

Nyers tejjel terjedő kullancsencephalitis

Doktori értekezés

Balogh Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Berencsi György, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Ghidán Ágoston, Ph.D.

Dr. Bakonyi Tamás, Ph.D.

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Nagy Károly, Ph.D.

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rozgonyi Ferenc, Ph.D., DSc

Dr. Rusvai Miklós, Ph.D., DSc

Budapest

2012

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Bevezetés.....	6
3.1. Flavivírusok.....	6
3.1.1. Rendszertan.....	6
3.1.2. Felépítés	7
3.1.3. Célsejtek	10
3.1.4. Fontos fajok	11
3.1.5. Betegségek.....	13
3.1.6. A fertőzés ellenanyagfüggő fokozódása	14
3.1.7. Magyarországi előfordulás	15
3.2. A kullancsencephalitis vírusa.....	15
3.2.1. Altípusok	15
3.2.2. Vektorok és gazdák.....	16
3.2.3. A környezeti tényezők hatása	19
3.3. Kullancsencephalitis betegség.....	20
3.3.1. Klinikai jellemzése	20
3.3.2. Laboratóriumi diagnózis	23
3.3.3. Megelőzés	25
3.3.4. Magyarországi kullancsencephalitis-kutatás	26
3.4. Élelmiszer (nyers tej) eredetű KE fertőzések	28
3.4.1. Nyers tej fogyasztása	28
3.4.2. A tejjel fertőző KE kutatásának története, előfordulása	28
3.4.3. Az állatok fertőződése és a tej szennyeződése kullancsencephalitis vírussal.....	31
3.4.4. A tápcsatornán át fertőző KE klinikai jellegzetességei	32
4. Célkitűzések	33
4.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták vizsgálata.....	33
4.2. Kecskék KEV fertőzésének vizsgálata.....	33
4.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata	33
5. Módszerek	34

5.1. Állatkísérletek	34
5.1.1. Fertőzőképes vírus kimutatása <i>in vivo</i> tenyésztéssel	34
5.1.2. Kecskek immunizálása humán oltóanyaggal és fertőzése élő KE vírussal	34
5.2. Vizsgálati minták	36
5.2.1. Emberi vér- és liquorminták a lakhegyi járványból	36
5.2.2. Kecske vérminták a lakhegyi kecskefarmról	36
5.2.3. Kecske vér- és tejminták a kecskekísérletből	36
5.3. Szerológiai módszerek	36
5.3.1. Hemagglutináció gátlás (HAG)	37
5.3.2. Indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálat (IIF)	37
5.3.3. Mikroneutralizációs vizsgálat (kecske vérsavók)	38
5.3.4. Kecske minták vizsgálatára alkalmazott ELISA módszer	38
5.4. Molekuláris módszerek	39
5.4.1. Nukleinsav-tisztítás	39
5.4.2. Vírus RNS kimutatása kecsketejből nested RT-PCR-rel	39
5.4.3. Relatív mennyiségi RT-PCR	40
5.5. Fertőző vírusrészecskéket tartalmazó, poolozott tejminták hőkezelése	40
5.6. Kecske testhőmérséklet-adatok statisztikai elemzése	41
6. Eredmények	42
6.1. Lakhegyi tej eredetű KEV járvány vizsgálata	42
6.2. Kecskek kísérleti fertőzése	44
6.2.1. A kecskek testhőmérséklete a fertőzés után	44
6.2.2. Immunizált kecskek szerológiai eredményei	45
6.2.3. KEV kimutatása a fertőzött kecskek tejéből szopós egérbe oltással illetve RT-PCR-rel	47
6.2.4. A kiválasztott tejminták víruskoncentrációja	48
6.2.5. KEV kimutatása az előzőleg immunizált fertőzött kecskek tejéből szopós egérbe oltással és RT-PCR-rel	49
6.2.6. KEV kimutatása fertőzött tejből hőkezelést követően, szopós egérbe oltással	49
7. Megbeszélés	51

7.1. Lakhegyi járvánnyal kapcsolatos eredmények.....	51
7.2. Kecskék kísérleti fertőzésével kapcsolatos eredmények.....	54
7.3. Fertőzött tej hőkezelésével kapcsolatos eredmények.....	56
8. Következtetések	59
8.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták vizsgálata.....	59
8.2. Kecskék KEV fertőzésének vizsgálata.....	59
8.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata	60
9. Összefoglalás.....	61
10. Summary	62
11. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk jegyzéke	63
12. Irodalomjegyzék.....	64
13. Köszönetnyilvánítás	78

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

cap	az mRNS 5' végén található MeGppp
CS	ciklizációs szekvencia
Ct	a mennyiségi PCR küszöb ciklusa
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
ELISA	enzimhez kapcsolt immunadszorpciós vizsgálat
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
IgA	immunglobulin A
HAG	hemagglutináció gátlás
IgG	immunglobulin G
IgM	immunglobulin M
IIF	indirekt immunfluoreszcencia
KE	kullancsencephalitis
KEm I	kullancsencephalitis vírus első magyar izolátuma
KEV	kullancsencephalitis vírus
ME	2-merkaptó-etanol
NMRI egér	Naval Medical Research Institute (az egértörzs innen kapta a nevét)
NS	nem strukturális (fehérje)
nt	nem történt vizsgálat
PBS	foszfátpufferes sóoldat
pM	pikomol
pr	prekurzor
PR	pirimidinben gazdag (DNS szakasz)
RNS	ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
TCID ₅₀	a szövettenyészetek felét megfertőző vírushatóegység
tfu	tünetek a fertőzés után
VIEU	bécsi relatív ELISA egység (Vienna units, Prof. C. Kunz után)
WNV	nyugat-nílusi láz vírusa

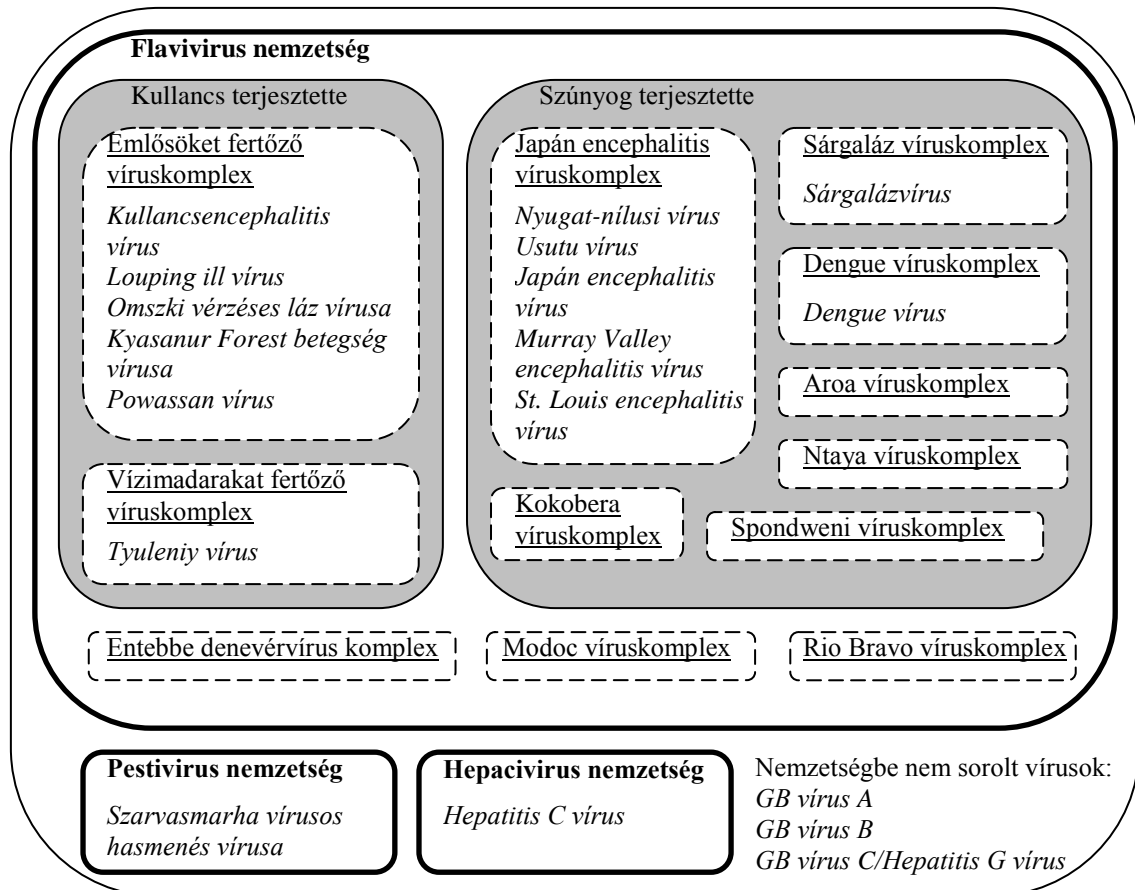
3. BEVEZETÉS

3.1. Flavivírusok

3.1.1. Rendszertan

A jelenleg a *Flavivirus* nemzetségbe sorolt vírusokkal (főként a sárgalázvírussal) már az 1800-as évek óta foglalkozik a tudomány; akkoriban sorolták be őket az arbovírusok (*arthropod borne*, vagyis ízeltlábúak terjesztette vírusok) csoportjába, az alapján, hogy szúnyogok és kullancsok játszanak szerepet az általuk okozott betegségek terjedésében. Az arbovírusokat az 1960-as években osztották fel antigénrokonság alapján az A és B víruscsoportokra, amelyek közül az A csoport ma a Togaviridae család *Alphavirus* nemzetségeként (pl. keleti lóencephalitis és nyugati lóencephalitis vírusa), a B csoport pedig a mai Flaviviridae család *Flavivirus* nemzetségeként (pl. sárgalázvírus, japán encephalitis vírusa, nyugat-nílusi láz vírusa, kullancsencephalitis vírusa) ismert. A flavivírus latin név is a sárgalázvírusra utal: *flavus* azt jelenti, sárga. A vektorokat azonban ma is figyelembe veszik a flavivírusok nemzetségen belüli csoportosításánál: megkülönböztetnek szúnyog terjesztette, kullancs terjesztette és nem vektorral terjedő vírusokat.

Az antigénrokonság vizsgálata mellett az utóbbi évtizedekben molekuláris módszerekkel és számítógépes programok segítségével is vizsgálták a flavivírusok leszármazását, és legtöbbször a korábban megállapított rokonsági viszonyok megfeleltek a modern eszközökkel kidolgozott filogenetikai fákknak.¹ A Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság mai álláspontja szerint a flavivírusok a Flaviviridae víruscsalád három nemzetsége közül alkotják az egyiket, a továbbiakban e nemzetség tagjait fogjuk flavivírusokként emlegetni.² A másik kettő a *Pestivirus* (a latin *pestitis* szóból) és a *Hepacivirus* (a májat jelentő görög „hepar” szóból) nemzetség. Az ezekbe tartozó vírusok antigenitás tekintetében távol állnak a flavivírusoktól, és nem is ízeltlábúak terjesztik őket, felépítésükben viszont hasonlítanak hozzájuk. Az 1. ábra mutatja a Flaviviridae család vírusainak csoportosítását.



1. ábra. A Flaviviridae család vírusainak csoportosítása. A vírusfajoknak (dőlt betű) csak egy kis részét tüntettük fel az ábrán.

3.1.2. Felépítés

A Flavivirus nemzetség vírusai kb. 50 nm átmérőjű, gömb formájú részecskék, amelyeket gazdasejt eredetű lipidburok vesz körül. Kapszidjuk egyféle fehérjemolekulából (C fehérje) épül fel, a burok pedig két membránfehérjét tartalmaz: az E (*envelop*, jelentése burok) és az M (membrán) fehérjét.³

3.1.2.1. Genomszerkezet

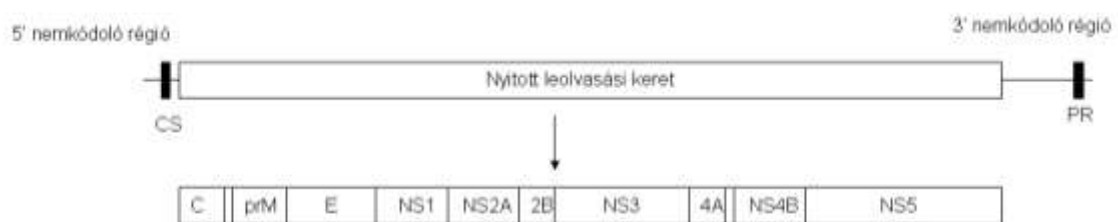
A flavivírusok genomja pozitív, egyszálú RNS, kb. 11 kilobázis méretű, és nem rendelkezik 3'-poli-A szakasszal, az 5' végén viszont „cap” található. Egyetlen nyitott leolvasási kerete van (a benne kódolt fehérjék elrendezése a Flaviviridae család mindhárom nemzetségében hasonló), amelyet nemkódoló régiók fognak közre.

A jellegzetes hajtűhurok szerkezetű 5'-nemkódoló régiónak valószínűleg a genom átírásában és replikációjában van szerepe, ugyanis ha a másodlagos szerkezet megbomlik, az gátolja az új RNS-szálak szintézisét.⁴

A 3' nemkódoló régió szekvenciája nagyon változékony, azonban a 3'-végéhez közel található egy konzervált hajtűhurok, amelynek ugyancsak a replikációban van szerepe, és az ebben részt vevő virális fehérjékkel (NS3 és NS5) való kölcsönhatása is bizonyított. A 3' nemkódoló régió másik érdekes eleme a szűnyog terjesztette flavivírusok genomjára jellemző konzervált CS (*cyclization sequence* – ciklizációs szekvencia) szakasz, amely bázispárosodással képes hozzákapcsolódni a genom másik végén található 5' CS elemhez. Ezeknek a ciklizációs szekvenciáknak a mutációja károsítja a replikációt. A kullancs terjesztette flavivírusok 3' nemkódoló régiójában nincs az előbbinek megfelelő CS elem, de ebben is megtalálható a konzervált régió, és azon belül egy olyan szakasz (PR – *pyrimidine rich* – pirimidinben gazdag), amely képes az 5' CS-hez kapcsolódni.⁵

3.1.2.2. Vírusfehérjék

A pozitív egyszálú RNS genomról mint mRNS-ről transzlálódnak a vírusfehérjék. Elsőként egy poliprotein jön létre, amelyet a leolvasás közben és után különböző enzimek (a gazdasejt szignál peptidáza és a vírus által kódolt szerin-proteáz) hasítanak fel kisebb molekulákra (2. ábra).



2. ábra. A kullancs által terjesztett flavivírusok genomjának szerkezete, és a genomról kifejeződő fehérjék.

A szerkezeti fehérjék közül a **kapszidfehérje** (C fehérje) erősen bázikus, feltételezések szerint a két végén található az oldalláncok, amelyek a genommal való kapcsolódásban vesznek részt, egy közbülső rövid hidrofób domainnel elválasztva.⁶

A **membránfehérje** (M fehérje) egy glikoprotein prekuzorból jön létre. A prM prekuzor molekula először átszállítódik az endoplazmatikus retikulumba, és ott hasítja el a gazda szignál peptidáz enzime prekuzor (pr) és M molekulára. A pr az E fehérje megfelelő térszerkezetének kialakításához is szükséges, valószínűleg ez stabilizálja a burokfehérjét, míg a virionok az érésük során a szekretoros útvonal csökkent pH-jú környezetében tartózkodnak.⁷ Hasítás után az M fehérje az érett virionokban marad, míg a pr rész kiválasztódik.

Az **E fehérje** a virion felszínén található glikoprotein, ez vesz részt a sejtekhez való kapcsolódásban és a membránfúzióban. Kristályszerkezetét a kullancsencephalitis vírus (KEV) E fehérjéjén tanulmányozták, amely hosszúka alakú, homodimereket alkotó molekula (3. ábra). Három domainből áll: az I. domain egy β -hordó, a II. domain párhuzamos a vírusfelszínnel és összeköti a monomerek transzmembrán régióit, a III. domain pedig az immunglobulinok konstans régiójához hasonló szerkezetű, ez feltételezhetően a receptorkötő régió.⁸ Az E fehérje a II. típusú virális fúziós fehérjék közé tartozik, amelyekre jellemző, hogy alacsony pH hatására a natív hetero- vagy homomultimer állapotukból átalakulnak trimer komplexszé, és így segítik a fúziót.⁹



3. ábra. A kullancsencephalitis vírus E (burok) fehérjéjének 3 dimenziós ábrázolása. (Forrás: RCSB Protein Databank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

A **nem szerkezeti fehérjék** közül az NS1 a fertőzött sejtekben, azok felszínén, és sejten kívül is megtalálható. A funkciója nem teljesen ismert, de fertőzéskor erős humorális immunválaszt vált ki^{10,11}, és az RNS-replikáció korai szakaszában is szerepet játszik.^{12,13} Az NS2A egy kisebb fehérjemolekula, melynek feladata valószínűleg az RNS-replikáció és –becsomagolás közötti eltolódás irányítása.¹⁴ Az NS2B az NS3-mal

komplexet alkotva segíti az utóbbi szerin-proteáz működését.^{15,16} Az NS3 a poliprotein hasítása mellett helikázként részt vesz az RNS-replikációban is.¹⁷ Az NS4A és NS4B fehérjék funkciója egyelőre ismeretlen, feltételezések szerint az NS4A-nak a replikációban lehet szerepe¹⁴, és az NS4B-t is a replikáció helyein és a sejtmagban tudták kimutatni.¹⁸ Az NS5 több módon is részt vesz a replikációban, egyrészt az 5' végen cap régió kialakításával¹⁹, másrészt RNS-függő RNS-polimeráz aktivitása révén.²⁰

3.1.3. Célsejtek

Az emberek általában szúnyog- vagy kullancscsípés útján fertőződnek a flavivírusokkal. A dengue vírussal végzett vizsgálatok szerint a vírus ilyenkor először a bőr dendritikus sejtjeiben, a Langerhans-sejtekben szaporodik.²¹ A replikáció főbb célpontjai azonban a monociták és makrofágok, amelyek közül a vérzéses lázat okozó vírusok – mint amilyen a dengue vírus is – patogenezisében a vérben található monociták és makrofágok a legfontosabbak (a vérlemezkék mellett), de a szöveti fehérvérsejtek flavivírus-fertőzését is kimutatták már.²² Sok flavivírus a vérrel az agyba jutva a központi idegrendszer sejtjeit is megtámadja, amihez át kell jutnia agyi hajszálerek endotélrétegén. Ennek a mechanizmusa nem teljesen ismert, történhet az endotélsejtek közvetlen fertőzésével, vagy transzcitotikus transzport útján, vagy a vér-agy gát integritásának megbontásával. Az idegrendszer sejtjei közül az idegsejtek és a gliasejtek is fogékonyak a flavivírus-fertőzésre.²³

A flavivírusok elsődleges célreceptorai egyelőre javarészt ismeretlenek. Sok más víruscsoporthoz hasonlóan a flavivírusok is képesek a sejtek felszínén található glükózaminoglikán molekulákhoz (pl. heparin és szerkezeti analógjai) kapcsolódni.²⁴ A dengue vírus E fehérjéjében például azonosítottak már lehetséges glükózaminoglikán kötőhelyeket, és kísérletekkel igazolták, hogy a dengue vírusok sejtbe jutását elsősorban heparán-szulfát tartalmú proteoglikánok közvetítik.²⁵ Ugyanakkor azt is rég felismerték, hogy a különböző sejt típusokon passzálva a dengue vírusnak (és más flavivírusoknak, pl. a kullancsencephalitis vírusnak is) kialakulhatnak megváltozott sejt tropizmusú variánsai, ami az E fehérje mutációinak köszönhető.²⁶ Ezért a glükózaminoglikánok szerepét a nem szövetenyészethez adaptált flavivírus törzsek esetében is tanulmányozni kell. A specifikus ellenanyag-molekulákkal való összekapcsolódást kihasználva a flavivírusok egy része (legjellegzetesebb példa a dengue) képes az F_c-receptorral

rendelkező sejtekbe is bejutni, aminek a fertőzés kimenetelében is fontos szerepe lehet (l. 3.1.6. A fertőzés ellenanyagfüggő fokozódása).

A flavivírusok a sejtekbe endocitózis útján jutnak be. A membránfúzióhoz savas pH-ra van szükség, amelynek küszöbértéke viszonylag magas: 6,6-6,8.^{27,28} Ebből arra következtethetünk, hogy a fúzió az endocitózis korai szakaszában történik, amikor az endoszómák belső pH-ja megfelel ennek a küszöbértéknek.²⁹ A savas pH olyan szerkezeti átalakulásokat vált ki a flavivírusok burkában, amelyeknek következtében véglegesen megszűnik a vírusok infektivitása, nem lesznek képesek hemagglutinációra, membránhoz kötődésre és fúzióra. A leglényegesebb változás az E fehérje I-es és II-es domainjének konformációjában történik³⁰, amitől átalakulnak a molekulák közötti kapcsolatok is – az eredetileg dimereket alkotó E fehérje molekulák a savas pH hatására disszociálnak, majd gyorsan és irreverzibilisen homotrimerekbe rendeződnek át.³¹ Mivel a savas pH-nak kitett virionok már nem képesek fúzióra, nyilvánvaló, hogy a fúzióban nem a végső trimerikus elrendezésű E-fehérjék vesznek részt, hanem feltehetőleg köztes szerkezetű formáik. A dimerek disszociációja ugyanis felfedi az addig takarásban levő fúziós peptidet, amely a trimerizáció során a membránhoz kapcsolódó karboxil-vég közelébe kerül.³² Vírusmutánsok tanulmányozása alapján a sejteken levő receptorokhoz az E fehérje III-as domainje kapcsolódik.³³

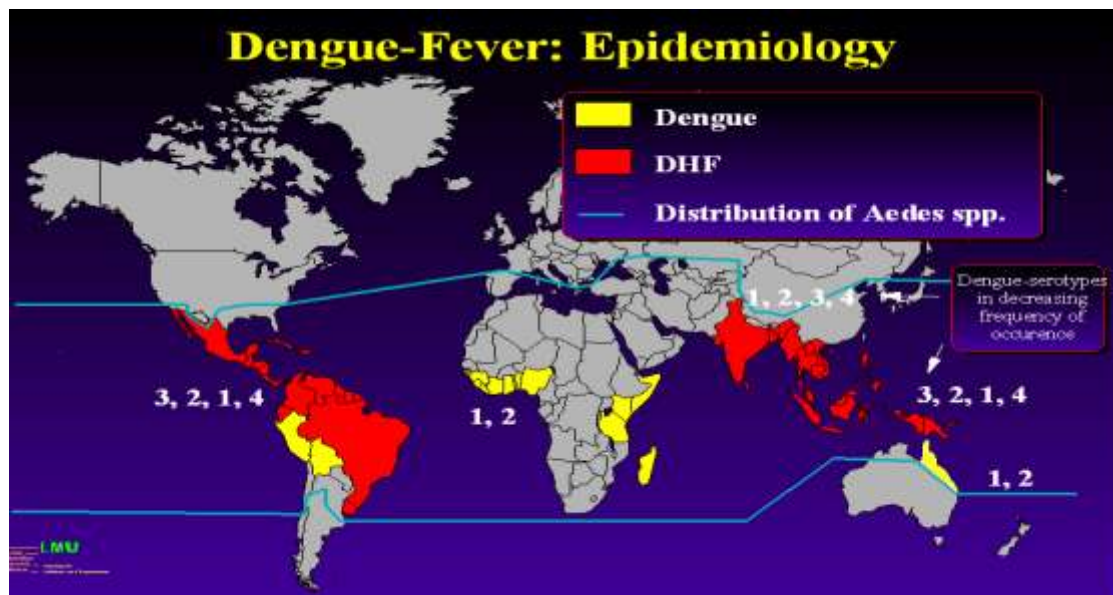
3.1.4. Fontos fajok

A szúnyog terjesztette flavivírusok közül a sárgaláz vírusnak és a dengue vírusnak régóta ismert a közegészségügyi jelentősége. Ezeken kívül a japán encephalitis víruskomplexbe tartoznak még olyan vírusok, amelyek nagy számban okoznak emberi megbetegedést.

