

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Egy igazolt kullancsencefalitisz góc 4 éves
terepi kutatása és kapcsolódó
járványtani elemzések, laboratóriumi vizsgálatok**

PhD értekezés tézisei

Zöldi Viktor

2015

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Dr. Egyed László
MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet

.....
Zöldi Viktor

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

A *Flaviviridae* családba tartozó kullancsencefalitisz vírus (KEV) által okozott zoonózis a leggyakoribb vírus okozta, és kullancsok által terjesztett betegség Közép-Európában. A kórokozó eurázsiai elterjedésű, Franciaország keleti határától a Japán szigetekig széles sávban előfordul. Elterjedési területén nem egyenletes gyakorisággal okoz megbetegedéseket. Olyan régiókban, ún. természeti góccokban a leggyakoribb, ahol az átvitel szempontjából kedvező feltételek adóttak, azaz nagy számban fordul elő a vírust fenntartani és terjeszteni képes kullancs, valamint a kullancsok számára alkalmas gazdaként, a vírus számára pedig rezervoárként szolgáló állatfajok.

A vírus egyik fontos vektora a Magyarországon is gyakori közönséges kullancs (*Ixodes ricinus*). A fertőzés jellemzően a kullancs vérszívása során történik, de a KEV heveny fertőzés állapotában lévő kórokozó nyersen fogyasztott tejével is terjedhet. Magyarországon a vírus fő rezervoárja a sárganyakú erdeiegér (*Apodemus flavicollis*) és a vöröshátú erdeipocok (*Myodes glareolus*).

Emberben a klinikai tünetek lázzal, fejfájással, elesettséggel járnak, az idegrendszeri gyulladás általában jóindulatúan zajlik le. A fertőzötteknek csak nagyjából 10-25%-ánál alakul ki betegség, közülük kórházi ellátásra csak azok szorulnak, akiknél az idegrendszeri tünetek is kialakulnak. Az esetek kis hányada, 1-2%-a végződik tartós bénulással vagy halállal.

A kullancsencefalitisz (KE) Európa 27 és Ázsia 6 országában endémiás. A regisztrált klinikai megbetegedések gyakorisága 1990 és 2009 között, 19 állam, köztük Oroszország összesített adatai alapján, évi 5352 és 12 733 új eset között alakult. A betegség Magyarországon 1972 óta bejelentésre kötelezett, kezdetben „encephalitis infectiosa”-ként regisztrálták, 2001-től pedig önálló kórképként tartják nyilván. A hazai fertőzőbeteg-jelentő rendszer adatai alapján a bejelentett és igazolt megbetegedések száma az 1985-1996 közötti évi átlag 262 esetről az 1997-2008 közötti időszakban – hirtelen váltással – évi átlag 68 esetre csökkent.

A KE-t az utóbbi években Európa-szerte intenzíven kutatják az endémiás területeken. A dokumentált esetek epidemiológiai elemzésének, valamint a vírusátvitelt és a fertőződési kockázatot befolyásoló tényezők vizsgálatának egyaránt széles az irodalma. A kutatásoknak új lendületet adott az a felfedezés, hogy a vektor elterjedési területe az utóbbi évtizedekben bővült, és a korábban nem ismert élőhelyein vele együtt megjelent vagy megjelenhet a vírus is. A közönséges kullancs elterjedésében tapasztalt változások, valamint a megnövekedett fertőzési kockázat összefügghet bizonyos társadalmi-szociális változásokkal, valamint a klímaváltozással is.

A hazánkban 1952 és 1981 között, Molnár Erzsébet irányításával zajlott KE góc-kutatás eredményeként 60 különböző vírustörzset sikerült izolálni (táplálékkereső kullancs nimfákból, kisemlős rezervoárokból, valamint elhunyt személyből egyaránt). A vizsgált kullancsok között a

vírushordozók aránya 0,5‰ volt. Ennek a munkának azóta nem volt folytatása Magyarországon. Sem új vírusizolátummal nem rendelkezünk, sem a vírus kullancsokban megfigyelhető előfordulási gyakoriságáról nincsenek új adataink. A rutin adatgyűjtés révén rendelkezésre álló megbetegedési adatok mélyebb elemzésére a '90-es évek vége óta csupán egy-egy tej közvetítette KE járvány kapcsán került sor.

A KE részletesebb hazai vizsgálata a fentiek ismeretében indokolt. Vizsgálatunk alapja egy földrajzilag pontosan azonosított vírusgóc, ahonnan 2007-ben egy kecsketej közvetítette KE járvány indult ki. E természetes góc 4 éven keresztül tartó felmérő vizsgálata során **célkitűzéseink az alábbiak voltak:**

- a) A gócterületen előforduló kullancsok és rágcsálók rendszeres, áprilistól októberig havonként szervezett kiszállásokon történő gyűjtése. Alapvető meteorológiai adatok (hőmérséklet, csapadék) feljegyzése.
- b) A kullancsok faj és stádium szerinti meghatározása, a rágcsálók élve csapdázása, majd egyedi jelölést és szemzúgból történő vérvételt követő visszaengedése. A fajképlet és a szezonális meghatározása.
- c) A kullancsok laboratóriumi feldolgozása KEV-izolálási kísérlet céljából. A kisemlősök KE szeropozitivitásának meghatározása.
- d) A KEV izolálása.
- f) A természeti góc leírása, jellemzése, dinamikájának vizsgálata, a fenti adatok segítségével.

A kullancsencefalitisszel kapcsolatos ismeretek további bővítése érdekében a gócvizsgálat kiegészítéseként célul tűztük ki az alábbiakat is:

- g) A rendelkezésre álló, rutinszerűen gyűjtött járványügyi adatok epidemiológiai elemzése, különös tekintettel a betegség előfordulására jellemző térkomponens vizsgálatára, valamint a hazánkban korábban feltárt alimentáris járványok tanulmányozására.
- h) Az *Ixodes ricinus* 24 órás táplálékkereső aktivitásának vizsgálata.
- i) Szöveti és szerológiai módszerrel megvizsgálni a vírus által vadon élő rágcsálófajban kiváltott fertőzés jellegzetességeit, a rezervoár szerep jobb megértése érdekében.

2. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

1. A fertőzőbeteg-jelentő rendszer megbetegedési adatainak elemzése

Az incidencia elemzéséhez használt, 1998 és 2008 közötti megbetegedési adatok az Országos Epidemiológiai Központ archívumából, illetve a fertőzőbeteg-jelentő rendszerből, a népességi adatok a Közigazgatási és Elektronikus Közszolgáltatások Központi Hivatalának nyilvántartásából származtak. Az incidencia **időbeli** alakulásának vizsgálatakor a direkt standardizálás módszerével számított standardizált incidencia arányszámokat (SIA) 100 000 lakosra vonatkoztatva használtuk. Az esetszámok kor és nem szerinti megoszlását 0-4 éves korig évenként, 4 éves kor felett 5 éves korcsoportokra vonatkozóan adtuk meg. A szezonális vizsgálatakor az éves morbiditást naptári hetenként adtuk meg. Az incidencia **területi** egyenlőtlenségeinek település szintű elemzése – a kis esetszámokból eredő bizonytalanság csökkentését szolgáló – hierarchikus Bayes-beccsléssel (HBB) simított indirekt standardizált incidencia hányadosok (SIH) alkalmazásával történt. Az ökológiai vizsgálatban a magyar lakosság KE és Lyme-borreliózis (LB) incidenciájának területi egyenlőtlenségei és a „magaslati” (150 méteres tengerszint feletti magasság fölött elterülő) erdőtől való távolság közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Ehhez χ^2 -homogenitás tesztet és χ^2 -linearitás trendvizsgálatot végeztünk.

A **tej-közvetítette** KE járványok elemzésénél minden olyan, 1953 és 2011 között ismertté vált KE járvány, illetve egyedi vírusátvitel adatát bevontuk, amelyeknél a betegséget laboratóriumi módszerrel igazolták, és amelyek kórelőzményében a járványügyi vizsgálat nyers tej és/vagy tejtermék fogyasztásának lehetőségét tárta fel.

Az adatok rendezését a Microsoft® Office Excel 2003 szoftverével végeztük. A térepidemiológiai vizsgálat elvégzésekor az ArcGIS térinformatikai rendszer kiterjesztéseként működő Rapid Inquiry Facility (RIF 3.2) szoftvert használtuk. A domborzati modell elkészítéséhez az ArcGIS 9.3 rendszert használtuk.

2. A kullancsencefalitisz góc vizsgálata

A terepi gyűjtéseket a Zala megyei Lakhegy település határában végeztük. A **gyűjtőterület** egykor szilvafa ültetvény volt, művelésével munkánk megkezdése előtt 20-25 évvel felhagytak. Miután előzetesen sikerült a vírusfertőzöttséget a kistrágyásokban kimutatnunk, kijelöltünk egy mintavételi területet (1-es gyűjtőhely), amelynek közepét egy, vadászok által létesített, de már nem használt vadetető hely képezte. Az 1-es területet felosztottuk 49 mintavételi egységre, amelyeket az egykori gyümölcsfa sorok között, 7 sorban jelöltünk ki, soronként 7-7 egységgel. Minden mintavételi egység 10x10 méteres, négyzet alakú volt, oldalukkal egymáshoz érintkezve egy 0,49 hektár méretű területet fedtek le. Ettől a területtől 177 méterre egy második mintavételi területet (2-es gyűjtőhely) is kijelöltünk, mivel 2010-ben, munkánk kezdetének évében itt is kialakításra került egy vadetető hely.

A terület **klimatikus jellemzőinek** rögzítése céljából felírtuk a legközelebbi (zalaegerszegi) meteorológiai mérőállomás által mért napi minimum, illetve maximum hőmérsékletet, valamint a napi csapadékmennyiséget. Ennek kiegészítéseként 2012-től két Tinytag Plus-2 mérőműszert is elhelyeztünk az 1-es gyűjtőhelyen, a léghőmérséklet és a páratartalom mérésére.

A **kullancsgyűjtést** dragging-módszerrel, 1 m² felületű, fehér lepedőanyagot használva végeztük. Minden mintavételi egységben kiszállásonként 5, egyenként 2 méter hosszúságú húzást hajtottunk végre. A faj és stádium azonosítását sztereomikroszkóppal végeztük. A kullancsokból csoportokat (pool-okat) képeztünk, kettős céllal. Biztosítani szerettük volna a vizsgálatok kullancs elemszámának kezelhetőségét, illetve az esetleges pozitív minták helyhez (mintavételi egységhez) kötését. A csoportosított egyedeket steril porcelán dörzsmozsárban eldörzsolgtük, majd a dörzsoléket steril foszfát-pufferben (PBS) szuszpendáltuk. A szuszpendáláshoz lárvák és nimfák esetén 200 µl, adultok esetén 400 µl PBS-t használtunk. Ebből az oldatból 20 µl-t oltottunk intrakraniálisan 5-7 napos, szopós NMRI egér agyába, a vírus jelenlétének kimutatása céljából. Az egereket 3 héten keresztül naponta megfigyeltük és esetleges klinikai tüneteket feljegyeztük.

A **kisemlősöket** élvefogó fa ládacsapdával fogtuk be. Minden mintavételi egység közepén elhelyeztünk 1-1 felcsalizott csapdát, és kint hagytuk két éjszakára. A csapdákat naponta kétszer ellenőriztük. Az állatok testtömegét rugós mérővel megmértük. Az első befogás alkalmával minden állatot egyedi jelöléssel láttunk el. A 17 grammnál nagyobb testtömegű, adult példányok retroorbitális szinuszából üvegkapilláris segítségével 200-400 µl-nyi teljes vért vettünk le, majd a csapdájukba visszahelyeztük azokat. A rágcsálókat a befogás helyére visszavittük és szabadon engedték, majd a csapdákat újra aktiváltuk. A vérmintákat 10 órán át 4 °C-on inkubáltuk, majd 1 percen át, 11 000-es fordulatszámú asztali centrifugával lecentrifugáltuk, végül a felülúszót leválasztottuk és fagyaszttva tároltuk. A vérsavókat hűtőtáskában a laborba szállítottuk, ahol azokat a tesztelésig -70 °C-on tartottuk. A KEV-specifikus ellenanyagokat vírusneutralizációs teszttel kíséreltük meg kimutatni. Tíz µl higítatlan rágcsáló mintasavót 96 lyukú lapos aljú szövettenyésztő lemezen összekevertünk, 10 µl térfogatban, 50 plakkformáló egységnyi KE vírussal (amely a lakhegyi 1-es gyűjtőhelyen 2011-ben fogott *I. ricinus* nimfákból származott), majd a lemezeket 37 °C -on, CO₂ termosztátban inkubáltuk, egy órán át. Ezután 10³ N2a neuroblasztóma sejtet (ezen titráltuk a vírust is) adtunk 200 µl térfogatban a lyukakhoz. A sejteket DMEM-HG tápfolyadékban, 10% fetal borjúsavóval, penicillin-streptomycin antibiotikumokkal tenyésztettük. Lemezenként 2-2 pozitív (vírussal fertőzött) és negatív (vírus nélküli) kontroll lyukat is hagytunk. Egy hét után értékeltük az eredményt, a nem neutralizálódott KE vírusok ez idő alatt az összes, tenyészetükben levő sejtet elpusztították, mely folyamatot a sejtek lekerekedése, alapról való leválása, szétesése, membránjuk szakadozottá válása jelzett.

