

Zárójelentés a K 81258 számú, „Egy kullancs-encefalitisz góc három éves felmérő vizsgálata, kecskék és rágesálók szerepe a vírus terjesztésében” című pályázat során végzett munkáról 2010-2013.

Végzett munkánkat az elfogadott illetve elbírálás alatt álló publikációink sorrendjében mutatom be.

1. Kecske kísérlet.

A hazai járványtan adatok szerint a humán kullancsencefalitisz (KE) fertőzések egyre jelentősebb hányada alimentális úton, nyers tej fogyasztásával valósul meg. A tej forrása az esetek szinte 100%-ban a kecske. Kísérletünk annak kimutatására irányult, hogy a kecskék tünetmentesen vészelik át a fertőzést, meddig virámiásak, meddig ürítik a vírust a tejükkel és átadják-e a szoptatás során gidáiknak.

20 szoptató anyakecskét 4 csoportra osztottunk. Kontrol, vírussal fertőzött, immunizált, de nem fertőzött, immunizált és fertőzött csoportokra. A kecskéknél naponta tejmintát vettünk, klinikai tüneteket, testhőmérsékletet naponta feljegyeztük 60 napon át. Minden másnap vért vettünk. A vérsavóból ellenanyagokat (immunfluoreszcencia), a tejből fertőzőképes vírust kísérleti állatoltással vizsgáltuk. A kísérlet után 6 hónappal a szoptatott gidák vérmintájából ellenanyagot próbáltunk kimutatni.

Főbb megállapítások:

- A kecskék klinikai tünet és láz nélkül vészelnek át.
- Immunizálás 1/10-1/40 IF titereket indukál, ami megakadályozza a vírusürítést.
- Nem immunizált anyák 8-19 nap között ürítettek tejjel vírust, a tej minták 3-18 napig voltak RT-PCR pozitívak
- 65C pasztörözés nem, 100C hőkezelés inaktiválja a fertőzött tejet.
- - A 6 hónapos szoptatott gidák 20-25 %-a 1/10 ellenanyagszinttel bírt, azaz fertőződtek.

Munkánk eredményéről az alábbi közleményben számoltunk be:

*Balogh, Zs, **Egyed L.**, Ferenczi, E., Bán E., Szomor N. K., Takács M., Berencsi, Gy. 2012.*

Experimental infection of goats with tick-borne encephalitis virus and the possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk

Intervirology 55(3): 194-200. (IF: 2,337)

2. Járványtani adatelemzési munkák:

Az országos epidemiológiai központ adatainak elemzésével vizsgáltuk 1998 és 2008 közötti 703 magyarországi kullancsencefalitiszes eset tulajdonságait, eloszlását, kimutatandó a leginkább veszélyeztetett területeket, életkort nemet stb. Lyme borreliozis vonatkozásában ugyanezt a munkát elvégeztük. A KE esetek 0,46 és 0,84/100 ezer lakos szinten mozogtak, 1998-ban mutatkozott a legtöbb fertőzés. Legveszélyeztetettebb a 15-59 éves férfikorosztály, az ország nyugati és északi területein sikerült kockázati veszélyzónákat kimutatni.

*Viktor Zöldi, Attila Juhász, Csilla Nagy, Zoltán Papp, **László Egyed**, 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. doi:10.1089/IF: 2,277

Hasonló járványtani adatok vizsgálatával elemeztük 1953-2011 közötti 27 tej közvetítette magyarországi KE járvány adatait. 111 ember betegedett meg, járványesetenként 1-26 beteggel. Leginkább érintve a 10-14 éves fiúk, valamint a 30-39, 55-59 éves férfiak voltak. A megbetegedések enyhe férfi (55%) túlsúlyt mutattak. Az esetek 76%-a Nógrád, Heves és Zala megyék területén történt, 92%-ban kecske, 8%-ban tehéntejtől. Az alimentáris esetek aránya az összes igazolt KE esethez képest 1992-2007 között 2,5-4% volt, ami 2007-2011 között 13,7%-ra nőtt, jelezvén a tej növekvő szerepét a humán KE fertőzésekben.

