

Állatorvostudományi Egyetem

Járványtani és Mikrobiológiai tanszék

**Telepesen költő madárfajok nyugat-nílusi vírus
fertőzöttségének vizsgálata**

Szakdolgozat

Készítette: Czikollai Anna

Témavezetők: Dr. Marosi András ÁTE, egyetemi adjunktus,
Dr. Erdélyi Károly Állatorvostudományi Kutatóintézet,

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1.A nyugat-nílusi láz elterjedése	5
3.2. Kóroktan	7
3.3. Járványtan.....	8
3.4. A vizsgált madártársulás ökológiája	10
3.5. Tünetek.....	12
3.6. Kórfejlődés.....	13
3.7. Kórtan	15
4.Anyag és módszer	16
4.1. Mintagyűjtés	16
4.2. ELISA vizsgálat	17
4.3. Módosított PCR vizsgálat.....	19
5. Eredmények.....	21
6.Következtetések.....	26
7.Összefoglalás	28
8.Summary	29
9.Irodalomjegyzék	30
10. Köszönetnyilvánítás.....	33

1. Rövidítések jegyzéke

WNV = Nyugat-nílusi láz vírusa (West Nile virus)

JEV = Japán encephalitis vírus

RT-PCR = Reverse transcription-polymerase chain reaction

ECDC = Európai Betegmegelőzési és Járványvédelmi Központ (European Centre for Disease Prevention and Control)

WNND = West Nile neuroinvasive disease

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

OD = Optikai sűrűség (Optical density)

NNGYK = Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ

IFN = Interferon

NK = Természetes ölósejtek (Natural killer cells)

MPS= Mononukleáris phagocytá rendszer (Mononuclear phagocyte system)

USUV= Usutu vírus (Usutu virus)

2. Bevezetés

A XXI. század egyik legfenyegetőbb problémája a globális felmelegedés okozta klímaváltozás. Az éghajlatváltozás veszélyezteti az emberek és az élővilág egészségét, számos környezeti és egészségügyi problémát okoz. Új kórokozók és ezáltal új fertőző betegségek jelennek meg. Egyre több kórokozó kerül át állatról emberre, mivel a változások új lehetőséget biztosítanak a vírusoknak, hogy új gazdafajokhoz alkalmazkodjanak, majd ezeken a közvetítőkön keresztül akár vektorok segítségével, az emberre is áterjedjenek. A klímaváltozás elősegíti az új vektorok – köztük különféle szúnyogfajok – megjelenését, térbeli és időbeli eloszlásának megváltozását is (például a trópusokról mérsékelt európai régióba kerülését).

Ezek alapján egyre fontosabbá válik a zoonózisok kitörésének kockázatfelmérése, az állati hordozók elterjedtségének kontrollálása, a fertőzöttség monitorozása. A zoonózisok és a járványok megelőzésére az egyetlen esély, ha próbáljuk a vírusok terjedését, genetikai és virulencia változásait időben detektálni és nyomon követni.

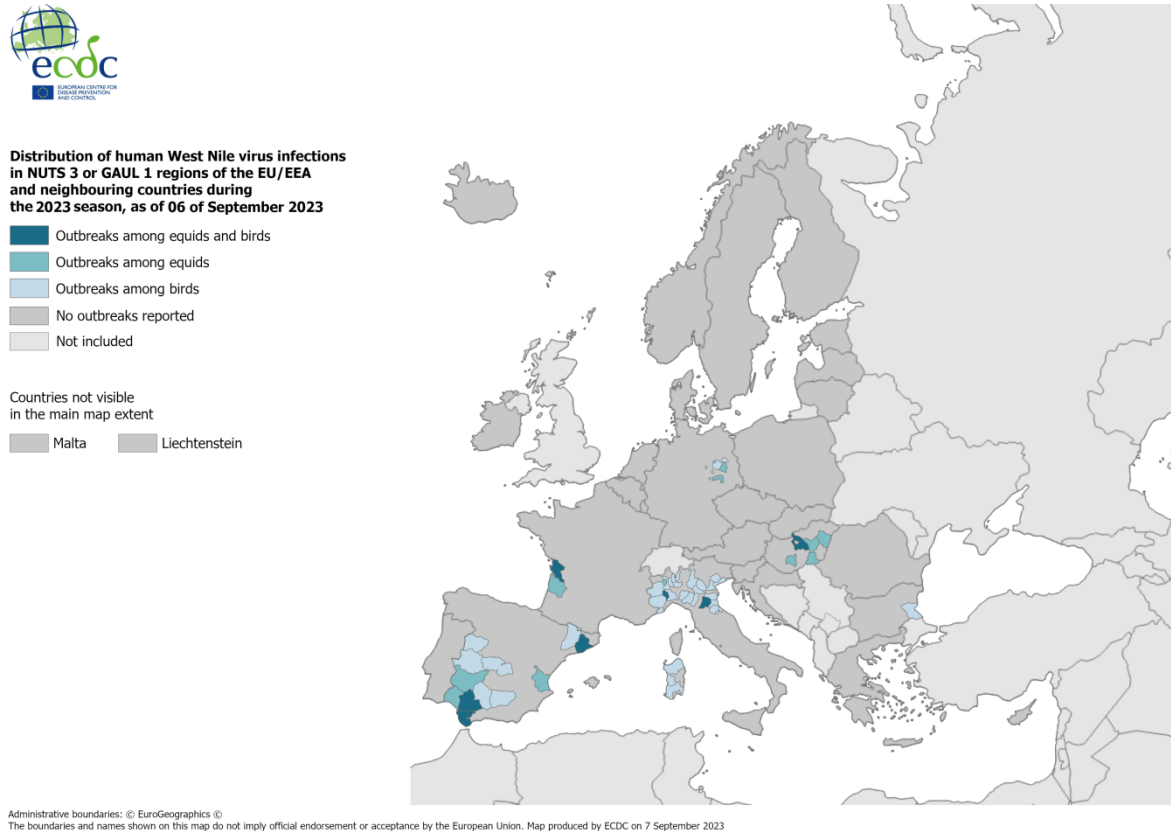
A dolgozatom témája is egy ilyen zoonózis nyomkövetése. A telepesen költő madárfajok nyugat-nílusi vírus (WNV) fertőzöttségének vizsgálatával próbáltuk feltérképezni hogy milyen szerepet játszanak a nyugat-nílusi láz kórokozójának terjesztésében.

E kutatás célja egy hazai madártársulás, a telepesen költő kék vércsék (*Falco vespertinus*), vörös vércsék (*Falco tinnunculus*) és csókák (*Corvus monedula*) vírusfertőzöttségének és a flavivírusok terjesztésében betöltött szerepének vizsgálata, amelyet 2022/2023-ban végeztünk, szárnyvénából vett vérminták vizsgálatával.

A nyugat-nílusi láz kórokozója a *Flaviviridae* víruscsaládba, ezen belül a *Flavivirus* nemzetségbe tartozik. Széles körben elterjedt, zoonotikus kórokozó, amely idegrendszeri tüneteket és lázas megbetegedést okozhat emberben és sok más gerinces fajban.

2018-ban Magyarországon és egész Európában az esetszámok drasztikus növekedése volt megfigyelhető. Az előző évi adatokhoz képest több mint hétszeresére nőtt a fertőzöttek száma, az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) adatai alapján [1].

A 2023-as év augusztásával bezárólag 26 járványkitörést jelentettek lovakban és 115-öt madarak körében az Európai Unió területén (**1. ábra**). Lovakat érintő megbetegedést jelentettek Spanyolország (12), Magyarország (6), Olaszország (4), Németország (2) és Franciaország (2) területén. Madarakat érintő megbetegedést jelentettek Olaszország (92), Németország (10), Bulgária (1), Franciaország (1) és Magyarország (1) területén.



1. ábra Nyugat-nílushi láz járványkitörései lovak és madarak körében, 2023 szeptember 6. az ECDC (European Centre for Disease Prevention) honlapja alapján

2023 nyarán a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ (NNGYK) is figyelmeztetést adott ki a lakosság részére. A szúnyogok elleni védekezésre kérték a lakosságot, szabadban hosszú szárú, hosszú ujjú ruházat viselését javasolták, a lehetséges csípéseknek kitett terület csökkentése céljából, továbbá rovarriasztó szerek használatát szorgalmazták. A javaslat szerint, ha valaki 2-12 nappal a szúnogcsípés után lázat és ízületi fájdalmat tapasztal, orvoshoz kell fordulnia. 2023-ban a 34. hetet bezáróan jelentett esetek száma 15 fő volt (14 hazai és 1 importált) [2].

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A nyugat-nílusi láz elterjedése

A nyugat-nílusi láz kórokozója (West Nile Virus, WNV) széles körben elterjedt vírus. Előfordul Afrikában, Európában, Ázsiában és Ausztráliában is.

Először 1937-ben Ugandában izolálták a vírust egy humán lázas betegből [3]. Az elnevezés Uganda West-Nile tartományára utal.

Az első európai megjelenést, szintén egy humán megbetegedés kapcsán, 1958-ban Albániában írták le. Később az 1960-as években Franciaországban, Oroszországban, Spanyolországban, Romániában, Ukrajnában, Csehszlovákiában is diagnosztizáltak humán eseteket. Ezzel párhuzamosan izolálták a vírus jelenlétét vadmadaraktól, rágcsálóktól, lovakból, szúnyogokból, kullancsokból [4].

A következő megbetegedési hullám az 1990-es években jelentkezett. A vírus Algériában, Romániában, Tunéziában, Oroszországban, Izraelben és Szudánban okozott humán megbetegedéseket. Ugyanebben az időben a betegség Franciaországban és Észak-Olaszországban elsődlegesen lovakban jelentkezett, bár humán esetek is előfordultak [4].

Európában az eddigi legjelentősebb emberi megbetegedést okozó járvány Romániában zajlott (1996 és 1997), ahol több mint 500 klinikai esetet írtak le és a halálozási ráta is megközelítette a 10%-ot [5].

A nyugat-nílusi láz az USA-ban 1999-ben jelent meg, New Yorkban, amikor több ezer madár hullott el és több fatális kimenetelű humán eset is volt. Nem sokkal később a megbetegedés az egész Észak-Amerikai kontinensen elterjedt [6]. Ekkor vált nyilvánvalóvá a vírus jelentős terjedési potenciálja.