3. Kullancsok táplálékkereső aktivitásának 24 órás vizsgálata

A vizsgálati területet a fent leírt, felhagyott gyümölcsösben helyezkedett el. Az egykori fasorok között, 24, egyenként 5x5 méteres mintavételi egységet jelöltünk ki. 2012. év áprilisa és októbere között (a hónap 5. és 15. napja közt) a vizsgálati területen havonta, 24 órán keresztül, óránkénti

ismétléssel végeztünk kullancsgyűjtést. A gyűjtést dragging-módszerrel, minden egységben alkalmanként 10 húzással, az adott mintavételi egység teljes felületén, 25 m²-en hajtottunk végre. A kullancsok begyűjtését, tárolását és azonosítását a fent leírtak szerint végeztük. A kijelölt területen 21 (3x7) élvefogó ládacsapdát is kihelyeztünk. Ezeket minden órában, a kullancsgyűjtéseket követően ellenőriztük. Adataik rögzítése után a rágcsálók a befogás helyén szabadon engedték, majd a csapdákat újra aktiváltuk. Óránként, a kullancsgyűjtésekkel párhuzamosan, a mintavételi egység szélén, a talajszinten, TESTO 605 H1 meteorológiai mérőeszközzel megmértük a páratartalmat és hőmérsékletet. A napfelkelte és napnyugta adatokat az Országos Meteorológiai Szolgálat honlapjáról jegyeztük fel, a területünkkel azonos hosszúsági fokon fekvő Szombathely adatait alapul véve.

4. Kullancsencefalitisz vírus-fertőzés dózis-függésének vizsgálata

NMRI laboregereket és egy vadonélő egérfaj (*A. agrarius*) egyedeit fertőztünk orálisan és intramuszkulárisan a KEV különböző mennyiségeivel. Összesen kilenc fertőző dózist alkalmaztunk: 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1, 10, 10², 10³ és 1500 plakkformáló egységnek megfelelő mennyiségeket. A dózisokat saját elővizsgálataink alapján határoztuk meg. Mindkét egérfajból 2-2 egyedat alkalmaztunk ezen hígítások száján át, illetve izomba történő beoltására. Így a kísérletben mindkét fajból 36-36 egyed alkalmazására került sor. Annak érdekében, hogy a vírus patogenezisét még az immunválasz kialakulása előtt tanulmányozzuk, a fertőzést követő 7. napon mindkét faj két-két, az adott dózissal fertőzött egyedét CO₂-kamrában feláldoztuk. A túlaltatás előtt vért vettünk a későbbi szerológiai vizsgálatokhoz. A klinikai tüneteket naponta feljegyeztük. A fertőzéseket a lakhegyi 1-es gyűjtőhelyen 2011-ben fogott *I. ricinus* lárvákból izolált KEV törzsszel végeztük. A vírus titrálását N2a neuroblasztóma sejteken végeztük.

Az **immunhisztokémiai festéshez** a szöveti metszetek sorozatát deparaffináltuk, majd inkubáltuk, először mikrohullámú sütőben 750 Watton, 20 percen át citrát pufferoldatban (pH = 6,0), majd szobahőmérsékleten, 10 percen keresztül, 3%-os H₂O₂-oldatban, végül pedig további 2 percig 2%-os tejpor oldatban. A metszeteket egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk KEV-specifikus ellenanyagban, amelyhez Matthias Niedrieg szíves segítségével jutottunk hozzá. A színreakciót ARK Animal Research kit HRP-vel végeztük el. A háttérfestéshez Mayer-féle hematoxilint használtunk, a metszeteket glicerol-zselatinnal, majd fedőlemezzel fedtük, és 200-szoros nagyításban vizsgáltuk.

A **vírusneutralizációs próbát** 100 plakkformáló egységnyi vírussal, a fentiekkel azonos módon végeztük. Az eredményt egy hét után, a sejtkárosító hatás alapján értékeltük. Kétes citopatogén hatás esetén kísérleti állatoltással bizonyítottuk az élővírus jelenlétét vagy hiányát.

