



# **Állatorvostudományi Doktori Iskola**

## **A nyugat-nílusi vírus magyarországi előfordulásának és virulenciájának vizsgálata**

PhD értekezés

dr. Szentpáli-Gavallér Katalin

2018



Témavezetők:

.....

Dr. Bakonyi Tamás

Állatorvostudományi Egyetem

.....

Dr. Dán Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Témabizottsági tagok:

.....

Dr. Bálint Ádám

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

.....

Dr. Erdélyi Károly

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

Készült X példányban. Ez a n. .... sz.  
példány.

.....

# Tartalomjegyzék

## Rövidítések jegyzéke

1. Összefoglalás

2. Bevezetés

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Történet, elterjedés

3.2. Rendszertani besorolás és filogenetikai változatosság

3.3. A vírus felépítése

3.4. Virulencia

3.5. A vírus életciklusa

3.6. A vírus terjedése, vektorok, gazdák

3.7. Klinikai tünetek

3.8. Kórfejlődés, kórbonctan

3.9. Védekezés

3.9.1. Immunitás

3.9.2. Megelőzés

3.9.3. Gyógykezelés

3.10. Diagnosztika

4. Célkitűzések

## 5. Anyag és módszer

### 5.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

#### 5.1.1. Passzív monitoring vadmadarakban és lovakban

#### 5.1.2. Aktív monitoring szúnyog vektorokban

#### 5.1.3. A minták feldolgozása, nukleinsav-kivonás és real-time RT-PCR

### 5.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenezise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás kísérletek

#### 5.2.1. Kiindulási vírus elszaporítása

#### 5.2.2. RNS kivonás és komplementer DNS (cDNS) szintézis

#### 5.2.3. Plazmid és kompetens sejtek

#### 5.2.4. A teljes hosszúságú duplaszálú DNS előállítása fúziós PCR-ek segítségével

#### 5.2.5. A fertőző klón előállítása hagyományos klónozási lépésekkel

#### 5.2.6. Pontmutációk létrehozása a WNV genomban

#### 5.2.7. Szekvenca-analízis

#### 5.2.8. Transzfekció és a vírusok visszanyerése

#### 5.2.9. Növekedési görbék sejt kultúrán



5.2.10. Virális RNS titerek mérése

5.2.11. In vivo virulencia vizsgálatok

5.2.12. Statisztika

6. Eredmények

6.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

6.1.1. Passzív monitoring vizsgálatok

6.1.2. Aktív monitoring (szúnyog vektor) vizsgálatok

6.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenezise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás vizsgálata

6.2.1. Az 1-es genetikai vonalú WN-NY99 és a 2-es genetikai vonalú WNV 578/10 törzsek genomjának összehasonlítása

6.2.2. A rekombináns vírusok visszanyerése

6.2.3. A rekombináns víruskészletek teljes genomszekvencia-analízise

6.2.4. A rekombináns vad típusú (WT) és mutációkat tartalmazó nyugat-nílusi vírusok szaporodási jellemzői Vero E6 sejttenyészetben

6.2.5. A WT és az NS1 mutáns vírus pozitív és negatív szálú RNS-ének mennyiségi meghatározása

in vitro

6.2.6. In vivo neuroinvazivitás vizsgálata egér modellben

6.2.7. A rekombináns WNV kimutatása az elhullott és túlélő egerek szerveiből

7. Megbeszélés

7.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

7.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenézise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás kísérletek

8. Új tudományos eredmények

Irodalomjegyzék

9. A doktori kutatás eredményeinek közlései

10. Nem a dolgozat témájában megjelent közlemények jegyzéke

11. Köszönetnyilvánítás

# Rövidítések jegyzéke

A: adenin / alanin (AS vagy nukleotid, a szövegkörnyezettől függően)

AS: aminosav

BAC: bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial artificial chromosome)

BHK-21: újszülött hörcsög vese (baby hamster kidney) szövettenyészet

BHQ: black hole quencher

C: citozin / cisztein (AS vagy nukleotid, a szövegkörnyezettől függően)

cDNS: komplementer DNS

CMV: cytomegalovírus

CNS: központi idegrendszer (central nervous system)

CPCV: Cacipacore vírus

CPE: citopatogén hatás (cytopathogen effect)

DEF: kacska embrió fibroblaszt sejtenyészet  
(duck embryo fibroblast)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNS: dezoxiribonukleinsav

ds: duplaszálú

DTT: dithiothreitol

E: glutaminsav

ELISA: enzimkapcsolt immunoszorbens  
vizsgálat

ER: endoplazmatikus retikulum

F: forward

FBS: főtális borjúsavó (fetal bovine serum)

G: guanin / glicin

I: izoleucin

IF: immunfluoreszcencia

IMS: vírus-indukált membrán struktúrák  
(virus-induced membrane structure)

INF: interferon

i. p.: intraperitoneális

H: hisztidin

HAG: hemagglutináció-gátlási próba

HNP: Hortobágyi Nemzeti Park

JEV: Japán encephalitis vírus

kb: kilobázis

KOUV: Koutango vírus

L: leucin

LD<sub>50</sub>: medián halálos adag (median lethal dose)

MIR: minimális fertőzöttségi ráta (minimal infection rate)

MOI: vírus / sejt arány (multiplicity of infection)

MVEV: Murray-völgyi láz (Murray Valley fever)

N: aszparagin

NTP-áz: nukleozid trifoszfátáz

ORF: nyitott leolvasási keret (open reading frame)

+ssRNS: pozitív irányítottságú egyszálú RNS

+RNS: pozitív irányítottságú RNS szál

-RNS: negatív irányítottságú RNS szál

P: prolin

PBS: foszfát sókkal pufferolt fiziológias sóoldat (phosphate buffered saline)

PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

p. i.: fertőzés után (post infection)

PFU: plakk-képző egység (plaque-forming unit)

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű RT-PCR (quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction)

PRNT: plakk-redukciós neutralizációs próba

RdRp: RNS-dependens RNS-polimeráz

RNS: ribonukleinsav

RT: reverz transzkripció

S: szerin

SLEV: St. Louis encephalitis vírus

T: timin / treonin (AS vagy nukleotid, a szövegkörnyezettől függően)

TCID<sub>50</sub>: medián fertőző dózis szövetkultúrán (median tissue culture infective dose)

TGE: transzmisszibilis gasztroenteritisz

TLR: toll-like receptor

T<sub>m</sub>: oladási hőmérséklet (melting temperature)

TNF: tumor nekrozis faktor (tumor necrosis factor)

U: uracil

USUV: Usutu vírus

UTR: nemkódoló szakasz (untranslated



region)

V: valin

Vero (E6): afrikai zöld majom vese epithel  
(African green monkey kidney epithel)  
sejttenyészet

WNV: West Nile virus, nyugat-nílusi vírus

WT: vad típusú (wild type)

YAOV: Yaoundo vírus

# Összefoglalás

A nyugat-nílusi láz vírusa (West Nile virus, WNV) világszerte elterjedt flavivírus. A nyugat-nílusi vírusokat filogenetikai különbségek alapján számos genetikai vonalba sorolják. Ezekből az 1-es és 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírusok okozzák a legtöbb emberi és állati megbetegedést. Az 1-es genetikai vonal vírusai világszerte elterjedtek, míg a 2-es genetikai vonalhoz tartozó törzset Afrikán kívül először 2004-ben Magyarországon sikerült izolálni. Felbukkanása óta a vírustörzs endémiássá vált az országban (és a környező országokban), és minden évben laboratóriumi kimutatásra is került.

Az utóbbi években (2009–2015) aktív és

passzív felmérő (monitoring) vizsgálatokat végeztünk a vírus hazai előfordulásának nyomon követésére. Minden évben ki tudtunk mutatni WNV fertőzést vadmadarak elhullott egyedeiből és agyvelő-gyulladásos lovak mintáiból. A 2011 és 2012 években felmérő vizsgálatokat végeztünk szúnyogokban az ország északkeleti (Szabolcs-Szatmár-Bereg megye), keleti (Hajdú-Bihar megye), délkeleti (Békés megye), dél-dunántúli (Baranya megye) és közép-magyarországi (Pest és Bács-Kiskun megye) területein. A két év alatt összesen 23 193 szúnyogot (645 poolban) vizsgáltunk meg WNV jelenlétére. Ez 2011-ben 11 728, 24 különböző fajhoz tartozó szúnyogot, 2012-ben pedig 11 465, 18 különböző fajú szúnyogot jelentett. 2011-ben három pozitív poolból kimutattuk az országban

keringő 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV-t: egy Fényeslitkén júniusban gyűjtött *Ochlerotatus annulipes* poolból, egy júliusban Debrecen környékén gyűjtött *Coquillettidia richiardii* poolból, és egy szeptemberben Kardoskút közelében gyűjtött *Culex pipiens* poolból. A különböző években és különböző gazdafajokból gyűjtött vírusok genetikai összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a vírusok nagyon közeli genetikai rokonságban állnak egymással, és mind a 2004-ben megjelent vírustörzs leszármazottjai. Ez arra utal, hogy a törzs képes volt több mint egy évtizeden keresztül fennmaradni hazánkban, valamint elterjedni Közép- és Dél-Európa több országában is.

A WNV fertőzések jelentős része

tünetmentesen zajlik le a gerinces gazdáiban. A lázas megbetegedéseken túl, viszonylag ritkán agy- és gerincvelő-gyulladás is kialakul, amelynek a kórjósolata kedvezőtlen. Egyes kutatási eredmények arra utalnak, hogy a WNV törzsek virulenciájának háttéréber genetikai eltérések állhatnak. Az 1-es genetikai vonal vírusai esetében már számos virulenciamarkert azonosítottak kísérletes úton is, azonban a 2-es genetikai vonal vírusait ilyen szempontból csak *in silico*, teljes genomszekvenciák összehasonlításával vizsgálták.

Kutatásaink során hat olyan pontmutációt – NS1 (P250L), NS2A (A30P) NS3 (P249H) NS4B (P38G, C102S, E249G) – illesztettünk reverz genetikai módszerek

segítségével a magyarországi magas virulenciájú 578/10-es azonosítójú WNV-2-es vírustörzs genomjába, amelyek attenuáló hatása 1-es genetikai vonalú vírusoknál már bizonyított volt. A teljes hosszúságú fertőző klónok előállítását követően a vad típusú, illetve a kiválasztott aminosav szubsztitúciókat tartalmazó mutáns vírusok replikációs tulajdonságait *in vitro* Vero E6 sejteken, neuroinvazivitásukat pedig *in vivo*, C57BL/6 egerekben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az NS1 nem strukturális fehérjén bekövetkező mutáció következtében a vírus szignifikánsan alacsonyabb fertőző titert ér el Vero sejtenyészetben, továbbá a mutáció jelentősen csökkenti a vírus virulenciáját egérben. A további öt mutációnak viszont nem volt jelentős hatása a hazai törzs kórokozó

képességére.

Kutatásaink felhívják a figyelmet a kórokozó hazai jelenlétére és alátámasztják kiterjedt és rendszeres monitoring vizsgálatok végzésének jelentőségét. A nyugat-nílusi vírus virulenciájáért felelős genetikai markerek vizsgálatának, a betegség kórfejlődésének pontosabb megismerése mellett, az oltóanyag-fejlesztésben is felhasználható eredményei lehetnek.

# Bevezetés

Az 1990-es évek közepétől a nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV) számos – súlyos, halálos áldozatokat is követelő – megbetegedést okozott Európában és Amerikában, sőt, napjainkban már a WNV-t világszerte az egyik legelterjedtebb szúnyog terjesztette flavivírusként tartják számon (Rossi és mtsai 2010; Weissenböck és mtsai 2010).

Magyarországon 2003 előtt, kóresetekből nem mutattak ki nyugat-nílusi vírust. 2003-tól házimadarakból (Glávits és mtsai 2005) és vadmadarokból is sikerült kimutatni a vírust, sőt 2004-ben egy magyarországi héja agyszövetéből izoláltak először 2-es genetikai vonalhoz tartozó



vírusteremt Afrikán kívül (Bakonyi és mtsai 2006). Az említett genetikai vonal európai megjelenésével szükségessé vált az izolált vírusok alapos vizsgálata, mivel ezek a vírusok sokkal patogénebbeknek bizonyultak, mint más afrikai rokon törzsek (Beasley és mtsai 2002).

A nyugat-nílushi vírus enzootiás ciklusát vadmadarak mint amplifikációs gazdák és szúnyogok mint biológiai vektorok tartják fenn. Ezek a szúnyogok főként madarakon táplálkoznak, de alkalomszerűen emlősállatokból és emberből is szívják vért, így közvetítve a vírust a fogékony gazdáknak (Savage és mtsai 1999; Apperson és mtsai 2004). WNV-t legalább 66 különböző szúnyogfajból sikerült már kimutatni (CDC

2016). Európában elsődleges vektornak bizonyultak a Magyarországon is széles körben elterjedt *Culex* fajok (ide értve a *C. pipiens*, *C. modestus* fajokat) és a *Coquillettidia richiardii* (Hayes és mtsai 1989; Higgs és mtsai 2004; Lvov és mtsai 2004; Zeller és Schuffenecker 2004).

A nyugat-nílusi vírus 2-es genetikai vonalának magyarországi megjelenése valószínűleg az Európa és Közép-, illetve Dél-Afrika között vonuló vándormadarakhoz köthető (Ciccozzi és mtsai 2013). Ugyanakkor a vírus kontinensen való megtelepedésének alapfeltétele volt a megfelelő amplifikációs madárfajok és ízeltlábú vektorok jelenléte.

A nyugat-nílusi vírus közvetítésére alkalmas szúnyog vektorok és a fogékony

madárfajok felderítése Európában is fontos szerepet játszik a vírus ökológiájának megismerésében és az ellene való hatékony védekezés tervezésében.

Számos tanulmány foglalkozik az 1-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírustörzsek virulenciamarkereinek felderítésével (Liu és mtsai 2006; Rossi és mtsai 2007; Audsley és mtsai 2011; Donadieu és mtsai 2013). Sok alacsony virulenciájú és szöveteken nehezen növekedő vírust azonosítottak már (Chambers és mtsai 2008), reverz genetikai rendszerek alkalmazásával pedig alacsony neurovirulenciát és neuroinvazivitást okozó nukleotid-, illetve animosav változásokat derítettek fel (Wicker és mtsai 2006; Puig-Basagioti és mtsai

2007). Az NS1 (Liu és mtsai 2003), NS2A (Liu és mtsai 2006; Audsley és mtsai 2011; Leung és mtsai 2008), NS3 (Brault és mtsai 2007), NS4B (Puig-Basagioti és mtsai 2007; Davis és mtsai 2007; Welte és mtsai 2011; Wicker és mtsai 2012) és NS5 (Davis és mtsai 2007) fehérjét kódoló gének esetében is kimutattak olyan mutációkat, amelyek a vírus egerekben való attenuálódásáért felelősek lehetnek.

Ellentétben az 1-es genetikai vonal vírusaival, a 2-es genetikai vonalat ilyen szempontból kísérletes úton a mai napig nem vizsgálták. Potenciális virulenciamarkerek felderítése csupán *in silico*, magas és alacsony patogenitású törzsek teljes genomjának elemzésével és

összehasonlításával (Botha és mtsai 2008), illetve egy tanulmányban az 1937 és 2011 között fellépő, egyre patogénebb törzsek összehasonlításával történt (McMullen és mtsai 2013).

# Irodalmi áttekintés

## 3.1. Történet, elterjedés

A nyugat-nílusi vírust első alkalommal 1937-ben Afrikában, emberi lázas megbetegedésből izolálták (Smithburn és mtsai 1940), majd a következő évtizedekben számos törzsét mutatták ki az Óvilágban, Európa és Ázsia országaiban, valamint Ausztráliában is (Gould és Fikrig 2004). Mára az egyik legelterjedtebb arbovírus a Földön, az Antarktiszon kívül az összes földrészen jelen van (Weissenböck és mtsai 2010). Az 1950-es évek előtt Afrika, Ázsia, Közép-Kelet és Dél-Európa területén enyhe megbetegedéseket és néhány halálos kimenetelű emberi, illetve ló agyvelő-gyulladással járó betegségeket kapcsoltak

össze nyugat-nílusi vírusfertőzéssel. WNV specifikus antitesteket találtak Albániában két emberi szérumban 1958-ban (Bárdos és mtsai 1959), néhány évvel később pedig a vírust is sikerült izolálni emberből és szúnyogból is a Rhone delta területén (Hannoun és mtsai 1964), illetve emberből és kullancsból a Volga delta területén (Chumakov és mtsai 1964; Butenko és mtsai 1967). Az 1960-as években sporadikus emberi megbetegedéseket írtak le Dél-Franciaországban (Hannoun és mtsai 1969), Dél-Oroszországban (Butenko és mtsai 1968), Délnyugat-Romániában (Topciu és mtsai 1971) és Spanyolországban (Filipe és Andrade 1990). A következő évtizedekben sem fordultak elő kiterjedt járványok, csak néhány embert érintő eseteket jelentettek

Fehéroroszországból (Voinov és mtsai 1981), Nyugat-Ukrajnából (Buletsa és mtsai 1989), Délkelet-Romániából (Le Guenno és mtsai 1996; Tsai és mtsai 1998) és Csehországból (Hubálek és mtsai 1999). A '90-es évek közepétől, 1996 és 2000 között Románia, Csehország, Olaszország, Oroszország, Tunézia, Marokkó, Izrael és Franciaország területén is megjelentek az embereket, lovakat és madarakat érintő WNV járványok, halálos kimenetelű agyvelő-gyulladásos esetekkel (Savage és mtsai 1999; Charrel és mtsai 2003; Zeller és Schuffnecker 2004). Európában a hazánkkal határos országokban is voltak halmozódott esetek, 1996-ban a Duna-delta környékén, Románia délkeleti területén (Tsai és mtsai 1998), 1997-ben



pedig Csehországban (Hubálek és mtsai 1999). A vírust 1999-ben behurcolták az Egyesült Államokba (Lanciotti és mtsai 1999), ahol néhány év alatt elterjedt az egész kontinensen, a vadmadarak körében jelentős elhullásokat okozott, nagyszámú lovat fertőzött meg és számos emberi megbetegedést idézett elő. Kanadában 2001-ben madaraktól, 2002-ben pedig emberektől is izolálták a vírust. 2002-ben szeropozitív madarakat találtak Jamaicában és a Dominikai Köztársaságban, valamint szeropozitív lovakat Mexikóban. Ezt követően emberi megbetegedést is leírtak a Karib-térségben (Gould és Fikrig 2004).

A kórokozó magyarországi előfordulásának gyanúja először az 1970-es

években merült fel. Az első feltételezett vírustörzset (W<sub>Nm</sub><sub>1</sub>) 1972-ben Veszprém megyében, egy erdei pocokból (*Myodes glareolus*) izolálták (Molnár 1982). A törzs későbbi részleges nukleotid sorrend vizsgálata alapján a legnagyobb, 99%-os hasonlóságot az 1951-ben, Egyiptomban izolált, Eg 101 jelű referenciatörzsszel mutatta. (Az eredményeket azonban annak tudatában kell kezelni, hogy ezt a törzset használták abban a szlovákiai laboratóriumban is referenciatörzsnek, ahol a magyarországi mintát vizsgálták). A nyugat-nílushi vírus magyarországi előfordulását viszont alátámasztja, hogy Koller és munkatársai (1969) 1968-ban szeropozitivitást mutattak ki emberi savómintákból. Az első megbetegedéseket is okozó vírus

felbukkanására azonban a 2000-es évek elejéig kellett várni. 2003-ban idegrendszeri tünetekkel és jelentős elhullásokkal járó járványt figyeltek meg egy alföldi lúdállományban. Molekuláris biológiai módszerekkel a nyugat-nílusi vírus jelenlétét sikerült kimutatni a mintákból (Glávits és mtsai 2005). Az izolált vírustörzs nukleotid-szekvenciájának részleges meghatározása alapján a legközelebbi rokon törzseknek az 1998-ban, Izraelben gólyából (Is98 „AF481864”), majd 1999 után az Egyesült Államokban emberekből, háziállatokból, vadmadaraktól és szúnyogokból kimutatott törzsek (pl. NY99a „AF202541”, NY99b „AF196835”) bizonyultak. Ezek a törzsek cirkuláltak Európában, a Közel-Keleten és

Észak-Afrikában is az 1990-es évek végén (Lanciotti és mtsai 2002, Bakonyi és mtsai 2004a). A „Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ 1999-2000 években kullancsencephalitis-ellenanyagra irányuló seroepidemiológiai szűrővizsgálatot végzett. A felmérő vizsgálat során gyűjtött savóminták utólagos vizsgálata WNV-ellenanyagra pozitív mintákat tárt föl. Ez arra enged következtetni, hogy a vírus 1999 előtt is cirkulált az országban, elsősorban azokon a területeken, ahol 2003-ban a vírust és ellenanyagait az emberi és madár idegrendszeri megbetegedésekből sikerült kimutatni (Ferenczi és mtsai 2004).

2004-ben a Körös-Maros Nemzeti Park területén élő héják (*Accipiter gentilis*) két

egyede idegrendszeri tünetekben betegedett meg, és az egyik madár el is pusztult. Kórbonctani, kórszövettani és molekuláris biológiai módszerekkel a nyugat-nílusi vírus jelenlétét lehetett kimutatni a héja szerveiből (Bakonyi és mtsai 2006). 2004-től jellemzően sporadikusan előforduló WNV eseteket regisztráltak hazánkban, azonban 2008-ban, az intenzív vírusterjedés hatására már 22 neuroinvazív humán és 37 állati megbetegedésből diagnosztizáltak WNV-t (Bakonyi és mtsai 2013).

### **3.2. Rendszertani besorolás és filogenetikai változatosság**

A nyugat-nílusi vírus a *Flaviviridae* családon belüli *Flavivirus* nemzetség tagja.

Hemagglutináció-gátlási és keresztneutralizációs próbák alapján a Japán encephalitis vírus szerokomplexbe tartozik, amelynek további tagjai a Japán encephalitis vírus (JEV), a Kountago vírus (KOUV), a St Louis encephalitis vírus (SLEV), a Murray Valley encephalitis vírus (MVEV) valamint az Usutu vírus (USUV).

A genetikailag változatos nyugat-nílusi vírusok egyetlen szerocsoportba tartoznak, azonban az E-proteint kódoló gén egy 225 nukleotid hosszúságú szakaszának nukleotid sorrendje alapján a vírustörzsek legalább nyolc genetikai vonalba sorolhatók (1. ábra). A leginkább változatos genetikai összetétel az afrikai kontinenshez köthető, ahonnan a vírus származik (Ciccozzi és mtsai 2013; May és

mtsai 2011). Az 1-es és 2-es genetikai vonalba tartozó vírusokat izolálják leggyakrabban emberi és állati megbetegedésekből, míg a 3-8-as genetikai csoport vírusait sporadikusan mutatják ki Európa, Afrika és Ázsia bizonyos területein. Az 1-es és 2-es genetikai vonal hozzávetőlegesen 75% nukleotid-azonosságot mutat.

Az 1-es genetikai vonal világszerte elterjedt, ezen belül három kládot különítenek el: 1a, 1b és 1c. Az 1a-n belül európai, afrikai és amerikai törzsek, az 1b-ben az ausztráliai Kunjin vírustörzs, míg az 1c-n belül indiai izolátumok vannak (Lanciotti és mtsai 2002; Bakonyi és mtsai 2005).

A 2-es genetikai vonalhoz tartozó

vírusokat 2004-ig csak Afrikában (a Szaharától délre eső területeken) és Madagaszkáron izoláltak (Lanciotti és mtsai 1999; Jupp és mtsai 2001; Zeller és Schuffenecker 2004). Az 1937-ben elsőként izolált WNV is ehhez a genetikai vonalhoz tartozott. Afrikán kívül 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírust először Magyarországon mutattak ki 2004-ben, vadmadarakban (Erdélyi és mtsai 2007). A következő években rokon vírusokat mutattak ki vadmadarokból, lovakból és emberből is Ausztriában (Bakonyi és mtsai 2006; Krisztalovics és mtsai 2008; Bakonyi és mtsai 2013), Görögországban (Chaskopoulou és mtsai 2011; Papa és mtsai 2011) és Olaszországban (Bagnarelli és mtsai 2011; Savini és mtsai 2012). A filogenetikai vizsgálatok szerint az európai 2-es genetikai



vonalú WNV Magyarországról terjedt át Ausztriába, majd később Görögországban és Olaszországban okozott megbetegedéseket (Bakonyi és mtsai 2013; Ciccozzi és mtsai 2013). Az utóbbi években a magyarországi vírusokkal közeli rokonságot nem mutató, de a 2-es genetikai vonalba tartozó vírusokat izoláltak Oroszországban (Platonov és mtsai 2008 és 2011) és Romániában is (Sirbu és mtsai 2011). Néhány évvel ezelőtt Szerbiából és Horvátországból is jelentettek szeropozitív lovakat (Lupulovic és mtsai 2011; Barbic és mtsai 2012), illetve kimutatták a vírust vadmadaraktól és humán megbetegedésekből is (Petrovic és mtsai 2013 a és b).

A 3-as genetikai vonalhoz egy 1997-ben

Csehországban szúnyogból (*Culex pipiens*) izolált törzs (Rabensburg 97-103), míg a 4-es genetikai vonalhoz egy 1998-ban, kaukázusi kullancsból (*Dermacentor marginatus*) kimutatott vírus tartozik (LEIVKrnd88-190). Az 5-ös genetikai vonalat Indiában (Bondre és mtsai 2007), a 6-os genetikai vonalat Spanyolországban izolált vírusok képviselik (Vázquez és mtsai 2010). A 7-es és 8-as genetikai vonalhoz afrikai törzsek tartoznak (Scherret és mtsai 2001 és 2002; Mackenzie és Williams 2009; Fall és mtsai 2014). A 9-es genetikai vonalat 2014-ben Magyarországon is megtalálták, *Uranotaenia unguiculata* szúnyogban (Kemenesi és mtsai 2014), habár ezt a vonalat mások a 4-es vonal alágának tekintik (Pachler és mtsai 2014).

Míg Indiába, Ausztráliába és az amerikai kontinensre a genetikai vizsgálatok alapján egy alkalommal történt behurcolással jutott be a vírus, majd vált endémiássá és alakított ki önálló kládokat vagy genetikai vonalakat (pl. 1b klád vagy 5-ös genetikai vonal), Európába valószínűleg több behurcolás történt egymástól függetlenül (Rappole és mtsai 2000 és 2006; Monini és mtsai 2010; May és mtsai 2011; Zehender és mtsai 2011).

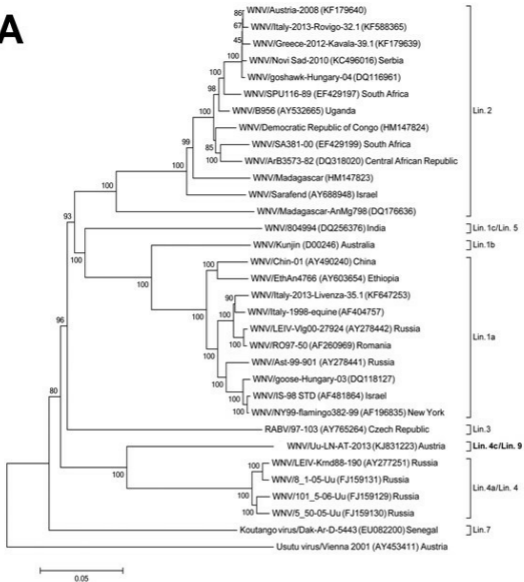
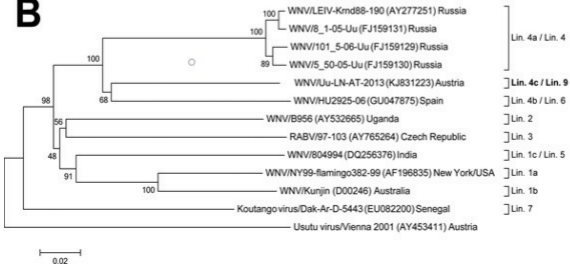
Az 1990-es évek elejéig Afrikán kívül az 1-es genotípusú vírusok okozta, többnyire enyhe lefolyású fertőzések voltak jellemzők, csak sporadikusan okozva agyvelő-gyulladást emberekben. Az első letális encephalitissel járó esetet 1994-ben Algériából jelentették, amelyet számos neuroinvazív fertőzéssel járó

járvány követett 1996-ban Romániában. Ebben az időben megnövekedett az encephalitissel járó megbetegedések száma Európa szerte más országokban is (Sotelo és mtsai 2011). Az 1999-es amerikai (Észak- majd Dél-Amerikát is érintő) járványt ugyancsak 1-es genetikai vonalba tartozó vírustörzs okozta, sok emberi és állati áldozatot szedve (Hayes 2001; Zeller és Schuffenecker 2004). A 2-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok sokáig nem tűntek olyan patogénnek, mint az 1-es vonalhoz tartozók. Általában enyhe lefolyású, nem letális megbetegedéseket okoztak (Petersen és Roehrig 2001). Az első halálos kimenetelű, Afrikán kívüli neuroinvazív fertőzés 2004-ben Magyarországon történt, egy héját (*Accipiter gentilis*) érintett (Bakonyi

és mtsai 2006; Erdélyi és mtsai 2007). Az utóbbi évtized vizsgálatai során kiderült, hogy Afrikában is előfordulnak a 2-es genetikai vonalhoz virulens törzsek (Venter és mtsai 2010).

**1. ábra.** A WNV főbb genetikai vonalai.

**A:** teljes nukleotid-szekvencián alapuló számítás, **B:** az NS5 gén egy 1813 nt hosszúságú szakaszán alapuló számítás (MEGA5, neighbor-joining, 1000-folc bootstrap analysis). /Forrás: Pachler és mtsai 2014/

**A****B**



### 3.3. A vírus felépítése

A WNV virionja 45–50 nm átmérőjű. Kívülről burok (envelope) borítja, ezen belül helyezkedik el a nukleokapszid. A burok egy gazdasejt eredetű kettős lipid membrán, amelybe két virális glikoprotein, az 53 kDa-os E protein (envelope) és a 8 kDa-os M proteint (matrix) van beágyazva. Az E protein egyrészt antigénként viselkedik, másrészt hemagglutinin, valamint a vírus gazdasejthez kötődését biztosító receptorfehérje is (Petersen és Roehrig 2001). A 12 kDa-os kapszidfehérjéből és a 11 kb hosszúságú, pozitív irányítottágú, egyszálú RNS-ből (+ssRNS) épül fel a 30–35 nm-es, ikozaéder szimmetriájú nukleokapszid. A kódoló molekula 5' végén egy 96 nukleotid

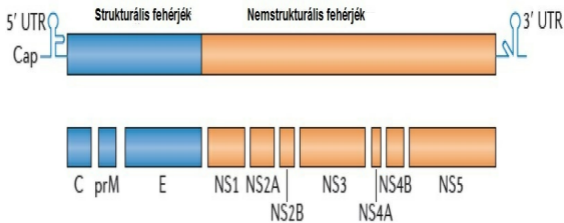


hosszúságú nem kódoló szakasz (Untranslated Region, UTR) található, majd ezt követi a 10 302 nukleotid hosszúságú nyitott leolvasási keret (a poliproteint kódoló szakasz), végül a 3' vég előtt egy 621 nukleotidból álló UTR. A vírus nem rendelkezik poli-A farokkal, de utolsó néhány nukleotidja nagyon konzervatív. A kódoló szakasz egyetlen nyitott leolvasási kerettel (ORF) rendelkezik, és három struktúrfehérje, valamint hét nem strukturális fehérje génjét tartalmazza. A virion felépítésében szerepet játszó struktúrfehérjék a C (kapszid protein), az E (envelope protein) és a 18–20 kDa-os pM (prekurzor membrán protein), melynek későbbi enzimatis hasításával keletkezik a burok membránjába integrált, 8 kDa-os M protein. A nem strukturális (NS) fehérjék –

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5 – nélkülözhetetlenek a sikeres replikációhoz, részt vesznek a virion összeépülésében és az immunrendszer kijátszásában. Az NS1, NS3, NS4A és NS4B fehérjék többek között képesek a sejt membránjait károsítani szaporodásuk során (Kaufusi és mtsai 2014). Az egyik legfontosabb, virulenciát meghatározó tulajdonság az interferon- (INF) szignalizációs folyamat (INF signal transduction pathway) blokkolása (Samuel és Diamond 2005; Keller és mtsai 2006; Suthar és mtsai 2012). Az I-es típusú interferon-szignalizációban bizonyítottan részt vesz a vírus NS2A (Liu és mtsai 2006), NS2B, NS3 NS4A (Liu és mtsai 2005), NS4B (Munoz Jordán és mtsai 2005; Evans és Seeger

2007) és NS5 (Laurent-Rolle és mtsai 2010), fehérjeje is. A genom felépítését a 2. ábra szemlélteti.

**2. ábra.** A nyugat-nílusi vírus genomjának struktúrája. /Forrás: Suthar és mtsai 2013/



Az NS1 fehérje a fertőzött sejtek

felszínén expresszázó glikoprotein, melynek egyik feladata az immunrendszer előli elrejtés elősegítése. A sejtben belül hólabilis homodimer formát vesz fel, az intercelluláris membránokhoz kapcsolódik, illetve így transzportálódik a sejt felszínére (Winkler és mtsai 1988 és 1989), ahol immunmoduláns funkcióját a komplementaktivitás csökkentésén keresztül látja el (Chung és mtsai 2006; Schlesinger és mtsai 2006). Az emléseredetű sejtek az NS1 fehérje oldékony hexamer formáját szekretálják is (Crooks és mtsai 1994; Flamand és mtsai 1999). Az immunmoduláns feladatokon túl az NS1 fehérje részt vesz a replikációban is. Egy tanulmányban Kunjin vírussal fertőzött sejtek ultrastruktúráját vizsgálva nyert bizonyítást, hogy az NS1 fehérje – hasonlóan más

flavivírusokhoz, mint például a dengue vírus (Mackenzie és mtsai 1996) – vagy a sárgaláz vírusa (Muylaert és mtsai 1997) a replikációs komplex felépítéséhez is szükséges (Westaway és mtsai 1997).

