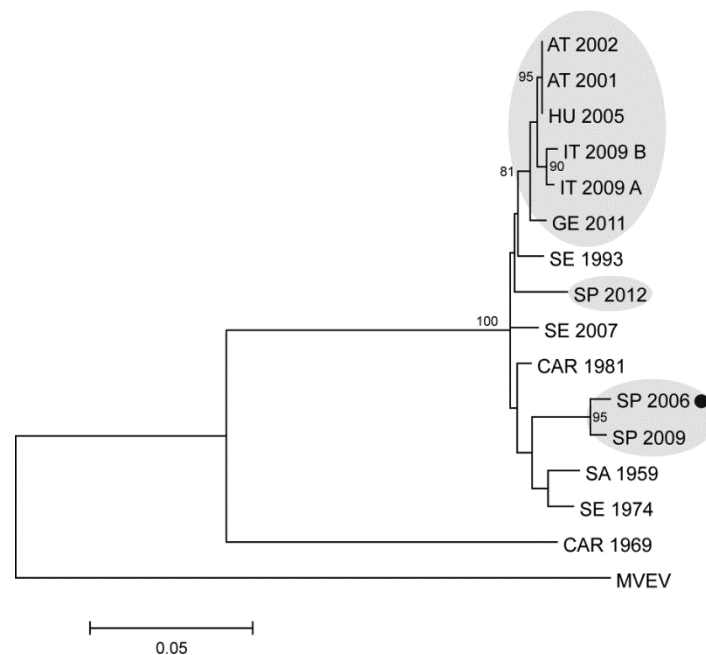
Kód	Törzs / vírus	Izolálás / kimutatás			GenBank azonosító	Hivatkozás
		helye	éve	gazda/vektor		
SA 1959	SA Ar 1776	Dél-Afrikai Köztársaság	1959	<i>Cx. neavei</i>	AY453412	Bakonyi és mtsai., 2004b
CAR 1969	ArB1803	Közép-Afrikai Köztársaság	1969	<i>Cx. perfuscus</i>	KC754958	Nikolay és mtsai., 2013
SE 1974	ArD19848	Szenegál	1974	<i>Cx. perfuscus</i>	KC754954	Nikolay és mtsai., 2013
CAR 1981	HB81P08	Közép-Afrikai Köztársaság	1981	ember	KC754955	Nikolay és mtsai., 2013
SE 1993	ArD101291	Szenegál	1993	<i>Cx. univittatus</i>	KC754956	Nikolay és mtsai., 2013
AT 2001	Vienna 2001	Ausztria	2001	feketerigó	AY453411	Bakonyi és mtsai., 2004b
AT 2002	Meise H	Ausztria	2002	kékcinke	JQ219843	Becker és mtsai., 2012
HU 2005	Budapest	Magyarország	2005	feketerigó	EF206350	Bakonyi és mtsai., 2007
SP 2006	MB119/06	Spanyolország	2006	<i>Cx. pipiens</i>	KF573410	Bakonyi és mtsai., 2014
SE 2007	ArD192495	Szenegál	2007	<i>Cx. neavei</i>	KC754957	Nikolay és mtsai., 2013
IT 2009A	Italia 2009	Olaszország	2009	feketerigó	JF266698	Savini és mtsai., 2011
IT 2009B	Bologna/09	Olaszország	2009	ember	HM569263	Gaibani és mtsai., 2013
SP 2009	HU10279 09	Spanyolország	2009	<i>Cx. perexiguus</i>	HQ833022*	Vázquez és mtsai., 2011
GE 2011	BH65/11- 02-03	Németország	2011	feketerigó	HE599647	Becker és mtsai., 2012
SP 2012	Flavi1	Spanyolország	2012	énekes rigó	KC437386*	Höfle és mtsai., 2013

* NS5 részleges szekvencia

Az USUV MB119/06 teljes genom szekvencia (a 4. ábrán fekete ponttal kiemelve) a SA Ar 1776 referencia törzzsel áll a legközelebbi genetikai rokonságban. Egy másik afrikai izolátum (ArD19848, *Cx. perfuscus*, Szenegál, 1974) helyeződik közös ágon az említett két vírussal. A többi, európai és afrikai eredetű USUV a törzsfá további ágaiba rendeződik.

Két további, Spanyolországban kimutatott USUV részleges genomszekvenciája (NS5 régió) érhető még el a GenBank adatbázisában (Vázquez és mtsai., 2011, Höfle és mtsai., 2013). Ezeket a

szekvenciákat is bevontuk a genom 8377. és 9305. nukleotidja közötti szakasz filogenetikai elemzésébe. Az ML módszerrel készített törzsfá (5. ábra) alapján az MB119/06 USUV a legközelebbi rokonságban a HU10279 09, (*Cx. perexiguus*, 2009; Vázquez és mtsai., 2011) vírussal áll. A másik, Spanyolországban kimutatott vírus (Flavi1, énekes rigó, 2012; Höfle és mtsai., 2013) viszont egy szenegáli vírussal (ArD101291) és Európában kimutatott vírusokkal áll közelebbi rokonságban. A származtatott aminosav szekvenciák ML módszerrel végzett filogenetikai vizsgálatai a nukleotid szekvenciák alapján készített törzsfákhoz hasonló szerkezetet mutattak, viszont a bootstrap statisztikai értékek általában alacsonyabbak voltak.



5. ábra: Usutu vírusok részleges genom nukleotid szekvenciái (NS5) alapján készített törzsfá.

Az USUV szekvenciák kódjait a 7. táblázat tartalmazza. Az Európában kimutatott vírusokat szürke háttér emeli ki. A bal alsó sarokban szereplő vonal a genetikai távolságot mutatja. Az 1000 ismétléses bootstrap analízis százalékos értékeit az elágazásoknál szereplő számok mutatják. Az 70%-nál magasabb értékek kerültek csak feltüntetésre. A MVEV szekvenciája kültágként a filogram gyökerének becsléséhez szerepel a törzsfán.

Afrikai eredetű USUV-k (Nikolay és mtsai., 2013) és egy olasz emberi megbetegedésből izolált vírus (Bologna/09, Gaibani és mtsai., 2013) genetikai vizsgálatai során a szerzők lehetséges virulencia markereket azonosítottak. Nikolay és mtsai., (2013) megállapította, hogy az A₁₂₀V és M₂₂₈₇I szubsztitúciók jellegzetesek az afrikai / európai törzsekre. Ezek alapján a lókuszok alapján az MB119/06 szekvenciája az afrikai vírusokéval egyezik meg. A szerzők leírtak egy afrikai, emberi megbetegedésből izolált törzs (HB81P08, Közép-Afrikai Köztársaság, 1981) szekvenciájában egyedi aminosav szubsztitúciókat (L₁₂₉₉S, H₁₉₇₇Y és Q₂₇₀₂H) valamint egy szakasz törlődését az 3'-UTR régióban (nt 10494-10510). Ezek az eltérések sem a MB119/06 törzsben, sem az olaszországi eredetű, emberi izolátumban nem voltak jelen. Gaibani és mtsai., (2013) két egyedi aa szubsztitúciót

azonosított a Bologna/09 törzsben. Az E fehérje S₅₉₅G mutációt az MB119/06 szekvenciája is tartalmazta, a többi vizsgált törzs viszont nem. Az NS5 fehérje D₃₄₂₅E szubsztitúciója csak az olaszországi törzsben fordult elő. A többi vizsgált USUV származtatott aminosav szekvenciához viszonyítva az MB119/06 vírus 24 egyedi szubsztitúciót tartalmaz (K₁₀₁R, V/A₁₁₂L, T₁₅₃M, D/E₁₇₂G, S₂₇₃G, A₄₅₄V, V₅₆₃I, A₆₃₆V, H₉₆₇Y, V/T₁₀₆₇I, A₁₂₂₇V, A₁₂₃₆T, L₁₂₇₀F, I₁₄₆₀V, K₁₆₄₅R, H₁₇₇₁Y, H₁₇₉₁D, G₁₉₈₁S, V₂₀₀₉I, P₂₃₀₁H, N₂₃₅₅T, D₂₅₅₂E, H₃₀₅₅Y, és V₃₃₂₂I).

Az egyéb európai országokból kimutatott Usutu vírusok genetikai jellemzésére a következő fejezetben kerül sor.

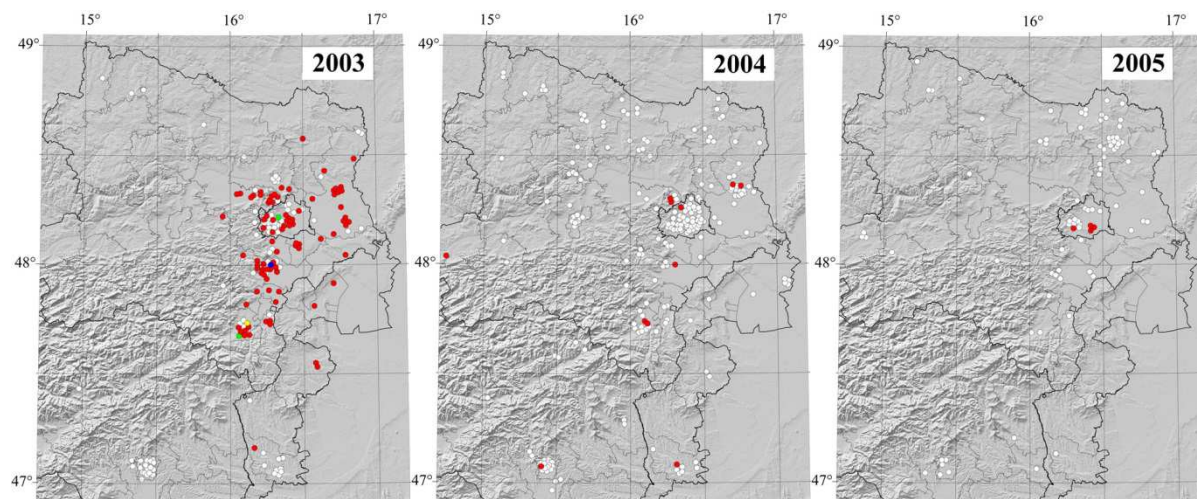
3.1.2. Az Usutu vírus közép-európai előfordulása és terjedése

3.1.2.1. Ausztria

Az USUV ausztriai felbukkanását követően elhullott madarak virológiai vizsgálatára alapuló, passzív surveillance programot hajtottunk végre 2003 és 2005 között, a vírus előfordulásának és terjedésének felmérése céljából (Chvala és mtsai., 2007). A program során, a 2001 és 2002 évek tapasztalatai alapján (Weissenböck és mtsai., 2003) a július és szeptember közötti időszakban gyűjtöttük a mintákat Ausztria keleti tartományaiból (Alsó-Ausztria, Bécs, Burgenland és Stájerország). A program kezdetén a sajtó (helyi és országos terjesztésű lapok, rádió- és televízió-műsorok) segítségével hívtuk fel a lakosság figyelmét a várható vadmadár elhullásokra és ösztönöztük őket a minták gyűjtésére és beküldésére. A minták átvételében és szállításában az osztrák hatósági állategészségügyi szolgálat jelentős segítséget nyújtott. A madártetemek feldolgozására és virológiai vizsgálatára a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetemen került sor.

A kutatás három éve alatt 504 vadmadár tetemét vizsgáltuk meg és 107-ben mutattuk ki az USUV jelenlétét. A 107 pozitív madármintából 100-at mind RT-PCR, mind immunhisztokémiai módszerrel megvizsgáltunk. 99 esetben mindkét vizsgálat pozitív eredményt adott, egy esetben csak az RT-PCR volt pozitív. A többi 7 pozitívnek bírált minta állapota nem tette lehetővé az immunhisztokémiai vizsgálatot, ezért ezeknél az RT-PCR eredménye alapján állapítottuk meg a fertőzöttséget. A 2003-ban megvizsgált, 27 fajhoz tartozó, 177 madár 52%-a (92) volt USUV fertőzött. A legtöbb pozitív madár feketerigó (*Turdus merula*) volt (87), de két széncinke (*Parus major*), egy csuszka (*Sitta europaea*), egy énekes rigó (*Turdus philomelos*) és egy vörösbegy (*Erithacus rubecula*) fertőzöttségét is megállapítottuk. A pozitív madarak tetemeit július 13. és szeptember 23. között gyűjtötték. A legtöbb pozitív tetemet (az összes 22%-át) a 34. héten (augusztus 18-24.) találták. 2004-ben 30 faj 224 tetemének vizsgálatára került sor. 11 feketerigó (5%) mintából lehetett a vírus jelenlétét kimutatni. A pozitív minták 37%-át a 34. héten gyűjtötték. 2005-ben 103 madártetemet (19 faj) vizsgáltunk, amelyek közül négy feketerigó esetében lehetett kimutatni a vírus jelenlétét. Három pozitív tetemet a 30. héten (július 25.-31.) találtak. A vizsgált madártetemek megtalálási helyeit az 6. ábra szemlélteti. Meghatároztuk 12 mintából kimutatott USUV részleges nukleotid szekvenciáját az 1159-2505 nt

pozíciók közötti szakaszon (E fehérje régió). A szekvenciák 99,7-100% hasonlóságot mutattak az USUV 2001-ben, Ausztriában izolált törzséhez (939/01). A származtatott aminosav szekvenciák megegyeztek az ausztriai vírusokban, kivéve egyetlen aminosav szubsztitúciót ($M_{419}V$) egy Bécsben, 2005-ben talált feketerigóból kimutatott vírus esetében (Chvala és mtsai., 2007).



6. ábra: Elhullott vadmadarak vizsgálatára alapuló USUV passzív surveillance 2003 és 2005 között kelet-Ausztriában

A térképeken a pontok a madártetemek megtalálási helyeit ábrázolják. Fehér: USUV-negatív madarak; színes: USUV pozitív madarak – piros: feketerigó, zöld: széncinege, kék: vörösbegy, sárga: csuszka

A passzív surveillance mellett szerológiai felmérő vizsgálatokat is végeztünk 2003 és 2006 között Ausztriai vadmadaraktól gyűjtött savómintákkal (Meister és mtsai., 2008). A mintákat a korábbi felmérő vizsgálatok alapján USUV-endémiás területeken gyűjtöttük. Összesen 442 madár mintáját vizsgáltuk meg: 2003-ban 113 vérmintát gyűjtöttünk augusztus és december között, 2004-ben 109 vérmintát január és október között, 2005-ben 197 vérmintát március és október között, valamint 2006 első öt hónapjában további 23 vérmintát a 2005-ös szezonban bekövetkezett fertőzések kimutatására. A vérmintákat függönyhálóval befogott énekesmadaraktól (2003: 14, 2004: 27, 2005: 91, 2006: 23), a Bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem madárklinikájára gyógykezelésre bevitt vadmadaraktól (2003: 28, 2004: 2, 2005: 45), egy ragadozómadár rehabilitációs központban (Haringsee, Alsó-Ausztria, É 48°11', K 16°46') nevelt madaraktól (2003: 28, 2005: 38), valamint kórbonctani vizsgálatra beküldött madaraktól (2003: 43, 2004: 80, 2005: 23) gyűjtöttük. 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 próbákat 90%-os gátlási szinten bíráltuk el, pozitívnak a $\geq 1:20$ titerű savómintákat tekintettük. A vizsgálatok eredményeit a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: Ausztriai vadmadarokból gyűjtött vérmintákból USUV elleni ellenanyagok kimutatására irányuló szerológiai felmérő vizsgálatok eredményei.

Nº	Faj Magyar név	Faj Latin név	össz.	2003 pozitív/össz.	2004 pozitív/össz.	2005 pozitív/össz.	2006 pozitív/össz.	2003-2006 pozitív/össz.
1	feketerigó	<i>Turdus merula</i>	165	3/33	8/83	20/35	6/14	37/165
2	barátposzáta	<i>Sylvia atricapilla</i>	R 23			12/23		12/23
3	uráli bagoly	<i>Strix uralensis</i>	22			16/22		16/22
4	balkáni gerle	<i>Streptopelia decaocto</i>	20	0/11		6/9		6/20
5	széncinege	<i>Parus major</i>	19	0/1	0/9	3/9		3/19
6	erdei fülesbagoly	<i>Asio otus</i>	17	3/11		5/6		8/17
7	nagy fakopáncs	<i>Dendrocopos major</i>	16			2/7	3/9	5/16
8	vörös vércse	<i>Falco tinnunculus</i>	12	0/7		4/5		4/12
9	vörösbegy	<i>Erithacus rubecula</i>	R 11			5/11		5/11
10	macskabagoly	<i>Strix aluco</i>	10	3/8	0/1	1/1		4/10
11	csóka	<i>Corvus monedula</i>	10	0/3		6/7		6/10
12	énekes rigó	<i>Turdus philomelos</i>	R 9	0/4	0/1	4/4		4/9
13	mezei veréb	<i>Passer montanus</i>	9	0/8		0/1		0/9
14	szajkó	<i>Garrulus glandarius</i>	8	½	1/4	2/2		4/8
15	szakállas saskeselyű	<i>Gypaetus barbatus</i>	7	0/2		2/5		2/7
16	kék cinege	<i>Parus caeruleus</i>	7	0/1	0/6			0/7
17	cserregő nádiposzáta	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	H 7			3/7		3/7
18	egerészölyv	<i>Buteo buteo</i>	6	0/2	0/2	0/2		0/6
19	dolmányos varjú	<i>Corvus corone cornix</i>	6	0/2		3/4		3/6
20	vetési varjú	<i>Corvus frugilegus</i>	T 5	0/3	0/2			0/5
21	csuszka	<i>Sitta europaea</i>	4			1/4		1/4
22	uhu	<i>Bubo bubo</i>	3			1/3		1/3
23	barna rétihéja	<i>Circus aeruginosus</i>	H 3	0/2		1/1		1/3
24	citromsármány	<i>Emberiza citrinella</i>	3	0/3				0/3
25	füsti fecske	<i>Hirundo rustica</i>	H 2			2/2		2/2
26	tengelic	<i>Carduelis carduelis</i>	2	0/2				0/2
27	jégmadár	<i>Alcedo atthis</i>	2	0/2				0/2
28	kis poszáta	<i>Sylvia curruca</i>	H 2			1/2		1/2
29	közép fakopáncs	<i>Dendrocopos medius</i>	2			0/2		0/2
30	bütykös hattyú	<i>Cygnus olor</i>	2			0/2		0/2
31	fácán	<i>Phasianus colchicus</i>	2	0/1		1/1		1/2
32	nádi sármány	<i>Emberiza schoeniclus</i>	R 2			1/2		1/2
33	mezei poszáta	<i>Sylvia communis</i>	H 2			1/2		1/2
34	gyöngybagoly	<i>Tyto alba</i>	1			1/1		1/1
35	házi rozsdafarkú	<i>Phoenicurus ochruros</i>	R 1			1/1		1/1
36	fenyőpinty	<i>Fringilla montifringilla</i>	T 1			0/1		0/1
37	siketfajd	<i>Tetrao urogallus</i>	1			0/1		0/1
38	erdei pinty	<i>Fringilla coelebs</i>	1		0/1			0/1
39	csilpcsalpfüzike	<i>Phylloscopus collybita</i>	R 1			0/1		0/1
40	keresztcsőrű	<i>Loxia curvirostra</i>	1			0/1		0/1
41	kerti poszáta	<i>Sylvia borin</i>	H 1			1/1		1/1
42	zöldike	<i>Carduelis chloris</i>	1	0/1				0/1
43	molnárfecske	<i>Delichon urbica</i>	H 1			1/1		1/1
44	tőkés réce	<i>Anas platyrhynchos</i>	1	0/1				0/1
45	fülemüle	<i>Luscinia megarhynchos</i>	H 1			0/1		0/1
46	páva	<i>Pavo cristatus</i>	1			1/1		1/1
47	függőcinege	<i>Remiz pendulinus</i>	R 1			0/1		0/1
48	kormos légykapó	<i>Ficedula hypoleuca</i>	H 1			1/1		1/1

49	fűrj	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>H</i>	1		0/1	0/1
50	töviszúró gébics	<i>Lanius collurio</i>	<i>H</i>	1		0/1	0/1
51	sirály	<i>Larus sp.</i>		1	0/1		0/1
52	karvaly	<i>Accipiter nisus</i>		1	0/1		0/1
53	seregély	<i>Sturnus vulgaris</i>	<i>R</i>	1		1/1	1/1
54	csonttollú	<i>Bombycilla garrulus</i>	<i>T</i>	1		0/1	0/1
55	erdei szalonka	<i>Scolopax rusticola</i>	<i>R</i>	1	0/1		0/1
				442	10/113	9/109	110/197
						9/23	138/442

R: rövid távú vándorló (mediterráneumban telelő), *H*: hosszú távú vándorló (Szaharától délre telelő),
T: nem vonuló / téli vendég (Közép-Európában telelő)

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. Egy USUV ellen 1:1280 ellenanyag titerű savó TBEV ellen is mutatott haemagglutináció gátló aktivitást (1:80 titer). TBEV elleni neutralizáló ellenanyagokat 7, WNV elleni neutralizáló ellenanyagokat 15 savóból lehetett kimutatni. A vizsgált madarak között 78 egy évnél fiatalabb volt. 42 fiatal madár (54%) savójából ki lehetett mutatni USUV elleni ellenanyagokat. A ragadozómadár rehabilitációs központban nevelt madarakból 2005-ben három alkalommal gyűjtöttünk vérmintákat. A májusban gyűjtött 86 savóból 63 (73%) tartalmazott USUV elleni ellenanyagokat; a haemagglutináció-gátló titerek 1:20 és 1:640 között szóródtak, közel 70%-uk titere $\leq 1:80$ volt. Augusztusban 39 savó (45%) volt pozitív, amelyek 56%-a 1:20-1:40 közötti titerben tartalmazott ellenanyagokat. Az októberben gyűjtött minták közül 56 (65%) volt pozitív, a $\geq 1:80$ titerű savók aránya meghaladta a 60%-ot. A vérmintákból kitisztított fehérvérsejtekből kivont RNS-ek RT-PCR vizsgálata egyetlen esetben sem mutatta ki USUV vagy WNV nukleinsav jelenlétét (Meister és mtsai., 2008).

Jelentős vadmadár elhullásokat 2005-öt követő tíz évben nem jelentettek Ausztriában. Ez alatt az időszak alatt összesen hét feketeterítő teteme érkezett vizsgálatra, amelyek mindegyike negatívnak bizonyult flavivírus fertőzöttség szempontjából. 2016-ban viszont ismét feltűnő mértékű feketeterítő elhullásokról számoltak be Ausztria keleti részén. Csak három madártetemet érkezett vizsgálatra, de ezek közül kettőből kimutattuk az USUV nukleinsavának és antigénjeinek jelenlétét. Meghatároztuk egyik, Fischamend településen, gyűjtött rigóból származó vírus teljes nukleotid szekvenciáját (GenBank azonosító: MF063042) 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).

A hatályos közegészségügyi előírások alapján azokban a régiókban, ahol nyugat-nílusi vírusherfertőzést állapítanak meg, a véradást vagy fel kell függeszteni, vagy a gyűjtött vérmintákat vizsgálni kell WNV kontamináció szempontjából. Ausztriában, 2017 júliusában és augusztusában gyűjtött vérminták WNV jelenlétére irányuló szűrővizsgálatai során hét mintánál pozitív reakciót észleltek. 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-ben gyűjtött és WNV pozitívnak diagnosztizált plazmaminták ismételt vizsgálatával egy további mintából is az USUV RNS jelenlétét mutattuk ki. Meghatároztuk egy vírus teljes (GenBank azonosító: MF991886) és öt vírus részleges nukleotid szekvenciáját (NS5-3'UTR régió, GenBank azonosítók: MF991887-M991890). Filogenetikai vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a vírusok a 2016-ban, Ausztriában, feketerigóból kimutatott Usutu vírussal állnak a legközelebbi genetikai rokonságban (Bakonyi és mtsai., 2017b).

3.1.2.2. Magyarország

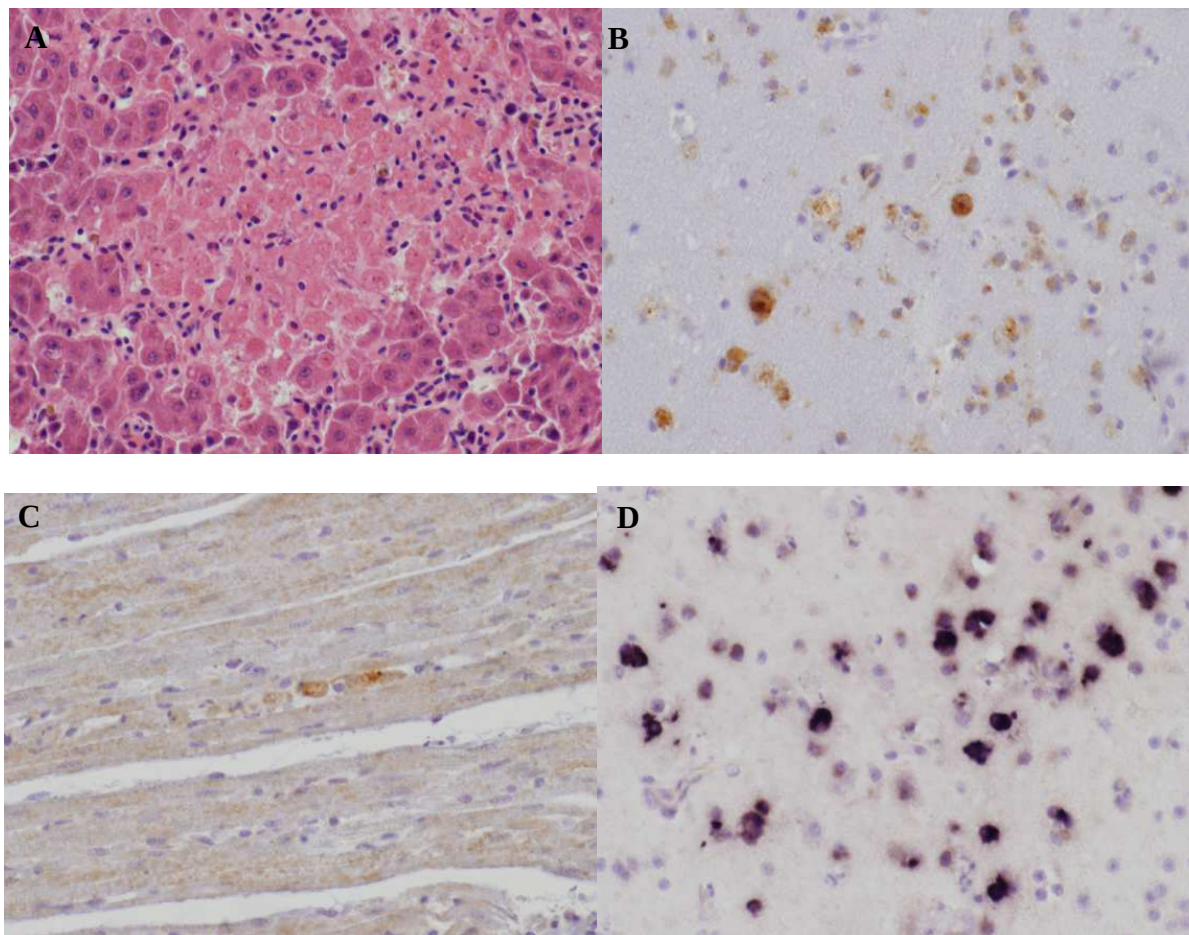
Az ausztriai felmérő vizsgálatokkal egyidőben Magyarországon is megkezdtek elhullott vadmadarak USUV fertőzöttségre irányuló vizsgálatainkat a vírus hazai felbukkanásának felismerése és terjedésének nyomon követése céljából (Bakonyi és mtsai., 2007). A vadmadár minták döntő többségét az Ócsai Madárvárta Egyesület munkatársai bocsátották rendelkezésünkre, de az ország számos részéről érkeztek még vadmadár tetemek a nemzeti parkok őrei, a Magyar Madártani Egyesület ornitológusai, állatorvosok és a lakosság jóvoltából is. A felméréseket 2003 és 2006 között végeztük és összesen 52 faj 332 egyedét dolgoztuk fel (9. táblázat). A tetemeket kórbonctani, kórszövettani, RT-PCR, immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatoknak vetettük alá. A pozitív mintákból vírusizolálást végeztünk lúdembrío-fibroblaszt primaer szövettényezeten.

A 2003-ban és 2004-ben gyűjtött madártetemek mindegyikének vizsgálata negatív eredménnyel zárult. 2005 augusztusában egy feketerigó tetemet találtak Budapest XI. kerületében és vizsgálatra eljuttatták az Országos Állategészségügyi Intézetbe. Az RT-PCR vizsgálatok mind JEV szerocsoport-specifikus, mind USUV-specifikus primerekkel pozitív eredményt mutattak. Az amplifikációs termékek direkt szekvenálása alátámasztotta a reakciók specifikusságát. A tetem megtalálója beszámolt a környéken még további nyolc beteg vagy elhullott feketerigó észleléséről a megelőző hetekben. A megfigyelt feketerigó elhullások száma szeptember végéig 18-ra nőtt. 2006 júliusában és augusztusában kilenc feketerigó teteme érkezett az országos madárinfluenza-monitoring program keretében virológiai felmérő vizsgálatra az Országos Állategészségügyi Intézetbe. A tetemek közül hat volt vizsgálatra alkalmas és mindegyikükből ki lehetett mutatni az USUV nukleinsavát. A madarakat Budapest XVI és XVIII kerületében találták (három-három tetemet). A 2005-ben és 2006-ban megvizsgált többi madár USUV fertőzöttségre negatívnak bizonyult. Az USUV pozitív feketerigók makroszkópos kórbonctani lelete jellegtelen volt. A lép és a máj megnagyobbodása mellett az egyéb zsigeri szervek kisebbedését lehetett megfigyelni. A kórszövettani elváltozások között a heveny májgyulladás multiplex elhalásos és gyulladásos góccal (7A ábra), elhalásos góccal a lépben, heveny hurutos bélgyulladás, enyhe, gócos lympho-histiocitás érköpenyek a vesékben és a szívben, gócos szívizom-elfajulás, a vese tubuláris hámsejtek vakuolizáló elfajulása, valamint agyi perivascularis és perineurális oedematizáció,

kevés lymphocytából álló érköpennyel voltak a legjellegzetesebbek. Az USUV antigéneket immunhisztokémiai módszerrel, elsősorban az agykérgi területeken lehetett kimutatni (7B ábra), de voltak pozitív sejtek a szívizomzatban (7C ábra), a vörös léppulpában, a tüdőben, a hasnyálmirigyben és a belek intramurális idegdúcaiban is. A vírus nukleinsavát az agyszövetben *in situ* hibridizációs módszerrel is kimutattuk (7D ábra).

9. táblázat: Az USUV magyarországi előfordulásának felmérése céljából 2003 és 2006 között gyűjtött és megvizsgált vadmadár tetemek listája

Nº	Magyar név	Latin név	Mintaszám
1	barátposzáta	<i>Sylvia atricapilla</i>	22
2	cigány csaláncsúcs	<i>Saxicola rubicola</i>	1
3	cserregő nádiposzáta	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	12
4	csilpcsalpfűzike	<i>Phylloscopus collybita</i>	10
5	egerészölyv	<i>Buteo buteo</i>	2
6	énekes nádiposzáta	<i>Acrocephalus palustris</i>	3
7	énekes rigó	<i>Turdus philomelos</i>	5
8	erdei fülesbagoly	<i>Asio otus</i>	1
9	erdei pinty	<i>Fringilla coelebs</i>	4
10	erdei szürkebegy	<i>Prunella modularis</i>	5
11	fácán	<i>Phasianus colchicus</i>	1
12	fehér gólya	<i>Ciconia ciconia</i>	6
13	feketerigó	<i>Turdus merula</i>	33
14	fenyőpinty	<i>Fringilla montifringilla</i>	6
15	foltos nádiposzáta	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	4
16	függőcinege	<i>Remiz pendulinus</i>	2
17	fülemülesítke	<i>Acrocephalus melanopogon</i>	8
18	füstifecske	<i>Hirundo rustica</i>	14
19	házi rozsdafarkú	<i>Phoenicurus ochruros</i>	3
20	házi veréb	<i>Passer domesticus</i>	2
21	házigalamb	<i>Columba livia</i>	1
22	hegyi fakusz	<i>Certhia familiaris</i>	1
23	jégmadár	<i>Alcedo atthis</i>	1
24	kékcinege	<i>Parus caeruleus</i>	33
25	kerti poszáta	<i>Sylvia borin</i>	2
26	kerti rozsdafarkú	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	1
27	kis poszáta	<i>Sylvia curruca</i>	5
28	kormos légykapó	<i>Ficedula hypoleuca</i>	1
29	közép fakopáncs	<i>Dendrocopos medius</i>	1
30	mezei poszáta	<i>Sylvia communis</i>	1
31	mezei veréb	<i>Passer montanus</i>	3
32	nádi sármány	<i>Emberiza schoeniclus</i>	7
33	nádi tücsökmadár	<i>Locustella luscinioides</i>	7
34	nagy fakopáncs	<i>Dendrocopos major</i>	1
35	ökörzem	<i>Troglodytes troglodytes</i>	3
36	őszapó	<i>Aegithalos caudatus</i>	1
37	régi tücsökmadár	<i>Locustella naevia</i>	1
38	rövidkarmú fakusz	<i>Certhia brachydactyla</i>	1
39	sárgafejű királyka	<i>Regulus regulus</i>	1
40	sárgalábú sirály	<i>Larus cachinnans</i>	1
41	sárgarigó	<i>Oriolus oriolus</i>	2
42	seregély	<i>Sturnus vulgaris</i>	2
43	sisegő fűzike	<i>Phylloscopus sibilatrix</i>	1
44	süvöltő	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	2
45	széncinege	<i>Parus major</i>	24
46	szürke gém	<i>Ardea cinerea</i>	1
47	tengelic	<i>Carduelis carduelis</i>	1
48	törpegém	<i>Ixobrychus minutus</i>	2
49	töviszúró gébics	<i>Lanius collurio</i>	5
50	vörös vércse	<i>Falco tinnunculus</i>	1
51	vörösbegy	<i>Erithacus rubecula</i>	51
52	zöldike	<i>Carduelis/Chloris chloris</i>	23
Σ			332



7. ábra: USUV fertőzött feketeterigó egyes kórszövettani elváltozásai, valamint a vírus kimutatása a szövetekben immunhisztokémia és *in situ* hibridizációs eljárással.

A: máj, heveny elhalásos májgyulladás, hematoxylin-eosin festés; **B:** agy, USUV antigén immunhisztokémiai festése a neuronokban; **C:** szív, gócos szívizom-elfajulás, USUV antigén immunhisztokémiai festése a szívizomsejtekben; **D:** agy, USUV nukleinsav *in-situ* hibridizációs kimutatása a neuronokban. 400× nagyítás

A 2006. augusztusában gyűjtött feketeterigók agy és máj homogenizátumait primaer lúd embrió fibroblaszt szövettényészetekre oltottuk. Három napos inkubációt követően citopatogén hatásokat (sejt-lekerekedés, lízis) lehetett megfigyelni a szövettényészeteken. Két napon belül a sejtkárosodások a sejtek 80-90%-át érintették, míg a kontroll szövetekben nem lehetett elváltozásokat megfigyelni. A citopatogén hatások még kifejezettebbeké váltak az izolátum továbboltása során. A vírusizolátumot a genom részleges felerősítését követő direkt szekvencia meghatározással azonosítottuk.

A 2005-ben kimutatott USUV teljes genomszekvenciáját felerősítettük átfedő amplifikációs termékek direkt szekvenálásával. A szekvenciát (GenBank azonosító: EF203550) összehasonlítottuk az USUV ausztriai (939/01) és dél-afrikai (SA Ar-1776) törzseinek szekvenciáival. A magyarországi USUV nukleotid szekvenciája 99,9% hasonlóságot mutatott az ausztriai víruséhoz és 97% hasonlóságot a dél-afrikai víruséhoz. A magyarországi és ausztriai vírusok nukleotid szekvenciái között 14 nukleotid

eltérés fordult elő, amelyek közül öt idézett elő aminosav eltérést is (10. táblázat). A 2006-ban kimutatott vírusok részleges nukleotid szekvenciáit az E fehérje régióban (nt pozíció: 1175-1529) meghatároztuk. C/T tranzíciók fordultak elő három nukleotid pozícióban (1231 – három vírusnál, 1317 – egy vírusnál, 1431 – egy vírusnál) amelyek egyike sem okozott aminosav szekvencia változást.

10. táblázat: Magyarországi és ausztriai USUV genom szekvenciák eltérései

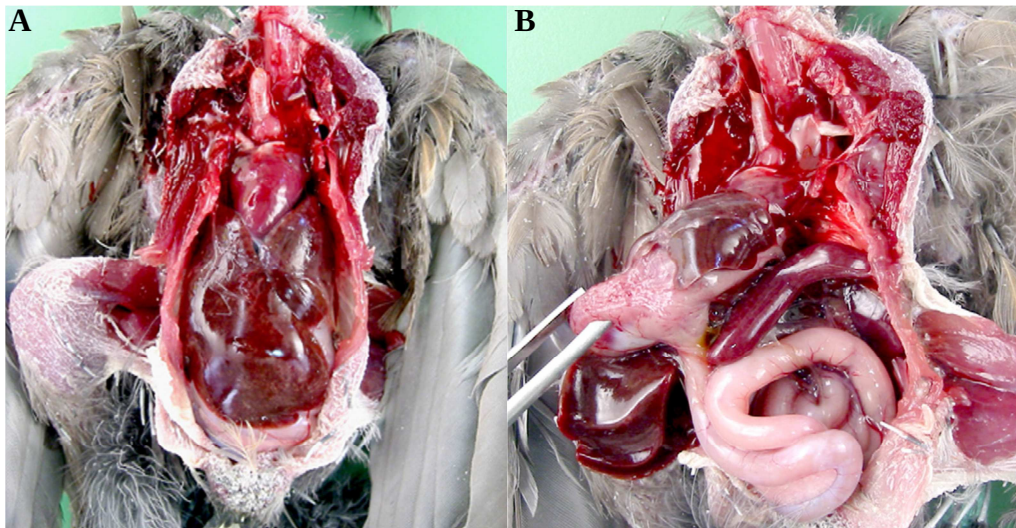
genom régió	preM	E	NS2a		NS2b	NS3	NS4a	NS4b	NS5					3'UTR
nt pozíció	623	2181	3686	4067	4366	5432	6700	7197	7689	7992	9321	9556	10311	10948
USUV Vienna- 2001	c	c	c	t	c	c	c	t	a	t	a	c	a	a
USUV Budapest- 2005	t	t	t	c	t	t	t	g	g	c	g	t	g	–
aa pozíció	176	695	1197	1324	1424	1779	2203	2367	2530	2631	3075	3154	3405	–
USUV Vienna- 2001	T	S	T	I	L	A	L	F	R	Y	R	L	R	–
USUV Budapest- 2005	I	.	I	T	.	V	.	L	.	.	.	.	.	–

A pontok a Budapest-2005 USUV származtatott aminosav szekvenciájában a Vienna-2001 szekvenciájával megegyező aminosavakat jelölik. A 3'UTR régió 10948 pozíciójában a budapesti USUV nukleotid szekvenciában adenin nincs jelen.

A következő években folytattuk az országos madárinfluenza-monitoring program keretében virológiai felmérő vizsgálatra érkezett minták közül az USUV fertőzésre gyanús madarak vizsgálatát. 2010 és 2015 között öt feketerigó és egy fenyőrigó (*Turdus pilaris*) szervmintáiból tudtuk kimutatni a vírus jelenlétét. A pozitív feketerigó tetemeket 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 az ország középső részén, Imrehegyen gyűjtött szajkóból (*Garrulus glandarius*) és Kecskeméten talált seregélyből (*Sturnus vulgaris*) lehetett kimutatni USUV fertőzést. Halmozott feketerigó elhullásokat figyeltek meg 2016 nyarán az ország nyugati részén, elsősorban Zala és Győr-Moson-Sopron megyében. Az Usutu vírusherfertőzést tíz feketerigó mintájából mutattuk ki. Meghatároztuk egy, Zalaegerszegen, 2016-ban gyűjtött feketerigóból származó USUV nukleotid szekvenciáját a poliprotein kódoló régióban (GenBank azonosító: MF063043), valamint további kilenc vírus részleges nukleotid szekvenciáit (NS5-3'UTR régió, GenBank azonosító: MF063044-MF063052). Filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a 2010 és 2015 között, az ország középső részéről gyűjtött madaraktól kimutatott vírusok az USUV 2001-ben Ausztriában, illetve 2005-ben Magyarországon kimutatott genotípusaival 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 genotípusokhoz hasonlítottak leginkább (Bakonyi és mtsai., 2017a).

3.1.2.3. Olaszország

Egy Milánó közelében található vadaspark 32 bagolyfaj 70 egyedéből álló gyűjteményében az egyik szakállas bagoly (*Strix nebulosa*) heveny tüneteket (levertség, borzolt tollazat, csökkent vízfelvétel) követően 2006. augusztus 5-én elhullott. A következő 6 hétben a faj további öt egyede hullott el hasonló tünetek között. A kórelőzményi adatok (faj, évszak) és a jellegtelen kórbonctani elváltozások (májduzzanat, gyulladásos sejtes infiltráció a májban, lépben és vesékben) felvetették az USUV fertőzés gyanúját. A baglyok szerveinek RT-PCR és immunhisztokémiai vizsgálatával megállapítottuk az USUV fertőzés tényét (Manarolla és mtsai., 2010). A következő év nyarán két gatyáskuvik (*Aegolius funereus*) betegedett meg és hullott el a vadasparkban, amelyet a faj hat fiókája, egy európai törpekuvík (*Glaucidium passerinum*) és egy karvalybagoly (*Surnia ulula*) követett. 2007. augusztus 28-án az egyik milánói parkban repképtelen feketeterigót (*T. merula*) fogtak be. Az állat a begyűjtést követő néhány percen belül elhullott. Az elhullott madarak kórbonctani és kórszövettani vizsgálatai során a baglyokban a májak és vesék megnagyobbodását és gócos gyulladásos sejtes infiltrációt (máj, lép, vese, tüdő), a feketeterigóban bővérű és megnagyobbodott lépet és májat (8. ábra), gyulladásos, elhalásos és vérzéses máj- és lép-elváltozásokat, szívizom elfajulást és gyulladást, valamint az agyszövetben glia-sarjadzást és neuronophagiát lehetett megfigyelni. Az USUV antigént immunhisztokémiai módszerekkel kimutattuk a máj, tüdő, vese, petefészek, zúzógyomor, agy és szív szöveteiben a különböző fajok mintáiból. 2008. júliusában a vadaspark területén találtak egy elhullott feketeterigót. A madár májában gyulladásos sejtes beszűrődést lehetett megfigyelni, valamint az USUV antigént immunhisztokémiai módszerrel, a nukleinsavat pedig RT-PCR vizsgálattal mutattuk ki.



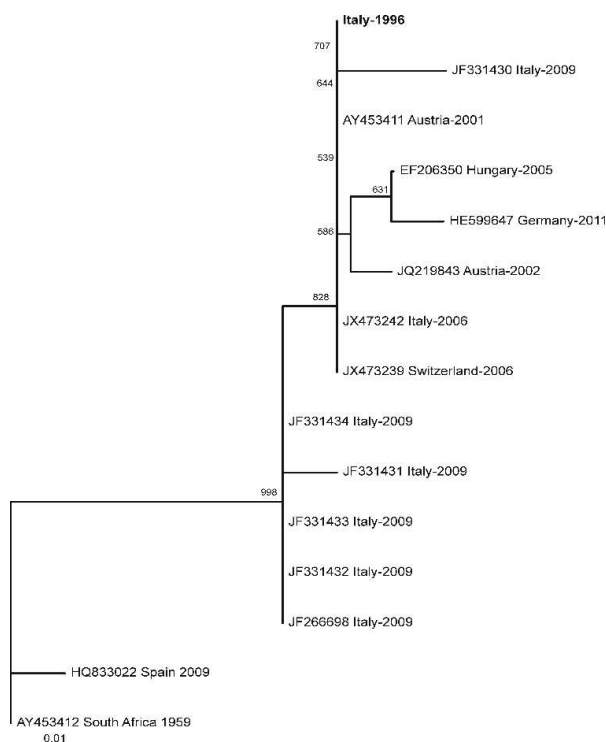
8. ábra: USUV fertőzés okozta kórbonctani elváltozások feketeterigóban (Olaszország, 2006)

A: bővérű és megnagyobbodott máj, **B:** bővérű és megnagyobbodott lép

A 2006-ban elhullott szakállas bagoly és a 2008-ban talált feketeterigó formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szöveteiből, valamint a 2007-ben elhullott feketeterigó -80°C-on tárolt szervmintáiból kivont

nukleinsavakból RT-PCR segítségével felerősítettünk négy genomterületet (részleges E-NS1 régió, 1179-2504 nt pozíció; részleges NS3 régió, 4805-5082 nt pozíció; részleges NS5 régió, 9267-9425 nt pozíció; és részleges 3'UTR, 10646-10808) és meghatároztuk a nukleotid szekvenciáikat. Az E fehérje és a 3'UTR régióban az olaszországi szekvenciák 100%-ban megegyeztek az ausztriai (939/01) USUV törzs szekvenciájával és egy nukleotidban (C₂₁₈₂T) tértek el a magyarországi rigóból 2005-ben kimutatott vírustól. Az NS3 régióban a szakállas bagolyból származó vírus szekvenciája egy nukleotidban (A₄₉₀₀G) tért el az ausztriai és magyarországi vírustól; amely szubsztitúció aminosav szekvencia változást is okozott (I₁₆₀₂V). Az NS5 régióban feltárt három tranzíció (T₉₀₈₇C, C₉₁₃₈T, T₉₁₅₃C) egyike sem járt aminosav szekvencia változással (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, csak akkor oki diagnózist nem sikerült felállítani. Toszkána tartományban, Firenze és Pistolia közelében 1996 kora őszén 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 gyakran bélféreg-fertőzöttséget tártak fel (Mani és mtsai., 1998). A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szervmintákat megőrizték és azokat 2012-ben bocsátották kutatócsoportunk rendelkezésére. Összesen 33 szövetminta (agyvelő, máj, lép, vese, tüdő, szív, mirigyes gyomor, zúzógyomor, vékonybél, hasnyálmirigy és vázizom) vizsgálatára került sor. 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 (Weissenböck és mtsai., 2013). A vírus nukleinsavát az említett mintákon túl kimutattuk feketerigók mirigyes- és zúzógyomor, vese és máj mintáiból is. A madarakat 1996. augusztus 28. és szeptember 25. között gyűjtötték Toszkána tartományban. A valós idejű RT-PCR segítségével felerősített genomszakasz (NS5 régió, 9739-9777) 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, 9247-9445; 3'UTR régió, 10626-10828). 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 szekvenciákkal. A spanyolországi (MB119/06) USUV szekvenciájához 95,6%-ban, a dél-afrikai (SA Ar-1776) szekvenciához 96,2%-ban hasonlított az olaszországi szekvencia. A rokonsági viszonyok ábrázolására készített törzsfát a 9. ábra mutatja be (Weissenböck és mtsai., 2013).



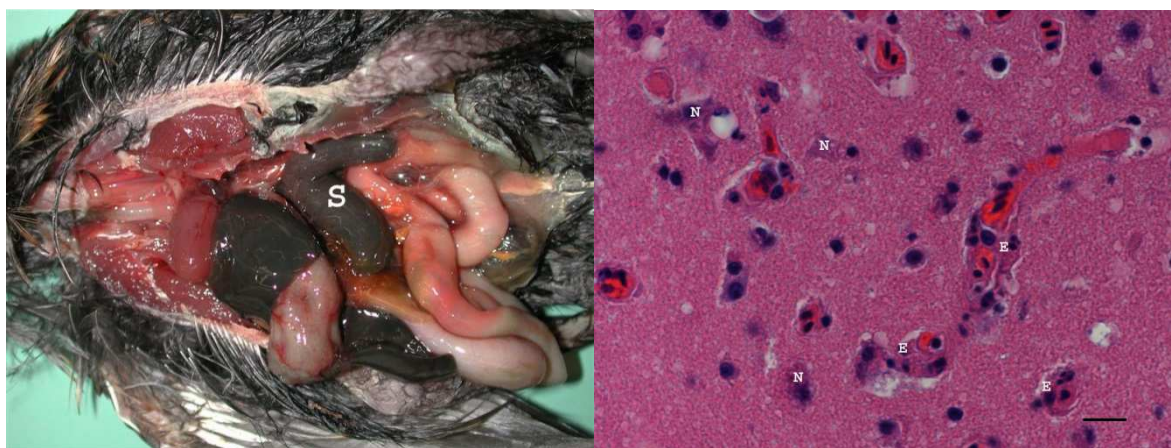
9. ábra: Az olaszországi feketeterigókból 1996-ban kimutatott USUV filogenetikai kapcsolata más USUV törzsekkel, az NS5 régió részleges nukleotid szekvenciáiból készített törzsfa alapján.