3. EREDMÉNYEK

1. A fertőzőbeteg-jelentő rendszer megbetegedési adatainak elemzése

A hazai fertőzőbeteg-jelentő rendszerben 1998 és 2008 között mindösszesen 703 KE esetet rögzítettek, amely éves átlagban 64 megbetegedés. Ezen időszakban a KE incidencia egy w-alakú görbével volt jellemezhető, relatív minimumokkal 2000-ben és 2005-ben. Az esetek döntő többségénél a **megbetegedés kezdete** a 17. és 34. naptári hét (április utolsó és augusztus utolsó hete) közé esett, ezen belül a 23. és 26. hét közötti (júniusi) halmozódással. A KE esetében (szemben a LB-sal) egy második, kisebb őszi csúcs is megfigyelhető volt. A KE esetek több mint kétharmadát (478 eset, 68%) férfiak körében jelentették, és mindössze 225 esetet (32%) regisztráltak nők körében (összehasonlításként: a LB-nál enyhe, 53%-os női többletet tapasztaltunk az esetek között). Az esetek korcsoport-specifikus **megbetegedési arányszámai** ennek megfelelően minden korcsoportban a férfiaknál voltak magasabbak, és különösen a 2-4, a 35-39 és a 45-49 éves korcsoportoknál voltak kiugróak ezek az értékek. (Egészen más megoszlást tapasztaltunk a LB-nál: itt a 45-64 éves nők, valamint a 2-9 éves gyermekek megbetegedési arányszámai voltak kiugróan magasak). A hierarchikus Bayes-bebecsléssel simított indirekt standardizált incidenciák eloszlása határozott **területi egyenlőtlenséget** mutatott. Szignifikánsan magasabb KE megbetegedési kockázatú területeket lehetett megfigyelni hazánk délnyugati részén, valamint az északi határsáv középső szakaszán. Azon települések KE incidenciájának arányszáma, amelyek 200 méteres tengerszint feletti területek el, 10,93-szoros (95%-os megbízhatósági tartomány = [9,39-12,75]) volt azon településekéhez képest, amelyek 114 méteres tengerszint feletti magasság alatt helyezkedtek el. A középső övben (140 < tengerszint feletti magasság ≤ 155) lévő települések arányszáma KE esetében az országos incidenciáéval átlagnál valamivel magasabb érték (LB esetében ahhoz közeli érték) volt. A **kockázatbecslés** eredményei mindkét betegségénél erős összefüggést mutattak a megbetegedéssel kapcsolatos kockázat és a „magaslati” (150 méternél magasabban elterülő) erdőktől számított távolság között (KE: $\chi^2_{\text{Homogenitás}} = 862,29$, $p = 0$, $\chi^2_{\text{Linearitás}} = 841,59$, $p = 0$; LB: $\chi^2_{\text{Homogenitás}} = 1463,49$, $p = 0$, $\chi^2_{\text{Linearitás}} = 1427,89$, $p = 0$). A két betegséggel kapcsolatos megbetegedési kockázat csökkenő tendenciát mutatott a magaslati erdőktől való távolság növekedésével.

Magyarországon az 1953 és 2011 közötti időszakban 15 olyan esztendő volt, amikor **élelmiszer-eredetű** KE fertőzés ismertté vált. Összesen 27 önálló fertőzési esemény került azonosításra, amelyek közül 9 (33%) sporadikus, 15 (56%) családi kiterjedésű volt, 3 (11%) pedig ennél nagyobb csoportot érintett. Az összes esetszám a vizsgált időszakban 111-nek adódott. Az esetek szezonálisága, területi megoszlása és a nem szerinti megoszlás jellegzetességei (55,1%-os férfi dominancia) egybeestek a direkt kullancscsípéssel kialakult fertőzések elemzése kapcsán találtakkal. Az élelmiszer-eredetű esetek közül azok eloszlása, amelyek forrása nyers kecsketej volt (a 27-ből 24 fertőződési esemény), a kecskeállomány alakulásával nem mutatott összefüggést.

2. A kullancsencefalitisz góc vizsgálata

Az **1-es területen** összesen 7247 kullancsot gyűjtöttünk, és három fajt (*Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* és *Dermacentor reticulatus*) mutattunk ki. A gyűjtött kullancsok 84,6%-a közönséges kullancs (*I. ricinus*) volt, főként annak ivaréretlen fejlődési stádiumai (38,3% lárva, 54,0% nimfa). Az egyes évek között e fajok szezonális változása változott, de például az *I. ricinus* esetében 2011-12-ben jellegzetes nimfahalmozódást figyeltünk meg tavasszal (április és június között), valamint ősszel (szeptember-októberben), míg a lárvák tömegessége nyárra (augusztusra) tevődött. 2010-ben az időjárásból adódó gyűjtési nehézség torzította a gyűjtési adatokat. Itt 541 kistrágsálót csapdázunk és négy fajt (*Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Myodes glareolus* és *Microtus subterraneus*) mutattunk ki. A fogásszám 78 és 165 /év/0,5 hektár érték között változott. Az egyes években a fajok relatív gyakorisága változott. A vöröshátú erdeipockot (*M. glareolus*) a 2. évben, 2011-ben figyeltük meg először. A 2-3. évben egyaránt 6% körüli gyakorisággal fordult elő, majd a 4. évben az összes fogott kisemlős közel negyedét (23%-át) tette ki. A visszafogási arány (vagyis hogy az előző évben fogott és megjelölt állatok hány százalékát tudtuk visszafogni a következő évben) 1,3-7,3% közötti volt.

A **KE vírust 3 alkalommal sikerült izolálnunk** a gyűjtött 7247 kullancsanyag pool-jaiból. Pozitívnak találtuk a következő pool-okat: 51 db *I. ricinus* lárva (2011 augusztusa), 10 db *I. ricinus* nimfa (2012 májusa), valamint 10 db *H. concinna* nimfa (2012 júliusa). Utóbbi faj KEV-pozitivitását az irodalomban elsőként mutattuk ki. Azon mintavételi egységek, ahol a három különböző időpontban pozitív kullancsokat gyűjtöttünk, nem estek egybe, de egymástól kb. 20 méter távolságban voltak.

A **megvizsgált 539 savó közül** 28-at (5,19%) találtunk a vírusra szeropozitívnak. A vöröshátú erdeipockok szeropozitivitása (20,5%) 5,5-szerese volt a csapdázott sárganyakú erdeiegeknek (3,7%), illetve 4,5-szerese a pírók erdeiegeknek (4,6%) szeropozitivitásának. A *M. glareolus*, illetve a két egérfaj szeropozitivitása közti különbség szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,0004$ az *A. flavicollis* és $p = 0,0027$ az *A. agrarius* esetében). A hím, illetve nőstény *A. agrarius* és *M. glareolus* egyedek szeropozitivitása nem különbözött számottevően, ugyanakkor az *A. flavicollis*-oknál 4,5-szer több szeropozitív nőstényt, mint hímeket találtunk. A két érték (6,7% és 1,5%) közötti különbség nem volt szignifikáns. Szignifikáns különbséget ($p = 0,0117$) találtunk viszont az adult ($n = 366$) és a szubadult ($n = 175$) rágcsálók szeropozitivitása között (6,8% és 1,7%). Azon mintavételi egységek, amelyekből sikerült vírust izolálnunk, illetve amelyekben szeropozitív rágcsálót csapdázunk, nem estek egybe.

