

## **Zárójelentés a K 103937 számú „Vírus izolálási, kimutatási vizsgálatok vadon élő rágcsáló fajokból, és kullancsencefalitisz góckutatás” című projektről.**

Futamidő: 2013 február 1-2018 január 31.

A vállalt munka alapvetően két részre, egy természetes kullancs encefalitisz góc kutatására, és vadon élő kistrágcsálókból való vírusizolálási próbálkozásra volt osztható.

### **1., Kullancsencefalitisz góckutatás:**

A projekt egy 2010-től folyó kutatási program folytatásaként indult. 2013 áprilisától-2017 augusztusig látogattuk a gyűjtőhelyet. 2013-15 között havonta április- október között, 2016-17 ben csak április-július-augusztusban. A terepen végzett munka két részre volt osztható: 2013-14-ben általános gócvizsgálat folyt, kullancsgyűjtéssel, rágcsálófogással, vírusizolálási próbálkozással a kullancsokból és szerológiai vizsgálatokkal a rágcsáló vérsavókból. 2015-17 ben csak rágcsálófogás volt, és a kullancsokat a gazdaállatokról gyűjtöttük be vírusizolálási céllal. A program megváltozását az okozta, hogy a kiszállási autón okozott karosszéria kár miatt munkahelyi vezetőim 2014-15-re eltiltottak a vállalati autó használatától, így az eredeti program nem volt teljes egészében tartható.

Góckutatási munkánk sok szempontból ismeretlen adatokat nyújtott egy természeti KE- góc tulajdonságairól. Soha senki sem vizsgált egy folyamatosan éveken át egy bizonyítottan gócnak tekinthető kis területet. Egy zalai faluban 2007-ben kitört kecsketej járvány után sikerült előzetes rágcsáló-szerológiai vizsgálatokkal a kecskék legelőjén egy kisebb 0,5-1 hektáros területet azonosítani ahol valószínűleg a kecskék fertőződtek, e területet jelöltük ki munkaterületnek. 77 db 10x10 méteres négyzetre osztottuk a területet. Minden négyzetben minden kiszálláskor a vegetációról, 10 nm<sup>2</sup> területről kullancsot gyűjtöttünk, illetve a négyzet közepére helyezett élvefogó csapdával kistrágcsálókat csapdáztunk három napon át reggel-esti csapdaellenőrzéssel. A kullancsok fajtát, fejlődési alakját meghatároztuk, 10-50-es csoportokat hoztunk létre, és a csoportokból vírust izoláltunk kísérleti állatoltással. A befogott kistrágcsálók adatait feljegyeztük, belső szemzúgából 200 µl vért vettünk szerológiai vizsgálathoz. Naponta a terület hőmérsékleti, pára adatait is megmértük, feljegyeztük a legközelebbi meteorológiai mérőállomás adatait is. 200 méterre mintavételi helyünktől egy

kontrol területet is kijelöltünk hasonló munkatervet megvalósítva rajta. Mindkét terület közepén egy vadetető hely volt, így a nagyvadak esetleges kullancs/vírus terjesztő szerepét is vizsgálhattuk. Rengeteg, nehezen feldolgozható mennyiségű adathoz jutottunk. A fontosabbak:

2011-14 között 9616 kullancsot fogtunk (7,247 a gócban, 2369-t a kontroll területen) 823 kistrágsáló egyedét azonosítottunk (539-et a gyűjtőhelyen, 284-t a kontroll helyen) a vizsgálati hely rágsálói közül 28 db. 5.19% volt szeropozitív, míg a kontroll területen 14 állat (4,93%). Egy KE vírustörzset sikerült izolálni 2011-ben és kettőt 2012-ben. A 2015-17 időszakban a kontrollterületet továbbiakban nem vizsgáltuk. A gócterületről további 279 kistrágsálót fogtunk be, és róluk 1517 kullancsot gyűjtöttünk le, egyikből 2016 augusztusban egy új, negyedik KE vírustörzset izoláltam. Így összesen vizsgálataink során 10924 kullancs, és 1112 kistrágsáló adataiból vonhattunk le következtetéseket.

