

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Magyarországon endémiás zoonotikus flavivírusok
mikrobiológiai diagnosztikai célú vizsgálata**

PhD értekezés

Nagy Anna

2021

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Takács Mária
Nemzeti Népegészségügyi Központ
Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály
témavezető

Némethné Dr. Szomor Katalin
Nemzeti Népegészségügyi Központ
Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály
témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....

Nagy Anna

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
Összefoglalás	7
Bevezetés	10
Irodalmi áttekintés	11
1. Flavivírusok – általános jellemzők	11
2. Nyugat-nílusi vírus	13
2.1. A nyugat-nílusi vírus járványtana	13
2.2. A nyugat-nílusi vírus terjedése	15
2.3. A humán nyugat-nílusi vírushatások klinikuma	18
2.4. Nyugat-nílusi vírushatások laboratóriumi diagnosztikája	20
2.5. Megelőzés és terápia	22
3. Usutu vírus	23
4. Kullancsencephalitis-vírus	25
4.1. A kullancsencephalitis-vírus járványtana	25
4.1. A kullancsencephalitis-vírus terjedése	27
4.2. A humán kullancsencephalitis-vírushatások klinikuma	29
4.3. Kullancsencephalitis-vírushatások laboratóriumi diagnosztikája	30
4.4. Megelőzés és terápia	32
5. Ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás (ADE)	34
6. A kutatás célkitűzései	35
7. Anyagok és módszerek	37
7.1. Molekuláris biológiai módszerek: PCR diagnosztika és szekvenálás	37
7.2. Szerológiai vizsgálati módszerek	43
7.2.1. Indirekt immunfluoreszcencia (IIF)	43
7.2.2. Enzyme linked immunosorbent assay: ELISA	47
7.2.3. Konfirmáló szerológia: WNV mikroneutralizációs próba	47
7.3. Vírusizolálás	48
8. Eredmények	49
8.1. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása: vírushatás kimutatás különböző mintatípusokból	49
8.1.1. A nyugat-nílusi vírus első, humán klinikai mintákból történő kimutatása Magyarországon	49
8.1.2. Nyugat-nílusi vírus: az egyes mintatípusok alkalmazhatósága a PCR diagnosztikában	56

8.2. A kullancsencephalitis-vírus első, humán klinikai mintából történő kimutatása Magyarországon	61
8.3. Nyugat-nílusi vírus nyomon követéses vizsgálatok	64
8.4. A 2018. évi nyugat-nílusi vírus járvány epidemiológiai és mikrobiológiai jellemzői	69
8.4.1. A 2018-as szezon járványügyi összefoglalása	69
8.4.2. A 2018-as szezon új mikrobiológiai diagnosztikai tapasztalatai	73
8.4.3. Az első konfirmált humán Usutu vírusfertőzés Magyarországon	79
8.5. A nyugat-nílusi vírus PCR pozitív minták szekvenciameghatározása	83
8.6. Nyugat-nílusi vírus szeroprevalencia meghatározása egészséges véradók körében.....	86
9. Megbeszélés	91
10. Új tudományos eredmények	103
Irodalomjegyzék	104
A doktori kutatás eredményeihez kapcsolódó publikációk	117
A doktori kutatás eredményeihez nem kapcsolódó publikációk	118
Mellékletek.....	120
Köszönetnyilvánítás	124

Rövidítések jegyzéke

ADE	Antibody-dependent enhancement of infectivity	<i>Ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás</i>
AFP	Acut flaccid paralysis	<i>Akut petyhüdt bénulás</i>
ÁOTI	Magyar Tudományos Akadémia (MTA) Agrártudományi Kutatóközpont – Állatorvos-tudományi Intézet	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	<i>Nukleotid szekvencia hasonlóság keresőprogram</i>
BSL-3	Biosafety Level 3	<i>3-as biológiai biztonsági szint</i>
C	Capsid	<i>Kapszid</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	<i>Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ</i>
CRP	C-reaktív protein	
Ct	Cycle threshold	<i>Küszöb ciklus</i>
DNS	Dezoxiribonukleinsav	
E	Envelope	<i>Burokfehérje</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	<i>Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	<i>Enzimhez kötött immunadszorpciós vizsgálat</i>
EMA	European Medicines Agency	<i>Európai Gyógyszerügynökség</i>
EVD-LabNet	Emerging Viral Diseases-Expert Laboratory Network	
FBS	Foetal bovin serum	<i>Foetalis borjúsavó</i>
HAG	Haemagglutináció-gátlás	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	<i>Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia</i>
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	<i>Nemzetközi vírustaxonomiai Bizottság</i>
IDT	Integrated DNA Technologies Inc.	
IgG/M/A	Immunoglobulin G/M/A	
IIF	Indirekt immunfluoreszcencia	
KSH	Központi Statisztikai Hivatal	
M	Membrane	<i>Membrán</i>
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis	<i>Molekuláris evolúciós genetikai elemzőprogram</i>
MTA	Magyar Tudományos Akadémia	
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation	<i>Többszörös nukleotid szekvencia illesztésére alkalmas program</i>
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test	<i>Nukleinsav amplifikációs teszt</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
NGS	Next generation sequencing	<i>Új-generációs szekvenálás</i>
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ	
NRL	Nemzeti Referencialaboratórium	
NS	Non-structural protein	<i>Nem strukturális fehérje</i>
OAS1	2'-5'-oligoadenilát szintetáz	
OEK	Országos Epidemiológiai Központ	
ORF	Open reading frame	<i>Nyitott leolvasási keret</i>
PBS	Phosphate buffered saline	<i>Foszfáttal puffertelt fiziológiás sóoldat</i>
PCR	Polymerase chain reaction	<i>Polimeráz láncreakció</i>
PFU	Plaque-forming Unit	<i>Plakk-formáló egység</i>

prM	Pre-Membrane	<i>Pre-Membrán</i>
TBE	Tick-borne encephalitis	<i>Kullancsencephalitis</i>
TBEV	Tick-borne encephalitis virus	<i>Kullancsencephalitis-vírus</i>
TCID₅₀	50% tissue culture infective dose	
TNFα	Tumornekrózis-faktor α	
USUV	Usutu virus	<i>Usutu vírus</i>
UTR	Untranslated region	<i>Nem-transzlálódó régió</i>
WHO	World Health Organization	<i>Egészségügyi Világszervezet</i>
WNF	West Nile fever	<i>nyugat-nílusi láz</i>
WNND	West Nile neuroinvasive disease	<i>nyugat-nílusi vírus neuroinvazív tünetegyüttes</i>
WNV	West Nile virus	<i>nyugat-nílusi vírus</i>

Összefoglalás

A *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségéhez jelen ismereteink szerint 53 vírusfaj sorolható, melyek közül számosnak köz- és állategészségügyi jelentősége van. Magyarországon endémiás és rendszeresen humán megbetegedéseket okoz a kullancsencephalitis (TBEV: *tick-borne encephalitis virus*) – és a nyugat-nílusi vírus (WNV: *West Nile virus*). A megbetegedések éves eloszlása – a vírus terjesztésében résztvevő kullancsok és szúnyogok aktivitási mintázatának megfelelően – szezonalitást mutat. A humán fertőzések laboratóriumi diagnosztikájában alapvető a szerológiai módszerek alkalmazása, hiszen a korábbi tapasztalatok szerint a klinikai tünetek megjelenésekor vér- és gerincvelői folyadék (liquor) mintából a vírus nukleinsava már nem, vagy csak kis valószínűséggel detektálható. Azonban az ellenanyagkimutatás flavivírusok esetén számos problémába ütközhet, melyek közül differenciáldiagnosztikai szempontból legfontosabb a nemzetségen belüli szerológiai keresztreaktivitást kiemelni. Ez a Magyarországhoz hasonló földrajzi területeken – ahol több flavivírus együttes cirkulációja figyelhető meg – problémát jelenthet a laboratóriumi diagnosztika során, különösen a secunder flavivírus fertőzések vagy koinfekció-gyanús esetek elbírálásakor. Az esetkonfirmálások és a diagnosztikai szenzitivitás növelése, a humán megbetegedéseket okozó vírustörzsek azonosítása, illetve a referencialaboratórium törzsközpontjának megújítása iránti igényből adódóan 2014-ben molekuláris biológiai módszerekkel bővítettük a diagnosztikai kapacitást. Ehhez TBEV és WNV kimutatására alkalmas, megfelelő érzékenységgű real-time és nested PCR módszereket optimalizáltunk. Továbbá, a WNV specifikus real-time PCR eljárást a Nemzeti Akkreditációs Hivatal által akkreditáltattuk. Kutatásunk célkitűzése annak megállapítása volt, hogy milyen mintatípusokból lehet hatékonyan elvégezni a víruskimutatást, sikeres eredmények esetén pedig követéses vizsgálatok révén meghatározni azt az időtartamot, ameddig a vírus még detektálható adott mintatípusból. A 2014 – 2017 közötti időszakban, szerológiai módszerekkel igazolt, aktuálisan TBEV vagy WNV fertőzött betegektől végeztünk mintagyűjtést, a vérsavó és liquor minták mellett a vizeletmintákra fókuszálva.

A PCR vizsgálatok bevezetésének eredményeként 2014-ben Magyarországon először sikerült nyugat-nílusi vírus RNS-t közvetlenül humán betegmintából kimutatni. Három beteg két vérsavó és három vizeletmintája adott PCR pozitív eredményt. A vizeletből a vírus, a vérsavóhoz képest magasabb koncentrációban volt kimutatható. A szekvenálást mindhárom betegnél elvégeztük, a vírusgenom NS3 régiójának egy szakasza alapján, egy mintánál pedig teljes genom meghatározást is végeztünk. A humán megbetegedések háttérében lineage 2 WNV fertőzést állapítottunk meg. 2015 és 2017 között a mintagyűjtést tovább folytattuk, eredményeinkből pedig arra a következtetésre jutottunk, hogy vizeletmintákból lehet a legnagyobb valószínűséggel és leghosszabb ideig kimutatni a WNV nukleinsavat. A vizsgált

beteg 45,45%-ánál bizonyult a vizeletminta PCR pozitívnak, míg vérsavó, illetve liquor mintából a betegek 16,86%-ánál és 4,08%-ánál volt csak sikeres a vírus kimutatása. A vírust 9 betegnél sikeresen izoláltuk vizelet mintából. Öt hosszú ideig kórházi ápolásra szoruló neuroinvaszív WNV fertőzésben szenvedő beteg nyomon követéses vizsgálatát végeztük el. Leghosszabb ideig vizelet mintából volt detektálható a WNV RNS: a vírus kimutathatóságának maximális időtartama két betegnél elérte a tünetek kezdetét követő 36. és 40. napot.

Kullancsencephalitis-vírus esetén összesen 84 mintát vizsgáltunk TBEV specifikus PCR módszerrel. A szerológiai vizsgálatokkal is megerősített TBE esetek közül négy beteg 2 vérsavó, 1 liquor és 1 vizeletmintája bizonyult PCR pozitívnak. Mind a négy betegnél a vírus európai szubtypusa okozta a fertőzést. Bár Magyarországon ezzel elsőként detektáltunk TBEV-t humán klinikai mintából, a PCR pozitív betegek kis száma miatt a módszer alkalmazhatósága és diagnosztikai relevanciája – a WNV-vel ellentétben – kérdéses.

Az értekezés külön fejezetben ismerteti a 2018-as WNV járvány epidemiológiai és mikrobiológiai laboratóriumi tapasztalatait. Abban az évben ugyanis Európa-szerte jelentős kiugrás volt tapasztalható a bejelentett humán megbetegedések számában, amely alól Magyarország sem volt kivétel. Az ötödik legtöbb esetet jelentő országgént összesen 225 laboratóriumiilag igazolt vagy valószínűsített humán WNV fertőzést diagnosztizáltunk, mely meghaladta a 2004 és a 2017 között regisztrált összes eset számát.

2018-ban a vizeletminták mellett megkezdtük a teljes vérminták gyűjtését és WNV PCR vizsgálatát is. Továbbá, differenciáldiagnosztikai céllal vizsgálatainkat a szintén endémiás és korábban Magyarországon állatokból kimutatott flavivírus: az Usutu vírus (USUV) irányába is kiterjesztettük. A 2018-as járvány három pontban összefoglalható konklúziója, hogy: **1.** a teljes vérminták jól alkalmazhatóak PCR diagnosztikai vizsgálatokhoz és a humán WNV fertőzések esetdefiníció szerinti konfirmálását is lehetővé teszik. A teljes vér és vizeletminták együttes PCR vizsgálata jelentősen növeli a WNV laboratóriumi diagnosztika szenzitivitását. A PCR pozitív betegek 45,3%-ánál a teljes vér és vizeletminta is pozitív eredményt adott, míg 18,9%-nál csak a teljes vérmintából sikerült a vírust kimutatnunk. **2.** A teljes vérminták PCR vizsgálatának eredménye az első hazai (neuroinvaszív) humán USUV fertőzés megerősítése. A szekvenálás során Európa lineage 2 USUV jelenlétét azonosítottuk a beteg mintájában. Az esetet korábban – a megelőző laboratóriumi eredmények alapján – *laboratóriumiilag valószínűsített* WNV esetként jelentettük, ami felhívja a figyelmet az esetleges humán USUV fertőzések WNV infekcióként történő félrediaosztizálásának veszélyére. **3.** Hasonlóan az előző évekhez, 2018-ban is lineage 2 WNV cirkulációt azonosítottunk az országban. A kiemelkedő esetszámok hátterében sokkal valószínűbb klimatikus és környezeti tényezők szerepe, mintsem egy új, virulensebb vírustörzs megjelenése a térségben.

Végezetül, a diagnosztikai vizsgálatok mellett, egészséges véradóktól származó plazmamintákból anti-WNV IgG vizsgálatokat végeztünk, a szeroprevalencia megállapítása érdekében. Ehhez, indirekt immunfluoreszcens módszerrel végeztünk IgG meghatározást,

majd az eredményeket haemagglutináció-gátlási és vírusneutralizációs próbával erősítettük meg. A 2112 mintából elvégzett szerológiai vizsgálatok eredményeképpen 46 személynél konfirmáltunk WNV szeropozitivitást, amely az összes minta 2,19%-a. Bár vizsgálataink nem minősülnek seroepidemiológiai szűrésnek, megállapítható, hogy 1999/2000 óta szignifikánsan nőtt hazánkban a WNV szeroprevalencia, amely korrelál a diagnosztizált megbetegedések éves számának fokozatosan növekvő tendenciájával.

Bevezetés

Az újonnan felbukkanó, más néven *emerging* vagy *re-emerging* kórokozókra fókuszáló kutatások a virológia legaktuálisabb és leggyorsabban változó területét képezik. Olyan ágenseket sorolhatunk e kategóriába, melyeknek humán (vagy állategészségügyi) jelentősége van, azonban kórokozó képességük korábban nem volt ismert vagy ismert volt ugyan, de az okozott megbetegedések incidenciájában növekedés tapasztalható, például mert a fertőzések földrajzi elterjedése kiterjedt vagy mert a kórokozó fokozott patogenitást mutat. A virális zoonózisok – azaz állatról emberre terjedő vírusok – többsége tipikus *emerging* vagy *re-emerging* ágens, melyek elterjedését, transzmissziós ciklusát és ezáltal az általuk okozott fertőzések gyakoriságát számos ökológiai tényező befolyásolja. A virális zoonózisok egy külön csoportját képezik az ún. arbovírusok (*arthropod-borne viruses*), azaz ízeltlábú vektorok által terjesztett vírusok. Az „*arbovírus*” kifejezés nem taxonómiai kategóriát jelöl, hiszen számos víruscsalád tagjait lehetne példaként említeni. Ami mégis általánosan igaz e kórokozókra, hogy az utóbbi években számos tényező kedvezett elterjedésüknek, úgy, mint például a klímaváltozás, a globális léptékű turizmus és kereskedelem, az urbanizáció és népességszám növekedés, vagy például olyan evolúciós folyamatok, melyek a vírus vektor- vagy gazdaszervezethez történő adaptációját segítették elő. A virológiai tárgyú kutatások egy fontos részét képezik a *surveillance* vizsgálatok, illetve a laboratóriumi diagnosztikai fejlesztések, melyek lehetővé teszik az adott területen zajló víruscirkuláció feltérképezését, az új esetek azonosítását és az esetleges járványok nyomon követését. Mindez pedig nélkülözhetetlen a megfelelő közegészségügyi intézkedések megtételéhez. Magyarországon az arbovírusok által okozott humán megbetegedések kapcsán a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségét érdemes kiemelni. Az értekezés tárgyát az országban endémiásan előforduló és éves rendszerességgel humán megbetegedéseket okozó flavivírusok képezik, azaz elsősorban a kullancsencephalitis- és a nyugat-nílusi vírus. Ezenkívül a nemzetséghez sorolhatunk számos más humán patogén vírust is, melyek egy része például a trópusi, szubtrópusi és/vagy mediterrán térségben okoz jelentős közegészségügyi problémát (például sárgaláz-vírus), de emellett hazánkban is rendszeresen regisztrálunk – egyelőre még csak – behurcolt eseteket (például Zika vagy Dengue vírust fertőzéseket).

Vizsgálataink célja a Magyarországon előforduló flavivírusokra specifikus molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek bevezetése és alkalmazhatóságának felmérése volt. A téma időszerűségét jelzi, hogy a Nemzeti Népegészségügyi Központban működő Virális Zoonózisok Nemzeti Referencialaboratórium, a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet értelmében országos szinten felel a virális zoonózisok okozta humán fertőzések laboratóriumi diagnosztikájáért. Ezért a nemzetközi trendek követése és a módszerek folyamatos fejlesztése, valamint *surveillance* vizsgálatok megszervezése alapvető feladata.

Irodalmi áttekintés

1. Flavivírusok – általános jellemzők

A *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségéhez jelenleg 53 vírusfaj sorolható (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2019). A genus névadó faja a sárgaláz vírusa, az elnevezés a latin „*flavus*” szóból ered, utalva a vírus által okozott sárgaságra. A flavivírusok egyszálú, pozitív polaritású RNS genommal rendelkező, körülbelül 50 nanométer átmérőjű, ikozahedrális szimmetriájú burkos vírusok (Colpitts et al., 2012). A genom 11 kilobázis méretű, melyen egyetlen nyitott leolvasási kereten (ORF: *open reading frame*) kódoltak a strukturális és nem strukturális fehérjék. 5'-3' irányban a strukturális gének: a C (*capsid*: kapszid), az M (*membrane*: membrán) és az E (*envelope*: burokfehérje). Az ORF-en ezenkívül hét nem strukturális fehérje génje található meg, melyek az alábbiak: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B és NS5 (Colpitts et al., 2012). A nagy immunogenitású és hexamer formában extracellulárisan is szekretálódó NS1 fehérje a vírusgenom replikációjában játszik szerepet. Az NS2A fehérje szintén a replikációs komplex alkotóeleme, az NS2B az NS3 proteáz kofaktora. Az NS3 fehérje proteáz és helikáz funkciót lát el, az NS4A és NS4B fehérjék a replikációs komplex lokalizációját segítik. Az NS5 fehérje C terminálisa RNS-függő RNS polimerázként, N terminálisa metiltranszferázként funkcionál (Westaway et al., 2011). A genom 3' vége nem poliadenilált, az ORF-en kívül, az 5' és 3' végeken UTR (*untranslated region*), azaz nem kódoló szekvenciák találhatóak (Colpitts et al., 2012). A flavivírusok receptor mediált endocitózissal jutnak be a gazdasejtbe. Az mRNS-ként funkcionáló virális genomról a fehérje transzláció, majd a vírusgenom replikációja a citoplazmában zajlik (Suthar et al., 2013). A fehérjeszintézis során poliprotein prekursor képződik, melyet virális és gazdasejt eredetű proteázok hasítanak funkcionális egységekre. A virális RNS-függő RNS polimeráz az mRNS genomról először negatív szálú RNS molekulát szintetizál, mely a pozitív szálú RNS genom szintéziséhez szolgál templátként (Suthar et al., 2013). A virionok összeépülése a sejt endomembrán rendszeréhez kötötten történik, az érett virionok a sejt szekréciós útvonalát képező transzportfolyamatok által, exocitózissal jutnak ki a fertőzött sejtekből (Suthar et al., 2013). A flavivírusok rendszerezése a molekuláris biológiai módszerek térhódítása előtt, a vírusok antigéntulajdonságai alapján történt. Poliklonális immunsavókkal végzett keresztneutralizációs és haemagglutináció-gátlási vizsgálatok segítségével szerológiailag nyolc antigén-komplexbe sorolták a nemzetség tagjait. Ezzel a módszerrel azonban nem volt besorolható valamennyi flavivírus, többek között éppen a nemzetség névadó fajtát, a sárgaláz vírusát sem sikerült antigén-komplexbe sorolni (Kuno et al., 1998). A nyolc antigén komplex az alábbi: Modoc; Rio Bravo; TBE (*tick-borne encephalitis*: kullancsencephalitis); Tyulenyi; Uganda S; Dengue; Ntaya; és Japán encephalitis szerokomplexek (Kuno et al., 1998). A felsorolásból a kullancsencephalitis és Japán encephalitis szerokomplexek emelhetők ki a

hazánkban is endémiás flavivírusok szempontjából. Előbbi szerocsoportozáshoz tartozik a kullancsencephalitis-vírus (TBEV: *tick-borne encephalitis virus*), míg utóbbihoz a nyugat-nílusi vírus és az Usutu vírus (USUV). A molekuláris biológiai, szekvenálási technikák fejlődésével később lehetővé vált a filogenetikai alapú rendszerezés is, amely – amellet, hogy pontosabb taxonómiai klasszifikációt eredményezett – lehetővé tette a vírusok genetikai evolúciójának és terjedésének tanulmányozását is. (A korábbi szerokomplexekbe sorolás egyébként korrelált a filogenetikai rokonsági viszonyokkal.) A *Flavivirus* nemzetségen belül három nagy csoportot különíthetünk el: a kullancsok által terjesztett vírusok és a szúnyogok által terjesztett vírusok csoportját, valamint azon vírusokat, melyeknek nem ismert vektora (például Rio Bravo, Modoc, Apoi flavivírusok). A szúnyogok terjesztette flavivírusokon belül a transzmisszióban résztvevő elsődleges vektor alapján megkülönböztethetünk egy úgynevezett *Culex* kládot, valamint *Aedes* kládot. A két csoport rezervoár szempontjából is különbözik: a *Culex* kládban jellemzően madarak az elsődleges amplifikáló gazdaszervezetek, az ide sorolt vírusok tipikusan neurotrop patogének, melyek gyakorta okoznak meningoencephalitist gerinces gazdaszervezetben (például nyugat-nílusi vírus, Japán encephalitis vírus, stb.) (Beck et al., 2013a). Ezzel szemben az *Aedes* kládban non-humán primáták az elsődleges rezervoárok és az ide sorolt vírusfajok többsége elsősorban nem neuroinvazív megbetegedést okoz (Beck et al., 2013a). Ez alól vannak kivételek, mint például a microcephaliával és más központi idegrendszeri malformációkkal is összefüggésbe hozott congenitális Zika vírusfertőzés (Mlakar et al., 2016), de a Dengue haemorrhagiás-láz és shock-szindómáról ismert Dengue vírusfertőzések esetén is kialakulhat neurológiai komplikáció (Carod-Artal et al., 2013). A kullancsok által terjesztett flavivírusok rezervoár szempontjából szintén két nagy csoportot alkotnak. Az egyik elsősorban tengeri madarakhoz köthető, míg a másik kullancsencephalitis csoport tagjainál a fő rezervoár szervezetek rágcsálók, az ide sorolt vírusok pedig általában encephalitis-t okoznak emberben (Beck et al., 2013a). (Bár az *Omszki haemorrhagiás láz* vírusa és a *Kyasanur Forest Disease* vírus összefüggésbe hozható vérzéscsillós-láz megbetegedésekkel is.) A kullancsok által terjesztett flavivírusok lassabban evolválódnak, ami vélhetően az alacsonyabb replikációs rátával és a kullancsok hosszabb generációs ciklusával hozható összefüggésbe (Beck et al., 2013a). Összességében mind a kullancsok, mind a szúnyogok által terjesztett flavivírusok elterjedése széles földrajzi területeket érint, ezzel jelentős köz- és állategészségügyi terhelést jelentve. A flavivírusok számos tagja úgynevezett *emerging* vagy *re-emerging* kórokozónak tekinthető, mivel a klímaváltozás hatásaként a megbetegedések előfordulási területe és száma dinamikusán változik, újabb régiók válnak érintetté (Bakonyi et al., 2020). Magyarországon rendszeresen humán megbetegedéseket is okozó, endémiás flavivírusok a nyugat-nílusi vírus, valamint a kullancsencephalitis-vírus. A doktori munka célkitűzése e két vírus okozta humán fertőzések hazai laboratóriumi diagnosztikájának fejlesztése, melynek kapcsán a továbbiakban a részletes irodalmi áttekintés is elsősorban ezen két kórokozóra fókuszál.

2. Nyugat-nílusi vírus

2.1. A nyugat-nílusi vírus járványtana

A nyugat-nílusi vírus (*West Nile virus: WNV*) a *Flavivirus* nemzetség szúnyogok által terjesztett csoportjának legszélesebb gazdaspektrummal és legnagyobb földrajzi elterjedéssel jellemezhető tagja, mely az Antarktisz kivételével valamennyi kontinensen elterjedt. Először 1937-ben izolálták egy lázas nő véréből Omogoban, Uganda West Nile nevű tartományában (Hubálek et al., 1999; Sambri et al., 2013). Afrikában a legnagyobb epidémiát a dél-afrikai Cape Province területén okozta 1974-ben (Hubálek et al., 1999). Európában először 1963-ban izolálták a vírust, a Rhône-folyó deltájában, majd később a Volga deltában (Hubálek et al., 1999). Nagyobb járványt először 1996-ban, Romániában okozott, 393 humán klinikai esettel, melyek közül 352 páciens mutatott központi idegrendszeri tüneteket és 17 megbetegedés végződött *fatalis* kimenetellel (Papa, 2017; Sambri et al., 2013). Pár évvel később, 1999-ben Volgográdban okozott nagyobb járványt a vírus, 826 kórházi esettel, melyek hátterében nyugat-nílusi vírusfertőzést valószínűsítettek. Összesen 318 beteg vérmintáját vizsgálták meg, melyek közül 183 esetben igazoltak laboratóriumiilag is akut WNV fertőzést (Papa, 2017). A kórokozóra mégis az 1999-es New York-i járványt követően irányult nagyobb figyelem. A rákövetkező években a vírus gyorsan elterjedt az észak-amerikai kontinensen, több ezer humán és ló megbetegedést okozva, de emellett jelentős mortalitást okozott a madárpopulációkban is, mely néhány faj egyedszámában drasztikus csökkenést eredményezett (Beck et al., 2013b). Ezzel szemben Európában 2007-ig kisebb járványkitörések, sporadikus megbetegedések, valamint az amerikaihoz képest mérsékeltebb madárelhullások jellemezték a vírus elterjedését. Az eltérő tendenciára magyarázatul szolgálhat az újvilági madárfajok nagyobb fogékonysága a vírusfertőzésre, illetve a szúnyogfajok vektorkompetenciájában és az elterjedt vírustörzsek virulenciájában is mutatkozhattak különbségek. Az elmúlt években ugyanakkor Európában is növekedés tapasztalható mind az esetszámban, mind pedig a virulenciában. A 2010-es év Európa-szerte kiemelkedőnek számított, ekkor több országban is megugrott a bejelentett megbetegedések száma: Görögországban például 261; Romániában 57, Oroszországban pedig 480 esetet regisztráltak (Beck et al., 2013b). Az Európai Unió tagállamai közül 2011 és 2013 között Görögország, míg 2014 és 2016 között Olaszország jelentette a legtöbb humán megbetegedést (Papa, 2017). Az Európai Unió tagállamai közül 2017 és 2019 között Görögország, Olaszország és Románia regisztrálta a legtöbb megbetegedést (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], Historical data by year - West Nile fever seasonal surveillance [2017-2019]). Összességében erősen endémiás Európa keleti, középső

és déli térsége. Hazánkban 2004 óta rendelkezünk humán nyugat-nílusi vírusfertőzésekre vonatkozó laboratóriumi adatokkal, saját néven pedig 2012 óta bejelentendő fertőző betegség (Krisztalovics et al., 2008; Szomor et al., 2011). A Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK; korábbi Országos Epidemiológiai Központ, majd Országos Közegészségügyi Intézet jogutódja) adatait tekintve 2004 és 2011 között évente átlagosan 7 megbetegedés került megerősítésre (Krisztalovics et al., 2008). A következő években fokozatos növekedés figyelhető meg: 2012 és 2017 között a bejelentett esetek éves száma átlagosan 26 volt. A laboratóriumiilag valószínűsített vagy megereősített WNV megbetegedések évenkénti eloszlását a 6. ábra szemlélteti (8.4.1. fejezet). Az esetszámban 2004 óta megfigyelhető növekvő tendencia hátterében állhat a javuló *surveillance* rendszer, valamint az a tény, hogy a nyugat-nílusi vírusfertőzések hazai előfordulása egyre inkább bekerül a köztudatba, ezért a klinikusok részéről is gyakrabban történik vizsgálatkérés, melynek következtében több eset kerülhet laboratóriumi kivizsgálásra.

A nyugat-nílusi vírusnak legalább nyolc genetikai leszármazási vonala (úgynevezett lineage) ismert, melyek közül az 1-es és 2-es genetikai vonalak azok, melyek bizonyítottan összefüggésbe hozhatók humán és állati megbetegedésekkel, míg a WNV 3-8 leszármazási vonalokhoz sorolt törzsek azonosítása vektor *surveillance* tevékenységhez köthető (Kemenesi et al., 2014; Pachler et al., 2014). Az elmúlt években Ausztriában és Magyarországon is, egymástól függetlenül két kutatócsoport egy feltételezett kilencedik genetikai vonalat is azonosított, egyelőre csak *Uranotaenia unguiculata* szúnyogfajból (Kemenesi et al., 2014; Pachler et al., 2014).

Az 1-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek elterjedtek a Mediterrán-térségben, Kelet-Európában, Észak-Amerikában, a Karibi-térségben, valamint Latin-Amerikában is (Papa, 2017). Többek között a New York-i járvány kitörését is WNV lineage 1 vírustörzs okozta (lineage 1a, izraeli vagy amerikai cluster) (Calistri et al., 2010). Neuroinvazív lineage 2 WNV törzs közép-európai megjelenését először Magyarországon igazolták. A vírust ragadozó madarakból: héjából (*Accipiter gentilis*) és karvalyból (*Accipiter nisus*) mutatták ki 2004-ben, majd 2005-ben (Erdélyi et al., 2007). Korábban ez a genetikai leszármazási vonal csak Afrika szubszaharai térségében és Madagaszkáron volt elterjedt. A Magyarországon madarakból izolált vírustörzs is közép és dél-afrikai WNV törzsekkel mutatta a legnagyobb hasonlóságot (Erdélyi et al., 2007). A különböző variánsok új földrajzi térségekben történő megjelenésében jelentős szerepet játszanak a vándormadarak, melyek Afrika felől évről évre új törzseket hurcolhatnak Európába. Mivel a héja nem vándorfaj, feltételezhető, hogy ez esetben az afrikai lineage 2 törzs a transzmissziót megelőzően már sikeresen adaptálódott a helyi szúnyogfajokhoz (Sambri et al., 2013). További filogenetikai analízisek alátámasztják, hogy a 2-es genetikai vonal európai megjelenése több egymástól független eseményhez köthető. Először a huszadik század elején a Mediterrán-térségbe került át Afrikából, melynek eredménye az 1968-as ciprusi izolátum (vírustörzs: Q3574-5; GenBank-i azonosító szám:

GQ903680.1), majd később a század közepén WNV lineage 2 vírustörzsek megjelentek Oroszország délnyugati térségében és Európában egyaránt (McMullen et al., 2013). Ugyanakkor a madárvonulásoknak köszönhetően egy folyamatosan fenntartott cirkuláció sem zárható ki a két kontinens között. Annyi biztos, hogy a 2-es leszármazási vonalhoz tartozó vírustörzsek az elmúlt években Európa-szerte elterjedtek, miközben újabb, neuroinvaszív fenotípusok evolválódtak (McMullen et al., 2013). Magyarországon 1-es és 2-es genetikai vonalhoz tartozó vírustörzseket is rendszeresen mutattak ki állatokból (Bakonyi et al., 2013; Erdélyi et al., 2007; Kutasi et al., 2011). A humán fertőzések háttérében álló vírustörzsekkel kapcsolatban azonban az NNK referencialaboratóriumában 2014-ben bevezetett molekuláris diagnosztikai vizsgálatokig nem állt rendelkezésre adat.

2.2. A nyugat-nílusi vírus terjedése

A nyugat-nílusi vírus terjedésének elsődleges módja fertőzött szúnyog csípése által bekövetkező vírustranszmisszió. A vektorok alapvetően ornitofil szúnyogfajok – főleg a *Culex* nemzetség tagjai – melyek fertőzött madarakon történő táplálkozás közben akvirálják a vírust (Ciota et al., 2013). A fertőzött szúnyogok ugyanakkor véletlenszerűen csíphetnek emlősöket, így például az embert is, ezzel átadva a kórokozót. Ezért híd-vektoroknak is nevezik őket. Európában és Afrikában a legfontosabb vektorok például a *Culex pipiens*, *Culex modestus*, *Culex univittatus*, *Culex antennatus* fajok, Indiában a *Culex vishnui* komplex fajai, míg Ausztráliában a *Culex annulirostris* (Hayes et al., 2005). Az Egyesült Államokban a nyugat-nílusi vírust mintegy 59 szúnyogfajból kimutatták, azonban elsődleges vektornak ebből csupán 10 faj bizonyult (Ciota et al., 2013). Vektor *surveillance* adatok alapján 2003-ban a pozitív szúnyog pool-ok 32%-a *Culex tarsalis*-nak bizonyult, egy évvel később azonban az Egyesült Államok délnyugati térségében kialakult epidémiában már elsődlegesen a *Culex quinquefasciatus* faj játszott szerepet (Hayes et al., 2005).

Magyarországon ugyan az egész országra kiterjedő vektor *surveillance* rendszer nem működik, 2011 és 2012 között a dél-dunántúli, északkeleti és délkeleti régiókban végeztek szúnyoggyűjtést, mely során *Ochlerotatus annulipes*, *Coquillettidia richiardii* és *Culex pipiens* fajokból mutatták ki a vírus 2-es genetikai leszármazási vonalát (Szentpáli-Gavallér et al., 2014). A vírustranszmisszió intenzitása és a humán fertőzések száma függ a kompetens szúnyogok abundanciájától, az infekció prevalenciájától a szúnyogpopulációban, valamint a vektorok táplálkozási mintázatától. A vertikális vírustranszmisszió lehetősége igazolt, illetve a vírust hibernált nőstény szúnyogokból is sikerült izolálni, azaz a vírusperzisztencia fennmaradhat hidegebb éghajlatú területeken is. Szúnyogokon kívül a vírussal képesek óvantagok (*Argasidae*) és kullancsok (*Ixodidae*) is megfertőződni, azonban a

vírustranzmisszióban betöltött szerepük nem tűnik jelentősnek (Hayes et al., 2005). Laboratóriumi körülmények között igazolták, hogy *Argas arboreus* faj csirkéket, míg az *Ornithodoros savignyi*, *O. maritimus*, *O. erraticus*, *O. moubata* fajok egereket képesek fertőzni nyugat-nílusi vírussal. Az *Amblyomma americanum*, *Ixodes scapularis*, *I. ricinus*, *Dermacentor variabilis*, és *D. andersoni* kullancsfajok pedig megfertőződtek ugyan a vírussal, de a kórokozót már nem adták tovább gerinces gazdafajnak (Hayes et al., 2005).

A vírus amplifikálásában és természetes ciklusának fenntartásában legfontosabb gazdaszervezetek a madarak. Jelentőségük azért is említésre méltó, mert a nem költöző madarak lokális helyváltoztatása, de különösen a vándorfajok hosszú távú migrációja elősegíti a vírus terjesztését új földrajzi területekre is. A *Passeriformes* (veréb- vagy énekesmadár-alakúak), *Charadriiformes* (lilealakúak), *Strigiformes* (bagolyalakúak), *Falconiformes* (sólyomalakúak) rendjéhez tartozó fajok kifejezetten érzékenyek a nyugat-nílusi vírusfertőzésre, bennük megfelelő mértékű és ideig tartó viraemia alakul ki ahhoz, hogy megfertőzzék a rajtuk táplálkozó legtöbb szúnyogfajt (Hayes et al., 2005). Varjúfélék (*Corvidae*), vagy például a házi pirok (*Carpodacus mexicanus*) és a házi veréb (*Passer domesticus*) rendkívül hatékonyan képesek a vírust átadni a vektornak, emellett ezeknél a fajoknál a vírusfertőzés nyomán a mortalitás mértéke akár a 40%-ot is meghaladhatja (Hayes et al., 2005). A nyugat-nílusi vírust rágcsálókból, denevérekből is izolálták már, azonban a legtöbb emlősfaj, így az ember sem képes olyan mértékű és tartós viraemiát produkálni, mely által a vírus átjuthatna a vektorba, ezért az emlősök úgynevezett fertőzési zsákutcának (*dead-end host*) tekinthetők. Laboratóriumi kísérletekben vizsgálva az egyik kompetens vektorfajt (*Culex tarsalis*) például azt tapasztalták, hogy $10^{7.1}$ PFU/ml víruskoncentráció mellett a szúnyogok hatékonyan akvirálták a vírust, azonban $10^{4.9}$ PFU/ml koncentráció mellett már a vizsgált csoportokban az egyedek csupán 0–36%-a fertőződött (Hayes et al., 2005). Viszonyításképpen emberben a legmagasabb becsült víruskoncentrációt egy véradó mintájában mérték: $10^{3.2}$ PFU/ml értéket (Hayes et al., 2005). Vektor közvetítette vírustranzmisszió ember és ember között nyugat-nílusi vírus esetén tehát jelen ismereteink szerint nem lehetséges. A vírus nem vektor közvetítette emberről emberre történő terjedésére ugyanakkor van lehetőség: transzfúzió, transzplantáció, transzplacentáris vagy szoptatás által bekövetkező vírusfertőzésre egyaránt olvashatók eseteírások. Az első igazoltan transzfúzió által bekövetkezett vírustranzmissziót 2002-ben írták le az Egyesült Államokban. Ekkor összesen 23 transzfundált páciens kapott nyugat-nílusi vírusfertőzést. Később a nyomon követés során 16, a véradás időpontjában viraemiás donort azonosítottak (Pealer et al., 2003). Közülük kilencen mutattak vírusinfekcióra jellemző tüneteket, öten viszont tünetmentesek maradtak. (Két véradót nem sikerült nyomon követni.) A donáció időpontjában valamennyi véradó nyugat-nílusi vírus specifikus IgM negatívnak bizonyult, a friss fertőzést PCR vizsgálattal igazolták (Pealer et al., 2003). Az eset kapcsán 2003 júniusától az Egyesült Államokban és Kanadában PCR módszerrel monitorozni kezdték a donációra szánt

vérmintákat nyugat-nílusi vírus kimutatása céljából. A transfúzió általi terjedés kockázatának jelentőségére felhívja a figyelmet, hogy 2003 és 2004 között több mint 1000 potenciális WNV viraemiás véradót sikerült kiszűrni csak az Egyesült Államokban (Hayes et al., 2005). Transzplantáció általi fertőződés szintén 2002-ben történt az Egyesült Államokban. Ekkor cadaver donortól származó szervek (két vese, szív és máj) beültetését követően fertőződött és betegedett meg négy recipiens, egy esetben fatális kimenetellel (Iwamoto et al., 2003). Az esetismertetés egy másik fontos tanulsága, hogy az egyébként baleseti traumában elszenvedett sérülései miatt elhunyt donor kórházba szállítását követően transfúzióban részesült, majd később a laboratóriumi és epidemiológiai vizsgálatok alátámasztották, hogy a transfúzió során fertőződött a vírussal (Iwamoto et al., 2003).

A szoptatáskor bekövetkező vírusátadás ritkának tűnik a jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján, azonban előfordulását nem lehet kizárni (Hinckley et al., 2015). A vírust mutatták már ki anyatejből és a szakirodalom is közöl olyan esetismertetést, melyben az egyébként postpartum, transfúzió által fertőződött anyából szoptatás közben az anyatejjel juthatott a vírus az újszülöttbe (Hayes et al., 2004). 2003-ban az amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*) 74, várandóssága ideje alatt nyugat-nílusi vírushordozóként átesett nő nyomon követését végezte el. A vizsgált személyek normál időben egészséges gyermeket szültek (Hayes et al., 2005). A tanulmány előzménye volt az a 2002-es eset, mely során egy várandós nő a 27. gestációs héten nyugat-nílusi vírushordozóként esett át. A magzatban congenitalis nyugat-nílusi vírushordozás következtében bilaterális chorioretinitis és az agyszövet károsodása alakult ki (Hayes et al., 2004; Hayes et al., 2005). Ugyanakkor a CDC jelenlegi ajánlása nem kezeli kiemelt kockázati tényezőként a várandósok nyugat-nílusi vírushordozását és csupán a szúnyogcsípés elleni védekezés szerepel javaslatai között (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2018).

2.3. A humán nyugat-nílusi vírusherőzések klinikuma

A humán fertőzések mintegy 80%-a tünetmentesen vagy csak enyhe, aspecifikus tünetekkel zajlik (Hayes et al., 2005). Klinikai tünetek megjelenésekor, expozíciót követően átlagosan 2-14 napos inkubációs idővel számolhatunk, bár a szűnyogcsípés időpontját sokszor nehéz pontosan behatározni. Tünetes fertőzések kapcsán az angol nyelvű szakirodalom különbséget tesz az enyhébb lefolyású, nyugat-nílusi lázként (WNF: *West Nile fever*) definiált kórforma és a súlyosabb, neurológiai szövődményekkel járó, úgynevezett „nyugat-nílusi vírus neuroinvasív tünetegyüttes” (WNND: *West Nile neuroinvasive disease*) között. Előbbire jellemző a hirtelen felszökő láz, fejfájás, fáradtság, gyengeség, izom- és ízületi fájdalom, rossz közérzet, valamint tranziens maculopapularis kiütések megjelenése a törzsön és a végtagokon. A gyengeség és izomgyengeség általában a tünetek kezdetétől számított 1-2 hónapon belül megszűnik (Hayes et al., 2005). A neuroinvasív kórforma kialakulása az esetek kevesebb, mint 1%-ára jellemző, míg a WNF esetek aránya 20% körül mozog (Barzon et al., 2015; Hayes et al., 2005). Az enyhébb és kevésbé specifikus tünetekkel járó fertőzéseket azonban kisebb eséllyel ismerik fel és jelentik be, ezért ezek aránya a valóságban magasabb is lehet (Hayes et al., 2005).

Nagyon ritka, nem neurológiai klinikai manifesztációként előfordulhat: fulmináns hepatitis, pancreatitis, myocarditis, rhabdomyolysis, orchitis, illetve chorioretinitis (Hayes et al., 2005). Érdekes ugyanakkor megjegyezni, hogy a chorioretinitis gyakoribb lehet, mint ahogyan azt korábban feltételezték. Egy tunéziai eseteírás szerint például 29 kórházi ápolat beteg 69%-ánál tapasztalták előfordulását (Hayes et al., 2005). Néhány WNV fertőzött észak-amerikai páciensnél pedig szívritmuszavart is leírtak.

A WNV neuroinfekció általában serosus meningitis, encephalitis, esetleg meningoencephalitis, encephalomyelitis formájában zajlik (Barzon et al., 2015). A neurológiai tünetek súlyossága széles skálán változik, az enyhe dezorientáltságtól kezdve a súlyos tudatvesztéses állapotig vagy akár fatális kimenetelig. A vegetatív központok (agytörzs, nyúltvelő és híd) érintettsége a rekeszizom és a bordaközi izmok bénulását okozhatja, mely légzésbénuláshoz, esetenként halálos kimenetelhez vezet (Hayes et al., 2005). A serosus meningitis legjellemzőbb tünetei a hirtelen felszökő magas láz, fejfájás, tarkókörtöttség, meningeális izgalmi jelek, photophobia. A fejfájás súlyos lehet, melyhez gyakran gastrointestinalis tünetek (hányinger, hányás) társulnak, amelyek dehidratációt is okozhatnak. Az encephalitisben szenvedő betegeknél emellett jellemző az alternáló tudatállapot, ataxia, tremor és myoclonus (főleg a felső végtagok és az arc területén). Kialakulhat cerebralis ödéma és ennek következtében a koponyaűri nyomás fokozódása. Görcsrohamok is jelentkezhetnek, bár ezek előfordulása ritka (Petersen et al., 2013).

Az idősebb korosztályban a WNV encephalitis kialakulásának valószínűsége szignifikánsan nagyobb: a WNND incidenciája a 65 év felettek körében 1:50, míg 65 év alatt ez az arány jóval

kiseb: 1:300 (Ludlow et al., 2016). A 75 év felettek korcsoportjában pedig a fatális kimenetelű megbetegedések száma is megugrik. A szervtranszplantáció és az azzal járó immunszupprimált állapot, valamint daganatos betegségek megléte szintén jelentősen növeli a neurológiai kórkép kialakulásának kockázatát. Különösen szervtranszplantáció recipienseinél a klinikai kép a spektrum súlyosabb vége felé tolódik (Kleinschmidt-DeMasters, 2004). Emellett olyan krónikus betegségek, mint például a diabetes, a magas vérnyomás, veseelégtelenség, esetleg cerebrovasularis alapbetegségek, a CCR5 kemokin receptor deficienciája szintén hozzájárulhatnak a WNND kialakulásához (Petersen et al., 2013). Érdekes például az az adat, melyet a 2000-es New Yorki, New Jersey-i WNV járvány kapcsán közöltek az Egyesült Államokban: 11 encephalitis-es, meningoencephalitis-es páciens közül nyolcan magas vérnyomásban szenvedtek, míg a csak meningitises betegekénél a magas vérnyomás előfordulása ritkább volt (8-ból 3 beteg) (Weiss et al., 2001).