A vírus hirtelen megjelenésére és gyors terjedésére több szervezet is felfigyelt. A Smithsonian Intézet 2003-ban rendezte meg a Nyugat-nílusi vírus és Vadegészség nevű konferenciáját, ahol megvitatták hogyan hat a nyugat-nílusi láz a közegészségügyre és a gazdálkodásra, és felállították a legfontosabb kutatási prioritásokat [7].

Hazánkban 2003-ban írták le az első WNV okozta megbetegedéseket. 2003 és 2004 között két különböző vírustörzs megjelenését is detektálták. A megbetegedéseket ludaknál, héjánál és emberekben észlelték.

2003-ban egy házilúd-állomány fertőződött. A megbetegedett állatokban a vírus letális kimenetelű encephalitist okozott. Az idegrendszeri tüneteket főleg fiatal, 6 hetes madaraknál észlelték. Ataxia, torticollis, inkoordináció megjelenése mellett kondícióromlás volt megfigyelhető. A járványkitörés helyén 14 humán esetet azonosítottak, amelyeknél a betegek a WNV okozta encephalitis és meningitis tüneteit mutatták. Az állatok gondozása során az ott dolgozók is ki voltak téve a fertőzésnek. Szúnyogok közvetíthették a fertőzést az emberekre a fertőzött madarokról [8]. A filogenetikai elemzés és a genomszekvenálás kimutatta, hogy az azonosított vírustörzs közeli rokonságot mutat az 1998-ban Izraelben izolált törzssel (1-es genetikai vonal).

2004-ben több növendék héja (*Accipiter gentilis*) is mutatott központi idegrendszeri tüneteket Magyarországon. RT-PCR segítségével a 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzset azonosítottak. Ennek kiemelt jelentősége van, ekkor jelent meg először egy afrikai eredetű törzs (2-es genetikai vonal) Európában. Az ezt követő években Magyarországon már csak a 2-es genetikai vonalhoz tartozó törzset azonosítottak, de jelentős esetszám nem volt [9]. 2007-ben a kék és vörös vércsékben is kimutatták a vírust.

A vírus endémiás lett Magyarországon, habár 2004 és 2007 között csak sporadikus esetek jelentkeztek. 2008-ban megjelent Magyarországon a WNV neuroinvazív tünetegyüttes (WNND), ami idegrendszeri tüneteket, encephalitist, meningitist okozhat embereknél. A WNND a fertőzöttek 1%-ban alakul ki és súlyos neurológiai tüneteket okoz. A vírus Ausztria keleti részére is áterjedt. 2009-ben járványkitörés alakult ki Magyarországon és Ausztriában is, amit a 2004-ben Magyarországon megjelenő 2-es genetikai variációhoz hasonló törzs okozott. A vírus később tovább terjedt, 2010-ben járványt okozott Görögország északi részén [10]: összesen 262 beteget jelentettek, 197 betegnél (75%-nál) alakult ki a WNND (encephalitis és meningitis) és 65 betegnél (25%-nál) WNV okozta lázat állapítottak meg [11].

2018-ban Európában hétszeresére emelkedett a WNV okozta humán megbetegedések száma. Magyarországon is jelentősen megemelkedtek az esetszámok. A mai napig nem ismert mi volt a pontos kiváltó ok. Országszerte humán és állategészségügyi kutatásokba kezdtek, több szerológiai vizsgálatot is végeztek. A filogenetikai vizsgálatok alapján a megbetegedéseket okozó WNV törzs endémiásnak bizonyult. Feltételezések alapján a szúnyogoknak kedvező időjárási viszonyok okozhatták a járványos megbetegedéseket [12].

Korábban azt feltételezték, hogy a vírust más országokból hurcolják be Európába időről-időre. Azonban ma már tudjuk, hogy ugyanaz a vírustörzs fordul elő hazánkban az évek során.

A vizsgálatok rámutattak, hogy Magyarország fontos szerepet tölt be ebben a földrajzi térségben a WNV széles körű elterjedésében és diverzitásában [13].

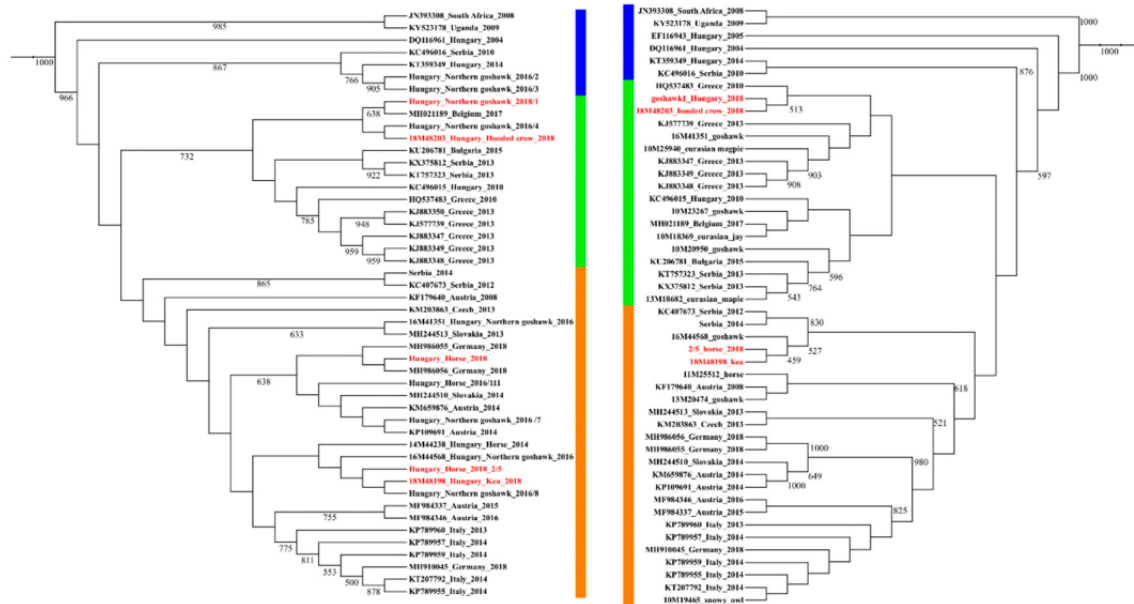
3.2. Kóroktan

A nyugat-nílusi láz kórokozója (West Nile vírus, WNV) a *Flaviviridae* víruscsaládba, *Flavivirus* nemzetségbe tartozik, a japán encephalitis vírus (JEV) komplex tagja. A csoport tagjai hasonló genetikai és antigenitású tulajdonságokkal rendelkeznek. Ebbe a csoportba tartozik a WNV mellett a Murray-völgyi láz vírus, az Usutu vírus és még sok más vírusfaj. A vírus 40 nm átmérőjű ikozaéder szimmetriájú kapsziddal rendelkezik, örökítő anyaga lineáris pozitív szálú RNS genom [14]. A vírust lipidburok veszi körül, amely érzékeny a környezeti hatásokra, mint fertőtlenítőszeres, magas hőmérséklet. A vírus ellenálló képessége a többi szúnyogok által terjesztett flavivírushoz képest csekély. A vírus gazdaspektruma széles, szinte bármelyik madár- vagy emlősfajt képes megbetegíteni, de kimutatták már alligátorokból és békákból is [15].

A WNV-nek több genetikai variánsát is azonosították. A filogenetikai vizsgálatok szerint két genetikai vonalat különítünk el. Az 1-es filogenetikai vonal három alcsoportra osztható, földrajzi elhelyezkedés alapján. Az A-csoportba tartozik Európa, Afrika, Közel-Kelet és Amerika. A B-csoportba az ausztráliai törzs tartozik, amit más néven Kunjin törzsnek is neveznek. Indiát eleinte mint a C-csoportba tartozó országot jelölték meg [16]. Később, mint 5-ös genetikai vonal azonosították [17]. A 2-es genetikai vonalhoz tartozik a B956 törzs, a Szaharától délre fekvő országokban és Madagaszkáron izolált törzs. Ide tartozik még a 2000-es években Közép-és Dél-Európa országaiba eljutott vírustörzs, ami azóta is jelen van. A két fő vonal mellett egy 3-as genetikai vonalat is azonosítottak a osztrák-cseh határon, amit Rabensburg vírusnak neveztek el és egy 4-es genetikai vonalat is a Kaukázuson [16].

Hazánkban végzett 2018-as filogenetikai analízisek alapján a Magyarországon megjelenő vírustörzs két alcsoportra osztható. Az NS3 és NS5 nem struktúrális fehérjét kódoló,

nukleotidokat tartalmazó régiók alapján. Az egyikük szoros rokonságban áll a balkáni alkláddal, míg a másik a dél- és nyugat-európai országokkal hasonlatos [12]. (2.ábra)



2.ábra A filogenetikai ábra a hazai lovakból és vadmadaraktól származó minták NS3 (bal oldalon) és NS5 (jobb oldalon) gén szekvenciáját szemlélteti, összehasonlítva a régióban található hasonló származású 2010 és 2018 között azonosított szekvenciákkal. Az ős afrikai, magyar és szerb WNV 2-es genetikai vonalat kék, míg a két jelentősebb alkládot zöld (balkáni alklád) és narancssárga (közép/észak-nyugat-európai alklád) színű csík jelöli. A piros kiemelés a 2018-as hazai mintákat reprezentálja [12].

Szezonalitás jellemzi a megbetegedések jelentkezését. A legmagasabb esetszám az augusztus-szeptemberi időszakra tehető [1]. A különböző környezeti tényezők, mint a meleg nyár, nagy mennyiségű csapadék, növelhetik a lovakat és embereket érintő esetszámokat [12].