Neighbor-joining statisztikai algoritmussal készített filogram. A szekvenciákat a génbanki azonosítót, a származási ország nevét és a gyűjtés évét tartalmazó kódok jelölik. A kutatás során meghatározott szekvenciát félkövér betűvel emeltük ki. Az 1000 újramintázásos bootstrap-analízis értékeit az elágazásoknál feltüntettük (a ≥ 500 értékeket). A genetikai távolságot a bal alsó sarokban található vonal mutatja.

3.1.2.4. Svájc

Számottevő elhullásokat figyeltek meg a zürichi állatkert fogságban tartott madarai és a környéken (kb. 2 km-es körzetben) élő vadmadarak (főként veréb- és bagolyalkatúak [Passeriformes, Strigiformes]) körében 2006. július vége és szeptember közepe között. 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 RT-PCR és immunhisztokémiai módszerekkel (Steinmetz és mtsai., 2011). Megállapítottuk az USUV fertőzést 22 házi veréb (*Passer domesticus*), 13 feketeterigó (*Turdus. merula*), 3 gatyáskuvik (*Aegolius funereus*), 2 szakállas bagoly (*Strix nebulosa*), egy zöldike (*Carduelis/Chloris chloris*), egy vörösbegy (*Erithacus rubecula*) és egy európai törpekuvík (*Glaucidium passerinum*) esetében. A következő évben (2007-ben) további elhullásokat figyeltek meg augusztus közepe és szeptember vége között az állatkertben és környékén (n=66). A megvizsgált madártetemek közül 8 háziveréb, 7 feketeterigó, egy vörösbegy, egy gatyáskuvik, egy szakállas bagoly és egy karvalybagoly (*Surnia ulula*)

mintáiból mutattuk ki az USUV jelenlétét. A 2008. nyarán az állatkertben megfigyelt vadmadár elhullások (n=16) egyikénél sem utaltak a kórbonctani és kórszövettani elváltozások USUV fertőzésre, és az RT-PCR vizsgálatok is negatív eredménnyel zárultak. A 2009. július és szeptember között az állatkertben elhullott madarak (n=25) közül kimutattuk a vírus jelenlétét 2 szakállas bagoly és egy karvalybagoly mintáiból. A madarakban megfigyelt kórbonctani és kórszövettani elváltozások, valamint az antigén eloszlása az egyes szervek szöveteiben nagyon hasonlítottak az ausztriai, magyarországi és olaszországi eseteknél megfigyeltékhez (10. ábra). A különböző években gyűjtött, USUV pozitív mintákból meghatároztuk a részleges, E fehérje kódoló régió (nt 1175-2490), a részleges NS5 régió (nt 9170-9704) és a részleges NS5-3'UTR régió (nt 10128-10736) szekvenciáit. A szekvencia eltéréseket az 11. táblázat foglalja össze. A tranzíciók egyike sem okozott aminosav szekvencia változást (Steinmetz és mtsai., 2011).



10. ábra: USUV fertőzés okozta kórbonctani és kórszövettani elváltozások feketeterigóban (Svájc, 2006)

S: lépduzzanat; N: agykérgi neuronok gócos elhalása, E: agykérgi kapilláris endothel duzzanat és elhalás (hematoxylin-eosin festés, vonal: 25 μ m)

11. táblázat: Svájci, ausztriai, magyarországi és dél-afrikai eredetű USUV részleges genomszekvenciáinak pozicionális illesztése segítségével feltárt eltérések

régió	E	NS5				
nt pozíció	1524	9549	9669	10289	10311	10374
USUV Zürich 2006	c	c	t	t	g	t
USUV Zürich 2009	t	.	c	.	.	c
USUV Vienna 2001	t	t	c	c	a	.
USUV Budapest 2005	t	t	c	c	.	.
USUV SA Ar 1776	t	.	c	c	.	.

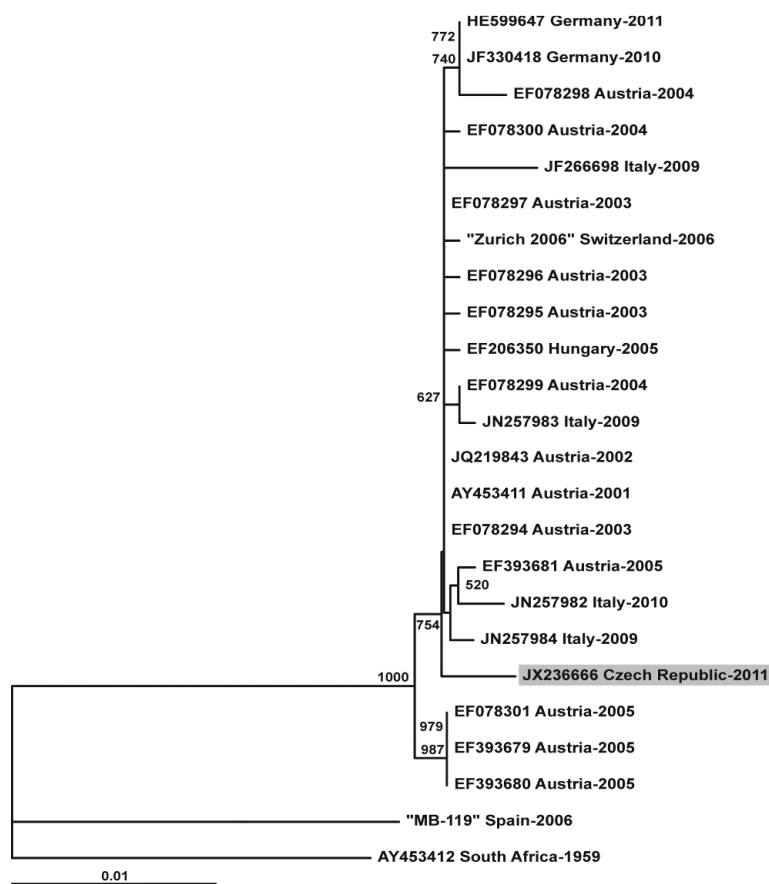
3.1.2.5. Csehország

Az USUV közép-európai terjedésének további bizonyítéka volt a vírus kimutatása dél-nyugat Németországban vadon és fogságban élő madarakban 2011-ben (Becker és mtsai., 2012), valamint USUV-elleni specifikus ellenanyagok kimutatása Csehországban (Hubálek és mtsai., 2008a) és Lengyelországban (Hubálek és mtsai., 2008b) mintázott madarakban. A vírus közvetlen kimutatására irányuló vizsgálatokat végeztünk Brno egyik városrészén (Brno – Pisárky, Dél-Morvaország, Csehország; É 49°19', K 16°58'), 2011. 05. 25.-én talált feketerigó teteméből. A szívizomzatból és agyvelőből gyűjtött minták homogenizátumaival szopósegereket oltottunk, valamint USUV-specifikus és JEV-szerokomplex specifikus primerekkel, RT-PCR segítségével vizsgáltuk őket vírusnukleinsav jelenlétére (Hubálek és mtsai., 2014b). A beoltott egerek mindegyike elhullott az oltást követő 4. és 6. nap között. (Az átlagos túlélési idő az agy homogenizátummal oltott egereknél 5,7 nap, a szív homogenizátummal oltottaknál 4,9 nap volt). A PCR vizsgálatok mind az eredeti rigó szervminták, mind az oltott egerek agyvelő-mintái esetében pozitív eredményt adtak. Az E-NS1 régióban (nt 1179-3017) felerősített genomszakasz nukleotid szekvenciája (GenBank azonosító: JX236666) 99,7 %-ban hasonlított az ausztriai, 939/01 izolátuméhoz. A felismert öt mutáció (C₁₃₁₁T, T₁₃₃₂C, A₁₄₁₃T, T₂₃₂₂C, és T₂₄₁₉C) egyike sem okozott változást a származtatott aminosav szekvenciában. Az NS5-3'UTR régióban (nt 10128-10828) meghatározott szekvencia (GenBank azonosító: JX236667) 100%-ban megegyezett a magyarországi, 2005-ben kimutatott USUV szekvenciájával. Az E-NS1 régió szekvenciái bevonásával, neighbor-joining algoritmussal készített törzsfa (11. ábra) a vírus közép-európai törzseinek rokonsági viszonyait ábrázolja. 2012 augusztusában további két, Brno városban talált feketerigó mintáiból sikerült kimutatni USUV fertőzést (Hubálek és mtsai., 2014b).

A flavivírusok szúnyog vektorokban való előfordulásának felmérése céljából csehországi kollégáink góckutatást végeztek három dél-morvaországi halastónál („Nesyt” és „Nový” Sedlec település közelében, és „Mlýnský” Lednice település közelében; É 48°47', K 16°42'–16°49'). CO₂ csalogatóval kiegészített CDC minilight csapdákkal gyűjtöttek szúnyogokat 2010 és 2014 évek között, július-augusztus hónapokban (Rudolf és mtsai., 2014). 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. augusztus 7.-én a Mlýnský tónál gyűjtött, *Culex modestus* nőstényeket tartalmazó pool (#13-622) vizsgálata pozitív eredménnyel zárult. Meghatároztuk a vírus részleges genomszekvenciáját öt régióban (összesen 4218 nukleotidot, a teljes genom 38%-át). A szekvencia 12 nukleotidban tért el a 2001-ben, Ausztriában felbukkant USUV törzs (939/01) szekvenciájától (99,7% hasonlóság).

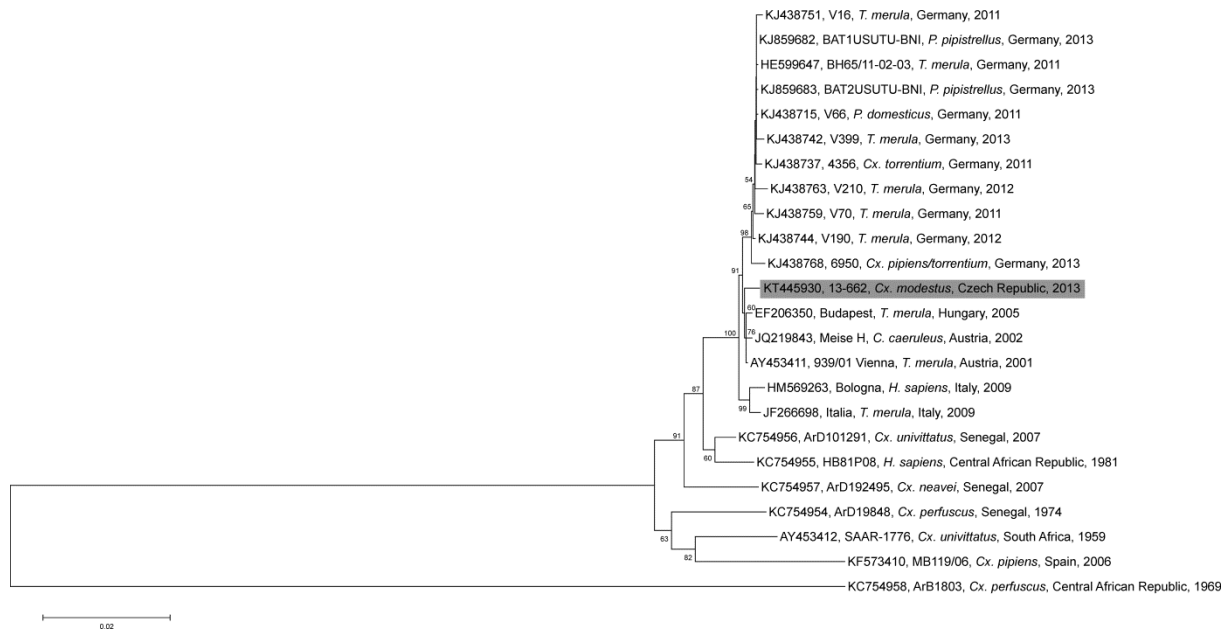
Az E-NS1 genom régióban (nt 1610-2980, 1371 nt) 1 szubsztitúciót, az NS1-NS2a régióban (nt 3021-3685, 665 nt) 2 szubsztitúciót, az NS2b-NS3 régióban (nt 4444-5615, 1172 nt) 6 szubsztitúciót, az NS4a-2K régióban (6582-6907, 326 nt): 0 szubsztitúciót, az NS4b-NS5 régióban (7351-8034, 684 nt)

3 szubsztitúciót azonosítottunk. A részleges szekvenciát a KT445930 azonosítóval helyeztük el a GenBank-ban. A szekvenciát illesztettük a génbanki adatbázisokban hozzáférhető, teljes USUV genomszekvenciákhoz. A neighbor-joining statisztikai módszerrel készített törzsfát a 12. ábra mutatja be. A maximum likelihood, minimum evolution, UPGMA és maximum parsimony algoritmusokkal készített törzsfák topológiája nagyon hasonlított a bemutatottéhoz. A fent említett, 2011-ben, feketerigóból kimutatott USUV korábban meghatározott szekvenciái az E fehérje kódoló régióban 1371 nukleotid hosszúságban (nt 1610-2980) fednek át a *Cx. modestus*-ból kimutatott vírusével. A két vírus szekvenciája három nukleotidban (T₁₈₇₂C, C₂₃₂₂T és C₂₄₁₉T) tér el egymástól (99,78% hasonlóság); a szubsztitúciók egyike sem járt aminosav szekvencia változással (Rudolf és mtsai., 2015a).



11. ábra: Csehországi feketerigóból 2011-ben izolált USUV filogenetikai kapcsolata más USUV törzsekkel, az E-NS1 régiók részleges nukleotid szekvenciáiból készített törzsfa alapján.

A szekvenciákat a génbanki azonosítót, a származási ország nevét és a gyűjtés évét tartalmazó kódok jelölik. A kutatás során meghatározott szekvenciát szürke háttérrel emeltük ki. Az 1000 újramintázásos bootstrap-analízis értékeit az elágazásoknál feltüntettük (a ≥ 500 értékeket). A genetikai távolságot a bal alsó sarokban található vonal mutatja.



12. ábra: Csehországi *Cx. modestus* pool-ból 2013-ben kimutatott USUV filogenetikai kapcsolata más USUV törzsekkel, az E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b és NS5 régiók részleges nukleotid szekvenciáiból készített törzsfá alapján.

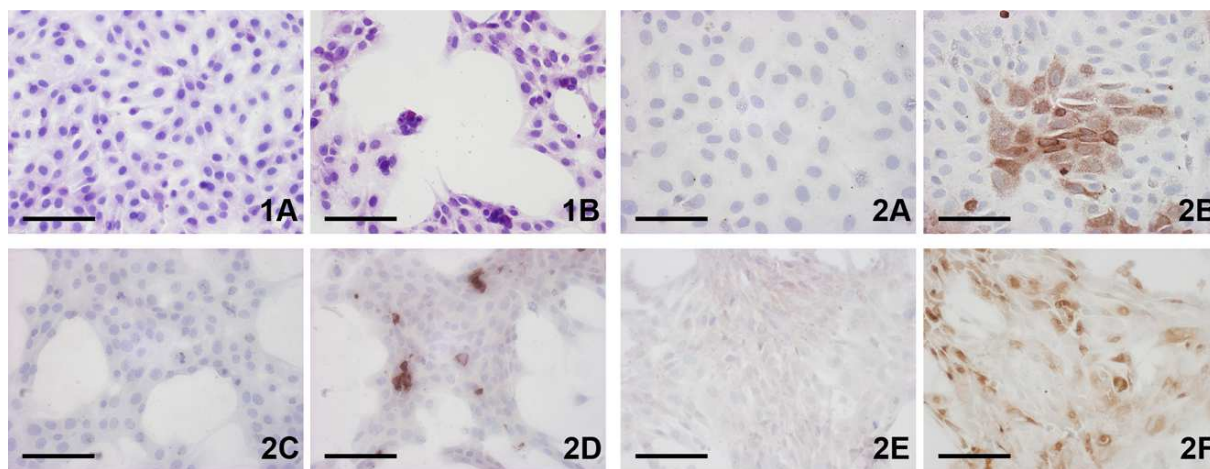
A szekvenciákat a génbanki azonosítót, a törzs nevét, a gazda/vektor latin nevét (*T. merula*: *Turdus merula* [feketerigó], *P. pipistrellus*: *Pipistrellus pipistrellus* [közönséges törpedenevér], *P. domesticus*: *Passer domesticus* [házi veréb], *Cx.*: *Culex*, *C. caeruleus*: *Cyanistes (Parus) caeruleus* [kék cinege], *H. sapiens*: *Homo sapiens* [ember]), a származási ország nevét és a gyűjtés évét tartalmazó kódok jelölik. A kutatás során meghatározott szekvenciát szürke háttérrel emeltük ki. Az 1000 újramintázásos bootstrap-analízis százalékos értékeit az elágazásoknál feltüntettük (az 50% feletti értékeket). A genetikai távolságot a bal alsó sarokban található vonal mutatja.

3.1.3. Az Usutu vírus gazdaspektruma és patogenitása

3.1.3.1. Az Usutu vírus *in vitro* sejt-spektruma

Az USUV *in vitro* szaporodóképességét 13 permanens sejtvonal (Vero E6, PK-15, HeLa, ED, MDBK, RK-13, MDCK, DK, CRFK, BHK-21, BF, C6 és TH1) és három primaer szövettany (csikó vese, lúd embrió fibroblaszt és csirke embrió fibroblaszt) sejtein vizsgáltuk (Bakonyi és mtsai., 2005b). Az egybefüggő, egyrétegű tenyészeteket képező sejteket az USUV 939/01 törzs háromszoros mennyiségével (MOI – multiplicity of infection) oltottuk és 3-5 napig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket fixáltuk, hematoxylin-eosinnal festettük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk sejtkárosító hatások (CPE) jelenlétére. A vírusfehérjék kimutatására immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A fertőzést követő 2-4. napon kifejezett CPE volt megfigyelhető a Vero E6 és PK-15 sejtvonalak, valamint a lúd embrió fibroblaszt szövettany sejtjein. Az első, gócos sejtlekerekedéseket a 2-3. napon lehetett megfigyelni 4-8 sejtes csoportokon (13. ábra). A lekerekedett sejtek 24 órán belül

elszakadtak a tenyésztőedény falától és a tápfolyadékban sodródtak. 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. Ezt követően mind a fertőzött, mind a fertőzetlen tenyészetekben degeneratív folyamatokat figyeltünk meg, így a további vizsgálatnak nem volt értelme. Az immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével a csirkeembrió fibroblaszt szövettenyészet kivételével mindegyik vizsgált sejttypusban ki lehetett mutatni az USUV antigénjeinek jelenlétét. Az pozitív sejtek gyakorisága ugyanakkor jelentős eltéréseket mutatott (pl. DK – a sejtek kb. 1%-a, lúd embrió fibroblaszt – a sejtek kb. 50%-a) (13. ábra, 12. táblázat).



13. ábra: USUV fertőzés hatására kialakuló sejtlekerekedés és a vírusantigén kimutatása immunhisztokémiai módszerrel fertőzött sejtekben

1A: fertőzetlen kontroll Vero E6 sejttenyészet; 1B: USUV fertőzött Vero E6 sejttenyészet. Hematoxylin-eosin festés a fertőzést követő 4. napon. Lépték: 100 μ m,

2A: fertőzetlen kontroll Vero E6 sejttenyészet; 2B: USUV fertőzött Vero E6 sejttenyészet. Immunhisztokémiai festés a fertőzést követő 3. napon. Lépték: 50 μ m

2C: fertőzetlen kontroll CR sejttenyészet; 2D: USUV fertőzött CR sejttenyészet. Immunhisztokémiai festés a fertőzést követő 3. napon. Lépték: 100 μ m

2E: fertőzetlen kontroll lúd embrió fibroblaszt szövettenyészet; 2F: USUV fertőzött lúd embrió fibroblaszt szövettenyészet. Immunhisztokémiai festés a fertőzést követő 3. napon. Lépték: 100 μ m

12. táblázat: Az USUV antigén előfordulása a fertőzött sejtenyészetekben

Sejttípus	Vero	HeLa	PK-15	ED	RK-13	MDCK	TH-1	ló vese ²
IHC ¹	++	++	++	++	++	++	++	++
Sejttípus	lúd embrió ²	MDBK	CR	BHK-21	BF	C6	DK	csirke embrió ²
IHC ¹	++	+	+	+	+	+	(+)	-

¹Szemi-kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálat: (+): 1-5% pozitív sejt; +: 6-25% pozitív sejt; ++: 26-50% pozitív sejt.

²Primaer szövetenyszövetek

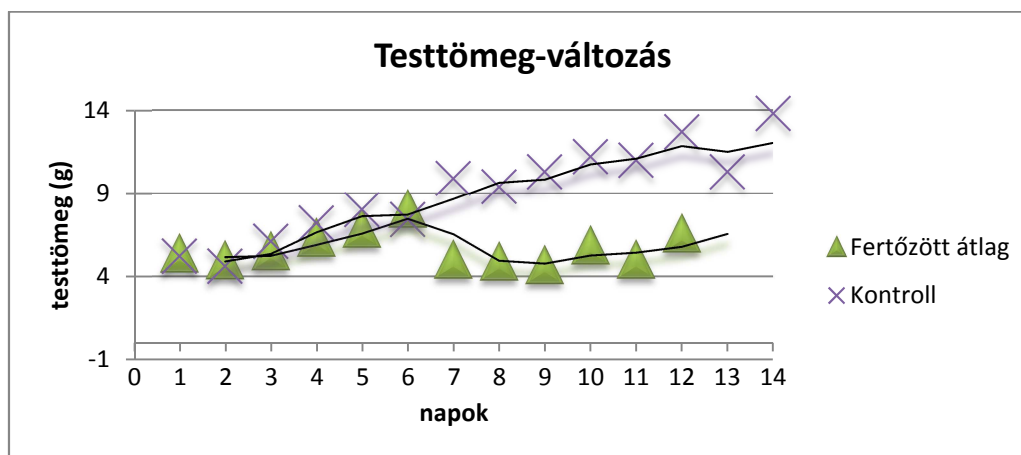
3.1.3.2. Az Usutu vírus patogenitása szopósegérben

Az USUV egér-patogenitását egy hetes egerek kísérletes fertőzésével vizsgáltuk (Weissenböck és mtsai., 2004). Előkísérletek segítségével megállapítottuk, hogy a 939/01 jelű USUV törzs 1.000 TCID₅₀ mennyiségű vírust tartalmazó szuszpenzióját intraperitoneálisan oltva az egerek következetesen megbetegsznek. Két hetes egerekben nem alakultak ki tünetek az említett dózissal. 100 TCID₅₀ dózisú vírussal a mortalitás nem érte el az 50%-ot. Intracraniális oltással (1.000 TCID₅₀) 3 hónapos korú egerek is megbetegedtek. Az első főkísérlet során a fertőzést követően 12 óránként megfigyeltük a klinikai tünetek kialakulását és jellegét, valamint minden napon két fertőzött és egy kontrol egeret feldolgoztunk. A fertőzést követő 5. napig az egerek egyike sem mutatott klinikai tüneteket. A 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 (paraparesis) és bénulása (paralysis), majd kóma alakult ki (14. ábra). A végső stádiumú tüneteket mutató állatokat extermináltuk.



14. ábra: USUV fertőzött, 13 napos egerek klinikai tünetei a fertőzést követő 6. napon

A fertőzött állatok testtömeg-gyarapodása a klinikai tünetek megjelenésekor megállt és az állatok fogyni kezdtek (15. és 16. ábra). A fertőzetlen kontroll egerek nem mutattak klinikai tüneteket és testtömeg-gyarapodásuk trendje emelkedő maradt (15. és 16. ábra).



15. ábra: Usutu vírussal fertőzött és fertőzetlen kontroll egerek testtömegei a feldolgozásuk napján

A fertőzött egerek testtömeg-átlagát az adott napon feldolgozott (exterminált vagy elhullott), ép állatok testtömeg-adataiból számoltam. A görbék a mozgó átlagok alapján számított trendvonalak.



16. ábra: USUV fertőzött és fertőzetlen kontroll, 18 napos egerek testméret eltérése a fertőzést követő 11. napon.

Alul USUV fertőzött egér, felül fertőzetlen kontroll alomtársa

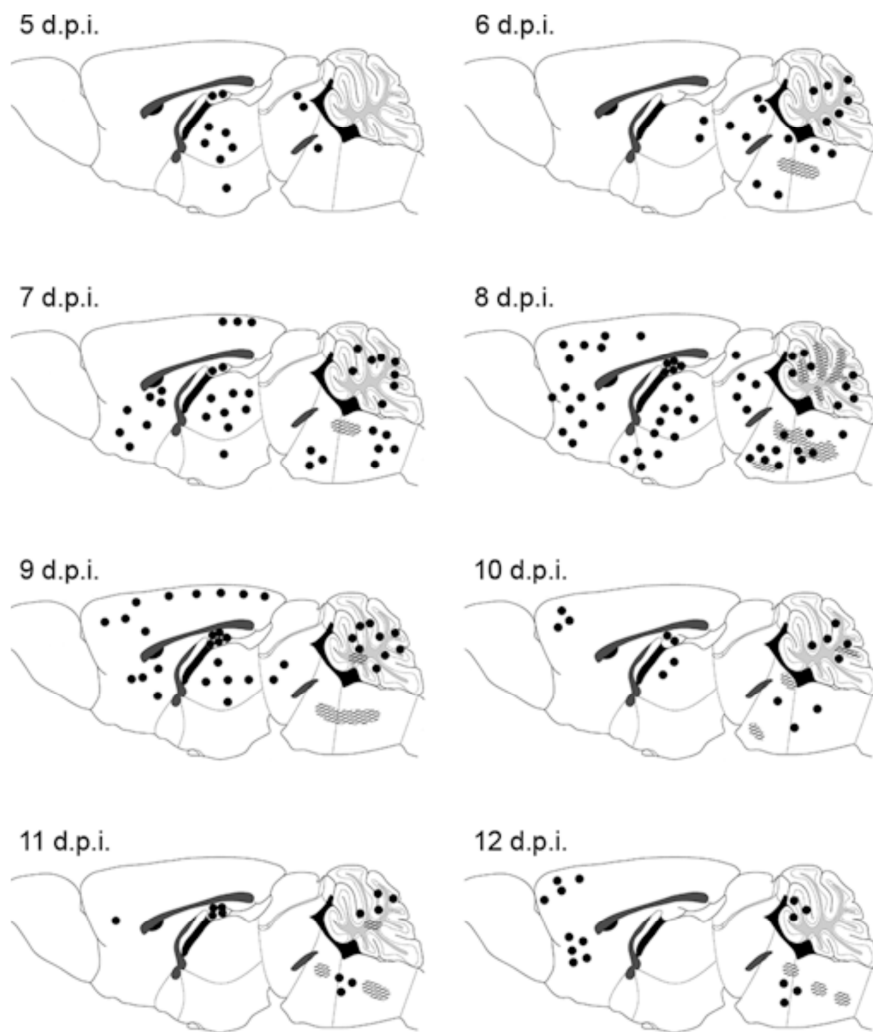
A második főkísérletben a fertőzés hatására kialakuló gerincvelői elváltozásokat kívántuk részletesebben vizsgálni. A fertőzött egerek (n=10) mindegyike megbetegedett és a fent leírt tüneteket mutatta a 6-9. napon. Négy egeret a 7., három-három egeret a 8. és 9. napon dolgoztunk fel.

A központi idegrendszer kórszövettani vizsgálatainak eredményei alapján a fertőzetlen kontroll egerekben és a fertőzést követő negyedik napig a fertőzött egerek egyikében sem voltak kóros elváltozások, az apoptotikus sejtek (TUNEL vizsgálattal pozitív sejtek) száma 100× nagyítás mellett

nem haladta meg látóterenként az ötöt, valamint nem lehetett kimutatni a vírus antigénjeit immunhisztokémiai módszerrel és a vírus nukleinsavát *in situ* hibridizációval. Az ötödik naptól a leölt vagy elhullott, fertőzött egerek agyában gócos vagy diffúz idegsejt elhalást (sejtmag zsugorodása, magállomány rögzös szétesése, citoplazma erős festődése) 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 nyúltagyban. Az elváltozások mértéke jelentős egyedi változatosságot mutatott. Az elváltozások helyeződését a 17. ábra szemlélteti. 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 megfogyatkozását, ami *primaer* 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.

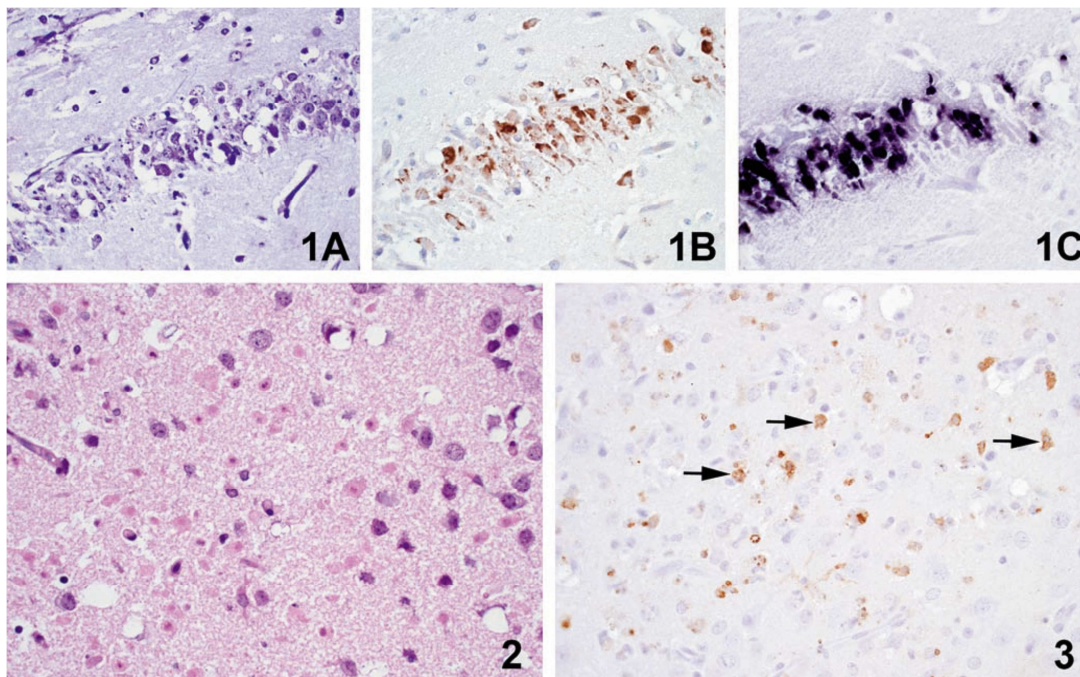
A második főkísérlet során gyűjtött mintákban az agyi elváltozások megegyeztek a fent ismertetettekkel (18. ábra). A gerincvelőben enyhe fokú idegsejt-elhalást lehetett megfigyelni, különösen a ventrális szarvakban és jelentősebb demyelinizációt, főként a dorsalis szarvakban. Apoptosisra utaló elváltozások voltak a fehérállományban. A demyelinizáció nem járt az axonok károsodásával és nem jelentek meg számottevő mennyiségben gyulladásos sejtek a gerincvelőben sem.

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 vírusherfőzött és apoptotikus területek általában egybeestek, de a vírussal fertőzött sejtek száma jelentősen meghaladta az apoptotikus sejtekét. A Purkinje sejtek gyakran voltak vírusherfőzöttek 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 szarvai neuronjainak citoplazmaiban lehetett megfigyelni. Emellett gócosban 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. A fertőzetlen kontroll állatok szervei RT-PCR vizsgálattal is negatívnak bizonyultak.



17. ábra: USUV fertőzött egerek agyi elváltozásainak helyeződése

Elváltozások a fertőzést követő (d.p.i.) 5.-12. napon. A pettyek száma az elváltozások (idegsejt apoptózis és elhalás) mértékével és a vírus jelenlétével arányos. A demyelinizációval érintett területeket szürke hálós minta jelzi.



18. ábra: Kórszövettani elváltozások Usutu vírussal fertőzött egerek agyában

1A: Idegsejt-elhalás a hippocampus CA1 régiójában a fertőzést követő 8. napon; Nissl (krezil-ibolya) festés. 1B: Az 1A képen bemutatottal szomszédos metszeten USUV antigének kimutatása immunhisztokémiai festéssel. 1C: Az 1A képen bemutatottal szomszédos metszeten USUV nukleinsav kimutatása *in situ* hibridizációs próbával. 270× nagyítás

2: Jelentős neuron-elhalás (fokozott citoplazma festődés, karyopyknosis, karyolysis) a thalamus területén. A fertőzést követő 9. napon; hematoxylin-eosin festés, 260× nagyítás.

3: Számos apoptotikus (TUNEL pozitív) sejt a thalamusban. A festődés olykor a teljes sejtben megfigyelhető (rámutató nyilak). A fertőzést követő 7. napon; TUNEL festés, 260× nagyítás.

3.1.3.3. Az Usutu vírus patogenitása házityúokban

Az USUV szaporodó- és kórokozó képességét házityúokban (*Gallus domesticus*) két hetes SPF csirkék kísérletes fertőzésével vizsgáltuk (Chvala és mtsai., 2005). A madarakat 1.000 TCID₅₀ mennyiségű vírussal fertőztük intravénás oltással. A fertőzött csirkéket fertőzetlen kontroll madarakkal együtt tartottuk, megfigyeltük őket és a 2.6. fejezetben leírt protokoll szerint mintákat vettünk belőlük. A mintákat vizsgáltuk az USUV fertőzöttség jelenlétére RT-PCR módszerrel, immunhisztokémiai festéssel és vírusizolálással; kórszövettani elváltozások jelenlétére, valamint a vérsavó mintákat vírusellenes ellenanyagok jelenlétére haemagglutináció gátlási próbával.

A fertőzést követő 14 napig a madarak egyike sem mutatott klinikai tüneteket. A kórbonctani vizsgálatok során a fertőzött madarakban enyhe lépmegnagyobbodást lehetett megfigyelni. Közepes vagy súlyos fokú mononukleáris gyulladásos sejtes beszűrődés fordult elő a fertőzött madarak begyének tunica muscularis rétegében és a mirigyesgyomor lamina propria részében. A fertőzést

követő 7-14. napon vizsgált csirkék lépeiben 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. A fertőzetlen (kontakt) kontroll madarak nem mutattak kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat. Vírusfehérjéket 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 kloáka tamponmintájából és egy madár 7. napon gyűjtött garat és kloáka mintájából mutattuk ki. Két madár 7. napon gyűjtött keringő fehérvérsejtjeiből is kimutattuk a vírus nukleinsav 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.

Az USUV szaporodóképességét csirkeembrióban is vizsgáltuk (Bakonyi és mtsai., 2005b). SPF állományból származó tojások allantoisz üregébe oltottunk 6×10^5 TCID₅₀ mennyiségű USUV 939/01 vírust 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 kórbonctani és kórszövettani elváltozások és az immunhisztokémiai vizsgálatok is negatív eredménnyel zárultak.

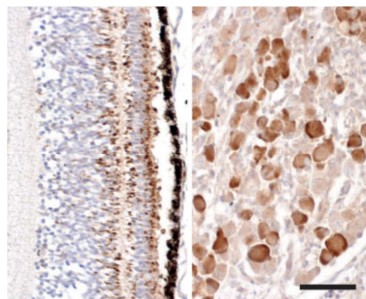
3.1.3.4. Az Usutu vírus patogenitása házilúdban

Az USUV szaporodó- és kórokozó képességét házilúdban (*Anser anser domestica*) két hetes korú, köztenyésztésből származó libák kísérletes fertőzésével vizsgáltuk (Chvala és mtsai., 2006). A madarakat 5×10^4 TCID₅₀ mennyiségű vírussal fertőztük intramuscularis oltással. A fertőzött libákat fertőzetlen kontroll madarakkal együtt tartottuk, megfigyeltük őket és a 2.6. fejezetben leírt protokoll szerint mintákat vettünk belőlük. A mintákat vizsgáltuk az USUV fertőzöttség jelenlétére RT-PCR módszerrel, immunhisztokémiai festéssel és vírusizolálással, kórszövettani elváltozások jelenlétére, valamint a vérsavó mintákat vírusellenes ellenanyagok jelenlétére haemagglutináció gátlási próbával.

A fertőzést követő 2. napon elhullott egy fertőzött és egy kontakt kontroll liba, a 3. napon pedig egy fertőzött liba. Egy további, fertőzött madár hullott el a 16. napon. A madarak az elhullás előtti napokon nem mutattak klinikai tüneteket. A reggeli vizsgálatkor elpusztulva találták őket. A kontakt kontroll madarat az állatszállóban elhelyezett játékra csavarodva találták; feltételezhetően megfulladt. A játékot az állatvédelmi szabályok előírásai szerint, környezetgazdagítási céllal helyezték el a madarak tartási helyén. A kórbonctani vizsgálatok során néhány madárban sárgásfehér gócot lehetett megfigyelni a légkamrák felszínén. Egyéb kórbonctani elváltozások nem voltak felismerhetők. Egy, a fertőzést követő 5. napon leölt madár agyában gliaszaporodást lehetett látni. A fertőzést követő 3. napon, spontán elhullott liba májában és lépében heveny, gócos coagulatív necrosis jelei látszóttak.

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 vékonybélből) lehetett még a fent említett baktériumok valamelyikét kis számban 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 kloaka tamponmintájából 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 vírusürítőnek talált madár 10. napon (1:40 titer) és 22. napon (1:20 titer) gyűjtött mintáiból. A kontroll madarak mindegyike szeronegatív maradt.

Az USUV szaporodóképességét lúdembrióban is vizsgáltuk (Chvala és mtsai., 2006). Köztenyésztésből származó lúd tenyésztőjások allantoisz üregében oltottunk 10^4 TCID₅₀ mennyiségű USUV 939/01 vírust a keltetés 12. napján. A tojásokat további négy napig keltettük, majd kórbonctani, kórszövettani és immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk őket. Az embriókban nem fordultak elő kórbonctani és kórszövettani elváltozások. Az immunhisztokémiai vizsgálatok a vírusantigén gócos előfordulását mutatták ki egy embrió retinájában, számos autonóm idegdúcában (19. ábra), az izomszöveteiben, és kötőszöveti sejtjeiben (feltételezhetően fibroblastokban). Két másik embrióban csak az izomszövetben, és kötőszövetben találtunk immunhisztokémiával pozitív sejteket. Egy további embrió vese tubuláris hámsejtjei és kötőszöveti sejtjei mutattak pozitivitást. A fertőzetlen kontroll embrió immunhisztokémiai vizsgálata negatív eredménnyel zárult.



19. ábra: USUV antigén kimutatása lúdembrió szöveteiben immunhisztokémiai módszerrel

Bal oldali kép: retina, jobb oldali kép: autonóm idegdúc. A fertőzést követő 4. napon. Avidin-biotin jelöléses módszer, lépték: 54 μ m

3.2. A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálataink eredményei

3.2.1. A nyugat-nílusi vírus genetikai változatossága, európai előfordulása és terjedése

3.2.1.1. A nyugat-nílusi vírus 2000 előtt izolált, európai törzseinek genetikai jellemzése

A nyugat-nílusi vírus első hazai izolálásáról a '70-es években, arbovírusok előfordulására irányuló góckutatásokkal kapcsolatban számoltak be (Molnár és mtsai., 1982). Az 1972-ben Gic környékén gyűjtött erdei pocok (*Clethrionomys glareolus*) mintából a Csehszlovák Tudományos Akadémia pozsonyi virológiai intézetében izolált, és az Országos Epidemiológiai Központ (Budapest) részére visszajuttatott törzs (WN_{m1}, „Gresiková”) 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 (génbanki azonosító AF260968 és EU081844) mutatták. A vizsgált szakaszokon a WN_{m1} jelű törzs szekvenciája 4 nukleotidban (A₁₁₉₁G, T₁₆₂₉C, T₃₆₅₇G, T₄₀₇₇C) tér el a referencia törzstől. A szubsztitúciók egyike sem eredményezett változást a vírus származtatott aminosav szekvenciájában (Bakonyi és mtsai., 2004a).

A dél-kelet morvaországi Lanzhot településtől kb. 10 km-re, a cseh-osztrák határ közelében 1997-ben egy flavivírust izoláltak nőstény *Cx. pipiens* szúnyogokból (Hubálek és mtsai., 1998). Az izolátum (azonosító: 97-103) vírusneutralizációs vizsgálatokkal a nyugat-nílusi vírushoz mutatta a legnagyobb antigénrokonságot, szopós egerekben intracraniális oltásával viszont csekélyebb virulenciát mutatott, mint a WNV referencia törzse (Eg 101). A törzset az izolálásához 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 (törzs azonosító: 99-222) (Hubálek és mtsai., 2000.). A vírus részletes genetikai jellemzése céljából meghatároztuk a 97-103 vírustörzs teljes genomszekvenciáját RT-PCR segítségével felerősített, átfedő genomszakaszok direkt szekvenálásával. A vizsgálatok során feltárt, 10972 nukleotid hosszúságú vírusgenom BLAST vizsgálattal 78-90% hasonlóságot mutatott a génbanki adatbázisokban hozzáférhető WNV szekvenciákhoz. A vírusgenom egy 3433 aminosav hosszúságú nyitott leolvasási keretet kódol a 97. nukleotid pozícióval kezdődően. A származtatott aminosav szekvencia vizsgálatával meghatároztuk az egyes vírusfehérjék lokalizációját: Az anchored C fehérje a 97–465 nt pozícióban kódolt, amelyen belül a C fehérje génje a 97–411 nt között található. A preM fehérje génje a 466–966 nt közötti szakaszon van, amelyen belül az M fehérje a 742–966 nt pozíciókban kódolt. Az E fehérje génjét (nt 967–2469) a nem szerkezeti fehérjék génjei követik, az alábbi sorrendben: NS1 (nt 2470–3525), NS2a (nt 3526–4218), NS2b (nt 4219–4611), NS3 (nt 4612–6468), NS4a (nt 6469–6846), 2K (nt 6847–6915), NS4b (nt 6916–7680) és NS5 (nt 7681–10395). A JEV szerokomplex vírusaira jellemző, konzervált szekvencia motívumokat (Cys-reziduumok az E és NS1 fehérjék diszulfid hídjaihoz, az E fehérje integrin kötőhelye, az NS3 fehérje szerin proteáz katalitikus triádja és

szubsztrát kötőhelye, az NS3 fehérje helikáz motívuma és az NS5 fehérje RdRp motívuma, ld. 3.1.1.1 fejezet) 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 (JEV, MVEV, USUV) és részleges (SLEV, ALFV, CPCV, KOUV, YAOV; NS5 gén) szekvenciáival (13. táblázat). A nukleotid hasonlósági értékeket a 14. táblázat mutatja be.

13. táblázat: A szekvencia összehasonlításokba és filogenetikai analízisbe bevont, JEV szerokomplexhez tartozó flavivírusok adatai

Vírus (törzs) név	Jelölés	GenBank azonosító*	Izolálás			WNV genetikai vonal
			éve	gazdafaj	földrajzi eredet	
WNV HNY1999	NY99a	AF202541	1999	ember	New York	1a
WNV NY99flamingo38299	NY99b	AF196835	1999	flamingó	New York	1a
WNV IS98-ST1	Is98	AF481864	1998	fehér gólya	Izrael	1a
WNV Italy1998Equine	It98	AF404757	1998	ló	Olaszország	1a
WNV RO9750	Ro96	AF260969	1996	<i>Cx. pipiens</i>	Románia	1a
WNV VLG4	Rus99a	AF317203	1999	ember	Volgográd	1a
WNV LEIV-Vlg99-27889	Rus99b	AY277252	1999	ember	Volgográd	1a
WNV PaH001	Tu97	AY268133	1997	ember	Tunézia	1a
WNV PaAn001	Fr00	AY268132	2000	ló	Franciaország	1a
WNV Eg101	Eg51	AF260968	1951	ember	Egyiptom	1a
WNV Chin-01	Chin01	AY490240	ismeretlen	ismeretlen	Kína	1a
WNV Kunjin MRM61C	Kunjin	D00246	1960	<i>Cx. annulirostris</i>	Ausztrália	1b
WNV Sarafend	Sarafend	AY688948	(B956 derivátum, labortörzs)			2
WNV B956 (WNFCG)	Ug37	M12294	1937	ember	Uganda	2
WNV LEIV-Krmd88-190	Rus98	AY277251	1998	<i>Dermacentor marginatus</i>	Kaukázus	4?
Rabensburg virus (97-103)	RabV	AY765264	1997	<i>Cx. pipiens</i>	Csehország	3?
Japanese encephalitis virus	JEV	NC_001437	–	–	–	–
Murray Valley encephalitis virus	MVEV	NC_000943	–	–	–	–
Usutu virus	USUV	AY453411	–	–	–	–
Saint Louis encephalitis virus	SLEV	AF013416	–	–	–	–
Alfuy virus	ALFV	AF013360	–	–	–	–
Cacipacore virus	CPCV	AF013367	–	–	–	–
Koutango virus	KOUV	AF013384	–	–	–	–
Yaounde virus	YAOV	AF013413	–	–	–	–

* A részleges nukleotid szekvenciákat (NS5 gén) dőlt betűvel jelöltük.

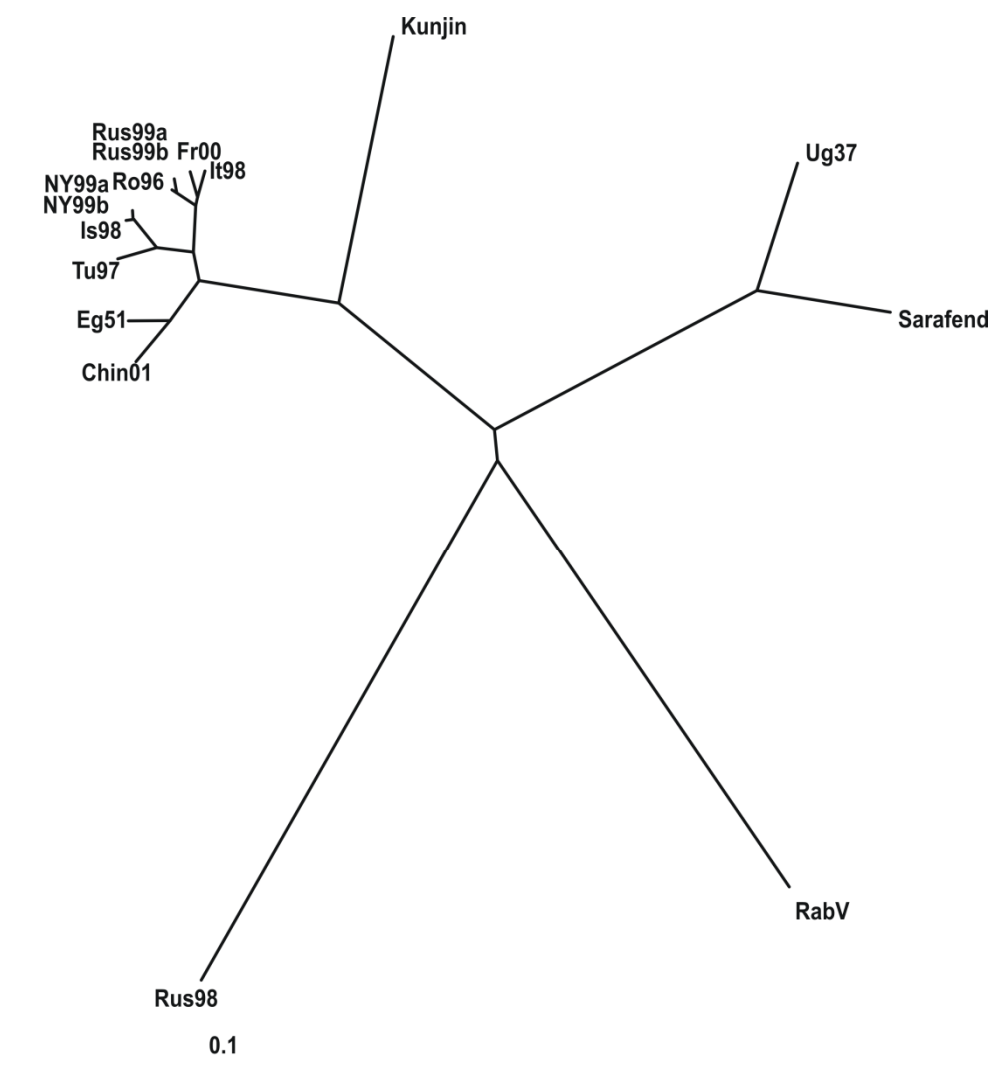
14. táblázat: Nukleinsav és aminosav szekvencia hasonlóságok a Rabensburg vírus és más, JEV-szerokomplexhez-tartozó flavivírusok között

Jelölés	WNV genetikai vonal	hasonlóság a RabV-hoz (%)			
		nukleotid		aminosav	
		teljes	részleges ^a	teljes	részleges ^b
NY99a	1a	77	78	90	95
NY99b	1a	77	78	90	95
Is98	1a	77	78	90	95
It98	1a	77	78	90	95
Ro96	1a	77	78	90	95
Rus99a	1a	77	78	90	95
Rus99b	1a	77	78	90	95
Tu97	1a	76	78	90	95
Fr00	1a	77	78	90	95
Eg51	1a	77	78	90	95
Chin01	1a	77	78	90	95
Kunjin	1b	75	77	89	94
Sarafend	2	77	78	90	96
Ug37	2	77	78	90	96
Rus98	4 (javasolt)	73	77	87	95
JEV	–	68	74	75	86
MVEV	–	69	74	76	86
USUV	–	68	72	75	83
SLEV	–	–	71	–	78
ALFV	–	–	74	–	88
CPCV	–	–	71	–	79
KOUV	–	–	76	–	90
YAOV	–	–	75	–	87

^a A 9067 – 10101 nt pozíciók közötti szakasz alapján.