A **sárgaláz** víruskomplex névadó faja Afrikának a Szaharától délre eső részén okoz járványokat, évente 200 000 is lehet a fertőzések száma, amelyekből mintegy 30 000 halállal végződik. Ritkábban előfordul még Dél-Amerikában, Közép-Amerikában és a Karib-szigeteken is. Az afrikai sárgalázat az *Aedes* nemzetségbe tartozó szúnyogok terjesztik. Két fő eltérő fertőzési ciklus különböztethető meg. A szúnyogok csípésükkel megfertőzik az egyenlítői erdőkben és a szavannán élő főemlősöket, amelyek csak ritkán betegszenek meg, viszont hordozzák, fenntartják a vírust. A dzsungel-sárgaláz, ha embert csíp meg fertőzött szúnyog a dzsungelben vagy a szavannán. Így a fertőzés eljut az emberi falvakba és városokba, ahol az *Aedes aegypti*

terjeszti tovább a vírust az emberek között – ez pedig a városi sárgaláz. Az amerikai kontinensre az utóbbi 500 év során, valószínűleg a rabszolga-kereskedelem idején került át a sárgaláz, ezért az újvilági majmok még nem alkalmazkodtak hozzá, gyakran elpusztulnak a fertőzéstől.³⁴ Az emberek fertőződése is kizárólag a dzsungelben fordul elő, mert a sárgalázvírus vektorai Amerikában a *Haemagogus* és *Sabethes* nemzetségre tartozó szúnyogok, amelyek az *Aedes aegyptivel* ellentétben nem alkalmazkodtak a városi környezethez. A betegség gyakran megjelent Európában és Észak-Amerikában is, hazánkban a járványos terjedése megfelelő vektor hiányában nem lehetséges, egyedi behurcolt megbetegedések azonban előfordulhatnak.

A dengue láz világszerte elterjedt (4. ábra). Nemcsak a trópusi éghajlaton (Ázsia, a Karib-tenger és a Csendes-óceán térsége, Ausztrália, Afrika, a 80-as évek óta Közép- és Dél-Amerika), hanem Európában is fordult már elő dengue fertőzés^{35,36,37}, de hazánkban jelenleg csak behurcolt esetként kell számolni vele. Évente összesen 50 millióan fertőződnek, ebből 60 000 fölötti a halálos kimenetelű megbetegedések száma. A dengue vírus városi járványainak rezervoárja az ember, és bizonyos *Aedes* szúnyogfajok (*A. aegypti*, *A. albopictus* stb.) különböző fejlődési alakjai, melyek egyben terjesztik is; egyéb gerinces állati gazdát csak Dél- és Közép-Amerikában ismerünk (majomfaj).³⁸



4. ábra. A dengue láz kockázata a fejlett és a fejlődő országokban. Sárga: dengue láz, piros: dengue vérzéses láz, kék vonal: *Aedes* szúnyogfajok elterjedésének határa, számok: dengue szerotípusok csökkenő gyakorisági sorrendben (forrás: Monath, T. P., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:2395-400.)

A **japán encephalitis** víruskomplexbe tartozó vírusok közül a japán encephalitis, a **Murray Valley encephalitis** és a **St Louis encephalitis** vírusa Magyarországon nem fordul elő (elterjedési területük Délkelet-Ázsia, Ausztrália illetve Amerika), a Nyugat-nílusi láz vírusa (*West Nile virus – WNV*) és az Usutu vírus azonban igen (l. 3.1.7. Magyarországi előfordulás). A komplexbe tartozó vírusokat a *Culex* nemzetség szúnyogjai terjesztik, amelyek madarak, emberek, sertések, lovak, hüllők vagy kétélűek vérével táplálkoznak. A japán encephalitis vírus az elterjedési területén tömeges megbetegedéseket okoz, de létezik ellene vakcina, amelyet sikerrel alkalmaznak.

A kullancs terjesztette flavivírusok közül az emlősöket fertőző víruskomplexben találhatóak olyan fajok, amelyek emberekben is okoznak megbetegedést. Ezek közül hazánkban a kullancsencephalitis vírusa fordul elő (l. 3.2. A kullancsencephalitis vírusa), illetve nagyon ritkán az egyébként szúnyog terjesztette WNV is terjedhet kullancscsípéssel. A **Powassan** vírus Amerikában, a **Louping Ill** vírus pedig a Brit-szigeteken az egyetlen kullancs terjesztette flavivírus. Embereket csak ritkán fertőznek meg, Louping Ill betegség főként juhoknál és faldoknál fordul elő. Az **omszki vérzések** vírusa Nyugat-Szibériában, a **Kyasanur Forest betegség** vírusa Nyugat-Indiában okoz egymáshoz hasonló, vérzéssel járó megbetegedéseket.

3.1.5. Betegségek

A fertőzött embereknek viszonylag kis hányadánál alakul ki súlyos **sárgaláz betegség**. Erre jellemző, hogy 3-6 napos lappangás utáni hirtelen lázzal indul, amelyhez általában hidegrázás, fejfájás, izomfájdalom, szédülés, hányinger és hányás társul. A betegek arca duzzadt, ödémás. Sok esetben a betegek ezután meg is gyógyulnak, a típusos betegségnél azonban kb. 24 órás láztalan szakasz után visszatérnek a tünetek: magas láz, sárgaság, veseelégtelenség és a vérzések jelei: a szem, orr, húghólyag, végbél vérzése. A betegség 7-10 nap alatt zajlik le, kimenetele gyakran (akár 50%-ban is) halálos.

A **dengue láz** kisgyermeknél aspecifikus lázas betegségként jelentkezik, idősebb gyermekek és felnőttek esetében pedig klasszikus láz-ízületi fájdalom-kiütés tünetegyüttest okoz. Ez hirtelen lázzal és izomfájdalommal kezdődik, és általában retroorbitális fájdalom, fénykerülés és duzzadt nyirokcsomók is jellemzőek. Bőrkiütés a betegek felénél alakul ki. A legtöbb esetben gyors a gyógyulás, azonban ha a beteg nem először fertőződik dengue vírussal, és ha az előző fertőzését más szerotípusú vírus

okozta, akkor ún. **dengue vérzések láz** alakulhat ki. Ebben az esetben vérzések jelentkeznek, megnő az erek átteresztőképessége, és plazma szivárog a szövetek közé, ami ödémát okoz, többnyire a mellkasban és a hasban. A vérzés és a plazma szivárgása sokkot okozhat (**dengue sokk szindróma**). Csecsemőknél a maternális immunitás csökkenése időszakában az anya korábbi fertőződése, akár az azonos típusú vírussal, szintén dengue vérzések láz/sokk szindróma kialakulásához vezethet.

A japán **encephalitis** víruskomplex fontosabb vírusainál a klinikai kép is hasonló: lázas, influenzaszerű betegség, amelyet követően idegrendszeri tünetek is megjelenhetnek. Nagyobb veszélyt általában a gyerekekre és az idősekre jelentenek, a legsúlyosabb betegséget okozó japán encephalitis halálozási aránya kb. 25%, és a betegséget átvészelő betegek 30%-ánál maradványtünetek figyelhetők meg.

A kullancs terjesztette, emlősöket is fertőző flavivírusok egy része (kullancsencephalitis, Powassan, Louping Ill) szintén idegrendszeri tünetekkel járó, kétfázisú lázas betegséget okoz, más részük (pl. Kyasanur Forest betegség) vérzések lázat, amelynek halálozási aránya 2-10% lehet.

3.1.6. A fertőzés ellenanyagfüggő fokozódása

A flavivírusokban, mivel közös őstől származnak, sok a közös antigén, így egy adott vírus antigénjei ellen termelődő ellenanyagok részleges keresztvédettséget adnak a hozzá hasonló vírusokkal szemben. A részleges védettség azonban nem elég a fertőzés teljes megakadályozásához, sőt, bizonyos esetekben a későbbi fertőzés még súlyosabb lefolyású, mint a korábbi. Ugyanez a jelenség megfigyelhető egy vírus (pl. a dengue) különböző szerotípusai között is: a súlyos lefolyású dengue fertőzések és a másodlagos típusú ellenanyagválaszok közötti szoros összefüggés mutatott rá arra, hogy egy korábbi fertőzés hatással lehet a későbbi súlyosbodására.

A szervezetben a korábbi fertőzés (vagy immunizálás) következtében jelen levő, de a vírusok semlegesítéséhez nem elegendő mennyiségű ellenanyag az egyik tényező, amely a fertőzésfokozódásban szerepet játszik. A másik a mononukleáris fagocitarendszer, amelynek sejtjein az ellenanyagokra érzékeny receptorok (F_c-receptorok) megtalálhatók, és amelynek sejtjeiben ezek a vírusok szaporodni képesek. Amikor a vírusokhoz kötődő, de azt nem semlegesítő ellenanyag-molekulák az F_c-receptorhoz kapcsolódnak, tulajdonképpen elősegítik a vírusok bejutását a számukra megfelelő gazdasejtbe, ami által a fertőzés hatékonyabb, a betegség lefolyása pedig

súlyosabb lesz. A dengue vírus esetében közvetlen bizonyíték az ellenanyagfüggő betegségfokozódásra, hogy az anyai ellenanyag a csecsemők első fertőződése alkalmával vérzéses vagy sokk tünetsoportot vált ki.³⁹

3.1.7. Magyarországi előfordulás

Magyarországon három flavivírus faj jelenlétéről tudunk. A legtöbb megbetegedést ezek közül a kullancsencephalitis vírus okozza (l. 3.2. A kullancsencephalitis vírusa). A Nyugat-nílusi láz vírusa által okozott, idegrendszeri gyulladással járó humán megbetegedések 2003 óta fordulnak elő hazánkban. Az Afrikából származó Usutu vírust eddig csak beteg madaraktól (feketerigókból) mutatták ki, bár képes az embert is megfertőzni⁴⁰.

3.2. A kullancsencephalitis vírusa

3.2.1. Altípusok

A kullancsencephalitis vírus elterjedési területe Európában Auszriától és Németországtól kelet felé egészen Kelet-Ázsiáig húzódik, északi határa Európában a Skandináv-félsziget és Finnország déli része, a déli pedig Szlovénia, Horvátország, Szerbia és Románia. A nagy földrajzi távolságuk ellenére az egyes KEV törzsek közeli rokonságban állnak egymással, így a kutatásuk kezdetén úgy gondolták, hogy csak egy vírus cirkulál Európában, Szibériában és a Távols-Keleten. Később két variánszt különítettek el az okozott betegségek alapján: a közép-európai encephalitis és az orosz tavaszi-nyári encephalitis vírusát, amelyek különbözőségét szerológiai tesztek igazolták.⁴¹ A KEV harmadik altípusát is az okozott klinikai tünetek és a földrajzi elterjedése alapján különítették el.⁴² A kullancsencephalitis vírus fajon belül ma három altípust különböztetnek meg: a távols-keleti (korábbi neve orosz tavaszi-nyári encephalitis), a szibériai (korábbi neve nyugat-szibériai) és az európai (korábbi neve közép-európai) encephalitis vírust.²

A **távols-keleti** altípus fertőzése okozza a legsúlyosabb központi idegrendszeri betegséget, amely gócos vagy kiterjedt agyhártya- és agyvelőgyulladásban nyilvánul meg, társulhat hozzá eszméletvesztés, illetve a gyógyulás során elhúzódó fáradtság. A legsúlyosabb esetekben nagy mértékben károsodnak az idegsejtek az agy és a gerincvelő különböző részein, aminek maradandó bénulás vagy halálos kimenetel lehet

a következménye. A halálozási arány 20-40%.⁴³ A betegség súlyosságát az is befolyásolja, hogy a vírust az *Ixodes persulcatus* kullancsfaj terjeszti, amelyben a vírus egy nagyságrenddel magasabb titert képes elérni, mint a másik kullancsfajban.

Ezzel szemben a **szibériai** altípusba tartozó törzsek általi fertőzésre a kevésbé súlyos akut szakasz és a bénulással nem járó lázas encephalitis jellemző. A halálozási arány ritkán haladja meg a 6-8%-ot, azonban egyes betegeknel a kullancsencephalitis krónikus formája alakul ki.

Az **európai** altípus által okozott betegség kétfázisú, az első fázisra a láz jellemző, a másodikra, amely a betegek 20-30%-ánál figyelhető meg, a különböző súlyosságú idegrendszeri zavarok. Ezek általában enyhébbek, mint a távol-keleti altípus által okozott tünetek, és legtöbbször maradványtünetek sincsenek, a halálozási arány 1-2%. A betegség gyermekeknél kevésbé súlyos lefolyású, mint felnőtteknél.⁴⁴

3.2.2. Vektorok és gazdák

A természetben a KEV ún. (természeti) **gócokban** fordul elő, ahol a kullancsokat és a gerinces gazdákat magába foglaló ciklus tartja fenn. Elsősorban két kullancsfaj terjeszti: az *Ixodes ricinus* és az *Ixodes persulcatus*, az előbbi az európai altípust, az utóbbi pedig a szibériait és a távol-keletit. Oroszországban az *I. persulcatus* mellett a *Haemaphysalis concinna* is részt vesz a vírus fenntartásában. (Más kullancs- és további parazitafajokból is izolálták már a vírust, de ezek szerepe az átadásában nem bizonyított.) A két *Ixodes* faj földrajzi elterjedése Európa északkeleti-keleti területén átfed, ezért ott a vírus mindhárom altípusa jelen van^{45,46}, hazánkban csak az *I. ricinus* fordul elő (5. ábra).

A kullancsok mindhárom fejlődési stádiumukban (lárva, nympa és kifejlett) néhány napig táplálkoznak a gazdafajok valamelyikén, így három alkalom is van az életsiklus során, amikor fertőződhetnek vírussal. Az egyes fejlődési stádiumok kb. egy évig tartanak, azaz a teljes életsiklus átlagosan 3 év, bár ez a földrajzi helytől függően eltérő lehet (2-6 év).⁴⁷ Ha egyszer megfertőződnek, a kullancsok a további fejlődési stádiumokban is fertőzőek maradnak, a vírus átadása szempontjából azonban a legjelentősebbek a nympák, mert ezekből több van, mint kifejlett állatból.⁴⁸ A lárváknak a vírusok fennmaradása szempontjából van jelentősége, mert méretük miatt csak kis méretű, vékonybőrű állatoktól képesek vért szívni. Az embereket csak a nagyobb fejlődési alakok képesek megfertőzni.⁴⁹

A szúnyog terjesztette flavivírusoknál már felvetődött, hogy összefüggés lehet a betegség típusa (vérzésekéses láz vagy agyvelőgyulladás) és a vektorfaj között (*Aedes* illetve *Culex* szúnyogok)¹; ugyanez igazolódni látszik a KE esetében is: a kullancsok révén szelektálódtak az enyhébb és súlyosabb lefolyású betegséget okozó vírusok.



5. ábra. Az *Ixodes ricinus* (pontozott) és *Ixodes persulcatus* (vonalazott) kullancsfajok földrajzi elterjedése. (forrás: Dumpis et al., 1999)

Laboratóriumi kísérletek bizonyítják, hogy a kullancsok és gazdaállatok hatással vannak a KEV biológiai tulajdonságaira. *I. ricinus* kullancsokban való sorozatos passzázs azt eredményezte, hogy a vírus egyre kevésbé volt fertőző egerekre és csökkent, majd megszűnt a hemagglutináló aktivitása. A fenotípusos változások tehát, amelyek a szelekció következtében jelentek meg, hatással voltak a vírus E fehérjéjére is, amit a szekvencia meghatározása is igazolt.⁵⁰ Egy másik vizsgálatban két KEV változatot tanulmányoztak: egy egéragyban tenyésztett törzset, és annak *Hyalomma marginatum* kullancsokhoz adaptált leszármazottját. A kullancsokhoz adaptált vírus kisebb plakkokat képzett, lassabban szaporodott sertés embrionális vesesejtekben, kevésbé volt neuroinvaszív egerekben, kullancsokban viszont jobban szaporodott, mint az eredeti törzs. A két vírusváltozat genomjai között 15 nukleotidszubsztitúció volt a különbség, amelyek közül hat aminosavcserét is okozott, ebből kettő az E fehérjében volt. Ezek a mutációk lehetnek felelősek a fenotípusos eltérésekért. A kullancsokhoz adaptált vírus egérben való passzálása során kapott eredmények arra utalnak, hogy a KEV heterogén populációt alkot, amelyben egyaránt található kullancsban és emlősben

jobban szaporodni képes vírusváltozatok is. Gazdaváltás esetén ezeknek a változatoknak az aránya változik meg a populációban.⁵¹

Hosszú ideig azt feltételezték, hogy az emlős gazdák közötti vírusátadáshoz arra van szükség, hogy az egyik állatnak jelen legyen a vírus a vérében (virémiája legyen), mert a kullancs a fertőző vérrrel táplálkozva tudja átvinni a kórokozót. Ma azonban már tudjuk, hogy a komplex vírusai olyankor is bekerülhetnek egy kullancs szervezetébe, amikor az egy fertőzött kullancssal egyidejűleg, egymáshoz közeli helyen táplálkozik („co-feeding”) egy gazdán.⁵² A gazdaállat virémiája nem szükséges a kullancs fertőződéséhez, feltehetőleg a bőr sejtjein való átszűrődés és bizonyos sejteknek a kullancscsípés helyéről való elvándorlása segíti a vírus átvitelét a fertőzött kullancstól a nem fertőzötthöz.⁵³ Az együttes táplálkozással nemcsak kifejlett, hanem különböző fejlődési fázisokban levő kullancsok között is adódhat át fertőző vírus.

A gerinces gazdák, amelyekből a kullancsok táplálkoznak, többféle szerepet tölthetnek be a természeti gócban, ezért megkülönböztethetünk rezervoár, indikátor és véletlen gazdákat. A **rezervoárok** olyan vadon élő gerincesek, amelyek képesek átadni a fertőzést. Nagy számban vannak jelen a természeti gócban, és magas a szaporodási rátájuk. A KEV esetében fogékonyak kell lenniük a vírusra, hogy az szaporodni tudjon bennük és átjuthasson a táplálkozó kullancsokba. Ha magas titerű virémia alakul ki, az nem okozhatja a rezervoár halálát, mielőtt a kullancsok be nem fejezték a táplálkozást, ami a kis testű rágcsálók esetében nem mindig teljesül, mert a virémiájuk csak pár napig tart, és a fertőzés halálos is lehet.⁵⁴ Ennek ellenére a kis rágcsálófajok, hazánkban elsősorban az *Apodemus flavicollis* (sárganyakú erdei egér), a legjelentősebb vírusterjesztő gazdaállatok, ezért a rezervoárok és nem az indikátorok közé sorolják őket. Az **indikátor gazdák** nem képesek átadni a vírust újabb kullancsoknak vagy azért, mert csak rövid ideig tart a virémiájuk alacsony vírustiterrel, vagy azért, mert hiányoznak náluk a virémiától független átadáshoz szükséges sejt szintű folyamatok.⁵³ Az ember és a nagytestű állatok (kecskék, szarvasmarhák, juhok, szarvasok, kutyák és sertések) véletlenül fertőződhetnek, de nem tudják átadni a fertőzést a rajtuk táplálkozó kullancsoknak.⁵⁵ Ezek a fajok azzal támogatják a vírus fennmaradását, hogy lehetővé teszik a kullancsok túlélését és szaporodását. A bennük mérhető anti-KE szeroprevalencia viszont közvetetten információval szolgál az adott földrajzi területen a KEV átadás intenzitásáról, ezért szentinel fajokként értékesek a járványtani vizsgálatokban. A **véletlen gazdák** azok a

fajok, amelyek megfertőződnek, virémiájuk is kialakul, de nem vesznek részt a vírus fenntartásában, és nem is szolgálnak jelentős táplálékforrásként a kullancsok számára.

3.2.3. A környezeti tényezők hatása

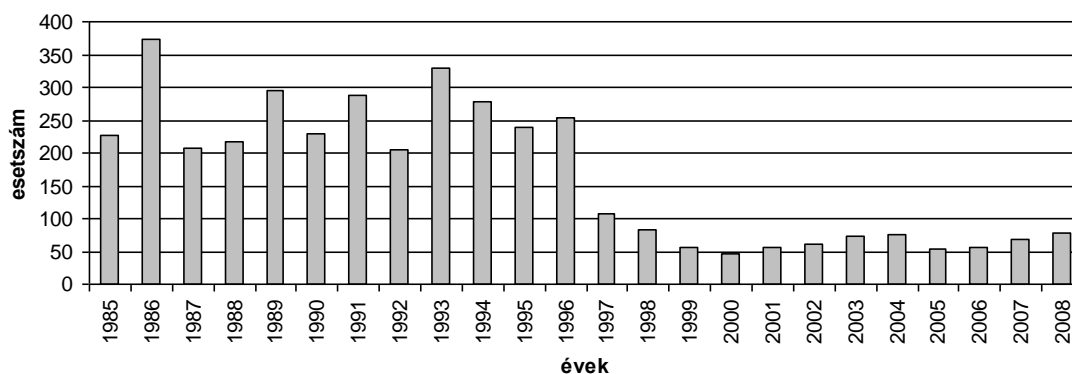
Az elterjedési területének nagy részén az *Ixodes ricinus* kullancs tavasszal, vagy kora nyáron válik aktívvá és kezd táplálkozni a különböző gazdákból. Az aktivitási görbéje Magyarországon kétszűcsű: az első maximum májustól júniusig, a második szeptemberben van. Hűvösebb éghajlaton csak egy csúcs van, amikor nagy számú lárva és nympa fordul elő egy időben, április-május körül, vagy még később, pl. a Skandináv-félszigeten júliusban.⁵⁶ A KE gócot, és azon belül a lárvák és nympák egyidejű aktivitását tehát nagyban befolyásolja a hőmérséklet. Az Egyesült Királyságban az *I. ricinus* 11°C-on és afölött válik biológiailag aktívvá, a relatív páratartalom alsó határa, amit még túlél, 70-80%.⁴⁷ Így az európai és ázsiai mérsékelt övi erdők ideális élőhelyek a kullancsok számára, mert a sűrű aljnövényzet megóvják őket a kiszáradástól.