3.3. Járványtan

A vírus terjesztésében a *Culicidae* családba, a *Culex* nemzetségbe tartozó szúnyogok, mint biológiai vektorok játszanak fontos szerepet. Több mint 65 szúnyogfajból mutatták ki a

vírust [18]. Legfőképpen a *Culex pipens pipiens* terjeszti madarak körében a vírust, ez a szúnyogfaj ornithofil, ami azt jelenti, hogy csak madarakon táplálkozik. A *Culex pipiens molestus* csak emlős gazdán táplálkozik, ezért a terjesztésben való szerepe csekély. A madárról emberre való átvitelben az úgy nevezett „híd vektor” szúnyogok felelősek, amelyek képesek madarakon és embereken is táplálkozni. A pipens és a molestus biotípusok hibridjei „híd vektornak” számítanak, mert madárról is képesek közvetíteni a vírust emlősökre [19].

A fertőzést a fertőzött madárból vért szívott szúnyog képes közvetíteni emlősökre, ritkább esetben vérátömlesztéssel vagy szervátültetéssel is átvihető. A ragadozó madarak a fertőzött zsákmány elfogyasztása útján is képesek fertőződni. Emberekben, lovakban és más emlősökben a vírus nem képes olyan mértékben jelen lenni a vérben, hogy tartós viraemiát alakítson ki, ezért ezek a fajok járványtani szempontból zsákutcának számítanak, róluk a vektorok nem képesek közvetíteni a vírust [20].

A szúnyogok mellett kullancsokban is találtak WNV-t, így a terjesztésben, ezen vérszívók is szerepet játszhatnak, habár ez egyelőre még tisztázatlan [21].

A vírus fenntartásában fontos szerepet játszanak a rezervoár fajok, legfőképpen a vándormadarak. A vándormadaraknak nagy szerepük van a vírus földrajzi elterjesztésében. Több mint 280 madárfajból mutatták ki a vírust az Egyesült Államokban 1999-2016 között (A CDC – Centers for Disease Control and Prevention– honlapja alapján) [22]. Különböző madárfajoknak eltérő szerepe van a nyugat-nílusi vírus elterjesztésében és fenntartásában. A vírus terjedésének megértéséhez lényeges a kulcsfontosságú rezervoár fajok azonosítása.

A varjúfélék, elsősorban az újvilági fajok, a fogékonyabb fajokhoz tartoznak, fertőződés esetén náluk nagyobb valószínűséggel alakul ki halálos encephalitis, más fajok esetén inkább szubklinikai az elváltozás [23].

A házi tyúk kevésbé fogékony a házimadarak közül, míg galambokban, vízimadarokban (kacsa, lúd) általában jelentkeznek idegrendszeri tünetek is [24].

Európában a ragadozó madarak közül a héja (*Accipiter gentilis*) az amely a legjobban összekapcsolható a WNV fertőzéssel. Ennek összefüggése egyelőre tisztázatlan, valószínű, hogy a ragadozó mivolta és a predáció során elejtett WNV-al fertőzött madarak elfogyasztása lehet az ok [25].

3.4. A vizsgált madártársulás ökológiája

A kék vércse (*Falco vespertinus*) a sólyomalakúak (*Falconiformes*) rendjébe tartozó ragadozó madár. **(3. ábra)** A vércsék egyik jellegzetessége, hogy nem építenek fészket, hanem más madarak fészkében költenek. A vetési varjak fészkei tökéletes költőhelyet biztosítanak számukra. Az ok a költési időszak eltolódásában rejlik. A vetési varjak költése a március-áprilisi hónapokra tehető, még a kék vércsék inkább a május-júniusi időszakban költenek. Valószínűsíthető, hogy az odúlakó papagájokkal közös ősz lehet az oka, a fészkeképzési viselkedésmintázat hiányának.



3.ábra A jobb oldalon a palaszürke alapszínű, vörös gatyával rendelkező hím kék vércse, a bal oldalon pedig az okkersárgás-barnás színezetű tojót láthatjuk.

Forrás: Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület honlapja

<https://mme.hu/kek-vercse>

Hazánkban olyan műfészek-telep rendszereket hoztak létre, amelyek segítik az idegen régióból érkező kék vércsék letelepedését és lehetőséget biztosítanak számukra a költsékre. A hatékony költés két legpontosabb szempontja az időjárás és a táplálékkínálat.

A kék vércse 1906 óta védett és 1954 óta fokozottan védett faj Magyarországon. Az Európai Unió kék vércse állományának mintegy 40%-a költ Magyarországon. Kiemelten fontos a Kárpát-medencében költő állomány védelme. 1949-ben az egész ország területén megtalálható volt. Viszont a vetésivarjú-telepek eltűnésével párhuzamosan 2006-ban szinte teljesen eltűnt a Dunántúlról, a Fertő tó kivételével. 2017-ben a műfészek-telepek kihelyezésének köszönhetően ismét elkezdtek megjelenni a Dunántúlon is.

A vércsék március végén jelennek meg a Kárpát-medencében. Az oda vezető úton sok madár elhullik, általában a jobb kondíciójú és legjobb repülő egyedek járnak sikerrel. Ennek legfőbb oka, hogy a legrövidebb út során az észak-keleti passzát-szelekkel kell szemben repülniük [26].

A fiókák nevelése kulcsfontosságú feladata a felnőtt madaraknak. Legfőképpen a hímek gyűjtik be a zsákmányt és szállítják a fiókáknak, előfordul azonban, hogy a tojó is besegít. A táplálékuk összetétele nagyrészt ízeltlábúakból, szöcskékből áll. Emellett vadásznak kisebb testű rágcsálókra és ásóbékákra is. Azonban a mezei pockok gyorsan tanulnak és képesek hosszabb időre elbújni a ragadozó madarak elől a vadászat idején. Ezért a kék vércséknek sokszor hosszabb utat kell megtenniük, hogy sikeres vadászattal zárják a napot. Képesek egymás eredményes vadászatának helyét kifigyelni, a hatékony táplálékszerzés érdekében. Ez is azt bizonyítja, milyen előnyöket tartogat számukra a telepesen költő életmód [26].

A vörös vércse (*Falco tinnunculus*) az egyik legismertebb ragadozómadarunk. A kék vércséhez hasonlóan nem épít saját fészket hanem más madarak pl. dolmányos varjak fészkeiben, kőbányákban, fák odvában fészkel. Előszeretettel jelenik meg lakott területen is, kedvelt költési helye a templomtornyok tetőzete. Táplálkozása többnyire megegyezik a kék vércséével, azonban a vörös vércse több mezei pockot fogyaszt, míg a kék vércse menüje nagyrészt ízeltlábúakból áll.

A vörös vércsék jelentős része délre vonul a telelési időszak alkalmával, azonban néhány idősebb példány nálunk tölti a telet. Míg a kék vércsék a hosszú távú vonuló fajokhoz

sorolhatóak, a vörös vércsék inkább rövid távra vonulnak, a telet a Földközi-tenger térségében töltik.

A csóka (*Coloeus monedula*) a verébalakúak rendjébe (*Passeriformes*) a varjúfélék családjába (*Corvidae*) tartozik. Sokszor a vércse-költőládában is megtelepszik, alkalmanként kék vagy vörös vércsével is osztozik egy fészken. A nagy versengés során általában csak az egyik fél győzedelmeskedik (általában a vércsék), azonban ritkán előfordul hogy a pár mindkét fészekalj fiókait gondozza [27].

A telepes költés miatt a madaraknál gyakori a testi kontaktus, ez elősegíti a különböző fertőző betegségek terjedését. Ilyen megbetegedés pl. a mycoplasmosis, ami felső légúti tüneteket és kötőhártya-gyulladást okoz fiókákban. A fiókák számára nagy halálozási rátával bíró megbetegedés a lábszétcsúszás (perózis), ami a tibiotarsus deformitásával jár.

Nagy jelentőségű továbbá a nyugat-nílusi láz, amit 2007-ben már vörös és kék vércsékben is megtaláltak és azonosítottak [28]. A legtöbb megbetegedés során a vércsékben nem alakulnak ki klinikai tünetek. Vannak azonban olyan esetek, ahol jelentkezhetnek súlyosabb központi idegrendszeret érintő tünetek is. Emellett általában gyors kondícióromlás, levertség, remegés és görcsök is kialakulhatnak.

Korábbi kutatások már vizsgálták a kék vércsék nyugat-nílusi láz terjesztésében betöltött szerepét. Ezek a vizsgálatok nem támasztották alá a faj jelentőségét a vírus fenntartásában és terjesztésében. Kevés egyedben alakul ki viraemia, kialakulás esetén is csak rövid viraemiás periódusokban jelentkeznek. Sok a szeropozitív egyed, így valószínű, hogy a populáció nagy része maternális ellenanyaghoz jut [29].

3.5. Tünetek

A nyugat-nílusi láz zoonotikus megbetegedés. Hazánkban sporadikusan jelentkezik augusztus-szeptemberi időszakban, ekkor a legnagyobb a szúnyogok aktivitása. Az emberek WNV fertőzése 70-80%-ban tünetmentesen zajlik le. A maradék 20-30%-ban általában influenzaszerű tünetek, fejfájás, gyengeség, ízületi fájdalmak jelentkeznek. Hányás, hasmenés is előfordulhat. Az esetek közel 1%-ban kialakulhat agyvelő- és agyhártyagyulladás.

A vírus a viraemiás időszak alatt emberről emberre is tud terjedni transzfúzió, transzplantáció útján és ritkán transzplacentárisan is. A véradók vérenek vizsgálatára vírus nukleinsav-kimutatást végeznek, a vérkészítmények biztonságosságának biztosítására [1].

Madarakban az esetek 60%-ban kevésbé jellegzetes tüneteket láthatunk, mint depresszió, anorexia, dehidráció. 30%-ban idegrendszeri tünetek jelentkeznek, mint ataxia, torticollis, emellett megfigyelhető még a rossz általános állapot. A maradék 10%-ban koordinálatlan repülés, paresis és görcsök jelentkeznek. Ragadozó madarak és baglyok körében az egyik legjellemzőbb elváltozás a vakság, mely jelentősen megnehezíti a vadászatot [30]. A fiatalabb egyedeknél gyakrabban alakul ki halálos kimenetelű meningoencephalitis. Bizonyos esetekben előfordulhat a tünetmentes fertőzés is [8]. A tünetek megjelenése esetén fontos az elkülönítő kórjelzés. Hasonló tüneteket eredményezhet madarakban a magas patogenitású madárinfluenza, baromfipestis, a Marek-betegség és különböző vitaminhiányok is (E, B1, B2 vitaminhiány).

