

Occurrence of West Nile virus in mosquito vectors and vertebrate hosts in Hungary

Szentpáli-Gavallér Katalin^{1*}
Dán Ádám¹
Erdélyi Károly¹
Bálint Ádám¹
Somhegyiné Barna Mónika²
Bakonyi Tamás^{2,3}

K. Szentpáli-Gavallér^{1*}
Á. Dán¹
K. Erdélyi¹
Á. Bálint¹
M. Somhegyiné Barna²
T. Bakonyi^{2,3}

1. NÉBIH ÁDI
H-1143 Budapest, Tábornok u. 2.

* e-mail: szgkati@gmail.com

2. SZIE ÁOTK Járványtani és
Mikrobiológiai Tanszék
H-1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

3. Bécsi Állatorvos-tudományi
Egyetem Vírológiai Intézet
A-1210 Bécs, Veterinärplatz 1

A nyugat-nílusi vírus hazai előfordulása szúnyog-vektorokban és gerinces gazdáiban

VIROLOGIA

ÖSSZEFOGLALÁS

A nyugat-nílusi láz vírusa (West Nile virus, WNV) világszerte elterjedt flavivírus. Magyarországon 2003 óta fordulnak elő diagnosztizált, WNV-fertőzéshez köthető idegrendszeri megbetegedések állatokban és emberekben. Szerzők az utóbbi években (2009–2015) aktív és passzív felmérő (monitoring-) vizsgálatokat végeztek a vírus hazai előfordulásának nyomon követésére. Minden évben ki tudták mutatni a WNV-fertőzést vadmadarak elhullott egyedeiből és agyvelőgyulladásos lovak mintáiból. A 2011 és 2012 években, szúnyogokon végzett felmérő vizsgálatok során három különböző szúnyogfajban (*Ochlerotatus annulipes*, *Coquillettidia richiardii* és *Culex pipiens*) is kimutatták a vírus jelenlétét. A monitoring vizsgálatokon túl a hazai 2-es genetikai vonalú WNV-törzs virulenciáját befolyásoló lehetséges genetikai markerek szerepét is vizsgálták. Kutatásaik felhívják a figyelmet a kórokozó hazai jelenlétére és alátámasztják kiterjedt és rendszeres monitoringvizsgálatok végzésének jelentőségét.

SUMMARY

West Nile virus (WNV) is a widely distributed mosquito-borne flavivirus. WNV-associated disease and mortality in animal and human hosts have been diagnosed in Hungary since 2003. Over the past years (2009–2015) active and passive monitoring programs have been carried out to survey WNV activity in Hungary. Each year WNV infections have been detected in wild bird carcasses and horses showing neurological signs. During a two year mosquito surveillance programme in 2011–2012, the viral RNA has been isolated from three different mosquito species (*Ochlerotatus annulipes*, *Coquillettidia richiardii* és *Culex pipiens*). Besides the monitoring programs, we have tested potential molecular markers of pathogenicity of the Hungarian lineage 2 WNV strain. The present study clearly demonstrates the presence of WNV in the country and reconfirms the importance of regular and expanded surveillance programs.

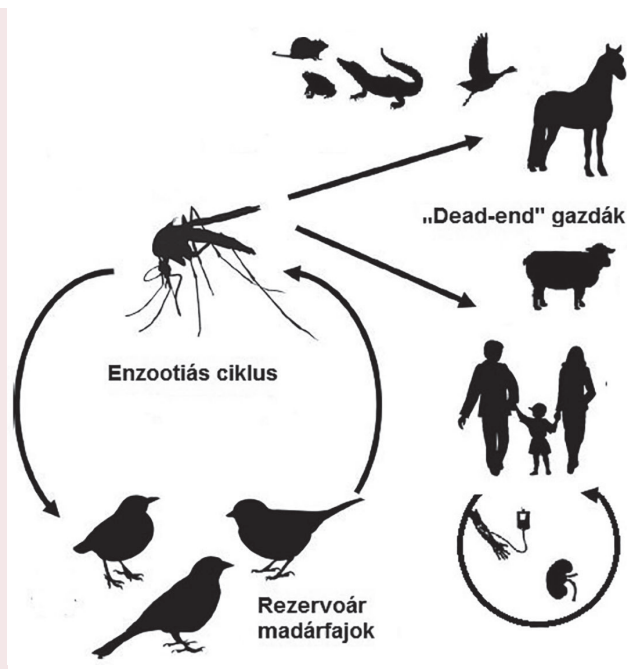
A nyugat-nílusi láz vírusa (West Nile virus, WNV) világszerte elterjedt kórokozó, amely a *Flaviviridae* víruscsaládon belül a *Flavivirus* nemzetség tagja. A virion 45–50 nm átmérőjű. Kívülről burok (envelope) borítja, ezen belül helyezkedik el a 12 kDa-os kapszidproteinből és a kb. 11 kb (kilobázis) hosszúságú, pozitív irányultságú szimpla szálú RNS-ből (+ssRNS) felépülő nukleokapszid. A kódoló molekulának az 5'- és 3'- vég nem kódoló (UTR) szakaszain kívül egyetlen nyitott leolvasási kerete (ORF) sincs. A szintetizálódó poliprotein érése során enzimatis hasítással három struktúrfehérjére [[C (kapszid), E (burok) és prM/M (premembrán/membrán)], valamint hét nemstruktúrális fehérjére (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5) bomlik.