Az utóbbi két évtizedben Közép- és Kelet-Európa több országában a kullancsencephalitis esetek számának növekedése figyelhető meg, amit a klímaváltozás hatásának tulajdonítottak. Erre utal, hogy amikor Csehországban több évtized KE eseteit abból a szempontból elemezték, hogy évente milyen legnagyobb tengerszint feletti magasságban fordultak elő, azt találták, hogy a magasság felső határa fokozatosan felfelé mozdult, ami jól korrelált az átlaghőmérséklet emelkedésével.⁵⁷ Ausztriában olyan alpesi legelőkön élő kecske tejéből készült sajt fertőzött meg embereket, amilyen magasságban korábban a KE nem fordult elő.⁵⁸

Valójában azonban nemcsak a klímaváltozás, hanem egyéb tényezők is szerepet játszanak ebben.⁵⁹ Valószínű, hogy társadalmi, politikai, ökológiai, gazdasági és demográfiai hatások is hozzájárultak a KE betegség terjedéséhez. Változott a földterületek használata (van, ahol több lett az erdő, másutt új kerteket hoztak létre), és egyre népszerűbbek a szabadtéri időtöltések pl. a túrázás és horgászás. A társadalmi-gazdasági körülményekről igazolták, hogy befolyásolják a KE gyakoriságát, mert azok, akik szegénységben élnek, munkanélküliség vagy politikai zavargások miatt, kevésbé valószínű, hogy be lesznek oltva KEV ellen, és nagyobb eséllyel élnek, vagy keresnek ételmelet (gombát, vad gyümölcsöt) az erdőkben, amivel növelik a kullancscsípés és a KEV-fertőzés kockázatát.⁶⁰ Közép- és Kelet-Európában a megművelt földterületek

növekedése és a kártevőirtó szerek használatának, illetve az ipari szennyezés mértékének csökkenése is hozzájárult a KEV gyakoriságának növekedéséhez.⁶¹ Egy további ok lehet a járványügyi megfigyelőrendszerek és a diagnosztika minőségének javulása, ami szintén befolyásolja a regisztrált KE esetek számát.⁴⁸

Mindezek ellenére vannak területek, ahol az esetek száma nem nő, hanem csökken. Magyarországon 1997-ben megváltozott a diagnosztikus vizsgálatok finanszírozása, és azóta a laboratóriumban igazolt KE esetek száma is jóval kevesebb (6. ábra). Lehetséges, hogy az egészségügyben zajló ilyen változások érdekes járványtani jelenségeket is elfednek.⁶² Szerepet játszhat azonban a csapadékmennyiség éveken át tartó csökkenése, valamint a lakosság átoltottságának a jelentős megnövekedése is.



6. ábra. KE esetek száma Magyarországon 1985 és 2008 között. (Forrás: A WHO központi, fertőző betegségekkel foglalkozó információs rendszere: <http://data.euro.who.int/cisid/>)

3.3. Kullansencephalitis betegség

3.3.1. Klinikai jellemzése

A KEV fertőzésnek többféle kimenetele lehet az egyszerű lázas betegségtől a halálos agyvelőgyulladásig. A betegség súlyosságától függetlenül azonban vannak általános jellemzők. A KE lappangási ideje 7-14 nap. Egyes betegekben megfigyelhetők korai tünetek, például 1-2 napig tartó fáradtság, fájdalom a nyak, a vállak és a hát területén. Fejfájás is gyakori. A klasszikus tünetek azonban hirtelen jelennek meg, a betegek gyakran pontosan emlékeznek ennek időpontjára. Jellemző ilyenkor a hirtelen jelentkező láz (38-39°C), hányinger, hányás, erős izomfájdalom a nyakban, vállakban, a

gerinc alsó részén és a végtagokban. Vannak betegek, akiknél már ebben a fázisban megjelennek meningeális jelek, pl. tarkókörtöttség, és előfordulhat még légszomj, illetve kipirultság az arcon, a nyakon és a felsőtesten.

Az akut fázis átlagosan 4 napig tart (1-8 nap)⁶³, ami összefüggésben van a virémiával. Ezt – átlagosan 8 tünetmentes nap után – az esetek 74-87%-ában egy második, magas lázzal járó fázis követ (a többi betegnél a betegség második fázis nélkül múlik el).⁶⁴ Ebben a fázisban idegrendszeri tünetek is jelentkeznek, többnyire ekkor keresik fel a betegek az orvost a súlyos fejfájásra és lázra panaszkodva. A központi idegrendszer fertőzése megjelenhet az agyhártyákban (agyhártyagyulladás v. meningitis), az agyvelőben (agyvelőgyulladás v. encephalitis), a gerincvelőben (gerincvelő-gyulladás v. myelitis), az ideggyökökben (ideggyökgyulladás v. radiculitis) vagy ezek bármilyen kombinációjában. Egy tanulmány szerint az agyhártya- és agyvelőgyulladás a megfertőződött személyek 20-30%-ában alakul ki.⁶⁵ Jellemzőek rá a meningeális tünetek (tarkókörtöttség, fénykerülés), a mozgáskoordinációs zavar, és a különböző kognitív zavarok, pl. gyenge koncentráció és memória, beszédzavarok, megváltozott tudatállapot, zavartság, ingerlékenység, remegés, és az agyidegek illetve a légzőizmok bénulása. A halálozási arány Európában <1%.

A betegség lezajlása után a gyógyulás hónapokig is eltarthat, gyakran maradványtünetek is megfigyelhetők, ezek általában kognitív és gócos idegrendszeri tüneteket jelentenek. Egyes tanulmányok halláskárosodásról is beszámolnak. A postencephalitis szindróma különböző tünetekkel járhat; megjelenhet gerincvelői idegek bénulásaként, neuropszichiátriai panaszok formájában, beszédzavarként, mozgáskoordinációs zavarként vagy izomgyengeségként. Megjelenését az idősebb életkorral, korábbi gépi lélegeztetéssel, rendellenes MRI képpel, a liquor >300 sejt/μl-es pleiocitózisával, illetve a vér-agy gát sérülésével tudták összefüggésbe hozni.⁶³

A legnagyobb múltja a KE kutatásának a volt Szovjetunió területén van, amelynek különböző részein a KEV mindhárom altípusa előfordul. Az orosz egészségügyi hatóságok a kullancsencephalitis következő formáit különböztetik meg⁴³:

1. *Lázás forma.* Általában teljes gyógyulással végződik. Nincsenek idegrendszeri tünetek. Az összes felismert KEV fertőzés körülbelül egyharmada ide sorolható. A lázas szakasz, amelynek során a testhőmérséklet elérheti a 39°C-ot, néhány órától 5 napig is tarthat.

2. *Agyhártyagyulladásos forma.* Ez a KE leggyakoribb formája, amely a lázas formához hasonlóan indul, de súlyosabbak a tünetek. A betegek igen erős fejfájásról és hányingerről panaszkodnak. Gyakori a hányás, a fénykerülés a szem fájdalma miatt, és meningeális tünetek is fellépnek. A láz 7-14 napig tart, és fokozatosan enyhül.

3. *Agyhártya- és agyvelőgyulladásos forma.* Kevésbé gyakori, de súlyosabb forma. A betegek gyengék, bágyadtak, gyakran hallucinálnak, néha eszméletüket veszítik. A tünetek közt előfordulhatnak szívritmuszavarok, gyomorvérzés, féloldali izomgyengeség és/vagy bénulás. Egyes betegeknél később epileptikus rohamok jelentkeznek. A megbetegedések 30%-a halálos, a gyógyultaknál, különösen idősebbeknél, a féloldali gyengeség maradandó. A gyógyulás nagyon lassú, és idegkimerültség, rossz közérzet és gyakori hangulatingadozás jellemzi.

4. *Poliomyelitikus forma.* A kezdeti szakaszra jellemző a fáradtság, az ismétlődő izomrángások, és a gyengeség vagy bénaság érzése valamelyik végtagban, majd később bénulásos betegség alakul ki. Az első lázas szakasz első és negyedik napja között, vagy a második lázas szakasz első és harmadik napja között a nyaki, vállövi és felső végtagi izomgyengeség erősödik, ami 2 hétig, de akár hónapokig is tarthat. A betegek álló testhelyzetben jellegzetesen lógatják a fejüket. A második-harmadik hét végére az izmok elkezdnek elhalni. Az alsó végtagok gyengesége vagy bénulása meglehetősen ritka. A betegség lefolyása mindig súlyos, a gyógyulás nagyon lassú, és a betegeknek csak kb. a felénél figyelhető meg az idegrendszeri károsodások részleges gyógyulása.

5. *Ideggyökök gyulladásával járó forma.* A károsodás és a fájdalom a perifériás idegeket érinti. A betegség lefolyása kétfázisú, az első fázis 3-7 nap után kezdődik lázzal (38-39°C), fejfájással, álmatlansággal, hányással, végtagi izomfájdalommal. Ezután 7-14 napos láztalan szakasz következik. A második fázisban visszatér a láz, és megjelennek a központi idegrendszer károsodásának jelei, agyhártyagyulladásos és gócos idegrendszeri tünetek jellemzőek. A gyógyulás általában teljes.

6. *Krónikus forma.* Ezt a formát a szibériai és távol-keleti (orosz) betegeknel írták le, Európában eddig még nem. Valószínűleg a KEV szibériai altípusával áll összefüggésben. A krónikus kullancsencephalitisnek két típusa van. Az egyiket gyakran az akut KE hosszú távú maradványtüneteiként határozzák meg, amelyek a hónapok, évek során tovább romlanak. Nehéz ezekben az esetekben bizonyítani a vírus jelenlétét, de a *post mortem* vizsgálat során többször friss beszűrődéseket találtak az agyban és a gerincvelőben, amit a patológusok a fennálló vírusfertőzés következményeként értelmeztek. A krónikus KE azonban kezdődhet a jellegzetes akut tünetek nélkül is, azaz a betegség lehet egyfázisú. Ez esetben a kullancscsípést követően az idegrendszeri tünetek kialakulása akár évekig is eltarthat. A klinikai kép igen sokféle lehet, pl. Kozsevnyikov-féle epilepszia (más néven *epilepsia continua*, amelyre jellemzők a test egy részére korlátozódó, szinte folyamatos, ritmikus izomösszehúzóadások), a kari idegfonat előrehaladott gyulladása, szklerózis, Parkinson-szerű betegség, vagy előrehaladott izomelhalás. A fizikai állapot romlásához gyakran szellemi leépülés társul, amely súlyos elbutuláshoz és/vagy halálhoz vezet. A krónikus KE eredetét sok esetben igazolták a tünetek megjelenését követő vírusizolálással.

Ezeknek a különböző klinikai formáknak a gyakorisága területenként változó (befolyásolja pl. a KEV altípusok elterjedése is), Szibériában például a KEV fertőzéseknek kb. 80%-a idegrendszeri tünetek nélküli lázas betegségként zajlik le, bár gyakran van szükség kórházi kezelésre. Bénulásos forma az esetek 7-8%-ában alakul ki, a Kozsevnyikov-féle epilepszia pedig 4-5%-ban.

3.3.2. Laboratóriumi diagnózis

Mivel a KEV fertőzés tünetei hasonlóak lehetnek más idegrendszeri betegségek pl. a herpeszvírus által okozott encephalitis tüneteivel, a differenciáldiagnózis egyik lépése a laboratóriumi vizsgálat. A KEV 3-as biológiai biztonsági szinten (BSL-3) kezelendő kórokozó, így a vírustenyészetekkel, fertőzött állatokkal stb. a vonatkozó biztonsági előírásoknak megfelelően kell bánni.

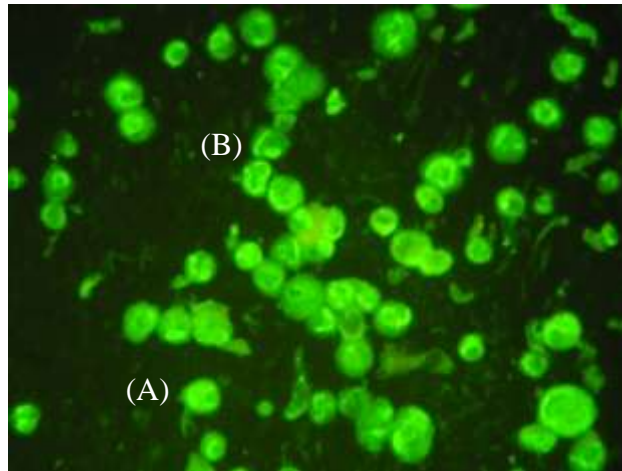
A KEV fertőzés kimutatásához használt minta általában a beteg vérsavója vagy liquorja, ritkán *post mortem* szövetminta. A klasszikus vírusizoláláson kívül ma már molekuláris biológiai módszereket: RT-PCR-t⁶⁶ (vírus RNS kimutatása vérsavóból

illetve liquorból az ellenanyagok megjelenése előtt), multiplex PCR-t⁶⁷ (KEV altípusok elkülönítése) és mennyiségi PCR-t⁶⁸ (vírus RNS mennyiség meghatározása liquorban) is alkalmaznak. Ezek a módszerek a betegség korai szakaszából származó minták esetén használhatók jól, amelyeket fagyasztva (-20°C-on, vagy az alatt) kell tárolni a vírus RNS érzékenysége miatt.

A legtöbb beteg azonban akkor megy el az orvoshoz, amikor idegrendszeri tünetei jelentkeznek, vagyis a betegség második fázisában.⁶⁹ Ekkor a vírus RNS már nem (vagy nehezen) kimutatható a liquorból és a vérből, valószínűleg azért, mert a virémia rövid idejű. A kialakuló immunválasz viszont lehetővé teszi, hogy a vírus helyett az ellene termelt ellenanyagokat mutassuk ki a vérből, a KEV-re specifikus IgM-et és IgG-t, illetve ritkábban IgA-t. A leggyakrabban alkalmazott módszerek az ELISA, az indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálat és a hemagglutináció gátlás, ritkábban vírusneutralizáció. Olyan esetekben, amikor az eredmény egy módszerrel nem egyértelmű, megerősítésként egy másik módszerrel is meg kell vizsgálni a mintát. A szerológiai diagnózist általában savópár összehasonlító vizsgálata alapján állapítják meg, amelyhez a két minta vétele között legalább 10-14 napnak kell eltelnie. (A szerológiai vizsgálatra szánt mintákat a vizsgálatig +4°C-on lehet tárolni, hosszú távú tároláshoz viszont érdemes -20°C-ra vagy az alá fagyasztani.) A megfelelő időpontokban – a virémia idején, majd a rekonvaleszcencia szakában – vett vérminták vizsgálatakor kimutatható legalább négyszeres ellenanyagtiter emelkedés, valamint a specifikus IgM kimutatása igazolja a friss KEV fertőzést. Amennyiben a beteg korábban kapott KEV elleni védőoltást, és fennáll az oltás ellenére kialakult betegség gyanúja, az IgM helyett az IgA ellenanyagok kimutatásával lehet igazolni a diagnózist. Az eredmények értékelésekor mindig figyelembe kell venni azt is, hogy a KEV antigéndeterminánsai részben közösek a rokon flavivírusokkal, így a szerológiai reakciót okozhatják egy másik flavivírus ellen termelt ellenanyagok is (keresztreakció). Így a beteg anamnézisének alapos ismerete (milyen más flavivírussal kerülhetett kapcsolatba) nagyon fontos a helyes diagnózishoz. Ha több flavivírussal is fertőződhetett a beteg, akkor az ellenanyagtiterek dinamikájának összehasonlításával dönthető el, melyik fertőzés zajlik aktuálisan.

Magyarországon a kullancsencephalitis diagnosztikája az Országos Epidemiológiai Központ Általános vírusdiagnosztikai osztályán történik. A rutinszerűen

alkalmazott szerológiai módszer az indirekt immunfluoreszcens teszt (7. ábra), megerősítő vizsgálatokat hemagglutináció gátlással végeznek.



7. ábra. Kullancsencephalitis vírusra specifikus IgG kimutatása indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal. A mikroszkópos felvételen negatív sejtek (A), és pozitív, specifikus festődésű sejtek (B) láthatók.

3.3.3. Megelőzés

A kullancsenephalitist a legegyszerűbben úgy kerülhetjük el, hogy a kullancscsípést igyekszünk elkerülni. Ezt megtehetjük a megfelelően zárt ruházat viselésével, repellensek (riasztószerek) alkalmazásával, illetve ahol megoldható, a kullancsok irtásával is. Ezeknek az óvintézkedéseknek nemcsak a kullancsencephalitis, hanem más kullancs terjesztette betegségek pl. a Lyme-kór (*Borrelia burgdorferi* baktérium) megelőzésében is fontos szerepük van.

Amennyiben nem a kullancscsípésre, hanem magára a betegségre koncentrálnunk, a kullancsencephalitis megelőzésének leghatékonyabb módja az immunizálás. (Kifejezetten a flavivírusok ellen – a hepatitisz C vírust kivéve – hatásos gyógyszer nem áll rendelkezésre, ezért ha kialakul a betegség, csak tüneti kezelés alkalmazható.) Jelenleg legalább négy oltóanyag van forgalomban, amelyeket tisztított, formaldehiddel inaktivált víusból gyártanak adjuváns hozzáadásával: az osztrák fejlesztésű FSME-Immun, a német Encepur (Magyarországon ez a kettő elérhető), és két orosz vakcina. Az európai vakcinákat a vírus európai altípusából (a Neudörfl és a K23 törzsből), az orosz oltóanyagokat pedig a távol-keleti altípusból (a 205-ös és a Sofjin törzsből) gyártják.⁷⁰ Egérkísérletek igazolják, hogy az európai és a távol-keleti altípus között erős a keresztvédettség; az európai altípusból készült oltóanyaggal immunizált egerek nem

fertőződtek meg a távol-keleti törzsekkel.⁷¹ Humán önkénteseknél az Encepur Adult oltóanyaggal (európai altípus) végzett immunizálás után szintén sikerült humorális immunválaszt kiváltani a távol-keleti altípusba tartozó törzsek ellen.

Ausztriában 1981-ben bevezették az éves kampányoltásokat, és így sikerült elérni, hogy az esetszám folyamatosan csökken, az átoltottság pedig 2001-re elérte a 86%-ot.^{72,73} Az oltási kampányok azonban más országokban nem ennyire sikeresek. A KEV elleni oltás Magyarországon például csak a foglalkozásuk miatt veszélyeztetett emberek számára kötelező, és mivel az oltóanyag viszonylag drága, és több dózissal, illetve emlékeztető oltásokra is szükség van belőle, az átoltottság alacsony. Az 1999-2000-ben az Országos Epidemiológiai Központ által szervezett szeroepidemiológiai szűrés során az ország lakosságának 5,7%-ánál találtak KEV elleni ellenanyagokat, de mivel a vizsgálatok nem tettek különbséget a természetes és az oltás útján szerzett immunitás között, az átoltottság aránya még ennél is kisebb.

Posztexpozíciósan korábban alkalmazták a passzív immunizálást is, azaz a kullancscsípést követően specifikus ellenanyagot tartalmazó gamma-globulint adtak be. Egy tanulmány szerint, ha 96 órán belül adták a gamma-globulint, azzal az esetek 60%-ában meg tudták előzni a betegséget, ez az adat azonban egy telefonos kutatás eredménye, orvosi bizonyítékok nem állnak rendelkezésre.⁷⁴ Ezen kívül a posztexpozíciós passzív immunizálás azért sem javasolt, mert ez akár súlyosbíthatja is a betegséget a fertőzés ellenanyagfüggő fokozódása révén.^{75,76} Ma Európában már nem alkalmazzák a passzív immunizálást KE ellen.

3.3.4. Magyarországi kullancsencephalitis-kutatás

Magyarországon 1950-ben kezdték el vizsgálni a KE természeti gócait a meningoencephalitis esetek helyi halmozódásai alapján, és ennek eredményeképp Forni Ferenc és Molnár Erzsébet 1952-ben izolálni is tudta a kullancsencephalitis vírust kullancsokból.⁷⁷ A 60-as, 70-es években eredményes munkakapcsolatok épültek ki az Országos Közegészségügyi Intézet (OKI) kutatói és egyrészt a szomszédos országokban dolgozó biológusok, orvosok, állatorvosok, másrészt a hazai közegészségügyben, állategészségügyben, erdészetben dolgozó kollégák között. A laboratóriumban vizsgált KE esetekről 1958-tól pontos nyilvántartások készültek, és tovább folyt a góckutatás és a vírusizolálás terepen gyűjtött kullancsok dörzsöléséből, és állatok vér- illetve szövetmintáiból. (A KEV mellett számos más virális zoonózis

előfordulását is bizonyították.) A seroepidemiológiai vizsgálatokból kiderült, hogy a legtöbb KE eset Magyarországon a Dunántúli-dombság területén, Zala és Somogy megyében fordult elő, szórványos esetek azonban az ország egész területén voltak.

Az OKI Oltóanyag-ellenőrző osztálya kezdeményezésére 1977-ben a KEV elleni inaktivált oltóanyag (FSME-Immun) hatékonyságát vizsgálták. Megállapították, hogy azoknál, akik az oltás előtt szeronegatívak voltak, az ellenanyag-titer az első két oltás után megemelkedik, de nem tartósan, míg a 3. oltás után egy hónappal az ellenanyagválasz 70%-os volt. Az oltás előtt szeropozitívak esetében csak az első oltás fokozta az immunitást, a további kettő nem.⁷⁸

A korábbi hemagglutináció gátlást és komplementkötést a rutindiagnosztikában 1981-től kezdve felváltotta a gyorsabban eredményt adó indirekt immunfluoreszcens teszt, de megerősítő vizsgálatként a pozitív és kétes mintáknál továbbra is végeznek hemagglutináció gátlást és szükség esetén vírusneutralizációt is (egérben vagy sejtenyészetben). Az 1990-ben immunizált egerekkel végzett fertőzési modellkísérlet azt mutatta, hogy ha az immunfluoreszcenciával és hemagglutináció gátlással is vizsgált vérsavó ellenanyagtartalma 1:10-es hígításban is kimutatható, az védelemet jelent a fertőzéssel szemben.⁷⁹ Ennek azért van nagy jelentősége, mert 1991-től bárki számára recept ellenében megvásárolható a KEV elleni oltóanyag a gyógyszertárakban⁸⁰, így a laboratórium rutinfeladatai közé a betegség diagnosztizálása mellett bekerült az oltás hatására kialakuló immunitás ellenőrzése is.