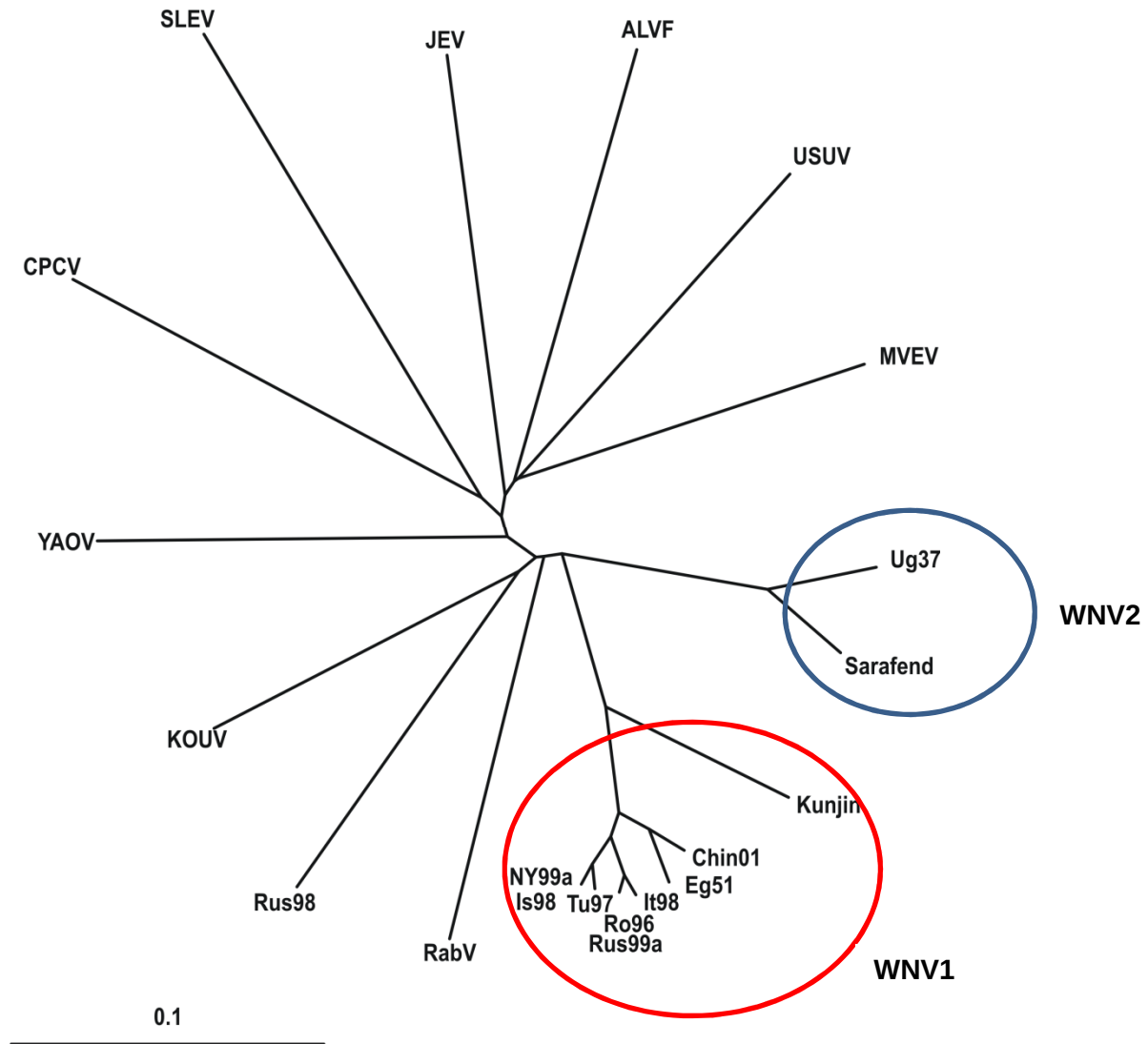
^b A 2991 – 3335 aa pozíciók közötti szakasz alapján.

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 rokonsági viszonyok pontosabb feltárása érdekében filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a WNV teljes genomszekvenciák és a JEV-szerokomplex vírusainak részleges genomszekvenciáinak felhasználásával. A WNV szekvenciák filogenetikai elemzésének eredményét a 20. ábra szemlélteti, a JEV-szerokomplex vírusai filogenetikai elemzésének eredményét a 21. ábra mutatja be.



20. ábra: Nyugat-nílusi vírusok teljes genomszekvenciáinak felhasználásával készült törzsfa.

Neighbor-joining módszerrel készített, gyökértelen törzsfa. A vírusok adatait a 13. táblázat tartalmazza. A lépték a genetikai távolságot mutatja.



21. ábra: A JEV-szerokomplexbe sorolt flavivírusok részleges genomszekvenciáinak felhasználásával készült törzsfa.

Az NS5 gén részleges szekvenciái alapján, neighbor-joining módszerrel készített, gyökértelen törzsfa. A vírusok adatait a 13. táblázat tartalmazza. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

A filogenetikai vizsgálatok eredményéből kitűnik, hogy a Rabensburg vírus genetikailag jelentősen eltér a WNV két, korábban ismert genetikai vonalához tartozó vírusoktól. 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, hogy egy másik, WNV-ként azonosított vírustörzs („Rus98”, WNV LEIV-Krnd88-190) 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 (Prilipov és mtsai., 2002, Lvov és mtsai., 2004). Az NS5 gén részleges nukleotid szekvenciái segítségével készített törzsfá alapján a RabV monofiletikus csoportot alkot a WNV lineage 1 és lineage 2 törzseivel. A Rus98 törzsnek legközelebbi közös őst a Koutango vírussal valószínűsíti a vizsgálat. A Koutango vírust eredetileg Kemp gerbilből (*Tatera kempii*) izolálták 1968-ban, Szenegálban, ám később egyéb rágcsálókból és kullancs fajokból (*Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Alectorobius*) is kimutatták előfordulását Afrikában.

A RabV 1999-ben izolált törzsének (99-222) részleges genomszekvenciáját meghatároztuk. A feltárt 3656 nt hosszúságú szakasz a 117–752 (C-M gének), 5294–5536 (NS3 gén), 5565–6343 (NS3 gén), 7321–8112 (NS4b-NS5 gének) és 9095–10305 (NS5 gén) nukleotid pozíciói közötti genomterületeket tartalmazzák. A szekvenciák >99% hasonlóságot mutatnak a 97-103 törzs szekvenciájának homológ szakaszaival. Az eltérések: C₆₀₉T, C₇₂₀A, G₅₇₂₇A, T₅₉₁₀C, T₅₉₆₁C, C₉₆₃₀A és G₉₈₄₃T. Két nukleotid szubsztitúció eredményezett aminosav szubsztitúciót (G₅₇₂₇A: Met–Ile, T₅₉₁₀C: Ile–Thr) (Bakonyi és mtsai., 2005).

A korábban kimutatott arbovírusok előfordulásának nyomon követésére a dél-morvaországi gyűjtőhelyen további szúnyogmintákat gyűjtöttek 2006 és 2008 között. Az egyik, Soutok-Hvezda település közelében, 2006. június 30.-án gyűjtött, 50 *Aedes rossicus* nőtényt tartalmazó szúnyog pool-ból sikerült vírust izolálni szopósegerek intracerebrális oltásával. A vírustörzs (06-222) kereszt-neutralizációs vizsgálatokkal a RabV-hez mutatta a legközelebbi antigén-hasonlóságot (neutralizációs indexek: RabV: 3,5; WNV Eg-101: 3,0; USUV: 1,5; DENV-1: 1,0). A 06-222 vírustörzs és a korábban említett, 99-222 törzs nukleotid szekvenciáját a 23–3114 nt pozíciók között meghatároztuk (GenBank azonosítók: GQ421358 és GQ421359) és összehasonlítottuk őket a RabV 1997-ben izolált törzsének homológ szakaszával. A szekvencia eltéréseket a 15. táblázat mutatja be. Összesen 12 szubsztitúciót lehetett felfedezni a szekvenciák vizsgálata során. A 06-222 törzsben megfigyelt A₅₈₂G mutáció a preM fehérje származtatott aminosav sorrendjében Ile₁₆₂Met szubsztitúciót eredményezett, míg a 99-222 törzsben megfigyelt A₁₃₃₀G mutáció az E fehérje származtatott aminosav sorrendjében Thr₄₁₂Ala szubsztitúciót okozott (Hubálek és mtsai., 2010).

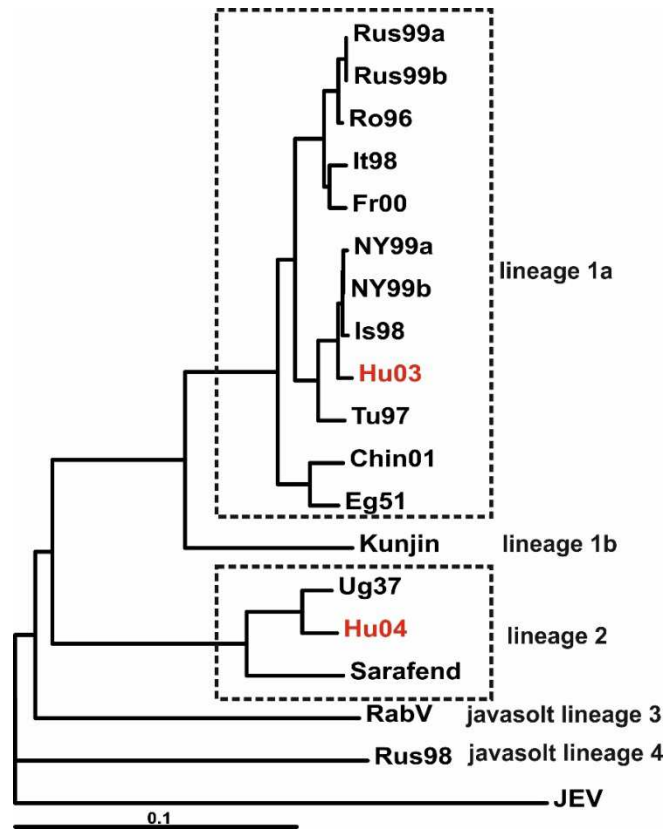
15. táblázat: Nukleotid szekvencia eltérések a Rabensburg vírus három izolátumának nt 23–3114 közötti genomszakaszán.

genom régió	5'UTR	preM				M		E			NS1	
nt	84	582	609	720	885	1330	1599	2016	2148	2247	2613	2949
pozíció												
97-103	c	a	c	c	c	a	t	t	c	t	g	c
99-222	.	.	t	a	t	g*	c	c	t	c	a	t
06-222	t	g*	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.

*: aminosav változást okozó szubsztitúciók. . : a 97-103 törzsszel megegyező nukleotid

3.2.1.2. A nyugat-nílusi vírus magyarországi felbukkanása és terjedése, törzseinek genetikai jellemzése

Egy dél-alföldi lúdállományban 2003. nyarán idegrendszeri megbetegedéseket és fokozott elhullásokat figyeltek meg 6 hetes libákban (Glávits és mtsai., 2005). A kórszövettani elváltozások és szerológiai vizsgálatok alapján nyugat-nílusi vírusfertőzés gyanúja merült fel, viszont a vírust sem Vero sejtvonalon, sem embrionált tyúktörzsben, sem szopósegér agyvelőbe oltással nem sikerült izolálni. A JEV-csoport vírusai nukleinsavának kimutatására alkalmas primerpárral (Weissenböck, 2002) vizsgáltuk elhullott libák agyvelő homogenizátumaiból kivont RNS-t RT-PCR segítségével és több mintánál is specifikus amplifikációs terméket detektáltunk. A termék szekvenciájának meghatározását követő BLAST keresés a WNV IS-98 ST1 (GenBank azonosító: AF481864) törzshöz, valamint az Egyesült Államokban 1999-ben felbukkanó vírustörzsek szekvenciáihoz találta azt leginkább hasonlónak (4/673 nt szubsztitúció) (Glávits és mtsai., 2005). Az IS-98 ST1 vírustörzset Izraelben izolálták 1998-ban fehér gólyából (Malkinson és mtsai., 2002). A vírus (WNV goose-Hungary/03) részletes genetikai jellemzése céljából meghatároztuk a teljes genomsekvenciáját, tüneteket mutató ludak agyvelő-homogenizátumaiból kivont vírusRNS átfedő primerpárokkal végzett RT-PCR-es felerősítését követő direkt szekvenálással. A vírus genomját 10969 nukleotid alkotja (GenBank azonosító: DQ118127), amely egy nyitott leolvasási keretet tartalmaz a 97. és 10398. nukleotidok között, és 3434 aminosav hosszúságú polipeptidet kódol. A teljes genom nukleotid szinten 98%-ban, származtatott aminosav szekvencia illesztéssel 99%-ban hasonlított az IS-98 ST1 törzs és az 1999-ben az Egyesült Államokban kimutatott WNV törzsek szekvenciáihoz. A teljes genomsekvenciák bevonásával végzett filogenetikai vizsgálat eredménye azt mutatja (22. ábra), 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 aelkülönülő, közös genetikai ágat alkottak (Bakonyi és mtsai., 2006).



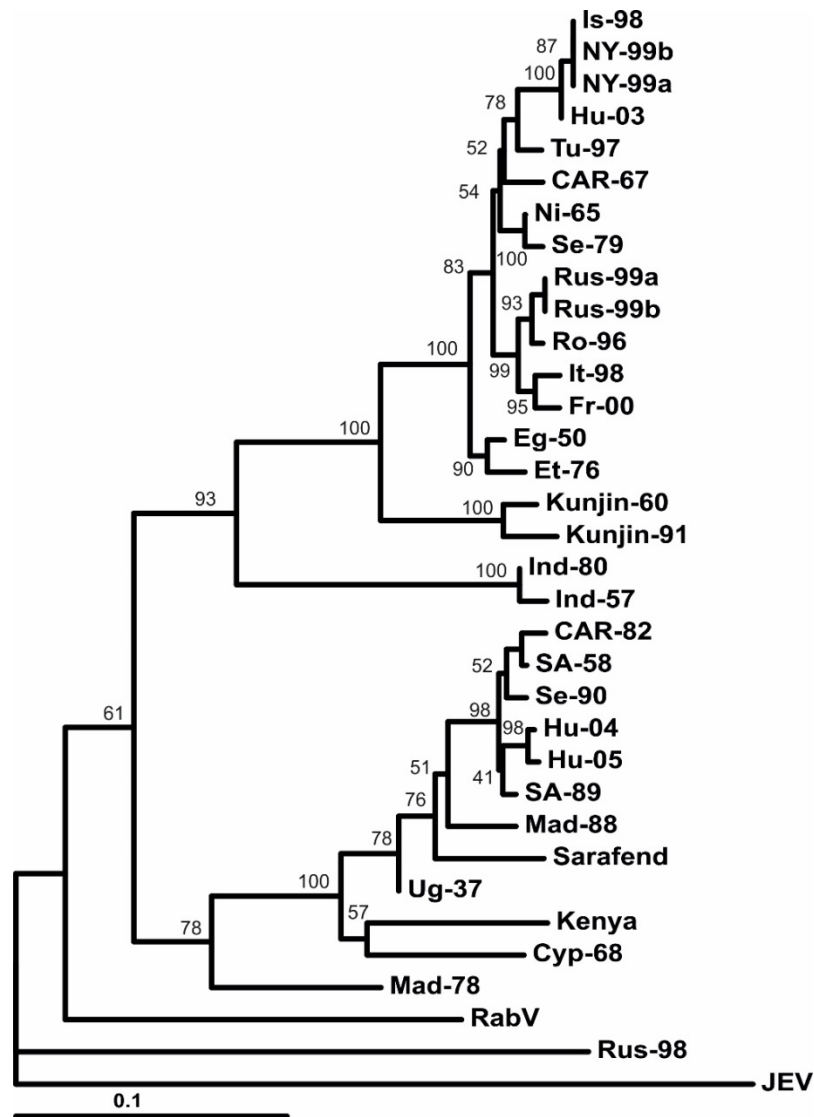
22. ábra: Magyarországon 2003-ban libából (Hu03) és 2004-ben héjából (Hu04) kimutatott nyugat-nílusi vírusok teljes genomszekvenciáinak rokonsági viszonyait ábrázoló törzsfa.

Neighbor-joining módszerrel készített filogram. A vírusok adatait a 13. táblázat tartalmazza. A vírus 1a és 2 genetikai vonalainak megfelelő csoportokat szaggatott vonalas négyzetek keretezik. A magyarországi vírusok szekvenciáit piros színnel emeltem ki. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

A ludakban megfigyelt nyugat-nílusi encephalitis járványkitörést követő év (2004.) augusztusában egy központi idegrendszeri tüneteket mutató fiatal héját (*Accipiter gentilis*) találtak a Körös-Maros Nemzeti Park munkatársai. A gyógykezelési próbálkozások ellenére a madár elhullott. A kórszövettani vizsgálatok felvetették a nyugat-nílusi vírushatás gyanúját. A WNV antigének kimutatására irányuló immunhisztokémiai, és a nukleinsav kimutatását célzó RT-PCR vizsgálatok pozitív eredménnyel zárultak. Az amplifikációs termék szekvenciája ugyanakkor eltért a 2003-ban, lúdból kimutatott vírustól és a WNV ugandai prototípus törzséhez („Ug37”, B956) mutatta a legnagyobb genetikai hasonlóságot. A vírustörzs részletes genetikai jellemzése céljából az Ug37 genomszekvencia alapján tervezett primerek segítségével meghatároztuk a vírus teljes genomszekvenciáját. A vírus (WNV goshawk-Hungary/04) genomját 11028 nukleotid alkotja (GenBank azonosító: DQ116961). A nyitott leolvasási keret a 97. és a 10401. nukleotid között kódolja a 3434 aminosavból álló prekursor poliproteint. A szekvencia BLAST kereséssel a B 956 törzs, a WNV kettes genetikai vonalának

prototípus törzse 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 (AnB3505, 1972-ben izolált, GenBank azonosító: AF001563 és HB83P55, 1983-ban izolált, GenBank azonosító: AF001557), az E fehérje gén részleges nukleotid szekvenciái álltak rendelkezésre (Berthet és mtsai., 1997). Ezek a szekvenciák 97-98%-ban hasonlítottak, a származtatott aminosav szekvenciák 100%-ban megegyeztek a hazai héjából kimutatott vírus szekvenciájának homológ szakaszával. A teljes genomszekvencia filogenetikai vizsgálatának eredménye (22. ábra) is megerősítette, hogy a héjából kimutatott WNV a vírus lineage 2 genetikai vonalához tartozik (Bakonyi és mtsai., 2005a). 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 héja és két beteg karvaly (*Accipiter nisus*) közül két héja és egy karvaly elhullott. Az elhullott madarak idegrendszeréből és a túlélő madarak fehérvérsejtjeiből ki lehetett mutatni a WNV nukleinsavát. A genom részleges nukleotid szekvenciája (NS5-3'UTR régió, ~1000 nt) csupán egy nukleotidban (G₉₃₇₅A) tért el a 2004-ben kimutatott vírusétól (Bakonyi és mtsai., 2005a). Az esetek részletesebb vizsgálata során a vírus hosszabb (1918 nt) genomszakaszának szekvenciáját határoztuk meg (a 9076 és 10993 nukleotid pozíciók között; GenBank azonosító: EF116943) ami további három nukleotid szubsztitúció (A₁₀₂₆₉T, C₁₀₃₉₆T és A₁₀₅₃₉C) jelenlétét tárta fel az NS5 gén és a 3'UTR régiók területén. A 2003-2005 között hazai esetekből kimutatott nyugat-nílusi vírusok nukleotid szekvenciáit az említett, NS5-3'UTR régióban filogenetikai analízisnek vetettük alá a génbankban a vizsgálat időpontjában hozzáférhető, homológ pozíciójú szakaszok bevonásával (16. táblázat). A neighbor-joining módszerrel készített törzsfát a 23. ábra mutatja be (Erdélyi és mtsai., 2007).

Kutatásaink későbbi szakaszában alkalmunk nyílt megvizsgálni egy olyan héja tetemét is, amely 2003-ban hullott el a Körös-Maros Nemzeti Parkban, és a park egyik munkatársa fagyasztott állapotban tárolta (valószínűleg későbbi preparálás céljából). Ennek a madárnak az agyvelő mintájából is ki lehetett mutatni a kettes genetikai vonalhoz tartozó vírustörzs nukleinsavának jelenlétét (nem közölt adat).



23. ábra: Magyarországon 2003-ban libából (Hu03), valamint 2004-ben (Hu04 és 2005-ben héjából (Hu05) kimutatott nyugat-nílusi vírusok NS5-3'UTR genomszakaszainak rokonsági viszonyait ábrázoló törzsfa.

A vírusok adatait a 16. táblázat tartalmazza. Az elágazásoknál szereplő számok az 1000 újramintázásos bootstrap analízis segítségével generált statisztikai támogatottságok százalékos értékei. A JEV kültagként szerepelt az analízisben. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

16. táblázat: A filogenetikai analízisbe bevont nyugat-nílusi vírusok szekvenciáinak adatai

Jelölés	Vírustörzs	Kimutatás / izolálás			genetikai vonal	GenBank azonosító
		helye	éve	forrása		
CAR-67	ArB-310/67	Közép-afrikai Köztársaság	1967	szúnyog	1a	AF458343
Eg-50	Eg t101	Egyiptom	1950	ember	1a	AF458355
Et-76	EthAn4766	Etiópia	1976	madár	1a	AF458347
Fr-00	PaAn001	Franciaország	2000	ló	1a	AY268132
Hu-03	Goose-Hungary/03	Magyarország	2003	lúd	1a	DQ118127
Is-98	IS98-ST1	Izrael	1998	fehér gólya	1a	AF481864
It-98	WN Italy1998Equine	Olaszország	1998	ló	1a	AF404757
Ni-65	IbAn7019	Nigéria	1965	madár	1a	AF458348
Ro-96	RO97-50	Románia	1996	<i>Cx. pipiens</i>	1a	AF260969
Rus-99a	VLG-4	Oroszország	1999	ember	1a	AF317203
Rus-99b	LEIV-Vlg99-27889	Oroszország	1999	ember	1a	AY277252
Se-79	AnD-27875	Szenegál	1979	majom	1a	AF458350
Tu-97	PaH001	Tunézia	1997	ember	1a	AY268133
NY99a	HNY1999	USA	1999	ember	1a	AF202541
NY99b	NY99flamingo382-99	USA	1999	flamingó	1a	AF196835
Kunjin-60	MRM16 (Kunjin)	Ausztrália	1960	<i>Cx. annulirostris</i>	1b	AF458351
Kunjin-91	K6453 (Kunjin)	Ausztrália	1991	szúnyog	1b	AF458356
Ind-57	IG-15578	India	1957	szúnyog	1c	AF458353
Ind-80	804994	India	1980	ember	1c	AF458352
CAR-82	ArB3573/82	Közép-afrikai Köztársaság	1982	kullancs	2	AF458349
Cyp-68	Q3574-5	Ciprus	1968	karvalyposzáta (<i>Sylvia nisoria</i>)	2	AF458346
Hu-04	Goshawk-Hungary/04	Magyarország	2004	héja	2	DQ116961
Hu-05	Sparrowhawk-Hungary/05	Magyarország	2005	karvaly	2	EF116943
Kenya	ArNa 1047	Kenya	ismeretlen	szúnyog	2	AF196535
Mad-78	DakAnMg789	Madagaszkár	1978	madár	2	AF458358
Mad-88	ArMg-979	Madagaszkár	1988	szúnyog	2	AF458354
SA-58	SAH-442	Dél-afrikai Köztársaság	1958	ember	2	AF458359
SA-89	SPU 116-89	Dél-afrikai Köztársaság	1989	ember	2	AF458357
Sarafend	Sarafend	laboratóriumi törzs			2	AY688948
Se-90	ArD-76104	Szenegál	1990	szúnyog	2	AF458345
Ug-37	B956 (WNFCG)	Uganda	1937	ember	2	NC_001563
RabV	97-103 (Rabensburg)	Csehország	1997	<i>Cx. pipiens</i>	javasolt 3	AY765264
Rus-98	LEIV-Krmd88-190	Oroszország (Grúzia?)	1998	<i>Dermacentor marginatus</i>	javasolt 4	AY277251
JEV	Japán encephalitis vírus, JaOArS982	(nem releváns)				NC_001437

A nyugat-nílusi vírus hazai felbukkanását követően passzív és aktív felmérő vizsgálatokat végeztünk a vírus hazai előfordulásának, aktivitásának és terjedésének nyomon követése céljából. 2005-ben a vírus jelenlétét sikerült kimutatni egy idegrendszeri tünetekben elhullott juhból (Kecskeméti és mtsai., 2007) és 2007-ben egy idegrendszeri tünetek miatt leölt lóból (Kutasi és mtsai., 2011.). (Az esetek részletesebb ismertetésére a 3.2.2 fejezetben kerül sor.) Jelentős számú megbetegedést tapasztaltunk 2008. augusztus 20. és október vége között, és a vírus számottevő földrajzi terjedését figyeltük meg. Abban az évben a passzív felmérő (monitoring) vizsgálataink során 33 fajhoz tartozó 91 vadmadár tetemét vizsgáltuk meg. Emellett fehérvérsejt és vérsavó mintákat gyűjtöttünk három madárfajból (héja, házigalamb [*Columba livia*] és barna rétihéja [*Circus aeruginosus*]). 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 (17. táblázat). 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 vadmadarokból gyűjtött 20 vérsavó minta 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 gyűjtöttük, 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 országrész (a Nagyalföld déli és keleti régiói) mellett a vírust kimutattuk az ország középső és dunántúli területein is, valamint 2008. augusztus 28-án Ausztria északkeleti részén (Alsó-Ausztria tartományban) találtak egy elhullott héját, amelyből szintén ki lehetett mutatni a vírus jelenlétét (Wodak és mtsai., 2011). A vírust 2008-ban Wodak és munkatársainak további öt héjából és egy északi sólyomból, míg saját vizsgálatainkkal öt héjából, egy saskeselyűből (*Gypaetus barbatus*) és egy keából (*Nestor notabilis*) sikerült kimutatni RT-PCR és immunhisztokémiai módszerrel. Három héja szövetmintából izoláltuk a vírust. Újabb vadmadár esetek bukkantak fel 2009-ben Ausztriában: hat héja, egy kea és egy hóbagoly (*Nyctea scandiaca*) szövetmintáiból tudtuk a vírus jelenlétét kimutatni RT-PCR és immunhisztokémiai módszerekkel (Bakonyi és mtsai., 2013).

17. táblázat: Nyugat-nílusi vírusfertőzöttség kimutatása vadmadarak mintáiból Magyarországon, 2008-2009-ban.

év	madárfaj		pozitív / vizsgált szövetminta			pozitív / vizsgált vérsavó minta		
	magyar név	latin név	RT-PCR	IHC ¹	vírus izolálás	ELISA	IIF ²	PRNT
2008	héja	<i>Accipiter gentilis</i>	17 / 34*	17 / 22	13 / 17	NE	NE	NE
	északi sólyom	<i>Falco rusticolus</i>	3 / 4	3 / 4	NV	NE	NE	NE
	Harris ölyv	<i>Parabuteo unicinctus</i>	2 / 2	1 / 1	NV	NE	NE	NE
	fehér gólya	<i>Ciconia ciconia</i>	NE	NE	NE	2 / 7	2 / 7	2 / 2
2009	héja	<i>Accipiter gentilis</i>	6 / 9	6 / 9	NV	5 / 10	5 / 10	5 / 5
	vörösbegy	<i>Erithacus rubecula</i>	2 / 3	NE	NE	NE	NE	NE
	karvaly	<i>Accipiter nisus</i>	1 / 12	1 / 12	NV	NE	NE	NE
	vándorsólyom	<i>Falco peregrinus</i>	1 / 1	1 / 1	NV	NE	NE	NE
	holló	<i>Corvus corax</i>	1 / 1	1 / 1	NV	NE	NE	NE
	házipveréb	<i>Passer domesticus</i>	1 / 6	NE	NE	NE	NE	NE
	házi rozsdafarkú	<i>Phoenicurus ochruros</i>	1 / 2	NE	NE	NE	NE	NE
	foltos nádiposzáta	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	1 / 2	NE	NE	NE	NE	NE
	nádi tücsökmadár	<i>Locustella luscinioides</i>	1 / 1	NE	NE	NE	NE	NE
	házigalamb	<i>Columba livia</i>	NE	NE	NE	25 / 29	25 / 25	25 / 25
	barna kánya	<i>Milvus migrans</i>	NE	NE	NE	1 / 2	NV	NV

NV: nem vizsgált, NE: nem elérhető

¹ immunhisztokémiai módszer; ² indirekt immunfluoreszcenciás módszer

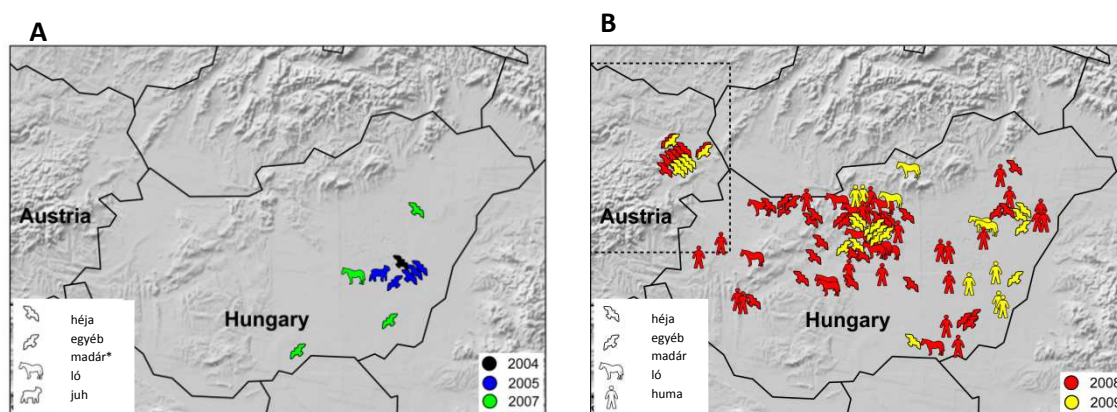
*: 22 szervminta és 12 fehérvérsejt minta. (A fehérvérsejtek immunhisztokémiai vizsgálata nem volt lehetséges)

Tekintettel arra, hogy a WNV által okozott megbetegedések egy része fokozottan védett madárfajokban fordult elő, és így természetvédelmi jelentősége is lehet, egy további kutatásban megvizsgáltuk, hogy a vírusfertőzés előfordul-e a hazánkban szintén fokozottan védett tűzok (*Otis tarda*) legnagyobb hazai populációjában. Egy átfogó állategészségügyi monitoring program részeként, tojásmintést követően a Dévaványai Tűzokmentő Állomáson keltetett és felnevelt madaraktól szabadon engedésük előtt vérmintákat gyűjtöttünk. A vérvételeket 2006-ban, 2009-ben és 2011-ben, július-augusztus hónapokban végeztük; a minták klinikailag egészséges tűzokokból származtak. A vérsavó-mintákat kompetitív IgG ELISA kittel (ID Vet) vizsgáltuk nyugat-nílusi vírus elleni ellenanyagok jelenlétére, továbbá haemagglutináció-gátlási próbával madárinfluenza vírusok és baromfipestis vírus elleni ellenanyagokra, valamint ELISA módszerrel madár orthoreovírusok elleni ellenanyagokra (IDEXX FlockCheck Avian Reovirus Antibody Test Kit). 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. Madárinfluenza vírus, baromfipestis vírus és madár orthoreovírus elleni ellenanyagok egyik mintából sem lehetett kimutatni (Sós és mtsai., 2012).

A vadmadár esetek mellett lovak halmozott idegrendszeri megbetegedéseit is megfigyeltük a 2008-2009-es járványidőszakokban: 2008-ban a vírus nukleinsavát és antigénjeit mutattuk ki egy ló fehérvérsejtjeiből, valamint két, a betegség végső stádiumában exterminált ló agyvelő-homogenizátumaiból. Egy mintából izoláltuk a vírust. 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 plak-redukciós neutralizációs próbával is megvizsgáltuk. A szerológiai vizsgálatok 12 lónál mutattak ki WNV antigénnel reaktív ellenanyagokat. 2009-ben 40 idegrendszeri tüneteket mutató ló mintáit vizsgáltuk. A vírus jelenlétét kimutattuk négy, súlyos tünetek miatt leölt 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 ellenanyag-titer emelkedést ($<1:10 - \geq 1:640$) tapasztaltunk. Egy mintából járt sikerrel a vírusizolálás. IgG ELISA módszerrel megvizsgáltunk egészséges lovakból, 2009. áprilisában és májusában gyűjtött, 92 savómintát. A lovakat 2008 őszén olyan állományokban tartották, ahol más lovakban diagnosztizált, klinikai tünetekkel járó WNV fertőzések fordultak elő. Pozitív eredményt kaptunk 34 ló (37%) mintájából. 2009. júniusában további három, 2008-ban nyugat-nílusi encephalitisserl érintett állományból származó, 184 ló savómintáját vizsgáltuk IgG ELISA módszerrel és 45 mintánál kaptunk pozitív eredményt (24%), viszont a megerősítő immunfluoreszcenciás és plak-redukciós neutralizációs próbák két savóminta esetében a kullancsencephalitis vírussal szemben magasabb titerben reagáltak, mint a WNV-vel szemben (Bakonyi és mtsai., 2013).

Az állati megbetegedésekkel nagyjából megegyező időszakban és földrajzi területeken, emberi idegrendszeri megbetegedések hátterében is igazolták a nyugat-nílusi fertőzést, szerológiai módszerekkel. Míg korábban, 2003. és 2007. között átlagosan évi hat személyben diagnosztizáltak Magyarországon (nem importált) nyugat-nílusi vírus okozta encephalitist (Krisztalovics és mtsai., 2008), a hazai emberi esetek száma is jelentősen megemelkedett 2008-ban: 22 esetet diagnosztizáltak augusztus 14. és október 28. között (Krisztalovics és mtsai., 2008), és 2009-ben hat idegrendszeri megbetegedés hátterében igazolták is a nyugat-nílusi vírus kóroki szerepét szerológiai módszerekkel. Ausztriában a 2008. és 2009. közötti időszakban sem lovakban, sem embereken nem állapítottak meg nyugat-nílusi fertőzést. A vírustörzs földrajzi terjedését a 24. ábra szemlélteti (Bakonyi és mtsai., 2013).

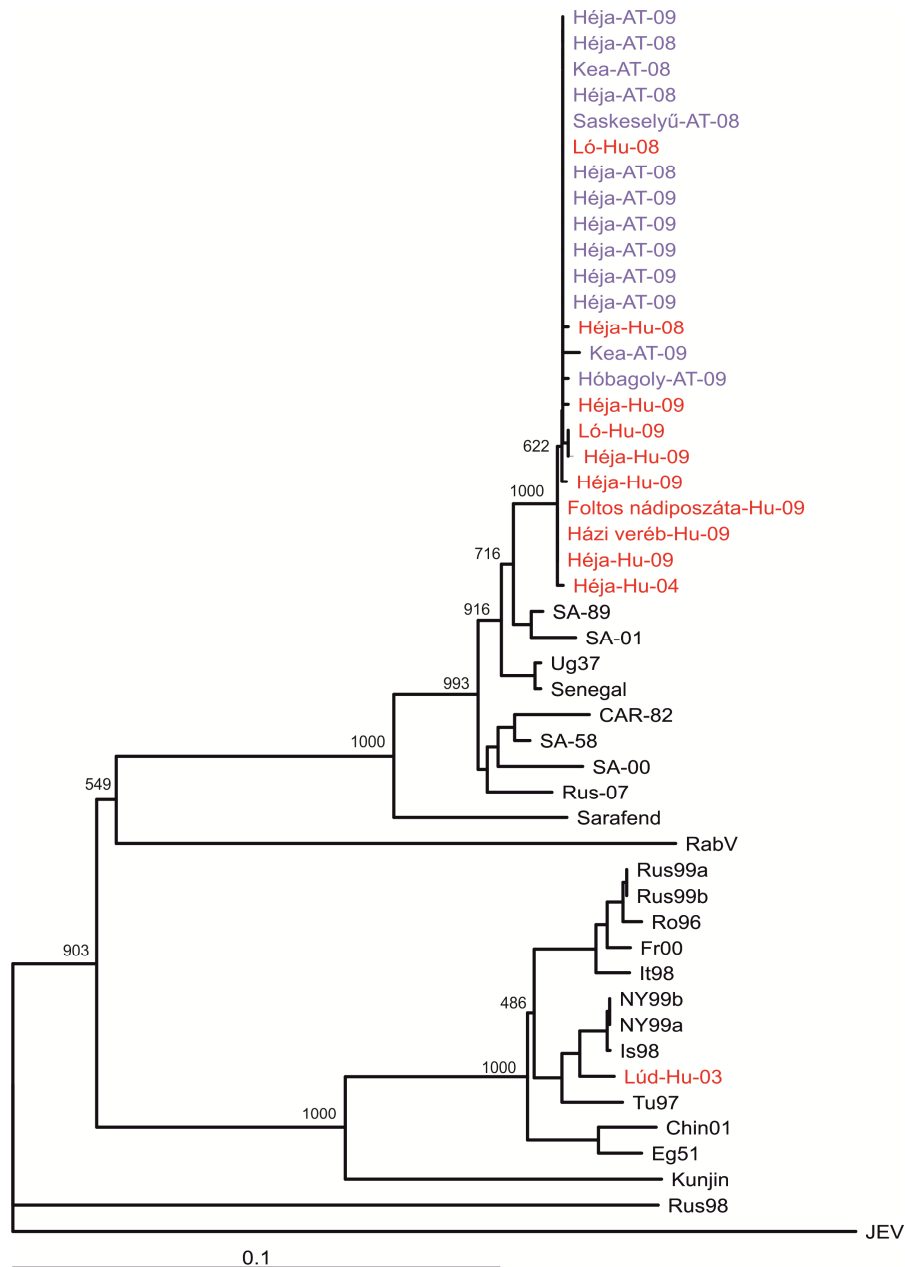


24. ábra: A lineage 2 WNV törzs földrajzi terjedése a Kárpát-medencében

A: 2004 és 2007 között diagnosztizált esetek. B: 2008-ban és 2009-ben diagnosztizált esetek. A piktogramok a gazdafajokat, a színek az éveket mutatják. *: karvaly (2003), lúd, kékvércse (2004)

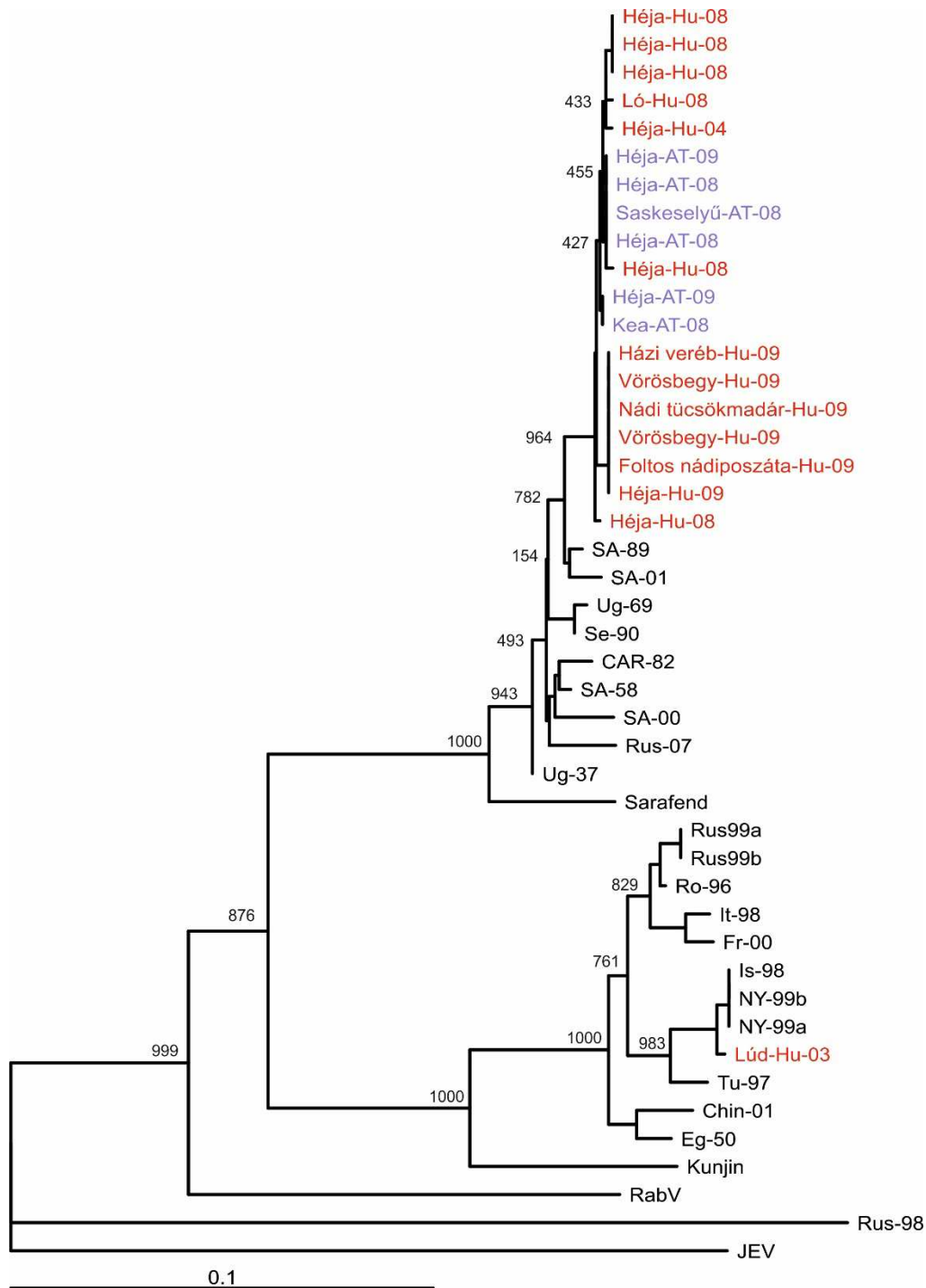
Vizsgálatokat folytattunk 2008-ban a WNV előfordulására szúnyog vektorokban is. Egy Kardoskút közelében található vörös vércse (*Falco tinnunculus*) kolóniában 2007-ben nyugat-nílusi vírust mutattunk ki fiókák tetemeiből. A fészkek közelében *Cx. pipiens* szúnyogokat gyűjtöttünk 2008. júliusában és összesen 19 db 2-25 egyedet tartalmazó pool-t vizsgáltunk és egy pool-ból tudtuk kimutatni a WNV RNS jelenlétét. Ausztriában 2008. szeptembere és októbere között Bécs, Alsó-Ausztria, Felső-Ausztria, Burgenland és Stájerország szövetségi tartományokban gyűjtött, 138 pool-ba csoportosított szúnyogminták vizsgálata során 7 db *Cx. pipiens* nőstényeket tartalmazó pool-ból lehetett kimutatni a vírus jelenlétét. Mindegyik pool Alsó-Ausztriából, a vadmadár esetek közeléből származott (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, Magyarországon kimutatott vírusokkal, meghatároztuk 22 vírusnak a részleges nukleotid szekvenciáját az E fehérje gén régiójában (nt 1617–2483): 9 vírus Magyarországról, 13 Ausztriából; 20 vadmadárból, 2 lóból; 7 szekvencia 2008-ból és 15 szekvencia 2009-ből). Ugyancsak meghatároztuk 18 vírusnak a szekvenciáját az NS5-3'UTR régióban (nt 10146–10820): 12 vírus Magyarországról, 6 Ausztriából; 17 vadmadárból, 1 lóból; 10 szekvencia 2008-ból és 8 szekvencia 2009-ből. A szekvenciákat illesztettük a korábbi vizsgálatoknál leírt WNV szekvenciákkal és neighbor-joining módszerrel filogenetikai analízist végeztünk. A legvalószínűbb rokonsági viszonyokat ábrázoló törzsfákat a 25. és 26. ábra mutatja be (Bakonyi és mtsai., 2013).



25. ábra: Az E fehérje régió részleges nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfa.

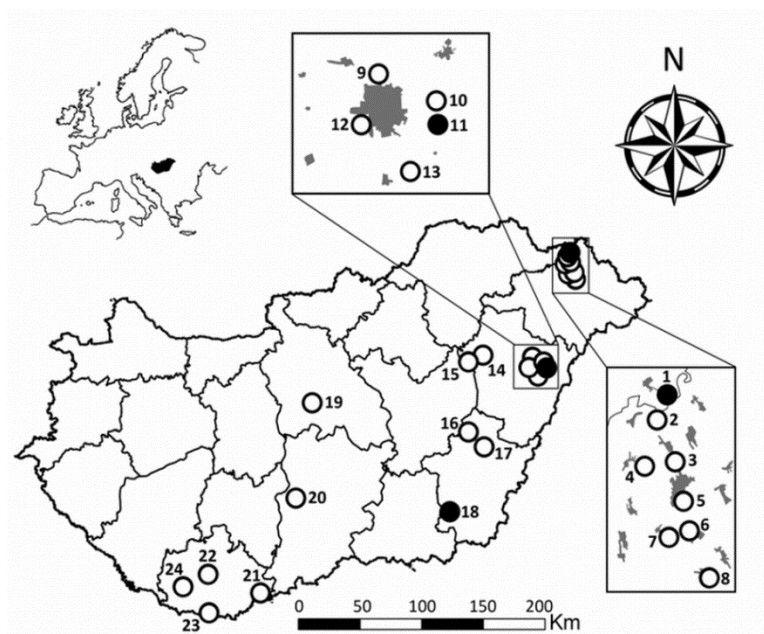
A vizsgálataink során meghatározott szekvenciákat gazdafaj - ország rövidítés (Hu: Magyarország, AT: Ausztria) - kimutatás éve (08: 2008, 09: 2009) kódokkal jelöltük. A magyarországi törzseket piros színnel, az ausztriai törzseket kék színnel emeltük ki. A génbanki szekvenciák kódjainak feloldását a 16. táblázat tartalmazza. Az elágazódásoknál olvasható számok a bootstrap analízis értékeit mutatják (1000 ismétlés, csak a nagyobb elágazódásoknál kiírva). Az ábra bal alsó sarkában a lépték a genetikai távolságot mutatja.



26. ábra: Az NS5-3'UTR régió részleges nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá.

A vizsgálataink során meghatározott szekvenciákat gazdafaj - ország rövidítés (Hu: Magyarország, AT: Ausztria) - kimutatás éve (08: 2008, 09: 2009) kódokkal jelöltük. A magyarországi törzseket piros színnel, az ausztriai törzseket kék színnel emeltük ki. A génbanki szekvenciák kódjainak feloldását a 16. táblázat tartalmazza. Az elágazódásoknál olvasható számok a bootstrap analízis értékeit mutatják (1000 ismétlés, csak a nagyobb elágazódásoknál kiírva). Az ábra bal alsó sarkában a lépték a genetikai távolságot mutatja.