Az NS2A egy kicsi, hidrofób membránhoz kötött fehérje, a replikációs komplexet köti az endoplazmatikus retikulum (ER) membránhoz (Lindenbach és Rice 2001), részt vesz a vírus összeépülésében, valamint az IFN $\beta$  promóterének aktivitását gátolja (Liu és mtsai 2004; Leung és mtsai 2008). Az NS2A fontos szerepet tölt be a citopatogenitásban és a virulenciában is (Rossi és mtsai 2007).

Az NS2B a virális NS3 proteáz kofaktora. Az NS3 gén többféle, a

replikációban, valamint a poliprotein hasításában és érésében szerepet játszó enzimeket kódol, úgy, mint tripszin-szerű szerin proteáz, RNS trifoszfátáz, NTP-áz és helikáz (Wengler és mtsai 1991; Padmanabhan és mtsai 2006).

Az NS4A a virális NS3 helikáz kofaktora továbbá gátolja az interferon-szignalizációt (Munoz-Jordán és mtsai 2005), illetve az ER módosításával elősegíti a replikációs domének beágyazódását. Az NS4A C terminusának sejt általi hasításával jön létre a 2K fragment. A 2K feltételezhetően az RNS szintézisében vesz részt (Zou és mtsai 2009).

Az NS4B helikális, hidrofób membránhoz kötött fehérje, INF antagonistaként viselkedik. Az NS4A és NS2A aktivitásával kiegészítve a

STAT-1 foszforiláció blokkolásán keresztül az interferon-szignalizációs kaszkád bénításával kritikus szerepe van a sejt antivirális válaszában (Munoz-Jordán és mtsai 2005).

Az NS5 a vírus legnagyobb és egyben legkonzervatívabb fehérjéje, egyrészt S-adenozilmetionin metiltranszferáz (az 5' vég metilezésével kialakítja a metilsapkát), másrészt RNS-dependens RNS-polimeráz (RdRp) aktivitással rendelkezik (Guyatt és mtsai 2001; Ray és mtsai 2006). Ezen kívül interferon-antagonista hatása is van (Laurent-Rolle és mtsai 2010). A 3'UTR régió speciális harmadlagos szerkezettel rendelkezik, amely fontos szabályozó funkciót tölt be a vírus replikációjában és összeépülésében (Brinton

2002).

### **3.4. Virulencia**

Neurovirulenciáról akkor beszélhetünk, ha a vírus betegséget tud előidézni az idegrendszer megtámadásán keresztül. A WNV virulenciáját leginkább befolyásoló tényezők a neuroinvazivitás (a vírus bejutása a központi idegrendszerbe) és a neurotropizmus (a vírus képessége, hogy neuronokat és/vagy más idegrendszeri sejtcsoportokat megfertőzzön, és azokban továbbterjedjen). Habár egy neurovirulens vírus általában neuroinvazív is, ez nem minden esetben jelenti azt, hogy a vírus neurotropikus is. Van olyan eset, amikor a tüneteket az indukált immunválasz okozza. Továbbá az is előfordul, hogy egy neuroinvazív vírus nem



neurovirulens, ilyenkor a vírus úgy fertőzi meg a központi idegrendszert, hogy tüneteket nem okoz (Buchmeier és Campbell 2001).

A WNV gazdában való fennmaradásának és megbetegítő képességének feltétele, hogy a vírus bejusson a célsejtekbe, és az immunrendszer elől rejtve maradjon. A súlyos betegséget okozó WNV több tulajdonsága is ezt segít elő. A vírus számos, különféle állatfaj eredetű sejtpopulációt képes megfertőzni (Xiao és mtsai 2001; Jacobson és mtsai 2005; Tesh és mtsai 2005; Garcia-Tapia és mtsai 2006). *In vitro* citolítikus, különböző sejtek (mint például a neuronok) apoptózisát idézi elő (Parquet és mtsai 2001; Shrestha és mtsai 2003), *in vivo* pedig neuron-nekrózist okoz

(Shieh és mtsai 2000; Ziegler és mtsai 2013; Diakakis és mtsai 2014).

A WNV-ok genetikai változatossága erősen befolyásolja a különböző vírustörzsek virulenciáját. A genomban előforduló számos mutációról bizonyították, hogy különböző mechanizmusokon keresztül növeli vagy éppen csökkenti a vírus virulenciáját.

Beasley és munkatársai (2005) kimutatták, hogy az E fehérje 154. és 156. helyén történő aminosav-változása gátolja az N-glikozilációt, és egérben jelentős attenuálódást eredményez. A csökkent neuroinvazivitás okaként a glikoziláció elvesztése következtében fellépő alacsonyabb vírusstabilitást jelölték meg, továbbá a célsejtek fertőzőképességére, a vírus

összeépülésére és sejtből való kiszabadulására, valamint az E fehérje és a célsejtek megzavart membránfúziójára gyakorolt hatást feltételezték (Beasley és mtsai 2005). A glikoziláció vírus replikációjában betöltött szerepét mások is vizsgálták. Egy madár modellben a glikozilált E fehérjével rendelkező WNV-ok virulensebbnek bizonyultak nem glikozilált társaiknál, valamint magasabb titert értek el a megfertőzött fiatal csirkék vérében (Murata és mtsai 2010). Moudy és munkatársai (2009) tanulmányában a glikoziláció elvesztése csökkent mértékű replikációhoz vezetett szúnyog sejtvonalakon, és a *Culex* szúnyogok orális fertőzése után a nem glikozilált vírusok gazdára való átvitele is alacsonyabb mértékű volt (Moudy és mtsai

2009). A glikoziláció megléte vagy hiánya nem csak az E fehérje esetében tűnik jelentősnek. Az NS1 fehérje glikozilációs helyeinek aminosav-változásai szintén neuroinvazivitás csökkenéshez vezet. A glikoziláció elvesztése az NS1 fehérje két vagy három glikozilációs helyén, alacsonyabb fokú virémiához és csökkent letalitáshoz vezet egérben (Whiteman és mtsai 2010). Az előbbiekből következően az E és az NS1 fehérje glikozilációjának változása nagy hatást gyakorol a virulenciára.

A WNV gazdaszervezetben való fennmaradásának alapkövetelménye az immunrendszer hatékonyságának csökkentése. Az egész *Flaviviridae* család nagyfokú rezisztenciát tanúsít az INF-ok

antivirális hatásaival szemben. Ebben a flavivirális NSP-knek kiemelkedő szerepük van (Munoz-Jordan és mtsai 2003; Lin és mtsai 2004 és 2006; Best és mtsai 2005; Guo és mtsai 2005; Liu és mtsai 2005). Az INF indukált immunválasz gátlása többféle úton történik, ezek közül úgy tűnik, hogy a virulens WNV-ok esetében kulcsszerepe az I-es típusú INF válasz befolyásolásának van (Keller és mtsai 2006). Mivel az immunválasz kijátszásában a nem strukturális fehérjék döntő szerephez jutnak, a bennük fellépő mutációk erre hatást gyakorolhatnak. A Kunjin vírus NS2A fehérjéjének A30P mutációja például az interferon-válasz gátlásának csökkenéséhez vezetett szopós egérben, ami az INF szint növekedését és a neurovirulencia mérséklődését okozta (Liu és mtsai 2006).

Egy másik tanulmányban az NS4B fehérje C102S szubsztitúciója neurovirulencia és neuroinvazivitás-csökkenéshez vezetett egérben (Wicker és mtsai 2006), amely okaként ugyancsak az INF-szignalizáció gátlásának zavara feltételezhető. A flavivirális NS4B fehérje N-terminálisának első 125 aminosava lehet felelős az INF- $\alpha/\beta$  szignalizáció inhibíciójáért (Munoz-Jordan és mtsai 2005), így egy itt fellépő mutáció lényegesen befolyásolhatja ezt a tulajdonságát.

A glikoziláción és az immunrendszer-gátló képességen túl egyéb tulajdonságokat is befolyásolhat a vírus genetikai felépítése. Egy tanulmányban az NS4B fehérje E249G AS szubsztitúciója például lelassította a vírus *in*

*in vitro* szaporodását, szövettenyészetben kisebb plakkok alakultak ki, alacsonyabb szintű volt az RNS-szintézis, *in vivo* pedig jelentős attenuációt okozott egérben (Puig-Basagoiti és mtsai 2007). Ugyanennek a nem strukturális fehérjének a P38G mutációja egy másik tanulmányban szintén *in vitro* lelassult replikációhoz, *in vivo* pedig attenuálódáshoz vezetett. A mutáns vírussal fertőzött egerekben a virémia szintje alacsonyabb volt, elhullást nem tapasztaltak, továbbá gyorsabb és erősebb immunválasz alakult ki bennük (Welte és mtsai 2011).

Általánosságban elmondható, hogy azoknak az AS szubsztitúcióknak van potenciális hatásuk a virulenciára, amelyek a fehérje másodlagos szerkezetének

megváltozásához vezetnek (például a hidrofób-hidrofil AS csere), és így a nem strukturális fehérje virális replikációban, vagy a fehérje hasításában betöltött szerepe károsodik, ami befolyásolja a vírus virulenciáját (Botha és mtsai 2008).

A flavivírusok RNS-dependens RNS-polimeráza viszonylag magas hibaszázalékkal dolgozó enzim (kb.  $10^{-4}$  mutáció/nt kópia), amely sokkal magasabb, mint a DNS-polimeráz enzimeké, így a vírus szaporodása során több vírusvariáns is kialakul (úgynevezett „kvázispecies”-ek) (Batschelet és mtsai 1976; Holland és mtsai 1982; Steinhauer és Holland 1987). Mind a kísérletes, mind a természetes fertőzések esetében megfigyelhetők ezek a



vírusváltozatok vagy -variánsok, ugyanis minden replikációs ciklus alatt képződhetnek pontmutációk, és az egyes mutációk feltételes számítások szerint bármely időpillanatban jelen lehetnek (Vignuzzi és mtsai 2005). Ugyanígy a molekuláris klónok a sejtbe jutás után, a gyors replikáció következtében rövid idő alatt hasonló szekvenciák „populációját” alakítják ki (Biebricher és Eigen 2006). A WNV a természetben is kvázispeciesként létezik. A new yorki 2003-as járvány idején gyűjtött tíz fertőzött madár és tíz fertőzött szúnyog pool E és NS1 génjeinek vizsgálata során kiderült, hogy a fertőzések háttérében egy genetikailag változatos víruspopuláció áll. Továbbá a szúnyogokból gyűjtött szekvenciák szignifikánsan magasabb változatosságot mutattak, mint a madaraktól gyűjtöttek. Ebből

arra lehet következtetni, hogy a WNV genetikai diverzitása inkább az enzootikus cikluson keresztül marad fenn, mintsem az egyes gazdáknban történő mutációk következtében (Jerzak és mtsai 2005). A WNV gazdán belüli populációdinamikájának vizsgálatára egy tanulmányban *C. pipiens* szúnyogban és fiatal csirkékben passzálták *in vivo* 20-szor a vírust. A szúnyogokban passzált vírus genetikai diverzitása jelentősen magasabb lett a 20 passzázs után, mint a csirkében passzált vírusé. A vírusokkal ezután egereket fertőztek meg. Az egerek mortalitása negatív korrelációt mutatott a WNV mutáns spektrumával, vagyis a változatosabb genetikai populációt tartalmazó, szúnyogban passzált vírus kevésbé

virulensnek bizonyult, míg a csirkében passzált, genetikailag egyneműbb vírus ugyanolyan virulens volt, mint az eredeti, kiindulási törzs. Úgy tűnik tehát, hogy a szúnyogok a WNV genetikai diverzitásának őrzői, míg a madarak a szelektálódásért felelnek (Jerzak és mtsai 2007). Valószínűnek tűnik, hogy az antitest-mediált neutralizációt is a kvázispecies antigénbeli variációja miatt sikerül elkerülnie a vírusnak a gazdaszervezetben (Samuel és mtsai 2006).

### **3.5. A vírus élelciklusa**

A WNV élelciklusának négy fő állomása van: 1. adszorpció és penetráció, 2. transláció, 3. replikáció, 4. összeépülés és kiszabadulás. A vírus az E fehérje

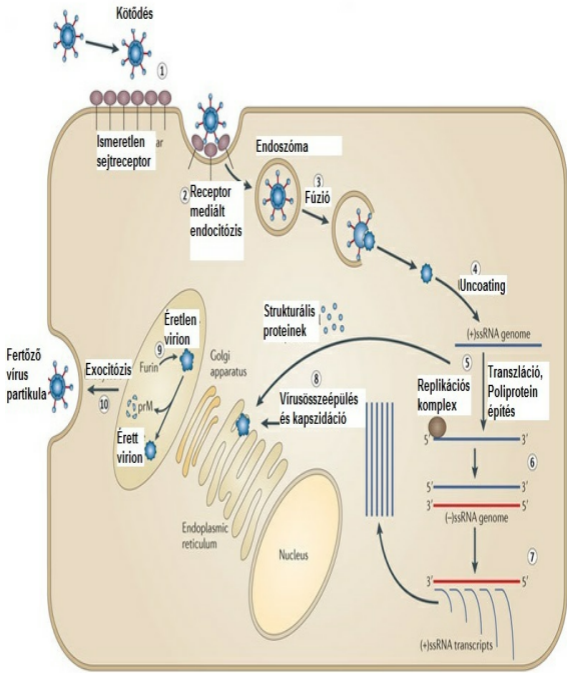
segítségével a sejthez kötődik és receptor-mediált endocitózissal bejut a gazdasejtbe. A sejtben a vírus endoszómákba transzportálódik, amely kompartmentek savasságának hatására az E-fehérje konformációja megváltozik, aminek következtében a virális és az endoszómális membrán fuzionál, majd a nukleokapszid a citoplazmába jut. A citoplazmában a kapszid és az RNS disszociál. A virális +ssRNS szerkezete a mRNS-éhez hasonló, így a policisztronos transzláció a gazdasejt mechanizmusaival és enzimei felhasználásával történik. A kódoló régióról tehát egyetlen poliprotein prekursor keletkezik, amely a későbbiekben érési folyamaton esik át, vagyis celluláris és virális proteázok hatására tíz - strukturális és nem strukturális - fehérjére

válí szét. Ezzel párhuzamosan – szintén a citoplazmában – zajlik a replikáció, a virális proteinek által megalapozott speciális doméneken, virális eredetű RdRp segítségével. Az RdRp a +ssRNS-duplaszálúvá egészíti ki, majd ez a replikációs intermedier kettéválí, és a leváló –ssRNS egészül ki duplaszálúvá, amely ugyancsak kettéválí. Ez a folyamat többször megismétlődik. A keletkező –ssRNS-ek templátként szolgálnak a RdRp számára a következő ciklusban, a +ssRNS-ek pedig bekapcsolódnak a transzlációba. Végül a keletkező +ssRNS-ek és a struktúrfehérjék az ER-ba jutnak, ahol a vírus összeépül, majd az ER-Golgi-apparátusban érési folyamaton mennek keresztül, végül az utódvirionok

exocitózissal vagy bimbózással elhagyják a gazdasejtet, miközben átesnek az utolsó érési fázisokon is (Castillo-Olivares és Wood 2004; Rossi és mtsai 2010). A WNV élelciklusát a 3. ábra szemlélteti.

**3. ábra.** A WNV élelciklusa. /Forrás:

Suthar és mtsai 2013/







### 3.6. A vírus terjedése, vektorok, gazdák

A *Flavivírus* nemzetség számos olyan vírusfajt tartalmaz, amelyek egyaránt képesek állatokat és embereket is fertőzni (zoonózisok), és esetenként súlyos megbetegedéseket előidézni bennük (Mackenzie és Tsai 2002). Mint a fent említett nemzetség döntő többsége, a nyugat-nílusi láz kórokozója is az arthropod-borne vírusok (arbovírusok) közé tartozik, vagyis a fogékony gazdaszervezetek között elsősorban ízeltlábú vektorok terjesztik. A szúnyogok által terjesztett flavivírusok gazdasági haszonállatokban vagy embereken általában sporadikusan, esetenként halmozottan előforduló megbetegedéseket idéznek elő. Ezek a vírusok a természetben főként

valamilyen vadon élő rezervoár gazdafajban maradnak fenn, és ezeknek a vadon élő állatoknak a vérszívó parazitái biztosítják a fertőzési ciklust. A vadon élő madarak közül különös járványtani jelentőséggel bírnak a vonuló fajok (Valiakos és mtsai 2012). Ezek a madarak a téli, hideg időszakot trópusi vagy szubtrópusi területeken töltik, azonban visszatérnek mérsékelt vagy hideg égövi élőhelyeikre, amint a tavaszi felmelegedéssel elviselhető hőmérséklet és kellő mennyiségű táplálék áll ismét rendelkezésükre. Az emberi települések közelében található vizes élőhelyek lehetőséget teremtenek a vadmadarak, a vektorok és a helyi településeken élő vad és házimadarak találkozására. Mivel a vándormadarakban hosszan tartó virémia alakulhat ki, sokszor

tünetek nélkül (Semenov és mtsai 1973; Work és mtsai 1955), a telelési időszak alatti esetleges fertőzéssel bekerült trópusi kórokozóval együtt érkeznek, könnyen fertőzve így a helyi szúnyogpopulációkat, amelyekben a vírus amplifikálódik. A szúnyogok által a vírus bekerül a helyi – az emberi településeken is nagy számban megtalálható – madarak populációjába, vagyis a szilvaticus ciklus mellett az urbánus ciklus is kialakul. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, miszerint a vírusmentes területekre betörő WNV-t először szúnyogokból vagy vadmadarokból lehet kimutatni. Később alakulhatnak ki az akár tömeges elhullásokkal járó járványok a fogékony madarakban, amit gyorsan követnek

az első emberi esetek is (Julian és mtsai 2002; Reisen és mtsai 2006).

A nyugat-nílusi vírus esetében az elsődleges biológiai vektorok Európában a világszerte elterjedt *Culex* szúnyogfajok (*C. pipiens*, *C. modestus*) és a *Coquillettidia richiardii* (Hayes 1989; Higgs és mtsai 2004; Lvov és mtsai 2004; Zeller és Schuffenecker 2004), de a kórokozó jelen van többek között a z *Anopheles*, *Aedes*, és *Ochlerotatus* fajokban is (Gould és Fikrig 2004). A vírust világszerte legalább 66 különböző szúnyogfajból sikerült már kimutatni (CDC 2016), de ezeknek csak egy része kompetens biológiai vektor (képes megfertőződni a vírussal, benne elszaporodik és a nyálmirigyében hordozott kórokozót át tudja

adni a fogékony gazdának) (Castillo-Olivares és Wood 2004; Monini és mtsai 2010). A főként madarak (alkalmanként ember és emlősállatok) vérével táplálkozó szúnyogok hazánkban is képesek istállókban, barlangokban, pincékben áttelelni, ezért a fertőzött egyedek évről évre átmenthetik a vírust is. Egy 2008-as tanulmány szerint a Duna-delta területén – ahol hatalmas és változatos populációk élnek mind helyi, mind vándormadarakat, mind pedig szúnyogfajokat illetően – a 17 fajhoz sorolható több mint 10 000 befogott szúnyognak 99%-a 5 fajhoz tartozott. A fajmegoszlás a következő volt: *C. pipiens* (44%), *C. torrentium* (27%), *C. modestus* (11%), *Coquillettidia richiardii* (14%), *Anopheles maculipennis* (3%) és egyéb fajok összesen (1%). Ugyanebben a

régióban az embereken fogott szúnyogok nagy része két fajhoz – *C. modestus* (35%) és *C. richardii* (34%) – volt sorolható. Ugyanakkor a régió egy városában csalétekkel ellátott billenő madárcsapdával gyűjtött szúnyogok 93%-a *C. pipiens*, 5%-a *C. torrentium* volt, míg *C. modestus* és *C. richardii* nem volt a csapdázott szúnyogok között (Reiter és mtsai 2010). Hasonlóan más emberi települések környezetében történt felméréshez, itt is az erősen ornitofil *C. pipiens* szúnyogfaj volt a domináns (Hamer és mtsai 2008). Ezek az adatok is azt mutatják, hogy a szúnyogok sűrűsége, fajösszetétele, a gazdafajok előfordulása és a vektorkompetencia kapcsolatrendszer nagyon komplex és bonyolult.

A WNV vertikális terjedését (a kórokozónak a fertőzött nőstény szúnyogból az utódaiba történő átjutását) számos szúnyogfaj esetében igazolták (Anderson és mtsai 2006; Goddard és mtsai 2003), továbbá kimutatták hibernálódott szúnyogokból is, ami bizonyítja, hogy a kórokozó képes áttelelni a fertőzött vektorokban (Hayes és mtsai 2005; Calistri és mtsai 2010; Farajollahi és mtsai 2011). A környezeti hőmérséklet és páratartalom kritikus tényezők a szúnyogban történő replikáció és a nyálmirigybe való behatolás időtartamát tekintve: meleg időben a folyamat nagyjából két hetet vesz igénybe. Mivel a környezeti tényezők a vektorok szaporodására, aktivitására is nagy hatással vannak, így a mérsékelt égövi területeken a

nyugat-nílusi láz járványok kifejezett szezonalitást mutatnak (Castillo-Olivares és Wood 2004). A legtöbb eset nyáron és kora ősszel figyelhető meg, ami egybeesik a szúnyogok maximális aktivitásával (Hubálek és Halouzka 1999). A vírus a természetben enzootiás (szilvatikus, exoantropikus) ciklus formájában marad fenn, melynek kialakításában rezervoár madárfajok és ornitofil szúnyogok (*C. univittatus*, *C. tarsalis*, *C. modestus*) vesznek részt. Ezek a szúnyogfajok főként madaraktól szívják vért, alkalmanként azonban emlősöket és az embert is megtámadják (Savage és mtsai 1999; Apperson és mtsai 2004). Emellett ismert egy epizootikus (urbán, szinantropikus) ciklus is, amelyben az emberi környezetben



élő madarak és olyan szúnyogok szerepelnek, melyek madarakon és emlősökön egyaránt tudnak táplálkozni (*C. pipiens pipiens*, *C. pipiens molestus*, *C. quinquefasciatus*) (Hubálek és Halouzka 1999; Monini és mtsa 2010). Ezek a szúnyogok trópusi és mérsékelt égövön, városban és vidéki környezetben is elterjedtek. A *C. pipiens* korábban elsősorban a szilvaticus ciklus fenntartása kapcsán került előtérbe, mint ornitofil szúnyog, az utóbbi években azonban az Egyesült Államokban leírták a *C. pipiens* két formájának intenzív hibridizációját és megállapították, hogy az olyan hibridek, amelyek ősei között több a *molestus* forma, szívesebben táplálkoznak embereken vagy egyéb emlősökön. Ezek alapján manapság úgy vélik, hogy a *C. pipiens* fontos „bridge”-

vektor, vagyis jelentős szerepe van a nyugat-nílusi láz kórokozójának madarokról emlősökre és emberekre történő átvitelében (Farajollahi és mtsai 2011). Bizonyos szúnyogfajok tehát a WNV élelciklusát a fogékony madarak között fenntartó, úgynevezett „enzootiás vektorok”, míg más fajok a rezervoár vadmadarak és a véletlenszerű „dead-end” gazdák közötti, úgynevezett „bridge”- (összekötő) vektorok (Medlock és mtsai 2007; Gray és Webb 2014).

Nyugat-nílusi vírust kimutattak már óvontagokból és kullancsokból is. Laboratóriumi körülmények között az óvontagok (pl. *Argas arboreus*, *Ornithodoros* fajok) képesek voltak a fertőzést átvinni más

állatokra is (csirkére, egérre), míg az *Amblyomma*, *Dermacentor* és *Ixodes* kullancsok fertőződtek ugyan, a későbbi vérszívás alkalmával azonban nem oltották át a vírust a fogékony gazdáikba. Az óvantagok és a kullancsok valószínűleg nem játszanak jelentős szerepet a vírus átvitelében (Hayes és Mtsai 2005).

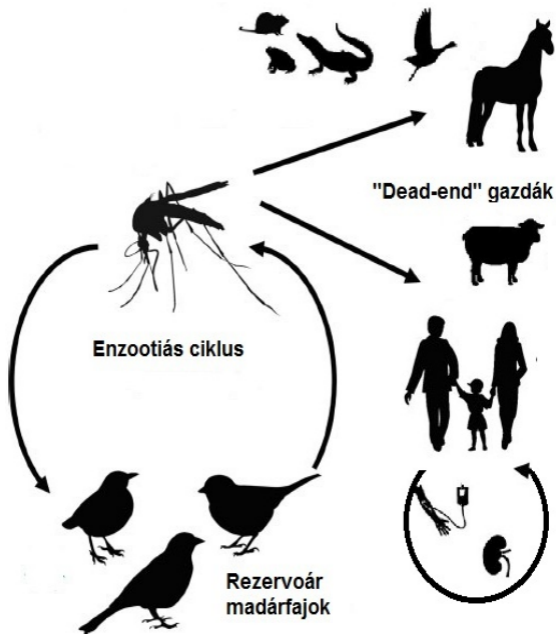
A WNV elsődleges gazdái a madarak; több mint 326 madárfajról (CDC, 2000) bizonyították már, hogy fogékony a vírusfertőzésre, ám az egyes fajok esetében nagy eltérések mutatkoznak a vírusszaporodás intenzitása, a virémia ideje és mértéke, valamint a klinikai tünetek tekintetében is. Bizonyos madarakban, mint a verébalakúak (*Passeriformes*), a lilealakúak

(*Charadriiformes*), a bagolyalakúak (*Strigiformes*) és a sólyomalakúak (*Falconiformes*), a vírus elég magas titert ér el ahhoz, hogy a belőlük vért szívó szúnyogok fertőződjenek. Ezeket a fajokat amplifikációs gazdának hívjuk. Egy amerikai tanulmány alapján madarakban a virémiaküszöb, amely ahhoz szükséges, hogy a szúnyog vektorok fertőződjenek vérszívás során  $5 \cdot \log_{10}$  PFU/ml szérum (Reisen és mtsai 2005). Európában és az Egyesült Államokban az emberi környezetben nagy számban élő házi verébnek (*Passer domesticus*) tulajdonítanak fontos szerepet a vírus járványmenetében (Castillo-Olivares és Wood 2004). Vannak „szentinel” madárfajok is, mint pl. az amerikai rövidcsőrű varjú (*Corvus brachyrhynchos*), amelyek magas fogékonyságuk (súlyos

virémia és nagyarányú elhullás) és emberi környezetben való elterjedésük miatt a vírusaktivitás megnövekedésének korai jelzői lehetnek. A madarakban a súlyos virémia moribund állapottal jár, a szúnyogcsípés ellen nem tudnak védekezni, a testhőmérsékletük és légzésszámuk magas - ez mind szúnyogcsalogató (Brault és mtsai 2007). Más madarak - mint pl. a lúdalakúak (*Anseriformes*) és a harkályalakúak (*Piciformes*) - a lovakhoz, számos más fogékony emlősfajokhoz, hüllőkhöz és kétélűekhez hasonlóan alkalmi, véletlenszerű „dead-end” gazdák, vagyis képesek megfertőződni a vírussal, de az alacsony vértiter miatt további szúnyogokat nem fertőznek (Hayes és mtsai 2005; Monini és

mtsai 2010; Rossi és mtsai 2010). Kompetens rezervoárnak bizonyultak viszont bizonyos rágcsáló, nyúl és mókus fajok, vagy a mississippi aligátor (*Alligator mississippiensis*) és a kacagó béka (*Rana ridibunda*) is (Klenk és mtsai 2004; Hayes és mtsai 2005; Jacobson és mtsai 2005; Monini és mtsai 2010). A vírusterjedés nem kizárólag vektorokkal történhet, leírtak már intrauterin, anyatejjel, vérátömlesztéssel és szervátültetéssel történt fertőzéseket is (Iwamoto és mtsai 2003; Gould és Fikrig 2004; Kramer és mtsai 2007, Hinckley és mtsai 2007). A WNV transzmissziós útjait szematikusan a 4. ábra szemlélteti.

#### **4. ábra.** WNV transzmissziós útjai.



Az Usutu vírus ökológiája a WNV-hoz hasonló, elsődleges gazdái a vadmadarak, és elsődleges ízeltlábú vektorai a *Culex* nemzetségbe tartozó szúnyogok. A

vadmadarak sokszor tünet nélküli hordozók, a vírus rezervoárjai, de bennük betegséget és akár tömeges elhullást is okozhat (Chvala és mtsai 2007; Weissenböck és mtsai 2003). Európában az USUV sikeresen adaptálódott a helyi körülményekhez, transzmissziós ciklusát fenntartja a helyi vadmadarak és szúnyog vektorok között, és évről évre okoz elhullásokat a fogékony fajok egyedei között (Weissenböck és mtsai 2003; Bakonyi és mtsai 2017).

### **3.7. Klinikai tünetek**

Emberben a fertőzések kb. 80%-a tünetmentes, 15-20%-ban influenzaszerű lázas tünetek jelentkeznek, mely kórképet nyugat-nílusi láznak (West Nile fever)



nevezünk (Davis és mtsai 2006). A tünetek a fertőzött szúnyog csípése után 2-14 nappal jelentkeznek: a láz, kimerültség, ízületi- és / vagy izomfájdalom, étvágycsökkenés, gyomor- és bélrendszeri panaszok, esetleg visszatérő bőrkiütés mellett számos egyéb ritkán előforduló klinikai tünetet (heveny májgyulladás, hashártyagyulladás és szívizomgyulladás) is leírtak (Couissinier-Paris 2006). Előfordulhatnak szemet érintő tünetek is, mint pl. multifokális ér- és ideghártyagyulladás (Koevary és mtsai 2005). Az idegrendszeri tüneteket nem mutató embereknél a gyógyulási idő átlagosan 7–10 nap (Monini és mtsai 2010). A nyugat-nílusi vírussal fertőzött emberek kevesebb, mint 1%-ában alakul ki idegrendszeri megbetegedés, amely agyvelő-, illetve agy-

és gerincvelő-gyulladásban nyilvánul meg (West Nile neuroinvasive disease) (Davis és mtsai 2006; Kramer és mtsai 2007). Az idegrendszeri érintettség főleg az idősebb korosztályban, immunhiányos állapotban, cukorbetegekben vagy daganatos betegekben fordul elő. A neuroinvazív megbetegedések agyhártya- vagy agyvelő-gyulladás, vagy akut petyhüdt bénulás formájában, 1–7 nappal az influenzaszerű tünetek kialakulását követően jelentkeznek. Az agyvelő-gyulladás jelei a tremor, mioklonus, megváltozott tudatállapot, ataxia és parkinsonizmus (Gould 2003; Couissinier-Paris 2006; Davis és mtsai 2006; Monini és mtsai 2010). Meningitisz esetén a láz mellett az agyhártya-irritáció tipikus jelei figyelhetők

meg: fejfájás, a nyakizmok és a tarkó merevsége, fotofóbia (Kramer és mtsai 2007). Fiatal embereken leírták a WNV fertőzés hosszútávon kialakuló tüneteként vesebetegséget is: Nolan és mtsai (2012) 139, 57 év átlagéletkorú WNV fertőzött ember 40%-ában diagnosztizált vesebetegséget éveken belül a fertőzés után.

Lovakban ugyancsak gyakori a tünetmentes fertőzés, klinikai tünetek ritkán jelentkeznek (Nielsen és mtsai 2008). A betegség a szúnyogcsípést követő 3–15 napos inkubációs idő után lázas általános tünetekkel (a láz nem feltétlen tünet lovak esetében – OIE Manual 2013) és gyengeséggel kezdődik. A körülbelül 10%-ban kialakuló idegrendszeri tünetek 1–2 héttel

az elsődleges tünetek megjelenése után azonban súlyos, heveny formában, a virémia lefutása után jelentkeznek, valószínűleg másodlagosan, az immunkomplexek kialakulása miatt (Ward és mtsai 2006; Davis és mtsai 2006; Pellegrini-Masini és Livesey 2006). Idegrendszeri tünetek kialakulása esetén az elhullási arány magas, a 30-40%-ot is elérheti (Reed és mtsai 2010), illetve felépülés esetén is maradhatnak vissza idegrendszeri tünetek, úgy, mint viselkedés-, testtartás-, illetve járásmódbeli rendellenességek (Wilson és mtsai 2003). A gerincvelő-károsodásra visszavezethető idegrendszeri tünetek ataxia, egy-vagy kétoldali (legtöbbször a hátsó lábakat érintő) parezis, esetleg négy láb paralízis formájában, gyakran bőr-túlérzékenységgel,

izommerevséggel vagy izomremegéssel kísérve jelentkeznek (Weese és mtsai 2003; Ward és mtsai 2004). Agyi érintettségre utaló tünetek a dizmetria, mentális zavarok, aluszékonyság, hiperexcitáció, agresszió, hiperesztézia, vagy a VII., IX., XII. agyideg el érintettsége miatt kialakuló faciális-bénulás, nyelvlógás, diszfágia (Castillo-Olivares és Wood 2004).