Az utóbbi években a hangsúly a molekuláris módszerek fejlesztésére, és a többi Magyarországon előforduló flavivírus kimutatására helyeződött. Az RT-PCR technika a KEV laboratóriumi diagnosztikájában kevésbé használatos, mert a legtöbb klinikai minta nem a betegség első, virémiás fázisából származik, így a közvetlen víruskimutatás nem lehetséges. Sikeresen alkalmazzák viszont a gerinces vírusgazdák virémiájának és vírusürítésének kimutatásában, illetve a kullancsok fertőzöttségét vizsgáló epidemiológiai kutatásokban. A másik két flavivírus közül Magyarországon a Nyugat-nílusi láz vírusa 2003 óta okoz humán megbetegedéseket^{81,82}, de eleinte az elterjedési területe nem fedett át a KE víruséval. Nyugat-nílusi láz vírussal fertőzött betegek 2008-tól kezdve már olyan helyeken is felbukkantak, ahol a KEV is endémiás, így a diagnosztikában figyelembe kell venni a lehetséges keresztreakciókat is.⁸³ Az Usutu

vírust eddig emberekben nem mutattuk ki, de tudjuk, hogy madarakat fertőz Magyarországon, és elméletileg az embert is képes megfertőzni.⁸⁴

3.4. Élelmiszer (nyers tej) eredetű KE fertőzések

3.4.1. Nyers tej fogyasztása

A családi gazdaságokban gyakran fogyasztják nyersen a tejet, főként azért, mert úgy kényelmesebb és az íze is más⁸⁵, de a nem farmon élő emberek egy kis része is iszik nyers tejet, mert úgy gondolják, hogy ezzel megelőzhetnek vagy kezelhetnek bizonyos betegségeket. A tej emellett olyan anyagokat is tartalmaz, amelyek gátolják a baktériumok és más mikrobák szaporodását, de ezekről úgy tartják, hogy érzékenyek a hőhatásokra (pasztörözés), és emiatt a nyers tej hívei szerint a forralt tejnek alacsonyabb a biológiai értéke. A tejben található legtöbb jótékony hatású biológiai anyag azonban a pasztörözés körülményei között hőstabil, vagy kevésbé hat rá a pasztörözés⁸⁶, és a pasztörözetlen tej jótékony hatásaival kapcsolatos feltételezéseket megerősítő tudományos bizonyítékból nagyon kevés van, sőt, akik azt találták, hogy a termelői tej (arról nincs adat, hogy nyers vagy sem) fogyasztása összefüggött a gyermekkori asztma és rhinoconjunctivitis kisebb kockázatával, azok arra is figyelmeztetnek, hogy a nyers tej fogyasztása milyen veszélyekkel jár.⁸⁷ A nyers tej és a belőle készített sajtok és más tejtermékek sokféle kórokozóval szennyeződhetnek, jelen lehet bennük többek közt *Mycobacterium bovis*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Brucella*, *Listeria*, *Shigella*, Shigatoxin-termelő *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, a száj- és körömfájás vírusa, amely ritkán embereket is fertőz, és nem utolsósorban a kullancsencephalitis vírusa. Szerencsére a sajtok és más termékek készítésekor a korszerű technológiák előírják a pasztörözést az „oltó” erjesztő készítmények adagolását megelőzően, így a kockázatok minimálisra csökkennek.

3.4.2. A tejjel fertőző KE kutatásának története, előfordulása

Az első tej eredetű KE járvány, amelyről tudományos publikáció született, 1951-ben zajlott Rozsnyón (Roznava, Szlovákia). A fertőzést több, mint 600 ember megkapta, akik közül 271 kórházba is került, miután ittak a helyi tejgazdaság által pasztörözetlenül forgalomba hozott, vírussal szennyezett tejből.⁸⁸ Hasonló, tej eredetű

fertőzéseket írtak le a Szovjetunió európai területein, ahol a betegséget kétfázisú tejláznak hívták.^{89,90} A megbetegedések és járványok leírása mellett a terjedési folyamat fázisait is elkezdtek tanulmányozni. Kísérletekkel sikerült reprodukálni a tejük miatt tartott haszonállatok (tehenek, kecskék, juhok) KEV fertőződését, és a vírust ki tudták mutatni az állatok tejéből.^{91,92,93} Egérkísérletekben igazolták azt is, hogy a KEV képes úgy fertőzni, hogy élelmiszerrel kerül a szervezetbe.⁹⁴

A KEV jelentősége az élelmiszer eredetű fertőzéseket okozó vírusok között azóta sem teljesen egyértelmű. Bár számos ilyen jellegű járványról számol be az irodalom, azokban a kísérletekben, ahol az volt a cél, hogy felmérjék a nyers tej fogyasztásának jelentőségét a vírusátadásban, azt az eredményt kapták, hogy ez nem tartozik a KE fertőzés vagy betegség fő kockázati tényezői közé.⁹⁵

A 80-as években a legtöbb országban, ahol a kullancsencephalitis endémiás, bevezették az oltást, és mivel egyre többen tudtak a fertőzés megelőzésének lehetőségéről, illetve a sikeres oltások következtében sok megbetegedést sikerült megelőzni. Az élelmiszer útján történő fertőződés azonban ma is jobbára ismeretlen a laikusok számára, így rendszeresen fordulnak elő újabb sporadikus esetek és járványok, és a nemzetközi szakirodalomban visszatérő téma a tejjel illetve tejtermékekkel terjedő kullancsencephalitis.^{55,96,97,98}

Magyarországon az Országos Epidemiológiai Központban (korábbi nevén Országos Közegészségügyi Intézet) már az 50-es évek óta foglalkoznak a kullancsencephalitis laboratóriumi diagnosztikájával. Sok esetben arról is készült feljegyzés, ha a betegek a betegségük előtt nyers tejet fogyasztottak. A legkorábbi ilyen adat 1955-ből származik (l. 1. táblázat), amikor Balassagyarmaton 7 megbetegedést regisztráltak. A legtöbb esetben a tej eredetű fertőzések egy-egy családot érintenek, akik a fertőzött állat tejét fogyasztják, de időnként előfordulnak nagyobb járványok is, ha a fertőzött tej kereskedelmi forgalomba kerül. Az első ilyen nagyobb járvány, amiről tudunk, 1992-ben volt Bélapátfalván. A fertőzésnek kitett emberek száma 76 volt (ennyien ittak a tejből), és a laboratórium 24 betegnél igazolta a kullancsencephalitis fertőzést.

A legutóbbi nyers tej eredetű járvány 2007 augusztusában volt hazánkban.⁹⁹ A Zala megyei Lakhegyen egy kecskefarmon árusították a nyers tejet, amelyből a járványügyi vizsgálat szerint legalább 154 ember ivott. A tejfogyasztást követően 31-en

betegedtek meg, és mivel egyikük sem számolt be kullancscsípésről a betegség szempontjából releváns időszakban, feltételezhető, hogy mindannyian a tejtől lettek betegek. Huszonöt betegnél a kullancsencephalitis jellegzetes tünetei voltak megfigyelhetők: kétfázisú láz, a második fázisban idegrendszeri tünetekkel. A többi hat betegnél aspecifikus tünetek jelentkeztek: szédülés, hányinger és hasmenés. Eszméletvesztés vagy más súlyos tünetek nem fordultak elő, a betegség lefolyása minden esetben jóindulatú volt és gyógyulással végződött.

#	Év	Hely	Állatok (pozitív/vizsgált)	A tejet fogyasztók száma	Emberi fertőzések
1.	1955	Balassagyarmat	Nincs adat	Nincs adat	7
2.	1966	Kisgyőr	Nincs adat	Nincs adat	4 igazolt KE
3.	1992	Bélapátfalva	1/5	76	24 igazolt KE
4.	1994	Zabar	Nincs adat	Nincs adat	3 igazolt KE
5.	1996	Gyöngyöspata	1/1	4	4 igazolt KE
6.	1996	Palotás	Nincs adat	Nincs adat	2 igazolt KE
7.	1997	Gyöngyöspata	1/1 1/2	6 2	4 igazolt KE 2 igazolt KE
8.	1997	Etes	1/3	Nincs adat	2 igazolt KE
9.	1999	Gyűrűfű	Nincs adat	Nincs adat	4 igazolt KE
10.	2004	Fertőrákos	0/4	4	4 igazolt KE
11.	2007	Nemesvid	2/7	7	5 igazolt KE
12.	2007	Lakhegy	4/75	154	25 igazolt KE
13.	2008	Úny	Nincs adat	2	2 igazolt KE
14.	2009	Biatorbágy	Nincs adat	1	1 igazolt KE
15.	2010	Mohács	1/1	2	1 igazolt KE
Σ		15 járvány			94 igazolt

1. táblázat. Emberi megbetegedést is okozó, tej eredetű KEV fertőzések Magyarországon.

3.4.3. Az állatok fertőződése és a tej szennyeződése kullancsencephalitis vírussal

A KEV főként kullancscsípés útján terjed; azonban a kullancsok nemcsak az embert, hanem az állatokat is megfertőzik, így kerül a vírus a tejlő állatok tejébe.^{100,101} Amikor a fertőzött kullancs megcsípi az állatot, a vírus először eljut a helyi nyirokcsomókba, ahonnan a nyirokkeringésen keresztül belép a vérkeringésbe. A kecskék esetében ez a fertőzést követő negyedik nap körül következik be. A virémia időtartama függ a bekerült vírusedménységtől, amit az is befolyásol, hogy az egyedfejlődés mely fázisában levő kullancs csípte meg az állatot (lárva, nimfa, vagy kifejlett). A neutralizáló ellenanyagok a fertőzést követő 10-13. napon jelennek meg először attól függően, hogy kifejlett nőtények vagy nimfák voltak a vektorok¹⁰². Az állatokban a fertőzés tünetmentesen zajlik, és teljes gyógyulással zárul, de a virémiás fázisban a vírus kiválasztódik és ürül a tejjel. Így a nyers tej és a pasztörözetlen tejből készült tejtermékek (pl. sajt) fertőzőek lehetnek, amennyiben a kisüzemi előállítás módszertanát alkalmazzák.^{55,103} A fertőzött tej a szopós kecskegidákra nézve is veszélyes lehet: ezt a KEV legközelebbi rokona, a Louping Ill vírus esetében kísérlettel igazolták.¹⁰⁴

A legeltetett kérődzők gyakran kerülnek kapcsolatba a kullancsokkal¹⁰⁵, és közülük is leggyakrabban a kecskék, mivel azok fő tápláléka a fűfélék és a cserjék hajtásai. A kullancsok a KEV mellett sok egyéb kórokozóval is megfertőzhetik a kecskéket és a többi tejet adó állatot. Egy elmélet szerint az *Anaplasma phagocytophilum*-mal való fertőzés (amelyet szintén a kullancsok terjesztenek) következtében kialakuló immunszuppresszió segítheti a KEV tejbe jutását.¹⁰³ Amikor egy kecskét kísérleti úton megfertőztek, a KEV a fertőzést követő 3.-8. napok között volt kimutatható a tejéből embrionált tyúktojásba illetve felnőtt egerekbe való oltással, miközben a kecske testhőmérséklete normális volt és egyéb tünetei sem voltak.¹⁰⁶ Egy későbbi vizsgálatban a KEV-t a fertőzést követő 5.-25. nap között ismételtelen izolálni tudták a fertőzött kecskék tejéből, és a fertőzőképesség a tej feldolgozása után is megmaradt a különböző tejtermékekben, pl. joghurtban, sajtban és vajban.¹⁰⁷ Mások arról számoltak be, hogy a KEV bizonyítottan virulens volt a tehének, kecskék és juhok tejében egészen a fertőzést követő 8. napig.⁴⁸ Az előírászerű pasztörözéssel azonban megelőzhetők a tej eredetű KEV fertőzések.⁷⁴

3.4.4. A tápcsatornán át fertőző KE klinikai jellegzetességei

A KEV a flavivírusok közé tartozik, tehát burkos RNS-vírus, amely viszonylag érzékeny pl. a hőre és a detergensekre. Mégis képes megtartani fertőzőképességét a csökkent aktivitású (pH 2,46-3,46) és a normális (pH 1,49-1,80) gyomornedvben is 2 órán át, mert a tejfehérjék védőkolloidot képeznek a vírussal. A savas közegben mutatott stabilitása hasonló a polio és Coxsackie vírusokéhoz.⁹⁰ A tej fogyasztása csökkenti a gyomorban a H⁺-koncentrációt. A tejtartalmú ételek meglehetősen gyorsan távoznak a gyomorból, (az elfogyasztott tej percekben belül eljut a patkóbélbe, és 1,5-2 óra múlva a gyomor már egyáltalán nem tartalmaz tejet).¹⁰⁷ Ily módon a KEV is elérheti a patkóbelet anélkül, hogy elveszítené a fertőzőképességét, és ott feltehetőleg a Peyer-plakkok M-sejtjeihez kötődik. Az M-sejtek képesek transzcitózissal átjuttatni a kórokozókat a bélnyálkahártya alatti nyirokszövetbe, ahonnan a helyi nyirokcsomókon és a ductus thoracicuson keresztül elérhető a véráram, és a vérrrel a kórokozók eljuthatnak a másodlagos replikáció helyére. Ezt a folyamatot már leírták az enterovírusokkal kapcsolatban, amelyekről tudjuk, hogy a gazdaszervezetbe az emésztőrendszeren keresztül jutnak be, és ott gyakran tünetmentes fertőzést okozva később továbbterjednek a gyomor-bélrendszerből, és távoli szövetekben és szervekben okoznak jelentős betegségeket, pl. a poliovírusok a központi idegrendszert fertőzik meg.¹⁰⁸

A fertőzött tejtől elkapott KE betegség lefolyása kétfázisú, ahogy ez a kullancscsípést követően is gyakran megfigyelhető. Az első fázis tünetei a hirtelen magas láz, a fejfájás, az izom- és ízületi fájdalom, időnként a hányinger, hányás és a fáradtság. Ezek a tünetek 5-10 nap után megszűnnek, és 6-10 napos tünetmentes szakasz következik. A második lázas fázisban a magas láz és a többi tünet is újból jelentkezik, ezúttal súlyosabb formában, és idegrendszeri tünetek is kialakulhatnak. Az idegrendszeri komplikációk általában nem annyira súlyosak, mint a kullancscsípéssel terjedő KE során.¹⁰⁷ Nagy a valószínűsége a teljes, maradványtünetek nélküli gyógyulásnak, de vannak irodalmi adatok olyan megbetegedésekről is, ahol élelmiszer eredetű fertőzést követően alakult ki izomgyengeség és bénulás.⁸⁹

4. CÉLKITŰZÉSEK

4.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták vizsgálata

- Kecsketej eredetű humán KE megbetegedések laboratóriumi igazolása
- KEV elleni specifikus IgG és IgM kimutatása rutindiagnosztikai módszerekkel (indirekt IF, hemagglutináció gátlás, vírusneutralizáció) a lakhegyi járványt okozó kecskefarm kecskéinek véréből
- A minták vizsgálata (lengyel fejlesztésű) ELISA módszerrel és az eredmények összehasonlítása a rutin módszerek eredményeivel

4.2. Kecskék KEV fertőzésének vizsgálata

- Kísérletileg KE vírussal fertőzött kecskék testhőmérsékletének statisztikai elemzése és a láztalan lefolyás igazolása
- KEV tejjel való ürülésének időbeli leírása
- A tejjel ürülő vírus mennyiségének vizsgálata
- Annak vizsgálata, hogy megelőzhető-e a tejjel való vírusürítés a kecskék humán oltóanyaggal való immunizálásával

4.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata

- KEV tartalmú kecsketej fertőzőképességének vizsgálata szobahőmérsékleten történt inkubációt követően
- KEV tartalmú kecsketej fertőzőképességének vizsgálata hőkezelés (melegítés, forralás) után

5. MÓDSZEREK

5.1. Állatkísérletek

5.1.1. Fertőzőképes vírus kimutatása *in vivo* tenyésztéssel

A kísérleteket az Országos Epidemiológiai Központ Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával, és az állatkísérletekre vonatkozó nemzeti és nemzetközi szabályoknak [243/1998 (XII.31.) Kormányrendelet az állatkísérletek végzéséről] megfelelően végeztük.

Az 1-2 napos szopós NMRI egereket intracerebrálisan fertőztük a vizsgált mintával. A fertőző anyag (0,01-0,02 ml kecsketej) beadása altatás nélkül, a koponya hosszanti középvonalától kissé oldalirányban, a frontális agylebenybe történt. Egy vagy két almot (összesen 10-12 kölyök) oltottunk be egy-egy anyaggal, majd 10 napig naponta kétszer ellenőriztük az egerek állapotát. A kevesebb, mint 24 óra elteltével elpusztuló állatok esetében nem virológiai okokra vezettük vissza az elhullást, de a kérdéses esetekben az állatokat felboncoltuk, és az agyuk szopós egerekbe való továbboltásával ellenőriztük, hogy a vírus okozta-e a halálukat. A tünetek, amelyek az állatok betegségét jelzik: a táplálkozás hiánya, szokatlan szín, kis testméret, szokatlan aktivitás, remegés, vagy oldalt fekvés. A kissé idősebb állatoknál gyakori a lábak bénulása, a remegés és a gyengeség.

A betegnek talált állatokat eutanáziában részesítettük, a koponyatetőt steril ollóval eltávolítottuk, és az agyat kiemeltük. Az agyból nyúlsavós szuszpenziót készítettünk, amelyet szétosztva fagyaszttva tároltunk későbbi felhasználásig. Amelyik vizsgálati anyag beoltásakor a betegség jelei mutatkoztak az egereken, arról az anyagról feljegyeztük, hogy tartalmazott élő, fertőzőképes vírust, kivéve, ha a tünetek a beoltást követő 24 órán belül jelentkeztek (ekkor megerősítő vizsgálatot végeztünk, l. fent).

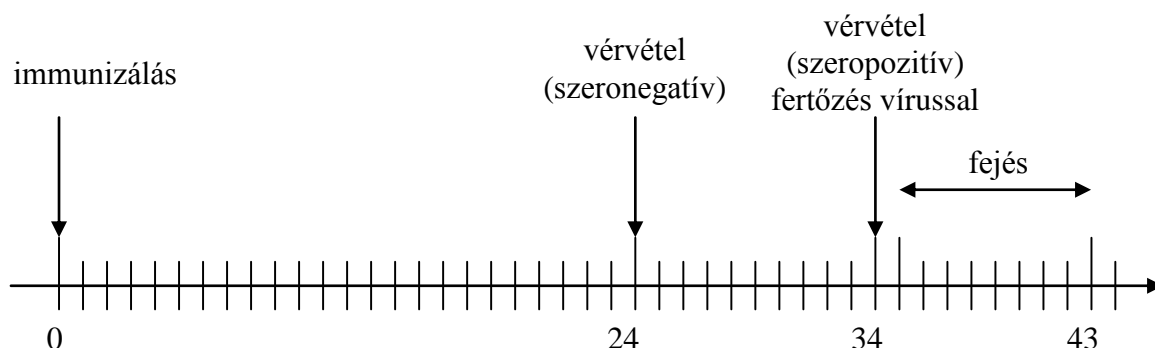
5.1.2. Kecskék immunizálása humán oltóanyaggal és fertőzése élő KE vírussal

Hús tejelő kecskét, amelyeknek kb. 3 hetes szopós gidái voltak, négy csoportra osztottunk, minden csoportban öt anyával. A négy csoportot egymástól elkülönítve tartottunk, szalma almon; takarmányként 3-4 kg szénát és 0,2 kg kukoricát kapott

naponta minden állat. A kecskéket úgy választottuk ki, hogy előzőleg szerológiai vizsgálattal ellenőriztük, hogy mindegyik fogékony kullancsencephalitisre.

Két csoportot immunizáltunk inaktivált humán KEV oltóanyaggal (FSME-IMMUN CC, Baxter vaccine AG, Bécs, Ausztria), amelyet a bőr alá adtunk be az állatok nyakába két alkalommal, 16 napos eltéréssel. A beadott dózis minden állat esetében azonos 0,5-0,5 ml volt (~2 µg tisztított vírus + adjuváns), mivel az állatok testtömege is hasonló volt. Az immunizált állatok szerokonverzióját vérsavó minták indirekt immunfluoreszcencia (IIF) és hemagglutináció gátlás (HAG) vizsgálatával ellenőriztük.

Öt immunizált és öt naiv kecskét megfertőztünk élő KE vírussal, amihez a vírus KEm I törzsét használtuk.^{77,109} KEV-fertőzött szopós egerek agyszuszpenziójából készített, 500 µl élő vírust tartalmazó szűrletet adtunk be az állatoknak bőr alá ca. 10⁴ TCID₅₀ töménységben. A fertőzött kecskéket 9 napon keresztül naponta megfejtük (a fejest végző személy előzőleg FSME védőoltás-sorozatban részesült), és ezzel párhuzamosan naponta feljegyeztük a tüneteiket és testhőmérsékletüket. A tíz kontroll állat (öt naiv és öt immunizált) tüneteit és testhőmérsékletét szintén rögzítettük. A kísérlet menetét a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra. A kísérlet időbeli lefolyása. Az immunizált kecskéket az immunizálást (0, nap) követő 24. napon megvizsgáltuk, ekkor szeronegatívnak bizonyultak. A 34. napon újra vért vettünk, és mivel ekkor a szerológiai vizsgálat szerint már kimutatható volt a vérükből a specifikus IgG, ekkor fertőztük meg őket. (Ugyanebben az időpontban fertőztük a naiv állatokat is.) A fertőzést követően mind az immunizált, mind a naiv kecskéket 9 napon át minden nap fejtük.

5.2. Vizsgálati minták

5.2.1. Emberi vér- és liquorminták a lakhegyi járványból

Harmincegy beteg vérsavómintáját vizsgáltuk, akik korábban nyers kecsketejet ittak, és tüneteik alapján gyanítható volt, hogy KE vírussal fertőződtek. A mintákat a tünetek megjelenése utáni 1. és 25. nap között vettük. Három beteg esetében liquor minta is rendelkezésre állt. Nyolc embertől, akik ittak a fertőzött tejből, de tünetmentesek voltak, szintén kaptunk vérmintát. A mintákat a vizsgálatig +4°C-on, utána pedig -20°C-on tároltuk.