A nyugat-nílusi vírus hazai szúnyog vektorainak pontosabb meghatározása, és bennük a WNV előfordulási gyakoriságának megismerése céljából felmérő vizsgálatokat végeztünk 2011-ben és 2012-ben Magyarország hat, keleti és déli megyéjében, összesen 24 gyűjtőhelyen (27. ábra). 2011-ben 24 szúnyogfaj, 11728 egyedét gyűjtöttük be, majd gyűjtési hely, faj és ivar alapján 1-50 egyedet tartalmazó, 362 pool-ba rendeztük. 2012-ben 18 szúnyogfaj 11465 egyedéből képeztünk 283 pool-t. A gyűjtött szúnyogok közül 23095 volt nőstény és 68 hím *Culex pipiens*; emellett 30 *Anopheles maculipennis* hím egyedet is gyűjtöttünk 2011. telén. A szúnyog pool-ok homogenizátumait megvizsgáltunk a nyugat-nílusi vírus nukleinsavának jelenlétére, valós idejű RT-PCR módszerrel. A 2011-ben gyűjtött szúnyogok közül három pool-ból mutattuk ki a vírusRNS jelenlétét: egy Fényeslitkén (a 27. ábrán "1"-el jelölt, $48^{\circ} 18' 44,75''$, $22^{\circ} 04' 07,64''$), júniusban gyűjtött, *Ochlerotatus annulipes* nőstényeket tartalmazó pool-ból; egy, a debreceni Fancsika-tónál ("11"-el jelölt, $47^{\circ} 30' 36,37''$, $21^{\circ} 44' 27,18''$), júliusban gyűjtött, *Coquillettidia richiardii* nőstényeket tartalmazó pool-ból; és egy kardoskúti kékvércse-kolóniánál ("18"-al jelölt, $46^{\circ} 29' 49,00''$, $20^{\circ} 42' 13,98''$), szeptemberben gyűjtött, *Culex pipiens* nőstényeket tartalmazó pool-ból (18. táblázat). A 2012-ben gyűjtött és csak hímeket tartalmazó pool-ok egyikéből sem lehetett a WNV nukleinsavát kimutatni.



27. ábra: A szúnyogminták gyűjtési helyei.

Üres körök: WNV negatív minták; feketével kitöltött körök: WNV pozitív minták. 1: Fényeslitke, 2: Szabolcsveresmart, 3: Döge, 4: Kékcse, 5: Kisvárd, 6: Anarcs, 7: Ajak, 8: Gyulaháza, 9-13: Debrecen, 14: Hortobágy-Halastó, 15: Egyek (Hortobágyi Nemzeti Park), 16: Dévaványa, 17: Körösladány, 18: Kardoskút, 19: Ócsa, 20: Felsőerek, 21: Mohács, 22: Pécs, 23: Drávaszabolcs, 24: Sumony

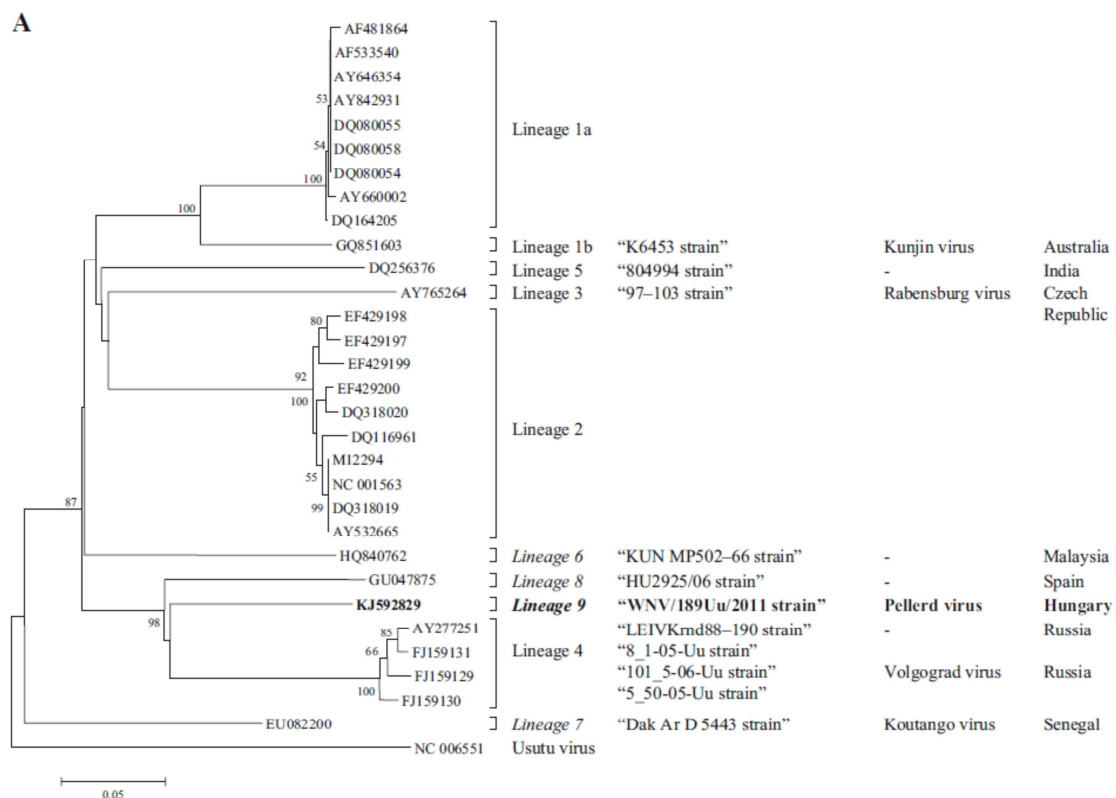
18. táblázat: A nyugat-nílusi vírus RNS jelenlétére megvizsgált szúnyog pool-ok száma és összetétele

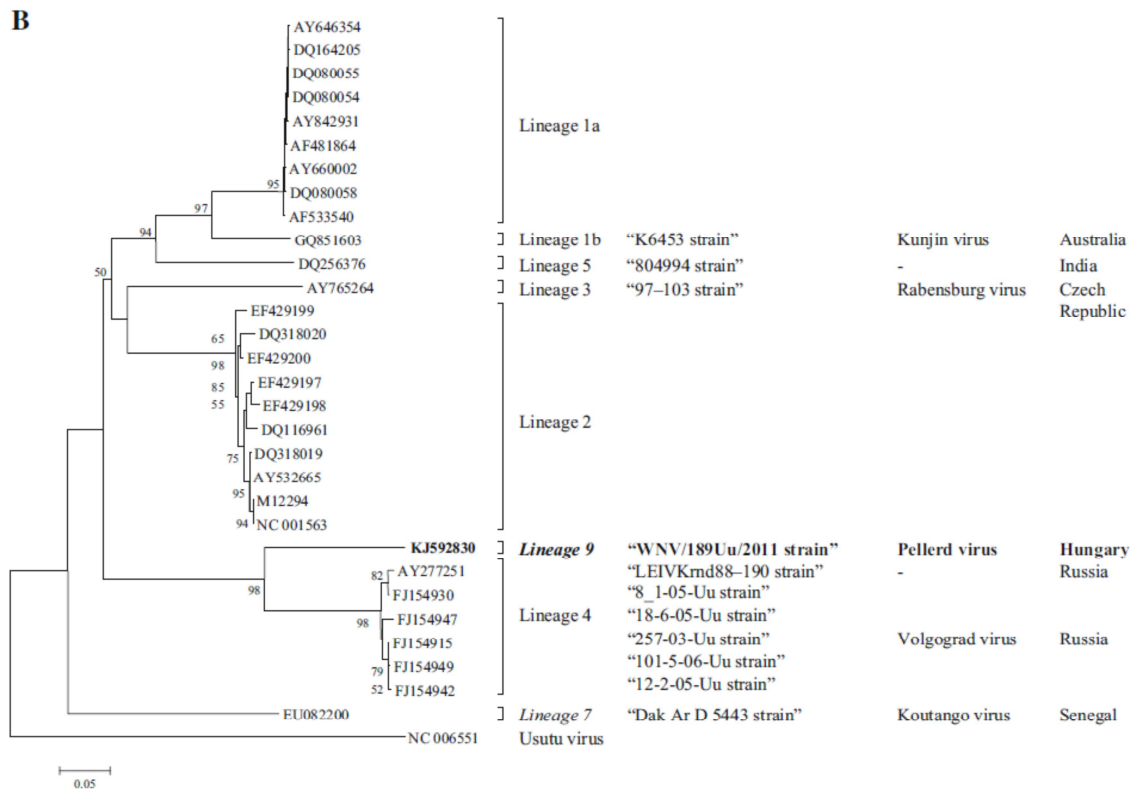
szúnyogfaj	gyűjtés éve: 2011; 2012					
	gyűjtő-helyek száma	pool-ok száma	szúnyogok száma a pool-okban			gyűjtés hónapja
			1-3	4-19	>20	
<i>Aedes cinereus</i>	8; 6	52; 16	8; 5	8; 1	36; 10	5,6,7,8,9; 5,6,7,8
<i>Aedes rossicus</i>	1; 2	4; 10	1; 1	2; 3	1; 6	5,6,7,8; 5,6,7,8
<i>Aedes vexans</i>	9; 9	94; 133	7; 25	9; 3	78; 105	5,6,7,8,9; 5,6,7,8,9
<i>Anopheles algeriensis</i>	1; 0	1; 0	1; 0	0; 0	0; 0	5; -
<i>Anopheles atroparvus</i>	0; 2	0; 2	0; 1	0; 0	0; 1	-; 2
<i>Anopheles claviger</i>	1; 0	3; 0	2; 0	1; 0	0; 0	7,8,9; -
<i>Anopheles hyrcanus</i>	5; 7	20; 20	4; 11	0; 3	16; 6	5,7,8,9; 5,6,7,8
<i>Anopheles maculipennis</i>	7; 6	13; 6	2; 2	5; 3	6; 1	5,6,7,8,9; 1,2,7
<i>Anopheles messeae</i>	0; 1	0; 1	0; 1	0; 0	0; 0	-; 1
<i>Anopheles plumbeus</i>	1; 2	2; 3	1; 3	1; 0	0; 0	6,8; 7,8
<i>Coquillettidia richiardii</i>	9; 9	35; 43	7; 17	11*; 9	17; 17	6,7*,8,9; 6,7,8,9
<i>Culex martinii</i>	1; 0	2; 0	1; 0	1; 0	0; 0	6,8; -
<i>Culex modestus</i>	9; 7	20; 22	6; 12	9; 9	5; 1	6,7,8,9; 5,6,7,8,9
<i>Culex pipiens molestus</i>	1; 0	1; 0	1; 0	0; 0	0; 0	12; -
<i>Culex pipiens pipiens</i>	7; 3	19; 5	5; 4	9; 0	5*; 1	6,7,8, 9*,12; 1,2,8
<i>Culex territans</i>	1; 0	1; 0	0; 0	1; 0	0; 0	7; -
<i>Culex torrentium</i>	1; 0	1; 0	0; 0	1; 0	0; 0	8; -
<i>Culiseta alaskaensis</i>	0; 1	0; 1	0; 1	0; 0	0; 0	-; 5
<i>Culiseta annulata</i>	1; 3	1; 3	1; 2	0; 0	0; 1	9; 1,2
<i>Ochlerotatus annulipes</i>	4; 4	22; 7	5; 7	7*; 0	10; 0	5,6*,7,8; 5,6,7,8
<i>Ochlerotatus cantans</i>	5; 0	16; 0	7; 0	4; 0	5; 0	5,6,7; -
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0; 1	0; 3	0; 3	0; 0	0; 0	-; 7,8,9
<i>Ochlerotatus excrucians</i>	0; 1	0; 1	0; 1	0; 0	0; 0	-; 6
<i>Ochlerotatus flavescens</i>	3; 1	5; 1	1; 1	4; 0	0; 0	5,6; 6
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	2; 0	2; 0	2; 0	0; 0	0; 0	8; -
<i>Ochlerotatus rusticus</i>	1; 0	1; 0	0; 0	1; 0	0; 0	6; -
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	5; 3	44; 3	3; 2	5; 1	36; 0	5,6,7,8,9; 7,8
<i>Ochlerotatus sp.</i>	1; 0	1; 0	1; 0	0; 0	0; 0	9; -
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1; 0	2; 0	1; 0	0; 0	1; 0	7,8; -

*: WNV pozitív pool-ok.

A 2011-ben talált, pozitív pool-ok egyedszámai alapján kiszámoltuk a minimális szúnyog WNV fertőzöttségi arányt (minimal infection rate, MIR = a fertőzött szúnyogok száma 1000 szúnyogonként, amennyiben a pozitív pool-ban csak egyetlen pozitív szúnyog volt). Ez az érték az összes szúnyogra vonatkoztatva 0,25, *Ochlerotatus annulipes*-re 2,03, *Coquillettidia richiardii*-ra 0,63, *Culex pipiens*-re 2,70 volt. A pool-ok változó elemszámának (a szúnyogok számának) figyelembe vételével prevalencia értékeket is számoltunk, 95%-os konfidencia intervallumokkal (95% CL). A számított WNV prevalencia értékek az összes gyűjtött szúnyogra vonatkoztatva 3×10^{-4} (alsó 95% CL = 10^{-4} , felső 95% CL = 7×10^{-4}); *Ochlerotatus annulipes*: 2×10^{-3} (alsó 95% CL = 10^{-4} , felső 95% CL = 9×10^{-3}); *Coquillettidia richiardii*: 7×10^{-4} (alsó 95% CL = 0, felső 95% CL = $2,9 \times 10^{-3}$); és *Culex pipiens*: $2,9 \times 10^{-3}$ (alsó 95% CL = 2×10^{-4} , felső 95% CL = $1,26 \times 10^{-2}$) (Szentpáli-Gavallér és mtsai., 2014.)

A Baranya megyében 2011–2012-ben és 2013-ban gyűjtött szúnyog pool-okat tovább vizsgáltuk, a flavivírusok széles körét kimutató, „univerzális” primereket használó, nested RT-PCR próba (Scaramozzino és mtsai., 2001) segítségével. Az egyik, a Pécs közelében található pellérdi halastavaknál (É46° 3'23,48", K18° 9'23,97") 2011. augusztusában, fehér fénycsapdával gyűjtött, 32 *Uranotaenia unguiculata* nőtény egyedet tartalmazó pool homogenizátumából felerősített, 250 bp hosszúságú amplifikációs termék szekvenciája BLAST kereséssel a legnagyobb hasonlóságot a WNV 8_1-05-Uu jelű törzséhez mutatta (GenBank azonosító: FJ159131). Ezt a vírust 10, *Uranotaenia unguiculata* nőtényt tartalmazó pool-ból mutatták ki 2005-ben Oroszország Volgograd régiójában. A hazai mintából kimutatott vírus (WNV/189/Uu/2011, „Pellérd vírus”) részleges nukleotid szekvenciáját két szakaszon sikerült meghatározni: az egyik szekvencia (KJ592830) 79,6%-ban hasonlított a FJ159131 génbanki azonosítójú, oroszországi törzs E fehérje gén 1261–2118 nukleotid pozíció közötti szakaszához; a másik szekvencia (KJ592829) pedig az NS5 gén 8161–9035 nukleotid pozíció közötti szakaszához hasonlított 82,5%-ban. A filogenetikai vizsgálatok eredményeit a 28. ábra mutatja be (Kemenesi és mtsai., 2014a).





28. ábra: Neighbor-joining algoritmussal számított törzsfák a WNV/189Uu/2011 vírus NS5 (A) és E fehérje (B) génjeinek részleges nukleotid szekvenciái alapján.

A hazai törzs szekvenciáit félkövér betűvel emeltük ki. A genetikai vonalak elnevezésénél Donadieu és mtsai., (2013) által javasolt nomenklaturát használtuk. Az elágazásoknál szereplő számok az 1000 újramintázásos bootstrap analízis segítségével generált statisztikai támogatottságok százalékos értékei. Az USUV kültágként szerepelt az analízisben. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

3.2.1.3. A nyugat-nílusi vírus Görögországban kimutatott törzsének genetikai jellemzése

Görögország észak-keleti részén jelentős számú emberi esettel járó nyugat-nílusi encephalitis járványt figyeltek meg 2010. nyarán és őszén (Papa és mtsai., 2010). 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. augusztus 10-én Nea Santa (É40,84194° K22,91499°) településen gyűjtött, 50 *Cx. pipiens* nőstény szúnyogot tartalmazó pool vizsgálata pozitív eredménnyel zárult. Az NS5 gén területén felerősített, 146 nt hosszúságú genomszakasz nukleotid sorrendje a legnagyobb hasonlóságot a Magyarországon, 2004-ben, héjából származó nyugat-nílusi vírus szekvenciájához mutatta (Papa és mtsai., 2011a). A vírus (Nea-Santa-Greece-2010) részletes genetikai jellemzése és rokonsági viszonyainak feltárása céljából meghatároztuk a teljes genomszekvenciáját és

filogenetikai vizsgálatokat végeztünk. A szúnyogmintából kivont RNS átfedő primerpárokkal végzett RT-PCR felerősítése, és az amplifikációs termékek direkt szekvenálása segítségével a vírusgenom 11028 nt hosszúságú szakaszát határoztuk meg (GenBank azonosító: HQ537483), amely tartalmazza a nyitott leolvasási keretet. A nukleotid és a származtatott aminosav szekvenciákat összehasonlítottuk a génbanki adatbázisokban hozzáférhető WNV szekvenciákkal. A legnagyobb nukleotid hasonlóságot (99,6%) ebben az esetben is a magyarországi héjából kimutatott, „goshawk-Hungary-2004” vírus szekvenciájával találtuk. A két vírus nukleotid szekvenciája 44 bázisban tért el egymástól; a mutációk nagyjából egyenletesen oszlottak el a genomban. A származtatott aminosav szekvenciák pozicionális illesztései az európai, kettes genetikai vonalhoz tartozó vírusok egyedi és jellegzetes aminosav-szubsztitúcióit tárták fel (19. táblázat).

19. táblázat: A Nea-Santa-Greece-2010 WNV származtatott aminosav szekvencia eltérései afrikai lineage 2 vírusokhoz és a WNV más genetikai vonalainak képviselőihez viszonyítva.

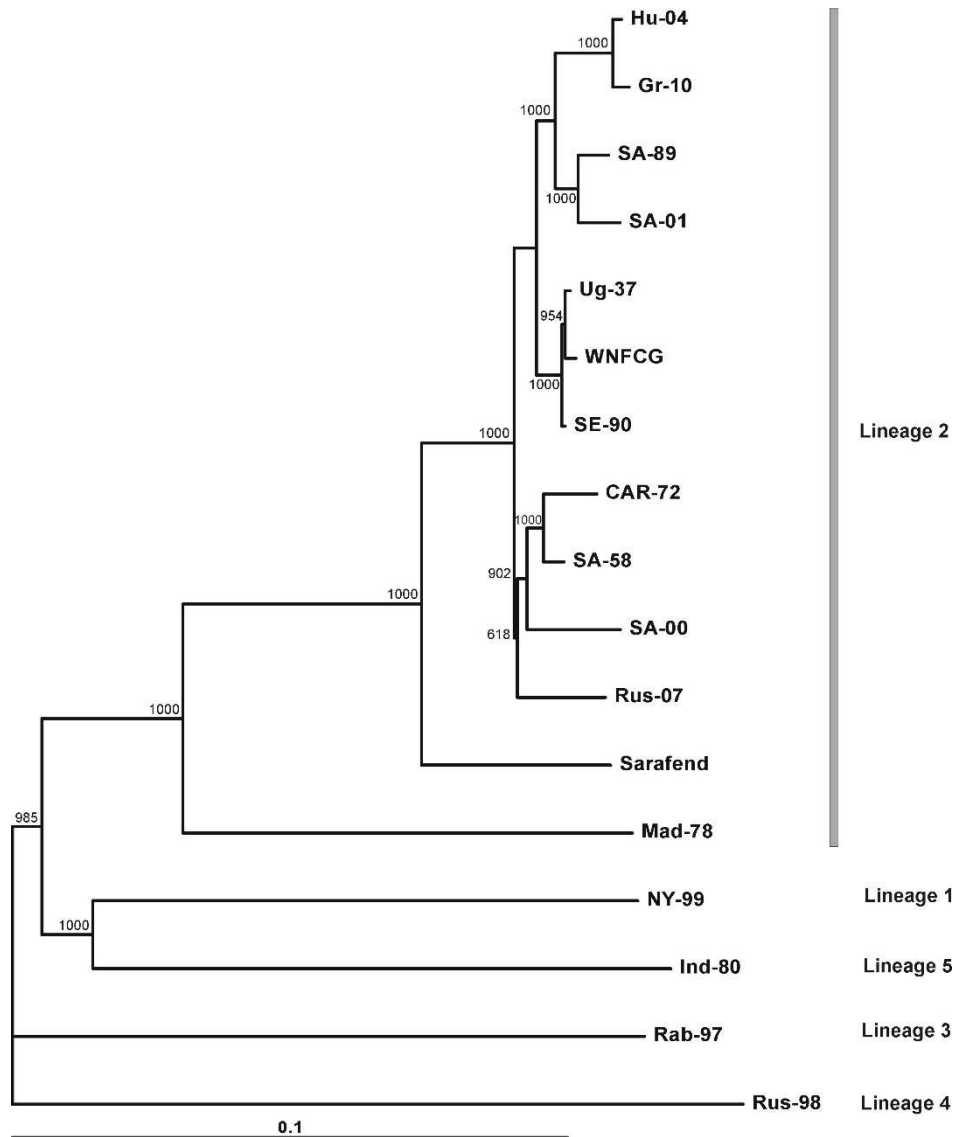
Fehérje	NS1	NS2B		NS3		NS4B					NS5
Aa pozíció	44	88	119	11	249	14	23	32	49	113	190
Gr-10 (lin. 2)	Arg	Ile	Ile	Arg	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala	Met	Arg
Hu-04 (lin. 2)	Arg	Ile	Val	Arg	His	Ser	Thr	Asn	Thr	Val	Lys
további, lineage 2 WNV törzsek	Lys	Met	Val	Lys	His	Ser*	Ala	Ser	Thr**	Val	Lys
NY-99 (lin. 1)	Lys	Met	Val	Lys	Pro	Ser	Val	Glu	Thr	Val	Lys
RabV (lin. 3)	Arg	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	Asp	Ser	Val	Lys
Rus-98 (lin. 4)	Lys	Met	Val	Arg	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Lys
Ind-80 (lin. 5)	Lys	Met	Val	Lys	Thr	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	Lys

A kutatás során meghatározott, Nea-Santa-Greece-2010 szekvenciáját a Gr-10 kód jelöli; a többi vírus rövidítésének feloldása a 16. táblázatban található. Az NS3 fehérje 249 aminosav pozíciójában megfigyelt Pro aminosav homológ az amerikai, lineage 1 törzsben virulencia markernek vélt aminosavval (szürke háttérrel kiemelve).

*kivéve SE-90, WNFCG, Mad-78 és Sarafend (Gly)

**kivéve Mad-78 (Ala)

A Nea-Santa-Greece-2010 WNV nukleotid szekvenciája rokonsági viszonyait vizsgáló filogenetikai analízis eredményét a 29. ábrán bemutatott törzsfá szemlélteti. A törzsfában a görögországi és magyarországi eredetű vírus különálló ágat alkot, közeli feltételezett közös őssel. Hozzájuk legközelebb Dél-Afrikában kimutatott WNV törzsek szekvenciái álltak. A bootstrap-analízis 100%-ban támogatta ezt a csoportosulást.

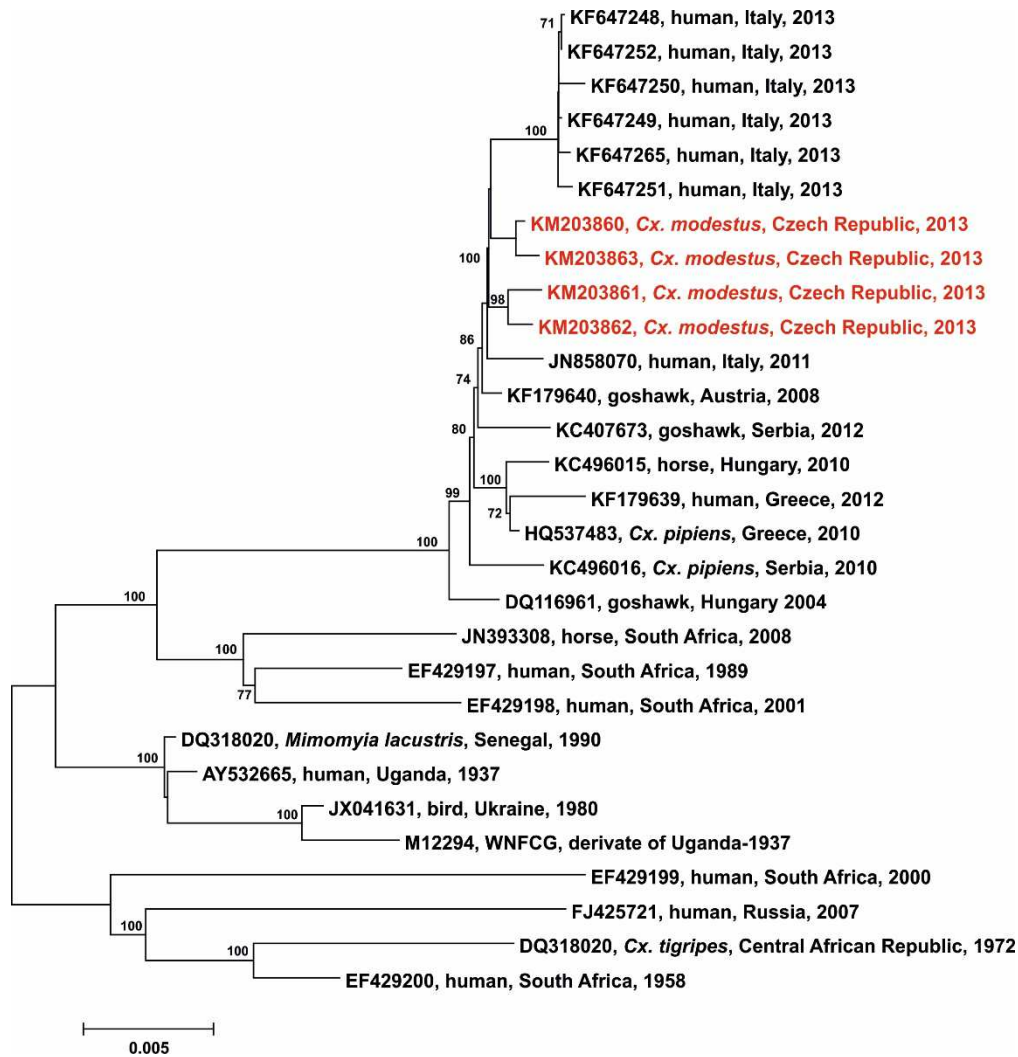


29. ábra: WNV törzsek teljes nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá.

A kutatás során meghatározott, Nea-Santa-Greece-2010 szekvenciáját a Gr-10 kód jelöli. A többi szekvencia kódjának feloldását a 16. táblázat tartalmazza. Az elágazódásoknál a bootstrap analízis értékei olvashatók (1000 ismétlés). Az ábra jobb oldalán az egyes genetikai vonalak jelölése látható. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

3.2.1.4. A nyugat-nílusi vírus Csehországban 2013-ban kimutatott törzsének genetikai jellemzése

A görögországi felbukkanást követően a vírustörzs előfordulását jelentették Olaszországban 2011-ben (Bagnarelli és mtsai., 2011), Horvátországban 2012-ben (Merdić és mtsai., 2013; Pem-Novosel és mtsai., 2014) és Szerbiában 2013-ban (Popovic és mtsai., 2013), ami alátámasztotta a terjedés nyomon követésére irányuló vizsgálatok fontosságát. A 3.1.2.5 fejezetben említett csehországi szúnyog arbovírus monitoring vizsgálatok során a dél-morvaországi tavak (Nesty, Novy, Mlynsky) közelében 2013. júliusa és augusztusa során 32500 nőstény *Cx. modestus* szúnyog egyedet gyűjtöttek cseh kutató partnereink. A 650 pool-ba rendezett szúnyogminta, kettes genetikai vonalhoz tartozó WNV RNS jelenlétére irányuló, specifikus RT-PCR vizsgálata négy (13-104, a Novy tónál gyűjtött; 13-329, a Nesty tónál gyűjtött, 13-479 és 13-502, a Mlynsky tónál gyűjtött) pool esetében pozitív eredménnyel zárult. Ez alapján 1:8,125 (0,012%) MIR értéket határoztak meg. Három mintából (13-104, 13-479 és 13-502) a vírust izolálták szopósegér intracraniális oltással. Az egerek az oltást követő 6-10. napon hullottak el. Meghatároztuk a vírusok teljes genomszekvenciáját (GenBank azonosítók: 13-104: KM203860, 13-329: KM203861, 13-479: KM203862, és 13-502: KM203863) és összehasonlítottuk kettes genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok szekvenciáival. A neighbor-joining statisztikai módszerrel készített filogenetikai analízis segítségével készített törzsfá (30. ábra) a csehországi vírusok feltételezett rokonsági viszonyait mutatja. A csehországi vírusok szekvenciái a törzsfán két ágat alkottak, és Olaszországban 2013-ban emberi megbetegedésekből kimutatott nyugat-nílusi vírusokkal van feltételezett legközelebbi közös ősök (100%-os bootstrap-támogatottság). 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 (100%-os bootstrap-támogatottság) (Rudolf és mtsai., 2014).



30. ábra: Kettes genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek teljes nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá.

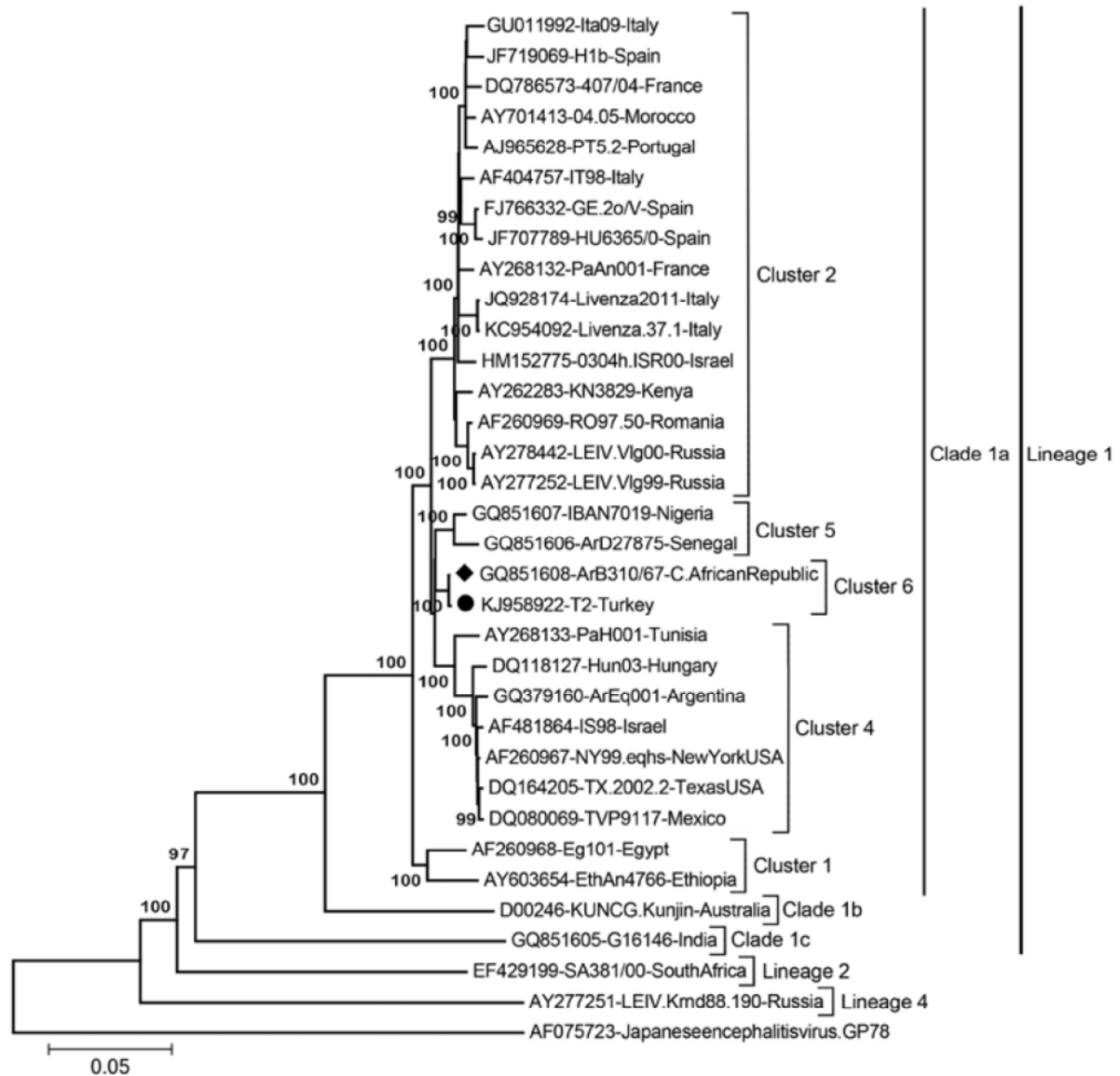
A kutatás során meghatározott szekvenciákat piros színnel emeltük ki. A szekvenciák kódjai a GenBank-i azonosítót, valamint a kimutatás eredetét (gazdafaj, ország, év) tartalmazzák. Az elágazódásoknál a bootstrap analízis értékei olvashatók (1000 ismétlés). A lépték a genetikai távolságot mutatja.

3.2.1.5. A nyugat-nílusi vírus Törökországban kimutatott törzseinek genetikai jellemzése

A nyugat-nílusi vírus közelmúltban izolált törzseinek genetikai jellemzésére irányuló kutatásaink keretében, együttműködésben törökországi kutatókkal, egy WNV törzs teljes genomszekvenciáját meghatároztuk. A vírust Törökország közép-anatóliai térségének Eskisehir tartományában (É39°24', K31°02') 2011. januárjában, lázas általános, majd idegrendszeri tüneteket mutató lóból izolálták (Ozkul és mtsai., 2013). A vírustörzs (T2) teljes genomszekvenciáját a korábban leírtak szerint, átfedő szakaszok amplifikációját követő direkt szekvenálásokkal határoztuk meg (Bakonyi és mtsai., 2006). A szekvenciák pozicionális illesztése után összeállított genomszekvencia (GenBank azonosító: KJ958922) a 93. nukleotid pozíciótól tartalmaz egy nyitott leolvasási keretet, amely 3433 aminosav hosszúságú, feltételezett prekursor poliproteint kódol. A génbanki adatbázisokban végzett BLAST homológia keresés eredménye szerint a genomszekvencia a legnagyobb hasonlóságot (99,3%) a WNV 1-es genetikai vonalához tartozó, ArB310/67 vírustörzs szekvenciájához (GenBank azonosító: GQ851608) mutatta. Ezt a vírust a Közép-Afriai Köztársaságban izolálták 1967-ben. További, 1-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok genomszekvenciáinak bevonásával filogenetika analízist végeztünk a vírustörzs rokonsági viszonyainak feltárására. A neighbor-joining módszerrel készített törzsfát a 31. ábra mutatja. A May és mtsai., (2011) által javasolt csoportosítás alapján a törökországi vírustörzs a WNV 1-es genetikai vonal, 1a klád, 6. klaszterébe sorolható, együtt az ArB310/67 törzssel (Ergunay és mtsai., 2015). Az 1a klád európai vírusokat tartalmazó 2. és 4. klaszterei külön ágakat alkotnak. A maximum-likelihood és UPMGA statisztikai módszerekkel végzett filogenetikai analízisek hasonló topológiájú törzsfákat eredményeztek (nem közölt adat).

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 (GenBank azonosítók: JN828805, JX310862, JX310863, KC290932 – KC290942, KC466019 – KC466021, KF437832 és KJ433822 – KJ433840) egy kivételével a legnagyobb hasonlóságot (98,8-100%) a T2 és ArB310/65 törzsek szekvenciáihoz, valamint egymáshoz mutatták. A neighbor-joining módszerrel végzett filogenetikai analízis segítségével készített törzsfát a 32. ábra mutatja. A vizsgált 37 vírus közül 36 szekvenciája a T2 vírussal képez monofiletikus ágat, egy (Eqn1, GenBank azonosító: JN828805) viszont az 5. klaszterhez sorolt vírusokkal (a Nigériában, 1965-ben izolált IBAN7019 törzssel és a Szenegálban, 1979-ben izolált ArD27875 törzssel) került közös ágra. Ez az a vírus, amelyet 2011. februárjában izoláltak egy lóból, Törökország Eskisehir tartományából (l. korábban). Megjegyzendő, hogy a vizsgált nukleinsav szakasz rövidegsége (183 nt) miatt, ez a csoportosulás statisztikailag nem támogatott. Az UPGMA módszerrel készített törzsfá hasonló topológiát mutatott (nem közölt adat). A T2 törzs származtatott aminosav-szekvenciájának elemzése során megfigyelt aminosav szubsztitúciók arra utalnak, hogy ez a vírus a mediterrán térségben kimutatott egyéb vírusoktól független evolúciós folyamaton esett át. Az egyes genetikai vonalban virulencia markernek feltételezett aminosav szubsztitúciók (NS2A A₃₀P, NS3 T₂₄₉P és NS4b

C₁₀₂S) a T2 törzsnél nem fordultak elő, viszont a WNV 2-es genetikai vonalában, *Cx. pipens*-ben rövidebb replikációs idővel összefüggésbe hozott E V₁₅₉A szubsztitúció (Moudy és mtsai., 2007) V₁₅₉F formában volt jelen (Ergunay és mtsai., 2015).



31. ábra: Egyes genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek teljes nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá.

A kutatás során meghatározott, T2 törzs szekvenciáját ●, a vele közeli rokon ArB310/67 törzs szekvenciáját ♦ jellel emeltük ki. A szekvenciák kódjai a GenBank-i azonosítót, a vírustörzs nevét és kimutatási ország nevét tartalmazzák. A főbb elágazódásoknál a bootstrap analízis százalékos értékei olvashatók (1000 ismétlés). Az ábra jobb oldalán található függőleges vonalak és kapocs jelek a May és mtsai. (2011) által javasolt csoportosítást mutatják. (A 3. klaszter nem került feltüntetésre.) A JEV GP78 törzsének szekvenciája kültagként került az analízisbe. A lépték a genetikai távolságot mutatja.



32. ábra: Egyes genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek E fehérje kódoló régió részleges nukleotid szekvenciáinak neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá.

A kutatás során meghatározott, T2 törzs szekvenciáját ●, a vele közeli rokon ArB310/67 törzs szekvenciáját ◆ jellel emeltük ki. A többi, törökországi eredetű szekvenciát a GenBank-i azonosító, a törzs nevét, a gazdafajt (Eqn: ló, human: ember, M: szúnyog, Cxp: *Cx. pipiens*, Occ: *Ochlerotatus caspius*), az izolálás helyét (tartományi szinten, ADN: Adana, ANK: Ankara, EDR: Edirne, ESK: Eskisehir, MGL: Mugla, MRS: Mersin, TKR: Tekirdag) és évét, valamint az ország (Törökország) nevét tartalmazó kódok jelölik. A más kutatók által meghatározott szekvenciákat a GenBank-i azonosítót, a vírustörzs nevét és a kimutatási ország nevét tartalmazó kódokkal jelöltük. Az elágazódásoknál a bootstrap analízis százalékos értékei olvashatók (60%-nál nagyobb értékek, 1000 ismétlés). A JEV GP78 törzsének szekvenciája kültagként került az analízisbe. A lépték a genetikai távolságot mutatja.

3.2.2. A nyugat-nílusi vírus gazdaspektruma és patogenitása

3.2.2.1. A nyugat-nílusi vírus magyarországi törzsének patogenitása házilúdban

Egy dél-alföldi telepen, szabad tartásban nevelt, 3600 egyedet tartalmazó lúdállományban idegrendszeri megbetegedéseket figyeltek meg 2003. augusztusában (Glávits és mtsai., 2005). A ludakat a Duna árterében, más baromfi fajoktól elkülönítve tartották, de vadmadarakkal érintkezésben kerülhettek. A legközelebbi lúdállományt kb. 30 km-re tartották. Ugyanabból a szülőállományból származó, máshol keltetett és nevelt libákban nem tapasztaltak megbetegedéseket, viszont circovírus fertőzést mind az érintett állományban, mind a máshol nevelt libákban is kimutattak. A megbetegedések a 6. élethétén kezdődtek és kb. 6 hétig tartottak. Az 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 (33. ábra). A tüneteket mutató madarak döntő többsége 4-5 napon belül elhullott.

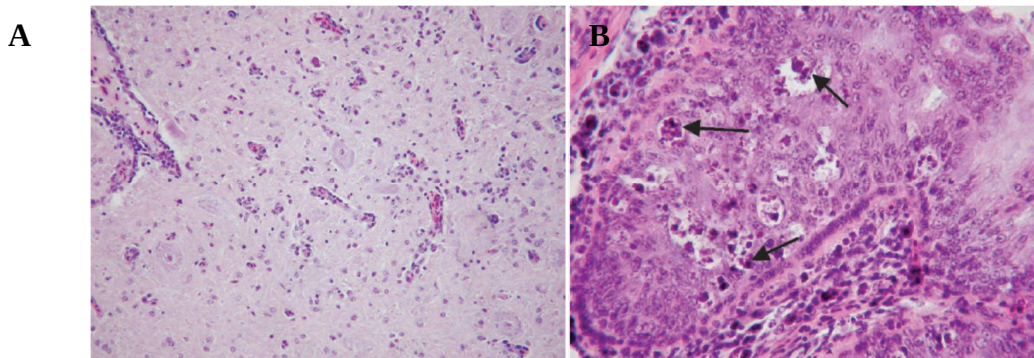


33. ábra: Nyugat-nílusi vírus okozta agyvelőgyulladás tünetei házilúdban (szárnylógatás, rendellenes fejtartás). Dr. Glávits Róbert felvétele

A kórbonctani vizsgálatra került libák kondíciója enyhén (5/12) vagy erősen (7/12) elmaradt az átlagostól. A makroszkópos vizsgálat során esetenként, jellegtelen elváltozásokat (tüdő bővérűség, enyhe tüdőöedema), valamint az agyvelő egyes területein 3-4 mm-es átmérőjű, sárgásszürke gócot lehetett látni. A bursa Fabricii fala vékonyabb és petyhüdtebb volt, mint a hasonló korú, egészséges állatoké. A kórszövettani vizsgálatok során mindegyik (n=12) vizsgált állatban lymphocytás agyvelőgyulladást, 7 állatban gerincvelő gyulladást is látni lehetett. Az agyi elváltozások (2-3 sejtsoros, lymphocytás és plazmasejtes érfal- és agyhártya beszűrődések, gócos glisasarjadzás, 34a ábra) különböző területeken (agytörzs, kéreg, thalamus, szaglóllebeny, kisagyvelő) egyaránt előfordultak, de a kisagyvelő molecularis rétege volt leginkább érintett. Négy állat gerincvelő mintáiban az idegrostok degenerációját és reparatív gliasejt-sarjadzást is meg lehetett figyelni. A vizsgált állatok mindegyikében a lymphoid szervekben (bursa Fabricii, lép, thymus) jelentős lymphocyta-depletiót és histiocytosist lehetett látni, gyulladásos reakciók nélkül. Négy állat mintáiban a folliculusok reticulumsejtjeinek citoplazmaiban vakuolizációt és basophil zárványokat lehetett

kimutatni (34b. ábra). Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal 12-14 nm átmérőjű, helyenként parakristályos formába rendeződött, kerekded virionokat lehetett kimutatni. Nyolc esetben a bursa folliculusok velőállományának teljes degenerációja és a kéreg-velő határon hámsejt-proliferáció fordult elő.

Az elhullott madarak szerveiből nem lehetett patogén baktériumokat kitenyészteni. Az agyvelő mintákból (n=5) végzett vírusizolációs kísérletek (szövettenyésztet, embrionált tyúktojás és szopósegér intracerebrális oltás) nem jártak sikerrel. Az agyvelő-mintákból készített homogenizátumokból RT-PCR vizsgálatával WNV 1-es genetikai vonalához tartozó vírus RNS-ét tudtuk kimutatni (ld. 3.2.1.2. fejezet). A lépminták (n=5) lúd circovírus DNS kimutatására irányuló PCR vizsgálata mindegyik mintánál pozitív eredményt adott. A felerősített termék szekvenciája 95%-os hasonlóságot mutatott a lúd circovírus referencia szekvencia (GenBank azonosító: AJ304456) homológ szakaszával (Glávits és mtsai., 2005).



34. ábra: Kórszövettani elváltozások nyugat-nílusi vírus és lúd circovírus fertőzés hatására lúdban.

A: Lymphoid sejtes érköpeny és gliosis az agyszövetben; haematoxylin-eosin festés, 200× nagyítás. B: Súlyos lymphocyt-depletio, vakuolizáció és zárványképződés (rámutató nyilakkal) bursa folliculusban; haematoxylin-eosin festés, 400× nagyítás.

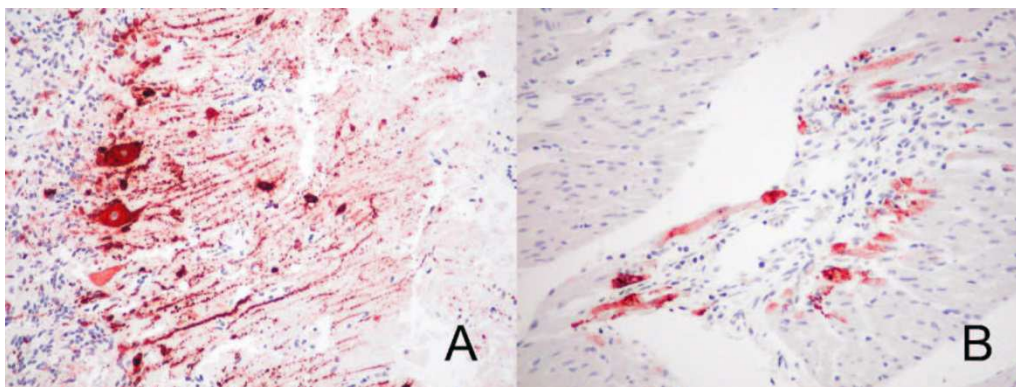
3.2.2.2. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása vadmadár-fajokban

Központi idegrendszeri megbetegedést figyeltek meg két, a Körös-Maros Nemzeti Park területén nevelt, fiatal héjában, 2004. augusztusában. A madarakat kikelésük után gyűjtötték be a nemzeti park munkatársai egy ragadozó madár megőrzési program keretében. Az egyik héja, egy 3 hónapos hím egyed, hirtelen jelentkező idegrendszeri tünetek (ataxia, fejremegés, görcsök) közepette, 2 napos betegeskedés után elhullott (1. eset). Két héttel később egy másik héja enyhébb tüneteket mutatott, és egy heti betegeskedés után állapota jobbra fordult, felgyógyult. A következő év (2005.) augusztus elején a nemzeti park területén találtak két, gyenge kondíciójú, idegrendszeri tüneteket mutató, növendék héját. A mesterséges táplálás és gyógykezelési próbálkozások ellenére a madarak állapota

három napon belül olyan mértékben rosszabbodott, hogy euthanasia alkalmazására volt szükség (2. és 3. eset). Egy, a madármentő állomáson 2005. júniusa óta tartott karvaly a fent említett madarak érkezése előtt idegrendszeri tüneteket kezdett mutatni, valamint egy, az állomáson nevelt növendék héja és egy kifejlett héja tojó is idegrendszeri tüneteket mutatott, a fent említett két héja elpusztulása után. Az állomáson nevelt madarak mindegyike nagyon jó kondícióban volt a betegség kialakulása előtt, ám kondíciójuk gyorsan romlott. Ezek a madarak is mesterséges táplálásban és tüneti gyógykezelésben részesültek; hozzávetőlegesen egy hetes betegeskedés után idegrendszeri tüneteik jelentősen enyhültek és fokozatosan felgyógyultak.