A nyugat-nílusi láz vírusa világszerte elterjedt kórokozó, amely képes állatokat és embereket is fertőzni és esetenként súlyos megbetegedéseket előidézni

A kórokozó képes állatokat és embereket is fertőzni (zoonotikus) és esetenként súlyos megbetegedéseket előidézni bennük (28). A nyugat-nílusi láz vírusát elsősorban ízeltlábú vektorok terjesztik a fogékony gazdaszervezetek között (arbovírusok). A WNV fenntartó gerinces gazdái vadmadarak; emlős gazdáiban általában nem alakul ki olyan szintű viraemia, ami elegendő volna a szúnyogvektorok fertőzéséhez, így ők a fertőzés továbbvitelében nem vesznek részt, ún. „dead-end” gazdák. A vírus terjedési útjait az **1. ábra** szemlélteti. A WNV-fertőzések túlnyomó része nem jár jelentős tünetekkel gerinces gazdáiban. A fertőzések kb. 20%-ában általános, lázas (influenzaszerű) tünetek alakulnak ki. A fertőzések kevesebb mint 1%-ában a vírus a központi idegrendszerbe jutva agy- és gerincvelő-gyulladászt okoz, amelynek súlyosak a tünetei és gyakran végzetes a kimenetele. Egyes fajokban (pl. lovakban, emberekben, ragadozó madarakban) nagyobb gyakorisággal lehet megfigyelni idegrendszeri tünetek kialakulását, mint más fajokban.

A nyugat-nílusi lázzal és a kórokozó fontosabb tulajdonságaival kapcsolatban 2003-ban jelent meg egy szemleci e lap hasábjain (46). Kutatócsoportunk a vírus hazai előfordulásával, valamint lovakban és vadon élő madarakban

okozott megbetegedéseivel kapcsolatos megfigyeléseit 2012-ben ismertette a *Magyar Állatorvosok Lapja* olvasóival (40, 43). A Körös–Maros Nemzeti Park területén élő héják (*Accipiter gentilis*) két egyede idegrendszeri tünetekben betegedett meg 2004-ben, és az egyik madár el is pusztult. Kórbonctani, kórszövettani és molekuláris biológiai módszerekkel a nyugat-nílusi vírus jelenlétét lehetett kimutatni a héja szerveiből (5). Ez a törzs a WNV kettes genetikai vonalához sorolt, afrikai törzsekkel közelebbi rokonságban állt, mint az Európában, Ázsiában és Amerikában előforduló vírustörzsekkel (5, 16). A vírustörzs 2008-ban komoly járványt okozott hazánkban, valamint gyors földrajzi terjedésbe kezdett (6, 22). Ez indokoltá tette a vírus nyomon követésére irányuló, célzott felmérő vizsgálatok végzését a fontosabb gerinces gazdáiban és szúnyogvektorokban. 2010-től 2013-ig a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (ÁDI) laboratóriumaiba az országos madárinfluenza monitoringprogram keretein belül vizsgálatra érkező minden, a 2009-es, 2014-es és 2015-ös években a kórbonctan alapján gyanúsnak ítélt vadmadárhullákból nyugat-nílusi vírus kimutatására irányuló vizsgálatokra is sor került. Ezekon kívül vizsgáltuk további, vadon élő vagy fogságban tartott madarak mintáit is,



1. ÁBRA. A nyugat-nílusi vírus terjedési útjai

FIGURE 1. West Nile virus transmission cycles

amennyiben a WNV-fertőzés gyanúja felmerült. A vektorok fertőzöttségének felmérése céljából aktív szúnyogmonitoring-programot végeztünk az ország több pontján 2011 és 2012 év során. Ebben a közleményben a felmérés főbb eredményeit és az azokból levonható következtetéseket ismertetjük.

Számos kutatás célja annak megállapítása, hogy mi befolyásolja a WNV-fertőzés következtében kialakuló idegrendszeri tünetek megjelenését és súlyosságát. Az esetek tanulmányozása során felismerhető, hogy ez összefüggésben áll a gerinces gazdák több tulajdonságával (pl. faj, életkor, általános és specifikus ellenálló képesség), valamint a fertőző vírustörzssel is. Korábban voltak, akik úgy vélték, hogy – szemben a világszerte elterjedt, egyes genetikai vonalhoz („lineage 1”) tartozó bizonyos vírustörzsekkel – a kettős genetikai vonalhoz („lineage 2”) sorolt vírusok kevésbé virulensek, és nem okoznak idegrendszeri megbetegedéseket. Saját kutatásaink mellett ezt dél-afrikai törzsekkel végzett vizsgálatok is cáfolták (8). Bizonyos, egyes genetikai vonalhoz tartozó törzsekkel végzett kutatások azonosítottak több olyan mutációt (genetikai markert), amelyeket összefüggésbe lehetett hozni a törzsek virulenciájával különböző gerinces gazdáknál (2, 26, 49, 50). Kutatásaink ezért arra is kiterjedtek, hogy megvizsgáljuk, vajon ezeknek a markereknek van-e szerepe a hazai WNV-törzs idegrendszert fertőző képessége (neuroinvasivitása) és megbetegítő képessége (neurovirulenciája) tekintetében.