5.2.2. Kecske vérminták a lakhegyi kecskefarmról

A fertőzés forrásaként azonosított kecskefarm minden kecskéjétől (73 anya és 2 bak) kaptunk vérmintát. Az állatok 2-8 év közöttiek voltak. A mintákat a vizsgálatig +4°C-on, utána pedig -20°C-on tároltuk.

5.2.3. Kecske vér- és tejminták a kecskekísérletből

Az immunizált kecskéktől vért vettünk az immunizálást követő 24. illetve 34. napon, hogy megállapíthassuk, kialakult-e a védettség. A vérmintákat +4°C-on tároltuk, amíg a szerológiai vizsgálatokat el nem végeztük, azt követően pedig -20°C-on. A tíz KE vírussal fertőzött kecskét (amelyek közül öt előzőleg immunizálva volt KEV ellen) a fertőzést követően 9 napon át fejtük, majd a 13. és 23. napon újból. (A 23. napon már csak 4 kecske adott tejet.) A tejmintákat a vizsgálatok elvégzéséig -20°C-on tároltuk. A vizsgálat előtt kiolvasztottuk, és vortexszel felkevertük őket.

5.3. Szerológiai módszerek

Az alább leírt HAG és IIF vizsgálati módszerek minőségét egy külső minőségbiztosítási program keretében ellenőrizték, amelyet a „Behurcolt Vírusbetegségek Európai Hálózata” (European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases – ENIVD) szervezett.¹¹⁰ A Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma mind az IgM, mind az IgG emberi mintákból való kimutatásában jó eredményt ért el.

5.3.1. Hemagglutináció gátlás (HAG)

A HAG vizsgálatokat a Takátsy-módszer¹¹¹ módosított változata szerint végeztük. A humán savóban jelenlevő aspecifikus inhibitorokat acetonnal vagy kaolinnal távolítottuk el a vérsavókból, az aspecifikus hemagglutinineket pedig liba vörösvértestekkel.¹¹² A vérsavók teljes ellenanyag-tartalmát (IgM és IgG) liba vörösvértestek és saját készítésű KEV antigén segítségével titráltuk meg, utóbbit az első magyar KEV izolátumból, a KEm I törzsből készítettük, a leírt módszerek szerint.¹¹² A vérsavó 1:10-es vagy magasabb véghígításában kimutatható hemagglutináció gátlást értékeltük reaktívként.

Az IgM meghatározáshoz a vérsavókat ioncserélő kromatográfiával fracionáltuk¹¹³, és az IgM-ben gazdag frakciót 2-merkapto-etanollal kezeltük. A kezelés célja, hogy az IgM aktív konformációját fenntartó S-S hidakat redukáljuk, így az nem tud az antigénhez kötődni. Tehát IgM jelenlétében a kezelést követően a titernek a kezeletlen mintá(k)hoz viszonyított értéke lecsökken. A kezelt és a kezeletlen minta közötti négyszeres titercsökkenést IgM-pozitivitásként értékeltük.

5.3.2. Indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálat (IIF)

A saját készítésű specifikus tárgylemezekhez olyan Vero sejteket használtunk, amelyeket KE vírussal fertőzött szopós egerek agy-homogenizátumával fertőztünk meg, és 5 napig hagytuk rajtuk a vírust szaporodni. A lemezekhez használandó sejteket ezután PBS-ben mostuk, rászárítottuk a tárgylemezekre és -20°C-os acetonnal fixáltuk.

A kezdeti 1:5 hígítás után minden vérsavómintából felező hígítási sort készítettünk PBS-sel. Minden hígítási fokból egy cseppet cseppentettünk a tárgylemezen levő sejtekhez. A tárgylemezeket egy órán át 37°C-on inkubáltuk nedveskamrában. Három PBS-es mosás után a sejtekre rácseppentettük a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt, anti-humán (Anti-human IgG-FITC conjugate, Anti-human IgM-FITC conjugate, Dako, Glostrup, Dánia) vagy anti-kecske (Anti-Goat IgG-FITC conjugate, Calbiochem, San Diego, USA, és Anti-Goat IgM-FITC conjugate, Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio, USA) IgG és IgM ellenanyagot („konjugátumot”), amelyet a gyártó cég előírása szerint előzőleg PBS-sel 1:20 arányban hígítottunk. A lemezeket ezután 30 percen át inkubáltuk 37°C-on, nedveskamrában. Ezután három PBS-es mosással eltávolítottuk a nem kötődött konjugátumot. A

tárgylemezre egy csepp 1:1 arányú PBS-glicerint, majd fedőlemezt tettünk, és fluoreszcens mikroszkóp alatt (Axiostar plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) vizsgáltuk a fluoreszcenciát.

Az emberi minták esetében az 1:10-es hígításban nem mérhető fluoreszcenciát negatívként értékeltük, az 1:10-es hígításban gyengén fluoreszkáló mintákat pedig kétesként. Azokat a mintákat, amelyeknek 1:10-es vagy nagyobb hígításában erős fluoreszcenciát tapasztaltunk, reaktívként értékeltük.

5.3.3. Mikroneutralizációs vizsgálat (kecske vérsavók)

Először a vírusszuspenziót (KEm I törzs) titráltuk meg Vero sejteken, hogy megtaláljuk azt a hígítási fokot, amely megfelel 100 TCID₅₀-nek. A 100 TCID₅₀ töménységű vírusból 50 µl-t inkubáltunk a vérsavóból készített hígítási sor minden fokozatának 50 µl-ével. Az egy órás 37°C-os inkubáció után minden keverékből 50 µl-t adtunk 100 µl Vero sejt szuszpenzióhoz 50 µl Parker-199 tápfolyadékkal, a mikrolemezt lefedtük, és 37°C-on inkubáltuk tovább. Öt nappal később mikroszkóp alatt értékeltük a sejtkárosító hatást. A neutralizációs titert (Nt) az a legmagasabb vérsavó hígítás jelentette, amely még gátolta a vírus sejtkárosító hatását.

5.3.4. Kecske minták vizsgálatára alkalmazott ELISA módszer

A mintákat az FSME ELISA IgG teszt (Genzyme Virotech, Rüsselsheim, Németország) kompetíciós gátlásra módosított változatával (az emberi vérsavó reaktivitásának gátlása kecske ellenanyagokkal) vizsgálták a lengyel Országos Közegészségügyi Intézetben. A módszert egy HAG vizsgálatban igazoltan anti-KEV IgG pozitív (1:128 titerű) kecske vérsavójával mint kontroll anyaggal hitelesítették. A kontroll savót (néhai) dr. Milan Labuda bocsátotta rendelkezésre (Zoológiai Intézet, Szlovák Tudományos Akadémia).

A gátlást összekevert (poolozott), KEV IgG-re pozitív (180 VIEU/ml, +/- 14,6) emberi vérsavókkal mutatták ki. Az IgG-re pozitív emberi vérsavó hígítási fokát úgy választották meg, hogy az ELISA eredmények mindig legalább 0,5 OD-vel a cut-off fölé essenek. Az anti-KEV-re pozitív kecske minta hígítását pedig úgy választották meg, hogy az emberi IgG ellenanyagok reaktivitásának legalább 80%-át gátolja.

Az anti-KEV-re pozitív kecske vérsavó 1:50-es hígításban teljesen meggátolta az emberi IgG ellenanyagok kötődését (IgG-re negatív emberi minta: OD=0,096, cut-

off=0,196, +/- 0,037, IgG-re pozitív emberi minta gátlás nélkül: OD=0,614, +/- 0,089, és gátlás után: OD=0,080, +/- 0,006). Amikor 1:100-as hígításban vizsgálták, az emberi IgG ellenanyagok aktivitásának 85%-át gátolta, 1:200-as hígításban a 67%-át, 1:400-as hígításban pedig 50%-át. A kecske vérsavó nem reagált az emberi IgG elleni konjugátummal. A gátlási függvény görbéje alapján a módszerre a következő kritikus értékeket határozták meg:

- Az eredményeket pozitívnak értékelték, ha a gátlás 40% felett volt,
- kétesnek, ha 25-40% között volt,
- és negatívnak, ha 25% alatt volt.

A módszer érzékenységét és reprodukálhatóságát úgy mérték fel, hogy 341 kecske vérsavóját vizsgálták meg vele (a kontroll mintákon kívül). A pozitív és kétes mintákat, valamint a negatív minták egy véletlenszerűen kiválogatott csoportját és a kontroll savót elküldték HAG és IIF módszerekkel történő megerősítő vizsgálatra a magyarországi Országos Epidemiológiai Központba, a Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriumába. A vérsavók ELISA eredményei 97%-os pontossággal megegyeztek a klasszikus módszerekkel (HAG, IIF) kapott eredményekkel. A rendszer bizonytalanságát 12,5%-ban állapították meg, a pozitív eredmények reprodukálhatósága 100%, a kéteseké 72%. Az álnegatív eredmények oka valószínűleg az erős hemolízis lehetett.

5.4. Molekuláris módszerek

5.4.1. Nukleinsav-tisztítás

A tejminták 140 µl-éből vontuk ki a virális RNS-t a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó cég leírása szerint. Az RNS-t 60 µl elúciós pufferben eluáltuk.

5.4.2. Vírus RNS kimutatása kecsketejből nested RT-PCR-rel

A reverz transzkripcióhoz 2 µl tisztított RNS-oldatot használtunk, a maradékot -70°C-on tároltuk. A reverz transzkripciót 20 µl-es reakciótér fogatban végeztük a GeneAmp RNA PCR kit reagenseivel (Applied Biosystems, Foster City, CA USA).

Az ún. „nested” (fészkes, kétkörös) PCR-hez a vírus NS5 régiójára tervezett primereket használtunk^{114,115}, az ott leírthoz képest kissé módosított PCR protokollal,

amelyet a következőkben részletezünk. A PCR első köre az RT reakcióelegy 2 µl-én kívül a következőket tartalmazta 42 µl végtérfogatban: 4 µl GeneAmp 15 mM MgCl₂-tartalmú 10X PCR puffer, 1 µl 25 mM MgCl₂-oldat, 4 µl dNTP keverék (10 mM), 0,5 µl az első kör primerjeiből (50 pM) és 0,25 µl AmpliTaq DNS-polimeráz enzim (Roche Molecular Systems Inc, Branchburg, NJ USA). Az amplifikáció harmincöt ciklusból állt (30 s 95°C-on, 30 s 55°C-on, 30 s 72°C-on), és Eppendorf Mastercycler készülékben történt. Ebből a reakcióelegyből 2 µl-t vittünk tovább a PCR második körébe, amely 30 ciklusos volt. A reakcióelegy összetétele megegyezett a PCR első körében használttal, azzal a kivétellel, hogy a belső primereket 20 pM töménységben használtuk. Az amplifikáció után a termékek 10 µl-ét futtattuk meg 2%-os agaróz gélben, etídium-bromid hozzáadásával, az eredményt UV fényvel megvilágítva fényképeztük és értékeltük.

5.4.3. Relatív mennyiségi RT-PCR

A kiválasztott mintákban levő vírusmennyiség meghatározásához 5 µl eluált RNS-t vizsgáltunk egy lépéses valós idejű RT-PCR reakcióban, amihez a SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System kitet használtuk (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) a publikált protokoll módosított változatával⁶⁸, LightCycler 2.0 készülékben (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). A minták eredményeit a saját készítésű KEV hígítási sorhoz hasonlítottuk. A fluoreszcencia értékeket a LightCycler Software 4.0 segítségével elemeztük.

5.5. Fertőző vírusrészecskéket tartalmazó, poolozott tejminták hőkezelése

A hőkezelés (melegítés, forralás vagy pasztörözés) a tejben levő kórokozókra gyakorolt hatásának vizsgálatához kiválasztottunk két kecskét: egyet, amelyiknek a mennyiségi PCR eredményei alapján jelentősen több vírust tartalmazott a teje, és egy másikat, amelyiknek a tejében kevesebb vírus volt (az állatok azonosítószámai: 76967; 77702). Mindkét kecske pozitív tejmintáiból készítettünk egy-egy poolt, amelyeknek megegyező térfogatait használtuk a különböző hőkezelési kísérletekben: szobahőmérsékleten inkubáltuk őket 3, 6, 12, 24, illetve 48 óráig; 65°C-on 5, 15, illetve 30 percig; és 100°C-on 3 percig. A 65°C-os hőkezelést vízfürdőben végeztük (HETO, IBN 18 / HWT 100-as modell, Heto-Holten A/S, Allerød, Dánia), a 100°C-os hőkezeléshez pedig a mintákat tartalmazó csöveket forrásban levő vízbe merítettük. A

hőkezelt tejmintákat szopós egerek agyába oltottuk (a már előzőekben ismertetett módon), és 10 napon keresztül naponta kétszer ellenőriztük az állatok állapotát (lásd 5.1.1).

5.6. Kecske testhőmérséklet-adatok statisztikai elemzése

A kecskék testhőmérsékleti adatait a Minitab® 15.1.1.0. szoftver (Minitab Inc., State College, Pennsylvania) segítségével elemeztük: két szempontos ANOVA varianciaanalízist végeztünk, ahol $p < 0,05$. Vizsgáltuk az immunizálás illetve a fertőzés testhőmérsékletre gyakorolt hatását, összehasonlítva a nem immunizált illetve nem fertőzött kontrollokkal.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Lakhegyi tej eredetű KEV járvány vizsgálata

A laboratóriumba szerológiai vizsgálatra küldött 39 emberi vérsavóból 25-ről mutattuk ki, hogy anti-KEV ellenanyagokra – IgG-re és IgM-re is – pozitív, IIF módszerrel és a megerősítő HAG próbával is. A 3 liquor mintából kettő tartalmazott specifikus IgG-t, a harmadik negatívnak bizonyult. Mindazoknál a betegeknél, akiknek KEV antigénnel reaktív volt a vérsavója, igazoltuk az aktuális KEV fertőzést.

Hat betegnek olyan tünetei voltak, amelyek a KE első fázisára lehetnek jellemzőek, például hányinger, hasmenés és szédülés, de második lázas fázis és/vagy idegrendszeri tünetek nem jelentkeztek náluk. Ezeknek a betegeknek a vérsavói negatívnak bizonyultak anti-KEV ellenanyagokra, így a klinikai kép ismeretében ezekben az esetekben a KEV fertőzés nem volt bizonyítható.

A 39 emberi vérsavó között nyolc olyan személy mintáit is megvizsgáltuk, akik fertőződhetnek, de tünetmentesek voltak. Ezek az emberek mind ittak a kecskefarmról származó nyers tejből, ellenanyagot azonban csak az egyikük vérsavójában találtunk, ami valószínűleg egy korábbi fertőzés eredménye lehetett egyrészt az IgG alacsony titere alapján, másrészt mert IgM nem volt kimutatható. Mivel ez a személy nem volt oltva KEV-fertőzés ellen, az IgG ellenanyagok egy korábban lezajlott tünetmentes fertőzés következtében lehettek jelen a szervezetében.

Mivel a farmon összekeverték a kecskék tejét, mielőtt a piacon árusították volna, az összes tejelő állat vérmintáját meg kellett vizsgálnunk, ha meg akartuk találni a fertőzés forrását (vagy forrásait). Azoktól az anyaállatoktól, amelyeket nem fejtek (4) és a bakoktól is (2) kaptunk vérsavó mintát, mert ezek további információval szolgáltak a kecskék fertőzéseiről. A humán diagnosztikai rutinmódszereket alapul véve először IIF módszerrel vizsgáltuk meg a kecske vérsavókat. Ez a módszer azonban erősen reaktív, de nem specifikus eredményt hozott a kecske mintáknál, így más vizsgálati módszereket alkalmaztunk, hogy az ellenanyagtitereket meghatározzuk, illetve megerősítsük, különösen azoknak a mintáknak az esetében, amelyeknél kiugróan magas ellenanyagszintet mértünk IIF teszttel. A laboratórium által rutinszerűen alkalmazott HAG próbán kívül a vérsavókat mikroneutralizációval is, és a lengyel fejlesztésű ELISA teszttel is megvizsgáltuk (az eredmények összefoglalása a 2. táblázatban található).

2. táblázat. A kecske vérsavók ellenanyagtiterei indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal (IIF), hemagglutináció gátlással (HAG), mikroneutralizációval (NT) és ELISA-val.

Minták száma	Nem	IIF titer	HAG (összellenanyag titer: IgM + IgG)		HAG + merkapto-etanolos kezelés (vírus-specifikus IgM kimutatása)		NT titer	ELISA gátlás %
			rutin módszer	dupla aspecifikus hemagglutinin eltávolítási lépés	rutin módszer	dupla aspecifikus hemagglutinin eltávolítási lépés		
alacsony IIF és HAG titerű minták								
40	nőstény	±1:40 és 1:160 között	<1:10 vagy ±1:10	egy esetben elvégezve: <1:10	-	-	2 esetben elvégezve : <1:10	3 esetben elvégezve: <25
magasabb IIF és HAG titerű minták, melyek NT-ben és/vagy ELISA-ban negatívak lettek								
26	nőstény	±1:160 és 1:640 között	<1:10 to ±1:80	<1:10 - 1:40	12 esetben elvégezve: mind negatív	14 esetben elvégezve: mind negatív	<1:10 - 1:10	12 esetben elvégezve: <25
1	nőstény	±1:160	1:40	1:80	negatív	negatív	±1:10	34
1	nőstény	±1:160	±1:640	±1:640	negatív	pozitív	±1:40	62
1	nőstény	±1:320	±1:160	±1:160	negatív	negatív	±1:160	72
a nem fejt nőstények és a bakok mintái								
1	nőstény	1:160	±1:80	1:80	negatív	negatív	1:20	<25
1	nőstény	±1:40	±1:10	-	-	-	-	-
1	nőstény	±1:160	<1:10	-	-	-	-	-
1	nőstény	±1:160	<1:10	-	-	-	<1:10	-
1	bak	±1:80	<1:10	-	-	-	-	-
1	bak	±1:80	<1:10	-	-	-	<1:10	-

A dőlt betűvel írt értékeket kétesnek, a félkövérrel írtakat pozitívnak értékeltük.

± : a végtitert jelentő hígítási fokban a fluoreszcencia gyengébb volt, mint a kisebb hígítási fokokban

- : nem vizsgáltuk

A 75 kecskéből 12-nek a vérsavója volt reaktív (11 fejt nőstényé és egy nem fejt nőstényé), és 11-é kétes a HAG próbával, az ellenanyag végtiterek az 1:10-es és 1:640-es vérsavóhígítások között voltak. Az összes reaktív és 4 kétes mintát kromatográfiával frakcionáltunk, és az IgM-et tartalmazó frakciót 2-merkaptó-etanollal kezeltük. Ebben az első vizsgálatban egy mintánál sem tapasztaltunk titercsökkenést, ami feltételezésünk szerint az aspecifikus hemagglutinációs reakció következménye volt, ezért megismételtük a próbát a minták egy kiválasztott csoportjával (12 reaktív, 7 kétes és 12 negatív mintával). A liba vörösvérsejtekkel végzett aspecifikus hemagglutinin eltávolítási lépést kétszer végeztük el, aminek eredményeként 12 minta reaktív, 13 minta kétesnek és 6 minta negatívnak bizonyult. A reaktív minták esetében az összellenanyag-titerek hasonlóak voltak az első vizsgálatéhoz, csak egy mintának lett sokkal alacsonyabb titere, mint előzőleg. Az IgM-kimutatást 18 mintánál próbáltuk meg (9 reaktív, 8 kétes és 1 negatív mintánál), és egyetlen mintánál megfigyelhető volt a markáns titercsökkenés. Ez azt jelenti, hogy a kezdeti liba vörösvérsejtes kezelés eltávolította az aspecifikus hemagglutinineket, amelyek elfedték a specifikus IgM-választ. Az aspecifikus inhibitorokat egyéb módszerrel is megpróbáltuk eltávolítani, például aceton helyett kaolinos kezeléssel, a mintákat fiziológiás sóoldatban illetve borátpufferben hígítva. Ezek közül a módszerek közül egyikkel sem kaptunk az eredetitől lényegesen különböző eredményeket.

A mikroneutralizációs tesztben 34 kecske vérsavóját vizsgáltuk meg, amelyek közül 3 bizonyult pozitívnak, 4 kétesnek és 27 negatívnak anti-KEV ellenanyagokra. A mikroneutralizációval pozitív minták mind HAG, mind IIF módszerrel egyaránt reaktívak voltak.

Az új fejlesztésű ELISA módszerrel 19 mintát vizsgáltunk, ezek közül 2 lett pozitív, 4 kétes és 13 negatív.

A minták végleges minősítéséhez összehasonlítottuk az összes különböző módszer eredményeit és hatékonyságát (l. 7. Megbeszélés).

6.2. Kecskék kísérleti fertőzése

6.2.1. A kecskék testhőmérséklete a fertőzés után

A tíz (öt immunizált és öt naiv) kecske rektális testhőmérsékletét fertőzés után 10 napon keresztül minden nap mértük, hogy észleljük az esetleges lázas állapotot.

Kontroll adatként nem fertőzött naiv és immunizált kecskék testhőmérsékletét is rögzítettük a megfelelő időtartamokban. A testhőmérsékleti adatokat a 3. táblázat A) részében foglaltuk össze, ahol ezen adatok a kecskék tejével végzett vírusizolálási és – kimutatási kísérletek eredményeivel is összevethetők. A táblázat B) részében összehasonlításként bemutatjuk az előzőleg immunizált, majd megfertőzött kecskék testhőmérsékleti adatait.

A hőmérsékleti adatokat két szempontos ANOVA módszerrel ($p < 0,05$) hasonlítottuk össze és elemeztük, de nem találtunk lényeges eltérést a fertőzött ($38,75^{\circ}\text{C}$), az immunizált-fertőzött ($38,89^{\circ}\text{C}$), az immunizált kontroll ($38,99^{\circ}\text{C}$) és a naiv kontroll ($38,94^{\circ}\text{C}$) csoportok átlagos testhőmérsékletei között. Az egyes napokon mért testhőmérsékletek átlagait is összehasonlítottuk, de nem találtunk szignifikáns eltérést ($p < 0,05$). A hőmérsékleti görbék grafikus ábrázolása alapján feltételeztük, hogy az egyik állatnál volt egy több napon át tartó folyamatos növekedés majd csúcs a testhőmérsékleti értékekben, de a statisztikai elemzés szerint ez sem volt szignifikáns, és hasonlóan jól látható eltérés negatív irányban is megfigyelhető volt egy másik állatnál.