Genetikai faktorok közül, melyek befolyásolhatják a morbiditást a 2'-5'-oligoadenilát szintetáz (OAS1) szerepét sikerült azonosítani (Ceccaldi et al., 2004). Az enzim részt vesz abban a biokémiai folyamatban, amely végül az exogén virális RNS molekulák ribonukleáz általi degradációját eredményezi. Deficienciája növeli a WNV fertőzéssel szembeni fogékonyságot. A WNND betegek kb. 13%-ánál jellemző a gerincvelői mozgató neuronok fertőződése, melynek következménye poliomyelitis-szerű aszimmetrikus flaccid paralysis kialakulása, mely igen gyorsan, a tünetek megjelenését követő 48 órában jelentkezik. Amennyiben a gerincvelő érintettsége kiterjedté válik, tetraplegia is kialakulhat. WNV fertőzéssel összefüggésben ascendáló, szimmetrikus végtaggyengeséggel és zsibbadással járó Guillain-Barré szindróma is kialakulhat. Általánosságban a WNND mortalitási rátája 10% körülire tehető, de a súlyosabb encephalitises eseteknél akár a 10-30%-ot is elérheti. A felépülés lassú, legjobb prognózisra azon meningitises pácienseknél számíthatunk, akiknél a tudatállapotban komolyabb romlás nem következett be. A meningitisekből felépülő betegek gyakran számolnak be elhúzódó fejfájásról, izomgyengeségről, izomfájdalmakról, és általános gyengeségről (Patel et al., 2015). Encephalitist vagy focalis neurológiai manifesztációt követően hónapokig vagy akár évekig megfigyelhető perzisztens neurológiai deficit, szomatikus és kognitív panaszok (Ludlow et al., 2016; Murray et al., 2010). A betegek kevesebb, mint felénél jellemző csak az egy éven belüli teljes felépülés. Egyetlen amerikai tanulmányban beszámoltak arról is, hogy néhány betegnél a WNV encephalitist követően évekkel – akár 7 évvel – később is kimutatható volt a virális RNS vizelet mintából, perzisztens vírusreplikációt feltételezve a vesékben (Murray et al., 2010). Mindezt a pácienseknél megfigyelt krónikus veseelégtelenséggel hozták összefüggésbe. Az eredmények korreláltak állatkísérletek tapasztalataival: perzisztens WNV fertőzésre utaló, hónapokig tartó viruriát követően histopathológiai elváltozásokat figyeltek meg az állatok veséiben (Tesh et al., 2005). A későbbiekben végzett retrospektív vizsgálatokban azonban nem sikerült újabb eredményekkel alátámasztani azt, hogy emberben esetleg ennyire elhúzódó lenne a vírusürítés, a súlyos neuroinvasív WNV fertőzés és a

későbbiekben kialakuló krónikus veseelégtelenség között ugyanakkor találtak statisztikai összefüggést (Nolan et al., 2012).

2.4. Nyugat-nílusi vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikája

Tünetmentes viraemiás véradok szűrését követő nyomon követéses vizsgálatok tapasztalata szerint az IgM ellenanyagok megjelenése előtt körülbelül már 7 nappal igazolható a vírus nukleinsav jelenléte vérben (Busch et al., 2008). Elsődleges nyugat-nílusi vírusfertőzés során a viraemia a maximumát az expozíciót követő 3-4. napon éri el (Barzon et al., 2015), átlagosan pedig 9,5 (95% CI: 7,7–11,3) napig tarthat (Busch et al., 2008). Neuroinvazív kórkép fennállásakor a vírus RNS-e valamivel hosszabb ideig is detektálható. Számolva az inkubációs periódus hosszával (2-14 nap) mindez azt jelenti, hogy a kórokozó gyorsan eliminálódik: a klinikai tünetek megjelenésekor a betegek 70-80%-ánál már nem mutatható ki a vérsavó- vagy liquor mintából (Barzon et al., 2015).

Szintén viraemiás véradok vizsgálatával nyert érdekes tapasztalat, hogy szeronegatív státuszban a WNV RNS magasabb koncentrációban mutatható ki plazma mintából, mint teljes vérmintából. A vírus specifikus ellenanyagok megjelenésével azonban ez a tendencia megfordul: teljes vérből hosszabb ideig és magasabb koncentrációban detektálható a vírus nukleinsava (Lanteri et al., 2014a; Lustig et al., 2016; Rios et al., 2007). A víruskimutatásra irányuló vizsgálatok egyik fontos és újszerű tapasztalata, hogy a vírus megjelenhet a vizeletben is, abból izolálható és – a vér és liquor mintákhoz képest – hosszabb ideig detektálható (Barzon et al., 2013; Barzon et al., 2014). Elhúzódó viruria azonban inkább jellemző a WNND és WNF betegekre, mint az aszimptomatikus fertőzöttekre (Barzon et al., 2013; Barzon et al., 2015; Tonry et al., 2005). Az elhúzódó viruriát kísérletesen, hörcsögök laboratóriumi fertőzését követően is igazolták (Tesh et al., 2005). A vírust sikerült izolálni is az állatok vizeletéből és veséjéből a fertőzést követően nyolc hónappal később, neutralizáló ellenanyagválasz mellett, amikor a vírus már nem volt kimutatható az állatok vérből (Tesh et al., 2005). Az elhúzódó viruria extrém, humán vonatkozású eredményeit ismerteti az az amerikai közlemény (Murray et al., 2010), melyben korábban WNV encephalitis-t átvészelt, krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek mintáiból mutatták ki WNV RNS jelenlétét, évekkel az akut fertőzést követően. A 2010-ben megjelent publikáció nyomán más kutatócsoportok is végeztek retrospektív vizsgálatokat, de az elhúzódó vírusürítés ilyen szélsőséges példáját nem sikerült igazolni (Gibney et al., 2011). A vírus nukleinsavát vizelet mellett nyálmintából is detektálták, igaz egyetlen encephalitises beteg esetén (Barzon et al., 2012). A nyálminták vizsgálatának diagnosztikai relevanciája valószínűleg nem túl nagy.

A PCR (PCR: *polymerase chain reaction*; polimeráz láncreakció) alapú diagnosztikai módszerek mellett a direkt víruskimutatás megvalósulhat a virális antigének detektálására

alkalmas tesztek segítségével is. Dengue vírusfertőzéseknél például a konzervatív NS1 nem-strukturális fehérje vizsgálata 1-9 napig adhat pozitív eredményt (Barzon et al., 2015). Az NS1 fehérjék mind a sejtek felszínén, mind pedig extracellulárisan expresszálódnak. Nyugat-nílusi vírus esetén kísérletesen fertőzött hörcsögök mintáiból expozíciót követően 3-8 napig volt kimutatható, az antigén koncentráció csúcsát az 5. napon mérték (Barzon et al., 2015). Bár jelenleg nyugat-nílusi vírus NS1 antigén kimutatására alkalmas kereskedelmi forgalomban kapható teszt még nem elérhető, a diagnosztika egyik ígéretes irányvonala lehet a jövőben.

A direkt víruskimutatásnál és vírusizolálásnál a laboratóriumi diagnosztika megbízhatóbb módja a vírus ellen termelt ellenanyagok kimutatása, amely flavivírus-fertőzés gyanújakor mindig elvégzendő, standard eljárás. *Busch és munkatársainak* 245 viraemiás véradó vizsgálatával kapott eredményei szerint a viraemia kezdeti fázisát követően a vírusmennyiség hamar lecsökken az IgM és IgA alosztályú ellenanyagok megjelenésével egyidejűleg vagy még az előtt [medián ablakperiódus: 3,9 (95% CI: 3,4 – 4,4) nap] (Barzon et al., 2015). Az IgG ellenanyagok megjelenése átlagosan a 7. nap környékén várható [7,7 (95% CI: 6,9 – 8,5) nap] (Busch et al., 2008). Más tanulmányok eredményei szerint az IgM és IgA ellenanyagok viraemiás véradóknál, az index személy donációját követően 3-9 nappal, míg az IgG ellenanyagok 4-16 nappal később mutathatók ki (Carson et al., 2014; Prince et al., 2007). Az IgM ellenanyagok megjelenésétől az IgG szerokonverzióig átlagosan 3,4 (95% CI: 2,6 – 4,3) nap telik el, vírusneutralizációs aktivitás pedig a 8. nap környékén mérhető (Busch et al., 2008). Az ellenanyagválasz kinetikájának nyomon követése alapján a tapasztalat az, hogy a neutralizáló ellenanyag- és IgG titerben legfeljebb minimális csökkenés mérhető öt évvel az akut fertőzést követően (Prince et al., 2007). Feltételezhető, hogy az IgG ellenanyagok élethossziglan jelen lehetnek, de emellett megfigyelhető az IgM és IgA ellenanyagok hosszútávú perzisztálása is, átlagosan hat hónapig, de az esetek 20-50%-ában egy évvel az akut fertőzést követően is kimutathatók (Barzon et al., 2015). Tünetes betegeknél ez utóbbi tendencia gyakoribbnak tűnik (Roehrig et al., 2003). *Busch és munkatársai* 22 véradó nyomon követésével kapott eredménye, hogy az IgM negatív eredményig átlagosan 156 (95% CI: 70 – 423) nap, míg IgA negatív eredményig átlagosan 220 (95% CI: 48 – 2100) nap telik el (Busch et al., 2008). Huszonhárom nyomon követett véradó 100%-a bizonyult WNV IgG szeropozitívnak, 17%-a IgM pozitívnak, míg 57%-a IgA pozitívnak egy évvel a fertőzést követően (Busch et al., 2008). Vagyis az IgM ellenanyagok hamarabb eliminálódnak, de esetenként hónapokkal az akut infekció után is kimutathatók, ezáltal megkérdőjelezve az akut nyugat-nílusi vírusfertőzések vérminta IgM pozitivitásán alapuló konfirmálhatóságát. Ezzel szemben a központi idegrendszer érintettsége esetén – amennyiben sor kerül lumbalpunkcióra – a liquor minta WNV IgM pozitivitása igazolja az aktuális nyugat-nílusi vírusfertőzés fennállását. Az IgM ellenanyagok méretükből és pentamer szerkezetükből adódóan nem képesek átjutni a vér-agy gáton, ezért jelenlétük intrathecalis ellenanyagképzésre és akut

neuroinfekció fennállására utal. WNV encephalitis-ben, meningitis-ben szenvedő betegeknél a liquorból IgM ellenanyagok a nyolcadik nap körül mutathatók ki (Prince et al., 2007). Annak eldöntésében, hogy a vérsavó WNV IgM pozitivitása az aktuális vagy előző évi szezonban szerzett fertőzés következménye a WNV IgG aviditásvizsgálat segíthet (Fox et al., 2006). Primer fertőzés fennállásakor alacsony (40% alatti) IgG aviditás alapján valószínűsíthető az aktuális vagy közelmúltban zajlott nyugat-nílusi vírusfertőzés.

2.5. Megelőzés és terápia

A humán nyugat-nílusi vírusfertőzések megelőzésére specifikus módszer, azaz kereskedelmi forgalomban kapható humán használatra is alkalmas védőoltás jelenleg nem áll rendelkezésre és a tünetes fertőzöttek kezelésére is az egyetlen megoldás a szupportív terápia. Az emberi használatra fejlesztett oltóanyagok közül, két, attenuált rekombináns vektor vakcinajelölt bizonyult eddig megfelelő immunogenitásúnak, egy dózis beadását követően. Minkét vakcinajelölt esetén a vírus prM és E fehérjéi expresszálódnak (Saiz, 2020). Ugyanakkor, az eddigi emberben vizsgált összesen hat vakcinajelölt közül, egyik tesztelése sem jutott még el a klinikai III-as fázisig (Saiz, 2020). A védekezés jelenleg egyénileg, aspecifikus úton lehetséges csak, a szúnyogcsípések elleni védekezéssel: megfelelő öltözék viselésével, repellensek használatával. A lovak nyugat-nílusi vírus által okozott megbetegedésének megelőzésére azonban már van lehetőség aktív immunizálással. Európában jelenleg három oltóanyag kapható kereskedelmi forgalomban:

- Equip® WNV (Zoetis): nyugat-nílusi New York 1999/VM-2 (lineage 1) inaktivált vírustörzset tartalmazó vakcina (European Medicines Agency [EMA], 2008).

Rekombináns vakcinák:

- Equilis®Prequenza (MSD Animal Health): Inaktivált kiméra Flavivírus YFV-WNV törzset tartalmazó vakcina (European Medicines Agency [EMA], 2013).
- Proteq® West Nile (Boehringer Ingelheim): nyugat-nílusi láz rekombináns kanárihimlő-vírus tartalmú vakcina (European Medicines Agency [EMA], 2011).

A védőoltás az állatok hat hónapos korától adható (Proteq® vakcina adásakor már 5 hónapos kortól). Az alapimmunizálás két vakcina beadásából áll, 3-5 hetes eltéréssel, mely után az immunitás körülbelül 3 héttel később alakul ki. Az immuntartósság 12 hónap, ezért alapimmunizálást követően évente ajánlott az emlékeztető oltások adása. Az immunizálás alkalmazásával csökkenthető a viraemiás lovak száma nyugat-nílusi vírusfertőzést követően, illetve lineage 2 vírustörzssel történő fertőződéskor a kórlefolyás súlyossága és hossza csökkenthető (Chaintoutis et al., 2015; Lecollinet et al., 2019).

3. Usutu vírus

A *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségének Japán encephalitis szerokomplexéhez tartozó Usutu vírus (USUV) elnevezését a dél-afrikai Szváziföldön található Usutu folyóról kapta, ahol először izolálták a vírust *Culex neavei* szúnyogfajból, 1959-ben (Roesch et al., 2019). Afrikai cirkulációja korábban is ismert volt, például Szenegálban, Ugandában, a Közép-Afrikai Köztársaságban, Nigériában, Burkina Fasóban és Elefántcsontparton (Roesch et al., 2019). Európában először 2001-ben figyeltek fel a kórokozóra, ekkor Bécsben és környékén okozott jelentős madárelhullást a helyi szakályas bagoly (*Strix nebulosa*) és feketerigó (*Turdus merula*) populációban (Weissenböck et al., 2002). Későbbi retrospektív vizsgálatok azonban igazolták, hogy már 1996-ban is jelen volt a vírus Olaszország Toszkána tartományában (Weissenböck et al., 2013). Mára Európában széles körben elterjedt, aktivitása az utóbbi években jelentősen megnőtt, elsősorban Németországban, Franciaországban, Belgiumban és Hollandiában (Vilibic-Cavlek et al., 2020). A vírusnak nyolc genetikai leszármazási vonala (lineage) ismert: Afrika lineage 1-3, valamint Európa lineage 1-5. A madárvonulásoknak köszönhetően az Afrika és Európa között fenntartott cirkuláció miatt, afrikai és különböző európai genetikai vonalak együttes előfordulása is jellemző adott földrajzi területen (Vilibic-Cavlek et al., 2020). A vírus természetes cirkulációja a nyugat-nílusi vírus enzootikus ciklusával egyező, a kórokozó terjesztésében résztvevő legfontosabb szúnyogfajok a *Culex* nemzetséghez tartozó szúnyogok, melyek közül elsődleges vektor a dalos szúnyog vagy *Culex pipiens* (Gaibani et al., 2017). Emellett, a vírus terjesztésében jelentős fajok a *Culex neavei* és *Culex quinquefasciatus*, de kimutatták *Aedes albopictus*-ból is (Roesch et al., 2019). A vírust ritkábban detektálták *Aedes japonicus*, *Aedes vexans*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles plumbeus*, *Coquillettidia richiardii*, *Culiseta annulata*, valamint *Ochlerotatus spp.* fajokból (Roesch et al., 2019). Kullancsokból azonban ezidáig nem sikerült kimutatni (Gaibani et al., 2017). Legfontosabb amplifikáló és rezervoár szervezetei a madarak. Mintegy 35 család 93 faja bizonyult fogékonyak a fertőzésre, a mortalitás azonban kiemelkedő feketerigóban (*Turdus merula*), szakállasbagolyban (*Strix nebulosa*), házi verébben (*Passer domesticus*) és seregélyben (*Sturnus vulgaris*) (Gaibani et al., 2017). Ezen fajokban jellemző a szisztémás fertőzés, melynek eredménye például encephalitis, myocardialis degeneráció, valamint nekrotikus léziók kialakulása különböző szervekben, például a lépben és a májban. A vírus jelentős mortalitást okozott – többek között – Ausztria, Németország és Hollandia madárállományában. Afrikából Európába történő behurcolásában vándorfajok vesznek részt, úgy mint például a vörös vércse (*Falco tinnunculus*), a cserregő nádiposzáta (*Acrocephalus scirpaceus*), a kis poszáta (*Sylvia curruca*), a mezei poszáta (*Sylvia communis*), vagy a kormos légykapó (*Ficedula hypoleuca*) (Gaibani et al., 2017). Más fajok lokális helyváltoztatása a vírus Európán belüli szétterjedését segíti elő. Ilyen fajok például a szarka (*Pica pica*), a házi veréb

(*Passer domesticus*), a bankivatyúk (*Gallus gallus*), vagy a feketerigó (*Turdus merula*) (Gaibani et al., 2017). A nyugat-nílusi vírushoz hasonlóan az USUV is véletlenszerűen fertőzhet emlősöket, azonban bennük megfelelő mértékű viraemia a vírus vektor-közvetítette terjedéséhez USUV esetén sem alakul ki. A vírus igazoltan képes megfertőzni rágcsálókat, denevéreket, lovat, kutyát, szarvast (Gaibani et al., 2017).

Humán kóroki szerepe máig kevésbé tisztázott, az első humán eseteket Afrikában dokumentálták: az 1980-as években a Közép-Afrikai Köztársaságban, illetve 2004-ben Burkina Fasóban (Roesch et al., 2019). Mindkét esetben enyhe megbetegedésről számoltak be, melyben a láz és kiütések megjelenése dominált. Az európai esetismertetésekben azonban már sporadikusan súlyosabb kórlefolyásról is olvashatunk, mint például encephalitis, meningoencephalitis és polyneuritis (Gaibani et al., 2010; Kaic et al., 2014; Pacenti et al., 2019; Pecorari et al., 2009; Santini et al., 2014). Atipikus manifesztációként egyetlen esetben *facialis paralyist* is leírtak (Simonin et al., 2018). Enyhébb kórlefolyás esetén a láz és fejfájás mellett jellemző tünet a myalgia és arthralgia. Szerológia vizsgálatok eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a humán USUV fertőzések mértéke alulbecsült lehet Európában. Olaszországban például egy retrospektív tanulmányban, – melynek keretében 915 beteget vizsgáltak – az USUV szeroprevalencia magasabbnak bizonyult (6,57%), mint a WNV szeroprevalencia (2,96%) (Grottola et al., 2017). Erdészeti dolgozók körében a prevalencia szintén magas: 18%-os volt, míg ezzel párhuzamosan véradók körében végzett hasonló vizsgálat eredménye is 1% körüli szeroprevalenciát igazolt, az észak-olaszországi Lombardiában (Percivalle et al., 2017). A vírus neurotropizmusára utal, hogy elhullott denevérek és madarak agyszövetéből is sikerült kimutatni, illetve szopós egerek intracranialis oltását követően paraplegia és paralysis lép fel, az idegsejtek és gliasejtek apoptózisa, valamint demyelinizáció figyelhető meg. A vírus apoptózist indukál neuronokban, astrocytáknak, microgliasejtekben, valamint neuralis őssejtekben is.

Magyarországon, 2003-tól passzív monitoring program keretében kezdtek USUV irányában is vizsgálatokat végezni, melynek eredményeképpen 2005-ben Budapesten egy elhullott feketerigóból sikerült kimutatni a vírust (Bakonyi et al., 2007). A rákövetkező évben újabb hat elhullott madár bizonyult USUV pozitívnak, egy esetben a vírusizolálás is sikeres volt. Ezt követően 2005 és 2015 között csupán sporadikus eseteket igazoltak a mortalitás háttérében, míg 2016 szezonális időszakában az incidencia növekedése volt tapasztalható. Ekkor 12 elhullott madárból volt kimutatható a vírus: egy szajkó (*Garrulus glandarius*), egy seregély (*Sturnus vulgaris*), és 10 feketerigó (*Turdus merula*) bizonyult pozitívnak (Bakonyi et al., 2017). A növekedés oka lehetett, hogy 2016-ban először mutatták ki a térségben USUV Európa lineage 2 vírustörzs jelenlétét. Korábbi években Európa lineage 1 elterjedése volt jellemző, míg 2016-tól az Európa lineage 2 genetikai vonal vált dominánssá: 2017 és 2018 között 253 vizsgált egyedből 6 madár bizonyult USUV PCR pozitívnak, valamennyi esetben Európa lineage 2 infekciót azonosítottak (Weidinger et al., 2020). Ezzel párhuzamosan, a szomszédos

Ausztriában is Európa lineage 2 cirkuláció volt jellemző, bár emellett 2018-ban Afrika lineage 3 jelenlétét is igazolták (Bakonyi et al., 2017; Weidinger et al., 2020).

A humán USUV esetek azonosításában a nyugat-nílusi vírusról ismertetett diagnosztikai eljárások irányadóak. A kereskedelmi forgalomban kapható diagnosztikai kitek korlátozott hozzáférhetősége miatt egyelőre az *in house* szerológiai és molekuláris biológiai módszereknek nagy jelentőségük van. A fertőzések megelőzésére vagy kezelésére specifikus protokoll jelenleg nem áll rendelkezésre.

4. Kullancsencephalitis-vírus

4.1. A kullancsencephalitis-vírus járványtana

A kullancsencephalitis-vírus felfedezése a Lev Zilber vezetésével Oroszország távol-keleti régiójában folytatott kutatóexpedícióhoz köthető, melynek eredményeképpen 1937-ben izolálták és azonosították a kórokozót, mint a kullancscsípést követően kialakuló encephalitis etiológiai ágensét (Gritsun et al., 2003). Ekkor a megbetegedés még az „orosz tavaszi-nyári encephalitis” nevet viselte, utalva a megbetegedések előfordulásának szezonálisára. A kullancsencephalitis-vírus Európa és Ázsia erdős területein terjedt el. A kórokozó előfordulása a humid mikroklímájú területekhez köthető, mely kedvező környezetet biztosít a terjesztésben résztvevő vektorok elterjedéséhez. A kórokozónak három altípusa (szubtípusa) ismert: a távol-keleti; a szibériai; valamint az európai, amelyek virulenciájukban, így az általuk okozott kórkép súlyosságában és lefolyásában is eltérőek. Az európai szubtípus terjesztésében elsődleges vektor az *Ixodes ricinus* (közönséges kullancs) faj, míg a szibériai és távol-keleti altípusok terjesztésében főleg az *Ixodes persulcatus* (tajga kullancs) vesz részt. A két különböző kullancsfaj életciklusának megfelelően a járványgörbe némi eltérést mutat a különböző szubtípusok esetén. A humán megbetegedések incidenciájának csúcsa követi a vektorok táplálkozási aktivitásának maximumát (Gritsun et al., 2003). Ez az Európában dominánsan előforduló *Ixodes ricinus* esetén két kiugrással jellemezhető: május–június, majd szeptember–október környékén (Egyed et al., 2012). Ezzel szemben, a tajga kullancs táplálkozási csúcsa a tavaszi, kora nyári időszakra tehető (Gritsun et al., 2003). A humán megbetegedések is halmozottan fordulnak elő ebben az időszakban. A legmagasabb incidenciával jellemezhető területek az Urál, Pre-Urál, valamint Szibéria térsége, de a kórokozó endémiás Európa nagy részén is (Gritsun et al., 2003). Leginkább érintett Közép- és Kelet-Európa, a balti valamint északi államok, de az endémiás területek lehúzódnak egészen Észak-Olaszorszáig és a balkáni államokig (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2012). Az *I. ricinus* vektor Közép-Kelet és Észak-Európában fordul elő,

ezért Európa-szerte főleg a vírus európai szubtypusa terjedt el, míg az *I. persulcatus* vektor Oroszországon és Szibérián kívül megtalálható a Baltikumban és Finnországban is, ezért ezeken a területeken két vagy mindhárom szubtypus együttesen is cirkulálhat (Lindquist et al., 2008; Mantke et al., 2008; Süss, 2011). Fontos megemlíteni, hogy az elmúlt évtizedekben a klímaváltozásnak köszönhetően kitolódtak az endémiás területek határai: északabbra és magasabban fekvő területekre húzódtak. Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*) adatait tekintve 2000 és 2010 között a bejelentett humán megbetegedések száma nagyjából stagnált, kisebb kiugrásokat 2003-ban, 2006-ban, majd 2009-2010 között mértek. A tíz éves periódus alatt az esetek 25%-át Csehország, 15%-át Litvánia, 11-11%-át Lettország és Németország, míg 10%-át Szlovénia jelentette (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2012). A bejelentett esetek incidenciája 2012 és 2018 között 0,4-0,6% között mozgott, az Európai Unió és Európai Gazdasági Térség (EEA) országaira vonatkozóan. Az incidenciát országokra és évekre bontva, Litvánia tekinthető a legérintettebb országnak (12,0-21,9 eset/100 000 fő), ezt követi Lettország, Észtország, Csehország és Szlovénia (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2012). Összességében erősen endémiásnak tekinthető Oroszország és a balti államok, de kullancsencephalitis megbetegedések magas számban fordulnak elő Csehországban, Finnországban, Lengyelországban, Magyarországon, Németországban, Svájcban, Svédországban, Szlovákiában, valamint Szlovéniában is (Mantke et al., 2008.). A hazai esetek éves eloszlását a 4. ábra szemlélteti (8.2. fejezet). Figyelemre méltó ugyanakkor Ausztria esete, mivel az országban 1981-ben oltási kampányt indítottak a betegség megelőzése érdekében. Ezt megelőzően a kullancsencephalitis morbiditás itt volt a legmagasabb Európában az évi mintegy 700 esettel (Süss, 2011). A kampányoltásoknak köszönhetően a populáció átoltottsága 6%-ról 84%-ra nőtt 1980 és 2000 között, 2008-ra pedig a lakosság 88%-a részesült legalább egy kullancsencephalitis elleni védőoltásban, 67% pedig a teljes oltási sorozatot megkapta (Süss, 2003; Süss, 2011). Ennek eredményeképpen 1991-ben már csupán 41 esetet, 2004-2008 között pedig átlagosan évi 74 megbetegedést regisztráltak, vagyis az esetszám jelentősen csökkent (Süss, 2003; Süss, 2011).

Magyarországon a kórokozót 1952-ben izolálták először, 1958-óta pedig rendszeresen végeznek laboratóriumi szerológiai diagnosztikai vizsgálatokat (Ferenczi et al., 2005). Be- és kijelentésre kötelezett fertőző betegség (Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo]. 2009). A legtöbb esetet 1981 és 1990 között diagnosztizálták, ekkor az éves esetszám elérte a kb. 300 igazolt megbetegedést is (Ferenczi et al., 2005). Ezzel szemben, 1991 és 2000 között jelentős csökkenés következett be az esetszámban (Süss, 2011). Erre a tendenciára több tényező figyelembevételére adhat magyarázatot, úgy, mint például az 1991-től gyógyszertárakban is elérhető védőoltás, a vírus alacsony prevalenciája (Zöldi et al., 2015), klimatikus vagy egyéb ökológiai faktorok, illetve az 1997-től megváltozott finanszírozási rendszer (Ferenczi et al.,

2005). Azóta a fekvőbeteg osztályokon kezelt páciensek specifikus diagnosztikai vizsgálatának költségei a kórházakat terhelik. Kullancsencephalitis-vírusfertőzés esetén az etiológiai ágens azonosításának nincs terápiás konzekvenciája, csak a differenciáldiagnosztikát és a prognózis megítélését segíti (Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo]. 2009). Mindez rejtett morbiditáshoz vezethet.

A 2000-2010 közötti időszakban összesen 686 megbetegedést regisztráltak, 2004-2008 között évente átlagosan 66 esettel (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2012; Süss, 2003; Zöldi et al., 2013). Az NNK referencialaboratóriumának saját adatait tekintve a 2011-2017 közötti időszakban további csökkenés tapasztalható a laboratóriumilag megerősített esetek számában (átlagosan 34 igazolt megbetegedés évente), miközben a vizsgálatkérések száma nem változott jelentősen az elmúlt időszakban.

Hazánkban leginkább érintettek a Dunántúl térsége bizonyul (Zala, Somogy, Vas megye), de emellett az Északi-középhegységben is kiemelkedő az incidencia (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2012; Süss, 2003; Zöldi et al., 2013).

4.1. A kullancsencephalitis-vírus terjedése

A kullancsencephalitis-vírus terjesztésében résztvevő legfontosabb vektorok az *Ixodidae* családnhoz tartozó *Ixodes ricinus* (közönséges kullancs) és *Ixodes persulcatus* (tajga kullancs) fajok. Előbbi Európa nagy részén elterjedt, ezért a vírus európai szubtypusának terjesztésében számít elsődleges vektornak, míg a tajga kullancs a szibériai és távol-keleti altípusok terjesztésében vesz részt (Mansfield et al., 2009a). Az *I. ricinus* úgynevezett háromgazdás kullancs, vagyis minden fejlődési stádiumban – lárva, nimfa és ivarérett adult példány – néhány napig tartó, egyszeri alkalommal táplálkozik a gazdán, minden fejlődési stádiumban különböző gazdafajokon. A természetben az egyes fejlődési stádiumok hossza akár egy évig is eltarthat, a teljes fejlődési ciklus pedig átlagosan három év alatt fejeződik be, ugyanakkor hossza földrajzi területtől függően 2-6 év között is változhat (Mansfield et al., 2009a). A hosszú élettartam miatt egyrészt a kullancsok a vírus legfontosabb rezervoárjai, másrészt szintén a vektor életsiklusának hosszával magyarázható, hogy a kullancsencephalitis-vírus lassabban evolválódik, mint például a szúnyogok által terjesztett flavivírusok (Lindquist et al., 2008). A kullancs bármely fejlődési stádiumban fertőződhet a vírussal és ezt követően a teljes élettartam alatt fertőzött marad, azaz a vírus átadódik az egyes fejlődési stádiumok között is. Ezt nevezik transz-stadiális vírusátadásnak. A nőtényből a petékbe történő úgynevezett transz-ovariális vírustranzmisszóra is van lehetőség, ez azonban sokkal ritkábban következik be (Lindquist et al., 2008; Mansfield et al., 2009a). A vírus enzootikus ciklusának fenntartásában legfontosabbak a nimfák, a magas abundancia és széles gazdaspektrum miatt. Elsősorban kis erdei emlősökön, madarakon, de akár hullőkökön is táplálkozhatnak. Ezzel

szemben a kifejlett egyed főleg a nagyobb testű emlősöket preferálja. A vírus természetes ciklusának fenntartásában a nimfa stádiumú kullancsok mellett a kis erdei emlősöknek, főleg rágcsálóknak is kiemelt jelentőségük van, mivel a vírusperzisztenciát hosszú ideig, akár egy évig is képesek fenntartani, hozzájárulva a kullancsok közötti vírusátadáshoz. A kis erdei rágcsálók tehát egyben fenntartó és amplifikáló gazdák, valamint rezervoárok is (Mansfield et al., 2009a). Néhány fontosabb rágcsáló faj: *Apodemus flavicollis* (sárganyakú erdeieger), *Apodemus sylvaticus* (erdei egér) és *Myodes* – korábbi nevén *Clethrionomys glareolus* (vöröshátú erdeipocok), mely fajok nagy egyedsűrűségben vannak jelen erdős területeken és a nem kifejlett stádiumú kullancsok gyakran táplálkoznak rajtuk (Labuda et al., 1993). Ezzel szemben a nagyobb testű gazdaszervezetek esetén, mint amilyenek például a madarak, a szarvas, a ló, vagy akár az ember, nem alakul ki hosszan tartó és magas szintű viraemia (Mansfield et al., 2009a).

A kullancs, táplálkozás közben fertőződik a vírussal, mely a szervezetébe jutva a középbél falának sejtjeiben kezd replikálódni. A nyálmirigy sejtjei csak ezt követően fertőződnek, majd következő táplálkozás során ürül a vírus a kullancs nyálával. Ezáltal képes a gerinces gazda fertőződni. Emellett ismert az úgynevezett *co-feeding* jelensége is, mely során fertőzött kullancs képes nem fertőzött egyednek átadni a vírust, miközben ugyanazon gazdán, egymás közvetlen közelében táplálkoznak (Mansfield et al., 2009a). Ezt a jelenséget megfigyelték kullancsok olyan gazdaszervezeten történő táplálkozásakor, amely nem produkált mérhető szintű viraemia-t (Labuda et al., 1993; Labuda et al., 1997).

A kullancsencephalitis-vírus terjedésének egy ritkább, ugyanakkor mára már jól ismert módja az alimentáris fertőzés, mely során a vírus fertőzött állat – kecske, juh, tehén – forralatlan tejének vagy az abból készült tejtermékeknek az elfogyasztása révén kerül a szervezetbe. Kecskék, juhok, vagy tehének a fertőzést követően már 2-3 nappal később üríthetik tejükkel a vírust, akár 3-7 napon keresztül is (Holzmann et al., 2009). Fertőződni pedig nem csak a forralatlan tej, hanem az abból készült tejtermékek, például sajtok fogyasztása révén is lehet. Ausztriában 2008-ban például hat személy kapott kullancsencephalitis-vírusfertőzést, fertőzött kecske tejéből készült sajt elfogyasztását követően. Külön érdekesség, hogy a sajtból, illetve a kecsketej maradékából négy házi sertés is kapott, amelyek szintén fertőződtek a vírussal, bár klinikai tüneteket nem mutattak az állatok (Holzmann et al., 2009). Fertőzött kecske vagy tehéntej fogyasztásához köthető járványok hazánkban is előfordultak az elmúlt években. 2007-ben Lakhegyen 31-en betegedtek meg ugyanazon kecskefarmról származó forralatlan tej fogyasztásától, 2011-ben pedig 11 fertőzés forrásaként azonosítottak fertőzött tehéntejet (Balogh et al., 2010; Caini et al., 2012).

Azoknál a kullancsencephalitis betegeknél, akiket a betegséget megelőző időszakban csípett kullancs, a fertőzés általában valamilyen szabadidős tevékenységhez köthető (Kaiser, 2002). Ugyanakkor vannak kifejezetten olyan foglalkozások, melyeknél fokozott az expozíció, mint például az erdészeti, mezőgazdasági és vadgazdálkodási területhez köthető

szakmák. Ezzel összefüggésben retrospektív tanulmányok és hazai tapasztalatok szerint is, a kullancsencephalitis férfiaknál gyakrabban előforduló megbetegedés (Zöldi et al., 2013).

4.2. A humán kullancsencephalitis-vírusfertőzések klinikuma

Kullancscsípést követően a prodromalis szakaszig – Kaiser és munkatársai 73 személy megfigyelésével végzett tanulmánya alapján – átlagosan 8 napos (4-28 nap) inkubációs idővel számolhatunk. A kullancsencephalitis-vírus európai szubtypusa által okozott megbetegedésekre jellemző az úgynevezett kétfázisos kórlefolyás. Ez a manifeszt esetek 74-87%-ára jellemző (Haglund et al., 2003). Az első, viraemiás fázisban általános vírusfertőzésre jellemző tünetek kialakulása gyakori, mint például: láz, fejfájás, felső légúti tünetek, abdominális tünetek, izomfájdalom, általános gyengeség (Haglund et al., 2003). Ezek az összességében influenza-szerű tünetek viszonylag hamar, 1-7 nap alatt megszűnnek (Kaiser, 2002). Az első fázist néhány napos – átlagosan 7-8 napos – tünetmentes periódus követi, majd ezután alakul ki a sokkal specifikusabb, már neurológiai tünetekkel jellemezhető második fázis (Haglund et al., 2003; Kaiser, 2002). Egyes tanulmányok szerint a második fázis az esetek 20-30%-ában alakul ki (Haglund et al., 2003), míg más források szerint a legtöbb betegnél, akinél jelentkeznek az első fázisú tünetek, kialakul a betegség második fázisa is. Egy 1991 és 2000 között, Németországban végzett vizsgálatban – melyben 850 páciensről voltak elérhetőek klinikai és epidemiológiai adatok – a betegek 47%-ánál alakult ki meningitis, 42%-nál meningoencephalitis, míg 11%-nál meningo-encephalomyelitis (Kaiser, 2002). A második, „meningoencephalitis” fázisban jellemző a magas lázzal kísért erős fejfájás, hányinger és hányás. Encephalitis esetén súlyosabb kórlefolyás jellemző, a tipikus tünetek közé sorolhatók: a láz, fejfájás, meningeális izgalmi jelek, ataxia, kognitív zavarok (mint például koncentrációs és memóriazavar), dysarthria, alternáló tudatállapot, zavartság, tremor, valamint cranialis idegbénulás (Haglund et al., 2003). Görcsrohamok ugyanakkor kevésbé jellemzők. Meningoencephalitis fennállásakor gyakori a tudatvesztés, ataxia, agyideg- és végtagbénulás. Utóbbi ugyanakkor meningo-encephalomyelitis-ben szenvedő betegekhez képest kevésbé gyakori és kevésbé súlyos lefolyású. Az agyidegbénulás általában tranziens, néhány (3-10) napon belül elmúlik, kivéve a halláskárosodást, dysphagiát és dysarthriát, melyek hosszabb ideig, perzisztensen is fennállhatnak. A kullancsencephalitis legsúlyosabb formája a meningo-encephalomyelitis, melyben a tudatvesztés sokkal súlyosabb, jellegzetes tünet a flaccid paralysis, mely lehet mono- vagy tetraparesis, de kialakulhat az alsó végtagok paraparesise is (Kaiser, 2002). Az agyidegbénulás nagyobb arányban és súlyosabb formában jelentkezik. Gyakori lehet a végtagremegés, mely főleg, mint intenciós tremor jelentkezik, a nyugalmi tremor kevésbé jellemző (Kaiser, 2002). A kullancsencephalitis-vírus európai szubtypusa esetén a mortalitási ráta 1-2% körüli (Mansfield et al., 2009b).

Klinikai cytológiai és kémiai laboreredményekben a betegség kezdeti, viraemiás fázisában tipikus eltérés a thrombocytopaenia, leukopaenia, emelkedett CRP (C-reaktív protein) szint, a későbbi meningoencephalitis során ugyanakkor már a leukocytosis jellemző (Lotrič-Furlan et al., 1995). Szintén jellegzetes laboreltérés a liquorban mérhető emelkedett sejtszám (pleocytosis), melynek értéke a 6 és 1200 sejt/μl közötti tartományba esik (Kaiser, 2002). Abnormális értékű liquor protein koncentráció gyakrabban mérhető meningoencephalitisben és meningo-encephalomyelitisben szenvedő betegeknél. Általánosságban a liquor emelkedett fehérje szint és pleocytosis tipikus eltérésnek tekinthető. Kullancsencephalitis-es betegeknél a liquor/szérum albumin koncentráció gyakran utal a vér-agy gát intenzív sérülésére, melynek eredménye a vér-agy gát fokozott átteresztőképessége. Egy német tanulmányban például a betegek 79%-ánál tapasztaltak ilyen eltérést (Haglund et al., 2003).

A hosszútávú morbiditás sem elhanyagolható, a visszamaradó tünetek kihatással vannak a betegek későbbi életminőségére. Retrospektív tanulmányok adataira hagyatkozva mind a prognózist, mind pedig a perzisztens tünetek kialakulását befolyásolja a beteg életkora, valamint, hogy a betegség akut fázisa alatt milyen mértékű a tudatvesztés. A klinikai kórlefolyás súlyosságát fokozza a neutralizáló ellenanyagok szubprotektív szintje, az inadekvát humorális immunválasz, valamint, ha a betegség korai fázisában az intrathecalis IgM válasz alacsony szintű marad (Kaiser et al., 2000). Súlyos maradványtünetek például az ataxia, tremor, fejfájás, sensorineuralis halláskárosodás, dysphagia, paresis, egyensúly- és koordinációs zavarok, illetve egyéb neuropszichiátriai tünetek fennállása (Kaiser et al., 2000). Gyermekeknél általában jobb prognózisra számíthatunk, míg az idősebb életkor vagy immunszupprimált állapot hajlamosít a súlyosabb kórlefolyásra és maradványtünetek kialakulására.

4.3. Kullancsencephalitis-vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikája

A humán kullancsencephalitis-vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikája során fontos figyelembe venni az európai szubtípus által okozott jellegzetes kétfázisú kórképet. A néhány napos inkubációs periódust követő aspecifikus tünetekkel kísért első fázis után körülbelül egy hét tünetmentes időszak után jelentkeznek a súlyosabb idegrendszeri tünetek. A viraemia az első fázisra tehető, ezáltal a direkt víruskimutatásra irányuló (PCR, vírusizolálás) eljárások csak ezen szűk időintervallumban alkalmazhatók, amikor a betegek többsége még nem fordul orvoshoz panaszával (Fox et al., 2006). A neuroinvazív esetekben, a beteg kórházi felvételének időpontjára a vírus már eliminálódik a szervezetből. Liquor mintákból nem, korai vérsavó vagy teljes vérmintákból néhány esetben – szerokonverzió előtt vett minták vagy IgM pozitív és IgG negatív betegek mintái – sikerült csak kimutatni a vírust (Saksida et al., 2005; Saksida et al., 2018; Veje et al., 2018). A szakirodalomban összesen két tanulmányban olvasható, hogy vizelet mintából sikerült a kullancsencephalitis-vírus nukleinsavát kimutatni.

Ugyanakkor a három betegből két páciens immunszupprimált volt, az ő esetükben nem meglepő a perzisztens fertőzés (Caracciolo et al., 2015; Veje et al., 2014). Az olasz esetismertetésben (Caracciolo et al., 2015) érdekesség, hogy nem csupán a beteg vizeletéből, hanem vérmintáinak szeparálását követően az erythrocyta frakcióból is hosszabb ideig sikerült detektálni a vírus RNS-ét (Caracciolo et al., 2015).

Ellentétben tehát más vírusfertőzésekkel, kullancsencephalitis esetén a neurológiai tünetes fázisban – hacsak a beteg nem immunszupprimált – a PCR vizsgálat már nem megbízható módja a rutin diagnosztikának. Az idegrendszeri tünetek megjelenésekor ugyanakkor többnyire már beindul a humorális immunválasz, a betegek többségénél mind IgM, mind pedig IgG ellenanyagok kimutathatók (Holzmann, 2003). Liquor mintából az IgM típusú ellenanyagok a betegség kezdetétől számítva legkésőbb a 10. napon detektálhatók (Holzmann, 2003). Vérmintában az IgM és IgA ellenanyagok akár hónapokkal az akut fertőzést követően is jelen lehetnek, az IgG ellenanyagok pedig élethossziglan perzisztálnak (Holzmann, 2003). Szérumban és liquorban a kullancsencephalitis-vírus specifikus IgG reaktivitás maximuma a hatodik hét környékén mérhető (Günther et al., 1997). Nyomon követéses vizsgálatok tapasztalata szerint szérum minta IgG reaktív eredményt adott a tünetek kezdete utáni 3. napon, a betegek 86%-ánál, a 9. napon pedig már 97%-nál (Günther et al., 1997). Hat héttel és egy évvel az akut tünetek után a betegek 100%-a bizonyult IgG szeropozitívnak (Günther et al., 1997). Liquor mintában az ellenanyagválasz kicsit később éri el a kimutathatósági határt: a tünetek kezdetétől számított 3. napon a betegek 23%-ának, a 9. napon 84%-ának, a hatodik héten 95%-ának, egy évvel a megbetegedés után pedig már csak 52%-ának a liquor mintája bizonyult IgG pozitívnak (Günther et al., 1997). Az IgM ellenanyagválasz kinetikájában hasonló tendencia figyelhető meg, összességében az intrathecalis IgG és/vagy IgM válasz maximuma a 9. nap és hatodik hét között mérhető (Günther et al., 1997). *Günther és munkatársainak* érdekes és diagnosztikai szempontból fontos eredménye, hogy a vizsgált liquor minták 22%-a IgM pozitív volt egy év elteltével is. A szérum IgA aktivitás maximuma szintén a hatodik hét környékére tehető és sok esetben egy évvel a fertőzés után is kimutathatók IgA ellenanyagok (Günther et al., 1997). Az esetenként hosszú ideg perisztáló IgM és IgA ellenanyagok miatt az IgG aviditásvizsgálat segítheti az akut vagy közelmúltban zajlott fertőzések elkülönítését (Gassmann et al., 1997), ugyanakkor az eredmények véleményezésekor mindig figyelembe kell venni a kullancsencephalitis oltási anamnézist. Oltás ellenére bekövetkező fertőzéskor ugyanis – amellet, hogy az IgG ellenanyagok a tünetek kezdetekor is magas titerben detektálhatók, az IgM megjelenése pedig ezzel szemben késleltetett – már a korai, első fázisú mintában is magas IgG aviditás mérhető (Stiasny et al., 2009).

4.4. Megelőzés és terápia

A humán kullancsencephalitis-vírusfertőzések megelőzésének leghatékonyabb módja az aktív immunizálás, amit azért is érdemes hangsúlyozni, mert célzottan kullancsencephalitis-vírus specifikus terápiára jelenleg nincs lehetőség. A szupportív, tüneti kezelés az egyetlen módja a kullancsencephalitisben szenvedő betegek kezelésének (Taba et al., 2017).