ANYAG ÉS MÓDSZER

FELMÉRŐ (MONITORING-) VIZSGÁLATOK

A WNV előfordulási gyakoriságának becslésére passzív és aktív monitoring-rendszereket használtunk. A passzív monitoring fő eleme idegrendszeri tünetekben megbetegedett vagy elhullott gerinces gazdák, főként vadmadarak és lovak vizsgálata volt. A vizsgált vadmadarak az országos madárinfluenza monitoring-program keretein belül a NÉBIH ÁDI-ba érkezett tetemeknél a nemzeti parkok munkatársai által gyűjtött, állatkertekben és madármentő-állomásokon kezelt, valamint solymászok által nevelt madarak mintái voltak. Emellett a kutatócsoportok laboratóriumaiba küldött, idegrendszeri tüneteket mutató lovak mintáit is megvizsgáltuk WNV-fertőzés kimutatása céljából. Az aktív monitoring a szúnyogvektorok fertőzöttségének felmérésére irányult. Az országban 24 gyűjtési helyen, entomológus szakértők gyűjtöttek szúnyogmintákat 2011-ben és 2012-ben (44). A minták azonosítását (faj- és ivarmeghatározását) és szúnyogok esetében csoportok (poolok) kialakítását a minták feldolgozása (madár-tetek boncolása, a szúnyogpoolok és a vadmadár szervek homogenizálása és vírus-RNS kivonása) követte (6, 44). A WNV nukleinsavának kimutatásához a genom NS3 fehérjét kódoló (6) és az 5' vég UTR-régiójára (25) irányuló real-time RT-PCR-t alkalmaztunk (44). A kimutatott vírustörzsek közül egyesekből további nukleinsavszakaszokat erősítettünk fel RT-PCR segítségével, majd az amplifikációs termékek nukleotidszekvenciáinak meghatározását követően genetikai összehasonlító vizsgálatoknak vetettük alá őket (6). A vadmadármintákat egyéb flavivírusok kimutatásának céljából tovább vizsgáltuk WEISSENBOCK és mtsai által leírt pan-flavi RT-PCR módszerrel is (48). Továbbá a NÉBIH ÁDI-ba érkezett, heveny idegrendszeri tüneteket mutató lovakból gyűjtött savómintákat WNV elleni IgM típusú ellenanyagokat jelenlétére vizsgáltuk ELISA-módszerrel (Ingezim West Nile IgM 1.4. WNV K.2. kit, Ingenasa, Madrid, Spain).

A patogenitásvizsgálatokhoz kiválasztottunk egy Magyarországon, 2010-ben, idegrendszeri tüneteket mutató ló agyveléből izolált WNV-törzset, amely szoros rokonságot mutatott a hazánkban előforduló 2-es genetikai vonal többi képviselőjével. Reverz genetikai módszerekkel előállítottuk a vírus teljes hosszúságú fertőző klónját, majd a neuroinvasivitást és neurovirulenciát az 1-es genetikai

A WNV előfordulási gyakoriságának becslésére passzív és aktív monitoring-rendszereket használtak, amelyek során idegrendszeri tünetekben megbetegedett vagy elhullott gerinces gazdák, ill. szúnyogvektorok fertőzöttségét vizsgálták

vonulhoz tartozó törzsekben befolyásoló pontmutációkat mutagenézissel hoztuk létre a genomban (45). A beillesztett nukleotidszubsztitúciók és a következő aminosav-változások a következők voltak: C3218T az NS1 fehérjében (P250L), G3613C az NS2A fehérjében (A30P), C5357A az NS3 fehérjében (P249H), és három mutáció az NS4B fehérjében: CC7030–31GG (P38G), G7223C (C102S) és A7664G (E249G). A módosított genommal rendelkező vírusokat szövettenyészetben életre keltettük, majd szaporodóképességüket *in vitro* Vero E6 sejtenyészetekben, ill. *in vivo* egérmodellben vizsgáltuk (45).

EREDMÉNYEK

2011 és 2012 során összesen 23 193 szúnyogot vizsgáltunk meg WNV jelenlétére: 2011-ben 24 különböző fajhoz tartozó szúnyog, 362 poolba rendezett 11 728 egyedét; 2012-ben pedig 18 különböző szúnyogfaj 283 poolba rendezett 11 465 példányát. A nyugat-nílus vírus kimutatására irányuló RT-PCR 2011-ben 3 pool esetében adott pozitív eredményt: egy Fényeslitkén júniusban gyűjtött nőstény *Ochlerotatus annulipes* szúnyogokat tartalmazó poolból, egy júliusban a debreceni Fancsika-tónál gyűjtött *Coquillettidia richiardii* poolból, továbbá egy szeptemberben, nőstény *Culex pipiens* nőstényeket tartalmazó, Kardoskút közelében gyűjtött poolból mutattuk ki a vírus-RNS jelenlétét. A 2012. évi összes szúnyog vizsgálata negatív eredménnyel zárult. A 2011-es adatok alapján számolt minimális fertőzöttségi ráta (minimal infection rate MIR = fertőzött szúnyogok aránya 1000 szúnyogra vetítve) az összes szúnyogra együttesen számítva 0,25; *Ochlerotatus annulipes* esetében 2,03, *Coquillettidia richiardii* esetében 0,63 és *Culex pipiens* esetében 2,70 lett (44).

Az elhullott vadmadarak vizsgálatára alapozott, passzív WNV-monitoring keretében 2010-től 2013-ig évente 275, 181, 266 és 257 vadmadár szerveinek homogenizátumát vizsgáltuk meg nyugat-nílus vírus-RNS jelenlétére. 2009-ben, ill. 2014 és 2015 év során a kórbonctani és kórszövettani gyanú alapján vizsgáltuk tovább a vadmadár hullákat. A pozitív madarak számait éves bontásban az **1. táblázat** ismerteti.