A gócban mért alapvető adatok (napi középhőmérséklet, csapadék, gazdafajok aránya, nimfák-lárvák, kullancsok eloszlása évről évre változó képet mutat, talán csak a hőmérsékleti görbék voltak hasonlóak az évek során. A többi fő mutató évről évre tendencia nélkül változott. A kullancsok száma, nimfák/lárvák aránya, a gazdafajok aránya a csapadék mennyisége nagyon változatos képet mutat, jelezve, hogy egy KE természeti góc sok hatásnak alávetett, évről évre változó körülményeket biztosító terület. Kisebb csoda, hogy e változó körülmények között a vírus évről évre meg tudja oldani túlélését, és a túléléséhez minimálisan szükséges számú kullancs fertőzését. Sem a szeropozitív rágsálók, sem a vírus pozitív kullancsok nem halmozódtak fel kisebb területeken, gócokban, megjósolhatatlanul össze-vissza fordultak elő a vizsgált gócterületen. Adataink az irodalomban eddig páratlanok, előzmény nélküliek. A főbb eredményeket a pályázat alapkérdéseire adandó válaszokkal foglalom össze:

A pályázati terv eredeti alapkérdései, és munkánk alapján az arra adható válaszok:

Mikor, mely faj és hány kullancs fertőzött a góc területén?

A vizsgált periódusban 2011 Aug., 2012 ben május és július, 2016-ban Augusztusban sikerült vírust izolálni. A gócterületen befogott 8359 kullancsból 4 volt pozitív, 2090 kullancsból egy, ez 0,478 ezrelékes prevalenciát jelent. Ezt az adatot nincs mihez hasonlítani, de mindenképpen alacsonynak tekinthető. Vírust mind az *Ixodes ricinus* mind a *Haemaphysalis concinna* fajtából sikerült kimutatni, nimfákból és lárvákból egyaránt.

### A vírusfertőzés mennyiben mutatkozik meg a rágcsálók ellenanyag válaszában?

A gócterületen a rágcsálók 5,23%-a, a kontrolterületen 4,93%-a volt pozitív. Ez kb. 100X magasabb arány mint a kullancsok 0,478 ezrelékes pozitivitása. Ez nem ellentmondás, ha a rágcsálót akár egy kullancs életében megfertőzi, az állat egy életen át pozitív marad, így nagyon kisszámú fertőzött kullancs is kialakíthat magasabb fertőzöttségi arányt a gazdában.

### Milyen szerepet játszik az időjárás, és a nagyemlősök (vaddisznó, szarvas, őz) a vírusciklus működésében?

Meglepő módon szinte semmilyen. Semmiféle időjárási adat, helyi eső, páratartalom, hőmérséklet, vadetető jelenléte, vagy hiánya nem mutatott kapcsolatot sem a begyűjtött kullancsok, sem a befogott rágcsálók számával, aktivitásával, sem az izolált vírusok számával idejével. Így nem tudom megerősíteni egyes irodalmi adatot a felmelegedés kullancs elterjedésre való hatásáról, vagy a nagyvadak kullancsot terjesztő szerepéről.

### Mekkora egy KE góc?

Az általunk vizsgált góc 0,75 hektár körüli.

### Állandó, stabil, vagy mozog?

Stabil, nem vettük észre bármilyen irányba való elmozdulását. A kullancsok a kistrágcsálókhoz kötődnek, a kistrágcsálók pedig ha megtalálják táplálékukat és búvóhelyüket egy adott helyen nem mozognak, így a kullancsok sem.

### E góckutatási munkánkat az alábbi cikkben adtuk közre:

Zöldi V., Papp, T, Rigó, Krisztina, Farkas, János, Egyed, László. 2015. *A four-year-long study of an active natural tick-borne encephalitis focus in Hungary 2010 2013. Ecohealth, 12(1):174-182.*