A **2-es területen** kevesebb kullancsot (2369 egyed) és kistrágsálót (375 egyed) gyűjtöttünk, mint az 1-es területen. A rágcsálók szeropozitivitása is alacsonyabb (4,93%) volt, vírust pedig nem tudtunk izolálni a kullancsokból.

A **két terület** szeroprevalencia értékei közötti különbség nem volt szignifikáns (χ^2 -teszt: $p = 0,7487$). A szubadult *I. ricinus* stádiumok szezonális maximuma és a szeropozitivitás kimutathatósága a rágcsálók körében időben átfedett.

3. Kullancsok táplálékkereső aktivitásának 24 órás vizsgálata

A 7 kiszálláson 1063 *I. ricinus*-t (408 lárvát, 598 nimfát, 34 nőstényt, 23 hímét) gyűjtöttünk, és 28 alkalommal sikerült kistrágcslót csapdáznunk. A rágcsálófogások 71,4%-a a nap első 6 órájára (23:20-05:20 óra közé) esett. Áprilistól októberig azt tapasztaltuk, hogy a táplálékkereső nimfák aktivitása a **napkelte utáni** 3 órában fokozódik, összevetve a napkelte előtti 3 óras időszakkal. A különbség szignifikánsnak bizonyult (páros t-próba: $p = 0,022$). Összehasonlítottuk a **napnyugta előtti és utáni** 3 órára eső nimfák számát is. A kereső aktivitás április-májusban a napnyugta előtt volt domináns, ez júniusra kiegyenlített, majd július-augusztus-szeptemberben átváltott a napnyugta utáni órákra, végül októberben ismét kiegyensúlyozott volt a két intervallumban. A következő arányszámot képeztük minden hónapra: a napnyugtát követő 3 órában gyűjtött nimfák száma / a napnyugta előtti és utáni 3-3 órában fogott nimfák száma. Az így képzett arányszám statisztikai összefüggést (pozitív korrelációt) mutatott az adott havi kiszálláson fogott rágcsálók számával. Az *I. ricinus* nimfák tavasztól nyár elejéig jellemző naplemente előtti aktivitása július-szeptemberben (amikor a legtöbb rágcsálót csapdáztuk) átváltott éjszakai aktivitásra. A Pearson-féle korrelációs együttható értéke 0,81 volt, az összefüggés szignifikánsnak bizonyult (Pearson-féle korreláció: $p = 0,026$). Áprilistól júliusig a lárvák és nimfák nagyobb nappali kereső aktivitást mutattak, majd augusztus-szeptemberben azt éjszakai dominancia jellemezte, míg októberben a két intervallum részesedése kiegyenlített volt. Ezek a változások mind a lárvák, mind a nimfák vonatkozásában szignifikánsnak bizonyultak (Pearson-féle Khí-négyzet próba: $p < 0,0001$).

4. Kullancsencefalitisz vírus-fertőzés dózis-függésének vizsgálata

A klinikai tünetek (lelassult mozgás, remegés, gubbasztás) csak az NMRI laboregérben voltak észrevehetőek, mind az orálisan, mind az intramuszkulárisan oltott csoportban. A fertőzött pirók erdeiegegek egyike sem mutatott klinikai tüneteket. **Intramuszkuláris fertőzéssel** az NMRI laboregérben a nagyagy szürkeállománya és az agytörzs idegsejtjeiben, valamint a vékonybél ganglionjaiban tudtuk kimutatni a vírusspecifikus antigént. Szöveti lézióknak hematoxin-eozin festéssel nem találtuk nyomát. Az *A. agrarius* esetében nem volt kimutatható az antigén, és nem találtunk szövettani elváltozásokat sem. **Orális fertőzéssel** az NMRI laboregereknél az agy minden területén nagyszámú fertőzött sejtet mutattunk ki az immunhisztokémiai festéssel, továbbá néhány fertőzött sejtet azonosítottunk a gyomor és a vékonybél ganglionjaiban, a fertőzött állatok mindegyikében. Szöveti lézióra utalt a közepagyban megfigyelt akut gócos lágyulás. Az idegsejtek száma lecsökkent, citoplazmájuk többnyire vakuolizált volt, és limfo-hisztociták beszűrődés is jelentkezett. A többi parenchimaszervben nem voltak megfigyelhetőek szövettani elváltozások. Az *A. agrarius* orális fertőzését követően először mutattunk ki antigént az agyban. Megfigyelhető volt a szaglólagymában és az elülső szaglómagban lévő néhány ideg- és gliasejt érintettsége, valamint az e területekre korlátozódó limfo-hisztociták érgyulladás. Néhány specifikusan festődő ideg- és gliasejt volt látható a nukleusz kaudátusz és a putamen területén, amely enyhe limfo-hisztociták érgyulladással egészült ki, továbbá az agytörzs területén idegsejt nekrozist és gliasarjadást figyeltünk meg. A többi szervben szövettani léziók nem voltak megfigyelhetőek.

5. Új tudományos eredmények

A négy éven keresztül terepen és laboratóriumban végzett vizsgálatokból nyert eredmények értékelése alapján az alábbi új tudományos eredmények fogalmazhatóak meg.