A nyugat-nílusi vírus természetes gazdái vadmadarak, amelyek sok esetben tünetmentes hordozók. Azonban a „szentinel” fajok és más érzékeny fajok, mint például Magyarországon a héjafélék / vágómadárfélék (*Accipitridae*) vagy Amerikában a varjúfélék (*Corvidae*) esetében súlyos levertség és idegrendszeri tünetek

jelentkezhetnek, akár kifejezetten magas elhullási rátával (Langevin és mtsai 2005; Bakonyi és mtsai 2006; Brault és mtsai 2007). Az elhullás a nagyon érzékeny fajokban akár jellegzetes tünetek nélkül, 24 órán belül is jelentkezhet. A nem specifikus tünetek (depresszió, anorexia, dehidráció, csapzott tollazat, vonaglás, ataxia, rendellenes fejtartás, remegés, inkoordinált repülés, parezis, dizorientáció, ragadozó madarakban akár vaksáig fokozódó látásromlás) általában a fertőzést követő 5. nap körül jelentkeznek (Gamino és Höfle 2013). Világszerte legalább 326 különböző fajhoz tartozó madár esetében regisztráltak WNV okozta elhullást (CDC, 2000). Az amerikai vagy európai, esetenként tömeges elhullásokkal szemben az Óvilágban csak

sporadikusan fordul elő WNV-okozta vadmadár elhullás (Gamino és Höfle 2013).

További gerinces fajok, rágcsálók, hüllők, kétéltűek nyugat-nílusi vírus fertőzései is ismertek, amelyek elhullásokban is megnyilvánulhatnak, mint például az említett mississippi aligátor esetében az Egyesült Államokban (McLean és mtsai 2002; Miller és mtsai 2003).

### **3.8. Kórfejlődés, kórbonctan**

A vírus a szúnyogcsípést követően a fertőzött szúnyog nyálával jut a szervezetbe, majd a beoltás helyén a bőr Langerhans-sejtjeiben (dendritikus sejtek) kezd szaporodni. Innen először a lokális nyirokcsomókba, majd azon keresztül a

nyirokáramba, onnan pedig a vérbe jut. Kialakul az elsődleges virémia, aminek következtében a vírus eljut a parenchimaszervekbe (lép, máj, vesék), ahol pedig további szaporodása zajlik (Kramer és mtsai 2007; Rossi és mtsai 2010). A kórbonctani elváltozások általában nem patognomikusak, kórszövettani vizsgálatok során leggyakrabban limfocitás-hisztiocitás perivaszkuláris infiltráció, gliózis, fokális neutrofil infiltráció, valamint neuron degeneráció látható az érintett szervekben (Cantile és mtsai 2000). Immunhisztokémiai módszerekkel a vírusantigének is azonosíthatók az elváltozást mutató területeken. Extrém esetben, egyes fajokban (pl. aranyhőrcsög) perzisztensen is



megtelepedhet a vírus bizonyos szervekben, mint pl. az agyban vagy a vesében (Tesh és mtsai 2005). Madarakban ezen kívül a lépben, a bőrben valamint a szemben is fennmaradhat hosszabb ideig a vírus (Gamino és Höfle 2013). Perzisztens vesefertőzést emberben is leírtak, egy tanulmányban a virális RNS 5–6 évvel a fertőződést követően is kimutatható volt a vizeletből (Monini és mtsai 2010; Baty és mtsai 2012). A kórfejlődés nem egységes, különböző fajokban, különböző virulenciájú vírusok esetében is lehetnek az átlagostól való eltérések. Például madarakban nem feltétlenül szükséges az elsődleges virémiát megelőző helyi vírusszaporodás sem, a vérben akár 30–45 perccel a szúnyogcsípést követően megjelenik a vírus (Reisen és mtsai

2007), és általánosságban elmondható hogy a fertőzött madarak véréből egy nappal a fertőződés után már kimutatható. A virémia csúcsát a fogékony fajokban (mint például lúd, varjú, szajkó) 2–3 nappal, kevésbé fogékony fajokban (mint például csirke, bagoly) 4–6 nappal a fertőzés után éri el. A virémia általában 6–10 napig tart (Gamino és Höfle 2013). A neuroinvazivitás módja egyelőre még ismeretlen, többféle feltételezés is elfogadott, úgy, mint passzív transzport a vér-agy gáton át (annak károsodásával vagy károsodása nélkül), a vér-agy gáton való aktív átjutás, illetve retrográd terjedés a perifériás idegek axonjai mentén. A passzív transzport ellen szól, hogy a magas vírustiter nem feltétlenül jár

neuroinvazivitással, illetve a letális egérfertőzések nem jártak minden esetben emelkedett permeabilitással. Sőt, azokban a fajokban (ember, ló) amelyekben alacsony a vértiter, gyakoribbak a neuroinvazív megbetegedések. Ezekben az esetben lehet fontos szerepe a perifériás neuronok mentén történő retrográd vírustranszportnak. A vér-agy gáton keresztüli aktív átjutás lehetőségét madarakban feltételezik, mivel immunhisztokémiai módszerekkel sikerült az endothel sejtekben WNV-antigéneket detektálni (Castillo-Olivares és Wood 2004; Kramer és mtsai 2007; Rossi és mtsai 2010; Gamino és Höfle 2013).

### **3.9. Védekezés**

### 3.9.1. Immunitás

A szervezet nyugat-nílusi vírus elleni védekezésében az immunrendszer sejtes és humorális immunitásának megfelelő működése is nélkülözhetetlen. A vírusfertőzést követően a szervezet első reakciója az interferonok termelése, így az I-es típusú interferon-szignalizációja nélkülözhetetlen korai lépés a vírus elleni *in vivo* küzdelemben. Az E, a prM/M és NS1 fehérjék ellen termelődő vírusneutralizáló ellenanyagok a periférián történő vírusszaporodást gátolják (Chung és mtsai 2007; Colombage és mtsai 1998; Pincus és mtsai 1992; Vazquez és mtsai 2002), míg a citotoxikus T-sejtek a központi idegrendszerbe bejutott vírust pusztítják el. A vírus elleni

küzdelemben továbbá szerepe van a nem neutralizáló ellenanyag-válasznak valamint az ellenanyag-függő sejt-közvetítette citotoxicitásnak is. Az NS3 és NS5 fehérjék ellen kialakuló nem-neutralizáló ellenanyag válasznak pontos szerepe még nem ismert (Wong és mtsai 2003). A keringő neutralizáló ellenanyagok direkt (pl. az internalizációhoz szükséges receptorok blokkolásával), illetve indirekt módon (a dekapszidációhoz és a citoplazmába való penetrációhoz szükséges konformáció változások gátlásával) semlegesíthetik a vírust (Castillo-Olivares és Wood 2004; Monini és mtsai 2010). A megfelelően működő immunrendszer nélkülözhetetlen a vírusfertőzéssel szembeni védekezésben, ezért immunszupresszált egyéneknél magasabb a kockázata a súlyos

megbetegedésnek (Davis és mtsai 2006).

### 3.9.2. Megelőzés

Jelenleg nincs általános és kötelező szűrővizsgálat (monitoring) és egészségügyi szabályozás a WNV járványok elkerülése tekintetében (Sambri és mtsai 2013), de valószínűleg Európában erre nincs is szükség. Az általános óvintézkedések, mint a szúnyogirtás, szúnyog-tenyészőhelyek felszámolása, szúnyoghálók és szúnyogriasztó szerek használata mellett az emberek tájékoztatása azonban fontos lehet a fertőzés veszélyének csökkentésére.

Európában az ECDC kezelésében egy internet alapú értesítő rendszer működik a WNV érintett területekről

([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west\\_nile\\_fever\\_maps/pages/index](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever_maps/pages/index)). Ezen a weboldalon az érintett területek térképes megjelenítésén kívül a helyi esetekről lehet tájékozódni, illetve az adott területeken véradásra nem lehet jelentkezni.

Lovak esetében a vírusfertőzés ellen inaktivált és élő, attenuált vakcinák is léteznek. Jelenleg Magyarországon és az EU-ban centrális forgalomba hozatali engedéllyel három vakcina rendelkezik, az inaktivált kiméra flavivírust tartalmazó Equilis West Nile<sup>®</sup> (Intervet/MSD), a rekombináns élőkánáripox vírus alapú Proteq West Nile<sup>®</sup> (BI/Merial), illetve az inaktivált WNV-tartalmazó Equip WNV<sup>®</sup> (Zoetis). Észak-Amerikában ugyancsak három vakcina van

forgalomban, egy formalin inaktivált teljes WNV-t tartalmazó (West Nile Innovator<sup>®</sup>, Zoetis), egy elölt vírus tartalmú (Vetera<sup>®</sup> WNV vakcina, BI/Merial) és egy rekombináns élő kanáripox kiméra vakcina (Recombitek<sup>®</sup> Equine West Nile Virus Vaccine, BI/Merial) (De Filette 2012). A járványszeton megkezdése előtt, a használati utasításnak megfelelően alkalmazott vakcina a veszélyeztetett területeken (esetleg előzetes szerológiai felmérés után, a még tünetmentes fertőzésen át nem esett lovak részére) megfelelő védelmet ad a fertőzés ellen. Emberek számára WNV vakcina nincs forgalomban.

### 3.9.3. Gyógykezelés



Mint a vírusfertőzésekre általánosan, a WNV kezelésére sincs specifikus gyógyszer. A súlyos betegségben szenvedő egyének kezelése ribavirinnel (Loginova és mtsai 2009), interferon- $\alpha$ -val (Kalil és mtsai 2005) és WNV-specifikus immunglobulinnal (Hamdar és mtsai 2002; Shimoni és mtsai 2001) történhet.

### 3.10. Diagnosztika

A WNV fertőzés gyors diagnosztikája kulcsfontosságú azokban az esetekben, amikor a vírus súlyos neuroinvazív megbetegedést okoz. Mivel a klinikai tünetek és az általa okozott kórbonctani és kórszövettani elváltozások jellegteleneek, nem patognomikusak, a diagnózis a vírus direkt vagy indirekt kimutatásával lehetséges. Direkt víruskimutató klasszikus virológiai módszer a kísérleti állatoltás (szopósegerek agyvelejében), embrionált tyúktojás oltása (allantoisz- és amnionüregében) valamint szövettenyészetek fertőzése (pl. Vero, liba embrió-fibroblaszt). Az izolálás után a vírus meghatározása WNV-specifikus monoklonális ellenanyagokkal vagy nukleinsav kimutatással

történhet (Gould 2003). Manapság a vírus nukleinsavának kimutatására reverz transzkripciós polimeráz láncreakciót (RT-PCR) használnak, amely gyorsabb és kevésbé költséges, mint a klasszikus módszerek. További előnye, hogy a megfelelő PCR termék szekvenálása után a kapott szekvenciák elemzésével a vírus genetikai rokonsága is feltérképezhető. A RT-PCR az idegrendszeri tünetek jelentkezésekor, a sokszor alacsony szintű virémia esetén is eredményre vezethet (Hayes és mtsai 2005). Kórszövetteni mintákból direkt kimutatható a vírusantigén immunhisztokémiai (IHC), illetve a vírus nukleinsava nukleinsav hibridizációs módszerekkel is. Direkt víruskimutatásra alkalmas élő állat esetében az alvadásban gátolt vér (fehérvérsejt frakciója), vagy a

liquor, elhullott állat esetében a szervek (agyvelő, gerincvelő, esetleg a parenchimas szervek) homogenizátuma. Embereknél a vérből történő direkt RNS kimutatás sokszor nehézségekbe ütközik (a tünetek jelentkezésekor a virémia már nagyon alacsony szintű), vizeletből azonban viszonylag hosszú ideig sikeresen kimutatható a vírus RT-PCR vagy vírusizolálás módszerével (Barzon és mtsai 2013 és 2015; Nagy és mtsai 2016).

A vírus indirekt kimutatása az ellene termelt ellenanyagok detektálását jelenti vérből vagy liquorból. A szerológiai vizsgálatok sokszor nem elég specifikusak (HAG, ELISA, IF) a flavivírusok között fennálló antigén-rokonság miatt, bár plakk-

redukciós neutralizációs próba (PRNT) esetér a savópár-vizsgálatok és a szóba jövő keresztreagáló vírusokkal (USUV, kullancsencephalitis, JEV, MVEV, SLEV), történő szimultán titrálás eredményre vezethet a diagnózisban (Zeller és Schuffenecker 2004; Monini és mtsai 2010). A diagnózist azonban megnehezíti, hogy a PRNT kivitelezése BSL3 szintű biztonsági labor igényel. Heveny fertőzés kimutatására alkalmas az IgM típusú ellenanyagok detektálása (pl. IgM-fogó ELISA módszerrel indirekt immunfluoreszcenciás (IF) vizsgálattal, vagy hemagglutináció-gátlási (HAG) próbával), amelynek vérszintje heveny fertőzés esetén hirtelen emelkedik, és a fertőzéstől számított 6–10. naptól maximum 2–3 hónapig mutatható ki a vérsavóból (Varga

és Fodor 2003; Davis és mtsai 2006). Az IgG ellenanyagok a fertőzést követő 2–3. hétben jelennek meg, és akár több évig is kimutathatók (pl. IgG-fogó ELISA próbával) a vérsavóból. Heveny fertőzésre lehet következtetni savópár vizsgálattal; a 2–3 héttel később vett vérmintában minimum négyszeres titer emelkedés friss fertőződésre utal (Durand és mtsai 2002; Varga és Fodor 2003). Az IgG ellenanyagok detektálása a (tünetmentes) fertőzés utólagos bizonyítására is alkalmas, akár madarak esetében is. A jelenleg ismert szerológiai módszerekkel nem lehet elkülöníteni az átvészelés kapcsán megjelenő, maternális vagy az immunizálás hatására termelt ellenanyagokat, sem pedig meghatározni, hogy a vírus, amely a fertőzést

okozta, melyik genetikai vonalhoz tartozik.

Embereknél az Európai Unió definíciója szerint (ECID Brussels 2012) akut WNV fertőzés bizonyított, ha vérből vagy liquorból izolálható a vírus, vagy kimutatható az RNS-e, illetve IgM ellenanyagok vannak a liquorban vagy a vérben magas az IgM titer, kimutatható az IgG és neutralizációval bizonyítottan WNV ellen termelődött.

# Célkitűzések

Vizsgálataink célja az utóbbi évtizedben Magyarországon kimutatott flavivírus-fertőzések – elsősorban a WNV – nyomor követése, a nyugat-nílusi vírustörzsek genetikai jellemzése, járványtani sajátosságai és állategészségügyi, illetve közegészségügyi jelentőségük felderítése volt.

Ennek érdekében munkánk egy része a vírusok fenntartásában és terjesztésében kulcsszerepet játszó vadmadarak és ízeltlábú vektorok vizsgálatára irányult, passzív és aktív monitoring rendszerek felállításával.

A flavivírusok terjesztésében fontos szerepet játszó ízeltlábú vektorok hazai



vizsgálatára eddig kevés figyelem irányult. Ezért egyik célkitűzésünk a WNV hazai vektorfajainak meghatározása, és az érintett területeken élő vektorokban a vírusfertőzés gyakoriságának felmérése, továbbá a leginkább érintett és veszélyeztetett madárfajok körének meghatározása volt.

A kutatás másik részében célunk volt a Magyarországon előforduló WNV 2-es genetikai vonalához tartozó egyik hazai vírustörzs patogenitással összefüggő virulenciamarkereinek azonosítása. Ennek feltétele a vírus genetikai anyagát tartalmazó, teljes hosszúságú fertőző klón előállítása volt, amely genomjának mutagenézissel történő módosításával lehetővé vált a rekombináns vírusok tulajdonságainak *in vitro*, illetve *in*

*vivo* vizsgálata.

A hazai kóresetekből kimutatott vírustörzs virulenciájára hatást gyakorló genetikai tényezők feltárásával fontos információkhoz juthatunk a 2-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok fenotípusos tulajdonságaira (pl. virulencia, neuroinvazivitás) vonatkozóan is.

# Anyag és módszer

## 5.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

### 5.1.1. *Passzív monitoring vadmadarakban és lovakban*

A passzív monitoring fő eleme idegrendszeri tünetekben megbetegedett vagy elhullott gerinces gazdák, főként vadmadarak és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (NÉBIH ÁDI) laboratóriumaiba valamint az Állatorvostudományi Egyetem laboratóriumaiba küldött, idegrendszeri tüneteket mutató lovak mintáinak vizsgálata volt. A vizsgált vadmadarak a NÉBIH ÁD

laboratóriumaiba érkező, a kórelőzmény és kórbonctan alapján gyanúsnak ítélt vadmadár hullák, nemzeti parkok munkatársai által gyűjtött, állatkertekben és madármentő-állomásokon kezelt, valamint solymászok által nevelt madarak mintái voltak, amennyiben a WNV fertőzés gyanúja felmerült. 2010-től 2013-ig a NÉBIH ÁDI-ba az országos madárinfluenza monitoring program keretein belül vizsgálatra érkező minden (évente 275, 181, 266 illetve 257) vadmadár hullát megvizsgáltunk. 2009 és 2015 között ez évente 79, 335, 241, 336, 354, 83, illetve 54 madárhulla vizsgálatát jelentette. A NÉBIH-ÁDI-ba érkezett vadmadár hullákat WNV mellett egyéb flavivírusok jelenlétére is vizsgáltuk.

### 5.1.2. Aktív monitoring szúnyog vektorokban

A szúnyogokat 2011 és 2012 év során gyűjtöttük öt földrajzi területen, 24 gyűjtési ponton (5. ábra). A szúnyogok szezonális aktivitását figyelembe véve a gyűjtés május és szeptember hónapok között történt, bizonyos pontokon téli mintagyűjtéssel kiegészítve. Az említett öt földrajzi terület elhelyezkedése a következő volt:

„terület I”: Dél-Dunántúl (4 gyűjtési pont Baranya megyében):

- Pécs közelében található mocsaras terület (22)
- sumonyi madárgyűrűző központ (24)

- Mohácshoz közel eső Duna holtág (21)
- Dráva ártere a drávaszabolcsi határátkelő közelében (23)

„terület II”: Északkelet-Magyarország (5 gyűjtési pont Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében):

- Tisza ártere (két gyűjtési pont) (1, 2)
- mocsaras területek Kisvárdánál közelében (két gyűjtési pont) (4, 8)
- Kisvárdánál közelében elhelyezkedő víztározó (5)

„terület III”: Kelet-Magyarország (6)

gyűjtési pont Hajdú-Bihar megyében):

- Debrecen közeli galériaerdők (két gyűjtési pont) (9, 10)
- Debrecen közeli horgásztavak (két gyűjtési pont) (11, 13)
- Debrecen városközpont (12)
- Hortobágyi Nemzeti Park (15)

„terület IV”: Délkelet-Magyarország (4 gyűjtési pont Békés megyében):

- Kardoskút közeli juhstálló (18)
- Kardoskút közeli kék vércse (*Falco vespertinus*) fészkelő hely (18)
- körösladányi galambdúc (17)

- dévaványai baromfi és sertéstartó telep (16)

„terület V”: 2 gyűjtési hely Közép-

Magyarországon:

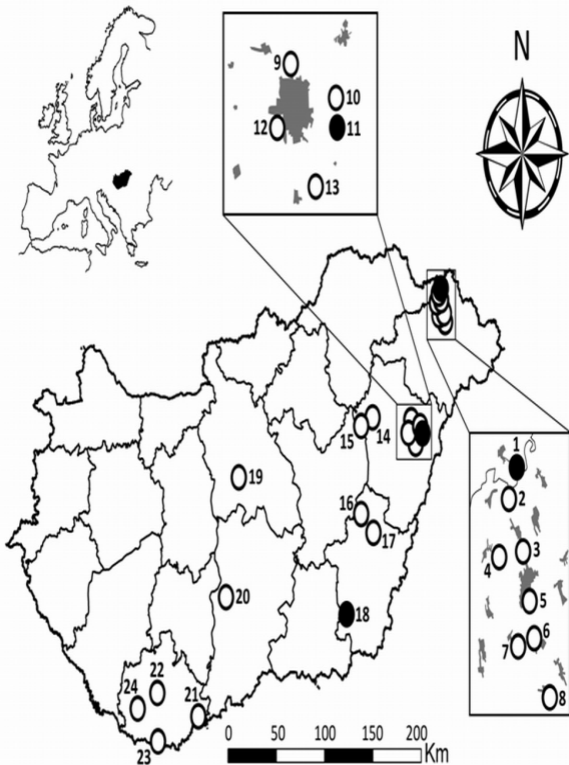
- ócsai pince (19)
- kacsatelep Felsőerek közelében (20)

A téli csapdázási pontok az előbb felsorolt helyszínek közelében, baromfitelepeken (3), pincékben (5, 7, 8), juhistállókban (6, 8) és tehenészetekben (14) helyezkedtek el.



## 5. ábra. A WNV-re tesztelt

szúnyogpoolok gyűjtési területei. A pontok jelölik a gyűjtési helyeket (üres körök: csak negatív minták; teli körök: legalább egy WNV pozitív minta). 1: Fényeslitke, 2: Szabolcsveresmart, 3: Döge, 4: Kékcse, 5: Kisvárda, 6: Anarcs, 7: Ajak, 8: Gyulaháza, 9-13: Debrecen, 14: Hortobágy-Halastó, 15: Egyek (HNP), 16: Dévaványa, 17: Körösladány, 18: Kardoskút, 19: Ócsa, 20: Felsőerek, 21: Mohács, 22: Pécs, 23: Drávaszabolcs, 24: Sumony. /Forrás: **Szentpáli-Gavallér K** és mtsai 2014/



A szúnyogcsapdázási módszerek eltérőek voltak területenként. Az I-es területen az emberre szálló felnőtt egyedeket szívócsővel, illetve a Pécs közeli mocsaras területen elhelyezkedő gyűjtési ponton függőleges légáramlású fénycsapdák segítségével is gyűjtöttük. A csapdázott szúnyogokat öt naponta összegyűjtöttük és laborba szállítottuk, ahol  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk. Az emberre szálló szúnyogok gyűjtése hetente egyszer, 15 perces időtartamban, napnyugta után történt. Az így élve befogott szúnyogokat a laboratóriumban ugyancsak  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk. A II-es és III-as területeken az emberre szálló szúnyogokat havonta kétszer motoros szívóval, napnyugta után 15 percen keresztül gyűjtöttük. Eközben történt a csípésszám és

a küllemi vizsgálat is. Télen az áttelelő szúnyogokat szívócsővel és motoros szívóval csapdáztuk épületek belső faláról, pincékből és ló-, juh-, baromfi- és tehenistállókból (Kisvárdra közelében 6, a HNP-ban egy ponton). Gyűjtés után az imágókat hűtőládában szállítottuk a laborba, ahol – 20°C-os fagyasztóban tároltuk a további vizsgálatokig. A IV-es és V-ös területeken többszöri egész napos gyűjtés történt. A szúnyogokat épületek belső faláról – Kardoskúton juhstállóban és pincékben, Körösladányban galambdúcban és pincékben, Dévaványán baromfi-, és sertéstelepeken, Ócsán pedig pincékben – szívócsővel gyűjtöttük. Felsőereken és Kardoskúton ezen kívül fénycsapdázás is folyt.

A két év alatt összesen 23 193 szúnyogot (645 poolban) vizsgáltunk meg WNV jelenlétére. Ez 2011-ben 11 728, 24 különböző fajhoz tartozó szúnyogot, 2012-ben pedig 11 465, 18 különböző fajú szúnyogot jelentett. A gyűjtött és vizsgált szúnyogok száma és fajmegoszlása az 1. táblázatban látható.

**1. táblázat.** A WNV jelenlétére tesztelt szúnyogok száma és fajmegoszlása gyűjtési területeként.

	<b>Terület</b>		
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
<i>Aedes cinereus</i>	2206	202	44
<i>Aedes rossicus</i>	356		
<i>Aedes vexans</i>	8603	814	98
<i>Anopheles algeriensis</i>	11		
<i>Anopheles claviger</i>	14		6
<i>Anopheles hyrcanus</i>	876	11	183
<i>Anopheles maculipennis</i>	113	2	4

<i>Anopheles plumbeus</i>	23		7
<i>Coquillettidia richiardii</i>	790	313	471
<i>Culex hortensis</i>	1		
<i>Culex martinii</i>	7		
<i>Culex modestus</i>	323	255	116
<i>Culex pipiens</i>	87	2	2
<i>Culex territans</i>	5		
<i>Culex torrentium</i>	8		
<i>Culiseta alaskaensis</i>	1		
<i>Culiseta annulata</i>			
<i>Ochlerotatus annulipes</i>	395	28	68
<i>Ochlerotatus</i>			

<i>cantans</i>	29	29	221
<i>Ochlerotatus caspius</i>			20
<i>Ochlerotatus cataphylla</i>		1	
<i>Ochlerotatus excrucians</i>		1	
<i>Ochlerotatus flavescens</i>		25	39
<i>Ochlerotatus geniculatos</i>	9		1
<i>Ochlerotatus leucomelas</i>		2	3
<i>Ochlerotatus rusticus</i>	68		
<i>Ochlerotatus sp.</i>			



<i>Ochlerotatus sticticus</i>	5656	38	55
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	34		

### 5.1.3. A minták feldolgozása, nukleinsav-kivonás és real-time RT-PCR

A szúnyogok fajmeghatározása sztereomikroszkóppal (Olympus, Tokyo, Japan), 25x-ös nagyítás mellett, Becker és munkatársai (2003) illetve Kenyeres és Tóth (2008) morfológiai kulcsai alapján, hűtött padon történt. Az egyedeket faj, nem, gyűjtési hely és idő szerint csoportosítottuk, és maximum 50 egyedet tartalmazó poolokba rendeztük. Ezután további három alcsoportra osztottuk, mint 1–3, 4–19 illetve 20–50 egyedet tartalmazó pool, és a molekuláris vizsgálatokig 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekben  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk. A vadmadár minták egyesével kerültek feldolgozásra.

A 1–3, 4–19 illetve 20–50 egyedet tartalmazó rovar poolok és a vadmadár, illetve ló szervek homogenizálása steril PBS pufferben, félautomata homogenizátorral (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Németország) történt. Homogenizálás után a fémgolyót tartalmazó csöveket 10 percig,  $10\,000 \times g$ -n centrifugáltuk a szövettörmelék leüleptése céljából. A virális RNS-t  $100 \mu\text{L}$  felülúszóból automata X-tractor Gene nukleinsav-kivonó robottal (Corbett Robotics, Queensland, Ausztrália), Nucleospin 96 RNA Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren Németország) felhasználásával izoláltuk. A mintákban ezután a WNV nukleinsavát RT-PCR módszerekkel vizsgáltuk, úgy, mint a Bakonyi és mtsai által (2013) leírt, a genom NS3 régióját célzó TaqMan alapú real-time

PCR és egy, a genom 5'UTR régiójára irányuló ugyancsak TaqMan alapú real-time RT-PCR (Linke és mtsai 2007). A Bakonyi és mtsai által leírt (2013) módszert kissé módosítva (a gátló TAMRA festék helyett 3' BHQ-t használtunk) és a saját laboratórium feltételeinkhez optimalizálva alkalmaztuk. Pozitív minták esetében a real-time RT-PCR termék szekvenálásával ellenőriztük a WNV jelenlétét. A kimutatott vírustörzsek közül egyesekből további nukleinsav-szakaszokat erősítettünk fel RT-PCR segítségével, majd az amplifikációs termékek nukleotid-szekvenciáinak meghatározását követően genetikai összehasonlító vizsgálatoknak vetettük alá őket (Bakonyi és mtsai 2013). A vadmadár mintákat egyéb flavivírusok

kimutatásának céljából tovább vizsgáltuk a Weissenböck és munkatársai által leírt panflavi RT-PCR módszerrel is (Weissenböck és mtsai 2002). 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 Spanyolország).

## **5.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenézise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás kísérletek**

### *5.2.1. Kiindulási vírus elszaporítása*

A WNV-578/10 elnevezésű (GenBank azonosító: KC496015) vírustörzs egy 2010-ben a SZIE ÁOTK Üllői Nagyállatklinika idegrendszeri tüneteket mutató és végstádiumban leölt ló agyvelejéből származott. A vírustörzs legközelebbi genetikai rokonságban a Magyarországon 2004 óta cirkuláló, 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsekkel állt. A vírus elszaporításához 10% kolosztrummentes főtális borjúsavót (FBS) tartalmazó Eagle's MEM szövetfenntartó folyadékban (Sigma-

Aldrich, Saint Louis, MO, USA) fenntartot egyrétegű Afrikai zöld majom vese epithel (Vero) sejtvonalat használtunk. A fenntartó folyadék 0,3 mg/ml glutamint, 100 U/ml penicillint, 0,1 mg/ml sztreptomicint és 0,25 µg/ml amphotericin B-t (Sigma-Aldrich) is tartalmazott. A szövettenyészet adszorpciós fertőzése után 4 nappal, a maximális citopatogén hatás elérésekor a palackok háromszori fagyasztása és olvasztása után a szövettörmelék és a felülúszóban maradó vírus elkülönítése érdekében alacsony fordulatszámú centrifugálás ( $1000 \times g$ , 20 perc) következett. Végül az elszaporított vírust pelletizáltuk (felülúszó ultracentrifugálása  $50\ 000 \times g$ -n, 8 órán keresztül) és 100 µL PBS-ben oldottuk fel.

### *5.2.2. RNS kivonás és komplementer DNS (cDNS) szintézis*

Az RNS kivonását az ultracentrifugált vírus szuszpenzióból QIAamp Viral RNA Min Kit-tel (Qiagen) végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az RNS vírus genomjáról készült teljes hosszúságú egyszálú komplementer DNS (cDNS) előállítása SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reverz transzkripciósi rendszerrel és genomspecifikus primerrel történt (3'XbaSacIIR). Az eljárás lényege röviden: első lépésben 5  $\mu$ L reverz primert (10  $\mu$ M) és 1  $\mu$ L RNS-t mértünk 7,5  $\mu$ L RNázmentes vízbe, majd 5 perces 65°C-os hőkezelés után 4°C-ra hűtöttük vissza. A 10



perces hűtést követően a reakció második lépésében 11  $\mu\text{L}$  reakcióelegyet (2  $\mu\text{L}$  reakciós puffer, 4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  dithiothreitol (DTT), 1  $\mu\text{L}$  RNase OU<sup>-</sup> inhibitor, 1  $\mu\text{L}$  SSIII enzyme és 1  $\mu\text{L}$  dNTP mix) mértünk az első lépésben összeállított folyadékhoz. A reakcióelegyet 30 perces szobahőn való állás után 60 percig 50°C-ra, majd 5 percre 85°C-ra melegítettük fel. A végül 4°C-ra visszahűtött, már cDNS-t tartalmazó elegyet RNáz H kezelésnek (1  $\mu\text{L}$  RNáz H hozzáadása után 37°C 20 percre keresztül) vetettük alá a heteroduplex termékek RNS szálainak elbontása érdekében.

### 5.2.3. Plazmid és kompetens sejtek

A felhasznált pBeloBAC TGE (Wang és mtsai 1997) bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) vektort L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Department of Molecular and Cell Biology, Madrid, Spanyolország) bocsátotta rendelkezésünkre, amelyet Bálint és munkatársai (2012) módosítottak egy, a 3' járulékos szekvenciák utáni XhoI restrikciós enzim vágóhely törlésével, továbbá egy SfiI, SfoI, BstBI, ClaI, BamHI, XhoI, AsiSI, AvrII és SacII restrikciós enzim vágóhelyeket tartalmazó többszörös klónozó hely (multiple cloning site) beépítésével. Az így létrehozott pBeloBAC FP plazmidot mint kiindulási vektor használtuk a WNV klónozásához. A plazmid

felszaporításához Max Efficiency DH10E kompetens *Escherichia coli* baktériumokat (Invitrogen) használtunk. Hő sok általi transzformáció után a baktériumokat klóramfenikol tartalmú táptalajra oltottuk, így a klóramfenikol rezisztenciáért felelős szakaszt is tartalmazó pBeloBAC FF plazmidot felvett kompetens sejtek szelektíven növekedhettek. A transzformációt követően egy éjszakán át tartó növekedés után Qiagen Large Construct Kit (Qiagen) segítségével nyertük ki a kiindulási, illetve később a klónozási lépések során előállított rekombináns plazmidokat.

*5.2.4. A teljes hosszúságú duplaszálú DNS előállítása fúziós PCR-ek segítségével*

A módszer elve a vírus teljes genomját lefedő, egymással átfedő polimeráz láncreakciók termékeiből felépülő fúziós PCR-ek sorozata. A polimeráz láncreakciókhoz genomspecifikus primereket (2. táblázat) és a nagyon alacsony hibaszázalékkal dolgozó (Phusion HF pufferben a hibaszázalék  $4,4 \cdot 10^{-7}$ , ami 50-szer alacsonyabb, mint a Taq polimerázé), kifejezetten hosszú DNS szakaszok felerősítéséhez alkalmazható Phusion Hot Start High-Fidelity DNS polimeráz-enzimet (Finnzymes, Espoo, Finnország) használtunk. A genomspecifikus primereket a PrimerSelect (Lasergene, Madison, WI, USA) programmal terveztük és ellenőriztük.

A módszer a következő fázisokból állt: első lépésben a CMV promóter szekvenciát

nyertük ki a pBeloBAC FP plazmidból, illetve a vírus első 5426 nukleotidját erősítettük fel PCR-rel, genomspecifikus primerek felhasználásával (5'SFI1F\*1FRC, illetve 1F\*5426R). Az így előállított két PCR termékből fúziós PCR-el állítottuk elő az I-es fragmentet, kihasználva azt, hogy az 1F és 1FRC oligók egymás reverz komplementerei. A reakcióhoz 5'SFI1F és 5314R primereket és a következő protokollt használtuk: kezdeti denaturáció 98°C 30 másodpercig; majd 30 cikluson keresztül ismételve 98°C 10 másodpercig a duplaszálú DNS denaturációjához, 60°C 30 másodpercig az annealinghez és 72°C 3 percig az extenzióhoz; végül 72°C 7 perc a végső láncépüléshez. A specifikus primereket az első négy ciklus lefutása után adtuk a

reakcióhoz, ezzel elősegítve a részben egymást átfedő templátok összetapadását. A második és a harmadik lépésben a vírus középső körülbelül 4500, illetve utolsó körülbelül 3000 nukleotidjának felerősítése következett, így létrehozva a II-es és III-as fragmentet (4750F\*9175R; 8190F\*3'25bR). Ezután fúziós PCR segítségével az egymást részben átfedő I-es és II-es fragment összeillesztésével előállítottuk a fragment I+II-t. A reakcióhoz 5'SF11F /T7F és 9175F oligókat és a fent említett protokollt használtuk, 4 perc extenzióval. A teljes hosszúságú komplementer DNS előállításának utolsó lépése fragment I+II és fragment III összekapcsolása volt, ugyancsak fúziós PCR segítségével. A reakció az

előzőkben leírthoz hasonlóan folyt, de ciklusonként 7 perc extenzióval, valamint 5'SF11F / T7F és 3'30bR primerrel felhasználásával. Valamennyi fragment és a végső teljes hosszúságú ds DNS elkülönítése agaróz gél elektroforézissel, majd tisztítása a 0,8%-os gélből QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) történt. A módszer sematikus szemléltetése a 6. ábrán látható.