**2.** Gócvizsgálati munkánk adatainak értékelése során vettük észre, hogy a vizsgált időszak végén a területre betörő erdei pocok (*Myodes glareolus*) állomány sokkal inkább terhelt kullancsokkal, főleg nimfákkal, mint az egyéb egér (*Muridae*) gazdafajok, a sárganyakú erdeieger (*Apodemus flavicollis*), és a pirókeger (*Apodemus agrarius*). A vizsgált időszak elején az erdei pocok faj egyáltalán nem volt jelen a területen, az egérfajok szeropozitivitása 1,8-4,6% között mozgott. A 4 . év végére az erdei pockok szeropozitivitása 20,5%-ra nőtt és emellett az együtt élő két egérfaj pozitivitása is emelkedett (3,6-4,8%). A megtalált nimfák

szinte teljes egészében a pocokokon voltak találhatóak főleg a fülkagylón, a fülszélén és különösen a hallójáratban. Azonos élőhelyen, ha minden természetes körülmény hasonló, a kullancsok akkor is sokkal sikeresebben parazitálják a pocokfajt, mint az egereket. Mindez jelzi a pocok fokozott szerepét a kullancsok (és ezáltal a KE vírus) fenntartásában, terjesztésében.

A pocok szerepét a kullancs és vírus terjesztésben az alábbi cikkben adtuk közre:

*Zöldi, V., Papp, T., Reiczigel, J., **Egyed L.** 2015.*

*Bank voles and adult rodents show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary. Infectious diseases. Mar 2015, Vol. 47, No. 3: 178–181 (IF: 2014: 1,64)*

### **3., Vírus izolátumaink szekvenálási eredményei:**

Az előbbieken említett gócban folyó munkánk során begyűjtött kullancsokból négy KEV törzset sikerült izolálni. 1951 óta ezek az egyetlen élő, használható magyar izolátumok. Mindez idáig a KEV nemzetközi irodalmából hiányzott magyarországi vírusszekvencia, miközben az összes környező országból, és 10-15 egyéb országból publikáltak már teljes vírus genom szekvenciákat. Az izolálás eredményét növeli, hogy azonos természeti gócból, egy 0,5-0,7 hektáros területről származnak, és a két szélső izolátumot 6 év választja el egymástól. Így nemcsak külföldi vírusokkal voltak összehasonlíthatóak izolátumaink, de segítségükkel egy természetes gócban folyó evolúciós folyamat lépéseit is ki lehetett mutatni. A szekvenciákat elhelyeztük génbankban. E négy izolátum mellett az első magyarországi (1951 Tatabánya) vírustörzset is megszekvenáltattuk. A letermelt víusból cDNS-t készítettünk, majd e mintát erősítettük fel 5-6 PCR termékkel, melyek bázissorrendjét új generációs szekvenálási módszerrel határoztattuk meg. Fő eredményként megállapítható volt, (i): az összes vírustörzs nagyon hasonlít egymásra, (ii), a mutációs ráta lassabb más RNS vírusokhoz képest (HIV), de gyorsabb finn TBEV kiszámolt adatokhoz képest (iii): törzseink a törzsfán nem a szomszédos országok törzseihez, hanem finn és észak-orosz vírusokhoz voltak hasonlóak. Kilenc mutáció alakult ki a 10994 bp nagyságú genomon, ebből 1-1 a két oldalon levő nem kódoló szakaszokon, a kapszid, a premembrán, és a N2a géneken, 2-2 a membrán és NS5 géneken. Ezek közül 5 volt sense mutáció, azaz okozott aminosav változást

a fehérjékben. Törzseink a poliA farkat nem tartalmazó KEV törzsek körébe tartoznak.  $1,537 \times 10^{-4}$  szubsztitúciós ráta adódott, amely sokkal kisebb, mint a HIV esetén, de gyorsabb evolúciós változásokat jelent, mint amit finn kutatók számoltak 2 finnországi izolátum összehasonlításakor. Mindez azt jelenti, hogy a KEV egy kimondottan konzervatív genomú RNS vírus, és bizonyítékot leltünk arra, hogy a vírusevolúció ugyanazon vírus esetén is élőhely függő, azaz eltérő sebességgel zajlik a különböző gócban. A mi gyűjtőhelyünk nagy rágcsáló- és kullancs egyedszáma lehet az oka e gyorsabb változékonyságnak. Ezen túl különös eredmény, hogy a filogenetikai törzsfán vírusaink nem a szomszédos közép-európai, hanem távoli északi országok törzseire hasonlítanak. Bár mindez további vizsgálatokat igényel, valószínűleg két KEV törzs juthatott el keletről közép-Európába, ezek közül az egyik Magyarországra. A magyar törzset pedig valószínűleg vándormadarak (fertőzött kullancsokat szállítva) terjesztették északra. A skandináviai vándormadarak (darvak, lúdfajok) százezrei vándorolnak Magyarországon keresztül minden évben. Egy a magyarhoz hasonló törzset találtak Bajorországban egy Duna menti vizes élőhelyen levő faluban.