*Zöldi Viktor, Ferenczy Emőke, **Egyed László**.*

Tej közvetítette kullancsencefalitisz járványok Magyarországon..

MAGY ÁLLATORVOSOK LAPJA 135: 48-56. 2013/1.

3., Kullancsok napi aktivitásának vizsgálata:

Mivel a kullancsok egyben vektorai és rezervoárjai is a vírusnak aktivitásuk viselkedésük ismerete fontos a vírus természeti góccokban való körforgásának megismerése szempontjából. Mivel a kullancsok napi ritmusáról aktivitásáról gyakorlatilag nincs adat az irodalomban, a nap 24 óráján keresztül 24 5x5 méteres szomszédos mintavételi területen áprilistól októberig havonta 1-1 vizsgálati napon minden órában kullancsokat gyűjtöttünk, és a négyzetekben rágcsálókát is csapdáztunk. Minden órában mintavételkor a hőmérsékletet, páratartalmat a talajszinten mértük. Az adott nap napkelte és napnyugta adatait is rögzítettük. Összesen 1063 kullancsot és 25 rágcsálót gyűjtöttünk. Megállapítható volt, hogy napnyugta utáni 3 órában a kullancsok kereső aktivitása növekedik. Illetve a napnyugta utáni 3 órában gyűjtött kullancsok aránya a napnyugta előtti és utáni 3-3 órában gyűjtöttekhez képest korrelált a területen mutatózó rágcsáló aktivitással. E szerint a kullancsok érzékelik a napnyugta után mozgó rágcsálókat és aktívan keresik őket. A kullancsok Júliusig aktívabbak voltak a nappali órákban, ez augusztus-szeptemberben éjszakai aktivitásra változott valószínűleg a megnövekedett rágcsáló populáció éjjeli aktivitása miatt. eredményeink jelzik a fény, és a rágcsálók jelentének pozitív hatását a kullancsok kereső aktivitására.

Viktor Zöldi, Jenő Reiczigel, László Egved. 2013.

Monitoring the diel activity of Ixodes ricinus ticks in Hungary.

Experimental and Applied Acarology. 61(4):509-517. IF: 1,847

4., Kullancsok baktérium hordozásának vizsgálata.

Mivel a kullancsok által hordozott és vérszíváskor a gazdának átadott baktériumokról nem rendelkezünk pontosabb információkkal, 6 mintavételi helyen 3 kullancsfaj 8 fejlődési alakját gyűjtöttük be, majd a felszíni baktérium flórát formalinnal inaktíválva, feltárva a kullancsok belső szöveteit baktériumokat izoláltunk, és faji szinten meghatároztuk őket PCR-szekvenálási technikával. 126 begyűjtött kullancsból 116 baktérium törzset izoláltunk, amelyek 21 genusba tartoztak. A törzsek 89% Gram pozitív volt, 21%ban bőr, 4,5% nyálkahártya, a többi környezeti (talaj, víz, növényzet) eredetű. Egyes fajok (Mycobacterium, Bacillus) replikálódni is képesek a kullancsban, ahogy nagyszámú izolált telepük jelzi. 14 olyan baktériumot találtunk, amelyet irodalmi adatok szerint már okozott bakteriémiát, halálesetet emberben, Először sikerült 10 anaerob baktériumot is kimutatni kullancsból. Látható volt, hogy az egyes fejlődési fokozatok egyre több baktériumot hordoznak, azaz a

kullancsok minél több időt töltenek a természetben, annál több baktériumot vesznek fel a környezetből. Az *Ixodes ricinus* faj baktériumokkal sokkal fertőzöttebb volt, mint a *Haemaphysalis concinna* faj egyedei. Munkánk először bizonyította, hogy a kullancsok a környezetből és vérszívás során felvesznek baktériumokat, azokat a gazdába juttathatják, bakteriémiát okozva. Bennük a baktériumok szaporodni is tudnak, és anaerob fajok is előfordulnak.

Beadva 3013. június 16.