**2. táblázat.** A CMV-WNV-3-2-1 teljes hosszúságú fertőző klón konstrukciója során, a vírus (578/10) genomját lefedő, egymást átfedő PCR termékek előállításához használt genomspecifikus primerek listája.

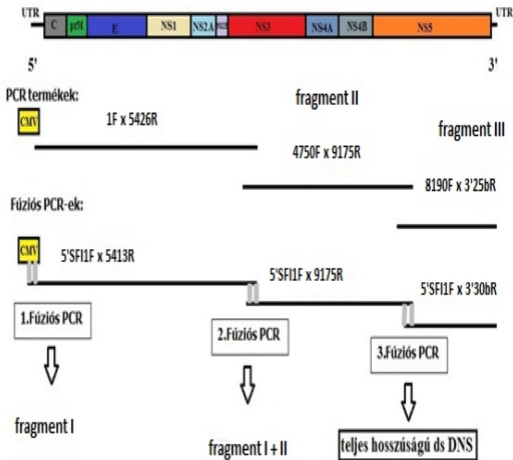
Primer neve	Nukleotid-szekvencia (5'→3'

1F†	<i>GAGCTCGTTTAGTGAACCG</i>
1FRC†	<i>GCTCACACAGGCGAACTAC</i>
4750F	<i>CACACACTATGGCACACCA</i>
5314R	<i>CCTCAGACATCTCAGCAGC</i>
5426R	<i>GACATCAGCCTGTGTGTGA</i>
8190F	<i>AGACTGGCTGCACAGAGG</i>
9175R	<i>GGTCTTCATTGAGGAATCC</i>
3'25bR	<i>AGATCCTGTGTTCTAGCAC</i>
3'30bR	<i>AGATCCTGTGTTCTAGCAC</i>
3'XbaSacII R‡	<i>ATCCGCGGTCTAGAGATCC</i>

† A dőlt betűs bázisok a cytomegalovirus (CMV) promóter részei. \* Primer pozíciók a WNV-578/10-es törzs szekvenciája alapján megadva. ‡ A dőlt betűs bázisok az extra restriktív enzim vágóhelyek.



## 6. ábra. A teljes hosszúságú dsDNS előállítása fúziós PCR-ek alkalmazásával.



5.2.5. A fertőző klón előállítása hagyományos klónozási lépésekkel

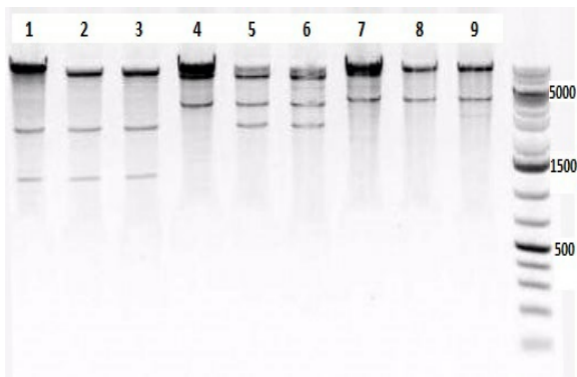
A módszer lényege a vírus teljes genomját tartalmazó duplaszálú DNS – pBeloBAC FP – alacsony kópiaszámú plazmidba való beépítése. Ebben az esetben is a vírus teljes genomját lefedő, egymást átfedő PCR termékek (fragment I, II és III előállítása volt az első lépés, amely az előbbieken leírtak szerint történt. Különbség csak a III-as fragment esetében volt, ugyanis előállításához reverz primerként egy olyan speciális oligonukleotidot használtunk, amely a WNV-578/10 vírus 3' végének nukleotidjain kívül két extra restrikciós enzimvágóhely (XbaI és SacII) szekvenciáját is tartalmazta.

A restrikciós enzimes emésztések, illetve a klónozás egyéb lépései a standard protokollok alapján történtek (Sambrook és

mtsai 2001). A restriktív endonukleázok és a DNS-módosító enzimek a Fermentas (Vilnius, Litvánia) és a New England Biolabs (Beverly, MA, USA) termékei voltak. A folyamat a következőekben leírtak szerint történt: első lépésben pBeloBAC FP plazmidot és fragment III-at AvrII és SacII restriktív enzimekkel emésztettük, majd az agaróz gélen szétválasztott és tisztított, ragadós véggel rendelkező fragmenteket ligálással összeillesztettük, T4 DNA Ligáz enzimet használva (Invitrogen). A következő lépéshez, az előzőekben leírt módon előállított CMV-WNV-3 rekombináns plazmidot szükséges mennyiségben DH10B *Escherichia coli* baktériumokban szaporítottuk fel, majd Qiagen Large Construct Kit (Qiagen) segítségével nyertük ki tiszta, koncentrált

formában. Második lépésben fragment II beillesztése következett az előbbi plazmidba BstBI és AvrII restrikciós enzimes emésztés után történő ligálással, így előállítva CMV-WNV-3-2 rekombináns plazmidot. Az utolsó lépésben SfiI és BstBI restrikciós enzimekkel emésztettük Fragment I-et és WNV-3-2 plazmidot, majd ligálásuk után létrejött CMV-WNV-3-2-1, teljes hosszúságú klón. Valamennyi rekombináns plazmid szekvenciáját restrikciós enzimes térképezéssel (példa a 7. ábrán látható) és polimeráz láncreakciók termékeinek szekvencia-analízisével ellenőriztük. Az összes előállított rekombináns plazmid a DH10B *E. coli* törzsben stabilan fenntartható volt, toxicitásra utaló jel nem volt látható.

**7. ábra.** Restriktációs enzimés térképezés. Balról jobbra: 1-3: *SacII*-*AvrII*, 4, 6: *SacII*-*SfiI*, 7-9: *AvrII*-*BstBI* enzimekkel emésztett WNV-3-2 rekombináns plazmid a kompetens sejtekben való felszaporítás és plazmidtisztítás után három-három baktérium telepből.



### 5.2.6. Pontmutációk létrehozása a WNV genomban

A kiválasztott aminosav-változások eléréséhez szükséges pontmutációk meghatározása után a kívánt nukleotid eltéréseket tartalmazó forward és reverz primerek tervezése és ellenőrzése az Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer version 3.1 online software (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) programjával történt. A PCR alapú mutagenézishez a 3. táblázatban felsorolt oligókat használtuk. A mutációt tartalmazó fragment I-t vagy II-t két darabban állítottuk elő, egyrészt az adott fragment 5' végéről induló forward primer és a módosítást tartalmazó reverz primer, másrészt a

módosított forward primer és az adott fragment 3' végéről induló reverz primer közötti szekvenciák PCR-es felerősítésével. Az új, kívánt mutációt tartalmazó fragmentet az így előállított két termékből, agaróz gélből való tisztítás után, fúziós PCR-el illesztettük össze. Az új, mutáns fragment I vagy II CMV-WNV-3-2-1 rekombináns plazmidba való beillesztése a megfelelő szakasz (Fragment I vagy II) restrikciós enzimes kivágása után ligálással került a plazmidba. A cserélni kívánt fragment és a rekombináns plazmid tisztítása agarózgél-elektroforézis után QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) történt.

**3. táblázat.** Az 578/10-es WNV törzs genomjába illesztett pontmutációkhoz használt primerek.

---

Primer neve	Nukleotid-szekvencia (5' → 3')
NS1F	CATCACCTTGGCAGGACTCAG
NS1R	GGTCTCCTGTTATGATTGCTTC
NS2AF	TTCGCAAGAGGTGGACGCCC
NS2AR	TGATAGCTGGAATGCTGATCT
NS3F	GGTACCAAACCTCAGCAGTGC
NS3R	TCATTTCCACTGTGCTCTCTG
38NS4BF	TTCTTGCTTGATCTGCGGGGG
38NS4BR	ATAGAGAGACCATGCTGTAGC
102NS4BF	TCAGCTCTCTTGCTGGCGGCC ACTGTGACT
102NS4BR	AGTCACAGTCAGGGTCACTTG
249NS4BF	GGACTCTCATCAAAAACATGG
249NS4BR	CTCTTGAGGCCTGGTTTCCCC

\* A primer pozíciók: a WNV-578/10-es törzs szekvenciája alapján. Dólt betűvel

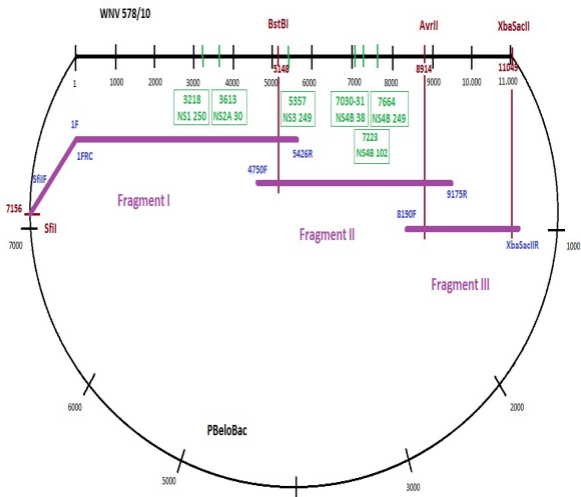


szedett tripleték jelzik a mutációk helyét, vastagon szedve a módosított nukleotidok.

A mutációk és a genomban elfoglalt helyük a következők voltak: C<sub>3218</sub>T az NS1 fehérje génben (P<sub>250</sub>L), G<sub>3613</sub>C az NS2A fehérje génben (A<sub>30</sub>P), C<sub>5357</sub>A az NS3 fehérje génben (P<sub>249</sub>H), és három mutáció az NS4E fehérje génben: CC<sub>7030-31</sub>GG (P<sub>38</sub>G), G<sub>7223</sub>C (C<sub>102</sub>S) és A<sub>7664</sub>G (E<sub>249</sub>G).

A WNV-578/10 törzs klónozási stratégiáját és a mutációk elhelyezkedését a genomban a 8. ábra szemlélteti.

**8. ábra.** A WNV-578/10 törzs klónozási stratégiája és a mutációk elhelyezkedése a genomban. *Fekete számok:* nukleotid pozíciók a WNV genomban és a PBeloBAC plazmid genomjában. *Piros számok:* a WNV genomjában található restrikciós enzim vágóhelyek nukleotid pozíciói. *Zöld számok bekeretezve:* a beillesztett mutációk nukleotid pozíciói. *Kékkel szedve:* a primerek neve. /Forrás: Szentpali-Gavaller K és mtsai 2016/.



### 5.2.7. Szekvencia-analízis

A kiindulási vírus (WNV-578/10) genomjának nukleotid sorrendje Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase enzim

(Finnzymes) segítségével felerősített, egymást átfedő PCR termékek szekvenálásával került meghatározásra. A felerősített termékek direkt szekvenálása ABI Prism BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával, automata ABI 377 DNS Szekvenátorral (Applied Biosystems) történt. A szekvenciák elemzéséhez és összeillesztésükhöz a SeqMan és MegAlign programokat (Lasergene) használtunk. A teljes hosszúságú WNV mutáns vírus nukleotid sorrendjét ABI Prism BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) és AB Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg. A módszert Bakonyi és mtsai írták le 2004-ben

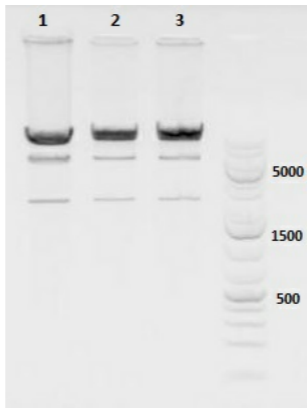
(Bakonyi és mtsai 2004b). A mutációkat tartalmazó WNV mutáns vírusok teljes genomjának meghatározása félvezető alapú újgenerációs szekvenálási technológiával (Ion Torrent PGM, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) történt.

### 5.2.8. Transzfekció és a vírusok visszanyerése

A transzfekció előtt CMV-WNV plazmidot SfiI és XbaI restriktív enzimekkel emésztettük, az expressziós kazetta létrehozásának céljából. Az emésztés során a 3' végen keletkezett, néhány nukleotid hosszúságú egyszálú szakasz eltávolításához Mung Bean Nuclease (New England Biolabs) enzimet használtunk. A kb. 12 kb hosszúságú expressziós kazetta elválasztása az emésztési termékektől 0,8%-os agaróz gélen (9. ábra), tisztítása pedig QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) történt.

**9. ábra.** CMV-WNV plazmid hasítása SfiI és XbaI restriktív enzimekkel a

restrikciós kazetta kinyerésének céljából.  
Balról jobbra: NS4B-38 klón, NS4B-102 klón  
NS4B-249 klón.



A transzekcióhoz 5% FBS tartalmú DMEM-ben (Sigma-Aldrich) növesztett BHK 21 sejtekre (ATCC<sup>®</sup>: CCL-10<sup>™</sup>) 4 µg ds cDNS-t oltottunk Turbofect *in vitro* Transzekciós Reagens (Thermo Fisher

Scientific) jelenlétében. A folyamat lényege röviden: 6 lyukú szövettenyésztő lemezen BHK-21 sejtekbe 60%-os benőttség mellett, 4 µg plazmid DNS-t transzfektáltunk 20 perces Turbofect reagenssel való inkubálás után. A lemezről a felülúszót eltávolítottuk egy következő 4 órás, 37°C-on való inkubálás után, és fenntartó folyadékként 10% FBS-t tartalmazó DMEM-et mértünk rá. A sejtek ezután 37°C-os termosztátba kerültek, majd 48–96 óra után – a látható citopatogén hatás (CPE) maximumakor – a vírustartalmú felülúszót eltávolítottuk és kíméletes centrifugálással (5 perc 1000 × g) a szövettörmeléktől megtisztítottuk, majd a további vizsgálatig -80°C-on tároltuk.

A keletkezett vad-típusú és módosított

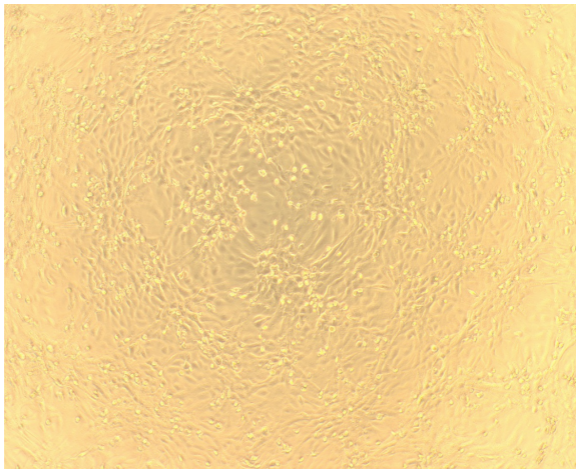


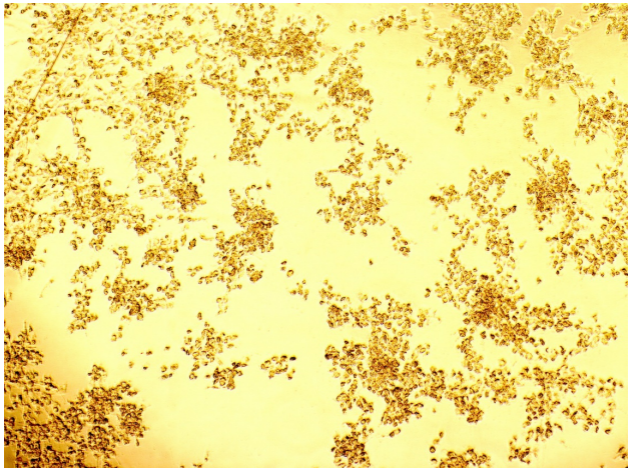
genommal rendelkező rekombináns RNS vírusokat az *in vitro* és *in vivo* kísérletekhez elegendő mennyiségben Vero E6 sejteken (ATCC®: CRL-1586™) szaporítottuk el. A 80%-osan összenőtt egyrétegű Vero sejttenyészet fertőzése után a palackokat 37°C-os termosztátban a maximális CP hatás eléréséig (4-5 nap p. i.) inkubáltuk. (A WNV CP hatása Vero sejttenyészetben a 10. ábrán látható.) Tápfolyadékként 0,75% nátrium-hidrogénkarbonát, 10 mM hepes puffer és 10% FBS tartalmú DMEM-et használtunk. Mind a transzfekció után, mind a vírusok elszaporításakor használt 10% FBS tartalmú DMEM antibiotikumokat (100 U penicillin, 100 µg/mL sztreptomycin) és 2 mM L-glutamint is tartalmazott. Az elszaporodó vírusokat, ha szükséges volt, még egyszer passzáltuk Vero

E6 sejtekben, amíg el nem érték a kívánt legalább  $6 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL titert. Kivétel az NS1 mutációt tartalmazó vírus volt, amely esetében a kísérletekhez használt víruskészlet titere  $10^{4,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL maradt, ugyanis további passzálás esetén minden alkalommal elvesztettük a kívánt mutációt. Az inkubációs idő letelte után a sejtörmelékek eltávolításának céljából a vírustartalmú felülúszót 5 percig  $1000 \times g$ -n centrifugáltuk, majd  $-80^{\circ}\text{C}$ -on raktároztuk el a további vizsgálatokig. A víruskészletek infektív titerét Vero E6 sejteken,  $\log_{10}$  alapú titrálással állapítottuk meg, a TCID<sub>50</sub> értéket a Spearman-Kärber módszerrel számoltuk ki (Spearman 1908; Kärber 1931). Az *in vitro* illetve *in vivo* kísérletek megkezdése előtt a

víruskészletek szekvenálásával ellenőriztük az adott mutáció meglétét.

**10. ábra.** Egyrétegű Vero sejttenyészet (natív) (nagyítás: 250x). Felső kép: kontroll, alsó kép: WNV citopatogén hatása.





### 5.2.9. *Növekedési görbék sejtkultúrán*

A vad, illetve a rekombináns mutáns vírusok növekedési görbéit Vero E6 sejttenyészetben, 37°C-on, két, egymástól független kísérletben határoztuk meg. A Vero sejtek szuszpenzióját 96 lyukú szövettenyésztő lemezre  $10^4$  sejt/vájulat mennyiségben mértük, 12 órára 37°C-os termosztátba helyeztük, majd a 80%-os fedettségi állapotú egyrétegű sejsort fertőztük 100  $\mu$ L szérummentes DMEM-ben hígított vírussal (3 vájulat/vírus/mintavételi időpont). A vírus / sejt arány (multiplicity of infection, MOI) 0,1 volt. A lemezek 1 óra 37°C-os inkubációs idő után 120  $\mu$ L 10% FBS tartalmú DMEM fenntartó folyadékot kaptak (háromszori szérummentes fenntartó

folyadékkal való mosás után). A felülúszók levétele a fertőzés után (post infection, p. i.) 0, 12, 24, 36, 48, 72 és 96 órával történt. A felülúszóból 70  $\mu\text{L}$ -t  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottunk a fertőző vírustiter meghatározáshoz, 50  $\mu\text{L}$  pedig RNS kivonás céljából 350  $\mu\text{L}$  lízis pufferbe (Roche Diagnostics, Almere, Hollandia) került. A 0, 12, 36 és 48 óra p. i. időpontokban, ugyancsak RNS kivonás céljából, a sejtek is felvételre kerültek (50  $\mu\text{L}$  lízis pufferben). A felülúszóból a fertőző vírustiter meghatározása Vero E6 sejteken, log<sub>10</sub>-es titrálással történt, az előzőekben leírtak szerint.

### *5.2.10. Virális RNS titerek mérése*

Az RNS kivonása mind a felülúszóból,

mind a Vero E6 sejtekből MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics) és nukleinsav tisztító robot (Roche Diagnostics) segítségével, a gyártó előírása szerint történt. Az 50  $\mu$ L eluáló pufferben felvett RNS-t azonnal qRT-PCR-re vizsgáltuk. Az *in vivo* kísérletekben az RNS kópiák számát az egér fél-agyakból súlymérés és antibiotikum (100 U penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) tartalmú DMEM-el, szövethomogenizáló készülékben való homogenizálás után határoztuk meg. A mintákból 100  $\mu$ L homogenizátumot 400  $\mu$ L lízis pufferbe mértünk (Roche Diagnostics), majd az RNS kivonást a fentiek szerint folytattuk. Az RNS kópiák számát szál-specifikus qRT-PCR-rel határoztuk meg, a nyugat-nílusi vírus 3'UTR régióját tartalmazó



plazmidből (pCR®4-TOPO®; Invitrogen Breda, Hollandia) *in vitro* átírt, ismert mennyiségű pozitív és negatív szálú RNS mérése során felállított standard görbe segítségével. A plazmid linearizálása után a rekombináns RNS szálát az Ambion® MaxiScript T7/T3 kit (Invitrogen) segítségével írtuk át. A pozitív irányítottágú RNS szál átírása T3 polimerázzal, a negatív irányítottágú RNS szál átírása T7 polimerázzal történt. A termékek DNáz enzimés emésztés (a maradék DNS eltávolítása céljából) után High Pure RNA Isolation Kittel (Roche Diagnostics) való tisztításon estek át. AZ RNS termékek koncentrációjának meghatározása 260 nm-en spektrofotométerrel (NanoDrop) történt.

Végül az *in vitro* átírt RNS hígítása következett, a qRT-PCR-rel való detektálhatóság határáig (Lim és mtsai 2013).

### 5.2.11. *In vivo* virulencia vizsgálatok

A *z in vivo* virulencia vizsgálatokhoz hathetes nőstény C57BL/6 egereket (Harlar Laboratories B.V., Venray, Hollandia) i. p. fertőztünk alacsonyabb (kb.  $10^1$ ) és magasabb (kb.  $10^4$ ) TCID<sub>50</sub> mennyiségű vad-típusú, illetve mutáns klón-eredetű nyugat-nílusi vírusokkal (8 egér/klón/dózis). (A tényleges, vagyis a fertőzést követő visszatitralás eredményei szerinti mennyiségeket az Eredmények fejezet 6. táblázata tartalmazza). Az egereket SPF körülmények között, zárt laborban, egér

izolátorokban helyeztük el a kísérlet alatt, 12 órás megvilágítási programot és *ad libitum* etetést alkalmaztunk. Az állatokat naponta kétszer monitoroztuk, és súlyos immobilitás vagy paralízis esetén eutanáziát hajtottunk végre (izoflurán gázos altatás után cervikális diszlokáció). Az elhullott (vagy eutanázián átesett) egerek agyát azonnal  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk a további vizsgálatokig. A kísérlet végén, 14 (alacsony dózissal fertőzött egerek esetében 18) nappal a fertőzés után az összes egéren eutanáziát hajtottunk végre, agyukat és a magasabb dózisú vírussal fertőzöttek esetén a veséket is összegyűjtöttük.

Az állatkísérlet engedélyét az Erasmus Medical Centre, Animal Ethics Committee

állította ki (protokoll szám: 122-13-19).

### 5.2.12. Statisztika

A statisztikai analízishez GraphPad Prism v5 szoftvert használtunk. A csoportok (2-nél több adat) összehasonlításához ANOVA tesztet, az egyes csoportok egymással való összehasonlításához pedig Mann-Whitney U tesztet használtunk. Szignifikáns különbségnek a  $p \leq 0.05$  értéket fogadtuk el. Az *in vivo* kísérlet elemzéséhez Fisher tesztet alkalmaztunk.

# Eredmények

## 6.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

### 6.1.1. Passzív monitoring vizsgálatok

Az elhullott vadmadarak vizsgálatára alapozott, passzív WNV monitoring keretében 2009-től 2015-ig évente 79, 335, 241, 336, 354, 83, illetve 54 vadmadár szerveinek homogenizátumát vizsgáltuk meg nyugat-nílusi vírus RNS jelenlétére. A 2009-es év során 16 magyarországi vadmadár mintából került kimutatásra a WNV nukleinsava: hat héjábó (*Accipiter gentilis*), egy karvalyból (*Accipiter nisus*), egy vándorsólyomból (*Falco peregrinus*), egy nagy fakopáncsból (*Dendrocopos major*), egy erdei

fülesbagolyból (*Asio otus*), valamint énekes madarakból [egy házi veréb (*Passer domesticus*), két vörösbegy (*Erithacus rubecula*), egy nádi tücsökmadár (*Locustella luscinioides*), egy házi rozsdafarkú (*Phoenicurus ochruros*) és egy foltos nádiposzáta (*Acrocephalus schoenobaenus*)].

2010-ben egy szajkó (*Garrulus glandarius*), egy hóbagoly (*Bubo scandiacus*), egy szarka (*Pica pica*), egy fácán (*Phasianus colchicus*) és két héja esetében sikerült kimutatni nyugat-níluszi vírust. Az esetek nagy része Bács-Kiskun megye területéről származott.

A 2011-es év során három héja, 2012-ben egy feketeterigó (*Turdus merula*) és egy héja, míg 2013-ban egy szarka, egy héja és

egy hóbagoly esetében sikerült igazolni WNV fertőzést.

2014 és 2015 év során a kórbonctani és kórszövettani gyanú alapján tovább vizsgált egy-egy vadmadárból – 2014-ben egy héjából, 2015-ben egy szirti sasból (*Aquila chrysaetos*), – mutattuk ki a vírust. A pozitív madarak számait éves bontásban a 4. táblázat szemlélteti.

A vizsgálati időszakban 416, heveny idegrendszeri tüneteket mutató, nyugat-nílusi vírusfertőzésre gyanús lóból gyűjtött savóminta érkezett a NÉBIH ÁD laboratóriumába (2009-ben 32, 2010-ben 40, 2011-ben 84, 2012-ben 20, 2013-ban 108, 2014-ben 31 és 2015-ben 101 minta). WNV elleni IgM-típusú ellenanyagokat tartalmazó

lósavók számát a 4. táblázat részletezi. 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.



**4. 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.

<b>Faj\Év</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>201</b>
héja ( <i>Accipiter gentilis</i> ) *	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
karvaly ( <i>Accipiter nisus</i> )	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
vándorsólyom ( <i>Falco peregrinus</i> ),	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
nagy fakopáncs ( <i>Dendrocopos major</i> )	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

erdei fülesbagoly ( <i>Asio otus</i> )	<b>1</b>	0	0	0
házi veréb ( <i>Passer domesticus</i> )	<b>1</b>	0	0	0
vörösbegy ( <i>Erithacus rubecula</i> )	<b>2</b>	0	0	0
nádi tücsökmadár ( <i>Locustella luscinioides</i> )	<b>1</b>	0	0	0
házi rozsdafarkú ( <i>Phoenicurus ochruros</i> )	<b>1</b>	0	0	0
foltos nádiposzáta ( <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> )	<b>1</b>	0	0	0
szajkó ( <i>Garrulus</i> )	0	<b>1</b>	0	0

<del>glandarius)</del> főbagoly ( <i>Bubo scandiacus</i> )	0	1	0	0
szarka ( <i>Pica pica</i> )	0	1	0	0
fácán ( <i>Phasianus colchicus</i> )	0	1	0	0
feketerigó ( <i>Turdus merula</i> )	0	0	0	1
szirti sas ( <i>Aquila chrysaetos</i> )	0	0	0	0
<b><u>Összes</u></b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

\*Minden madár eredmény kórbonctan, illetve kórszövetten alapján.

<b>ló (<i>Equus caballus</i>)**</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
<b>IgM</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>4</b>

<b>(ELISA)</b>				
<b>RT-PCR</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

**\*\*Ló eredmények IgM/RT-PCR alapján.**

A pan-flavi RT-PCR-rel a nyugat-nílus vírussal rokon Usutu vírus (USUV) RNS-é 2010, 2011, 2012, 2013 és 2015 évben egy-egy feketerigó, továbbá 2015-ben egy fenyőrigó (*Turdus pilaris*) szerveiből sikerült kimutatni.

### 6.1.2. Aktív monitoring (szúnyog vektor) vizsgálatok

A kétéves (2011–2012) szúnyog felmérő vizsgálatok során összesen 23 193 szúnyogot vizsgáltunk meg WNV jelenlétére. Ez 2011-ben 11 728, 24 különböző fajhoz tartozó, 362 poolba rendezett szúnyogot, 2012-ben pedig 11 465, 18 különböző fajú, 283 poolba rendezett szúnyogot jelentett. A szúnyogok nagy része (23 095) nőstény volt, a 68 hím *Culex pipiens*, és 30 hím *Anopheles maculipennis* szúnyog mind a 2011 évi téli gyűjtésből származott. A különböző gyűjtési területeken eltérés mutatkozott a gyűjtött szúnyogok összetételében. Az I-es területen leggyakrabban befogott szúnyog az *Aedes vexans* (8603/19 615, 43,9%), a második

leggyakoribb az *Ochlerotatus sticticus* (5656/19615, 28,8%) majd az *Aedes cinereus* (2206/19615, 11,2%) volt. A II-es területen az első négy leggyakoribb befogott fajnak az *Aedes vexans* (814/1723, 47,2%), a *Coquillettidia richiardii* (313/1723, 18,2%), a *Culex modestus* (255/1723, 14,8%) és az *Aedes cinereus* (202/1723, 11,7%) bizonyult. A III-as területen külön értékeltük a Debrecer környékén és a Hortobágyi Nemzeti Parkbar csapdázott szúnyogok összetételét, aminek az oka a HNP többi mintavételi helytől való viszonylag elszigetelt földrajzi elhelyezkedése és sajátos ökológiai tulajdonságai (füves puszták és szikes mocsaras területek jellemzőek) voltak. Az előbbi esetben a *Coquillettidia richiardii* (229/601, 38,1%) és az *Ochlerotatus cantans* (221/601, 36,8%),

míg a HNP-ban a *Coquillettidia richiardii* (353/737, 47,9%), az *Anopheles hyrcanus* (177/737, 24,0%) és a *C. modestus* (96/737, 13,0%) volt a leggyakrabban befogott faj. A IV-es területen a *C. pipiens* (178/350, 50,9%) és az *Anopheles maculipennis* (166/350, 47,4%) fajokat csapdáztuk legnagyobb számban. Az V-ös területhez a téli mintagyűjtő helyeket soroltuk, istállókból, pincékből gyűjtöttük az áttelelő szúnyogokat, így viszonylag kevés számú minta állt rendelkezésünkre a többi területhez képest. A leggyakrabban csapdázott áttelelő szúnyogok a *C. pipiens* (78/135, 57,8%) és a *Culiseta annulata* (50/135, 37,0%) fajhoz tartoztak. A II-es és III-as területen a két *Culex* biotípus (*pipiens* és *molestus*) arányát is

megvizsgáltuk, és a korábbi Magyarországon mért adatokkal ellentétesen, közel 1:1 arányt kaptunk (Tóth és Szabó 2011). A *C. pipiens pipiens* and *C. pipiens molestus* forma azonosítása és elkülönítésük morfológiailag, Mohrig (1969) határozó kulcsai alapján történt.

A nyugat-nílusi vírus kimutatására irányuló RT-PCR 2011-ben három pool esetében adott pozitív eredményt: egy Fényeslitkén ("1", N48° 18' 44,75", E22° 04' 07,64") júniusban gyűjtött közepes méretű (4-19 egyedet tartalmazó) nőstény *Ochlerotatus annulipes* pool, egy ugyancsak közepes méretű, júliusban a debreceni Fancsika-tónál ("11", N47° 30' 36,37", E21° 44' 27,18") gyűjtött *Coquillettidia richiardii* pool, továbbá




szeptemberben, egy 20-50 nőstény *Culex pipiens*-t tartalmazó, Kardoskút közelében található kékvércse fészkelő helyen ("18", N46°29' 49,00", E20° 42' 13,98") gyűjtött pool esetében. A 2011-ben gyűjtött hím szúnyogok, mint ahogyan a 2012 évi összes szúnyog is, negatív eredményt adott.

A MIR (fertőzött szúnyogok aránya 1000 szúnyogra vetítve) számítások 2011-ben, amikor a három pozitív poolt találtuk, a következő eredményt adták: az összes szúnyogra együttesen számítva a MIR 0,25; fajonként pedig *Ochlerotatus annulipes* esetében 2,03, *Coquillettidia richiardii* esetében 0,63 és *Culex pipiens* esetében 2,70 lett. Figyelembe véve a különböző méretű poolokat, a prevalenciát az EpiTools

epidemiológiai

kalkulátorral

(<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=PPVariablePoolSize>) is meghatároztuk, 95%-os konfidencia intervallumokat alkalmazva. A számított prevalenciák a következők lettek:  $3 \times 10^{-4}$  (alsó 95% KI =  $10^{-4}$ , felső 95% KI =  $7 \times 10^{-4}$ ) az összes szúnyogra együttesen vetítve,  $2 \times 10^{-3}$  (alsó 95% KI =  $10^{-4}$ , felső 95% KI =  $9 \times 10^{-3}$ ) *Ochlerotatus annulipes*,  $7 \times 10^{-4}$  (alsó 95% KI = 0, felső 95% KI =  $2,9 \times 10^{-3}$ ) *Coquillettidia richiardii* és  $2,9 \times 10^{-3}$  (alsó 95% KI =  $2 \times 10^{-4}$ , felső 95% KI =  $1,26 \times 10^{-2}$ ) *Culex pipiens* esetében.