Lovak esetében kólikás nyugtalanság, levertség, átmeneti láz, idegrendszeri tünetek jelentkeznek. Leggyakrabban izomremegés, ataxia, végtaggyengeség és a bőr túlérzékenysége figyelhető meg. A tünetek súlyossága nagyon változó lehet, a teljesen tünetmentestől a tudatvesztésig is terjedhet [31]. A nyugat-nílusi vírus okozta megbetegedést el kell különíteni más idegrendszeri tüneteket okozó betegségektől, mint a veszettség, a lovak togavírus okozta agy- és gerincvelő gyulladása, a herpeszvírus-fertőzések, bornai betegség és a botulizmus.

3.6. Kórfejlődés

A fertőzött szúnyog a vérszívás során a bőrbe juttatja a vírust, ahonnan a Langerhans-sejtek migrációjával jutnak el a regionális nyirokcsomóba. Itt történik meg a vírus primer replikációja. Ezt követően a WNV elterjed a parenchymás szervekbe is, mint például a vese és a lép; ezekben zajlik le a szekunder replikációs fázis [32].

A madár gazdában nem feltétlenül hasonló mechanizmus megy végbe, mint emberben [33]. Kutatások bizonyították, hogy a WNV kimutatható a vérből a vérszívást követő 30-40 perc elteltével. Ez azt jelenti, hogy madarak esetében nem szükséges az elsődleges replikációs fázis [34].

A pontos mechanizmus viszont még nem teljesen tisztázott a WNV replikációjával kapcsolatosan.

A WNV-t izolálni lehet a fertőzött madarak véréből a fertőzést követő napokban. A viraemiás csúcs az infekciót követő 2-3 nap után jelentkezik és 6-7 napig kimutatható libákban és énekesmadár-alakúakban, mint varjakban, szajkóban. A ragadozó madarak és baglyok esetében pedig 4-6 nappal a fertőzést követően jelentkezik és akár a 10. napon is még kimutatható. A madarakban lejátszódó természetes védekezési módokról egyelőre kevés információval rendelkezünk [30].

Emlős gazdában először a természetes (veleszületett) immunrendszer aktiválódik, amelynek legfőbb célja a szervezetbe jutott kórokozó elpusztítása. A folyamat a „veszély” érzékelése esetén azonnal végbe megy. A szervezetben sok egymással kapcsolódó és párhuzamos folyamat játszódik le rövid időn belül (interferon [IFN]-termelés, komplement rendszer aktiválódás, phagocytosis és cytotoxicosis). A veleszületett immunrendszer megfelelő működését a természetes immunitásban résztvevő sejtek biztosítják. A makrofágok majdnem mindenhol előfordulnak, szerepük az idegen anyag bekebelezésében és lebontásában lényeges. A neutrophil granulocyták a leggyakrabban előforduló fehérvérsejtek, a gyulladásos folyamatok esetén van szerepük. Az NK (natural killer) sejtek (természetes ölősejtek) receptoraik segítségével felismerik és eliminálják a vírussal fertőzött vagy tumorossá vált sejteket.

A WNV sokféle sejtípust és a legtöbb szervrendszert képes megtámadni. Madarak esetében fontos szerepe lehet a kórfejlődésben, hogy a vírus a mononukleáris phagocytá rendszer (MPS)-ben szerepet játszó sejteket veszi célba. Képes ezen sejteken belül szaporodni és a sejtek segítségével szétszóródni a szervezetben [30].

A vírusszámtól függően a WNV át tud lépni a vér-agy gáton és az agyba kerülve meningoencephalitist okozhat. A mechanizmus, mely során a WNV eljut az agyba nem teljesen tisztázott. Számos szerző úgy véli, hogy emlősök esetében a bejutást a TNF- α termelődése miatt megváltozott endothel sejtek fokozott permeabilitása okozza. Egy másik elmélet alapján a vírus passzív transzporttal képes átjutni a plexus chorioideus epithel vagy endothel sejtjein keresztül. További lehetséges út a közvetlen retrográd axonális transzport a szagló vagy motor neuronok segítségével és a fertőzött immunsejtekkel való szállítás. Az idős, immunszuppresszált egyedeknél nagyobb valószínűséggel alakul ki fatális kimenetelű encephalitis [35].

3.7. Kórtan

A WNV okozta megbetegedés nem jár makroszkópos kórbonctani elváltozással. Az agyvelőben okozott elváltozások megfigyelésére legalkalmasabb vizsgálat a kórszövetten.

Az alacsonyabb fogékonyssággal bíró madárfajoknál, mint például a házi tyúknál nem alakulnak ki megfigyelhető elváltozások. Viszont a fogékonyabb fajok egyedei, mint az újvilági fajok többsége rövidebb inkubációs periódus után is elpusztulhatnak, náluk nagyobb eséllyel figyelhetjük meg a kórszövetteni léziókat.

A legjellemzőbb elváltozások közé tartozik a rossz fizikális kondíció, kiszáradás és a több szervre kiterjedő vérzés, vérpangás. Emellett előfordulhat splenomegália, hepatomegália, halvány pettyezettség a májon, lépen, vesén. Ragadozók esetében az agy atrofizációja és lágyulása jellemző. A lymphoplastikus és histiocitás infiltráció, sejtd degeneráció, nekrozis, és a vérzések a fő mikroszkopikus elváltozások [30].

4. Anyag és módszer

4.1. Mintagyűjtés

A monitoring vizsgálatoknak fontos szerepe van a kutatásban. A Nemzeti Parkok és természetvédők évről évre felméri a kék vércsék populációját.

A terepmunkára 2022/2023-ban került sor a Körös-Maros Nemzeti Parkhoz tartozó Vásárhelyi-pusztá területén (46°28'16"N 20°36'17"E). A területen négy műfészektelep található, ahol évi több mint 100 kék vércse költ számos vörös vércsével (*Falco tinnunculus*), csókával (*Corvus monedula*), és erdei fülesbagollyal (*Asio otus*) egyetemben. A füves pusztá mellett nagy jelentőségű vizes területek találhatóak meg, mint mocsarak, árterek, melyek elősegítik a szúnyogok szaporodását ezzel fokozva a WNV terjedését.

A költési időszakban minden fészket ellenőriznek és megbecsülik a tojásrakás időpontját, a fészkealj nagyságát és a kirepülési arányokat. A gyűrűzés során mind a felnőtt egyedeket mind a fiókákat egyedi színnel ellátott jelölőrendszerrel azonosítják, emellett mérik a fiókák tömegét, a középső faroktoll hosszát, a szárnyhúrt és a szárnycsont hosszát. Ezen információk segítenek megérteni a fiókák kelési sorrendjét [29].

Az állapotfelmérés érdekében vérmintát is vesznek. A fiókákból is vesznek vért, amint eléri a 17-23 napos kort. A mintavétel steril körülmények mellett történik, kis mennyiségű (0,5-0,8 ml) vért vesznek szárnyvénából.

A vérvételt követően a vérsavót elválasztottuk az alvadéktól és -20°C-on tároltuk feldolgozásig. A laboratóriumba érkezés után a savót és a sejtes elemeket -80°C-on tároltuk az RNS/DNS kivonás megkezdéséig.

A WNV terjesztésében nagy szerepet betöltő *Culex* nembe tartozó szúnyogok vizsgálata is fontos szempont. A csapdákat babaolajjal megkent műanyag lapokból alakítják ki, és legtöbbször a költőládák tetején helyezik el. Az ilyen módon csapdázott szúnyogok szintén vizsgálatra kerülnek.

4.2. ELISA vizsgálat

A szerológiai vizsgálatok során az ID Screen West Nile Competition ELISA kítet használtuk (ID VET, Montpellier, Franciaország), a gyártó utasítása alapján (**4. ábra**). A vizsgálat során a vérsavóban megtalálható nyugat-nílusi láz vírusának antigénje (pr-E) ellen termelődött ellenanyagokat (IgY) mutattuk ki kompetitív ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgálat segítségével. Ez a technika a mintában jelenlévő antitestek és az enzimhez kötött másodlagos antitestek közötti, antigénhez való kötődésért zajló versengés elvén alapul.