A 2004-ben elhullott héja jó kondícióban volt (882 g testtömeg), a 2005-ben elpusztult példányok viszont erősen lesóványodottak voltak (668 és 612 g testtömeg). A kórbonctani vizsgálat során (a zsigeri szervek megkisebbedésén túl) kóros makroszkópos elváltozásokat nem lehetett megfigyelni. A kórszövettani vizsgálatok a központi idegrendszerben multifokális, lymphocytás panencephalitist tártak fel. Idegsejt degenerációt, elhalást és neuronocytophagiát, valamint kifejezett gliasarjadzást lehetett megfigyelni mindhárom madár agyvelejének különböző részein. A 2. és 3. esetről a kisagy fehérállományában demyelinizáció és lymphocytás meningitis is kialakult. Az 1. esetről a keresztfont idegeinek enyhe, gócos, mononuclearis sejtes beszűrődését lehetett megfigyelni. Mindhárom madár lépében a lymphoid sejtek kiürülését és reticulocytá-proliferációt, valamint a szívizomzatban lympho-histiocytás gyulladást lehetett megfigyelni. A 2. és 3. esetről a májban vérváz és lympho-histiocytás (és heterophyl granulocytás) gyulladásos góccok fordultak elő. Az 1. és a 3. esetről gócos, interstitális, lympho-histiocytás vesegyulladás is kialakult. Enyhe, lymphocytás mirigyesgyomor- és bélgyulladás, illetve tüdő-bővítés lehetett mindhárom madárban megfigyelni; a 3. esetben másodlagos, gócos, fibrines bronchopneumonia is kialakult.

A nyugat-nílusi vírus 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 pozitivitást mutattak. Az agyban a neuronok, a gliasejtek és a Purkinje sejtek citoplazmájában (35a. ábra), a macrophagokban, a keringő monocytákban, a szívizomsejtekben (35b. ábra), a fibroblastokban, a vese tubuláris hámsejtjeiben, az endothel sejtekben, a kiserek simaizom sejtjeiben, a levegőkapillárisok epithel sejtjeiben, a vékonybél nyálkahártya hámsejtjeiben és simaizom sejtjeiben, a hasnyálmirigy külső elválasztású sejtjeiben, a májsejtjeiben és a pajzsmirigy tüszők hámsejtjeiben is ki lehetett mutatni a vírusantigén jelenlétét (Erdélyi és mtsai., 2007.) A madarak agyszövet-homogenizátumaiból a nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalához tartozó vírus nukleinsavát lehetett kimutatni RT-PCR módszerrel (ld. 3.2.1.2. fejezet). A fertőzést 2005-ben túlélő héják és karvaly keringő fehérvérsejtjeiből kivont RNS-ből is kimutattuk a vírusRNS jelenlétét RT-PCR segítségével, valamint a vírust szopósegér agyban és Vero sejttenyészetben izoláltuk is (Erdélyi és mtsai., 2007).

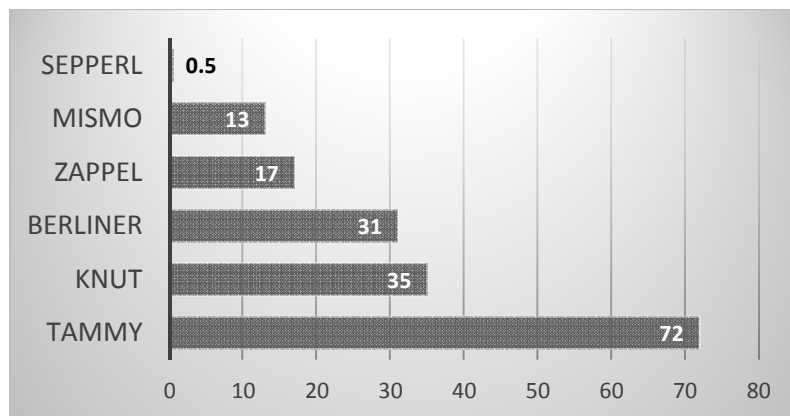


35. ábra: A nyugat-nílusi vírus antigén kimutatása immunhisztokémiai módszerrel héjában. A: pozitív sejtek a kisagy neuronok axonjaiban és a Purkinje sejtekben. B: pozitív sejtek a szívizomzatban, körülöttük lympho-histiocytás gyulladásos gócok. Tormaperoxidázal jelölt polymer (EnVision+ Kit, Dako, Glostrup, Dánia), Mayer-féle haematoxylin kontrasztfestés, 200× nagyítás.

A vírustörzs ausztriai felbukkanása (ld. 3.2.1.2. fejezet) során megbetegedéseket tapasztaltak a Konrad Lorenz Etológiai Intézet Bécshez közeli (Wilhelminenberg, É48°13'14", K16°17'04") kísérleti telepén nevelt kea (*Nestor notabilis*, Gould) állományában. A 24 madarat (13 hím és 11 tojó) tartalmazó csoportból hat hím állat idegrendszeri tüneteket mutatott 2008. nyár végén. A madarakat volierekben tartották. Mind a tüneteket mutató, mind az egészséges madaraktól mintákat (vér, garat és kloaka tampon) gyűjtöttek. Az elhullott állatokat kórbonctani és kórszövettani vizsgálatoknak vetették alá, valamint a nyugat-nílusi vírusfertőzés kimutatása céljából direkt (RT-PCR, immunhisztokémia, vírusizolálási próbálkozás szopós egerek intracerebrális oltásával) és indirekt (kompetitív IgG ELISA, PRNT) vizsgálatokat végeztünk. Az első megbetegedéseket öt keán figyelték meg 2008. augusztus 11. és 13. között, amit egy további követett szeptember 4-én. A madarak étvágytalanná és inaktívvá váltak, összekuporodva, lógó fejjel, borzolt tollazattal gubbasztottak. Gyengeségük miatt el kellett őket különíteni a többi egyedtől. A madarak tüneti kezelésben részesültek. Az egyik idősebb madár (Sepperl) tünetei súlyosbodtak, ezért augusztus 29-én euthanasiát kellett alkalmazni. A kórbonctani és kórszövettani vizsgálat során közepes súlyosságú máj- és lépduzzanatot, a májban multiplex elhalásos gócot, 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 vázizom sejtjeiben, (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 (Mismo, Zappel, Berliner, Knut és Tammy) tüneti 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 a Mismo nevű madárban kiújultak az idegrendszeri tünetek és olyan mértékben

súlyosbodtak, hogy euthanasia mellett döntött az ellátó állatorvos. Néhány héttel később a Zappel nevű keában is kiújultak a tünetek, ami miatt 2010. januárjában kellett végleg elaltatni. 2011. márciusában a Berliner nevű kea egy lábtörést követő gyógykezelés után visszakerült a kutatóintézetbe és ott, idegrendszeri tünetek nélkül, néhány napon belül elhullott. A Knut nevű kea tünetei 2011. júliusában újultak ki, és leromlása miatt ez a madár is euthanasiában részesült. Az utolsó, Tammy nevű kea tünetei 2014. nyarán újultak ki és augusztusban vált szükségessé az euthanasia. A fertőzés és a madarak elhullása közötti időtartamokat az 36. ábra szemlélteti.

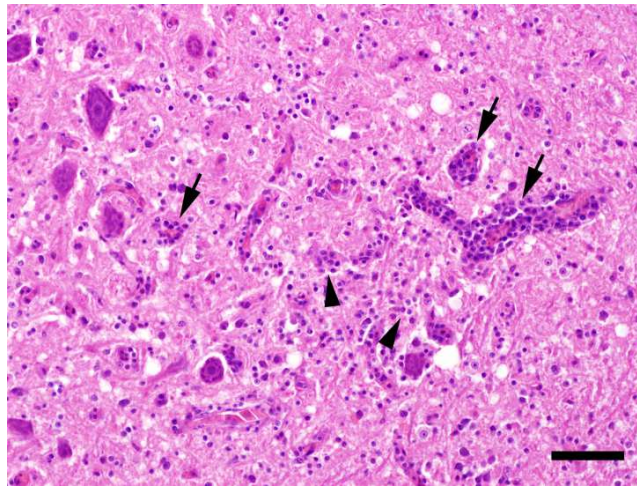


36. ábra: A 2008. őszén nyugat-nílusi vírussal fertőződött keák túlélési ideje hónapokban mérve

Az elpusztult madarak közül Mismo, Berliner és Tammy 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, lymphoid sejtes érköpenyek, gócos demyelinizáció, 37. ábra) 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 agyszövet mintáiból 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.

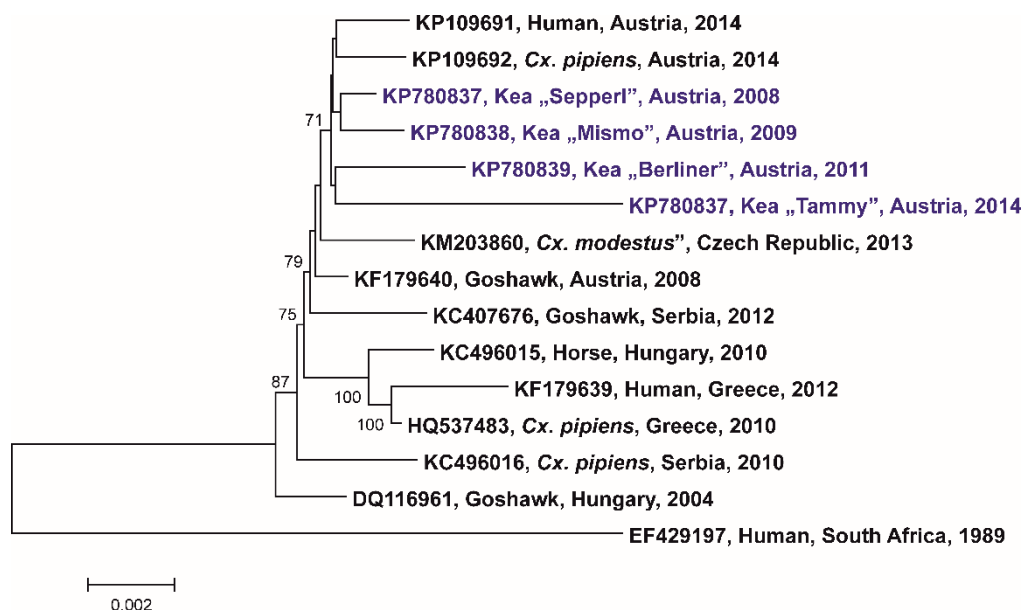
Meghatároztuk a pozitív madarak agyvelő mintáiból kimutatott WNV-k teljes genomszekvenciáit (GenBank azonosítók: KP780837-KP780840), összehasonlítottuk más, kettes genetikai vonalhoz tartozó, európai WNV-k szekvenciáival, és filogenetikai vizsgálatokat végeztünk (neighbor-joining, maximum likelihood, minimum evolution, és maximum parsimony algoritmusokkal). A szekvenciák közötti rokonsági viszonyokat a 38. ábrán bemutatott, neighbor-joining módszerrel készített törzsfá ábrázolja. (A másik három statisztikai módszerrel végzett analízis hasonló topológiájú törzsfákat

eredményezett.) A négy, keából kimutatott szekvencia két Ausztriában kimutatott WNV szekvenciájával helyeződik közös ágon. Az egyik vírust egy egészséges véradóból, a másikat egy *Cx. pipiens* pool-ból mutatták ki. Mindkét mintát Bécsben gyűjtötték 2014-ben (Kolodziejek és mtsai., 2015). A szekvenciák monofiletikus csoportot alkotnak a csehországi, *Cx. modestus*-ból izolált WNV-k egyik képviselőjével (ld. 3.2.1.4. fejezet), illetve egy Ausztriában, 2008-ban héjából kimutatott vírus szekvenciájával. A filogramon a kea-eredetű négy szekvencia genetikai távolsága feltételezett közös őstől a primer fertőzéstől eltelt idővel arányosan meghosszabbodott. A származtatott aminosav szekvenciák alapján készített törzsfa topológiája hasonlított a nukleotid szekvenciák alapján készítettekéhez. Megjegyzendő azonban, hogy míg három szekvenciánál a WNV esetében jellemző, 3434 aminosav hosszúságú prekursor polipeptid szekvenciát lehetett lefordítani, a Berliner nevű, 2011-ben elhullott kea agyából kimutatott szekvencia eredeti, kezdő metionin ATG kódja ACG-re változott, így a szekvencia a tőle 45 nukleotidra helyeződő, alternatív transzláció-iniciációs helyről íródhatott át, az N-terminális részen 15 aminosavval rövidebb polipeptidet eredményezve (Bakonyi és mtsai., 2016).



37. ábra: Nyugat-nílusi vírussal prezisztensen fertőzött kea (Mismo) agyszövetének kórszövettani képe.

Lymphocytás érköpenyek (nyilakkal jelölve) és gliasejt-sarjadzás (nyílhegyekkel jelölve). Haematoxylin-eosin festés; lépték: 80 μ m

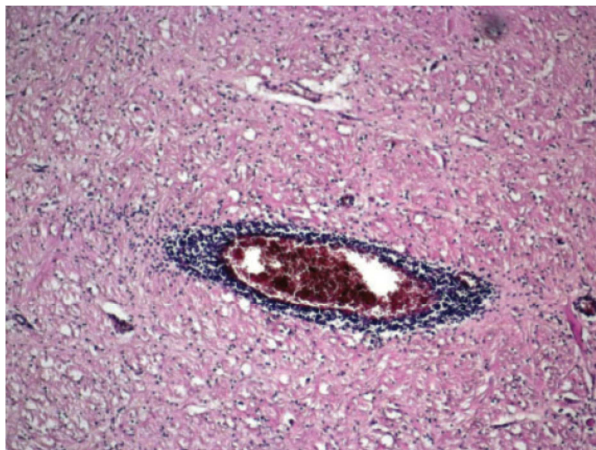


38. ábra: A keából kimutatott nyugat-nílusi vírusok teljes nukleotid szekvenciáinak rokonsági viszonyai más európai WNV szekvenciákkal

Neighbor-joining algoritmussal végzett filogenetikai analízis alapján készített törzsfa. A keából származó szekvenciákat kék színnel emeltük ki. A szekvenciák kódjai a GenBank-i azonosítót, valamint a kimutatás eredetét (gazdafaj, ország, év) tartalmazzák. Az EF429197 szekvencia kültagként szerepelt az analízisben. Az elágazódásoknál a bootstrap újramintázási próbák százalékos értékei olvashatók. (1000 ismétlés alapján, csak a támogató [$>70\%$] értékeket tüntettük fel.) A lépték a genetikai távolságot mutatja.

3.2.2.3. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása juhban

A 2004-ben és 2005-ben vadmadarakban megfigyelt nyugat-nílusi encephalitis eseteiktől kb. 30 km-re tartott juhállományban, 2005. őszén az egyik négy éves anyajuh idegrendszeri tüneteket mutatott (elmaradt a nyájtól, lógatta a fejét, csikorgatta a fogait és járászavarokat mutatott). A nyájban tartott további 75 anya és 5 kos nem mutatott idegrendszeri tüneteket sem 2005-ben, sem a korábbi években, valamint elhullások sem fordultak elő 2005-ben. A beteg állat tüneti gyógykezelése (0,1 mg/kg dexamethasone, Dexafort, Intervet, USA és 10 mg/kg ampicillin, Vetrimoxin, Ceva-Phylaxia, Magyarország) hatástalan volt, a juh néhány napon belül elhullott. Az állat tartási helyén elvégzett kórbonctani vizsgálat során makroszkópos kóros elváltozásokat nem találtunk. Az állat feje a NÉBiH ÁDI debreceni intézetébe került kórszövettani vizsgálat és bejelentési kötelezettség alá tartozó, fertőző betegségek (veszettség, surlókór) kizárása céljából. A kórszövettani vizsgálatok során az agy minden részében lymphocytás polio- és leucoencephalitist (lymphoid sejtes érköpenyt, gócos és diffúz gliasarjadzást) találtunk (39. ábra). A bakteriológiai vizsgálatok negatív eredménnyel zárultak. A veszettség vírus jelenlétét direkt immunfluoreszcenciás módszerrel, a surlókórt pedig a kórszövettani lelet alapján zártuk ki.



39. ábra: Lymphocytás érköpeny nyugat-nílusi vírussal fertőzött juh agyvelő szövetében. Haematoxylin – eosin festés, 100× nagyítás.

A juh agyszövetének homogenizátumával oltottuk Vero és BHK-21 sejtvonalak sejtjeit. Az inokulációt követő 48-72 óra múlva mindkét sejttypusban diffúz citopatogén hatást (sejtlekerekedés) lehetett megfigyelni. A sejtenyészet felülúszókból vett mintákat 9 napos embrionált tyúktojások allantoisz üregébe oltottuk. Az embriók 72 órán belül elpusztultak, súlyos fokú oedema, a bőr alatti kötőszövetben vérzések és májkárosodás alakult ki bennük. A 4622 jelű vírusizolátumot szopósegér agyba oltva, az egerek az oltást követő 4-6. napon idegrendszeri tüneteket mutattak, és néhány óra múlva elhullottak. Kórszövettani vizsgálatokkal lymphocytás agyvelőgyulladást lehetett felismerni az elhullott egerek agyvelő mintáiban.

Az izolátum azonosítása céljából megvizsgáltuk JEV csoportba tartozó flavivírusok kimutatására alkalmas RT-PCR módszerrel (ld. 2.3 fejezet, WNV3f-WNV2r primerpár). 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.).

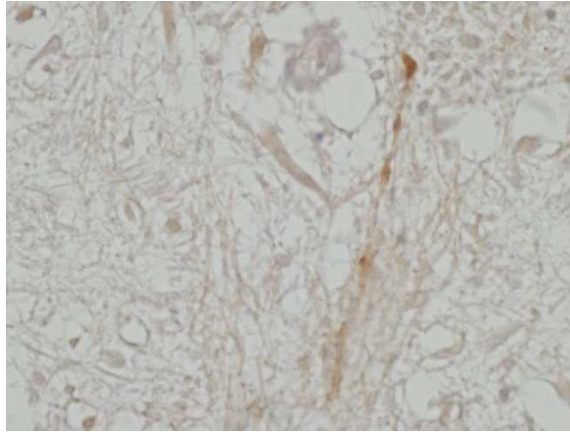
3.2.2.4. A nyugat-nílusi vírus kettes genetikai vonalhoz tartozó törzsének patogenitása lóban

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 mellső 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 (40. ábra).



40. ábra: Nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelő-gyulladás tünetei lóban. Dr. Korbacska-Kutasi Orsolya felvétele.

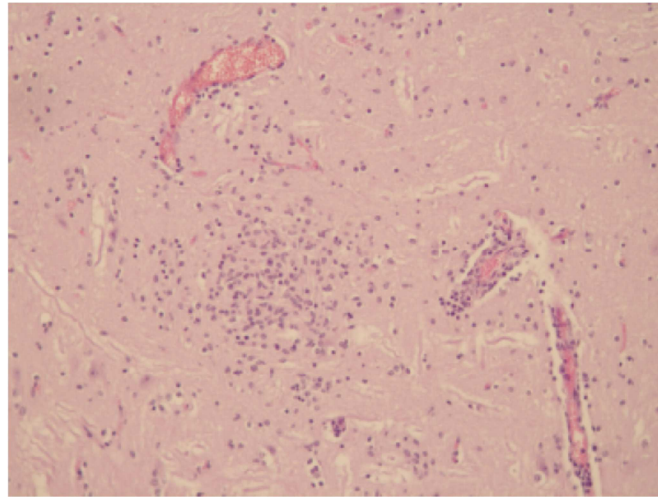
A vérkép-vizsgálat emelkedett fehérvérsejtszámot, de lymphocytopeniát és neutrophiliát mutatott. Az atlanto-occipitális résen át vett cerebrospinális folyadék fehérjetartalma a normálisnál magasabb volt; emelkedett sejtszámát főként neutrophil granulocyták és kis lymphocyták okozták. A ló súlyos és gyorsan romló állapota miatt a kezelőorvosok euthanasia mellett döntöttek. A kóronctani 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 gerincvelő mintáiból, valamint immunhisztokémiai vizsgálattal a vírus antigén jelenlétét a gerincvelő fehérállományából (41. ábra). A vírus RNS részleges nukleotid szekvenciája a legnagyobb (99,7%) hasonlóságot a Magyarországon, 2004-ben és 2005-ben kimutatott nyugat-nílusi vírusok szekvenciáihoz mutatta.



41. ábra: Nyugat-nílusi vírus antigén kimutatása immunhisztokémiai módszerrel ló gerincvelő axonjában. 100× nagyítás. Dr. Erdélyi Károly felvétele.

A fent bemutatott, hazánkban elsőként diagnosztizált, lóban megfigyelt nyugat-nílusi encephalitis esetet követő évben 17 idegrendszeri tünetet mutató, nyugat-nílusi vírusfertőzésre gyanús lovat vizsgáltunk. A megbetegedések 2008. augusztus 26. és október 10. között fordultak elő. Az érintett lovak (8 kanca, 6 herélt és 3 mén) átlagéletkora 8 év volt; a legfiatalabb egy 6 hónapos telivér méncsikó, a legidősebb egy 16 éves félvér kanca volt. A lovakat az ország különböző részein tartották. Legtöbbjük (10/17) félvér volt, de telivérek (3/17), Shetland pónik (3/17) és egy friz fajtahez tartozó ló is megbetegedett. A leggyakoribb tünet a járászavar (ataxia) és gyengeség volt (13/17). Ezek a tünetek 4 lónál a mellő végtagokon kifejezettebbek voltak. További 4 lónál ferde testtartást is meg lehetett figyelni. A triceps, quadriceps, fej- és nyakizmok remegése 7 esetben, hiperszenzitivitás 5 esetben, izommerevség 5 esetben fordult elő. Viselkedészavarokat két ló mutatott; 4 esetben az agyidegek érintettségére utaló tünetek (rágászavar, nyelészavar, egyoldali facialis bénulás) alakultak ki. Az izomgyengeség 7 esetben mind a négy végtagra kiterjedő bénulássá súlyosbodott, 5 ló elhullott vagy túltatásra 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. (Heveny fertőzésre utaló szerológiai eredménynek tekintettük a savópárban az IgG ellenanyagok szintjének legalább négyszeres emelkedését, vagy az IgM ellenanyagok kimutatását.) A neutralizáló ellenanyagok titere 1:10 és 1:270 között változott (medián 1:90). Emelkedett fehérvérsejtszámot és neutrophiliát három, elhullásra vezető esetben lehetett megfigyelni. A plazma metabolikus profilvizsgálata 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 cerebrospinális folyadékban két lónál lehetett emelkedett fehérjeszintet (>210 mg/dl) és emelkedett neutrophil granulocytá és kis lymphocytá számot megállapítani. Az elhullott állatok makroszkópos kórbonctani vizsgálata 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 (42. ábra). 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 vírusRNS jelenlétét két ló agyvelő és egy fehérvérsejt-mintáiból mutattuk ki RT-PCR módszerrel. A vírusok részleges nukleotid szekvenciái a legnagyobb hasonlóságot a 2008-ban, vadmadaraktól kimutatott nyugat-nílusi vírusokhoz mutatták (Kutasi és mtsai., 2011.)



42. ábra: Nyugat-nílusi vírus okozta agyvelőgyulladás lóban.

Gócos gliasejt-sarjadzás és lymphocytás érköpenyek. Hematoxylin-eosin festés, 200× nagyítás.

4. Megbeszélés

Az arbovírusok főként a trópusi országokban jelentenek komoly köz- és állategészségügyi problémát. Európai előfordulásukra irányuló felmérő vizsgálatokat elsősorban az 1960'-as és '70-es években folytattak. Akkoriban hazánkban is végeztek góckutatásokat, és számos arbovírus előfordulását igazolták (Molnár, 1982). Ezekben a felmérő vizsgálatokban, Európa-szerte, a „klasszikus” virológiai módszereket alkalmazták (pl. vírusizolálás szopósegerek intracerebrális oltásával, szerológiai módszerek: haemagglutináció gátlás, vírusneutralizációs próba). Ezek a módszerek hatékonynak bizonyultak számos vírus kimutatása során, ám végrehajtásuk nagyszámú és gyakorlott laboratóriumi személyzetet igényelt. Az arbovírusok kimutatását követő részletesebb (pl. elterjedtségre és patogenitásra irányuló) vizsgálatok feltárták, hogy ezek a vírusok – kevés kivétellel, (pl. kullancsencephalitis) – általában sporadikusan okoznak megbetegedéseket emberekben és háziállatokban. Talán ez is oka lehetett annak, hogy az arbovírusokkal kapcsolatos kutatások intenzitása az 1980-as és '90-es években Európa-szerte csökkent. A rutin diagnosztikában csak szűk körben végeztek arbovírusok célzott kimutatására irányuló vizsgálatokat. Az 1990-es évektől egyre szigorodó laboratóriumi biztonsági előírások egyre jobban behatárolták azoknak a kutatócsoportoknak a körét, amelyek bizonyos arbovírusokkal kapcsolatban kutatásokat folytathattak. Romániában, 1996. és 1998. között, észlelt nyugat-nílusi encephalitis járvány (Tsai és mtsai., 1998; Cernescu és mtsai., 2000), és különösen a WNV amerikai felbukkanása 1999-ben (Rappole és mtsai., 2000) ismételten ráirányította a kutatók figyelmét az arbovírusok kórtani jelentőségére. Az utóbbi két évtizedben a vírusok kimutatására elsősorban már molekuláris diagnosztikai módszereket (pl. PCR) használtak. Ezekkel a módszerekkel nagyszámú minta vizsgálatára nyílt mód és hatékonyabban lehetett kimutatni a vírusok nukleinsavának jelenlétét. (Saját vizsgálataink eredményei is azt mutatják, hogy a PCR segítségével olyan esetekben is sikerült igazolni a vírusfertőzést, ahol a vírusizolálási próbálkozások negatív eredménnyel zárultak.) A romániai és amerikai WNV fertőzések kapcsán a patológiai diagnosztikában dolgozó kollégákban, bizonyos eseteknél (pl. vadmadarak lymphocytás agyvelőgyulladásainál) felmerült annak az igénye, hogy flavivírusok jelenlétére irányuló vizsgálatokat végezzünk. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredménye az USUV és a WNV egzotikus törzse felbukkanásának kimutatása Közép-Európában.

4.1. Az Usutu vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink

Az Usutu vírus ausztriai megjelenésének kimutatása tulajdonképpen egy szerológiai keresztreakciónak köszönhető. Az első járványban elhullott feketerigók szövetmintáit immunhisztokémiai módszerrel vizsgálták nyugat-nílusi vírus antigének jelenlétére, poliklonális ellenanyagokkal. A pozitív eredményt viszont WNV-specifikus PCR-rel nem sikerült megerősíteni. Ezek után több flavivírus kimutatására

alkalmas PCR-rendszerekkel sikerült amplifikálni a vírusgenom rövid szakaszait, amelyek a szekvenciájuk alapján az Usutu vírusának bizonyultak (Weissenböck és mtsai., 2002). A kimutatás időpontjában az USUV genomjából csak egy rövid szakaszból (NS5-3'UTR) állt rendelkezésre szekvencia-adat (Kuno és mtsai., 1998). Saját kutatásaink során meghatároztuk az USUV ausztriai, illetve dél-afrikai eredetű referencia törzsének (SA Ar 1776) teljes genomszekvenciáját; annotáltuk, és összehasonlítottuk a *Flavivirus* genus többi ismert vírusának teljes vagy részleges genomszekvenciájával. A vizsgálatok igazolták azt, hogy az USUV a legközelebbi genetikai rokonságban a JEV szerokomplex vírusaival áll; a csoportra jellemző genetikai motívumok fellelhetők a nukleotid szekvenciákban (Bakonyi és mtsai., 2004b). A teljes genomszekvencia meghatározása lehetőséget teremtett egyrészt új diagnosztikai módszerek (RT-PCR, real-time RT-PCR) kifejlesztésére, másrészt a későbbi filogenetikai vizsgálatokhoz referenciát képeztek. Ezekkel a vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a közép-európai térségben (Magyarország, Svájc, Németország és Csehország) és Olaszországban kimutatott Usutu vírusok nagyon közeli genetikai rokonságban állnak a 2001-es ausztriai izolátummal, valószínűleg annak leszármazottjai. Az eredmények arra utalnak, hogy a vírus képes volt áttelelni az egymást követő években és endemiássá vált a régióban; a felbukkanása egyes közép-európai országokban nem egymástól független, afrikai behurcolások eredménye. Ezzel szemben a Spanyolország észak-keleti részén gyűjtött *Cx. pipens* pool-ból kimutatott USUV teljes genomszekvenciájának meghatározása és filogenetikai analízise azt bizonyította, hogy Európa dél-nyugati részén az USUV egy másik törzse fordul elő (Bakonyi és mtsai., 2014). Ez a vírus nem okozott diagnosztizált megbetegedéseket gerincesekben, ami lehetséges magyarázatul szolgál arra, hogy USUV elleni ellenanyagokat mutattak ki az Egyesült Királyságban tartott baromfi fajokban (Buckley és mtsai., 2003; Buckley és mtsai., 2006), annak ellenére, hogy sem házi-, sem vadmadarakban nem tapasztaltak USUV fertőzéssel összefüggésbe hozható megbetegedéseket vagy elhullásokat. Lehetséges, hogy ez a vírustörzs kevésbé virulens, mint az Ausztriában / Olaszországban felbukkant törzs. Megjegyzendő, hogy kimutattak egy másik USUV-t is elhullott énekes rigó mintájából Spanyolországban (Höfle és mtsai., 2013). Ez a vírus közelebbi genetikai rokonságot mutat a közép-európai vírusokkal, de nyugat-afrikai vírusokhoz is közel áll. Az utóbbi években számos alkalommal mutatták ki az USUV jelenlétét olaszországi és németországi mintákból (Savini és mtsai., 2011; Becker és mtsai., 2012; Cadar és mtsai., 2014, Cadar és mtsai., 2015; Calzolari és mtsai., 2017). Nagyszámú vírustörzs teljes vagy részleges szekvencia meghatározása és filogenetikai analízise lehetőséget teremtett az USUV genetikai változatosságának pontosabb leírására, valamint a vírustörzsek eredetével és terjedésével kapcsolatos elméletek kialakítására (Engel és mtsai., 2016; Ziegler és mtsai., 2016; Cadar és mtsai., 2017a; Calzolari és mtsai., 2017). Ezekben a tanulmányokban az eddig ismert Usutu vírusokat 5-8 genetikai csoportba (genetikai vonalba vagy kládba) sorolják. Egyeseket „afrikai”, másokat „európai” vonalaknak tekintenek. Mindemellett, az elnevezések valójában tendencia-szerűek, mivel egyrészt előfordulnak Európában is „afrikai” vonalak képviselői, másrészt a különböző statisztikai módszerekkel és különböző hosszúságú szekvenciák

felhasználásával készített törzsfák topológiája olykor eltér, és polifiletikus csoportok kialakítását eredményezi. A vírusok Európán belüli terjedésével kapcsolatban a tanulmányok mindegyike arra a következtetésre jut, hogy a Közép- és Nyugat-Európában (Belgiumban, Hollandiában, Franciaországban) előforduló (direkt módszerrel kimutatott) Usutu vírusok az ausztriai, 2001. évi járványból származó izolátummal állnak a legközelebbi genetikai rokonságban. A spanyolországi, szúnyogból kimutatott USUV a közép-európaiaktól független behurcolás eredménye, ahogy a 2014-ben, Németországban felbukkant vírustörzs is (Cadar et al., 2015). Az a következtetés, hogy a vírus először Ausztriában bukkant fel és onnan terjedt tovább a környező országokra, azonban nem biztos, hogy megállja a helyét. Retrospektív vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az USUV nukleinsava jelen van azoknak a vadmadaraknak a szervmintáiban, amelyeket 1996-ban Észak-Olaszországban (Toszkána tartományban) elhullott vadmadarokból gyűjtöttek (Weissenböck és mtsai., 2013). A formalinban fixált szövetmintákban a vírus-RNS a tárolás éveitől jelentősen töredezett, ezért sajnos csak rövid genomszakaszok amplifikációjára és szekvencia-meghatározására nyílt mód. Ezeknek a szekvenciáknak a filogenetikai analízisével nem lehetett megfelelő statisztikai támogatottsággal igazolni azt, hogy az 1996-os, olaszországi vírus a 2001-es ausztriaihoz áll a legközelebbi rokonságban („őse”). Az USUV előfordulását Észak-Olaszországban első kimutatása óta minden évben igazolták (Savini és mtsai., 2011; Calzolari és mtsai., 2017), ami endémiás jelenlétre utal.

Legutóbbi vizsgálataink eredményei alapján az USUV Magyarországon 2010. és 2015. között gyűjtött mintákból kimutatott szekvenciái a 2001-es ausztriai és 2005-ös magyarországi vírusokkal állnak a legközelebbi genetikai rokonságban. Az ország nyugati részén, 2015-ben és 2016-ban, valamint Ausztriában 2016-ban kimutatott vírusok az Olaszországban, 2009-ben és 2010-ben talált vírusokhoz hasonlítanak leginkább (Bakonyi és mtsai., 2017a). Ez arra utal, hogy a vírus Olaszországból el tud jutni Magyarországra és Ausztriába. Ezért semmi sem zárja azt ki, hogy az 1996-ban, Olaszországban jelen levő vírus fennmaradt és átterjedt Ausztriába és Magyarországra is. A genetikai órát is figyelembe vevő filogenetikai becslések az „európai” genetikai vonalak őseinek elkülönülését az „afrikai” vonalakétól az 1970-es – ’80-as évekre (1966-1991 közé teszi) (Engel és mtsai., 2016). Ez is alátámasztja, hogy a vírus már jóval a 2001. évi felfedezése előtt jelen lehetett Európában.

A vírus afrikai felbukkanása a filogenetikai alapú becslések szerint a XV. században (XII. és XVIII. század között) történhetett (Engel és mtsai., 2016). Előfordulása a Dél-Afrikai Köztársaság mellett egyenlítői országokban (Szenegál, Elefántcsontpart, Burkina Faso, Nigéria, Közép-Afrikai Köztársaság és Uganda) ismert, valamint szeropozitivitást mutattak ki Marokkóban mintázott feketerigóból is (Nikolay és mtsai., 2011). Elsősorban szúnyogfajokból mutatták ki Afrikában, de számos madárfajban is igazoltak USUV fertőzést (ld. 1.4. fejezet). A vírus nukleinsavát vagy vírus elleni ellenanyagokat mutattunk ki olyan, Ausztriában mintázott, vonuló madárfajokból (barna rétihéja, cserregő nádiposzáta, füsti fecske, kerti poszáta, kis poszáta, kormos légykapó, mezei poszáta, molnárfecske, vörös vércse), amelyek Afrikában telelnek (Meister és mtsai., 2008). Ezekben az esetekben nem

bizonyítható, hogy a madarak Afrikában fertőződtek, de hosszú távú terjesztő szerepüket nem lehet kizárni. Az USUV elleni ellenanyagokat Marokkóban feketerigóból mutattak ki (Figuerola és mtsai., 2009), amely faj különösen fogékonyak tűnik erre a vírusra. Azt azonban még nem sikerült megállapítani, hogy mely vonuló madarak játszanak szerepet a vírus kontinensek közötti terjesztésében. Egyes közlemények az USUV kimutatását írják le afrikai rágcslókból. A sokcsecsű egérből (*Praomys*) izolált és eredetileg USUV-nak vélt vírusról (S-t Y 276) későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy attól eltér és jelenleg *Yaounde virus*-ként önálló fajnak tekintik (Nikolay és mtsai., 2011). Viraemia jeleit mutatták ki afrikai közönséges pásztásegérből (*Arvicanthis abyssinicus*) (Simpson és Lule, 1964), de erről a leletről további részletek nem állnak rendelkezésre. Az újabb európai kutatások kimutatták, hogy az USUV emlősöket (pl. denevért, embert) is képes természetes úton fertőzni, ezért nem zárható ki, hogy az afrikai emlős gazdák köre tágabb az eddig ismerteknél. Emberekből eddig kétszer izoláltak USUV-t Afrikában. Az egyik alkalommal a Közép-Afrikai Köztársaságban történt 1981-ben, egy kiütéses lázas betegből, a másik esetben láz és sárgaság tüneteit mutató, 10 éves gyermekből izolálták a vírust Burkina Faso-ban 2004-ben (Nikolay és mtsai., 2011). Figyelembe kell venni azt is, hogy Afrikában az egészségügyi ellátás szintje számos területen alacsony. A lázas betegeknek csak egy része kerül orvosi vizsgálatra, a vírusfertőzésekre irányuló laboratóriumi vizsgálatok aránya alacsonyabb (pl. malária klinikai diagnózisa miatt), illetve a kevésbé specifikus vizsgálómódszerek használatával téves diagnózisok (pl. nyugat-nílusi láz) születhetnek. Ezért joggal feltételezhető, hogy az USUV által okozott megbetegedések döntő többségénél az oki körjelzés elmarad.

Az USUV ausztriai felbukkanását követően, 2002. és 2005. között, célzott kutatást folytattunk a vírus előfordulásának és terjedésének nyomon követésére. Az eredmények alapján a járvány 2003-ban csúcsosodott ki Ausztriában. 2002-ben a vizsgált madarak (72) 42%-ából (3 fajból) lehetett kimutatni a vírus (RNS és antigén) jelenlétét (Weissenböck és mtsai., 2003), 2003-ban a megvizsgált 177 madárminta 52%-a (5 fajból) volt pozitív. A vizsgált madarak száma hasonló volt a következő két évben is, 2004-ben a minták 5%-a (11/224), 2005-ben pedig 4%-a (4/103) bizonyult USUV pozitívnak (Chvala és mtsai., 2007). Ezzel párhuzamosan, a szeropozitív madarak aránya a 2003-ban és 2004-ben kimutatott ~8%-ról (10/113 és 9/109) 2005-re 56%-ra (110/197) emelkedett és 2006-ban is magas szinten maradt (39%, 9/23) (Meister és mtsai., 2008). Az adatok alapján valószínűsíthető, hogy a 2001-et megelőző években az USUV nem volt jelen Ausztria keleti részén, ezért a gazda populációk immunológiaiilag védtelenek voltak vele szemben. A vírus 2001-ben (vagy akár 1-2 évvel korábban) jutott a területre (pl. telelő területről visszatérő, vírusfertőzött madárral, de akár vírussal fertőzött szúnyoggal, passzív módon) Afrikából vagy a mediterrán térségből. A vírus elszaporodott a fogékony gerinces gazdákban és a szúnyog vektorokban. Jelenlétét akkor sikerült felismerni, amikor a (jelenlegi tudásunk szerint) leginkább érzékeny, és ráadásul városban élő (antropophil) gazdafajban, a feketerigóban olyan arányban fordultak elő megbetegedések és elhullások, hogy ez feltűnt az

embereknek és vizsgálatra küldtek rigó tetemeiket. A járványtani és filogenetikai adatok alapján egyértelműnek tűnik, hogy a vírus képes volt áttelelni az ausztriai klimatikus viszonyok között, és szaporodási ciklusa 2002-ben és 2003-ban is folytatódott. A vadmadár gazdák mind nagyobb számban fertőződtek a vírussal, és jelentős részük túlélte a fertőzést, bennük immunológiai védetség alakult ki. A szikimmunitásnak köszönhetően valószínűleg a fiókák is védetté váltak olyan mértékben, hogy bennük a megbetegedések és elhullások aránya csökkent. Az immunis madarak a következő évek folyamán valószínűleg ismételten fertőződtek a szúnyog vektorok csípései alkalmával, ami szekunder immunválaszt váltott ki bennük, és ezért védetségük fennmaradt. 2004-re már olyan arányú immunitás alakulhatott ki a gazdapopulációban, ami jelentősen csökkentette a fogékony és így fertőzés után viraemiássá váló madarak arányát, ezért a szúnyog vektorok is egyre ritkábban fertőződtek. Modellszámításaink alapján a 2003-ban 1,35-ös R_0 érték 2004-re 0,54-re csökkent (Rubel és mtsai., 2008). Ezért 2004 után egyre ritkábban fordultak elő megbetegedések és elhullások; a járvány véget ért (Meister és mtsai., 2008). Hasonló módon történt az USUV első kimutatása Magyarországon, Olaszországban, Svájcban és Csehországban is. Magyarországon már 2003-2004 során végeztünk passzív monitoring vizsgálatokat az USUV kimutatására, de a vizsgált madártetemek egyikében sem volt jelen a vírus. Elsőként 2005. augusztusában jelentettek Budapest több kerületéből is feketerigó elhullásokat, és a vizsgálatra érkezett madarak szerveiből ki tudtuk mutatni a vírus jelenlétét. Ornitológusok beszámoltak arról, hogy 2003-ban, az ország nyugati részén (Sopron környékén) megfogytak a feketerigók száma, de az onnét vizsgálatra érkezett, két madártetemből nem lehetett kimutatni a vírus jelenlétét, ezért biztonsággal nem állítható, hogy ennek az egyedszámcsökkenéseknek a hátterében az USUV terjedése állt. Budapesten a következő két évben (2006. augusztusában és 2007. júliusában) is kimutattunk néhány feketerigó elhullásával járó USUV fertőzéseket, ami a vírus fennmaradására utalt a populációban (Bakonyi és mtsai., 2007). Észak-nyugat Olaszországban egy vadsparkban nevelt baglyok idegrendszeri megbetegedései vetették fel az USUV fertőzés gyanúját. Különösen azért, mert a 2001-es ausztriai járványkitörés során – a feketerigók mellett – a schönbrunni állatkert szakállas baglyaiban alakultak ki elhullással járó megbetegedések; ugyanúgy, mint az olaszországi járványkitörésnél. Vizsgálataink igazolták az USUV jelenlétét az elhullott madarak szövetmintáiban, és közeli genetikai rokonságot állapítottunk meg az ausztriai és olaszországi vírusok között (Manarolla és mtsai., 2010). Svájcban szintén 2006-ban okozott jelentősebb járványt az USUV. A zürichi állatkertben jelentős számú bagoly (köztük szakállas baglyok) és feketerigók elhullása vetette fel az USUV fertőzés gyanúját. Érdekes módon, a svájci járványkitörésben háziverebek is nagy számban érintettek voltak, valamint kék cinegéből és vörösbegyéből is ki tudtuk mutatni a vírus jelenlétét (Steinmetz és mtsai., 2011). Csehország déli, Ausztriához közeli városában, Brnoban, 2011. májusában találták azokat a feketerigó-tetemeiket, amelyekből először mutattuk ki a vírus jelenlétét az országban. A fertőzöttség fennmaradására utal, hogy a vírust 2012-ben is ki tudtuk mutatni a városban talált rigók tetemeiből (Hubálek és mtsai., 2014b), valamint 2013-ban *Cx. modestus* szúnyogokból (Rudolf és mtsai., 2015b). Az USUV

németországi (Becker és mtsai., 2012), belgiumi (Garigliany és mtsai., 2014; Garigliany és mtsai., 2017), franciaországi (Lecollet és mtsai., 2016) és hollandiai (Rijks és mtsai., 2016) felbukkanása is vagy városi környezetben megfigyelt vadmadár-elhullásokhoz, vagy fogságban nevelt madarak megbetegedéseikhez köthető. A felbukkanást követő években végzett, célzott monitoring vizsgálatok Észak-Olaszországban (Savini és mtsai., 2011; Calzolari és mtsai., 2017) és Magyarországon (Bakonyi és mtsai., 2017a) is igazolták a vírus folyamatos jelenlétét. Olyan években is, amikor különösebb mértékű vadmadár megbetegedéseket és elhullásokat nem tapasztaltak. A filogenetikai vizsgálatok eredményei is alátámasztják azt az elméletet, hogy az USUV legalább 2001. (vagy 1996.) óta endémiásan jelen van Európában. Azt, hogy jelentősebb vadmadár elhullásokkal járó járványkitörések melyik években alakulnak ki nehezen jelezhető előre. Valószínűleg a gazdafajok védettségi szintjének csökkenése (fogékony generációk felnövése) mellett az időjárás is befolyásolja, a vektorok szaporodását és bennük a vírusreplikáció intenzitát.

Az Usutu vírus gazdafaj-spektrumával kapcsolatban egyre több adat áll rendelkezésünkre. A vadmadarak közül feketeterigókban fordultak elő leggyakrabban megbetegedések. Kórszövettani, immunhisztokémiai és *in situ* nukleinsav-hibridizációs vizsgálatokkal is igazoltuk, hogy a vírus szaporodik a feketeterigók szöveteiben. Ez a faj valószínűleg szerepet játszik a vírus fenntartásában és terjesztésében; ám mivel számos más madárfaj fogékonyasága is ismert, nem feltétlenül a feketeterigó a legfontosabb amplifikációs gazdája a vírusnak, sokkal inkább indikátor-fajnak tekinthető fokozott érzékenysége és antropofil életmódja miatt. Saját vizsgálataink során 36 vadmadár faj fogékonyágát igazoltuk direkt vagy indirekt virológiai módszerekkel. Más kutatások adatait is figyelembe véve elmondható, hogy a vírus legalább 62 madárfajt képes fertőzni Afrikában és Európában (Nikolay, 2015).

A baromfi fajok fogékonyágának vizsgálata céljából fertőzési kísérleteket végeztünk házityúokban és házilúdiban. Két hetes korú csirkék intravénás fertőzése 10^3 TCID₅₀ mennyiségű vírussal nem okozott klinikai tünetekkel járó megbetegedéseket, és csak enyhe kórszövettani elváltozásokat lehetett megfigyelni egyes madarak lépében, májában és agyszövetében. A fertőzést követő 5-7. napon a fertőzött madarak egy része viraemiás volt és ürítette a vírust testvázadékaival. Ellenanyagok csak néhány fertőzött csirkében, alacsony szinten képződtek (Chvala és mtsai., 2005). Amikor két hetes korú libákat nagyobb (5×10^4 TCID₅₀) mennyiségű vírussal intramuscularisan fertőztünk, hasonló eredményeket kaptunk. A madarakban nem lehetett az USUV-fertőzéssel összefüggésbe hozható klinikai tüneteket megfigyelni a kísérlet 22 napja alatt. A vírus nukleinsavának jelenlétét több madár különböző szerveiből ki lehetett mutatni, valamint viraemia és testvázadékokkal vírusürítés alakult ki a fertőzést követő 5-8. napon. Ellenanyagok a libák egy részében képződtek, és viszonylag alacsony titert értek el (Chvala és mtsai., 2006). A két kísérlet eredménye arra utal, hogy a tyúkok és libák mérsékelten fogékonyak az USUV fertőzésre, nem betegszenek meg, rövid ideig tartó viraemia és alacsony szintű ellenanyag-válasz alakul ki bennük. Ez alapján a vírus nem jelent különösebb veszélyt

erre a két baromfi fajra (és a klinikai tapasztalatok alapján a többi házasított madárfajra sem), és valószínűleg ezek a fajok nem játszanak fontos szerepet a vírus ökológiájában (nem amplifikációs gazdák). A fertőzött madaraknak csak egy részében és alacsony szinten termelődtek ellenanyagok, ami egyben arra is utal, hogy ezek a fajok kevésbé alkalmasak az USUV aktivitás nyomon követésére (szentinel állatok gyanánt).

Az USUV emlős gazdafajainak köre kevésbé ismert. Saját vizsgálataink is alátámasztották, hogy – sok más arbovírushoz hasonlóan – szopósegerek intracraniális oltással fertőzhetők a vírussal, az szaporodik az egerek idegrendszerében. Intracraniálisan oltva a 3 hónapos egereket is megbetegíti. Intraperitoneálisan bejuttatva a vírus egy hetes korú egereket megbetegített (kb. a fertőzés utáni 6. naptól), két hetes korúakban viszont már nem alakultak ki tünetek. Kórszövettani elváltozásokat és a vírus jelenlétét a tünetek kezdetén főként az agytörzs, a nyúltagy és a kisagy neuronjaiban lehetett megfigyelni, később viszont további agyi területek érintettsége is kimutatható volt (Weissenböck és mtsai., 2004). Egerekben az USUV a többi, JEV-szerokomplexbbe sorolt vírushoz nagyon hasonló elváltozásokat (lymphocytás panencephalitist) idézett elő. Európai emlősellatokban klinikai megbetegedéseket és elhullásokat eddig csak Németországban figyeltek meg, közönséges törpedenevérekben (*Pipistrellus pipistrellus*) (Cadar és mtsai., 2014.). Különböző denevér fajok számos, gyakran közegészségügyi jelentőségű vírus (pl. rhabdo-, filo-, corona-, henipavírusok) hordozói. Az ízeltlábú vektor nélküli flavivírusok jelentős részét is denevérekből mutatták ki. Nem meglepő, hogy a denevérek fogékonyak az Usutu vírusra is, ugyanakkor járványtani szerepük egyelőre nem ismert. Tekintettel életmódjukra, elképzelhető, hogy ugyanazok a szúnyogfajok (pl. *Cx. pipiens pipiens*) szívnak vért belőlük, mint amelyek a vadmadaraktól, és így gyakrabban lehetnek kitéve USUV fertőzésnek is. A denevérek jelentőségének vizsgálata az USUV járványtanában jelenleg is folyó kutatások tárgya. USUV elleni ellenanyagokat lehetett még kimutatni lovak, kutyák és gímszarvasok savómintáiból (Durand és mtsai., 2016; García-Bocanegra és mtsai., 2016). Saját vizsgálataink is igazolták, hogy klinikai tüneteket nem mutató lovak és kutyák között előfordulnak USUV pozitív egyedek (nem közölt adatok). Ennek a megfigyelésnek elsősorban differenciál-diagnosztikai jelentősége van, mivel a rutinszerűen használt szerológiai módszereknél (ELISA, HAG) gyakoriak a keresztreakciók pl. WNV és USUV vonatkozásában.