A kullancsencephalitis védőoltás formalinnal inaktivált, teljes vírust tartalmazó vakcina, melyet a kórokozó csirkeembrió sejtvonalon történő szaporításával állítanak elő (Taba et al., 2017). Jelenleg négy vakcina kapható kereskedelmi forgalomban. Ezek közül a Pfizer gyógyszercég által gyártott FSME-Immun és a GlaxoSmithKleine cég által forgalmazott Encepur a kullancsencephalitis-vírus európai szubtypusát (Neudörfl és K23 törzsek) tartalmazzák (Taba et al., 2017). Ezzel szemben az Oroszországban forgalmazott TBE-Moscow és EnceVir® oltóanyagokat a vírus távol-keleti szubtypusához tartozó vírustörzsek (Sofjin és TBEV-Fe 205) felhasználásával állítják elő (Taba et al., 2017). Utóbbi két vakcinára az Európai Gyógyszerügynökség nem adott Európai Unión belüli forgalomba hozatali engedélyt. Az Európában kapható oltóanyagoknak létezik kisebb dózisú – 0,5 ml helyett 0,25 ml szuszpenziót tartalmazó – változata is, melyet az 1 és 15 év közötti gyermekek részére ajánlanak. Ezek az FSME-Immun Junior® és az Encepur-K® oltóanyagok (World Health Organization [WHO], 2011). Az alapimmunizálás három vakcina beadásából áll, ahol az első két vakcina adása között 1-3 hónap, míg a második és harmadik vakcina adása között 9-12 hónap telik el. Az első *booster* oltást 3 év múlva javasolt beadatni. Ezt követően a hosszantartó védettség kialakítása érdekében a vakcinagyártók javaslata az emlékeztető oltások rendszeres adása: FSME-Immun vakcina esetén: 60 éves korig 3-5 évente, majd 60 éves kor felett 3 évente. Ettől az Encepur oltási sémája kis mértékben eltér: 49 éves korig 5 évente, 49 éves kor felett pedig 3 évente javasolt az ismétlődő oltásokat beadatni (Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo], 2016). Mindkét vakcina esetén létezik egy úgynevezett gyorsított alapimmunizálási séma is: FSME-Immun alkalmazásakor a 0., 14. nap majd a 6-12. hónap, míg Encepur oltóanyag adásakor a 0., 7. nap és a 21. nap a három vakcina adásának ajánlott időpontja (Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo], 2016). A normál és gyorsított séma között hatékonyságban nincs különbség (World Health Organization [WHO], 2011). Összességében a kullancsencephalitis védőoltások immunogenitás és effektivitás szempontjából megfelelőnek bizonyultak. *Demicheli és munkatársai* 2009-ben közölt összefoglalója szerint a szerokonverzió 87% fölötti volt minden esetben (Demicheli et al., 2009). Közleményükben 8184 résztvevővel és különböző kullancsencephalitis védőoltások tesztelésével végzett, összesen 11 korábbi vakcinakísérlet eredményeit összegezték. A védőoltás kullancsencephalitis megelőzésében nyújtott hatékonyságát mi sem bizonyítja jobban, mint Ausztria példája, ahol komoly vakcinációs kampányt végeztek 1981-től kezdődően: 1981 és 2001 között a populáció áttoltottsága 6%-ról 86%-ra – egyes

hiperendémiás területeken 90% fölé – nőtt, ezzel párhuzamosan pedig jelentősen csökkent a megbetegedések száma (Kunz, 2003). Kunz és munkatársai a védettség mértékét három vakcina beadását követően 96-98,7%-osra becsülték (Kunz, 2003). Egy 2000 és 2006 között végzett átfogó osztrák tanulmány megerősítette korábbi eredményeiket, mivel e szerint a vakcina hatékonysága 99% körülire tehető (Heinz et al., 2007). A kifejezetten magas százalékos értékek ellenére 100%-os hatékonyság sosem érhető el, ennek megfelelően kullancsencephalitis esetén is leírtak már oltás ellenére bekövetkező fertőződést, bár ezek előfordulása ritka és általában az idősebb korosztályt érinti (Taba et al., 2017). Az ilyen úgynevezett „*vaccine breakthrough*” esetek hátterében számos tényező állhat, mint például nonreszponzibilitás az adott antigénnel szemben, az antigenitás elvesztése a vakcina nem megfelelő tárolásának következtében, megszakított alapimmunizálás vagy rendszertelen vakcinciót követően bekövetkező fertőződés (Stiasny et al., 2009). Az egyes szubtypusok közti genetikai és antigénszerkezetbeli hasonlóságnak köszönhetően a különböző szubtypusú vírust tartalmazó vakcinák keresztvédettséget adnak. Bár kevés klinikai evidencia áll rendelkezésre, *in vitro* vírusneutralizációs vizsgálatokban, a neutralizációs titerek összehasonlításával igazolták a keresztimmunitás fennállását (Orlinger et al., 2011). Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy korábban nem oltott személyek esetén kullancscsípést követően nem ajánlott posztexpozíciós profilaxisként alkalmazni a védőoltást. Egyrészt az inkubációs idő hossza nem teszi lehetővé a megfelelő immunitás kialakulását a klinikai tünetek megjelenéséig, másrészt kullancsencephalitis-vírusnál éppen a szubprotektív ellenanyag-szint miatt nőhet meg az úgynevezett ADE (ADE: *antibody-dependent enhancement of infectivity*), azaz ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás veszélye is. Szintén az ADE miatt ma már a kullancscsípést követő passzív immunizálás, azaz kullancsencephalitis-vírus specifikus immunglobulin adása sem javallott (World Health Organization [WHO], 2011).

A kullancsencephalitis-vírusfertőzések megelőzésének egy sokkal kevésbé specifikus módja a kullancscsípés elleni védekezés, például kiránduláskor megfelelő, zárt öltözet viselésével. Csípés esetén pedig ajánlott a kullancsot mielőbb eltávolítani.

5. Ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás (ADE)

A humán flavivírus fertőzések kapcsán mind az átfedő endémiás területek, mind pedig az immunizációs stratégiák szempontjából fontos kiemelni az ellenanyag-függő fertőzés-fokozódás, azaz ADE jelentőségét, amelyet elsősorban Dengue vírushatások kapcsán tanulmányoztak, és azon a megfigyelésen alapult, hogy a sekunder fertőzés lefolyása általában súlyosabb, mint a primer infekció (Pierson et al., 2007). A jelenség nemcsak Dengue vírusra, hanem a *Flavivirus* nemzetség többi tagjára is jellemző (Halstead, 2003; Rey et al., 2018) ADE során a flavivírusok Fcγ receptor mediáltan – azaz vírusreceptortól függetlenül – kapcsolódnak a target sejtekhez. A folyamatot olyan ellenanyagok váltják ki, melyek szubneutralizáló koncentrációban vannak jelen a szervezetben, vagy képesek ugyan a vírus felszínéhez kötődni, de nem képesek a kórokozót neutralizálni. Utóbbira példa a flavivírusok prM fehérjéjére vagy az E felszíni glikoprotein fúziós loop-jára specifikus antitestek, melyekkel kapcsolatban igazolták *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is, hogy fontos fertőzés fokozó hatásuk van (Rey et al., 2018). Emellett, az ADE lehetősége szóba jöhet heterológ flavivírussal történő sekunder infekció esetén is. Összességében az antitest-vírus komplex az Fcγ receptort expresszáló sejtek – például macrophagok és monocyták – felszínéhez kötődve, receptor-mediált endocitózissal jut be a sejtekbe (Halstead, 2003; Takada et al., 2003). Ez fokozza a vírusreplikációt és ezáltal a viraemia mértékét, ami súlyosabb kórlefolyáshoz vezethet. Az ADE kapcsán fontos megemlíteni, hogy például a kullancsencephalitis-vírushatások megelőzésében nem csak a passzív immunizálás kerülendő, hanem az alapimmunizálás első két oltását is érdemes lehetőség szerint a kullancsok tavaszi aktivitása előtti időszakra időzíteni, ugyanis ekkor az ellenanyag-válasz még nem biztos, hogy eléri a megfelelő szintet (Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo], 2016). Az alapimmunizálás teljes egészét az oltási séma időpontjai miatt nem lehetséges kizárólag a fertőzésveszély-mentes hónapokra ütemezni.

6. A kutatás célkitűzései

A doktori munka célja a hazánkban endémiás zoonotikus flavivírus fertőzések mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikájának bővítése, elsősorban új diagnosztikai módszerek bevezetésével.

1. Víruskimutatásra irányuló módszerek bevezetése a rutin diagnosztikába:

- a. A kullancsencephalitis és nyugat-nílusi vírus specifikus PCR vizsgálatok fejlesztése és bevezetése a referencialaboratórium rutin diagnosztikai módszertanába.
- b. A szerológiai vizsgálatok alapján aktuálisan fertőzött betegek különböző mintatípusainak vizsgálata PCR módszerrel, annak megállapítása érdekében, hogy mely mintatípus alkalmas PCR diagnosztikai vizsgálatokhoz.
- c. A PCR pozitív minták szekvenálása, majd a szubtípus és/vagy lineage meghatározása filogenetikai módszerekkel.
- d. Vírusizolálás elvégzése a PCR pozitív betegek mintáiból.

2. Nyugat-nílusi vírus nyomon követéses vizsgálatok elvégzése:

- e. A PCR pozitívitás hosszának meghatározása kórházi kezelésre szoruló páciensek vizeletmintáiban, majd a PCR pozitív vizeletmintákból vírusizolálás elvégzése.

3. A 2018. évi nyugat-nílusi vírus járvány mikrobiológiai tapasztalatainak összegzése:

2018-ban Európa-szerte jelentősen megemelkedett a bejelentett WNND és WNF esetek száma. Összehasonlítva a 2017-es évi WNV szezonnal, 7,2-szeres növekedést tapasztalhattunk. Európában a bejelentett humán megbetegedések számában Magyarország kiemelkedő helyen állt. A jelentősen megnőtt esetszám nagy mennyiségű klinikai minta mikrobiológiai vizsgálatát tette lehetővé:

- f. Elsődleges célunk a vizeletminták mellett az alvadásgátolt teljes vérminták nyugat-nílusi vírus PCR vizsgálatának bevezetése és a két mintatípus vizsgálatával kapott eredmények összehasonlítása volt.
- g. A differenciáldiagnosztikai kapacitás bővítése érdekében további célunk volt Usutu vírus specifikus PCR és szerológiai módszerek bevezetése, majd a 2018-as WNF és WNND betegek mintáinak retrospektív vizsgálata.

4. Egészséges véradók szerológiai vizsgálata a nyugat-nílusi vírus szeroprevalencia megállapítása érdekében:

- h. Mivel a magyarországi humán populációban aktuális nyugat-nílusi vírus szeroprevalencia adatok nem ismertek, a doktori munka 4. célkitűzése 2112 egészséges véradó szerológiai vizsgálata volt, az anti-WNV IgG szeropozitivitás arányának meghatározása érdekében. A vizsgálat az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) Konfirmáló Laboratóriuma és az NNK Virális Zoonózisok Nemzeti Referencialaboratóriuma közötti szakmai együttműködés keretében történt. A véradók szerológiai szűréséhez szükséges etikai engedély hivatkozási száma: **IKME-ált/00919-2/2017** (Országos Epidemiológiai Központ; 2017.03.31.).

7. Anyagok és módszerek

7.1. Molekuláris biológiai módszerek: PCR diagnosztika és szekvenálás

A doktori munkához felhasznált vizsgálati mintatípusok az alábbiak voltak: vérsavó vagy vérplazma, gerincvelői folyadék, vizelet, valamint 2018-tól kezdődően alvadásgátolt teljes vérminta. A PCR vizsgálatokat nukleinsav kivonás és reverz transzkripció előzte meg.

Nukleinsav kivonás:

Manuális nukleinsav kivonáshoz az alábbi kereskedelmi forgalomban kapható kitéket használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen; Hilden, Németország; katalógusszám: 52904 és 52906), valamint: High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Life Science; Bázél, Svájc; katalógusszám: 11858882001). A két nukleinsav kivonó kit érzékenységet összehasonlítottuk, melyről validálási jegyzőkönyv készült.

Reverz transzkripció:

A PCR vizsgálatokat két lépésben végeztük, a reverz transzkripció által kapott cDNS-t (cDNS; complementary DNA: komplementer DNS) a későbbiekben különböző PCR vizsgálatokhoz használtuk fel. A reverz transzkripció összemérési protokollja, valamint a reakció hőprofilja az 1. és 2. táblázatokban olvasható.

1.táblázat: A reverz transzkripció összemérési protokollja.

Anyagok/reagensok megnevezése	Gyártó	Katalógusszám	Összemérés 1x térfogatra (µl)
RNáz/DNáz mentes ultratiszta desztillált víz	GIBCO™	10977-015 (10977035)	1,0
GeneAmp 10x PCR Puffer	Applied Biosystems™	N8080006 (1x1.5 ml) vagy N8080129 (6x1.5 ml)	2,0
25 mM MgCl ₂	Applied Biosystems™	N8080161	4,0
dNTP mix (10 mM)	Applied Biosystems™	N8080260	8,0
Random hexamer (50 µM)	Invitrogen™	N8080127	1,0
RNáz inhibitor (20 U/µl)	Applied Biosystems™	N8080119	1,0
MuLV reverz transzkriptáz (50 U/µl)	Invitrogen™	N8080018	1,0
RNS mennyiség	-----	-----	5,0

2.táblázat: A reverz transzkripció hőprofilja.

Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
42	30	1
99	5	1
5	5	1

A diagnosztikai vizsgálatokhoz alkalmazott hidrolízis próbás vagy TaqMan real-time

PCR:

A vizsgálatokhoz használt készülék: LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Life Science; Bázél, Svájc; katalógusszám: 03531414001). A real-time PCR reakcióelegy összemérése a reagens gyártó javaslata alapján történt (LightCycler® TaqMan® Master, Roche Life Science; Bázél, Svájc; katalógusszám: 4535286001). Az egyes vírusok kimutatásakor a PCR mix különbségét az eltérő primerek és próbák hozzáadása jelentette, melynek megfelelően a reakció hőprofilja is különbözött. Az eltérő oligonukleotid szekvenciákat és a reakciók hőprofilját a 3. és 4. táblázat ismerteti.

3.táblázat: Az egyes vírusok kimutatásához használt primerek és TaqMan próbák. Az eredeti közlemények hivatkozása – melyekből a primer és próba szekvenciák származnak – az adott vírus neve mellett olvashatók a táblázatban.

Vírus:	WNV (5'- 3') (Linke et al., 2007)	5' Reporter	3'Quencher ¹	Target régió
Forward primer	CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT	-	-	5' UTR és capsid
Reverz primer	GCGTTTTAGCATATTGACAGCC	-	-	
TaqMan próba	CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCTCGTGC	6-FAM	ZEN™ / Iowa Black FQ	
Vírus:	TBEV (5'- 3') (Brinkley et al., 2008)	5' Reporter	3'Quencher	Target régió
Forward primer	TGGGCGGTTCTTGTCTCC	-	-	3' UTR
Reverz primer	TCACACATCACCTCCTTGTCAGA	-	-	
TaqMan próba	CTGAGCCACCATCACCCAGACACAG	6-FAM	TAMRA	
Vírus:	USUV (5'- 3') (Nikolay et al., 2014)	5' Reporter	3'Quencher	Target régió
Forward primer	CAAAGCTGGACAGACATCCCTTAC	-	-	5'UTR
Reverz primer	CGTAGATGTTTTAGCCACGT	-	-	
TaqMan próba	AAGACATATGGTGTGGAAGCCTGATAGGCA	HEX	ZEN™/Iowa Black™ FQ	

4.táblázat: Az egyes vírusok kimutatásához optimalizált real-time PCR-ek hőprofilja.

Vírus	Hot-start Taq polimeráz aktiválás és kezdeti denaturáció	Denaturáció	Anelláció	Elongáció	Hűtés
WNV	95°C; 10 min	95°C; 15 sec	60°C; 30 sec	72°C; 60 sec	40°C; 30 sec
TBEV	95°C; 10 min	95°C; 15 sec	60°C; 45 sec	72°C; 15 sec	40°C; 30 sec
USUV	95°C; 10 min	95°C; 15 sec	54°C; 40 sec	72°C; 20 sec	40°C; 30 sec
Ciklusszám	1	45			-
Detektálás	nincs	nincs	nincs	egyszeri	-

¹ Az IDT által szintetizált „ZEN” elnevezésű próbák a 3' quencher mellett tartalmaznak egy ún. internális quenchert is. Ezáltal a kioltás hatékonyabb, a háttérzaj csökkenthető, az ún. „double quenched” próbák alkalmazása multiplex PCR rendszerekben előnyös. 2019-től a WNV és USUV real-time PCR-t multiplex formában is alkalmazzuk. Rövidítések: **6-FAM:** 6-Carboxyfluorescein; **HEX:** Hexachloro-Fluorescein; **TAMRA:** tetramethylrhodamine; **UTR:** untranslated region (nem-transzlálódó régió).

Konfirmáláshoz alkalmazott nested PCR:

A real-time PCR vizsgálatban pozitív mintákat nested PCR módszerrel konfirmáltuk, majd a PCR termékeket Sanger-féle láncterminációs módszerrel szekvenáltuk. A nested PCR kiindulási alapját a fentebb ismertetett módon szintetizált cDNS képezte. A vizsgálatokhoz MyTaq™Red Mix (Meridian Bioscience; Cincinnati, OH; Egyesült Államok; katalógusszám: BIO-25043) PCR master mix-et használtunk, a gyártó javaslatainak megfelelő hőprofil alkalmazva, az anellációs hőmérsékletet primer páronként optimalizálva. 2018-tól kezdődően a Meridian Bioscience új, egylépéses master mix termékének használatára tértünk át: MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit (Meridian Bioscience; Cincinnati, OH; Egyesült Államok; katalógusszám: BIO-65049). Ennek megfelelően a reverz transzkripció és az első körű PCR egylépésben zajlott, ezt követte a második vagy *nested* PCR, melyhez ismételt MyTaq™Red Mix-et használtunk. Az új protokollban a reverz transzkripciót random hexamer primerek helyett az első körű génspecifikus primerekkel végeztük. Az új protokoll bevezetése megfelelő érzékenység mellett rövidítette az egyébként időigényes munkafolyamatot. Az egyes vírusok kimutatására több konfirmáló nested PCR protokollt is bevezettünk, szakirodalomban publikált primerek és saját tervezésű primerek segítségével. A MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit és MyTaq™Red Mix használatakor a gyártó által javasolt általános összemérési protokollt és hőprofilot követtem. A hozzáadott oligonukleotid mennyisége és koncentrációja, az anellációs hőmérséklet, illetve a templát nukleinsav mennyisége változott protokollonként. A 5. táblázat összegzi az egyes primereket közlő szakcikkek hivatkozásait és target genomi régiókat. Saját tervezésű primerek esetén a pontos szekvenciákat is ismertetem (5. táblázat).

5.táblázat: A konfirmáló nested PCR vizsgálatokhoz használt primerek. (nt: nukleotid).

Vírus	Target genomi régió	Hivatkozás/saját tervezésű primerek esetén a szekvencia (5' - 3')	PCR ampikon hossza
WNV	NS3	(Chaskopoulou et al., 2011) és (Savini et al., 2012)	Nested: 424 nt
TBEV	5'UTR	(Schrader et al., 1999)	Nested: 149 nt
TBEV	NS5	(Puchhammer-Stöckl et al., 1995)	Nested: 239 nt
TBEV	Capsid és Membrán fehérjéket kódoló régió	KEVf1: CTTAGGAGAACAAGAGCTGGG	490 nt
TBEV		KEVr1: TCATCACACCATGACCCCAT	
TBEV		KEVf2: CGACGAGTGTGCGAAAGAGACCG	385 nt
TBEV		KEVr2: GCCAGGATCACACAGGTGCCAT	
TBEV	NS1 és NS2	KEV10F: TGTGACACAGGAGTGATGG	692 nt
TBEV		KEV10R: CACTGCCACCACATAGCGCAC	
TBEV		KEV20F: CTGAGGAACTGCTCATGGCC	433 nt
TBEV		KEV20R: CACAAACAATGCCACTATTCC	
USUV	NS5	UsuF1: TCCTGAAGTACAGGAAAGAGGC	478 nt
USUV		UsuR1: CGTGGCATGTATGGGCAGAGA	
USUV		UsuF2: GCCATCACTGAAGTCGACCGGT	434 nt
USUV		UsuR2: GGTCCTCTCTGCAGCCAATCAGA	

A nested PCR vizsgálatok eredményét agaróz gélelektroforézis segítségével értékeltük, melyhez a PCR termékekből 10,0 µl mennyiségeket mértünk be az agaróz gél zsebeibe.

Pozitív eredmény esetén a fennmaradó térfogatot Sanger-féle láncterminációs szekvenáláshoz készítettük elő.

Sanger-féle láncterminációs szekvenálás:

A szekvenálás előkészítéséhez első lépésben a PCR amplikonok tisztítását végeztük el, melyhez a PCR Advanced PCR Clean Up System (Viogene Biotek Corp.; New Taipei City, Tajvan; katalógusszám: PF2002) extrakciós kitet használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. Ezt követte a láncterminációs PCR, melynek összemérési protokollját és hőprofilját a 6. táblázat összegzi. A szekvenálást mindkét irányból végeztük.

6.táblázat: A láncterminációs PCR összemérési protokollja és hőprofilja.

Anyagok/reagensek megnevezése	Gyártó	Katalógusszám	Összemérés 1x térfogatra (µl)
RNáz/DNáz mentes ultratiszta desztillált víz	GIBCO™	10977-015 (10977035)	5,0
BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems™	4336697	2,0
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™	4337454	1,0
Forward/Reverz primer (5,0 µM)	Integrated DNA Technologies	-	1,0
Templát DNS	-	-	1,0
Végtérfogat:	-	-	10,0
Hőprofil:	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	96 °C	60 sec	1
Denaturáció	96 °C	10 sec	25
Anelláció	50 °C	5 sec	
Elongáció	60 °C	240 sec	

A láncterminációs PCR-t a reakciótermék tisztítása követte, melyhez a BigDye XTerminator™ Purification Kit-et (Applied Biosystems™; Foster City, CA; Egyesült Államok; katalógusszám: 4376484) használtuk, a reakció komponenseinek összemérését a gyártó javaslatai szerint végeztük.

A már szekvenáló lemezben (*plate*) összemért elegy rázatása: 2500 rpm-en 40 percig történt. Ezt követően a plate-et centrifugáltuk 10000-es fordulatszámon 2 percig. A kapilláris elektroforézis alapú szekvenáláshoz 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™; Foster City, CA; Egyesült Államok; katalógusszám: 4440462) készüléket használtunk.

Új-generációs szekvenálással (NGS: next generation sequencing) végzett teljes genom meghatározás:

A 2014-ben, Magyarországon elsőként humán mintából kimutatott WNV teljes genom szekvenálását is elvégeztük, egyetlen betegminta esetén. A teljes genom szekvenálását a Magyar Tudományos Akadémia (MTA) Agrártudományi Kutatóközpont – Állatorvos-tudományi Intézet (ÁOTI) új kórokozók felderítése témacsoportjának munkatársaival együttműködésben

végeztük. Az amplikon-alapú szekvenálás előkészítését jelentő reverz transzkripció PCR protokollját a 7 – 8. táblázatok foglalják össze.

7.táblázat: Az NGS előkészítéséhez alkalmazott reverz transzkripció protokollja.

Anyagok/reagensek megnevezése	Gyártó	Katalógusszám	Összemérés 1x térfogatra (µl)
RNáz/DNáz mentes ultratiszta desztillált víz	GIBCO™	10977-015 (10977035)	5,0
5X „first-strand” puffer	Invitrogen™	18080-044	5,0
DTT (100 mM)	Invitrogen™	18080-044	1,0
dNTP mix (10mM)	Applied Biosystems™	N8080260	1,0
Random hexamer (50 µM)	Invitrogen™	N8080127	1,0
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µL)	Thermo Fisher Scientific™	EO0381	1,0
SuperScript® III Reverz Transzkriptáz (200 U/µl)	Invitrogen™	18080-044	1,0
RNS	-	-	5,0
Végtérfogat	-	-	20,0
Hőprofil:	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti inkubáció	25 °C	10 min	1
Reverz transzkripció	50 °C	30 min	1
Inaktiválás	70 °C	15 min	1

A reverz transzkripció eredményeként kapott cDNS-en RNase-H emésztést végeztünk [RNase H (5 U/µl), Thermo Fisher Scientific™; Waltham, MA; Egyesült Államok, katalógusszám: EN0201], a gyártó által javasolt protokollt követve. A teljes genomot 12 átfedő fragment által amplifikáltuk (8. táblázat), melyhez 24 primert terveztünk. A primerszekvenciákat az I. számú melléklet tartalmazza.

8.táblázat: A genomi fragmentek amplifikálásához használt PCR protokollja.

Anyagok/reagensek megnevezése	Gyártó	Katalógusszám	Összemérés 1x térfogatra (µl)
RNáz/DNáz mentes ultratiszta desztillált víz	GIBCO™	10977-015 (10977035)	14,5
5X Phusion Green HF Buffer	Thermo Fisher Scientific™	F534L	5,0
DMSO	Thermo Fisher Scientific™	F534L	0,75
dNTP mix (10mM)	Applied Biosystems™	N8080260	0,5
Forward primer (20 µM)	Integrated DNA Technologies	-	0,5
Reverz primer (20 µM)	Integrated DNA Technologies	-	0,5
Phusion DNA Polymerase, 2 U/µl	Thermo Fisher Scientific™	F534L	0,25
cDNS	-	-	3,0
Végtérfogat	-	-	25,0
Hőprofil:	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
Kezdeti denaturáció	98°C	30 sec	1
Denaturáció	98°C	10 sec	35
Anelláció	69 °C	30 sec	
Elongáció	72 °C	90 sec	
Végső elongáció	72 °C	10 min	1

A megfelelő méretű PCR amplikonok jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az Ion Torrent készüléken (Ion Personal Genome Machine® [PGM™]; Life Technologies, Carlsbad, CA; Egyesült Államok) végzett szekválásához szükséges további munkafolyamatokat az MTA ÁOTI kutatócsoportja végezte, ezért az értekezésben nem kerülnek részletes ismertetésre. Az NGS eredményeképpen előállított konszenzus szekvenciát Dr Bányai Krisztián témacsoport vezető bocsátotta rendelkezésünkre.

A szekvenciák értékeléséhez használt szoftverek:

1. A kromatogramok szerkesztéséhez a **FinchTV 1.4.0** szoftvert használtuk.
2. A szekvenciák azonosítása a **NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool;** <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) felületen történt. (NCBI: **National Center for Biotechnology Information;** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
3. Többszörös szekvencia illesztéshez az alábbi online felületeket használtuk:
 - **Multalin:** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
 - **MUSCLE: MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation;** <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
4. A többszörösen illesztett szekvenciák szerkesztése a **GeneDoc 2.7;** <https://genedoc.software.informer.com/2.7/> szoftver segítségével történt.
5. Filogenetikai fa készítéséhez a **MEGA X 10.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis;** <https://www.megasoftware.net/>) szoftvert alkalmaztuk.

7.2. Szerológiai vizsgálati módszerek

Bár a doktori munka alapvetően a hazánkban endémiás flavivírusok humán mintákból történő kimutatására fókuszál, a flavivírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikája szerológiai vizsgálati módszerek alkalmazása nélkül nem kivitelezhető: valamennyi aktuálisan fertőzött beteg PCR vizsgálatát ellenanyagkimutatás előzte meg. Emellett, az Országos Vérellátó Szolgálattal (OVSZ) véradók körében végzett szeroprevalencia vizsgálatokat is a diagnosztikai rutinban alkalmazott szerológiai módszerekkel végeztük, ezért ezek röviden bemutatásra kerülnek.

7.2.1. Indirekt immunfluoreszcencia (IIF)

A virális meningitis vagy encephalitis klinikai diagnózissal beküldött vérsavó, plazma és liquor mintákból TBEV, WNV (2018-tól USUV) IgG, IgM és IgA vizsgálatot végeztünk. Az aktuálisan fennálló fertőzés megerősítése vagy kizárása érdekében minden esetben 10-14 nappal később levett második vérminta szerológiai vizsgálatát is elvégeztük. (Amennyiben megtörtént a második minta beküldése a laboratóriumba.)

Az NNK referencialaboratóriumában a WNV, TBEV, valamint USUV IIF tárgylemezek gyártása házilag történik. Az antigén tárgylemezek előállítása, valamint az IIF vizsgálatok kivitelezése munkautasításban pontosan szabályozott, a TBEV IIF ellenanyagvizsgálat a Nemzeti Akkreditációs Hivatal által akkreditált vizsgálat. Az IIF lemezek gyártása, valamint a módszer kivitelzési eljárásának kidolgozása nem a doktori munka részét képező fejlesztés, munkám során már meglévő protokollokkal dolgoztam. A módszer specifikitása és az eljárás *in-house* jellege miatt a protokollt az alábbiakban ismertetem:

7.2.1.1. Az IIF lemezek gyártása: antigéntermelés sejtenyészetben

1. Szövetfertőzés:

A fertőzést megelőző napon passzált és a tenyésztőedény felületét kb. 80%-osan benőtt Vero vagy Vero E6 (*Cercopithecus aethiops*: szavannacerkóf – vagy másnéven afrikai zöldmajom – vese eredetű sejtvonal) szövetkultúráról a foetalis borjúsavót (FBS: foetal bovin serum) tartalmazó tápfolyadékot eltávolítjuk és FBS-t nem tartalmazó tápfolyadékkal egyszer mossuk. A -80°C-on ampullákban tárolt tömény vírust 100 TCID₅₀ (TCID₅₀: 50% *tissue culture infective dose*) mértékben FBS-mentes tápfolyadékban hígítjuk, majd annyit mérünk a szövettenyésztő palackba, hogy a sejteket filmszerűen egyenletesen ellepje.

(Inkubálás: 90 perc, 37°C-os termosztátban, 5% CO₂ koncentráció mellett). Inkubáció után a sejtekre 5%-os FBS-t tartalmazó tápfolyadékot mérünk.

Minden termelésnél egy negatív (nem fertőzött) palack sejttel is dolgozunk, két okból: egyrészt, mert minden munkafázisnál kontrollként szolgál a megfelelő, kontaminációt elkerülő munkavégzéshez. Másrészt a vírussal fertőzött sejtekhez mindig keverünk nem fertőzött sejteket is, megfelelő arányban, az antigén tartalmú tárgylemezek készítésénél. A negatív sejtek a későbbiekben belső kontrollként szolgálnak egy-egy antigén cseppben, mivel általuk jól elkülöníthető az aspecifikus festődés a valódi pozitivitástól.

2. Fertőzött szövet leválasztása a palackról:

Vírusonként meghatározott ideig (általában: 4-5 nap) tartó inkubációt követően a felülúszót leöntjük, a sejtekre 0,05 V/V%-os tripszin-EDTA (EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav) oldat (Gibco™– Thermo Fisher Scientific™; Waltham, MA; Egyesült Államok) keverékét mérjük, annyit, amennyi filmszerű bevonatként ellepi a sejtréteget. Ezzel először átöblítjük a palackokat, majd a folyadékot leöntjük. Ezután ismét tripszin-EDTA steril keverékét mérjük a sejtekre. A tripszin oldatot 37°C-on néhány percre hagyjuk hatni; a palack faláról leváló sejtréteget időnként szabad szemmel vagy inverz fénymikroszkóp segítségével ellenőrizve. Megfelelő hatás elérésekor a tripszin emésztő hatását 5% FBS tartalmú tápfolyadékkal állítjuk le. TBEV és USUV esetén szükséges tripszin-EDTA kezeléssel leválasztani a sejteket a tenyésztőedény faláról, WNV-vel való fertőzéskor azonban a vírus által kifejtett citopatogén hatás 100%-os, ezért a sejtenyésztő palackok enyhe ütégetésével a sejtek könnyen leválaszthatók az edény faláról.

3. Sejtek kicseppentése, IIF tárgylemezek készítése:

A sejtsuszpenziót centrifugacsövekbe mérjük, majd 1100-as fordulatszámon 10 percre ülepitünk. A felülúszót óvatosan leszívjuk és a sejteket PBS oldatban (PBS: *phosphate buffered saline*; foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat) alaposan szuszpendáljuk. Ezt a műveletet kétszer megismételjük, azaz a sejtsuszpenziót mossuk, a fehérjetartalmú tápfolyadék, a különböző szennyeződések és kisebb törmelékek eltávolítása céljából. A harmadik mosás után leszívjuk a felülúszót úgy, hogy kicseppentésre megfelelő sűrűségű sejtsuszpenziót kapjunk. A sejtszámot inverz fénymikroszkóp alatt ellenőrizzük, és a látott képnek megfelelően hígítjuk a szuszpenziót. A cél a sejteket egyenletesen, egy rétegben tartalmazó cseppek létrehozása. Optimális sejtsűrűség esetén 2x6 csepp/tárgylemez elhelyezéssel a teljes sejtsuszpenziót tárgylemezekre mérjük (3,0 µl/csepp). A lemezeket 30 percre lamináris fülke alatt szárítjuk és UV lámpával kezeljük, a fertőzőképesség megszüntetése céljából.

A tárgylemezeket hideg acetonban fixáljuk 20 percig. Az acetonos fixálást követően szárítjuk a lemezeket. A tárgylemezeket egyesével szűrőpapírba tekerve, szilikagélt tartalmazó műanyag tárolóedényben tároljuk -20°C-on.

4. A kicsepegtetett antigén próbafestése:

A frissen készült antigén érzékenységet és specifitását negatív és ismert titerű humán IgG, IgM és IgA pozitív mintákkal ellenőrizzük.

7.2.1.2. Az IIF vizsgálatok kivitelezése

1. Minták hígítása szűrővizsgálat céljából:

- Szűrővizsgálat elvégzése céljából a vérsavó vagy plazma mintákat 1:10-es hígításban vizsgáljuk, hígítófolyadékként PBS oldatot használunk. A liquor mintákat hígítatlanul mérjük a tárgylemez megfelelő antigén-cseppjére.
- IgM és IgA vizsgálatot megelőzően a vérsavó vagy plazma minta IgG tartalmát adszorbens kezelés segítségével merítjük ki. Az előkezelés két okból szükséges: egyrészt az IgG és IgM/IgA ellenanyagok közötti kompetíció következtében előforduló álnegatív eredmény elkerülése céljából. Másrészt, a savóban esetleg jelenlévő reumafaktor (RF) következtében kialakuló álpozitív IgM eredmény elkerülése érdekében. Ekkor a vérminták 1:10-es hígítását PBS helyett *EUROSORB liquid RF absorbent* (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG; Lübeck; Németország, katalógusszám: ZF 1270-0145) oldatban végezzük el, majd szobahőmérsékleten inkubálunk 15 percig.

2. A kihígított minta felvitele IIF tárgylemezre:

- A tárgylemezek 1 antigén cseppjére a kihígított vérsavó (vagy hígítatlan liquor) mintából 10,0 µl-t mérünk.
- A minták felvitelét követően a lemezeket „nedves kamrába” helyezzük, majd 37°C-on 3 órán át vagy – a beállítás időpontjától függően – egy éjszakán át inkubálunk.

3. A ki nem kötődött ellenanyagok eltávolítása mosás segítségével:

- Desztillált vízzel történő öblítés után, a tárgylemezeket üvegcádkba helyezzük, majd a kádakat feltöltjük PBS oldattal. A lemezeket 5 percig áztatjuk. (Ezt a folyamatot még kétszer ismétljük meg.)
- A kádakat átöblítjük desztillált vízzel és lemezeket ventilátor segítségével megszárazítjuk.

4. Az ellenanyag konjugátum felvitele a lemezekre:

Ebben a lépésben mérjük rá a cseppekre az anti-humán IgG/IgM/IgA FITC (FITC: fluoreszcein-izotiocianát) konjugátumot. A konjugátum törzsoldatát PBS oldatban hígítjuk, mely hígítást mindig frissen készítjük el! A megfelelő munkahígítást az adott ellenanyag konjugátum megelőző titrálása során állapítjuk meg. A különböző alosztályú ellenanyagok vizsgálatához az alábbi konjugátumokat használtuk:

- ❖ **IgG kimutatáshoz:** Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/FITC (Dako Denmark A/S, Glostrup; Dánia, katalógusszám: F0202) – **Munkahígítása: 1:90**
- ❖ **IgM kimutatásához:** Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/FITC (Dako Denmark A/S, Glostrup; Dánia, katalógusszám: F0203) – **Munkahígítása: 1:60**
- ❖ **IgA kimutatásához:** Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/FITC (Dako Denmark A/S, Glostrup; Dánia, katalógusszám: F0204) – **Munkahígítása: 1:25**

- A negatív sejtek háttérfestése érdekében a hígított konjugátumhoz 5,0 µl tömény Evans Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis; MO; Egyesült Államok; katalógusszám: E2129) oldatot mérünk.
- 1 antigén csepre 10,0 µl kerül a hígított konjugátumból.
- Nedves kamrába helyezzük a lemezeket, majd 37°C-os termosztátban inkubálunk 30 percig.

5. A ki nem kötődött konjugált ellenanyagok eltávolítása mosás segítségével:

A 3. pontban leírt lépéseket követjük.

6. A lemezek fedése:

- A lemezek fedéséhez fedő folyadékot használunk, mely glicerín és PBS 1:1 arányú keveréke.
- Fedőlemezekkel fedjük a tárgylemezt.
- Az eredmények leolvasása fluoreszcens mikroszkóp segítségével történik.

7.2.2. Enzyme linked immunosorbent assay: ELISA

Az IIF ugyan viszonylag gyors és a flavivírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikájában megbízható eljárás, a gyakorlatban bizonyos esetekben ELISA vizsgálatokkal kombináltan alkalmazzuk. Ennek például az IgG ellenanyagok aviditásának meghatározásakor vagy IgM kimutatásakor van jelentősége. Utóbbi esetben a módszer jellegéből adódóan az IgM Capture ELISA tesztek érzékenysége meghaladja az IIF IgM vizsgálatok érzékenységét. Ugyanakkor a flavivírusokra jellemző szerológiai keresztreaktivitás IIF módszerrel könnyebben véleményezhető a mikroszkóp alatt megfigyelhető specifikus morfológiának köszönhetően. A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek használatakor a gyártó utasításainak megfelelően jártunk el. Ezért a pontos protokollok nem kerülnek részletes bemutatásra. Az alkalmazott tesztek listáját a 9. táblázat foglalja össze.

9.táblázat: A hazánkban endémiás flavivírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott ELISA tesztek.

A vizsgálat megnevezése	A kit megnevezése	Gyártó	Katalógusszám
TBEV IgG és IgM kimutatás	FSME/TBE IgG/IgM ELISA	Virotech Diagnostics GmbH	EC117.00
WNV IgG kimutatás	West Nile virus (WNV)	Euroimmun AG	EI 2662-9601 G
WNV IgG aviditás meghatározás	West Nile virus (WNV) avidity determination	Euroimmun AG	EI 2662-9601-1 G
WNV IgM kimutatás	West Nile Virus IgM Capture DxSelect	Focus Diagnostics Inc	EL0300M
USUV IgG kimutatás ²	Usutu virus IgG	Euroimmun AG	EI 2667-9601 G

7.2.3. Konfirmáló szerológia: WNV mikroneutralizációs próba

A diagnosztikai rutinvizsgálatokban mint verifikáló módszer, elsősorban a humán WNV fertőzések megerősítésben kiemelkedő fontosságú, mivel az Európai Unió által elfogadott esetdefiníciók értelmében a vírusneutralizációs próbával verifikált esetek „konfirmált” esetminősítést kaphatnak (ld.: 9. fejezet; „Megbeszélés”). Célunk volt a korábban konfirmálásra használt – azonban a szerológiai keresztreakciókat kevésbé elkülönítő – haemagglutináció-gátlási (HAG) próba helyettesítése vírusneutralizációval. Továbbá, a módszert felhasználtuk az OVSZ-szel együttműködésben végzett vizsgálatokhoz is: az IIF módszerrel kapott eredmények alapján WNV szeropozitívnak véleményezett véradók konfirmáló vizsgálatát (a HAG mellett) vírusneutralizációs próbával is elvégeztük. A vizsgálat bevezetése a rutin diagnosztikába (2018-ban) a doktori munka részét képezte, 2019-től kezdődően valamennyi valószínűsített WNV beteg mintáját vizsgáljuk vírusneutralizációs próbával is.

² Humán anti-USUV IgM ellenanyagkimutatásra alkalmas kit kereskedelmi forgalomban jelenleg nem kapható.

A próbában felhasznált vírusszuszpenzió töménysége nemzetközi szabvány szerint 100 TCID₅₀ (TCID₅₀: 50% *tissue culture infective dose*) volt. A vírus végtiterét és a 100TCID₅₀ pontos értékét a tömény vírusszuszpenzió titrálásával, majd a Spaerman-Karber formula segítségével határoztuk meg. További előkészültként (a komplement faktorok és esetleges aspecifikus inhibitorok inaktiválása érdekében) a vizsgálati mintákat hőkezeltük: 30 percig inaktiváltunk 56°C-on. A vizsgálati mintákból kettesalapú hígítási sort készítettünk, minden mintát két párhuzamosban bemérve. A minták vizsgálati eredményét az alábbi kontrollok alkalmazásával validáltuk:

- ❖ **Negatív kontroll:** WNV ellenanyagokra nézve biztosan szeronegatív státuszú vérsavó minta.
- ❖ **Pozitív kontroll:** ismert titerű WNV szeropozitív vérsavó minta.
- ❖ **Sejtkontroll**
- ❖ **Savókontroll:** minden egyes vizsgálati minta esetén a vizsgálati mintából külön készítettünk 1:4-es és 1:8-as hígítást, melyben a vírusszuszpenziót tápfolyadékkal helyettesítettük, így ellenőrizve a vizsgált vérsavó vagy plazmaminta esetleges citotoxikus hatását.
- ❖ **Vírus visszatitrálása:** a vírusszuszpenzió 10-es alapú hígítását minden egyes vizsgálati beállításkor ellenőriztük 3 párhuzamos mérésben.

A felhasznált vírustörzs: WNV 578/10 lineage 2 törzs (NCBI GenBank-i azonosító szám: KC496015) szopós egerek intracranialis oltásával előállítva. A vizsgálatához -80°C-on tárolt, 5% FBS tartalmú tápfolyadékban feldolgozott egéragy szuszpenziót használtunk.

7.3. Vírusizolálás

A PCR vizsgálatokban pozitívnak bizonyult beteganyagokból vírusizolálást is végeztünk, melynek célja a referencialaboratórium vírus törzsbankjának bővítése és frissítése volt. A PCR pozitív mintákat sejtenyésztetre oltottuk, melynek menete az IIF lemezek gyártását megelőző „*sejtenyészetek fertőzése*” ponttal egyezően zajlott. Vizeletminták esetén a sejtenyésztetre oltás előtt a mintákat centrifugáltuk (1100-as fordulatszámom 10 percig), 0,22 µm-es szűrőn szűrtük, majd a minta pH értékét neutrálisra állítottuk. A fertőzést követő napokban az esetlegesen megjelenő citopatogén hatásokat folyamatosan monitoroztuk. A settenyészetben történő vírusszaporítást a hetedik napon zártuk le. Minden mintát legalább kétszer ko-kultiválással tovább passzáltunk. Az izolálás sikerességét real-time PCR-rel ellenőriztük. A sejtenyészetek *Mycoplasma* státuszát rendszeresen (kb. minden 5. passzázs után) PCR módszerrel ellenőriztük. A sejtenyészetben történő vírusizolálás mellett BALB/c szopósegerek intracranialis inokulálását is elvégeztük, a már meglévő izolátumok további szaporítása érdekében.

8. Eredmények

8.1. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása: víruskimutatás különböző mintatípusokból

8.1.1. A nyugat-nílusi vírus első, humán klinikai mintákból történő kimutatása Magyarországon

Az NNK Virális Zoonózisok NRL-ben 2014-ben kerültek bevezetésre a molekuláris diagnosztikai eljárások, elsősorban a hazánkban endémiás flavivírusok okozta humán fertőzések diagnosztikájának bővítése érdekében. A laboratóriumba érkező beteganyagokból a beérkezés napján – a beérkező minta mennyiségének függvényében – 500-1000 µl fagyasztásra került -80°C-on, azzal a céllal, hogy a későbbiekben a mintából PCR diagnosztikai vizsgálatot végezhesünk. A PCR vizsgálatokat valamennyi valószínűsített vagy igazolt fertőzött esetén elvégeztük. A minták fagyasztva tárolása lehetővé tette, hogy utólag azoknál a betegeknél is elvégezzük a PCR vizsgálatot, akiknél a második vérminta szerológiai vizsgálatával megállapított szerokonverzió igazolta az aktuális vagy közelmúltban zajlott fertőzés fennállását. Az ismert immunszupprimált személyeknél a PCR vizsgálatokat a szerológiai vizsgálatok eredményétől függetlenül végeztük. A vérsavó vagy plazma mintákból adott mennyiséget külön tároltunk szerológiai, illetve PCR vizsgálatokhoz, elkerülve a víruskimutatáshoz felhasználni kívánt minta sorozatos felolvasztását. A WNV kimutatására irányuló TaqMan real-time PCR módszert 2017-től a Nemzeti Akkreditációs Hivatal által akkreditáltattuk. A módszer specifitását és szenzitivitását a minőségbiztosítási követelményeknek megfelelő rendszerességgel külső jártassági vizsgálatokban validáltuk:

- 2016-ban és 2020-ban: az INSTAND e.V. (Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V.: <https://www.instand-ev.de/en/about-instand-ev/instand-ev/>) által szervezett körvizsgálatokban;
- 2017-ben az EVD-LabNet (Emerging Viral Diseases-Expert Laboratory Network: <https://www.evd-labnet.eu/>) laborhálózat által szervezett körvizsgálatban.

Mindhárom, nyugat-nílusi vírus RNS kvalitatív meghatározására irányuló körvizsgálatot 100%-os eredményességgel teljesítette laboratóriumunk.

A módszer érzékenységének belső validálását is elvégeztük, a kereskedelmi forgalomban kapható LightMix® Kit West Nile Virus lineages 1 and 2 EC (TIB Molbiol; Berlin, Németország; katalógusszám: 40-0334-32) kittel történő összehasonlító vizsgálat által. Ehhez, a pozitív kontrollként használt tömény vírusszuszpenzióból (WNV 578/10 lineage 2, GenBank-i azonosító szám: KC496015) készített hígítási sor párhuzamos méréseivel kapott értékeket hasonlítottuk össze (10. táblázat). A gyári kit segítségével meghatároztuk az adott hígítási fokú pozitív kontroll 1 ml térfogatára vonatkozó kópiaszámot is (10. táblázat). A két módszer csak az utolsó, 93,95 kópia/ml koncentrációjú hígítási fokban adott eltérő eredményt. Az egyes hígítási fokoknál a Ct értékek nem különböztek jelentős mértékben (10. táblázat).

10.táblázat. Az *in house* optimalizált WNV real-time PCR módszer és a kereskedelmi forgalomban kapható WNV PCR kit érzékenységének összehasonlításával kapott eredmények.

Vírushígítás mértéke	<i>In house</i> WNV real-time PCR (WNV lineage 1-2) Ct értékek átlaga	LightMix® Kit West Nile Virus lineages 1 and 2 EC Ct értékek átlaga	LightMix® Kit West Nile Virus lineages 1 and 2 EC Kópiaszám (átlag)
10 ⁻¹	23,53	22,19	2 171988 kópia/ml
10 ⁻²	27,70	25,59	194922 kópia/ml
10 ⁻³	30,45	28,57	23562 kópia/ml
10 ⁻⁴	34,09	33,29	846,09 kópia/ml
10 ⁻⁵	negatív	36,40	93,95 kópia/ml

A betegminták gyűjtése során először a WNV esetek kivizsgálására fókuszáltunk: 2014 augusztusa és novembere között a Virális Zoonózisok NRL 11 páciens (7 férfi és 4 nő) esetén igazolt (n=6) vagy valószínűsített (n=5) szerológiai módszerekkel aktuálisan zajló WNV fertőzést. A betegek átlagéletkora 53 év volt (legfiatalabb beteg: 18 éves; legidősebb: 68 éves). A betegek többségét a súlyosabb meningitisszel vagy encephalitisszel járó neurológiai kórkép (WNND) fennállása jellemezte (n=9), míg 2 páciensnél a kevésbé súlyos WNF formájában zajlott a megbetegedés (11. táblázat). (Utóbbi esetekre a maculopapulosus bőrkiütések megjelenése, nyirokcsomóduzzanat, valamint láz volt jellemző.) A WNND betegek átlagéletkora magasabb volt: 59 év volt (legfiatalabb beteg: 34 éves; legidősebb: 68 éves). A betegek anamnézisében nem szerepelt külföldi utazási előzmény, valamint a szerológiai eredményeket esetlegesen befolyásoló TBEV vagy sárgaláz védőoltásban sem részesültek a panaszok megjelenését megelőzően. Anamnézisükben továbbá nem szerepelt kullancscsípés vagy egyéb állatkontaktus, sem pedig nyers tej vagy abból készült tejtermékek fogyasztása. A klinikai jellemzők összegzése a 11. táblázatban olvasható. 2014-ben egy eset sem végződött fatális kimenetellel.

