

## OTKA K67900

„Vadon élő madarak egyes vírusfertőzéseinek vizsgálata” projekt 2007 – 2011

### Szakmai zárójelentés

A vadon élő madarakban előforduló vírusok jelentősége nem csupán abban rejlik, hogy egyes fajok egyedeit megbetegítve vagy elpusztítva befolyásolják a madárfauna összetételét és mennyiségét egyes földrajzi területeken. A vadmadarak olykor olyan vírusok gazdái is lehetnek, amelyek rajtuk kívül gazdasági haszonállatokat vagy embereket is megbetegíthetnek. Ezért a bennük előforduló vírusok vizsgálatának állat- és közegészségügyi jelentősége van. A pályázat írásakor (2006-ban) korábbi kutatásaink eredményei alapján tudtuk azt, hogy legalább két flavivírus faj (a nyugat-nílusi vírus és az Usutu vírus) előfordul hazai vadmadarakban. Ebben az évben jutott el a madárinfluenza H5N1 szerotípusának magas pathogenitású, távol-keleti eredetű törzse Magyarországra, ami ráirányította a közvélemény figyelmét is a vadmadarak vírusfertőzést közvetítő szerepére. A pályázat támogatásával folytatott kutatómunka célja a vadmadarakban előforduló, köz- és állategészségügyi jelentőségű vírusok kimutatása, gyakoriságuk és elterjedtségük felmérése, a járványtani folyamatok nyomon követése, valamint a vírustörzsek genetikai jellemzése volt. A projekt időtartama alatt a vizsgált vírusok előfordulásában gyökeres változásokat tapasztaltunk, amely számos vonatkozásban a kutatások kiszélesítését, újabb szempontok figyelembe vételét tette szükségessé. A projekt keretében végzett kutatómunka eredményei véleményünk szerint hozzájárultak ahhoz, hogy tisztában legyünk a vizsgált vírusok vonatkozásában a hazai és európai járványtani helyzettel, valamint hogy pontosabban meg tudjuk ítélni a vadmadarak járványtani jelentőségét a vírusok terjesztésében.

#### 1. A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálatok:

A nyugat-nílusi vírus (West Nile virus, WNV) a *Flaviviridae* család, *Flavivirus* nemzetség, Japán encephalitis vírus szerokomplex tagja. A vírus természetes gazdái vadmadarak, vektorai főként a *Culex* nemzetséghez tartozó szúnyogfajok. A vírus iránt számos gerinces állatfaj fogékony. Bár gyakoriak a tünetmentes fertőzések, a vírus számos gazdafajban lázas általános tünetekkel járó megbetegedést, valamint bőrkiütéseket okoz. Az igazi veszélyt az jelenti, hogy bizonyos esetekben a vírus eljut a központi idegrendszerbe és annak nem ritkán halásos kimenetelű, gyulladással elváltozásait okozza (neuroinvasivitás). Agyhártya-, agy- és gerincvelő-gyulladást leggyakrabban egyes madárfajokban, lovakban és embereknél okoz a WNV.

A vírus világszerte elterjedt, a törzsek két fő és további, legalább öt kisebb genetikai vonalhoz (lineage) soroltak. Az 1. genetikai vonal (lineage 1.) képviselőit az Antarktisz kivételével minden földrésről kimutatták már. A 2. genetikai vonalhoz (lineage 2.) tartozó vírusok korábban csak Afrikának a Szaharától délre eső területein és Madagaszkáron fordultak elő. 2004-ben egy lineage 2. csoportba tartozó WNV törzs bukkant fel a Körös-Maros Nemzeti Park területén és okozott elhullásokat héjájában (*Accipiter gentilis*). Ugyanez a vírustörzs okozott megbetegedéseket 2005-ben héjájában, karvalyban (*Accipiter nisus*), valamint juhban. A megbetegedések ebben az évben az előző évvel megegyező helyen (vadmadarak), illetve annak kb. 30 km-es közelében (juh) fordultak elő. 2006-ban nem diagnosztizáltunk WNV fertőzéseket magyarországi vadmadarakban.