6.2.2. Immunizált kecskék szerológiai eredményei

A KEV elleni immunizálást követő 24. és 34. napon három kecskétől vért vettünk, hogy felmérjük az állatok immunológiai állapotát. A vérsavó mintákat indirekt immunfluoreszcens teszttel vizsgáltuk, pozitív eredmény esetén hemagglutináció gátlással is megerősítettük az anti-KEV IgG ellenanyagok jelenlétét. Huszonnégy nappal az immunizálás után a háromból egy kecske sem volt pozitív anti-KEV ellenanyagokra. Tíz nappal később (a 34. napon) újabb vérmintákat vettünk az ötből három kecskétől, és ezeket is megvizsgáltuk. Ezúttal a vizsgált vérsavókban kimutatható volt a specifikus IgG-vel való immunreakció indirekt immunfluoreszcenciával és hemagglutináció gátlással egyaránt. Az IIF ellenanyagtiter 1:40 volt mindhárom állatnál, a megerősítő HAG vizsgálatban pedig 1:20, 1:20 és 1:160 titereket kaptunk. Így ezt a napot választottuk az immunizált kecskék megfertőzésére.

3. táblázat. Testhőmérsékleti adatok és laboratóriumi eredmények. A) Öt KEV-fertőzött kecske testhőmérsékleti adatai, és a tejmintáik vizsgálati eredményei, melyeket szopós egérbe oltással és specifikus RT-PCR-rel kaptunk, valamint a valós idejű RT-PCR-rel vizsgált minták Ct értékei. A pozitív eredményeket szürke szín jelzi. A valós idejű RT-PCR-hez használt standard a saját készítésű vírusszuszpenzió 1:1000 hígítása volt (Ct=22.01). B): Öt előzőleg immunizált, majd később fertőzött kecske testhőmérsékleti adatai.

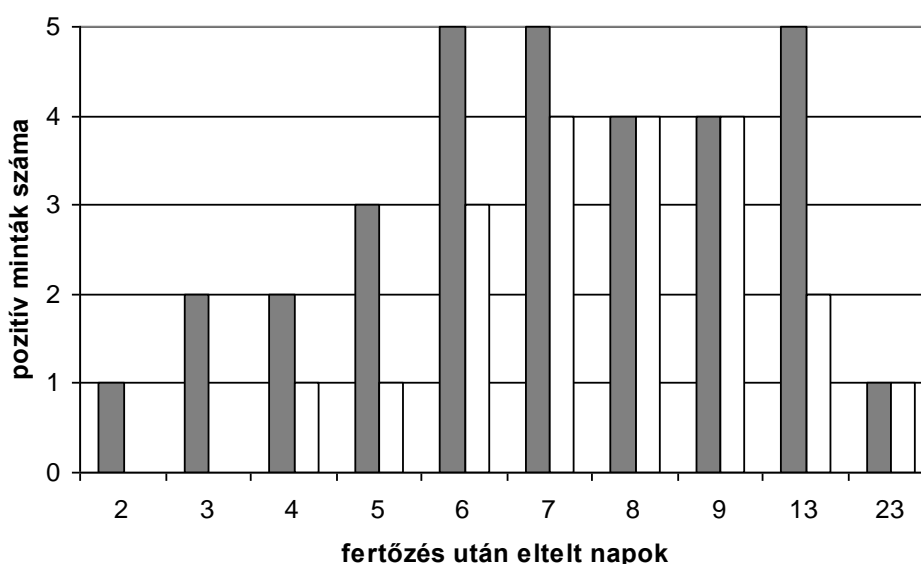
fertőzést követő napok	76110 sz. kecske					76967 sz. kecske					77447 sz. kecske					77450 sz. kecske					77702 sz. kecske				
	T (°C)	VI	PCR	qPCR	Ct	T (°C)	VI	PCR	qPCR	Ct	T (°C)	VI	PCR	qPCR	Ct	T (°C)	VI	PCR	qPCR	Ct	T (°C)	VI	PCR	qPCR	Ct
0	38.8		nem volt minta			38.6		nem volt minta			38.6		nem volt minta			38.9		nem volt minta			38.5		nem volt minta		
1	38.5		nem volt minta			38.5		nem volt minta			38.5		nem volt minta			39.1		nem volt minta			38.7		nem volt minta		
2	37.9	N	N	n.a.		38.4	N	N	n.a.		38.9	P	N	n.a.		37.9	N	N	n.a.		38.7	N	N	n.a.	
3	38.6	N	N	n.a.		38.2	P	N	n.a.		38.8	P	N	n.a.		37.8	N	N	n.a.		38.7	N	N	n.a.	
4	38.8	N	N	n.a.		38.1	P	P	n.a.		38.6	P	N	n.a.		39.3	N	N	n.a.		39	N	N	n.a.	
5	38.9	N	N	n.a.		38.8	P	P	n.a.		38.7	P	N	n.a.		39	N	N	n.a.		38.9	P	N	n.a.	
6	39.2	P	N	32.7		39.6	P	P	13.71		39.1	P	P	29.75		38.7	P	N	35.98		38.5	P	P	27.15	
7	38.7	P	N	n.a.		40.1	P	P	27.19		38.5	P	P	27.35		38.4	P	P	31.67		38.6	P	P	25.64	
8	38.6	N	N	n.a.		39.6	P	P	n.a.		38.9	P	P	n.a.		38.4	P	P	n.a.		38.7	P	P	n.a.	
9	39	N	N	n.a.		39.2	P	P	n.a.		39	P	P	n.a.		38.5	P	P	n.a.		39	P	P	n.a.	
13	38.8	P	N	n.a.		38.8	P	P	n.a.		38.6	P	N	n.a.		37.8	P	N	n.a.		37.8	P	P	n.a.	
23	n.a.	N	N	n.a.		n.a.	N	N	n.a.		n.a.		nem volt minta			n.a.	N	N	n.a.		n.a.	P	P	n.a.	

VI = vírusizolálás, N = negatív, P = pozitív, n.a. = nincs adat.

fertőzést követő napok	75326 sz. kecske	76590 sz. kecske	76699 sz. kecske	76897 sz. kecske	80179 sz. kecske
1	38.1	39.1	39.1	39.3	38.7
2	38.3	39.3	39.2	39.1	38.7
3	38.3	37.1	39	39.2	38.6
4	39	39.1	39.2	39.3	38.9
5	38.9	39	38.9	39.1	38.6
6	38.7	39.1	39	39	38.9
7	38.8	39	39	39.1	39.1
8	38.8	38.9	39.1	38.6	39
9	39	39	38.9	38.8	39.1

6.2.3. KEV kimutatása a fertőzött kecskék tejéből szopós egérbe oltással illetve RT-PCR-rel

Az öt naiv kecske tejét naponta megvizsgáltuk szopós egérbe oltással és RT-PCR-rel a fertőzést követő 2. és 9. nap között, hogy található-e bennük KEV. Két további mintát szintén megvizsgáltunk minden kecskétől a fertőzést követő 13. és 23. napról. A KEV mind az öt kecske tejéből kimutatható volt. A 9. ábra mutatja, hány tejminta volt pozitív KE vírusra szopós egérbe oltással illetve RT-PCR-rel a fertőzést követő egyes napokon, kezdve a 2. naptól.

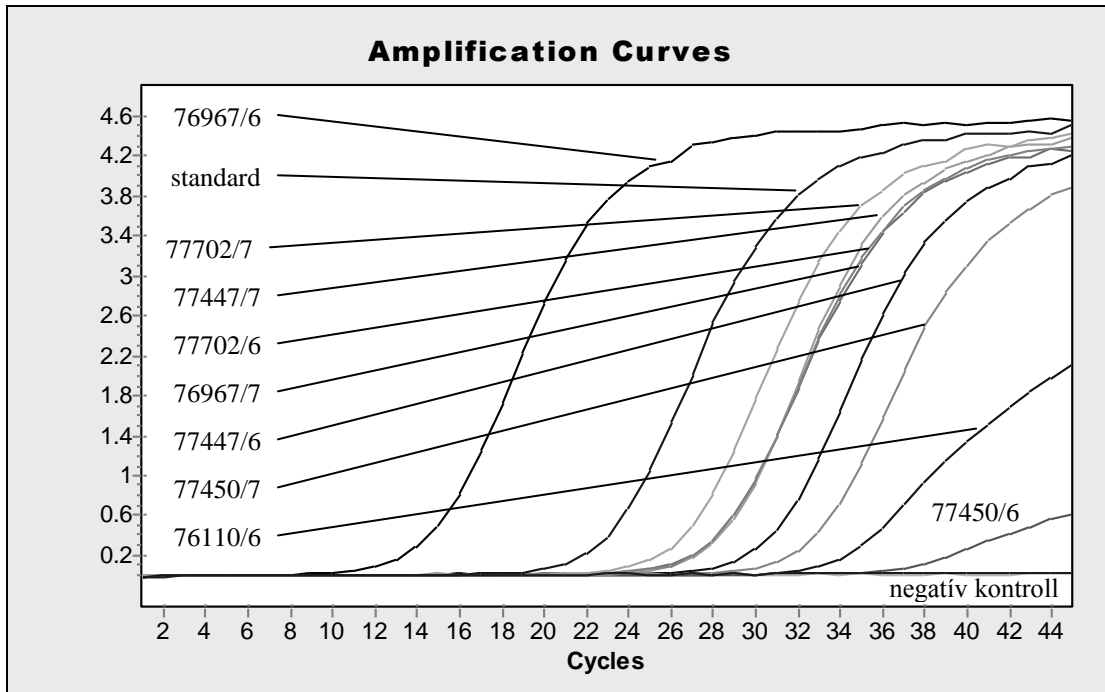


9. ábra. Öt KE vírussal fertőzött kecske tejmintái, amelyek pozitívak lettek KEV-re szopós egérbe oltással illetve specifikus RT-PCR-rel. Szürke: szopós egérbe oltással vizsgálva, fehér: RT-PCR-rel vizsgálva. (Megj.: a 23. napon csak 4 kecskétől állt rendelkezésre minta.)

A fertőzést követő 6. napon már minden kecske tejmintájában kimutatható volt a KEV szopós egérbe oltással, egy állat esetében a legkorábbi pozitív tejminta a 2. napi minta volt. A fertőzést követő 13. napon még mindig kimutatható volt a vírus kiválasztás minden kecske minden tejmintájából szopós egérbe oltással, RT-PCR-rel azonban nem. Ennek oka feltételezhetően az, hogy az egyes állatok tejmintáinak különböző volt a vírustartalma. A 23. napon az öt kecskéből négytől állt rendelkezésre tejminta, és ezek közül egy mindkét módszerrel pozitív volt KE vírusra.

6.2.4. A kiválasztott tejminták víruskoncentrációja

A víruskimutatási eredmények alapján a 6. és 7. napi mintákat választottuk, hogy megmérjük a vírusterhelést valós idejű RT-PCR-rel. A titereket egy standard sorhoz viszonyítottuk, amely a KEV szuszpenzió négy hígítását tartalmazta. A 10. ábra a tejminták és egy standard (1:1000 hígítás) fluoreszcenciájának változását ábrázolja az amplifikációs ciklusok függvényében.



10. ábra. A fertőzést követő 6. és 7. napról származó tejminták amplifikációs görbéi. A futtatáshoz használt standard a saját készítésű vírusszuszpenzió 1:1000-es hígítása volt. Minden mintához feltüntettük annak a kecskének az azonosító számát, amelyiktől származott (ötjegyű szám), és a gyűjtés napját. A 76110/7-es mintánál nem volt kimutatható fluoreszcens jel, ezért ez nincs jelölve az ábrán.

A vizsgált minták Ct (*cross threshold* – a fluoreszcencia küszöb átlépése) ciklus értékeit a 3. táblázat tartalmazza. A 6. napon gyűjtött minták vírustartalma egyenként nagyon különböző volt, a legkorábban (Ct = 13,71) és legkésőbb (Ct = 35,98) detektált minta átlépési pontjai között 22 ciklus volt a különbség. A 7. napon a koncentrációk kevésbé szórta, a Ct értékek 25,64 és 31,67 közé estek, azonban a 76110-es számú kecskénél a 7. napi pozitivitást, amelyet nested RT-PCR-rel mutattunk ki, a valós idejű PCR nem erősítette meg. Mind közül a legmagasabb koncentrációt a 76967-es számú

kecske 6. napi mintájában mértük, amelynek vírustartalma nagyságrendileg a standardként használt fertőzött szopós egér agyszuszpenzió 1:10-es hígításának felelt meg.

6.2.5. KEV kimutatása az előzőleg immunizált fertőzött kecskék tejéből szopós egérbe oltással és RT-PCR-rel

Öt immunizált, majd KE vírussal megfertőzött kecskét minden nap megfejünk a fertőzést követően, és megvizsgáltuk a tejmintákat szopós egérbe oltással, hogy megtudjuk, ürítik-e a fertőző KE vírust a tejükkel az immunizálás ellenére. Az egerek állapotát naponta kétszer ellenőriztük 10 napon keresztül, és csak egy csoportban tapasztaltunk elhullást. Ezt a csoportot a kecskék fertőzését követő második napon fejt tejjel oltottuk be. Ugyanannak a kecskének a további napokról származó tejmintái azonban nem okoztak semmilyen tünetet, és az elhullott egerek agyát nested RT-PCR-rel megvizsgálva sem tudtunk vírust kimutatni. Ebből arra következtettünk, hogy az egerek halálát valószínűleg aspecifikus (feltehetőleg bakteriális) fertőzés okozhatta.

6.2.6. KEV kimutatása fertőzött tejből hőkezelést követően, szopós egérbe oltással

Az egérkísérletek eredményeit a 4. táblázat foglalja össze. Két kecske tejmintáit vizsgáltuk, melyek közül az egyiknek a teje nagy mennyiségű vírust tartalmazott (76967. számú), a másiké kevesebbet (77702. számú).

tej pool eredete	kezeletlen	szobahőmérséklet					hőkezelés			
							65°C			100°C
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	5 min	15 min	30 min	3 min
77702. sz. kecske	4 tfu	4 tfu	4 tfu	4 tfu	5 tfu	5 tfu	nt	nt	nt	nt
76967. sz. kecske	3 tfu	3 tfu	3 tfu	4 tfu	4 tfu	N. a.	4 tfu	4 tfu	4 tfu	nt

4. táblázat. Fertőző KEV kimutatása hőkezelt tejből szopós egérbe oltással. A számok azt jelzik, hány nappal a beadás után kellett eutanáziában részesíteni a szopós egereket a fertőzés egyértelmű tünete miatt. tfu = tünetek a fertőzés után; nt = nem tapasztaltunk a fertőzésre utaló tüneteket. N. a. = nincs adat.

A 77702-es számú kecske esetében a kezeletlen fertőző tej a beadás utáni 4. napon a szopós egerek elhullását okozta. Szobahőmérsékletű inkubáció után a tej még mindig fertőző maradt, és az összes egér elpusztult tőle az inkubáció időtartamától függetlenül.

A vírus még 2 napi szobahőmérsékletű inkubáció után is fertőzőképes volt, bár a tünetek kicsivel később jelentkeztek, mint a kontrollnál. A tej 65°C-os hőkezelésével azonban sikerült megelőzni az egerek fertőződését még a legrövidebb inkubációs idő (5 perc) esetén is. Mivel a 65°C-os hőkezelést általában hosszabb ideig szokás alkalmazni, az, hogy esetünkben még 5 perc is elegendő volt a KEV inaktiválásához, a felhasznált tejminta kis térfogatával függhet össze. A 100°C-os kezelésből 3 perc elegendő volt, hogy megelőzze a szopós egerek fertőződését.

Amikor a magasabb vírustartalmú tejjel kísérleteztünk, a szobahőmérsékletű inkubáció a fentiekhez hasonló eredményt hozott: a vírus fertőzőképes maradt két nap után is, de a tünetek hosszabb inkubációs időt (12-48 órát) követően kissé később jelentkeztek. Figyelemre méltó, hogy a 65°C-os hőkezeléssel ennél a tejnél nem lehetett megelőzni a fertőzést, mert még 30 perces inkubáció után is fertőző maradt, bár a tünetek ekkor kicsivel később jelentkeztek, mint a kezeletlen kontroll esetében. A 3 perces 100°C-os hőkezelés itt is ugyanolyan hatásos volt, mint a másik tej pool esetében, egy egernél sem tapasztaltunk a fertőzésre utaló tüneteket a kísérlet végéig.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. Lakhegyi járvánnyal kapcsolatos eredmények

Egyes közlemények szerint a tápcsatorna útján való terjedés a kullancsencephalitis esetében kis jelentőségű járványtani szempontból, mert ezek a fertőzések kevésbé gyakoriak, mint azok, amelyek kullancscsípést követően alakulnak ki. Magyarországon azonban számos alkalommal fordult már elő tej eredetű kullancsencephalitis megbetegedés, és ezek nemcsak különálló esetek illetve családi halmazódások voltak, hanem több tucat beteget érintő járványok is (Bélapátfalva, 1992; Lakhegy, 2007).

A 2007-es járvány során 154 embernél állt fenn a KEV-fertőzés veszélye, akik mind ittak egy bizonyos kecskefarmról származó tejből, és a tejet nyersen, forralás nélkül fogyasztották. Később közülük 31-nek alakultak ki különböző tünetei, amelyek a legtöbb esetben jellemzőek voltak a KE-re, és 25 betegnél a szerológiai eredmények igazolták is a friss KEV-fertőzést. Ezek közül a betegek közül egynek sem szerepelt ismert kullancscsípés az előtörténetében, így feltételezhető volt, hogy a kecsketej volt a fertőzés forrása.

A Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma klinikusokkal, állatorvosokkal és epidemiológusokkal együttműködésben alaposan kivizsgálta ezt a járványt. Vérmintákat gyűjtöttünk a farmon tartott kecskéktől, hogy ellenanyagvizsgálat segítségével azonosítsuk a fertőzött állatokat, és olyan emberektől is vért vettünk, akik ittak a tejből, de nem voltak tüneteik, így lehetőség nyílt az esetleges tünetmentes fertőzések felderítésére is.

Többféle diagnosztikus módszert alkalmaztunk a kecske vérminták vizsgálatára, hogy biztosan helyes és pontos eredményeket kapjunk. A humán rutindiagnosztikában használt indirekt immunfluoreszcens vizsgálat erősen aspecifikusnak bizonyult, amikor kecskemintákkal dolgoztunk, ezzel a módszerrel ugyanis szinte minden vérsavó reaktív volt. A hemagglutináció gátlási próba megbízhatóbb és jobban elkülöníthető eredményeket adott, különösen miután az aspecifikus hemagglutinineket és inhibitorokat alaposabban eltávolítottuk a mintákból, azonban mégis úgy döntöttünk, hogy nemcsak az ellenanyagok teljes hiányát, hanem az alacsonyabb HAG titereket (1:80 alatt) is negatívnak értékeljük, mert az ilyen HAG titerű mintákból több is negatívnak bizonyult neutralizációval és/vagy ELISA-val vizsgálva.

Megjegyzendő, hogy az IIF festődés értékelésében jelentős szerepe van a szubjektív megítélésnek, azonban vannak egyértelmű jelek, amelyek alapján a kullancsencephalitis ellenanyagok esetén az aspecifikus kép megkülönböztethető a specifikustól. A specifikus festődés kullancsencephalitis IgG ellenanyagvizsgálat esetén mindig a citoplazmában látható, sok esetben egy jól körülhatárolt fluoreszkáló képlet, mely a sejtmagra sapkaszerűen, kb. félhold formában ráborul (7. ábra). IgM vizsgálat esetén szórt, apró szemcseszerű a kép. Ezzel szemben az aspecifikus festődés egyértelmű jele a fluoreszcencia a sejtmagban, nukleoluszban, illetve ha az összes sejt egyformán festődött. Mivel a rutinos leolvasó viszonylag könnyen meg tudja ítélni, specifikus-e a festődés, az IIF módszer egyéb előnyei miatt is (gyors, gazdaságos) a KE laboratóriumi diagnosztikájának alapja.

A mikroneutralizációs teszt és a módosított ELISA nagyon specifikus és hatékony módszernek bizonyult a kecske vérsavóból való anti-KEV ellenanyagok kimutatására, ezért mindkettőt érdemes a jövőben megerősítő vizsgálatként alkalmazni.

Mivel a különböző módszerekkel nem teljesen egybevágó eredményeket kaptunk, a kecske minták végső értékelésekor a következőket mondhatjuk. A 69 fejt kecskéből kettőnek a vérsavója volt minden módszerrel egyértelműen pozitív eredményű, vagyis reaktív az anti-KEV IgG típusú ellenanyagokra. Az egyik ilyen pozitív vérsavó a KEV-specifikus IgM-re is pozitív volt, ami azt jelenti, hogy ily módon sikerült azonosítanunk egy aktuálisan fertőzött kecskét. Mivel a kecskék vérmintáit a humán megbetegedések észlelése – és következésképp hetekkel a fertőzött tej ivása – után vették, nagyon valószínű, hogy ennek az állatnak a teje okozhatta az emberek fertőzését. Arra is következtethetünk ebből az eredményből, hogy a kecskéket aktuálisan olyan területen legeltették, ahol fertőző kullancsok előfordultak. A többi kecske, amelyeknek a vérsavója IgG-pozitív volt HAG próbával és neutralizációs teszttel, és kétes ELISA-val, feltehetőleg korábban vészelhette át a KEV fertőzést.

Az egymással rokon flavivírusok ellen termelt ellenanyagok közötti keresztreakció jól ismert jelenség, amely megfigyelhető a Magyarországon jelen levő KEV és Nyugat-nílusi vírus (WNV) között is. Ez problémát jelenthet a betegek szerológiai eredményeinek értelmezésekor, bár a Nyugat-nílusi vírussal való fertőződés eddig meglehetősen ritka volt Magyarországon, és 2008-ig a két vírus földrajzi eloszlása között nem is volt átfedés, tehát aki nem utazott el az egyik vírus endémiás

területéről a másikéra, az nem fertőződhetett mindkettővel, csak az egyikkel. Az itt tárgyalt 2007-es vizsgálatban a kecskék vérsavóit WNV elleni ellenanyagokra nem teszteltük, de mivel azóta a Nyugat-nílusi vírus tovább terjedt az ország nyugati része felé, ahol a KEV endémiás, ma már szükség lenne erre a megerősítő vizsgálatra is, hogy a keresztreakciót kizárhassuk.