11. táblázat: A 2014-ben aktuális WNV fertőzéssel diagnosztizált betegek anamnesztikus adatai.

A beteg azonosítója	Életkor (év)	Nem	Tünetek és klinikai diagnózis	Földrajzi terület (lakcím alapján)
Hun No.1.	64	Férfi	Encephalitis Láz, dysarthria, dezorientáció, nystagmus	Budapest
Hun No.2.	68	Nő	Meningitis serosa Láz, hányás, fejfájás, halláskárosodás	Bács-Kiskun megye
Hun No.3.	48	Férfi	Meningitis serosa Láz, zavartság, halláskárosodás, fejfájás, leukocitózis	Csongrád megye
Hun No.4.	63	Férfi	Meningitis serosa fejfájás, szédülés, remegés, hányinger, rigor	Csongrád megye
Hun No.5.	65	Férfi	Encephalitis emelkedett liquor fehérje szint	Jász-Nagykun-Szolnok megye
Hun No.6.	63	Nő	Meningitis lymphocytosis	Békés megye
Hun No.7.	62	Férfi	Cephalalgia elhúzódó láz, fejfájás	Hajdu-Bihar megye
Hun No.8.	37	Férfi	Maculopapular exanthema nyirokcsomó fájdalom	Budapest
Hun No.9.	18	Férfi	Maculopapular exanthema fejfájás, láz	Budapest
Hun No.10.	66	Nő	Meningitis serosa eszméletlenség, tarkómerevség	Csongrád megye
Hun No.11.	34	Férfi	Meningitis serosa fejfájás, vertigo, hányinger	Budapest

A rutin szerológiai vizsgálatokhoz valamennyi betegtől érkezett vérsavó minta, míg lumbalpunkció-ra 8 betegnél került sor. Vizeletmintát összesen 9 betegtől sikerült gyűjteni. Összességében a PCR vizsgálatokat 11 beteg n=26 mintájából végeztük el. A 26 WNV real-time PCR vizsgálat 3 betegnél adott pozitív eredményt: 3 vizelet mintából, valamint 2 vérsavóból sikerült WNV RNS-t detektálnunk (12. táblázat). Az eredményeket nested PCR módszerrel is konfirmáltuk (12. táblázat). A vizeletminták 3 különböző betegtől származtak, így összességében 3 esetben sikerült WNV PCR módszerrel is alátámasztani az aktuális fertőzés fennállását (12. táblázat). (A 12. táblázat Hun No.1-3. jelzésű, piros színnel jelölt betegek esetén volt sikeres a vírus kimutatása.)

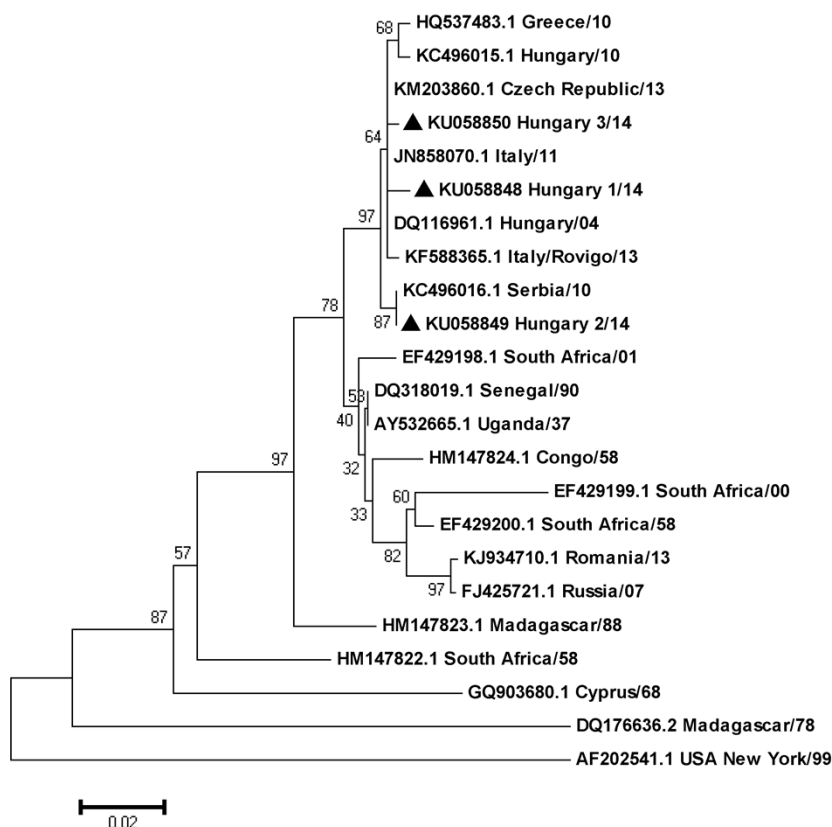
A víruskimutatás sikerességét feltehetően befolyásolta az a tény, hogy a vizeletminták gyűjtését 2014-ben vezettük be. 2014-ig a flavivírus-fertőzések rutin diagnosztikájában kizárólag szerológiai módszereket alkalmaztunk, melyhez csak vérsavó és/vagy liquor minták érkeztek laboratóriumunkba. Bár a WNV szezon megelőzően a leggyakoribb mintabeküldőinket körlevélben kértük a vizeletminták automatikus küldésére WNV fertőzés

gyanúja esetén, ez a gyakorlatban azt jelentette, hogy a legtöbb esetben e mintatípus csak később került levételre és beküldésre, a laboratórium utólagos kérésére (12. táblázat). Vizeletminta összesen 9 betegtől érkezett, a vérsavó és a vizeletminta vételének dátuma ugyanazon betegnél pedig csak két esetben egyezett (12. táblázat). A vérsavó minták vétele átlagosan a betegség kezdete utáni 8,5. napon történt (minimum: 1 nap; maximum: 22 nap), míg a liquor minták vétele átlagosan az 6. napon (minimum: 1 nap; maximum: 9 nap). Ezzel szemben a vizeletminták vétele átlagosan két héttel követte a tünetek megjelenését [átlagérték: 15,5 nap (minimum: 1 nap; maximum: 40 nap)], a mintavételi időpontokban megfigyelhető eltolódás limitálhatta a víruskimutatás sikerességét. A szerológiai eredményeket is figyelembevéve: 2014-ben egy betegnél sem figyelhattunk meg szerokonverziót, a tünetek – és különösen a neurológiai tünetek – megjelenésekor a vírus specifikus ellenanyagok detektálhatók voltak, ami magyarázza, hogy vérsavó és liquor mintákból miért kevéssé (vagy egyáltalán nem) sikeres a vírus kimutatása (12. táblázat). Bár a diagnosztizált manifeszt esetek és ezen belül a PCR pozitív betegek száma alacsony, a 3 pozitív esetből 2 személynél (Hun No.1-2.) a vizelet mintából a vírus magasabb koncentrációban volt kimutatható. Egy személynél (Hun No.3.) pedig ugyan a vérsavómintával nem állt módunkban összehasonlítást végezni (a vérsavó PCR negatív eredménye miatt), a tünetek kezdetétől számított 13. napon vett vizeletminta még PCR pozitívnak bizonyult.

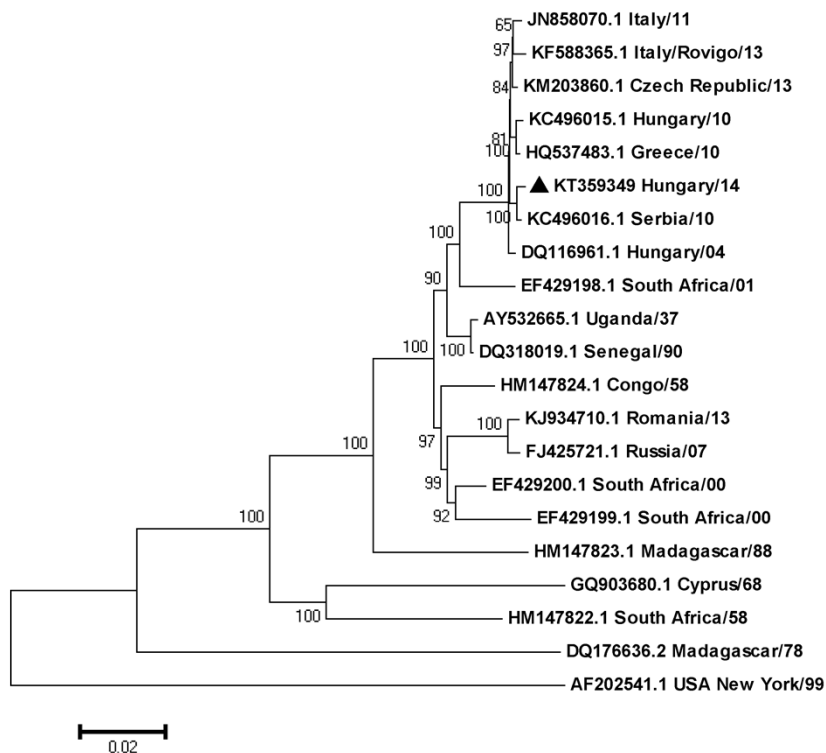
12.táblázat: A 2014-ben aktuális WNV fertőzéssel diagnosztizált beteg különböző mintatípusainak PCR és WNV szerológiai eredményei. (Az esetminősítés kritériumai a 9. fejezetben olvashatók.)

Beteg azonosító	Minta	A betegség kezdete és mintavétel között eltelt idő	WNV IIF eredmények (titer)	WNV real-time PCR eredmény Ct érték	WNV nested PCR eredmény	Laboratóriumi esetminősítés
Hun No.1.	Vérsavó	7 nap	IgG: $\geq 1:640$ IgM: negatív IgA: $\geq 1:10$	Ct 37,21	pozitív	Konfirmált
	Liquor	7 nap	IgG: pozitív IgM: negatív IgA: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	8 nap		Ct 33,25	pozitív	
Hun No.2.	Vérsavó	1 nap	IgG: $\geq 1:160$ IgM: 1:10 IgA: $\geq 1:10$	Ct 36,06	pozitív	Konfirmált
	Liquor	1 nap	IgG: pozitív IgM: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	1 nap		Ct 27,57	pozitív	
Hun No.3.	Vérsavó	7 nap	IgG: $\geq 1:640$ IgM: $\geq 1:10$	nem elegendő a mennyiség	nem vizsgáltuk	Konfirmált
	Liquor	7 nap	IgG: pozitív IgM: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	13 nap		Ct 36,10	pozitív	
Hun No.4.	Vérsavó	7 nap	IgG: $\geq 1:160$ IgM: $\geq 1:10$	nem elegendő a mennyiség	nem vizsgáltuk	Konfirmált
	Liquor	7 nap	IgG: pozitív IgM: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.5.	Vérsavó	9 nap	IgG: $\geq 1:160$ IgM: $\geq 1:10$	negatív	nem vizsgáltuk	Konfirmált
	Liquor	9 nap	IgG: pozitív IgM: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	14 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.6.	Vérsavó	5 nap	IgG: $\geq 1:640$ IgM: negatív IgA: $\geq 1:10$	negatív	nem vizsgáltuk	Valószínűsített
	Liquor	5 nap	IgG: pozitív IgM: negatív IgA: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	13 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.7.	Vérsavó	22 nap	IgG: 1:10240 IgM: pozitív IgA: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	Valószínűsített
	Vizelet	40 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.8.	Vérsavó 1	15 nap	IgG: 1:640 IgM: negatív IgA: negatív	negatív	nem vizsgáltuk	Valószínűsített
	Vérsavó 2	30 nap	IgG: 1:5120 IgM: negatív IgA: pozitív	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	34 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.9.	Vérsavó	11 nap	IgG: 1:320 IgM: $\geq 1:10$	negatív	nem vizsgáltuk	Valószínűsített
	Vizelet	11 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.10.	Vérsavó	1 nap	IgG: $\geq 1:1280$ IgM: $\geq 1:10$	negatív	nem vizsgáltuk	Konfirmált
	Liquor	3 nap	IgG: pozitív IgM: pozitív	negatív	nem vizsgáltuk	
	Vizelet	5 nap		negatív	nem vizsgáltuk	
Hun No.11.	Vérsavó	8 nap	IgG: $\geq 1:640$ IgM: $\geq 1:10$	negatív	nem vizsgáltuk	Valószínűsített
	Liquor	8 nap	IgG: pozitív IgM: negatív	negatív	nem vizsgáltuk	

A 2014-es WNV szezonális időszakban Magyarországon először sikerült kimutatni WNV-t humán klinikai mintából. A víruskimutatás mellett elvégeztük a minták szekvenálását is, az NS3 fehérjét kódoló régió 375 nt hosszúságú szakaszának nukleotid sorrendjét határoztuk meg, illetve egyetlen vizelet mintából (Hun No.2.; 12. táblázat) teljes genom szekvenálást is végeztünk, melynek eredménye 10 966 nukleotidból álló egybefüggő szekvencia (NCBI GenBank-i azonosító szám: KT359649). A szekvenálás eredményeként megállapítható, hogy lineage 2 WNV okozta mindhárom esetben a fertőzést. Az NS3 régió 375 nt hosszúságú részlete alapján készített filogenetikai fa (1. ábra) alapján 2 beteg (Hun.No.1 és 3.) mintája olasz, cseh, és egy Magyarországon, korábban héjából (DQ116961.1 goshawk-Hungary/04) kimutatott vírustörzssel mutatta a legnagyobb homológiát (1. ábra). A 3. beteg (Hun No.2.) mintája egy 2010-es, Közép/Dél-európai lineage 2 kládhoz tartozó szerb törzssel mutatta a legnagyobb hasonlóságot, melyet a mintából nyert teljes genommal történt filogenetikai vizsgálat is megerősített (2. ábra). A két vírustörzs teljes genom szekvenciája 99%-ban bizonyult azonosnak, összesen 30 nukleotid szubsztitúciót azonosítottunk, mely aminosav szinten 3 eltérést eredményezett, az NS1 (A115T), NS2A (V97A) és az NS2B (G98D) régiókban. Korábban kísérletesen igazolták, hogy az NS3 fehérje 249. aminosav pozíciójában történő treonin – prolin szubsztitúció az észak-amerikai kontinensen honos rövidcsőrű varjakban (*Corvus brachyrhynchos*) magasabb szintű viraemiát eredményez (Brault et al., 2007). Bár későbbi tanulmányok szerint az Európában őshonos madarakban, az egyébként lineage 2 WNV törzsekben is előforduló hisztidin→prolin szubsztitúció nem hozható összefüggésbe a virulencia növekedésével (Del Amo et al., 2014; Sotelo et al., 2011), előfordulását vizsgáltuk mintáinkban. Mindhárom esetben az NS3 fehérje 249. aminosav pozíciója hisztidint tartalmazott. A két filogenetikai fán (1. és 2. ábra) Hun.No.2. NS3 fehérjekódoló régiójából származó 375 nukleotid hosszúságú szekvencia az NCBI GenBank adatbázisában KU058849 azonosító számon szerepel, míg a teljes genom szekvencia KT359649 azonosító számon. Ennek oka, hogy a rövidebb NS3 szekvenciák feltöltését követően került csak sor a teljes genom szekvenálására, majd a szekvencia beküldésére az NCBI GenBank adatbázisába. A teljes genom szekvencia feltöltésekor jeleztük, hogy a két szekvencia ugyanazon mintából származik.



1. ábra: A WNV NS3 genomi régió 375 nt hosszúságú szakaszának illesztésével készült Neighbour-joining filogenetikai fa (Kimura két-paraméteres modell, 1000-szeres bootstrap ismétlés). A 3 vezető mintából kimutatott WNV szekvenciát fekete háromszöggel jelöltük. A vírusörzsek jelölése az alábbiak szerint történt: NCBI GenBank-i azonosító szám/az ország, ahol a vírust kimutatták vagy izolálták/az évszám utolsó 2 számjegye (pl. 10 = 2010; 88 = 1988).



2. ábra: WNV teljes genomok illesztésével készült Neighbour-joining filogenetikai fa (Kimura két-paraméteres modell, 1000-szeres bootstrap ismétlés). A 2014-es teljes genom szekvenciát fekete háromszöggel jelöltük. A vírusörzsek jelölése az alábbiak szerint történt: NCBI GenBank-i azonosító szám/az ország, ahol a vírust kimutatták vagy izolálták/az évszám utolsó 2 számjegye (pl. 00 = 2000; 90 = 1990).

8.1.2. Nyugat-nílusi vírus: az egyes mintatípusok alkalmazhatósága a PCR diagnosztikában

A 2014-ben végzett sikeres WNV kimutatást követően a vizeletminták PCR-rel történő vizsgálatát integráltuk a humán WNV fertőzések laboratóriumi rutin diagnosztikájába. 2015 és 2017 között 93 akut WNV fertőzést diagnosztizált laboratóriumunk (szerológiai és molekuláris módszerekkel). A 3 éves időtartam alatt összesen 87 vérsavó, 49 liquor és 117 db vizeletminta real-time PCR vizsgálatára került sor (13. táblázat). A pozitívítás aránya a vizeletminták esetén bizonyult legmagasabbnak: a **vizsgált betegek 45,45%-a, míg a vizsgált minták 57,26%-a** volt pozitív, szemben a vérsavó és liquor mintákkal, ahol ez az érték jóval alacsonyabb volt (13. táblázat). Vérsavó minták vizsgálatakor a betegek 16,86%-a míg az összes vizsgált minta 18,39%-a adott PCR pozitív eredményt (13. táblázat). A liquor minták vizsgálata esetén azt tapasztaltuk, hogy mindösszesen a betegek 4,08%-ánál tudtuk – jellemzően a kimutathatósági határon – detektálni a vírus nukleinsav jelenlétét (13. táblázat). A 3 év tapasztalatai alapján tehát e mintatípus kevésbé használható PCR vizsgálatokhoz. Az egyes mintatípusok összehasonlíthatóságát nehezítette, hogy a vizeletminták vérsavó és liquor mintákkal egyidejűleg történő vétele és beküldése a Virális Zoonózisok NRL-be sok esetben nem valósult meg (14-15. táblázat). Azon betegeknél, akiktől mind vérsavó, mind pedig vizeletminta rendelkezésre állt, 2015-ben és 2016-ban kevesebb, mint 50%-ban történt azonos napon a mintavétel (15. táblázat). Ez az arány 2017-ben javult, ekkor a betegek 61,11%-nál egyszerre történt a vérvétel és a vizeletminta vétele (15. táblázat). Emellett, a vizeletminták esetén a tünetek kezdete és a mintavétel közt eltelt idő is csökkent (15. táblázat). Ugyanakkor ebben az évben csupán 3 olyan betegünk volt, akiknél az egyidejű mintavétel mellett egyik vagy mindkét mintatípusból sikeres volt a WNV RNS kimutatása, tehát lehetőségünk volt a Ct értékek összehasonlítására (14. táblázat). Egy betegnél, vizelet pozitívítás mellett a vérsavó minta PCR negatív volt (2017/2 jelű beteg, 14. táblázat). Két páciens esetén pedig mindkét mintatípusból kimutatható volt a vírus, azonban a vizeletmintákban a Ct értékek alapján magasabb koncentrációban volt jelen a WNV örökítőanyaga (2017/1 és 2017/3 jelű betegek, 14. táblázat). Sokszor problémát jelentett tehát a mintavételi időpont, mivel vizeletminták esetén általában hosszabb idő telt el a tünetek kezdete és a mintavétel között, összehasonlítva a vérsavó és/vagy liquor mintákkal (15. táblázat). Ennek ellenére a legnagyobb arányban e mintatípusból volt sikeres a vírus kimutatása. A WNV viruria időtartamának megállapítása érdekében 2015-ben követéses vizsgálatokat szerveztünk, melynek keretében ugyanazon betegtől került sor sorozatos mintavételre. A követéses vizsgálatok eredményeit a 8.3. alfejezet ismerteti. 2014 és 2018 között összesen 75 betegnél végeztünk sikeres szekvenálást, valamennyi esetben lineage 2 WNV volt kimutatható a vizsgálati mintántárból. A szekvenciák összehasonlítására a 2018-as epidémia kontextusában a 8.5. alfejezetben térünk ki. A 2018-

as WNV szezonban változott a diagnosztikai algoritmusunk, ezért a PCR vizsgálatok eredményeit a 8.4.2. fejezetben ismertetem részletesen.

13.táblázat: A WNV PCR pozitív esetek és a vizsgált mintatípusokon belüli pozitivitás aránya éves bontásban, 2015 és 2018 között.

Év:	2015	2016	2017	Összesen (2015-2017)	2018
Diagnosztizált humán WNV esetek száma (db)	22	48	23	93	225, ebből PCR-rel vizsgált betegek száma: 166
real-time PCR pozitív betegek száma (db)	7 (31,81%)	25 (52,08%)	7 (30,43%)	39 (41,93%)	53 (31,92%)
PCR-rel vizsgált vérsavók száma	22 betegtől 24 db minta	40 betegtől 42 db minta	21 betegtől 21 db minta	83 betegtől 87 db minta	44 db minta
PCR pozitív vérsavók száma	3 betegtől 4 db minta	9 betegtől 10 db minta	2 betegtől 2 db minta	14 betegtől 16 db minta	6 db minta
PCR pozitivitás aránya*³	13,64% (16,67%)	22,5% (23,80%)	9,52% (9,52%)	16,86% (18,39%)	(13,65%)
PCR-rel vizsgált alvadásgátol teljes vérminták száma	nem végeztük	nem végeztük	nem végeztük	nem végeztük	107 db minta
PCR pozitív alvadásgátolt teljes vérminták száma					39 db minta
PCR pozitivitás aránya*					36,45%
PCR-rel vizsgált liquor minták száma	16 betegtől 16 db minta	22 betegtől 22 db minta	11 betegtől 11 db minta	49 betegtől 49 db minta	nem végeztük
PCR pozitív liquor minták száma	0 db	1 betegtől 1 db minta	1 betegtől 1 db minta	2 betegtől 2 db minta	nem végeztük
PCR pozitivitás aránya*	0%	4,54% (4,54%)	9,09% (9,09%)	4,08% (4,08%)	nem végeztük
PCR-rel vizsgált vizelet minták száma	20 betegtől 45 db minta	38 betegtől 53 db minta	19 betegtől 19 db minta	77 betegtől 117 db minta	143 db minta
PCR pozitív vizelet minták száma	8 betegtől 29 db minta	21 betegtől 32 db minta	6 betegtől 6 db minta	35 betegtől 67 db minta	35 db minta
PCR pozitivitás aránya*	40,0% (64,44%)	55,26% (60,37%)	31,57% (31,57%)	45,45% (57,26%)	24,48%

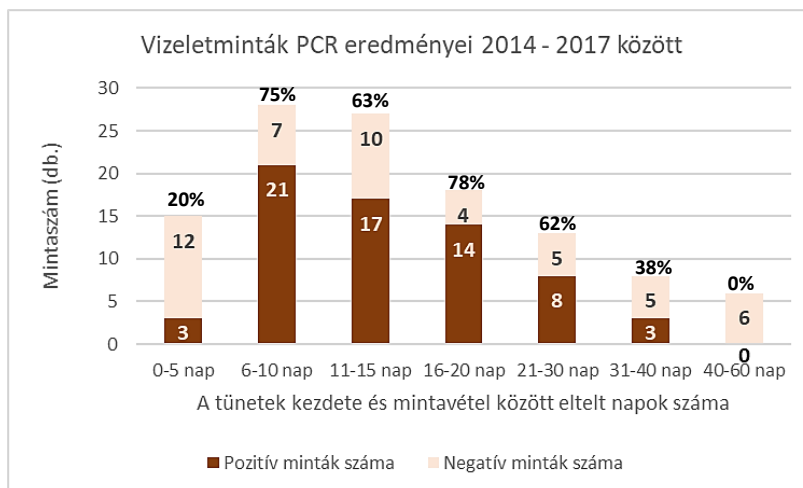
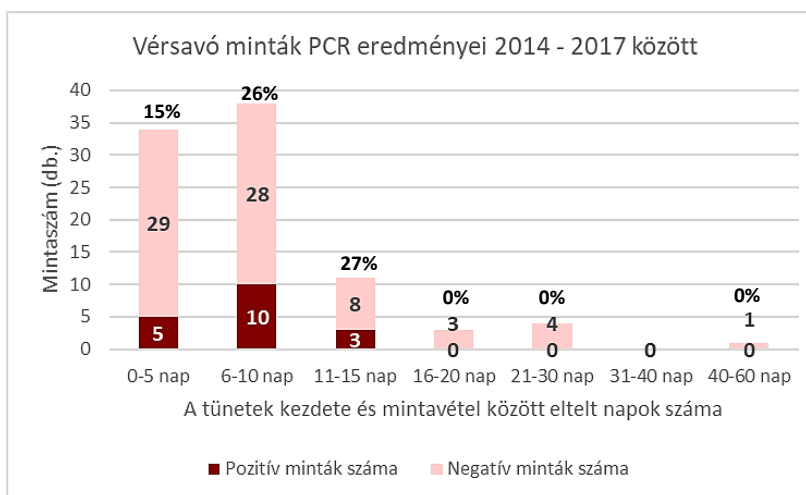
³ PCR pozitivitás aránya: a PCR pozitív betegek aránya a mintatípusonként vizsgált betegek körében (a PCR pozitív minták aránya a vizsgált mintatípusokon belül).

14.táblázat: 2017 azon betegeknek PCR eredményei, akiknél a WNV kimutatása sikeres volt és a vérsavó, valamint a vizeletminta vétele ugyanazon a napon történt.

Beteg kód	Mintatípus	A betegség kezdete és mintavétel közt eltelt napok száma	WNV real-real time PCR eredmény
2017/1	vérsavó	5	POZITÍV Ct >40,00
2017/1	liquor	5	negatív
2017/1	vizelet	5	POZITÍV Ct 25,55
2017/2	vérsavó	10	negatív
2017/2	vizelet	10	POZITÍV Ct 29,49
2017/3	vérsavó	7	POZITÍV Ct 36,95
2017/3	vizelet	7	POZITÍV Ct 30,23

15.táblázat: A tünetek kezdete és mintavétel között eltelt napok számának átlaga mintatípusokra bontva, valamint azon betegek száma, akiknél a vérsavó és az 1. vizeletminta vétele ugyanazon a napon megtörtént. A vizelet mintavételi időpontok megadásakor mindig az 1. minta vételének időpontját vettük figyelembe.

Mintatípus	2015	2016	2017
Vérsavó	6,95 nap (min.:1 nap; max.: 24 nap)	8,92 nap (min.: 1 nap; max.:32 nap)	6,31 nap (min.: 1 nap; max.: 24 nap)
Alvadásgátolt teljes vér	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk
Liquor	5,43 nap (min.:0. nap; max.: 16 nap)	9,45 nap (min.:1 nap; max.: 48 nap)	4,2 nap (min.: 1 nap; max.:12 nap)
Vizelet	11,28 nap (min.:1 nap; max.: 36 nap)	17,27 nap (min.:1 nap; max.: 48 nap)	9,11 nap (min.: 1 nap; max: 14 nap)
Vér és vizelet minta PCR vizsgálata is megtörtént ugyanazon betegnél	20 db beteg	36 db beteg	18 db beteg
Vér és vizelet vétele ugyanazon napon történt (db beteg)	5 db beteg (25,0%)	12 db beteg (33,33%)	11 beteg (61,11%)

A:**B:**

3. ábra: A PCR pozitívitás mértéke 2014 – 2017 között vizsgált vizelet (A) és vérsavó (B) minták esetén, a tünetek kezdete és mintavétel között eltelt idő függvényében.

Összességében a négyéves időtartam alatt azon vizelet (n=115) és vérsavó (n=91) minták esetén, amelyeknél pontosan ismert volt a tünetek kezdete és a mintavétel között eltelt idő, az idő függvényében ábrázoltuk a PCR pozitívitás arányát mintatípusonként (3. ábra). A 3. ábrán látható, hogy vizeletmintáknál **(A)** a tünetek megjelenése után 6-10 nappal később vett minták 75%-a, a 11-15 nappal később vett minták 63%-a, míg a 16-20 nappal később vett minták 78%-a adott PCR pozitív eredményt. Továbbá, a 30 nappal később vett vizeletminták 38%-ából is sikeres volt a vírus kimutatása. (A nyomon követhető PCR vizsgálatokkal a 8.3. alfejezet foglalkozik részleteiben.) Ezzel szemben vérsavó mintáknál **(B)** még a korai mintavétellel érkező mintákból is csak kis, 30% alatti arányban volt kimutatható a vírus. A tünetek megjelenése után 16 nappal később vett vérsavó mintákból pedig egyáltalán nem volt detektálható a vírus RNS-e (3. ábra; A-B).

A WNV PCR pozitív betegek mintáinak Vero sejtenyésztésre történő oltásával, illetve szopós egerek intracranialis inokulálásával 2014 és 2017 között összesen 9 beteg 11 mintájából volt sikeresen elvégezhető a vírusizolálás (16. táblázat). Ennek eredményeként Magyarországon elsőként 9 közvetlenül humán mintából nyert izolátummal bővült a Virális Zoonózisok NRL törzsbankja. A vírusizolálás vizeletmintákból bizonyult sikeresnek, 2 beteg esetén a vírus

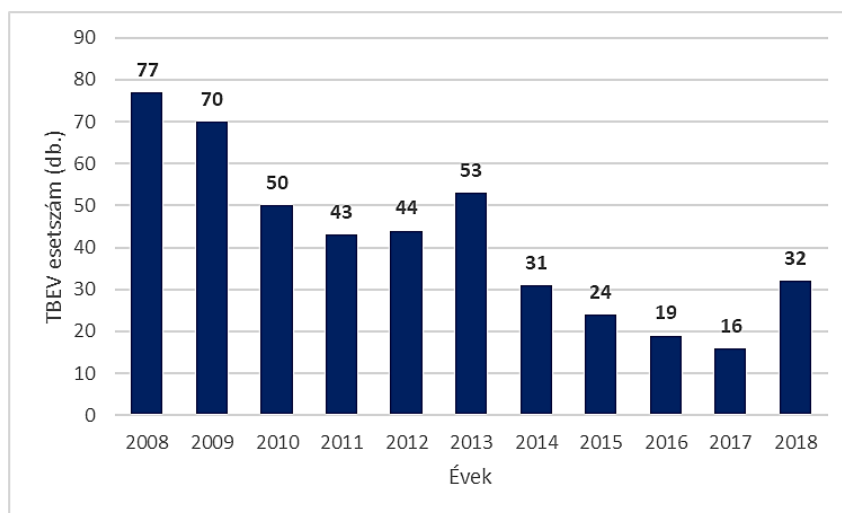
szaporítása az eredeti mintában mért magas (35,00 feletti) Ct érték ellenére is lehetséges volt (16. táblázat). Az eredeti betegmintából és a vírus szaporítását követően nyert izolátumból végzett WNV real-time PCR vizsgálatok Ct értékeit a 16. táblázat foglalja össze.

16.táblázat: A 2014-2017 közötti időszakban WNV PCR pozitív mintákból elvégzett sikeres vírusizolálás eredményeként kapott saját izolátumok.

Azonosító szám/2015	A tünetek kezdete és a mintavétel között eltelt idő	Eredeti minta Ct értéke	Ct érték Vero szöveten történő izolálást követően	Ct érték egéragyban történő izolálást követően
3676/2015 vizelet	8 nap	24,03	19,93	12,22
3554/2015 vizelet	9 nap	28,20	15,11	12,10
3744/2015 vizelet	11 nap	26,30	nem végeztük	18,62
3745/2015 vizelet	12 nap	26,63	nem végeztük	22,52
Azonosító szám/2016				
3200/2016 vizelet	9 nap	30,31	17,46	15,65
3227/2016 vizelet	10 nap	36,38	19,60	16,19
Azonosító szám/2017				
4693/2017 vizelet	5 nap	25,55	19,17	12,49
2824/2017 vizelet	7 nap	30,23	31,96	15,98
4770/2017 vizelet	10 nap	29,49	19,02	13,56
5041/2017 vizelet	12 nap	33,64	19,05	12,66
5204/2017 vizelet	nem ismert	>40,00	21,04	16,92

8.2. A kullancsencephalitis-vírus első, humán klinikai mintából történő kimutatása Magyarországon

2016 és 2017 között a szerológiailag igazoltan vagy valószínűsítetten kullancsencephalitis-vírossal fertőzött betegekre is kiterjesztettük a molekuláris biológiai vizsgálatokat. A laboratóriumi is megerősített humán TBEV esetek száma az elmúlt 5 évben csökkenő tendenciát mutat: évi 20-30 körül mozog (4. ábra). A vizsgált években az esetszám n=19 (2016) és n=16 volt (2017) (4. ábra).



4. ábra: Az igazolt és valószínűsített humán TBEV fertőzések számának éves eloszlása Magyarországon, 2008 és 2018 között. (Az NNK Virális Zoonózisok NRL saját adatai alapján.)

A szerológiai vizsgálatok mellett real-time és nested PCR vizsgálatokat végeztünk, a rendelkezésre álló valamennyi mintatípusból. A két év összesen 35 esete közül 30 betegnél állt rendelkezésre megfelelő mennyiségű minta a PCR vizsgálat elvégzéséhez. A 30 betegtől összesen 84 mintán végeztünk PCR vizsgálatot, a vizsgálati minták eloszlását mintatípusonként a 17. táblázat összegzi.

17. táblázat: A 2016-2017 között TBEV PCR-rel vizsgált mintatípusok megoszlása.

TBEV PCR-rel vizsgált minták	2016	2017	Összesen
Vérsavó	20 db	13 db	33 db
Teljes vér	5 db	1 db	6 db
Liquor	12 db	10 db	22 db
Vizelet	15 db	8 db	23 db

2016-ban a 19 friss fertőzött beteg közül 18 beteget vontunk be a PCR vizsgálatokba. Ekkor 3 betegnél volt sikeres a TBEV kimutatása (18. táblázat). Real-time PCR-rel 2 vérsavó és 2 vizeletminta adott gyenge pozitív eredményt. Valamennyi minta esetén a real-time PCR Ct

értéke 35,00 feletti volt. A konfirmáló nested PCR vizsgálatokat több protokoll segítségével is elvégeztük, részben a genom konzervatív 5'UTR és NS5 régióra specifikus primerekkel (5. táblázat). A módszer érzékenységének kedvezett, hogy mindkét protokoll kis méretű PCR termékek amplifikálását eredményezte (200 nukleotidnál rövidebb ampikonok, ld.: 5. táblázat). Ugyanakkor a szekvenciák GenBank-ba történő feltölthetősége érdekében saját tervezésű primerekkel is elvégeztük a konfirmáló vizsgálatokat. Ennek eredményeképpen 408 nukleotid hosszúságú szakasz szekvenálását végeztük el, a capsid és membrán fehérjéket kódoló, átfedő régióra specifikus primerekkel (5. táblázat). A nested PCR vizsgálatok eredményeként 2 vérsavó és 1 vizeletminta real-time PCR pozitív eredményét sikerült megerősíteni, mellyel Magyarországon először sikerült TBEV-t közvetlenül humán betegmintából kimutatnunk. Egy vizeletmintánál (1/2016, 18. táblázat) 40,00 feletti real-time PCR Ct értéket mértünk, e minta konfirmáló PCR vizsgálata negatív eredményt adott. A TBEV fertőzésekre általánosan igaz, – az inkubációs idő hossza, valamint a betegség kétfázisú lefolyása miatt – hogy a specifikus neurológiai tünetek megjelenésekor a szerológiai vizsgálatok már többnyire pozitív eredményt adnak, az ellenanyagok titer értékében jelentős változás ekkor nem mérhető. Ez alól 2016-ban az egyik PCR pozitív beteg (3/2016, 18. táblázat) jelentett kivételt, esetében savópár szerológiai vizsgálatával szerokonverziót igazoltunk. A vírus kimutatása az 1. szeronegatív mintából volt sikeres (18. táblázat).

2017-ben egyetlen beteg mintájából sikerült TBEV RNS-t detektálni (1/2017, 18. táblázat). A beteg liquor mintája bizonyult PCR pozitívnak. A liquor mintából ezzel egyidejűleg vírus specifikus IgM, IgA és IgG ellenanyagok is kimutathatók voltak. A beteg ugyanaznap (a tünetek megjelenését követő 5. napon) vett vérsavó és vizelet mintája azonban PCR negatív volt. A mintából real-time PCR vizsgálat nem készült, a diagnosztikai céllal használt 5'UTR és NS5 régiókra specifikus primerekkel végeztük el a vizsgálatokat és ellenőriztük az eredményeket Sanger szekvenálással. Nagyobb méretű termék amplifikálása nem történt meg, ezért a GenBank adatbázisába csak a 2016-os szekvenciák kerültek feltöltésre.

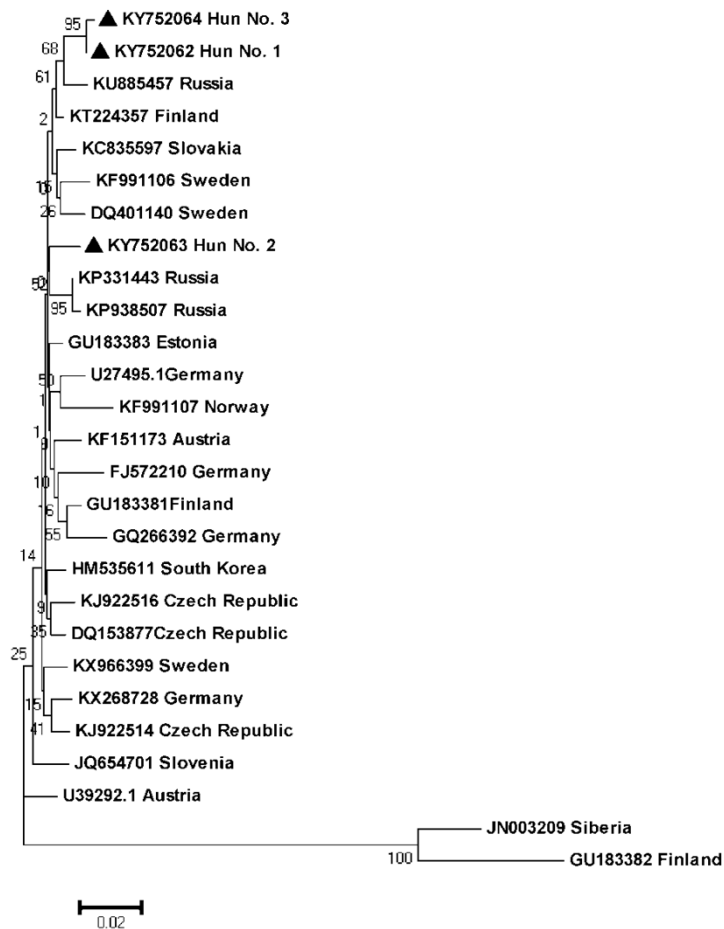
A WNV esetekhez hasonlóan a vizeletminták beküldése időben később követte a vérmintákat: a vérsavó mintákat a tünetek kezdetétől 2016-ban átlagosan 13 nappal (min.:1 nap; max.:28 nap), 2017-ben pedig átlagosan 8,5 nappal (min.:2 nap; max.: 25 nap) később vették. Ezzel szemben a vizeletmintákat 2016-ban átlagosan a 17. napon (min.: 3 nap; max.: 57 nap), 2017-ben pedig átlagosan a 12. napon (min.:5 nap; max.: 25 nap) vették. Azon betegek közül, akiknél lehetőségünk volt vérsavó és vizeletminták egyidejű vizsgálatára, a betegek csupán 40%-ánál (2016), illetve 50%-ánál (2017) történt ugyanaznap a két mintatípus vétele.

A két évben vizsgált PCR pozitív betegek anamnézisében külföldi utazás nem szerepelt, tehát valamennyi esetben autochton fertőzést igazoltunk. Továbbá, a betegek TBEV elleni védőoltásban nem részesültek korábban, kullancscsípésről azonban beszámoltak, de a csípés pontos időpontja nem volt ismert. A 4 PCR pozitív beteg lakóhelyén fertőződött, amely mind a 4 esetben jellemzően TBEV hiperendémias terület [Zala megye, Fejér megye (18. táblázat)].

18.táblázat: A TBEV PCR pozitív betegek anamnesztikus adatai és laboratóriumi eredményei. (GAM HAG: IgG, IgM, IgA össz-ellenanyag szint meghatározására szolgáló haemagglutináció-gátlási próba.)

Beteg azonosító	Tünetek/Anamnézis	Eltelt napok száma	Mintatípus	Real-time PCR eredmény	Nested PCR eredmény	TBEV IIF eredmény	Anti-TBEV GAM HAG eredmény
1/2016	51 éves férfi Nagykapornak, Zala megye Diagnózis: Lymphocytás meningoencephalitis	28 nap	Vérsavó 1	Ct 35,83	pozitív	IgG: 1:2560 IgM: ≥1:10	1:640
		57 nap	Vérsavó 2	negatív	nem vizsgáltuk	IgG: 1:2560 IgM: ≥1:10	1:640
		57 nap	Vizelet	Ct>40,00	negatív	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk
2/2016	10 éves nő, Sárosd, Fejér megye Tünetek: Láz, fejfájás, tarkómerevség Diagnózis: Meningitis serosa	1 nap	Vérsavó	negatív	nem vizsgáltuk	IgG: ≥1:1280 IgM: ≥1:10	1:160
		1 nap	Liquor	negatív	nem vizsgáltuk	IgG: pozitív IgM: negatív	nem vizsgáltuk
		3 nap	Vizelet	Ct 36,24	pozitív	nem vizsgáltuk	
3/2016	48 éves férfi, Csatár, Zala megye Tünetek: Láz, neutropaenia Diagnózis: Lymphocytás meningitis	4 nap	Vérsavó 1	Ct 35,75	pozitív	IgG:<1:10 IgM:<1:10 IgA: <1:10	1:20
		16 nap	Vérsavó 2	negatív	nem vizsgáltuk	IgG: ≥1:160 IgM: ≥1:10 IgA: ≥1:10	1:1280
1/2017	48 éves férfi, Tordas, Fejér megye Tünetek: Láz, fejfájás Diagnózis: Meningitis serosa	5 nap	Vérsavó 1	nem vizsgáltuk	negatív	IgG: ≥1:1280 IgM: ≥1:10 IgA: ≥1:10	nem vizsgáltuk
		5 nap	Liquor	nem vizsgáltuk	pozitív	IgG: pozitív IgM: pozitív IgA: pozitív	nem vizsgáltuk
		5 nap	Vizelet	nem vizsgáltuk	negatív	nem vizsgáltuk	nem vizsgáltuk

A 2016-os mintákból végzett szekvenálás eredményeként kapott 408 nukleotid hosszúságú szekvenciák filogenetikai vizsgálatát végeztük el (5. ábra). Mindhárom minta TBEV Európai szubtypusnak bizonyult. Két minta: KY752062 (1/2016 – Zala megye) és KY752064 (3/2016 – Zala megye) esetén egyetlen nukleotid eltérést azonosítottunk a vizsgált szakaszon. A két mintától némiképp elkülönül a harmadik: KY752063 (2/2016 – Fejér megye): 9 nukleotid eltérés azonosítható, mely a vizsgált aminosav szakaszban 5 aminosavnyi különbséget jelent.



5. ábra: A capsid és membrán fehérjéket kódoló gének részleges szekvenciáinak illesztésével kapott Neighbour-joining filogenetikai fa (Kimura két-paraméteres modell, 1000-szeres bootstrap ismétlés). A szekvenciaillesztéshez TBEV európai szubtípusú törzsek szekvenciáit használtuk fel. A 2016-os hazai szekvenciákat fekete háromszög jelöli. A TBEV szekvenciák jelölése az alábbiak szerint történt: GenBank-i azonosító szám, majd az ország megnevezése, ahol a mintát izolálták vagy detektálták.

8.3. Nyugat-nílusi vírus nyomon követéses vizsgálatok

2015-ben nyomon követéses vizsgálatokat szerveztünk a WNV viruria hosszának megállapítása érdekében. Mivel az előző év tapasztalata alapján a vizeletmintákból végzett víruskimutatás ígéretes diagnosztikai eljárásnak bizonyult, a követéses vizsgálatokban is elsősorban e mintatípusra fókuszáltunk. Összesen 5, hosszabb ideig kórházi ellátásra szoruló betegnél volt lehetőség a sorozatos mintavételre. A követéses vizsgálatokat három betegellátó intézménnyel együttműködésben végeztük. A betegminták gyűjtésében és a klinikai adatok összegzésében a Fejér Megyei Szent György Egyetemi Oktató Kórház Infektológiai Osztályának, a dunaújvárosi Szent Pantaleon Kórház Infektológiai-; illetve Aneszteziológiai és Intenzív Betegellátó Osztályának, valamint a Dél-pesti Centrumkórház – Országos

Hematológiai és Infektológiai Intézet (akkori nevén: Egyesített Szent István és Szent László Kórház-Rendelőintézet) Infektológiai Osztályának munkatásai működtek közre.

A 2015. év szezonális időszakában összesen 22 klinikailag diagnosztizált akut WNV vírusfertőzést erősítettünk meg laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatokkal. Esetdefiníció szerint ezek közül 9 eset minősült konfirmáltnak, 12 valószínűsíthetőnek, egy betegnél pedig közelmúltban lezajlott infekciót véleményeztünk. A neurológiai kórforma 18 páciensnél, a WNF-re jellemző láz, valamint maculopapulosus és roseoliform exanthamák megjelenése 4 betegnél volt tapasztalható. A betegek anamnézisében trópusi országokba történő utazási előzmény nem szerepelt, ezért ezekről a területekről importálható flavivírusok irányába nem végeztünk vizsgálatot a szerológiai keresztreakciók kizárása érdekében. A PCR módszerrel megvizsgált összesen 22 személy közül 9 beteg vizeletmintájából volt kimutatható a vírus. Ezzel szemben vérsavó vagy teljes vér pozitivitást csak 3 beteg esetén tapasztaltunk.