### 1.1. WNV kimutatása vadmadarak elhullott egyedeiből

Kutatásaink középpontjában a vadmadarak WNV-re irányuló passzív surveillance felmérései álltak, amelyet elhullott madarak vizsgálatára alapoztunk. Az Ócsai Madárvárta, a Természetvédelmi Hatóság és a nemzeti parkok munkatársai, a Magyar Madártani Egyesület munkatársai, valamint solymászok közreműködésével vadmadarak elhullott egyedeit gyűjtöttük, fajukat meghatároztuk és morfológiai paramétereiket dokumentáltuk, amelyből adatbázist készítettünk. (A teljes adatbázis bemutatására terjedelmi okok miatt nincs mód, ezért a továbbiakban csak a pozitív esetek ismertetésére szorítkozunk.) A madárhullákat kórbonctani és kórszövettani módszerekkel feldolgoztuk, az elhullás okát megállapítottuk, és a feltételezhetően vírusfertőzésben elpusztult madarak mintáit virológiai vizsgálatokra bocsátottuk. A madarak agyvelő mintáiból vírus RNS-t vontunk ki, amelyet polimeráz láncreakcióra alapozott nukleinsav kimutató módszerrel vizsgáltunk a nyugat-nílusi vírus genetikai anyagának detektálására. A módszer a WNV összes ismert genetikai vonalához tartozó törzs, valamint rokon flavivírusok kimutatására egyaránt alkalmas. Emellett az agyvelőből és egyéb szervekből készített kórszövettani metszeteken immunhisztokémiai vizsgálattal mutattuk ki a vírusantigén jelenlétét specifikus ellenanyagok segítségével. A pozitív mintákból szopósegerek intracerebrális oltásával és Vero sejtenyészetek fertőzésével kíséreltük meg a vírusok izolálását.

2007-ben három, a Körös-Maros Nemzeti Park és a Hortobágyi Nemzeti Park területéről származó héja és három kék vércse (*Falco vespertinus*) mintáiból mutattuk ki a nyugat-nílusi vírus jelenlétét. A korábbi évekhez viszonyítva a vírus mérsékelt földrajzi terjedését figyeltük meg (kb. 80 km a 2004.-2005. évi esetekhez képest).

A 2008. évben a vírustörzs váratlan és jelentős földrajzi terjedését tapasztaltuk. Ebben az évben a megvizsgáltak közül 25 madár bizonyult nyugat-nílusi vírusra pozitívnak. Legnagyobb számban héjákban (n=17) mutattuk ki a vírus jelenlétét, de emellett három északi sólyom (*Falco rusticolus*), két Harris ölyv (*Parabuteo unicinctus*), egy kék vércse, egy szalakóta (*Coracias garrulus*) és egy gyöngybagoly (*Tyto alba*) mintáit találtuk pozitívnak. A vírust több mintából sikeresen izoláltuk. A vírustörzs ebben az évben már az ország középső és nyugati területein is előfordult, valamint felbukkant Ausztria keleti részén is (hat héja, egy saskeselyű [*Gypaetus barbatus*] és egy kea [*Nestor notabilis*] eset), ami a 2007. évi elterjedtséghez képest több mint 300 km-es távolságot jelent.

Folytattuk a vírus előfordulására irányuló vizsgálatokat 2009.-ben is. Ebben az évben 16 vadmadár-mintából mutattuk ki a WNV jelenlétét. Héják (n=5) mellett egy karvalyból, egy vándorsólyomból (*Falco peregrinus*), egy nagy fakopáncsból (*Dendrocopos major*), egy hollóból (*Corvus corax*), egy erdei fülesbagolyból (*Asio otus*), egy házi verébből (*Passer domesticus*), két vörösbegyből (*Erithacus rubecula*), egy nádi tücsökmadárból (*Locustella luscinioides*), egy házi rozsdafarkúból (*Phoenicurus ochruros*) és egy foltos nádiposzátaból (*Acrocephalus schoenobaenus*) mutattuk ki a vírust. Ez volt az első év, amikor hazai énekesmadár-fajok is fertőzöttek bizonyultak. Mivel a vírus 2008-ban gyakorlatilag az ország egész területén elterjedt, 2009-ben már nem volt lehetőség további terjedést megfigyelni a határokon belül. Legnagyobb számban ebben az évben is az ország középső részén találtunk eseteket, bár ezt a mintagyűjtési helyek eloszlása is befolyásolhatta. A vírus ebben az évben is okozott elhullásokat Ausztria keleti részén vadmadarakban (hat héja, egy kea és egy hóbagoly [*Nyctea scandiaca*] eset).

2010-ben az előző két évhez viszonyítva kisebb intenzitású WNV aktivitást tapasztaltunk hazai vadmadarakban. Egy héja, egy szajkó (*Garrulus glandarius*) és egy hóbagoly mintából tudtuk kimutatni a vírus nukleinsavát. Ezeket a madarakat Közép-Magyarországon gyűjtöttük. Emellett Ausztriában egy héja és egy kea mintáiból került kimutatásra a vírus. Az alacsonyabb esetszám háttérben az időjárási viszonyok vektorokra kifejtett hatása mellett nagy szerepet játszhatott a fogékony populációkban a korábbi években kialakuló átvészeléses immunitás, illetve a fiókákba jutó maternális immunitás is.