1. Első alkalommal vizsgáltuk párhuzamosan, összehasonlító jelleggel a bejelentett hazai KE és LB eseteket, települési szinten, az 1998 és 2008 közötti évekre vonatkozóan. Ennek során térinformatikai módszerekkel:
 - azonosítottuk a két betegség legfontosabb kockázati területeit;
 - megállapítottuk, hogy a 150 méter tengerszint feletti magasság fölött elterülő erdőktől távolodva csökken a két betegséggel kapcsolatos incidencia.
2. Első alkalommal mutattuk be átfogóan, és elemeztük leíró epidemiológiai módszerekkel a Magyarországon ismertté vált, élelmiszer-eredetű KE fertőzéseket.
3. Több éven keresztül, április és október közötti, havi rendszerességű kiszállásokkal folyamatosan vizsgálva egy természetes KE gócot, új adatokat kaptunk a góc működésével kapcsolatban. Megállapítottuk, hogy:
 - a vírusprevalencia a kullancsokban alacsony (3 pozitív pool az 1-es gyűjtőhelyen fogott 7247 kullancsból, 0,414‰);
 - a kismélsők összesített szeropozitivitása a két gyűjtőhelyen 5,1% (42 pozitív savó, a vizsgált 823-ból);
 - az egy adott pillanatban fertőző pontok néhány m² nagyságúak, és állandó változásban vannak, a vírushordozó kullancsok pusztulásának vagy sikeres vérszívásának függvényében;
 - semmilyen mért időjárás-érték nem mutatott jelentős hatást a góc működésére;
 - a terület vöröshátú erdeipocok állománya határozottan nagyobb vírushordozottságot és kullancsterheltséget mutatott az *Apodemus*-fajokénál, ami felveti a pocokfaj egereknél jelentősebb szerepét a vírus terjesztésében, fenntartásában;
 - a *Haemaphysalis concinna* kullancsfaj nimfái is hordozzák a vírust.
4. A közönséges kullancs 24 órás táplálékkereső aktivitásának alakulását 7 hónap időtartamra kiterjedően, célzott terepmunkával vizsgáltuk meg. Statisztikailag sikerült igazolni, hogy
 - az *Ixodes ricinus* nimfák napkelte utáni aktivitása fokozódik;
 - a kullancsok szezonális aktivitása korrelál a növekvő rágcsáló populáció esti aktivitás növekedésével.
5. Szövetteni kísérletben sikerült igazolnunk, hogy
 - magas fertőzővirion szám esetén az *Apodemus agrarius* egérfaj is szubklinikai encefalitiszen esik át.

4. MEGBESZÉLÉS

Az 1998 és 2008 között bejelentett KE és LB esetek epidemiológiai elemzése során azt találtuk, hogy az esetek között jelentős a férfiak túlsúlya, amely egybeesik korábbi adatokkal, de oka nem ismert. A jelentett és szerológiailag igazolt KE esetek térbeli komponensét Magyarországon is elemezték, de munkánk az első, amely ezt a LB-sal összehasonlításban végezte el. A nagyobb tengerszint feletti magasságok és az erdőborítottság párhuzamos elemzése új szempontot adott a tipikus átviteli terület definíciójához: mindazon települések, amelyek magasabban fekszenek, vagy közel (0-1 km-re) esnek olyan területekhez, amelyek "magaslatai" (150 méteres tengerszint fölötti magasságon helyezkednek el), emelkedett átviteli kockázatúaknak tekinthetők. Fontos megjegyezni, hogy a vegetációt (erdőtípust) magát is jellemzi összetételi szempontból az a magasságérték, amelyen elterül, így eredményeinkben ez is magyarázó tényező lehet. Korábban ismertté vált, hogy az erdőborítottság és a jelentett KE esetszám minden hazai megyében igazolhatóan összefügg egymással, továbbá hogy az erdők és a települések közelsége magyarázni képes a Magyarországon megfigyelt KE incidenciát. Eredményeink ezt a KE kapcsán megerősítették, míg a LB esetében elsőként igazolták. A be nem jelentett megbetegedési esetek minden hasonló vizsgálatnak korlátját jelentik, ez alól a mi elemzésünk sem kivétel. Az esetek geokódolását a betegek jelentésekben rögzített lakóhelye szerint végeztük és nem a fertőződés valószínűsített helye szerint. Mivel a jelentett esetek erős területi függést mutattak, így a két pont csekély földrajzi távolságát feltételeztük. A vizsgálatunkban alkalmazott módszerek segítséget nyújtanak abban, hogy – a specifikus korcsoportok és nemi megoszlás ismeretében – pontosabban azonosítsuk a **kockázatnak kitett népességet**.



A tej közvetítésével kialakuló KE járványok elemzésekor azt találtuk hogy az 1992-2011 között igazolt összes KE eset 4,4%-a bizonyítottan nyers kecske- illetve tehéntej fogyasztásakor fertőződött a vírussal. Ez illeszkedik a Közép-Európában megfigyelt hasonló arányok közé. Azt tapasztaltuk, hogy az élelmiszer-közvetítette fertőzéseknel nem érvényesült a közvetlen kullancscsípésből származó esetekre jellemző esetszám csökkenés: 1997-2011 között regisztráltak a hazánkban addig ismertté vált összes élelmiszer-eredetű KE fertőzés 58%-át. Kivételes volt a 2007-es év, amikor a lakhegyi járvány esetei adták az az évi összes igazolt KE fertőzés felét. A tej közvetítette fertőzések aránya a kullancs közvetítette esetekhez képest növekvő tendenciát mutatott a vizsgált időszak során. A 27 élelmiszer-eredetű járvány kiindulási pontjai kivétel nélkül beleestek az általunk térepidemiológiai módszerekkel is igazolt természeti göcökbe. A fertőzés járványügyi azonosítása sajnos csak ritkán járt együtt a fertőzés kiindulásához köthető tejelő állatok alapos vizsgálatával. Fontos hangsúlyozni, hogy a szerológiai vizsgálat során a fertőzést frissen átvészeltnek minősülő állatokat szükségtelen hosszú távon kizárni a tejtermelésből, hiszen ezen állatok, a következő laktációjuktól életük végéig védettek lesznek.



Egy aktív magyarországi KE-gócban végzett négy éves kutatómunkánk eredményei alapján a vírus prevalenciája a kullancsokban alacsony. Mivel kevés, mindössze 3 pozitív pool-t találtunk, valószínűsíthető, hogy ezekben nimfák esetében 1-1, lárvák esetében pedig minimum 1, maximum 4-5 vírushordozó egyed volt. Ezt a pozitív *I. ricinus* lárvá-pool-t egy olyan fogásban gyűjtöttük az 1-es gyűjtőhely 36-os mintavételi egységében, amelyben összesen 151 lárvá volt. Ezekből 3 pool-t képeztünk, kettő 50-50 lárvát tartalmazott, egy pedig 51-et. Feltételezhető, hogy a 151 lárvá egyazon nőstény által lerakott tojásokból kelt ki, és fertőzöttségüket transzovariális úton szerezték. Nagy valószínűséggel nem tévedünk, ha azt feltételezzük, hogy a 3 pozitív-nak talált pool 3 pozitív egyedet jelentett. Ez $3/7247 \cdot 100$, vagyis 0,414%-nek felel meg, és egybevág a korábbi hazai vizsgálat adataival (0,473%-es prevalencia). Az alacsony vírusprevalencia érték egybecseng a 2007-ben a szomszédos kecskefarról kiindult KE járványhoz kapcsolódó állatorvosi vizsgálatok eredményeivel is, amely megállapította, hogy a 73 tejelő kecskéből mindössze egy anyaállat esetében igazolható a fertőzés a vírusspecifikus IgM jelenlétével, 50 nappal azt követően, hogy a nyáj a későbbi gyűjtőterületünkön legelt.