A vizsgálati időszakban 416, heveny idegrendszeri tüneteket mutató, nyugat-nílus vírusfertőzésre gyanús lovakból gyűjtött savóminta érkezett a NÉBIH ÁDI laboratóriumába (2009: 32, 2010: 40, 2011: 84, 2012: 20, 2013: 108, 2014: 31 és 2015: 101). A WNV elleni IgM típusú ellenanyagokat tartalmazó lósavók számát lásd az **1. táblázatban**. A kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok eredményei alapján WNV-fertőzésre gyanús, elhullott vagy leölt lovak idegrendszeri mintáiból RT-PCR módszerrel pozitívnak talált egyedek számát is ez a táblázat tartalmazza.

A patogenitási kísérletekben az eredeti, neuroinvaszív WNV-törzs egyedül az NS1 fehérjében létrehozott mutáció (P250L) során mutatott teljes attenuálódást. Az *in vitro* Vero E6 sejtenyészetben vizsgált növekedési görbék **(2. ábra)** statisztikai elemzése az NS1 vírus szignifikánsan lelassult replikációját mutatta, a mutációt tartalmazó klónvírus infektív titere szignifikánsan kisebb volt minden mintavételi időpontban (12 óra p. i. – 96 óra p. i.), mint a vad típusú vírusé. Az *in vivo* kísérletek során az NS1 mutáns vírussal fertőzött egerek mindegyike túlélte a 14 napos megfigyelési időszakot, míg a vad vírus nagyobb fertőzési dózisa (10^4 TCID₅₀) esetében a mortalitás 100%-os, a kisebb dózissal (10 TCID₅₀) pedig 75%-os volt. Részleges (de nem szignifikáns) attenuációt figyeltünk meg az *in vivo* kísérletekben az NS3-H249P (a nagyobb dózissal fertőzött egerek esetében 75%-os mortalitás) és az NS4B-E249G (a magasabb dózissal fertőzött egerek esetében 63%-os mortalitás) mutációkat tartalmazó vírusoknál. A nyugat-nílus vírussal rokon Usutu-vírus (USUV) RNS-ét 2010, 2011, 2012, 2013 és 2015 évben 1–1 fekete rigó, továbbá 2015-ben egy fenyőrigó (*Turdus pilaris*) szerveiből mutattuk ki.

2011-ben három esetben mutatták ki a vírust különböző szúnyogfajokban

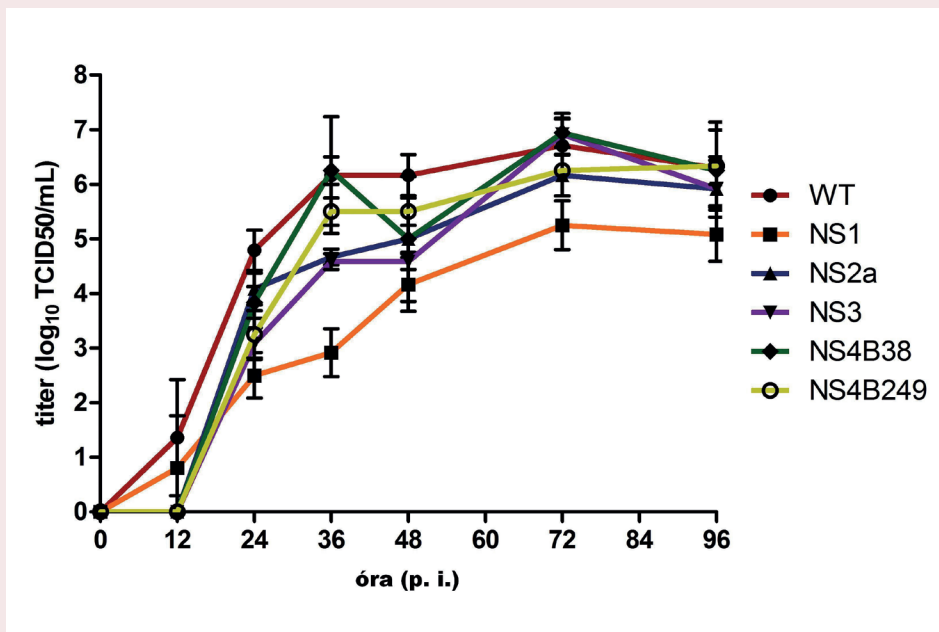
1. TÁBLÁZAT. WNV passzív felmérő vizsgálatok eredményei, 2009–2015. RT-PCR módszerrel WNV-fertőzöttnek talált elhullott vadmadarak és lovak száma; ELISA-módszerrel WNV IgM pozitívnak talált, idegrendszeri tüneteket mutató lovak száma