A mintagyűjtés és feldolgozás a 2011. évben is folyamatban van. Halmozott esetszámot vagy járványszerű megjelenést a korábbi években a nyár közepétől az első fagyok beköszöntéig; döntően az augusztus - szeptemberi időszakban szoktunk tapasztalni. Ez a WNV járványok jellemzője, ami a vektor-fajok fertőzött egyedeinek nyár végi felszaporodásával magyarázható. Az első pozitív eset – egy héja – 2011-ben is megállapításra került már.

## 1.2. WNV kimutatása egyéb fajokból

A WNV emlősök közül leggyakrabban lovakat és embereket betegít meg. Az első, hazai, WNV okozta ló agyvelőgyulladásos esetet 2007 szeptemberében diagnosztizáltuk. A 2008-as járvány során 12 ló agyvelőgyulladásos eset háttérben bizonyítottuk a WNV jelenlétét. 2009-ben további 5, 2010-ben pedig 3 WNV okozta agyvelőgyulladásos esetet diagnosztizáltunk lovakban. Emberekben 2007-ben 4 nyugat-nílusi lázas eset került diagnosztizálásra hazánkban. A 2008-as járvány során nem csak madarakban és lovakban, de emberekben is halmozott esetszámot tapasztaltunk (19 eset). A következő évben az emberi esetszám is alacsonyabb volt (7 eset), majd 2010-ben ismét emelkedést tapasztaltunk (19 eset).

A vírus szúnyog vektorainak azonosítása és bennük a vírus elterjedtségének felmérése céljából szúnyogmintákat gyűjtöttünk, azonosítottuk a fajokat és valós idejű polimeráz láncreakciós próbával vizsgáltuk a szúnyog-pool-okban a WNV RNS előfordulását (25-50 szúnyog poolonként). A 2008-ben Kardoskúton gyűjtött 25 *Culex pipiens* pool-ok közül 2 bizonyult pozitívnak. A mintagyűjtéseket 2009-ben és 2010-ben is folytattuk, bár alacsony intenzitással, mivel a gyűjtés, határozás és PCR-es vizsgálat költségei nagy számú szúnyogmintán nagyon megerhelték volna a projekt költségvetését.

## 1.3. Szerológiai vizsgálatok a WNV elleni ellenanyagok kimutatására.

A pályázat írásakor a WNV szerodiagnosztikája különböző állatfajokból gyűjtött savóminták esetében nehézségekbe ütközött. A rutin szerológiai próbákhoz (pl. ELISA, immunoperoxidáz, immunofluoreszcens vizsgálatok) fajspecifikus szekunder ellenanyagokra van szükség. Ezeket a próbákat főként emberi savóminták vizsgálatára fejlesztették ki és validálták; a fajspecifikus ellenanyagok lecserélése befolyásolhatja a próbák megbízhatóságát és esetenként nem is lehetséges (pl. ritka vadmadár-fajoknál). Azok a hagyományos szerológiai próbák, ahol a gazdafaj nem számít (pl. vírusneutralizációs próba, haemagglutináció-gátlási próba) sajnos a WNV esetében BSL3 körülményeket igényel, ami az állatorvosi alkalmazást jelentősen korlátozza. A projekt futamideje alatt kezdték el hazánkban forgalmazni az ID-Vet cég (Montpellier, Franciaország) kompetitív WNV ELISA kitjét, amely a gazdafajtól függetlenül képes meghatározni a WNV elleni ellenanyagok jelenlétét a savómintákban. Vizsgálataink során vérmintákat gyűjtöttünk vadmadarokból. A mintagyűjtés egyrészt énekesmadarak gyűrűzőtáborban befogott egyediből származott. Ilyenkor a gyűjthető vér egyedi mennyiségét jelentősen befolyásolta a madarak testmérete. További mintákat gyűjtöttünk házi galambokból (*Columba livia domestica*), amelyeknek a vírus járványtanában különös jelentőséget tulajdonítunk. Emellett ragadozó madarak,