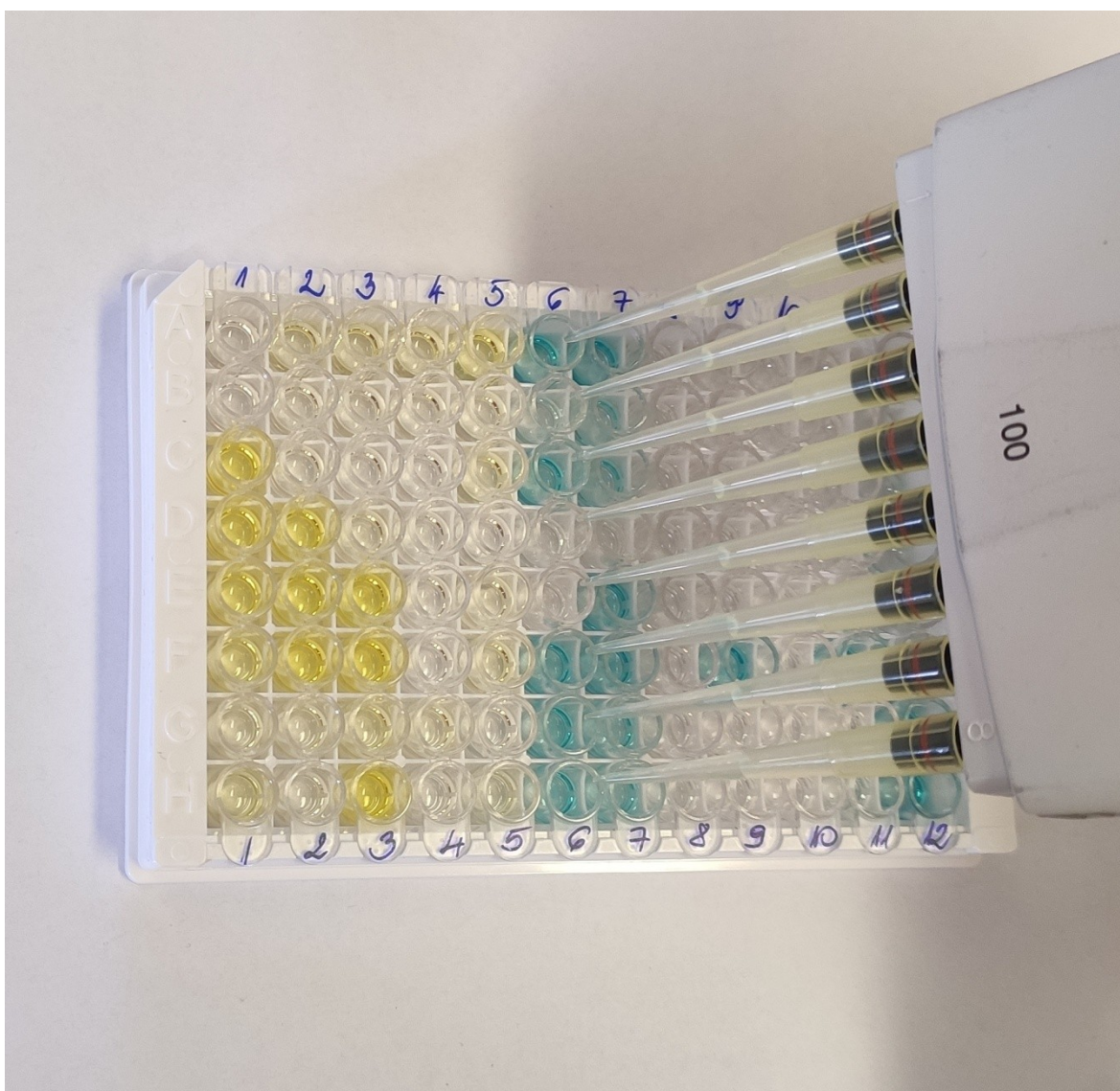
A vizsgálathoz 2 ELISA lemezt alkalmaztunk. Az eljárás során először a WNV antigénjét hozzáadtuk a mikrotitráló lemez mintahelyeihez, az antigének bevonták a lyuk felületét. Második lépésként egy mosási fázis következett, ennek célja a felesleges, nem megfelelően kötött antigének eltávolítása volt. Ezt követte a WNV elleni antitesteket tartalmazható szérumminta hozzáadása a megfelelő lyukakba. Inkubációs idő után a lemezt újra mostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött szérumfehérjéket, antigéneket. Hozzáadtuk az enzimhez kötött WNV-specifikus antitesteket, ezek kötődnek az antigénekhez, amelyekhez még nem kötődött a korábbi lépések során antitest. Újabb mosási fázist követően, a WNV-specifikus antitestekhez kapcsolódó enzimre specifikus szubsztrátot adtunk. Színváltozást figyelhetünk meg abban az esetben, amikor a szubsztrát és az enzim reakcióba lép. A színváltozást intenzitása arányos az enzimaktivitás mértékével, amely a WNV antigénekhez kötődő enzimhez kötött antitestek mennyiségét tükrözi. Amennyiben nincs színváltozás a vizsgált szérumminta nagy mennyiségű WNV elleni antitestet tartalmazott, minél élénkebb színreakciót látunk annál kevesebb a WNV ellen termelődött antitest mennyisége. A színváltozás mértékét spektrofotométerrel mérhetjük.

A kompetitív ELISA vizsgálatokban kétféle kromofórt alkalmaztunk, o-fenilén-diamint (OPD) valamint N,N,N',N'-tetrametil-benzidint (TMB). Amennyiben a minta nem vagy csak kevés mennyiségű ellenanyagot tartalmazott, kék elszíneződés vált láthatóvá. A reakció leállítására egy savas kémhatású "STOP" oldatot alkalmaztunk, amely a kéken elszíneződött elegyet sárgává alakította.

Az eredmény értelmezése során kvalitatív és kvantitatív vizsgálatot is végeztünk. A kvalitatív vizsgálat az antitest jelenlétét vagy hiányát jelöli a színváltozás segítségével. A

kvantitatív vizsgálat során, az oldat optikai sűrűségének leolvasása segíti a mennyiségi meghatározást.

A vizsgálat során az optikai sűrűséget (optical density, OD) bizonyos optikai értékre (OD ratio) váltottuk át. A versengési érték (Competition rate) kiszámítása a következőképpen történik: $OD_{\text{minta}}/OD_{\text{negatív kontroll}} \times 100$. Az újonnan kapott érték segítségével átalakítottuk a gyártó által javasolt értékeket. Pozitívnak minősítettük az eredményt, ha a versengési érték 40% alatti, kétesnek, ha a versengési érték 40 és 50% közötti, míg negatívnak, ha a versengési érték 50% feletti volt.



4. ábra Kompetitív ELISA vizsgálat a WNV elleni ellenanyagok meghatározása céljából. A kép a savas kémhatású “STOP” oldat hozzáadása pillanatában készült.

4.3. Módosított PCR vizsgálat

A madaraktól levett vérmintákból a vírus-specifikus nukleinsavak jelenlétét PCR vizsgálattal detektáltuk. A DeLamo qRT-PCR eljárást alkalmaztuk apróbb módosításokkal [36]. Az eredeti vizsgálatok során a rendszer nem mutatta ki az összes lineage 2-es genetikai vonalba tartozó vírust, ezért a vizsgálat eredményessége érdekében lecseréltük a reverz primert, ezzel növelve a PCR hatékonyságát. Az RNS/DNS kivonáshoz a Roche High Pure Viral Nucleic Acid kitet (Lewes, United Kingdom) alkalmaztuk a gyártó utasítása alapján. Ezen kit segítségével képesek voltunk RNS-t és DNS-t is kivonni szérumból, plazmából illetve akár teljes vérből is. A mintákat különböző flavivírusokra WNV 1-es, 2-es és Usutu vírusra vizsgáltuk.

A kutatás során a vérminták mellett, madaraktól származó szervmintákat és szúnyogokat is vizsgáltunk. Az RNS kivonásához ezen mintákból a QIAamp Viral RNA Mini Kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk a gyártó utasítása alapján.

A TaqMan rendszerű, triplex reverz transzkripció real-time PCR teszthez Verso 1-step RT-qPCR Kit (Thermo Scientific) használtuk a gyártó utasítása alapján. Előkészítettük a reakcióhoz szükséges elegyeket. Egy csőhöz tartozó mennyiség 1,5 µl RNS minta, 0,4 µM minden egyes primerből és 0,2 µM a próbákból, 7,5 µl 2x RoxMix, 0,75 µl RT Enhancer, 0,15 µl Enzyme mix, amit Rnáz-mentes vízzel egészítettük ki 15 µl-ig. Két-két csőhöz a negatív, illetve a pozitív kontroll mintákat mértük. A reakció elegyek helyes kimérése után a PCR csöveket a thermocycler gépbe helyeztük. A gép kezdetben 50°C-ra melegítette a master mixet 30 percig, ezalatt ment végbe a reverz transzkripció, amelynek során az RNS DNS-é íródott át. Ezek után a készülék tovább emelte a hőmérsékletet 95°C-ra, ahol további 15 perc volt szükséges a polimeráz enzim aktiválásához. A polimeráz lánreakció minden ciklusa három lépésből áll, amelyek 40 alkalommal ismétlődnek. Az első szakasz a DNS szálak szétválasztása (95°C), ezt követi a primerek kötődése (50°C) és az extenzió (72°C). **(1.táblázat)**

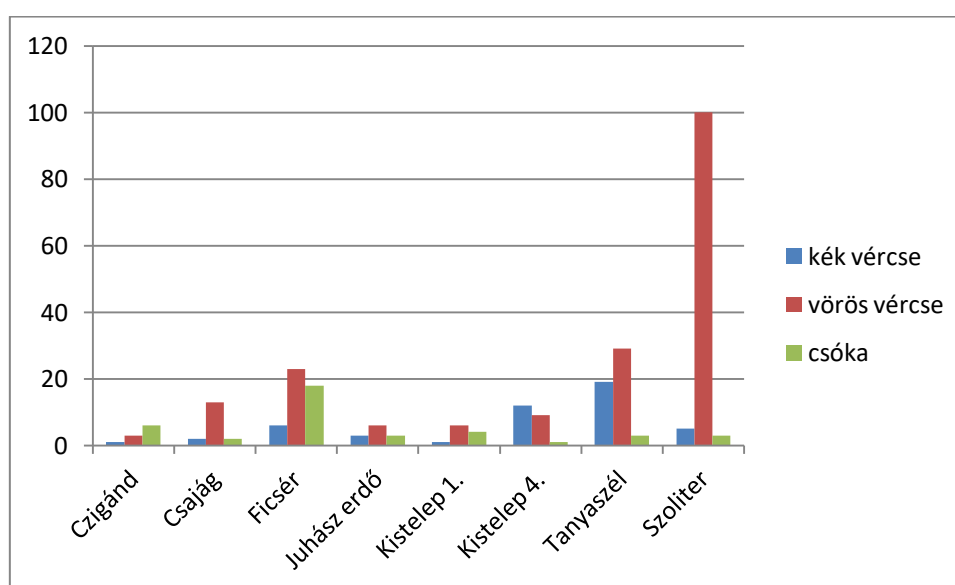
A triplex PCR-hez háromféle, különböző fluorofórral (FAM, VIC és CY5) jelölt próbákat alkalmaztuk, amelyek fluoreszencia fénykibocsátása három különböző hullámhosszon detektálható. A festékek az általunk vizsgált vírusok elkülönítésére szolgáltak, külön szín jelölte a WNV lineage 1-es, WNV lineage 2-es és Usutu vírust.

1. táblázat : A vizsgálat során alkalmazott RT-PCR folyamatának lépései.