László Egyed, László Makrai. *Cultivable internal bacterial flora of ticks.*

Experimental and applied acarology 2013 IF: 1,847

2013 október 1-én minor revision minősítést kaptunk jelenleg a szerkesztő elfogadási döntésére várunk.

5., Egy természeti kullancsencefalitisz góc vizsgálata terepen 2010-2013.

Munkánk fő területe egy természetes kullancsencefalitisz góc vizsgálata volt parazitológiai, zoológiai, virológiai eszközökkel. E munkánk a vírus irodalmában előzmények nélküli, mivel e természetes gócokat nem szokták pontosan megtalálni, helyüket bizonyítani. 2007-ben egy kecsketej-közvetítette járvány tört ki Zala megyében 25 kórházi esetszámmal. Ezzel lehetővé vált, hogy a kecskék legelőjén előzetes rágcsáló csapdázásokkal és szerológiai vizsgálatokkal bizonyítsuk a vírus jelenlétét, és pontosan helyhez kössük előfordulását. E gócot 2010-13 között áprilistól-októberig havonta látogattunk 3 napra. A pozitív egerek területén 7x7 mintavételi négyzetet (10x10 méter) vettünk fel, a négyzetek közepén rágcsálócsapdákat helyeztünk el, amelyeket 2 nappal-2 éjszakán kinthagytunk, a csapdázott állatok adatait felvéve vért vettünk, majd a befogás helyén elengedtük őket. E 10x10 méteres négyzetek mindegyikében 10 nm²-ről kullancsokat gyűjtöttünk, fajukat fejlődési fokozatukat meghatároztuk, majd belőlük a vírust kísérletei állatoltással mutattuk ki. A környezet hőmérsékletét és páratartalmát a talajszinten egész évben negyedóránként mértük. 177 méterre egy hasonló mintavételi rendszert vettünk fel (ahol előzetesen nem bizonyítottuk a vírus jelenlétét), kontroll területként.

Munkánk annyi adatot eredményezett, hogy egy sokoldalas cikkben is nehéz volt összefoglalni.

Összesen a munkaterületünkön 7247 kullancsot fogtunk (3 faj) ezekből 3 vírustörzset izoláltunk (0,404 ezrelék), a kontrollterületen 4322 kullancs vírusizolálás nélkül. 571 rágcsáló

egyedet azonosítottunk a munkaterületen, 539 vérsavómintát vizsgáltunk meg, 5,57% bizonyult KE pozitívnak. Kontroll területen 376 volt az azonosított rágcsáló egyed, 4,26% pozitívítással.

Főbb eredmények:

- Először sikerült vírust kimutatnunk a természetben *Haemaphysalis concinna* kullancsból.
- Először sikerült egy természetes petecsomóból kikelő (*Ixodes ricinus*) lárvák közül a vírust kimutatni (151 lárva 1 törzs, ami statisztikailag max 9%-os fertőzöttséget jelez, azaz transzovariálisan ilyen hatásfokkal megy át a vírus a petékbe).
- A fertőzött kullancsok és rágcsálók helye nem esett egybe, ez valószínűleg a rágcsálók véletlenszerű mozgásával, és a vért szívott kullancsok véletlenszerű leesésével magyarázható.
- A kullancsok és rágcsálók szezonálisága, egyedszáma a fajok összetétele, aránya rendszeresen változik. Láthatóan ez egy dinamikus összetett rendszer, de hogy mi miatt változó a kullancs és rágcsáló populáció, azt továbbra sem tudjuk, a meteorológiai adatok, ragadozók, rendelkezésre álló táplálék nem ok.
- Vírus perzisztencia. A vírus túléléséhez egyszerre magas egyedszámú rágcsáló és kullancs populáció szükséges, tartósan egy helyen. A vírus rossz hatásfokkal tudja a ciklusát végigfutni, ehhez sok kullancs, és rágcsáló szükséges. (0,4 ezrelékes víruspozitivitás kullancsban, 4-5% rágcsálókban)
- Góc. A fertőzött terület egy adott pillanatban mindig egy kicsi, néhány nm^2 -es terület, ahol néhány lárva vagy 1-2 nimfa épp gazdát keres. Ezek a "forró pontok" előre nem láthatóan, tervezhetően, megszűnnek illetve néhány méterre vagy kilométerre újjá alakulnak, ahogy a fertőzött kullancsok gazda hiányában elpusztulnak, vagy gazdájukról véletlenszerűen valahol leesnek. Így egy nagyobb terület, (erdő) endémiásnak tekinthető, de bennük csak több, kicsi, néhány nm^2 -es terület az igazán fertőző. És ezek a kis területek a kullancsok sikeres vérszívása függvényében állandóan átalakulnak.
- Védekezés. E területeket csak a vegetáció teljes kiirtásával és elhordásával lehet mentesíteni. A vegetáció hiánya annyira lecsökkenti a kullancs- és rágcsálópopulációt, hogy a vírus rossz fertőzési hatásfokával nem tudja fenntartani a ciklusát. Egy adott területen a tartós növényzetirtás, és ezen állapot tartós fenttartása nem gyakorlatias. A