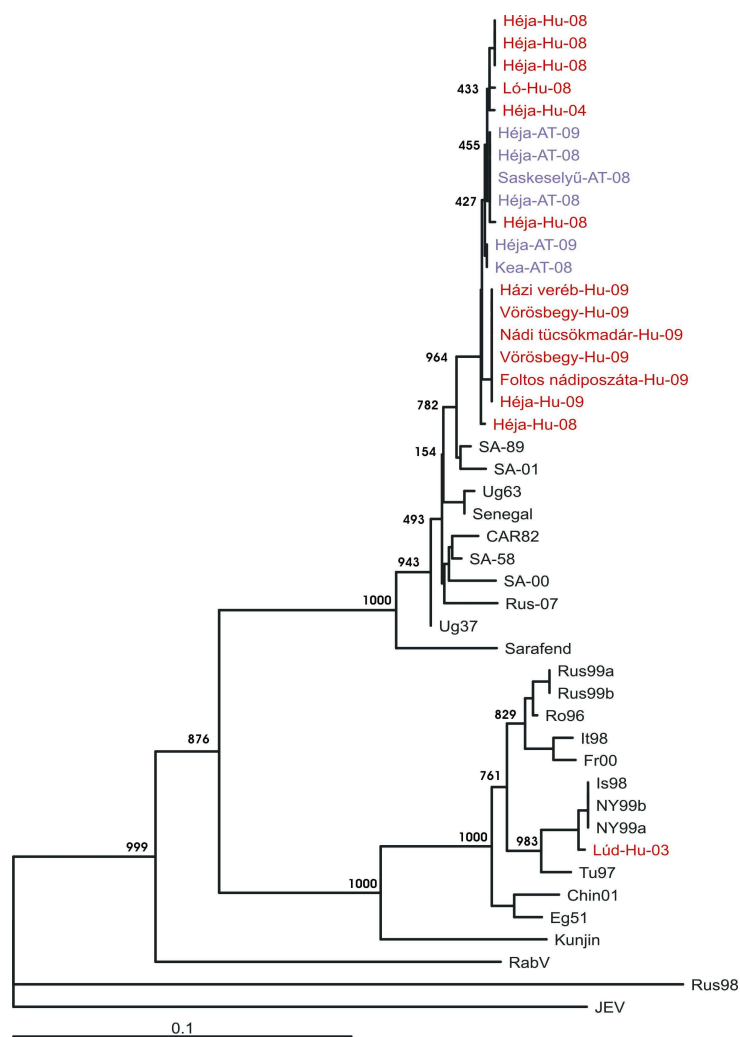
valamint fehér gólyák (*Ciconia ciconia*) és tűzokok (*Otis tarda*) savómintáit vizsgáltuk. Összességében 241 madársavót vizsgáltunk a kompetitív ELISA módszer segítségével, amelyek közül pozitívnak bizonyult 2007-ben egy barna rétihéja (*Circus aeruginosus*), egy karvaly, illetve egy fehér gólya savóminta; 2008-ban két fehér gólya; 2009-ban két héja, egy barna kánya (*Milvus migrans*), négy házi galamb, valamint tíz tűzok savómintája; 2010-ben három házi galamb, 2011-ben pedig 35 kék vércse és három tűzok savómintája.

A kompetitív ELISA specifikusságát ló, kecske és emberi savóminták vizsgálatával ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy a teszt nem képes különbséget tenni a WNV és a kullancsencephalitis vírus (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) ellen termelt ellenanyagok között. Ezért az ELISA alapú szerológiai vizsgálat csupán a savóminták szűrésére alkalmas, a pozitív mintákat specifikusabb szerológiai módszerrel, leginkább plak-redukciós vírusneutralizációs próbával (plaque-reduction neutralisation test, PRNT) szükséges vizsgálni a WNV és rokon flavivírusok (pl. Usutu vírus, TBEV) ellen termelt ellenanyagok elkülönítése és a vizsgálati eredmény validálása céljából. Ezeket a vizsgálatokat csak azokon a mintákon tudtuk elvégezni, ahol rendelkezésre állt elegendő mennyiségű savó a PRNT vizsgálatához. Vadmadarak esetében a PRNT megerősítette a pozitív eredményeket.