TABLE 1. Results of passive monitoring of WNV, 2009–2015. Number of WNV infected dead wild birds and horses based on RT-PCR. Number of WNV IgM positive (based on ELISA test) horses showing neurological signs

| Faj\Év | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|
| Héja (<i>Accipiter gentilis</i>) | 6 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Karvaly (<i>Accipiter nisus</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vándorsólyom (<i>Falco peregrinus</i>), | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nagy fakopáncs (<i>Dendrocopos major</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Erdei fülesbagoly (<i>Asio otus</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Házi veréb (<i>Passer domesticus</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vörösbegy (<i>Erithacus rubecula</i>) | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nádi tücsökmadár (<i>Locustella luscinioides</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Házi rozsdafarkú (<i>Phoenicurus ochruros</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Foltos nádiposzáta (<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Szajkó (<i>Garrulus glandarius</i>) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hóbagoly (<i>Bubo scandiacus</i>) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Szarka (<i>Pica pica</i>) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Fácán (<i>Phasianus colchicus</i>) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Feketerigó (<i>Turdus merula</i>) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Szírti sas (<i>Aquila chrysaetos</i>) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ló (<i>Equus caballus</i>) igm/RT-PCR | 6/3 | 21/2 | 20/1 | 4/0 | 9/1 | 5/1 | 9/0 |

2. ÁBRA. A vad típusú (WT) és mutáns vírusok növekedési görbéi Vero E6 sejtenyészetben (MOI = 0,1) A titerek három szimultán fertőzés átlagaként megadva (log₁₀ TCID₅₀/mL); a hibásávok a szórást jelölik

FIGURE 2. Growth kinetics of infectious virus of the wild type (WT) virus and mutant viruses after triplicate infection of Vero E6 cells at an MOI of 0.1. The titres are given as the mean (log₁₀ TCID₅₀/mL); error bars represent standard deviation



MEGVITATÁS

A 2003-as és 2004-es magyarországi WNV-törzsek genetikai összehasonlító vizsgálata feltárta, hogy míg a 2003-as libaesetekből kimutatott vírus a legnagyobb hasonlóságot az 1999-ben az Egyesült Államokba behurcolt törzshöz mutatta (1-es genetikai vonal), a 2004-ben héja-agyvelőgyulladás előidéző törzs a nyugat-nílusai vírus 2-es genetikai vonalához tartozik, amely csoport tagjait korábban kizárólag Afrika Szaharától délre fekvő területeiről mutatták ki (5). 2005-ben, majd 2007-től minden évben több-kevesebb megbetegedés fordult elő, főleg az Alföld területén. A vírusok részleges nukleotidszekvenciáinak összehasonlítása alapján megállapítható, hogy azok lényegében megegyeznek az először 2004-ben, héjából kimutatott, 2-es genetikai vonalhoz tartozó törzsszel. A vírustörzs 2008-ban jelentős fölrzaji terjedést mutatott az országban. Az állati esetek mellett a járványidőszakban 19 hazai humán agyvelőgyulladásos eset háttérében lehetett bizonyítani a WNV kóroki szerepét a szerológiai vizsgálatok alapján. Mind az állati, mind a humán megbetegedések az ország középső és nyugati részén fordultak elő, szemben a korábbi évek alföldi lokalizációjával. A következő években újra a héják tűntek a legérzékenyebbek a kórokozóra, de az elhullott madarak változatos fajmegoszlást mutattak (vö. 1. táblázat). 2009-ben a 17 WNV-pozitív vadmadár mellett a vizsgálatok három agyvelőgyulladásos ló és hét agyvelőgyulladásos ember esetében igazolták víruskimutatással is a WNV kóroki szerepét. A lovak kifejezett érzékenysége 2009 után is minden évben számos IgM-pozitivitásban mutatkozott meg beteg állatokból az intézetbe küldött vérminták vizsgálata során, ill. több elhullott lóból RT-PCR módszerrel is sikerült igazolni WNV-fertőzést (vö. 1. táblázat). Emberi esetek is minden évben előfordultak, számuk 2009-ben 7, 2010-ben 19, 2011-ben 4, 2012-ben 17, 2013-ban 31, 2014-ben 11, 2015-ben 18 volt (13, 14).

Európában mind a *Culex pipiens*, mind a *Coquillettidia richiardii* szúnyogfaj a nyugat-nílusai vírus elsődleges vektorának számít (19, 20, 27, 36). A *Culex pipiens* elsősorban ornithophil faj, azonban több tanulmány is kimutatta, hogy a vérszívás egy része történhet emlősökön és emberen is (18, 53). Kontinentális éghajlaton képes áttelelni, majd tavasszal ismét terjeszteni a vele együtt áttelelt vírust (1, 17, 30). Európában hasonlóan elterjedt szúnyogfaj a *Coquillettidia richiardii*, amely lárvastádiuma még jeges vízben is át tud telelni. Embereken előszeretettel táplálkozik zárt térben, de kisebb részben madarakon is szív vért (41). Az *Ochlerotatus annulipes* petéi képesek áttelelni kontinentális éghajlaton is. A nőstények áprilistól szeptemberig aktívak, főként alkonyatkor szívnek vért elsősorban emlősállatokon, de ismertén jó közvetítő („bridge”) vektorok is madarak és emlősök között (7, 23). Az *Ochlerotatus annulipes* kifejezetten szeret emberen is vért szívni (52). Mindhárom előbb említett faj Magyarországon is széles körben elterjedt. Számos európai országban foglalkoznak a különböző szúnyogfajok nyugat-nílusai vírus transzmissziós ciklusában betöltött lehetséges szerepével (15). A Magyarországon számolt MIR-értékek hasonlóak voltak más európai országban mért adatokhoz.