A szeropozitív rágcsálók csapdázási pontjai egymáshoz közel estek és részben átfedést mutattak a pozitív kullancsok gyűjtési pontjaival. A pozitív rágcsálók két időszakban, május-júniusban és szeptember-októberben halmozódtak, amelyet közvetlenül megelőzött a nimfák tavaszi, illetve a lárvák augusztusi populációs csúcsa. A rágcsálók alacsony téli túlélési aránya (a visszafogások gyakorisága 1-7% között változott) és az 5% körüli szeroprevalencia értékek egyaránt arra utalnak, hogy a kevés szeropozitív egyed nagy valószínűséggel elpusztul télen, így a tavaszi populációs felfutásban túlnyomórészt szeronegatív egyedek vesznek részt. A kullancsok szezonális csúcsa és a szeropozitív rágcsálók azt követő halmozódása fogási adatainkban jelzi diagnosztikai módszereink eredményességét, és azt is, hogy a rágcsálók fertőzésében mindkét stádiumnak fontos szerepe van, továbbá, hogy az ellenanyagok termelése a fertőzést követően gyorsan lezajlik. A fertőzési kockázatnak kitett, **KE fertőzési pontnak („hot spot”-nak)** nevezhető terület mérete mindössze néhány m²-es és megegyezik azzal a felülettel, amelyet táplálékkereső aktivitása során egy vírushordozó nimfa, illetve egy fertőzött tojás-csomóból kikelő lárvák bejárnak. Ennek következtében nem jelezhető előre, hogy a gócon belül mely részek azok, amelyek egy bizonyos időpontban humán szempontból átviteli kockázatot jelentenek. Annak ellenére, hogy pontosan nem lehet megmondani, hogy egy adott időpontban hol vannak vírushordozó kullancsok, illetve szeropozitív rágcsálók, megjelölhetőek azok az élőhelytípusok, amelyek a kullancsok túlélése és a kiscsálók egyedsűrűsége szempontjából a legkedvezőbbek, és amelyek ezért kiemelt kockázati területek az emberi fertőződés szempontjából, legalábbis az év azon időszakában, amikor a humán esetszámok halmozódnak. Az időjárás vizsgálatunk során mért, illetve figyelembe vett tényezői érdemi hatást nem gyakoroltak vizsgálati eredményeinkre.



A közönséges kullancs táplálékkereső aktivitása egész évben közvetlenül **napkelte után** fokozódott (szeptember kivételével, amikor kevés kullancsot gyűjtöttünk és felhős volt az ég). Adataink szerint a rágcsálók aktivitása is enyhén fokozódott napkelte után (a 28 fogásból 5 történt a napkeltét követő 3 óras időszakban). A közvetlen adatok hiányában is elképzelhetőnek tartjuk, hogy a hajnali fény mennyiség növekedése fokozta a kereső aktivitást. Mivel **a napnyugtát követő 3 órában** gyűjtött nimfák száma / a napnyugta előtti és utáni 3-3 órában fogott nimfák száma alapján képzett arányszám összefüggést (pozitív korrelációt) mutatott az adott havi kiszálláson fogott rágcsálók számával, feltételezzük, hogy a kullancsok valahogyan érzékelik a helyi rágcsálópopuláció aktivitásváltozásait is. A rágcsálók aktivitása a napnyugtával kezdődött, és jellemzően éjjeli volt. A nimfák nappali aktivitása akkor fordult esti-éjszakai aktivitásra, amikor az éjjel mozgó rágcsálók denzitása a maximumon volt, vagyis július-szeptemberben.



Szövetteni kísérletünkben első alkalommal mutattuk be, hogy a nagy mennyiségű KE oltóvírussal fertőzött, vadon élő egérfajban (az *A. agrarius*-ban) a vírus eléri a központi idegrendszert, és ott szaporodni képes, anélkül, hogy ez látható klinikai tünetekkel járna együtt. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a vírussal történő fertőzés nyomán nemcsak a pocok fajok, hanem bizonyos körülmények között az Apodemus-fajok is áteshetnek szubklinikai encefalitiszen. Ez, és a fertőzés gyógyuló jellege azt bizonyítja, hogy immunfolyamatok állhatnak a KE fertőzés különböző kistrágcsáló fajknál megfigyelt változatos lefolyása mögött. Azonban viszonylag alacsony vírusedényesség mellett a pirók erdeieger immunrendszere képes meggátolni a vírus bejutását a központi idegrendszerbe, illetve az oda esetleg mégis bejutó vírust elpusztítani, és így nem alakul ki klinikai tünetekkel járó megbetegedés. Pirók erdeiegekben a szerológiai immunválasz hiánya, alacsony fertőző dózisok esetén, jelzi, hogy kisebb mennyiségű invazív vírussal a természetes immunválaszuk megbírkózik. Laboregekben a szerológiai válasz hiánya (vagy nagyon alacsony jellege) jelzi immunválaszuk kevésbé hatékony voltát, illetve központi idegrendszerük gyors fertőzése miatt a szerológiai immunválasz kialakulására nincs idő, vagy a gyengülő szervezetnek nem erre van kapacitása.