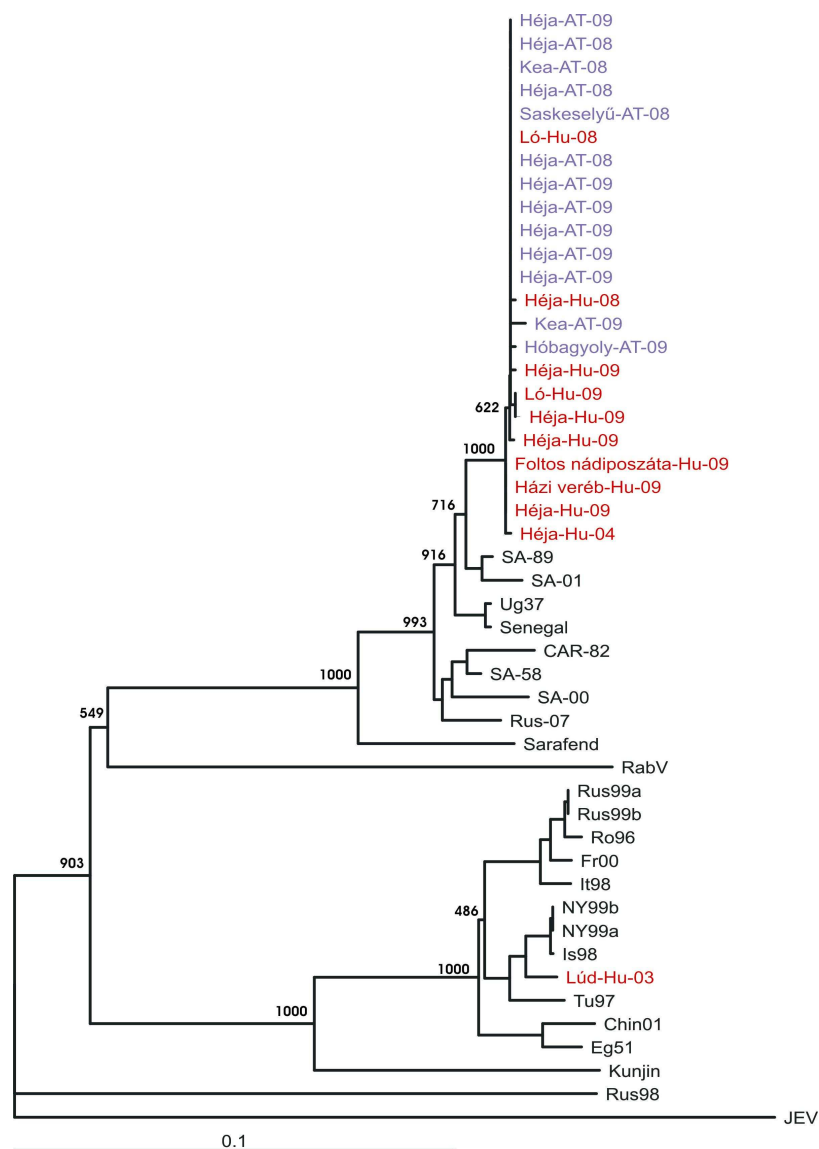
#### 1.4. WNV törzsek genetikai elemzése

Meghatároztuk egyes, a 2008-as és 2009-es magyarországi és ausztriai esetekből származó WNV törzsek részleges nukleotid szekvenciáit és filogenetikai vizsgálatoknak vetettük alá őket. Az NS5 nem strukturális fehérje (RNS-dependens RNS polimeráz) gén és a 3' nem kódoló régió 675 nukleotid hosszúságú szakaszán 11 magyarországi és 6 ausztriai vadmadárból származó mintát hasonlítottunk össze egy magyarországi lóból származó vírustörzsszel, a 2004-ben felbukkant héja-törzsszel, a 2003-ban felbukkant lúd-törzsszel, valamint a WNV különböző genetikai vonalaihoz tartozó, a génbanki adatbázisokban fellelhető szekvenciákkal. A törzsfa-rekonstrukciós vizsgálatok eredményét az 1. ábra mutatja. A 2008-2009-ben, Magyarországon és Ausztriában kimutatott WNV törzsek a 2004-ben felbukkant, lineage 2 genetikai vonalhoz tartozó törzsszel képeznek jól elkülönülő csoportot. Ez a csoport további ágakra oszlik, ahol az azonos évben, ugyanabból az országból kimutatott vírusok közös ágakon vannak, ám vannak kivételek is, valamint a kis genetikai távolságok miatt a bootstrap statisztikai analízis nem támogatja ezeknek a csoportoknak az elkülönítését (70% alatti bootstrap-értékek). A magyarországi és ausztriai törzsek ugyanakkor jól elkülönülnek az afrikai lineage 2 vonalhoz tartozó törzsektől.

Az E burokfehérje gén részleges szekvenciáinak összehasonlítására 7 hazai vadmadár, 13 ausztriai vadmadár, és két hazai ló mintáiból származó WNV szekvenciákat hasonlítottunk össze a 2004-ben és 2003-ban Magyarországon felbukkant WNV törzsekkel, valamint reprezentatív génbanki szekvenciákkal. Összesen 48 szekvencia összehasonlítására került sor 867 nukleotid hosszúságú szakaszon (2. ábra). A törzsfa szerkezete hasonlít az NS5-3'UTR régió vizsgálata során felállított törzsfáéhoz. A 2008-2009-ben Magyarországon és Ausztriában kimutatott vírustörzsek a 2004-es hazai törzssel állnak egyértelműen a legközelebbi genetikai rokonságban. A törzsfa ezen ágán belül további elkülönüléseket nem lehet megfigyelni. A hazai törzsek egyértelműen elkülönülnek mind az afrikai, lineage 2 vírustörzsektől, mind pedig a WNV többi genetikai vonalaihoz tartozó törzsektől.