A vizsgált liquorok közül pedig csak egyetlen mintából mutattuk ki a vírust a detektálhatósági határon. A vérsavóra nézve PCR-pozitív páciensek mindegyikénél kimutatható volt a vírus RNS-e a vizeletmintában is, a vérsavóhoz viszonyítva magasabb koncentrációban. Az ismételt mintavételt és nyomon követést 5 páciensnél volt lehetőségünk elvégezni. A szerológiai vizsgálatokban az IgG végtiter, össz-ellenanyag szint, valamint IgM vizsgálat egyértelműsítette, hogy mind az 5 betegnél aktuális WNV fertőzés állt fenn, ugyanakkor az IgG és össz-ellenanyagtiter meghatározásban tapasztalható volt szerológiai keresztreaktivitás is a TBEV-specifikus ellenanyagok kimutatásakor (20. táblázat). Az 5 beteg változó súlyosságban produkált neurológiai tüneteket, anamnézisüket az 19. táblázat foglalja össze.

19. táblázat: A követéses vizsgálatokban részt vett páciensek anamnesztikus adatainak rövid összefoglalása.

Névkód	Lakhely (lakcím szerint)	A beküldő orvos által leírt tünetek, anamnesztikus adatok
A2015	Mátyásdomb, Fejér megye	57 éves férfi, 2015.09.01-jén kezdődő tünetek: láz, tudatzavar. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . A páciens 2 napig intenzív terápiás ellátásra és gépi lélegeztetésre szorult, bal fülére maradandó halláskárosodást szenvedett. A tünetek kezdete előtti időszakban a beteg vadászatot vett részt Szerbiában.
B2015	Rácalmás, Fejér megye	51 éves nő, 2015.08.30-án kezdődő tünetek: láz, zavartság. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . Alapbetegsége: <i>myasthenia gravis</i> .
C2015	Dunaújváros, Fejér megye	66 éves férfi, 2015.09.15-én kezdődő tünetek: láz, zavartság, eszméletlenség. A beküldő diagnózis: <i>encephalitis</i> . A páciens 2 napig intenzív terápiás ellátásra és gépi lélegeztetésre szorult, később maradványtünetek nélkül gyógyult.
D2015	Budapest	60 éves férfi, 2015.09.25-én kezdődő tünetek: láz, fejfájás. A beküldő diagnózis: <i>encephalitisnek megfelelő tünetek</i> .
E2015	Dunaújváros, Fejér megye	53 éves férfi, 2015.08.31-én kezdődő tünetek: láz, ataxia. A beküldő diagnózis: <i>cerebellitis, encephalitis</i> .

A páciensektől érkező vérsavó- és liquorminták szerológiai vizsgálatokor egyetlen, az E2015 kóddal jelölt beteg esetén volt megfigyelhető szerokonverzió, így az aktuális fertőzés fennállását a második vérminta eredményei konfirmálták. A szerológiai vizsgálatok eredményeit a 20. és 21. táblázat tartalmazza. Az öt, szerológiai vizsgálatok segítségével akut

fertőzöttnek minősíthető páciensről az ismételt mintavétel a hosszabb ideig tartó kórházi kezelés tette lehetővé. A PCR módszerrel történő nyomon követést elsősorban vizeletminták gyűjtésével végeztük, emellett két betegnél második vérminta vizsgálatára is lehetőségünk nyílt. A PCR vizsgálatok eredményeit a 22. táblázat foglalja össze.

20.táblázat: A nyomon követésben részt vett páciensek vérsavó és liquor mintáiból elvégzett IIF vizsgálat eredményei. Az „eltelt napok száma” a betegség kezdeti időpontja és a mintavétel közt eltelt napok számát jelöli.

Névkód/minta	Eltelt napok száma	Anti-WNV IgG IIF	Anti-WNV IgM IIF	Anti-TBEV IgG IIF	Anti-TBEV IgM IIF
A2015/vérsavó	9 nap	≥1:320 pozitív	≥1:10 pozitív	<1:10 negatív	<1:10 negatív
A2015/liquor	9 nap	pozitív	pozitív	negatív	negatív
B2015/vérsavó	24 nap	≥1:5120 pozitív	≥1:10 pozitív	1:1280 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
B2015/liquor	16 nap	pozitív	pozitív	pozitív, valószínűleg keresztreakció	negatív
C2015/vérsavó	9 nap	≥1:1280 pozitív	≥1:10 pozitív	1:40 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
C2015/liquor	9 nap	pozitív	pozitív	pozitív, valószínűleg keresztreakció	negatív
D2015/vérsavó	11 nap	≥1:1280 pozitív	≥1:10 pozitív	1:40 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív
D2015/liquor	11 nap	pozitív	pozitív	kétes, valószínűleg keresztreakció	negatív
E2015/1. vérsavó	6 nap	<1:10 negatív	≥1:10 pozitív	<1:10 negatív	<1:10 negatív
E2015/liquor	6 nap	negatív	a minta elfogyott	negatív	a minta elfogyott
E2015/2. vérsavó	36 nap	≥1:5120 pozitív	≥1:10 pozitív	1:1280 valószínűleg keresztreakció	<1:10 negatív

21. táblázat: A nyomon követésben részt vett páciensek vérsavó mintáiból elvégzett haemagglutináció-gátlási próba eredményei. Az „eltelt napok száma” a betegség kezdeti időpontja és a mintavétel közt eltelt napok számát jelöli. (GAM HAG: IgG, IgM, IgA össz-ellenanyag szint meghatározására szolgáló haemagglutináció-gátlási próba.)

Névkód/minta	Eltelt napok száma	Anti-WNV GAM HAG	Anti-WNV IgM HAG	Anti-TBEV GAM HAG	Anti-TBEV IgM HAG
A2015/vérsavó	9 nap	1:320 pozitív	pozitív	elfogyott a minta	elfogyott a minta
B2015/vérsavó	24 nap	1:1280 pozitív	pozitív	1:80 valószínűleg keresztreakció	kétes, valószínűleg keresztreakció
C2015/vérsavó	9 nap	1:2560 pozitív	pozitív	1:20 valószínűleg keresztreakció	kétes, valószínűleg keresztreakció
D2015/vérsavó	11 nap	1:160 pozitív	pozitív	<1:10 negatív	nem vizsgáltuk
E2015/1. vérsavó	6 nap	1:160 pozitív	pozitív	<1:10 negatív	negatív
E2015/2. vérsavó	36 nap	1:1280 pozitív	pozitív	1:80 valószínűleg keresztreakció	negatív

Az **A2015 jelű páciensnél** a tünetek megjelenését követő 9. naptól a 23. napig folyamatos volt a vizeletminták bekérése, összesen 10 alkalommal. A 23. napon a beteget otthonába bocsátották, ezt követően két kontrollvizsgálat alkalmával, a 43. és 57. napon történt ismételt mintavétel. Az ekkor vett mindkét vizeletminta PCR vizsgálata negatív eredményt adott (22. táblázat), ezért feltételezzük, hogy a viruria a 23. és 43. napok között ért véget. A kilencedik napon vett vérsavó- és liquormintából a vírus a detektálhatósági limiten volt csak kimutatható (22. táblázat). A **B2015 kódú betegől** a 24. napon vett vizeletmintában a detektálhatósági határon még jelen volt a virális RNS, a viruria feltételezhetően ekkor érhetett véget. Ezzel szemben az ugyanazon nap vett vér- és korábbi liquorminták negatív eredményt adtak (22. táblázat).

A **C2015 jelű páciens** esetén a betegség kezdetétől számított 40. napig végeztük a nyomon követést, amely összesen 14 vizeletminta vizsgálatát jelentette. Valamennyi mintából detektálható volt WNV RNS-e. A 40. napon vett vizeletmintában azonban már csak a kimutathatósági határon volt jelen a vírus nukleinsava. További kontrollvizsgálat nem történt, ezért a 40. napon lezárult a nyomon követés. Feltételezhető, hogy egy következő vizeletminta vizsgálata már negatív eredményt adott volna, a viruria a 40. nap körül érhetett véget. A C2015 kódú betegnél látható, hogy a későbbi időpontban vett vizeletminta erősebben pozitív (Ct 24,03), összehasonlítva a korábban levett vérsavó mintával (Ct 35,85). Továbbá ennél a betegnél a vérsavó- és teljesvér minta külön-külön is PCR-pozitívnak bizonyult, utóbbi

mintatípusból a vérsavóhoz képest (Ct 35,85) magasabb koncentrációban volt kimutatható a vírus: Ct 27,01 (22. táblázat).

A **D2015 jelű betegnél** a 27. nap körül ért véget a viruria, az **E2015 névkódú beteg** vizeletmintájából pedig még a 36. napon is kimutatható volt a vírus, az ugyanaznap vett vérmintához képest magasabb koncentrációban (22. táblázat). E2015 névkódú betegől további mintavételt nem sikerült megszerveznünk.

22. táblázat: A nyomon követett páciensek különböző mintáinak real-time PCR vizsgálata során kapott eredmények. (n.m.: nem állt rendelkezésre a minta; n.v.: nem végeztük a vizsgálatot).

Névkód	Eltelt napok száma	vérsavó	teljes vér	liquor	vizelet	Izolálás vizeletből
A2015	9 nap	Ct>40,00	n. m.	Ct>40,00	Ct 29,85	Ct 15,11
	17 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 30,18	negatív
	18 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 30,58	negatív
	19 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 30,03	negatív
	20 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 31,57	negatív
	21 nap	negatív	n. m.	n. m.	Ct 31,16	negatív
	22 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 29,89	negatív
	23 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 28,83	negatív
	43 nap	n. m.	n. m.	n. m.	negatív	n.v.
	57 nap	n. m.	n. m.	n. m.	negatív	n.v.
B2015	16 nap	n. m.	n. m.	negatív	n. m.	n.v.
	24 nap	negatív	negatív	n.m.	Ct>40,00	n.v.
	37 nap	n. m.	n. m.	n. m.	negatív	n.v.
C2015	5 nap	Ct 35,85	Ct 27,01	negatív	n. m.	n.v.
	8 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 24,03	Ct 19,93
	10 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 25,63	negatív
	11 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 26,30	Ct 18,62
	12 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 26,63	Ct 22,52
	13 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 32,19	negatív
	16 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 35,13	negatív
	17 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 34,65	negatív
	18 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 34,94	n.v.
	19 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 34,54	n.v.
	20 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 35,43	n.v.
	26 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 35,81	n.v.
	27 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 38,16	n.v.
	40 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct>40,00	n.v.
D2015	11 nap	negatív	negatív	negatív	n. m.	n.v.
	13 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct 35,15	negatív
	27 nap	n. m.	n. m.	n. m.	Ct>40,00	n.v.
E2015	6 nap	Ct 34,11	n. m.	negatív	n. m.	n.v.
	36 nap	Ct>40,00	n. m.	n. m.	Ct 38,10	negatív

A genom NS3 fehérjét kódoló régiójára tervezett primerekkel végzett nested PCR amplikonok szekvenálása alapján mind az 5 beteg esetén lineage 2 WNV jelenlétét azonosítottuk.

A nyomonkövetéses vizsgálatok részeként Vero sejtenyészetben és egéroltas révén is végeztünk vírusizolálást (22. táblázat). A vírusizolálás két beteg esetén (A2015 és C2015) volt sikeres. A2015 kóddal jelölt páciens 9. napon vett vizeletmintájából (Ct 29,85) tudtuk izolálni a vírust. C2015 sorszámú beteg 3 mintájából volt sikeres a vírusizolálás: a 8., 11. és 12. napi mintavételből (~Ct 24-26). A 22. táblázat adataiból látható, hogy hasonló Ct értékű mintákból sem minden esetben volt sikeres a vírus szaporítása. Ezzel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy a mintavételezés során az egymást követő napokon vett mintákat összegyűjtötték, majd egyszerre szállították a laboratóriumba. A szállítás időpontjáig a minták tárolása 4°C-on történt, ami befolyásolhatta a kapott eredményt.

8.4. A 2018. évi nyugat-nílusi vírus járvány epidemiológiai és mikrobiológiai jellemzői

8.4.1. A 2018-as szezon járványügyi összefoglalása

A 2018-as évi WNV szezonális időszak kiemelkedőnek számított, mind Magyarországon, mind pedig Európa-szerte. Nem csupán az esetszámok emelkedtek drasztikus mértékben, hanem maga a szezonális időszak is a megszokotthoz képest korábban kezdődött. Az ECDC 2018. augusztus 13-án publikált gyors kockázatelemzésében (RRA: *Rapid risk assessment*) adott ki figyelmeztetést arra vonatkozóan, hogy a korábbi évekhez képest eltérő tendenciát mutat a járványügyi helyzet. Ekkorra (2018. augusztus 9-ig) Európában 335 humán esetet jelentettek, ami kiugrónak számított a korábbi évekhez képest: 2014 és 2017 között ugyanezen időszakban átlagosan csak 5-45 esetet jelentettek a tagállamok (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2018a). 2018-ban az első humán fertőzést Görögországban azonosították, a 26. héten (június 25 – július 1. közötti időszak). Ugyanakkor a beteg tünetei május 31-re datálódtak, azaz a 22. naptári hétre (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2018a). Viszonyításképpen 2014-ben, 2016-ban, és 2017-ben az első eseteket a 28. héten kezdték jelenteni (2015-ben a 25. naptári héten jelentett egy esetet Bulgária). Összességében a szezonális időszak végére 2083 humán fertőzést jelentettek Európában, amely meghaladta az előző 7 év (n=1832) összes esetszámát, 2017-hez képest pedig 7,2-szeres növekedést jelentett (European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC], 2018b). A halálozási ráta 8,6% volt (n=180 eset).

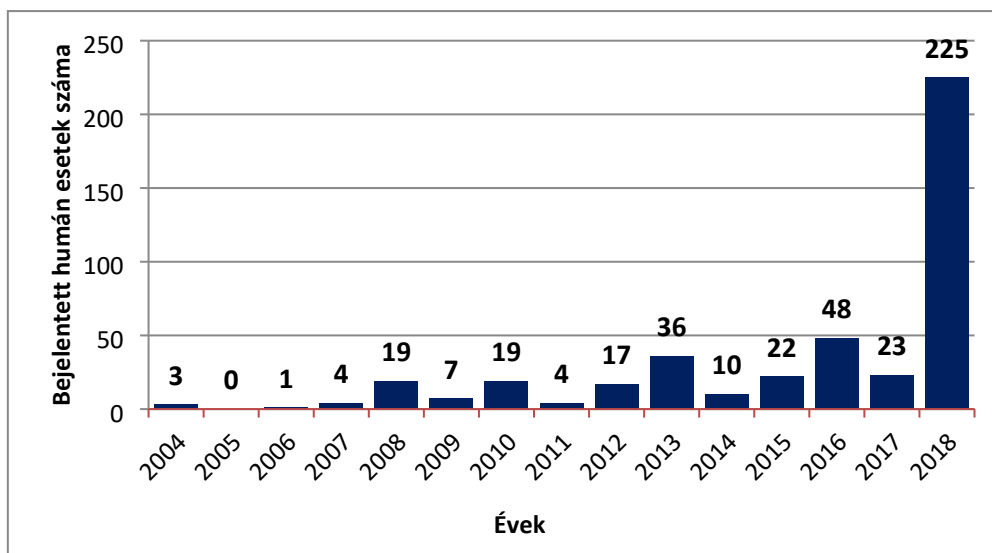
A magyarországi járványügyi helyzet az európai trendet követte: az első humán fertőzést július 9-én regisztráltuk (28. hét), ugyanakkor a beteg tünetei a 27. héten kezdődtek. (A tünetek

kezdete és a kórházi felvétel, valamint a minta beküldése között eltelt idő miatt az eset laboratóriumi kivizsgálása és bejelentése időbeli csúszással történt.) Viszonyításképpen 2016-ban és 2017-ben az első humán fertőzéseket Magyarország a 33. és 34. héten, azaz augusztus 15-én, illetve augusztus 21-én jelentette, amely időpontok korrelálnak a korábbi évek tapasztalataival. Igaz, 2017-ben egyetlen humán eset bejelentése történt a 27. héten (a laboratóriumi kivizsgálás ekkor zajlott), míg a beteg tünetei június 12-én, azaz a 24. héten kezdődtek. Ez az eset azonban a laboratóriumi kritériumoknak megfelelően valószínűsített minősítést kapott. (A továbbiakban a „konfirmált” és „valószínűsített” jelzők minden esetben a laboratóriumi esetminősítést jelentik.)

2018-ban az esetszámban is jelentős növekedést tapasztaltunk. A 27. és 45. hét között összesen 225 humán esetet jelentettünk. Ezzel Magyarország a legtöbb esetet jelentő európai országok listáján az 5. helyen állt. A legtöbb megbetegedést augusztusban diagnosztizáltuk: az esetek 62,6%-át (n=141) a 31. és 35. hét között regisztráltuk.

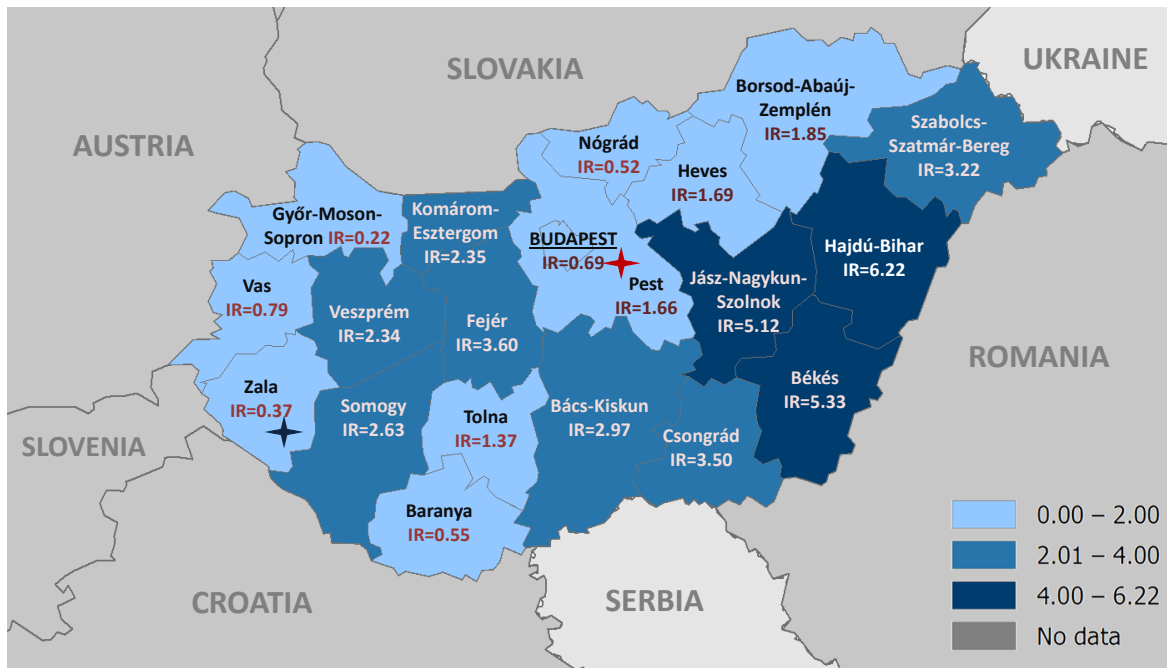
A 225 eset közül 215 volt autochton, 10 pedig importált fertőzés. Az importált esetek epidemiológiai kivizsgálása során az utazási előzményeket a tünetek kezdetét megelőző kéthetes időintervallumban veszik figyelembe, amely WNV fertőzéseknél az inkubációs periódus maximális hossza. 2018-ban 10 esetben az alábbi országokból volt valószínűsíthető a fertőzések behurcolása: Ausztria (n=1 konfirmált eset); Belgium (n=1 valószínűsített eset); Horvátország (n=2 konfirmált eset); Románia (n=2 konfirmált eset); Szerbia (n=2 konfirmált eset és n=1 valószínűsített eset); és Törökország (n=1 konfirmált eset). A felsoroltak közül Belgium kivételével valamennyi WNV endémiás ország. Belgium 2018-ig bezáróan nem jelentett humán WNV fertőzést, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a beteg életvitelszerűen Belgiumban (Brüsszelben) tartózkodott, Magyarországra csak látogatóba tért haza, tünetei pedig közvetlenül az érkezését követő napon kezdődtek. Tudomásunk szerint más ország sem szerepelt utazási előzményében, ahol esetleg fertőződhetett volna a vírussal.

Az összes 2018-ban diagnosztizált fertőzést tekintve az előző év 23 bejelentett esetéhez képest kilencszeres esetszám növekedést tapasztalhattunk, de emellett 2018 összes esetszáma meghaladta a megelőző 14 év összes esetszámát is (6. ábra). (Magyarországon humán WNV fertőzésekről 2004 óta állnak rendelkezésre hivatalos adatok.)



6. ábra: A bejelentett autochton és importált humán WNV megbetegedések éves eloszlása Magyarországon, 2004 – 2018 között.

Az incidenciát megyék szintjén vizsgálva leginkább az alföldi régiót, tehát a keleti és déli országrészt érintette az epidémia (7. ábra). Az incidencia Hajdú-Bihar, Békés, valamint Jász-Nagykun-Szolnok megyékben volt a legmagasabb, amely korrelál a korábbi évek adataival: az alföldi régió kiemelten endémiás térségnek számít. Bár valamennyi megyéből regisztráltunk eseteket, külön érdekesség, hogy Zala megyében 2018-ban azonosítottunk először humán WNV megbetegedést (7. ábra). Ez persze nem jelenti azt, hogy korábbi években nem lehetett jelen a vírus a térségben. Az esetek felderítését nagyban segítette a megnövekedett laboratóriumi vizsgálatkérések száma is: 2017. június 1. és szeptember 20. között például 227 beteg laboratóriumi vizsgálatát végeztük el, míg 2018-ban ugyanezen időszakban 2,7-szer több, azaz 604 betegől érkezett minta WNV irányú laboratóriumi vizsgálatra.



7. ábra: A 2018-ban laboratóriumiilag diagnosztizált WNV és WNF esetek megyénkénti eloszlása. (IR: incidenci ráta). Zala megyét kék csillaggal jelöltük, mivel e régióban 2018-ban először azonosítottunk humán WNV megbetegedést. Az 1. konfirmált humán USUV beteg lakóhelyét piros csillag jelöli (ld.: 8.4.3. alfejezet).

Országos szinten a WNV incidenciája (a diagnosztizált WNV esetek száma/100 000 lakos) hazánkban 2006 és 2016 között 0,01 és 0,5 között mozgott, míg 2018-ban az incidenciája értéke 2,3 volt, ami 4,5-szörös növekedést jelentett az előző évhez képest. (Az országos incidenciára vonatkozó adatokat Mezei Eszter az NNK Járványügyi és Infekciókontroll Főosztályának epidemiológus munkatársa bocsátotta rendelkezésünkre.)

A 2018-ban diagnosztizált WNV betegek átlagéletkora 57 év volt (legfiatalabb beteg: 17 éves; legidősebb beteg: 88 éves). A férfi betegek száma 128 volt (56,9%), a nőké: 97 (43,1%). Mivel sokszor a súlyosabb esetek kerülnek laboratóriumi kivizsgálásra 2018-ban is a WNV betegek domináltak: az összes jelentett fertőzés **70,2%-a (n=158) volt neuroinvaszív megbetegedés. WNF-re jellemző tünetek 65 betegnél** jelentkeztek, ami az esetek 28,9%-a. Két betegtől (<1%) tünetekre, kórlefolyásra vonatkozó információt nem sikerült megszerezni. Klasszikus maculopapulosus és morbilliform exanthema **49 betegnél** jelentkezett (21,8%). Ezen belül a kiütések mellett neurológiai tüneteket is produkált 11 beteg (4,9%), míg 38 betegnél (azaz az összes eset 16,9%-nál) tipikus nyugat-nílusi láz kórlefolyás volt jellemző, neurológiai manifesztáció nélkül. A kórházban ápolott betegeknél a hospitalizáció átlagos időtartama 9,1 nap volt (Mezei Eszter az NNK Járványügyi és Infekciókontroll Főosztályának epidemiológus munkatársának saját adata). Fatalis kimenetellel 15 eset végződött, azaz a hazai diagnosztizált esetek 6,7%-a.

8.4.2. A 2018-as szezon új mikrobiológiai diagnosztikai tapasztalatai

A 2018-as WNV szezon megemelkedett esetszáma a vizsgálati minták számában is jelentős növekedést eredményezett, ami lehetővé tette a mikrobiológia laboratóriumi tapasztalatok bővítését, különös tekintettel a PCR alapú diagnosztikai eljárásokra. 2018-ban a vizeletminták mellett megkezdtük az alvadásgátolt vérminták gyűjtését is, szintén PCR vizsgálatokhoz. A differenciáldiagnosztikai algoritmust emellett kiterjesztettük USUV irányába is.

Az Európai Unió esetdefinícióinak megfelelően 2018-ban 138 konfirmált és 87 valószínűsített WNV esetet diagnosztizáltunk. A 2018-as szezonális időszak egyik fontos differenciáldiagnosztikai aspektusa volt az NNK Kiütéses Vírusbetegségek NRL és Virális Zoonózisok NRL között megvalósuló szakmai együttműködés, melynek keretében a kiütéses, lázas, valamint ízületi- és izomfájdalom tünetekkel beküldött betegmintákat – a leggyakoribb kiütéses vírusbetegségek mellett – vizsgáltuk WNV irányában is, akár a klinikus kérésétől függetlenül. Összesen 69 beteg mintáját vizsgálta közösen a két laboratórium. Közülük 23 betegnél (33,3%) állapítottunk meg aktuális WNV fertőzést, míg morbilli vagy rubeola fertőzést egyik esetben sem igazoltak a laboratóriumi vizsgálatok. Parvovírus B19 és WNV koinfekció lehetősége azonban egy esetben felmerült. A célzottan a Virális Zoonózisok NRL-be érkező beteganyagok WNV szűrését automatikusan elvégeztük. Ennek eredményeképpen nyolc neurológiai tünetes betegnél (a WNND esetek 5,1%-a), akiknél a vizsgálatkérő orvos csak TBEV irányában kért laboratóriumi vizsgálatot végül aktuális WNV infekciót állapítottunk meg. A 138 konfirmált beteg közül 32 esetben (23,2%) mértünk savópár IIF vizsgálatával szerokonverziót vagy legalább négyszeres ellenanyag titer-szint különbséget. Hatvanhat beteg esetén (47,8%) pedig a liquor minta bizonyult anti-WNV IgM pozitívnak. Az esetkonfirmálást 40 betegnél (29,0%) tette lehetővé a vérmintából történő vírus nukleinsav kimutatása. Ehhez jelentős mértékben hozzájárult a teljes vérminták (mint új mintatípus) PCR vizsgálata. A PCR módszerrel történő esetkonfirmálás kritériuma a vérből vagy liquor mintából történő víruskimutatás. A vérsavó minták mellett bevezetésre kerülő teljes vérminták vizsgálatához szükség volt alvadásgátlót tartalmazó vérvételi csőben vett minták gyűjtésére is. Szerológiai vizsgálatokhoz ugyanis a vérmintákat natív vérvételi csövekben veszik le, amelyben az alakos elemeket tartalmazó frakció hamar megalvad, így a továbbiakban csak a vérsavó használható fel. Ezért EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátolt vérvételi csövekbe vett vérminták beküldésére hívtuk fel a klinikus kollégák figyelmét. Az EDTA vagy a teljes vér haemoglobin tartalma miatti esetleges PCR inhibíciós hatást előkísérletekben teszteltük: vérsavóhoz, EDTA-val alvadásgátolt teljes vérhez, natív csőben frissen vett vérből kinyert teljes vérhez, valamint RNáz/DNáz mentes ultratiszta desztillált vízhez mértük a PCR vizsgálatban használt WNV pozitív kontrollt, majd összehasonlítottuk a WNV real-time PCR Ct értékeket. A kísérletet megismételtük úgy is, hogy a mintákat egy éjszakán át tároltuk -80°C-

on. PCR inhibíciós hatást az EDTA-val alvadásgátolt teljes vérminták esetén nem tapasztaltunk. Az IgG; IgM; és IgA vizsgálatokhoz vérsavó és/vagy liquor minta valamennyi betegtől érkezett (vérsavó minta a betegek 99%-ától, liquor minta pedig 55%-tól.) A szerológia vizsgálatokat minden esetben elvégeztük. Ezzel szemben PCR vizsgálatot az esetek 73,8%-ánál végeztünk, azaz összesen 166 betegnél. Az egyes mintatípusok esetén, a tünetek megjelenése és a mintavételi időpontok között eltelt napok számát a 23. táblázat foglalja össze. A vizelet és teljes vérminták vételének átlagos időpontja nem mutatott jelentős eltérést a vérsavó és liquor mintákhoz képest, a problémát inkább az jelentette, hogy sokszor ezeket a mintatípusokat egyáltalán nem vették le és küldték be laboratóriumi vizsgálatra. **EDTA-val alvadásgátolt teljes vér (a továbbiakban teljes vér) 107 betegtől érkezett (47,6%), míg vizeletminta 143 betegtől (63,6%),** tehát a PCR szempontjából leginkább adekvát mintatípusok beküldése limitálta vizsgálatainkat.

23. táblázat: A tünetek kezdete és a mintavétel időpontja között eltelt napok száma mintatípusonként. (A 0 nap azt jelöli, hogy a mintavétel a tünetek kezdetének napján megtörtént.)

Mintatípus	Átlag	Minimum	Maximum
Vérsavó	8,75 nap	0 nap	77 nap
Alvadásgátolt teljes vér	9,53 nap	0 nap	44 nap
Liquor	7,86 nap	0 nap	65 nap
Vizelet	8,61 nap	0 nap	44 nap

Mivel a laboratórium leterheltsége rendkívül nagy volt és korábbi évek tapasztalatai alapján a liquor minták PCR vizsgálata nem segíti az esetkonfirmálást, liquor mintákból nem végeztünk víruskimutatást. Összesen 53 betegnél kaptunk PCR pozitív eredményt, ami az esetek 31,9%-a. A teljes vérminták bevezetésével növekedett a diagnosztikai szenzitivitás: a PCR pozitív betegek 45,3%-ánál a teljes vér és a vizelet is pozitív volt, 18,9%-ánál a teljes vér PCR pozitív, míg a vizelet PCR negatív eredményt adott. Vizelet PCR pozitívitás mellett a teljes vér a betegek 5,7%-ánál bizonyult negatívnak. Előfordult, hogy csak az egyik mintatípus érkezett a laboratóriumba: ebben az esetben teljes vérből 9,4%-ban, vizeletből pedig 15,1%-ban tudtuk kimutatni a vírust. A PCR pozitívitás eloszlását mintatípusonként részletesen a 24. táblázat mutatja be.

24.táblázat: A WNV PCR pozitivitás aránya mintatípusoként.

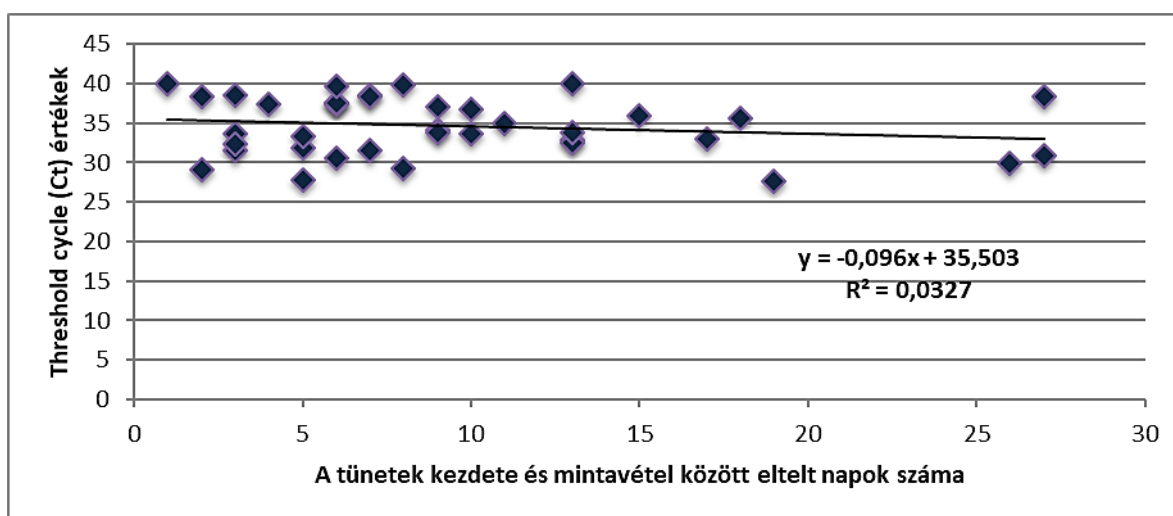
Nukleinsav kimutatás mintánként	A vizsgált minták száma	A WNV PCR pozitív minták száma
EDTA-val alvadásgátolt teljes vér	107	39
Vérsavó	44	6
Vizelet	143	35
PCR pozitivitás az egyes mintatípusok szerinti kategóriákban	A PCR pozitív betegek száma	A PCR pozitivitás aránya az egyes kategóriákban, az összes PCR pozitív beteghez viszonyítva (n összes=53)
Teljes vér PCR- & Vérsavó PCR +	1	1,9%
Teljes vér PCR+ & Vizelet PCR+	24	45,3%
Teljes vér PCR+ & vizelet PCR -	10	18,9%
Teljes vér PCR- & vizelet PCR+	3	5,7%
Teljes vér PCR+ & vizelet nem érkezett	5	9,4%
Vizelet PCR+ & teljes vér nem érkezett	8	15,1%
Csak vérsavó minta érkezett, mely PCR+ eredményt adott	2	3,8%

A teljes vérminták PCR vizsgálata során tapasztalt nagyarányú pozitivitásra való tekintettel 41 betegnél teljes vér és vérsavó minta összehasonlítást is végeztünk. Mindkét minta PCR pozitív eredményt adott **6 betegnél (14,6%)**, mindkét minta negatívnak bizonyult **2 személynél (4,9%)**. A vérsavó pozitivitás mellett teljes vér negatív PCR eredményt **egyetlen betegnél kaptunk (2,4%)**. Fontos azonban megjegyezni, hogy ebben az esetben a natív vérminta vétele 3 nappal a tünetek megjelenése után történt, míg a teljes vérmintáé a 11. napon (25. táblázat). Vérsavó negatív eredmény mellett a WNV kimutatása teljes vérmintából **32 betegnél** volt sikeres **(78,0%)**. Azoknál a személyeknél, akiknél a vírus mindkét mintatípusból kimutatható volt, a teljes vérmintákban alacsonyabb Ct értékeket mértünk, azaz a vírus RNS nagyobb mennyiségben volt jelen (25. táblázat). Továbbá F/2018 jelű betegnél a korai (1 napos) mintavétellel vett vérsavó mintából a vírus nukleinsav csak a detektálhatósági határon volt kimutatható (Ct 39,71), míg a 13. napon vett alvadásgátolt teljes vér alacsonyabb Ct értékkel (Ct 32,55) adott pozitív eredményt (25. táblázat). A Ct értékek összehasonlítása, a mintavételi időpontokkal a 25. táblázatban olvasható.

25.táblázat: Ct értékek és mintavételi időpontok a vérsavó és teljes vér PCR pozitív személyeknél.

Azonosító kód betegenként	Vérsavó minta WNV real-time PCR Ct értékei	A tünetek kezdete és a mintavételt között eltelt napok száma	Teljes vérminta WNV real-time PCR Ct értékei	A tünetek kezdete és a mintavételt között eltelt napok száma
A/2018	36,88	13	32,88	13
B/2018	34,01	2	29,01	2
C/2018	37,68	8	29,28	8
D/2018	40,00	5	31,81	5
E/2018	37,41	19	27,58	19
F/2018	39,71	1	32,55	13
G/2018	39,43	3	negatív	11

A továbbiakban vizsgáltuk a PCR pozitív teljes vérmintákban mérhető Ct értékek és a mintavételi időpontok összefüggését, vagyis azt, hogy esetünkben a betegség kezdete és a mintavétel között eltelt idő befolyásolta-e Ct értékeket. Azokat a PCR pozitív személyeket vontuk be a vizsgálatba, akiknél a tünetek kezdeti időpontja és a mintavétel dátuma is pontosan ismert volt. Összesen 37 beteg n=38 mintájának Ct értékeit vettük figyelembe a lineáris regresszióval végzett vizsgálatban, ahol az egyenes meredeksége -0,096 volt (8.ábra). A statisztikai adatok alapján tehát a rendelkezésre álló minták Ct értékei és a mintavétel időpontja között nem állt fenn lineáris kapcsolat. [Student-féle egymintás *t*-próbát végezve 5%-os szignifikancia szinten: $t_0 = -1,1028$; $t_{0,05/2} = 2,0281$ (Student-féle t-eloszlás táblázatból $v=36$ szabadsági fokon). (H_0 hipotézist elfogadtuk mivel: $-t_{0,05/2} < t_0 < t_{0,05/2}$; azaz $-2,0281 < -1,1028 < 2,0281$).]



8. ábra: PCR pozitív teljes vérminták (n=38) Ct értékei a mintavételi idő függvényében.

Két páciens esetén rendelkezésre állt második teljes vérminta is, amelyek mellé natív vérminta már nem érkezett:

- az egyik páciensnél a betegség kezdetétől számított **2. napon** vett teljes vérminta **Ct értéke 29,01** volt, míg a **6. napon vett teljes vér Ct értéke: 30,49**;
- a második betegnél az első, **19 napos teljes vér Ct értéke 27,58** volt, míg a második **26 napos teljes vérminta Ct értéke: 29,92**.

Egyik betegnél sem volt tudomásunk immunszuppresszióról, mint az elhúzódó viraemiát befolyásoló tényezőről.

A Ct értékek összehasonlításakor vizsgáltuk azon betegeket is, akiknek ugyanazon napi mintavétellel érkezett teljes vér és vizeletmintája, valamint mindkét mintatípus PCR eredménye pozitív volt. **Összesen 22 beteg n=24 mintáját** vettük figyelembe a vizsgálat során. (A mintavételi időpontokat és az egyes mintatípusokhoz tartozó Ct értékeket a II. számú melléklet tartalmazza.) H_0 nullhipotézisünk szerint a két mintatípus várható Ct értékei

megegyeznek. *Páros t próbát* alkalmaztunk 5%-os szignifikanciaszinten, ahol $t_0 = -0,942$; illetve $t_{krit} = 2,069$ volt (Student-féle t-eloszlás táblázatból $v = 23$ -as szabadsági foknál). Mivel: $-t_{krit} < t_0 < t_{krit}$; azaz $-2,069 < -0,942 < 2,069$, megállapíthattuk, hogy esetünkben az ugyanazon napi mintavételkor a vizelet és teljes vér minták várható Ct értékei nem tértek el szignifikánsan.

8.4.2.1. A vizelet és teljes vér PCR vizsgálatok további diagnosztikai aspektusa

Az esetkonfirmálások mellett a sikeres PCR vizsgálatoknak differenciáldiagnosztikai jelentősége is van. Különösen igaz ez a flavivírus fertőzések esetén, ahol a diagnosztikai vizsgálatokat tovább komplikálhatja a nemzetségen belül jellemző nagyfokú szerológiai keresztreaktivitás. Másodlagos flavivírus fertőzés esetén vagy korábbi heterológ flavivírussal végzett vakcináció mellett bekövetkező fertőzéskor, a *buster* hatás miatt az első fertőzést okozó flavivírus vagy a vakcinában megtalálható vírustörzs ellen termelt ellenanyagok szintje indul gyors emelkedésnek. A 2018-as év egyik új tapasztalata, hogy korábbi TBEV elleni vakcináció vagy korábban átvészelt TBEV fertőzés után bekövetkező WNV fertőzéskor már a korai vérmintában végzett anti-WNV IgG aviditás vizsgálat is magas értékeket mutat. A magas aviditás érték önmagában azt feltételezné, hogy korábban átvészelt WNV fertőzés esete áll fenn. 2018-ban négy olyan aktuálisan WNV fertőzésben szenvedő betegnél mértünk magas anti-WNV IgG aviditást, akiknél az anamnézisben szerepelt korábbi vagy közelmúltban kapott TBEV védőoltás. Emellett, egy betegnél a rendkívül magas ellenanyag-titer értékek és anamnesztikus adatok figyelembevételével korábban átvészelt TBEV fertőzést is valószínűsítettünk, az aktuálisan fennálló WNV fertőzés mellett. A négy betegből három esetben vizeletből és/vagy teljes vérmintából sikeres volt a WNV nukleinsav kimutatása, mely jelentős mértékben hozzájárult a diagnózis megerősítéséhez. A négy páciens részletes TBEV és WNV szerológiai, illetve PCR eredményeit a 26. táblázat összegzi.

26.táblázat: Korábban TBEV ellen oltott, 2018-ban aktuális WNV fertőzéssel diagnosztizált betegek WNV és TBEV szerológiai és PCR eredményei. (n.t.: nem teszteltük a mintát)

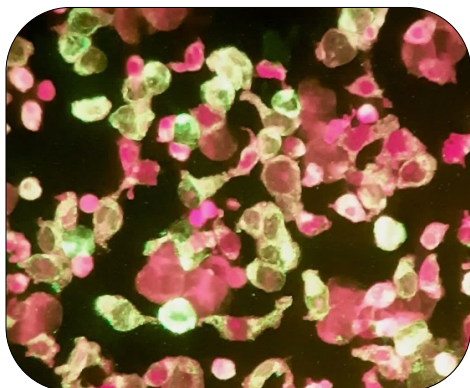
Beteg száma	WNV IgG IIF	WNV IgA IIF	WNV IgM IIF	TBEV IgG IIF	TBEV IgA IIF	TBEV IgM IIF	PCR	WNV IgG aviditás ELISA	Flavivirus vakcinációs anamnézis
1.	≥1:5120	pozitív	pozitív	≥1:160	pozitív	negatív	Vizelet WNV+	70,5% Magas	TBEV oltás: 3-4 évvel korábban.
2.	1:160	pozitív	pozitív	1:160	negatív	negatív	negatív	n.t.	TBEV oltás: évekkal korábban.
2.	1:2560	pozitív	pozitív	≥1:160	n.t.	n.t.	n.t.	96,7% Magas	
3.	≥1:10	pozitív	negatív	≥1:10	pozitív	negatív	Vizelet és teljes vér WNV+	89,9% Magas	TBEV vakcináció a közelmúltban: 2018.04.06. és 2018. 04.20. (WNV tünetek kezdete: 2018.08.24.)
4.	1:20480	pozitív	pozitív	1:20480	pozitív	kétes	Vizelet és teljes vér WNV+	94,3% Magas	TBEV ellen korábban oltott, nyugalmazott erdész, számos kullancscsípés érte. Korábban átvészelt TBE valószínűsíthető.
4.	≥1:20480	pozitív	pozitív	≥1:20480	negatív	pozitív		96,5% Magas	

8.4.3. Az első konfirmált humán Usutu vírusherzítés Magyarországon

A differenciáldiagnosztikai vizsgálatokat 2018-tól kezdődően USUV irányába is kiterjesztettük. Ennek első lépéseként valamennyi WNV real-time PCR-ben negatív teljes vér és vizeletmintát vizsgáltunk USUV real-time PCR módszerrel, amely egyetlen teljes vérminta esetén adott pozitív eredményt. (A páciens vizeletmintája emellett PCR negatív volt.) A beteget megelőző WNV szerológiai és PCR eredményei alapján valószínűsített WNV esetnek minősítettük, amely eredményről készült mikrobiológiai leletet utólag visszavontuk. A vérsavó szerológiai vizsgálatokat USUV irányában is elvégeztük, a betegtől liquor minta nem érkezett. Ezt követően az IIF ellenanyag végtiter meghatározás is egyértelművé tette az aktuális USUV fertőzés fennállását: a legmagasabb titer-szint értékeket az USUV specifikus IgG; IgM és IgA vizsgálatokban mértük (27. táblázat). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a rutin diagnosztikában végzett WNV ellenanyagszűrés az IgG, IgM és IgA IIF, valamint WNV IgM ELISA vizsgálatokban is pozitív eredményt adott, szerológiai keresztreaktivitás miatt (27. táblázat). Ezzel szemben a korai vérmintában az anti-USUV IgG vizsgálat csak IIF módszerrel adott szeropozitív eredményt. A kereskedelmi forgalomban kapható anti-USUV IgG ELISA vizsgálatban a vérsavó minta negatívnak bizonyult (27. táblázat). A betegtől második vér- és vizeletminta – a laboratórium kérése ellenére – nem érkezett. A vérsavó minta anti-USUV IgG IIF vizsgálatáról készült fluoreszcens mikroszkópos felvétel a 8. ábrán látható.

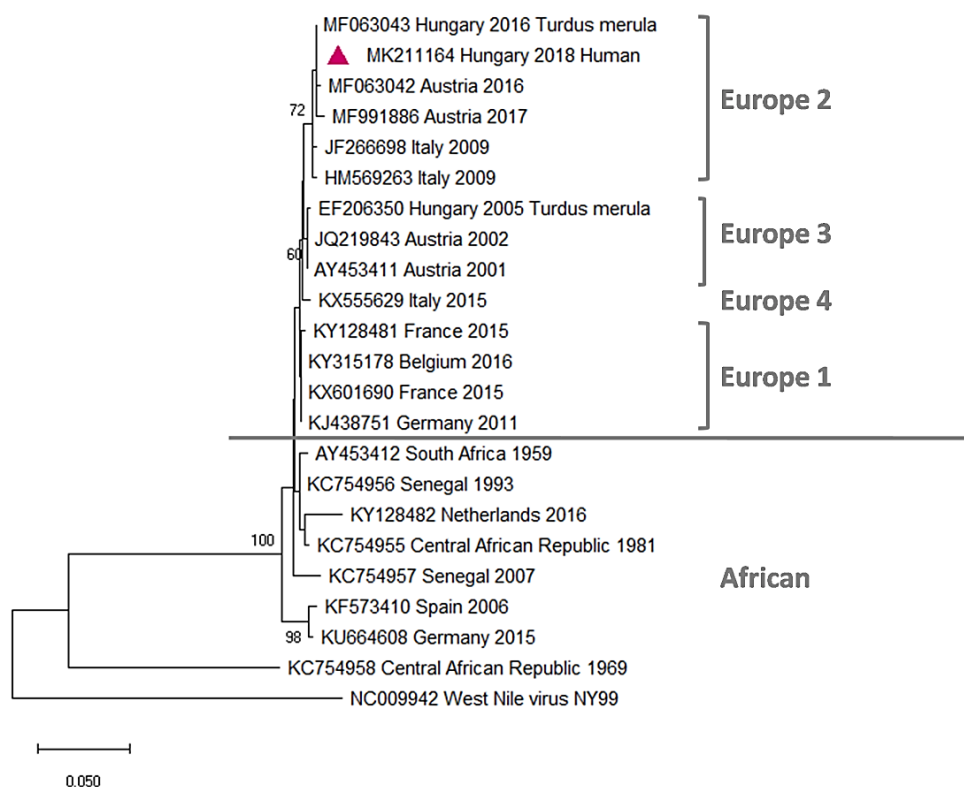
27.táblázat: A 2018-ban Magyarországon igazolt humán USUV eset laboratóriumi diagnosztikai eredményei.

