

Nyers tejjel terjedő kullancsencephalitis

Doktori tézisek

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.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Nagy Károly, Ph. D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rozgonyi Ferenc, Ph.D., DSc

Dr. Rusvai Miklós, Ph.D., DSc

Budapest
2012

1. BEVEZETÉS

A családi gazdaságokban gyakran fogyasztják nyersen a tejet, főként azért, mert úgy kényelmesebb és az íze is más, de a nem farmon élő emberek egy kis része is iszik nyers tejet, mert úgy gondolják, hogy ezzel megelőzhetnek, vagy kezelhetnek bizonyos betegségeket. A pasztörözetlen tej jótékony hatásaival kapcsolatos feltételezéseket megerősítő tudományos bizonyítékból azonban nagyon kevés van, ellentétben azokkal a közleményekkel, amelyek a tej eredetű fertőzésekről számolnak be. A nyers tej és a belőle készített sajtok és más tejtermékek sokféle kórokozóval szennyeződhetnek, jelen lehet bennük többféle baktérium és a kullancsencephalitis vírusa (KEV) is.

Az Országos Epidemiológiai Központban (OEK) már az 1950-es évek óta foglalkoznak a kullancsencephalitis laboratóriumi diagnosztizálásával. Sok esetben arról is készült feljegyzés, ha a betegek a betegségük előtt nyers tejet fogyasztottak. Legtöbbször a tej eredetű fertőzések csak egy-egy családot érintenek, akik a fertőzött állat tejét fogyasztják, de időnként előfordulnak nagyobb járványok is, ha a fertőzött tej kereskedelmi/piaci forgalomba kerül. A legutóbbi nyers tej eredetű járvány 2007 augusztusában volt hazánkban. A tejfogyasztást követően 31-en betegedtek meg, 25 betegnél a kullancsencephalitis jellegzetes tünetei voltak megfigyelhetők: kétfázisú láz, a második fázisban idegrendszeri tünetekkel.

A betegminták vizsgálata az OEK-ben rutinfeladat, a zoonotikus betegségek kapcsán, járványügyi szempontok miatt azonban időnként olyan vizsgálatokra is szükség van, amelyek nem

tartoznak szorosan a humán diagnosztika profiljába, hanem a humán- és az állategészségügy határán helyezkednek el. Ilyenkor az OEK Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma állati minták elemzését is elvégzi. A 2007-es fertőzés forrásaként azonosított farm kecskéinek vérmintáit is megvizsgáltuk, és közben lehetőségünk nyílt az alkalmazott szerológiai módszerek pontosságát és specificitását összehasonlítani.

Mivel a kecskék KEV fertőzésének lefolyásáról és a KEV tejjel való ürüléséről viszonylag kevés kísérleti eredmény áll rendelkezésre, a munkánk második részében egy 20 kecskével végzett kísérletben arra kerestünk választ, mennyi ideig kimutatható a KEV a kecsketejből, hozzávetőleg milyen mennyiségben ürül, és milyen hatással van mindezekre, ha az állatot immunizáljuk a fertőzés előtt. Végül megvizsgáltuk, elengedhetetlenül szükséges-e a forralás ahhoz, hogy inaktiváljuk a tejben levő fertőző vírust.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták (liquor és/vagy vérsavó) 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

2.2. 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

2.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán vér- és liquorminták. Harmincegy beteg vérmintáját vizsgáltuk, akik korábban nyers kecsketejet ittak, és gyanítható volt, hogy KE vírussal fertőződtek. A mintákat a tünetek megjelenése utáni 1. és 25. nap között vették. Három beteg esetében liquor minta is rendelkezésre állt. Nyolc embertől, akik ittak a fertőzött tejből, de tünetmentesek voltak, szintén kaptunk vérmintát.

Kecske vérminták a lakhegyi farmról. A fertőzés forrásaként azonosított kecskefarm minden kecskéjétől (73 anya és 2 bak) kaptunk vérmintát. Az állatok 2-8 év közöttiek voltak.

Kecske vérminták és –tejminták az állatkísérletből. Az immunizált kecskéktől vért vettünk, hogy megállapíthassuk, kialakult-e bennük a védettség. A tíz KE vírussal fertőzött kecskét a fertőzést követően 9 napon át fejtük, majd a 13. és 23. napon újból.