A nyugat-nílusai vírus 2-es genetikai vonalához tartozó vírustörzs terjedése az utóbbi években az országhatáron is átlépett (6, 10). Először Ausztriában sikerült kimutatni vadmadarak mintáiból (51), majd a vírus megjelent Görögországban (9, 31), Olaszországban (3, 39), Szerbiában (33), Horvátországban (24), Csehországban (38) és Szlovákiában is (11). Filogenetikai elemzések szerint az említett országokban elterjedt vírusok a Magyarországon 2004-ben felbukkant WNV-törzs leszármazottjai, míg a pár évvel később Oroszország területén izolált (34, 35), majd Romániában is megtalált (42) ugyancsak 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírus különbözik tőlük (10).

A 17 vadmadár mellett a vizsgálatok három agyvelőgyulladásos ló és hét ember esetében igazolták a WNV kóroki szerepét

Európában mind a *Culex pipiens*, mind a *Coquillettidia richiardii* szúnyogfaj a nyugat-nílusai vírus elsődleges vektorának számít, de az *Ochlerotatus annulipes* is közvetítheti a fertőzést

A nyugat-nílusi vírus térfoglalása jellemzően a déli és közép európai országokban jelentős, főként a vonuló madarak útvonalába eső területeken. A vírus megjelenése és stabilizálódása a korábban mentes területeken egyrészt időjárási viszonyokkal magyarázható, másrészt valószínűleg sok egyéb (gazdasági, szociális-társadalmi, környezeti) tényező együttes hatása is közrejátszik. Ahhoz, hogy egy új vírus endémiássá váljon, a számára még elfogadható időjárási viszonyokon túl szüksége van megfelelő ízeltlábú vektorra és fogékony gazdafajra szaporodási ciklusának fenntartásához. Ha ezek a tényezők adottak, és a vírus még áttelelni is képes a szúnyogvektorban, kontinentális éghajlaton is endémiássá válhat. Vizsgálataink eredménye alapján a hazánkban minden évben vadmadarakban, lovakban és emberekben megjelenő ugyanazon vírustörzs (5, 6, 21, 29, 40), továbbá az áttelelni képes szúnyogfajok potenciális vektorszerepének felderítése is erre enged következtetni (44).

A hazai megfigyelések is bizonyították, hogy a 2-es genetikai vonalhoz is tartoznak neuroinvaszív, erősen patogén törzsek

A két genetikai vonal patogenitását nem feltétlenül ugyanazok a genetikai tényezők befolyásolják

A szerzők igazolták, hogy a nyugat-nílusi vírus mellett az USUTU-vírus is endémiás hazánkban

A 2-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok sokáig nem tűntek olyan patogénnek, mint az 1-es vonalhoz tartozók; általában enyhébb lefolyású, gyógyulásra hajlamos megbetegedéseket okozva (32). Az utóbbi 10 évben hazánkban is megfigyelt esetek alapján azonban bebizonyosodott, hogy ehhez a genetikai vonalhoz is tartoznak neuroinvaszív, erősen patogén törzsek. Számos tanulmány foglalkozik az 1-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzsek virulencia-markereinek felderítésével (2, 12, 26, 37), amelyek közül már sokat azonosítottak is, ellenben a 2-es genetikai vonal képviselőivel, amelyeket ilyen szempontból kísérletes úton korábban nem vizsgáltak. Kutatócsoportunk 6 olyan pontmutáció patogenitást befolyásoló szerepét vizsgálta egy 2-es genetikai vonalhoz tartozó, hazai izolálású vírustörzsben, amelyek az 1-es genetikai vonalban megjelenve jelentős attenuáló hatásúak. A 6 mutáció közül egy esetben figyeltünk meg teljes attenuálódást (NS1-P250L), kettő esetben pedig (NS3-H249P és az NS4B-E249G) *in vivo* részleges, de nem szignifikáns attenuációt figyeltünk meg. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a két genetikai vonal (1-es és 2-es) vírusai ugyan részben hasonlítanak egymásra, patogenitásukat nem feltétlenül ugyanazok a genetikai tényezők befolyásolják. Ezért tartjuk fontosnak a jövőben az egyre nagyobb területeket meghódító, neuroinvaszív, 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV-törzsek további vizsgálatát és patogenitásmarkereinek felderítését.

A WNV mellett egyéb flavivírusok jelenlétére is vizsgáltuk a NÉBIH ÁDI-ba érkezett vadmadárhullákat. Vizsgálataink során USUV-fertőzést állapítottunk meg feketerigókban és fenyőrigóban. Az USUV a WNV-vel rokon, szúnyogok által terjesztett, afrikai flavivírus. Először 2001-ben ausztriai vadmadaraktól (főként feketerigókból) izolálták Európában (48), de retrospektív vizsgálatok már 1996-os olaszországi madármintákból is kimutatták a vírus jelenlétét (47). Magyarországi előfordulásáról 2005 óta tudunk (4). A vizsgálatok eredményei felhívják arra a figyelmet, hogy a WNV mellett az USUV is endémiás hazánkban, így az is okozhat vadmadarakban agyvelőgyulladásos eseteket; valamint a WNV és az USUV hasonló felszíni antigénjei miatt egyes szerológiai próbákban keresztreakciók alakulhatnak ki a vírusok között, ami megnehezíti a pontos diagnózis felállítását.