A vérsavó minta IIF szerológiai eredményei					
Anti-USUV IgG:	1:160	Anti-WNV IgG:	1:20	Anti-TBEV IgG:	1:10
Anti-USUV IgM:	1:640	Anti-WNV IgM:	1:40	Anti-TBEV IgM:	<1:10; negatív
Anti-USUV IgA:	≥1:1280	Anti-WNV IgA:	1:20	Anti-TBEV IgA:	<1:10; negatív
A vérsavó minta ELISA eredményei					
Focus Diagnostics WNV IgM Capture ELISA: Ratio = 4,75 Pozitív					
Euroimmun Usutu virus IgG ELISA: Ratio = 0,25 Negatív					
A PCR vizsgálatok eredménye					
Minta:	EDTA-val alvadásgátolt teljes vér		Vizelet		
WNV real-time PCR:	negatív		negatív		
USUV real-time PCR:	pozitív Ct 37,00		negatív		
USUV nested RT-PCR:	pozitív		negatív		



9. ábra: Az igazolt USUV fertőzött páciens vérsavó mintájának anti-USUV IgG in-house IIF fluoreszcens mikroszkópos felvétele. A vérsavó minta hígítási foka: 1:40. Az IIF lemez Vero E6 sejtek felhasználásával készült. (Leica DM LB2 fluoreszcens mikroszkóp; 200-szoros nagyítás.)

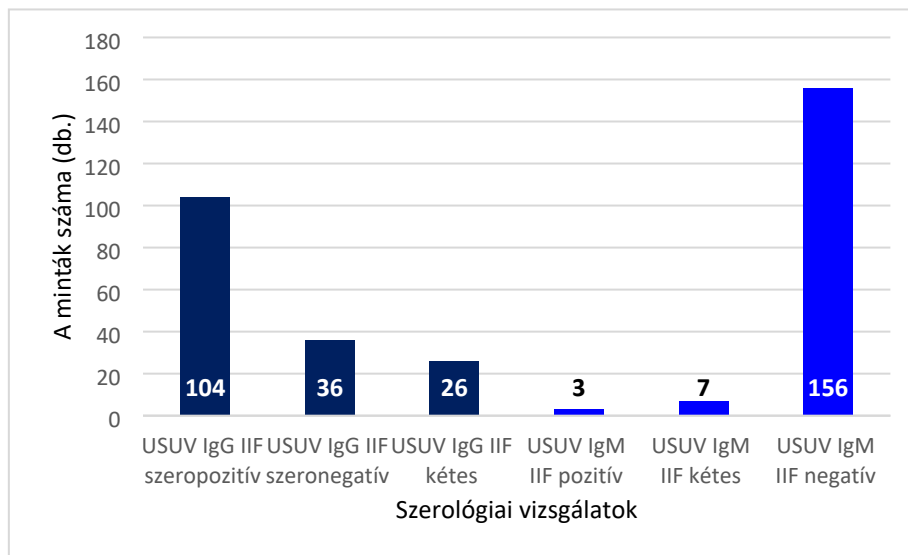
Az USUV real-time PCR eredményt nested PCR módszerrel konfirmáltuk, majd a kapott PCR terméket Sanger módszerrel szekvenáltuk (10. ábra). Az USUV genom NS5 fehérjét kódoló régiójának 391 nukleotid hosszúságú szekvenciárészlete alapján USUV Európa lineage 2 jelenlétét azonosítottuk (GenBank-i azonosító szám: MK211164). A vizsgált génszakasz 100%-ban egyezett egy 2016-ban Magyarországon feketerigóból kimutatott USUV törzs szekvenciájával (GenBank-i azonosító szám: MF063043) (10. ábra). A vírust a klinikai mintából nem sikerült izolálnunk.



10. ábra: USUV NS5 391 nukleotid hosszúságú szekvenciák illesztésével kapott Neighbour-joining filogenetikai fa (Kimura két-paraméteres modell, 1000-szeres bootstrap ismétlés). A 2018-as hazai humán betegmintából nyert szekvenciát piros háromszög jelöli. A filogenetikai fán a szekvenciák jelölése az alábbiak szerint történt: GenBank-i azonosító szám; az ország, ahol vírust izolálták vagy kimutatták; az azonosítás éve.

A beteg 43 éves férfi, tápiósági lakos (Tápióság, Pest megye), anamnézisében utazási előzmény nem szerepelt. (A beteg lakóhelyét a 6. ábrán piros csillag jelöli.) Tünetei 2018. szeptember 8-án kezdődtek, mintavételre 10 nappal később: 2018. szeptember 18-án került sor. A beteg virális meningitis jellegzetes tüneteit mutatta: láz, hidegrázás, izomgörcs, fejfájás és tarkómerevség kíséretében. Kezelőorvosa elmondása szerint másfél-két hét alatt tünetmentesen gyógyult. Kórházi ápolásra hét napig szorult. A kórlefolyást súlyosbító komorbiditási tényezők: alapbetegségek vagy immunszuppresszió fennállásának lehetősége nem merült fel. A 2018-as neuroinvazív fertőzés diagnosztizálásával először igazoltunk humán fertőzést Magyarországon.

Az első humán USUV fertőzés megerősítését követően, a WNV betegektől még rendelkezésre álló vérsavó mintákat tovább vizsgáltuk USUV ellenanyagokra nézve, a rutin diagnosztikában alkalmazott IIF és ELISA tesztekkel. A kiegészítő vizsgálatok szükségesek voltak az esetlegesen USUV PCR negatív, de aktuálisan vagy közelmúltban fertőzött betegek azonosításához. A vizsgálatokat annak érdekében is végeztük, hogy felmérjük a WNV és USUV szerológiai tesztekben kialakuló keresztreaktivitás mértékét. Összesen 166 anti-WNV IgG és IgM IIF pozitív vérsavó mintát vizsgáltunk tovább IIF módszerrel: anti-USUV IgG és IgM ellenanyagok irányában. Az ellenanyag kimutatást a vérsavó minták 1:10 és 1:40 hígításában végeztük el. Amennyiben a minta 1:10-es hígításában specifikus morfológiájú, pozitív festődés nem volt látható, az eredményt negatívnak tekintettük. Ha a minta csak 1:10-es hígításban adott reaktív eredményt, akkor kétes véleményezést adtunk. Ha mindkét hígítási fokban specifikus festődést láttunk, az eredményt pozitívnak fogadtuk el. Az anti-USUV IgG IIF szűrővizsgálatokban a szerológiai keresztreaktivitás mértéke nagyfokúnak bizonyult: a minták 62,6%-a (n=104) szeropozitív; 21,7%-a (n=36) kétes eredményt adott. Szeronegatív értékelést 15,7%-ban (n=26) adtunk. Összességében tehát a vizsgált WNV IgG szeropozitív betegek 84,3%-a (n=140) adott reaktív eredményt az USUV IgG IIF vizsgálatokban. Az IgM ellenanyagszűrés során a keresztreaktivitás mértéke alacsonyabbnak bizonyult: pozitív eredményt a minták 1,8%-a (n=3), míg kétes eredményt 4,2%-a (n=7) adott. A minták 94%-a (n=156) anti-USUV IgM IIF negatív volt. A három IgM pozitív minta közül az egyik az igazolt USUV fertőzött beteg vérsavó mintája volt. A másik két esetben az ellenanyag végtiter meghatározás és PCR vizsgálatok eredményeképpen aktuális WNV fertőzést valószínűsítettünk. Az IIF szerológiai vizsgálatok eredményeit a 11. ábra foglalja össze.



11. ábra: Az anti-WNV IgG és IgM pozitív vérsavó minták USUV IgG és IgM IIF vizsgálatának eredményei.

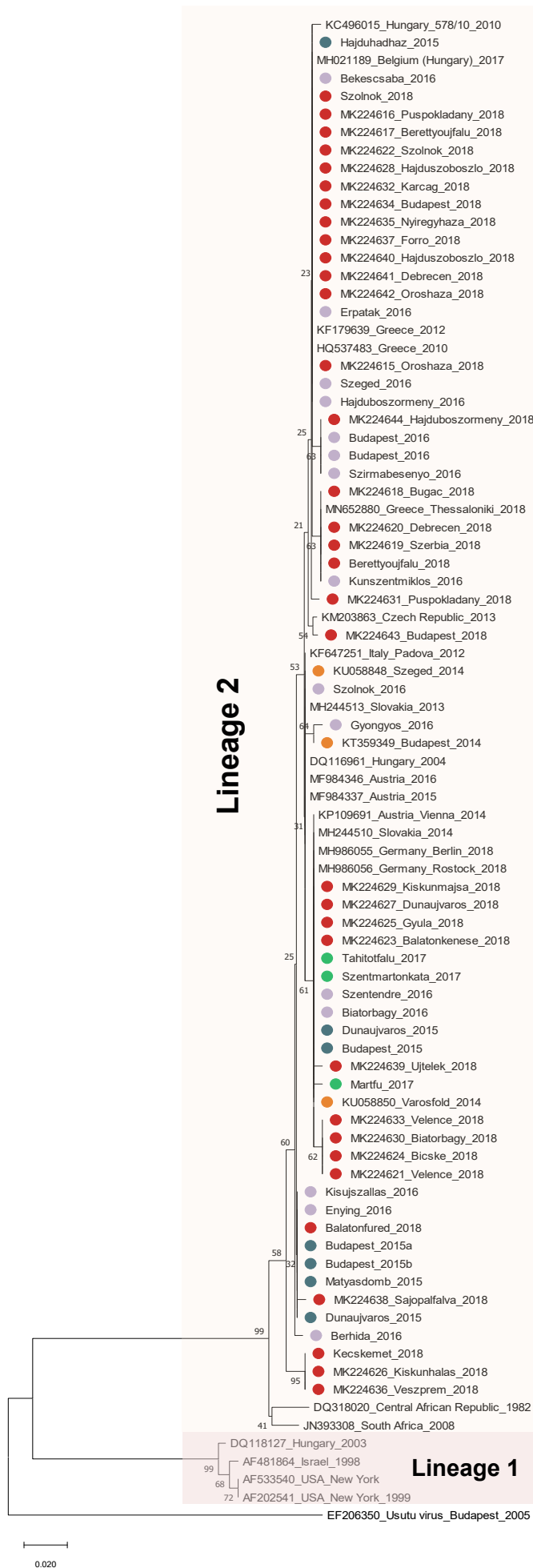
A továbbiakban kereskedelmi forgalomban kapható USUV IgG ELISA (teszt pontos megnevezését ld.: 9. táblázatban) vizsgálatokat is végeztünk azon vérsavó mintákkal, melyek 1:40-es hígításban is erősen pozitív eredményt adtak az USUV IgG IIF vizsgálatban. Mivel az ELISA tesztek korlátozott mennyiségben álltak rendelkezésre, nem végeztünk vizsgálatot valamennyi mintán. Az IIF eredményekhez viszonyítva a szerológiai keresztreaktivitás mértéke kisebbnek bizonyult az aktuálisan WNV fertőzött, anti-WNV IgG szeropozitív betegek körében: reaktív eredményt a minták 26,6%-ánál (n=12 szeropozitív; n=9 kétes) mértünk, szeronegatívnak a minták 73,4%-a (n=58) bizonyult. Ugyanakkor a PCR vizsgálattal és IIF módszerrel igazolt USUV fertőzött beteg első vérmintája az anti-USUV IgG ELISA vizsgálatban negatív eredményt adott (27. táblázat). Ugyan a kapott eredmény csak egyetlen igazolt eset kivizsgálására korlátozódik, e tapasztalat is elegendő ahhoz, hogy a laboratóriumi vizsgálatokban ne csupán egy módszerre hagyatkozva végezzük a diagnosztikai vizsgálatokat. Korai mintában mért szeronegatív ELISA eredmény épp az olyan betegeknél vezethet az esetkonfirmálás elmaradásához, akiktől – a laboratórium javaslata ellenére – nem érkezik második vérminta szerológiai vizsgálatokhoz. Az ELISA és IIF vizsgálatokban kapott eltérő anti-USUV IgG eredmények magyarázhatók a két módszer jellegéből adódó különbségekkel is: míg az IIF módszerben az antigén gyártása során az infektív vírussal fertőzött sejtekben végbemenő vírusreplikáció különböző virális antigének expresszióját eredményezi, addig az ELISA tesztek egyetlen virális antigént tartalmaznak. Ha az erre specifikus ellenanyagok szintje nem éri el a detektálhatósági limitet, míg más virális antigén epitópokra specifikus ellenanyagok már mérhető koncentrációban vannak jelen, magyarázható a két módszerrel kapott eltérő eredmény. Kereskedelmi forgalomban kapható anti-USUV IgM kimutatásra alkalmas ELISA teszt jelenleg még nem elérhető, ezért a keresztreaktivitás mértékét csak IIF módszerrel vizsgáltuk.

8.5. A nyugat-nílusi vírus PCR pozitív minták szekvenciameghatározása

2014 és 2018 között összesen 75 különböző betegből származó minta szekvenálását végeztük el (75 esetben az NS3 fehérjekódoló régió egy részletét, 1 betegnél pedig teljes genom szekvenálást is). Valamennyi mintában lineage 2 WNV jelenlétét azonosítottuk. A 2018-as epidémia mintáiból 46 betegnél sikerült szekvenálással is megerősíteni, hogy a fertőzést lineage 2 WNV okozta. Ebből GenBanki feltöltésre 34 mintánál került sor (GenBank-i azonosító számok: MK224611–MK224644). (A 2014 – 2018 között szekvenált minták települések szerinti eloszlását a III. számú melléklet tartalmazza, ahol GenBank-i feltöltésre került sor, jelölve az azonosító számot.) A Kimura két-paraméteres modell szerint készült Neighbour-joining filogenetikai fán látható, hogy a 2018-as szekvenciák nem különülnek el sem a korábbi években azonosított hazai WNV szekvenciáktól, sem pedig a környező országokból származó szekvenciáktól (12. ábra).

A 12. ábrán MH021189 GenBank-i azonosítószámú szekvencia egy Belgiumban diagnosztizált, 2017-ben Magyarországról importált humán WNV esetből származik, tehát nem meglepő, hogy a hazai szekvenciáktól nem különül el a filogenetikai fán (Wollants et al., 2018). A WNV NS3 fehérje 249. aminosav pozíciójában Hisztidin→Prolin (H249P) vagy Treonin→Prolin (T249P) szubsztitúció szakirodalmi adatok szerint magasabb szintű viraemia kialakulását okozhatja Észak-Amerikában elterjedt madárfajokban (Braut et al., 2007; Papa et al., 2011) E polimorfizmus meglétét vizsgáltuk az általunk meghatározott szekvenciák esetén is (28. táblázat). Bár fontos megjegyezni, hogy a vírustörzs és a gerinces gazdaszervezet közötti interakció mindig fajspecifikus, ezért a virulenciára vonatkozó messzemenő következtetések levonása nem volt célja vizsgálatainknak.

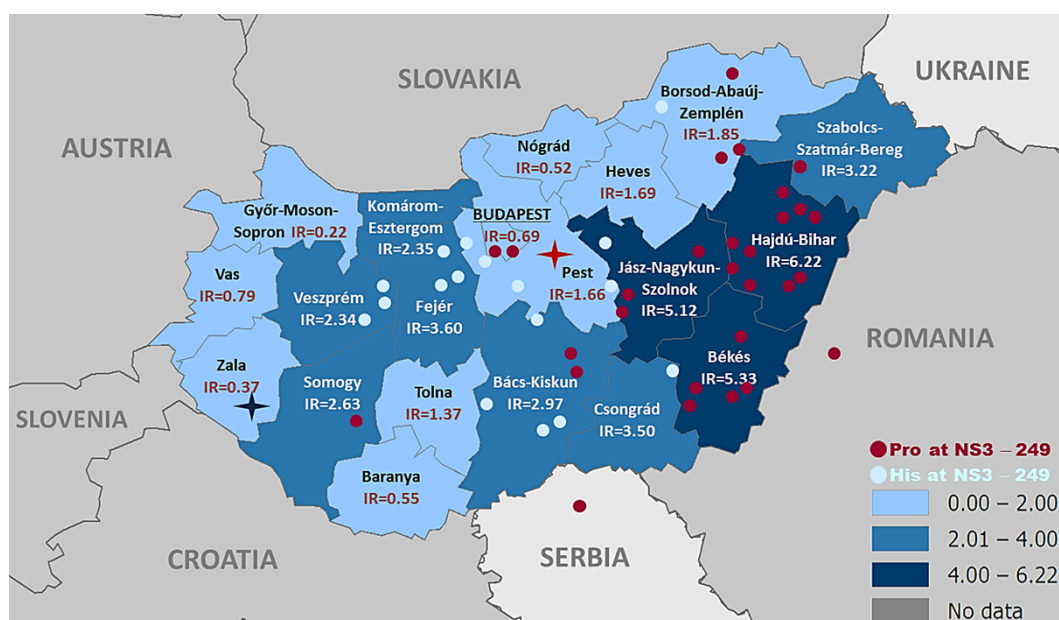
A 2018-ban szekvenált minták esetén a H249P polimorfizmus aránya viszonylag magas: 63%-os volt. A minták eloszlását tekintve a H249P variánsok előfordulása a keleti és déli országrészre koncentrálódott, beleértve két külföldről (Szerbiából és Romániából) behurcolt fertőzés esetén is (13. ábra). Az aminosav szekvenciák illesztésekor további egy eltérést azonosítottunk MK224615 (Orosháza 2018) minta esetén. Az NS3 fehérje 215. aminosav lókuszán egy Lizin → Arginin szubsztitúció található e mintában. A szekvencia a filogenetikai fán nem különül el (12. ábra). A misszensz mutációt az NS3 kódoló régió 644. nukleotid pozíciójában bekövetkező adenin (A) → guanin (G) tranzíció eredményezte. A tranzíciót az NC_001563.2 GenBank-i azonosító számú WNV lineage 2 referenciaszekvenciához történő illesztéssel azonosítottuk. Az NCBI BLAST adatbázisában végzett keresés eredményeként nem találtunk olyan GenBank-ba feltöltött szekvenciát, mely ugyanezt a polimorfizmust tartalmazta volna.



12. ábra: Kimura két-paraméteres modell szerinti Neighbour-joining filogenetikai fa (1000-szeres ismétléssel végzett bootstrap analízis). A 2014 és 2018 között azonosított hazai humán betegmintákból származó WNV szekvenciák felhasználásával, melyek jelölése az alábbi: **2014: narancssárga kör; 2015: kék kör; 2016: lila kör; 2017: zöld kör; 2018: vörös kör.**

28.táblázat: Az NS3 H249P szubsztitúció előfordulása a hazai humán mintákból kimutatott WNV törzsekben.

Év	Szekvenciák száma	H249P mutáció
2014	3	0
2015	4	n=1 (25%)
2016	18	n=7 (39%)
2017	4	0
2018	49	n=29 (63%)
Összesen	78	n=37 (49%)



13. ábra: A H249P polimorfizmus területi eloszlása 2018-ban (a betegek lakóhelye szerint). A 2018-as incidencia adatokat tartalmazó térképen piros színű pöttyök jelölik a 249-es aminosav pozícióban Prolint, kék színű pöttyök a Hisztidint tartalmazó mintákat.

8.6. Nyugat-nílusi vírus szeroprevalencia meghatározása egészséges véradók körében

A humán WNV fertőzések jelentős hányada szubklinikailag zajlik, kórházi ellátásra és laboratóriumi kivizsgálásra a súlyosabb, többnyire neurológiai tünetekkel kísért megbetegedéseknél kerül sor. Ezért a humán fertőzések valós számáról nincs információnk, mint ahogyan a hazai lakosság körében sem végeztek az átvészeltég felmérésére irányuló vizsgálatokat az első hazai WNND esetek diagnosztizálása óta. Bár seroepidemiológiai szűrés megszervezése nem állt módunkban, nagyobb (n=2112) számban rendelkezésre álló, egészséges véradóktól érkező plazmaminták szerológiai vizsgálatával felmértük a WNV szeroprevalenciát a vizsgált csoporton belül. A vizsgálatokat az Országos Vérellátó Szolgálat (továbbiakban OVSZ) Konfirmáló Laboratóriumával folytatott szakmai együttműködés keretében végeztük. A véradók mintáit az OVSZ 2016 őszén gyűjtötte WNV nukleinsav amplifikációs tesztek bevezetése céljából. WNV nukleinsavat nem sikerült kimutatni egyetlen mintából sem. A fennmaradó plazmamintákon azonban további szerológiai vizsgálatokat végeztünk: anti-WNV IgG IIF szűrővizsgálatot követően a reaktív mintákon a WNV és TBEV IgG végtitert IIF módszerrel határoztuk meg, majd haemagglutináció-gátlással és vírusneutralizációval konfirmáltuk az eredményeket. A reaktív minták esetén végeztünk anti-WNV IgM IIF és IgM Capture ELISA (teszt megnevezését ld.: 9. táblázatban) vizsgálatot is. A szeropozitív és szeronegatív donorok csoportja nemek és életkor szerinti összehasonlításában Mann-Whitney nem-paraméteres U-tesztet és khi négyzet próbát alkalmaztunk. A statisztikai szignifikanciát $p < 0.05$ értéknél határoztuk meg. A minták gyűjtése 2016. szeptember 28. és 2016. október 11. között történt. A donorminták területi eloszlásában a 19 megyét és a fővárost is magába foglaló hét régiót vettük figyelembe (29. táblázat). A minták gyűjtését az OVSZ budapesti központi laboratóriuma végezte. Területi ellátási kötelezettség szerint hat régió (81%) az OVSZ budapesti központi laboratóriumához, míg egy régió (19%) az OVSZ debreceni székhelyű regionális laboratóriumához tartozik (29. táblázat). A vizsgálatba önkéntes véradók kerültek beválogatásra, random mintavétellel. A hazai demográfiai adatokat a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) nyilvánosan is elérhető adatbázisából gyűjtöttük. A vizsgálathoz összesen 2112 véradótól érkezett plazma minta. A 2112 véradó a 2016-os össznépesség (9 830 485 fő) 0,021%-ának felelt meg (29. táblázat). A véradók átlagéletkora 38,4 év volt, 1053 férfi és 1059 nő mintáját vizsgáltuk. A férfiak átlagéletkora 36,7 év (legfiatalabb véradó: 18 éves; legidősebb: 65 éves), még a nők átlagéletkora 40,2 év (legfiatalabb véradó: 18 éves; legidősebb: 67 éves) volt. Véradásra első alkalommal jelentkezett 378 fő, míg ismert véradó volt: 1734 fő. A vérminták gyűjtése 45 vérvételi helyről, a véradók állandó tartózkodási helye alapján: 437 településről valósult meg. Nyolc donor esetén nem volt ismert a tartózkodási hely: 6 főnél költözés miatt, 2 fő pedig külföldi állampolgár volt. A véradók 85%-ánál (n=1787 fő) a véradás helye és a lakóhely régiós

szinten egybeesett, 15% esetén azonban eltért. Az eltérés oka 73 személynél (3,46%) az volt, hogy míg a donáció helye a budapesti központi laboratórium ellátási területéhez tartozott, addig a véradók lakcíme az észak-alföldi régióba esett. Az adatok értékelése a véradók lakcíme alapján történt.

Szeroprevalencia a teljes mintaszámban:

A 2112 véradó anti-WNV IgG IIF szűrővizsgálatában 393 minta bizonyult reaktívnek (a minta 1:10-es hígításában specifikusan pozitív festődést mutató sejtek voltak láthatók). Az IIF módszerrel történő végtiter meghatározás eredményeként ebből 267 véradónál anti-TBEV IgG szeropozitivitást véleményeztünk. A fennmaradó 126 véradó közül 71 személynél az anti-WNV IgG IIF titer legalább négyszer magasabbnak bizonyult, mint az anti-TBEV IgG titer. Ötvenöt plazma esetén az anti-WNV IgG és anti-TBEV IgG IIF titerek egyeztek. A konfirmáló szerológiai vizsgálatokat a 126 reaktív mintán elvégeztük. Haemagglutináció-gátlással 55 mintánál (2,6%) állapítottunk meg WNV szeropozitivitást, míg vírusneutralizációval 46 véradónál (2,19%) konfirmáltuk a WNV szeropozitív eredményt. WNV szeropozitívnek csak azokat a mintákat fogadtuk el, melyeknél a vírusneutralizációs próba is igazolta az eredményt. A 46 anti-WNV IgG szeropozitív donor közül három személynél (6,52%) az IgG pozitívás mellett anti-WNV IgM pozitívás is mérhető volt, mind IIF, mind pedig ELISA módszerrel. E három véradónál tehát aktuális vagy közelmúltban zajlott WNV infekciót is valószínűsíthettünk. A WNV szeroprevalencia a vizsgált önkéntesek körében 2,19% volt [95%-os konfidencia intervallum (a továbbiakban 95% CI): 1,64% - 2,90%]. A népességarányosan korrigált, súlyozott prevalencia 2,34% volt (95% CI: 1,65% - 3,03%) (29. táblázat). A 46 WNV szeropozitív véradó átlagéletkora 41,2 év volt (legfiatalabb véradó: 18 éves; legidősebb: 67 éves). A szeropozitív véradók nemek szerinti megoszlása az alábbi volt: 25 férfi (átlagéletkor: 42,2 év) és 21 nő (átlagéletkor: 39,9 év). A szeropozitív és szeronegatív személyek életkor szerinti eloszlásában szignifikáns különbség nem volt ($p=0,113$), illetve nemek szerinti eloszlás tekintetében sem találtunk szignifikáns eltérést ($p=0,538$).

A szeroprevalencia területi eloszlása:

A területi eloszlás vizsgálata során 2104 véradó mintáját vettük figyelembe (nyolc donornál a tartózkodási hely nem volt ismert). A hét régióban a véradók eloszlása régiónként 73 – 893 véradó/régió között mozgott (0,005% - 0,038%). A régiós népességszámhoz viszonyítva legkevesebb mintát az észak-alföldi régióból sikerült gyűjteni (29. táblázat). Ennek oka, hogy ez az egy régió területi ellátási kötelezettség szerint nem az OVSZ központi laboratóriumához tartozott, hanem a debreceni régiós laboratóriumhoz. Legmagasabb szeroprevalencia értékeket a dél-alföldi (3,57%); a dél-dunántúli (3,31%); az észak-alföldi (2,74%); valamint a közép-magyarországi (2,24%) régiókban mértünk (29. táblázat). E négy régióban a WNV szeroprevalencia az országos érték fölöttinek adódott. Három régióban a szeroprevalencia

viszont alacsonyabbnak bizonyult: a közép-dunántúli (1,98%); a nyugat-dunántúli (0,93%); valamint az észak-magyarországi (0,63%) régiókban (29. táblázat). A WNV IgM pozitív véradók a dél-dunántúli és közép-dunántúli régiókban lokalizáltak (14. ábra). A szeroprevalencia régiók szerinti eloszlását a 29. táblázat mellett a 14. ábra szemlélteti.

29.táblázat: A régiónkénti mintaszámok és szeroprevalencia értékek (CI: konfidencia intervallum).

Szerológiai szűrés véradók körében – 2016						
Régió	Rövidítés	OVSZ laboratórium	Mintaszám (db)	Régiós népességszámhoz viszonyított arány (%)	anti-WNV IgG szeropozitív donorok (db)	anti-WNV IgG prevalencia (%) 95% CI
Közép-Magyarország (Central Hungary)	CH	Budapest	893	0,030	20	2,24 (1,45-3,43)
Közép-Dunántúl (Central Transdanubia)	CTD	Budapest	405	0,038	8	1,98 (1,00-3,85)
Nyugat-Dunántúl (Western Transdanubia)	WTD	Budapest	214	0,022	2	0,93 (0,26-3,34)
Dél-Dunántúl (Southern Transdanubia)	STD	Budapest	121	0,014	4	3,31 (1,29-8,19)
Észak-Magyarország (Northern Hungary)	NH	Budapest	146	0,013	1	0,69 (0,12-3,78)
Észak-Alföld (Northern Great Plain)	NGP	Debrecen	73	0,005	2	2,74 (0,75-9,45)
Dél-Alföld (Southern Great Plain)	SGP	Budapest	252	0,02	9	3,57 (1,89-6,65)
Összesen:			2104	0,02	46	2,19 (1,64-2,90)
Súlyozott szeroprevalencia						2,34 (1,65-3,03)

A szeroprevalencia régiós eloszlását összehasonlítottuk a klinikai tünetes esetek területi eloszlásával is. E tekintetben kumulatív incidenciáértékeket vettünk figyelembe, azaz az adott régióban 2004 és 2016 között diagnosztizált WNV esetek számát, arányítva a régió átlagos népességszámához a vizsgált időszakban. A kumulatív incidenciá legmagasabbnak a dél-alföldi (0,0038%); észak-alföldi (0,0028%); valamint a közép-magyarországi (0,0022%) régiókban volt (30. táblázat). A szerológiai szűrés során a legmagasabb szeroprevalencia értéket szintén a dél-alföldi régióban mértük. Egyetlen esetben tapasztaltunk eltérést a kumulatív incidenciá és a mért szeroprevalenciá között: a dél-dunántúli régióban. Itt a 2004 és

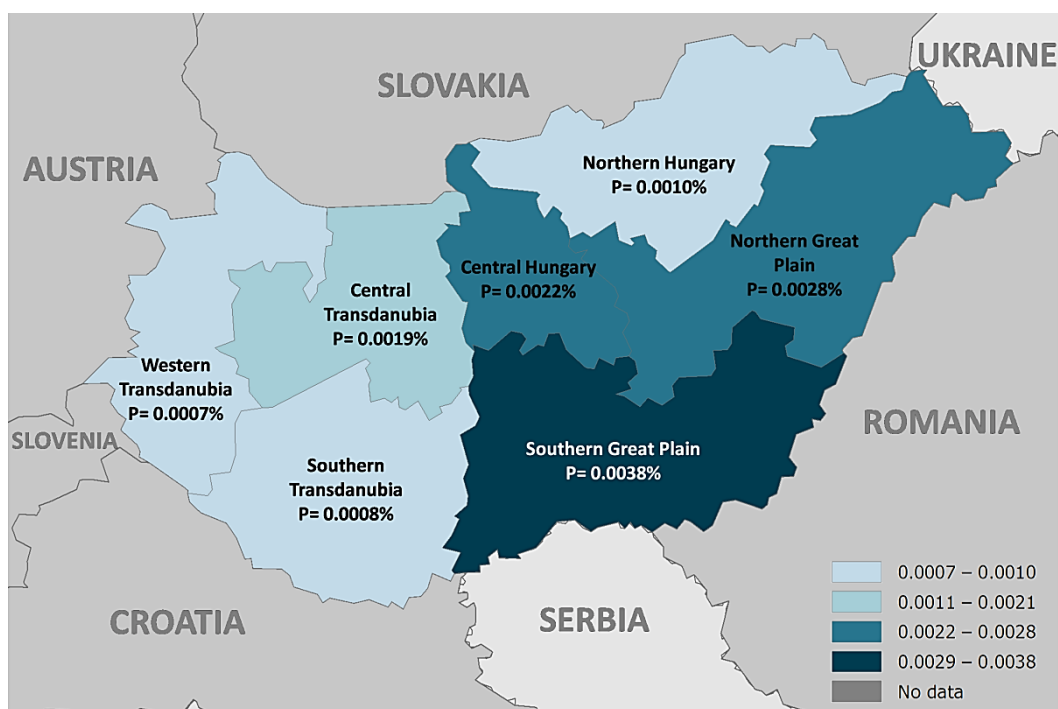
2016 közötti időszakban alacsonynak bizonyult a kumulatív incidencia, míg e régióban mértük a második legmagasabb szeroprevalencia értéket (29-30. táblázat, 14-15. ábra). Fontos azonban megjegyezni, hogy a WNV okozta megbetegedések kivizsgálását nagymértékben befolyásolja az egészségügyi szolgáltató intézmények elérhetősége az adott régióban, illetve az, hogy ezáltal az esetek hány százalékában kerül sor kórházi ellátásra majd laboratóriumi kivizsgálásra. Hat régió esetén a kumulatív incidencia és a szeroprevalencia korrelált egymással. A kumulatív incidencia régiók szerinti eloszlását a 30. táblázat mellett a 15. ábra szemlélteti.



14. ábra: A WNV szeroprevalencia régiónkénti megoszlása 2016-ban. Az anti-WNV IgM pozitív véradók lakóhelyét piros csillag jelöli. (P: prevalencia)

30. táblázat: A diagnosztizált WNND és WNF esetek régiókénti kumulatív incidenciája, 2004 – 2016 között.

Régió	Átlagos népszámszám 2004 és 2016 között	A klinikai WNND és WNF esetek kumulatív száma (db)	Kumulatív incidencia (%) 95% CI
CH	2 921 717	66	0,0022 (0,0018-0,0029)
CTD	1 091 368	20	0,0019 (0,0012-0,0028)
WTD	993 254	7	0,0007 (0,0003-0,0015)
STD	944 999	7	0,0008 (0,0004-0,0015)
NH	1 216 426	11	0,0010 (0,0005-0,0016)
NGP	1 505 145	41	0,0028 (0,0021-0,0037)
SGP	1 314 599	48	0,0038 (0,0028-0,0048)
Összesen	9 987 508	200	0,0020 (0,0017-0,0023)



15. ábra: A laboratóriumiilag diagnosztizált WNND és WNF esetek számán alapuló kumulatív incidencia (P) régiókénti megoszlása 2004 és 2016. között. (Az NNK Virális Zoonózisok NRL saját adatai alapján.)

9. Megbeszélés

A doktori munka célkitűzése a humán flavivírus-fertőzések differenciáldiagnosztikájának fejlesztése és a diagnosztikai szenzitivitás növelése volt, melyhez molekuláris biológiai módszerek bevezetésével bővítettük az addig kizárólag szerológiai vizsgálatokon alapuló diagnosztikai algoritmust. Bár a korábban elterjedt vélekedés szerint a PCR módszer kevésbé alkalmazható a flavivírus infekciók diagnosztikájában, a direkt víruskimutatás ma már nélkülözhetetlen eleme a referencialaboratóriumok tevékenységének, hiszen enélkül az esetek konfirmálása, filogenetikai vizsgálatok elvégzése, a vírustörzsbank fenntartása, valamint diagnosztikumok gyártása sem lehetséges. A referenciatevékenység mellett azonban a napi rutin diagnosztikában is hasznos e módszerek alkalmazása, hiszen éppen a flavivírusok esetén a szerológiai diagnosztika is számos nehézségbe ütközhet.

Az aktuális flavivírus fertőzések laboratóriumi konfirmálását nehezíti a rövid ideig tartó viraemia, ami miatt a PCR diagnosztika alkalmazhatósága megkérdőjelezhető. (Egy PCR negatív eredmény például nem zárja ki az aktuálisan zajló fertőzés lehetőségét.) Emellett, a vérből hosszú ideig kimutatható IgM és IgA ellenanyagok miatt a szerológiai vizsgálatok eredménye is fenntartásokkal kezelendő. A flavivírus fertőzések laboratóriumi rutin diagnosztikájának legnagyobb kihívását mégis a nemzetségre jellemző szerológiai keresztreaktivitás jelenti (Allwinn et al., 2002). A flavivírusok három strukturális fehérjéje közül az E felszíni glikoprotein tartalmaz olyan antigén determinánsokat, melyek a humorális immunválasz fő célpontjává szolgálnak, haemagglutináló és neutralizáló ellenanyagok termelését váltják ki (Allwinn et al., 2002). Ezen konzervatív antigén epitópok meglétének eredménye, hogy az egyes flavivírusok ellen termelt ellenanyagok keresztreaktivitást mutatnak heterológ flavivírusok felszíni antigén doménjeivel. A jelenség jellemző az egész nemzetségre, azonban mértéke eltérhet az egyes antigén komplexek között (Allwinn et al., 2002; Mansfield et al., 2011), adott antigén komplexen belül viszont kifejezetten magas (Niedrig et al., 2007). A keresztreaktivitás az ellenanyagkimutatásra irányuló különböző szerológiai módszerekben is megnyilvánul (Calisher et al., 1989; Mansfield et al., 2011), mely nem kellő körültekintéssel végzett diagnosztikai vizsgálatok esetén – ahogyan azt az igazolt USUV eset példáján is láthattuk – fals pozitív eredményhez és helytelen interpretáláshoz vezethet. A szerológiai vizsgálatok kiterjesztésekor éppen ezért figyelembe kell venni a flavivírus oltási anamnézist – kullancsencephalitis-, Japán encephalitis-, és sárgaláz vírusok ellen elérhető védőoltás – hiszen az oltási ellenanyagok jelenléte szintén befolyásolhatja a szerológiai eredményeket (Mansfield et al., 2011). Nagyobb problémát jelentenek azonban az átfedő endémiás területek, ezért mindig szükséges párhuzamos diagnosztikai vizsgálatokat végezni a területen endémiás valamennyi humán patogén flavivírus irányában. Amennyiben pedig a beteg járt olyan földrajzi területen a tüneteket megelőzően, ahol egyéb flavivírusok cirkulációja is ismert, a szóba jöhető

kiegészítő vizsgálatok elvégzése szintén indokolt. Az átfedő endémiás területek a másodlagos infekciók kapcsán is problémát jelentenek. Secunder flavivírus infekciókor a *buster* hatás következtében, már a tünetek kezdetekor magas IgG titer mérhető, míg az IgM ellenanyagok alacsony koncentrációban vannak jelen, az IgM válasz megjelenése késleltetett. Ekkor állhat elő az úgynevezett „eredendő antigén bűn” (*original antigenic sin*) jelensége, amely azt jelenti, hogy némely betegnél a legmagasabb IgG neutralizáló titer az első fertőzést okozó vírussal szemben mutatható ki (Kuno et al., 1993; Midgley et al., 2011).

A flavivírus fertőzések szerológiai diagnosztikájának számos nehézsége miatt a víruskimutatást megcélzó eljárások szenzitivitásának növelése kerülhet a diagnosztikai fejlesztések fókuszába. A szerológiai módszerek természetesen nem hagyhatók el a napi rutinból, azonban azok fontos kiegészítése lehet a nukleinsav amplifikáción alapuló minél hatékonyabb víruskimutatás, mely segítheti az esetdefiníció szerinti konfirmálást, de immunuszupprimált betegek diagnosztikai vizsgálatához, vér- és szervdonorok szűréséhez is jól alkalmazható.

A fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről szóló 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet értelmében a humán nyugat-nílusi vírusfertőzések laboratóriumi kivizsgálását és humán diagnosztikai eredmények szolgáltatását Magyarországon egyedülállóan a Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK) Virális Zoonózisok Nemzeti Referencialaboratóriuma végzi. Az epidemiológiai adatok gyűjtéséért és az esetek ECDC felé történő heti rendszerességű jelentéséért pedig az NNK; Járványügyi és Infekciókontroll Főosztálya felel. A közösségi hálózatnak jelentendő fertőző betegségek esetdefinícióit az Európai Parlament és Tanács 2012-es 2119/98/EK határozatában foglaltak definiálják (European Commission. Commission Implementing Decision 2012/506/EU, 2012). Eszerint beszélhetünk klinikai, epidemiológiai és laboratóriumi kritériumokról. A laboratóriumi kritériumokon belül megkülönböztethető az igazolt (konfirmált) és valószínűsített eset. A humán nyugat-nílusi vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikája során az eredmények mikrobiológiai leleten történő interpretálása, majd a későbbiekben az ECDC felé történő jelentés követi a 2012-es határozatban megállapított kritériumokat. Laboratóriumilag konfirmált esetminősítés adható, amennyiben a négy alábbi feltétel legalább egyike teljesül: **1.** nyugat-nílusi vírus izolálása vérből vagy liquorból; **2.** nyugat-nílusi vírus nukleinsav kimutatása vérből vagy liquorból; **3.** nyugat-nílusi vírussal szemben specifikus IgM ellenanyagok kimutatása liquorból; **4.** nyugat-nílusi vírus specifikus IgM magas titere és nyugat-nílusi vírus specifikus IgG ellenanyagok detektálása vérmintában és megerősítés vírusneutralizációval. Laboratóriumilag valószínűsíthető esetminősítés adható, amennyiben nyugat-nílusi vírus specifikus ellenanyagokat mutatunk ki vérsavó mintából.

A nyugat-nílusi vírushoz hasonlóan a kullancsencephalitis-vírusfertőzések laboratóriumi differenciál diagnosztikáját is az NNK referencialaboratóriuma végzi országos szinten, a laboratóriumi esetminősítésekben pedig szintén az Európai Parlament és Tanács 2012-es

határozata az irányadó (European Commission. Commission Implementing Decision 2012/506/EU, 2012). A megerősített laboratóriumi eset feltétele az alábbi öt kritérium legalább egyikének teljesülése: **1.** kullancsencephalitis-vírus specifikus antitestek jelenléte vérmintában; **2.** kullancsencephalitis-vírus specifikus IgM ellenanyagok jelenléte gerincvelői folyadékban; **3.** szerokonverzió vagy kullancsencephalitis-vírus specifikus ellenanyagtiter négyszeres emelkedése savópárban; **4.** kullancsencephalitis-vírus nukleinsav kimutatása klinikai mintában; **5.** kullancsencephalitis-vírus izolálása klinikai mintából. A valószínűsíthető eset laboratóriumi kritériuma: kullancsencephalitis-vírus specifikus IgM ellenanyagok kimutatása egyetlen savómintában.

Mind a kullancsencephalitis, mind pedig a nyugat-nílusi vírusfertőzések laboratóriumi vizsgálata során fontos figyelembe venni a beteg flavivírus oltási státuszát, illetve a tünetek kezdete előtti legalább két hétre kiterjesztett utazási anamnézist. Amennyiben a rendelkezésre álló adatok alapján indokolt, egyéb szóba jöhető flavivírus infekció kizárására irányuló differenciáldiagnosztikai vizsgálatok elvégzése is javasolt.

A 2014 – 2018 közötti öt éves időtartam alatt célunk a Virális Zoonózisok NRL diagnosztikai kapacitásának fejlesztése volt, különös tekintettel a humán nyugat-nílusi és kullancsencephalitis-vírusfertőzések differenciáldiagnosztikájára. A téma időszerűségét önmagában nem csak az egyre növekvő humán esetszámok (nyugat-nílusi vírus), hanem az a tény is indokolta, hogy Magyarországon az NNK-ban működő referencialaboratórium egyedülállóan felel országos szinten a humán zoonotikus eredetű vírusfertőzések laboratóriumi kivizsgálásáért. Tehát a diagnosztika folyamatos korszerűsítése és a legfrissebb nemzetközi eredmények nyomon követése alapvető feladatunk.

A molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek bevezetésének eredményeképpen Magyarországon először mutattunk ki nyugat-nílusi és kullancsencephalitis-vírust, közvetlenül humán betegmintából, WNV esetén pedig vírusizolálást is sikeresen végeztünk. Eredményeink alapján a vírus kimutatásához WNV fertőzött betegeknél az egyik legoptimálisabb mintatípus a vizeletminta. A 2015 – 2017 között megvizsgált betegek 45,45%-ánál volt sikeres a víruskimutatás vizeletből, ami – a követéses vizsgálatokat is beleszámítva – az összes PCR-rel vizsgált minta 57,26%-át jelentette, annak ellenére is, hogy a vizeletminták a legtöbb betegnél időbeli csúszással érkeztek a laboratóriumba: a mintavételre általában a tünetek megjelenését követően későbbi időpontokban került csak sor. Ezzel szemben a vizsgált vérsavó minták a betegek csupán 16,86%-ánál, míg a liquor minták a betegek 4,08%-ánál adtak PCR pozitív eredményt. A vírus emellett vizeletmintákban magasabb koncentrációban és hosszabb ideig volt kimutatható, a vírusizolálást 9 betegnél, kivétel nélkül vizelet mintából tudtuk elvégezni, mind kísérleti állatoltást, mind pedig fogékony sejtenyésztésre történő oltást követően. Vagyis e mintatípus gyűjtése nem csak a diagnosztikai vizsgálatokhoz, hanem a referencialaboratóriumok törzsközpontjának fenntartásához is hozzájárulhat.