Az indirekt immunfluoreszcencia során saját készítésű tárgylemezeket használtunk. A titráláshoz a kezdeti 1:5 hígítás után minden vérsavó mintából felező hígítási sort készítettünk, a lemezre cseppentve egy éjszakán át +4°C-on inkubáltuk, majd fluoreszcein-izotiocianátos ellenanyag-konjugátummal 30 percig festettük 37°C-on.

A hemagglutináció gátlást a Takátsy-módszer módosított változata szerint végeztük. Az aspecifikus inhibitorokat acetonnal vagy kaolinnal távolítottuk el a mintákból, az aspecifikus hemagglutinineket pedig liba vörösvértestekkel. A vérsavók teljes ellenanyag-tartalmát (IgM és IgG) liba vörösvértestek és saját készítésű KEV antigén segítségével titráltuk meg. IgM

meghatározáshoz a vérsavókat frakcionáltuk, és az IgM-ben gazdag frakciót 2-merkaptó-etanollal kezeltük.

Mikroneutralizáció (kecske vérminták). Vero sejteken 100 TCID₅₀ töménységű vírust inkubáltunk a vérsavóból készített hígítási sor minden fokozatával és 5 nappal később mikroszkóp alatt értékeltük a sejtkárosító hatást.

ELISA (kecske vérminták). A kecskevéreket az FSME ELISA IgG teszt kompetíciós gátlásra módosított változatával (az emberi vérsavó reaktivitásának gátlása kecske ellenanyagokkal) vizsgálták a lengyel Országos Közegészségügyi Intézetben.

Nukleinsav-tisztítás. A vírus RNS-t a szilikamembrán alapú QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki, a gyártó cég leírása szerint.

RT-PCR módszerek. A reverz transzkripcióhoz a GeneAmp RNA PCR kit reagenseit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) használtuk. A nested PCR-hez a vírus NS5 régiójára tervezett primereket és GeneAmp reagenseket használtunk, az egy lépéses mennyiségi RT-PCR-hez pedig a SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System kitet (Invitrogen, Carlsbad, USA). A PCR reakciók részletes leírását l. Balogh és mtsai (2011).

Tejminták hőkezelése. 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.

Statisztikai elemzés. A kecskék testhőmérsékleti adatait a Minitab® 15.1.1.0. szoftver (Minitab Inc., State College, Pennsylvania) segítségével elemeztük. Két szempontos ANOVA varianciaanalízist végeztünk, ahol $p < 0,05$.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Lakhegyi tej eredetű KEV járvány vizsgálata

A 39 emberi vérsavóból 25 esetben mutattuk ki, hogy anti-KEV ellenanyagokra – IgG-re és IgM-re is – pozitív, IIF módszerrel és a megerősítő HAG próbával is. Ennél a 25 betegnél igazoltuk az akut KEV fertőzést. Hat beteg vérsavója negatívnak bizonyult anti-KEV ellenanyagokra, így esetükben a KEV fertőzés kizárható volt.

A klinikai diagnózisok megerősítése mellett azonosítani akartuk azokat a kecskéket, amelyek korábban vagy frissen fertőződtek KE vírussal, és így üríthették azt a tejjükkel. Vérmintát vettünk a farm 75 kecskéjétől, és megvizsgáltuk őket különböző szerológiai módszerekkel: indirekt immunfluoreszcenciával (IIF), hemagglutináció gátlással (HAG), mikroneutralizációval (NT) és ELISA-val. A négy módszer eltérő specificitásának bizonyult. A legkevésbé az IIF volt specifikus. A másik három módszer eredményeinek összehasonlításával megállapítottuk, hogy két savó volt pozitív anti-KEV IgG-re és egy anti-KEV IgM-re (1. táblázat).

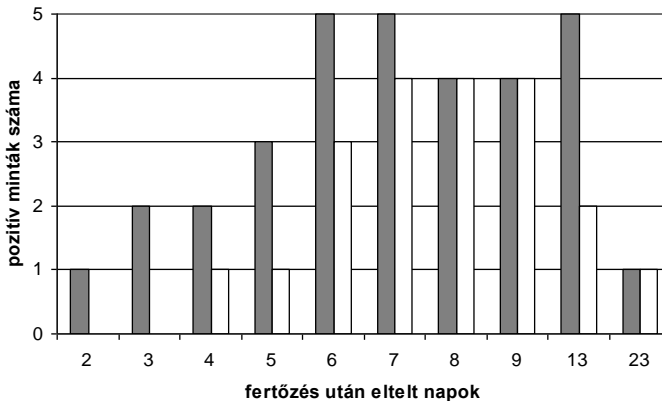
1. táblázat. A két pozitívnak értékelt kecske vérsavó szerológiai eredményei a különböző módszerekkel.