E szekvenáló munkánkról szóló cikket 2018 február 26-án fogadták el közlésre:

**Egyed, L., Rónai, Zs., Dán, Á. 2018. Hungarian tick-borne encephalitis viruses isolated from a 0.5-hectare focus are closely related to Finnish strains. Ticks and tick-borne diseases (accepted 2018 feb 26.).**

A pályázati terv eredeti alapkérdései, és e munkánk alapján az arra adható válaszok:

Egy vagy több vírustörzs cirkulál a gócban? Mivel az izolátumok nagyban hasonlítanak egymáshoz, és minden mutáció megtalálható az öt időben követő izolátumban, biztonsággal állítható, hogy egyetlen vírustörzs természetes perzisztálását volt lehetőségünk kimutatni.

E vírustörzsek konzervatívak, vagy változékonnyak? A RNS vírusok világán belül a KEV kimondottan konzervatívnak minősül, a cikkben kiszámított szubsztitúciós ráta alapján a KEV 10-100 x kevésbé változékonny, mint pl. a HIV.

A vírusgenom mely része stabil, és mely rész változékonny? Az egésze stabil, a vírus 10 genetikai szakasza (génje) közül hétben volt kimutatható genetikai változás hat év alatt. Leginkább (két mutáció) az envelop és az NS5 gének változtak, de a kisszámú genetikai változás miatt ez alapján nem állítható, hogy ezen génszakaszok változékonnyabbak. Összességében a a genom stabil, és nem látszik benne látványosan változékonny szakasz.

#### **4., Szubklinikai KEV encefalitisz pirókegérben.**

A KEV irodalmában elfogadott tény, hogy a vadon élő kistrágcshalófajok nem fogékonyak a KE vírus fertőzésre. Mivel a KEV fertőzés klinikai lefolyása emberben nagy eltéréseket mutat, és az immunválasz pontos lépései nem ismertek, fontosnak gondoltuk utána nézni A KEV fertőzés lefolyásának a rezisztensnek tartott kistrágcshalófajokban. A legnagyobb számban rendelkezésre álló faj (pirókegér, *Apodemus agrarius*) csoportjait izomba, illetve szájon át fertőztük különböző (0.1 pf.u-1000 p.f.u.) vírussal. A klinikai tüneteket naponta megfigyeltük, a csoportokból a 4. és 7. napokon 1-1 egyedet feláldoztunk, és hematoxilin-eozin, illetve monoklonális ellenanyag alapú immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk főbb parenchymás szerveiket és az agyat-gerincvelőt. Klinikai tüneteket nem figyeltük meg, és az állatok szövettanilag is negatívak voltak. Kivéve a szájon át 1000 p.f.u.-val fertőzött csoportot, ahol a középagyban, szaglólagymában elszórtan néhány tucat fertőzött sejtet találtunk. Ez azt jelzi, hogy a látszólag rezisztensnek tartott fajokban is kialakul szubklinikai, spontán gyógyuló encefalitisz. Valószínűleg a kialakulás oka a nagyszámú fertőző virion és a fertőzés helyének és a központi idegrendszernek (agynak) a közelsége. A fertőzés ugyan szájon át történt, de a száj- és orr- és garatüreg funkcionális egység, így a szájüregbe került vírusok a szaglóhamot, ornyálkahártyát is elérték, ahonnan 1-2 mm a szaglólagyma. Valószínűleg az érző, szagló idegvégződéseken keresztül el tudtak jutni az agyba, ahol az immunválasz kialakulásáig néhány tucat- száz sejtet meg tudtak fertőzni. A faj valóban képes leküzdeni a fertőzést, de az immunrendszernek valószínűleg mennyiségi korlátja van, egy adott szám feletti vírust nem tud semlegesíteni a periférián, és az agyon belül (szintén részleteiben nem ismert) immunválasz kialakulásának napjai alatt az encefalitisz kialakulhat. Azonban ez az encefalitisz nem végzetes, mint a házi egér (*Mus musculus*) esetében, az immunválasz eliminálni tudja az agyba került vírusokat, és elpusztítja a fertőzött sejteket. Hogy a háziegérben ez a folyamat miért nem zajlik le, nem bizonyított, egy Oas1b gén-beli mutációt tesznek ezért felelőssé. Eredményeink jelzik, hogy ember esetén is a fertőzés helye, módja, és a fertőző virionok száma oka lehet a fertőzés klinikai kimenetelében mutatkozó sokféleségnek.