RT-PCR program	Lépései	Hőmérséklet	Időtartam
Reverz-transzkripció	Reverz transzkripció	50°C	30 perc
	Reverz transzkriptáz denaturálása, polimeráz aktiválása	95°C	15 perc
Polimeráz láncreakció	DNS-szálak szétválasztása	95°C	15 másodperc
	Primerek kötődése és extenzió	50°C	1 perc

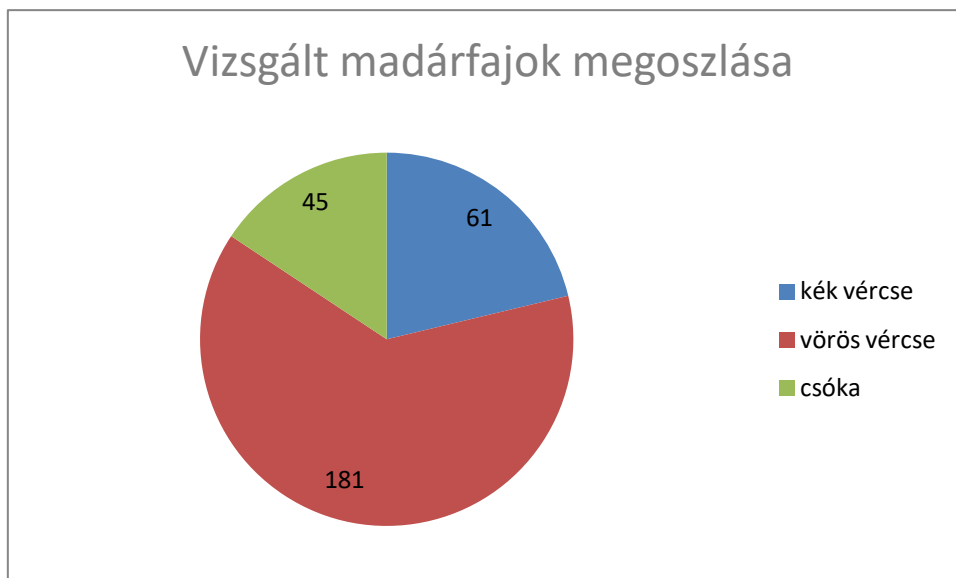
5. Eredmények

A vizsgálatra a Körös-Maros Nemzeti Parkhoz tartozó Vásárhelyi-puszta területén (46°28'16"N 20°36'17"E) került sor. Ezen a területen körülbelül 278 költőpár alkotja a teljes populációt. (**1. ábra**) A vörös vércsék fordulnak elő a legnagyobb számban 189 költőpár, a kék vércsék 49 és a csókák 40 költőpárral vannak jelen az adott térségben. A kutatás során 287 fiókat vizsgáltunk 2022 júniusa és augusztusa között. Több telepen, köztük Czigánd, Kistelep 4, Tanyaszél, Ficsér, Kistelep 1, Csajág és Juhász erdőn vizsgáltunk telepesen költő madrakat és néhány szoliter fészket is.



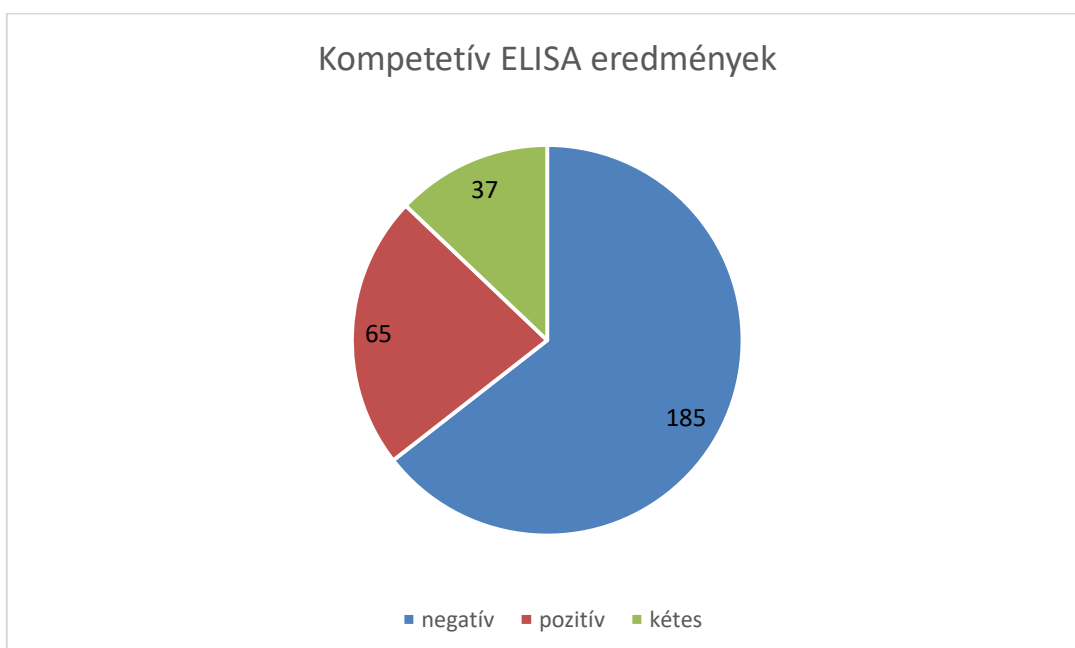
1. ábra A vizsgált terület teljes populációjának (278 költőpár) megoszlása a különböző telepek között. A foglaló párokat nem tartalmazza csak legalább a tojásrakásig eljutott költéseket.

A vizsgált mintáink három madárfajból származtak, 61 kék vércsét, 45 csókát és 181 vörös vércsét vizsgáltunk. A kutatásban részt vett madarak faji eloszlását a **2. ábra** szemlélteti. A vérmintákból ELISA vizsgálatot és WNV ill. USUV kimutatását célzó qRT-PCR vizsgálatot hajtottunk végre.

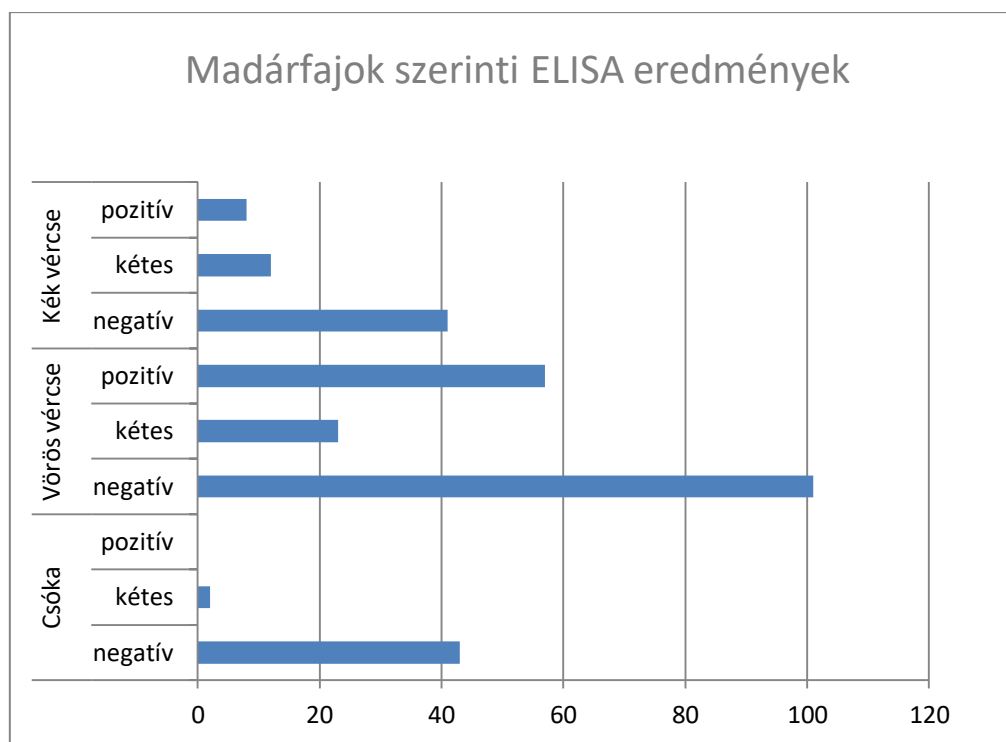


2.ábra A kutatásban vizsgált madarak, kék vércse (*Falco vespertinus*), vörös vércse (*Falco tinnunculus*) és csóka (*Coloeus monedula*) fajok szerinti megoszlása.

Az ELISA vizsgálat során a 287 mintából 65 pozitív, 37 kétes és 185 negatív eredményt kaptunk. **(3. ábra)** Madárfajokra lebontva a 61 kék vércséből 8 pozitív, 12 kétes és 41 negatív esettel volt dolgunk. Csókák esetén 45 egyedből 0 pozitív, 2 kétes és 43 negatív eredményt bíráltunk el, még a 181 vörös vércse közül 57 pozitív, 23 kétes és 101 negatív mintára bukkantunk. **(4. ábra)**

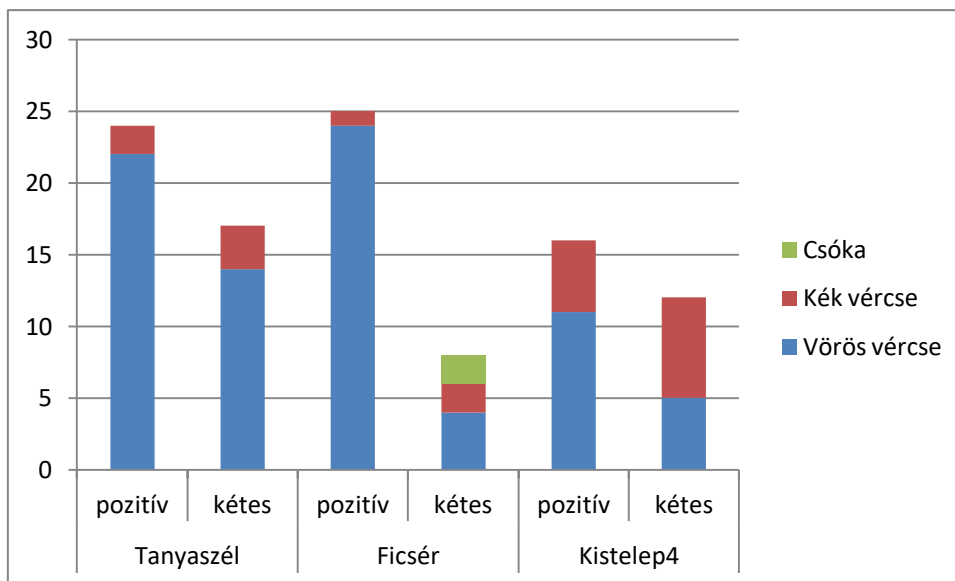


3. ábra A vizsgált vérminták kompetetív ELISA vizsgálatának eredményei.