KÖVETKEZTETÉSEK

A nyugat-nílusi vírus egzotikus (2-es genetikai vonalhoz tartozó) törzse több mint tíz éve bukkant fel Magyarországon. Az utóbbi években végzett vizsgálatok eredményei egyértelműen bizonyítják, hogy a vírustörzs endémiássá vált az országban, és széles körben elterjedt Közép- és Dél-Európában. Mivel a vírus éves aktivitását jelentősen befolyásolja az időjárás, a kompetens vektorok és fogékony gerinces gazdák gyakorisága, a fertőzések és megbetegedések száma ingadozó. Az emberek és háziállatok fertőzéseinek elkerülésére nem specifikus védekező

A szerzők olyan, több pilléren álló, szervezett programot dolgoztak ki és alkalmaztak, amely sikeresen mutatta ki a WNV jelenlétét gerinces gazdáiban és ízeltlábú vektorokban

módszereket (pl. szúnyogirtás, repellens szerek használata) lehet alkalmazni. A védekezés megfelelő időzítéséhez szükség van a vírusaktivitás nyomon követésére. Kutatásaink során olyan, több pilléren álló, szervezett programot dolgoztunk ki és alkalmaztunk, amely passzív és aktív elemek bevonásával, sikeresen mutatta ki a WNV (és USUV) jelenlétét gerinces gazdáiban és ízeltlábú vektorokban. A felmérő vizsgálatok folytatása köz- és állat-egészségügyi szempontból fontos adatokkal szolgálhatna, és kiterjesztése még pontosabb előrejelzéseket tenne lehetővé. Ezen túl, a mintákat további, zoonotikus arbovírusok (pl. bunyavírusok, alphavírusok, Zika-vírus stb.) jelenlétére is meg lehetne vizsgálni, így újonnan felbukkanó, egzotikus vírusok kimutatására is lehetőség nyílna.

A nyugat-nílusi vírus virulenciájáért felelős genetikai markerek vizsgálatának a betegség kórfejlődésének pontosabb megismerése mellett az oltóanyag-fejlesztésben is felhasználható eredményei lehetnek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők ezúton is köszönetet mondanak az entomológus szakembereknek a szúnyoggyűjtési és szúnyogmeghatározási munkájukért. Köszönettel tartozunk a NÉBIH ÁDI Molekuláris Biológiai Laboratórium dolgozóinak, JUHÁSZ ÁGNESNEK és OTTINGERNÉ MARIKÁNAK a szúnyog- és vadmadárminták előkészítéséért. A kutatásokat az „EDENext” (FP7-HEALTH-2010/261504; <http://www.edenext.eu>) és a „VECTORIE” (FP7-HEALTH-2010/261466; <http://vectorie.eu/>), Európai Unió kutatási programok támogatásával végeztük.

IRODALOM

- ANDERSON, J. F. – MAIN, A. J.: Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. *J. Infect. Dis.*, 2006. 194. 1577–1579.
- AUDSLEY, M. – EDMONDS, J. et al.: Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile virus. *Virology*, 2011. 414. 63–73.
- BAGNARELLI, P. – MARINELLI, K. et al.: Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill.*, 2011. 16. 1–4.
- BAKONYI, T. – ERDÉLYI, K. – URSU, K. – FERENCZI, E. – CSÖRGŐ, T. – LUSSY, H. – CHVALA, S. – BUKOVSKY, C. – MEISTER, T. – WEISSENBOCK, H. – NOWOTNY, N.: Emergence of Usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.*, 2007. 45. 3870–3874.
- BAKONYI, T. – IVANICS, É. – ERDÉLYI, K. – URSU, K. – FERENCZI, E. – WEISSENBOCK, H. – NOWOTNY, N.: Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2006. 12. 618–23.
- BAKONYI, T. – FERENCZI, E. – ERDÉLYI, K. – KUTASI, O. – CSÖRGŐ, T. – SEIDEL, B. – WEISSENBOCK, H. – BRUGGER, K. – BÁN, E. – NOWOTNY, N.: Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.*, 2013. 165. 61–70.
- BECKER, N. – PETRIĆ, D. et al.: *Mosquitoes and their control*. Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York, 2003. 498.
- BOTHA, E. M. – MARKOTTER, W. et al.: Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008. 14. 222–230.
- CHASKOPOULOU, A. – DOVAS, C. et al.: Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill.*, 2011. 16. 1–4.
- CICCOZZI, M. – PELETTO, S. et al.: Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect. Genet. Evol.*, 2013. 17. 46–50.
- CSANK, T. – BHITE, K. et al.: Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set. *Arch. Virol.*, 2016. 161. 1679–1683.
- DONADIEU, E. – BAHUON, C. et al.: Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses*, 2013. 5. 2856–80.
- ECDC Annual epidemiological report. *Emerging and vector-borne diseases*, 2014. www.ecdc.europa.eu
- ECDC European Centre of Disease Prevention and Control. West Nile Fever. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/pages/index.aspx.
- ENGLER, O. – SAVINI, G. et al.: European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013. 10. 4869–4895.
- ERDÉLYI, K. – URSU, K. – FERENCZI, E. – SZEREDI, L. – RÁTZ, F. – SKÁRE, J. – BAKONYI, T.: Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vect. B. Zoon. Dis.*, 2007. 7. 181–188.
- FARAJOLLAHI, A. – FONSECA, D. M. et al.: „Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.*, 2011. 11. 1577–1585.
- GÓMEZ-DÍAZ, E. – FIGUEROLA, J.: New perspectives in tracing vector-borne interaction networks. *Trends Parasitol.*, 2010. 26. 470–476.
- HAYES, E. B. – KOMAR, N. et al.: Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg. Inf. Diseases*, 2005. 11. 1167–1173.