**5. táblázat.** A 2011–2012 években Magyarországon gyűjtött és WNV jelenlétére tesztelt szúnyog poolok száma fajonként. \* pozitív minták, † *dőlt betűvel szedett számok* a 2012-es évre vonatkoznak.

Faj	Gyűjtési hely száma	Poolok száma (össz)	2011; Poolok nagy csoportjai	
			1–3	4–6
<i>Aedes cinereus</i>	8; 6	52; 16	8; 5	
<i>Aedes rossicus</i>	1; 2	4; 10	1; 1	
<i>Aedes vexans</i>	9; 9	94; 133	7; 25	
<i>Anopheles algeriensis</i>	1; 0	1; 0	1; 0	
<i>Anopheles claviger</i>	1; 0	3; 0	2; 0	
<i>Anopheles hyrcanus</i>	5; 7	20; 20	4; 11	

<i>Anopheles maculipennis</i>	7; 6	13; 6	2; 2
<i>Anopheles plumbeus</i>	1; 2	2; 3	1; 3
<i>Coquillettidia richiardii</i>	9; 9	35; 43	7; 17
<i>Culex hortensis</i>	0; 1	0; 1	0; 1
<i>Culex martinii</i>	1; 0	2; 0	1; 0
<i>Culex modestus</i>	9; 7	20; 22	6; 12
<i>Culex pipiens molestus</i>	1; 0	1; 0	1; 0
<i>Culex pipiens pipiens</i>	7; 3	19; 5	5; 4
<i>Culex territans</i>	1; 0	1; 0	0; 0
<i>Culex torrentium</i>	1; 0	1; 0	0; 0
<i>Culiseta alaskaensis</i>	0; 1	0; 1	0; 1
<i>Culiseta annulata</i>	1; 3	1; 3	1; 2
<i>Ochlerotatus</i>	4; 4	22; 7	5; 7

<i>annulipes</i>			
<i>Ochlerotatus cantans</i>	5; 0	16; 0	7; 0
<i>Ochlerotatus caspius</i>	0; 1	0; 3	0; 3
<i>Ochlerotatus cataphylla</i>	0; 1	0; 1	0; 1
<i>Ochlerotatus excrucians</i>	0; 1	0; 1	0; 1
<i>Ochlerotatus flavescens</i>	3; 1	5; 1	1; 1
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	2; 0	2; 0	2; 0
<i>Ochlerotatus leucomelas</i>	2; 0	2; 0	2; 0
<i>Ochlerotatus rusticus</i>	1; 0	1; 0	0; 0
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	5; 3	44; 3	3; 2

<i>Ochlerotatus sp.</i>	1; 0	1; 0	1; 0	
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1; 0	2; 0	1; 0	

-

## **6.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenézise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás vizsgálata**

### *6.2.1. Az 1-es genetikai vonalú WN-NY99 és a 2-es genetikai vonalú WNV 578/10 törzsek genomjának összehasonlítása*

A WN-NY99 vírustörzs (GenBank azonosító: AF202541) és az 578/10-es vírustörzs (GenBank azonosító: KC496015) teljes genomjának összehasonlítása során 2236 nt eltérést (21%) találtunk. A nukleotid-szubsztitúciók eloszlása a genomban nagyjából egyenletes képet mutatott: 5'UTR: 0 nt eltérés (0%), C protein gén: 59 nt eltérés (16%), preM-M protein gén: 102 nt eltérés (21%), E protein gén: 309 nt eltérés (21%),

NS1 protein gén: 227 nt eltérés (22%), NS2A protein gén: 153 nt eltérés (23%), NS2B protein gén: 82 nt eltérés (22%), NS3 protein gén: 382 nt eltérés (21%), NS4A protein gén: 80 nt eltérés (22%), 2K gén: 13 nt eltérés (19%), NS4B protein gén: 184 nt eltérés (25%), NS5 protein gén: 560 nt eltérés (21%), 3'UTR: 90 nt eltérés (20%). A poliprotein prekurzorban 203 aminosav (AS) eltérést (6%) találtunk: C protein: 12 AS eltérés (10%), preM-M protein: 7 AS eltérés (5%), E protein: 22 AS eltérés (5%), NS1 protein: 33 AS eltérés (10%), NS2A protein: 24 AS eltérés (11%), NS2B protein: 7 AS eltérés (6%), NS3 protein: 25 AS eltérés (5%), NS4A protein: 7 AS eltérés (6%), 2K protein: 1 AS eltérés (5%), NS4B protein: 19 AS eltérés (8%), és NS5 protein: 46 AS



eltérés (6%). (A százalékok megadásánál figyelembe vettük a gének különböző hosszúságát.) A nt és AS különbségek megfelelnek az 1-es és 2-es genetikai vonalú vírusok között általában mérhető eltéréseknek.

### 6.2.2. A rekombináns vírusok visszanyerése

Annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon az 1-es genetikai vonalhoz tartozó WNV-okban azonosított virulenciamarkerek befolyásolják-e a magyarországi neuroinvazív, 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV 578/10 vírustörzs virulenciáját *in vitro* és/vagy *in vivo*, a vizsgálni kívánt szubsztitúciókat tartalmazó, fertőző cDNS klónokat állítottunk elő és transzfektáltunk BHK-21 sejtekbe. A cDNS

klónokról a genomiális RNS CMV promóterre íródott át a fertőzött sejtekben. Az *in vivo* transzkripciót követően minden mutáns vírus a kívánt  $6 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL titerben elszaporodott. Kivétel az NS1 mutációt tartalmazó vírus volt, amely esetében a kísérletekhez használt víruskészlet titere  $10^{4,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL maradt, ugyanis további passzálás esetén minden alkalommal elvesztettük a kívánt mutációt. Az NS4B102 mutációt tartalmazó rekombináns vírus nem tudott megfelelő mennyiségben elszaporodni a BHK-21, majd a Vero E6 sejtekben sem, ezért a további vizsgálatokból kizártuk. A további *in vitro* illetve *in vivo* kísérletekhez ezeket a kisebb adagokra elosztott és elraktározott víruskészleteket használtuk,

ezzel elkerülve a szaporítások során bekövetkezhető genetikai változásokat.

### *6.2.3. A rekombináns víruskészletek teljes genomszekvencia-analízise*

A vírusok visszanyerése és elszaporítása után teljes genom-analízist végeztünk mind a vad típusú, mind a mutációkat tartalmazó mutáns vírusok esetében azzal a céllal, hogy az idő közben fellépő esetleges egyéb nt és AS eltéréseket feltárjuk. Három mutáns klón esetében találtunk a kívánt mutáción felül még egy-egy nt eltérést, amelyből csak egy járt AS-szubsztitúcióval is. A két csendes nt változás a következő volt: G-ről A-ra cserélődés a 627. nt helyen az NS1 klón esetében; A-ról G-re cserélődés a 6768. nt helyen az NS4B38

klón esetében. Az AS változással - valinról (V) izoleucin (I) - járó nukleotid cserét (G-ről A-ra a 7480. nt helyen), az NS4B249 klón NS4E fehérjéjének 188. helyén találtuk. A genomokban fellépő változásokat elfogadhatónak találtuk, így a további kísérletekhez az előállított vírusokat használtuk fel.

#### *6.2.4. A rekombináns vad típusú (WT) és mutációkat tartalmazó nyugat-nílusi vírusok szaporodási jellemzői Vero E6 sejtenyészetben*

A rekombináns vírusok (a mutációkat tartalmazó vírusok és a klón-eredetű vad típusú WNV-578/10 vírus) szaporodási tulajdonságait Vero E6 sejteken, 37°C-on,

MOI = 0,1 mellett, három párhuzamos kísérletben határoztuk meg. Minden 12. órában mintát vettünk a felülúszókból. Az egy irányú ANOVA teszttel mintavételi időpontoként csoportosan vizsgálva a mutáns rekombináns vírusok infektív titereinek átlagát, elmondható, hogy azok minden mintavételi időpontban (12 óra p. i. - 96 óra p. i.) szignifikáns különbséget mutattak ( $p < 0,02$ ). A növekedési görbéket a 11/a. ábra szemlélteti.

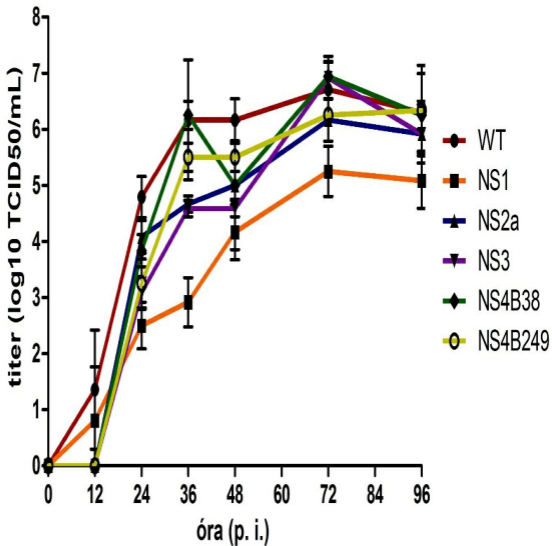
Az egyes vírusok páronkénti statisztikai összehasonlítása a következő eredményeket adta: A WT vírus infektív titere 24 óra elteltével minden mutációt tartalmazó vírushoz hasonlítva szignifikánsan magasabb volt, az NS1 mutáns vírus esetében a  $p$  érték 0,005,

az NS2A, NS3, NS4B38 és NS4B249 után vírusok esetében pedig a  $p$  érték 0,03 lett. Ebben az időpontban az NS1 vírus infektiós titere szignifikánsan alacsonyabb volt az NS2A ( $p = 0,03$ ) és az NS4B38 ( $p = 0,03$ ) vírusok infektiós titeréhez képest. A fertőzés után 36 órával a WT vírus infektiós titere már csak az NS1 ( $p = 0,002$ ), az NS2A ( $p = 0,02$ ) és NS3 ( $p = 0,02$ ) vírusokhoz viszonyítva adott szignifikáns különbséget. A WT és az NS1 vírus infektiós titere ebben a mintavételi időpontban mutatta a legnagyobb eltérést, a WT titere kb. 2500-szorosa volt az NS1 titerének, továbbá az NS1 infektiós titere szignifikánsan alacsonyabb maradt az összes többi mutáns vírushoz hasonlítva ( $p = 0,03$  minden egyes mutáns vírus esetében). A WT vírus titere 48 óra elteltével még mindig

szignifikánsan magasabb volt, mint az NS1 vírus ( $p = 0,005$ ), az NS2A és az NS3 ( $p = 0,03$ ) vírusok titere. Az NS1 vírus infektív titere a többi mutáns vírushoz viszonyítva csak az NS2A ( $p = 0,04$ ) és az NS4B249 ( $p = 0,03$ ) vírusokhoz képest mutatott szignifikáns különbséget. A WT vírus infektív titere csak az NS1 vírushoz hasonlítva volt szignifikánsan magasabb ( $p = 0,005$  72 óra p. i. és  $p = 0,02$  96 óra p. i.) 72 órával és 96 órával a fertőzés után. Továbbá az NS1 vírus titere szignifikánsan alacsonyabb volt 72 órával a fertőzés után, mint az összes többi mutáns vírus titere ( $p < 0,04$ ), illetve 96 óra p. i., mint az NS4B38 és NS4B249 vírusok titere ( $p < 0,04$ ). A 11/b. ábra az infektív titereket szemlélteti mintavételi időpontokként.

**11/a. ábra.** A vad típusú (WT) és mutáns vírusok növekedési görbéi Vero E6 sejtenyészetben (MOI = 0,1). A titerek a három szimultán fertőzés átlagaként megadva, ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL); a hibasávok a szórást jelölik. /Forrás: Szentpali-Gavaller K és mtsai 2016/





**11/b. ábra.** Infektív titerek mintavételi időpontoként (24 óra p. i. - 96 óra p. i.).

### 6.2.5. A WT és az NS1 mutáns vírus pozitív és negatív szálú RNS-ének mennyiség meghatározása *in vitro*

A WT és az NS1 mutáns vírus előzőekben tapasztalt *in vitro* replikációs különbségeit tapasztalva felmerült a kérdés,

hogy az NS1 vírus lelassult replikációja vajon megmutatkozik-e a pozitív (+RNS) és negatív irányítottságú RNS (-RNS) kópiák szintézisében is. Az RNS kópiák mennyiség meghatározásához az *in vitro* szaporított vírus meghatározott mintavételi időpontjaiban a felülúszóból és a sejtekből is elkülönítettünk megfelelő mennyiséget a szál-specifikus qRT-PCR vizsgálatokhoz (Lim és mtsai 2013). 12 órával a fertőzés után a felülúszóban mért pozitív irányítottságú RNS szálak mennyisége (12/a. ábra) több, mint tízszer magasabb volt az NS1 vírus esetében, mint amit a WT vírusról mértünk, habár a különbség nem volt szignifikáns ( $p > 0,05$ ). A fertőzést követő 24. órában a WT vírus +RNS kópiáinak száma kb. 0,9  $\log_{10}$ -zel magasabb volt az NS1-nél mérténél ( $p = 0,002$ ). A különbség 1,4  $\log_{10}$

RNS kópiára nőtt a fertőzés utáni 36. órára ( $p = 0,002$ ), majd lassan csökkenni kezdett, és 48 óra elteltével  $1,3 \log_{10}$  ( $p = 0,002$ ), 72 óra elteltével  $0,8 \log_{10}$  ( $p = 0,002$ ) volt. 96 órával a fertőzés után már csak  $0,6 \log_{10}$  +RNS kópiaszám különbség volt a WT és NS1 mutáns vírusok között, ami azonban még mindig szignifikánsnak bizonyult ( $p = 0,04$ ).

A fertőzést követő első mintavételkor (12 óra p. i.), az intracelluláris pozitív irányítottágú RNS szálak mennyisége (12/b. ábra) az NS1 vírus esetében - hasonlóan a felülúszóban mérthez - ugyancsak magasabb volt, mint a WT vírusnál mért. A következő mintavételnél (24 óra p. i.) azonban már a WT vírus +RNS titere mutatkozott  $0,9 \log_{10}$  nagyságrenddel magasabbnak az NS1-nél

mértnél ( $p = 0,002$ ). A különbség a maximumát a felülúszóhoz hasonlóan 36 órával a fertőzést követően érte el, ekkor 1  $\log_{10}$  RNS kópiabeli eltérés volt mérhető a két vírus között ( $p = 0,002$ ). 48 órával a fertőzést követően a különbség még mindig szignifikáns volt ( $p = 0,004$ ), de a WT vírusnál mért titer már csak 0,6  $\log_{10}$  RNS kópiával volt magasabb az NS1 vírus +RNS titerénél.

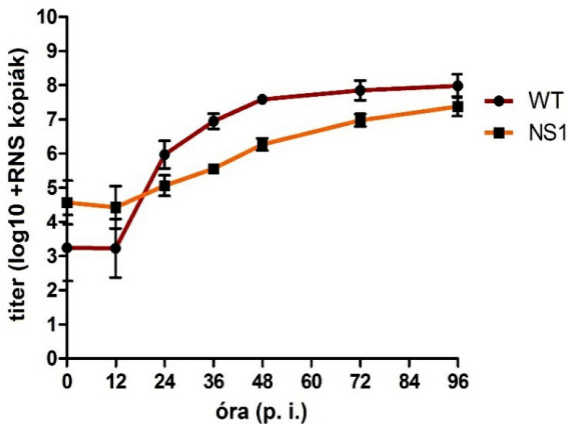
Az intracellulárisan mért negatív irányítottságú RNS kópiák mennyisége (12/c. ábra) már az első mintavételkor (12 óra p. i.) is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az NS1 vírus esetében, mint a WT vírusnál ( $p = 0,02$ ). A különbség szignifikáns maradt 24 óra és 36 óra elteltével is, mindkét esetben kb. 1,2  $\log_{10}$  –RNS kópiával kevesebbet mértünk az

NS1 vírus esetében ( $p = 0,002$ ). 48 órával a fertőzést követően a szignifikáns különbség eltűnt, a WT vírusnál mért  $-RNS$  kópiák száma már csak 0,4  $\log_{10}$  nagyságrenddel múlta felül az NS1-nél mértet ( $p = 0,06$ ).

**12. ábra.** A WT és NS1 vírusok kópiaszáma Vero E6 sejteken (MOI = 0,1). A kópiaszámok a két független kísérlet átlagaként megadva, ( $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL); a hibaszávok a szórást jelölik. **(a)** **(b)** **(c)**. /Forrás: Szentpali-Gavaller K és mtsai 2016/

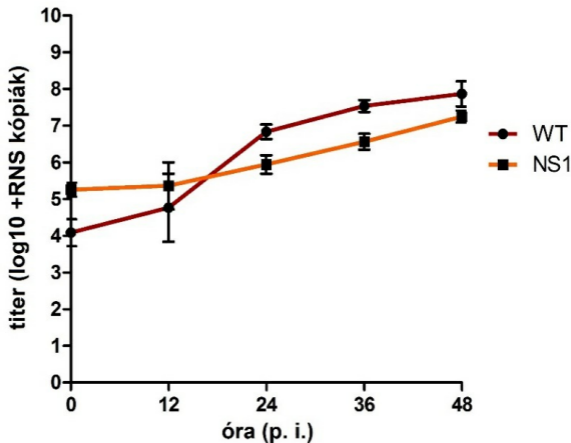
**(a)** extracelluláris pozitív irányítottágú RNS szál mennyisége



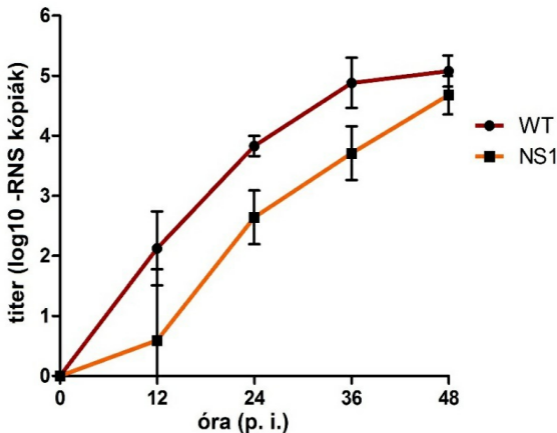


**(b)** intracelluláris pozitív irányítottágú

RNS szál mennyisége



(c) negatív irányítottágú RNS szá  
mennyisége



### 6.2.6. *In vivo* neuroinvazivitás vizsgálata egér modellben

A mutációkat tartalmazó vírusok neuroinvazivitását 6 hetes nőstény C57BL/6 egerekben vizsgáltuk. Az egereket kétféle (magasabb és alacsonyabb) dózisú vírussal,

intraperitoneálisan fertőztük, majd 14 napig megfigyeltük. A vad típusú (WT) vírushoz viszonyítva csak az NS1 mutáns vírussal fertőzött egereknél tapasztaltunk számottevő attenuációt. Míg a WT vírus magasabb dózisa esetében a mortalitás 100%-os, az alacsonyabb dózisnál pedig 75%-os volt, az NS1 mutáns vírussal fertőzött egerek mindegyike túlélte a kísérletet, azaz ennél a mutánsnál a mortalitás 0%-os volt. Az összes többi mutáns vírus esetében a magasabb dózissal fertőzött egerek között elhullások történtek. A mortalitás az NS4B38 vírus esetében 100% (8/8), az NS2A vírus esetében 88% (7/8), az NS3 vírus esetében 75% (6/8) és az NS4B249 vírus esetében 63% (5/8) volt. A mortalitási adatok statisztikai elemzése megerősítette az NS1

mutáns vírus attenuálódását, ugyanis szignifikáns különbséget mértünk az NS1 mutáns vírus magasabb dóziséval fertőzött egerek és a WT vírus ( $p < 0,0002$ ), NS2A vírus ( $p = 0,0014$ ), NS3 vírus ( $p = 0,007$ ), NS4B38 vírus ( $p = 0,0002$ ) és NS4B249 vírus ( $p = 0,0256$ ) magasabb dóziséval fertőzött egerek túlélési görbéi között. Ugyanakkor a többi mutáns vírus magasabb dóziséval fertőzött csoportok túlélési görbéi nem mutattak szignifikáns különbséget sem a vad típusú (WT) vírushoz, sem pedig egymáshoz hasonlóan.

A mortalitás az alacsony dózissal fertőzött csoportokban a következőképpen alakult: 0% (0/8) az NS1 vírus esetében, 75% (6/8) az NS2A vírus esetében, 38% (3/8) az

NS3 vírus esetében, 63% (5/8) az NS4B38 vírus esetében és 50% (4/8) az NS4B249 vírus esetében. Az NS1 vírus alacsonyabb dóziséval fertőzött egerek mortalitási adatainak statisztikai elemzése szignifikáns különbséget mutatott a WT vírus ( $p = 0,007$ ), az NS2A vírus ( $p = 0,007$ ) és az NS4B38 vírus ( $p = 0,0256$ ) mortalitási adataihoz viszonyítva. A többi mutáns vírus (NS2A, NS3, NS4B38 és NS4B249) egymással, illetve a WT vírussal való összehasonlításakor az alacsonyabb dózisú fertőzés esetén sem találtunk statisztikailag szignifikáns különbségeket.

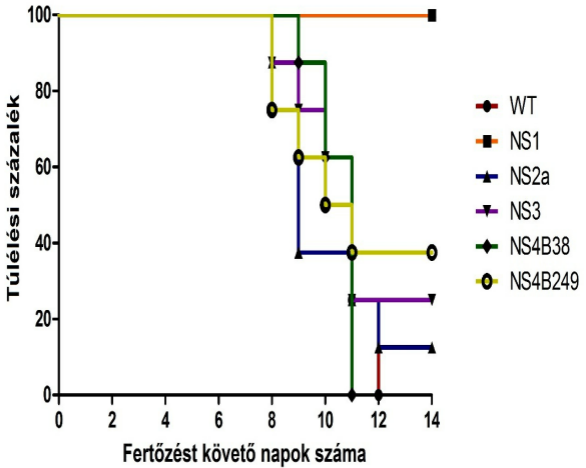
A pontos mortalitási adatokat a 6. táblázat ismerteti, a túlélési görbéket pedig a 13. ábra szemlélteti.



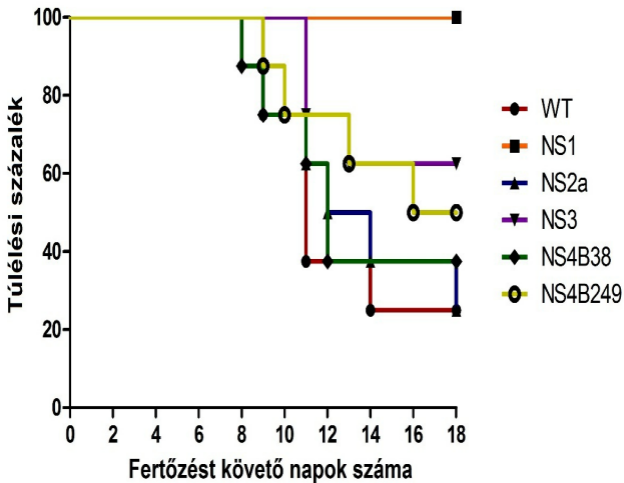
**13. ábra.** A hathetes nőstény C57/Bl6 egerek túlélési görbéi **(a)** magas dózisú ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>) és **(b)** alacsony dózisú ( $10^1$  TCID<sub>50</sub>) rekombináns WNV-vel való intraperitoneális fertőzés után. /Forrás: Szentpali-Gavaller K és mtsai 2016/

**(1)** i. p. fertőzés magas dózisú WNV-vel





(2) .i. p. fertőzés magas dózisú WNV-vel



**6. táblázat.** A hathetes nőstény C57/Bl6 egerek mortalitási adatai magas dózisú és alacsony dózisú WT és mutáns WNV-vel való intraperitoneális fertőzés után.

<b>Vírus</b>	<b>Dózis (TCID<sub>50</sub>) *</b>	<b>Elhullás (8 egérből)</b>	<b>Mc (%)</b>
WT	10 <sup>5</sup>	8/8	10
WT	10 <sup>1</sup>	6/8	75
NS1	10 <sup>4</sup>	0/8	0
NS1	10 <sup>1</sup>	0/8	0
NS2A	10 <sup>5.5</sup>	7/8	88
NS2A	10 <sup>1</sup>	6/8	75
NS3	10 <sup>3</sup>	6/8	75
NS3	10 <sup>0</sup>	3/8	38
NS4B38	10 <sup>4</sup>	8/8	10
NS4B38	10 <sup>0</sup>	5/8	63
NS4B249	10 <sup>4</sup>	5/8	63

\*A dózisok a tényleges, fertőzés utáni visszatitralás eredményei alapján megadva.

### *6.2.7. A rekombináns WNV kimutatása az elhullott és túlélő egerek szerveiből*

A *in vivo* kísérletet követően minden elhullott egér agyvelejéből kimutatható volt a virális RNS. Annak tisztázása érdekében, hogy a magas dózissal fertőzött, és a kísérlet során súlyos neurológiai tünetek miatt elaltatott egerek agyából kimutatott vírusokban megmaradtak-e az általunk előidézett mutációk (vagy visszaalakultak az eredeti vírusban előforduló aminosavak), csoportonként két-két állat agyából származó WNV izolátum genomját szekvenálással

ellenőriztük. Minden egyes esetben a szekvenálás eredménye igazolta a mutáció jelenlétét, tehát a mutáns vírusok nem revertálódtak az eredeti formára. A fertőzést túlélő egerek a 14. napon eutanáziára kerültek, majd a reziduális vírusfenmaradás felderítésének céljából minden magasabb dózissal fertőzött csoport esetében a túlélő egerek (NS1, n=8; NS2A, n=1; NS3, n=2; és NS4B249, n=3) agyából és veséjéből qRT-PCR-t végeztünk a virális RNS kimutatásához. Minden pozitív agyból vagy veséből kimutatott vírusban a mutáció meglétét szekvenálással ellenőriztük. Az NS1 vírusfertőzést túlélő 8 egér közül egy agyban találtuk meg a vírust, amely az eredeti formára revertálódott, azaz az NS1 génben létrehozott mutáció eltűnt az izolátumból. Az NS2A vírussal való fertőzést

túlélte egyetlen egér veséjéből tudtuk kimutatni a beillesztett mutációt tartalmazó vírust. Az NS3 fertőzést túlélő 2, illetve az NS4B249 fertőzést túlélte 3 egér közül 1-1-ben találtuk meg a vírus RNS-ét az agyszövetben. A vírus mindkét esetben megőrizte az általunk előidézett AS változást.

# Megbeszélés

## 7.1. Magyarországi felmérő (monitoring) vizsgálatok

A nyugat-nílusi vírus passzív monitorozása az utóbbi 15 évben előforduló WNV esetek és járványok kapcsár létjogosultságot nyert hazánkban. A 2003-as és 2004-es magyarországi WNV törzsek genetikai összehasonlító vizsgálata feltárta, hogy amíg a 2003-as liba esetekből kimutatott vírus a legnagyobb hasonlóságot az 1999-ben az Egyesült Államokba behurcolt törzshöz mutatta (1-es genetikai vonal), a 2004-ben héjában agyvelő-gyulladást előidéző törzs a nyugat-nílusi vírus 2-es genetikai vonalához tartozik, amely csoport tagjai korábban kizárólag Afrika Szaharától délre

fekvő területein okoztak megbetegedéseket (Bakonyi és mtsai 2006). A vírust 2005-ben, majd 2007-től minden évben kimutatták vadmadár, ló, ember illetve szúnyog mintákból. A vírusok részleges nukleotid-szekvenciáinak összehasonlítása alapján megállapítható, hogy azok lényegében megegyeznek az elsőként 2004-ben, héjából kimutatott, 2-es genetikai vonalhoz tartozó törzssel (Bakonyi és mtsai 2013). A 2-es genetikai vonalhoz tartozó törzsek 2004 óta tapasztalt kizárólagos előfordulása országunkban felveti a gyanút, hogy a korábban izolált 1-es genetikai vonalhoz tartozó vírusokat az új törzsek kiszorították, vagy legalábbis terjedésüket nagymértékben visszaszorították.



Az új vírustörzs 2008-ban jelentős fölrajzi terjedést mutatott az országban. Az állati esetek mellett, a járványidőszakban 19 hazai humán agyvelő-gyulladásos eset háttérében lehetett bizonyítani a WNV kórok szerepét a szerológiai vizsgálatok alapján (ECDC; ECDC Annual Report 2014). Mind a állati, mind a humán megbetegedések az ország középső és nyugati részén fordultak elő, szemben a korábbi évek alföldi lokalizációjával. A következő években is héjákban tapasztaltunk leggyakrabban elhullásokat (2009-ben 6, 2010-ben 2, 2011-ben 3, 2012, 2013 és 2015-ben egy-egy esetben), de összességében az elhullott madarak változatos fajmegoszlást mutattak.

Európában a vírus járványmenetében

fontos szerepet tulajdonítanak a házi verébnek (Castillo-Olivares és Wood 2004), amellyel összhangban van, hogy a Magyarországon végzett monitoring vizsgálataink során is sikerült ebből a fajból WNV-t kimutatni. Amerikában a varjűfélék nagyfokú fogékonysága ismert (Brault és mtsai 2007), továbbá európai vizsgálatok kimutatták, hogy az Európában cirkuláló vírusok ugyanolyan virulensek az európai *Corvus* fajokra – mint például a Lim és mtsai (2014 és 2015) tanulmányában vizsgált kormos varjú (*Corvus corone*), vagy a csóka (*Corvus monedula*) – mint amerikai társaik. Vizsgálataink során a varjűfélék (*Corvidae*) családjába tartozó madárból nem sikerült WNV-t kimutatnunk. Ez azonban nem jelent azt, hogy hazánkban a varjűfélék nem

fogékonyak a vírusra, és lehetséges közvetítő szerepüket sem zárhatjuk ki. A feketeerigó fogékonysága más flavivírusok (pl. az USUV) irányába ismert (Bakonyi és mtsai 2017), de Európa területén valószínűleg a WNV terjesztésében is fontos szerepet játszik ez a madárfaj. Egy olaszországi tanulmány a *C. pipiens* szúnyog vérszívási szokásait vizsgálta Észak-Olaszországban, a WNV fertőzések területén, és kimutatta, hogy a vizsgált szúnyogok erős preferenciát mutattak a feketeerigó irányába (Rizzoli és mtsai 2015). A vírust Magyarországon is sikerült feketeerigóból kimutatnunk, amely ugyancsak alátámasztja a madárfaj WNV epidemiológiájában betöltött szerepét.

2009-ben a 17 WNV pozitív vadmadár

mellett a vizsgálatok három agyvelő-gyulladásos ló és hét agyvelő-gyulladásos ember esetében igazolták a WNV kórok szerepét (ECDC; ECDC Annual Report 2014). A lovak kifejezett érzékenysége 2009 után is minden évben számos IgM pozitivitásban mutatkozott meg beteg állatokból a NÉBIH-ÁDI-ba küldött vérminták vizsgálata során, illetve több elhullott lóból RT-PCR módszerrel is sikerült igazolni WNV fertőzést (4. 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 (ECDC; ECDC Annual Report 2014). A WNV-re fogékony vadmadarak feltérképezésével, a bennük kialakuló virémia hosszának és mértékének elemzésével, az elhullott

egyedekből való víruskimutatással, illetve az élő madaraktól történő szerológiai vizsgálat révén a vírus helyi transzmissziós ciklusáról fontos információkat gyűjthetünk.

Európában mind a *Culex pipiens*, mind a *Coquillettidia richiardii* szúnyogfajt a nyugat-nílusi vírus elsődleges vektorának tekintjük (Higgs és mtsai 2004; Lvov és mtsai 2004; Hayes és mtsai 2005; Reiter és mtsai 2010). Fros és mtsai (2015) európai szúnyogkompetencia vizsgálataik során bizonyították az északnyugat-európai *C. pipiens* kompetens vektor szerepét mind az 1-es (NY99), mind a 2-es (Greece-10) genetikai vonalhoz tartozó WNV tekintetében, ugyanis a szúnyogok képesek voltak megfertőződni a különböző vírusokkal, a vírus

bennük elszaporodott és nyálmirigyükben kiválasztódott. A *C. pipiens* elsősorban ornitofil faj, azonban több tanulmány is kimutatta, hogy a vérszívás egy része történhet emlősökön, köztük emberen is (Zimmerman és mtsai 1985; Apperson és mtsai 2004). Elterjedése változatos, a városi környezetben ugyanúgy megél, mint a természetben. A *C. pipiens* faj Magyarországon is széles körben elterjedt, az ország éghajlata és természeti adottságai kiváló körülményeket nyújtanak a szaporodásához (Kenyeres és Tóth 2008). Kontinentális éghajlaton képes áttelelni, majd tavasszal az átlaghőmérséklet emelkedésével a nyugalmi állapot (diapausa) véget ér, a nőstények újra vért szívnak és terjesztik a velük együtt áttelelt vírust (Spielman és Wong

1973; Cornel és mtsai 1993; Nasci és mtsai 2001; Anderson és Main 2006; Farajollahi és mtsai 2011). A fertőzött nőstény szúnyogok a vérszívás során horizontálisan fertőzik a madár vagy emlős gazdát, azonban a vírus szúnyogok közötti vertikális terjedését is igazolták mind laboratóriumi (Baqar és mtsai 1993; Goddard és mtsai 2003), mind pedig természetes körülmények között (Miller és mtsai 2000). Anderson és Main (2006) tanulmányában egy 168 napos vertikálisan fertőzött nőstény *C. pipiens* szúnyog képes volt horizontális úton nyugat-nílusi vírussal fertőzni egy hörcsögöt, ami nyolc nappal a vérszívás után el is pusztult a betegségben. Ez a kísérlet is azt támasztja alá, hogy az ősszel diapausába vonult szúnyog tavasszal

képes újra átvinni a benne áttelelt vírust a fogékony gazdába akár már az első vérszívás alkalmával (Anderson és Main 2006). Európában hasonlóan elterjedt szúnyogfaj a *Coquillettidia richiardii*, amely lárvális stádiuma még jeges vízben is képes áttelelni. Aktivitásuk csúcsán (július–augusztus) nagy sűrűségben elszaporodnak, és agresszívan támadják fő célpontjukat, az emlősöket. Embereken előszeretettel táplálkoznak zárt térben, de kisebb részben madarakból is szívnak vért (Service 1971). Magyarországon a *C. richiardii* faj is széles körben elterjedt, főleg a vizek környékét, nádasokat kedveli, ugyanis lárvája a szerves anyagokban és mikroorganizmusokban gazdag vizekben fejlődik (Schaffner és mtsai 2001). Közép-Európában egy szaporodási



ciklusuk van, de a délebbre eső országokban 2-3 generáció is kifejlődik. Ugyancsak gyakori faj Európában az *Ochlerotatus annulipes*, amelynek petéi képesek áttelelni kontinentális éghajlaton is. A nőstények áprilistól szeptemberig aktívak, legelőkön, lombhullató erdőkben főként alkonyatkor szívnak vért elsősorban emlősállatokból, de ismerten jó összekötő, úgynevezett „bridge”-vektorok is madarak és emlősök között (Kulasekera és mtsai 2001; Becker és mtsai 2003). Az *Ochlerotatus annulipes* kifejezetten szeret emberen is vért szívni (Zamburlini 1996). Magyarországon főként az Alföld területén találkozhatunk ezzel a fajjal (Tóth 2004).