5. A KUTATÁSI EREDMÉNYEK KÖZLÉSEI

A témában megjelent tudományos publikációk

- Zöldi Viktor, Juhász Attila, Nagy Csilla, Papp Zoltán, Egyed László: **Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary: the epidemiological situation between 1998 and 2008**, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, (13)4: 256-265, 2013. doi:10.1089/vbz.2011.0905., *IF₂₀₁₃*: 2,531
- Zöldi Viktor, Ferenczi Emőke, Egyed László: **Tej közvetítette kullancsencephalitis-járványok Magyarországon**, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 135. 48-56, 2013. *IF₂₀₁₃*: 0,185
- Zöldi Viktor, Reiczigel Jenő, Egyed László: **Monitoring the diel activity of Ixodes ricinus ticks in Hungary over three seasons**, *Experimental and Applied Acarology*, 61(4): 509-517, 2013. doi:10.1007/s10493-013-9708-4, *IF₂₀₁₃*: 1,821
- Zöldi Viktor, Papp Tibor, Rigó Krisztina, Farkas János, Egyed László: **A 4-year study of a natural tick-borne encephalitis virus focus in Hungary, 2010-2013**, *EcoHealth*, doi:10.1007/s10393-014-0969-0, *IF₂₀₁₃*: 2,267
- Zöldi Viktor, Papp Tibor, Reiczigel Jenő, Egyed László: **Bank voles show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary**, *Infectious Diseases*, doi:10.3109/00365548.2014.975743, *IF₂₀₁₃*: 1,640

Összes impakt faktor: 8,444

A témában tartott előadások

- Zöldi Viktor, Szilágyi Andrásné: **Elegendő-e a bejelentett megbetegedések számának ismerete a kullancsok által terjesztett fertőző betegségek hazai járványügyi helyzetének megítéléséhez?**, a *Magyar Zoonózis Rudnai – Kemenes Tudományos Ülése*, Ráckeve, 2008. október 7-9.
- Zöldi Viktor: **Milyen módon előzhető meg az emberek kullancsossága?**, a *Magyar Parazitológusok Társaságának „Kullancsokkal és az általuk terjesztett kórokozókkal kapcsolatos újabb eredmények” című előadójelentése*, Budapest, 2009. április 28.
- Zöldi Viktor, Juhász Attila, Nagy Csilla, Szilágyi Andrásné, Páldy Anna: **A Lyme-kór és a kullancsencephalitis incidenciája területi egyenlőtlenségeinek térinformatikai vizsgálata a fertőzőbeteg-jelentő rendszer (EFRIR) adatai alapján, 1998-2008.**, a *Magyar Zoonózis Társaság által szervezett Szent-Iványi – Binder Napok és Rudnai – Kemenes Tudományos Ülés*, Tiszafüred, 2009. október 14-16.
- Zöldi Viktor, Juhász Attila, Nagy Csilla, Szilágyi Andrásné, Páldy Anna: **Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Hungary – The epidemiological situation between 1998 and 2008**, *European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE)*, Lisszabon, Portugália, 2010. november 11-13.
- Zöldi Viktor, Nagy Csilla, Juhász Attila, Papp Zoltán: **A kullancsencephalitis és Lyme-kór incidenciája valamint a feltételezhetően magas átviteli kockázatot jelentő területek térbeli eloszlásának összefüggés-vizsgálata**, a *Magyar Higiénikusok Társaságának XL. Vándorjelenése*, Esztergom, 2011. október 5-7.
- Zöldi Viktor, Papp Tibor, Rigó Krisztina, Ádámszki Szabolcs, Egyed László: **Egy természetes kullancsencephalitis-góc kétéves vizsgálata**, a *Magyar Tudományos Akadémia*

Állatorvos-tudományi Bizottságának és a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskolájának 38. „Akadémiai beszámoló” ülése, Budapest, 2012. január 17.

Jelenik Zsuzsanna, Ferenczi Emőke, Melles Márta, Zöldi Viktor: **Tick-borne encephalitis (TBE) – Epidemiology**, *International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW-TBE), 14th Meeting*, Bécs, Ausztia, 2012. február 2-3.

Zöldi Viktor, Papp Tibor, Rigó Krisztina, Ádámszki Szabolcs, Egyed László: **Egy Zala megyei természetes kullancsencephalitis-góc vizsgálata**, *a Magyar Higiénikusok Társasága által szervezett, VIII. Fiala Higiénikusok Fóruma*, Gödöllő, 2012. május 10-11.

Zöldi Viktor, Juhász Attila, Nagy Csilla: **A kullancsencephalitis és Lyme-kór miatti megbetegedés területi eloszlásának változása Magyarországon, 2000-2011.**, *a Magyar Higiénikusok Társaságának XLI. Vándorgyűlése*, Esztergom, 2012. október 3-5.

Egyed László, Zöldi Viktor, Szeredi Levente: **Kullancsencephalitis vírus-fertőzés szövettani vizsgálata vadon élő rágcsáló fajokban és laboregérben**, *a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottságának és a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskolájának 39. „Akadémiai beszámoló” ülése*, Budapest, 2013. január 28-30.

Zöldi Viktor, Egyed László: **Kullancsok 24 órás napi aktivitásának vizsgálata**, *a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottságának és a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskolájának 39. „Akadémiai beszámoló” ülése*, Budapest, 2013. január 28-30.

Zöldi Viktor, Nagy Csilla, Juhász Attila, Papp Zoltán, Egyed László: **Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary – the epidemiological situation between 1998 and 2008**, *47th Days of Preventive Medicine – International Congress organised by Faculty of Medicine in Niš, Public Health Institute of Niš, Serbian Medical Society of Niš*, Niš, Szerbia, 2013. szeptember 24-27.

Zöldi Viktor, Papp Tibor, Rigó Krisztina, Farkas János, Egyed László: **Egy természetes kullancsencephalitis-góc 4 éves vizsgálata**, 2010-2013, *a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottságának és a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Doktori Iskolájának 40. „Akadémiai beszámoló” ülése*, Budapest, 2014. január 27-29.

A témában készített tudományos poszterek

Zöldi Viktor, Juhász Attila, Nagy Csilla, Szilágyi Andrásné, Páldy Anna: **Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Hungary – The epidemiological situation between 1998 and 2008**, *European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE)*, Lisszabon, Portugália, 2010. november 11-13.

Zöldi Viktor, Ferenczi Emőke, Egyed László: **Milk transmitted tick-borne encephalitis epidemics in Hungary**, *European Regional Conference on Goats in Hungary and Romania*, 2014, Debrecen-Nagyvárad, 2014. április 7-13.