Emberi USUV fertőzéseket Európában elsőként Olaszországban írtak le. Az egyik esetben thromboticus thrombocytopeniás purpura (Moschcowitz syndrome) és heveny májgyulladás tüneteit követően, májtranszplantáción átesett betegben alakultak ki idegrendszeri tünetek. A transzplantáció előtt elvégzett, WNV viraemiára irányuló molekuláris diagnosztikai vizsgálat (nucleic acid amplification test – NAAT) pozitív eredményt adott. A WNV specifikus kimutatására végzett vizsgálat viszont negatív eredménnyel zárult, ezért univerzális, flavivírus-kimutató rendszerrel (Scaramozzino és mtsai., 2001) tovább vizsgálták a beteg savómintáit. Pozitív eredményt kaptak; az amplifikációs termék szekvencia analízise segítségével megállapították, hogy az USUV okozott

viraemiát a betegben (Cavrini és mtsai., 2009). Az alapbetegségen túl, valószínűleg a szervátültetéshez köthető immunszuppresszió is szerepet játszhatott a vírus központi idegrendszerbe jutásában. A másik esetben B sejtes lymphoma miatt gyógykezelt (szintén erősen immunszuppresszált) betegben alakultak ki lázas, majd idegrendszeri tünetek. Az USUV nukleinsavát kimutatták a beteg cerebrospinális folyadék mintájából (Pecorari és mtsai., 2009). Mindkét megbetegedés nagyjából egyidőben (2009. augusztus-szeptember) történt Észak-Olaszország Modena és Emilia-Romagna tartományaiban. Az eseteket követő retrospektív vizsgálatok kimutatták az USUV nukleinsavának jelenlétét további három, heveny meningoencephalitissel 2008-ban és 2009-ben az említett régiókban kezelt beteg cerebrospinális folyadékában is (Cavrini és mtsai., 2011). Egy közelmúltban publikált tanulmány további nyolc esetben mutatott ki USUV RNS-t észak-olaszországi meningoencephalitises betegek cerebrospinális folyadék mintáiból, illetve egészséges vagy más betegségben szenvedő személy vérmintájából. Az USUV fertőzés gyakorisága meghaladta a WNV gyakoriságát az ilyen jellegű mintákban a régióban (Grottola és mtsai., 2017). Horvátországban 2013-ban diagnosztizáltak (szerológiai módszerekkel) USUV fertőzést egy idegrendszeri megbetegedésben szenvedő betegnél (Vilibic-Cavlek és mtsai., 2014). Emellett véradókból (egészséges emberekből) gyűjtött vér WNV-re irányuló NAAT vizsgálata során pozitívnak talált minták RT-PCR-es ellenőrzése Németországban is azonosított humán USUV fertőzést 2016-ban (Cadar és mtsai., 2017b). Legutóbbi saját vizsgálataink során ausztriai véradók WNV-NAAT pozitív vérmintájából mutattuk ki az USUV RNS jelenlétét (Bakonyi és mtsai., 2017b). Szerológiai felmérő vizsgálatok észak-olaszországi véradókban 0,23%-os (Pierro és mtsai., 2013) és 1,1%-os (Gaibani és mtsai., 2012), kevert populációban (egészséges és beteg embereken) 6,5%-os (Grottola és mtsai., 2017) gyakorisággal mutattak ki USUV elleni ellenanyagokat (ELISA és PRNT módszerekkel). Németországban 4200 véradó szerológiai (ELISA, IIF és PRNT) vizsgálata során 1 esetben (0,02%) találtak USUV pozitivitást (Allering és mtsai., 2012). Szerbiában, szúnyogcsípésnek gyakran kitett, 93 személy közül hétből mutattak ki USUV elleni ellenanyagokat (Hrnjaković Cvjetković és mtsai., 2016). A kutatások egyértelműen bizonyítják, hogy az USUV emberi fertőzéseket okoz Európában is, bár a gyakorisága viszonylag alacsony. Mivel az USUV és a WNV előfordulási területe jelentősen átfed, a WNV-re irányuló molekuláris és szerológiai felmérő vizsgálatoknál tekintettel kell lenni a két vírus közti keresztreakciók lehetőségére (Nikolay, 2015; Grottola és mtsai., 2017).

Az USUV előfordulását eddig kimutatták *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis s.l.*, *Culex neavei*, *Culex pipiens/torrentium*, *Culex perexiguus*, *Culiseta annulata*, *Ochlerotatus caspius*, és *Ochlerotatus detritus* (Nikolay, 2015) szúnyogfajokból, valamint a *Coquillettidia* és *Mansonia* nemzetség egyes fajaiból (Gaibani és Rossini, 2017). Kutatásaink igazolták az USUV előfordulását *Culex modestus*-ban is (Rudolf és mtsai., 2015a). Felmérő és vektor-kompetencia vizsgálatok alapján a *Cx. pipiens* tűnik a vírus elsődleges vektorának (Calzolari és mtsai., 2012, Fros és mtsai., 2015).

Az Usutu vírussal kapcsolatos kutatásaink kezdetén nem álltak rendelkezésre a vírus kimutatására irányuló, specifikus virológiai vizsgáló módszerek. A vírus teljes genomszekvenciájának meghatározását követően konvencionális és TaqMan hibridizációra alapuló, valós idejű RT-PCR rendszereket fejlesztettünk ki a vírus nukleinsavának kimutatására különböző mintákból. Ezekkel a módszerekkel igazolni lehetett a vírusfertőzést olyan minták esetén is (pl. autolizált minták, formalinnal fixált szövetek, szúnyogok, vérsejtek), amikor a klasszikus, izolálási módszereket nem lehetett használni, illetve a fehérje-kimutató módszerek kudarcot vallottak. A molekuláris módszerek használata azonban nem válthatja fel teljesen a klasszikus virológiai módszereket. Sikeres vírusizolálást követően olyan további tulajdonságait lehet vizsgálni a vírusnak (pl. virulencia, antigenitás) amelyre a nukleinsav szekvencia-adatokból csak következtetni lehet. Vírusizolálási és -szaporítási vizsgálatainkban ezért meghatároztuk az USUV *in vitro* sejtspektrumát. Megállapítottuk, hogy a vírus számos, emlős és madár eredetű, permanens sejtvonal és primaer szövettényészet sejtjeiben képes szaporodni. A legfeltűnőbb citopatogén hatást a Vero és PK-15 sejtvonalak és a lúd embrió fibroblaszt primaer szövettényészet sejtjei mutatták. Megjegyzendő azonban, hogy a CPE intenzitása Vero és PK-15 sejtekben végzett passzálások során csökkent, és akár el is tűnt (de a vírusszaporodás immunhisztokémiai és PCR módszerrel igazolható volt), a lúd embrió szövettényészetben viszont sorozatos passzázásokat követően is fennmaradt. Ezért ez a szövettípus megbízhatóbban használható a vírus elszaporítására (bár számos, elsősorban gyakorlati szempontból nehezebb a használata, mint a sejtvonalaké). Az USUV izolálására vizsgálataink alapján a csirkeembriók nem alkalmasak, a libaembriók viszont igen. Szopósegerek intracerebrális oltásával az USUV (hasonlóan más arbovírusokhoz) hatékonyan izolálható.

Szerológiai vizsgálatra kifejlesztettünk haemagglutináció-gátlási próbát is: a vírus a lúd vörösvérsejteket agglutinálja, de a próba kivitelezése során figyelemmel kell lenni arra, hogy az agglutináció erősen pH-függő. (Általában pH 6.2 értéknél volt a legkifejezettebb a haemagglutináció.) A kereskedelmi forgalomban kapható WNV IgG kompetitív ELISA kitek egy részénél keresztreaktivitást figyeltünk meg; a kit a WNV mellett az USUV (és TBEV) elleni ellenanyagokat is kimutatja. Gyakorlati szempontból ez azt jelenti, hogy ez a kit alkalmas az USUV szerodiagnosztikájára is, ám a pozitív (és kétes) savómintákat specifikusabb szerológiai módszerrel, leginkább PRNT-vel (vagy WNV-specifikus ELISA-val) tovább kell vizsgálni a homológ vírus pontosabb beazonosítása céljából. Mivel a WNV és USUV egyes neutralizáló ellenanyagai is keresztreakálnak a másik vírussal, mindkét antigénnel, szimultán végzett (és 90%-os gátlási szinten elbíralt) PRNT segítségével lehet legpontosabban meghatározni a szeropozitivitás specifikusságát (amennyiben legalább négyszer magasabb neutralizáló titer lehet megfigyelni az egyik vírus ellen, mint a másik ellen). A WNV (és egyes vélemények szerint az USUV is) fokozott biológiai kockázatú vírus, emiatt a szaporításához BSL-3 szintű laboratórium használata szükséges, ami a szimultán PRNT vizsgálatokat végző laboratóriumok körét erősen behatárolja.

4.2. A nyugat-nílusi vírus európai előfordulásával kapcsolatos megfigyeléseink

A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos tudományos ismeretek sokkal szélesebb körűek, mint amit az Usutu vírusról tudunk. Az Egyesült Államok közegészségügyi intézete (National Institute of Health) által üzemeltetett Nemzeti Orvostudományi Könyvtár (US National Library of Medicine) nyilvános publikációs adatbankjában (PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) a keresőprogram 2017. november 29.-én 6682 olyan közleményt talál, amelyben a West Nile vírus kifejezést említik. (Az Usutu vírus kifejezést 183 publikáció tartalmazza.) Az első említés (1943) és a vírus 1999. októberi, new york-i felbukkanása között eltelt 56 évben csupán 716 közlemény említi a vírust; a többi 5966 az utóbbi 18 évben jelent meg, vagyis átlagosan évi 331 közleményt publikáltak a témában. A tudományos érdeklődés a vírus iránt nem csökken, hiszen 2017 januárja és novembere között 343 olyan közlemény jelent meg, ami a nyugat-nílusi vírussal (is) foglalkozik. Emiatt a nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos új ismeretek teljességre törekvő áttekintése és összegzése meghaladja értekezésem kereteit; csak a kutatásaink szempontjából leginkább releváns publikációk hivatkozásai szerepelnek a dolgozatban.

A WNV első hazai izolátumának (WN_{m1}, erdei pocok, Gic, 1972) genetikai jellemzése céljából végzett vizsgálataink kimutatták, hogy a vírusgenom >55%-ának összehasonlítása alapján a vírus nukleotid szekvenciája 99,93%-ban (6081/6085 nt), származtatott aminosav szekvenciája pedig 100%-ban megegyezik a WNV lineage 1 referencia törzsének (Eg 101) szekvenciájával (Bakonyi és mtsai., 2004a). Ezt a vírustörzset 1951-ben izolálták Egyiptomban emberi megbetegedésből, és azt követően számos európai arbovírus laboratóriumba eljutott. A nagyfokú hasonlóságnak két magyarázata lehet. Az egyik szerint az 1970-es években, arbovírus góckutatások során gyűjtött mintákat a Csehszlovák Tudományos Akadémia pozsonyi virológiai intézetében dolgozták fel. Előfordulhatott az, hogy a vírusizolálás során, tévedésből, a laborban használt referencia törzset oltották a szopósegekbe, de az is, hogy amikor az Országos Epidemiológiai Központ munkatársai kértek az izolátumból, valamilyen félreértés folytán a szlovák kollégák a referencia törzset küldték el. Ebben az esetben kétségre vonható, hogy a WNV valóban jelen volt-e a Bakonyban és Börzsönyben az 1970-es években gyűjtött kisemlősök mintáiban. A másik lehetséges magyarázat, hogy a vírustörzs valóban, szinte változatlanul volt jelen 20 évvel később, az eredeti izolálás helyétől több ezer kilométerre. Ezt a feltételezést egy másik, WNV lineage 1-be tartozó vírustörzsszel végzett vizsgálataink eredményei támaszthatják alá. Törökországban először 2011-ben mutatták ki a WNV jelenlétét. Egy törzset (T2) izoláltak idegrendszeri tüneteket mutató lóból. Meghatároztuk a vírustörzs teljes genomszekvenciáját, és összehasonlítottuk azt a génbanki adatbázisokban hozzáférhető vírusokéval. A legnagyobb hasonlóságot (10954/10964 nt; 99,9% és 3428/3433 aa, 99,8%) a Közép Afrikai Köztársaságban, 1967-ben izolált WNV törzshöz (ArB310/67) mutatta (Ergunay és mtsai., 2015). Egyik vizsgáló

laboratóriumban sem volt jelen az ArB310/67 törzs, ezért a laboratóriumi kontamináció lehetősége kizárható. Nehezen magyarázható tény, hogy hogyan tudott a vírus fennmaradni szinte változatlanul több mint 40 éven keresztül és eljutni Közép Afrikából Törökországba. A T2 vírustörzshöz genetikailag nagyon közeli vírusokat mutattunk ki Törökország különböző régióiban, emberekből, lovakból és szúnyogokból, 2011-2013 között gyűjtött mintákból is. Az egyik (, Közép-Anatóliában, lóól, 2011-ben izolált) vírus viszont más afrikai törzsekhez (IBAN7019, Nigéria, 1965 és ArD27875, Szenegál, 1979) hasonlított jobban. Hasonló jelenséget írtak le Shah-Hosseini és munkatársai (2014) is: egy idegrendszeri tüneteket mutató iráni betegből 2009-ban kimutatott, lineage 2 WNV részleges nukleotid szekvenciája 100%-os hasonlóságot mutatott a vírus Közép Afrikai Köztársaságban, 1982-ben izolált törzséhez (Shah-Hosseini és mtsai., 2014). Lehetséges, hogy ezek a vírustörzsek olyan szelekciós előnyöket élveznek, ami miatt genomjuk (az RdRp pontatlansága ellenére) szinte változatlanul maradt fenn az évtizedek folyamán, egyelőre még nem azonosított gazdában vagy vektorban. Arra valószínűleg soha nem kapunk választ, hogy a magyarországi, erdei pocokból származónak vélt vírusnak is ez-e a története, mivel az eredeti izolálást végző személyek már nem dolgoznak a pozsonyi intézetben. A genetikai vizsgálatok mindemellett meggyőzően bizonyították az Országos Epidemiológiai Központban, WNV diagnosztikához (IIF) az utóbbi 40 évben használt vírustörzs (WN_{ml}) fajazonosságát. Ezt azért is érdemes kihangsúlyozni, mivel ez alatt az idő alatt arbovírus fertőzöttség gyanújával az Országos Epidemiológiai Központba küldött minták kullancsencephalitis kizárását követő, nyugat-nílusi lázra irányuló vizsgálata ezzel a vírustörzsszel történt. Így az, hogy 2003-ig nem mutattak ki hazánkban emberekben nyugat-nílusi vírushatást, nem a vizsgálómódszer hibája, hanem arra utal, hogy valóban nem voltak ilyen megbetegedések.

A XX. században Közép-Európában a fent említett, magyarországi WNV izolálás mellett ugyanannak a pozsonyi kutatócsoportnak a tagjai számoltak be a vírus kimutatásáról Nyugat-Szlovákiában gyűjtött, *Aedes cantans* szúnyogokból (Labuda és mtsai., 1974); illetve egy WNV törzset izoláltak 1997-ben dél-kelet Morvaországban *Cx. pipiens* szúnyogokból (Hubálek és mtsai., 1998). Ez a vírustörzs virulenciájában (egér patogenitás) és antigenitásában is némileg eltért a WNV lineage 1-es referencia törzsetől. A szúnyogok gyűjtési helyéhez közeli osztrák település neve alapján Rabensburg vírusnak (RabV) elnevezett törzset részletes genetikai vizsgálatnak vetettük alá. Meghatároztuk a teljes genomszekvenciáját és összehasonlítottuk más WNV szekvenciákkal. A nukleotid és származtatott aminosav szekvenciák hasonlósági értékei elmaradtak a WNV akkor ismert két genetikai vonalának képviselőitől. Filogenetikai vizsgálatokkal is igazoltuk, hogy a vírustörzs nem sorolható be a két genetikai vonal egyikébe sem. A genetikai távolság meghaladta a két vonal képviselőinek egymástól mért genetikai távolságát. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a RabV a WNV egy eddig ismeretlen (harmadik) genetikai vonalának képviselője (Bakonyi és mtsai., 2005a). A génbanki adatbázisokban hozzáférhető WNV szekvenciák összehasonlítása során azt is megfigyeltük, hogy a Kaukázusban, 1998-ban gyűjtött *Dermacentor marginatus* kullancsból kimutatott WNV

(LEIV-Krnd88-190) (Prilipov és mtsai., 2002; Lvov és mtsai., 2004) hasonlóan nagy genetikai távolságra helyeződik mind a WNV lineage 1 és 2 vírusaitól, mind pedig a RabV törzstől. Ezért ezt a vírust a WNV negyedik genetikai vonala képviselőjének tekintettük. Meg kell jegyezni, hogy a törzsfa-rekonstrukciós vizsgálat a LEIV-Krnd88-190 és a Koutango vírus legkésőbbi közös őst a másik három WNV közös őstől eltérőnek jelezte. A Koutango vírust – rágcsálók mellett – különböző kullancs fajokból mutatták ki Afrikában. A RabV ismételt izolálható volt ugyanazon a gyűjtőhelyen 1999-ben befogott *Cx. pipiens*-ből (Hubálek és mtsai., 2000) és annak közelében, 2006-ban gyűjtött *Aedes rossicus*-ból (Hubálek és mtsai., 2010). A vírustörzsek részleges genomszekvenciáinak vizsgálatával több, mint 99%-os hasonlóságot mutattunk ki az 1997-es RabV törzshöz viszonyítva (Bakonyi és mtsai., 2005a, Hubálek és mtsai., 2010). Ez alapján megalapozottan feltételezhető, hogy a RabV endémiásan jelen van Csehország dél-keleti részén. Hozzá köthető megbetegedéseket viszont sem madarakban, sem emlősállatokban, sem emberben nem figyeltek meg. A RabV biológiai tulajdonságainak (szaporodóképesség emlős, madár és szúnyogsejtekben, virulencia és vektor kompetencia) részletesebb vizsgálatai feltárták, hogy a vírus Vero sejtekben csak 35°C alatti hőmérsékleten szaporodik (míg *Aedes albopictus* eredetű, C6/36 sejtvonalon 37°C-on is) (Aliota és Kramer, 2012); valamint hogy madarak mesterségesen nem fertőzhetők a vírussal (Aliota és mtsai., 2012). Mindezek alapján az az elmélet született, hogy a RabV átmenetet képez a csak szúnyogokban szaporodó (mosquito only) és a szúnyog vektorok útján terjesztett flavivírusok között (Aliota és mtsai., 2012). Lehetséges, hogy a vírus elterjedési területe kiterjedtebb a manapság ismertnél, ám ennek feltárására célzott szúnyog-monitoring vizsgálatokra volna szükség.

A WNV 3. és 4. genetikai vonalának felfedezése más kutatócsoportokat további törzsek genetikai jellemzésére, illetve a már ismertek átsorolására készítette. Az egyik legutóbbi javaslat szerint a WNV-nek legalább nyolc genetikai vonala különíthető el: A korábban említett négy vonalon túl ötödik vonalként Indiában izolált vírusokat (Bondre és mtsai., 2007), a hatodik vonal képviselőjeként a WNV (Kunjin vírus?) egy malajziai izolátumát (Scherret és mtsai., 2001), hetedikként a Koutango vírust (Donadieu és mtsai., 2013), a nyolcadik vonal képviselőjeként pedig egy Spanyolországban 2006-ban *Cx. pipiens*-ből kimutatott WNV-t tartanak (Vazquez és mtsai., 2010; Donadieu és mtsai., 2013). A vírusok genetikai vonalakba sorolásának azonban nincsenek általánosan elfogadott szabályai (mivel nem hivatalos rendszertani kategóriák) és kialakításuknak igazából akkor van értelme, ha segítik a vírus evolúciójának, terjedésének vagy kórtani jelentőségének megértését.

A WNV hazai szúnyogokban való előfordulásának vizsgálata során, 2011. nyarán a pellérdi halastavaknál gyűjtött, *Uranotaenia unguiculata* szúnyogokból flavivírus-specifikus RT-PCR módszerrel sikerült felerősíteni egy nukleinsav szakaszt. A szekvencia filogenetikai vizsgálata a legközelebbi rokonságban a WNV korábban említett, LEIV-Krnd88-190 törzsével (lineage 4), valamint Oroszország Volgograd régiójában 2003. és 2006. között, *Ur. unguiculata* szúnyogokból kimutatott vírusokkal állt. Hasonló genetikai távolságra volt a spanyolországi *Cx. pipiens*-ből

kimutatott HU2925/06 (lineage 8) törzzsel, ezért nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a negyedik genetikai vonalhoz tartozik-e, vagy egy újabb, kilencedik genetikai vonal képviselője (Kemenesi és mtsai., 2014a). A pellérdihez nagyon hasonló vírus szekvenciáját kimutatták a Duna-deltában 2012-ben és 2013-ban gyűjtött, *Ur. unguiculata* pool-okból (Dinu és mtsai., 2015). (A vizsgált 8 pool-ból 5-ben jelen volt a vírus.) A Fertő tónál, 2013-ban gyűjtött négy *Ur. unguiculata* pool vizsgálata során egyből szintén ki lehetett mutatni a WNV negyedik genetikai vonala képviselőivel legközelebbi rokonságban álló vírust (Pachler és mtsai., 2014). Az adatok alapján a WNV negyedik genetikai csoportjának képviselői elterjedtek Kelet- és Közép-Európában, viszont különös ökológiai teret foglalnak el, mivel következetesen csak *Ur. unguiculata* szúnyogokból sikerült kimutatni jelenlétüket. A vírus izolálására irányuló próbálkozások nem jártak sikerrel. Ez alapján elképzelhető, hogy ez a vírustörzs (hasonlóan a Rabensburg vírushoz) gerinces gazdáiban nem, vagy csak mérsékeltén képes szaporodni. A potenciális gerinces gazdák keresése problémát jelent, mivel nem tisztázott, hogy az *Ur. unguiculata* milyen fajokból szív vért. Általánosan elfogadott vélemény szerint az Uranotaenia nemzetség tagjai változó testhőmérsékletű állatok (kétéltűek, elsősorban békák) vérért fogyasztják (Toma és mtsai., 2014; Kurucz és mtsai., 2017). Ezzel szemben Azerbajdzsánban végzett vizsgálatok szerint az *Ur. unguiculata* gyakran szív vért emberből (bár csípése kevésbé fájdalmas) (Bagirov és mtsai., 1994), valamint Magyarországon is sikerült csípésszámlálós módszerrel gyűjteni a faj egyedeit (Tóth, 2011). A közelmúltban végzett vizsgálatok alapján e a szúnyogfaj imágó alakban telel át, ami elősegítheti a vírus fennmaradását is (Rudolf és mtsai., 2015b). A szúnyogfaj ökológiai tulajdonságainak, valamint a bennük jelen lévő WNV törzsek szaporodási tulajdonságainak részletesebb megismerése a WNV szerodiagnosztikája szempontjából is fontos feladat. Szerológiai felméréseket végeztünk magyarországi, tünetmentes kutyák WNV fertőzöttségének felderítése céljából. Kompetitív IgG ELISA módszerrel vizsgálva a kutyák kb. egyharmadában pozitív eredményt kaptunk. A PRNT módszerrel megerősítő vizsgálatokat végeztünk WNV (lineage 1), USUV és TBEV elleni neutralizáló ellenanyagszint kimutatására. A savóminták kevesebb, mint 10%-ánál lehetett igazolni a WNV specifikusságot (négyeszeres titerkülönbség a másik két vírushoz képest). TBEV ellen csak egy kutya savómintájában találtunk neutralizáló ellenanyagokat és néhány eb mintájából az USUV ellen magasabb titerben mutattunk ki ellenanyagokat, mint WNV ellen. A savóminták jelentős részénél a WNV és az USUV ellen hasonló, jellemzően alacsony (1:20-1:40) titerben tudtunk ellenanyagokat kimutatni (nem közölt adat). Amennyiben az *Ur. unguiculata* szív vért kutyákból, és a benne előforduló WNV képes (mérsékelt intenzitással, viraemia és tünetek nélkül) szaporodni és szerológiai áthangolódást okozni az ebekben, az magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért tapasztaltuk a fent leírt, pontosan nem azonosítható háttérű szeropozitivitást.

A nyugat-nílusi vírus Magyarországon először diagnosztizált, klinikai tünetekben és elhullásokban is megnyilvánuló megbetegedést 2003-ban okozott, circovírus-sal fertőzött libákban (Glávits és mtsai., 2005). Az elhullott libák agyszövetmintáiból a WNV lineage 1. genetikai csoportjához tartozó vírus

nukleinsavát lehetett kimutatni. Sajnos a vírust többszöri próbálkozás ellenére sem sikerült izolálni a madarak szöveteiből. Más, fogékony állatfajból nem lehetett kimutatni a vírust, viszont a lúdtartó telepen dolgozó személyek és családtagjaik enyhe, lázas általános tünetekkel, émelygéssel, fejfájással és izomgyengeséggel járó, heveny betegség tüneteit mutatták, valamint WNV elleni ellenanyagokat lehetett kimutatni a savómintáikból (Ferenczi és mtsai., 2005). Arra nincsenek közvetlen bizonyítékaink, hogy a vírus az esetet megelőző években is jelen volt-e már Magyarországon. A vírus teljes genomszekvenciájának meghatározását követő filogenetikai vizsgálataink alapján a szekvencia a legnagyobb (98%-os) hasonlóságot a WNV 1998-ban Izraelben és 1999-ben az Egyesült Államokban izolált törzseinek szekvenciáihoz mutatta. Az izraeli IS98-ST1 törzset olyan gólya agyából izolálták, amely társaival 1998. augusztusában érkezett az Eilat közelében levő madár-megfigyelő helyre, és augusztus 28.-án elhullott (Malkinson és mtsai., 2002). A kb. 1200 egyedét számláló csoportból számos gólya elpusztult. Az ornitológiai vizsgálatok alapján a madarak 1998. nyarán kelhettek ki, valahol Európa keleti részén. Őszi vonulásuk idején erős és forró nyugati szelek elsodorták őket a szokásos útvonalukról és hosszú, aktív repülés után, kimerülten érkeztek az Akabai/Eilati öbölhöz. Valószínű, hogy a fizikai megterhelés szerepet játszott a megbetegedések kialakulásában. A vírustörzs 1998-ban és 1999-ben megbetegedéseket okozott izraeli lúdállományokban, valamint a tel-avivi állatkert pápaszemes sirályai (*Ichthyaelus leucophthalmus*) körében is. A vírust kimutatták emberi megbetegedésekből is Izraelben (Giladi és mtsai., 2001). A jelenleg leginkább elfogadott feltételezés szerint ezt a törzset hurcolták be 1999 őszén New Yorkba. Az általunk meghatározott szekvencia ugyan kisebb mértékben hasonlít az izraeli és new york-i törzsekhez, mint azok egymáshoz, de azt is figyelembe kell venni, hogy ezt a vírust öt évvel később fedeztük fel. Az adatok alapján nem lehet azt kizárni, hogy az Amerikában felbukkant vírus jelen volt-e Magyarországon 1998-ban, és akár innen Izraelbe jutott el és onnan New Yorkba, akár közvetlenül tőlünk hurcolták be Amerikába (Bakonyi és mtsai., 2006). Sajnos egyelőre nem sikerült olyan archivált mintákat találnunk a hazai diagnosztikai intézetekben 1998-1999-ből, amelyek vizsgálatával ezt a feltételezést alá lehetne támasztani. Ugyanakkor Fabbi és mtsai., (2014) argentínai WNV genomszekvenciák filogenetikai analízise alapján arra a következtetésre jutott, hogy 2006-ot megelőzően az IS98-ST1 törzshöz hasonló törzsek többször, egymástól függetlenül behurcolásra kerültek Dél-Amerikába. A vírustörzshöz hasonló törzset Európa egyik országában sem mutattak ki és hazánkban sem sikerült fennmaradását igazolnunk. Az érintett telepen 2004-ben kacsákat neveltek. Augusztus hónapban szúnyogokat gyűjtöttünk a telepen és környékén. Érdekes módon, annak az istállóknak a mennyezetén, amelyben az előző évben a megbetegedett libákat tartották, nagy számban lehetett *Cx. pipiens* hím egyedeket fogni (amelyek nem szívnak vért, azért a fertőzés fenntartásában és átvitelében nem játszanak szerepet), nőstényeket viszont csak a közeli, fás-bokros területen tudtunk gyűjteni. A szúnyogminták egyikéből sem lehetett WNV RNS-t kimutatni és új megbetegedéseket sem tapasztaltak azóta a telepen. A vírust 2003. után egyetlen mintából sem tudtuk többé kimutatni.

A libákban megfigyelt megbetegedések után egy évvel, és a járványkitörés helyétől kb. 160 kilométerre keletre, a Körös-Maros Nemzeti Park területéről származó, idegrendszeri tüneteket mutató, majd elhullott héja agyszövetéből szintén a WNV nukleinsavát tudtuk kimutatni. A vírus teljes genom szekvencia meghatározását követő filogenetikai vizsgálat viszont – szemben az előző év eredménye alapján várttal – egy másik nyugat-nílusi vírus jelenlétét tárta fel. Ennek a vírusnak a nukleotid- és származtatott aminosav szekvenciái a legnagyobb hasonlóságot a WNV második genetikai vonalához tartozó, afrikai vírustörzsekhez mutatták (Bakonyi és mtsai., 2006). Ez volt az első alkalom, hogy klinikai megbetegedésből, Afrikán (és Madagaszkáron) kívüli területről ehhez a genetikai csoporthoz tartozó vírust sikerült kimutatni, mivel korábban – a szakirodalmi adatok szerint – csak egy alkalommal, 1968-ban izoláltak lineage 2 WNV törzset, egészséges, vonuló karvalyposztából (*Sylvia nisoria*) Cipruson (Watson és mtsai., 1972). A vírus 2005-ben is felbukkant az első kimutatása helyén, ekkor héják mellett karvalyok megbetegedéseit is okozva, valamint a vadmadár esetektől mintegy 30 km-re nyugatra egy idegrendszeri tüneteket követően elhullott anyajuh agyvelejéből sikerült izolálni is a kórokozót (Kecskeméti és mtsai., 2007). A genetikai összehasonlító vizsgálatok csupán néhány nukleotid eltérést mutattak ki a 2004-ben és 2005-ben talált vírusok szekvenciái között. Annak az esélye igen csekély, hogy a 2004. nyarán felbukkant vírus nem élte volna túl a hazai telet és egy évre rá ugyanoda, egy másik vonuló madár Afrikából ugyanazt a vírust hurcolja be. Sokkal valószínűbb magyarázata az ismételt felbukkanásnak az, hogy a vírus áttelelt és endémiássá vált. Bár 2006-ban egyetlen állati megbetegedésből sem tudtunk WNV-t kimutatni, az OEK-ben egy hazai humán eset abban az évben szerológiai módszerrel diagnosztizálásra került. A vírus fennmaradását és továbbterjedését bizonyította az, hogy 2007-ben egy idegrendszeri betegségben elpusztult lóból ismételen ki lehetett mutatni a vírus jelenlétét (Kutasi és mtsai., 2011). A lovat a 2005-ös juh eset helyszínétől kb. 30 km-re nyugatra tartották. Ugyancsak 2007-ben kimutattuk a vírus jelenlétét a kardoskúti kékvércse telepen gyűjtött, elhullott fiókákból, valamint egy a Hortobágyi Nemzeti Park területéről származó héjából. Ezek az esetek a vírus első felbukkanásától kb. 70 km-re délnyugatra és északkeletre találhatók. A vírusok egyes nukleinsav-szakaszainak filogenetikai vizsgálatai ebben az esetben is igazolták, hogy a 2004-ben felbukkant, lineage 2 törzs leszármazottjai okozták a megbetegedéseket. Az első három év fokozatos földrajzi terjedése és alacsony esetszáma után 2008. augusztusában és szeptemberében jelentős vírusaktivitást és gyors földrajzi terjedést tapasztaltunk. Héják mellett egyéb ragadozó madaraktól (északi sólyom, Harris ölyv) és 12 lóból sikerült kimutatni a vírust, valamint az OEK 22 emberi fertőzést igazolt (Krisztalovics és mtsai., 2008). Az esetek az ország mindegyik régiójában előfordultak, halmozottan Közép-Magyarországon. Emellett a vírus felbukkant Alsó-Ausztriában, ahol héják, keák és egy saskeselyű megbetegedéseiből lehetett kimutatni (Bakonyi és Erdélyi, 2011; Bakonyi és mtsai., 2013). A megbetegedések 2009-ben is folytatódtak: abban az évben héják mellett karvalyból, vándorsólyomból, hollóból és énekesmadaraktól; összesen 15 madárból tudtuk kimutatni a vírus nukleinsavát. Hat ló és hat ember idegrendszeri megbetegedésének hátterében lehetett igazolni a WNV fertőzést. A vírus fennmaradt

Ausztriában is, ahol 2009-ben további vadmadár elhullásokat okozott. Emellett szerológiai vizsgálatokkal is igazoltuk a vírus elterjedését és kimutattuk jelenlétét *Cx. pipiens*-ben. Filogenetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a 2008-ban és 2009-ben Magyarországon és Ausztriában kimutatott vírusok a legközelebbi genetikai rokonságban a 2004-ben felbukkant vírussal állnak (Bakonyi és mtsai., 2013).

A vírustörzs ausztriai felbukkanását további európai terjedése követte. Jelentős számú emberi megbetegedéssel és halálózással járó encephalitis járvány tört ki Görögország észak-keleti részén 2010. nyarának végén. Szerológiai vizsgálatokkal igazolták a WNV kóroki szerepét, (Papa és mtsai., 2011b), a vírust kimutatták *Cx. pipiens*-ből (Papa és mtsai., 2011c). Teljes genomszekvenciájának meghatározását követő filogenetikai vizsgálataink feltárták, hogy a vírus legközelebbi genetikai rokonságban a Magyarországon, 2004-ben felbukkant törzzsel áll (Papa és mtsai., 2011a). A vírustörzs további jelentős földrajzi terjedésére utal, hogy 2011-ben kimutatták Olaszország adriai-tengeri partvidékén, lázas tüneteket mutató betegből (Bagnarelli és mtsai., 2011; Barzon és mtsai., 2013), majd vadmadaraktól és *Cx. pipiens*-ből az ország észak-keleti részén (Savini és mtsai., 2012), valamint 2012-ben héjából és varjakból Szardínia szigetén is (Savini és mtsai., 2013). A vírus további megbetegedéseket okozott 2012-ben, horvátországi emberekben (Merdić és mtsai., 2013; Pem-Novosel és mtsai., 2014). A kezdeti esetekben csak szerológiai módszerekkel tudták igazolni a WNV kóroki szerepét, viszont a 2013-ban diagnosztizált esetekből kimutatták a vírus RNS-t is és a filogenetikai vizsgálatok igazolták, hogy lineage 2 törzs okozta a fertőzéseket (Kurolt és mtsai., 2014). A vírust megtalálták 2012-ben mintázott szerbiai vadmadarakban; a genetikai vizsgálatok ebben az esetben is igazolták a lineage 2 törzs jelenlétét (Petrovic és mtsai., 2013). A következő év nyarán jelentős emberi járvány alakult ki 2013-ban Szerbiában; több mint 300 emberi megbetegedést diagnosztizáltak, amelyek közül 52 idegrendszeri tüneteket mutatott és 9 elhunyt (Popovic és mtsai., 2014). A vírus szerbiai szúnyog vektorokban való előfordulására irányuló vizsgálatok jelentős fertőzöttséget mutattak ki *Cx. pipiens* és *An. maculopennis* pool-okban (Kemenesi és mtsai., 2014b). A Balkán-félszigeten valószínűleg már korábban is jelen lehetett a vírustörzs, mivel lovakban végzett szerológiai felmérő vizsgálatok Horvátországban (Madic és mtsai., 2007) és Szerbiában (Lupulovic és mtsai., 2011) számottevő szeropozitivitást állapítottak meg. A vírustörzs 2014-ben felbukkant a mediterrán térség keleti részén is: Törökország Bursa régiójában, idegrendszeri tüneteket követően elhullott lóból is ennek a lineage 2 vírusnak a jelenlétét mutatták ki (Monaco és mtsai., 2016). Az északi irányú terjedésre utal, hogy Csehország dél-keleti részén, *Cx. modestus* pool-okból is sikerült izolálni a vírust 2013-ban. Az izolátumok teljes genomszekvenciái az Olaszországban és Ausztriában kimutatott, WNV lineage 2 szekvenciáihoz hasonlítottak leginkább (Rudolf és mtsai., 2014). A vírus jelenlétét kimutatták elhullott héjából Szlovákia déli részén is (Csank és mtsai., 2016). A kutatások eredményei alapján egyértelműen megállapítható, hogy a 2004-ben (pontosabban, retrospektív vizsgálataink szerint már 2003-ban) Magyarországon felbukkant, kettes genetikai vonalhoz tartozó

WNV törzs sikeresen adaptálódott a helyi klimatikus viszonyokhoz, gerinces gazdákhoz és szúnyog vektorokhoz, endémiássá vált a térségben és tíz év alatt elterjedt Közép- és Dél-Európa számos országában. A vírustörzs endémiás jellegét az is alátámasztja, hogy 2007. óta minden évben előfordultak általa előidézett vadmadár, ló és emberi megbetegedések Magyarországon is.

A WNV egy másik, lineage 2 genetikai vonalhoz sorolható törzse bukkant fel és okozott emberi megbetegedéseket 2004-ben Oroszország Rosztov régiójában (Platonov és mtsai., 2011). A vírustörzs jelentős számú emberi megbetegedést idézett elő 2007-ben Oroszország Volgográd régiójában (Platonov és mtsai., 2008). A vírustörzs 2010-ben felbukkant Románia dél-keleti részén, ahol 57 emberi megbetegedéssel és 5 személy halálával járó járványkitörést okozott (Sirbu és mtsai., 2011). A vírus jelenlétét kimutatták számos szúnyogfajból 2011. és 2013. között Románia déli részén (Dinu és mtsai., 2015), a Duna-deltában énekes rigóról gyűjtött *Hyaloma marginatum* kullancsból (Kolodziejek és mtsai., 2014), valamint 2014-ben *Cx. pipiens*-ből észak-kelet Olaszországban is (Ravagnan és mtsai., 2015). Filogeográfiai becslések szerint a közép-európai lineage 2 törzs valamikor 1999., az oroszországi pedig 2000. tájékán juthatott el Afrikából Európába (Ciccozzi és mtsai., 2013). Az utóbbi 15-20 évben megfigyelhető, jelentős WNV aktivitásnak és új törzsek felbukkanásának az okát egyelőre nem ismerjük. Az viszont egyértelmű, hogy Európa számos országában a WNV különböző genetikai vonalaihoz sorolt vírusok egyidejűleg jelen vannak (pl. Magyarországon és Ausztriában lineage 2 és 4 (9?), Csehországban lineage 2 és 3, Olaszországban lineage 1 és kétféle lineage 2, Romániában és Oroszországban lineage 1, lineage 2 és lineage 4 vírusok).

A különböző WNV törzsek gazdaspektrumában, pontosabban egyes fajok fertőződésének gyakoriságában, valamint virulenciájában (az adott fajban a megbetegedések gyakoriságában és súlyosságában) eltéréseket tapasztaltunk. A 2003-ban, Magyarországon kimutatott, lineage 1 genetikai csoporthoz sorolt vírus virulenciájáról annyit tudunk biztosan, hogy ludakban agyvelőgyulladást és elhullásokat okozott. Fontos szempont viszont, hogy az elhullott állatokból circovírus fertőzést és ehhez kapcsolódóan az immunszövetek károsodását lehetett kimutatni. Valószínűsíthető, hogy a circovírus okozta immunsuppresszió elősegítette a WNV klinikai betegségben való megnyilvánulását. A vírustörzs a libák mellett valószínűleg emberekben is neuroinvasív. Erre nincsenek közvetlen bizonyítékaink, mivel az emberi megbetegedések hátterében csak szerológiai módszerrel tudtuk igazolni a WNV fertőzöttséget. Az alkalmazott szerológiai módszerekkel nem lehetett különbséget tenni a lineage 1 és lineage 2 fertőzések között. A járványtani szempontok (földrajzi és időbeli egybeesés) figyelembe vételével nem volna megalapozott azt feltételezni, hogy ugyanabban az időben, ugyanott, más vírustörzs legyen jelen libákban és emberekben. Ezt a vírustörzset nem sikerült a libák szöveteiből izolálni, ezért a virulencia meghatározására irányuló további kísérleteket sem lehetett végrehajtani vele. A teljes genom szekvencia meghatározása viszont lehetőséget teremt arra, hogy reverz genetikai módszerekkel, kísérletes körülmények között előállítsák a vírustörzset. Mivel az IS98-ST1 törzsből előállítottak fertőző klónt (Bahuon és mtsai., 2012), a

kisszámú nukleotid szubsztitúció miatt, mutagenezissel viszonylag egyszerűen előállítható volna a magyarországi vírussal megegyező szekvenciájú klón. Az bizonyos, hogy mind az IS98-ST1, mind a hozzá közel álló, Amerikában felbukkant vírustörzs(ek) madarakban, emlősállatokban és emberben egyaránt neuroinváziák és neurovirulensek.

Az először 2004-ben héjából kimutatott, lineage 2 genetikai vonalhoz tartozó törzs gazdaspektruma is széles körű; madarakat és emlősöket képes megbetegíteni. A vírust 2004. és 2016. között összesen 71 hazai vadmadár mintájából mutattuk ki nukleinsav- és fehérje-vizsgáló módszerekkel. Az esetek több mint felében (38 madár) héják megbetegedéseinek hátterében igazoltuk a fertőzést. Emellett egyéb ragadozó madarak (karvaly, kékvércse, Harris ölyv, északi sólyom, vándorsólyom; összesen 18 eset) mintáinak vizsgálata során diagnosztizáltuk a WNV lineage 2 törzse okozta fertőzést. Kimutattuk a vírust kistestű énekes madaraktól (8 esetben), varjúfélékből (4 esetben) és galambfélékből (3 esetben) is. A ragadozó madarak, különösen a héják gyakori megbetegedéseit többféle elmélettel is lehet magyarázni. Az nehezen elképzelhető, hogy ezek a fajok gyakrabban lennének kiteve a vektor szúnyogok csípéseinek. Bár számos ragadozómadár fészkenél megfigyelhető, hogy a fiókák körül nagy számban fordulnak elő („rajzanak”) a szúnyogok, megbetegedéseket fiókákban ritkán tapasztaltunk, sokkal inkább fiatal, de kifejlett (repülőképes) egyedekben. A nagyobb gyakoriság hátterében állhat egyszerűen a mintavételezés elfogultsága. A ragadozómadarak általában a fokozottan védett fajok közé tartoznak. Egyedszámuk alacsonyabb, viszont testméretük, viselkedésük miatt nagyobb figyelem irányul rájuk. Ráadásul, számos egyedet fogságban nevelnek, természetvédelmi vagy sportolási célból (solyászok). Az általunk diagnosztizált esetek jelentős része is fogságban nevelt madaraknál történt. Az is igaz, hogy – mivel az első eseteket héjában és karvalyokban találtuk – ezeket a fajokat indikátornak tekintettük és nagyobb figyelmet fordítottunk a beteg vagy elhullott egyedek gyűjtésére. (Az évek során több solymással és természetvédelmi szakemberrel alakítottunk ki szoros munkakapcsolatot, és ők minden évben rendelkezésünkre bocsátottak idegrendszeri megbetegedésekből származó vizsgálati mintákat.) Emellett, az egyéb vadmadarak (különösen énekesmadarak) magas egyedszáma és kis testmérete miatt az elhullások valószínűleg kevésbé feltűnőek, illetve (hasonlóan az USUV fertőzések esetén fennálló helyzethez) a természeti környezetben ezeknek a madaraknak a tetemei ritkán találhatók meg, vagy ritkán kerülnek vizsgálatra. Számos más madárfaj egyedeit is megvizsgáltuk (köztük pl. gyűrűzőközpontokban gyűjtött énekesmadarakét), ezért azt valószínűsítjük, hogy más tényezők is szerepet játszhatnak a ragadozó madarak nagyobb arányú megbetegedéseinek hátterében. Ilyen lehet például a nem vektoriális átvitel fokozott szerepe ragadozó madarak fertőzéseiben. Amennyiben a ragadozó madarak zsákmányállatai nyugat-nílusi vírussal fertőzöttek, szerveikben viszonylag magas titerben lehet jelen a vírus. Esetleg a fertőzés miatt lázas általános tüneteik, vagy akár enyhe idegrendszeri tüneteik is lehetnek, ami kedvezőtlenül befolyásolja tájékozódásukat és röpképességüket, így könnyebben eshetnek ragadozó madarak áldozatául, mint egészséges társaik. A ragadozó madarak táplálkozási szokásaiból fakad,

hogy a fertőzött madarak elfogyasztásakor a törött csontok vagy egyéb, kemény, hegyes vagy éles képletek az emésztőcső nyálkahártyájának kisebb sérüléseit okozhatják, amelyek bemeneti kapuként szolgálhatnak a nyugat-nílusi vírusnak. Mivel az elfogyasztott madarak szöveteiben nagyságrendekkel több vírus van, mint amennyi egy-egy szúnyogcsípés során bejut a gazdafajba, ennél a fertőzési módnál is nagy (sőt a „vector-borne” módnál akár nagyobb) lehet a vírus keringésbe jutásának és elszaporodásának esélye. Hasonló érvekkel magyarázható egy szokatlan WNV járványkitörés az Egyesült Államokban. A Nagy Sós Tó (Great Salt Lake) környezetében 2013. novemberében és decemberében nagyon jelentős elhullásokat tapasztaltak a telelő feketenyakú vöcsök (*Podiceps nigricollis*) populációban. A becslések szerint 15.000 - 20.000 madár pusztult el. Ezt a környéken élő fehérfejű rétisasok (*Haliaeetus leucocephalus*) több mint 86 egyedét érintő elhullása követte (Ip és mtsai., 2014). Mind a vöcsökben, mind a sasokban agyvelőgyulladásos elváltozásokat tapasztaltak és WNV jelenlétét mutatták ki. A járvány időpontjában a Nagy Sós Tó környékén fagypont körüli volt a hőmérséklet, így szúnyog vektorok nem fordultak elő. A fehérfejű rétisas jelentős mértékben dögevő, ezért nagyon valószínű, hogy a sasok a beteg vagy elpusztult vöcsökök szöveteinek elfogyasztása során fertőződtek. Érdekes kérdés az, hogy a vöcsökök hogyan fertőződhetek. Egy közelmúltban megjelent tanulmány alapján a nyugat nílusi vírus a magas sótartalmú, hideg vízben napokig megőrzi a fertőzőképességét, valamint a vízben élő sórákok (*Artemia salina*) képesek felvenni a vírust, ami szaporodik a középbél enterocytákban (Lund és mtsai., 2017). A sórákok a tónál telelő feketenyakú vöcsökök legfontosabb (szinte kizárólagos) táplálékai. Más vízimadarak, pl. a szárcsa (*Fulica atra*) esetében magas arányú WNV fertőzöttséget lehet kimutatni (Fereidouni és mtsai., 2011; Straková és mtsai., 2015), valamint ezek a madarak bélsarukkal ürítik is a vírust. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a valamilyen vízimadár útján a tó vízébe jutó vírust felvették a sórákok, amelyek elfogyasztásával a vöcsökök egy része fertőződött. Ezek bélsarukkal a vírust a tóba ürítették, ami feldúsult és egyre több sórák vált fertőzötté. Ez az önerősítő folyamat vezethetett végül a vöcsökök tömeges megbetegedéséhez és elhullásához. A felszíni vizek WNV kontaminációját és benne a vírus túlélésének lehetőségét a jövőben mi is vizsgálni tervezzük. A vízben fejlődnek a szúnyogok lárvái, amelyek vízben lebegő részecskékként táplálkoznak. Amennyiben a lárvák ilyen módon fertőződnek, az befolyásolhatja a vírus szaporodási ciklusát és a germinatív átvitelhez képest alternatív magyarázatot adhat a hím szúnyogok vírussfertőzöttségére is. Visszatérve a héják és egyéb ragadozó madarak gyakori megbetegedéseinek magyarázatára, a mesterségesen nevelt állatok táplálására leggyakrabban házigalambokat használnak. Ezért felmerült bennünk a házigalamb fertőzés-közvetítő szerepének lehetősége. Az első járványkitörés helyén nevelt és a héják táplálására használt galambfiókákból 2005-ben kimutattuk vírust, valamint magas (>86%-os) szeropozitivitást állapítottunk meg 2009-ben vizsgált galambokban. A WNV 1-es genetikai vonalával végzett fertőzési kísérletek során arra a következtetésre jutottak, hogy a házigalamb a WNV terjesztése szempontjából kevésbé jelentős, mivel benne csak rövid ideig tartó és alacsony szintű viraemia alakul ki (Komar és mtsai., 2003; Spedicato és mtsai., 2016). Hasonló eredményt hoztak a balkáni gerlek (*Streptopelia decaocto*) fertőzési kísérletei is (Panella és

mtsai., 2013). A közelmúltban végzett házigalamb fertőzési kísérleteink kimutatták, hogy a hazai, WNV lineage 2 törzs nem betegíti meg a galambokat, de a vírust több hétig ki lehet mutatni a fertőzött madarak szöveteiből, valamint átmeneti viraemia és a testváladékokkal vírusürítés is kialakult (Forgách és mtsai., 2015). A nem vektoriális átvitelnél a viraemia szintje és hossza kevésbé lényeges, mint a vektoriális átvitel esetén, ezért a házigalambok fertőzés-közvetítő szerepének vizsgálatára a jövőben is különös hangsúlyt kívánunk helyezni. Szerológiai felmérő vizsgálataink számos további vadmadár faj fogékonyságát bizonyították. Egy kutatási projekt keretében kiemelt figyelmet fordítottunk a hazai tűzokállomány érintettségére, mert a lineage 2 WNV törzs a Dévaványai Tűzokmentő Állomástól néhány kilométerre bukkant fel. A vizsgálatok jelentős (27-100%; átlagosan 52%-os) szeropozitivitást tártak fel a nevelésük során egészséges fiatal madarakban. Ez arra utal, hogy a tűzokfiókák ugyan jelentős arányban fertőződhetnek az állomáson, de tüneteket nem mutattak és szabadon bocsátásuk időpontjában már szerológiai védettséget élveztek (Sós és mtsai., 2012).