Számos európai országban foglalkoznak a különböző szúnyogfajok nyugat-nílusi vírus

átvitelében betöltött lehetséges szerepével (Engler és mtsai 2013). Egyik jellemző mérőszám a MIR, amely a fertőzött szúnyogok arányát mutatja meg 1000 szúnyogra vetítve. A MIR érték Romániában, egy 1997-es felmérés szerint *Culex pipiens* szúnyogban 0,19 volt. A felmérést a Duna völgyében és Románia déli területein 1996 júliusa és októbere között kitört WNV járványt követően végezték Bukarestben és környékén. A gyűjtött 5577 szúnyog 96%-a *C. pipiens pipiens* volt (Savage és mtsai 1999). Portugáliában az egész országra kiterjedő 2001 és 2004 között folyó megfigyelés során 32 460 szúnyogot 2355 poolban vizsgáltak arbovírusok jelenlétére. A MIR 0,23-nak bizonyult az összes gyűjtött szúnyogra vetítve, míg az összes *C. pipiens*-t nézve 1,93

(Almeida és mtsai 2008). Oroszországban, a Volga deltájában 2001 és 2002 augusztusában csapdázott, több mint 80 000 szúnyog vizsgálata során a MIR 0,35 volt az összes szúnyogfajra tekintve, 0,26 a *Culex pipiens* fajban, míg 0,49 a gyűjtött *Coquillettidia richiardii* szúnyogokban (Lvov és mtsai 2004). A felmérő vizsgálataink során kapott MIR érték 2011-ben, 3 pozitív szúnyog poolal és az összes gyűjtött szúnyoggal számolva 0,25, fajonként lebontva pedig: *Ochlerotatus annulipes*-ben 2,03, *Coquillettidia richiardii*-ben 0,63 és *Culex pipiens*-ben 2,70 lett. A különböző tanulmányokban kapott eltérő MIR értékek függenek a gyűjtés időpontjától, módjától és különböző környezeti tényezőktől is, ezért

összehasonlításukkal körültekintőnek kell lenni. Eltérő vektorkompetenciát nem csak a szúnyogfajok között, hanem fajon belül eltérő genotípusok (eltérő földrajzi helyekről gyűjtött szúnyogok) esetén is kimutattak (Richards és mtsai 2014). Az európai szúnyogok WNV fertőzést közvetítő szerepében az egyik legfontosabb korlátozó tényező valószínűleg a hőmérséklet. Fros és mtsai tanulmányában a hőmérséklet emelkedése szignifikánsan összefüggött a fertőzött szúnyog vektorok arányával (Fros és mtsai 2015).

A nyugat-nílusi vírus 2-es genetikai vonalához tartozó vírusok terjedése az utóbbi években az országhatáron is átlépett (Bakonyi és mtsai 2013; Ciccozzi és mtsai 2013). Először Ausztriában fordult elő megbetegedés

vadmadarakban (Bakonyi és mtsai 2006; Erdélyi és mtsai 2007; Krisztalovics és mtsai 2008), majd a vírus megjelent Görögországban (Chaskopoulou és mtsai 2011; Papa és mtsai 2011), Olaszországban (Bagnarelli és mtsai 2011; Savini és mtsai 2012), Szerbiában (Petrovic és mtsai 2013a), Horvátországban (Kurolt és mtsai 2014), Csehországban (Rudolf és mtsai 2014) és Szlovákiában is (Csank és mtsai 2016). Filogenetikai elemzések szerint az említett országokban elterjedt vírus a legnagyobb hasonlóságot a Magyarországon 2004-ben izolált vírushoz mutatja, míg a pár évvel később Oroszország területén izolált (Platonov és mtsai 2008 és 2011), majd Romániában is megtalált (Sirbu és mtsai 2011) ugyancsak 2-es genetikai vonalhoz

tartozó vírus különbözik tőle (Ciccozzi és mtsai 2013). A nyugat-nílusi vírus térfoglalása jellemzően a dél-, és közép-európai országokban jelentős, főként a vonuló madarak útvonalába eső területeken. A vírus megjelenése és stabilizálódása az addig mentes területeken egyrészt időjárási viszonyokkal magyarázható, másrészt valószínűleg sok egyéb tényező együttes hatása (mint például a növekvő gazdasággal összefüggő gyakoribb egzotikus utazások, a népsűrűség, a vektorok elleni helyi védekezési programok megléte vagy éppen hiánya, vagy akár az emberek tájékoztatásának hatékonysága a védekezés lehetőségeiről). Ahhoz, hogy egy új vírus endémiássá váljon egy számára új területen, az elfogadható

időjárási viszonyokon túl szüksége van megfelelő ízeltlábú vektorra és fogékony amplifikációs gazdára életciklusának 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 (Bakonyi és mtsai 2006; Korbacska-Kutasi és mtsai 2011; Sárdi és mtsai 2012; Bakonyi és mtsai 2013; Nagy és mtsai 2016), továbbá az áttelelni képes szúnyogfajok potenciális vektorszerepének felderítése is erre enged következtetni (Szentpáli-Gavallér és mtsai 2014).

A WNV mellett egyéb flavivírusok jelenlétére is vizsgáltuk a NÉBIH ÁDI-ba érkezett vadmadár hullákat. Vizsgálataink során USUV fertőzést állapítottunk meg fekete- és fenyőrigóban. Az USUV a WNV-vel rokon, szúnyogok által terjesztett, afrikai flavivírus. Először 2001-ben ausztriai vadmadarokból (főként fekete- és fenyőrigókból) izolálták Európában (Weissenböck és mtsai 2002), de retrospektív vizsgálatok már 1996-os olaszországi madármintákból is kimutatták a vírus jelenlétét (Weissenböck és mtsai 2013). Magyarországi előfordulásáról 2005 óta tudunk (Bakonyi és mtsai 2007). A vizsgálatok eredményei felhívják arra a figyelmet, hogy a WNV mellett az USUV is endémiás hazánkban, így az is okozhat vadmadarakban agyvelő-gyulladásos



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.

## **7.2. Magyarországi 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus klónozása, mutagenezise, *in vitro* és *in vivo* patogenitás kísérletek**

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 okoztak (Petersen és mtsai 2001). Az elmúlt 10 évben hazánkban is megfigyelt esetek alapján

azonban bebizonyosodott, hogy ehhez a genetikai vonalhoz is tartoznak neuroinvazív, erősen patogén törzsek. Ezt támasztja alá az utóbbi években egyre több esetben agyvelő-gyulladásban szenvedő lovak és emberek mintáiból azonosított neuroinvazív, virulens WNV2-es törzsek kimutatása Afrikában is (Venter és mtsai 2010). Súlyos, akár halálos kimenetelű megbetegedéseket okozó 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírusokat a 2004-es első magyarországi megjelenése óta Közép-Európa több országában is izoláltak lovakból és emberekből is (Bakonyi és mtsai 2013; Savini és mtsai 2012). Az európai nyugat-nílusi vírus járványok változó epidemiológiája és patogenitása felhívja a figyelmet a közép-európai WNV-2 vizsgálatának fontosságára, kórokozó-

képességének összevetése az 1-es genetikai vonal vírusaival fontos információkat deríthet föl akár a vakcina gyártás szempontjából is. A nyugat-nílusi vírus 2-es genetikai vonalához tartozó vírusok patogenitásának genetikai hátterét kísérletesen még nem vizsgálták, potenciális virulenciamarkereket eddig csak elméletben, *in silico*, virulens és attenuált vírustörzsek teljes genomjának összehasonlításával és elemzésével azonosítottak (Botha és mtsai 2008; McMullen és mtsai 2013). Munkánk során, a Magyarországon izolált 578/10-es törzs teljes hosszúságú fertőző klónját állítottuk elő reverz genetikai módszerekkel, és genomjában pontmutációkat idéztünk elő. A WNV nem strukturális fehérjéi, mint

potenciális virulenciamarkerek, hosszú ideje témát szolgáltatnak különböző kutatásoknak. Az általunk kiválasztott mutációk olyan aminosav-változások voltak a nem strukturális fehérjét kódoló genomszakaszban, amelyek attenuáló hatása az 1-es genetikai vonalban már ismertek voltak (Liu és mtsai 2006; Audsley és mtsai 2011; Puig-Basagoiti és mtsai 2007; Liu és mtsai 2003; Brault és mtsai 2007; Davis és mtsai 2007; Welte és mtsai 2011; Wicker és mtsai 2012). Az előidézett hat pontmutáció patogenitást befolyásoló szerepét *in vitro* Vero sejttenyészetben és *in vivo* egér modellben vizsgáltuk. Fertőző cDNS klónokat már régóta használnak a flavivírusok virulenciáját befolyásoló genetikai háttér kutatásaiban, replikációjának vizsgálatára, szubgenomikus

replikonok előállítására, vagy éppen gén expressziók, vagy gén inzerció céljából (Davis és mtsai 2001; Scholle és mtsai 2004; Rossi és mtsai 2005). A teljes hosszúságú WNV klónok előállításának módja legtöbb esetben a hagyományos plazmid alapú klónozási technikára vagy fúziós PCR-ek alkalmazására épül (Yamschikov és mtsai 2001; Shi és mtsai 2002; Maeda és mtsai 2008; McGee és mtsai 2010). Mivel a plazmid vektorokban összeállított flavivírus klónok több esetben toxikusnak, instabilnak vagy szaporodásra képtelennek bizonyultak a baktérium gazdáikban (Campbell és Pletnev 2000; Montigny és mtsai 2004; Ulper és mtsai 2008; Maeda és mtsai 2009), az általunk vizsgált WNV-578/10 törzset bakteriális mesterséges

kromoszómába klónoztuk (Almazan és mtsai 2000). Az általunk használt BAC tartalmazta a citomegalovírus (CMV) promóter génjét, így a WNV RNS-ének transzkripciójain *vivo* a fertőzött sejt magjában, sejt eredetű RNS polimeráz II segítségével történt, kiiktatva ezzel az *in vitro* RNS átírás szükségességét.

A flavivírusok nem strukturális fehérjéi számos funkciót látnak el. Az NS1 nem strukturális fehérje három konzervált N-glikozilációs helyvel rendelkezik és nélkülözhetetlen a virális RNS replikációjában. A Kunjin vírus (1-es genotípusú WNV) NS1 génjének konzervált szakaszába beillesztett P250L mutáció a polipeptid struktúrájában változást idézett elő, amely során a dimerképződés zavart szenvedett, az NS1

fehérje monomer formában szekretálódott a sejt felszínére. Ez a konformáció-változás eredményezhette a Vero sejteken megfigyelt alacsonyabb infektív titert a replikáció kezdeti szakaszában (a vadvírushoz hasonlítva 100-szor alacsonyabb titert ér el a P250L mutációt tartalmazó vírus p. i. az első 12-24 órában), amely különbség azonban fokozatosan csökkent majd eltűnt 48 óra elteltével (Hall és mtsai 1999). Hasonlóan Hall és munkatársai megfigyeléseihez, az általunk előállított NS1 mutáns vírus is 100-szorosan csökkent titert ért el Vero sejteken, habár a különbség 24 óra elteltével jelent meg, 36 órával a fertőzés után volt a maximumán, majd 96 óra elteltével is maradt tízszeres különbség a WT vírushoz hasonlítva. A mutáció replikációra kifejtett hatását az *in vitro* kísérlet során

meghatározott pozitív és negatív irányítottságú RNS szálak mennyisége alapján is értékelhetjük. A fertőzés utáni első 48 órában levett mintákból megállapíthatjuk, hogy az NS1 P250L mutációt tartalmazó vírus replikációja szignifikánsan lelassult, ugyanis a sejtekben mért mind pozitív, mind negatív irányítottságú RNS szálak mennyisége, illetve a felülúszóban mért +RNS mennyisége kb. tízszer alacsonyabb volt, mint a WT vírusnál mért mennyiségek.

Az NS1 fehérje virális RNS replikációbar betöltött szerepének fontosságára számos korábbi tanulmány felhívja a figyelmet. Youn és mtsai (2013) leírták, hogy a sérült NS1 génnel rendelkező WNV ugyan lefordítódik, de nem képez szabályos replikációs



komplexet közvetlenül a fertőzés után, aminek következtében a replikáció zavart szenved és következményesen kevesebb +RNS és -RNS mutatható ki a fertőzött sejtekben (Youn és mtsai 2013). A kísérletünk során az első 48 órában mért alacsonyabb +RNS és -RNS szál mennyisége utalhat a P250L mutáció NS1 fehérjére kifejtett aktivitás-, vagy stabilitás csökkentő hatására, amely következtében a replikációs komplex kialakulásában problémák léphetnek föl. Hall és mtsai (1999) tanulmányában a P250L mutációt tartalmazó Kunjin vírus NS1 fehérjéje esetén a dimerképződés zavara lépett föl. A P olyan gyűrűs láncú aminosav, amelyben a központi nitrogénatom is a gyűrű része, ezért a P görbületet ad a peptidláncnak, és általában a flexibilis régióban helyezkedik el.

Ezzel ellentétesen a L egy egyenes láncú aminosav. Valószínűleg a P és L aminosavak eltérő szerkezete miatt a peptidlánc struktúrája is megváltozik a mutáció következtében, és ez magyarázza a dimerképződés elmaradását. Az NS1 fehérje a fertőzött sejtek felszínére monomer formában szekretálódik, de ennek hatása az immunmodulációra még nem ismert. A fehérje sejten belüli eloszlása és szekréciója viszonylag sértetlen marad, így a dimerizáció valószínűleg nem feltétlenül szükséges a fehérje működéséhez. Az viszont a P meghatározó szerepére utalhat, hogy az egész flavivírus genusban az NS1 gén 250. és 256. AS helyén konzekvensen P található (1999-ig szekvenált törzsek alapján), továbbá

maga a régió is nagyfokban konzervált a fehérjében (Hall és mtsai 1999). Habár a monomer forma szekretálódik a sejt felszínére és a fehérje működőképesnek tűnik, a konformációváltozás érintheti a replikációs komplex stabilitását, vagy akár az immunmoduláns szerep hatékonyságát is. Hall és mtsai (1999) tanulmányában az *in vivo* fertőzött egerek megbetegítéséhez tízszer több WNV-KUN vírusra volt szükség, mint a vad típusú vírus esetében. Kísérleteink során ennél sokkal nagyobb fokú attenuálódást tapasztaltunk az 578/10-es törzs esetében, a P250L mutációt tartalmazó vírus alacsonyabb és magasabb dóziséval fertőzött egerek közül egyetlen egy sem pusztult el. A túlélő egerek euthanáziája után egy állat agyvelejéből izoláltunk vissza WNV-t, amely azonban

revertálódott a vad típusra. Az NS1 mutáns vírust nem lehetett sem az agyvelőkből sem pedig a vesékből kimutatni. A Kunjin vírussal ellentétben a neuroinvazivitás minimum 10 000-ed részére csökkent az általunk vizsgált 2-es genetikai vonalhoz tartozó 587/10-es törzs esetében. A Hall és mtsai által megfigyelt és a mi kísérleteink során tapasztalt eltérő attenuáló képességet azonban befolyásolhatta az *in vivo* kísérletekben használt egértörzs (BALB/c) vagy az egerek különböző életkora is (18-20 napos). Az sem kizárható, hogy az NS1 mutáns vírus teljes genomjának szekvenálása során talált további csendes nukleotid-mutáció (G627A) hatással volt a vírus attenuálódására. Nem utolsó sorban pedig az

1-es és 2-es genetikai vonal vírusai közötti egyéb genetikai eltéréseknek (kb. 25% AS eltérés) is szerepe lehet egy-egy genetikai marker virulenciára kifejtett hatásában.

Az előzőekben felsorolt befolyásoló tényezők valódi hatására csak további 1-es és 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek vizsgálatával derülhet fény. Az NS1 mutáns vírus *in vitro* Vero sejtenyészetben tapasztalt szignifikánsan lelassult replikációja (amelyre bizonyíték a kísérleteinkben mért szignifikánsan alacsonyabb mennyiségű +RNS és -RNS szál is) lehet magyarázat az *in vivo* kísérletekben látott csökkent neuroinvazivitásra, mivel az immunrendszer gyors válaszreakciói még azelőtt eliminálhatták a vírust a szervezetből, mielőtt

az a központi idegrendszerbe jutott volna. Habár 14 nappal a fertőzés után egyetlen egér agyából tudtunk virális RNS-t kimutatni (és az is revertálódott a vad formára), azt nem tudjuk teljes mértékben kizárni, hogy a fertőzés korábbi szakaszában az NS1 mutációt tartalmazó vírus bejutott a központi idegrendszerbe, azonban csökkent neurovirulenciája révén a 14. napra onnan el is tűnt. A csökkent neurovirulencia bizonyítására további (intrakraniális fertőzést is magában foglaló) vizsgálatokra van szükség. Kísérleteink eredménye arra enged következtetni tehát, hogy az NS1 fehérje P250L mutációja attenuáló hatású, illetve bizonyíték arra, hogy az NS1 fehérjének a WNV replikációjában szerepe van.

Az NS2A egy kisméretű, hidrofób, membránhoz kötött fehérje, valószínűleg az RNS replikációs komplexet kapcsolja az endoplazmatikus retikulum (ER) membránhoz (Lindenbach és mtsai 2013). Fontos szerepe van a vírus összeépülésében és a veleszületett immunitás gátlásában. Ez utóbbi hatását az INF-béta promóter vezérelt transzkripció gátlásán keresztül fejt ki (Leung és mtsai 2008; Liu és mtsai 2004). Liu és mtsai kísérletében az Ala30Pro mutációt tartalmazó Kunjin vírus háromhetes egerekben magas fokú attenuálódást mutatott, de *in vitro* a mutáns replikonok számában nem volt eltérés a vad típushoz viszonyítva. Ugyanez a mutáns vírussal való fertőzés után öthetes Swiss egerek vérében magasabb INF-alfa és béta

szintet mérték (Liu és mtsai 2006). Egy másik tanulmányban a NY99 vírus (1-es genetikai vonalhoz tartozó virulens törzs) NS2A kódoló genomszakaszát Kunjin vírus (1-es genetikai vonalhoz tartozó kevésbé virulens törzs) eredetűre cserélték, illetve az NS2A génszakaszba illesztettek egy mutációt (A30P), aminek következtében a mutáns NY99 vírus virulenciája jelentősen csökkent négyhetes Swiss-Webster egérben. Az NS2A gén A30P mutáció önmagában beillesztve a NY99 vírus genomjába (a Kunjin vírus NS2A génjének további 6 természetes szubsztitúciója nélkül) csak mérsékelt citopatogenitás és virulencia-csökkenést okozott (Audsley és mtsai 2011). Néhány évvel korábban egy másik tanulmány szerint



az NS2A A30P mutációt tartalmazó NY99 vírus Vero sejteken enyhe fokban lelassult replikációt mutatott, de öthetes egerekben (Swiss-Webster) virulencia csökkenést nem tapasztaltak (Rossi és mtsai 2007). A mi megfigyeléseink leginkább az utóbbi megállapítással vannak összhangban, ugyanis az A30P mutációt tartalmazó mutáns vírus esetén sem a replikációs kinetikában, sem pedig az egérfertőzési kísérletekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást a vad típusú vírushoz viszonyítva.

A nyugat-nílusi vírus NS3 fehérjéje multifunkcionális enzimeként működik (az N terminus tripszin-szerű szerin proteáz, a C terminus RNS-trifoszfátáz, NTPáz és helikáz enzimeket kódol), így fontos szerepe van a

virális poliprotein hasításában, az RNS érésében és replikációjában is (Wengler és mtsai 1991; Padmanabhan és mtsai 2006). Az NS2A fehérjével együttműködve a vírus összeépülésében is feltehetően részt vesz (Kummerer és mtsai 2002). Varjufélékben jelentős attenuálódást figyeltek meg (100%-ról 12,5%-ra csökkent a mortalitás) olyan NY99 vírussal végzett fertőzési kísérletben, ahol a vírus NS3 fehérjéjének 249. aminosavát prolinról treoninra cserélték. Amikor viszont ugyanezen a helyen egy alacsony patogenitású vírusban (KEN-3829) prolin szubsztitúciót illesztettek be, a vírus virulenciája 31%-ról 94%-ra nőtt, valószínűleg annak köszönhetően, hogy a vírus replikációja magasabb fokot ért el a varjufélékben (Brault és mtsai 2007). Úgy tűnik a NY99 törzs NS3

249. aminosava kulcs virulencia faktor varjűfélék esetében, habár egérmodellben csak minimális hatást tulajdonítanak neki (Langevin és mtsai 2014). A magyarországi 2004-ben héjából izolált WNV2-es törzs (goshawk-Hungary-2004) és a Görögországban izolált közeli rokonsági fokot mutató, virulens Nea Santa-Greece-2010, ugyancsak 2-es genetikai vonalú vírustörzs genetikai összehasonlító vizsgálata során az NS3 fehérjében H249P mutációra derült fény. A feltételezések szerint ez a mutáció szerepet játszhat a görögországi törzs virulenciájában (Papa és mtsai 2011). Az általunk vizsgált 578/10-es WNV 2-es törzs is tartalmazta ezt a mutációt. Annak felderítésére, hogy a H249P szubsztitúció valóban hatással van-e

ezeknek a törzseknek a virulenciájára, pontmutációt idéztünk elő az NS3 249. aminosav helyén, az eredetileg előforduló prolint hisztidinre cseréltük. Az attenuáló hatást *in vitro* és *in vivo* egérmódelben is vizsgáltuk. Az *in vivo* vizsgálatokban részleges, de nem szignifikáns attenuációt figyeltünk meg, annak ellenére, hogy az *in vitro* kísérletben a Vero sejtek fertőzése után 3 mintavételi időpontban is szignifikánsan alacsonyabb titert mértünk az NS3-249H mutációt tartalmazó vírusnál, mint a WT-nél. Ez azonban több mintavételi időpontban, több mutáns vírusra is igaz volt (pl. az NS2A klónra), amelyeknél egyáltalán nem tapasztaltunk *in vivo* csökkent virulenciát. Eredményeink alapján úgy tűnik, az *in vitro* mért infektív titerek és az *in vivo* tapasztalt

attenuálódás között nincs egyértelmű kapcsolat. Ezzel a tapasztalattal összhangban van Langevin és mtsai (2014) megfigyelése, ahol az NS3-P249T mutációt tartalmazó vírus 6 log<sub>10</sub> PFU/mL-rel alacsonyabb titert ért el varjűfélékben, míg 37°C-on Vero sejteken nem volt szignifikáns különbség a fertőző titer átlagos csúcsát tekintve az NS3 249. AS helyén P-t tartalmazó vírushoz viszonyítva.

A fentiekből adódóan úgy tűnik, hogy az NS3 fehérje 249. aminosavának virulenciára kifejtett hatása csak madarakban jelentős. Sőt, madarak esetében is jelentős különbségek lehetnek az egyes fajok között. Rövidcsőrű varjűban például nagyfokú attenuációt mutattak ki, míg házi verébben csak enyhe fokú virulencia-csökkenést

figyeltek meg (Langevin és mtsai 2014). A madárfajok P249T mutáció attenuáló képességére adott eltérő érzékenységének lehetséges magyarázata a vírusok eltérő hőérzékenysége. Míg a P-t tartalmazó vírus 44°C-on is szaporodik, a T-t tartalmazó vírus nem (DEF sejtvonalon vizsgálva) (Langevin és mtsai 2014). Ezzel összhangban van az a megfigyelés, hogy a WNV fertőzése különböző madárfajokban vagy magas lázzal - pl. a rövidcsőrű varjúban (Kinney és mtsai 2006), vagy éppen hipotermiával társul pl. házi verébben (Langevin és mtsai 2014-es tanulmányában említett, nem publikált adat). Munkánk során a mutációk attenuáló képességét kizárólag egerekben modelleztük, ezért *in vitro* hőérzékenységi kísérleteket nem végeztünk. A jövőben hasznos lenne az *in*

*vitro* kísérleteket magasabb hőmérsékleten (41–44°C) valamint az *in vivo* kísérleteket varjufélékben elvégezni.

A flavivírusok NS4B fehérjéje helikális, hidrofób, membránhoz kötött nem strukturális fehérje. Fő feladata a gazdaszervezet immunválaszának gátlása. Interferon-antagonista, az NS4A és NS2A fehérjékkel együttműködve a STAT-1 foszforiláció blokkolásán keresztül nagymértékben csökkenti az interferon-választ (Munoz-Jordán és mtsai 2005). A flavivírus genom NS4B fehérje kódoló szakaszában bekövetkező aminosav-változás következtében tehát változás léphet föl az interferon-szignalizációra kifejtett gátló hatásban (Evans és Seeger 2007). Az NS4B 38. AS helyér

elhelyezkedő prolin annak a transzmembrán doménnek a része, amely a fehérjét az ER-hez köti. Welte és mtsai (2011) tanulmányában a P38G mutáció 6–10 hetes C57BL/6 egerekben csökkent szintű virémiát és 0%-os letalitást okozott. Ugyanakkor a mutáns vírussal fertőzött egerekben magasabb szintű volt az INF-1 és IL-1 válasz a memória T-sejtek és citotoxikus T-sejtek száma. Wicker és mtsai (2012) tanulmányában a NY99 vírustörzs az NS4B-P38G mutáció következtében hőérzékennyé vált, Vero sejteken jelentősen lelassult a szaporodása 41°C-on, míg 37°C-on változást nem tapasztaltak az eredeti vírus replikációjához képest. A hőérzékenység *in vivo* attenuálódással is társult, a neuroinvazivitás intraperitoneális fertőzés után



10 000 PFU LD<sub>50</sub> értékkel csökkent 3–4 hetes NIH Swiss egerekben (de a neurovirulencia a vad típusú vírushoz hasonló maradt). A kísérletek során két további mutációt találtak (NS4B-T116I és NS3-N480H), azonban önállóan beillesztve a NY99 genomjába őket, egyik sem vezetett csökkent virulenciához egérben (Wicker és mtsai 2012). A mi kísérletünkben a P38G mutáció nem volt hatással a vírus replikációjára Vero sejteken, és annak ellenére, hogy ugyanazon egérvonalban és ugyanolyan életkorban fertőztük az egereket, mint Welte és mtsai, *in vivo* attenuálódást sem tapasztaltunk. A teljes genom-analízis során kiderült, hogy a Wicker és mtsai által leírt két további mutáció nem szerepelt az NS4B38-as mutáns vírusban,

viszont egy csendes mutációra fény derült a 6768. nukleotid helyen (A-ról G-re cserélődött a nt). Kísérleteink alapján úgy tűnik, a 2-es genetikai vonalú nyugat-nílusi vírus esetében a P38G mutációnak nincs jelentős szerepe a vírus virulenciájának meghatározásában, azonban nem zárhatjuk ki a további „extra” mutációk, illetve a két genetikai vonal egyéb genombeli eltérésének befolyásoló hatását az említett P38G mutáció attenuáló képességének megítélése kapcsán.

Az NS4B-C102S szubsztitúciót a NY99 vírus esetében *in vitro* hőérzékenységgel (41°C-on lelassult replikáció) és egér modellben *in vivo* neuroinvazivitás- és neurovirulencia-csökkenéssel társítják (Wicker és mtsai 2006). Ugyanezen mutációt

beillesztve az 578/10-es törzs genomjába, a vírus szaporodása drámai módon lecsökkent, olyannyira, hogy a sejtenyészetekeken nem volt CPE és nem lehetett fertőző titert mérni a mutáns vírus transzfektálása után. Ennek következtében sem az *in vitro* sem az *in vivo* kísérleteket nem tudtuk elvégezni a C102S mutációt tartalmazó mutáns vírussal. Az említett mutáció attenuáló hatása a NY99 vírus esetében az interferon-szignalizáció csökkent mértékű gátlásának tulajdonítható (Wicker 2006). A mi esetünkben azonban a C102S mutációt tartalmazó 578/10-es mutáns vírus képtelen volt replikálódni BHK-21 vagy Vero E6 sejteken, annak ellenére, hogy ezekben a sejtvonalakban az IFN- $\alpha$  és - $\beta$  útvonalak nem működnek. További kísérleteket igényelne annak kiderítése, hogy

esetleg milyen más tényezők játszanak szerepet a C102S mutáció WNV 2-es vírusra kifejtett letális hatásának kialakulásában.

Az NS4B-E249G szubsztitúció számos WNV törzsben természetesen is előfordul (Davis és mtsai 2004; Lanciotti és mtsai 2002). 1-es genetikai vonalú WNV-ben kimutatták, hogy az E249G mutáció lelassult replikációhoz vezetett C3H/He és BHK-21 sejtvonalakon, habár Vero sejtvonalon csak elhanyagolhatóan csökkent a vírus szaporodóképessége. Ugyanez a mutáns törzs szignifikáns attenuációt mutatott hathetes C3H/HeN egerekben talppárná fertőzés után (a vad típusú vírus által előidézett 100%-os mortalitás 50%-ra csökkent) (Puig-Basagioti és mtsai 2007).

Egy másik tanulmányban egy NS4B-E249G mutációt tartalmazó 1-es genetikai vonalú WNV sem *in vitro*, sem pedig i. p. fertőzött öthetes Swiss-Webster egerekben *in vivo* nem társult csökkent virulenciával (Rossi és mtsai 2007). A mi eredményeink inkább ez utóbbi tanulmány eredményeivel vannak összhangban, ugyanis az E249G mutációval rendelkező 2-es genetikai vonalú mutáns vírus *in vitro* a WT vírushoz hasonló titert ért el Vero E6 sejteken, és *in vivo* kis mértékben (nem szignifikánsan) alacsonyabb mortalitást (63%) okozott. Fontos megemlíteni, hogy nem zárható ki a teljes genom szekvenálás során feltárt további NS4B-V188 szubsztitúció E249G mutáció attenuálóképességére kifejtett lehetséges befolyásoló szerepe.

Összefoglalva az általunk vizsgált nem strukturális fehérjéket kódoló génekben előforduló mutációk változatos befolyásoló hatással bírtak *in vitro* és *in vivo* a Magyarországon izolált 2-es genetikai vonalhoz tartozó 578/10-es WNV törzsrre. Szignifikáns attenuációt *in vitro* és *in vivo* együttesen csak az NS1-P250L mutácié esetében tapasztaltunk, ahol a mutáció hatására a neurovirulencia teljes elvesztését tapasztaltuk. Valószínűleg a mutáns vírus a neuroinvazív tulajdonságát is elveszítette, azonban ez nem jelenthető ki minden kétséget kizáróan. A vírus ugyan a kísérleti idő végén (14 nap p. i.) nem volt kimutatható az agyszövetből (csak egy esetben a revertálódott forma), nem zárhatjuk ki azt a

lehetőséget, hogy a vírus bejutott az agyba, de 14 nappal a fertőzés után már kiürült onnan. Az NS3-P249H és az NS4B-E249C mutáció részleges, (a mortalitásban megfigyelhető enyhe csökkenésben megnyilvánuló), de nem szignifikáns virulencia-csökkenéssel társult egér modellben, míg az NS2A-A30P és NS4B-P38G mutációknak gyakorlatilag nem volt *in vivo* attenuáló hatásuk. Az 1-es genetikai vonalú vírusokban megfigyelt virulencia-csökkenéshez hasonló eredmények hiánya az NS4B (249) vagy az NS2A gén esetében lehetséges, hogy abból adódott, hogy az előbbi vizsgálatokban több mutáció együttes jelenléte (1, illetve 6 további mutációt fedeztek föl a genomban a korábban említett tanulmányokban) is befolyásolhatta az egérben megfigyelt virulenciát (Audsley és

mtsai 2011; Puig-Basagoiti és mtsai 2007). Az NS3 génjének mutációja a legújabb tanulmányok szerint csak madarakban jelentős, sőt madarak esetében is csak a P és T aminosav cseréje bizonyult attenuáló hatásúnak (Langevin és mtsai 2014). Az NS1, NS2A és NS3 génszakaszokat érintő mutációval rendelkező mutáns vírusok 37°C-on Vero sejtekben vizsgálva *in vitro* replikáció-lassulást mutattak, habár ez a szignifikáns különbség a kísérleti idő végére (96 óra p. i.) csak az NS1 klón esetében maradt szignifikáns a WT-hez hasonlítva.

Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy az NS1 gén 250. aminosavának jelentős szerepe lehet a 2-es genetikai vonalú WNV-k virulenciájában, azonban a fentiekben felsorolt



és kifejtett 1-es genetikai vonalú vírusokban vizsgált egy-egy virulenciamarker különböző időpontokban és tanulmányokban megjelenő eltérő megítélése óvatosságra int. Mind az *in vivo* kísérletekben használt egerek típusa vagy életkora, mind a genomban előforduló egyéb mutációk és azoknak interakciója jelentős hatással lehet a vírust attenuáló képességre. Az 1-es és 2-es genetikai vonal közti 75,7–76,8%-os nukleotid és 93,2–94,0%-os aminosavbeli eltérésnek (Lanciotti és mtsai 2002), mint ahogyan az 578/10-es törzs egyedi genomfelépítésének is befolyása lehet egy-egy mutáció virulenciára kifejtett hatására. Éppen ezért fontos lenne további 2-es genetikai vírusokkal, és más gerinces modellekben is vizsgálni az NS1-P250L mutáció virulenciára kifejtett szerepét, vagy a

mutáció, vagy akár az egész 578/10-es eredetű NS1 gén más vírusokba való beillesztésével.

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, neuroinvazív, 2-es genetikai vonalhoz tartozó WNV törzsek tovább vizsgálatát és patogenitás markereinek felderítését.

A munkánk során előállított fertőző klónok és a velük elvégzett *in vitro* és *in vivo* kísérletek tudományos eredményei értékes

adatokkal szolgálnak a feltételezett genetikai markerek virulenciát befolyásoló hatásainak vizsgálatában. Az elmúlt évtizedben a magas patogén, 2-es genetikai vonalhoz tartozó nyugat-nílusi vírusok térhódítása figyelhető meg Európában. A 2004-ben Magyarországon megjelent WNV 2-es törzs leszármazottja például 2010-ben Görögországban okozott kiterjedt járványt, számos neuroinvazív esettel. Egy másik 2-es genetikai vonalú vírus (Reb\_VLG\_07\_H GenBank accession No. FJ425721) Oroszország Volgograd régiójában okozott human neurológiai megbetegedéseket (Platonov és mtsai 2008 és 2011). 2010-ben ugyanez a törzs Délkelet Romániában jelent meg (Sirbu és mtsai 2011), ahol legalább 3 éven keresztül izolálták a megbetegedésekből

(Kolodziejek és mtsai 2014). A különböző vírustörzsek genetikai összehasonlító vizsgálata potenciális virulenciamarkereket deríthet föl, amelyek vizsgálata reverz genetikai módszerekkel, a mi általunk fölállított modellhez hasonlóan, sok fontos információt szolgáltathatnak a 2-es genetikai vonalú WNV-k virulenciáját befolyásoló tényezők megismerésére, vagy akár a vakcinagyártás számára.

A NÉBIH ÁDI-ba érkezett vadmadár hullák egyéb flavivírusokra irányuló vizsgálatai során USUV fertőzést állapítottunk meg feketerigókban és fenyőrigóban. Az Usutu vírust 1959-ben Dél-Afrikában mutatták ki először, majd kiderült, hogy a vírus számos afrikai országban jelen van (Nikolay és mtsai

2011). Európában először 2001-ben ausztriai vadmadaraktól (tömegesen elhullott fekete rigók) izolálták (Weissenböck és mtsai 2002), de retrospektív vizsgálatok már 1996-os olaszországi madármintákból is kimutatták a jelenlétét (Weissenböck és mtsai 2013). Magyarországi előfordulásáról 2005 óta tudunk (Bakonyi és mtsai 2007). A 2001-es ausztriai izolálása óta számos európai országból jelentettek USUV okozta vadmadár elhullásokat (Manarolla és mtsai 2010; Steinmetz és mtsai 2011). A vírus zoonotikus, esetenként az emberben is megtelepszik és agyvelő-gyulladással járó betegséget okozhat, ökológiája és patogénitása is hasonló a WNV-hoz (Pecorari és mtsai 2009; Nikolay és mtsai 2011). Ennek ellenére Afrikában csak két emberi esetet

jelentettek, 1981-ben illetve 2004-ben (Nikolay és mtsai 2011). Afrikán kívül az első emberi neuroinvazív vírust 2009-ben Olaszországban diagnosztizálták, egy agyvelő-gyulladásban szenvedő (és egyébként immunhiányos) betegből (Pecorari és mtsai 2009), majd 2010-ben három virális agyvelő-gyulladásban szenvedő beteg cerebrospinális folyadékából (Cavrini és mtsai 2010). Az USUV elleni specifikus IgG ellenanyagok kimutatása véradókból arra enged következtetni, hogy a fertőzés tünetmentes is maradhat az emberben (Gaibani és mtsai 2012). Észak-Olaszországban egy 2008–2009 évi, madarakra és szúnyogokra kiterjedő felmérő vizsgálatban a *Culex pipiens* mellett a vírust

megtalálták *Aedes albopictus*ban is. A 12 USUV pozitív madár közt a leggyakoribb a fekete-terigő (*Turdus merula*) volt (öt), de a vírust kimutatták erdei fülesbagoly (*Asio otus*), szarka (*Pica pica*), dolmányos varjú (*Corvus cornix*), szajkó (*Garrulus glandarius*), balkáni gerle (*Streptopelia decaocto*), európai lappantyú (*Caprimulgus europaeus*) és vörös fogoly (*Alectoris rufa*) szerveiből (Calzolari és mtsai 2012). 2010 és 2016 között passzív monitoring vizsgálatok folytak Magyarország és Ausztria területén a vírus elterjedtségének felmérésére, amely során ugyancsak a fekete-terigők (17 a 20 pozitív esetből) mutatkoztak a legfogékonyabbnak a vírusfertőzésre (Bakonyi és mtsai 2017). A vizsgálatok eredményei felhívják a figyelmet arra, hogy a

WNV mellett az USUV is jelen van hazánkban így az is okozhat vadmadarakban agyvelőgyulladásos eseteket. A szúnyogokból és vadmadarokból izolált esetek száma összevetve a humán megbetegedésekkel arra enged következtetni, hogy az USUV a WNV-vel szemben kisebb mértékben képes megbetegíteni az embert, így alacsonyabb zoonotikus kockázatot jelent (Calzolari és mtsai 2012). A WNV és az USUV hasonló felszíni antigénjei miatt egyes szerológiai próbákban keresztreakciók alakulhatnak ki a vírusok között, ami megnehezíti a pontos diagnózis felállítását.



# Új tudományos eredmények

1. A magyarországi WNV passzív monitoring rendszerének felállítása, és ennek keretében két évig tartó szúnyoggyűjtés és vizsgálat megszervezése. A WNV kimutatása *Ochlerotatus annulipes*, *Coquillettidia richiardii* és *Culex pipiens* szúnyog vektorokból.
2. A hazai izolálású WNV 2-es genotípushoz tartozó WNV-578/10 vírustörzs teljes genomszekvenciájának meghatározása.
3. Az WNV-578/10 vírustörzs teljes hosszúságú fertőző klónjának

előállítás, valamint mutagenézissel történő genetikai módosítása, és ennek során hat, egy-egy pontmutációt (NS1 (P250L), NS2A (A30P), NS3 (P249H) NS4B (P38G C102S, E249G)) tartalmazó klónvírus előállítás.

4. A vad típusú és rekombináns mutáns vírusok Vero E6 sejtenyészetben történt *in vitro* és egér modellben való *in vivo* virulencia vizsgálataival egy, a WNV-578/10 vírustörzs szignifikáns attenuációját okozó pontmutáció (NS1 P250L), valamint egy, a vírust szaporodásképtelenné tevő (NS4B C102S) és négy, a virulenciát kevésbé befolyásoló pontmutáció

(NS2A A30P, NS3 P249H, NS4E P38G és E249G) hatásának felderítése.

# Irodalomjegyzék

Almazan, F., Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Izeta, A. Calvo, E., Plana, Duran, J., Enjuanes, L.: Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* 97(10). 5516–5521. 2000.

Almeida, A. P., Galão, R. P., Sousa, C. A., Novo, M. T., Parreira, R., Pinto, J., Piedade, J., Esteves, A. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(8) 823–832. 2008.

Anderson, J. F., Andreadis, T. G., Main, A. J., Ferrandino, F. J., Vossbrinck, C. R.: West Nile virus from female and male mosquitoes (Diptera: Culicidae) in subterranean, ground, and canopy habitats in Connecticut. *J. Med. Entomol.*, 43(5). 1010–1019 2006.

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.*, 194(11). 1577–1579. 2006.

Apperson, C. S., Hassan, H. K., Harrison, B. A., Savage, H. M., Aspen, S. E., Farajollahi, A., Crans W., Daniels, T. J., Falco R. C., Benedict M., Anderson, M., McMillen, L., Unnasch, T. R.: Host feeding patterns of probable vector mosquitoes of West Nile virus in the eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 4(71). 82. 2004.

Audsley, M., Edmonds, J., Liu, W., Mokhonov, V., Mokhonova, E., Melian, E. B., Prow, N., Hall, R. A., Khromykh, A. A.: Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile virus. *Virology*, 414(1). 63–73. 2011.

Bagnarelli, P., Marinelli, K., Trotta, D., Monachetti, A., Tavio, M., Del Gobbo, R., Capobianchi, M., Menzo, S., Nicoletti, L., Magurano, F., Varaldo, P.: Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill.*, 16. (43). 2011.

Bakonyi T., Erdélyi K., Brunthaler, R., Dán Á. Weissenböck, H., Nowotny, N.: Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016. *Emerg. Microbiol. Infect.*, 6. e85. 2017.

Bakonyi T., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Csörgő T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H., Nowotny, N.: Emergence of Usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.*, 45. 3870–3874. 2007.

Bakonyi T., Ferenczi E., Erdélyi K., Kutasi O., Csörgő T., Seidel, B., Weissenböck, H., Brugger, K., Bán E., Nowotny, N.: Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.*, 165(1–2). 61–70. 2013.

Bakonyi T., Ferenczi E., Mittlerné Tóth E.: Egyes magyarországi arbovírus-izolátumok molekuláris genetikai vizsgálata. Szent-Iványi Binder Napok Szeged, május 12–14. 2004a.

Bakonyi T., Gould, E. A., Kolodziejek, J. Weissenböck, H., Nowotny, N.: Complete genome

analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*, 328(2). 301–310. 2004b.

Bakonyi T., Hubálek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N.: Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2). 225–331. 2005.

Bakonyi T., Ivanics E., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Weissenböck, H., Nowotny, N.: Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(4). 618–623. 2006.

Bálint Á., Farsang A., Zádori Z., Hornyák Á., Dencs L., Almazan F., Enjuanes, L., Belák S.: Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in virion cell tropism. *J. Virol.*, 86(11). 6258–6267. 2012.

Baqar, S., Hayes, C. G., Murphy, J. R., Watts, D. M. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. of Trop. Med. and*

Hyg., 48. 757–762. 1993.

Barbić, L., Listeš, E., Katić, S., Stevanović, V., Labrović, A., Di Genarro, A., Savini, G.: Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet. Microbiol.*, 159(3–4). 504–508. 2012.

Bárdos, V., Adamcová, J., Dedei, S., Gjini, N., Rosický, B., Simková, A.: Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol.*, 3 277–282. 1959.

Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., Palu', G. Excretion of West Nile Virus in urine during acute infection. *J. Infect. Dis.*, 208(7). 1086–1092. 2013.

Barzon, L., Pacenti, M., Ulbert, S., Palu', G.: Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Anti. Infect. Ther.*, 13(3). 327–342. 2015.

Batschelet, E., Domingo, E., Weissmann, C.: The proportion of revertant and mutant phage in a growing



population, as a function of mutation and growth rate. *Gene*, 1(1). 27–32. 1976.

Baty, S. A., Gibney, K. B., Staples, J. E., Patterson, A. B., Levy, C., Lehman, J., Wadleigh, T., Feld, J. Lanciotti, R., Nugent, C. T., Fischer, M.: Evaluation for West Nile Virus (WNV) RNA in urine of patients within 5 months of WNV infection. *J. Infect. Dis.*, 205(9) 1476–1477. 2012.

Beasley, D. W., Li, L., Suderman, M. T., Barrett, A. D. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology*, 296.17–23. 2002.

Beasley, D. W., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang C. Y., Schneider, B. S., et al.: Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *J. Virol.*, 79. 8339–8347. 2005.

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Minoc M., Dahl, C., Kaiser, A.: *Mosquitoes and their control* Kluwer Academic/Plenum Publisher. New York. 498.

2003.

Best, S. M., Morris, K. L., Shannon, J. G., Robertsor S. L., Mitzel, D. N., Park, G. S., Boer, E. Wolfenbarger, J. B., Bloom, M. E.: Inhibition of interferon-stimulated JAK–STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.*, 79(20). 12828–12839. 2005.

Biebricher, C. K., Eigen, M.: What is quasispecies? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 299. 1–31. 2006.

Bondre, V. P., Jadi, R. S., Mishra, A. C., Yergolkar, P. N., Arankalle, V. A.: West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J. Gen. Virol.*, 88. 875–884. 2007.

Botha, E. M., Markotter, W., Wolfaardt, M., Paweska J. T., Swanepoel, R., Palacios, G., Nel, L. H., Venter M.: Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg. Infect. Dis.* 14(2). 222–230. 2008.

Brault, A. C., Huang, C. Y., Langevin, S. A., Kinney, R.

M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., Panella, N. A., Holmes, E. C., Powers, A. M., Miller, B. R.: A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.*, 39(9). 1162–1166. 2007.

Brinton, M. A.: The molecular biology of West Nile virus: a new invader of the western hemisphere. *Annual Review of Microbiology*, 56. 371–402. 2002.

Buchmeier, M. J., Campbell, I. L.: *Neurovirology viruses and the brain*. San Diego, Calif.; London Academic Press, 2001.

Buletsa, B. A., Turak, J. A., Korol, M. J., Ignatovich, I. I., Vitvitskyi, A. A.: Neurologic manifestations of West Nile fever in the Transcarpathian region. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova*, 89(2). 29–30. 1989.

Butenko, A. M., Chumakov, M. P., Stolbov, D. N.: [Serological and virological examinations in a natural focus of West Nile fever in the Astrakhan region] [in Russian]. *Voprosy Medicinskoj Virusologii*, 208–211.

1967.

Butenko, A. M., Chumakov, M. P., Bashkirtsev, V. N., Tkachenko, E. A., Rubin, S. G., Stolbov, D. N.: [New investigations of West Nile virus infections in the USSR – Astrakhan region] [in Russian]. *Materialy XV. Nauchnoi Sessii Instituta Poliomielitov I Virusnykh Encefalitov* (Moskva), 175–176. 1968.

Calistri, P., Giovannini, A., Hubálek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., Lelli, R.: Epidemiology of west Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol. J.*, 4. 29–37. 2010.

Calzolari, M., Gaibani, P., Bellini, R., Defilippo, F., Pierro, A., Albieri, A., Maioli, G., Luppi, A., Rossini, G., Balzani, A., Tamba, M., Galletti, G., Gelati, A., Carrieri M., Poglayen, G., Cavrini, F., Natalini, S., Dottori, M., Sambri, V., Angelini, P., Bonilauri P.: Mosquito, Bird and Human Surveillance of West Nile and Usutu Viruses in Emilia–Romagna Region (Italy) in 2010 [PLoS ONE](#), 7(5). e38058. 2012.

Campbell, M. S., Pletnev, A. G.: Infectious cDNA

clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology*, 269(1). 225–37. 2000.

Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C., Arispici, M. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, 32. 31–35. 2000.

Castillo-Olivares, J., Wood, J.: West Nile virus infection of horses. *Veterinary Research*, 35(1). 467–483. 2004.

Cavrini, F., Della Pepa, M. E., Gaibani, P., Pierro, A. M., Rossini, G., Landini, M. P., Sambri, V.: A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.*, 50. 221–223. 2010.

CDC Centers for Disease Control and Prevention  
Division of Vector-Borne Infectious Diseases, West Nile Virus.  
<https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/MosquitoSurveillance2016.pdf>

CDC, Guidelines for surveillance, prevention, and control of West Nile virus infection.

control of West Nile virus infection – United States. *Jama—Journal of the Am. Med. Ass.*, 283(8). 998–998. 2000.

Chambers, T. J., Droll, D. A., Walton, A. H., Schwartz J., Wold, W. S., Nickells, J.: West Nile 25A virus infection of B-cell-deficient ((micro)MT) mice: characterization of neuroinvasiveness and pseudoreversion of the viral envelope protein. *J. Gen. Virol.*, 89(3). 627–635. 2008.

Charrel, R. N., Brault, A. C., Gallian, P., Lemasson, J J., Murguec, B., Murrice, S., Pastorino, B., Zeller, H., de Chesse, R., de Micco, P., de Lamballerie, X.: Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains: Evidence for viral gene flow between africa, the middle east, and europe. *Virology*, 315(2). 381–388. 2003.

Chaskopoulou, A., Dovas, C., Chaintoutis, S. Bouzalas, I., Ara, G., Papanastassopoulou, M. Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa, Greece, 2010, lineage 2), Greece, May to

July 2011. Euro Surveill., 16(31). 19933. 2011.

Chumakov, M. P., Belyaeva, A. P., Butenko, A. M.: [Isolation and study of an original virus from *Hyalomma plumbeum plumbeum* ticks and from the blood of a febrile patient in the Astrakhan region] [in Russian]. Materialy XI. Nauchnoi Sessii Instituta Poliomielitov Virusnykh Encefalitov (Moskva), 5–7. 1964.

Chung, K. M., Thompson, B. S., Fremont, D. H., Diamond, M. S.: Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells. J. Virol., 81(17). 9551–9555. 2007.

Chung, K. M., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., Atkinson, J. P., Diamond, M. S.: West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 103(50). 19111–19116. 2006.

Chvala, S., Bakonyi T, Bukovsky, C., Meister, T., Brugger, K., Ruber, F., Nowotny, N., Weissenböck, H.:

Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet. Microbiol.*, 122. 237–245. 2007.

Ciccozzi, M., Peletto, S., Cella, E., Giovanetti, M., La A., Gabanelli, E., Acutis, P. L., Modesto, P., Rezza, G., Platonov, A. E., Lo Presti, A., Zehender, G. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect. Genet. Evol.* 17. 46–50 2013.

Colombage, G., et al.: DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology*, 250(1). 151–163. 1998.

Cornel, A. J., Jupp, P. G., Blackburn, N. K. Environmental temperature on the vector competence of *Culex univittatus* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J. Med. Entomol.*, 30(2). 449–456. 1993.

Couissinier–Paris, P.: West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public



health? Bull. Soc. Pathol. Exot., 99. 348–354. 2006.

Crooks, A. J., Lee, J. M., Easterbrook, L. M., Timofeev, A. V., Stephenson, J. R.: The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. J. Gen. Virol., 75(12). 3453–3460. 1994.

Csank, T., Bhide, K., [Bencúrová, E.](#) , [Dolinská, S.](#), [Drzewnioková, P.](#) , [Major, P.](#) , [Korytár Ľ.](#) , [Bocková, E.](#), [Bhide, M.](#) , [Pistl, J.](#) : [Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set.](#) Arch. Virol., Mar. 21. 2016.

Davis, B. S., Chang, G. J., Cropp, B., Roehrig, J. T., Martin, D. A., Mitchell, C. J., Bowen, R., Bunning, M. L.: West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. J. Virol., 75(9). 4040–4047. 2001.

Davis, C. T., Beasley, D. W., Guzman, H., Siirin, M., Parsons, R. E., Tesh, R. B., Barrett, A. D.: Emergence

of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology*, 330(1). 342–350. 2004.

Davis, C. T., Galbraith, S. E., Zhang, S., Whiteman, M. C., Li, L., Kinney, R. M., Barrett, A. D.: A combination of naturally occurring mutations in North American West Nile virus nonstructural protein genes and in the 3' untranslated region alters virus phenotype. *J. Virol.*, 81(11). 6111–6116. 2007.

Davis, L. E., DeBiasi, R., Goade, D. E., Haaland, K. Y., Harrington, J. A., Harnar, J. B., Pergam, S. A., King, M. K., DeMasters, B. K., Tyler, K. L.: West Nile virus neuroinvasive disease. *Annals of Neurology*, 60. 286–300. 2006.

De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M., Sanders, N. N. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.*, 43. 16. 2012.

Diakakis, N., Chaintoutis, S. C., Bouzalas, I., Brellou G. D., Vlemmas, I., Papanastassopoulou, M., Dovas C. I.: Investigation of Equine Encephalitis Cases During the West Nile Virus (WNV) Epidemics in

Greece. *Equine Vet. J.*, 46(Suppl. 47). 2–25. 2014.

Donadieu, E., Bahuon, C., Lowenski, S., Zientara, S., Couplier, M., Lecollinet, S.: Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses*, 5(11). 2856–2580. 2013.

Durand, B., Chevalier, V., Pouillot, R., Labie, J., Marendat, I., Murgue, B., Zeller, H., Zientara, S.: West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: Results of a Serosurvey. *Emerg. Infect. Dis.*, 8. 777–782. 2002.

ECDC Annual epidemiological report, Emerging and vector-borne diseases, 2014. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)

ECDC European Centre of Disease Prevention and Control. West Nile Fever. [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west\\_nile\\_fever](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever)

Engler, O., Savini, G., Papa, A., Figuerola, J., Groschup, M. H., Kampen, H., Medlock, J., Vaux, A., Wilson, A. J., Werner, D., Jöst, H., Goffredo, M., Capelli, G., Federici, V., Tonolla, M., Patocchi, N., Flacio, E., Portmann, J., Rossi-Pedruzzi, A.

Mourelatos, S., Ruiz, S., Vázquez, A., Calzolari, M., Bonilauri, P., Dottori, M., Schaffner, F., Mathis, A., Johnson, N.: European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10(10). 4869–4895. 2013.

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. Born. Zoon. Dis.*, 7(2). 181–188. 2007.

European Commission Implementing Decision (ECID) Brussels, 8.8.2012 C(2012) 5538. <http://www.fhi.no/dokumenter/23cf9ecb6a.pdf>. Assessed 10 Nov 2015.

Evans, J. D., Seeger, C.: Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. *J. Virol.*, 81(21). 11809–11816. 2007.

Fall, G., Diallo, M., Loucoubar, C., Faye, O., Sall, A A.: Vector competence of *Culex neavei* and *Culex*

quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 90. 747–754 2014.

Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D. Kilpatrick, A. M.: „Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.*, 11(7). 1577–1585. 2011.

Ferenczi E., Mittlerné Tóth E.: Első hazai Nyugat-nílus láz vírusfertőzések idegrendszeri tünetekkel 2003-ban. Szent-Iványi Binder Napok, Szeged, május 12–14 2004.

Filipe, A. R., de Andrade, H. R.: Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta. Virol.*, 34(6). 582–591. 1990.

Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey F. A., Deubel, V.: Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation, dependent fashion. *J. Virol.*, 73(7). 6104–6110. 1999.

Fros, J. J., Geertsema, C., Vogels, C. B., Roosjen, F. P., Failloux, A. B., Vlak, J. M., Koenraadt, C. J. Takken, W., Pijlman, G. P.: West Nile Virus: High Transmission Rate in North-Western European Mosquitoes Indicates Its Epidemic Potential and Warrants Increased Surveillance. *PLoS Negl. Trop Dis.*, 9(7). e0003956. 2015.

Gaibani, P., Pierro, A., Alicino, R., Rossini, G., Cavrini, F.: Detection of Usutu-virus specific IgG in blood donors from Northern Italy. *Vector Born. Zoon. Dis.*, 12(5). 431–433. 2012.

Gamino, V., Höfle, U.: Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Veterinary Research*, 44(1). 39. 2013.

Garcia–Tapia, D., Loiacono, C. M., Kleiboeker, S. B. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 110(3–4). 229–244. 2006.

Glávits R., Ferenczi E., Ivanics É., Bakonyi T., Mató T. Zarka P.: Occurrence of West Nile Fever in a

circovirus infected goose flock in Hungary. *Avian Pathol.*, 34. 408–414. 2005.

Goddard, L. B., Roth, A. E., Reisen, W. K., Scott, T. W.: Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J. Med Entomol.*, 40. 743–746. 2003.

Gould, E. A.: Implications for Northern Europe of the Emergence of West Nile virus in the USA. *Epidemiology & Infection*, 131(1). 583–589. 2003.

Gould, L. H., Fikrig, E.: West nile virus: a growing concern? *The J. of Clin. Invest.*, 113(8). 1102–1107. 2004.

Gray, T. J, Webb, C. E.: A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int. J. Gen. Med.*, 7. 193–203. 2014.

Guo, J. T., Hayashi, J., Seeger, C.: West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J. Virol.*, 79(3). 1343–1350. 2005.

Guyatt, K. J., Westaway, E. G., Khromykh, A. A.

Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5 of the flavivirus Kunjin. *J. Virol. Methods*, 92. 37–44. 2001.

Hall, R. A., Khromykh, A. A., Mackenzie, J. M. Scherret, J. H., Khromykh, T. I., Mackenzie, J. S. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology*, 264(1). 66–75. 1999.

Hamdan, A., Green, P., Mendelson, E., Kramer, M. R., Pitlik, S., Weinberger, M.: Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis. *Transpl. Infect. Dis.*, 4(3). 160–162. 2002.

Hamer, G. L., Kitron, U. D., Brawn, J. D., Loss, S. R., Ruiz, M. O., Goldberg, T. L., Walker, E. D.: *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J. Med. Entomol.*, 45(1). 125–128. 2008.



Hannoun, C., Panthier, R., Mouchet, J., Eouzan, J. P. Isolation in France of the West Nile virus from patients and from the vector *Culex Modestus Ficalbi*. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., 259. 4170–4172. 1964.

Hannoun, C., Panthier, R., Corniou, B.: Epidemiology of West Nile infections in the South of France, in Arboviruses of the California complex and the Bunyamwera group. V. Bardos Editor, Publ. House SAS: Bratislava, 379–387. 1969.

Hayes, C. G.: West Nile fever. In: Monath TP, ed. The arboviruses: epidemiology and ecology, vol. V. Boca Raton (FL): CRC Press, 59–88. 1989.

Hayes, C. G.: West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. Ann. NY. Acad. Sci., 951. 25–37. 2001.

Hayes, E. B, Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S P., O'Leary, D. R., Campbell, G. L.: Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. Emerg. Infect. Dis., 11(8). 1167–1173. 2005.

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.* 98. 82–87. 2004.

Hinckley, A. F., O'Leary, D. R., Hayes, E. B. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*, 119(3). 666–671. 2007.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S.: Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215(4540). 1577–1585. 1982.

Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricova, Z.: West Nile fever in Czechland. *Emerg. Infect. Dis.*, 5(4). 594–595. 1999.

Hubálek, Z., Halouzka, J.: West Nile Fever – a re-emerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Inf. Dis.* 5. 643–650. 1999.

Iwamoto, M., Jernigan, D. B., Guasch, A., Trepka, M

J., Blackmore, C. G., Hellinger, W. C., Pham, S. M., Zaki, S., Lanciotti, R. S., Lance-Parker, S. E., DiazGranados, C. A., Winqvist, A. G., Perlino, C. A., Wiersma, S., Hillyer, K. L., Goodman, J. L., Marfin, A. A., Chamberland, M. E., Petersen, L. R: West Nile Virus in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N. Engl. J. Med.*, 348(22) 2196–2203. 2003.

Jacobson, E. R., Ginn, P. E., Troutman, J. M., Farina, L., Stark, L., Klenk, K., Burkhalter, K. L., Komar, N.: West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J. Wildl. Dis.* 41(1). 96–106. 2005.

Jerzak, G. V., Bernard, K., Kramer, L. D., Ebel, G. D.: Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection. *J. Gen. Virol.*, 86(8). 2175–2183. 2005.

Jerzak, G. V., Bernard, K., Kramer, L. D., Shi, P. Y.,

Ebel, G. D.: The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology*, 360(2). 469–476. 2007.

Julian, K. G., Eidson, M., Kipp, A. M., Weiss, E. Petersen, L. R., Miller, J. R., Hinten, S. R., Marfin, A. A.: Early season crow mortality as a sentinel for West Nile virus disease in humans, northeastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2. 145–155. 2002.

Jupp, P. G.: The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann. NY Acad. Sci.* 951. 143–152. 2001.

Kalil, A. C., Devetten, M. P., Singh, S., Lesiak, B., Poage, D. P., Bargenquast, K., Fayad, P., Freifeld, A. G.: Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin. Infect. Dis.*, 40(5). 764–766. 2005.

Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162. 480–487. 1931.

Kaufusi, P. H., Kelley, J. F., Yanagihara, R., Nerurkar, V. R.: Induction of endoplasmic reticulum, derived replication, competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B. *PLoS One*, 9(1) e84040. 2014.

Keller, B. C., Fredericksen, B. L., Samuel, M. A., Mock, R. E., Mason, P. W., Diamond, M. S., Gale, M. Jr.: Resistance to alpha/beta interferon is a determinant of West Nile virus replication fitness and virulence. *J. Virol.*, 80(19). 9424–9434. 2006.

Kemenesi G., Dallos B., Oldal M., Kutas A., Földes F. Németh V., Reiter, P., Bakonyi T., Bányai K., Jakab F.: Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary. *Virusdisease*, 25(4). 500–503. 2014.

Kenyeres Z., Tóth S.: Csípőszúnyog határozó II (Imágók). Keszthely: Pannónia Központ Szakértői és Tanácsadói Koordinációs Kft. Pannónia Füzetek, 2. 96. 2008.

Kinney, R. M., Huang, C. Y., Whiteman, M. C., Bowen

R. A., Langevin, S. A., Miller, B. R., Brault, A. C.: Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J Gen Virol.* 87 3611–3622. 2006.

Klenk, K., Snow, J., Morgan, K., Bowen, R., Stephens M., Foster, F., Gordy, P., Beckett, S., Komar, N., Gubler, D., Bunning, M.: Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg. Inf. Dis.*, 10. 2150–2155. 2004.

Koevary, S. B.: Ocular involvement in patients infected by the West Nile virus. *Optometry*, 76. 609–612. 2005.

Koller, M., Gresikova, M., Berencsi, Gy., Schablik, M. Hemagglutination inhibition antibodies to arboviruses in the population of Hajdú–Bihar district, Hungary. *Folia Parasitol.*, 16. 75–79. 1969.

Kolodziejek, J., Marinov, M., Kiss, B. J., Alexe, V. Nowotny, N.: The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd

2007. PLoS One, 9(10). e109905. 2014.

Korbacska-Kutasi O., Bakonyi T., Lecollinet, S., Biks I., Ferenczi E., Sárdi S., Szenci O.: Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile Virus in Hungary. *J. of Vet. Int. Med.*, 25(3). 586–591. 2011.

Kramer, L. D., Li, J., Shi., P. Y.: West Nile virus. *The Lancet Neurology*, 6.(2). 171–181. 2007.

Krisztalovics, K., Ferenczi E., Molnár Z., Csohan, A. Bán E., Zöldi V., Kaszás, K.: West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008. *Euro Surveill.*, 13(45). 19030. 2008.

Kulasekera, V. L., Kramer, L., Nasci, R. S. Mostashari, F., Cherry, B., Trock, S. C., Glaser, C. Miller, J. R.: West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4). 722–725. 2001.

Kummerer, B. M., Rice, C. M.: Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.*, 76(10).

4773–4784. 2002.

Kurolt, I. C., Krajinović, V., Topić, A., Kuzman, I., Baršić, B., Markotić, A.: First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Res.*, 189. 63–66. 2014.

Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J. Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D., Roehrig, J. T. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 298(1). 96–105. 2002.

Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J. Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T., Gubler, D. J.: Origin of the West Nile



virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*, 286. 2333–2337. 1999.

Langevin, S. A. , Brault, A. C., Panella, N. A., Bowen R. A., Komar, N.: Variation in Virulence of West Nile Virus Strains for House Sparrows (*Passer domesticus*). *The Am. J. of Trop. Med. Hyg.*, 72(1). 99–102. 2005.

Langevin, S. A., Bowen, R. A., Reisen, W. K. Andrade, C. C., Ramey, W. N., Maharaj, P. D. Anishchenko, M., Kenney, J. L., Duggal, N. K., Romc H., Bera, A. K., Sanders, T. A., Bosco–Lauth, A. Smith, J. L., Kuhn, R., Brault, A. C.: Host competence and helicase activity differences exhibited by West Nile viral variants expressing NS3–249 amino acid polymorphisms. *PLoS One*, 9(6). e100802. 2014.

Laurent–Rolle, M., Boer, E. F., Lubick, K. J. Wolfenbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R. Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., Garcia-

Sastre, A., Khromykh, A. A., Best, S. M.: The NS<sub>5</sub> protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J. Virol.*, 84(7). 3503–3515. 2010.

Le Guenno, B., Bougermouh, A., Azzam, T., Bouakaz, R.: West Nile: a deadly virus? *Lancet*, 348(9037). 1315. 1996.

Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A.: Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J. Virol.*, 82(10). 4731–4741. 2008.

Lim, S. M., Brault, A. C., van Amerongen, G., Bosco-Lauth, A. M., Romo, H. E., Sewbalaksing, V. D. Bowen, R. A., Osterhaus, A. D., Koraka, P., Martina B. E.: Susceptibility of Carrion crows (*Corvus corone*) to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 21(8). 1357–1365. 2015.

Lim, S. M., Brault, A. C., van Amerongen, G. Sewbalaksing, V. D., Osterhaus, A. D., Martina, B. E. Koraka, P.: Susceptibility of European jackdaws

(*Corvus monedula*) to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile viruses. *J. Gen. Virol.*, 95(P 6). 1320–1329. 2014.

Lim, S. M., Koraka, P., Osterhaus, A. D., Martina, B. E.: Development of a strand-specific real-time qRT-PCR for the accurate detection and quantitation of West Nile virus RNA. *J. Virol. Methods*, 194(1–2). 46–53. 2013.

Lin, R. J., Chang, B. L., Yu, H. P., Liao, C. L., Lin, Y. L.: Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.*, 80(12). 5908–5918. 2006.

Lin, R. J., Liao, C. L., Lin, E., Lin, Y. L.: Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection. *J. Virol.*, 78(17). 9285–9294. 2004.

Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Thiel, H. J., Rice, C. M.: *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology*, 6th ed., Knipe, D. M., Howley, P. M.,

Griffin, D. E., Hartin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. Straus, S. E. (Eds). Lippincott–Williams & Wilkins: New York, NY, 2013.

Lindenbach, B. D., Rice, C. M.: Flaviviridae: the viruses and their replication. In Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds), Fields Virology. Lippincott–Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 991–1041. 2001.

Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A., Pauli, G.: Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. J. Virol. Methods, 146(1–2). 355–358 2007.

Liu, W. J., Chen, H. B., Khromykh, A. A.: Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. J. Virol., 77(14). 7804–7813 2003.

Liu, W. J., Chen, H. B., Wang, X. J., Huang, H. Khromykh, A. A.: Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the

flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.*, 78(22). 12225–12235. 2004.

Liu, W. J., Wang, X. J., Clark, D. C., Lobigs, M., Hall R. A., Khromykh, A. A.: 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.*, 80(5). 2396–2404. 2006.

Liu, W. J., Wang, X. J., Mokhonov, V. V., Shi, P. Y., Randall, R., Khromykh, A. A.: Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J. Virol.*, 79(3). 1934–1942. 2005.

Loginova, S., Borisevich, S. V., Pashchenko, I. A., Bondarev, V. P.: [Ribavirin prophylaxis and therapy of experimental West Nile fever] [in Russian]. *Antibiot. Khimioter.*, 54(11–12). 17–20. 2009.

Lupulovic, D., Martín-Acebes, M. A., Lazic, S.,

Alonso–Padilla, J., Blázquez, A. B., Escribano–Romero, E., Petrovic, T., Saiz, J. C.: First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vect. Born. Zoon. Dis.*, 11(9). 1303–1305. 2011.

Lvov, D. K., Butenko, A. M., Gromashevsky, V. L. Kovtunov, A. I., Prilipov, A. G., Kinney, R., Aristova, V. A., Dzharkenov, A. F., Samokhvalov, E. I., Savage, H. M., Shchelkanov, M. Y., Galkina, I. V., Deryabin, P. G., Gubler, D. J., Kulikova, L. N., Alkhovsky, S. K., Moskvina, T. M., Zlobina, L. V., Sadykova, G. K., Shatalov, A. G., Lvov, D. N., Usachev, V. E., Voronina, A. G.: West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging–reemerging situations. *Arch. Virol. Suppl.*, 18. 85–96. 2004.

Mackenzie, J. M., Jones, M. K., Young, P. R. Immunolocalization of the dengue virus non–structural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*, 220(1). 232–240. 1996.

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.*, 267. 1–10. 2002.

Mackenzie, J. S., Williams, D. T.: The zoonotic flaviviruses of southern, south, eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, 56(6–7). 338–356. 2009.

Maeda, A., Murata, R., Akiyama, M., Takashima, I., Kariwa, H., Watanabe, T., Kurane, I., Maeda, J.: A PCR-based protocol for the generation of a recombinant West Nile virus. *Virus Res.*, 144(1–2). 35–43. 2009.

Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., Maeda, A.: A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods*, 148(1–2). 244–252. 2008.

Manarolla, G., Bakonyi T, Gallazzi, D., Crosta, L., Weissenböck, H., Dorrestein, G. M., Nowotny, N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet. Microbiol.*, 141. 159–163. 2010.

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE Manual). Chapter 2. 1. 24. West Nile fever. 2013.

May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B., Barrett, A. D.: Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.*, 85(6). 2964–2974. 2011.

McGee, C. E., Shustov, A. V., Tsetsarkin, K., Frolov, I. V., Mason, P. W., Vanlandingham, D. L., Higgs, S.: Infection, dissemination, and transmission of a West Nile virus green fluorescent protein infectious clone by *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquitoes. *Vect. Born. Zoon. Dis.*, 10(3). 267–274. 2010.

McLean, R. G., Ubico, S. R., Bourne, D., Komar, N.: West Nile virus in livestock and wildlife. *Current Top. Microbiol. Immunol.*, 267. 271–308. 2002.

McMullen, A. R., Albayrak, H., May, F. J., Davis, C. T., Beasley, D. W., Barrett, A. D., Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *J. Gen. Virol.*, 94(2). 318–325. 2013.



Medlock, J. M., Snow, K. R., Leach, S.: Possible ecology and epidemiology of medically important mosquito-borne arboviruses in Great Britain. *Epidemiol. Infect.*, 135. 466–482. 2007.

Miller, B. R., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Savage, H. M., Lutwama, J. J., Lanciotti, R. S., Peters, C. J.: First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(2). 240–246. 2000.

Miller, D. L., Mael, M. J., Baldwin, C., Burtle, G., Ingram, D., Hines, M. E., Frazier, K. S.: West Nile virus in farmed alligators. *Emerg. Inf. Dis.*, 9. 794–799. 2003.

Mohrig W.: Die Culiciden Deutschlands. Untersuchung zur Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken. *Parasitologische Schriftenreihe*, 18. 1–260. 1969.

Molnár E.: Occurrence of tick-borne encephalitis and

other arboviruses in Hungary. *Geogr. Med.*, 12. 78–120. 1982.

Monini, M., Falcone, E., Busani, L., Romi, R., Rugger F. M.: West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millenium World. *The Oper Virology Journal*, 4(2). 42–51. 2010.

Montigny, C., Penin, F., Lethias, C., Falson, P.: Overcoming the toxicity of membrane peptide expression in bacteria by upstream insertion of Asp–Pro sequence. *Biochim Biophys Acta*, 1660(1–2). 53–65. 2004.

Moudy, R. M., Zhang, B., Shi, P. Y., Kramera, L. D.: West Nile virus envelope protein glycosylation in required for efficient viral transmission by *Culex* vectors. *Virology*, 387(1). 222–228. 2009.

Munoz-Jordán, J. L., Sánchez–Burgos, G. G, Laurent–Rolle, M , García–Sastre, A.: Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(24). 14333–14338. 2003.

Munoz-Jordán, J. L., Laurent–Rolle, M., Ashour, J.

Martinez–Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., Garcia-Sastre, A.: Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.*, 79(13) 8004–8013. 2005.

Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Akita, S., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., Takashima, I.: Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(4). 696–704. 2010.

Muylaert, I. R., Galler, R., Rice, C. M.: Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.*, 71(1). 291–298. 1997.

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. ápr. 2.

Nasci, R. N., White, D. J., Stirling, H., Oliver, J. A

Daniels, T. J., Falco, R. C., Campbell, S., Crans, W. J., Savage, H. M., Lanciotti, R. S., Moore, C. G., Godsey, M. S., Gottfried, K. L., Mitchell C. J.: West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 7. 626–630 2001.

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

Nielsen, C. F., Reisen, W. K., Armijos, M. V., Machlachlan, N. J., Sott, T. W.: High subclinical West Nile virus incidence among nonvaccinated horses in northern California associated with low vector abundance and infection. *The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.*, 78(1). 45–52. 2008.

Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S., Sall, A. A.: Usutu Virus in Africa. *Vector Born. Zoon. Dis.*, 11. 1417–1423. 2011.

Nolan, M. S., Podoll, A. S., Hause, A. M., Akers, K. M Finkel, K. W., Murray, K. O.: Prevalence of chronic kidney disease and progression of disease over time among patients enrolled in the Houston West Nile virus

cohort. PLoS One, 7(7). e40374. 2012.

Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., Rudolf, I., Hubálek, Z. Nowotny, N.: Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 20(12). 2119–2122. 2014.

Padmanabhan, R., Mueller, N., Reichert, E., Yon, C. Teramoto, T., Kono, Y., Takhampunya, R., Ubol, S., Pattabiraman, N., Falgout, B., Ganesh, V. K., Murthy K.: Multiple enzyme activities of flavivirus proteins. *Novartis Found Symp.*, 277. 74–84. 2006.

Papa, A., Bakonyi T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A. Tenorio, A., Nowotny, N.: Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(5). 920–922. 2011.

Parquet, M. C., Kumatori, A., Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A.: West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett.*, 500(1–2). 17–24. 2001.

Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottola, A. Sabbatini, A., Tagliazucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M.: [First human case of Usutu virus](#)

neuroinvasive infection, Italy, August–September 2009. *Eurosurveillance*, 14(50). 2009.

Pellegrini–Masini, A., Livesey, L. C.: Meningitis and encephalomyelitis in horses. *Equine Practice*, 22. 553–589. 2006.

Petersen, L. R., Roehrig, J. T.: West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4). 611–614. 2001.

Petrović, T., Blazquez, A., Lupulović, D., Lazić, G., Escribano–Romero, E., Fabijan, .D, Kapetanov, M., Lazić, S., Saiz, J. C.: Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012 first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill.*, 18(44). 20622. 2013a.

Petrović, T., Petrić, D., Hrnjaković–Cvjetković, I., Lupulović, D., et al. Update on the epidemiology of West Nile virus in Serbia. *EuroWestNile newsletter*, 4. 2–3. 2013b.

<http://www.eurowestnile.org/wp,content/uploads/2012/08>

Pincus, S., Mason, P. W., Konishi, E., Fonseca, B. A. Shope, R. E., Rice, C. M., Paoletti, E.: Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology*, 187(1). 290–297. 1992.

Platonov, A. E., Fedorova, M. V., Karan, L. S. Shopenskaya, T. A., Platonova, O. V., Zhuravlev, V. I.: Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol. Res.*, 103 45–53. 2008.

Platonov, A. E., Karan', L. S., Shopenskaia, T. A. Fedorova, M. V., Koliashnikova, N. M., Rusakova, N. M. Shishkina, L. V., Arshba, T. E., Zhuravlev, V. I., Govorukhina, M. V., Valentseva, A. A., Shipulin, G. A.: Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2. 29–37. 2011.

Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Bennett, C. J., Zhou

Y., Munoz-Jordán, J. L., Garcia-Sastre, A., Bernard K. A., Shi, P. Y.: A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology*, 361(1). 229–241. 2007.

Rappole, J. H., Derrickson, S. R., Hubalek, Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.*, 6(4), 319–328. 2000.

Rappole, J. H., Compton, B. W., Leimgruber, P., Robertson, J., King, D. I., Renner, S. C.: Modeling movement of West Nile virus in the Western hemisphere. *Vect. Born. Zoon. Dis.*, 6(2). 128–139. 2006.

Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., Deas T. S., Zhou, Y., Li, H., Shi, P. Y.: West Nile Virus 5'–Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N–7 and Ribose 2'–O Methylations by Nonstructural Protein 5. *J. Virol.*, 80(17). 8362–8370. 2006.

Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C.: Equine



Internal Medicine. 3th ed. Saunders, Philadelphia 2010.

Reisen, W. K., Barker, C. M., Carney, R., Lothrop, H. D., Wheeler, S. S., Wilson, J. L., et al.: Role of corvids in epidemiology of West Nile virus in southern California. *J. Med. Entomol.*, 43. 356–367. 2006.

Reisen, W. K., Fang, Y., Martinez, V. M.: Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J. Med. Entomol.*, 42(3). 367–375. 2005.

Reisen, W. K., Fang, Y., Martinez, V.: Is nonviremic transmission of West Nile virus by *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) nonviremic? *J. Med. Entomol.*, 44. 299–302. 2007.

Reiter, P.: West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.*, 15(10). 19508. 2010.

Richards, S. L., Anderson, S. L., Lord, C. C.: Vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus*

- (Diptera: Culicidae) for West Nile virus isolates from Florida. *Trop. Med. Int. Health*, 19(5). 610–617. 2014.
- Rizzoli, A., Bolzoni, L., Chadwick, E. A., Capelli, G., Montarsi, F., Grisenti, M., de la Puente, S. M., Muñoz J., Figuerola, J., Soriguer, R., Anfora, G., Di Luca, M., Rosà, R.: Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit. Vectors*, 8. 213. 2015.
- Rossi, S. L., Fayzulin, R., Dewsbury, N., Bourne, N., Mason, P. W.: Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. *Virology*, 364(1). 184–195. 2007.
- Rossi, S. L., Ross, T. M., Evans, J. D.: West Nile virus. *Clin. Lab. Med.*, 30(1). 47–65. 2010.
- Rossi, S. L., Zhao, Q., O'Donnell, V. K., Mason, P. W. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. *Virology*, 331(2). 457–470. 2005.

Rudolf, I., Bakonyi T., Šebesta, O., Mendel, J., Peško J., Betášová, L., Blažejová, H., Venclíková, K. Straková, P., Nowotny, N., Hubálek, Z.: [West Nile virus lineage 2 isolated from Culex modestus mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North?](#) Euro Surveill., 19(31). 2–5. 2014.

Sambri, V., Capobianchi, M., Charrel, R., Fyodorova, M., Gaibani, P., Gould, E., Niedrig, M., Papa, A., Pierro, A., Rossini, G., Varani, S., Vocale, C., Landini, M. P.: West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Infect., 19(8). 699–704. 2013.

Sambrook, J., Russell, D. W., Fritsch, E. F., Maniatis T.: Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001.

Samuel, M. A., Diamond, M. S.: Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal

survival. *J. Virol.* 79(21). 13350–13361. 2005.

Samuel, M. A., Diamond, M. S.: Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J. Virol.*, 80. 9349–9360. 2006.

Sárdi S., **Szentpáli-Gavallér K.**, Bakonyi T., Szenci O., Kutasi O.: Lovak nyugat-nílusi vírus okozta agy, és gerincvelő gyulladása. Irodalmi áttekintés. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 134(12). 707–717. 2012.

Savage, H. M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos N., [Lanciotti, R.](#), [Vladimirescu, A.](#), [Laiv, L.](#), [Ungureanu, A.](#), [Romanca, C.](#), [Tsai, T. F.](#): Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61. 600–611. 1999.

Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Piscicella, M., Terregino, C., Marangon S., Capua, I., Lelli, R.: Evidence of West Nile virus

lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.*, 158(3–4). 267–273. 2012.

Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J. P., Rhaïem, A., Brunheset, J.: *The mosquitoes of Europe Identification and training program (CD–Rom)*. IRÉ Editions, Montpellier, France. 2001.

Scherret J. H., Poidinger M., Mackenzie J. S., Broor A. K., Deubel V., Lipkin W. I., Briese T., Gould E. A. Hall R. A.: The relationships between West Nile and Kunjin viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 7. 697–705. 2001.

Scherret, J. H., Mackenzie, J. S., Hall, R. A., Deube V., Gould, E. A.: Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 267. 373–390. 2002.

Schlesinger, J. J.: Flavivirus nonstructural protein NS1 complementary surprises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(50). 18879–18880. 2006.

Scholle, F., Girard, Y. A., Zhao, Q., Higgs, S., Mason P. W.: trans–Packaged West Nile virus–like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito

vectors. *J. Virol.*, 78(21). 11605–11614. 2004.

Semenov, B. F., Chunikhin, S.P., Karmysheva, V. Y., Yakovleva, N. I.: [Studies of chronic arbovirus infections in birds. 1. Experiments with West Nile, Sindbis, Bhanja and SFS viruses] [in Russian]. *Vestnik Akademii Medicinskikh NaukSSSR (Moszkva)*, 2. 79–83. 1973.

Service, M. W.: Feeding behaviour and host preferences of British mosquitoes. *Bull. Entomol. Res.* 60(4). 653–661. 1971.

Shi, P. Y., Tilgner, M., Lo, M. K., Kent, K. A., Bernard, K. A.: Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from New York City. *J. Virol.*, 76(12). 5847–5856. 2002.

Shieh, W.J., Guarner, J., Layton, M., Fine, A., Miller J., Nash, D., Campbell, G. L., Roehrig, J. T., Gubler D. J., Zaki, S. R.: The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 6. 370–372. 2000.

Shimoni, Z., Niven, M. J., Pitlick, S., Bulvik, S.: Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4). 759. 2001.

Shrestha, B., Gottlieb, D., Diamond, M. S.: Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.*, 77(24). 13203–13213. 2003.

Sirbu, A., Ceianu, C. S., Panculescu–Gatej, R. I., Vazquez, A., Tenorio, A., Rebreanu, R., Niedrig, M., Nicolescu, G., Pistol, A.: Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.*, 16(2). 19762. 2011.

Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., Paul, J. H.: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20. 471–492. 1940.

Sotelo, E., Fernandez–Pinero, J., Llorente, F., Vazquez, A., Moreno, A., Agüero, M., Cordioli, P., Tenorio, A., Jimenez–Clavero, M. A.: Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus

strains (1996–2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions? *J. Gen. Virol.*, 92(11). 2512–2522. 2011.

Spearman, C.: The method of 'right and wrong cases ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Brit. J. Psychol.*, 2. 227–242. 1908.

Spielman, A., Wong, J.: Studies on autogeny in natural populations of *Culex pipiens*. III. Midsummer preparation for hibernation in anautogenous populations. *J. Med. Entomol.*, 10(4). 319–324. 1973.

Steinhauer, D. A., Holland, J. J.: Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41. 409–433. 1987.

Steinmetz, H. W., Bakonyi T, Weissenböck, H., Hatt, J. M., Eulenberger, U., Robert, N., Hoop, R., Nowotny, N.: Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, comparison to other central European outbreaks. *Vet. Microbiol.*, 148. 207–212. 2011.

Suthar, M. S., Brassil, M. M., Blahnik, G., Gale, M. Jr



Infectious clones of novel lineage 1 and lineage 2 West Nile virus strains WNV-TX02 and WNV-Madagascar. *J. Virol.*, 86(14). 7704–7709. 2012.

Suthar, M. S., Diamond, M. S., Gale Jr, M.: West Nile virus infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 11. 115–128. 2013.

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. *Vect. Born. and Zoon. Dis.*, 14(9). 648–655. 2014.

Szentpáli-Gavallér K., Lim, S. M., Dencso L., Bányai 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*, 8(2). 49. 2016.

Tesh, R. B., Siirin, M., Guzman, H., Travassos da Rosa, A. P., Wu, X., Duan, T., Lei, H., Nunes, M. R., Xiao, S. Y.: Persistent West Nile virus infection in the

golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infections. *J. Infect. Dis.*, 192(2). 287–295. 2005.

Topciu, V., Rosiu, N., Arcan, P.: Contributions to the study of arboviruses in Banat. *Rev. Roum. Inframicrobiol.*, 8(2). 101–106. 1971.

Tóth M., Szabó L. J.: Overwintering adult mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages in the region of Debrecen and Kisvárda, NE Hungary. {in Hungarian} *Acta Biol. Debrecina Suppl. Oecol. Hung.*, 26. 203–210. 2011.

Tóth S.: The fauna of mosquitoes in Hungary (Diptera Culicidae). {in Hungarian}. *Nat. Somogyiensis*, 6. 327–337. 2004.

Tsai, T. F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L., Nedelcu, N. I.: West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, 352(9130). 767–771. 1998.

Ulper, L., Sarand, I., Rausalu, K., Merits, A.: Construction, properties, and potential application of

infectious plasmids containing Semliki Forest virus full-length cDNA with an inserted intron. *J. Virol. Methods* 148(1–2). 265–270. 2008.

Valiakos, G., Touloudi, A., Athanasiou, L. V., Giannakopoulos, A., Lacovakis, C., Birtsas, P., Spyrou, V., Dalabiras, Z., Petrovska, L., Billinis, C.: Serological and molecular investigation into the role of wild birds in the epidemiology of West Nile virus in Greece. *Virology Journal*, 9. 266. 2012.

Varga J., Fodor L.: Nyugat-nílushi láz. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 125. 451–457. 2003.

Vázquez, A., Sánchez–Seco, M. P., Ruiz, S., Molero F., Hernández, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G., Tenorio, A.: Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 16(3). 549–552 2010.

Vazquez, S., Guzmán, M. G, Guillen, G., China, G., Pérez, A. B., Pupo, M., Rodriguez, R., Reyes, O., Garay, H. E., Delgado, I., García, G., Alvarez, M.: Immune response to synthetic peptides of dengue prM

protein. *Vaccine*, 20(13–14). 1823–1830. 2002.

Venter, M., Swanepoel, R.: West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Born. Zoon. Dis.*, 10(7). 659–664. 2010.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Andino, R.: Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanism, resistance and biological implications. *Virus Res.*, 107(2). 173–181. 2005.

Voinov, I. N., Rytic, P. G., Grigoriev, A. I.: [Arbovirus infections in Belarus] [in Russian]. *Virusy i virusnyjeinfektsii*, S. G. Drozdov, Editor. *Inst. Poliomieli Virus Enc. Moskva*, 86–87. 1981.

Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M. I., Hood, L.: Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *Biotechniques*, 23(6). 992–994. 1997.

Ward, M. P., Schuermann, J. A., Highfiel L. D., Murray, K. O.: Characteristics of an outbreak of West

Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet. Microbiol.*, 118(3–4). 255–259. 2006.

Weese, J. S., Baird, J. D., DeLay, J., Kenney, D. G. Staempfli, H. R., Viel, L., Parent, J., Smith–Maxie, L. Poma, R.: West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(6). 469–473. 2003.

Weissenböck, H., Bakonyi T., Rossi, G., Mani, P., Nowotny, N.: Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.*, 2. 274–277. 2013.

Weissenböck, H., Hubálek, Z., Bakonyi T., Nowotny, N.: Zoonotic mosquito–borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet. Microbiol.*, 140(3–4). 271–280. 2010.

Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Fragner, K., Kuhn R., Pfeffer, M., Nowotny, N.: Usutu virus activity in Austria, 2001–2002. *Microbes. Infect.*, 5. 1132–1136. 2003.

Weissenböck, H., Kolodziejek, J., [Url, A.](#), [Lussy, H.](#), [Rebel-Bauder, B.](#), [Nowotny, N.](#): Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe *Emerg. Infect. Dis.*, 8. 652–656. 2002.

Welte, T., Xie, G., Wicker, J. A., Whiteman, M. C., Li L., Rachamalla, A., Barrett, A., Wang, T.: Immune responses to an attenuated West Nile virus NS4B-P38G mutant strain. *Vaccine*, 29(29–30). 4853–4861. 2011.

Wengler, G., Wengler, G.: The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* 184(2). 707–715. 1991.

Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Kenney, M. T., Jones, M. K., Khromykh, A. A.: Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J. Virol.*, 71(9). 6650–

6661. 1997.

Whiteman, M. C., Li, L., Wicker, J. A., Kinney, R. M., Huang, C., Beasley, D. W., Chung, K. M., Diamond, M. S., Solomon, T., Barrett, A. D.: Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine*, 28(4). 1075–1083. 2010.

Wicker, J. A., Whiteman, M. C., Beasley, D. W. Davis, C. T., McGee, C. E., Lee, J. C., Higgs, S Kinney, R. M., Huang, C. Y., Barrett, A. D.: Mutation analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology*, 426(1). 22–33. 2012.

Wicker, J. A., Whiteman, M. C., Beasley, D. W. Davis, C. T., Zhang, S., Schneider, B. S., Higgs, S. Kinney, R. M., Barrett, A. D.: A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology*, 349(2). 245–253. 2006.

Wilson, J. H., Davis, A., Bender, J., Minicucci, L. Residual effects of West Nile viral encephalomyelitis in

horses. 49th Annual Convention of the American Association Equine Practitioner, New Orleans, LA USA, 667. 2003.

Winkler, G., Maxwell, S. E., Rueemler, C., Stollar, V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*, 171(1). 302-305. 1989.

Winkler, G., Randolph, V. B., Cleaves, G. R., Ryan, T E., Stollar, V.: Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, 162(1). 187-196. 1988.

Wong, S. J., Boyle, R. H., Demarest V. L. Woodmansee, A. N., Kramer, L. D., Li, H., Drebot, M. Koski, R. A., Fikrig, E., Martin, D. A., Shi, P. Y.: Immunoassay targeting non-structural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *J. Clin. Microbiol.*, 41(9). 4217-4223. 2003.



Work, T. H., Hurlbut, H. S., Taylor, R.M.: Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 4. 872–878. 1955.

Xiao, S. Y., Guzman, H., Zhang, H., Travassos da Rosa, A. P., Tesh, R. B.: West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg. Inf. Dis.*, 7(4). 714–721. 2001.

Yamshchikov, V. F., Wengler, G., Pereygin, A. A., Brinton, M. A., Compans, R. W.: An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology*, 281(2). 294–304. 2001.

Youn, S., Ambrose, R. L., Mackenzie, J. M., Diamond M. S.: Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. *Viol. J.*, 10. 339. 2013.

Zamburlini, R.: A new culicid in Italy: *Aedes* (*Ochlerotatus*) *annulipes* (Diptera, Culicidae). *Parassitologia*, 38(3). 491–494. 1996.

Zehender, G., Ebranati, E., Bernini, F., Lo Presti, A., Rezza, G., Delogu, M., Galli, M., Ciccozzi, M.: Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infect. Genet. Evol.*, 11(3). 646–653. 2011.

Zeller, H. G., Schuffenecker, I.: 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(3). 147–156. 2004.

Ziegler, U., et al.: Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Vet. Microbiol.*, 161(3–4). 263–273. 2013.

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.*, 22(1). 82–87. 1985.

Zou, G., Puig-Basagoiti, F., Zhang, B., Qing, M., Chen, L., Pankiewicz, K. W., Felczak, K., Yuan, Z., Shi, P. Y.: A single-amino acid substitution in West Nile virus

2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology*, 384(1). 242–252. 2009.

## **A doktori kutatás eredményeinek közlései**

Referált szakfolyóiratban megjelent közlemények:

1. **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 and Zoon. Dis.*, 14(9). 648–655.

2014.

2. **Szentpáli-Gavallér K**, Lim, S. M., Dencso 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*, 8(2). 49. 2016.
3. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bálint Ádám, Somhegyiné Barna Mónika, Bakony Tamás: A nyugat-nílusi vírus hazai előfordulása szúnyog-vektorokban és gerinces gazdáikban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138. 431–439.

2016.

4. Sárdi Sára, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Bakonyi Tamás, Szenci Ottó, Kutasi Orsolya: Lovak nyugat-nílusvírus okozta agy, és gerincvelőgyulladására. Irodalmi áttekintés. West Nile virus encephalomyelitis in horses. Literature review. Magyar Állatorvosok Lapja, 134. 707–717. 2012.
5. Soltész Zoltán, Erdélyi Károly, Bakonyi Tamás, Barna Mónika, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Solt Szabolcs, Horváth Éva, Palatitz Péter, Kotymán László, Dán Ádám, Papp László, Harnos Andrea, Fehérvári Péter: West Nile virus host-vector-

pathogen interactions in a colonial raptor. *Parasites & Vectors*, 10(1). 449. 2017.

Konferencia előadások, poszterek:

1. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bakonyi Tamás: A nyugat-nílusi vírus diagnosztikájában használt molekuláris biológiai módszerek összehasonlítása. MTA Akadémiai beszámoló. Budapest, 2011. jan. 25.
2. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Bálint Ádám, Dencső László, Dán Ádám Erdélyi Károly, Bakonyi Tamás: Nyugat-nílusi vírus teljes hosszúságú fertőző klónjának előállítása, patogenitás markerek vizsgálatának

céljából. MTA Akadémiai beszámolók.  
Budapest, 2012. jan. 17.

3. Bakonyi Tamás, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Papp László, Soltész Zoltán, Kemenesi Gábor, Bernhard Seidel, Zdenek Hubálek, Norbert Nowotny: Detection of West Nile virus in culicid mosquitoes in Central Europe. 6th European Mosquito Control Association Workshop (EMCA 2011). Budapest, 2011. szept. 12–15.
4. **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Antal László, Tóth Mihály, Kemenesi Gábor, Soltész Zoltán, Dán Ádám, Erdélyi Károly, Bányai Krisztián, Bálint Ádám, Jakab Ferenc, Bakonyi Tamás: Monitoring of West Nile virus

in mosquitoes between 2011–2012,  
Hungary. A Magyar Mikrobiológiai  
Társaság 2013. évi nagygyűlése.  
Keszthely, 2013. okt. 16–18.  
(poszter)



# Nem a dolgozat témájában megjelent közlemények jegyzéke

Referált szakfolyóiratban megjelent  
közlemények:

1. Bálint Á., Kiss I., Bányai K., Biksi I., **Szentpáli-Gavallér K.**, Magyar T., Jankovics I., Rózsa M., Szalai B., Takács M., Tóth Á. Gy., Dán Á.:  
Emergence and characterisation of pandemic H1N1 influenza viruses in Hungarian swine herds. Acta Veterinaria Hungarica, 61. 125–134. 2013.
2. Dandár E., Bálint Á., Kecskeméti S., **Szentpáli-Gavallér K.**, Kisfali P.,

Melegh B., Farkas S. L., Bányai K. Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from broiler chicken with central nervous system disease. *Arch. of Virology*, 158. 2583–2588. 2013.

3. Bányai K., Tóth Á. Gy., Ivanics É. Glávits R., **Szentpáli-Gavallér K.**, Dán Á.: Putative novel genotype of avian hepatitis E virus, Hungary, 2010. *Emerg. Inf. Dis.*, 18(8). 1365–1368. 2012.
4. Bányai K., Kovács E., Tóth Á. Gy. Biksi I., **Szentpáli-Gavallér K.**, Bálint Á., Dencső L., Dán Á.: Genome sequence of a monoreassortant H1N1 swine influenza virus isolated from a

pig in Hungary. J. Virol., 86(23).  
13133. 2012.

## Előadások:

1. Ivanics Éva, Makrai László, Bálin Ádám, Punczman Tamás, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Thuma Ákos, Glávits Róbert: Egy haza csirkeállományban jelentkező tömegesen előforduló conjunctivitis kóroktanának vizsgálata. MTA Akadémiai beszámolók. Budapest, 2011. jan. 25.
2. Ivanics Éva, Makrai László, Bálin Ádám, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Punczman Tamás, Thuma Ákos, Glávits Róbert: Tömeges és tartós conjunctivitis baromfiállományban. 19.

Derzsy Napok tudományos konferencia. Sárvár, 2011. június 2–3.

3. Fehérvári Péter, Soltész Zoltán, Bakonyi Tamás, Barna Mónika, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Solt Szabolcs, Palatitz Péter, Lázár Béla, Kotymán László, Harnos Andrea, Erdélyi Károly: Nyugat-nílusi láz kék vércsében: Fiókkori szeroprevalencia és a vektorban mért vírus prevalencia becslések egy potenciális hazai kórokozó, rezervoár rendszerben. Akadémiai Beszámoló. Budapest, 2012. jan. 17.
4. Soltész Zoltán, Fehérvári Péter, Bakonyi Tamás, Barna Mónika, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Solt

Szabolcs, Palatitz Péter, Lázár Béla, Kotymán László, Dán Ádám, Papp László, Harnos Andrea, Erdélyi Károly: Investigation of mosquitoes and West Nile virus in Red footed Falcon (*Falco vespertinus*) nest boxes. 18th ESOVE conference of the European Society of Vector Ecology. Montpellier, 2012. okt. 08–11.

5. Thuma Ákos, Kléh Zsófia, Tóth Ádám, **Szentpáli-Gavallér Katalin**, Gyuris Éva: Polyomavírus okozta megbetegedés libában, a betegség előfordulása hazai kacsállóományban. Derzsy napok. Sümeg, 2013. jún. 6–7.



# Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bakonyi Tamásnak**, a kutatások alatt nyújtott segítőkézségéért, a pályázatok sikeres lebonyolításáért, és hogy lehetővé tette számomra a rotterdami EMC-ber elvégezni az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat.

Köszönöm társtémavezetőmnek, **Dr. Dán Ádámnak** a szúnyog és vadmadár felmérő vizsgálatok során nyújtott segítségét és mindazt, amit a molekuláris biológia területén Tőle tanulhattam.

Hálával tartozom **Dr. Bálint Ádámnak**, aki idejét és energiáját nem sajnálva bevezetett a reverz genetika rejtelseibe, a sokszor nehézségekbe ütköző klónozási

folyamat során mutatott szakmai iránymutatásáért, az Ő segítségével nélkül nem jöhettek volna létre a WNV mutáns vírusok.

Köszönet illeti a rotterdami **Erasmus Medical Center** munkatársait, kiemelve **Dr. Byron E. E. Martiná** és **Penelope Korakát** a szakmai-, illetve **Stephanie Limet** az *in vitro* és *in vivo* kísérletekben nyújtott segítségével és a Rotterdamban együtt töltött időért.

Köszönöm **Dr. Abonyi Tamásnak**, a NÉBIH ÁDI igazgatójának hogy lehetősége biztosított a kutatás elvégzésére és külföldi tartózkodásaimra.

Hálával tartozom **Dencső Lászlónak** a klónozási lépések szakszerű kivitelezéséért és hogy mindig rendelkezésre állt, amikor



szükségem volt a segítségére.

Köszönettel tartozom **Dr. Bányai Krisztiánnak** a mindig gyors és magas színvonalú segítő munkájáért.

Köszönöm **Dr. Erdélyi Károlynak** a vadmadár minták rendelkezésemre bocsátását.

Köszönetet érdemel **Ottinger Ernőné** és **Juhász Ágnes** a szúnyog és vadmadár minták előkészítéséért és idejükért, amit erre feláldoztak.

Külön köszönettel tartozom a **NÉBIH ÁDI Sertés és Baromfi Virologia Laboratórium dolgozóinak**, különösképpen **Ratkainé Michna Juditnak** és **Bozsa Ágnesnek** támogatásukért és türelmükért a kísérletek és a dolgozatírás ideje alatt.

Köszönöm az entomológus szakembereknek, **Soltész Zoltánnak**, **Kemenesi Gábornak**, **Tóth Mihálynak**, **Jakab Ferencnek** és **Antal Lászlónak** a szúnyogminták csapdázását és azonosítását.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat fejezem ki a **családomnak** a támogatásért, türelméért és gondoskodásért, amit folyamatosan biztosítottak számomra.

A kutatásokat az „**EDENext**” (FP7,HEALTH,2010/261504, <http://www.edenext.eu>) és a „**VECTORIE**” (FP7,HEALTH,2010/261466, <http://vectorie.eu>), Európai Uniósi kutatási programok támogatásával végeztük.