20. HIGGS, S. – SNOW, K. R. – GOULD, E.: The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2004. 98. 82–87.
21. KORBACSKA-KUTASI, O. – BAKONYI, T. – LECOLLINET, S. – BIKSI, I. – FERENCZI, E. – SÁRDI, S. – SZENCI, O.: Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile Virus in Hungary. *J. Vet. Int. Med.*, 2011. 25. 586–591.
22. KRISZTALOVICS, K. – FERENCZI, E. et al.: West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008. *Euro Surveill.*, 2008. 13. 1–3.
23. KULASEKERA, V. L. – KRAMER, L. et al.: West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001. 7. 722–725.
24. KUROLT, I. C. – KRAJINOVIĆ, V. et al.: First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Res.*, 2014. 189. 63–66.
25. LINKE, S. – ELLERBROK, H. et al.: Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 2007. 146. 355–358.
26. LIU, W. J. – WANG, X. J. et al.: A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J. Virol.*, 2006. 80. 2396–2404.
27. LVOV, D. K. – BUTENKO, A. M. et al.: West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch. Virol. Suppl.*, 2004. 18. 85–96.
28. MACKENZIE, J. S. – BARRETT, A. D. – DEUBEL, V.: The Japanese encephalitis serological group of flaviviruses: a brief introduction to the group. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2002. 267. 1–10.
29. NAGY, A. – BÁN, E. – NAGY, O. – FERENCZI, E. – FARKAS, Á. – BÁNYAI, K. – FARKAS, SZ. – TAKÁCS, M.: Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch. Virol.*, 2016. 161. 1797–1806.
30. NASCI, R. N. – WHITE, D. J. et al.: West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001. 7. 626–630.
31. PAPA, A. – BAKONYI, T. et al.: Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011. 17. 920–922.
32. PETERSEN, L. R. – ROEHRIG, J. T.: West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001. 7. 611–614.
33. PETROVIĆ, T. – BLAZQUEZ, A. B. et al.: Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill.*, 2013. 18. 1–8.
34. PLATONOV, A. E. – FEDOROVA, M. V. et al.: Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol. Res.*, 2008. 103. 45–53.
35. PLATONOV, A. E. – KARAN', L. S. et al.: Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2011. 2. 29–37.
36. REITER, P.: West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.*, 2010. 15. 1–7.
37. ROSSI, S. L. – FAYZULIN, R. et al.: Mutations in West Nile virus non-structural proteins that facilitate replicon persistence *in vitro* attenuate virus replication *in vitro* and *in vivo*. *Virology*, 2007. 364. 184–195.
38. RUDOLF, I. – BAKONYI, T. et al.: 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.*, 2014. 19. 2–5.
39. SAVINI, G. – CAPELLI, G. et al.: Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.*, 2012. 158. 267–73.
40. SÁRDI S. – SZENTPÁLI-GAVALLÉR K. – BAKONYI T. – SZENCI O. – KUTASI O.: Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelő gyulladása. Irodalmi áttekintés. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2012. 134. 707–717.
41. SERVICE, M. W.: Feeding behaviour and host preferences of British mosquitoes. *Bull. Entomol. Res.*, 1971. 60. 653–661.
42. SIRBU, A. – CEIANU, C. S. et al.: Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.*, 2011. 16. 1–5.
43. SÓS E. – MOLNÁR V. – DANDÁR E. – BÁLINT Á. – BAKONYI T.: Szerológiai vizsgálatok hazai tűzok- (*Otis tarda*) állományokban: Serológiai examination in Hungarian great bustard (*Otis tarda*) populations. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2012. 134. 361–365.
44. SZENTPÁLI-GAVALLÉR, K. – ANTAL, L. – TÓTH, M. – KEMENESI, G. – SOLTÉSZ, Z. – DÁN, Á. – ERDÉLYI, K. – BÁNYAI, K. – BÁLINT, Á. – JAKAB, F. – BAKONYI, T.: Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011–2012 in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2014. 14. 648–655.
45. SZENTPÁLI-GAVALLER, K. – LIM, S. M. – DENCSE, L. – BANYAI, K. – KORAKA, P. – OSTERHAUS, A. D. – MARTINA, B. E. – BAKONYI, T. – BALINT, A.: *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*, 2016. 8. 2–20.
46. VARGA J. – FODOR L.: Nyugat-nílusi láz. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2003. 125. 451–457.
47. WEISSENBOCK, H. – BAKONYI, T. et al.: Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013. 2. 274–277.
48. WEISSENBOCK, H. – KOLODZIEJEK, J. et al.: Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002. 8. 652–656.
49. WODAK, E. – RICHTER, S. et al.: 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.*, 2011. 149. 358–366.
50. WELTE, T. – XIE, G. et al.: Immune responses to an attenuated West Nile virus NS4B-P38G mutant strain. *Vaccine*, 2011. 29. 4853–4861.
51. WICKER, J. A. – WHITEMAN, M. C. et al.: Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology*, 2012. 426. 22–33.
52. ZAMBURLINI, R.: A new culicid in Italy: *Aedes* (*Ochlerotatus*) *annulipes* (Diptera, Culicidae). *Parassitologia*, 1996. 38. 491–494.
51. ZIMMERMAN, J. H. – HANAFI, H. A. – ABBASSY, M. M.: Host-feeding patterns of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) on farms in Gharbiya Governorate, Egypt. *J. Med. Entomol.*, 1985. 22. 82–87.

Közlésre érkk.: 2016. máj. 5.