1. ábra: Az NS5-3'UTR régió részleges nukleotid szekvenciáinak Neighbor-Joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfa. A vizsgálataink során meghatározott szekvenciákat gazdafaj - ország kód (Hu: Magyarország, AT: Ausztria) - kimutatás éve (08: 2008, 09: 2009) kódokkal jelöltük. A magyarországi törzseket piros színnel, az ausztriai törzseket kék színnel emeltük ki. A génbanki szekvenciák kódjainak feloldását a függelék 2. táblázata tartalmazza. Az elágazódásoknál olvasható számok a bootstrap analízis értékeit mutatják (1000 ismétlés, csak a nagyobb elágazódásoknál kiírva). Az ábra bal alsó sarkában a lépték a genetikai távolságot mutatja.



2. ábra: Az E fehérje régió részleges nukleotid szekvenciáinak Neighbor-Joining algoritmussal végzett filogenetikai analízise alapján készített törzsfá. A vizsgálataink során meghatározott szekvenciákat gazdafaj - ország kód (Hu: Magyarország, AT: Ausztria) - kimutatás éve (08: 2008, 09: 2009) kódokkal jelöltük. A magyarországi törzseket piros színnel, az ausztriai törzseket kék színnel emeltük ki. A génbanki szekvenciák kódjainak feloldását a függelék 2. táblázata tartalmazza. Az elágazódásoknál olvasható számok a bootstrap analízis értékeit mutatják (1000 ismétlés, csak a nagyobb elágazódásoknál kiírva). Az ábra bal alsó sarkában a lépték a genetikai távolságot mutatja.

A filogenetikai vizsgálatok eredményei alátámasztják, hogy a 2004-ben Kelet-Magyarországon felbukkant vírustörzs vált endémiássá és terjedt el 2008-ban az ország nyugati részén és Ausztria keleti területén; nem ismételt behurcolás eredménye a 2008-as járvány.

2010-ben Görögország észak-keleti területén 191 bejelentett agyvelőgyulladásos esettel és 35 halálos áldozattal járó WNV járványt tapasztaltak. Nemzetközi együttműködés keretében hozzájutottunk a területen gyűjtött szúnyog mintákhoz, amelyek PCR vizsgálattal WNV

pozitívnak bizonyultak. Meghatároztuk a vírus teljes genom szekvenciáját, ami alapján megállapítottuk, hogy az a legközelebbi rokonságot a 2004-ben Magyarországon felbukkant vírushoz mutatja. Ez arra utal, hogy 2010-re a vírus a Balkán-félszigeten dél felé terjedve eljutott Görögországba. Legújabb, Szerbiában gyűjtött szúnyogokból kimutatott WNV-re irányuló vizsgálataink is megerősítik ezt a hipotézist. Ezzel szemben bukaresti humán esetekből kimutatott, szintén lineage 2 csoportba tartozó WNV törzsek nem a magyarországi, hanem a 2007-ben Oroszországban, Volgográd környékén felbukkant vírushoz hasonlítanak leginkább.

A WNV egyes törzsei eltérő gyakorisággal okoznak központi idegrendszeri megbetegedéseket. Korábban számos kutató azon a véleményen volt, hogy a lineage 1 genetikai vonal vírusai között vannak neuroinvaszívok, míg a lineage 2 csoportba tartozó vírusok nem bírnak ilyen képességgel. Saját kutatásaink eredményei mellett dél-afrikai vizsgálatok is bizonyították, hogy a neuroinvaszivitás nem függ a genetikai vonalhoz tartozástól. A neuroinvaszivitás hátterében álló genetikai markerek tisztázására újabb vizsgálatokba kezdtünk. A teljes genom szekvenciák összehasonlításával azonosítottunk potenciális neuroinvaszivitás-markereket, amelyek közül egyesek (pl. az NS3 régióban található H<sub>249</sub>P szubsztitúció) lineage 1 WNV törzsek vizsgálata során a virulenciával összefüggő markernek bizonyultak. További kutatásaink a hazai lineage 2 törzs teljes genom szekvenciáját kifejező, fertőző klón összeállítására és azon indukált mutagenézissel a feltételezett virulencia markerek változásainak fenotípusos hatásaira irányulnak.