A vírustörzs ausztriai felbukkanásának évében a Konrad Lorenz Etológiai Intézet kísérleti telepén nevelt keák is természetes fertőzésen estek át. Hat madár mutatott idegrendszeri tüneteket; egyikük állapota olyan súlyosra fordult, hogy a kezelő állatorvos euthanasia mellett döntött. Vizsgálataink igazolták a WNV lineage 2 törzs által okozott fertőzést. A másik öt madár meggyógyult és szeropozitívra vált. Hónapokkal a heveny betegséget követően a madarakban vagy kiújultak az idegrendszeri tünetek, és emiatt véglegesen el kellett altatni őket, vagy egyéb betegség miatt hullottak el. Három egyednél nyílt lehetőségünk kórtani és virológiai vizsgálatok végzésére. A kórszöveti vizsgálatok lymphocytás agyvelőgyulladást tártak fel, a WNV nukleinsavát RT-PCR módszerrel kimutattuk a madarak agyszöveteiből; az immunhisztokémiai vizsgálatok azonban negatív eredménnyel zárultak. A zsigeri szervekből nem lehetett kimutatni a vírus jelenlétét, viszont WNV neutralizáló ellenanyagok magas titerben voltak a keringésben. A heveny fázisban, illetve a később elpusztult madaraktól kimutatott vírusok teljes genomszekvenciáit meghatároztuk és filogenetikai analízisnek vetettük alá. A törzsfarekonstrukciós vizsgálatok eredményei alapján azt feltételezzük, hogy mindegyik kea 2008-ban fertőződött. A heveny tünetek között elpusztult madárból kimutatott WNV szekvencia rövidebb genetikai távolságra van a 2008-ban, Ausztriában, héjából kimutatott vírustól, mint az idült fertőzésekből kimutatott szekvenciák, de a keákból származó WNV szekvenciák közös ágon vannak. A genetikai távolságok arányosak a fertőzés időpontja és az elhullások között eltelt idővel. Valószínű, hogy azokban a madarakban, amelyek túléltek a heveny fertőzést, a vírus fennmaradt a központi idegrendszerben és ott – csekély intenzitással – tovább szaporodott. Mivel az ellenanyagok nem jutnak át az agy-vér gáton, a szeropozitivitás ellenére a keák immunrendszere nem tudta teljes mértékben eliminálni a vírust. Hasonló folyamatokat más, krónikus vírushordozók során is meg lehet figyelni (Sips és mtsai., 2007; Patel és mtsai., 2012). Az immunrendszer szelekciós hatásától védetten úgy tűnik, hogy a vírusok evolúciója felgyorsult, a genetikai távolságuk a feltételezett közös őstől nagyobb lett, mint azoké a vírusoké, amelyek a

természetes ciklusukban szaporodtak. A vírusnukleinsav változása egyértelműen arra utal, hogy a hónapok – évek során RNS replikáció folyt a sejtekben (szemben pl. a herpeszvírusoknál ismert látens fertőzéssel). Arra viszont nincs bizonyíték, hogy a replikációt a vírus szerkezeti fehérjéinek kifejeződése és virionok összeépülése követte volna. Az egyik vírus C fehérjéjének származtatott aminosav szekvenciájából az N-terminális részen 15 aminosav hiányzik, ami szintén arra utal, hogy a központi idegrendszerben replikálódó vírusok jelentős változásokon estek át. Megfigyeléseink egyértelműen bizonyítják, hogy a keák fogékonyak a WNV lineage 2 törzse okozta fertőzésre, de azt nem tudjuk, hogy miért alakult ki bennük idült fertőzés. Természetes élőhelyükön (Új-Zélandon) ezek a madarak nem találkoznak a nyugat-nílusi vírussal, mivel annak ausztráliai változata (Kunjin vírus) sem fordul elő a szigeten. Korábbi kutatások csak viszonylag rövid idejű (< 1 év) perzisztenciát mutattak ki vadmadarak WNV fertőzéseinél (Komar és mtsai., 2003; Nemeth és mtsai., 2009; Wheeler és mtsai., 2012a; 2012b). Amennyiben ez a típusú fertőzés más madárfajokban is előfordul, az elősegítheti a vírus fennmaradását a gerinces gazdában, illetve földrajzi terjedését. Az ilyen módon krónikusan fertőzött madarak ugyan nem viraemiásak és nem ürítik a vírust testváladékaikkal, ám amennyiben ragadozó madarak zsákmányául esnek, a központi idegrendszer elfogyasztása során fertőzhetik azokat (ld. a fent említett, nem-vektoriális átvitel).

Korábban széles körben elfogadott vélemény volt az, hogy a WNV lineage 2 genetikai vonalához tartozó vírusok emlősökben kevésbé neurovirulensek, mint a lineage 1 vonal képviselői (Beasley és mtsai., 2002). Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a Magyarországon felbukkant, lineage 2 genetikai vonalhoz tartozó WNV törzs neuroinvaszív és neurovirulens számos emlős fajban. A juhban és lovakban megfigyelt kórszöveti elváltozások a vírusok által okozott agy- és gerincvelő-gyulladásoknál ismert képet mutatják, illetve a vírus nukleinsavát és antigénjeit ki lehet mutatni az idegrendszeri tüneteket mutató emlősökből is (Kecskeméti és mtsai., 2007; Kutasi és mtsai., 2011; Sárdi és mtsai., 2012; Bakonyi és mtsai., 2013). Az antigén kimutatás hatékonysága / érzékenysége emlősöknél is elmarad a nukleinsav kimutató módszerekétől, ezért célszerű a kétféle módszert szimultán alkalmazni az oki diagnózis felállításakor. Szerológiai felmérő vizsgálataink eredményei viszont arra utalnak, hogy emlős háziállatokban is jelentős a fertőzést tünetmentesen átvészelő egyedek aránya. Az általunk vizsgált lóállományokban a lovak 24-37%-ának véréből WNV elleni IgG ellenanyagokat mutattunk ki, holott ezek a lovak nem részesültek immunizálásban, és nem mutattak sem idegrendszeri, sem feltűnő, lázas általános tüneteket. Gyakorlati szempontból ennek ott lehet jelentősége, hogy – a jelenlegi ismereteink szerint – a flavivírus fertőzés átvészelése (egészséges immunrendszerű állatban) élethosszig tartó védettséget eredményez. Ehhez képest a lovak részére forgalomban levő, inaktivált vagy vektorvakcinák védő hatása rövidebb ideig tart (Seino és mtsai., 2007; Long és mtsai., 2007). Ezt saját vizsgálataink is igazolták (Minke és mtsai., 2011; Joó és mtsai., 2017). Ezért a lótartók számára megfontolandó tanács, hogy lovaik immunizálása előtt szerológiai vizsgálattal győződjenek meg arról, hogy az állat átesett-e természetes fertőzésen. A lineage 2

genetikai vonalhoz tartozó vírusok neuroinvazivitását afrikai eredetű törzsek vizsgálataival is bizonyították (Venter és mtsai., 2005; Botha és mtsai., 2008). A közelmúltban megjelent, a különböző genetikai vonalakhoz tartozó WNV törzsek egér neuroinvazivitását összefoglaló tanulmány is arra a következtetésre jut, hogy a neuroinvazivitás genetikai vonaltól és földrajzi eredettől független tulajdonság (Pérez-Ramírez és mtsai., 2017). Azt egyelőre nem ismerjük, hogy mi befolyásolja leginkább a WNV neuroinvazivitását, noha számos kutatást végeztek a WNV virulencia markereinek megismerése céljából. Az egyik leggyakrabban hivatkozott megfigyelés, hogy a lineage 1 genetikai vonalhoz tartozó, neurovirulens WNV törzsek NS3 fehérje 249. aminosav pozíciójában prolin található, míg a nem neurovirulens törzsekben threonin van (Brault és mtsai., 2007). A mutációnak szerepet tulajdonítanak a vírus szaporodási képességében amerikai varjúbán (Kinney és mtsai., 2006). A korábban ismert, lineage 2-be sorolt vírusokban, valamint a 2004-ben Magyarországon felbukkant törzsben hisztidin van ebben a pozícióban. A Görögországban, nagyszámú emberi megbetegedést okozó és magas lethálisú vírustörzs viszont – hasonlóan a neurovirulens lineage 1 törzsekhez – prolint tartalmaz ezen a lókuszon (Papa és mtsai., 2011a), ami lehetséges, hogy fokozta a virulanciát emberben. Ezzel ellentmond az, hogy Olaszországban, *Cx. pipens* pool-ból kimutatott, a 249-es aminosav pozícióban prolint tartalmazó lineage 2 törzset nem tudtak állati vagy emberi megbetegedésekkel összefüggésbe hozni (Capelli és mtsai., 2013), és a Magyarországon, 2008. után kimutatott, nem magas patogenitású WNV szekvenciák vizsgálata is számos esetben feltárt H₂₄₉P mutációt (nem közölt adat). A hazai lineage 2 törzs virulencia markereinek megismerése céljából előállított fertőző klónon végzett mutagenesis nem igazolta a H₂₄₉P mutáció virulencia marker szerepét egérmodellben, viszont az NS1 fehérje P₂₅₀L subsztitúciója a vírus attenuálódását eredményezte (Szentpáli-Gavallér és mtsai., 2016). A neuroinvazivitást a vírus virulencia markerei mellett az emlős (alkalmi) gazdák genetikai tulajdonságai és egészségi állapota is befolyásolja. Míg megbetegedések lovakban és emberekben fordulnak elő leggyakrabban, más fajoknál ez ritkaság, bár a szeropozitivitás aránya gyakran magas (Jeffrey Root, 2013). Emberekben a vér-agy gátat károsító kóros folyamatok (különösen a magas vérnyomás) ismert kockázati tényezője a WNV által okozott idegrendszeri megbetegedéseknek (Jean és mtsai., 2007; Lindsey és mtsai., 2012; Montgomery és Murray, 2015). Magyarországon 2004. és 2016. között 189, idegrendszeri tüneteket mutató betegnél diagnosztizáltak WNV fertőzést (döntően IgM ellenanyagok kimutatása alapján). Az első halálos áldozatról, egy idős férfibetegről, 2010-ben számoltak be. A vírus nukleinsavát ki lehetett mutatni az elhunyt személy agyszövetéből, saját vizsgálataink szerint a szekvencia leginkább a hazai lineage 2 törzshöz hasonlított (nem közölt adat). A vírust kimutatták három idegrendszeri tüneteket mutató, hazai beteg vizeletéből is 2014-ben; a filogenetikai vizsgálatok ebben az esetben is a lineage 2 törzs jelenlétét igazolták (Nagy és mtsai., 2016). Azt, hogy a WNV vizelettel tartósan ürül először aranyhőrcsög modellkísérletekkel bizonyították (Tonry és mtsai., 2005a), majd heveny emberi fertőzés esetén is kimutatták (Tonry és mtsai., 2005b). Amerikai betegeken végzett vizsgálatok a heveny fertőzés után hat évvel is ki tudták mutatni a WNV RNS-t a vizeletből (Murray és mtsai., 2010), bár ezt egy másik, hasonló felmérés nem

igazolta (Gibney és mtsai., 2011). Megvizsgáltuk nyugat-nílusi encephalitis lovak vizeletmintáit, de a vírusRNS jelenlétét a legérzékenyebb qRT-PCR módszerrel sem lehetett kimutatni belőlük (nem közölt adat).

A nyugat-nílusi vírus hazai szúnyog vektorfajainak, és bennük a fertőzöttség arányának megismerése céljából felmérő vizsgálatokat végeztünk 2011-ben és 2012-ben. Szúnyogokat gyűjtöttünk az ország hat megyéjében, 24 helyen. A két év alatt gyűjtött, közel 12 ezer szúnyogból képzett 362 pool vizsgálata során három, 2011. júniusa és szeptembere között gyűjtött poolból mutattuk ki a WNV jelenlétét (Szentpáli-Gavallér és mtsai., 2014.). Mindhárom az ország keleti részéből származott. *Cx. pipens* mellett fertőzöttnek találtunk *Ochlerotatus (Aedes) annulipes* és *Coquillettidia richiardii* fajokat is. Az összes szúnyogra számított (0,25) és fajokra lebontott minimális fertőzöttségi arányok (0,63-2,7) hasonlóak voltak a Görögországban, 2011-ben mért értékekhez (0,85-3,71) (Patsuola és mtsai., 2016), valamint a korábbi években olyan területeken kimutatott szúnyog fertőzési rátákhoz, ahol emberekben és állatokban nyugat-nílusi vírus okozta megbetegedéseket diagnosztizáltak (Savage és mtsai., 1999; Bernard és mtsai., 2001; Condotta és mtsai., 2004; Lotfin és mtsai., 2006). Olyan területeken és időszakokban viszont, amikor nem figyeltek meg járványos megbetegedéseket, a szúnyogokban mért MIR értékek is alacsonyabbak voltak (Hubálek és mtsai., 2000; Samoilova és mtsai., 2003; Lvov és mtsai., 2004; Hubálek és mtsai., 2010), bár például Portugália déli részén, 2001. és 2004. között gyűjtött szúnyogokban az általunk kimutatotthoz hasonló WNV fertőzési arányt találtak (MIR 0,23 az összes szúnyogban és 1,93 *Cx. pipiens*-ben), annak ellenére, hogy megbetegedésekről nem számoltak be (Almeida és mtsai., 2008). Az általunk pozitívnak talált szúnyogfajok közül a *Cx. pipens* és a *Co. richiardii* a WNV elsődleges vektorai Európában (Zeller és Schuffenecker, 2004; Higgs és mtsai., 2004; Lvov és mtsai., 2004; Hayes és mtsai., 2005; Reiter, 2010; Dinu és mtsai., 2015; Mancini és mtsai., 2017). A *Co. richiardii* gyakran szív emberből is vért, ezért lehetséges közvetítője lehet a WNV-nek (Reiter és mtsai., 2010). Tudomásunk szerint ez az első eset, hogy a WNV jelenlétét lehetett kimutatni *Oc. annulipes* fajból. Németországi felmérések ezt a fajt leggyakrabban emberen találták (Börstler és mtsai., 2016), ezért szintén szerepet játszhat a vírus közvetítésében. Csehországi kollégáink 2013. augusztusában gyűjtöttek *Cx. modestus* szúnyogokat dél-kelet Morvaországban. A 32500 egyedet tartalmazó 650 pool közül négy bizonyult fertőzöttnek a WNV lineage 2 genetikai csoporthoz sorolt törzsével (Rudolf és mtsai., 2014). Mivel a *Cx. modestus* szintén ismert vektora a WNV-nek (Reiter és mtsai., 2010; Dinu és mtsai., 2015) és gyakran táplálkozik emberből, egyike a potenciálisan emberre közvetítő vektor fajoknak (Reiter, 2010).

A WNV különböző változatai európai előfordulásának leírása és genetikai jellemzése elősegítette a fertőzések pontosabb diagnosztikáját is. A vírus kimutatásával foglalkozó vizsgálólaboratóriumok körében 2005-ben szervezett körvizsgálat során a WNV lineage 1 törzseket a laborok 90-97%-a ki tudta mutatni RT-PCR módszerrel, a lineage 2 törzset viszont csak a 43%-ának sikerült (Niedrig és mtsai., 2006). Talán a nagyobb számú szekvencia alapján kidolgozott és tesztelt módszereknek is

köszönhető, hogy az öt évvel később, több labor bevonásával végzett körvizsgálatban már 73%-uk ki tudta mutatni a WNV lineage 2 törzset (75% a magyarországi törzset) (Linke és mtsai., 2011). A WNV fertőzés az emberek nagyobb részében tünetmentesen zajlik le, átmeneti viraemia előfordulhat. Ennek közegészségügyi kockázata van, mert ha a viraemiás, de tünetmentes személyek vért adnak, és ezt olyan beteg kapja meg aki életkora vagy alapbetegsége kapcsán, vagy valamilyen beavatkozás – pl. szervátültetés – miatti immunszuppresszió okán fokozottan érzékeny a vírusfertőzésre, abban a vírus súlyos megbetegedést okozhat. Ezért, az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) ajánlása alapján azokat a személyeket, akik olyan területen jártak a véradást megelőző 30 napon belül, ahol WNV aktivitást jelentettek, ki kell zárni a véradásból. Ez a szabály a vérellátás ellehetetlenülését eredményezheti, hiszen pl. 2016-ban Magyarország 15 megyéjéből jelentettek WNV eseteket augusztus-szeptember folyamán. Alternatív megoldás a gyűjtött vérek vizsgálata WNV nukleinsav jelenlétére. A korábbi években erre nem állt rendelkezésre infrastrukturális háttér (és forrás). A NAAT módszer kifejlesztésével viszont lehetőség van nagyszámú minta költséghatékony vizsgálatára, és több európai országban (pl. Olaszország, Ausztria) sikerült kimutatni a WNV (vagy az USUV) RNS jelenlétét véradók mintáiból (Pierro és mtsai., 2013; Kolodziejek és mtsai., 2015).

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

Kutatásaink eredményei alapján az utóbbi két évtizedben jelentős változások következtek be Európában a szúnyogok-közvetítette flavavírusok előfordulása tekintetében. Két egymással közeli rokonságban álló vírus, az Usutu vírus és a nyugat-nílusi vírus bukkant fel olyan régiókban, ahol korábbi előfordulását nem ismerték. A két vírus sok szempontból hasonlít egymáshoz. Mindkettő valószínűsíthetően afrikai eredetű, de Európába jutásuk pontos módja és időpontja nem ismert. A filogenetikai vizsgálatok mindkét vírus esetében meggyőzően igazolták, hogy – szemben a korábban elterjedt vélekedéssel – ezek a vírusok képesek áttelelni az európai időjárási viszonyok között. Emiatt néhány év alatt endémiássá váltak majd Európa számos országában elterjedtek. A részletesebb és alaposabb felmérő vizsgálatok és genetikai elemzések mindkét vírusfajnál genetikai változatosságot tártak fel, ami arra utal, hogy több, egymástól független behurcolás eredményeként vannak jelen a törzsek. Túélési és terjedési képességeikben azonban ezek a variánsok eltérnek egymástól. Egyesek csak sporadikusan és jellemzően a szúnyog vektorokból mutathatók ki (pl. az USUV „afrikai” genetikai vonalai, a WNV lineage 3, 4 és 8 genetikai vonalakhoz sorolt törzsei), mások „sikereesebbek” és akár több száz kilométerre is képesek terjedni az évek folyamán. A két vírus különböző genetikai variánsai jelenleg a mediterrán térségben és számos közép-európai országban egyszerre, átfedően jelen vannak. Közös tulajdonságuk az is, hogy legfontosabbnak vélt vektoruk a *Cx. pipiens*, illetve hogy különböző madárfajok, döntően vadmadarak az elsődleges gerinces gazdái. Bizonyos madárfajok fokozottan érzékenyek ezek iránt a vírusok iránt; az USUV feketerigót és bizonyos bagolyfajokat, míg a WNV lineage 2 genetikai vonalához tartozó vírus ragadozó madarakat, főként héjákat betegít meg

nagy gyakorisággal. Saját kutatásaink is igazolják, hogy az emlősök is fogékonyak mindkét vírus iránt, bár alkalmi gazdaként járványtani szerepük csekély. Mindkét vírus iránt fogékony az ember is; a fertőzések nagyobb része tünetmentes, de esetenként súlyos agy- és gerincvelő-gyulladást is okozhatnak. A két vírus közötti antigén-hasonlóság miatt szerológiai próbákban keresztreagálhatnak. Ezért bizonyos próbákkal egyszerre lehet a mintákat USUV és WNV elleni ellenanyagok jelenlétére szűrni, ám az elkülönítő kórjelzés további vizsgálatokat igényel. A hasonló ökológiai tulajdonságok miatt a védekezés elveiben és módszereiben is sok a közös: a vektoriális terjedés csökkentése érdekében a (*Cx. pipiens* ellen is hatékony) szúnyoggyérítés, a szúnyog-tenyészhelyek számának csökkentése és a szúnyogcsípések elkerülése (szúnyogháló, megfelelő ruházat, repellensek alkalmazása) jótékony hatású lehet. Arról, hogy az antigén hasonlóság eredményez-e vadmadarakban keresztvédelmet, egyelőre nincsenek adataink; de egérmodellben végzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy bizonyos fokú immunitás kialakulhat (Blázquez és mtsai., 2015).

A két vírus között legfontosabb eltérés a patogenitásukban, valamint az állat- és közegészségügyi jelentőség területén van. A WNV nagyobb gyakorisággal okoz idegrendszeri megbetegedéseket emlősökben, elsősorban lovakban és emberekben. Ezért az OIE és a WHO listáján is a jelentendő kórokozók köréhez tartozik. Az USUV dokumentált idegrendszeri megbetegedést eddig csak immunszuppresszált személyekben okozott. Egyrészt az ilyen személyek aránya jelentős lehet az európai társadalmakban, másrészt – amennyiben egy vírus képes egy adott fajt fertőzni – a virulencia fokozódását eredményező mutációk váratlanul és kedvezőtlenül változtathatják ezt a helyzetet. Ezért az USUV egyértelmű közegészségügyi kockázatot jelent, terjedését, aktivitását és annak változásait fontos a jövőben is nyomon követni. Látszólagosan eltérések vannak a két kórokozó gyakoriságában is. Gyakrabban diagnosztizálnak a WNV által okozott, olykor tömeges megbetegedéseket és járványokat. De ennek hátterében is a két vírus gazdaspektrumának és patogenitásának eltérései állhatnak. Vektor-monitoring programokkal hasonló gyakorisággal lehet a két kórokozót kimutatni endémiás területeken (Calzolari és mtsai., 2013; Rudolf és mtsai., 2015a). Annak ellenére, hogy a WNV a legszélesebb körben elterjedt flavivírus a Földön, európai elterjedése északi irányba behatároltabb, mint az Usutu vírusé. A WNV-t Európában legészakabbra Csehország déli részén izolálták, míg Észak-Amerikában jóval északabbra eső területeken is előfordul. Az USUV viszont az utóbbi néhány évben széles körben elterjedt Németországban, valamint felbukkant Belgiumban és Hollandiában is. Ilyen szempontból az USUV sikeres terjedése és endémiássá válása a WNV további térhódításának előhírnöke lehet. Arra viszont még mindig nincsenek egyértelmű tudományos adatok, hogy milyen körülmények egybeesése eredményezheti egy korábban egzotikus („trópusi”) flavivírus felbukkanását és endémiássá válását. Így például nehezen magyarázható, hogy a dengue vírus miért nem vált még endémiássá a Mediterrán térségben, hiszen az egyik leggyakrabban behurcolt flavivírus, és fő vektora (*Ae. albopictus*) elterjed ebben a régióban. Leírtak ugyan 2010-ben helyi dengue fertőzést Horvátországban (Schmidt-Chanasit és mtsai., 2010; Gjenero-Margan és mtsai., 2011), de

későbbi vizsgálatokkal nem lehetett kimutatni a vírus fennmaradását (Pem-Novosel és mtsai., 2015). Komoly veszélyt jelent ilyen szempontból a Japán encephalitis vírus is, hiszen közeli rokona a nyugat-nílusi és Usutu vírusoknak, és elsődleges vektora a *Culex tritaeniorhynchus* jelen van Görögországban (Lytra és Emmanouel, 2014). Ebből a szempontból is fontos, hogy olyan diagnosztikai módszerek álljanak rendelkezésünkre, amelyekkel többféle flavivírus jelenlétét egyszerre ki lehet mutatni a vizsgálati mintában. Az általunk alkalmazott, univerzális flavivírus RT-PCR a WNV és az USUV különböző genetikai vonalain túl képes kimutatni a DENV-2 (Nemes és mtsai., 2004) és a Tembusu (Baiyangdian) vírus RNS-ét is (nem közölt adat). A két vírus magyarországi és ausztriai terjedésének nyomon követése céljából monitoring rendszereket dolgoztunk ki és üzemeltettünk néhány éven keresztül. Ennek a monitoring rendszernek az egyik legfontosabb eleme az elhullott vadmadarak flavivírusokra irányuló vizsgálata. Bár a rendszer hatékonyságát jelentősen fokozza, ha célzottan, a fokozottan érzékeny madárfajokra irányul, ugyanakkor azonban az állategészségügyi hatóság által jelenleg üzemeltetett, madárinfluenza passzív monitoring során gyűjtött mintákból is számos esetben ki lehetett mutatni az USUV vagy WNV jelenlétét. A szúnyog-monitoring érzékenyen és pontosan le tudja írni egyes területek fertőzöttségét. A szúnyogok gyűjtése és határozása speciális képzettséget, nagyon sok élőléleket igényel, ezért kiterjedt alkalmazásának jelenleg személyi és pénzügyi akadályai vannak. Kutatásokat folytatunk olyan felmérő módszerek kialakítása céljából, amelyekkel gyorsan és költséghatékonyan lehet előszűrni, hogy a gyűjtőhelyek melyikén van jelen a WNV a szúnyog vektorokban. A klasszikus felmérő (surveillance) vizsgálatok gyakran alapulnak indirekt (szerológiai) módszerekre. Ezeket a WNV és USUV esetében is sikeresen alkalmaztuk. Az érzékeny fajokban (ló, ember) végzett szerológiai felmérő vizsgálatoknak az egyik hátránya, hogy az IgG ellenanyagok tartós perzisztálása miatt gyakran nem állapítható meg, hogy mikor következett be a fertőzés; az IgM ellenanyagok kimutatása viszont bonyolultabb (költségesebb) lehet. A vírusok valódi gazdáiból, a vadmadaraktól szerológiai vizsgálatokra körülményes vért gyűjteni ó, ezért megfontolandó baromfi-fajokra alapozni a felmérést. Ebből a célból főként a szabadtartású és víz közelben élő fajok jöhetnek szóba. Vizsgálataink szerint ludakban nagyobb gyakorisággal alakul ki immunválasz az USUV fertőzést követően, mint háztútyokban. Ezért a libatelepek ellenőrzése – amelyeken a nyár közepén-végén jellemzően ugyanabban a naptári évben tavasszal kelt madarakat nevelnek – alkalmasak lehetnek a környező terület szezonális flavivírus aktivitásának előjelzésére. Szervezett és szisztematikus (hatósági) WNV és USUV monitoring programok elindítása – a rendelkezésünkre álló tapasztalat és módszerek birtokában – lényegében véve elhatározás, akarat és pénzügyi forrás kérdése. Az értekezésben leírt kutatás az állategészségügy és közegészségügy területén dolgozó szakemberek példaértékű, tudományos érdeklődésből és szakmai felelősségérzetből fakadó, sok éves, fáradhatatlan munkájának az eredménye. Lehet, hogy ezek a kórokozók korábban is előfordultak Európában, de akkor nem diagnosztizálta senki őket. Az utóbbi 15 évben végzett vizsgálataink viszont számos részletét feltárták és nyomon követték az USUV és WNV terjedését, és manapság sokkal felkészültebben szállhatunk szembe ezekkel a vírusokkal, mint ahogy azt korábban tehattük.

5. Új tudományos eredmények

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 szövettenyészetek 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_{ml} jelű magyarországi törzsének részleges nukleotid szekvenciáját 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-ben 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.

6. Az értekezés 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. 2005: [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. 2005: [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. 2017: [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. 2017: [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 túzok- \(*Otis tarda*\) 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

Irodalmi hivatkozások

- Abbassy MM, Osman M, Marzouk AS. 1993: [West Nile virus \(Flaviviridae:Flavivirus\) in experimentally infected Argas ticks \(Acari:Argasidae\)](#). Am J Trop Med Hyg. 48:726-737.
- Adam F, Diguette JP. 2005: Virus d'Afrique (base de données). Centre Collaborateur OMS de référence et de recherche pour les arbovirus et les virus de fièvres hémorragiques (CRORA). Institut Pasteur de Dakar.
- Addis SN, Lee E, Bettadapura J, Lobigs M. 2015: [Proteolytic cleavage analysis at the Murray Valley encephalitis virus NS1-2A junction](#). Virol J. 12:144.
- Adelman ZN, Miller DM, Myles KM. 2013: [Bed bugs and infectious disease: a case for the arboviruses](#). PLoS Pathog. 9:e1003462.
- Ajello C, Gresíková M, Buckley SM, Casals J. 1975: [Detection of West Nile complement-fixing antigen in Aedes albopictus cell cultures](#). Acta Virol. 19:441-442.
- Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, DelProposto J, Ogata CM, Skiniotis G, Kuhn RJ, Smith JL. 2014: [Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system](#). Science. 343:881-885.
- Alcalá AC, Medina F, González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Fragoso-Soriano RJ, Vásquez C, Cervantes-Salazar M, Del Angel RM, Ludert JE. 2016: [The dengue virus non-structural protein 1 \(NS1\) is secreted efficiently from infected mosquito cells](#). Virology. 488:278-287.
- Alekseev AN, Chunikhin SP. 1990: [Exchange of the tickborne encephalitis virus between Ixodidae simultaneously feeding on the animals with subthreshold levels of viremia]. Med Parazitol. 2:48-50.
- Aliota MT, Jones SA, Dupuis AP 2nd, Ciota AT, Hubalek Z, Kramer LD. 2012: [Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis antigenic group](#). PLoS One. 7:e39387.
- Aliota MT, Kramer LD. 2012: [Replication of West Nile virus, Rabensburg lineage in mammalian cells is restricted by temperature](#). Parasit Vectors. 5:293.
- Allering L, Jöst H, Emmerich P, Günther S, Lattwein E, Schmidt M, Seifried E, Sambri V, Hourfar K, Schmidt-Chanasit J. 2012: [Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012](#). Euro Surveill. 17. pii: 20341.
- Almeida AP, Galão RP, Sousa CA, Novo MT, Parreira R, Pinto J, Piedade J, Esteves A. 2008: [Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection](#). Trans R Soc Trop Med Hyg. 102:823-832.
- Bagirov GA, Gadzhibekova EA, Alirzaev GU. 1994: [\[The attack activity of Uranotaenia unguiculata Edwards, 1913 mosquitoes on man\]](#). Med Parazitol (Mosk). 3:39-40.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, Capobianchi M, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo P. 2011: [Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011](#). Euro Surveill. 16:pii: 20002.
- Baharuddin A, Hassan AA, Sheng GC, Nasir SB, Othman S, Yusof R, Othman R, Rahman NA. 2014: [Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family](#). Curr Pharm Des. 20:3428-3444.
- Bahuon C, Desprès P, Pardigon N, Panthier JJ, Cordonnier N, Lowenski S, Richardson J, Zientara S, Lecollinet S. 2012: [IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus](#). PLoS One.;7:e47666.

- Bakonyi T, Ferenczi E, Mitterné Tóth E. 2004a: Egyes magyarországi arbovírus-izolátumok molekuláris genetikai vizsgálata. Magyar Zoonózis Társaság, Szent-Iványi – Binder napok, Szeged, 2004. május 12-14, Előadások 2004:pp. 185-193.
- Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. 2004b: [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.
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2005a: [Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe.](#) Emerg Infect Dis. 11:225-231.
- Bakonyi T, Lussy H, Weissenböck H, Hornyák Á, Nowotny N. 2005b: [In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus.](#) Emerg Infect Dis. 11:298-301.
- 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.
- 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.
- Bakonyi T, Erdélyi K. 2011: [Increased bird of prey mortality in Hungary due to West Nile virus infection.](#) Ornis Hungarica 19:1-10.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bárdos V, Adamcová J, Dedei S, Gjini N, Rosický B, Simková A. 1959: [Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania.](#) Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology (Prague) 3:277-282.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Masi G, Squarzon L, Pagni S, Toppo S, Russo F, Cattai M, Cusinato R, Palu G. 2013: [Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 1 and lineage 2 from human cases of infection, Italy, August 2013.](#) Euro Surveill. 18: pii: 20591.
- Beasley DW, Li L, Suderman MT, Barrett AD. 2002: [Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype.](#) Virology. 296:17-23.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. 2003: Mosquitoes and their control. Kluwer Academic-Plenum Publisher, New York. pp 498.
- Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, Fichet-Calvet E, Ehichioya DU, Czajka C, Gabriel M, Hoffmann B, Beer M, Tenner-Racz K, Racz P, Günther S, Wink M, Bosch S, Konrad A, Pfeffer M, Groschup MH, Schmidt-Chanasit J. 2012: [Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany.](#) PLoS One. 7:e32604.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel G, Dupuis AP 2nd, Ngo KA, Nicholas DC, Young DM, Shi PY, Kulasekera VL, Eidson M, White DJ, Stone WB, Kramer LD; NY State West Nile Virus Surveillance Team. 2001: [West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000.](#) Emerg Infect Dis. 7:679-685.

- Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. 1997: [Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses.](#) J Gen Virol. 78:2293-2297.
- Blair CD, Olson KE. 2015: [The role of RNA interference \(RNAi\) in arbovirus-vector interactions.](#) Viruses. 7:820-843.
- Blázquez AB, Escribano-Romero E, Martín-Acebes MA, Petrovic T, Saiz JC. 2015: [Limited susceptibility of mice to Usutu virus \(USUV\) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity.](#) Virology. 482:67-71.
- Blitvich BJ, Firth AE. 2015: [Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization.](#) Viruses. 7:1927-1959.
- Bolling BG, Olea-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. 2012: [Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected Culex pipiens laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus.](#) Virology. 427:90-97.
- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. 2015: [Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community.](#) Viruses. 7:4911-4928.
- Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. 2007: [West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage.](#) J Gen Virol. 88:875-884.
- Boonnak K, Slike BM, Donofrio GC, Marovich MA. 2013: [Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection.](#) J Immunol. 190:5659-5665.
- Börstler J, Jöst H, Garms R, Krüger A, Tannich E, Becker N, Schmidt-Chanasit J, Lühken R. 2016: [Host-feeding patterns of mosquito species in Germany.](#) Parasit Vectors. 9:318.
- Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R, Palacios G, Nel LH, Venter M. 2008: [Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains.](#) Emerg Infect Dis. 14:222-230.
- Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, Panella NA, Holmes EC, Powers AM, Miller BR. 2007: [A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows.](#) Nat Genet. 39:1162-1166.
- Brinton MA, Pereygin AA. 2003: [Genetic resistance to flaviviruses.](#) Adv Virus Res. 60:43-85.
- Brinton MA. 2013: [Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus.](#) Viruses. 6:13-53.
- Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. 2003: [Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK.](#) J Gen Virol. 84:2807-2817.
- Buckley A, Dawson A, Gould EA. 2006: [Detection of seroconversion to West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus in UK sentinel chickens.](#) Virol J. 3:71.
- Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Ignacio Nuñez J. 2008: [Usutu virus sequences in Culex pipiens \(Diptera: Culicidae\), Spain.](#) Emerg Infect Dis. 14:861-863.
- Cadar D, Becker N, Campos Rde M, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. 2014: [Usutu virus in bats, Germany, 2013.](#) Emerg Infect Dis. 20:1771-1773.
- Cadar D, Bosch S, Jöst H, Börstler J, Garigliany MM, Becker N, Schmidt-Chanasit J. 2015: [Putative Lineage of Novel African Usutu Virus, Central Europe.](#) Emerg Infect Dis. 21:1647-1650.
- Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, Lahoreau J, Lachmann L, Becker N, Kik M, Oude Munnink BB, Bosch S, Tannich E, Linden A, Schmidt V, Koopmans MP, Rijks J, Desmecht D, Groschup MH, Reusken C, Schmidt-Chanasit J. 2017a: [Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016.](#) Euro Surveill. 22: pii: 30452.

- Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, Schlaphof A, Jansen S, Jöst H, Tannich E, Runkel S, Hitzler WE, Hutschenreuter G, Wessiepe M, Schmidt-Chanasit J. 2017b: [Blood donor screening for West Nile virus \(WNV\) revealed acute Usutu virus \(USUV\) infection, Germany, September 2016](#). Euro Surveill. 22. pii: 30501.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. 1989: [Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera](#). J Gen Virol. 70:37-43.
- Calisher CH, Gould EA. 2003: [Taxonomy of the virus family Flaviviridae](#). Adv Virus Res. 59:1-19.
- Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, Maioli G, Luppi A, Rossini G, Balzani A, Tamba M, Galletti G, Gelati A, Carrieri M, Poglayen G, Cavrini F, Natalini S, Dottori M, Sambri V, Angelini P, Bonilauri P. 2012: [Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region \(Italy\) in 2010](#). PLoS One. 7:e38058.
- Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Tamba M, Tassinari M, Gelati A, Cordioli P, Angelini P, Dottori M. 2013: [Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region \(Italy\) in 2011](#). PLoS One. 8:e63978.
- Calzolari M, Chiapponi C, Bonilauri P, Lelli D, Baioni L, Barbieri I, Lavazza A, Pongolini S, Dottori M, Moreno A. 2017: [Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014](#). Infect Genet Evol. 51:255-262.
- Campbell CL, Smith DR, Sanchez-Vargas I, Zhang B, Shi PY, Ebel GD. 2014: [A positively selected mutation in the WNV 2K peptide confers resistance to superinfection exclusion in vivo](#). Virology. 464-465:228-232.
- Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Fabrizio S, Cazzin S, Bonfanti L, Di Gennaro A, Portanti O, Mulatti P, Monne I, Cattoli G, Cester G, Russo F, Savini G, Marangon S. 2013: [Further evidence of lineage 2 West Nile Virus in Culex pipiens of North-Eastern Italy](#). Vet Ital. 49:263-268.
- Casals J, Brown LV. 1954: [Hemagglutination with arthropod-borne viruses](#). J Exp Med. 99:429-449.
- Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, Gerunda GE, Di Benedetto F, Pasetto A, Girardis M, Dottori M, Landini MP, Sambri V. 2009: [Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009](#). Euro Surveill. 14 pii: 19448.
- Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, Sambri V. 2011: [A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid](#). J Clin Virol. 50:221-223.
- Ceccaldi PE, Lucas M, Despres P. 2004: [New insights on the neuropathology of West Nile virus](#). FEMS Microbiol Lett. 233:1-6.
- Cernescu C, Nedelcu NI, Tardei G, Ruta S, Tsai TF. 2000: [Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998](#). J Infect Dis. 181:710-712.
- Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, Pastorino B, Zeller H, de Chesse R, de Micco P, de Lamballerie X. 2003: [Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe](#). Virology. 315:381-388.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. 1997: [Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate](#). Nat Med. 3:866-871.
- Chu JJ, Ng ML. 2003: [The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose](#). J Gen Virol. 84:3305-3314.
- 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.

- 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.
- 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.
- Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E, Acutis PL, Modesto P, Rezza G, Platonov AE, Lo Presti A, Zehender G. 2013: [Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2.](#) Infect Genet Evol. 17:46-50.
- Ciota AT, Kramer LD. 2013: [Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus.](#) Viruses. 5:3021-3047.
- Ciota AT, Styer LM, Meola MA, Kramer LD. 2011: [The costs of infection and resistance as determinants of West Nile virus susceptibility in Culex mosquitoes.](#) BMC Ecol. 11:23
- Ciota AT, Ehrbar DJ, Matarachiero AC, Van Slyke GA, Kramer LD. 2013: [The evolution of virulence of West Nile virus in a mosquito vector: implications for arbovirus adaptation and evolution.](#) BMC Evol Biol. 13:71.
- Clarke DH, Casals J. 1958: [Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses.](#) Am J Trop Med Hyg. 7:561-573.
- Cleaves GR, Dubin DT. 1979: [Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA.](#) Virology. 96:159-165.
- Collins WE. 1962: [Trans-stadial passage of St. Louis encephalitis virus in Aedes aegypti mosquitoes.](#) Am J Trop Med Hyg. 11:535-538.
- Condotta SA, Hunter FF, Bidochka MJ. 2004: [West Nile virus infection rates in pooled and individual mosquito samples.](#) Vector Borne Zoonotic Dis. 4:198-203.
- Conte A, Candeloro L, Ippoliti C, Monaco F, De Massis F, Bruno R, Di Sabatino D, Danzetta ML, Benjelloun A, Belkadi B, El Harrak M, Declich S, Rizzo C, Hammami S, Ben Hassine T, Calistri P, Savini G. 2015: [Spatio-Temporal Identification of Areas Suitable for West Nile Disease in the Mediterranean Basin and Central Europe.](#) PLoS One. 10:e0146024.
- Cook S, Moureau G, Kitchen A, Gould EA, de Lamballerie X, Holmes EC, Harbach RE. 2012: [Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses.](#) J Gen Virol. 93:223-234.
- Csank T, Bhide K, Bencúrová E, Dolinská S, Drzewnioková P, Major P, Korytár I, Bocková E, Bhide M, Pistl J. 2016: [Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set.](#) Arch Virol. 161:1679-1683.
- Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai A. 2009: [Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus.](#) Virology. 385:47-57.
- Davis CW, Nguyen HY, Hanna SL, Sánchez MD, Doms RW, Pierson TC. 2006: [West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection.](#) J Virol. 80:1290-1301.
- De Madrid AT, Porterfield JS. 1974: [The flaviviruses \(group B arboviruses\): a cross-neutralization study.](#) J Gen Virol. 23:91-96.
- Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. 2003: [Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus.](#) Viral Immunol. 16:259-278.
- Dick GW, Gee FL. 1952: [Immunity to yellow fever nine years after vaccination with 17D vaccine.](#) Trans R Soc Trop Med Hyg. 46:449-458.

- Dinu S, Cotar AI, Pănculescu-Gătej IR, Fălcută E, Prioteasa FL, Sîrbu A, Oprişan G, Bădescu D, Reiter P, Ceianu CS. 2015: [West Nile virus circulation in South-Eastern Romania, 2011 to 2013](#). Euro Surveill. 20. pii: 21130.
- Dobson SL, Bordenstein SR, Rose RI. 2016: [Wolbachia mosquito control: Regulated](#). Science. 352:526-527.
- Donadieu E, Bahuon C, Lowenski S, Zientara S, Couplier M, Lecollinet S. 2013: [Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses](#). Viruses. 5:2856-2880.
- Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachieri N, Beck C, Lecollinet S. 2016: [Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species?](#) Epidemiol Infect. 144:1857-1864.
- Ebel GD, Kramer LD. 2004: [Short report: duration of tick attachment required for transmission of powassan virus by deer ticks](#). Am J Trop Med Hyg. 71:268-271.
- Eckels KH, Putnak R. 2003: [Formalin-inactivated whole virus and recombinant subunit flavivirus vaccines](#). Adv Virus Res. 61:395-418.
- Egberink H, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Horzinek MC, Hosie MJ, Marsilio F, Lloret A, Lutz H, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Möstl K; European Advisory Board on Cat Diseases. 2015: [West Nile virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management](#). J Feline Med Surg. 17:617-619.
- Engel D, Jöst H, Wink M, Börstler J, Bosch S, Garigliany MM, Jöst A, Czajka C, Lühken R, Ziegler U, Groschup MH, Pfeffer M, Becker N, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. 2016: [Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa](#). MBio. 7:e01938-15.
- 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.
- 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.
- Fabbri CM, García JB, Morales MA, Enría DA, Levis S, Lanciotti RS. 2014: [Complete genome sequences and phylogenetic analysis of two West Nile virus strains isolated from equines in Argentina in 2006 could indicate an early introduction of the virus in the Southern Cone](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 14:794-800.
- Fereidouni SR, Ziegler U, Linke S, Niedrig M, Modirrousta H, Hoffmann B, Groschup MH. 2011: [West Nile virus monitoring in migrating and resident water birds in Iran: are common coots the main reservoirs of the virus in wetlands?](#) Vector Borne Zoonotic Dis. 11:1377-1381.
- Ferenczi E, Rácz G, Faludi G, Czeglédi A, Mezey I, Berencsi G. 2005: [Natural Foci of Classical and Emerging Viral Zoonoses in Hungary](#). NATO Science Series, I: Life and Behavioural Sciences Emerging Biological Threat. 370:43-49.
- Figuerola J, Baouab RE, Soriguer R, Fassi-Fihri O, Llorente F, Jiménez-Clavero MA. 2009: [West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008](#). Emerg Infect Dis. 15:1651-1653.
- Finlay CJ. 1903: [New Aspects of Yellow Fever Etiology Arising from Experimental Findings of the Last Three Years](#). Public Health Pap Rep. 29:68-70.
- Finlay C. 1937: [The Mosquito Hypothetically Considered as an Agent in the Transmission of Yellow Fever Poison](#). Yale J Biol Med. 9:589-604.
- Forgách P, Erdélyi K, Pályi B, Nowotny N, Bakonyi T: [Experimental infection of domestic pigeons \(Columba livia L.\) with lineage 2 West Nile virus](#). Xth International Congress of Veterinary Virology of ESVV, Montpellier, Franciaország, 2015. 08. 31.- 09. 03., Proceedings pp. 195-196.
- Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015 [Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes](#). Viruses. 7:3741-3767.

- Fros JJ, Miesen P, Vogels CB, Gaibani P, Sambri V, Martina BE, Koenraadt CJ, van Rij RP, Vlak JM, Takken W, Pijlman GP. 2015: [Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local Culex pipiens mosquitoes in north-western Europe](#). One Health. 1:31-36.
- Gaibani P, Pierro A, Alicino R, Rossini G, Cavrini F, Landini MP, Sambri V. 2012: [Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 12:431-433.
- Gaibani P, Cavrini F, Gould EA, Rossini G, Pierro A, Landini MP, Sambri V. 2013: [Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms](#). PLoS One. 8:e64761.
- Gaibani P, Rossini G. 2017: [An overview of Usutu virus](#). Microbes Infect. 19:382-387.
- García-Bocanegra I, Busquets N, Napp S, Alba A, Zorrilla I, Villalba R, Arenas A. 2011: [Serosurvey of West Nile virus and other flaviviruses of the Japanese encephalitis antigenic complex in birds from Andalusia, southern Spain](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 11:1107-1113.
- García-Bocanegra I, Paniagua J, Gutiérrez-Guzmán AV, Lecollinet S, Boadella M, Arenas-Montes A, Cano-Terriza D, Lowenski S, Gortázar C, Höfle U. 2016: [Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants](#). BMC Vet Res. 12:249.
- Garigliany MM, Marlier D, Tenner-Racz K, Eiden M, Cassart D, Gandar F, Beer M, Schmidt-Chanasit J, Desmecht D. 2014: [Detection of Usutu virus in a bullfinch \(Pyrrhula pyrrhula\) and a great spotted woodpecker \(Dendrocopos major\) in north-west Europe](#). Vet J. 199:191-193.
- Garigliany M, Linden A, Gilliau G, Levy E, Sarlet M, Franssen M, Benzarti E, Derouaux A, Francis F, Desmecht D. 2017: [Usutu virus, Belgium, 2016](#). Infect Genet Evol. 48:116-119.
- Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. 2002: [Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus](#). Virology. 292:162-168.
- Gibney KB, Lanciotti RS, Sejvar JJ, Nugent CT, Linnen JM, Delorey MJ, Lehman JA, Boswell EN, Staples JE, Fischer M. 2011: [West nile virus RNA not detected in urine of 40 people tested 6 years after acute West Nile virus disease](#). J Infect Dis. 203:344-347.
- Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, Berger SA, Campbell GL, Lanciotti RS. 2001: [West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection](#). Emerg Infect Dis. 7:659-661.
- Girard YA, Popov V, Wen J, Han V, Higgs S. 2005: [Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in Culex pipiens quinquefasciatus \(Diptera: Culicidae\)](#). J Med Entomol. 42:429-444.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Duričić S, Betica-Radić L, Okmadžić J, Vilibić-Čavlek T, Babić-Erceg A, Turković B, Avsić-Županc T, Radić I, Ljubić M, Sarac K, Benić N, Mlinarić-Galinović G. 2011 [Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010](#). Euro Surveill. 16. pii: 19805
- Glaser RL, Meola MA. 2010: [The native Wolbachia endosymbionts of Drosophila melanogaster and Culex quinquefasciatus increase host resistance to West Nile virus infection](#). PLoS One. 5:e11977.
- Glávits R, Ferenczi E, Ivanics E, Bakonyi T, Mató T, Zarka P, Palya V. 2005: [Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary](#). Avian Pathol. 34:408-414.
- Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC. 2001: [Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies](#). Adv Virus Res. 57:71-103.
- Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC. 2003: [Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus](#). Adv Virus Res. 59:277-314.

- Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, Monaco F, Marchegiano P, Marini V, Meacci M, Rumpianesi F, Lorusso A, Pecorari M, Savini G. 2017: [Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy](#). Clin Microbiol Infect. 23:33-37.
- Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. 2007: Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM. (Eds) Fields Virology, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. I, Chapter 34, pp. 1153-1252.
- Guzman MG, Harris E. 2015: [Dengue](#). Lancet. 385:453-465.
- Hall RA, Hall-Mendelin S, Hobson-Peters J, Prow NA, Mackenzie JS. 2016: Ecological and epidemiological factors influencing arbovirus diversity, evolution and spread. In: Vasilakis N, Gubner JD (Eds.): Arboviruses, Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press, Norfolk, pp 135-166.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. 2005: [Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease](#). Emerg Infect Dis. 11:1167-1173.
- Heinz FX, Allison SL. 2003: [Flavivirus structure and membrane fusion](#). Adv Virus Res. 59:63-97.
- Heinz FX, Stiasny K. 2012: [Flaviviruses and flavivirus vaccines](#). Vaccine. 30:4301-4306.
- Higgs S, Snow K, Gould EA. 2004: [The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom](#). Trans R Soc Trop Med Hyg. 98:82-87.
- Higgs S, Schneider BS, Vanlandingham DL, Klingler KA, Gould EA. 2005: [Nonviremic transmission of West Nile virus](#). Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8871-8874.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL. 2011: [Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission](#). Nature. 476:454-457.
- Höfle U, Gamino V, de Mera IG, Mangold AJ, Ortíz JA, de la Fuente J. 2013: [Usutu virus in migratory song thrushes, Spain](#). Emerg Infect Dis. 19:1173-1175.
- Hopla CE, Francy DB, Calisher CH, Lazwick JS. 1993: [Relationship of cliff swallows, ectoparasites, and an Alphavirus in west-central Oklahoma](#). J Med Entomol. 30:267-272.
- Hrnjaković Cvjetković I, Petrović T, Petrić T, Cvjetković D, Kovačević G, Radovanov J, Jovanović Galović A, Patić A, Nikolić N, Mikić SS, Milošević V. 2016: [Seroprevalence of mosquito-born and tick-born microorganisms in human population of South Backa district](#). Arhiv Veterinarske Med. 9:23-30.
- Hubálek Z, Chanas AC, Johnson BK, Simpson DI. 1979: [Cross-neutralization study of seven California group \(Bunyaviridae\) strains in homoiothermous \(PS\) and poikilothermous \(XTC-2\) vertebrate cells](#). J Gen Virol. 42:357-362.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z, Sebesta O. 1998: [First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic](#). Acta Virol. 42:119-120.
- Hubálek Z, Halouzka J. 1999: [West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe](#). Emerg Infect Dis. 5:643-650.
- Hubálek Z, Savage HM, Halouzka J, Juricová Z, Sanogo YO, Lusk S. 2000: [West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland](#). Viral Immunol. 13:427-433.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z, Sikutová S, Rudolf I, Honza M, Janková J, Chytil J, Marec F, Sitko J. 2008a: [Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia \(Czech Republic\)](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 8:659-666.
- Hubálek Z, Wegner E, Halouzka J, Tryjanowski P, Jerzak L, Sikutová S, Rudolf I, Kruszcwicz AG, Jaworski Z, Włodarczyk R. 2008b: [Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland](#). Viral Immunol. 21:247-253.

- Hubálek Z, Rudolf I, Bakonyi T, Kazdová K, Halouzka J, Sebesta O, Sikutová S, Juricová Z, Nowotny N. 2010: [Mosquito \(Diptera: Culicidae\) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile \(Lineage Rabensburg\) and Tahyna viruses in Central Europe.](#) J Med Entomol. 47:466-472.
- Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2014a: [Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals.](#) Adv Virus Res. 89:201-275.
- Hubálek Z, Rudolf I, Čapek M, Bakonyi T, Betášová L, Nowotny N. 2014b: [Usutu virus in blackbirds \(Turdus merula\), Czech Republic, 2011-2012.](#) Transbound Emerg Dis. 61:273-276.
- Hurrelbrink RJ, McMinn PC. 2003: [Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation.](#) Adv Virus Res. 60:1-42.
- ICTV 1984: Minutes of the sixth meeting of the ICTV, Sendai, 5th September 1984, http://ictvonline.org/proposals/Ratification_1984.pdf
- ICTV 2016: Virus Taxonomy: 2016 Release, EC 48, Budapest, Hungary, August 2016, Email ratification 2017 (MSL #31), <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Ip HS, Van Wettere AJ, McFarlane L, Shearn-Bochsler V, Dickson SL, Baker J, Hatch G, Cavender K, Long R, Bodenstein B. 2014: [West nile virus transmission in winter: the 2013 great salt lake bald eagle and eared grebes mortality event.](#) PLoS Curr. 6. pii: ecurrents.outbreaks.b0f031fc8db2a827d9da0f30f0766871.
- Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. 2014: [A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available.](#) Vaccine. 32:1326-1337.
- Jackson BT, Brewster CC, Paulson SL. 2012: [La Crosse virus infection alters blood feeding behavior in Aedes triseriatus and Aedes albopictus \(Diptera: Culicidae\).](#) J Med Entomol. 49:1424-1429.
- Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA. 2007: [Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005.](#) Emerg Infect Dis. 13:1918-1920.
- Jeffrey Root J. 2013: [West Nile virus associations in wild mammals: a synthesis.](#) Arch Virol. 158:735-752.
- Joó K, Bakonyi T, Szenci O, Sárdi S, Ferenczi E, Barna M, Malik P, Hubálek Z, Fehér O, Kutasi O. 2017: [Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in equine serum after natural infection or vaccination.](#) Vet Immunol Immunopathol. 183:1-6.
- Jordan I, Briesse T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. 2000: [Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells.](#) J Infect Dis. 182:1214-1217.
- Kaufmann B, Rossmann MG. 2011: [Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry.](#) Microbes Infect. 13:1-9.
- 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.
- Kemenesi G, Dallos B, Oldal M, Kutas A, Földes F, Németh V, Reiter P, Bakonyi T, Bányai K, Jakab F. 2014a: [Putative novel lineage of West Nile virus in Uranotaenia unguiculata mosquito, Hungary.](#) Virusdisease. 25:500-503.
- Kemenesi G, Krtinić B, Milankov V, Kutas A, Dallos B, Oldal M, Somogyi N, Németh V, Bányai K, Jakab F. 2014b: [West Nile virus surveillance in mosquitoes, April to October 2013, Vojvodina province, Serbia: implications for the 2014 season.](#) Euro Surveill. 19. pii: 20779.
- Kenyeres Z, Tóth S. 2008: Csípőszúnyog határozó II. (Imágók). Pannónia Központ Szakértői és Tanácsadói Koordinációs Kft, Keszthely, pp 96.
- Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. 2001: [Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus.](#) J Virol. 75:4633-4640.
- Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. 2004: [Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles.](#) J Virol. 78:8078-8084.

- King NJ, Getts DR, Getts MT, Rana S, Shrestha B, Kesson AM. 2007: [Immunopathology of flavivirus infections](#). Immunol Cell Biol. 85:33-42.
- King NJ, Shrestha B, Kesson AM. 2003: [Immune modulation by flaviviruses](#). Adv Virus Res. 60:121-155.
- Kinney RM, Huang CY, Whiteman MC, Bowen RA, Langevin SA, Miller BR, Brault AC. 2006: [Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus](#). J Gen Virol. 87:3611-3622.
- Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH. 2015: [Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping](#). Viruses. 7:4640-4656.
- Klema VJ, Ye M, Hindupur A, Teramoto T, Gottipati K, Padmanabhan R, Choi KH. 2016: [Dengue Virus Nonstructural Protein 5 \(NS5\) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface](#). PLoS Pathog. 12:e1005451.
- Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. 2002: [Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence](#). J Virol. 76:3534-3543.
- Kok WM. 2016: [New developments in flavivirus drug discovery](#). Expert Opin Drug Discov. 11:433-45.
- Koller M, Gresikova M, Berencsi G, Schablik M. 1969: Hemagglutination inhibition antibodies to arboviruses in the population of Hajdú-Bihar district, Hungary. Folia Parasitologica 16: 75-79.
- Kolodziejek J, Marinov M, Kiss BJ, Alexe V, Nowotny N. 2014: [The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a Hyalomma marginatum marginatum tick collected from a song thrush \(Turdus philomelos\) in eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007](#). PLoS One. 9:e109905.
- Kolodziejek J, Seidel B, Jungbauer C, Dimmel K, Kolodziejek M, Rudolf I, Hubálek Z, Allerberger F, Nowotny N. 2015: [West Nile virus positive blood donation and subsequent entomological investigation, Austria, 2014](#). PLoS One. 10:e0126381.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. 2003: [Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus](#). Emerg Infect Dis. 9:311-322.
- Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V, Kaszas K. 2008: [West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008](#). Euro Surveill. 13:pii: 19030.
- Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. 2003: [Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus](#). Virology. 308:92-100.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. 1998: [Phylogeny of the genus Flavivirus](#). J Virol. 72:73-83.
- Kuno G. 2016: The boundaries of arboviruses: Complexities revealed in their host ranges, virus-host interactions and evolutionary relationships. In: Vasilakis N, Gubner JD (Eds.): Arboviruses, Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press, Norfolk, pp 191-218.
- Kurolt IC, Krajcinović V, Topić A, Kuzman I, Baršić B, Markotić A. 2014: [First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia](#). Virus Res. 189:63-66.
- Kurucz K, Kemenesi G, Zana B, Zeghib S, Oldal M, Jakab F. 2017: [Ecological preferences of the putative West Nile virus vector Uranotaenia unguiculata mosquito with description of an original larval habitat](#). North-Western Journal of Zoology 2017: e161103
- 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.
- Labuda M, Kožuch O, Grešíková M. 1974: Isolation of West Nile virus from Aedes cantans mosquitoes in West Slovakia. Acta Virol. 18:429-433.

- Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttall PA. 1993: [Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks](#). J Med Entomol. 30:295-299.
- Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttall PA. 1996: [Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission](#). Virology. 219:357-366.
- Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA. 1997: [Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts](#). Virology. 235:138-143.
- Lambert AJ, Lanciotti R. 2016: Laboratory diagnosis of arboviruses. In: Vasilakis N, Gubner JD (Eds.): Arboviruses, Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press, Norfolk, pp 271-280.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. 1999: [Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States](#). Science. 286:2333-2337.
- Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT. 2002: [Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East](#). Virology. 298:96-105.
- Lazear HM, Diamond MS. 2015: [New insights into innate immune restriction of West Nile virus infection](#). Curr Opin Virol. 11:1-6.
- Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, Touzain F, Lucas P, Eraud C, Bahuon C, Zientara S, Beck C, Decors A. 2016: [Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015](#). Emerg Infect Dis. 22:2225.
- Lee E, Lobigs M. 2008: [E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence](#). J Virol. 82:6024-6033.
- Leyssen P, Charlier N, Paeshuyse J, De Clercq E, Neyts J. 2003: [Prospects for antiviral therapy](#). Adv Virus Res. 61:511-553.
- Li XD, Deng CL, Ye HQ, Zhang HL, Zhang QY, Chen DD, Zhang PT, Shi PY, Yuan ZM, Zhang B. 2016: [Transmembrane Domains of NS2B Contribute to Both Viral RNA Replication and Particle Formation in Japanese Encephalitis Virus](#). J Virol. pii: JVI.00340-16.
- Lindenbach BD, Rice CM. 2003: [Molecular biology of flaviviruses](#). Adv Virus Res.;59:23-61
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007: Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. (Eds) Fields Virology, Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. I, Chapter 33, pp. 1101-1152.
- Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M. 2012: [Medical risk factors for severe West Nile Virus disease, United States, 2008-2010](#). Am J Trop Med Hyg. 87:179-184.
- Linke S, Mackay WG, Scott C, Wallace P, Niedrig M. 2011: [Second external quality assessment of the molecular diagnostic of West Nile virus: are there improvements towards the detection of WNV?](#) J Clin Virol. 52:257-260.
- Liu Y, Blanden RV, Müllbacher A. 1989: [Identification of cytolytic lymphocytes in West Nile virus-infected murine central nervous system](#). J Gen Virol. 70:565-573.
- Lobigs M, Müllbacher A, Wang Y, Pavy M, Lee E. 2003: [Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus](#). J Gen Virol. 84:567-572.
- Loftin KC, Diallo AA, Herbert MW, Phaltankar PG, Yuan C, Greife N, Flemming A, Foley K, Williams J, Fisher SL, Elberfeld M, Constantine J, Burcham M, Stallings V, Xia D. 2006: [Five-year surveillance of West Nile and eastern equine encephalitis viruses in Southeastern Virginia](#). J Environ Health. 68:33-40.

- Long MT, Gibbs EP, Mellencamp MW, Bowen RA, Seino KK, Zhang S, Beachboard SE, Humphrey PP. 2007: [Efficacy, duration, and onset of immunogenicity of a West Nile virus vaccine, live Flavivirus chimera, in horses with a clinical disease challenge model.](#) Equine Vet J. 39:491-497.
- Lorenz IC, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. 2003: [Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus.](#) J Virol. 77:4370-4382.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. 2005: [Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin \(DC-SIGN\)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals.](#) J Biol Chem. 280:23698-23708.
- Lund M, Shearn-Bochsler V, Dusek RJ, Shivers J, Hofmeister E. 2017: [Potential for Waterborne and Invertebrate Transmission of West Nile Virus in the Great Salt Lake, Utah.](#) Appl Environ Microbiol. 83. pii: e00705-17.
- Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. 2015: [The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development.](#) Antiviral Res. 118:148-58.
- Lupulovic D, Martín-Acebes MA, Lazic S, Alonso-Padilla J, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Petrovic T, Saiz JC. 2011: [First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia.](#) Vector Borne Zoonotic Dis. 11:1303-1305.
- Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Larichev VP, Gaidamovich SY, Vyshemirsky OI, Zhukov AN, Lazorenko VV, Salko VN, Kovtunov AI, Galimzyanov KM, Platonov AE, Morozova TN, Khutoretskaya NV, Shishkina EO, Skvortsova TM. 2000: [Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999.](#) Emerg Infect Dis. 6:373-376.
- Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharhenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, Deryabin PG, Gubler DJ, Kulikova LN, Alkhovsky SK, Moskvina TM, Zlobina LV, Sadykova GK, Shatalov AG, Lvov DN, Usachev VE, Voronina AG. 2004: [West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations.](#) Arch Virol Suppl. 18:85-96.
- Lytra I, Emmanouel N. 2014: [Study of Culex tritaeniorhynchus and species composition of mosquitoes in a rice field in Greece.](#) Acta Trop. 134:66-71.
- Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R. 2011: [Lower survival rate, longevity and fecundity of Aedes aegypti \(Diptera: Culicidae\) females orally challenged with dengue virus serotype 2.](#) Trans R Soc Trop Med Hyg. 105:452-458.
- Madić J, Savini G, Di Gennaro A, Monaco F, Jukić B, Kovac S, Rudan N, Listes E. 2007: [Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia.](#) Vet Rec. 160:772-773.
- Mahmood F, Reisen WK, Chiles RE, Fang Y. 2004: [Western equine encephalomyelitis virus infection affects the life table characteristics of Culex tarsalis \(Diptera: Culicidae\).](#) J Med Entomol. 41:982-986.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V. 2002: [Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks.](#) Emerg Infect Dis. 8:392-397.
- 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.
- Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, Capelli G, Dottori M, Ravagnan S, Lelli D, Chiari M, Santilli A, Quaglia M, Quaglia M, Federici V, Monaco F, Goffredo M, Savini G. 2017: [Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy.](#) Vet Ital. 53:97-110.
- Mani P, Rossi G, Perrucci S, Bertini S. 1998: [\[Mortality of Turdus merula in Tuscany\].](#) Selezione Veterinaria. 8-9:749-753.
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR. 2011: [Flavivirus-induced antibody cross-reactivity.](#) J Gen Virol. 92:2821-2829.

- Martina BE. 2014: [Dengue pathogenesis: a disease driven by the host response](#). Sci Prog. 97:197-214.
- Mashimo T, Simon-Chazottes D, Guénet JL. 2008. [Innate resistance to flavivirus infections and the functions of 2'-5' oligoadenylate synthetases](#). Curr Top Microbiol Immunol. 321:85-100.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. 2011 [Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas](#). J Virol. 85:2964-2974.
- McGee CE, Schneider BS, Girard YA, Vanlandingham DL, Higgs S. 2007: [Nonviremic transmission of West Nile virus: evaluation of the effects of space, time, and mosquito species](#). Am J Trop Med Hyg. 76:424-30.
- McIntosh BM. 1985: "Usutu (SA Ar 1776), nouvel arbovirus du groupe B.". International Catalogue of Arboviruses. 3:1059–1060.
- 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.
- Melnick JL, Paul JR, Riordan JT, Barnett VH, Goldblum N, Zabin E. 1951: [Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus](#). Proc Soc Exp Biol Med. 77:661-665.
- Merdić E, Perić L, Pandak N, Kurolt IC, Turić N, Vignjević G, Stolfi I, Milas J, Bogojević MS, Markotić A. 2013: [West Nile virus outbreak in humans in Croatia, 2012](#). Coll Antropol. 37:943-947.
- Merino-Ramos T, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Cañas-Arranz R, Sobrino F, Saiz JC, Martín-Acebes MA. 2014: [Protection of a single dose west nile virus recombinant subviral particle vaccine against lineage 1 or 2 strains and analysis of the cross-reactivity with Usutu virus](#). PLoS One. 9:e108056.
- Micieli MV, Glaser RL. 2014: [Somatic Wolbachia \(Rickettsiales: Rickettsiaceae\) levels in Culex quinquefasciatus and Culex pipiens \(Diptera: Culicidae\) and resistance to West Nile virus infection](#). J Med Entomol. 51:189-199.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. 2008: [The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages](#). PLoS Pathog. 4:e17.
- Minke JM, Siger L, Cupillard L, Powers B, Bakonyi T, Boyum S, Nowotny N, Bowen R. 2011: [Protection provided by a recombinant ALVAC®-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain](#). Vaccine. 29:4608-4612.
- Molnár E. 1982: [Occurrence of tick-borne encephalitis and other arboviruses in Hungary](#). Geogr Med. 12:78-120.
- Monaco F, Çizmecı Ş, Polci A, Portanti O, Barut F, Deniz A, Cosseddu GM, Pişkin Ç, Savini G. 2016: [First evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Turkey](#). Vet Ital. 52:77-81.
- Moncayo AC, Edman JD, Turell MJ. 2000: [Effect of eastern equine encephalomyelitis virus on the survival of Aedes albopictus, Anopheles quadrimaculatus, and Coquillettidia perturbans \(Diptera: Culicidae\)](#). J Med Entomol. 37:701-706.
- Montgomery RR, Murray KO. 2015: [Risk factors for West Nile virus infection and disease in populations and individuals](#). Expert Rev Anti Infect Ther. 13:317-325.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, Gutierrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernandez F, Levis S, Enría D. 2006: [West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006](#). Emerg Infect Dis. 12:1559-1561.
- Morrey JD, Taro BS, Siddharthan V, Wang H, Smee DF, Christensen AJ, Furuta Y. 2008: [Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents](#). Antiviral Res. 80:377-379.
- Moudy RM, Meola MA, Morin LL, Ebel GD, Kramer LD. 2007: [A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by Culex mosquitoes](#). Am J Trop Med Hyg. 77:365-370.

- Mourya DT, Soman RS. 1999: [Venereal transmission of Japanese encephalitis virus in Culex bitaeniorhynchus mosquitoes](#). Indian J Med Res. 109:202-3.
- Müllbacher A, Lobigs M, Lee E. 2003: [Immunobiology of mosquito-borne encephalitic flaviviruses](#). Adv Virus Res. 60:87-120.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ (Eds) 1999: Chapter 39 Flaviviridae. In: Veterinary Virology, Third Edition, Academic Press Elsevier, San Diego, pp. 555-569.
- Murphy FA. 1980: Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW. (Ed) The Togaviruses: Biology, Structure, Replication, Academic Press, New York, pp. 241-316.
- Murray K, Walker C, Herrington E, Lewis JA, McCormick J, Beasley DW, Tesh RB, Fisher-Hoch S. 2010: [Persistent infection with West Nile virus years after initial infection](#). J Infect Dis. 201:2-4.
- Nagy A, Bán E, Nagy O, Ferenczi E, Farkas Á, Bányai K, Farkas S, Takács M. 2016: [Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period](#). Arch Virol. 161:1797-1806.
- Nagy G, Mezey I. 1977: [The use of ion exchange chromatography for demonstration of rubella-specific IgM antibodies](#). Acta Microbiol Acad Sci Hung. 24:189-194.
- Nayar JK, Rosen L, Knight JW. 1986: [Experimental vertical transmission of Saint Louis encephalitis virus by Florida mosquitoes](#). Am J Trop Med Hyg. 35:1296-1301
- Nemes Z, Kiss G, Madarassi EP, Péterfi Z, Ferenczi E, Bakonyi T, Ternák G. 2004: [Nosocomial transmission of dengue](#). Emerg Infect Dis. 10:1880-1881.
- Nemeth N, Young G, Ndaluka C, Bielefeldt-Ohmann H, Komar N, Bowen R. 2009: [Persistent West Nile virus infection in the house sparrow \(Passer domesticus\)](#). Arch Virol. 154:783-789.
- Netland J, Bevan MJ. 2013: [CD8 and CD4 T cells in west nile virus immunity and pathogenesis](#). Viruses. 5:2573-2584.
- Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, Vien QM, Bui TC, Le HT, Kutcher S, Hurst TP, Duong TT, Jeffery JA, Darbro JM, Kay BH, Iturbe-Ormaetxe I, Popovici J, Montgomery BL, Turley AP, Zigterman F, Cook H, Cook PE, Johnson PH, Ryan PA, Paton CJ, Ritchie SA, Simmons CP, O'Neill SL, Hoffmann AA. 2015: [Field evaluation of the establishment potential of wMelPop Wolbachia in Australia and Vietnam for dengue control](#). Parasit Vectors. 8:563.
- Niedrig M, Linke S, Zeller H, Drosten C. 2006: [First international proficiency study on West Nile virus molecular detection](#). Clin Chem. 52:1851-1854.
- Niedrig M, Avsic T, Aberle SW, Ferenczi E, Labuda M, Rozentale B, Donoso Mantke O. 2007. [Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections](#). J Clin Virol. 38:260-264.
- Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. 2011: [Usutu virus in Africa](#). Vector Borne Zoonotic Dis. 11:1417-1423.
- Nikolay B, Dupressoir A, Firth C, Faye O, Boye CS, Diallo M, Sall AA. 2013: [Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa](#). Virol J. 10:217.
- Nikolay B. 2015: [A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap?](#) Trans R Soc Trop Med Hyg. 109:609-618.
- OIE 2016: [Japanese Encephalitis](#), Chapter 2.1.10., Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. pp. 6-10.
- OIE 2017: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>
- Ozkul A, Ergunay K, Koysuren A, Alkan F, Arsava EM, Tezcan S, Emekdas G, Hacıoglu S, Turan M, Us D. 2013: [Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses](#). Int J Infect Dis. 17:e546-551.

- Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. 2014: [Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013](#). *Emerg Infect Dis.* 20:2119-2122.
- Panella NA, Young G, Komar N. 2013: [Experimental infection of Eurasian collared-dove \(*Streptopelia decaocto*\) with West Nile virus](#). *J Vector Ecol.* 38:210-214.
- Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, Theocharopoulos G, Chrysagis D, Vassiliadou E, Kamaria F, Liona A, Mellou K, Saroglou G, Panagiotopoulos T. 2010: [Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010](#). *Euro Surveill.* 15:pii: 19644.
- Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. 2011a: [Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010](#). *Emerg Infect Dis.* 17:920-922.
- Papa A, Karabaxoglou D, Kansouzidou A. 2011b: [Acute West Nile virus neuroinvasive infections: cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus](#). *J Med Virol.* 83:1861-1865.
- Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. 2011c: [Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece](#). *Clin Microbiol Infect.* 17:1176-1180.
- Patel H, Sander B, Nelder MP. 2015: [Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: a systematic review](#). *Lancet Infect Dis.* 15:951-959.
- Patel JR, Heldens JG, Bakonyi T, Rusvai M. 2012: [Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control](#). *Vaccine.* 30:1767-1781.
- Patsoula E, Vakali A, Balatsos G, Pervanidou D, Beleri S, Tegos N, Baka A, Spanakos G, Georgakopoulou T, Tserkezou P, Van Bortel W, Zeller H, Menounos P, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. 2016: [West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece \(2010-2013\)](#). *Biomed Res Int.* 2016:2450682.
- Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini A, Tagliazucchi S, Savini G, Monaco F, Simone M, Lelli R, Rumpianesi F. 2009: [First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009](#). *Euro Surveill.* 14. pii: 19446.
- Peiris JS, Gordon S, Unkeless JC, Porterfield JS. 1981: [Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages](#). *Nature.* 289:189-191.
- Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Kaic B, Babic-Erceg A, Merdic E, Medic A, Ljubic M, Pahor D, Erceg M. 2015 [Dengue virus infection in Croatia: seroprevalence and entomological study](#). *New Microbiol.* 38:97-100.
- Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Pandak N, Peric L, Barbic L, Listes E, Cvitkovic A, Stevanovic V, Savini G. 2014: [First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012](#). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14:82-84.
- Pérez-Ramírez E, Llorente F, Del Amo J, Fall G, Sall AA, Lubisi A, Lecollinet S, Vázquez A, Jiménez-Clavero MÁ. 2017: [Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories](#). *J Gen Virol.* 98:662-670.
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. 2016: [Zika Virus](#). *N Engl J Med.* 374:1552-1563.
- Petersen LR, Roehrig JT. 2001: [West Nile virus: a reemerging global pathogen](#). *Emerg Infect Dis.* 7:611-614.
- Petrović T, Blázquez AB, Lupulović D, Lazić G, Escribano-Romero E, Fabijan D, Kapetanov M, Lazić S, Saiz J. 2013: [Monitoring West Nile virus \(WNV\) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia](#). *Euro Surveill.* 18. pii: 20622.
- Pierro A, Gaibani P, Spadafora C, Ruggeri D, Randi V, Parenti S, Finarelli AC, Rossini G, Landini MP, Sambri V. 2013: [Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010-2011](#). *Clin Microbiol Infect.* 19:E451-453.
- Pitisuttithum P, Bouckennooghe A. 2016: [The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection](#). *Expert Rev Vaccines.* 15:795-798.

- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, Yazyshina S, Platonova OV, Obukhov IL, Zhukov AN, Vengerov YY, Pokrovskii VI. 2001: [Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999](#). Emerg Infect Dis. 7:128-132.
- Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. 2008: [Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito \(Diptera: Culicidae\) bionomics](#). Parasitol Res. 103 Suppl 1:S45-53.
- Platonov AE, Karan' LS, Shopenskaia TA, Fedorova MV, Koliashnikova NM, Rusakova NM, Shishkina LV, Arshba TE, Zhuravlev VI, Govorukhina MV, Valentseva AA, Shipulin GA. 2011: [\[Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results\]](#). Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2:29-37.
- Popović N, Milošević B, Urošević A, Poluga J, Lavadinović L, Nedeljković J, Jevtović D, Dulović O. 2013: [Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012](#). Euro Surveill. 18: pii: 20613.
- Popovic N, Milosevic B, Urosevic A, Poluga J, Popovic N, Stevanovic G, Milosevic I, Korac M, Mitrovic N, Lavadinovic L, Nikolic J, Dulovic O. 2014: [Clinical characteristics and functional outcome of patients with West Nile neuroinvasive disease in Serbia](#). J Neurol. 261:1104-1111.
- Prilipov AG, Kinney RM, Samokhvalov EI, Savage HM, Al'khovskii SV, Tsuchiya KR, Gromashevskii VL, Sadykova GK, Shatalov AG, Vyshemirskii OI, Usachev EV, Mokhonov VV, Voronina AG, Butenko AM, Larichev VF, Zhukov AN, Kovtunov AI, Gubler DJ, L'vov DK. 2002: [\[Analysis of new variants of West Nile fever virus\]](#). Vopr Virusol. 47:36-41.
- Putnak R, Porter K, Schmaljohn C. 2003: [DNA vaccines for flaviviruses](#). Adv Virus Res. 61:445-468.
- Pybus OG, Thézé J. 2015: [Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus](#). Curr Opin Virol. 16:1-7.
- Rainey SM, Shah P, Kohl A, Dietrich I. 2014: [Understanding the Wolbachia-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: progress and challenges](#). J Gen Virol. 95:517-530.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. 2000: [Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere](#). Emerg Infect Dis. 6:319-328.
- Ravagnan S, Montarsi F, Cazzin S, Porcellato E, Russo F, Palei M, Monne I, Savini G, Marangon S, Barzon L, Capelli G. 2015: [First report outside Eastern Europe of West Nile virus lineage 2 related to the Volgograd 2007 strain, northeastern Italy, 2014](#). Parasit Vectors. 8:418.
- Reisen WK, Fang Y, Martinez V. 2007: [Is nonviremic transmission of West Nile virus by Culex mosquitoes \(Diptera: Culicidae\) nonviremic?](#) J Med Entomol. 44:299-302
- Reiter P. 2010: [West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future](#). Euro Surveill. 15. pii:19508.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. 2005: [Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells](#). J Virol. 79:4557-4567.
- Rijks JM, Kik ML, Slaterus R, Foppen R, Stroo A, IJzer J, Stahl J, Gröne A, Koopmans M, van der Jeugd HP, Reusken C. 2016: [Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016](#). Euro Surveill. 21: pii: 30391.
- Ritchie S, Devine G. 2016: Conventional vector control: Evidence it controls arboviruses. In: Vasilakis N, Gubner JD (Eds.): Arboviruses, Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press, Norfolk, pp 281-290.
- Roby JA, Setoh YX, Hall RA, Khromykh AA. 2015: [Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins](#). J Gen Virol. 96:1551-1569.
- Roehrig JT. 2003: [Antigenic structure of flavivirus proteins](#). Adv Virus Res. 59:141-175.

- Romoser WS, Wasieloski LP Jr, Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, Ludwig GV. 2004: [Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito \(Diptera: Culicidae\) midgut](#). J Med Entomol. 41:467-475.
- Rosen L, Gubler D. 1974: [The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses](#). Am J Trop Med Hyg. 23:1153-1160.
- Rothman AL. 2003. [Immunology and immunopathogenesis of dengue disease](#). Adv Virus Res. 60:397-419.
- Rothman AL. 2011: [Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms](#). Nat Rev Immunol. 11:532-543.
- Rothman AL, Medin CL, Friberg H, Currier JR. 2014. [Immunopathogenesis Versus Protection in Dengue Virus Infections](#). Curr Trop Med Rep. 1:13-20.
- Rubel F, Brugger K, Hantel M, Chvala-Mannsberger S, Bakonyi T, Weissenböck H, Nowotny N. 2008: [Explaining Usutu virus dynamics in Austria: model development and calibration](#). Prev Vet Med. 85:166-186.
- 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.
- Rudolf I, Bakonyi T, Sebesta O, Mendel J, Peško J, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Nowotny N, Hubálek Z. 2015a: [Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem](#). Parasit Vectors. 8:520.
- Rudolf I, Sebesta O, Straková P, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Seidel B, Tóth S, Hubálek Z, Schaffner F. 2015b: [Overwintering of Uranotaenia unguiculata adult females in Central Europe: A possible way of persistence of the putative new lineage of West Nile virus?](#) J Am Mosq Control Assoc. 31:364-365.
- Russell PK, Brandt WE, Delrymple JM. 1980: Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger RW. (Ed) The Togaviruses: Biology, Structure, Replication, Academic Press, New York, pp. 503-529.
- Saitou N, Nei M. 1987: [The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees](#). Mol Biol Evol. 4:406-425.
- Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. 2007: [Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein](#). Am J Trop Med Hyg. 77:283-290.
- Saluzzo JF. 2003: [Empirically derived live-attenuated vaccines against dengue and Japanese encephalitis](#). Adv Virus Res. 61:419-443.
- Samoilova TI, Votikov VI, Titov LP. 2003: [Virologic and serologic investigations of West Nile virus circulation in Belarus](#). Cent Eur J Public Health. 11:55-62.
- Samuel MA, Diamond MS. 2006: [Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion](#). J Virol. 80:9349-9360.
- Sárdi S, Szentpáli-Gavallér K, Bakonyi T, Szenci O, Kutasi O. 2012: Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelő gyulladása. Irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja, 134:707-717.
- Savage HM, Ceianu C, Nicolescu G, Karabatsos N, Lanciotti R, Vladimirescu A, Laiv L, Ungureanu A, Romanca C, Tsai TF. 1999: [Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes](#). Am J Trop Med Hyg. 61:600-611.
- Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo F, Di Gennaro A, Marini V, Teodori L, Montarsi F, Pinoni C, Piscicella M, Terregino C, Marangon S, Capua I, Lelli R. 2012: [Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy](#). Vet Microbiol. 158:267-273.

- Savini G, Monaco F, Terregino C, Di Gennaro A, Bano L, Pinoni C, De Nardi R, Bonilauri P, Pecorari M, Di Galleonardo L, Bonfanti L, Polci A, Calistri P, Lelli R. 2011: [Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection?](#) Vet Microbiol. 151:264-274.
- Savini G, Puggioni G, DI Gennaro A, DI Francesco G, Rocchigiani AM, Polci A, Marini V, Pinoni C, Rolesu S, Marruchella G, Lorusso A, Monaco F. 2013: [West Nile virus lineage 2 in Sardinian wild birds in 2012: a further threat to public health.](#) Epidemiol Infect. 141:2313-2316.
- Saxena SK, Mathur A, Srivastava RC. 2001: [Induction of nitric oxide synthase during Japanese encephalitis virus infection: evidence of protective role.](#) Arch Biochem Biophys. 391:1-7.
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. 2001: [Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences.](#) J Clin Microbiol. 39:1922-1927.
- Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. 2015: [Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins.](#) PLoS Pathog. 11:e1005277.
- Scherret JH, Poidinger M, Mackenzie JS, Broom AK, Deubel V, Lipkin WI, Briese T, Gould EA, Hall RA. 2001: [The relationships between West Nile and Kunjin viruses.](#) Emerg Infect Dis. 7:697-705.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schoneberg I, Gunther S, Stark K, Frank C. 2010: [Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany.](#) Euro Surveill. 15. pii: 19677.
- Scott TW, Lorenz LH. 1998: [Reduction of Culiseta melanura fitness by eastern equine encephalomyelitis virus.](#) Am J Trop Med Hyg. 59:341-346.
- Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. 2015: [New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection.](#) Nat Rev Immunol. 15:745-759.
- Seino KK, Long MT, Gibbs EP, Bowen RA, Beachboard SE, Humphrey PP, Dixon MA, Bourgeois MA. 2007: [Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile Virus \(WNV\) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model.](#) Clin Vaccine Immunol. 14:1465-1471.
- Shah-Hosseini N, Chinikar S, Ataei B, Fooks AR, Groschup MH. 2014: [Phylogenetic analysis of West Nile virus genome, Iran.](#) Emerg Infect Dis. 20:1419-1421.
- Shroyer DA. 1990: [Venereal transmission of St. Louis encephalitis virus by Culex quinquefasciatus males \(Diptera: Culicidae\).](#) J Med Entomol. 27:334-337.
- Simpson DIH, Lule M. 1964: East African Virus Reserach Institute Report No.14:48.
- Sips GJ, Chesik D, Glazenburg L, Wilschut J, De Keyser J, Wilczak N. 2007: [Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease.](#) Rev Med Virol. 17:223-244.
- Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Rebreanu R, Niedrig M, Nicolescu G, Pistol A. 2011: [Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010.](#) Euro Surveill. 16. pii: 19762.
- Slovák M, Kazimírová M, Siebenstichová M, Ustaníková K, Klempa B, Gritsun T, Gould EA, Nuttall PA. 2014: [Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks.](#) Ticks Tick Borne Dis. 5:962-969.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. 1940: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am J Trop Med Hyg. 20:471.
- Sós E, Molnár V, Dandár E, Bálint Á, Bakonyi T. 2012: [Szerológiai vizsgálatok hazai tüzök- \(Otis tarda\) állományokban.](#) Magyar Állatorvosok Lapja. 134: 361-365.

- Spedicato M, Carmine I, Bellacicco AL, Marruchella G, Marini V, Piscella M, Di Francesco G, Lorusso A, Monaco F, Savini G. 2016: [Experimental infection of rock pigeons \(*Columba livia*\) with three West Nile virus lineage 1 strains isolated in Italy between 2009 and 2012](#). Epidemiol Infect. 144:1301-11.
- Stapleton JT, Fount S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. 2011: [The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C \(HGV\), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae](#). J Gen Virol. 92:233-246.
- Stapleton JT, Bukh J, Muerhoff AS, Fount S, Simmonds P. 2012: Assignment of human, simian and bat pegiviruses (previously described as GBV-A, GBV-C, and GBV-D) as members of a new Genus (*Pegivirus*) within the *Flaviviridae*. Proposal of the International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://ictvonline.org/proposals/2012.011a-dV.A.v2.Pegivirus.pdf>
- 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.
- Straková P, Šikutová S, Jedličková P, Sitko J, Rudolf I, Hubálek Z. 2015: [The common coot as sentinel species for the presence of West Nile and Usutu flaviviruses in Central Europe](#). Res Vet Sci. 102:159-161.
- Styer LM, Kent KA, Albright RG, Bennett CJ, Kramer LD, Bernard KA. 2007: [Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts](#). PLoS Pathog. 3:1262-1270.
- Sugiura T, Shimada K. 1999: [Seroepizootiological survey of Japanese encephalitis virus and Getah virus in regional horse race tracks from 1991 to 1997 in Japan](#). J Vet Med Sci. 61:877-881.
- Suthar MS, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. 2013: [Innate immune sensing of flaviviruses](#). PLoS Pathog. 9:e1003541.
- 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.
- Szentpáli-Gavallér K, Lim SM, Dencső L, Bányai K, Koraka P, Osterhaus AD, Martina BE, Bakonyi T, Bálint Á. 2016: [In vitro and in vivo evaluation of mutations in the NS region of lineage 2 West Nile virus associated with neuroinvasiveness in a mammalian model](#). Viruses. 8. pii: E49.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013: [MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0](#). Mol Biol Evol. 30:2725-2729.
- Tesh RB, Bolling BG, Beaty BJ. 2016: Role of vertical transmission in mosquito-borne arbovirus maintenance and evolution. In: Vasilakis N, Gubner JD (Eds.): Arboviruses, Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press, Norfolk, pp 191-218.
- Thepparit C, Smith DR. 2004: [Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor](#). J Virol. 78:12647-12656.
- Thompson WH, Beaty BJ. 1977: [Venereal transmission of La Crosse \(California encephalitis\) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes](#). Science. 196:530-531.
- Thompson WH, Beaty BJ. 1978: [Venereal transmission of La Crosse virus from male to female *Aedes triseriatus*](#). Am J Trop Med Hyg. 27:187-196.
- Toma T, Miyagi I, Tamashiro M. 2014: [Blood meal identification and feeding habits of *uranotaenia* species collected in the ryukyu archipelago](#). J Am Mosq Control Assoc. 30:215-218.
- Tonry JH, Xiao SY, Siirin M, Chen H, da Rosa AP, Tesh RB. 2005a: [Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters](#). Am J Trop Med Hyg. 72:320-324.

- Tonry JH, Brown CB, Cropp CB, Co JK, Bennett SN, Nerurkar VR, Kuberski T, Gubler DJ. 2005b: [West Nile virus detection in urine](#). *Emerg Infect Dis*. 11:1294-1296.
- Tóth S. 2011: Mosquito fauna of the Mecsek Mountains and its surroundings (SW Hungary). In: Fazekas I. (Ed.): The fauna of the Mecsek Mountains 4. *Acta Nat Pannon* 6:5-112.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. 1998: [West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania](#). *Lancet*. 352:767-771.
- Tsetsarkin KA, Liu G, Shen K, Pletnev AG. 2016: [Kissing-loop interaction between 5' and 3' ends of tick-borne Langat virus genome 'bridges the gap' between mosquito- and tick-borne flaviviruses in mechanisms of viral RNA cyclization: applications for virus attenuation and vaccine development](#). *Nucleic Acids Res*. pii: gkw061.
- Vaidyanathan R, Scott TW. 2006: [Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection](#). *Apoptosis*. 11:1643-1651.
- van der Most RG, Corver J, Strauss JH. 1999: [Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein](#). *Virology*. 265:83-95.
- van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. 2008: [Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells](#). *PLoS Pathog*. 4:e1000244
- Varga J, Tuboly S, Mészáros J. 1998: [A háziállatok fertőző betegségei \(Állatorvosi járványtan II\)](#) Mezőgazda Kiadó pp 25-28.
- Varga J, Fodor L. 2003: [Nyugat-nílusi láz: Szemleciikk](#), *Magyar Állatorvosok Lapja* 125: 451-457.
- Vázquez A, Ruiz S, Herrero L, Moreno J, Molero F, Magallanes A, Sánchez-Seco MP, Figuerola J, Tenorio A. 2011: [West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009](#). *Am J Trop Med Hyg*. 85:178-181.
- Vázquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, Magallanes A, Tejedor CG, Tenorio A. 2010: [Putative new lineage of west nile virus, Spain](#). *Emerg Infect Dis*. 16:549-552.
- Venter M, Myers TG, Wilson MA, Kindt TJ, Paweska JT, Burt FJ, Leman PA, Swanepoel R. 2005: [Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence](#). *Virology*. 342:119-140.
- Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, Pem-Novosel I, Slavic-Vrzic V, Lesnikar V, Kurecic-Filipovic S, Babic-Erceg A, Listes E, Stevanovic V, Gjenero-Margan I, Savini G. 2014: [First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak](#). *Infection*. 42:689-695.
- Villordo SM, Carballeda JM, Filomatori CV, Gamarnik AV. 2016: [RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation](#). *Trends Microbiol*. 24:270-283.
- Voßmann S, Wieseler J, Kerber R, Kümmerer BM. 2015: [A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production](#). *J Virol*. 89:4951-4965.
- Watson GE, Shope RE, Kaiser MN. 1972: An ectoparasite and virus survey of migratory birds in the eastern Mediterranean. In: Cherepanov IA, (Ed.): *Transcontinental Connections of Migratory Birds and their Role in the Distribution of Arboviruses*. Nauka, Novosibirsk, Russia. pp. 176-180.
- Weingartl HM, Drebot MA, Hubálek Z, Halouzka J, Andonova M, Dibernardo A, Cottam-Birt C, Larence J, Marszal P. 2003: [Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum](#). *Can J Vet Res*. 67:128-132.
- Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. 2002: [Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe](#). *Emerg Infect Dis*. 8:652-656.

- Weissenböck H, Kolodziejek J, Fagner K, Kuhn R, Pfeffer M, Nowotny N. 2003: [Usutu virus activity in Austria, 2001-2002](#). *Microbes Infect.* 5:1132-1136.
- 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.
- Weissenböck H, Chvala-Mannsberger S, Bakonyi T, Nowotny N. 2007: Emergence of Usutu virus in central Europe: diagnosis, surveillance and epizootiology. In: Takken W, Knols B (Eds.): *Emerging pests and vector-borne disease in Europe*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp 153-168.
- Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. 2013: [Usutu virus, Italy, 1996](#). *Emerg Infect Dis.* 19:274-277.
- Wheeler SS, Langevin SA, Brault AC, Woods L, Carroll BD, Reisen WK. 2012b: [Detection of persistent west Nile virus RNA in experimentally and naturally infected avian hosts](#). *Am J Trop Med Hyg.* 87:559-64.
- Wheeler SS, Vineyard MP, Woods LW, Reisen WK. 2012a: [Dynamics of West Nile virus persistence in House Sparrows \(*Passer domesticus*\)](#). *PLoS Negl Trop Dis.* 6:e1860.
- WHO 1967: [Arboviruses and human disease. Report of a WHO Scientific Group](#). World Health Organ Tech Rep Ser. 369:1-84.
- WHO 2015: Fact sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- Williams JH, van Niekerk S, Human S, van Wilpe E, Venter M. 2014: [Pathology of fatal lineage 1 and 2 West Nile virus infections in horses in South Africa](#). *J S Afr Vet Assoc.* 85:1105.
- Williams MC, Simpson DI, Haddow AJ, Knight EM. 1964: [The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* \(theobald\) in the Entebbe area of Uganda](#). *Ann Trop Med Parasitol.* 58:367-747.
- Wodak E, Richter S, Bagó Z, Revilla-Fernández S, Weissenböck H, Nowotny N, Winter P. 2011: [Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009](#). *Vet Microbiol.* 149:358-366.
- Woodall JP. 1964: The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc E Afr Acad II:* 141-146.
- Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. 2013: [The pathogenesis of dengue](#). *Curr Opin Infect Dis.* 26:284-289.
- Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. 2013: [Immune evasion strategies of flaviviruses](#). *Vaccine.* 31:461-471.
- Yu L, Takeda K, Markoff L. 2013: [Protein-protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells](#). *Virology.* 446:365-377.
- Yu XJ, Tesh RB. 2014: [The role of mites in the transmission and maintenance of Hantaan virus \(*Hantavirus: Bunyaviridae*\)](#). *J Infect Dis.* 210:1693-1699.
- Zeller HG, Schuffenecker I. 2004: [West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas](#). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23:147-156.
- Zhang M, Zheng X, Wu Y, Gan M, He A, Li Z, Liu J, Zhan X. 2010: [Quantitative analysis of replication and tropisms of Dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*](#). *Am J Trop Med Hyg.* 83:700-707
- Ziegler U, Fast C, Eiden M, Bock S, Schulze C, Hoepfer D, Ochs A, Schlieben P, Keller M, Zielke DE, Luehken R, Cadar D, Walther D, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. 2016: [Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany](#). *Vet Microbiol.* 192:60-66.
- Zink SD, Van Slyke GA, Palumbo MJ, Kramer LD, Ciota AT. 2015: [Exposure to West Nile Virus Increases Bacterial Diversity and Immune Gene Expression in *Culex pipiens*](#). *Viruses.* 7:5619-5631.
- Zöldi V, Juhász A, Nagy C, Papp Z, Egyed L. 2013: [Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary: the epidemiological situation between 1998 and 2008](#). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13:256-265.

Köszönetnyilvánítás

A flavivírusokkal kapcsolatos kutatásokat széleskörű hazai és nemzetközi kutatási együttműködésben végeztem. A legtöbb köszönettel 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 Emőkét (OEK), aki a nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos kutatásaink kezdetétől példa értékű nyitottsággal, lelkesedéssel és segítőkészséggel vett részt a munkában. A laboratóriumi vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségért tanszéki kollégáimnak, dr. Forgách Petrának, Somhegyiné Barna Mónikának, dr. Tapaszi Zsuzsannának, Kojnok Ádámnának, Stoll Gyulánának, 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 ló-minták gyűjtésében nyújtott segítségért dr. Csörgő Tibornak, Halmos Gergőnek, dr. Sós Endrének, dr. Molnár Viktornak, dr. Harrach Balázsnak, 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.