IIF titer	HAG össztiter	IgM kimutatás	NT titer	ELISA gátlás %
±1:160	±1:640	pozitív	±1:40	62
±1:320	±1:160	negatív	±1:160	72

4.2. Kecskék kísérleti fertőzése

Tíz kecskét (melynek felét előzőleg immunizáltuk) megfertőztünk KE vírussal, tízet pedig kontrollként megfigyeltünk (ezek közül 5 immunizált és 5 naiv). Az állatok állapotát és testhőmérsékletét feljegyeztük, és naponta fejtük őket. A virális RNS-t RT-PCR-rel, a fertőző vírusrészecskéket szopós egerek intracerebrális oltásával mutattuk ki a tejből.

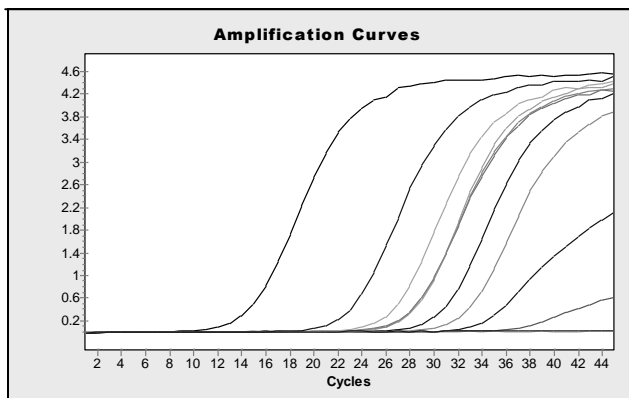
A kísérlet során a fertőzött állatoknál nem tapasztaltunk tüneteket és a statisztikai elemzés szerint a testhőmérsékletük sem tért el a kontrollokétól. A fertőző virionokat 8-19 napig tudtuk kimutatni a fertőzött kecskék tejmintáiból, a vírusgenomot PCR-rel 3-18 napig (1. ábra). Az immunizált kecskék nem ürítették a vírust.



1. 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.

4.3. A tejminták vírustartalmának összehasonlítása

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 6. napon gyűjtött minták vírustartalma egyedenként nagyon különböző volt, a 7. napon a koncentrációk kevésbé szórtak. A legmagasabb koncentrációt a 76967-es számú kecske 6. napi mintájában mértük (2. ábra), amelynek vírustartalma nagyságrendileg a standardként használt fertőzött szopós egér agyszuszpenzió 1:10-es hígításának felelt meg. A hőkezelési kísérletben ennek az állatnak a tejét használtuk nagy mennyiségű vírust tartalmazó mintaként.



2. ábra. A fertőzést követő 6. és 7. napról származó tejminták amplifikációs görbéi. A legkorábban megjelenő fluoreszcens jel a 76967-es sz. kecske 6. napi mintája.

4.4. Hőkezelés hatásának vizsgálata

A hőkezelés hatását két kecske tejmintáin vizsgáltuk, melyek közül az egyiknek a teje nagy mennyiségű vírust tartalmazott, a má-

siké kevesebbet. A háztartásokban bevett gyakorlat modellezésére három hőmérsékletet választottunk: a szobahőmérsékletű inkubációt, a 65°C-ot, hogy szimuláljuk a melegített, de nem felforralt tej hőkezelését, és a 100°C-ot mint forralási hőmérsékletet.

A szobahőmérsékletű inkubáció egyik tej pool esetében sem előzte meg a velük beoltott szopós egerek halálos fertőződését, bár hosszabb inkubációs időt követően a tünetek valamivel később jelentkeztek. A nagyobb mennyiségű vírust a 65°C-on való melegítés sem inaktiválta még fél óra inkubáció után sem, a tej forralása azonban mindkét tej pool esetében hatásos volt, egy egérnél sem tapasztaltunk a fertőzésre utaló tüneteket a kísérlet végéig.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Lakhegyi járvány felderítése: humán és kecske minták (liquor és/vagy vérsavó) vizsgálata

- A kecskék tejjével 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, de a tejük a többi kecskééhez keverve is elég volt a fertőzéshez.
- A rutindiagnosztikai módszerek közül a kecske vérmintákat 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 kecske vérmintákkal, ezért célszerű megerősítő vizsgálatokhoz alkalmazni kérdéses eredmények esetén.