A nyugat-nílusi vírussal kapcsolatos vizsgálatainkról számos hazai és nemzetközi fórumon számoltunk be. A 2008-as és 2009-es járványokat ismertető, a projekt szempontjából legfontosabb cikk kéziratát 2010-ben benyújtottuk az Emerging Infectious Diseases szakfolyóirathoz, ahonnan azért utasították el, mert a hazai humán esetekből csak szerológiai alapon tudtuk bizonyítani a WNV fertőzést, így a kézirat egyik lektora nem látta bizonyítottnak az összefüggést az állati és az emberi esetek között. 2010 őszén egy hazai beteg agyvelőgyulladásos tünetekkel elhunyt. A beteg agyvelő-mintájából PCR módszerrel sikerült kimutatni a WNV nukleinsavát. A nukleinsav-szekvencia vizsgálatok igazolták, hogy a vírus megegyezik a hazai madarakból és lovakból kimutatottával. Ennek az információnak a birtokában a kézirat átdolgozott változatát benyújtottuk a Journal of Infectious Diseases szakfolyóirathoz, ahol most a szerkesztőbizottság döntésére várunk. Ezért a projekt elbírálásakor kérjük, hogy a következő 2 évben a kutatásokkal kapcsolatban megjelenő további publikációkat is vegyék figyelembe.



## 2. Az Usutu vírussal kapcsolatos vizsgálatok

Az Usutu vírus (USUV) a WNV-el közeli rokon, szúnyogok által terjesztett flavivírus. Európai elsőként Ausztriában figyelték meg a felbukkanását, ahol jelentős elhullásokat okozott vadmadarakban, különösen feketerigókban (*Turdus merula*). Kutatócsoportunk nemzetközi együttműködésben szerteágazó vizsgálatokat végzett a vírus genetikai, szerológiai és járványtani tulajdonságainak jellemzésére. A kórokozó Magyarországon is felbukkant 2005-ben. A projekt keretében végzett kutatások során az USUV által okozott agyvelőgyulladásztizáltunk 2007-ben kettő, 2008-ban pedig egy, Budapesten talált, elhullott feketerigóban. Nem találtunk USUV pozitív eseteket 2009-ben, 2010-ben viszont egy újabb elhullott feketerigó vizsgálata során sikerült kimutatni a vírus nukleinsavának jelenlétét. Ezt a madarat Kunadacson találták. A vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a vírushoz tartozó fertőzés továbbra is jelen van a populációban. Meghatároztuk a Budapesten 2005-ben felbukkant Usutu vírustörzs teljes genomszekvenciáját. A törzs 99,9%-os hasonlóságot mutat az Ausztriában 2001-ben felbukkant vírushoz.

A vírus ausztriai felbukkanását követően további földrajzi terjedést mutatott. 2006-ban Svájcban és Olaszország északi részén is megjelent és elhullásokat okozott főként baglyokban és feketerigókban. Nemzetközi együttműködés keretében részt vettünk ezeknek az eseteknek a feldolgozásában és publikálásában. Genetikai összehasonlító vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a Közép-Európában kimutatott USUV törzsek több mint 99%-ban hasonlítanak egymáshoz, emiatt valószínűleg egyszeri afrikai behurcolást követő elterjedésre, mintsem független behurcolásokra került sor. Az USUV nukleinsavát mutatták ki spanyol kutatók Spanyolországban gyűjtött szúnyogmintákból. A rendelkezésünkre bocsátott mintákból meghatároztuk a vírustörzs teljes genomszekvenciáját és megállapítottuk, hogy az 96%-os hasonlóságot mutat mind a közép-európai, mind az afrikai ismert USUV szekvenciákkal. Ez arra utal, hogy Nyugat-Európában az USUV más törzse fordul elő, mint Közép-Európában. Nyugat-Európában – bár a leginkább fogékonyak tűnő gazdafajok jelen vannak, és szerológiai pozitívitásuk is bizonyított (pl. az Egyesült Királyságban) – nem tapasztaltak USUV-fertőzéssel összefüggésbe hozható madárelhullásokat, ezért valószínű, hogy a törzsek között virulencia-beli eltérések is vannak.

### 3. További vírusok előfordulásának vizsgálata vadmadarakban

Szúnyogok által terjesztett, madarakban előforduló vírusok a korábban említett flavivírusok mellett leginkább a *Bunya*-, *Reo*- és *Togaviridae* víruscsaládokba tartoznak. Madár-bunyavírusok közép-európai előfordulásának vizsgálata céljából molekuláris diagnosztikai rendszert fejlesztettünk ki több bunyavírus L genomszegmentjének konzervált szakasza kimutatására. A PCR-alapú rendszert a Sedlec víruson teszteltük. Ezt a vírust cserregő nádiposztából (*Acrocephalus scirpaceus*) izolálták Csehországban. A módszer segítségével elsőként határoztuk meg a vírusgenom L szegmensének részleges szekvenciáját. Az eredmények arra utalnak, hogy a vírus a *Bunyaviridae* család, *Orthobunyavirus* nemzetség, Simbu csoportjához tartozik. A WNV surveillance során gyűjtött madárminták egy részét megvizsgáltuk bunyavírusok nukleinsavának jelenlétére is. Az eddigi vizsgálatok negatív eredménnyel zárultak.