A 2015-ben, öt hosszú ideig tartó kórházi kezelésre szoruló WNND betegnél végzett nyomon követéses vizsgálatunk eredménye, hogy vizeletmintákból hosszabb ideig ürülhet a vírus, akár több héttel a tünetek megjelenését követően is. Esettanulmányunkban például két betegnél a betegség kezdete utáni 36. és 40. napon is kimutatható volt a WNV nukleinsav a páciens vizeletéből. Eredményeink korrelálnak más európai referencialaboratóriumok tapasztalataival (Barzon et al., 2015). Fontos azonban, hogy vizsgálataink egyik limitációja volt, hogy a sorozatos mintagyűjtés a hosszabb ideig kórházi ápolásra szoruló, tehát súlyosabb kórlefolyással jellemezhető WNND betegekre korlátozódott. Ennek oka, hogy a mintavétel és mintaszállítás a kórházban fekvő betegeknél volt könnyen kivitelezhető. (Sokszor az egyébként vidéki településeken élő betegek kontroll vizsgálatokra történő visszahívása is nehezen megoldható, a sorozatos mintavétel komolyabb szerevezést igényelt volna.) Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy a vírusürítés mértéke és időtartama összefüggést mutat a kórlefolyás súlyosságával. Nagyobb mintaszámmal elvégzett kísérletek alapján WNND betegeknél például szignifikánsan magasabbnak bizonyult a víruskoncentráció a különböző mintatípusokban, illetve a vírus is hosszabb ideig volt detektálható. Például a vizsgált WNND betegek 50%-ánál vizelet mintából a vírus nukleinsav kimutatható volt, még a tünetek kezdete után 31-60 nappal később is (Pacenti et al., 2020). Ezzel szemben WNF betegeknél, valamint tünetmentes, WNV PCR pozitív véradoknál a 15. és 30. nap között a PCR pozitivitás aránya vizeletmintákban 20% alá csökkent (Pacenti et al., 2020). A vizeletmintákból történő WNV kimutatás kapcsán fontos az Európai Unió által 2012-ben elfogadott esetdefiníciókra is utalást tenni. Az esetdefiníciók ugyanis nem térnek ki a vizeletmintákra, csak a vérből vagy liquorból történő víruskimutatás, vagy vírusizolálás esetén adható „*konfirmált aktuális WNV fertőzés*” véleményezés (Id.: fentebb). Annak oka, hogy az elmúlt évek nemzetközi tapasztalatai ellenére sem bírálták felül a jelenleg érvényben lévő esetdefiníciókat, az lehet, hogy számolni kell egy esetlegesen elhúzódó viruria lehetőségével. Ekkor a WNV expozíció akár hetekkel korábban is történhetett, ezért önmagában a vizelet PCR pozitív eredménye nem erősíti meg az aktuálisan fennálló tünetek és – akár csak a közelmúltban zajló – WNV infekció közti közvetlen összefüggést. Összegezve tehát, a vizeletmintákból végzett víruskimutatás a flavivírus fertőzések differenciáldiagnosztikájának fontos eleme, szükséges a sikeres vírusizolálás elvégzéséhez, ugyanakkor önmagában esetkonfirmáláshoz nem elegendő csak e mintatípust PCR módszerrel vizsgálni. Az esetkonfirmálásnál azonban problémát jelent, hogy vérsavó és liquor mintákból nemhogy izolálni, de kimutatni is kis eséllyel lehet a WNV-t (Zannoli et al., 2019). Liquor mintákkal kapcsolatos eredményeink szintén illeszkednek a nemzetközi trendhez, WNND betegek liquor mintájából a tünetek megjelenését követő első héten a betegek kevesebb, mint 40%-ánál mutatható ki a vírus RNS-e (Pacenti et al., 2020). Ez az arány a 7. és 9. napok között tovább romlik: 20% alá esik (Pacenti et al., 2020). *Pacenti és munkatársai* 2020-ban megjelent tanulmánya szerint a PCR pozitív betegeknél a vírus nukleinsava csak nagyon alacsony

koncentrációban volt mérhető, a real-time PCR vizsgálatokban az átlagos Ct érték liquor mintáknál: 35,00 (legalacsonyabb Ct érték: 31,00; legmagasabb: 41,00)(Paceni et al., 2020). Liquor mintából 2014 és 2017 között összesen két beteg esetén (n=2 mintából) sikerült WNV RNS-t kimutatnunk (14. táblázat), a Ct értékek pedig mindkét esetben 40,00 fölötti értéket adtak. Fontos továbbá, hogy mindkét beteg egyéb mintatípusai is PCR pozitívnak bizonyultak (vérsavó és vizelet), tehát a liquorból történő víruskimutatás egyik esetben sem járult hozzá az esetkonfirmáláshoz. Magas (>40,00) real-time PCR Ct értéknél a pozitív eredmény is kétségbe vonható, ebben az esetben indokolt a „kétes” véleményezés, amely szintén nem segíti az esetkonfirmálást.

A másik lehetősége az aktuális fertőzés PCR módszerrel történő megerősítésének, hogyha vérmintából mutatjuk ki a vírus örökítőanyagát. A 2018-as szezonális időszak alatt a vérmintából végzett PCR vizsgálatok szenzitivitásának növelése érdekében új mintatípus: az alvadásgátolt teljes vérminták gyűjtését kezdtük meg.

A teljes vérminták alkalmazhatóságára már korábban is találhattunk utalást a szakirodalomban: véradók WNV PCR szűrése kapcsán végeztek összehasonlító vizsgálatokat, amelyek eredményeképpen jelentős kópiaszámbeli különbséget mértek az alakos elemeket tartalmazó frakció, illetve a vérplazma között. A legmagasabb víruskoncentrációt az erythrocyta frakcióban kapták (Rios et al., 2007). A vizsgálat előzményeül szolgált több olyan esetleírás, melyben a véradó plazma mintája WNV NAAT szűrésben negatívnak bizonyult, azonban a vörösvértesteket tartalmazó egység későbbi vizsgálatokban pozitív eredményt adott, feltételezve, hogy sejt-asszociáltan lehet jelen a vírus a vérmintákban (Rios et al., 2007). Véradók további vizsgálata hasonló eredményt adott, támogatva *Rios és munkatársai* 2007-ben közölt tanulmányát (Lai et al., 2012; Lanteri et al., 2014b). A teljes vérminták vizsgálatával, mint a klinikai WNV esetek laboratóriumi rutin diagnosztikájának egy új lehetőségével *Lustig és munkatársai* 2016-ban publikált tanulmánya foglalkozik először. A vizsgált teljes vérminták 86,6%-ánál kaptak PCR pozitív eredményt (Lustig et al., 2016). Összehasonlítva a vérsavó (26%) és vizeletmintákkal (58,1%), a teljes vérminták nagyobb számban bizonyultak PCR pozitívnak (86,6%). Ugyanakkor, a vírus vizeletből magasabb koncentrációban volt kimutatható. Az általuk vizsgált 34 beteg közül csak egyetlen esetben kaptak teljes vér PCR negatív és vizelet PCR pozitív eredményt, míg 12 betegnél csak a teljes vérminta bizonyult PCR pozitívnak (Lustig et al., 2016). *Lustig és munkatársai* 2016-os publikációja mellett a *Flavivirus* genus más, humán patogén tagjai kapcsán is megjelentek biztató tanulmányok arra vonatkozóan, hogy teljes vérmintákból hatékonyan elvégezhető a vírus nukleinsav kimutatása. Zika és Dengue vírusfertőzések esetén például azt tapasztalták, hogy teljes vérmintából hosszabb ideig detektálható a vírus, mint vérsavó és/vagy vizeletmintákból (Klungthong et al., 2007; Lustig et al., 2016; Mansuy et al., 2017; Murray et al., 2017; Rossini et al., 2017).

A szakirodalmi előzményekre hivatkozva tehát 2018-ban a vizeletminták mellett megkezdtük az EDTA-val alvadásgátolt teljes vérminták gyűjtését és WNV PCR vizsgálatát. Bár alvadásgátolt teljes vér a betegek csupán ~48%-ától, vizeletminta pedig csak ~64%-tól érkezett, a két mintatípus és különösen a teljes vérminták PCR vizsgálata jelentősen növelte a diagnosztikai érzékenységet. A PCR pozitív betegek (n=53) 73,6%-ánál (n=39) tette lehetővé az eset confirmálását a teljes vérminta PCR pozitív eredménye: a legtöbb betegnél (45,3%) a WNV nukleinsav kimutatható volt mind vizelet, mind pedig teljes vérmintából, ugyanakkor 10 páciensnél (18,9%) csak a teljes vér adott PCR pozitív eredményt, míg 5 betegről (9,4%) nem érkezett vizeletminta, azonban a teljes vérből kimutatható volt a vírus. A teljes vér – vérsavó összehasonlításban a minták 78,0%-ában (n=32) adott a teljes vér PCR pozitív eredményt, míg a vérsavóból nem volt kimutatható a vírus RNS-e. Teljes vér WNV PCR negatív eredmény mellett vizelet mintából detektálható volt a WNV 3 betegnél (5,7%), míg teljes vér nem érkezett, de a vizeletminta PCR pozitívnak bizonyult 8 személynél (15,1%). Vagyis a két mintatípus együttes vizsgálata támogatta nagymértékben a laboratóriumi diagnosztikát. Azoknál PCR pozitív személyeknél, akiknél a teljes vér és vizeletminta vétele ugyanazon napon történt, a két mintatípus várható real-time PCR Ct értéke között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ugyanakkor eredményeink limitáló tényezője, hogy nyomon követést nem végeztünk. A megfelelő következtetések levonása érdekében jövőbeli célunk olyan követéses vizsgálatok megszervezése, melyben a vizelet és teljes vérminták sorozatos gyűjtése lehetővé teszi a két mintatípus várható Ct értékeinek összehasonlítását az idő előrehaladtával. *Pacenti és munkatársai* 2020-ban megjelent, a 2018-as WNV epidémia mikrobiológiai tapasztalatait összegző tanulmánya szerint a WNND betegek 70-80%-ánál, míg WNF betegeknek 50%-ban mutatható ki a vírus teljes vérmintából a tünetek megjelenését követő első kilenc napon belül. Neuroinvaszív kórforma esetén pedig mind vizeletből, mind pedig teljes vérmintából hosszabb ideig és szignifikánsan magasabb koncentrációban mutatható ki a vírus RNS-e, WNF betegekhez vagy tünetmentes WNV PCR pozitív véradókhoz képest (Pacenti et al., 2020). A vizsgálatainkban teljes vér PCR pozitív személyeknél a tünetek kezdete és a mintavétel között eltelt idő függvényében nem láttunk szignifikáns emelkedést a Ct értékekben. A PCR pozitív teljes vérminták vétele átlagosan 9,74 (~10) nappal a tünetek megjelenése után történt (legkorábban: 2 napot; legkésőbb: 27 napot követően). A későbbiekben nyomon követéses vizsgálatok révén szeretnénk pontosabb választ adni arra vonatkozóan, hogy a betegség kezdetéhez képest mennyi ideig számíthatunk PCR pozitív eredményre e mintatípusnál.

Nyugat-nílusi vírusfertőzések esetén eredményesnek bizonyult a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok bevezetése, kullancsencephalitis-vírus kimutatása kapcsán ugyanez azonban nem mondható el. Bár a vírust Magyarországon először sikerült közvetlenül humán mintából kimutatnunk és megállapítani, hogy a fertőzést a vírus európai szubtípusa okozta, a víruskimutatás sikeressége véletlenszerűnek bizonyult a különböző mintatípusokból. Két éves

időtartam alatt összesen négy beteg, n=2 vérsavó, 1 vizelet és 1 liquor mintájából végeztünk eredményes víruskimutatást. Ebből egy esetben a vizsgálat sikerességét jelentősen befolyásolhatta, hogy a PCR pozitív vérsavó minta vétele szerokonverziót megelőzően történt (18. táblázat). A szakirodalomban két olyan esettanulmány ismert, amelyekben vizelet mintából kimutatható volt a TBEV RNS-e (Caracciolo et al., 2015; Veje et al., 2014), azonban fontos megemlíteni, hogy a három beteg közül kettőnél immunszuppresszió fennállása befolyásolhatta a kapott eredményeket. Kullancsencephalitis-vírusfertőzések kivizsgálásakor szintén a PCR diagnosztika egy lehetősége a teljes vérminták vizsgálata. Azonban, az eddigi eredmények alapján mind a vérsavóból, mind pedig a teljes vérből végzett víruskimutatás a vírus specifikus ellenanyagok megjelenése előtt (a betegség első fázisában) vagy nem sokkal kullancscsípést követően vett vérmintából eredményes (Saksida et al., 2005). Az első fázisban ugyanakkor a legtöbb esetben nem történik mintavétel. Az NNK Virális Zoonózisok NRL-be kerülő betegek mintái a kórházi – többnyire fekvőbeteg – ellátásba kerülő, már neurológiai tüneteket mutató betegektől származnak. Jól példázza mindezt, hogy a vizsgálati időszak alatt csupán egyetlen betegnél mérhettünk szerokonverziót vagy szignifikáns ellenanyag titer-szint különbséget savópárban. Ellentétben a nyugat-nílusi vírussal, a TBE esetkonfirmálást kevésbé kötik szigorú kritériumokhoz az Európai Unió által elfogadott esetdefiníciók (ld.: fentebb). A kullancsencephalitis-vírus specifikus IgM és IgG ellenanyagok kimutatása vérsavó mintából például önmagában is megengedi az aktuális fertőzés fennállásának megerősítését, természetesen az oltási és utazási anamnézis figyelembevétele mellett.

A víruskimutatás szenzitivitásának növelése nem csupán az esetkonfirmálás miatt fontos célkitűzése a referencialaboratóriumoknak: az átfedő endémiás területeken a differenciáldiagnosztikai szemléletet is előtérbe kell helyezni. A hazánkban endémiás flavivírusok okozta humán megbetegedések klinikailag gyakorlatilag nem különíthetők el, a laboratóriumi diagnosztika során azonban számos nehézségbe ütközhetünk, úgy, mint például a már említett szerológiai keresztreaktivitás, mely a flavivírusok esetén valamennyi szerológiai vizsgálati módszerben megfigyelhető és általánosan jellemző a nemzetségre. Erre való tekintettel a szerológiai vizsgálatokat, azaz a vírus specifikus IgM, IgA, és IgG szűréseket valamennyi, a területen endémiás flavivírus irányában elvégezzük, függetlenül a mintabeküldő klinikus kérésétől. A szerológiai keresztreakciók kizárása és megfelelő szakmai véleményezés kizárólag ez esetben adható. A parallel vizsgálatok egy pozitív hozadéka, hogy esetenként a klinikus iránydiagnózisától eltérő eredményt hoznak a kiegészítő vizsgálatok. Ennek érzékletes példája, hogy a 2018-as WNV szezonális időszak alatt nyolc TBEV fertőzés gyanújával beküldött betegnél igazoltunk aktuális WNV infekciót.

A szerológiai keresztreakciók mellett, problémát jelenthet, hogy az IgM (és IgA) alosztályú ellenanyagok az aktuális fertőzést követően akár még hónapokig is kimutathatóak maradnak. A nyugat-nílusi vírusfertőzések konfirmálása esetdefiníció szerint például ezért sem lehetséges csupán a vírus specifikus IgM ellenanyagok vérmintából történő kimutatása

alapján. Bár az Európai Unió által elfogadott kritériumok nem térnek ki a szerokonverzió eshetőségére, amennyiben szerokonverziót tapasztalunk és emellett a szerológiai keresztreaktivitás-, illetve minden olyan külső körülmény, amely befolyásolhatja az ellenanyag szintet (például plazmaferézis) kizárható, konfirmált esetben minősítést adunk. Ez azonban csupán a betegek kis százalékánál igazolja egyértelműen az aktuálisan fennálló fertőzés tényét: 2018-ban a WNV esetek 23,2%-ában mértünk szerokonverziót vagy legalább négyszeres titer-szint emelkedést savópárban. Ez az eredmény egyébként korrelál más laboratóriumok tapasztalataival: *Pacenti és munkatársai* 2020-as tanulmánya szerint például a tünetek megjelenését követően egy héttel a WNND betegek csupán 20%-a, míg a WNF betegek 40%-a bizonyult WNV szeronegatívnak (Pacenti et al., 2020). A vérmintából végzett szerológiai vizsgálatok kapcsán az anti-WNV IgG aviditás mérése informálhat arról, hogy közelmúltban vagy korábban zajlott vírusfertőzés esete áll fenn. Hatvan százalék feletti értéknél magas IgG aviditásról beszélhetünk, míg 40% alatt alacsony aviditásról. (A 40 – 60% közötti IgG aviditás kétes eredménynek felel meg, ez esetben a legtöbb teszt gyártója ismételt vizsgálatot javasol.) Magas aviditás értéknél korábban – három hónapnál régebben – átvészelt vírusfertőzést valószínűsíthetünk. Amennyiben ellenanyag kimutatáshoz csak vérsavó minta áll rendelkezésre a betegtől – tehát liquor IgM pozitivitás alapján nem lehetséges az esetkonfirmálás – az IgM pozitivitás mellett mérhető alacsony anti-WNV IgG aviditás indikátora az aktuálisan fennálló vírusfertőzésnek (Vilibic-Cavlek et al., 2018). A 2018-as WNV szezonban a referencialaboratórium egy diagnosztikai újítása volt az anti-WNV IgG aviditás ELISA vizsgálat bevezetése. Ezután azonban hamar egyértelművé vált, hogy a szerológiai keresztreaktivitás és az átfedő endémiás területek miatt, a nem kellő körültekintéssel végzett értékeléskor milyen félrevezető eredményt kaphatunk. Aktuálisan zajló WNV fertőzés fennállása mellett ugyanis korábban adott TBEV elleni védőoltás és/vagy korábban átvészelt TBEV fertőzés esetén már a korai vérmintában is magas (70 – 97%-os) aviditás értékeket mértünk (26. táblázat). Négyből 3 betegnél a WNV PCR pozitivitás – 2 betegnél teljes vér és vizelet PCR pozitív eredmény, 1 betegnél vizelet PCR pozitivitás – igazolta, hogy nem hónapokkal korábban zajlott WNV infekció esete állt fenn.

A differenciáldiagnosztika és ennek kapcsán az egyre hatékonyabban végzett víruskimutatás egy további, nagyon fontos aspektusa a 2018-ban Magyarországon először diagnosztizált humán Usutu vírusfertőzés.

Bár az USUV humán kóroki szerepe kérdéses, a differenciáldiagnosztika teljessé tétele miatt a laboratóriumi vizsgálatokat USUV irányába is kiterjesztettük. Először a WNV PCR negatív teljes vér és vizeletminták USUV PCR vizsgálatát végeztük el. Ennek eredményeképpen sikerült a vírust kimutatni egyetlen teljes vérmintából. Tehát aktuális USUV fertőzést erősítettünk meg egy neurológiai tünetes betegnél, akit nem sokkal korábban – a szerológiai eredményekre hagyatkozva – valószínűsített WNV fertőzöttnek minősítettünk. A kiegészítő laboratóriumi vizsgálatokkal egyéterművé vált, hogy a WNV specifikus ellenanyagok szűrése

során kapott pozitív eredmények háttérében szerológiai keresztreaktivitás áll (27. táblázat). A kapott eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy a párhuzamosan végzett ellenanyag-szűrések és a PCR diagnosztika együttesen szükséges elemei a humán flavivírus fertőzések laboratóriumi diagnosztikájának, hiszen ezek hiányában az USUV fertőzések WNV infekcióként félrediaosztizálhatók. A két vírus ugyanazon flavivírus szerokomplexhez, a Japán encephalitis vírus antigéncsoportozáshoz tartozik, vagyis az antigén szerkezetbeli hasonlóság is nagymértékű a két kórokozó között, ebből adódóan pedig a szerológia keresztreaktivitás is kifejezett (Zannoli et al., 2019). Az USUV – a WNV-hez hasonlóan – afrikai eredetű vírus, először a Dél-Afrikai Köztársaságban izolálták 1959-ben (Ashraf et al., 2015). Nyolc genetikai leszármazási vonala (lineage) különíthető el: három afrikai és öt európai leszármazási vonal (Vilibic-Cavlek et al., 2020; Zannoli et al., 2019). Az egyes izolátumok között 94%-os a szekvencia homológia. Ez alól kivételt képez a CAR_1969 nevű törzs (Genbank-i azonosító szám: KC754958), amely az „Afrika lineage 1” egyetlen tagja és genomszekvenciája 78,3%-ban tér el a többi USUV szekvenciától.

Az első humán fertőzést 1981-ben regisztrálták a Közép-Afrikai Köztársaságban (Nikolay et al., 2011; Zannoli et al., 2019). Ezt követően inkább állategészségügyi vonatkozásban került előtérbe az USUV: Európában először 2001-ben figyeltek fel a kórokozóra, mivel ekkor jelentős mortalitást okozott madarakban, Bécsben és környékén (Weissenböck et al., 2002). Egy későbbiekben végzett retrospektív vizsgálat során azonban Toszkánában már 1996-ból származó szövetmintákból is sikerült a vírust kimutatni (Weissenböck et al., 2013). Magyarországon 2005-ben detektálták először elhullott feketerigóból (*Turdus merula*), a szekvenciaelemzés szerint Ausztriából és nem közvetlenül Afrikából került behurcolásra (Bakonyi et al., 2007). A vírus folyamatos cirkulációját az országban az elmúlt évek passzív monitoring vizsgálatai is igazolták (Bakonyi et al., 2017).

Humán megbetegedésekkel kapcsolatban sporadikus eseteket bemutató tanulmányok olvashatók a szakirodalomban: két súlyos neurológiai manifesztációjú fertőzéssel először Olaszországban, 2009-ben hozták összefüggésbe a vírust (Gaibani et al., 2010; Pecorari et al., 2009; Santini et al., 2014). Az USUV neurotropizmusára vonatkozóan azonban fontos, hogy alapbetegsége miatt mindkét beteg immunszupprimált állapotú volt: egyikőjük szervtranszplantáció recipiense volt, a másik beteg pedig B-sejtes lymphomában szenvedett. 2013-ban Horvátországban három neuroinvazív megbetegedés kapcsán, 2016-ban pedig Franciaországban egyetlen betegnél *idiopathiás facialis paresis* háttérében igazoltak USUV fertőzést (Kaic et al., 2014; Santini et al., 2014; Simonin et al., 2018; Vilibic-Cavlek et al., 2019). Az elmúlt években tünetmentes vagy enyhe tüneteket mutató véradóknál is sikerült USUV fertőzést konfirmálni: ugyanis a véradók WNV NAAT szűrésére alkalmazott kereskedelmi forgalomban kapható teszt – mint ahogy arra több eset kivizsgálása is rávilágított – USUV-ra is specifikusnak bizonyult. Ausztriában, Németországban és Olaszországban egyaránt kimutatható volt a vírus RNS-e véradók mintáiból. 2018-ban Ausztriában az USUV PCR pozitív

donorok száma meghaladta a WNV PCR pozitív donorokét, egy esetben pedig WNV és USUV koinfekciót is igazoltak a molekuláris biológiai vizsgálatok (Aberle et al., 2018; Bakonyi & Jungbauer, et al., 2017; Cadar et al., 2017; Carletti et al., 2019).

Az utóbbi évek európai eseteirásai, illetve az első igazolt hazai humán USUV fertőzés is rávilágít arra, hogy e zoonótikus ágenssel is számolhatunk, mint potenciális humán patogénnel. A WNV és USUV földrajzi elterjedése átfed, a vektor és gazdaszervezetek azonosak, a humán fertőzések pedig pusztán tünetek alapján, klinikailag nem különíthetők el. Az esetleges koinfekciókra való tekintettel 2019-től kezdődően a WNV és USUV real-time PCR vizsgálatokat multiplex rendszerben alkalmazzuk, így nem csak a WNV PCR negatív betegek mintáit vizsgáljuk USUV irányában.

A rutin diagnosztikában alkalmazott IIF és ELISA vizsgálatokban egyaránt nagyarányban tapasztaltunk szerológia keresztreaktivitást az igazoltan WNV fertőzött betegek anti-USUV IgG szűrésekor. Ezzel párhuzamosan az IgM vizsgálatokban a keresztreaktivitás mértéke alacsonyabbnak bizonyult (11. ábra). A kapott eredmények nem meglepőek, hiszen a két vírus ugyanazon szerokomplex tagja. Eredményeink azonban felhívják a figyelmet a flavivírus fertőzések diagnosztikájának kihívásaira: a szerológiai vizsgálatokat nem csak párhuzamosan, de végtiter meghatározással szükséges elvégezni a területen endémiás valamennyi flavivírus irányában, teljes vérből és vizelet mintából végzett víruskimutatással kiegészítve. A nem kellő körültekintéssel végzett laboratóriumi vizsgálatok fals véleményezéshez és ezáltal például az USUV fertőzések azonosításának elmulasztásához vezethetnek. Az aszeptikus meningitis és virális encephalitis klinikai képét mutató betegek vizsgálata USUV irányában a szerológiai keresztreaktivitástól függetlenül is indokoltá vált, a szűnyogok aktivitási időszakában. A beérkező betegminták anti-USUV IgG; IgM; és IgA szűrése 2018-tól kezdődően a diagnosztikai panel részét képezi.

Az esetkonfirmálás elősegítése és differenciáldiagnosztikai relevanciája mellett a klinikai mintákból végzett víruskimutatás, majd az ezt követő szekvenálás filogenetikai vizsgálatokat is lehetővé tesz, melynek jelentősége volt a 2018-as WNV epidémia okainak feltárásában is. Az állatorvosi és humán egészségügy területén nyert szekvencia adatok összehasonlítása arra utal, hogy a 2018-as WNV járványt a térségben egyébként is cirkuláló lineage 2 vírustörzsek okozták és nem esetlegesen új, virulensebb variáns (vagy variánsok) megjelenése indukálta (Camp et al., 2020; Veo et al., 2019; Zana et al., 2020). Jelen tudásunk szerint sokkal valószínűbb, hogy klimatikus és környezeti paraméterekkel magyarázható a 2018-as évi kiugrás. A hőmérséklet és csapadékeloszlás változása kedvezhetett a vírus enzootikus ciklusának: a kora tavaszi időszakban hirtelen bekövetkező hőmérséklet emelkedés és megnövekedett csapadékmennyiség a vektor populációk abundanciájának gyors növekedését eredményezte. A csapadékos és meleg tavaszi időjárást követő szárazság pedig a vírus transzmissziójának kedvezhetett: egyrésztől magasabb hőmérsékleten lerövidül az extrinsic inkubációs periódus hossza, másrésztől a száraz meleg klíma elősegíti, hogy a

vektorok és gazdaszervezetek a vizes élőhelyek köré koncentrálódnak (Camp et al., 2020; Tran et al., 2014). Európa-szerte a 2018-as év volt a négy legmelegebb év egyike, 2015, 2016 és 2017 után (Camp et al., 2020).

Végezetül a diagnosztikai fejlesztéseken túl fontos említést tenni a WNV szeroprevalencia felméréséről is, melyet 2016-ban gyűjtött 2112 véradó mintáján végeztünk el. A vizsgálat időszerűnek bizonyult, hiszen 2004-óta – amióta a laboratóriumi igazolt humán megbetegedésekről rendelkezésre állnak hivatalos adatok – az éves esetszámok fokozatos növekedése figyelhető meg. 2004 óta nem végeztek az országban a lakosság WNV átvészelttségének felmérésére irányuló vizsgálatot. A növekvő trend persze magyarázható azzal is, hogy a fokozott figyelemnek köszönhetően egyre több eset kerül laboratóriumi kivizsgálásra.

Az Országos Epidemiológiai Központ (az NNK jogelődje) utoljára 1999/2000 között végzett országos szintű szeroepidemiológiai szűrővizsgálatokat. Az ekkor gyűjtött minták egy részéből (~5000 minta) retrospektíve végeztek WNV szeroprevalencia vizsgálatot is. Igaz, ez esetben a minták nem csak a 18 és 67 év közötti korcsoportokat, hanem a teljes korfát lefedték, mivel a mintagyűjtés nem csupán az önkéntes véradókra korlátozódott. A vizsgálatot a Virális Zoonózisok NRL akkori munkatársai végezték, az eredmények publikálásra nem kerültek. A szűrővizsgálathoz alkalmazott laboratóriumi módszerek az akkori és a mostani vizsgálatban egyeztek (IIF és haemagglutináció-gátlás). Az 1999-2000 között gyűjtött mintákban a WNV szeroprevalencia 0,61% (95% CI: 0,00% - 1,2%) volt. Megállapítható tehát, hogy azóta a WNV szeroprevalencia a hazai lakosság körében szignifikánsan nőtt ($p=0,001$).

A szeroprevalencia adatok tehát támogatják a laboratóriumi igazolt esetek éves eloszlásában megfigyelhető tendenciát. Az általunk végzett vizsgálatnak azonban számos limitációja volt: a vizsgálatot olyan mintákon volt lehetőségünk elvégezni, melyeket az OVSZ kifejezetten WNV NAAT szűrés céljából gyűjtött, tehát az elsődleges szempont nem az volt, hogy megyék szintjére bontva, népességarányosan történjen a mintagyűjtés. Ez az oka annak, hogy a szeroprevalencia értékeket régiós szinten határoztuk meg. Másrészt a szűrés véradókra korlátozódott, tehát a 18 és 67 év közötti egészséges, felnőtt korú lakosságra. A fiatalabb és idősebb korú csoportok vizsgálatunkból kimaradtak. Bár szeroepidemiológia szűrés megszervezése továbbra sem áll módunkban, a területi eloszlásra vonatkozó adatok korrekciója érdekében 2019-ben újabb szakmai együttműködés alakult az NNK Virális Zoonózisok NRL és az OVSZ budapesti Konfirmáló Laboratóriuma között. Ennek keretében 3000 véradó mintájának gyűjtése zárult le 2019-ben. A mintavételezés megyénként és három korcsoportra, azon belül nemekre bontva történt, úgy, hogy az egyes csoportokon belüli mintaszámokat a Központi Statisztikai Hivatal interaktív korfájának segítségével arányítottuk a népességszámokhoz. A vizsgálat célja a frissebb adatok szolgáltatása mellett, hogy pontosabb összehasonlítást végezhesünk a szeroprevalencia és a laboratóriumi igazolt klinikai esetek megyénkénti eloszlására vonatkozóan.

A 2016-os tanulmány egy másik limitációja, hogy – bár kizárólag a WNV vírusneutralizációval is konfirmált eredményeket fogadtuk el – vizsgálataink nem terjedtek ki USUV specifikus ellenanyagok szűrésére. A 2018-ban igazolt első humán USUV fertőzés felhívja a figyelmet e vizsgálatok hiányára. Éppen ezért a 2019-ben gyűjtött donorminták szűrésébe az USUV ellenanyagvizsgálatokat is integráltuk.

A laboratóriumi diagnosztika folyamatos fejlesztésével és a bizonyos időközönként, rendszeresen végzett szeroprevalencia vizsgálatokkal célunk minél pontosabb képet alkotni a Magyarországon cirkuláló humán patogén flavivírusokról.

10. Új tudományos eredmények

A 2014-es nyugat-nílusi vírus szezonális időszakától kezdődően, a Nemzeti Népegészségügyi Központ Virális Zoonózisok Nemzeti Referencialaboratóriumában molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek bevezetésével bővítettük a flavivírus fertőzések addig kizárólag szerológiai módszereken alapuló laboratóriumi diagnosztikáját.

1. Magyarországon először mutattunk ki nyugat-nílusi vírust humán klinikai mintákból (vérsavó, teljes vér, liquor, vizelet) és izoláltuk a vírust vizeletből (Nagy et al., 2016. Arch Virol.; Nagy et al., 2017. Orv Hetil.; Nagy et al., 2019. Euro Surveill.)
2. Magyarországon először végeztünk WNV teljes genom szekvenálást humán mintából, megállapítottuk, hogy a hazai humán WNV fertőzéseket lineage 2 vírustörzsek okozzák (Nagy et al., 2016. Arch Virol.; Nagy et al., 2019. Euro Surveill.).
3. Nyomon követéses vizsgálatok során megállapítottuk, hogy WNND páciensek vizeletmintáiból akár hetekkel a tünetek kezdete után is kimutatható a WNV RNS-e (Nagy et al., 2017. Orv Hetil.).
4. Egészséges véradók vizsgálatával megállapítottuk, hogy 1999/2000 és 2016 között szignifikánsan nőtt a WNV szeroprevalencia, és a legérintettebb régiók a dél-dunántúli, dél-alföldi, majd ezt követően az észak-alföldi, valamint közép-magyarországi régiók (Nagy et al., 2019. Vector Borne Zoonotic Dis.).
5. Magyarországon először igazoltunk humán USUV fertőzést, és először mutattuk ki a kullancsencephalitis vírus RNS-ét humán betegmintákból (vérsavó, vizelet, liquor) (Nagy et al., 2019. Euro Surveill.; Nagy et al., 2018. Ticks Tick Borne Dis.).

Irodalomjegyzék

- Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J. H., Zoufaly, A., Hourfar, K., Weidner, L., & Nowotny, N. (2018). **Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018.** *Euro Surveill.*, 23(43), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Allwinn, R., Doerr, H., Emmerich, P., Schmitz, H., & Preiser, W. (2002). **Cross-reactivity in flavivirus serology: New implications of an old finding?** *Med. Microbiol. Immunol.*, 190(4), 199–202. <https://doi.org/10.1007/s00430-001-0107-9>
- Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., & Cao, S. (2015). **Usutu virus: An emerging flavivirus in Europe.** *Viruses*, 7(1), 219–238. <https://doi.org/10.3390/v7010219>
- Bakonyi, T., Erdélyi, K., Brunthaler, R., Dán, Á., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2017). **Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016.** *Emerg Microbes and Infect.*, 6(10), 2010–2016. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.72>
- Bakonyi, T., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Csörgo, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2007). **Emergence of Usutu virus in Hungary.** *J Clin Microbiol.*, 45(12), 3870–3874. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-07>
- Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdélyi, K., Kutasi, O., Csörgo, T., Seidel, B., Weissenböck, H., Brugger, K., Bán, E., & Nowotny, N. (2013). **Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009.** *Vet Microbiol.*, 165(1–2), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
- Bakonyi, T., & Haussig, J. M. (2020). **West Nile virus keeps on moving up in Europe.** *Euro Surveill.*, 25(46), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938>
- Bakonyi, T., Jungbauer, C., Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Dimmel, K., Stiasny, K., & Nowotny, N. (2017). **Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges.** *Euro Surveill.*, 22(41), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644>
- Balogh, Z., Ferenczi, E., Szeles, K., Stefanoff, P., Gut, W., Szomor, K. N., Takacs, M., & Berencsi, G. (2010). **Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk.** *J Virol Methods.*, 163(2), 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.003>
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Squarzon, L., Lavezzo, E., Toppo, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., & Palù, G. (2012). **Novel West Nile virus lineage 1a full genome sequences from human cases of infection in north-eastern Italy, 2011.** *Clin Microbiol Infect.*, 18(12). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12001>
- Barzon, L., Pacenti, M., Ulbert, S., & Palù, G. (2015). **Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection.** *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 13(3), 327–342. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1007044>
- Barzon, Luisa, Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., & Palù, G. (2013). **Excretion of West Nile virus in urine during acute infection.** *J Infect Dis.*, 208(7), 1086–1092. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit290>
- Barzon, Luisa, Pacenti, M., Franchin, E., Squarzon, L., Sinigaglia, A., Ulbert, S., Cusinato, R., & Palù, G. (2014). **Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection.** *J Clin Microbiol.*, 52(9), 3411–3413. <https://doi.org/10.1128/JCM.01328-14>

- Beck, C., Jimenez-Clavero, M. A., Leblond, A., Durand, B., Nowotny, N., Lepercq-Goffart, I., Zientara, S., Jourdain, E., & Lecollinet, S. (2013a). **Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease.** *Int J Environ Res and Public Health.*, 10(11), 6049–6083. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>
- Brault, A. C., Huang, C. Y. H., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., Panella, N. A., Holmes, E. C., Powers, A. M., & Miller, B. R. (2007). **A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows.** *Nat Genet.*, 39(9), 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/ng2097>
- Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., Lundkvist, Å., & Bergström, T. (2008). **Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden.** *Int J Med Microbiol.*, 298(SUPPL. 1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.12.005>
- Busch, M. P., Kleinman, S. H., Tobler, L. H., Kamel, H. T., Norris, P. J., Walsh, I., Matud, J. L., Prince, H. E., Lanciotti, R. S., Wright, D. J., Linnen, J. M., & Caglioti, S. (2008). **Virus and antibody dynamics in acute West Nile Virus infection.** *J Infect Dis.*, 198(7), 984–993. <https://doi.org/10.1086/591467>
- Cadar, D., Maier, P., Müller, S., Kress, J., Chudy, M., Bialonski, A., Schlaphof, A., Jansen, S., Jöst, H., Tannich, E., Runkel, S., Hitzler, W. E., Hutschenreuter, G., Wessiepe, M., & Schmidt-Chanasit, J. (2017). **Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016.** *Euro Surveill.*, 22(14), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30501>
- Caini, S., Szomor, K., Ferenczi, E., Gáspár, Á. S., Csohán, Á., Krisztalovics, K., Molnár, Z., & Horváth, J. K. (2012). **Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in Western Hungary, September to October 2011.** *Euro Surveill.*, 17(12) 1–5, <https://doi.org/10.2807/ese.17.12.20128-en>
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera.** *J Gen Virol.*, 70(1), 37–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Camp, J. V., & Nowotny, N. (2020). **The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak?** *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 18(2), 145–154. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1713751>
- Caracciolo, I., Bassetti, M., Paladini, G., Luzzati, R., Santon, D., Merelli, M., De Sabbata, G., Carletti, T., Marcello, A., & D'Agaro, P. (2015). **Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in North-Eastern Italy.** *J Clin Virol.*, 69, 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.019>
- Carletti, F., Colavita, F., Rovida, F., Percivalle, E., Baldanti, F., Ricci, I., De Liberato, C., Rosone, F., Messina, F., Lalle, E., Bordi, L., Vairo, F., Capobianchi, M. R., Ippolito, G., Cappiello, G., Spanò, A., Meschi, S., & Castilletti, C. (2019). **Expanding Usutu virus circulation in Italy: Detection in the Lazio region, Central Italy, 2017 to 2018.** *Euro Surveill.*, 24(3), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649>
- Carod-Artal, F. J., Wichmann, O., Farrar, J., & Gascón, J. (2013). **Neurological complications of dengue virus infection.** *Lancet Neurol*, 12(9), 906–919. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70150-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70150-9)
- Carson, P. J., Prince, H. E., Biggerstaff, B. J., Lanciotti, R., Tobler, L. H., & Busch, M. (2014). **Characteristics of antibody responses in West Nile virus-seropositive blood donors.** *J Clin Microbiol.*, 52(1), 57–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.01932-13>

- Ceccaldi, P. E., Lucas, M., & Despres, P. (2004). **New insights on the neuropathogenicity of West Nile virus.** *FEMS Microbiol Lett.*, 233(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.01.035>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2018). **Mother to Baby during Pregnancy, Delivery, or Breast Feeding.** Elérhető: <https://www.cdc.gov/westnile/transmission/pregnancy.html> Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- Chaintoutis, S. C., Diakakis, N., Papanastassopoulou, M., Banos, G., & Dovas, C. I. (2015). **Evaluation of cross-protection of a lineage 1 West Nile virus inactivated vaccine against natural infections from a virulent lineage 2 strain in horses, under field conditions.** *Clin Vaccine Immunol.*, 22(9), 1040–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00302-15>
- Chaskopoulou, A., Dovas, C. I., Chaintoutis, S. C., Bouzalas, I., Ara, G., & Papanastassopoulou, M. (2011). **Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011.** *Euro Surveill.*, 16(31), 1–4. <https://doi.org/10.2807/ese.16.31.19933-en>
- Ciota, A. T., & Kramer, L. D. (2013). **Vector – virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus.** *Viruses*, 5(12), 3021–3047. <https://doi.org/10.3390/v5123021>
- Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R., & Fikrig, E. (2012). **West Nile virus: Biology, transmission, and human infection.** *Clin Microbiol Rev.*, 25(4), 635–648. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-12>
- Del Amo, J., Llorente, F., Pérez-Ramirez, E., Soriguer, R. C., Figuerola, J., Nowotny, N., & Jiménez-Clavero, M. A. (2014). **Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus strains of lineages 1 and 2.** *Vet Microbiol.*, 172(3–4), 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.005>
- Demicheli, V., Mg, D., & Rivetti, A. (2009). **Vaccines for preventing tick-borne encephalitis.** *Cochrane Database Syst Rev.*, (1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000977.pub2>
- Egyed, L., Élo, P., Sréter-Lancz, Z., Széll, Z., Balogh, Z., & Sréter, T. (2012). **Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of Ixodes ricinus ticks in Hungary.** *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(2), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.01.002>
- Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Rátz, F., Skáre, J., & Bakonyi, T. (2007). **Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary.** *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 7(2), 181–188. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>
- European Centre for Disease and Prevention Control [ECDC]. (2012). **Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and Europe Free Trade Association countries.** In ECDC technical report. <https://doi.org/10.2900/62311>
- European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC] (2017-2019), **Historical data by year - West Nile fever seasonal surveillance.** In ECDC Surveillance and disease data. Elérhető: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical> Utolsó hozzáférés dátuma: 2021.01.25.
- European Centre for Disease and Prevention Control [ECDC]. (2014 - 2018). **Annual epidemiological report - Tick-borne encephalitis.** In ECDC Annual epidemiological report. Elérhető: <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/surveillance-and-disease-data/annual-epidemiological-report> Utolsó hozzáférés dátuma: 2021.01.22.