- A KEV endémiás területein további tájékoztatásra van szükség, mely a kullancscsípés kockázata mellett kitér a nyers tej fogyasztásának veszélyeire is.

5.2. Kecskék KEV fertőzésének vizsgálata

- Kísérletileg KE vírussal fertőzött kecskék és 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 vírusrészecskék között nagy egyedi eltérések lehetnek.
- A tejjel való vírusürítés hatékonyan megelőzhető a kecskék immunizálásával, akár a humán oltóanyaggal is.

5.3. A fertőző kecsketej hőkezelési lehetőségeinek vizsgálata

- A KEV tartalmú 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 inaktíválja biztonságosan a tejben levő KE vírust, ha az nagy töménységű.
- A kecsketejben levő KEV inaktíválásához elegendő 3 perc forralás.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Balogh Z**, Ferenczi E, Széles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, Takács M, Berencsi G: Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary

due to consumption of raw goat milk. *J Virol Met.* 2010;163:481-485.

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

Egyéb közlemények:

1. Szomor KN, Rigó Z, Bán E, Nagy L, Szalkai T, **Balogh Z**, Ferenczi E, Takács M: Serologic evidence of West Nile virus infection in patients with exanthema in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2011;58:157-167.

2. Takács M, Balog K, Tóth G, **Balogh Z**, Szomor KN, Brojnás J, Rusvai E, Minárovits J, Berencsi G: TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003;35:153-157.

Könyvfejezet:

1. Balogh Zs.: Tenyésztés állatokban. (in: Tenyésztésen alapuló módszerek, Klinikai és Járványügyi Virologia. Főszerkesztő: Takács Mária.) Melánia Kiadó Kft., Budapest, 2011.

2. Balogh Zs., Rózsa M: Immunfluoreszcencián alapuló módszerek. (in: Klinikai és Járványügyi Virologia. Főszerkesztő: Takács Mária.) Melánia Kiadó Kft., Budapest, 2011.

3. Balogh Zs., Bán E.: Filoviridae. (in: Klinikai és Járványügyi Virologia. Főszerkesztő: Takács Mária.) Melánia Kiadó Kft., Budapest, 2011.

Konferencia előadások, posztterek:

Külföldi előadások, posztterek

1. **Balogh Z**: Infection through goat milk in Hungary. 12th ISW-TBE Annual meeting, 2010, Bécs, Ausztria, meghívott előadó.
2. **Balogh Z**, Ferenczi E, Egyed L, Szomor KN, Takács M, Berencsi G: Tick-borne encephalitis caused by unpasteurized milk in Hungary. EDEN Annual Meeting 2010, Montpellier, Franciaország.
3. Ferenczi E, Széles K, **Balogh Z**, Gut W: Tick-borne encephalitis outbreaks through raw milk consumption in Hungary. MedVetNet Annual Meeting, 2008, Saint Malo, Franciaország.
4. **Balogh Z**, Széles K, Ferenczi E: Alimentary TBEV outbreaks in Hungary. EDEN Annual Meeting 2008, Brno, Csehország.

Hazai előadások, posztterek

1. Ferenczi E, Széles K, **Balogh Z**, Gut W: Tick-borne encephalitis outbreaks through raw milk consumption in Hungary. International Congress of Veterinary Virology 2009, Budapest.
2. **Balogh Z**, Ferenczi E, Széles K, Gut W, Berencsi G: Nyers tej fogyasztásával terjedő kullancsencephalitis járványok Magyarországon. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése 2008, Keszthely.
3. **Balogh Z**: Rövid áttekintés a Magyarországon felbukkanó, új fertőző kórokról. A Chiron cég és a Magyar Hemofília Egyesület szimpóziuma, 2008, Szeged, meghívott előadó.
4. **Balogh Z**, Takács M: A TT vírus előfordulása a magyar lakosság körében. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Jubileumi Nagygyűlése 2001, Balatonfüred.