A kecskefarmon a kecskék tejét összekeverték, ezért azt nem lehetett már utólag visszakövetni, hogy mely állat(ok)tól származott a humán fertőzéseket okozó tej. Még ha rendelkezésre is állnának egyedi tejminták, és ki tudnánk mutatni belőlük a virális RNS-t, akkor sem hasonlíthatnánk azt össze az emberekben jelen levő víruséval, mert az emberi vérmintákat akkor vették, amikor az idegrendszeri tünetek megjelentek, és a legtöbb esetben ekkorra már a virális RNS eltűnik a vérből. Az azonban figyelemre méltó, hogy az egy, vagy legfeljebb két állattól származó vírus ennyi embert megfertőzött még hígított formában is, hiszen a nem fertőző tejjel való keverés tulajdonképpen hígítás. Ebből arra is következtethetünk, hogy a nyers tej fogyasztása jelentős egészségügyi kockázattal jár, különösen olyan területeken, ahol gyakran előfordulnak KE esetek, azaz a természeti göcökben, ahol az állatok is kapcsolatba kerülhetnek a kullancsokkal, és fertőződhetnek a KE vírussal.

A járvány kiindulópontja Zala megyében volt (Lakhegyen), ami az ország leginkább KEV-fertőzött része, és ahol már korábban is többször előfordultak tej eredetű fertőzések. Ennek ellenére a hat tünetmentes személynek, akiknek a vérmintája rendelkezésre állt laboratóriumi vizsgálat céljaira, nem volt anti-KEV ellenanyag a vérsavójában, hasonlóan ahhoz a hat beteghez, akiknél második fázisra jellemző tünetek nem voltak megfigyelhetők; így sem lappangó, sem tünetmentes fertőzést nem találtunk a fertőzésnek kitett embereknek ebben a csoportjában. (A 6 beteg csak első fázisra jellemző, főként gasztrointesztinális tüneteire magyarázatot adhat, hogy a kecskék takarmányának elemzésekor T-2 mikotoxint találtak, ami szintén belekerülhetett a tejbe.) Egy több főből álló kontroll csoport vizsgálata még pontosabbá tehetné volna az összképet, de az anyagi korlátok miatt csak ennyi minta vizsgálatára volt lehetőség.

A tej eredetű fertőzéseket könnyen el lehetne kerülni, ha fogyasztás előtt a tejet felforrálnák, mivel a megfelelő hőkezelés inaktiválja a vírust. A járványügyi vizsgálat során azonban kiderült, hogy a kikérdezett személyek nagy része azért itta szándékosan nyersen a tejet, mert a közfelfogás szerint az hatásos természetes gyógyszer bizonyos

krónikus betegségek (pl. allergia, cukorbetegség stb.) ellen. Az emberek úgy gondolják, hogy ez a jótékony hatás megszűnik, ha a tejet hőkezelik, ezért a legtöbb esetben nem forralták azt fel, mielőtt megitták. Mivel az egészséges és „bio” életmód egyre népszerűbb, számíthatunk rá, hogy még többen fognak nyers tejet és pasztörizetlen tejből készült tejtermékeket fogyasztani.

Fontos azt is megemlíteni, hogy az összes beteg és a fertőzésnek kitett, egészséges személy olyan területen élt, amelyről közismert, hogy fertőzött kullancsencephalitisszel, azonban ennek ellenére egyikük sem volt beoltva KEV ellen, bár az oltóanyag kapható a gyógyszertárakban, és minden évben szezonális médiakampányok tájékoztatják a lakosságot a veszélyről. Következésképp, az oltás hatását a tápcsatorna útján való fertőződés kockázatára ebben a vizsgálatban nem volt módunk felbecsülni. A laboratóriumba érkező vizsgálati anyagok adatainak felvételekor mindig rákérdeztünk, kapott-e a beteg korábban oltást (KE és/vagy sárgaláz), illetve tud-e arról, hogy korábban átvészelt volna a KE fertőzést, valamint, hogy a betegségét megelőzően utazott-e valamerre (külföldi utazást is beleértve), hogy a kapott vizsgálati eredményeket helyesen tudjuk értelmezni.

Kétségtelen, hogy gondos szervezésre és figyelemre van szükség, ha a jövőben el akarjuk kerülni a tej eredetű járványokat, amelyek fontos jellemzője, hogy a tápcsatorna útján való terjedés miatt nemcsak egy, hanem számos ember megbetegedhet akár egyetlen fertőzött kullancstól (amely megcsípi a tejelő állatot). A 2007-es járvány felhívta a figyelmet a kullancs által terjesztett fertőzések élelmiszer útján való terjedésére, valamint arra, hogy az embereket nyomatékosabban kell figyelmeztetni a nyers tej fogyasztásának veszélyeire.

7.2. Kecskék kísérleti fertőzésével kapcsolatos eredmények

Nyers tejjel terjedő kullancsencephalitis esetek szinte minden évben előfordulnak Magyarországon és a többi országban is, ahol endémiás a KEV. Tudomásunk szerint a kecskék, a tehenek és a juhok nem betegsznek meg a KEV-fertőzéstől, és úgy ürítik a tejükkel a vírust, hogy közben semmilyen a fertőzésre utaló tünetet nem mutatnak. A kecskék KEV-fertőzésének élettani jeleit tanulmányozó vizsgálatból azonban meglehetősen keveset ismerünk.

Ebben a kísérletben tíz kecskét fertőztünk meg élő KE vírussal, és a következő napokban nyomon követtük a testhőmérsékletüket. Közülük öt naiv állat volt, ötöt pedig

előzőleg immunizáltunk két adag humán oltóanyaggal, hogy megtudjuk, megakadályozható-e az oltással a kecskék fertőződése, és megelőzhető-e ezáltal a virémia. Tíz nem fertőzött kecske (öt naiv és öt immunizált) testhőmérsékletét is rendszeresen mértük, és ezeket az adatokat használtuk a statisztikai elemzésben kontrollként. A hőmérsékleti adatok elemzése (két szempontos ANOVA módszer) megmutatta, hogy sem a fertőzés, sem az immunizálás nem okozott jelentős növekedést az állatok testhőmérsékletében $p < 0,05$ mellett. Így tehát lázas állapotot nem tudtunk kimutatni, a különböző kísérleti csoportokban a kecskék látható tünetek nélkül vészelték át a fertőzést.

A kísérletileg fertőzött kecskéket naponta megfejtük, hogy meghatározzuk azt az időszakot, amelyen belül a KEV ürül a tejjel, illetve hogy megtudjuk, az immunizálással meg lehet-e előzni a vírusürítést. A mintákat klasszikus (egérbe oltás) és modern (PCR) virológiai módszerekkel vizsgáltuk meg. Minden naiv fertőzött kecske tejéből ki tudtuk mutatni a vírust, bár az időintervallum, amíg a fertőző KEV kimutatható volt a tejből, egyedenként kissé eltért. A legrövidebb ürítési időtartam két nap volt (a fertőzést követő 6. és 7. nap), de amelyik állatnál ezt tapasztaltuk, annak a tejéből a 13. napon ismét ki tudtuk mutatni a fertőző vírust egéroltással. A leghosszabb ürítést nem tudtuk meghatározni, mert az egyik kecske tejéből a kísérlet végén, 23 nappal a fertőzés után is kimutatható volt a KEV. Ennek az állatnak a tejét érdemes lett volna tovább vizsgálni, azonban a kísérleti állatok tartására csak korlátozott ideig volt lehetőség. Az állatoltások eredményeit KEV-specifikus nested RT-PCR vizsgálatok eredményeivel hasonlítottuk össze. A várakozásokkal ellentétben a PCR-t nem találtuk érzékenyebbnek az állatoltásnál, amire magyarázat lehet, hogy a tejből való RNS-izolálás nem volt elég hatékony.

A korábban immunizált kecskék fertőzése után nem tudtunk fertőző KE vírust kimutatni a tejmintákból egérbe oltással, ami arra utal, hogy az immunizálás megakadályozta a vírusfertőzés és a virémia kialakulását. Tehát az emberi oltóanyag, amit az immunizáláshoz használtunk, kecskéknek beadva is hatásos volt és kiváltotta a megfelelő immunválaszt.

Az alapján, hogy mely napokon tudtuk a legtöbb mintából kimutatni a KE vírust, kiválasztottuk a tejminták egy csoportját, hogy ezekben meghatározzuk a vírus mennyiségét real-time RT-PCR-rel. Az eredmények azt mutatták, hogy a tejjel ürített

vírus koncentrációja egyedenként nagyon különböző lehet. A relatív koncentrációkat egy vírus hígítási sor tagjaihoz viszonyítottuk, és azt találtuk, hogy a legmagasabb vírustartalmú minta attól a kecskétől származott, amelynek egy jól látható csúcs volt a testhőmérsékleti görbéjén a következő napon. Ez a hőmérsékleti csúcs azonban az elemző program számításai szerint nem volt statisztikailag szignifikáns. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a vírusrészecskék nagyobb koncentrációja okozhatott kisebb hőemelkedést ennél az állatnál. Mivel eddig ilyen megfigyelésről nem volt tudomásunk, és a jelenleg elfogadott nézetek szerint a kecskék tünetmentesen vészelik át a KEV fertőzést, felmerül a kérdés, vajon a fertőző szuszpenzióknak volt-e olyan magas a vírustartalma, hogy ilyen reakciót váltson ki, és/vagy ennek az egyednek a szervezete volt fogékonyabb, vagy reagált eltérően a fertőzésre valamilyen okból. Hogy a fertőzött kullancsok csípésével mennyi virion jut a gazdaállat szervezetébe, arról egyelőre nincs irodalmi adat, így lehetséges, hogy a mesterséges fertőzéssel bejuttatott mennyiség ettől lényegesen eltér.

Másrészt viszont a legtöbb megvizsgált tejminta sokkal kevesebb vírust tartalmazott, mint a fent említett. A vizsgált 10 tejmintából egynél az egéroltással kimutatott vírushatóanyag a real-time RT-PCR módszer érzékenységi küszöbe alá esett, bár minden állat ugyanakkora fertőző vírushatóanyagot kapott. Mivel a gyakorlati lehetőségeink csak egy standard vírushatóanyag sor eredményeivel való összehasonlítást tettek lehetővé, az érzékenységi küszöb konkrét értékét nem tudtuk meghatározni. A PCR módszer további optimalizálásával és több standard sor alkalmazásával pontosabb, megbízhatóbb eredményeket kaphatunk. A vírushatóanyag időtartama és a tejjel ürülő vírus mennyisége közötti nagy egyedi különbségek arra a nyilvánvaló tényre is felhívják a figyelmet, hogy számos élettani tényező befolyásolja a vírus gazdaszervezeten belüli terjedését, illetve tejjel való ürülését.

7.3. Fertőzött tej hőkezelésével kapcsolatos eredmények

Két kecske fertőző tejmintáiból egy-egy poolt készítettünk, és ezekből megegyező térfogatú adagokat különböző hőmérsékleteken különböző időtartamokig hőkezeltünk. A háztartásokban bevett gyakorlat modellezésére három hőmérsékletet választottunk: a szobahőmérsékletet, hogy utánozzuk a hűtés nélkül hagyott nyers tej állapotát (amelyet sajt vagy túró készítésére használnak), a 65°C-ot, hogy szimuláljuk a melegített, de nem felforralt illetve magasabb hőmérsékleten pasztörözött tej hőkezelését, és a 100°C-ot

mint forralási hőmérsékletet. (Megjegyezzük, hogy a 65°C körüli hőmérsékletet is használják a gyakorlatban mint pasztörözési hőmérsékletet, de ez mindig hosszabb időtartammal – 30 perc – párosul. Ezért az itt kapott eredményekből a pasztörözésre vonatkozóan nem tudunk általános következtetéseket levonni.)

Amikor szopós egerek agyába oltottuk, a magasabb vírustartalmú tej pool az állatok halálát okozta a beadás utáni 3. npra, míg a másik pool, amelynek alacsonyabb volt a vírustartalma, a 4. npra ölte meg az egereket. A tej poolok szobahőmérsékletű inkubációja nem előzte meg a szopós egerek halálos fertőződését, bár hosszabb inkubációs időt követően (több mint 12 óra után) az állatok halála valamivel később következett be, valószínűleg azért, mert az inkubáció során csökkent a fertőzőképes vírusrészecske mennyiség. Ezt mindkét tej pool esetében megfigyelhettük. A 65°C-os kezelés, amely a tej forralás nélküli melegítését jelképezte, eltérő eredményt hozott a két poolnál. Az alacsonyabb vírustartalmú pool 5 perces vagy hosszabb 65°C-os kezeléssel elvesztette a fertőzőképességét, a magasabb vírustartalmú pool azonban megtartotta azt még 30 perc melegítés után is. A 3 percig tartó 100°C-os hőkezelés mindkét pool esetében megszüntette a fertőzőképességet.

Ennek a vizsgálatnak az eredményei is alátámasztják, hogy a nyers kecsketej fogyasztását kerülni kell a vírusfertőzés kockázata miatt, és a közönséges háztartási körülmények között a tej eredetű KE elkerülésének legegyszerűbb és legbiztosabb módja az, ha felforraljuk a tejet, mielőtt megisszuk vagy feldolgozzuk, mivel a lehetséges fertőző vírustartalom az egyszerű melegítést túlélheti. Ha a fogyasztó ragaszkodik a forralatlan tej ivásához, egy másik megoldás a kecskék immunizálása lehet a KEV endémiás területein, ugyanis az eredményeink szerint az immunizált állatok teje nem volt fertőző. Ez az eljárás azonban még mindig nem védi ki teljesen a nyers tej fogyasztásával járó veszélyeket, hiszen a KE víruson kívül számos, szintén súlyos kórképet okozó patogén fordulhat elő a nyers tejben.

További vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy kiderítsük, milyen hosszú ideig marad meg ez az immunitás a kecskében, illetve hogy a természetesen szerzett immunitás náluk is élethosszig tart-e, ahogyan az embernél, mert az endémiás területeken a nyers tejet fogyasztók számára a legígéretesebb lehetőség a KEV-fertőzés megelőzésére az lenne, ha a kecskéket immunizálnák.

Nincsenek kereskedelmi forgalomban a kecskék oltására kifejlesztett KEV elleni oltóanyagok. Az oltás még az emberek számára is csupán egy lehetőség, bár azok számára, akik forralatlanul isszák a tejet, ez erősen ajánlott megelőzési mód lenne. Egy farmerek körében végzett tanulmány szerint azok, akik tudatában vannak a kockázatnak, kisebb valószínűséggel isznak nyers tejet, így a tömegtájékoztatásra nagy hangsúlyt kellene helyezni. A pasztörözetlen tej fogyasztása azonban egy bizonyos életmód része is lehet, és ebben az esetben az embereket nehezebb meggyőzni, hogy változtassanak azon. Ezen kívül az ilyen életmód magában foglalhatja az oltóanyagok és gyógyszerek korlátozott használatát is, ami a megelőzési stratégiát még tovább bonyolíthatja.

Magyarországon jelenleg a nyers tej vizsgálatáról szóló 16/2008. (II. 15.) FVM-SZMM együttes rendelet van érvényben. Ez a 3.§-ban kimondja: az emberi fogyasztásra és feldolgozásra szánt nyers tej akkor hozható forgalomba, ha a termelés feltételei, illetve a nyers tejre vonatkozó követelmények megfelelnek az élelmiszer-higiéniáról szóló, 2004. április 29-i 852/2004/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletben, a 853/2004/EK rendeletben, valamint e rendeletben foglalt követelményeknek. A 853/2004/EK rendelet III. mellékletében olvashatók a nyers tejre vonatkozó szabályok. A nem tehéntől származó nyers tej összcsíraszám 30°C-on ml-enként <1 500 000, ha azonban a tehéntől különböző fajok nyers tejét hőkezelést nem tartalmazó folyamat során nyers tejjel készült termékek előállítására szándékozzák felhasználni, az élelmiszeripari vállalkozóknak lépéseket kell tenniük annak biztosítására, hogy a felhasznált nyers tej összcsíraszám (30°C-on ml-enként) <500 000 legyen. A nyers tej hatósági ellenőrzése pillanatnyilag elsősorban bakteriológiai és toxikológiai vizsgálatokat foglal magába, nincs külön szabályozás a kullancsencephalitis vírusra illetve a kecsketejre vonatkozóan. Az illetékes Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal véleménye szerint a vírusokkal történő foglalkozás orvosegészségügyi feladat, és jelenleg KEV kimutatást valóban csak a humán egészségügy végez, tehát csak akkor kerül rá sor, amikor felmerült a tej eredetű fertőződésgyanúja.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

8.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták vizsgálata

- A kecskék tejével ürülő KEV elég tömény ahhoz, hogy hígítva is képes legyen megfertőzni az embert, hiszen 69-ből csak néhány kecskénél mutattuk ki, hogy átvészelte a KE fertőzést, és mindössze egynél volt igazolható a közelmúltban lezajlott fertőzés, így feltételezhetően ezen állat(ok) teje okozta az emberi megbetegedéseket. A vírussal fertőzött tej a többi – szeronegatív – kecskééhez keverve is elég volt a fertőzéshez.
- A rutindiagnosztikai módszerek közül a kecskevéreket nem elég csak IIF vizsgálattal megnézni, szükség van HAG és/vagy neutralizáció végzésére is, hogy kiszűrjük az aspecifikus reakciókat.
- A lengyel fejlesztésű, kompetitív gátláson alapuló ELISA módszer az ellenőrző vizsgálatok alapján pontos, specifikus és reprodukálható eredményt ad kecskevér mintákkal, ezért célszerű megerősítő vizsgálatokhoz alkalmazni kérdéses eredmények esetén.
- A KEV endémiás területein további tájékoztatásra van szükség, amely a kullancscsípés kockázata mellett kitér a nyers tej fogyasztásának veszélyeire is.

8.2. Kecskék KEV fertőzésének vizsgálata

- Kísérletileg KE vírussal fertőzött kecskék és a kontroll állatok testhőmérsékleteinek összehasonlításával statisztikailag is igazolható, hogy a kecskéknél nem okoz testhőmérséklet-emelkedést a KEV fertőzés.
- KEV tejjel való ürülésének időbeli lefolyása és a tejbe kerülő vírusszám között nagy egyedi eltérések lehetnek.
- A tejjel való vírusürítés hatékonyan megelőzhető a kecskék immunizálásával, akár a gyógyszertárakban beszerezhető humán oltóanyaggal is.

8.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata

- A KEV tartalmú, hőkezelés nélküli kecsketej szobahőmérsékletű inkubációt követően (tehát pl. aludttej, túró stb. készítésekor) is megtartja fertőzőképességét még 2 nap után is.
- A KEV tartalmú kecsketej 65°C-os hőkezelése nem inaktiválja biztonsággal a tejben levő KE vírust, ha az nagy töménységű.
- A kecsketejben levő KEV inaktiválásához elegendő 3 perc forralás.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

2007 augusztusában 154 fertőzésnek kitett emberből 25 betegedett meg egy magyarországi kullancsencephalitis járványban. Egyik betegnek sem szerepelt kullancscsípés az előtörténetében, viszont mindannyian ittak egy kecskefarmról származó nyers tejből. A klinikai diagnózisok megerősítése mellett azonosítani kívántuk azokat a kecskéket, amelyek korábban vagy frissen fertőződtek KE vírussal, és így üríthették azt a tejjükkel. A farm 75 kecskéjétől vett vérmintát vizsgáltuk meg különböző szerológiai módszerekkel: indirekt immunfluoreszcenciával, hemagglutináció gátlással, mikroneutralizációval és ELISA-val, hogy meghatározzuk a savók anti-KEV ellenanyag szintjét. A négy módszer eltérő specificitásának bizonyult. A legkevésbé az IIF volt specifikus, ezzel minden savóban mutatkozott egy alacsony titer. A másik három módszer eredményeinek összehasonlításával megállapítottuk, hogy két savó volt pozitív anti-KEV IgG-re és egy anti-KEV IgM-re. Azt is megállapítottuk, hogy a kecskék különböző módszerekkel kapott szerológiai eredményeit össze kell vetni a végső diagnózis előtt, mert a módszerek specificitása jelentősen eltér.

A nyers kecsketej által okozott emberi KE megbetegedések és a friss kísérleti adatok hiánya vetette fel egy kecskével végzett kísérlet tervét, hogy tanulmányozzuk a kecskék KEV fertőzésének esetleges jeleit, a tejjel való vírusürítést és a humán esetek megelőzésének lehetőségeit. Ezért tíz kecskét (melynek felét előzőleg immunizáltuk) megfertőztünk KE vírussal, tízet pedig kontrollként megfigyeltünk (5 immunizált és 5 naiv). Az állatok állapotát és testhőmérsékletét feljegyeztük, és naponta fejtük őket. A kísérlet során a fertőzött állatoknál nem tapasztaltunk tüneteket és a kontrolloktól jelentősen eltérő testhőmérsékletet. A virális RNS-t RT-PCR-rel, a fertőző vírusrészecskéket szopós egerek intracerebrális oltásával mutattuk ki a tejből. A fertőző virionokat 8-19 (23) napig mutattuk ki (tovább nem vizsgáltuk), a vírusgenomot PCR-rel 3-18 napig. Az immunizált kecskék nem ürítették a vírust. A hőkezelés hatását is megvizsgáltuk különböző mennyiségű vírust tartalmazó tejminták esetén. A 30 perc 65°C-on való melegítés nem inaktiválta a nagyobb mennyiségű vírust, a tej 3 perces forralása után azonban nem tudtunk infektív vírust kimutatni szopós egerek intrakraniális oltásával.

Ezeket az eredményeket célszerű figyelembe venni, ha a tej eredetű humán betegségeket szeretnénk megelőzni akár a kecskék/emberek immunizálásával, akár a tej hőkezelésével.

10. SUMMARY

A tick-borne encephalitis (TBE) outbreak involving 25 patients of 154 exposed persons occurred in Hungary in August 2007. None of the patients had a history of tick-bite, however, all of them drank unpasteurized raw goat milk from the same farm. Beside confirming the suspected clinical diagnosis of patients, we tried to identify the goats on the farm which had a previous or actual TBEV infection and could have spread the virus through their milk. Blood samples were taken from 75 goats on the farm and were examined by various serological methods, namely indirect immunofluorescent assay, hemagglutination inhibition, microneutralization and ELISA, to determine antibody levels in the serum. The four methods have proved different levels of specificity. The least specific was the indirect immunofluorescence (IIF) assay, which showed a low titre in all sera. Comparison of the results of the other three methods indicates that two sera were positive for anti-TBEV IgG and one for anti-TBEV IgM. It has also been concluded that serological results for goats by the different methods should be compared before final diagnosis because the specificity of methods in use can differ significantly.