E munkánk eredményeit az alábbi cikkben jelentettük meg:

**Egyed L.** Zöldi V. Szeredi L. 2016.

*Subclinical Tick-borne encephalitis virus encephalitis in experimentally infected Apodemus agrarius. Intervirology 58(6):369-372. IF: 1,822*

## **5., Kullancs élettani vizsgálatok:**

Közvetetten a témához tartozik a kullancsok viselkedése, gazdakereső aktivitása is, amely befolyásolhatja egy KEV gócban a fertőzött kullancsok számát, és így a potenciális emberi fenyegetettséget is. Azt vizsgáltuk, hogy a kullancsok mely kistrágszáló fajt választják, ha lehetőségük van e fajok közül választani, illetve, hogy egy természeti gócban mely testtájékon csoportosulnak leginkább a kullancsok?

**5.a.** Egy laboratóriumi kísérletben 50 x75 cm alapterületen hat rágcsálófaj (sárganyakú erdei egér, pirókegér, háziegér, güzüegér, mezei pocok, erdei pocok) 1-1 egyedét 24 órára összezártuk 500 *Ixodes ricinus* kullancs lárvával. Majd a rágcsálóegyedeket kivéve egyedi ketrecbe zártuk 3 napra, mely kis ketrecekből a kullancsok kieshettek egy, az alapon levő 2x2 mm lyukú fémhálón. A kiesett kullancsokat naponta megszámláltuk. Az eredmények szerint a háziegéren és pirókegéren szívott vért legsikeresebben a legtöbb kullancs (1,625 kullancs/egér, pirókegéren, 1,25). A két pocokfaj közepesen (1,125 és 0,8) volt fertőzve kullanccsal, míg a güzü és erdei egéren alig találtunk sikeresen szívott kullancsot (0,25 kullancs/gazda). A háziegér az emberi környezethez való alkalmazkodása során elveszthette a kullancstól való megszabaduláshoz szükséges magatartási mintázatokat. Eredményeink jelzik a háziegér kullancsok terjesztésében betöltött szerepét az emberi településeken és a pirókegér hasonló funkcióját a természeti gócbokban.

A munka eredményét az alábbi publikáció összegezi:

**Egyed L.** 2017. *Difference in susceptibility of small rodent host species to infestation by Ixodes ricinus larvae. Experimental and applied Acarology. 72(2):183-189. IF: 1,812.*

**5.b.** A másik, a természeti gócban zajló kísérlet során három éven (2015-17) át évi kétszeri, háromnapos kiszállás eredményeként július-augusztusban 54 pirókegeret, 211 sárganyakú erdeiegeret, és 8 erdei pockot fogtam, róluk 1517 kullancsot gyűjtöttem le, 95%-ban lárvákat. A kullancsokat a gazdáról legyűjtve feljegyeztem a testtájékot, ahol megtapadtak, illetve a legyűjtött kullancsok, és rágcsálók adatait (nem kor, faj stb.). Az adatok statisztikai feldolgozása jelenleg folyamatban van, azonban a gyűjtési számokból is látszik néhány előzetes tendencia. A pocokfajon sok nimfa halmozódik fel, a nyolc pocokban annyi nimfa

volt, mint a 265 egéregyeden. Főleg a hallójáratban, ami az egerekben nem volt érintett. Pirókegerekben viszont a toroktájékon halmozódtak fel kullancsok, csoportosan, ami a másik két fajon nem fordult elő. A fiatal, nem ivarérett egyedeken, szoptató, vemhes nőstényeken láthatóan kevesebb kullancs volt található mint az egyéb csoportokon. A 24 órán belül újra befogott egyedeken az újjak fokozottan voltak érintettek, jelezve a kullancsok gazdára jutásának útját. Pirókegéreken egyedenként 7,2, sárganyakú erdei egéren 4,55, pocokon 7,5 kullancs volt található átlagosan. Az eredmények statisztikai feldolgozása egy újonnan kidolgozott statisztikai elemzőmódszerrel éppen folyik az Állatorvos-tudományi egyetem matematikai tanszékén, e vizsgálatok még eddig nem látható, észrevehető összefüggéseket bizonyíthatnak be a kullancs-gazda parazitáció jelenségével kapcsolatban. E munkát azonban a jelen jelentés beküldési határidejéig nem tudjuk majd elkészíteni, de utólag is még ez évben az OTKA téma (103937) megjelölésével próbáljuk meg publikálni a „Ecosphere” folyóiratban (IF: 2,86 2015).