Reovírusok hazai előfordulására irányuló vizsgálatokat is terveztünk a projekt keretében. Pályázatunktól függetlenül, és a munkatervi ütemezésben szereplő reovírusokkal kapcsolatos kutatások megkezdése előtt értesültünk arról, hogy a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Kutatóintézetében Dr. Bányai Krisztián kutatócsoportja ugyanezen téma vizsgálatába kezdett. A párhuzamos kutatások elkerülése céljából ezért nem foglalkoztunk ezzel a résztémával, helyette figyelmünket és anyagi forrásainkat a flavivírusokkal és egyéb madárvírusokkal kapcsolatos kutatásokra fordítottuk.

A togavírusok közül Európában leginkább a Sindbis vírus (SINV) előfordulása ismert. PCR-alapú diagnosztikai módszert dolgoztunk ki a SINV nukleinsavának kimutatására diagnosztikai mintákból. A módszert referencia vírustörzsön teszteltük. A madaraktól származó minták SINV-re irányuló vizsgálatai eddig negatív eredménnyel jártak.

A pályázat írásának idején bukkant fel Magyarországon az Influenza A vírus magas patogenitású, H5N1 szerotípusú törzse, és okozott elhullásokat főként bütykös hattyúban (*Cygnus olor*), majd később baromfi-állományokban. Ezért a munkatervünkben szerepelt a H5N1 hazai előfordulásával kapcsolatos kutatások végzése is. A projekt futamideje alatt ugyanakkor nem fordultak elő az országban további, a magas patogenitású H5N1 törzshöz köthető megbetegedések vadmadarakban. A 2006-os esetek genetikai és kórtani feldolgozását az Országos Állategészségügyi Intézet (mai nevén MgSzH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) laboratóriumaiban dolgozó kollégák végezték, a vizsgálatok eredményeiből azóta számos publikáció és két PhD dolgozat született (Dr. Szelezky Zsófia és Dr. Pálmai Nimród tollából). Bár mindenben segítettük az említett fiatal kutatók munkáját, nem láttuk

értelmét annak (és a kórokozó hatósági állategészségügyi jelentősége miatt nem is nyílt módunk arra), hogy a madárinfluenza vírussal önálló, a fent említettekkel párhuzamos kutatásokat folytassunk.

2008-ban jelentek meg az első amerikai publikációk arról, hogy a papagájfélék mirigyegyomor-tágulattal járó betegségének (Proventricular Dilatation Disease, PDD) háttérében egy korábban nem ismert bornavírus fertőzés áll. Ez azért volt meglepő, mivel bornavírust korábban csak emlősökben találtak. A témában végzett kutatásaink kapcsán elsőként igazoltuk a kórokozó magyarországi előfordulását, valamint genetikai vizsgálatokat végeztünk Európai kóresetekből gyűjtött vírusok összehasonlítása céljából. Megállapítottuk, hogy Európában legalább négy különböző genetikai vonalhoz tartozó madár-bornavírus fordul elő, és ezekből három jelenlétét Magyarországon is bizonyítottuk. Elsőként mutattunk ki egy, a papagáj-bornavírushoz hasonló kórokozót PDD tüneteiben elhullott kanári (*Serinus canaria*) kórszöveti mintáiból. A WNV surveillance során gyűjtött vadmadár minták bornavírusokra irányuló vizsgálata eddig negatív eredménnyel járt.

Az OTKA K67900 projekt támogatásával végzett vizsgálataink jelentősen hozzájárultak ahhoz, hogy a nyugat-nílusi vírus által okozott hazai állati és emberi megbetegedésekről naprakész és részletes tudományos adatokkal rendelkezünk. A vizsgálatok eredményeire alapozottan hazánk hivatalos képviselői felkészülten tudtak beszámolni európai és egyéb nemzetközi fórumokon a nyugat-nílusi láz hazai járványhelyzetéről. A kutatás nemzetközi elismertségére utal az is, hogy a projekt során elért tudományos eredmények alapján az Európai Unió FP7 pályázati rendszerében kiírt két, a WNV további vizsgálatára irányuló projekt (EDENext, futamidő 48 hó, kezdet 2011. és Vectorie, futamidő 36 hónap, kezdet 2010.) konzorciumi tagjaként nyílik módja kutatócsoportunknak a vizsgálatok folytatására.