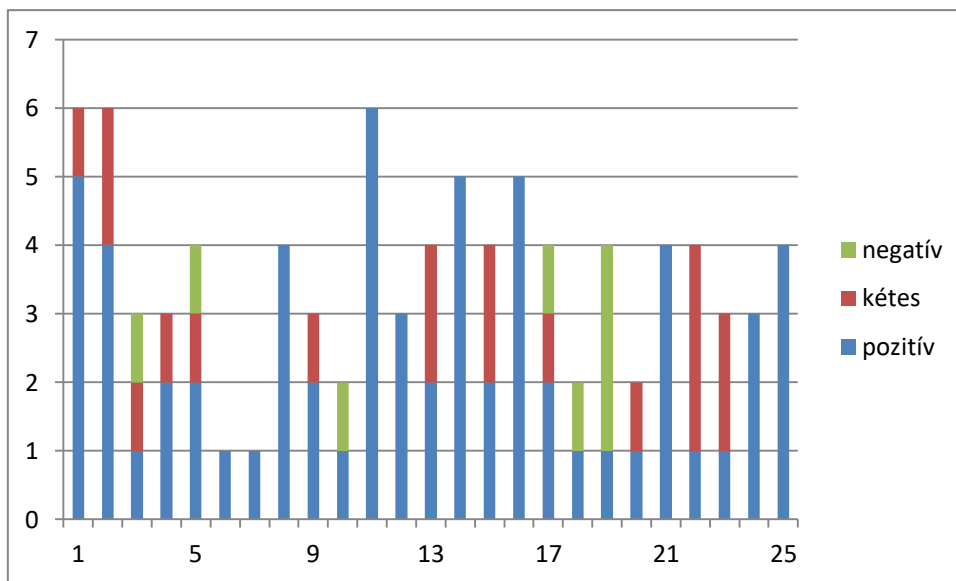
4.ábra Összesített ELISA eredmények, madárfajok eloszlása alapján. Függetlenül láthatjuk a madárfajokat és a minták pozitív/kétes eredményeit, vízszintesen a vizsgált madarak darabszámát.

Kutatásunk során 7 telepen, Czigánd, Tanyaszél, Ficsér, Kistelep 1, Kistelep 4, Csajág, és Juhász erdő területeken, illetve szoliter fészkelő madarakat is vizsgáltunk. A legtöbb pozitív mintát Ficséren (25), ezt követően Tanyaszélen (24), illetve Kistelep 4-en (16) találtunk, a többi telephelyen nem azonosítottunk fertőzöttségnek kitett egyedeket. Kétes eredmények is ezen telephelyeken fordultak elő Tanyaszél (17), Ficsér (8) és Kistelep 4 (12). Kistelep 4-en a vörös és kék vércsék voltak érintettek, Ficsér és Tanyaszél esetében főleg a vörös vércsék pozitív egyedei domináltak. Csókák kétes egyedeit csak Ficséren (2) azonosítottunk. **(5.ábra)**



5. ábra A kutatásban részt vett telepek ELISA vizsgálata során pozitív illetve kétes eredményeinek összehasonlítása.

Összesen 91 fészekaljat tanulmányoztunk, ezek közül 25 bizonyult érintettnek, amelyben legalább 1 pozitív egyedet azonosítottunk, további 12-ben találtunk legalább egy kétes eredményt. A kutatás során a szikimmunitással rendelkező vagy fertőzésnek kitett fészekaljakból (25), összesen 10-ben egyöntetűen pozitív fiókákat találtunk. 19 esetben volt csak pozitív vagy kétes eredmény egy fészekaljon belül, ahol nem fordult elő negatív eset és 6 alkalommal negatív eredményű fióka is megtalálható volt. Fészekaljanként körülbelül 3-4 fiókával számolhatunk átlagban, a legkisebb fészekalj esetében 1, a legnagyobbban 6 fióka került vizsgálatra. **(6. ábra)**



6. ábra A 25 legalább egy szeropozitív fiókát tartalmazó fészekalj eredményei. A függőleges tengely a fészekaljba tartozó fiókák számát, a vízszintes tengely a vizsgált fészekaljak számozását jelöli.

A modDeIAmo qRT-PCR vizsgálat eredményeket WNV lineage 1, WNV lineage 2, és Usutu vírusra nézve vizsgáltuk. Két pozitív és 1 kétes minta kivételével, minden minta negatívnak bizonyult. Kistelep 4-en azonosítottunk egy Usutu vírus pozitív csókát, Tanyaszélen egy WNV lineage 2-es pozitív vörös vércsét és Kistelep 4-en egy WNV lineage 2-es kétes vörös vércsét.

6.Következtetések

A minták begyűjtésére és a gyűrésre a költési időszakban kerül sor. A 2022-ben levett vérminták PCR vizsgálatait WNV lineage 1, 2 és USUV-ra vizsgáltuk. Egy WNV lineage 2-es pozitív, egy USUV pozitív és egy WNV lineage 2-es kétes mintát azonosítottunk. Az adatok azt bizonyítják, hogy ez a madártársulás nem tölt be fontos szerepet a WNV amplifikációjában. A szerológiai vizsgálatok viszont kimutatták, hogy a populáció a vírus megjelenésével kapcsolatosan érintett, kitétsége azonban kisebb fokú, nagy valószínűséggel a fiókákban megjelenő szikimmunitás következménye.

A maternális ellenanyagok, más néven a szikimmunitás a kikelt fiókák első 3 hetében töltenek be fontos szerepet, azonban a kor előrehaladtával egyre jobban elveszítik jelentőségüket. A szikimmunitás átadásának legfőbb feltétele a tojó vérében jelenlévő ellenanyagok magas koncentrációja. Az, hogy a madár milyen antigénnel találkozott a tojásrakás előtt és idején, hatással van az ellenanyagok minőségére [37].

Amennyiben közelebbről megvizsgáljuk a szerológiai adatokat, láthatjuk, hogy a kompetitív ELISA vizsgálat során, ahol a fiókák szeropozitivitását vizsgáltuk a vörös vércsék esetében 57 pozitív, 23 kétes és 101 negatív esetet állapítottunk meg. Pozitív eredményt az esetek 31,5%-ban találtunk. A szeropozitivitás a kék vércsék esetében 13,11% míg csókáknál nem találtunk pozitív egyedeket.

A 7 telephely közül 3, Ficsér, Tanyaszél és Kistelep 4 volt fertőzésnek kitétt terület, ezen telephelyeken sikerült pozitív illetve kétes vérmintákat gyűjtenünk. A kutatás során összesen 91 fészekalj került vizsgálatra, ezek közül 82 volt az említett 3 telepen.

A prevalencia egy adott populáció körében a betegség gyakoriságának előfordulását és a környezeti tényezők közötti összefüggéseket jelöli. A 91 vizsgált fészekaljból 25 bizonyult érintettnek, a nyugat-nílusi láz szeroprevalenciája 27,47%. 19 fészekalj esetén csak pozitív vagy kétes eredményeket azonosítottunk, ami azt bizonyítja, hogy az egy fészekaljba tartozó madarak közül mindegyik fertőzésnek kitétt volt vagy maternális ellenanyagban részesült. 6 esetben találtunk a pozitivitást mutató fészekaljokban található negatív egyedeket.

Magyarországon több helyen is vizsgálják a különböző ragadozó madarakban jelentkező fertőzéseket. A Borsodi-Mezőségen 2023-ban költési időszak végén kék vércséből

származó tamponmintákat gyűjtöttek. A vizsgálatok során a WNV mellett madárhimlővírust azonosítottak. Annak érdekében, hogy a betegség jellegzetes klinikai tüneteket mutasson, ebben az esetben szükség volt valamilyen társfertőzésre. Himlővírus társfertőzéssel itt kisebb járvány alakult ki a térségben. Bizonyos szúnyog aktivitásnak kedvező környezeti tényezők, mint, meleg nyár, nagyobb mennyiségű csapadék, növelhetik az esetszámokat. (Erdélyi Károly szóbeli közlése alapján)

7.Összefoglalás

A kutatás célja a telepesen költő madarak nyugat-nílusi láz vírusfertőzöttségének vizsgálata volt. A Nyugat-nílusi láz egy *Flavivirus* okozta szúnyogcsípés útján terjedő, zoonotikus megbetegedés, ami széles körben elterjedt. Lázos megbetegedést és idegrendszeri tüneteket, mint agyvelő- és agyhártyagyulladás okozhat vadmadarakban, lovakban és emberekben is.

Magyarországon először 2003-ban jelentkezett, 2018-ban az embereket és állatokat érintő esetek drasztikus növekedése volt megfigyelhető. 2018-ban hazánkban 215 hazai és 10 importált esetet igazoltak, ezek az esetszámok szoros összefüggésben állnak a szúnyogok gradációjával. A vírusfentartásban nagy szerepet játszanak a vándormadár gazdafajok és a *Culex* nemzetségbe tartozó szúnyogvektorok. A megbetegedés szezonálisan jelentkezik a szúnyogok aktivitása alapján, augusztus-szeptemberi időszakban.

2022 júniusa és augusztusa között 287 telepesen költő madarat vizsgáltunk abból a célból, hogy meghatározzuk milyen szerepet töltenek be a WNV fenntartásában. A kutatás során kék vércsék (*Falco vespertinus*), vörös vércsék (*Falco tinnunculus*) és csókák (*Coloeus monedula*) szárnyvénájából vett vérmitát gyűjtöttünk.

A vérmintákat kompetitív ELISA vizsgálatnak és WNV és USUV fertőzés kimutatására irányuló qRT-PCR vizsgálatnak vetettük alá. A PCR vizsgálatok alapján egy WNV lineage 2-es pozitív, egy Usutu vírus pozitív és egy WNV lineage 2-es kétes eredményű vírust azonosítottunk. Ez azt bizonyítja, hogy ez a madártársulás nem vesz részt jelentős mértékben a WNV amplifikációjában.