## **6., Vírusizolálási vizsgálatok:**

A pályázati program alapján vírusizolálási próbálkozások a pályázati évek során folyamatosan folytak. E típusú munka sikerét több tényező folyamatosan hátráltatta. Nehéz volt friss mintához jutni, a rágcsálók egy része (szakmailag érdekesebb része) védelem alatt áll, amelyeket csak természetes elhullás esetén lehet begyűjteni, illetve a szövettényezetekben általánosan (saját és kért, kapott sejteknél is) egyaránt elterjedt mikoplazma fertőzések miatt a szövettényezetek tartósan nem voltak fenntarthatóak. Az izolálási próbálkozások sárganyakú erdeieger, pirókeger, törpeeger, mezei és erdei pocok fajokra terjedtek ki, a parenchymás szerveket (lép, máj, vese, agy, tüdő szív) felhasználva. A 30-40 felhasznált állatból a fenti gátló hatások miatt összesen 3 vírust sikerült izolálni. Két izolátumot még nem sikerült azonosítani, sem ultracentrifugáláshoz elegendő mennyiségben letermelni. Ez a genom vizsgálat alapja. Az egyik törzs egy véletlenül kapott vörös rókából, a másik mezei pocokból származik. Azonosításuk folyamatban van. A harmadik izolátum törpeegerből (*Micromys minutus*) Paramyxovirusok pneumovirus genusába tartozik. Jelentőségét az adja, hogy eddig csak 2 eger pneumovirus ismert, mindkettő háziegerből. A kórházi gyermekhalálozások vezető oka világszerte a human RS (respiratory syncytial) vírus. Melyekkel való kísérletekre etikai okok miatt nincs lehetőség. Egy új egerpneumovirus mint potenciális állatmodell, igényt tarthat a szakmai közvélemény érdeklődésére, illetve a lehetőséget teremt a vírusgenusz filogenetikai kapcsolatainak tisztázására. teljes szekvenálás, után ezt az



eredményt 2018-ban tervezzük publikálni. Összességében elmondható, hogy a kistrágcsőfajok hordoznak ugyan, de az emberre, vagy háziállatunkra veszélyes kórokozót, könnyen izolálható formában, tömegesen nem ürítenek. Vírusokat izolálni belőlük kimondottan bonyolult, mely munkát a friss mintához jutás, valamint a laboratóriumi szövettenyésztő munka nehézségei gátolnak.

**A program során publikált összes közlemény:**

Zöldi V., Papp, T., Rigó, K., Farkas, J., **Egyed, L.** 2015.

A four-year-long study of an active natural tick-borne encephalitis focus in Hungary 2010-2013. *Ecohealth*, 2015(March)12(1):174-182. IF: 2,267

Zöldi, V., Papp, T., Reiczigel, J., **Egyed L.** 2015.

Bank voles and adult rodents show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary. *Infectious diseases*. Mar 2015, Vol. 47, No. 3: 178–181 (IF: 2014: 1,64)

**Egyed, L.**, Rónai, Zs., Dán, Á. 2018. Hungarian tick-borne encephalitis viruses isolated from a 0.5-hectare focus are closely related to Finnish strains. *Ticks and tick-borne diseases* (accepted 2018 feb 26.)

**Egyed L.** Zöldi V. Szeredi L. 2016.

Subclinical Tick-borne encephalitis virus encephalitis in experimentally infected *Apodemus agrarius*. *Intervirology* 58(6):369-372. IF: 1,822

**Egyed L.** 2017. Difference in susceptibility of small rodent host species to infestation by *Ixodes ricinus* larvae. *Experimental and applied Acarology*. 72(2):183-189. IF: 1,812.