- European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC]. (2018a). **Early large increase in West Nile virus infections in the EU/EEA and EU neighbouring countries**. In ECDC Rapid Risk Assessment. Elérhető: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/west-nile-fever-rapid-risk-assessment%20-13-Aug-2018.pdf> Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- European Centre for Disease Control and Prevention [ECDC]. (2018b). **Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018**. In ECDC epidemiological update. Elérhető: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018> Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- European Commission. Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2012) 5538). Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2012. Elérhető: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/10ed460f-0711-11e2-8e28-01aa75ed71a1/language-en> Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- European Medicines Agency [EMA]. (2008). **Equip WNV, INN-inactivated West Nile virus, strain VM-2**. EMA/510730/2008. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/equip-wnv-epar-summary-public_en.pdf Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- European Medicines Agency [EMA]. (2011). **Proteq West Nile**. EMA/494487/2011. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/proteq-west-nile-epar-summary-public_en.pdf Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- European Medicines Agency [EMA]. (2013). **Equilis West Nile**. EMA/243127/2013. Elérhető: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/equilis-west-nile-epar-summary-public_hu.pdf Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo]. 2009. 16. évfolyam 3 különszám: **2. Módszertani levél a kullancsok elleni védekezésről**. Írta és összeállította: Zöldi Viktor, dr Erdős Gyula, dr Szlobodnyik Judit. Közreműködött: dr Ferenczi Emőke, dr Krisztalovics Katalin, dr Pauliny Zsuzsanna.
- Epidemiológiai Információs Hetilap [Epinfo]. 2016. 23 évfolyam 1. különszám: **Módszertani levél a 2016. évi védőoltásokról**. Írta és összeállította: dr Csohán Ágnes. Közreműködött: dr Molnár Zsuzsanna, dr Melles Márta, dr Pauliny Zsuzsanna, Brachmann Krisztina, dr Jelenik Zsuzsanna.
- Ferenczi, E., Rácz, G., Faludi, G., Czeglédi, A., Mezey, I., & Berencsi, G. (2005). **Natural Foci of Classical and Emerging Viral Zoonoses in Hungary**. In G Berencsi, A. S. Khan & J Halouzka (Eds.), NATO Science Series, I: Life and Behavioural Sciences. Volume 370: *Emerging Biological Threat* (pp. 43–49). Amsterdam: IOS Press.
- Fox, J. L., Hazell, S. L., Tobler, L. H., & Busch, M. P. (2006). **Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus**. *Clin Vaccine Immunol.*, 13(1), 33–36. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.33-36.2006>
- Gaibani, P., Pierro, A. M., Cavrini, F., Rossini, G., Landini, M. P., & Sambri, V. (2010). **False-positive transcription-mediated amplification assay detection of West Nile virus in blood from a patient with viremia caused by an Usutu virus infection**. *J Clin Microbiol.*, 48(9), 3338–3339. <https://doi.org/10.1128/JCM.02501-09>
- Gaibani, P., & Rossini, G. (2017). **An overview of Usutu virus**. *Microbes Infect.*, 19(7–8), 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.05.003>

- Gassmann, C., & Bauer, G. (1997). **Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections.** *J Med Virol.*, 51(3), 242–251. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199703\)51:3<242::AID-JMV17>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199703)51:3<242::AID-JMV17>3.0.CO;2-M)
- Gibney, K. B., Lanciotti, R. S., Sejvar, J. J., Nugent, C. T., Linnen, J. M., Delorey, M. J., Lehman, J. A., Boswell, E. N., Staples, J. E., & Fischer, M. (2011). **West Nile virus RNA not detected in urine of 40 people tested 6 years after acute West Nile virus disease.** *J Infect Dis.*, 203(3), 344–347. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq057>
- Gritsun, T., Lashkevich, V., & Gould, E. (2003). **Tick-borne encephalitis.** *Antiviral Res.*, 57(1–2), 129–146. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1)
- Grottola, A., Marcacci, M., Tagliazucchi, S., Gennari, W., Gennaro, A. Di, Orsini, M., Marchegiano, P., Marini, V., Meacci, M., Rumpianesi, F., Lorusso, A., Pecorari, M., & Savini, G. (2017). **Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy.** *Clin Microbiol Infect.*, 23(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.019>
- Günther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Sköldenberg, B., & Forsgren, M. (1997). **Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome.** *Clinical and Diagnostic Virology*, 8(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0928-0197\(97\)00273-0](https://doi.org/10.1016/S0928-0197(97)00273-0)
- Haglund, M., & Günther, G. (2003). **Tick-borne encephalitis - Pathogenesis, clinical course and long-term follow-up.** *Vaccine*, 21(SUPPL. 1), 2–9. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00811-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00811-3)
- Halstead, S. B. (2003). **Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses.** *Adv Virus Res.*, 60, 421–467. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60011-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60011-4)
- Hayes, E. B., & O'Leary, D. R. (2004). **West Nile virus infection: A pediatric perspective.** *Pediatrics*, 113(5), 1375–1381. <https://doi.org/10.1542/peds.113.5.1375>
- Hayes, Edward B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V., & Campbell, G. L. (2005a). **Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease.** *Emerg Infect Dis.*, 11(8), 1174–1179. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289b>
- Hayes, E. B., Komar, O., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., Leary, D. R. O., & Campbell, G. L. (2005b). **Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease.** *Emerg Infect Dis.*, 11(8), 1167–1173. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>
- Heinz, F. X., Holzmann, H., Essl, A., & Kundi, M. (2007). **Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis.** *Vaccine*, 25(43), 7559–7567. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.024>
- Hinckley, A. F., Leary, D. R. O., & Hayes, E. B. (2007). **Transmission of West Nile Virus through human breast milk seems to be rare.** *Pediatrics*, 119(3), e666–71. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2107>
- Holzmann, H. (2003). **Diagnosis of tick-borne encephalitis.** *Vaccine*, 21(SUPPL. 1), S36–S40. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00819-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00819-8)
- Holzmann, H., Aberle, S. W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., & Heinz, F. X. (2009). **Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria.** *Emerg Infect Dis.*, 15(10), 1671–1673. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090743>
- Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1999). **West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe.** *Emerg Infect Dis.*, 5(5), 643–650. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990506>

- International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV]. (2019). **Virus Taxonomy: 2019 Release**. Elérhető: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.
- Iwamoto, M., Jernigan, D.B., Guasch, A., Trepka, M. J., Pham, S. M., Zaki, S., Lanciotti, R. S., Lance-Parker, S.E., DiazGrandos, 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. (2003). **Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients**. *N Eng J Med.*, 348(22), 2196–2203. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022987>
- Kaic, B., Barbic, L., Lesnikar, V., Listes, E., Stevanovic, V., & Savini, G. (2014). **First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak**. *Infection.* (42)4, 689–695. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0625-1>
- Kaiser, R., & Holzmann, H. (2000). **Laboratory findings in tick-borne encephalitis - Correlation with clinical outcome**. *Infection*, 28(2), 78–84. <https://doi.org/10.1007/s150100050051>
- Kaiser, R. (2002). **Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease**. *Int J Med Microbiol.*, 291(SUPPL. 33), 58–61. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(02\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(02)80012-1)
- Kemenesi, G., Dallos, B., Oldal, M., Kutas, A., Földes, F., Németh, V., Reiter, P., Bakonyi, T., Bányai, K., & Jakab, F. (2014). **Putative novel lineage of West Nile virus in *Uranotaenia unguiculata* mosquito, Hungary**. *Virus Disease*, 25(4), 500–503. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0234-8>
- Kleinschmidt-DeMasters, B. K. (2004). **Naturally acquired West Nile virus encephalomyelitis in transplant recipients**. *Arch Neurol.*, 61(8), 1210–1220. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.8.1210>
- Klungthong, C., Gibbons, R. V., Thaisomboonsuk, B., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Thirawuth, V., Nutkumhang, N., Mammen, M. P., & Jarman, R. G. (2007). **Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation**. *J Clin Microbiol.*, 45(8), 2480–2485. <https://doi.org/10.1128/JCM.00305-07>
- Krisztalovics, K., Ferenczi, E., Molnár, Z., Csohán, Á., Bán, E., Zöldi, V., & Kaszás, K. (2008). **West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008**. *Euro Surveill.*, 13(45), 1–3. <https://doi.org/10.2807/ese.13.45.19030-en>
- Kuno, G., Oliver, A., & Gubler, D. J. (1993). **Use of ‘original antigenic sin’ theory to determine the serotypes of previous dengue infections**. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 87(1), 103–105. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90444-U](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90444-U)
- Kuno, Goro, Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. (1998). **Phylogeny of the genus *Flavivirus***. *J Virol.*, 72(1), 73–83. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0874>
- Kunz, C. (2003). **TBE vaccination and the Austrian experience**. *Vaccine*, 21(SUPPL. 1), S50–S55. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00813-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00813-7)
- Kutasi, O., Bakonyi, T., Lecollinet, S., Biksi, I., Ferenczi, E., Bahuon, C., Sardi, S., Zientara, S., & Szenci, O. (2011). **Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary**. *J Vet Intern Med.*, (25), 586–591. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0715.x>
- Labuda, M., Nuttall, P. A., Kožuch, O., Elečková, E., Williams, T., Žuffová, E., & Sabó, A. (1993). **Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature**. *Experientia*, 49(9), 802–805. <https://doi.org/10.1007/BF01923553>
- Labuda, Milan, Kozuch, O., Zuffová, E., Elečková, E., Hails, R. S., & Nuttall, P. A. (1997). **Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts**. *Virology*, 235(1), 138–143. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8622>

- Lai, L., Lee, T. H., Tobler, L., Wen, L., Shi, P., Alexander, J., Ewing, H., & Busch, M. (2012). **Relative distribution of West Nile virus RNA in blood compartments: Implications for blood donor nucleic acid amplification technology screening.** *Transfusion*, 52(2), 447–454. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03289.x>
- Lanteri, M. C., Lee, T. H., Wen, L., Kaidarova, Z., Bravo, M. D., Kiely, N. E., Kamel, H. T., Tobler, L. H., Norris, P. J., & Busch, M. P. (2014a). **West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: Implication for transfusion and transplantation safety.** *Transfusion*, 54(12), 3232–3241. <https://doi.org/10.1111/trf.12764>
- Lecollinet, S., Pronost, S., Couplier, M., Beck, C., Gonzalez, G., Leblond, A., & Tritz, P. (2019). **Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe?** *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/v12010023>
- Lindquist, L., & Vapalahti, O. (2008). **Tick-borne encephalitis.** *Lancet*, 371(9627), 1861–1871. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4)
- Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A., & Pauli, G. (2007). **Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR.** *J Virol Methods.*, 146(1–2), 355–358. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.021>
- Lotrič-Furlan, S., & Strle, F. (1995). **Thrombocytopenia - A common finding in the initial phase of tick-borne encephalitis.** *Infection*, 23(4), 203–206. <https://doi.org/10.1007/BF01781197>
- Ludlow, M., Kortekaas, J., Herden, C., Hoffmann, B., Tappe, D., Trebst, C., Griffin, D. E., Brindle, H. E., Solomon, T., Brown, A. S., van Riel, D., Wolthers, K. C., Pajkrt, D., Wohlsein, P., Martina, B. E. E., Baumgärtner, W., Verjans, G. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2016). **Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology.** *Acta Neuropathol.*, 131(2), 159–184. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1511-3>
- Lustig, Y., Mannasse, B., Koren, R., Katz-Likvornik, S., Hindiyeh, M., Mandelboim, M., Dovrat, S., Sofer, D., & Mendelson, E. (2016). **Superiority of west nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection.** *J Clin Microbiol.*, 54(9), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.01283-16>
- Lustig, Y., Mendelson, E., Paran, N., Melamed, S., & Schwartz, E. (2016). **Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016.** *Euro Surveill.*, 21(26), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30269>
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T. (2009a). **Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis.** *J Gen Virol.*, 90(8), 1781–1794. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011437-0>
- Mansfield, Karen L., Horton, D. L., Johnson, N., Li, L., Barrett, A. D. T., Smith, D. J., Galbraith, S. E., Solomon, T., & Fooks, A. R. (2011). **Flavivirus-induced antibody cross-reactivity.** *J Gen Virol.*, 92(12), 2821–2829. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0>
- Mansuy, J. M., Mengelle, C., Pasquier, C., Chapuy-Regaud, S., Delobel, P., Martin-Blondel, G., & Izopet, J. (2017). **Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens.** *Emerg Infect Dis.*, 23(5), 863–865. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161631>
- Mantke, O. D., Schädler, R., & Niedrig, M. (2008). **A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries.** *Euro Surveill.*, (13)17, 1–9. <https://doi.org/10.2807/ese.13.17.18848-en>

- McMullen, A. R., Albayrak, H., May, F. J., Davis, C. T., Beasley, D. W. C., & Barrett, A. D. T. (2013). **Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus.** *J Gen Virol.*, 94(PART2), 318–325. <https://doi.org/10.1099/vir.0.046888-0>
- Midgley, C. M., Bajwa-Joseph, M., Vasanaawathana, S., Limpitikul, W., Wills, B., Flanagan, A., Waiyaiya, E., Tran, H. B., Cowper, A. E., Chotiyarnwon, P., Grimes, J. M., Yoksan, S., Malasit, P., Simmons, C. P., Mongkolsapaya, J., & Srean, G. R. (2011). **An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection.** *J Virol.*, 85(1), 410–421. <https://doi.org/10.1128/jvi.01826-10>
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Rus, K. R., Vipotnik, T. V., Vodusek, V. F., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., & Zupanc, T. A. (2016). **Zika virus associated with microcephaly.** *N Eng J Med.*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Murray, K. O., Gorchakov, R., Carlson, A. R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., Garcia, M. N., Correa, A., Patel, S. M., Aagaard, K., & Mulligan, M. J. (2017). **Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood.** *Emerg Infect Dis.*, 23(1), 99–101. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161394>
- Murray, K., Walker, C., Herrington, E., Lewis, J. A., McCormick, J., Beasley, D. W. C., Tesh, R. B., & Fisher-Hoch, S. (2010). **Persistent infection with West Nile virus years after initial infection.** *J Infect Dis.*, 201(1), 2–4. <https://doi.org/10.1086/648731>
- Niedrig, M., Sonnenberg, K., Steinhagen, K., & Paweska, J. T. (2007). **Comparison of ELISA and immunoassays for measurement of IgG and IgM antibody to West Nile virus in human sera against virus neutralisation.** *J Virol Methods.*, 139(1), 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.09.009>
- Nikolay, B., Weidmann, M., Dupressoir, A., Faye, O., Boye, C. S., Diallo, M., & Sall, A. A. (2014). **Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe.** *J Virol Methods.*, 197, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039>
- Nikolay, Birgit, Diallo, M., Boye, C. S. B., & Sall, A. A. (2011). **Usutu virus in Africa.** *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(11), 1417–1423. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631>
- Nolan, M. S., Podoll, A. S., Hause, A. M., Akers, K. M., Finkel, K. W., & Murray, K. O. (2012). **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), 3–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040374>
- Orlinger, K. K., Hofmeister, Y., Fritz, R., Holzer, G. W., Falkner, F. G., Unger, B., Loew-Baselli, A., Poellabauer, E. M., Ehrlich, H. J., Barrett, P. N., & Kreil, T. R. (2011). **A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans.** *J Infect Dis.*, 203(11), 1556–1564. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir122>
- Pacienti, M., Sinigaglia, A., Franchin, E., Pagni, S., Lavezzo, E., Montarsi, F., Capelli, G., & Barzon, L. (2020). **Human West Nile virus lineage 2 infection: Epidemiological, clinical, and virological findings.** *Viruses*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/v12040458>

- Pacenti, M., Sinigaglia, A., Martello, T., de Rui, M. E., Franchin, E., Pagni, S., Peta, E., Riccetti, S., Milani, A., Montarsi, F., Capelli, G., Doroldi, C. G., Bigolin, F., Santelli, L., Nardetto, L., Zoccarato, M., & Barzon, L. (2019). **Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018**. *Euro Surveill.*, 24(47), 1–10. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180>
- Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., Rudolf, I., Hubalek, Z., & Nowotny, N. (2014). **Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013**. *Emerg Infect Dis.*, 20(12), 2119–2122. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>
- Papa, A. (2017). **Emerging arboviral human diseases in Southern Europe**. *J Med Virol.*, 89(8), 1315–1322. <https://doi.org/10.1002/jmv.24803>
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., & Nowotny, N. (2011). **Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010**. *Emerg Infect Dis.*, 17(5), 920–922. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>
- Patel, H., Sander, B., & Nelder, M. P. (2015). **Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: A systematic review**. *Lancet Infect Dis.*, 15(8), 951–959. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00134-6)
- Pealer, L.N., Marfin, A.A., Petersen, L. R., Lanciotti, R. S., Page, P. L., Stramer, S. L., Stobierski, M. G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., Goodman, J. L., & Chamberland, M. E. (2003). **Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States in 2002**. *N Eng J Med.*, 349(13), 1236–1245. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030969>
- Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottola, A., Sabbatini, A. M. T., Tagliazucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M.L., Lelli, R., & Rumpianesi, F. (2009). **First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009**. *Euro Surveill.* 2009;14(50): 1–2. <https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19446-en>
- Percivalle, E., Sasser, D., Rovida, F., Isernia, P., & Fabbi, M. (2017). **Usutu Virus antibodies in blood donors and healthy forestry workers in the Lombardy region, Northern Italy**. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17(4), 1–4. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2126>
- Petersen, L. R., Brault, A. C., Nasci, R. S., Infectious, Z., Services, H., & Collins, F. (2013). **West Nile virus: Review of the literature**. *Jama*, 310(3), 308–315. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>
- Pierson, T. C., Xu, Q., Nelson, S., Oliphant, T., Nybakken, G. E., Fremont, D. H. H., & Diamond, M. S. (2007). **The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection**. *Cell Host Microbe*, 1(2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.002>
- Pietsch, C., Michalski, D., Münch, J., Petros, S., Bergs, S., Trawinski, H., Lübbert, C., & Liebert, U. G. (2020). **Autochthonous West Nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020**. *Euro Surveill.*, 25(46), 2–7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001786>
- Prince, H. E., Tobler, L. H., Yeh, C., Geffer, N., Custer, B., & Busch, M. P. (2007). **Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors**. *Clin Vaccine Immunol.*, 14(9), 1228–1230. <https://doi.org/10.1128/CVI.00233-07>
- Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., Mandl, C. W., & Heinz, F. X. (1995). **Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay**. *Clinical and Diagnostic Virology*, 4(4), 321–326. [https://doi.org/10.1016/0928-0197\(95\)00022-4](https://doi.org/10.1016/0928-0197(95)00022-4)

- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). **The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design.** *EMBO Rep.*, 19(2), 206–224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Rios, M., Daniel, S., Chancey, C., Hewlett, I. K., & Stramer, S. L. (2007). **West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood.** *Clin Infect Dis.*, 45(2), 181–186. <https://doi.org/10.1086/518850>
- Roehrig, J. T., Nash, D., Maldin, B., Labowitz, A., Martin, D. A., Lanciotti, R. S., & Campbell, G. L. (2003). **Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases.** *Emerg Infect Dis.*, 9(3), 376–379. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020531>
- Roesch, F., Moratorio, G., Moratorio, G., & Vignuzzi, M. (2019). **Usutu virus: An arbovirus on the rise.** *Viruses*, 11(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/v11070640>
- Rossini, G., Gaibani, P., Vocale, C., Cagarelli, R., & Landini, M. P. (2017). **Comparison of Zika virus (ZIKV) RNA detection in plasma, whole blood and urine – Case series of travel-associated ZIKV infection imported to Italy, 2016.** *J Infect.*, 75(3), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.05.021>
- Saiz, J.-C. (2020). **Animal and Human Vaccines against West Nile Virus.** *Pathogens*, 9(12), 1073. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121073>
- Saksida, A., Duh, D., Lotrič-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M., & Avšič-Županc, T. (2005). **The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis.** *J Clin Virol.*, 33(4), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.07.014>
- Saksida, A., Jakopin, N., Jelovšek, M., Knap, N., Fajs, L., Lusa, L., Lotrič-Furlan, S., Bogovič, P., Arnež, M., Strle, F., & Avšič-Županc, T. (2018). **Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia.** *Emerg Infect Dis.*, 24(7), 1315–1323. <https://doi.org/10.3201/eid2407.180059>
- 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. (2013). **West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention.** *Clin Microbiol Infect.*, 19(8), 699–704. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12211>
- Santini, M., Vilibic-cavlek, T., Barsic, B., Barbic, L., Savic, V., Stevanovic, V., Listes, E., Gennaro, A. Di, & Savini, G. (2015). **First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August – September 2013: clinical and laboratory features.** *J Neurovirol.*, 21, 92 – 97. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0300-4>
- Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Piscicella, M., Terregino, C., Marangon, S., Capua, I., & Lelli, R. (2012). **Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy.** *Vet Microbiol.*, 158(3–4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.018>
- Schrader, C., & Süss, J. (1999). **A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci.** *Zentralblatt Fur Bakteriologie*, 289(3), 319–328. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(99\)80069-3](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(99)80069-3)
- Simonin, Y., Sillam, O., Carles, M. J., Gutierrez, S., Gil, P., Constant, O., Martin, M. F., Girard, G., Van de Perre, P., Salinas, S., Leparac-Goffart, I., & Foulongne, V. (2018). **Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016.** *Emerg Infect Dis.*, 24(5), 875–878. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171122>

- Sotelo, E., Gutierrez-Guzmán, A., Del Amo, J., Llorente, F., El-Harrak, M., Pérez-Ramírez, E., Blanco, J., Höfle, U., & Jiménez-Clavero, M. (2011). **Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: The red-legged partridge.** *Vet Res.*, 42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-11>
- Stiasny, K., Holzmann, H., & Heinz, F. X. (2009). **Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs.** *Vaccine*, 27(50), 7021–7026. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.069>
- Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale, M. (2013). **West Nile virus infection and immunity.** *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 115–128. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2950>
- Süss, J. (2003). **Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines.** *Vaccine*, 21(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00812-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00812-5)
- Süss, J. (2011). **Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – An overview.** *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(1), 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.007>
- Szentpáli-Gavallér, K., Antal, L., Tóth, M., Kemenesi, G., Soltész, Z., Dán, Á., Erdélyi, K., Bányai, K., Bálint, Á., Jakab, F., & Bakonyi, T. (2014). **Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011–2012 in Hungary.** *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 14(9), 648–655. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1549>
- Szomor, K., Rigó, Z., Bán, E., Nagy, L., Szalkai, T., Balogh, Z., Ferenczi, E., & Takács, M. (2011). **Serologic evidence of West Nile virus infection in patients with exanthema in Hungary.** *Acta Microbiol Immunol Hung.*, 58(2), 157–167. <https://doi.org/10.1556/AMicr.58.2011.2.8>
- Taba, P., Schmutzhard, E., Forsberg, P., Lutsar, I., Ljøstad, U., Mygland, Levchenko, I., Strle, F., & Steiner, I. (2017). **EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis.** *Eur J Neurol.*, 24(10), e61-1214. <https://doi.org/10.1111/ene.13356>
- Takada, A., & Kawaoka, Y. (2003). **Antibody-dependent enhancement of viral infection: Molecular mechanisms and in vivo implications.** *Rev Med Virol.*, 13(6), 387–398. <https://doi.org/10.1002/rmv.405>
- Tesh, R. B., Siirin, M., Guzman, H., Travassos da Rosa, A. P. A., Wu, X., Duan, T., Lei, H., Nunes, M. R., & Xiao, S. (2005). **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. <https://doi.org/10.1086/431153>
- Tonry, J. H., Brown, C. B., Cropp, C. B., Co, J. K. G., Bennett, S. N., Nerurkar, V. R., Kuberski, T., & Gubler, D. J. (2005). **West Nile virus detection in urine.** *Emerg Infect Dis.*, 11(8), 1294–1296. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050238>
- Tran, A., Sudre, B., Paz, S., Rossi, M., Desbrosse, A., Chevalier, V., & Semenza, J. C. (2014). **Environmental predictors of West Nile fever risk in Europe.** *Int J Health Geogr.*, 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-13-26>
- Veje, M., Studahl, M., Johansson, M., Johansson, P., Nolskog, P., & Bergström, T. (2018). **Diagnosing tick-borne encephalitis: a re-evaluation of notified cases.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 37(2), 339–344. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3139-9>
- Veje, M., Studahl, M., Norberg, P., Roth, A., Möbius, U., Brink, M., & Bergström, T. (2014). **Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in urine.** *J Clin Microbiol.*, 52(11), 4111–4112. <https://doi.org/10.1128/JCM.02428-14>

- Veo, C., Della Ventura, C., Moreno, A., Rovida, F., Percivalle, E., Canziani, S., Torri, D., Calzolari, M., Baldanti, F., Galli, M., & Zehender, G. (2019). **Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011-2018**. *Viruses*, 11(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/v11090814>
- Vilibic-Cavlek, T., Kristofic, B., Savic, V., Kolaric, B., Barbic, L., Tabain, I., Peric, L., Sabadi, D., Miklausic, B., Potocnik-Hunjadi, T., Zember, S., Stevanovic, V., Listes, E., & Savini, G. (2018). **Diagnostic significance of immunoglobulin G avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection**. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 51(5), 591–595. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0482-2017>
- Vilibic-Cavlek, T., Petrovic, T., Savic, V., Barbic, L., Tabain, I., Stevanovic, V., Klobucar, A., Mrzljak, A., Ilic, M., Bogdanic, M., Benvin, I., Santini, M., Capak, K., Monaco, F., Listes, E., & Savini, G. (2020). **Epidemiology of Usutu virus: The European scenario**. *Pathogens*, 9(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090699>
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Sabadi, D., Peric, L., Barbic, L., Klobucar, A., Miklausic, B., Tabain, I., Santini, M., Vucelja, M., Dvorski, E., Butigan, T., Kolaric-Sviben, G., Potocnik-Hunjadi, T., Balenovic, M., Bogdanic, M., Andric, Z., Stevanovic, V., Capak, K., ... Savini, G. (2019). **Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the ‘One health’ context, 2018**. *Transbound Emerg Dis.*, 66(5), 1946–1957. <https://doi.org/10.1111/tbed.13225>
- Vlaskamp, D. R., Thijsen, S. F., Reimerink, J., Hilkens, P., Bouvy, W. H., Bantjes, S. E., Vlamincx, B. J., Zaaijer, H., van den Kerkhof, H. H., Raven, S. F., & Reusken, C. B. (2020). **First autochthonous human West Nile virus infections in the Netherlands, July to August 2020**. *Euro Surveill.*, 25(46), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001904>
- Weidinger, P., Kolodziejek, J., Bakonyi, T., Brunthaler, R., Erdélyi, K., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2020). **Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018**. *Transbound Emerg Dis.*, 67(1), 298–307. <https://doi.org/10.1111/tbed.13351>
- Weiss, D., Carr, D., Kellachan, J., Tan, C., Phillips, M., Bresnitz, E., & Layton, M. (2001). **Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000**. *Emerg Infect Dis.*, 7(4), 654–658. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010409>
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P., & Nowotny, N. (2013). **Usutu virus, Italy, 1996**. *Emerg Infect Dis.*, 19(2), 274–277. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121191>
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., & Nowotny, N. (2002). **Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, Central Europe**. *Emerg Infect Dis.*, 8(7), 652–656. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>
- Westaway, E.G. (2011). **Flavivirus, Flaviviridae**. In C. Tidona & G. Darai (Eds.), *The Springer Index of Viruses* (pp. 799–804). New York: Springer.
- Wollants, E., Smolders, D., Naesens, R., Bruynseels, P., Lagrou, K., Matthijnsens, J., & Van Ranst, M. (2018). **Use of use of next-generation sequencing for diagnosis of West Nile virus infection in patient returning to Belgium from Hungary**. *Emerg Infect Dis.*, 24(12), 2380-2382. <https://doi.org/doi:10.3201/eid2412.180494>.
- World Health Organization [WHO]. (2011). **Vaccines against tick-borne encephalitis**. Elérhető: https://www.who.int/immunization/sage/1_TBE_PP_Draft_13_Mar_2011_SAGE_apr_2011.pdf
Utolsó hozzáférés dátuma: 2020.11.30.

- Zana, B., Erdélyi, K., Nagy, A., Mezei, E., Nagy, O., Takács, M., Bakonyi, T., Forgách, P., Korbacska-Kutasi, O., Fehér, O., Malik, P., Ursu, K., Kertész, P., Kepner, A., Martina, M., Süli, T., Lanszki, Z., Tóth, G. E., Kuczmog, A., ... Kemenesi, G. (2020). **Multi-approach investigation regarding the West Nile virus situation in Hungary, 2018.** *Viruses*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v12010123>
- Zannoli, S., & Sambri, V. (2019). **West Nile virus and usutu virus co-circulation in Europe: Epidemiology and implications.** *Microorganisms*, 7(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070184>
- Zöldi, V., Juhász, A., Nagy, C., Papp, Z., & Egyed, L. (2013). **Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary: The epidemiological situation between 1998 and 2008.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0905>
- Zöldi, V., Papp, T., Rigó, K., Farkas, J., & Egyed, L. (2015). **A 4-Year Study of a Natural Tick-Borne Encephalitis Virus Focus in Hungary, 2010–2013.** *EcoHealth*, 12(1), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0969-0>

A doktori kutatás eredményeihez kapcsolódó publikációk

1. Referált külföldi vagy hazai folyóiratban megjelent közlemények:

1. Anna Nagy, Enikő Bán, Orsolya Nagy, Ferenczi Emőke, Ágnes Farkas, Krisztián Bányai, Szilvia Farkas, Mária Takács. (2016). **Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period.** Arch Virol., 161, 1797–1806. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2844-5>
2. Anna Nagy, Orsolya Nagy, Enikő Bán, Eszter Molnár, Zsófia Müller, Márton Orbán, Borbála Kecskés, Emese Henriett Harsányi, Levente Kővágó, Lajos Jobbágy, Zoltán Németh, Zsuzsanna Várnai, Mária Takács. (2017). **A nyugat-nílusi vírus kimutatása humán betegmintákból: nyomon követéses vizsgálatok a 2015. évi szezonális időszakban.** Orv Hetil., 158(20), 791–796. <https://doi.org/10.1556/650.2017.30760>
3. Anna Nagy, Orsolya Nagy, Katalin Tarcsai, Ágnes Farkas, Mária Takács. (2018). **First detection of tick-borne encephalitis virus RNA in clinical specimens of acutely ill patients in Hungary.** Ticks Tick Borne Dis., (9)3, 485–489. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.017>
4. Anna Nagy, Tímea Szöllősi, Mária Takács, Nóra Magyar, Éva Barabás. (2019). **West Nile Virus Seroprevalence Among Blood Donors in Hungary.** Vector Borne Zoonotic Dis., (19)11, 1–7. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2401>
5. Anna Nagy, Eszter Mezei, Orsolya Nagy, Tamás Bakonyi, Nikolett Csonka, Magdolna Kaposi, Anita Koroknai, Katalin Szomor, Zita Rigó, Zsuzsanna Molnár, Ágnes Dánielisz, Mária Takács. (2019). **Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018.** Euro Surveill., (24)28, 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038>

2. Könyvfejezetek, jegyzetek:

1. András Lakos, Enikő Bán, Ferenc Schneider, Anna Nagy, Eszter Mezei. (2019). **TBE in Hungary.** In Gerhard Dobler, Wilhelm Erber, Michael Bröker, & Heinz-Josef Schmit (Eds), *The TBE Book (2nd Edition)*. Singapore: Global Health Press Pte Ltd. https://doi.org/10.33442/978-981-14-0914-1_12b-1

3. Kongresszusi kiadványok:

1. **Nagy, Anna**, Enikő Bán, Orsolya Nagy, Emőke Ferenczi, Ágnes Farkas, Krisztián Bányai, Szilvia Farkas, Mária Takács. (2015). **“Detection of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (62)1,187.
2. **Nagy, Anna**, Enikő Bán, Eszter Molnár, Emőke Ferenczi, Ágnes Farkas, Krisztián Bányai, Szilvia Farkas, et al. (2016). **“Nyugat-Nílusi vírus kimutatása humán vizelet mintákból: a 2014-2015. évi szezonális időszak tapasztalatai.”** In A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 44. Kongresszusa, 22.
3. **Nagy, Anna**, Orsolya Nagy, Katalin Tarcsai, Ágnes Farkas, Mária Takács. (2017). **“First detection of tick-borne encephalitis virus in clinical specimens of acutely ill patients in Hungary.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (64)1, 151–152.
4. **Nagy, Anna**, Eszter Mezei, Orsolya Nagy, Tamás Bakonyi, Nikolett Csonka, Magdolna Kaposi, Anita Koroknai, et al. (2019). **“Extraordinary increase in the number of West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (66)1,168–169.
5. **Nagy, Anna**, Orsolya Nagy, Anita Koroknai, Nikolett Csonka, Anett Mária Dömötör, and Mária Takács. (2019). **“Kihívások és buktatók - A Nyugat-Nílusi vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikájának új eredményei.”** In Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 47. Kongresszusa, 31.

6. Csonka, Nikolett, **Anna Nagy**, Orsolya Nagy, Anita Koroknai, and Mária Takács. (2019). “**Usutu vírus irányában végzett diagnosztikai vizsgálatok: új tapasztalatok a Flavivirus diagnosztikában.**” In Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 47. Kongresszusa, 53.
7. **Nagy, Anna**, Eszter Mezei, Orsolya Nagy, Anita Koroknai, Katalin Szomor, Zita Rigó, Nikolett Csonka, Magdolna Kaposi, and Mária Takács. (2019). “**Extraordinary increase in the number of human West Nile virus infections - Conclusion of the laboratory experiences.**” In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (66)1, 67–68.
8. **One-Health European Joint Programme – 1st Annual Scientific Meeting.** 2019. május 22-24. Dublin, Írország. **Oral presentation:** Anna Nagy, Eszter Mezei, Orsolya Nagy, Tamás Bakonyi, Nikolett Csonka, Magdolna Kaposi, Anita Koroknai, Katalin Szomor, Zita Rigó, Zsuzsanna Molnár, Ágnes Danielisz, Mária Takács. (2019). „**Extraordinary increase in the number of West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018.**” In 1st Annual Scientific Meeting of the One Health European Joint Programme on Foodborne Zoonoses, Antimicrobial Resistance and Emerging Threats, 58.
https://onehealthjep.eu/wp-content/uploads/2018/12/OneHealth_ASM_2019_Proceedings_.pdf

A doktori kutatás eredményeihez nem kapcsolódó publikációk

1. Referált külföldi vagy hazai folyóiratban megjelent közlemények:

1. Márton Koch, Katalin Tímea Török, Ferenc Nagy, Viktor Soós, Éva Pozsgai, Zsuzsanna Lelovics, **Anna Nagy**, Csaba Varga. (2019). **A nyugat-nílusi vírus okozta neuroinvasív tünetegyüttes előfordulása sürgősségi osztályon.** Orv Hetil., (160)51, 2026–2035.
<https://doi.org/10.1556/650.2019.31575>
2. Orsolya Nagy, **Anna Nagy**, Szilvia Tóth, Bernadett Pályi, Anita Vargáné Koroknai, Mária Takács. (2019). **Imported Zika virus infections in Hungary between 2016 and 2018.** Acta Microbiol Immunol Hung., (66)4, 423–442. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.025>
3. Brigitta Zana, Károly Erdélyi, **Anna Nagy**, Eszter Mezei, Orsolya Nagy, Mária Takács, Tamás Bakonyi, Petra Forgách, Orsolya Korbacska-Kutasi, Orsolya Fehér, Péter Malik, Krisztina Ursu, Péter Kertész, Anett Kepner, Máté Martina, Tamás Süli, Zsófia Lanszki, Gábor Endre Tóth, Anett Kuczmozg, Balázs Somogyi, Ferenc Jakab, Gábor Kemenesi. (2020). **Multi-Approach Investigation Regarding the West Nile Virus Situation in Hungary, 2018.** Viruses., (12)1, 1–12.
<https://doi.org/10.3390/v12010123>
4. Orsolya Fehér, Tamás Bakonyi, Mónika Barna, **Anna Nagy**, Mária Takács, Ottó Szenci, Kinga Joó, Sára Sárdi, Orsolya Korbacska-Kutasi. (2020). **Serum neutralising antibody titres against a lineage 2 neuroinvasive West Nile Virus strain in response to vaccination with an inactivated lineage 1 vaccine in a European endemic area.** Vet Immunol Immunopathol., 227, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110087>
5. Orsolya Kutasi, Orsolya Fehér, Sára Sárdi, Nándor Balogh, **Anna Nagy**, Leticia Moravszki, Emese Bócai, Ottó Szenci. (2020). **Characterisation of the cerebrospinal fluid of horses with West Nile virus neuroinvasive disease.** Acta Vet Hung., (68)2, 177–185.
<https://doi.org/10.1556/004.2020.00022>
6. Nóra Magyar, Zoltán Kis, Éva Barabás, **Anna Nagy**, Judit Henczkó, Ivelina Damjanova, Mária Takács, Bernadett Pályi. (2020). **New geographical area on the map of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: First serological evidence in the Hungarian population.** Ticks Tick Borne Dis., (12)1, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101555>

7. Márton Koch, Éva Pozsgai, Viktor Soós, **Anna Nagy**, János Girán, Norbert Nyisztor, Tibor Martyin, Zsófia Müller, Melánia Fehér, Edit Hajdú, Csaba Varga. (2021). **Identifying risks for severity of neurological symptoms in Hungarian West Nile virus patients.** BMC Infect Dis., (21)65, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05760-7>

2. Kongresszusi kiadványok:

1. **Nagy, Anna**, Marina Varga, Mária Takács, Katalin N Szomor. (2013). **“Retrospective study for screening Usutu virus antibodies in two different groups of human population in Hungary.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (60)1, 191–192.
2. Nagy, Orsolya, Enikő Bán, Emőke Ferenczi, **Anna Nagy**, Zita Rigó, Katalin N Szomor, Mária Takács. (2015). **“Antibody dependent enhancement of infectivity in human flavivirus infections.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (62)1, 72.
3. **Nagy, Anna**, Orsolya Nagy, Enikő Bán, Emőke Ferenczi, Zita Rigó, Katalin Némethné Szomor, Mária Takács. (2015). **“Examination of serologically confirmed human hantavirus infections in Hungary: conclusions of laboratory diagnostics.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (62)1, 68.
4. Nagy, Orsolya, **Anna Nagy**, Enikő Bán, Emőke Ferenczi, István Jankovics, Mária Takács. (2017). **“Results and conclusions of Zika virus diagnostics during the 2016 Summer Olympic Games.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (64)1, 63–64.
5. Nyisztor, Norbert, Tivadar Bányai, Tibor Martyin, Piroska Lakatos, Réka Pocsay, Ábel Seres, Mária Takács, **Anna Nagy**. (2019). **“Nyugat-Nílusi láz Békés megyében, 2018-ban.”** In Magyar Infektológiai És Klinikai Mikrobiológiai Társaság 47. Kongresszusa, 53.
6. Nagy, Orsolya, **Anna Nagy**, Anita Koroknai, Nikolett Csonka, and Mária Takács. (2019). **“Importált Dengue-, Chikungunya és Zika-vírus fertőzések Magyarországon 2016-2019 között.”** In Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 47. Kongresszusa, 49.
7. Nagy, Orsolya, **Anna Nagy**, and Mária Takács. (2019). **“Role of serological cross-reaction and cross-neutralization in the diagnosis of Flavivirus infections.”** In Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, (66)1, 71–71.
8. Koroknai, Anita, Orsolya Nagy, **Anna Nagy**, Nikolett Csonka, Mária Takács. (2019). **“Rágcsálók által terjesztett virális zoonózisok előfordulása és diagnosztikája Magyarországon 2012-2019 között.”** In Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 47. Kongresszusa, 30.

Mellékletek

I.számú melléklet: A WNV lineage 2 teljes genom szekvenálásához tervezett primerek.

Primer név	Szekvencia (5'-3')	Orientáció	Amplikon mérete (nt)
WNf1	TGAGCTGACAACTTAGTAGTG	sense	900
WNR1	GCATYGTGTTGCTYCCTAGCATCC	antisense	
WNf2	CTGGTVAAGACAGARTCATGGATA	sense	816
WNR-b	CTCCATGGCARGTTCAGRTCCAT	antisense	
WNf-c	ACGGTTGAYTGTGAGCCACGGTC	sense	1298
WNR-c	CCCAAGCCTTCCARCCCATCTC	antisense	
WNf-d	GATGTGGAAGCBTGGATGGATCG	sense	1069
WNR-d	CCACCTCTTGCGAAGGACCTCTG	antisense	
WNf-e	CCGACATGATTGATCCTTTTCAG	sense	1205
WNR-e	TCTACCATCACTCCGGCTCCAGC	antisense	
WNf-f	ATGTTYGTGGCATTGTGCATYTC	sense	1107
WNR3	GGRACTCTGTGTGGAGACATCA	antisense	
WNf-g	TATGGGAACGGCGTCATCATGCC	sense	1117
WNR-g	CCCGTCCATGGTGTACACYTT	antisense	
WNf-h	ATGCTAGACAAYATCAACATGCC	sense	1485
WNR-h	GTTGCATTCCACACTGARCTAGC	antisense	
WNf-i	GTGGACGTTGGTGTGTCAGCTCT	sense	929
WNR-4	GATGACTCTCCAATGTCACAGAG	antisense	
WNf-j	GTACAGGAAGTGAAAGGGTA	sense	1151
WNR-j	GCCACATRAACCARATGGCTCT	antisense	
WNf6	ACCTGCATHTACAACATGATGGG	sense	1512
WNR-7	CCGTCTACTCAACTCCGGTGGCA	antisense	
WN-f7	GAATGGATGACGACRGAAGACATGCT	sense	920
WNR6	ACCTATDTCGGCGCACTGTG	antisense	

II. számú melléklet: A 2018-as év WNV PCR pozitív teljes vér és vizelet mintapárjainak összehasonlítása: real-time PCR Ct értékek és mintavételi időpontok szerint.

Beteg azonosító	Teljes vér	PCR Ct	Eltelt nap	Vizelet	PCR Ct	Eltelt nap
2/2018	POZITÍV	32,88	13	POZITÍV	30,60	13
4/2018	POZITÍV EDTA1.	29,01	2	POZITÍV vizelet1.	27,10	2
4/2018	POZITÍV EDTA2.	30,49	6	POZITÍV vizelet 2.	32,11	6
10/2018	POZITÍV	38,56	7	POZITÍV	37,89	7
11/2018	POZITÍV	29,28	8	POZITÍV	28,79	8
21/2018	POZITÍV	31,81	5	POZITÍV	31,27	5
24/2018	POZITÍV	31,46	3	POZITÍV	38,23	3
28/2018	POZITÍV	39,81	8	POZITÍV	38,19	8
41/2018	POZITÍV	34,05	9	POZITÍV	33,77	9
45/2018	POZITÍV	35,91	15	POZITÍV	35,94	15
65/2018	POZITÍV	36,76	10	POZITÍV	32,48	10
70/2018	POZITÍV	33,61	3	POZITÍV	38,25	6
73/2018	POZITÍV EDTA1.	27,58	19	POZITÍV vizelet 1.	31,90	19
73/2018	POZITÍV EDTA2.	29,92	26	POZITÍV vizelet 2.	34,76	26
76/2018	POZITÍV	37,53	6	POZITÍV	27,57	6
80/2018	POZITÍV EDTA1.	32,34	3	POZITÍV	30,00	3
82/2018	POZITÍV	37,41	6	POZITÍV	35,48	6
83/2018	POZITÍV	33,27	5	POZITÍV	29,09	5
89/2018	POZITÍV	27,85	5	POZITÍV	32,87	5
110/2018	POZITÍV	37,48	6	POZITÍV	32,76	6
111/2018	POZITÍV	31,53	7	POZITÍV	31,29	7
120/2018 ⁴	POZITÍV	30,21	2018.08.28.	POZITÍV	29,61	2018.08.28.
148/2018	POZITÍV	34,97	11	POZITÍV	34,34	11
198/2018	POZITÍV	33,73	9	POZITÍV	24,01	9

⁴ **120/2018** sorszámú betegnél a tünetek kezdeti időpontjának napja nem ismert, ezért a mintavétel dátumát tüntettem fel, mely a vér- és vizeletminta esetén egyezett.

III. számú melléklet: A 2014 – 2018 között szekvenált WNV minták területi eloszlása, az NS3 H249P polimorfizmus jelölése mintánként. (H: Hisztidin; P: Prolin)

Év	GenBanki- azonosító szám	Település	Megye	H249P_NS3
2014				
1	KU058848	Szeged	Csongrád	H
2	KT959349	Budapest	Budapest	H
3	KU058850	Városföld	Bács-Kiskun	H
2015				
1	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H
2	nincs feltöltve	Hajdúhadház	Hajdú-Bihar	P
3	nincs feltöltve	Mátyásdomb	Fejér	H
4	nincs feltöltve	Dunaújváros	Fejér	H
5	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H
6	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H
7	nincs feltöltve	Dunaújváros	Fejér	H
2016				
1	nincs feltöltve	Szeged	Csongrád	P
2	nincs feltöltve	Kunszentmiklós	Bács-Kiskun	P
3	nincs feltöltve	Szirmabesenyő	Borsod-Abaúj-Zemplén	P
4	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	P
5	nincs feltöltve	Hajdúböszörmény	Hajdú-Bihar	P
6	nincs feltöltve	Békéscsaba	Békés	P
7	nincs feltöltve	Érpaták	Szabolcs-Szatmár-Bereg	P
8	nincs feltöltve	Gyöngyös	Heves	H
9	nincs feltöltve	Pomáz	Pest	H
10	nincs feltöltve	Szolnok	Jász-Nagykun-Szolnok	H
11	nincs feltöltve	Biatorbágy	Pest	H
12	nincs feltöltve	Szentendre	Pest	H
13	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H
14	nincs feltöltve	Berhida	Veszprém	H
15	nincs feltöltve	Nagyhegyes	Hadú-Bihar	H
16	nincs feltöltve	Kisújszállás	Jász-Nagykun-Szolnok	H
17	nincs feltöltve	Enying	Fejér	H
18	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H
2017				
1	nincs feltöltve	Szentmártonkáta	Pest	H
2	nincs feltöltve	lakcím nem = exp. helyével!	Hajdú-Bihar	H
3	nincs feltöltve	Martfű	Jász-Nagykun-Szolnok	H
4	nincs feltöltve	Tahitótfalu	Pest	H
2018				
1	nincs feltöltve	Hajdúszoboszló	Hajdú-Bihar	P
2	MK224611	Balatonfüred	Veszprém	H
3	MK224612	Szolnok	Jász-Nagykun-Szolnok	P
4	MK224613	Kecskemét	Bács-Kiskun	H
5	MK224614	Berettyóújfalú	Hajdú-Bihar	P
6	nincs feltöltve	Gyula	Békés	P
7	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	P
8	MK224615	Orosháza	Békés	P
9	MK224616	Püspökladány	Hajdú-Bihar	P
10	MK224617	Berettyóújfalú	Hajdú-Bihar	P
11	MK224618	Bugac	Bács-Kiskun	P
12	MK224619	Szerbia	Szerbia	P
13	MK224620	Debrecen	Hajdú-Bihar	P
14	MK224621	Velence	Fejér	H
15	MK224622	Szolnok	Jász-Nagykun-Szolnok	P
16	MK224623	Balatonkenese	Veszprém	H
17	MK224624	Bicske	Fejér	H
18	MK224625	Gyula	Békés	H
19	MK224626	Budapest/Kiskunhalas	Bács-Kiskun	H
20	nincs feltöltve	Budapest	Budapest	H

Év	GenBank-i azonosító szám	Település	Megye	H249P_NS3
21	MK224627	Dunaújváros	Fejér	H
22	MK224628	Hajdúszoboszló	Hajdú-Bihar	P
2018				
23	nincs feltöltve	Gyula	Békés	P
24	nincs feltöltve	Békéscsaba	Békés	P
25	nincs feltöltve	Ausztria/Szlovákia	Ausztria/Szlovákia	P
26	MK224629	Kiskunmajsa	Bács-Kiskun	H
27	nincs feltöltve	Abony	Pest	H
28	nincs feltöltve	Kaposvár	Somogy	P
29	nincs feltöltve	Jászberény	Jász-Nagykun-Szolnok	H
30	MK224630	Biatorbágy	Pest	H
31	nincs feltöltve	Tiszaújváros	Borsod-Abaúj-Zemplén	P
32	MK224631	Püspökladány	Hajdú-Bihar	P
33	MK224632	Karcag	Jász-Nagykun-Szolnok	P
34	MK224633	Velence	Fejér	H
35	MK224634	Románia	Románia	P
36	MK224635	Nyíregyháza	Szabolcs-Szatmár-Bereg	P
37	MK224636	Veszprém	Veszprém	H
38	MK224637	Forró	Borsod-Abaúj-Zemplén	P
39	MK224638	Sajópálfala	Borsod-Abaúj-Zemplén	H
40	MK224639	Újtelek	Bács-Kiskun	H
41	nincs feltöltve	Tiszalúc	Borsod-Abaúj-Zemplén	P
42	MK224640	Hajdúszoboszló	Hajdú-Bihar	P
43	MK224641	Debrecen	Hajdú-Bihar	P
44	MK224642	Orosháza	Békés	P
45	MK224643	Budapest	Budapest	P
46	MK224644	Hajdúböszörmény	Hajdú-Bihar	P

Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi- és infrastrukturális feltételeinek maradéktalan biztosításában, szakmai munkám évek óta tartó irányításában, valamint a publikációk kéziratának és a tudományos konferenciákra szánt előadások, poszterek anyagának lektorálásában szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek: Dr Takács Mária címzetes egyetemi tanárnak. Köszönöm, hogy mindig számíthattam támogató segítségére.

Hálás vagyok a Nemzeti Népegészségügyi Központ; Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály egykori és jelenlegi dolgozóinak szakmai támogatásáért és a kollegiális légkör megteremtéséért. Köszönet illeti a Virális Zoonózisok Nemzeti Referencialaboratóriumának jelenlegi munkatársait: Dr Nagy Orsolya szakorvost, Vargáné Dr Koroknai Anita biológust és Csonka Nikolett népegészségügyi ellenőrt. Az együtt töltött évek során rengeteget tanulhattam tőlük. Külön köszönettel tartozom a referencialaboratórium volt munkatársának: Kaposi Tamásné szakasszisztensnek, akinek számos gyakorlati tanácsa segítette a laboratóriumi munka elsajátításában.

Némethné Dr. Szomor Katalinnak külön köszönöm, hogy már egyetemi tanulmányaim alatt lehetőséget kaptam arra, hogy a flavivírusok izgalmas témájával foglalkozhassak.

Továbbá, az Enterovírusok NRL; WHO Nemzeti Poliovírus Referencialaboratórium vezetőjének: Farkas Ágnes biológusnak köszönöm, hogy a molekuláris biológiai módszerek kapcsán felmerülő kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá.

A molekuláris biológiai laboratóriumi munkafolyamatok elsajátításában Marchut Anna és Wellerné Pus Ágota szakasszisztensek gyakorlati tanácsai segítettek, köszönöm, hogy tanulhattam tőlük.

Mezei Eszter epidemiológus kollégánknak (NNK, Járványügyi és Védőoltási Surveillance Osztály) köszönöm a közvetlen és mindig nagyon segítőkész hozzáállását. A járványügyi és laboratóriumi adatok egyeztetésekor kialakult szakmai együttműködés hozzájárult az eredmények megfelelő interpretálásához.

Dr Rusvai Erzsébet (NNK, Hepatitisz vírusok NRL) és Dr Kis Zoltán (NNK, Nemzeti Biztonsági Laboratórium) kollégáimnak szeretném megköszönni, hogy időt szakítottak az értekezés átolvasására, hasznos javaslataikkal sokat segítettek a dolgozat végleges formájának elkészítésében.

Közvetlen kollégáim szakmai és baráti támogatását hálásan köszönöm.

Köszönettel tartozom a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont – Állatorvos-tudományi Intézet munkatársainak: Dr Bányai Krisztián témacsoport vezetőnek és Dr Farkas Szilvia tudományos főmunkatársnak az első humán mintából végzett WNV teljes

genom szekvenálásában nyújtott szakmai segítségért és az eredmények publikálása során adott hasznos tanácsokért.

Nagyon köszönöm az Országos Vérellátó Szolgálat; budapesti Konfirmáló Laboratóriumának vezetője: Dr Barabás Éva közreműködését a véradók WNV szeroprevalencia vizsgálatában. A minta- és adatgyűjtés mellett közös publikációnk kéziratának elkészítésében és az eredmények statisztikai értékelésében is nagyon sok segítséget kaptam tőle.

Köszönöm, hogy az Állatorvostudományi Egyetem; Állatorvostudományi Doktori Iskola hallgatójaként végezhettem tanulmányaimat. Az oktatási tevékenységben nyújtott támogatásért és szakmai együttműködésért köszönettel tartozom a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék jelenlegi és egykori munkatársainak: Dr Forgách Petrának, Dr Marosi Andrásnak, Hofbauer Gyöngyinek és Bakonyi Győzőnek. Továbbá, szeretném megköszönni Dr Bakonyi Tamás professzornak, hogy szakmai javaslataival segítette munkámat.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, hogy támogatásukkal és gondoskodásukkal lehetővé tették, hogy minél több időt és energiát fordíthassak munkámra.