védekezés egyetlen lehetősége a természetes göcök hatékony felderítése, oda lehetőleg emberek ne járjanak, vagy ha mégis szükséges, oltassák be magukat.

Egy sajnálatos baleset, 200 ezer ft-os autos karosszériakár miatt intézetünk vezetése eltiltott a vállalati autó használatától ezzel ellehetetlenítették további kiszállásainkat. 2013 év második felének kiszállásait lehetetlen módon vonaton tettük meg, de ez így nem folytatható, 7 évre tervezett terepi munkánkat abba kell hagyni. Az első 3 majd a további 4 év munkájából terveztünk két cikket írni, így egy cikk született az első 4 év adataiból. Ehhez meg kellett várnunk ez év (2013) utolsó októberi kiszállását, a gyűjtött vérsavókat, kullancsokat meg kellett vizsgálni, így csak novemberben lett kész az e munkából írt cikk. Jelen pillanatban a Journal of General Virology-ban van elbírálás alatt.

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

A four-year-long study of an active natural tick-borne encephalitis virus focus in Hungary, 2010-2013.

JGV 2013 Nov.

6. Immunhisztokémiai vizsgálatok, az vírus intraneuronális terjedése.

A vírus fertőzött szervezetben való terjedése, a központi idegrendszer fejlődése az elmúlt évtizedekben vizsgálatlan területe a KEV kutatásnak. Különböző időpontokban laboratóriumi egereket per os és intramuskulárisan (m. semimembranosus) fertőzve az állatokat naponta vizsgáltuk hagyományos (hematoxin-eosin) és immunhisztokémiai (IHC) módszerekkel, valamint kísérleti állatoltással. A központi idegrendszer 8 régióját elkülönülten, valamint a nagyobb viscerális szerveket vizsgáltuk. Egyértelműen megállapítható volt, hogy a vírus eltérő időpontokban jut be a központi idegrendszerbe (per os 2 nap, im, 5 nap), és eltérő agyi területeken át (per os bulbus olfactoricus-cerebrum, im- hypothalamus). A viscerális szervekben IHC-vel csak a per os fertőzött állatokban, és csak az emésztőrendszer (garat, nyálmirigy, gyomor, vékonybél), autonóm helyi ganglionjainak idegsejtjeiben volt kimutatható. Mindez azt jelzi, hogy a vírus nem a virémia során, az arteriolák endotelsejtjein át közvetlenül, sem immunsejtek segítségével, hanem más flavivírusokhoz és a veszettség vírusához is hasonlóan a perifériás érző-mozgató idegvégződéseket jut be az idegrendszerbe majd a neuronokon át az agyba. Ez minden valószínűséggel az ember esetén is így van.

E munkánkról írt cikket frissen adtuk be, jelenleg elbírálás alatt van:

L. Egyed, V. Zöldi, and L. Szeredi

Studies of the intraneuronal spread of tick-borne encephalitis virus infection in laboratory mice.

Archives of virology 2013 Nov.