The cases of human TBE caused by raw goat milk and the lack of recent experimental data suggested the design of an experiment on milking goats to study the possible clinical signs of TBE in goats, the virus spread in milk, and the options to prevent human TBEV infection. Therefore, ten goats (half of them immunized previously) were challenged with infectious TBEV, and 10 were left uninfected (5 immunized and 5 naïve controls). Clinical signs and body temperatures of the animals were recorded and milk samples were collected daily. Presence of viral RNA and infectious virions were detected by RT-PCR and intracerebral inoculation of suckling mice, respectively. During the experiment, the infected animals did not show any clinical signs or fever compared to uninfected ones. Infectious virions were detected for 8-19 (23) days from the milk samples (genome for 3-18 days by PCR) of infected goats (further not investigated). Immunized goats did not shed the virus by their milk. Milk samples containing different amounts of infectious virions were subjected to heat treatment and re-tested afterwards by mouse inoculation. Heating milk for 30 min to 65°C did not inactivate higher virus content, but after 3 min boiling, infectious virus was not detected by intracranial inoculation of suckling mice. These data could be considered in the prevention of human milk-borne TBEV cases either by immunization of goats/humans or heat treatment of milk.

11. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. 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 Met.* 163:481-485.
2. Balogh, Z., Egyed, L., Ferenczi, E., Bán, E., Szomor, K. N., Takács, M., Berencsi, G. (2011) Experimental infection of goats with tick-borne encephalitis virus and the possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk. *Intervirolgy* 2011 Feb 12. [DOI: 10.1159/000324023].

12. IRODALOMJEGYZÉK

¹Gaunt, M., Sall, A. A., de Lamballerie, X., Gould, E. A. (2001) Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol.* 82:1867-1876.

²Heinz, F. X., Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., Thiel, H. J. (2000) Family Flaviviridae. In „Virus Taxonomy: 7th International Committee for the Taxonomy of Viruses” (M. H. V. Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner eds.), 859-878. Academic Press, San Diego.

³Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E. G., Baker, T. S., Strauss, J. H. (2002) Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 108(5):717-725.

⁴Cahour, A., Pletnev, A., Vazielle, F. M., Rosen, L., Lai, C. J. (1995) Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology.* 207(1):68-76.

⁵Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J., Westaway, E. G. (2001) Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol.* 75(14):6719-6728.

⁶Markoff, L., Falgout, B., Chang, A. (1997) A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology.* 233(1):105-117.

⁷Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X., Helenius, A. (2002) Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 76(11):5480-5491.

- ⁸Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S. C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. 375(6529):291-298.
- ⁹Lescar, J., Roussel, A., Wien, M. W., Navaza, J., Fuller, S. D., Wengler, G., Rey, F. A. (2001) The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*. 105(1):137-148.
- ¹⁰Lin, Y. L., Chen, L. K., Liao, C. L., Yeh, C. T., Ma, S. H., Chen, J. L., Huang, Y. L., Chen, S. S., Chiang, H. Y. (1998) DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol*. 72(1):191-200.
- ¹¹Timofeev, A. V., Ozherelkov, S. V., Pronin, A. V., Deeva, A. V., Karganova, G. G., Elbert, L. B., Stephenson, J. R. (1998) Immunological basis for protection in a murine model of tick-borne encephalitis by a recombinant adenovirus carrying the gene encoding the NS1 non-structural protein. *J Gen Virol*. 79(Pt 4):689-695.
- ¹²Mackenzie, J. M., Jones, M. K., Young, P. R. (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 220(1):232-240.
- ¹³Muylaert, I. R., Chambers, T. J., Galler, R. G., Rice, C. M. (1996) Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology*. 222(1):159-168.
- ¹⁴Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K., Westaway, E. G. (1998) Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 245(2):203-215.
- ¹⁵Chambers, T. J., Grakoui, A., Rice, C. M. (1991) Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: A catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J Virol*. 65:6042-6050.

- ¹⁶Chambers, T. J., Nestorowicz, A., Amberg, S. M., Rice, C. M. (1993) Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol.* 67:6797-6807.
- ¹⁷Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., Padmanabhan, R. (1999) The serine protease and RNA stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* 73(4):3108-3116.
- ¹⁸Westaway, E. G., Khromykh, A. A., Kenney, M. T., Mackenzie, J. M., Jones, M. K. (1997) Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology.* 234(1):31-41.
- ¹⁹Koonin, E. V. (1993) Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol.* 74 (Pt 4):733-40.
- ²⁰Tan, B. H., Fu, J., Sugrue, R. J., Yap, E. H., Chan, Y. C., Tan, Y. H. (1996) Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology.* 216(2):317-25.
- ²¹Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., Filgueira, L., Marovich, M. A., Wong, H. K., Blauvelt, A., Murphy, G. S., Robb, M. L., Innes, B. L., Birx, D. L., Hayes, C. G., Frankel, S. S. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Med.* 6:816-820.
- ²²Halstead, S. B. (1989) Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: A pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 11(Suppl. 4):S830-839.
- ²³Chu, C. T., Howell, D. N., Morgenlander, J. C., Hulette, C. M., McLendon, R. E., Miller, S. E. (1999) Electron microscopic diagnosis of human flavivirus encephalitis: Use of confocal microscopy as an aid. *Am J Surg Pathol.* 23:1217-1226.
- ²⁴Liu, J., Thorp, S. C. (2002) Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med Res Rev.* 22:1-25.

- ²⁵Hilgard, P., Stockert, R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32:1069-1077.
- ²⁶Lee, E., Weir, R. C., Dalgarno, L. (1997) Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology* 232:281-290.
- ²⁷Corver, J., Ortiz, A., Allison, S. L., Schalich, J., Heinz, F. X., Wilschut, J. (2000) Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology*. 269:37-46.
- ²⁸Gollins, S. W., Porterfield, J. S. (1986) pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J Gen Virol*. 67:157-166.
- ²⁹Clague, M. J. (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J*. 336:271-282.
- ³⁰Heinz, F. X., Stiasny, K., Puschner, A. G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W., Kunz, C. (1994) Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*. 198:109-117.
- ³¹Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., Heinz, F. X. (1995) Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*. 69:695-700.
- ³²Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T. Allison, S. L., Schalich, J., Heinz, F. X., Harrison, S. C., Rey, F. A., Fuller, S. D. (2001) Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell*. 7(3):593-602.
- ³³Mandl, C. W., Allison, S. L., Holzmann, H., Meixner, T., Heinz, F. X. (2000) Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol*. 74:9601-9609.

- ³⁴Gould, E. A., de Lamballerie, X., Zanotto, P. M., Holmes, E. C. (2003) Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. *Adv Virus Res.* 59:277-314.
- ³⁵La Ruche, G., Soares, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Despres, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparac-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L., Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J. P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilaret, P., Zeller, H., Van Bortel, W., Dejour-Salamanca, D., Grandadam, M., Gastellu-Etchegorry, M. (2010) First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 15(39):pii=19676. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
- ³⁶Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Đuričić S, Betica-Radić L, Okmadžić J, Vilibić-Čavlek T, Babić-Erceg A, Turković B, Avšić-Županc T, Radić I, Ljubić M, Šarac K, Benić N, Mlinarić-Galinović G. (2011) Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 16(9):pii=19805. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
- ³⁷Seyler, T., Grandesso, F., Le Strat, Y., Tarantola, A., Depoortere, E. (2009) Assessing the risk of importing dengue and chikungunya viruses to the European Union. *Epidemics* 1:175-184.
- ³⁸Vilela, A. P., Figueiredo, L. B., dos Santos, J. R., Eiras, A. E., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., Kroon, E. G. (2010) Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 16(6):989-92.
- ³⁹Libraty, D. H., Acosta, L. P., Tallo, V., Segubre-Mercado, E., Bautista, A., Potts, J. A., Jarman, R. G., Yoon, I. K., Gibbons, R. V., Brion, J. D., Capeding, R. Z. (2009) A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PloS Med.* 6(10):e1000171.

- ⁴⁰Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, Gerundi GE, Di Benedetto F, Pasetto A, Girardis M, Dottori M, Landini MP, Sambri V. (2009) Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 14(50):pii=19448. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19448>
- ⁴¹Clarke, D. H. (1960) Antigenic analysis of certain group B arthropod-borne viruses by antibody absorption. *J Exp Med.* 111:25-36.
- ⁴²Pogodina, V., Bochkova, N. G., Koreshova, G. V. (1981) Strain properties of the Aina/1448 serotype of the tick-borne encephalitis virus. *Vopr Virusol.* 6:741-746. (orosz nyelvű cikk, angol összefoglaló)
- ⁴³Gritsun, T. S., Nuttall, P. A., Gould, E. A. (2003) Tick-borne Flaviviruses. *Adv Virus Res.* 61:317-371.
- ⁴⁴Burke, D. S., Monath, T. P. (2001) Flaviviruses. In: *Fields Virology*, vol. 1. (Knipe, D. M., Howley, P. M. eds.), 1043-1125. Lippincott Williams & Wilkins, London, New York, Tokyo.
- ⁴⁵Golovljova, I., Vene, S., Sjölander, K. B., Vasilenko, V., Plyusnin, A., Lundkvist, A. (2004) Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *J Med Virol.* 74:580-588.
- ⁴⁶Jaaskelainen, A. E., Tikkakoski, T., Uzcátegui, N. Y., Alekseev, A. N., Vaheri, A., Vapalahti, O. (2006) Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis.* 12:1568-1571.
- ⁴⁷Gray, J. S. (1998) The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Exp Appl Acarol.* 22:249-258.
- ⁴⁸Süss, J. (2003) Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 21:S19-S35.

- ⁴⁹Pfeffer, M. and Dobler, G. (2010) Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* 3(1):35.
- ⁵⁰Labuda, M., Jiang, W. R., Kaluzova, M., Kozuch, O., Nuttall, P. A., Weismann, P., Eleckova, E., Zuffova, E., Gould, E. A. (1994) Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus Res.* 31:305-315.
- ⁵¹Romanova, L. I., Gmyl, A. P., Dzhivaniyan, T. I., Bakhmutov, D. V., Lukashev, A. N., Gmyl, L. V., Rumyantsev, A. A., Burenkova, L. A., Lashkevich, V. A., Karganova, G. G. (2007) Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology.* 362:75-84.
- ⁵²Labuda, M., Kozuch, O., Zuffova, E., Eleckova, E., Hails, R. S., Nuttall, P. (1997) Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural hosts. *Virology.* 235:138-143.
- ⁵³Labuda, M., Austyn, J. M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J., Nuttall, P. A. (1996) Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology.* 219:357-366.
- ⁵⁴Kozuch, O., Chunikhin, S. P., Gresikova, M., Nosek, J., Kurenkov, V. B., Lysy, J. (1981) Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. *Acta Virol.* 25:219-224.
- ⁵⁵Labuda, M., Eleckova, E., Lickova, M., Sabo, A. (2002) Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int J Med Microbiol.* 291(suppl 33):43-47.
- ⁵⁶Randolph, S. E., Rogers, D. J. (2000) Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proc Biol Sci.* 267:1741-1744.
- ⁵⁷Zeman, P., Benes, C. (2004) A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? *Int J Med Microbiol.* 293(S37):48-54.

- ⁵⁸Holzmann, 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):1671-3.
- ⁵⁹Sumilo, D., Asokliene, L., Bormane, A., Vasilenko, V., Golovljova, I., Randolph, S. E. (2007) Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS One.* 2(6):e500.
- ⁶⁰Sumilo, D., Asokliene, L., Avsic-Zupanc, T., Bormane, A., Vasilenko, V., Lucenko, I., Golovljova, I., Randolph, S. E. (2008a) Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: Vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia. *Vaccine.* 26:2580-2588.
- ⁶¹Sumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Vasilenko, V., Golovljova, I., Avsic-Zupanc, T., Hubalek, Z., Randolph, S. E. (2008b) Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Rev Med Virol.* 18:81-95.
- ⁶²Randolph, S. E. (2008) Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: consequences of political transition. *Microbes Infect.* 10:209-216.
- ⁶³Kaiser, R. (1999) The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 122:2067-2078.
- ⁶⁴Haglund, M., Günther, G. (2003) Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21:S11-S18.
- ⁶⁵Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V., Frolova, T. V., Gould, E. A., Gritsun, T. S., Heinz, F. X., Labuda, M., Lashkevich, V. A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D. V., Mandl, C. W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V. S., Plyusnin, A., Randolph, S., Süß, J., Zlobin, V. I., de Lamballerie, X. (2004) Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 10:1040-1055.

- ⁶⁶Saksida, A., Duh, D., Lotric-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T. (2005) The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol.* 33:331-335.
- ⁶⁷Ruzek, D., St'astná, H., Kopecky, J., Golovljova, I., Grubhoffer, L. (2007) Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* 144:133-137.
- ⁶⁸Schwaiger, M., Cassinotti, P. (2003) Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol.* 27:136-145.
- ⁶⁹Holzmann, H. (2003) Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21:S36-S40.
- ⁷⁰Leonova, G. N., Ternovoi, V. A., Pavlenko, E. V., Maistrovskaya, O. S., Protopopova, E. V., Loktev, V. B. (2007) Evaluation of vaccine Encepur® Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine* 25:895-901.
- ⁷¹Holzmann, H., Vorobyova, M. S., Ladyzhenskaya, I. P., Ferenczi, E., Kundi, M., Kunz, C., Heinz, F. X. (1992) Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine* 10:345-349.
- ⁷²Süss, J. (2008) Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill.* 13:18916.
- ⁷³Kunz, C. (2003) TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 21:S50-S55.
- ⁷⁴Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J. (1999) Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis.* 28:882-890.
- ⁷⁵Arras, C., Fescharek, R., Gregersen, J. P. (1996) Do specific hyperimmunoglobulins aggravate clinical course of tick-borne encephalitis? *Lancet* 347:1331.

- ⁷⁶Phillipotts, R. J., Stephenson, J. R., Porterfield, J. S. (1985) Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity. *J Gen Virol.* 66:1831-1837.
- ⁷⁷Fornosi, F., Molnár, E. (1954) Tick encephalitis in Hungary; isolation of virus and its properties. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 1(1-3):9-21.
- ⁷⁸Molnár, E. (1979) A kullancsencephalitis és egyéb arbovírusok előfordulása és közegészségügyi jelentősége Magyarországon. Doktori értekezés.
- ⁷⁹Ferenczi, E. (1990) VIIIth International Congress of Virology, Berlin.
- ⁸⁰Ferenczi, E., Racz, G., Faludi, G., Czeglédi, A., Mezey, I., Berencsi, G. (2005) Natural foci of classical and emerging viral zoonoses in Hungary. In: *NATO Science Series vol. 370: Emerging Biological Threat* (Berencsi, G., Khan, A. S., Halouzka, J. eds.), 43-49. IOS Press, Amsterdam.
- ⁸¹Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N. (2006) Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 12(4):618-23.
- ⁸²Glávits, R., Ferenczi, E., Ivanics, E., Bakonyi, T., Mató, T., Zarka, P., Palya, V. (2005) Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian pathol.* 34(5):408-14.
- ⁸³Krisztalovics, 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):pii: 19030.
- ⁸⁴Bakonyi, T., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Csorgo, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Mesiter, T., Weissenböck, H., Nowotny, N. (2007) Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol.* 45(12):3870-4.
- ⁸⁵Jayarao, B. M., Donaldson, S. C., Straley, B. A., Sawant, A. A., Hegde, N. V., Brown, J. L. (2006) A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci.* 89(7):2451-8.

⁸⁶LeJeune, J. T., Rajala-Schultz, P. J. (2009) Unpasteurized milk: A continued public health threat. *Clin Infect Dis.* 1;48(1):93-100.

⁸⁷Waser, M., Michels, K. B., Bieli, C., Flöistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., Schram-Bijkerk, D., Brunekreef, B., van Hage, M., Lauener, R., Braun-Fahrländer, C.; PARSIFAL Study team. (2007) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy.* 37(5):661-70.

⁸⁸Blaskovic, D., ed. (1954) An epidemic of encephalitis in a natural focus of infections at Roznava. 314 Akademia Vied, Bratislava (szlovák nyelvű cikk, angol összefoglaló).

⁸⁹Levkovich, E.N., Pogodina, V.V., 1958. Infection through the alimentary tract with tick-borne encephalitis. *Vopr Virusol.* 3:145–150 (orosz nyelvű cikk, angol összefoglaló).

⁹⁰Pogodina, V.V., 1958. Stability of tick-borne encephalitis virus to the action of gastric juice. *Vopr Virusol.* 5:271–275 (orosz nyelvű cikk, angol összefoglaló).

⁹¹Gresikova, M., 1958a. Recovery of the tick-borne encephalitis virus from the blood and milk of subcutaneously infected sheep. *Acta Virol.* 2(2):113–119.

⁹²Gresikova, M., 1958b. Excretion of the tick-borne encephalitis virus in the milk of subcutaneously infected cows. *Acta Virol.* 2(3):188–192.

⁹³Gresikova, M., Rehacek, J., 1959. Isolation of the tick encephalitis virus from the blood and milk of domestic animals (sheep and cow) after infection by ticks of the family *Ixodes ricinus* L *Arch Ges Virusforsch.* 9:60–364 (német nyelvű cikk).

⁹⁴Pogodina, V. V. (1960) Experimental study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis on alimentary infection. II. Study of pathways of excretion of virus from white mice. *Probl Virol.* 5:304-310.

⁹⁵Rieger, M.A., Nübling, M., Kaiser, R., Tiller, F.W., Hofmann, F. (1998) Tick-borne encephalitis transmitted by raw milk—what is the significance of this route of

infection? Studies in the epidemic region of South-West Germany. *Gesundheitswesen* 60(6):348–356.

⁹⁶Kohl, I., Kozuch, O., Elecková, E., Labuda, M., Zaludko, J. (1996) Family outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Slovakia associated with a natural focus of infection. *Eur J Epidemiol.* 12(4):373–375.

⁹⁷Matuszczyk, I., Tarnowska, H., Zabicka, J., Gut, W. (1997) The outbreak of an epidemic of tick-borne encephalitis in Kielce province induced by milk ingestion. *Przegl Epidemiol.* 51(4):381–388.

⁹⁸Kerbo, N., Donchenko, I., Kutsar, K., Vasilenko, V. (2005) Tickborne encephalitis outbreak in Estonia linked to raw goat milk, May–June 2005. *Euro Surveill.* 10(25):2730 (online elérhető: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2730>).

⁹⁹Balogh, 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 Met.* 163:481-485.

¹⁰⁰Gresikova, M., Sekeyova, M., Stupalova, S., Necas, S. (1975) Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology* 5(1-2):57-61.

¹⁰¹Leonov, V. A., Kogan, V. M., Nekipelova, G. A., Vasenin, A. A., Shikharbeev, B. V. (1976) Typifying foci of tick-borne encephalitis in the pre-Baikal. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 5:56-60. (orosz nyelvű cikk, angol összefoglaló)

¹⁰²Nosek, J., Kozuch, O., Ernek, E., Lichard, M. (1967) The importance of goats in the maintenance of tick-borne encephalitis virus in nature. *Acta Virol.* 11(5):470-472.

¹⁰³Zeman, P., Januska, J., Orolinova, M., Stuen, S., Struhar, V., Jebavy, L. (2004) High seroprevalence of granulocytic ehrlichiosis distinguishes sheep that were the source of an alimentary epidemic of tick-borne encephalitis. *Wien Klin Wochenschr.* 116(17-18):614-6.

- ¹⁰⁴Reid, H. W., Buxton, D., Pow., I., Finlayson, J. (1984) Transmission of louping-ill virus in goat milk. *Vet Rec.* 114(7):163-5.
- ¹⁰⁵Juceviciene, A., Zygtiene, M., Leinikki, P., Brummer-Korvenkontio, H., Salminen, M., Han, X., Vapalahti, O. (2005) Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian domestic animals and ticks. *Scand J Infect Dis.* 37(10):742-6.
- ¹⁰⁶Van Tongeren, H. A. E. (1955) Encephalitis in Austria IV. Excretion of virus by milk of the experimentally infected goat. *Arch Gesamte Virusforsch.* 6(2-3):158-162.
- ¹⁰⁷Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A. (2003) Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 57(1-2):129-146.
- ¹⁰⁸Sicinski, P., Rowinski, J., Warchol, J. B., Jarzabek, Z., Gut, W., Szczygiel, B., Bielecki, K., Koch, G. (1990) Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* 98(1):56-8.
- ¹⁰⁹Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., Heinz, F. X. (1999) Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol.* 80:179-185.
- ¹¹⁰Niedrig, M., Avsic, T., Aberle, S. W., Ferenczi, E., Labuda, M., Rozentale, B., Donoso Mantke, O. (2007) Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol.* 38:260-264.
- ¹¹¹Takatsy, G. (1955) The use of spiral loops in serological and virological micro-methods. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 3:191.
- ¹¹²Clarke, D. H., Casals, J. (1958) Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 7:561-573.
- ¹¹³Nagy, G., Mezey, I. (1977) The use of ion exchange chromatography for demonstration of rubella-specific IgM antibodies. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 24(3):189-194.

¹¹⁴Mandl, C. W., Heinz, F. X., Stöckl, E., Kunz, C. (1989) Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 173:291-301.

¹¹⁵Puchhammer-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. *Clin Diagn Virol.* 4:321-326.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Berencsi Györgynek, amiért lehetővé tette, hogy az OEK Vírusdiagnosztikai osztályán végezzek kutatómunkát. Köszönöm dr. Ferenczi Emőkének, hogy javaslataival segítette előrehaladásomat és önálló munkámat, valamint hogy kiterjedt nemzetközi kapcsolatai révén a témával foglalkozó külföldi kutatókkal is összeismerkedhettem.

Köszönet illeti dr. Takács Máriát és dr. Szomor Katalint az OEK Virologiai főosztályán, akikre mindig számíthattam, ha valamilyen tanácsra, segítségre volt szükségem a munkám során. A belém vetett bizalmuk sokat jelentett nekem, és segített, hogy kitartsak akkor is, ha problémák adódtak a munkámban.

Köszönöm az OEK Vírusdiagnosztikai osztályán dolgozó minden kollégának, különös tekintettel a Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriumában dolgozó munkatársaknak, hogy türelemmel és segítőkészséggel voltak irántam, valamint az OEK Állatház munkatársainak az állatkísérletek során nyújtott segítségét. Köszönöm Németh Andrásnak a statisztikai elemzésben nyújtott értékes segítségét.

Köszönöm az EDEN projekt (GOCE-2003-010284 EDEN), a Med Vet Net (MedVetNet WP31 Food producing animals as a potential source of emerging viral zoonoses) és az OTKA (K 81258) anyagi támogatását, amely révén a munkámhoz szükséges tárgyi feltételeket meg tudtuk teremteni.

Hálás vagyok dr. Kapusinszky Beatrixnak és Malikné Dencs Ágnesnek, akik amellet, hogy kollégaként sok hasznos ötlettel és inspiráló beszélgetéssel szolgáltak az évek során, még barátoknak is nagyszerűek.

Elismerés illeti családomat, mert már lassan két évtizede türelmesen és elnézően viselik, hogy még mindig biológus szeretnék lenni.

Végül, köszönöm kedvesemnek, Ivanits Zoltánnak, hogy ösztönzött, mellettem állt és példát mutatott, és mindvégig hitt abban, hogy van erőm megvalósítani a céljaimat.