Az ELISA vizsgálat alapján találtunk több pozitív és kétes eredményt, ami a fiókákban megjelenő szikimmunitás következménye. Az adott térségben a madarak mintavételezésével párhuzamosan szúnyogok és más madárfajok is vizsgálatra kerültek, ami bizonyította az adott térség WNV cirkulációját. Ez által bizonyítható a WNV jelenléte, azonban az általunk vizsgált fajokban nem tapasztaltunk jelentős víruscirculációt. Ezen fajok úgy tűnik nem lényegesek a WNV amplifikációjában.

8. Summary

The aim of this study was to determine the West Nile virus infection of the colonial breeding birds. West Nile virus is a mosquito-borne, widely spread zoonotic disease belonging to the *Flavivirus* genus. It can cause febrile and central nervous system illness like meningitis and encephalitis in wild birds, horses and also in humans.

WNV appeared in Hungary in 2003 and then in 2018 there was an extraordinary increase in human and animal cases. In Hungary there were 215 local and 10 imported cases. The high case numbers were related to the gradation of the mosquitoes. West Nile virus is maintained in nature in a mosquito-bird-mosquito transmission cycle. The virus is transmitted by mosquitoes belonging to the *Culex* genus. In late August and early September more people get infected because the weather is optimal for mosquitoes to multiply and their activity starts to increase.

Between June and August of 2022 we have tested 287 colonial breeding birds to determine whether they have an important role of the maintenance of WNV in Hungary. In this study we collected blood samples from the wing vein of red-footed falcons (*Falco vespertinus*), common kestrels (*Falco tinnunculus*) and western jackdaw (*Coloeus monedula*).

The blood samples were tested with competitive ELISA for anti WNV antibodies and a qRT-PCR for WNV and USUV detection. According to the PCR test results we detected a WNV lineage 2 positive and an USUV positive case, as well as a WNV lineage 2 doubtful result. We conclude that the examined bird colony seems not to play an important role of the WNV amplification.

Among the samples examined with competitive ELISA, we found multiple positive and doubtful cases, this is the result of the nestling maternal immunity. Besides the above-mentioned examinations, there were other research activities at the same region, testing different bird species and also mosquitoes. These tests have proven the WNV presence in the region. It means that the WNV is present locally but the tested bird colony is not playing a significant part in West Nile virus circulation; the studied species do not have an important role in the maintenance of WNV.

9.Irodalomjegyzék

1. Nagy A, Horváth A, Nagy O, Koroknai A, Csonka N, Takács M, Barabás É (2022) A nyugat-nílusi vírushatások jelentősége hazánkban. *Orvosok Lapja* 19:22–24
2. NNK honlapja 2023.09.06. <https://www.nnk.gov.hu/index.php/nnk-hirek/2160-vedekezes-a-szunyogok-ellen>
3. Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul (1940) A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 471–492
4. Hugh W, Erdélyi K, Herbert W (2012) Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe
5. Hubálek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5:643–650. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>
6. 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. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-1085-1>
7. Marra PP, Griffing SM, McLean RG (2003) West Nile virus and wildlife health. *Emerg Infect Dis* 9:898–899. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030277>
8. 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. <https://doi.org/10.1080/03079450500268039>
9. Erdogan Bamac O, Cizmecigil UY, Mete A, Yilmaz A, Aydin O, Tali HE, Tali BH, Yilmaz SG, Gurel A, Turan N, Ozsoy S, Vatansever Celik E, Sadeyen J-R, Roman-Sosa G, Iqbal M, Richt JA, Yilmaz H (2021) Emergence of West Nile Virus Lineage-2 in Resident Corvids in Istanbul, Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 21:892–899. <https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0010>
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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
11. Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, Baka A, Lytras T, Mellou K, Bonovas S, Panagiotopoulos T (2011) Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* 17:1868–1872. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110525>

12. Zana B, Erdélyi K, Nagy A, Mezei E, Nagy O, Takács M, Bakonyi T, Forgách P, Korbacska-Kutasi O, Fehér O, Malik P, Ursu K, Kertész P, Kepner A, Martina M, Süli T, Lanszki Z, Tóth GE, Kuczmog A, Somogyi B, Jakab F, Kemenesi G (2020) Multi-Approach Investigation Regarding the West Nile Virus Situation in Hungary, 2018. *Viruses* 12:123. <https://doi.org/10.3390/v12010123>
13. Chaintoutis SC, Papa A, Pervanidou D, Dovas CI (2019) Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004-2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Mol Phylogenet Evol* 141:106617. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106617>
14. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ (2002) West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2:519–529. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00368-7)
15. Varga J, Tuboly S, Mészáros J (1999) A háziállatok fertőző betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest
16. 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. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>
17. 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. <https://doi.org/10.3201/eid2008.131321>
18. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E (2012) West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev* 25:635–648. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-12>
19. Vogels CBF, Hartemink N, Koenraadt CJM (2017) Modelling West Nile virus transmission risk in Europe: effect of temperature and mosquito biotypes on the basic reproduction number. *Scientific Reports* 7:5022. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05185-4>
20. Bowen RA, Nemeth NM (2007) Experimental infections with West Nile virus. *Curr Opin Infect Dis* 20:293–297. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32816b5cad>
21. Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA (2004) Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis* 10:653–657. <https://doi.org/10.3201/eid1004.030517>
22. <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/BirdSpecies1999-2016.pdf> 2023.10.18.
23. 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. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>
24. Banet-Noach C, Simanov L, Malkinson M (2003) Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol* 32:489–494. <https://doi.org/10.1080/0307945031000154080>

25. Vidaña B, Busquets N, Napp S, Pérez-Ramírez E, Jiménez-Clavero MÁ, Johnson N (2020) The Role of Birds of Prey in West Nile Virus Epidemiology. *Vaccines (Basel)* 8:550. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030550>
26. Solt S, Fehérvári P, Palatitz P (2018) Kék könyv. Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület, Budapest
27. Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület honlapja <https://mme.hu/kec-vecsek-nyomaban-i-resz-tavaszi-erkezes>
28. Hunsperger EA, McElroy KL, Bessoff K, Colón C, Barrera R, Muñoz-Jordán JL (2009) West Nile virus from blood donors, vertebrates, and mosquitoes, Puerto Rico, 2007. *Emerg Infect Dis* 15:1298–1300. <https://doi.org/10.3201/eid1508.090333>
29. Soltész Z, Erdélyi K, Bakonyi T, Barna M, Szentpáli-Gavallér K, Solt S, Horváth É, Palatitz P, Kotymán L, Dán Á, Papp L, Harnos A, Fehérvári P (2017) West Nile virus host-vector-pathogen interactions in a colonial raptor. *Parasit Vectors* 10:449. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2394-z>
30. Gamino V, Höfle U (2013) Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet Res* 44:39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39>
31. Fehér OE, Szoboszlai H, Korbacska-Kutasi O (2019) Nyugat-nílusi vírus okozta agy- és gerincvelőgyulladás kezelése lovakban istálló körülmények között. *Magyar Állatorvosok Lapja* Vol.141. No 4.
32. Valiakos G, V. L, Touloudi A, Papatsiros V, Spyrou V, Petrovska L, Billinis C (2013) West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence. In: Rosas-Acosta G (ed) *Viral Replication*. InTech
33. Nemeth NM, Thomsen BV, Spraker TR, Benson JM, Bosco-Lauth AM, Oesterle PT, Bright JM, Muth JP, Campbell TW, Gidlewski TL, Bowen RA (2011) Clinical and pathologic responses of American crows (*Corvus brachyrhynchos*) and fish crows (*C. ossifragus*) to experimental West Nile virus infection. *Vet Pathol* 48:1061–1074. <https://doi.org/10.1177/0300985811398249>
34. 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. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[299:intown\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[299:intown]2.0.co;2)
35. Lim SM, Koraka P, Osterhaus ADME, Martina BEE (2011) West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses* 3:811–828. <https://doi.org/10.3390/v3060811>
36. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA (2013) A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J Virol Methods* 189:321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.02.019>
37. Smith, A. L., Powers, C., & Beal, R. (2022). The avian enteric immune system in health and disease. In *Avian immunology* (pp. 303-326). Academic Press.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki hozzájárult szakdolgozatom sikeres elkészüléséhez. Elsősorban témavezetőimnek dr. Marosi Andrásnak és dr. Erdélyi Károlynak, hogy hasznos tanácsokkal és ötletekkel színesítették dolgozatomat.

Köszönettel tartozom még a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék dolgozóinak, elsősorban Bakonyi Győzőnek, hogy segítségével megismerhettem a laboratóriumi munka szépségeit.

Külön köszönet dr. Tenk Miklósnak a kedves fogadtatásért a Járványtan és Mikrobiológiai Tanszéken.

A szakdolgozat megírását az ELKH-SA99-2021, TKP2021-EGA 01 és RRF-2.3.1-21-2022-00006 kutatási projektek anyagi támogatása és az azok keretében folyó munka tette lehetővé.



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Czikkolai Anna

Neptun-kódja: GT5DG3

A témavezető neve és beosztása: Dr. Marosi András, egyetemi adjunktus

Tanszék: Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Telepesen költő madárfajok nyugat-nílusi vírus fertőzöttségének vizsgálata

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	02	08	Téma pontosítása	<i>[Signature]</i>
2.	2023	03	21	Részeredmények konzult.	<i>[Signature]</i>
3.	2023	04	17	Részeredmények konzult.	<i>[Signature]</i>
4.	2023	04	19	További kísérletek megbesz.	<i>[Signature]</i>
5.	2023	06	05	Tervezés a nyári időszakra	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén:⁵.....

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	08	25	Eredményel értékelése	<i>[Signature]</i>
2.	2023	09	07	Eredményel értékelése	<i>[Signature]</i>
3.	2023	10	09	Dolgozat szerkezeti terve	<i>[Signature]</i>
4.	2023	10	20	Dolgozatirás konzult.	<i>[Signature]</i>
5.	2023	11	02	Dolgozatirás konzult.	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy a második félév végén:⁵.....

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Csikollai Anna*

[Signature]
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *Jékőné dr. Anna* Átvétel dátuma: *2023. 11. 06.*

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!